

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin



Fakulta lesnická
a dřevařská

**Genetická analýza přeživších jedinců
smrku ztepilého po kůrovcovém ataku**

Diplomová práce

Autor: Bc. Jan Procházka

Vedoucí práce: Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Jan Procházka

Lesní inženýrství

Lesní inženýrství

Název práce

Genetická analýza přeživších jedinců smrku ztepilého po kůrovcovém ataku

Název anglicky

Genetic analysis of Norway Spruce individuals survived bark beetle attack

Cíle práce

Cílem práce je analyzovat genetickou strukturu jedinců smrku ztepilého přežívajících na zájmové lokalitě po kůrovcovém ataku.

Porovnání genetické struktury přeživších jedinců a jedinců pocházejících z lokální referenční populace umožní vyvodit závěry o charakteru genetické struktury studovaných skupin stromů.

Metodika

Rešeršní část práce bude obsahovat kapitoly popisující druh smrk ztepilý, genetiku druhu a jeho stanovištní nároky a také prognózy vývoje jeho zastoupení v důsledku klimatických změn. Dále budou rozebrána témata týkající se odolnosti jedinců či adaptovaných populací vůči různým negativním vlivům.

Pro výzkumnou část práce bude nejprve ze vzorků rostlinného materiálu zájmových stromů izolována DNA, minimální počet analyzovaných jedinců je 40 přeživších stromů (tzv. last standing trees) a 40 jedinců referenční lokální populace, celkem tedy 80 stromů.

Na těchto vzorcích bude provedena amplifikace mikrosatelitových DNA úseků s využitím existující metody SSRs PCR multiplex (Bínová et al. 2020).

Generovaná data budou analyzována s využitím softwarových molekulárně-genetických nástrojů (Genalex a vhodné utility na bázi programovacího jazyka R).

Budou interpretovány poznaky o zjištěné genetické struktuře obou populací a pro další posouzení míry genetické odlišnosti budou generovaná data také konfrontována s již existujícími mikrosatelitovými daty dalších populací smrku v České republice. Důraz bude kladen především na posouzení parametru heterozygotnosti studovaných skupin stromů.

Harmonogram práce: Do konce prosince 2020 bude vypracována literární rešerše a detailně zpracována metodika diplomové práce. Mikrosatelitová data pro cílovou i referenční populaci budou v laboratoři generována do konce února 2021.



Doporučený rozsah práce

55 stran + mapový podklad s lokalizací přeživších stromů

Klíčová slova

kůrovec, last standing trees, mikrosatelitové markery

Doporučené zdroje informací

- Bínová, Z., Korecký, J., Dvořák, J., Bílý, J., Zádrapová, D., Jansa, V., & Lstibůrek, M. (2020). Genetic Structure of Norway Spruce Ecotypes Studied by SSR Markers. *Forests*, 11(1), 110.
- Edwards, M. C., & Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *Genome Res*, 3(4), S65-S75.
- Jarne, P., & Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol*, 11(10), 424-429.
- Jombart, T. (2008). ADEGENET: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405.
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes*, 6(1), 288-295.
- Pfeiffer, A., Olivieri, A. M., & Morgante, M. (1997). Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 40(4), 411-419.
- White, T. L., Adams, W. T., & Neale, D. B. (2007). *Forest Genetics*. CABI, Wallingford.

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FLD

Vedoucí práce

Ing. Jiří Korecký, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra genetiky a fyziologie lesních dřevin

Elektronicky schváleno dne 25. 10. 2020

prof. Ing. Milan Lstibůrek, MSc., Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 25. 10. 2020

prof. Ing. Róbert Marušák, PhD.

Děkan

V Praze dne 02. 04. 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Genetická analýza přeživších jedinců smrku ztepilého po kůrovcovém ataku vypracoval samostatně pod vedením Ing. Jiřího Koreckého, Ph.D. a použil jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů. Jsem si vědom, že zveřejněním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Ve Vodňanech dne 20.4.2021

Podpis autora

Touto cestou bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce panu Ing. Jiřímu Koreckému, Ph.D. za trpělivost, věnovaný čas a cenné připomínky, bez kterých by tato práce nevznikla. Také musím poděkovat Ing. Zuzaně Faltinové za pomoc a rady při zpracování vzorků během praktické části. Zároveň velké díky patří mé rodině, která mě finančně podporovala během celého studia.

Abstrakt

Předložená závěrečná práce s genetickým zaměřením na smrk ztepilý sleduje dvě Šumavské populace z hlediska odolnosti. Cílem bylo pomocí vybraných mikrosatelitových lokusů analyzovat genetickou strukturu jedinců přeživších v oblastech intenzivního kůrovcového ataku (tzv. last standing trees) a porovnat ji s referenční populací tvořenou jedinci, kteří nebyli vystaveni tlaku kůrovce. Byla posuzována míra genetické diference mezi těmito populacemi. Pomocí SSRs markerů a multiplex PCR bylo možné analyzovat celkem 96 vzorků, z toho 48 pro každou populaci. Rešeršní část popisuje ekologii smrku, škodlivé vlivy a základní přehled o genetice druhu. Vyhodnocení dat probíhalo v programech GenAIEx a adegenet jako doplněk do softwaru R. Výsledky obsahují data o polymorfismu, F-statistice a celkové variabilitě obou populací. V závěru práce jsou výsledky diskutovány a popsána doporučení pro budoucí výzkumy.

Klíčová slova: kůrovec, last standing trees, mikrosatelitové markery

Abstract

The presented final work with a Genetic focus on Norway spruce monitors two Sumava populations in terms of resistance. The aim was to use selected microsatellite loci to analyze the genetic structure of survivors in areas of intense bark beetle attack (so-called last standing trees) and compare it with a reference population of individuals who were not exposed to bark beetle pressure. The degree of genetic differentiation between these populations was assessed. Using SSRs markers and multiplex PCR, a total of 96 samples could be analyzed, of which 48 for each population. The research part describes the ecology of spruce, harmful influences and a basic overview of the genetics of the species. Data evaluation took place in GenAIEx and adegenet programs as a supplement to the R software. The results include data on polymorphism, F-statistics and overall variability of both populations. At the end of the work, the results are discussed and recommendations for future genetic studies.

Keywords: bark beetle, last standing trees, microsatellite markers

Obsah

1	Úvod.....	14
2	Cíle práce	15
3	Literární přehled	16
3.1	Obecná charakteristika smrku ztepilého (<i>Picea abies</i> L. Karst) .	16
3.2	Popis	16
3.3	Současný stav	17
3.4	Ekologické nároky	19
3.5	Areál a rozšíření	19
3.6	Negativní vlivy na smrk ztepilý	20
3.6.1	Srážky a teplota.....	20
3.6.2	Uhlík	21
3.6.3	Lýkožrout smrkový.....	22
3.6.4	Zvěř jako limitující faktor obnovy lesa.....	23
3.6.5	Vítr	24
3.6.6	Sníh a námraza.....	24
3.7	Budoucí vývoj	24
3.8	Odolnost populací a jedinců	26
3.9	Úvod do principů genetiky	27
3.10	Genetická variabilita.....	28
3.11	Genom	29
3.12	Genetické markery	29
3.13	Mikrosatelity	30
3.14	Primery	32
4	Metodika	33
4.1	Sběr vzorků.....	33

4.2	Příprava vzorků	36
4.3	Izolace DNA	37
4.4	Měření DNA	39
4.5	Ředění DNA	40
4.6	Elektroforéza	40
4.7	Polymerázová řetězová reakce	41
4.7.1	Volba primerů	42
4.8	Vyhodnocování dat	44
4.8.1	GeneMarker	44
4.8.2	GenAIEx	45
4.9	Softwarový nástroj R	45
5	Výsledky	47
6	Diskuze	58
7	Závěr	61
8	Použitá literatura	62

Seznam obrázků

Obrázek 1: Areál smrku ztepilého; zelená přirozený výskyt; žlutá = introdukovaný	20
Obrázek 2: Mapový zakres lokalit Modravy a Smrčiny; zdroj Google Maps; zpracování vlastní.....	34
Obrázek 3: Mapový zakres Modravy: populace LS (oranžová) a R (modrá); mapový podklad: Google Maps; zpracování vlastní.....	35
Obrázek 4: Mapový výstup ze Smrčiny: populace S; mapový podkla Google Maps; zpracování vlastní.....	35
Obrázek 5: Ideální křivka NanoDrop	39
Obrázek 6: Vyhodnocování dat v programu GeneMarker	45
Obrázek 7: Výsledek elektroforézy	47
Obrázek 8: Klastrovací analýza metodou Discriminant analysis of principle components	56
Obrázek 9: Dendrogram metodou UPGMA s využitím Neiovy genetické vzdálenosti.....	57

Seznam tabulek

Tabulka 1: Taxonomické zařazení smrku ztepilého	18
Tabulka 2: Program pro PCR	41
Tabulka 3: Vybrané primery	42
Tabulka 4: Objemů pro Multiplexy	43
Tabulka 5: Počty nehodnocených vzorků.....	48
Tabulka 6: Průměrné statistické ukazatele mezi lokusy I.	50
Tabulka 7: Průměrné statistické ukazatele mezi lokusy II.	51
Tabulka 8: Statistické srovnání populací.....	52

Seznam grafů

Graf 1: Efekt průměrné teploty na růst (Albert a Schmidt, 2010).....	21
Graf 2: Vliv CO ₂ na růst (Huang et al.,2019)	22
Graf 3: Pravděpodobnost přežití s věkem (Neuner et al., 2015)	25

Graf 4: Alelová frekvence lokusu PAAC3	48
Graf 5: Polymorfismus	49
Graf 6: Alelové schéma populací	49
Graf 7: Statistické srovnání populací	52
Graf 8: AMOVA.....	54
Graf 9: Analýza hlavních koordinát pro jedince	55

Seznam příloh

Příloha 1: Frekvence lokusu WS00716.F13 pro LTS	74
Příloha 2: Frekvence lokusu Pt71936 pro LTS	75
Příloha 3: Frekvence lokusu EATC1D02A pro LTS	75
Příloha 4: Frekvence lokusu paGB3 pro LTS	75
Příloha 5: Frekvence lokusu PA 33 pro LTS.....	76
Příloha 6: Frekvence lokusu WS0019.F22 pro LTS	76
Příloha 7: Frekvence lokusu PA 28 pro LTS.....	76
Příloha 8: Frekvence lokusu WS0073.H08 pro LTS.....	76
Příloha 9: Frekvence lokusu PAAC23 pro LTS	77
Příloha 10: Frekvence lokusu WS0023.B03 pro LTS	77
Příloha 11: Frekvence lokusu WS0092.A19 pro LTS.....	77
Příloha 12: Frekvence lokusu PA_56 pro LTS.....	78
Příloha 13: Frekvence lokusu PAAC3 pro LTS	78
Příloha 14: Frekvence lokusu Pt63718 pro S	79
Příloha 15: Frekvence lokusu EATC1E03 pro S.....	79
Příloha 16: Frekvence lokusu WS00716.F13 pro S	79
Příloha 17: Frekvence lokusu Pt71936 pro S	80
Příloha 18: Frekvence lokusu EATC1D02A pro S	80
Příloha 19: Frekvence lokusu WS0019.F2 pro S	81
Příloha 20: Frekvence lokusu PA 28 pro S	82
Příloha 21: Frekvence lokusu WS0073.H08 pro S.....	82
Příloha 22: Frekvence lokusu PAAC23 pro S.....	82
Příloha 23: Frekvence lokusu WS0023.B03 pro S	83
Příloha 24: Frekvence lokusu WS0092.A19 pro S.....	83

Příloha 25: Frekvence lokusu Pa_56 pro S.....	83
Příloha 26: Frekvence lokusu PAAC3 pro S.....	84
Příloha 27: Frekvence lokusu Pt63718 pro Ref.....	85
Příloha 28: Frekvence lokusu EATC1E03 pro Ref.....	85
Příloha 29: Frekvence lokusu WS00716.F13 pro Ref.....	85
Příloha 30: Frekvence lokusu Pt71936 pro Ref.....	86
Příloha 31: Frekvence lokusu EATC1D02A pro Ref.....	86
Příloha 32: Frekvence lokusu paGB3 pro Ref.....	86
Příloha 33: Frekvence lokusu PA 33 pro Ref.....	87
Příloha 34: Frekvence lokusu WS0019.F22 pro Ref.....	87
Příloha 35: Frekvence lokusu PA 28 pro Ref.....	88
Příloha 36: Frekvence lokusu WS0073.H08 pro Ref.....	88
Příloha 37: Frekvence lokusu PAA23 pro Ref.....	88
Příloha 38: Frekvence lokusu PAAC3 pro Ref.....	90
Příloha 39: Alelová frekvence pro všechny lokusy.....	91
Příloha 40: Tabulka s objemy DNA.....	92
Příloha 41: Tabulka s objemy ultračisté vody.....	92
Příloha 42: Výsledky NanoDropu.....	95
Příloha 43: Klastrovací dendrogram.....	96
Příloha 44: Přeznačené vzorky pro mapové výstupy a klastrovací analýzy	97

1 Úvod

Smrku ztepilému bylo v posledních pěti letech věnováno přes 20.000 vědeckých článků dohledatelných přes webové stránky Google Scholar a přes 2.600 vědeckých studií podle databáze Web of Science. Plyne z toho skutečnost, jakým významným druhem smrk ztepilý je, a to nejen v České republice. Současným problémem posledních let je sucho a s tím zvýšená aktivita kůrovců, která postupně přerostla v kůrovcovou kalamitu. Potvrzují to i údaje ze Zprávy o stavu lesa za rok 2019. V letech 2009-2019 došlo k navýšení nahodilé hmyzové těžby téměř devítinásobně (MZE, 2019).

Vzhledem k významnosti smrku ztepilého, jako domácí dřeviny a nejpodstatnější hospodářské dřeviny, je důležité nezapomínat na již známá fakta o ekologických nárocích. Právě dodržování těchto ekologických požadavků může snížit budoucí ztráty na produkci a zisku. Hanewinkel et al., (2010) na základě sestaveného modelu predikuje postupné vytrácení smrku z porostů a v roce 2100 zmizí smrk z lesní plochy o více než 20 % jen v důsledku globálního oteplování. Pěstováním smíšených lesů je možné takové dopady snížit (Hilmers et al., 2019).

Vědecké výstupy věnované smrku ztepilému, které se zabývají genetikou druhu, majoritně využívají molekulární markery. V tomto konkrétním případě to jsou Simple sequence repeats, SSRs - mikrosatelity, jsou neutrální a kodominantní. S největší pravděpodobností jsou přenášeny na další generace podle medelovských pravidel (Selkoe a Toonen, 2006). S využitím mikrosatelitových markerů je možné sledovat míru polymorfismu či příbuznosti, a to nejen mezi jedinci, ale i mezi celými populacemi.

2 Cíle práce

Primárním cílem této diplomové práce je detekce genetické variability tří populací smrku ztepilého. Dvě populace přeživších jedinců se nacházely na lokalitách po kůrovcovém ataku. První populace nese označení LS z Modravy a druhá S ze Smrčiny. Referenční populace, která byla na stejné lokalitě Modravy, je novou generací po rodičích, kteří nepřežili kůrovcový atak a obsahuje jedince i z populace LS. Celkový soubor bude obsahovat 96 vzorků, konkrétně 30 vzorků z populace LS, 18 vzorků z populace S a 48 z referenční z populace.

Pro zjištění genetické diference budou použity metody izolace DNA, SSRs PCR multiplex podle Bínova et al., (2020) s následným vyhodnocením ve vhodných softwarech jako jsou GeneMarker a GenAIEx. Hlavním parametrem bude posouzení heterozygotnosti v rámci populací. Tato práce si klade za cíl porovnat výsledky ze zkoumaných lokalit s výsledky jiných autorů, kteří se zabývají zkoumáním smrku za pomoci mikrosatelitových markerů a to nejen na území České republiky.

3 Literární přehled

3.1 Obecná charakteristika smrku ztepilého (*Picea abies* L. Karst)

Jedná se o nejvýznamnější dřevinu lesního hospodářství nejen v České republice, ale i v celé Evropě. Původní rozšíření smrku je ve vysokých polohách Evropy s dosahem až do Asie. Dnes je taxon rozšířen po celé severní polokouli a díky lesnickému hospodaření se vyskytuje i v nižších polohách na nepůvodních stanovištích. Na těchto stanovištích je pěstován i v monokulturách. V České republice se areál rozšíření nachází od nížin po vysoké hory (Krása, 2007).

3.2 Popis

Smrk je stálezelená jehličnatá dřevina, která dosahuje výšky 30-50 m. Jehlice jsou tmavě zelené, lesklé a špičaté. Jehlice vyrůstají do všech stran a na svrchní straně rostou ve dvou řadách. Jedinci, kteří jsou zapojeni v porostu, s věkem postupně ztrácejí větve. Soliterní jedinci jsou většinou zavětveni až k zemi (Úradníček, 2009). Nožička (1972) popisuje přirozený výskyt hlavně v podhorských a horských oblastech. Ze stanovištních a fytoecologických hledisek vyplývá i přirozený výskyt smrku v nižších polohách, ale na stanovištích s vyšší půdní vlhkostí, která nahrazovala aridní klima nižších poloh (Plíva, 2000).

K prvnímu kvetení dochází v 60. letech a semenné roky se opakují ve čtyř až pětiletých periodách (Trnka, 2008). Smrk jako nahosemenná dřevina je opylován větrem. Pyl je nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje genetickou strukturu, přesto v podstatě nedochází k samoopylení (Burczyk, Lewandowski a Chalupka, 2004). Hájková et al., (2012), popisuje stále častější výskyt předčasného kvetení. Poleno a Vacek (2011) líčí smrk jako dřevinu, která má vysokou schopnost adaptačních procesů v krátkém časovém úseku.

Smrkové dříví se široce uplatňuje v řadě odvětví, například stavebnictví, nábytkářství. Rezonanční dřevo je velmi cenné a je využíváno pro výrobu hudebních nástrojů. Nejen dřevo, ale i pryskyřice ze smrku se hojně používala při výrobě bednářské smůly, kalafuny a terpentýnu (Krása, 2007).

3.3 Současný stav

Lesní ekosystémy podle Petit et al., (2005) jsou tvořeny dřevinami, které můžeme považovat za divoké druhy rostlin. Tyto ekosystémy jsou neustále vystavovány stresujícím faktorům ať biotickým, tak abiotickým. V posledních letech jdou tyto dva faktory ruku v ruce. Dochází k rekordním těžbám. V roce 2019 dosáhla celková těžba 32,6 mil. m³ (MZE, 2019). Celkově lze hodnotit situaci v českých lesích jako katastrofální. V České republice je mnoho míst, která se již vymkla kontrole. Od roku 2013 dochází ke skokovému nárůstu kalamitních těžeb. Dosud je rok 2019 brán jako nejhorší na objem těžby. Srážky sice nebyly tak podprůměrné jako v letech 2015 a 2018, ale z důvodu nedostatku pracovních sil, nízké ceny dřeva a problémy se zadáváním státních zakázek, zůstalo na konci roku 2019 v porostech další cca. 5 – 10 mil. m³ (Šrámek, 2020).

Kůrovcové i větrné disturbance popisují Janda et al., (2019), které se opakují v krátkých intervalech v řádu let nebo desítek let, způsobují úmrtnost na malých plochách, většinou do 1 ha. Může ovšem dojít i k rozsáhlejším poškozením. Dlouhodobé sucho podporuje množení kůrovce, ale i houbové patogeny. Oslabené stromy mají minimální možnost obrany. Nejvýznamnější je václavka smrková (*Armillaria ostoyae*) (Lorenc, 2019). Parazituje na živých stromech a rozkládá i mrtvé dřevo. Celkový objem vytěženého dříví činil téměř 210 tis. m³. Plošně bylo vykázáno 5,6 tis. ha smrkových porostů, které byly napadeny v roce 2019, to je o 40 tis. m³ méně než v roce 2018. Tento trend pokračuje již třetí rok v řadě. Logicky by se dalo soudit o ústupu václavky, ale příčinou je ústup smrků z pahorkatin, tradičních oblastí tohoto patogenu (MZE, 2019).

Modlinger a Pešková (2017) popisují jako další patogen kloubnatku smrkovou (*Gemmamyces piceae*). Ta primárně napadá smrk pichlavý (*Picea pungens*) a v posledních letech se vyskytuje i na smrku ztepilém, zejména v Krušných horách. Patogen napadá pupeny, které buď odumírají nebo při pokusu o vyrašení dochází k charakteristickému „vykloubení“. Takto napadené stromy umírají většinou v rozmezí 2 – 3 let. Podle statistik (MZE, 2019) v posledních letech dále pokračuje trend snižování plochy jehličnatých lesů. U smrku došlo v letech 2000–2019 k procentuálnímu snížení o 4,5 % tj. 104 550 ha. Na druhé straně dochází k procentuálnímu zvýšení u listnatých dřevin, zejména ve prospěch buku a dubu. Pozitivně se dá hodnotit nárůst smíšených lesů v rámci jednotných prostorových jednotek lesa. Přírozená druhová skladba byla sestavena tak, jak by vypadaly lesní ekosystémy, které by se v dnešních podmínkách vyvinuly bez zásahu člověka. Proto by mělo být cílem přírozené skladby dosáhnout.

Tabulka 1: Taxonomické zařazení smrku ztepilého

Systematické zařazení		
	česky	latinsky
Říše	rostliny	<i>Plantae</i>
Podříše	cévnaté rostliny	<i>Tracheobionta</i>
Oddělení	nahosemenné	<i>Pinophyta</i>
Třída	jehličnany	<i>Pinopsida</i>
Řád	borovicotvaré	<i>Pinales</i>
Čeleď	borovicovité	<i>Pinaceae</i>
Rod	smrk	<i>Picea</i>
Druh	Smrk ztepilý	<i>Picea abies</i>

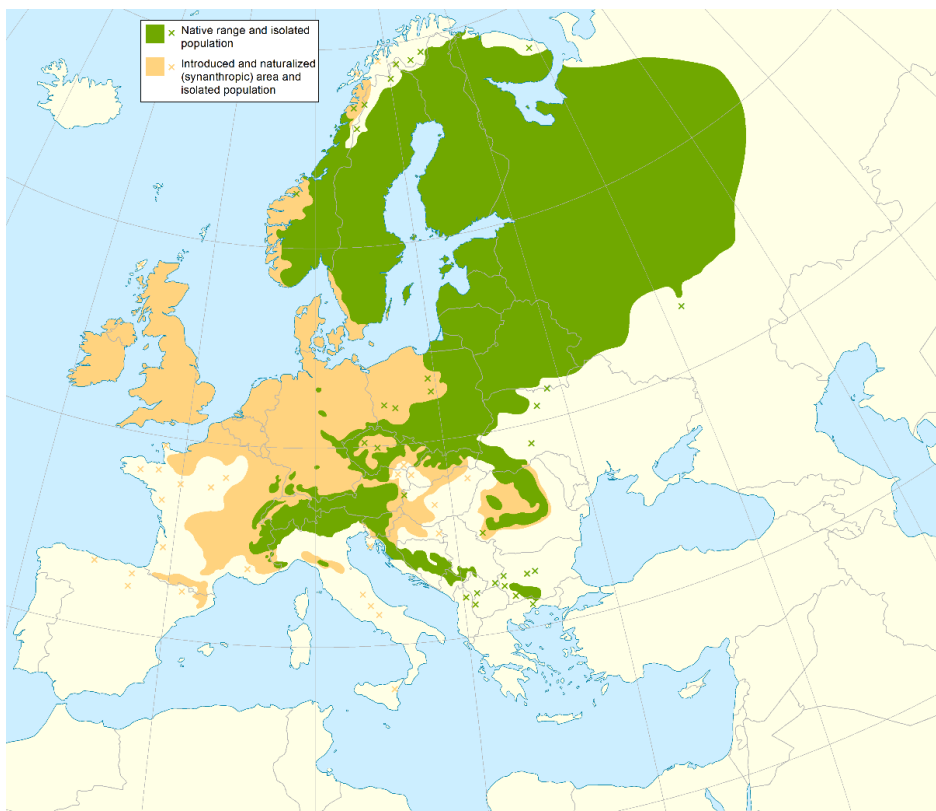
3.4 Ekologické nároky

Smrk ztepilý roste na vzdušných, vlhkých, neutrálních až kyselých půdách. Stanoviště snáší v polostínu až po plně osluněné. Dává přednost lokalitám s nižší teplotou, s vyššími srážkami a vyšší vzdušnou vlhkostí. Nevyhovují mu dlouhá období sucha a vysokých teplot, v nižších polohách je pak náchylnější k napadení škůdci. Povrchový kořenový systém je značně náročný na půdní vlhkost. Snese i stagnující vodu rašelinišť a bažin. Nedostatek vláhy může zpomalit růst. Vzhledem k povrchovému kořenovému systému je náchylný na poškození větrem, ale poškozován je i námrazou a sněhem. Smrk je také choulostivý vůči znečištěnému ovzduší a imisím. V České republice chybí na místech teplých úvalů kolem velkých řek, jinak je jeho výskyt hojný (Kunt, 2007).

3.5 Areál a rozšíření

Rozšíření dřeviny je rozsáhlé, protože smrk ztepilý patří mezi dřeviny s euroasijským areálem. Z toho důvodu je lepší areál rozdělit do dvou oblastí. První oblastí je středoevropsko–balkánská, která se pak dělí do dalších 4 podoblastí. V této oblasti převažují jednotlivá pohoří jako jsou Alpy nebo Karpaty.

Druhou oblastí je severoevropská neboli Skandinávsko – Ruská. Skandinávsko - Ruská oblast má větší rozlohu a vyznačuje se především nižší nadmořskou výškou a souvislejším výskytem smrkových porostů. Převažují zde nížinné roviny s pahorkatinou. Na východní straně je tato oblast ukončena ve středním Povolží (Musil, Hamerník a Leugnerová, 2002).



Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Picea_abies_range.svg#/media/File:Picea_abies_range.svg

Obrázek 1: Areál smrku ztepilého; zelená přirozený výskyt; žlutá = introdukovaný

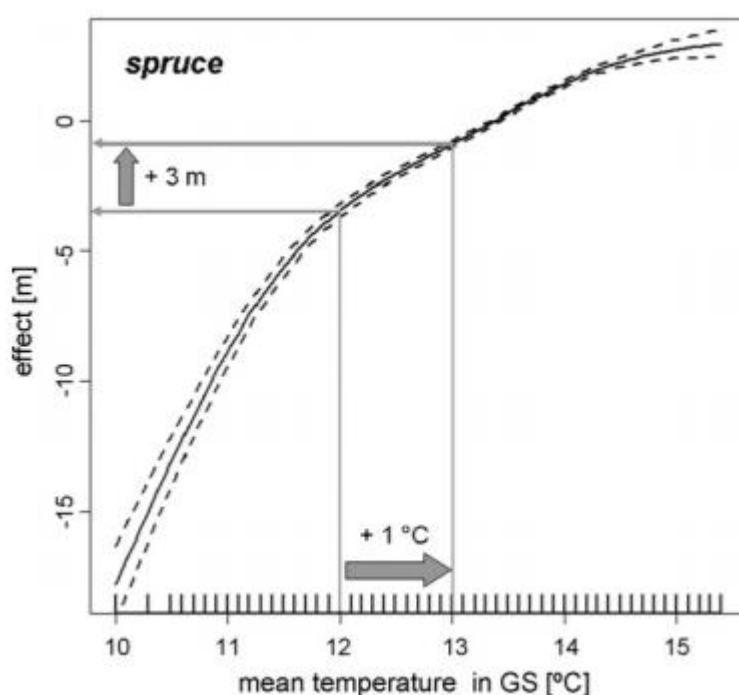
Autoři Svoboda (1953), Křísek a Žárník (2007) popisují, že určit přesný výškový rozsah smrku je přinejmenším problematické. Již od výšky 800 m. n. m. se pomalu přestává vyskytovat jedle bělokora (*Abies alba*) a buk lesní (*Fagus sylvatica*). Tím získává adaptační výhodu smrk a ve výškách nad 1100 m. n. m. se stává dominantním a od výšek 1250 až 1300 se vyskytují přirozeně monokulturální smrčiny. V současné době tyto horské smrčiny zabírají 0,8 %, tj. cca. 21 % lesní půdy v České republice.

3.6 Negativní vlivy na smrk ztepilý

3.6.1 Srážky a teplota

Hlavními limitními faktory pro růst dřevin v horských oblastech je teplota a srážky jako hlavní faktor v oblastech nížin (Larcher, 1988). Dostatek srážek podporuje růst kořenů i kmene. Především jarní srážky mají pozitivní vliv na mykorhízu, která podporuje celkový růst kořenů. Naopak sucha v jarním období může bránit kořenovému růstu. Z toho vyplývá, že růst kořenů je úzce spojen se

srážkami, především v měsíci dubnu a poté v období června – srpna (Čermák, 2007; Svoboda, 1953; Úradníček, 2009). Dá se předpokládat, že se snižováním srážek dojde k navýšení teploty, a proto dojde k poklesu produkce smrku. Z modelu na grafu č. 1 můžeme předpokládat nižší produkci smrku, která predikuje nutnost úpravy dřevinné skladby. Negativní dopad na vitalitu lesa bude v budoucnu stoupat. Další stresové faktory jako vítr, sucho a biotičtí škůdci budou intenzivněji ovlivňovat lesní ekosystémy. Konkrétní predikce vývoje smrkových lesů není možná, protože nikdo neví, co se bude přesně odehrávat. (Albert a Schmidt, 2010).

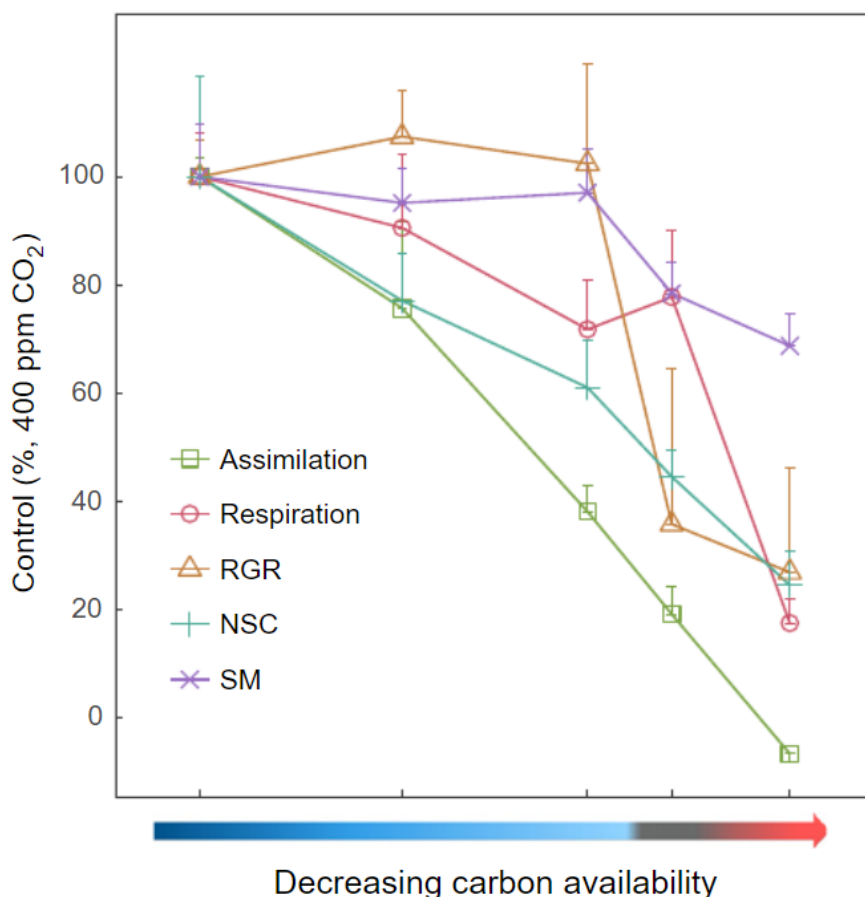


Graf 1: Efekt průměrné teploty na růst (Albert a Schmidt, 2010)

3.6.2 Uhlík

Nejen srážky a teplota jsou limitním faktorem pro růst a existenci smrku, ale i obsah uhlíku (C). Uhlík je důležitý v metabolismu rostlin v náležité spojitosti s vodíkem, kyslíkem a rovněž s dalšími elementy. Proto je sledování uhlíku zásadní při adaptaci na enviromentální změnu (Atkin, 2015). Reakce smrku na snižování objemu CO₂ je vyobrazena na grafu č. 2. Vyplyývá z toho, že při snižování klesala plocha asimilace (Assimilation), dýchání (Respiration), produkce sekundárních metabolitů (SM), nestrukturálních sacharidů (NSC) i relativní hodnota růstu (RGR).

Z těchto výsledků lze dospět k závěru, že smrk ztepilý má konzervativní alokační strategii, při které umí regulovat růst a dýchání. Zachovává přitom základní koncentraci NSC pro další produkci (Huang et al., 2019)



Graf 2: Vliv CO₂ na růst (Huang et al., 2019)

3.6.3 Lýkožrout smrkový

Dalším značným negativním biotickým činitelem jsou kůrovci, konkrétně lýkožrout smrkový (*Ips typographus*), lýkožrout severský (*Ips duplicatus*) a lýkožrout lesklý (*Pityogenes chalcographus*). Rozsah poškození smrkových porostů lýkožroutem byl v posledních letech obrovský. Velké množství veřejných finančních prostředků bylo investováno do asanace (Hlásny et al., 2021). Struktura kůry je klíčová pro napadení stromu lýkožroutem. Při sekundárním radiálním růstu dochází k zesilování peridermu. Takovým růstem se zvyšuje tloušťka a hustota pryskyřných kanálek. Důsledkem sekundárního radiálního růstu došlo k poklesu pokusů o navrtání floému, ale zvýšil se počet ataků do míst, která jsou bráněna

primárním výronem pryskyřice. Sezónní změny v obranné reakci lze vyhledat zpětně ke změnám v zásobách škrobu v floému. Změny v rovnováze sacharidů a vody mohou ovlivnit obranyschopnost, ale základní podmínky pro reakce napadající kůrovce, ovlivňují strukturní a anatomické vlastnosti kůry (Baier, 1996).

Podle Jakuš et al., (2011) nejen struktura kůry, ale i stínění kmene hraje roli při prvotním ataku. Smrky, které jsou dále od sebe a mají delší korunu, lépe odolávají. Přesto délka koruny není rozhodujícím faktorem. Jednu z hlavních rolí podle Führer, Wiener a Hausmann, (1992) hraje hustota koruny. Stromy se střední hustotou koruny vytvářejí příznivější podmínky pro napadení kůrovcem. Většího rozestupu pro delší koruny se dá dosáhnout pěstebním zásahem při prořezávkách a nebo hned při sázení. Pro preventivní ochranu jedinců je lepší uplatňovat těžební postupy od severu. Na lesních okrajích budou stromy k napadení méně náchylnější. Patrně nejlepším řešením je sázení smíšených lesů. (Jakuš et al., 2011).

3.6.4 Zvěř jako limitující faktor obnovy lesa

Erber (2019) navrhuje pro zajištění úspěšného obnovení lesních porostů po kalamitních holinách, s nejnižšími náklady a co nejrychleji, snížení stavů zvěře. Je nutné zajistit takový stav, při kterém budou kultury odrůstat bez oplocení. Tím se sníží náklady alepší se schopnost konkurence. Pro zjednodušení redukce zvěře, Mlynář (2019) vydalo MZE metodický pokyn pro snížení početních stavů spárkaté zvěře. Tím doporučuje orgánu státní správy vydávat kladná vyjádření k lovu nenormované zvěře do věku dvou let, na dobu nejméně tří po sobě jdoucích letech. Dalším krokem by mělo být povolení k lovu spárkaté zvěře noktovizory nebo lov v odchyťových zařízeních. Celkovému zlepšení by prospěla motivace k lovu pomocí peněžní odměny neboli zástřelného (Foit, 2019). Mezi lety 2010-2018 došlo k celorepublikovému nárůstu odlovu spárkaté zvěře; u zvěře jelení o 27 %, dančí o 68,6 %, mufloní o 5 % (Český Statistický úřad, 2019).

3.6.5 Vítr

Vzhledem ke klimatické změně posledních let je důležité počítat s hojnějším výskytem větrů s vyšší rychlostí. Z empirických faktorů polomy ovlivňuje zastoupení smrku s vyšším štíhlostním koeficientem, věkem a zakmeněním (Kolejka et al., 2010). Vicena (2006) k těmto faktorům dále řadí expozici, prostorovou úpravu, zdravotní stav, původ dřevin, bonitu. V roce 2019 bylo v České republice zpracováno celkem 3,69 mil. m³ abioticky poškozeného dřeva; to činí cca 60 % negativních abiotických vlivů. Nejčastěji byly zasaženy porosty borovice a smrku. Z pohledu regionálního to byl především Moravskoslezský kraj s objemem 719 tis. m³ (MZE, 2019). Ke škodám dochází i z pedologického hlediska, kdy při vývratu jednoho smrku je objem zeminy v kořenovém systému asi 1 m³. Půda zůstane téměř na svém místě, ale četné vývraty vytváří členitý mikrorelief, který má pozitivní vliv na retenci vody (Kolejka et al., 2010).

3.6.6 Sníh a námraza

Průběh zimy a množství sněhových srážek se reflektuje do škod na lesních porostech (Křístek a Holuša, 2014). Autorky Rychtecká a Urbaňcová (2008) popisují sníh a námrazu jako další nejpodstatnější abiotické činitele v České republice. Sněhem bylo v roce 2019 poškozeno 724 tis. m³. Námrazou výrazně méně a to pouhých 21 tis. m³, nejvíce postiženým regionem byla Vysočina 260 tis. m³ (MZE, 2019).

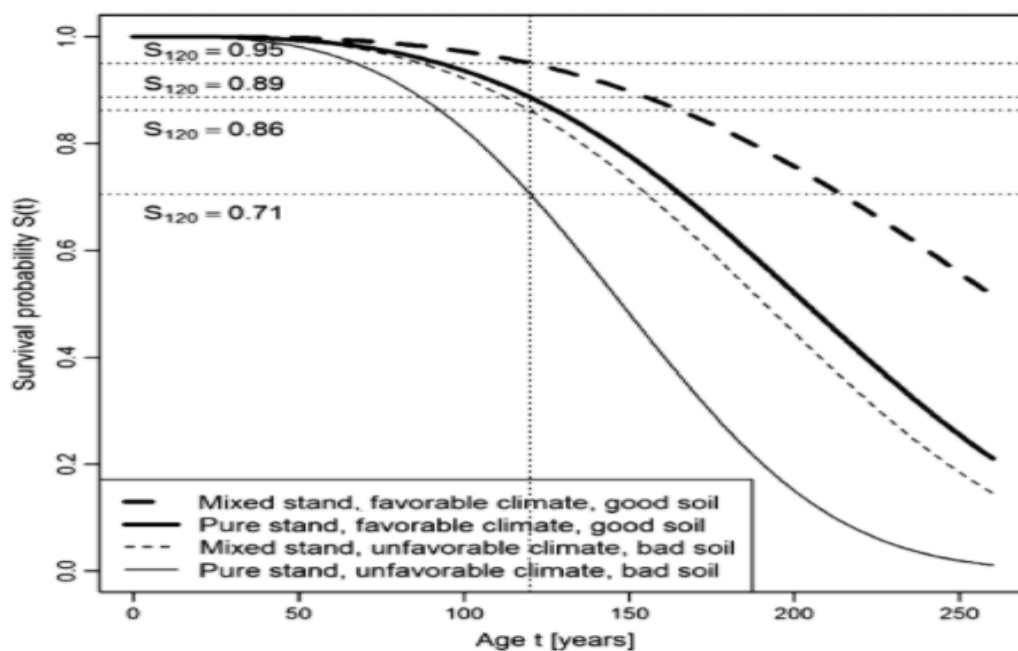
3.7 Budoucí vývoj

Aslam et al. (2017) a Piras et al. (2016), popisují oteplení planety v letech 1880-2012 o 1°C. To způsobilo posun ekologických zón severním směrem o 160 km. Vyšší teploty jsou převážně doprovázeny vlhčími podmínkami v závislosti na zeměpisných podmínkách. Vlhkost půdy v létě je predikována jako snížená, a to zapříčiní zvýšení stresu způsobeného suchem. Tyto poznatky přivádějí k závěru, že přežití druhů bude záviset na jejich schopnosti adaptace na jiné životní podmínky (Thuiller, 2007).

Předpokládá se, že budoucí vlivy budou mít v roce 2100 za důsledek posunutí smrku do nadmořských výšek nad 1000 m. n. m. Za předpokladu takové hypotézy dojde k úplnému vymizení smrku z celkové rozlohy lesa o 9 – 22%. Ztratí se více než 20 % z rozlohy smrku pouze z důvodu zvyšující se teploty. Do roku 2100 dojde ke snížení zastoupení smrku na 50 % lesní plochy. Výměra vhodná pro pěstování smrku bude v roce 2030 snížena na 55 – 40 % a v roce 2065 na 28 %. Model predikuje v roce 2100 vhodnou rozlohu plochy 5 % (Hanewinkel, Hummel a Cullmann, 2010).

Pravděpodobnost přežití smrku (graf č.3) v monokulturách bude v důsledku klimatických změn postupně snižována. Při zakládání smíšených lesů bude pravděpodobnost přežití smrku minimálně o 5 % a maximálně o 27 % vyšší, než v monokulturách. Ve smíšených porostech při zhoršování klimatu nebude smrk tolik dotčený, riziko poklesu je přibližně 7 %.

Ve 120 letech bude pravděpodobnost přežití smrku o 24 % nižší. Na nevhodných půdách a při nepříznivých podmínkách by se mělo snížit obmýtí u monokultur na 85 let. Na stanovištích s vhodnějšími podmínkami by mělo být obmýtí 90 let, aby se dorovnal produkce smíšeným porostům ve věku 120 let (Neuner et al., 2015)



Graf 3: Pravděpodobnost přežití s věkem (Neuner et al., 2015)

Genetická rozmanitost dřevin je ovlivněna především populační historií a postglaciální migrací (Petit et al., 2005). Úspěšnost populací bude záviset na genetické variabilitě, míře rozptýlení a umístění jedinců. Populace jsou lokálně adaptovány v místech, kde mají největší relativní fitness. Rozsah lokální adaptace je dán rovnováhou mezi tokem genů a selekcí. Silný přirozený výběr a genetická diferenciacce se vyskytují v rámci stovek kilometrů, ale spolehlivá měření jsou pouze na mnohem kratších úsecích (Savolainen, Pyhäjärvi a Knürr, 2007). Kromě dynamické genetické konzervace v přirozeném prostředí by mělo být využíváno více lokálních semenných zdrojů. Stěžejním bude využívání vyzkoušených proveniencí, které nepomohou jen konzervovat, ale i nastavit nepřijatelnější genetický zdroj pro budoucnost (Schueler et al., 2013).

3.8 Odolnost populací a jedinců

Přeměnou monokultur na vhodné smíšené lesy se zvýší odolnost vůči abiotickým i biotickým škůdcům (Hilmers et al., 2019; Seidl, Rammer a Lexer, 2011). Podle Jactel et al., (2009) je hlavním argumentem pro smíšené lesy vyšší odolnost vůči disturbancím a zároveň jejich rychlejší obnovení. Druhová rozmanitost může eliminovat rizika poškození rozdělením mezi vícero dřevin. Směsi se totiž mnohem rychleji zotavují z poškození.

V našich podmínkách vytvářely tzv. hercynskou směs smrk ztepilý, buk lesní, jedle bělokorá a tyto dřeviny společně tvořily přírodě blízké lesy bez nutnosti aktivní péče. Vztahy těchto tří dřevin se zdají jako vyrovnané, kdy z toho profitují všechny tři dřeviny (Pretzsch et al., 2015). Na jaře může smrk profitovat z hlubších kořenových systémů buku a jedle. Ve vyšších polohách je smrk s jedlí vyšší než buk a ten na to může reagovat posunem na světlejší stanoviště. Vzhledem k budoucí transformaci monokultur na smíšené lesy se dají předpokládat značné ztráty z produkce smrkového dřeva (Hanewinkel, Hummel a Cullmann, 2010). Změna lesů na monokultury je výsledkem potřeb lidské populace. Z toho důvodu je důležité transformovat lesy na smíšené, které jsou stabilní, udržitelné a mají rychlejší přirozenou obnovu po disturbanci (Hilmers et al., 2020).

Balogh et al., (2018) popisuje konkrétní fenotypy u borovice, které vykazují vyšší odolnost vůči napadení kůrovcem (*Dendroctonus ponderosae*). Jedinci, kteří produkovali terpeny, měli vyšší odolnost vůči napadení. Prozatím se nepodařilo zjistit konkrétní složení terpenů, které odolnost vůči napadení zvyšují, a tento cíl bude předmětem dalších studií. Chemické vlivy na odolnost popisují i Erbiling et al., (2017). Proti klikorohu borovému (*Hylobius abietis*) u semenáčků, jako potencionální účinná obranná látka se jeví jeden z terpenů – limonen, ovšem do jakého stádia je takto semenáček chráněn, zůstává zatím neobjasněno (Pettersson et al., 2008). Přesto, že dřeviny obsahují kyselinou abietovou, která se vyskytuje v pryskyřici a připisuje se jí obranný efekt vůči biotickým škůdcům Wagner et al., (1983), existují látky jako je diterpen-resinová kyselina, která se vyskytuje v trávicím traktu biotických škůdců a i v malé koncentraci dokáže překonat obranu hostitelské dřeviny a kvůli tomu dochází k napadení i odolných dřevin (Boone et al., 2013).

3.9 Úvod do principů genetiky

Pro existenci organismu je nezbytná fyzická informace uložená v deoxyribonukleové kyselině, známé jako DNA (Avery, MacLeod a McCarty, 1944). Vědci James Dewey Watson a Francis Crick (1953) popsali tvar této informace, povedlo se jim vyobrazit reálnou podobu dvoušroubovice DNA u lidského genu. Základní jednotkou jsou nukleotidy: Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T) (Sanger, Nicklen a Coulson, 1977).

Majoritní část vyšších organismů je diploidní, mají dvě molekuly DNA. Jedna přichází od otce a druhá od matky. Molekula je rozdělena do chromozomů. Chromozomové páry, které mají stejnou funkční formu genu - alelu, nazýváme homozygoty, a ty s odlišnou nazýváme heterozygoty. Dřeviny se vyvíjejí z jedné buňky, ta obsahuje všechny podstatné informace pro potřebu celého životního cyklu. Molekula DNA, která přichází od obou rodičů se nachází v buněčném jádře a v dalších buněčných strukturách jako jsou mitochondrie (mtDNA) nebo DNA plastidů (cpDNA) (White, Adams a Neale, 2007).

Přenos genetické informace na potomstvo se dělí na mimojadernou, a chromozomovou. Mendelovská, tedy chromozomová dědičnost je přenos genetické informace z obou sad chromozomů rodičů. K té dochází pouze při pohlavním rozmnožování. Přenos probíhá pomocí řízení rekombinace, replikace, mutace, anebo transmisí genetického kódu chromozomů. Konkrétně se jedná o biparentální dědičnost. Proti tomu cytoplazmatická-mimojaderná kontroluje cytoplazmatické jednotky (plazmidy). Hlavním projevem cytoplazmatické dědičnosti je somatické dělení neboli reciproční křížení a štěpení, během ontogenetického vývoje, konkrétně se dědičnost nazývá mateřská (maternal inheritance). Umožňuje předání znaků pouze z jedné sady rodičovského materiálu od otce. Přenos probíhá díky mitochondriím a nazýváme ji jako uniparentální (Paule a Hamplová, 1992).

3.10 Genetická variabilita

Genetická variabilita je ovlivněna velkým množstvím genetické informace v molekulách DNA. Během transportu genů z rodičů na potomstvo prostřednictvím pohlavních buněk se může vytvořit zdatné množství geneticky pestrých pohlavních buněk (Relichová, 1997). Z pohledu genu záleží na určitém místě, kde dochází k degeneraci a výsledkem je mutace. Mutace se může objevit v regulační oblasti genu, to souvisí s množstvím produkce proteinu, který je takto kódován. Na konečnou produkci proteinu bude mít vliv mutace, která se nalezne v kódující části tak, že ovlivní jednotlivé kodóny. Vzhledem k degenerovanému genetickému kódu, kdy je aminokyselina kódována vícero kodóny, nemusí být mutace projevena (tichá mutace) (Doležal, 2019). Původní genetická variabilita smrku byla snížena bottle neckem díky ochlazení asi před 1,6 mil let. Po opětovném zlepšení přírodních podmínek došlo k šíření smrku, ovšem již se sníženou variabilitou (Ziedler, 2007).

Důležitější, než genová variabilita, je genenová stabilita, kdy se molekuly DNA uchovávají a předávají se dalším generacím téměř beze změn. To je výhodné nejen pro zajištění své identity, ale i pro přežití vůbec. Kdyby genetická informace byla často šířena se změnami nebo chybami, tak by se organismy nemohly reprodukovat nebo přežít (Relichová, 1997).

3.11 Genom

Celkový soubor všech nukleotidů nazýváme genom. Pravidlo, kdy složitost organismu nebo evoluční vyspělost je přímo úměrná objemu genomu, neplatí. Tento jev je popisován jako paradox C (White, Adams a Neale, 2007). Obecně genomy borovicovitých se skládají z karyotypu, který má 12 ($2n = 24$) chromozomů

(Mehra a Khoshoo, 1956; Morse et al., 2009). Genomy jehličnanů se dají také charakterizovat podle své velikosti, která je více než 15 Gpb a významné množství opakujících se sekvencí asi 60 %. Ty hrají podstatnou roli při čtení genomu. Sekvence patří do různých rodin transportovatelných prvků, které se vložily do smrkového genomu a po desítky milionů let vytvářely velké introny a vysoký počet pseudogenů (Nystedt et al., 2013). Jedním z důsledků velkých a složitých genomů jehličnanů je obtížné sledování jejich úrovní (Heuertz et al., 2006).

I při používání moderních technologií je sekvenování nebo resekvenování genomu velmi časově náročné, ale i drahé. Velikost a repetitivní přirozenost jehličnanů ztěžuje manipulaci s daty u opakovaného sekvenování, kde například chybějí oblasti genomové sestavy (De La Torre et al., 2019). K zachycení určité části genomu se používají metody redukce složitosti výběru konkrétní oblasti, toho se dosahuje pomocí štěpení enzymy (RADseq a GBS). (Wang, Bernhardsson a Ingvarsson, 2020). Vzhledem k ostatním jehličnatým dřevinám, u kterých prozatím nedošlo k zmapování genomové základny, je smrk prvním popsáním druhem. Velikost jeho genomu je pravděpodobně 19,6 Gpb (Nystedt et al., 2013). To je asi 7x více, než se nachází u člověka. Počet genů u smrku je asi 28 tisíc. U listnatých dřevin jsou genomy menší, u rodu *Quercus* kolem 1,46 miliardy nukleotidů (Plomion et al., 2018).

3.12 Genetické markery

Genetickým marker je konkrétní úsek DNA s přesnou lokalizací na chromozomu, tím se mohou objasnit některé dědičné znaky. Díky markerům je možné sledovat genetickou příbuznost jedinců, populací nebo druhů. Pro detekci rozdílů je důležitý polymorfismus (Eriksson, Ekberg a Clapham, 2013).

3.13 Mikrosatelity

Mikrosatelitem nazýváme určité sekvence u repetitivní DNA, která se skládá z opakujících se jednotek, obvykle do velikosti šesti nukleotidů. Počet opakování jedné repetice v určitém místě DNA (lokusu) definuje alelu. U diploidních jedinců má každý jedinec dvě alely na jednom lokusu. Jedna je od otce a druhá od matky. Pro zjištění délky alely je nutné provést PCR amplifikaci konkrétního lokusu přidáním primerů přiléhající ke konkrétní sekvenci mikrosatelitu (Chlumský, 2015).

SSRs (Simple sequence repeats) jsou v současné době jedním z nejpoužívanějších markerů pro hodnocení genetické variability na úrovni populací. Z toho důvodu je metoda použitelná pouze v případě, kdy již pro daný druh byly publikovány primery (Zhang et al., 2004). Mezi jejich hlavní výhody patří neutrálnost, reprodukovatelnost, detekce polymorfismu nebo využití u dalších příbuzných druhů, díky výskytu mikrosatelitů i u nekódujících sekvencí pro analýzy genetické rozmanitosti populací (Androsiuk et al., 2013) (Maghuly et al., 2006) (Yazdani et al., 2003). Mikrosatelitové lokusy se řadí k nejproměnlivějším oblastem genomu, kdy je polymorfismus určen rozdílem počtu opakování základního schématu nukleotidů a lokusy jsou v délce 5-40 opakování, ale jsou možné i delší varianty (Selkoe a Toonen, 2006).

Ve většině případů genetických studií se používají nukleotidy ve variantách mono, di, tri, $(A)_n$, $(AT)_n$, $(ATA)_n$. Dinukleotidy se nejčastěji používají pro svou velkou možnost využitelnosti na vícero druzích (Li et al., 2002). Lokusy, které se vyskytují v celém genomu, převážně v oblastech kde je nekódující DNA, jsou pro výzkum nejužitečnější. Právě zde se nachází velký počet variant, které se dají využít pro identifikaci jedinců. Problém této metody se může projevit v tom, že variabilita se posuzuje na konkrétně sledovaných lokusech. (Jarne a Lagoda, 1996; Zane, Bargelloni a Patarnello, 2002). Mezi další nevýhody patří náročnost této metody, a to z hledisek časových a technických, protože jsou nezbytné dva primery, tedy pro každý směr (forward, reverse) (Zane, Bargelloni a Patarnello, 2002).

Naopak výhodou takové metody při sledování kodominantních dat se dá jednoduše rozpoznat homozygot od heterozygota. Touto metodou se dá i jednoduše sledovat stupeň polymorfismu, kde může být i <20 alel na jeden lokus.

Na mikrosatelitech se mohou vyskytovat také nulové alely. Takové alely není možné amplifikovat, takže ani není možné je změřit. Vznikají na místech mutací, které jsou těsně přiléhajícími k sekvenci mikrosatelitu. Pokud k takové mutaci dojde, tak primer není schopen nasednout a není možná amplifikace. Dalším důvodem může být rozdílná amplifikace dvou různých alel, pak se jednodušeji amplifikují kratší než delší alely. Při špatné kvalitě nebo nízké koncentraci DNA je možnost špatně proběhnuté PCR a tím mohou také vzniknout nulové alely (De Sousa, Kinkeldey a Gailing, 2005).

Pferiffer et al. (1997); Nystedt et al., 2013 uvádějí, že u smrku ztepilého existuje zhruba 40 000 kopií AG v mikrosatelitních sekvencích. Vzhledem k objemu genomu smrku, kde se nachází velké množství repetitivních úseků, které tvoří mikrolokusy, a ty pak komplikují výsledné hodnocení (Scotti et al., 2000). Díky mikrosatelitům bylo možné u smrku zjišťovat diference a diverzitu mezi populacemi (Scotti et al., 2006). Mikrosatelitové markery SSR detekují polymorfní lokusy s jednoduchou Mendelovskou dědičností. V praktickém lesnictví se dají tyto markery použít při sledování rychlosti křížení v semenných sadech nebo klasických porostech. Dále se dají sledovat skutečnosti jako inbreeding, kontrola kvality kontrolovaných křížení, kontrola umělého opylení, kontaminace pyly, identifikace otcovství nebo genová disperze (Yazdani et al., 2003). Potencionální nevýhodou mikrosatelitů podle Wang et al., (2009) je nepřítomnost nulových alel, kdy jejich přítomnost může zkreslit výsledky.

3.14 Primery

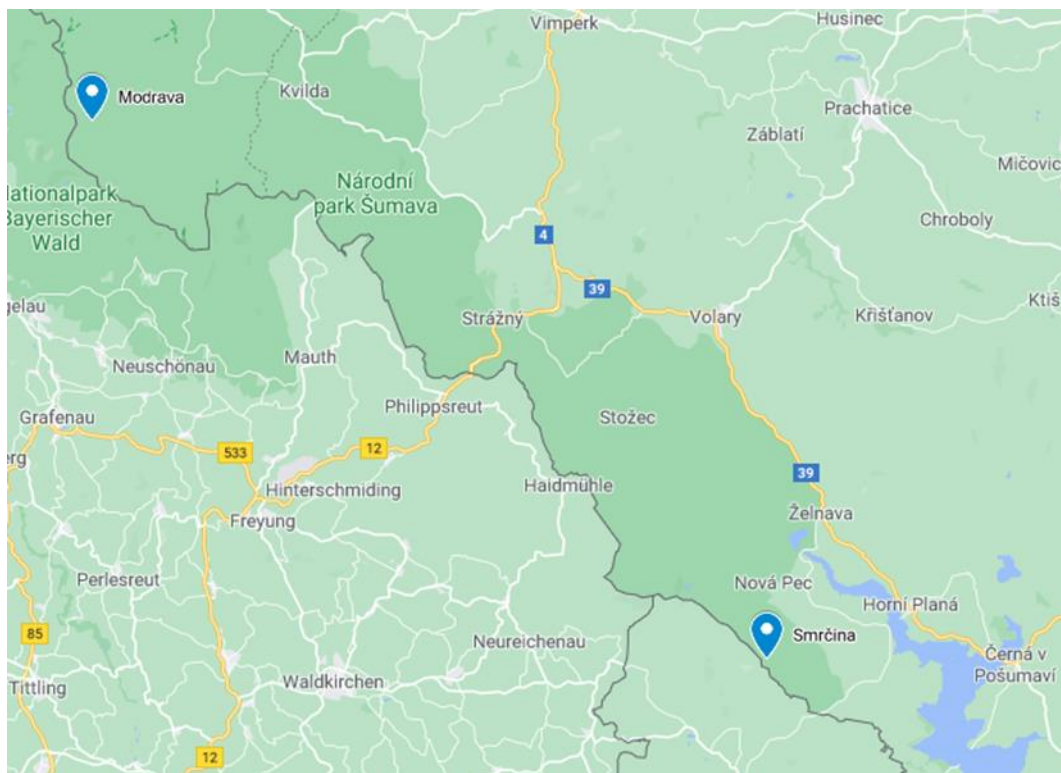
Pojem primer je využíván pro krátký oligonukleotid, který by měl nabývat velikosti od 15 do 25 nukleotidů a je nezbytný pro PCR. Primery jsou specificky konstruovány pro konkrétní lokus, který je v genomu jenom jednou. Primery jsou většinou barveny různými fluorescenčními barvami pro sekvenování DNA a následné vyhodnocování dat. Pro každý organismus existují specifické primery. Pro určité druhy již hotové primery, které se dají najít ve vědeckých člancích, databázích nebo genových bankách (Zane, Bargelloni a Patarnello, 2002; Varshney, Graner a Sorrells, 2005).

4 Metodika

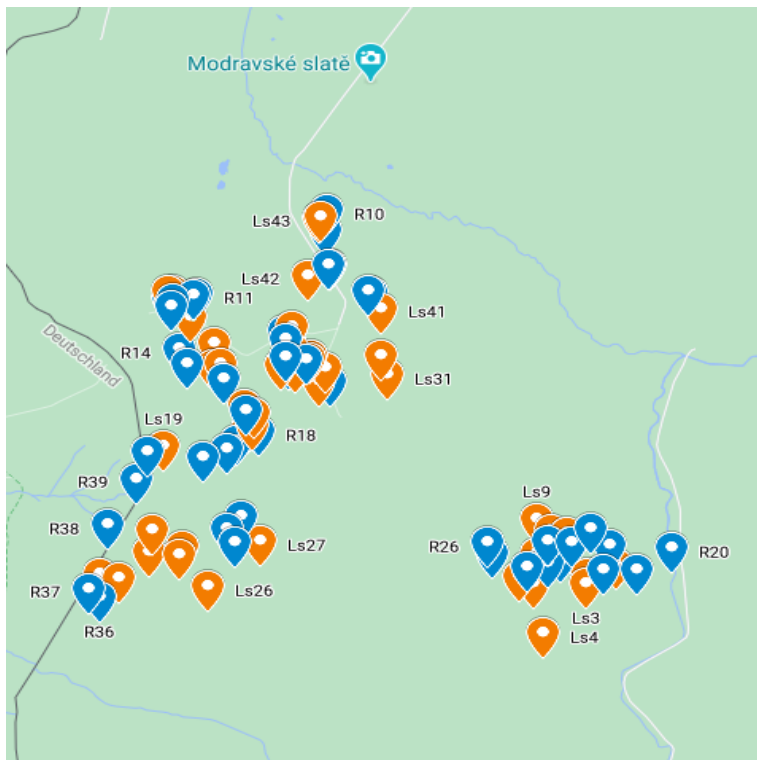
4.1 Sběr vzorků

Sběr vzorků přeživších jedinců (last standing trees) probíhal v oblasti Modravy, Smrčiny a Hluboké nad Vltavou. Vzorky z těchto lokalit, tedy první populace, byly označeny LS nebo LTS. Vybráno bylo 30 jedinců, to je soubor, který už má vypovídající hodnotu. Z toho byly 4 vzorky sebrány u Hluboké nad Vltavou, vzorky ze Smrčiny s označením S mělo 18 vzorků a byla považována za druhou populaci (viz. obrázek č. 6). Tyto populace jsou již atraktivní pro napadení kůrovcem, a přesto ataku odolávají. Rozmezí výšek těchto stromů bylo 17,9-30 m, výčetní tloušťka nabývala hodnot od 35,5-95cm.

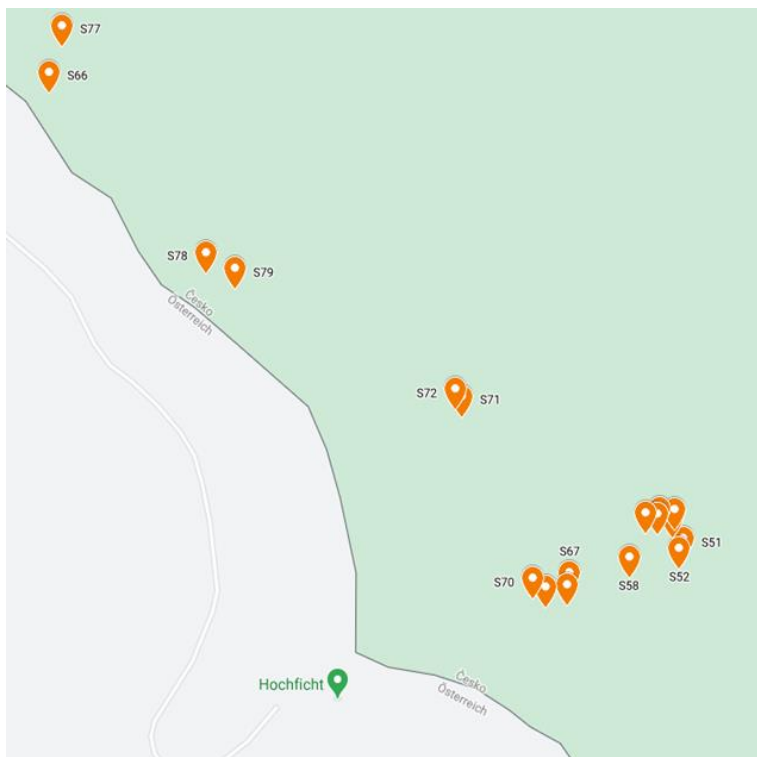
Třetí populace, neboli referenční, označována jako R nebo Ref, má celkem 48 vzorků. Referenční populace je nová generace stromů, její původ je z porostů, které neustály kůrovcový atak. V důsledku uvolnění plochy původním porostem dostaly semenáčky šanci, a proto jsou tyto vzorky sebrány ze zmlazení. Tedy náhodná populace, kde se dají očekávat specifické genotypy v minimu. Referenční populace slouží k porovnání odlišností od předešlých dvou sledovaných populací. Geografická vzdálenost mezi populacemi (obrázek č.3) je cca 40 km. Sběr vzorků probíhal v létě 2020, tedy 13 let po orkánu Kyril, který na Šumavě poškodil kolem 1 milionu m³ dřeva a o další škodu podobného rozsahu se postaral kůrovec. Pro mapové podklady a klastrovací dendrogram byly vzorky přeznačeny (pro lepší přehlednost přeznačené vzorky uvedeny v příloze č. 51).



Obrázek 2: Mapový zakres lokalit Modravy a Smrčiny; zdroj Google Maps; zpracování vlastní



Obrázek 3: Mapový zákres Modravy: populace LS (oranžová) a R (modrá); mapový podklad: Google Maps; zpracování vlastní



Obrázek 4: Mapový výstup ze Smrčiny: populace S; mapový podklad Google Maps; zpracování vlastní

4.2 Příprava vzorků

Vzorky pro referenční jedince byly připravovány z pupenů. Tyto pupeny byly skalpelem odděleny od letorostu a na plastové podložce byly očištěny od krycích šupin. Očištěné pupeny byly umístěny po dvou až třech kusech podle velikosti pupenů do zkumavek určených k homogenizaci. Tyto zkumavky mají zamykatelné silnější víčko proti proražení kuličkou při drcení. Do zkumavek byly přidány sterilní kuličky pro jemné nadrcení. Kuličky se skládají ze slitiny oceli a karbidu wolframu. Použité zkumavky byly od firmy Eppendorf o objemu 2 ml. Po každém připraveném vzorku byly nástroje i pracovní plocha očištěny lihem, který zabraňuje vzájemné kontaminaci vzorků.

Pro last standing trees bylo z výseku kůry odebráno kambium, které bylo skalpelem odděleno od kůry a umístěno do stejných, odolnějších zkumavek.

Zkumavky byly označeny identifikačním číslem, aby nedošlo k záměně s ostatními vzorky. Připravené vzorky byly usazeny do dvou konzolí pro oscilační mlýn. Tyto konzole byly umístěny do nádoby a zality tekutým dusíkem pro hluboké zamrazení a lepší homogenizaci. Teplota kapalného dusíku je přibližně $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ a používá se pro zmrazení tkání, které se tímto stanou křehké, tvrdé a jednodušeji se rozdrtí na jemný prach. Po zmrazení, které trvalo zhruba 2 minuty, byly konzole vyjmuty a okamžitě umístěny do kovových držáků v oscilačním mlýnu. Po utažení a zavření bezpečnostního krytu započalo drcení na 3 minuty a intenzitě 30 kmitů za sekundu ve vertikálním směru. Za uspokojivou kvalitu drcení se považuje absence hrubých tkání a dostatečné množství prachu. Tento prach byl většinou nakumulovaný ve víčku zkumavky a musel být mechanicky vyjmut. Pokud nebyla po prvním drcení kvalita uspokojující, znovu se vzorky zmrazily a proces se opakoval.

4.3 Izolace DNA

K izolaci byl použit izolační kit NucleoSpin Plant II od firmy MACHEREY-NAGEL. Tato firma poskytuje technologie pro chemickou a biomolekulární analýzu. Izolace DNA by nebyla možná bez použití přístrojů a pomůcek. Jak již bylo zmíněno výše, oscilační mlýn, centrifuga, vortex – přístroj k promíchávání vzorků a roztoků, termoshaker – pro zahřátí vzorku na předepsanou teplotu, mikropipety a opakovací pipeta – Gilson Repetman. Opakovací pipeta po nastavení určitého objemu přesně dávkovala reagensii do zkumavek, ale pouze v případě, kdy nebylo nutné okamžité spojení vzorku s reagensií. K tomu sloužily klasické mikropipety a k těmto pipetám byly používány špičky o různých objemech kompatibilní s velikostí pipety. Celý proces izolace byl prováděn v ochranných latexových rukavicích.

Série izolace byla většinou prováděna po 24 vzorcích. Do homogenizovaných vzorků byla přidána první reagensie Buffer PL2 o objemu 300 μ l a vzorek byl zvortexován (promixován). Po tomto kroku následovalo přidání RNase 10 μ l, která má zajistit zneškodnění RNA ve vzorku. Zkumavka byla opět zvortexována. Pro zvýšení výtěžnosti byl vzorek vložen do termobloku v rozmezí intervalu 30–60 minut, při teplotě 65°C.

Po uplynutí časového limitu se do vzorku přidalo 75 μ l PL3. Vzorek byl neprodleně zvortexován a vložen do předem připravené nádoby s ledem na pět minut. V tomto kroku se vysrážejí bílkoviny, polysacharidy a detergenty, které se usadí na dně zkumavky. Celý obsah zkumavky se přelije i se sraženinou do nové zkumavky na fialový filtr. Tento filtr zachycuje zbytkový a nežádoucí materiál mimo roztok. Takto připravená zkumavka prošla centrifugací na 11 000 rcf při časovém intervalu dvou minut.

Pokud buněčné zbytky ucpaly filtr a tekutina neprošla skrz, bylo nutné zbytky mechanicky promíchat, aby mohla tekutina snadněji projít přes filtr a centrifugace se opakovala, dokud nebyla veškerá tekutina ve zkumavce. Protože fialový filtr je hrubý, objevila se na dně zkumavky sedimentární peleta. Bylo nutné roztok přelit do náhradních, čistých zkumavek, přidat 450 μ l Buffer PC a

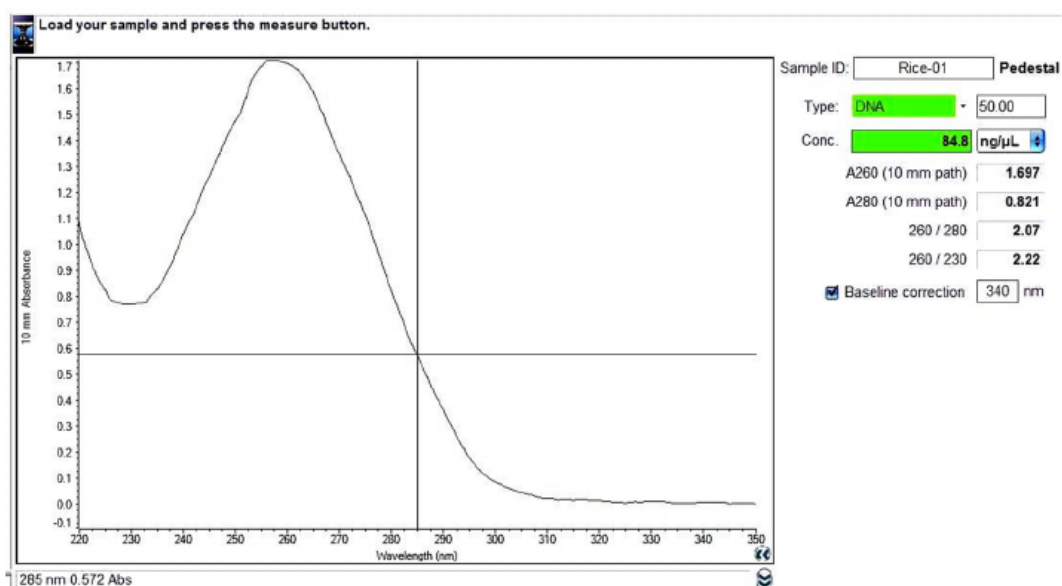
neprodleně propipetovat (přidanou reagensii nasát zpět do špičky i s roztokem DNA). Po tomto kroku byl roztok přelit na křemičitý filtr se zeleným kroužkem sloužící k navázání DNA. Následovala centrifugace po dobu jedné minuty a 11 000 rcf. Jelikož přefiltrovaná tekutina již nebyla potřebná, byla ekologicky zlikvidována a filtr vrácen do stejné zkumavky.

V dalším kroku bylo přidáno 400 µl Buffer PW1 a opět stočeno v centrifuze na stejné otáčky i čas. Následovalo 700 µl Buffer PW2 a v dalším kroku 200 µl Buffer PW 2. Po tomto vymývání bylo důležité, aby byl filtr úplně suchý a neobsahoval zbytky Buffer PW 2, protože obsahuje ethanol. Z tohoto důvodu byla zkumavka znovu vložena do centrifugy a stočena tzv. na sucho.

Následovala konečná eluce DNA, proto byl filtr umístěn do nové 1,5 ml zkumavky. Z předem připravené zkumavky s Buffer PE zahřáté na 65 °C bylo aplikováno 50 µl na střed filtru a zkumavka byla vložena do termobloku na dobu 5 minut, pro co nejvyšší výtěžnost. Poté byla vložena do centrifugy na 11 000 rcf po dobu 1 minuty. Pro druhou eluci byl vyjmut filtr a vložen do nové 1,5 ml zkumavky a postup eluce byl opakován.

4.4 Měření DNA

U vy-izolované DNA byla měřena koncentrace a čistota. K tomuto účelu slouží přístroj NanoDrop a stejnojmenný program v počítači, který provádí spektrometrickou diagnózu. Před samotným měřením je důležité, aby DNA nebyla usazena na dně zkumavky, proto je podstatné vzorek zvortexovat. Před začátkem měření je důležité nastavit standard čistoty tzv. blank. Ten se nastaví pomocí Buffer PE. Pro korektní posouzení musí vzorek vykazovat průběh typické křivky (viz obrázek č. 5). Čistota by měla nabývat hodnot od 1,7 – 1,9 při vlnové délce 260/280nm. Ideální křivky by měla nabývat nejvyšší hodnotu právě v bodě 260nm a protínat křivky x a y v nulovém bodě.



Obrázek 5: Ideální křivka NanoDrop

Dostupné na: https://www.researchgate.net/figure/Nanodrop-spectrophotometry-measurements-of-gDNA_fig2_258502500

4.5 Ředění DNA

Změřené vzorky bylo nutné připravit na stejnou koncentraci DNA 20 ng/ μ l. Koncentrace nabývaly hodnot od 31,9 do 668,6 ng/ μ l. Výpočet ředění probíhal podle vzorce (konečný objem DNA x požadovaná koncentrace) / koncentrace z NanoDropu. Výsledné hodnoty množství DNA se odečetly od hodnoty 20 μ l a výsledek se rovnal množství ultra-čisté vody. Tato množství byla pipetována do PCR destiček, kde každý vzorek měl své souřadnice. Vypočtené objemy DNA a ultračisté vody jsou uvedeny v přílohách č. 47 a č. 48.

4.6 Elektroforéza

Elektroforéza je jednou ze separačních metod, která se používá pro kontrolní testování kvality vzorků. Důvodů pro provádění elektroforézy jsme měli hned několik. Prvně bylo důležité pro ověření amplifikace, tzn. zda vzorky obsahují DNA. Druhým důvodem bylo zjištění kvality DNA. Zda není kontaminovaná, neobsahuje zbytky proteinů nebo RNA. Třetím důvodem bylo ověření měření z NanoDropu. Často při měření Nanodropem dochází ke zkreslení výsledku, už jen kvůli principu měření.

Elektroforéza probíhá v elektroforetické vaně, která je vyplněna agarózovým gelem. Na přípravu gelu bylo nalito 55 ml 1x TAE Bufferu do skleněné kádinky a do té se přidalo 0,7 g agarózy. Pro lepší rozpuštění agarózového prášku se připravený roztok zahřál na 1 minutu v mikrovlnové troubě. Poté se kádinka zchladila pod tekoucí vodou a do roztoku se přidalo 1 μ l RedGel pro kontrastní vyobrazení. Objem byl vylit do elektroforetické vany, ve které již byly připraveny drážky na jamky od elektroforetických hřebenů. Při lití roztoku je důležité, aby povrch gelu po zatuhnutí zůstal rovný a bez vzduchových bublin. Po zatuhnutí gelu bylo možné vyjmout hřebeny, které vytvořily jamky pro ředěné vzorky. Na netoxické fólii Parafilm bylo smícháno 3 μ l DNA s 2 μ l RedGelu pro fluorescenční účinek v temné komoře. Pro porovnání kvality vzorků byl do první jamky vždy přidán velikostní marker o objemu 5 μ l. Vana byla přiklopena víkem a spustila se elektroforéza na 30 minut a napětí 90 Voltů. Výsledek je na obázku č.7.

4.7 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce, ve zkratce PCR, se používá k množení určitých úseků DNA. Tyto konkrétní úseky je nutné ohraničit na začátku i na konci primery. Tímto způsobem se dá úsek amplifikovat až na miliony kopií. To umožňuje i z velmi malého vzorku provést analýzu. Konkrétně i z jediné molekuly DNA.

Reakce probíhá ve třech krocích denaturace, nasednutí primerů (*annealing*), syntéza DNA. Denaturace probíhá při teplotě 94–95 °C, tím dojde k rozpletení dvoušroubovice DNA. Poté je teplota snížena na rozmezí 55–72 °C, kvůli nasedání primerů. Pro amplifikaci je nezbytná Taq polymeráza, která zajišťuje syntézu vláken DNA. Pokud dojde k 20 opakování cyklu, molekuly se namnoží na jeden milion kopií konkrétního úseku. Běžně se používá 20 až 40 opakování cyklu (McPherson a Moller, 2006).

Po celém procesu přípravy vzorků, homogenizace, izolace DNA, její ředění a po sestavení multiplexů bylo možné pipetovat primery do nařaděných vzorků. Použitý kit pro provedení PCR byl QIAGEN Type-it Microsatellite PCR Kit. PCR proběhla v přístroji Mastercycler® Nexus od firmy Eppendorf Germany, celé programy pro oba multiplexy jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2: Program pro PCR

Multiplex I.		
počet opak.	teplota	doba trvání
1x	95°C	15min
40x	95°C	30s
40x	60°C	45s
40x	72°C	30s
1x	60°C	30min

Multiplex II.		
počet opak.	teplota	doba trvání
1x	95°C	5min
35x	95°C	45s
35x	59°C	60s
35x	72°C	45s
1x	72°C	30min

4.7.1 Volba primerů

Před provedením PCR je nutné vybrat konkrétní primery, které budou odpovídat templátové oblasti DNA. Tyto primery byly vyhledávány v odborných člancích nebo primerových bankách a z těchto primerů byly vytvořeny dva multiplexy (viz tabulka č. 3) (ADDGENE, 2020). Metoda multiplex PCR vykazuje značnou flexibilitu, díky které se dají zjistit dědičné choroby nebo mutace na lokusech. Multiplex PCR by tedy měla být ideální metodou pro sledování vztahů mezi populacemi a environmentálních vazeb (Edwards a Gibbs, 1994). Využité primery byly zakoupeny od firmy Thermo Fisher Scientific. Pro multiplexy byly objemy primerů následovné (viz tab. č. 4)

Tabulka 3: Vybrané primery

Multiplex	Primery	Autor primeru	Forward primer	Reverse primer
1	paGB3	(Besnard et al., 2003)	AGTGATTAAACTCCTGACCAC	CACTGAATACACCCATTATCC
	WS0022.B15	(Rungis et al., 2004)	TTTGTAGGTGCTGCAGAGATG	TGGCTTTTATTCCAGCAAGA
	SpAGD1	(Pfeiffer, Olivieri a Morgante, 1997)	GTCACCAACTGTAAAGCCA	ACTTGTGGCATTTTCCC
	SpAG2	(Pfeiffer, Olivieri a Morgante, 1997)	GCTCTCACGTGFACTTGATC	TTCGAAGATCCTCCAAGATAC
	EATC1E03	(Scotti et al., 2002)	CCOCTTATTCTAAOGTCAA	TACCA GTGGTGACAACGATG
	WS00716.F13	(Rungis et al., 2004)	TCAAGTAA TGGACAAACGATACA	TTTCCAA TAGAATGGTGGATTT
	Pt71936 *	(Vendramin et al., 1996)	TTCATTGGAAATACACTAGCCC	AAAACCGTACATGAGATTCCC
	Pt63718 *	(Vendramin et al., 1996)	CACAAAAGGATTTTTTTCAGTG	CGACGTGAGTAAGAATGGTGTG
	EATC1D02A	(Scotti et al., 2002)	TTGTCATCGTCGFCATTGTC	TTTTAGCCTCTGTTTCTAGCG
2	WS0073.H08	(Scotti et al., 2002)	TGCTCTCTTATTCCGGCTTC	AAGAACAAGGCTTCCCAATG
	Pa_28	(Fluch et al., 2011)	GGCCGAAA GTGCTACTGCTA	TGCTCCAGA AGAACACTCACA
	PAAC23	(Scotti et al., 2000)	TGTGGCCCACTTACTAATATCAG	CGGGCATTGGTTACAAGAGTTGC
	WS0092A19	(Scotti et al., 2002)	TGTGGTTTTCTGCTTGAAA	CCCATTTTGACTTTGAAA TAAGC
	WS0023B03	(Scotti et al., 2002)	AGCAGCTGGGTCAAAGTT	AAAGAAAGCATGCATATGACTCAG
	Pa_33	(Fluch et al., 2011)	GGTCGAGGAGGAGGAGGTAG	CACCGTAGTGCACTCTCTG
	WS0019.F22	(Scotti et al., 2002)	AAGCGTTTCTCATTTTCTTGG	GGCCCAAGACTAACAAATGA
	PA56	(Fluch et al., 2011)	ATCGTCTGCATTGCATTAC	CTTCGTTCTTCTCTGATCCA
	PAAC3	(Scotti et al., 2000)	CGCTACCTCAGATTTCTCCA	AGATAATCCCTCACAAGTGG

Tabulka 4: Objemů pro Multiplexy

Multiplex 1					
	Primery	Délka bp	objem (μl)	x106	x2
1	paGB3	110-120	0,2	21,2	42,4
2	WS0022.B15	180-200	0,5	53	106
3	SpAGD1	147	0,5	53	106
4	SpAG2	90 - 105	0,12	12,72	25,44
5	EATC1E03	175	0,1	10,6	21,2
6	WS00716.F13	281-307	1,04	110,24	220,48
7	Pt71936 *	146	0,025	2,65	5,3
8	Pt63718 *	92	0,035	3,71	7,42
9	EATC1D02A	200-250	0,15	15,9	31,8
			2,67	283,02	566,04
Multiplex 2					
	Primery	Délka bp	objem (μl)	x106	x2
1	WS0073.H08	200-210	0,075	7,95	15,9
2	Pa_28	145-170	0,06	6,36	12,72
3	PAAC23	300	0,075	7,95	15,9
4	WS0092A19	103	0,3	31,8	63,6
5	WS0023B03	90 - 105	0,15	15,9	31,8
6	Pa_33	90-110	0,225	23,85	47,7
7	WS0019.F22	350-400	0,15	15,9	31,8
8	PA56	120-140	0,3	31,8	63,6
9	PAAC3	260	0,3	31,8	63,6
			1,635	173,31	346,62

Do každého vzorku byl pipetován uvedený objem v tabulce č. 4. Objem primerů byl přepočítán na celkový počet vzorků, tedy 96 vzorků v PCR destičce. Protože se používají primery pro dva směry (forward i reverse) je nezbytné objem jednoho primeru vynásobit dvěma, k tomu počítat i s chybou pipetování 10 %. Celkový postup výpočtu je: $96 \cdot 2 \cdot 0,1$.

4.8 Vyhodnocování dat

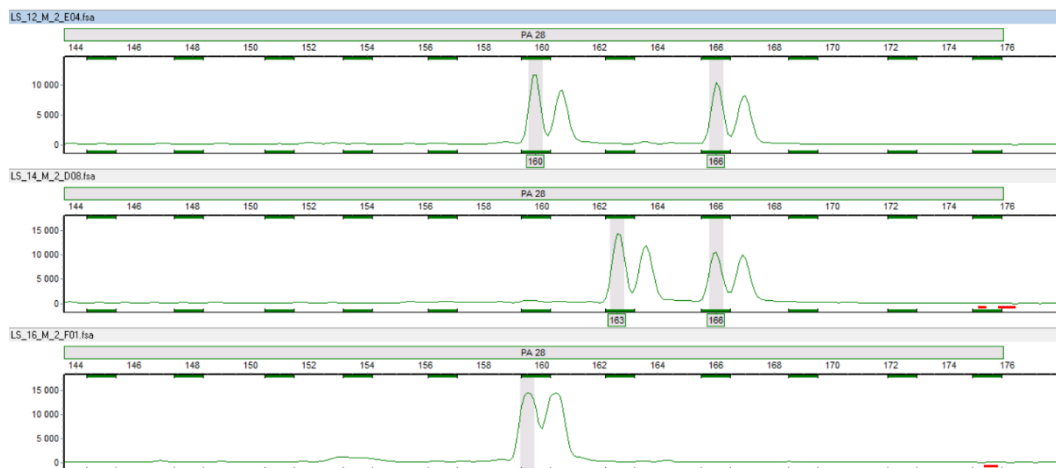
4.8.1 GeneMarker

Data byla z mikrosatelitových markerů vyhodnocována v programu GeneMarker od firmy SoftGenetics. Tento jedinečný software pro analýzu genotypů integruje nové technologie, které zvyšují rychlost, přesnost a snadnost analýz. Program se dá použít pro výzkumy ve zdravotnictví, zemědělství nebo biologii (SoftGenetics, 2012).

GeneMarker v grafickém výstupu zobrazuje analyzované lokusy (viz. obrázek č. 6). Celkem mělo být u obou multiplexů vyhodnocováno 9 lokusů (tabulka č. 4). Prvním krokem k vyhodnocování dat je nastavení srovnávacích panelů pro stejnou výchozí pozici všech vzorků. Multiplexy mají panel, který je optimalizovaný přímo pro daný biologický druh. V tomto případě byl využit srovnávací panel GMC-GT500-LIZ. Bohužel, u prvního multiplexu došlo ke špatné volbě primerů a nebyly hodnoceny 3 lokusy (SpAG2; SpAGD1; WS0022.B15). Na prvním multiplexu bylo vyhodnocováno 6 lokusů. paGB3 v rozsahu 99-130 bp; EATC1D02A 186-237 bp. Pt71936 138-150 bp; Pt63718 92-102 bp; EATC1D02A 186-238 bp.

Na druhém multiplexu bylo vyhodnocováno 9 lokusů. Na lokusu WS0073.H08 se skórovaly alely v rozmezí 197–223 bp; WS00716.F13 208-246 bp; PA 28 142-176 bp; PAAC23 268-316 bp; WS0092.A19 211–237 bp; WS0023.B03 164-208 bp; PA 33 92-108 bp; WS0019.F22 354-388 bp; PA_56 120-141 bp; PAAC3 240-318 bp.

Při vyhodnocování takto vykreslených dat na lokusech je důležité dodržovat konzistentní postup v hodnocení. V případě porušení konzistentnosti může dojít k absolutnímu rozpadnutí konečných výsledků.



Obrázek 6: Vyhodnocování dat v programu GeneMarker

4.8.2 GenAIEx

Druhým nástrojem ve kterém probíhalo vyhodnocování dat, byl doplněk do MS Excel s názvem GenAIEx ver. 6.503. Doplněk nabízí široké spektrum variancí pro hodnocení genetických markerů. Pro svou uživatelskou přívětivost, dostupnost a přehledné exporty dat je velmi oblíbený mezi učiteli nebo studenty (Peakall a Smouse, 2012). Pro vyhodnocování genetických dat se využívá F-statistika. Ta sleduje souvislosti mezi geny v rámci populace. Uvedený fakt je nezbytný pro populační genetiku a sledování migrace, mutace, přirozeného výběru nebo inbreedingu (White, Adams a Neale, 2007).

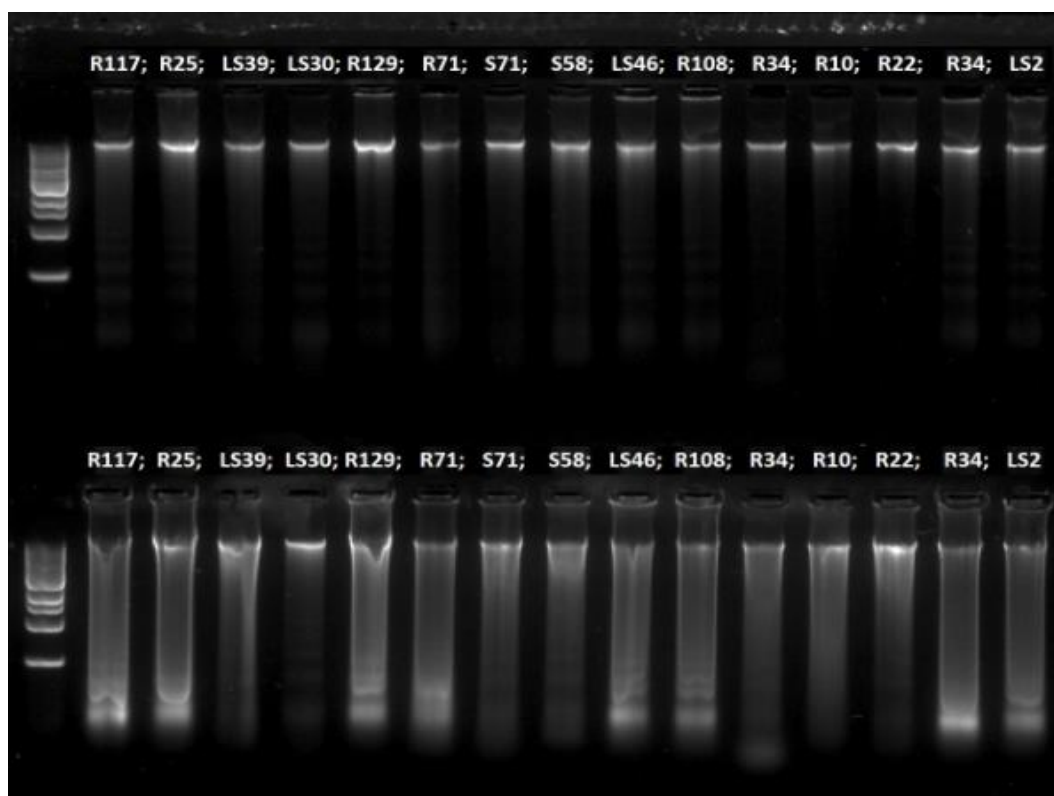
4.9 Softwarový nástroj R

Pro další statistické analýzy byl využíván volně dostupný software R. Software využívá jako programovací jazyk R pro interpretaci statistických výpočtů a grafiky. Používá se k široké škále statistických analýz jako jsou lineární nebo nelineární modelování, statistické testy, shlukování a mnoho dalších. Majoritní výhodou programu R je jeho snadnost a jednoduchost s jakou lze vytvářet požadované grafické výstupy (R Core Team 2020).

Pro tuto studii bylo využito rozšiřujícího balíčku adegenet od autora Jombart (2008). Tento doplněk je určený pro analýzu genetických dat. V případě této studie byl využit ke dvěma analýzám. První využitou byla shluková analýza, též clusterová, s metodou Discriminant analysis of principle components (Jombart, Devillard a Balloux, 2010). Jedná se o vícerozměrnou statistickou metodu, která je běžně používána k hodnocení skupin do shluků, aby bylo možné rozpoznat podobnosti mezi skupinami. Je podstatné založit shluky na souboru stejných znaků, které je možné sledovat. Druhým výstupem z tohoto doplňku byl dendrogram. Tím je možné vyobrazit jednotlivé kroky ze shlukové analýzy. Dendrogram byl vytvořen na základě objevu Sokal a Michener (1958) díky metodě UPGMA podle autorů Gronau a Moran (2007) s využitím Neiovy genetické vzdálenosti (Nei, 1972). UPGMA neboli metoda neváženého párování s aritmetickým průměrem. Jedná se o jednoduchou metodu, která shlukuje páry s největší podobností a ty následně vytváří konečnou síť.

5 Výsledky

Koncentrace DNA z NanoDropu nabývaly hodnot od 31,9 ng/μl u vzorku LS 2 až do 668,6 ng/μl u vzorku R22. Takto velký rozsah je zapříčiněný použitím dvou typů vzorků. Pupeny nabývají vyšší koncentrace než výseky z kůry, protože v pupenech se nachází nejčerstvější buňky. Přesto se oba vzorky úspěšně amplifikovaly přes všechny lokusy. Po naředění proběhla elektroforéza v agarósovém gelu (obrázek č. 7).



Obrázek 7: Výsledek elektroforézy

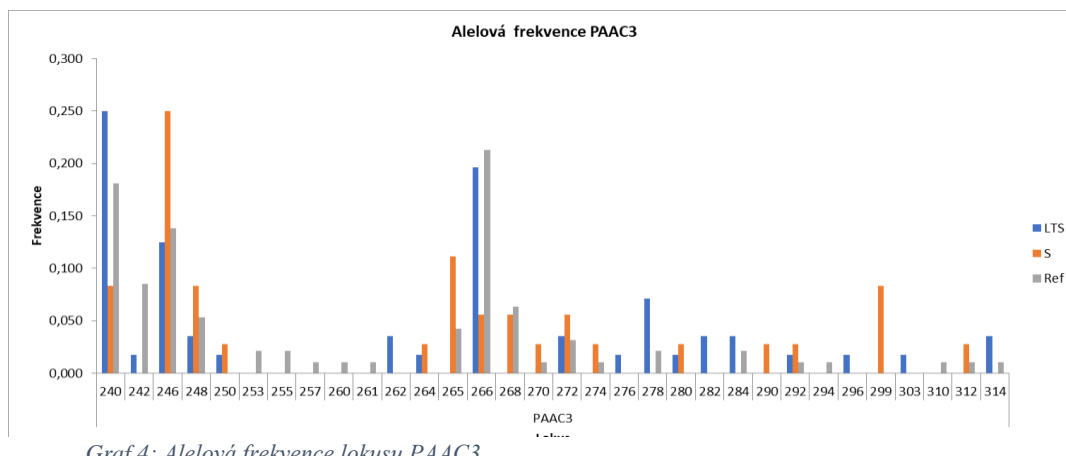
V horní řadě zleva je prvním nepopsaným vzorkem velikostní marker, který slouží k porovnání. První řada je vyplněna ředěnými vzorky na 20 ng/μl. Intenzita záření je nekonzistentní, došlo k ní pravděpodobně nepřesností naředění DNA.

Zpracovaná data jsou prezentovaná v následných grafech a tabulkových přehledech. Z celkového souboru nebyly některé vzorky hodnotitelné (viz tabulka č. 6). Důvodem k neskórování alel v těchto vzorcích byla nemožnost určit přesnou pozici alely. Z tohoto důvodu bylo praktičtější nejasný vzorek nehodnotit a tím pádem využít kvalitnější a přesnější data bez zkreslení takovými nejasnými vzorky. Ani jeden lokus z hodnocených nevykazoval známky problémové amplifikace. U lokusu Pt 63718 dochází ke zkreslení, protože se zde nachází pouze čtyři alely a tento lokus má nejvyšší počet nehodnocených vzorků ze všech lokusů. Celkem ze všech populací a lokusů bylo vyhodnocováno 358 alel.

Tabulka 5: Procenta nehodnocených vzorků na lokusech

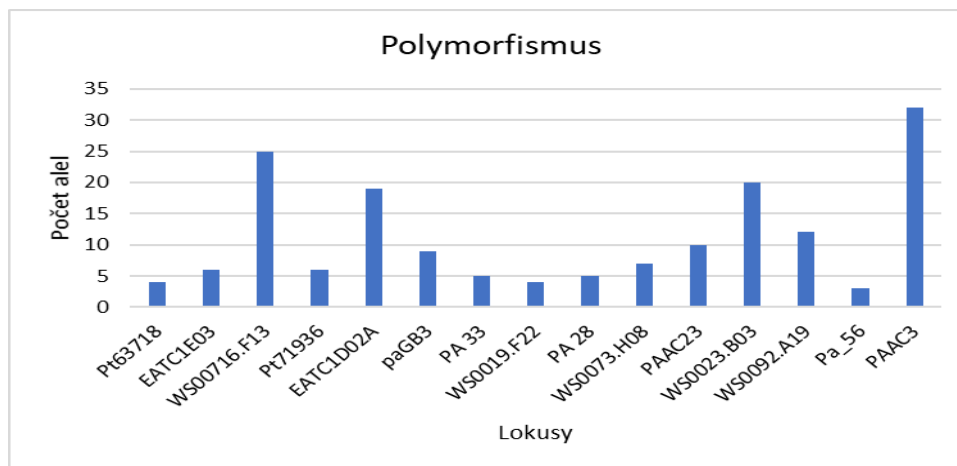
Procenta nehodnocených vzorků na lokusech			
Lokus	%	Lokus	%
Pt63718	27,1	PA 28	4,2
EATC1E03	16,7	WS0073.H08	9,4
WS00716.F13	16,7	PAAC23	8,4
Pt71936	22,9	WS0023.B03	24
EATC1D02A	1	WS0092.A19	4,2
paGB3	0	Pa_56	0
PA 33	0	PAAC3	3,1
WS0019.F22	11,5		

Lokus na kterém se vyskytoval největší polymorfismus (graf č.4), s počtem 32 alel, byl PAAC3. Kdy největší frekvenci v populaci LST měly alely 240 frekvenci 0,250; u populace S měla alelu 246 hodnotu 0,250 a referenční populace měla alelu 266 s nejvyšší frekvencí 0,213.



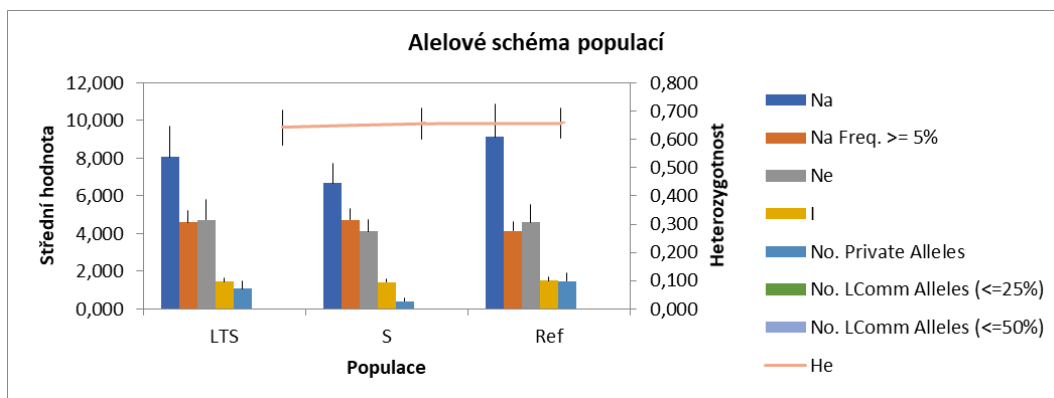
Graf 4: Alelová frekvence lokusu PAAC3

Nejméně polymorfním byl lokus Pa_56 se třemi alelami. Nejvyšší frekvencí 0,5 má alela 135. Tento lokus je samostatně málo informativní, ale při sloučení dat s ostatními lokusy má adekvátní vypovídající hodnotu.



Graf 5: Polymorfismus

Výše uvedený graf č.5 znázorňuje polymorfismus napříč lokusy pro všechny populace. Nejvíce polymorfním lokusem je PAAC3 s hodnotou 32 alel. Druhým v pořadí je WS00716.F13 s počtem 25 alel na lokus. Třetím lokusem s obstojným polymorfismem je WS0092.A19 s počtem 20 alel. Čtvrtým lokusem EATC1D02A s hodnotou 19 alel. Ostatních 11 lokusů nabývalo hodnot v rozmezí 3-12 alel.



Graf 6: Alelové schéma populací

Srovnání tří populací pomocí genetických ukazatelů vykresluje graf č.6. Ukazatel N_a vyobrazuje celkový počet různých alel v každé jedné populaci, v tomto případě pro LTS 8,067; S 6,667; Ref 9,133.

$N_a \text{ Freq. } \geq 5\%$ znázorňuje počet alel, které mají vyšší frekvenci než 5 % tedy pro LTS 4,6; pro S 7,733 a pro referenční 4,133.

N_e představuje počet efektivních alel, které vychází ze vzorečku: $N_e = 1/\sum \pi^2$ a nabývají hodnot pro LTS 4,717; S 4,107; Ref 4,587.

Shannonův informační index I vychází z: $I = -1 * \sum (\pi * \ln(\pi))$ a počítá se pro alelickou i genetickou diverzitu. Výsledná hodnota pro populaci LTS je 1,458; pro S 1,42 a pro Ref 1,501.

Dalším ukazatelem v grafu č. 6 je N_o . *Private Alleles*, který vykresluje jedinečné alely pro konkrétní populaci. Pro LTS je výsledek 0,396,

Tabulka 6: Průměrné statistické ukazatele mezi lokusy I.

Lokus	N		Na		Ne		I		F	
	Průměr	Sm. odchylka	Průměr	Sm. odchylka	Průměr	Sm. odchylka	Průměr	Sm. odchylka	Průměr	Sm. odchylka
Pt63718	23,333	4,177	2,333	0,333	1,157	0,053	0,273	0,078	1,000	0,000
EATC1E03	26,667	5,487	4,000	0,000	1,393	0,028	0,588	0,029	0,339	0,298
WS00716.F13	24,333	5,783	18,333	3,283	13,199	2,675	2,687	0,205	0,097	0,030
Pt71936	24,333	4,667	4,667	0,333	2,599	0,174	1,105	0,073	-0,545	0,070
EATC1D02A	31,667	8,413	12,667	0,882	4,742	0,629	1,923	0,087	0,288	0,039
paGB3	32,000	8,718	7,000	0,577	3,936	0,215	1,571	0,021	-0,057	0,021
PA 33	32,000	8,718	4,000	0,577	2,240	0,158	0,993	0,081	-0,336	0,044
WS0019.F22	28,333	6,360	3,667	0,333	2,479	0,322	1,027	0,114	0,216	0,066
PA 28	30,667	8,413	4,333	0,333	2,855	0,249	1,172	0,062	0,068	0,107
WS0073.H08	29,000	7,234	4,667	0,333	2,913	0,174	1,196	0,055	-0,033	0,088
PAAC23	29,333	7,219	7,667	0,667	3,461	0,126	1,565	0,039	-0,123	0,078
WS0023.B03	24,333	5,207	15,000	2,517	9,618	0,996	2,456	0,112	0,060	0,050
WS0092.A19	30,667	7,513	9,333	1,202	5,743	0,177	1,942	0,045	-0,048	0,045
Pa_56	32,000	8,718	3,000	0,000	2,344	0,038	0,926	0,017	-0,276	0,046
PAAC3	31,000	8,505	18,667	1,764	8,373	0,420	2,468	0,032	0,314	0,032
Průměr	28,644	1,601	7,956	0,858	4,470	0,524	1,459	0,105	0,064	0,056

Tabulka č. 6 kde N je průměrný počet vzorků pro daný lokus v rozmezí hodnot od 24,333 – 32 s chybovou odchylkou v rozsahu 4,177 – 8,718 a průměrnými hodnotami 28,644 pro N a 1,6 pro směrodatnou odchylku.

Sloupec *Na* zobrazuje hodnoty diferentních alel v rozpětí 3-18,667 a chybová odchylka nabývá hodnot 0,333-2,517 celkový průměr 7,956 pro *Na* a pro směrodatnou odchylku 0,858. *Ne* neboli počet efektivních alel v rozmezí 1,393-13,199 s celkovým průměrem 4,470 a směrodatnou odchylkou 0,524.

Shannonův informační index *I* má hodnoty 0,273-2,468 s celkovým průměrem 1,459 a směrodatnou odchylkou 0,105.

V posledním sloupci *F* jsou hodnoty fixačního indexu, který zobrazuje odchylku od HW rovnováhy v rozmezí -0,545 -1. První lokus Pt63718 vykazuje zkrácené výsledky z důvodu nevariabilního lokusu a výskytu pouze čtyř alel, proto je třeba výsledky tohoto lokusu brát s rezervou.

Tabulka 7: Průměrné statistické ukazatele mezi lokusy II.

Lokus	Ht	Mean He	Mean Ho	Fis	Fit	Fst	Nm	
Pt63718	0,135	0,132	0,000	1,000	1,000	0,024	10,245	
EATC1E03	0,284	0,282	0,186	0,338	0,345	0,010	24,844	
WS00716.F13	0,937	0,917	0,827	0,098	0,117	0,021	11,429	
Pt71936	0,617	0,612	0,943	-0,540	-0,528	0,008	30,451	
EATC1D02A	0,798	0,782	0,554	0,291	0,305	0,020	12,140	
paGB3	0,756	0,744	0,788	-0,058	-0,041	0,016	15,594	
PA 33	0,554	0,549	0,737	-0,341	-0,329	0,009	28,859	
WS0019.F22	0,595	0,581	0,462	0,204	0,224	0,025	9,936	
PA 28	0,658	0,645	0,607	0,059	0,078	0,020	12,182	
WS0073.H08	0,666	0,654	0,676	-0,032	-0,015	0,017	14,302	
PAAC23	0,716	0,710	0,797	-0,121	-0,113	0,008	32,305	
WS0023.B03	0,909	0,894	0,841	0,059	0,075	0,017	14,840	
WS0092.A19	0,838	0,826	0,865	-0,048	-0,032	0,015	15,903	
Pa_56	0,577	0,573	0,731	-0,275	-0,267	0,007	35,607	
PAAC3	0,902	0,880	0,604	0,313	0,331	0,025	9,765	
				Mean	0,063	0,077	0,016	18,560
				SE	0,093	0,092	0,002	2,358

První sloupec tabulky č.7 je *Ht*, kdy popisuje celkovou heterozygotnost, pokud by všichni jedinci ve všech subpopulacích byli panmiktictí, v tomto případě nabývá hodnot od 0,135 do 0,937.

H_e neboli očekávaná heterozygotnost byla v rozsahu 0,132 – 0,917. Pozorovaná heterozygotnost H_o v hodnotách od 0 – 0,943.

F_{is} představuje průměrnou genotypovou odchylku od HW rovnováhy pro lokus, nabývá rozsahu -0,540 - 1, celkový průměr je 0,063; odchylka 0,093. F_{it} znázorňuje vztah mezi jednotlivcem a celkovým souborem vzorků a nabývá hodnot od -0,528-1 a průměrná hodnota pro všechny lokusy 0,077 s odchylkou 0,092.

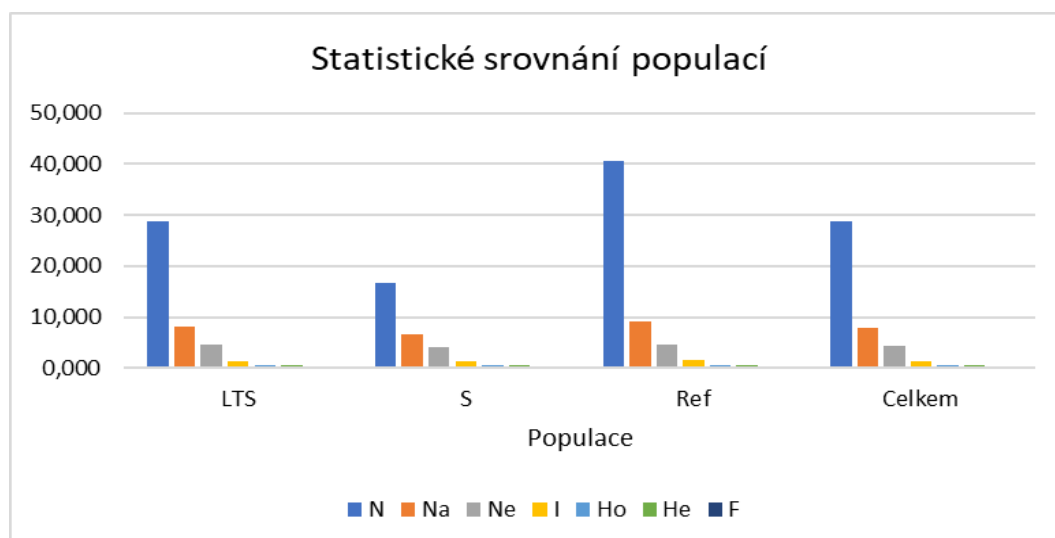
Pokud jsou F_{is} a F_{it} s negativní hodnotou, tak můžeme tvrdit, že je přítomen nadbytek heterozygotů.

Sloupec F_{st} čili míra diferenciace mezi subpopulacemi nebo také známé jako koeficient inbreedingu, v hodnotách od 0,007 – 0,025. V tomto případě se průměrná hodnota rovnala 0,016 s chybovou odchylkou 0,002.

Sloupec N_m , který vyjadřuje genový tok se vypočetl podle vzorce: $N_m = [(1/F_{ST} - 1)]/4$ s rozmezím hodnot od 9,765 do 32,305 a průměrnou hodnotou 18,560 s chybovou odchylkou 2,358.

Tabulka 8: Statistické srovnání populací

Populace	N	Na	Ne	I	Ho	He	F
LTS	28,667	8,067	4,717	1,458	0,620	0,642	0,073
S	16,733	6,667	4,107	1,420	0,684	0,657	0,002
Ref	40,533	9,133	4,587	1,501	0,620	0,657	0,117
Celkem	28,644	7,956	4,470	1,459	0,641	0,652	0,064



Graf 7: Statistické srovnání populací

Tabulka č. 8 poskytuje souhrnný přehled o všech populacích a celkovém průměru populací. Pro lepší přehlednost je tabulka převedena do grafu č. 7.

První hodnotou pod ukazatelem N je průměrný počet vzorků pro každou populaci. Pro LTS byl vstupní vzorek 30 vzorků, populace S měla 18 vzorků a referenční populace měla celkem 48 vzorků. První populace má průměrnou velikost vzorků 28,667 se směrodatnou odchylkou 0,361. Druhá populace, neboli S, má průměrnou velikost 16,733 a velikost směrodatné odchylky 0,396. Třetí populace nabývá průměrné hodnoty 40,533 a nejvyšší směrodatné odchylky ze všech populací 1,91.

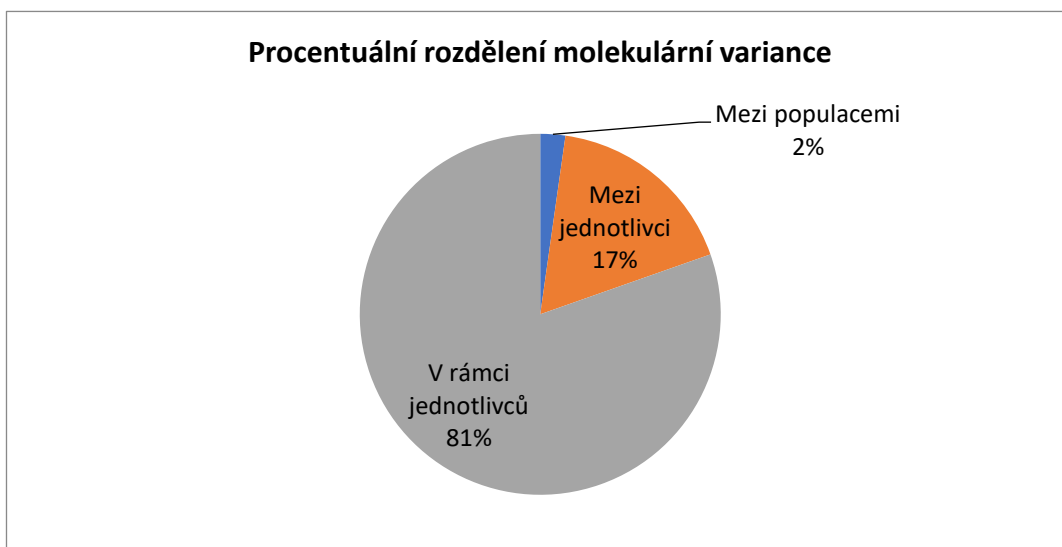
N_a - průměrné alely na lokus; v první populaci LTS má hodnotu 8,067 s chybovou odchylkou 1,614. Pro druhou populaci S nabývá 6,667 a odchylka dosahuje hodnoty 1,072. Referenční populace 9,133 se směrodatnou odchylkou 1,723. Celkový průměr pro všechny 3 populace je 7,956 s odchylkou 0,858.

Počet efektivních alel N_e se částečně liší mezi populacemi v první (LTS) nabývá hodnot 4,717, pro druhou (S) 4,107 a referenční populace má hodnotu 4,587. Celkový průměr pro všechny populace je 4,470 se směrodatnou odchylkou 0,524.

Hodnota genetické diverzity populace je podle Shannonova indexu u první populace 1,458 se směrodatnou odchylkou 0,203. Druhá populace nabývá hodnoty 1,420 s odchylkou 0,165. Třetí populace má hodnotu 1,501 s odchylkou 0,190. Celkový souhrn je 1,459 a směrodatná odchylka 0,105.

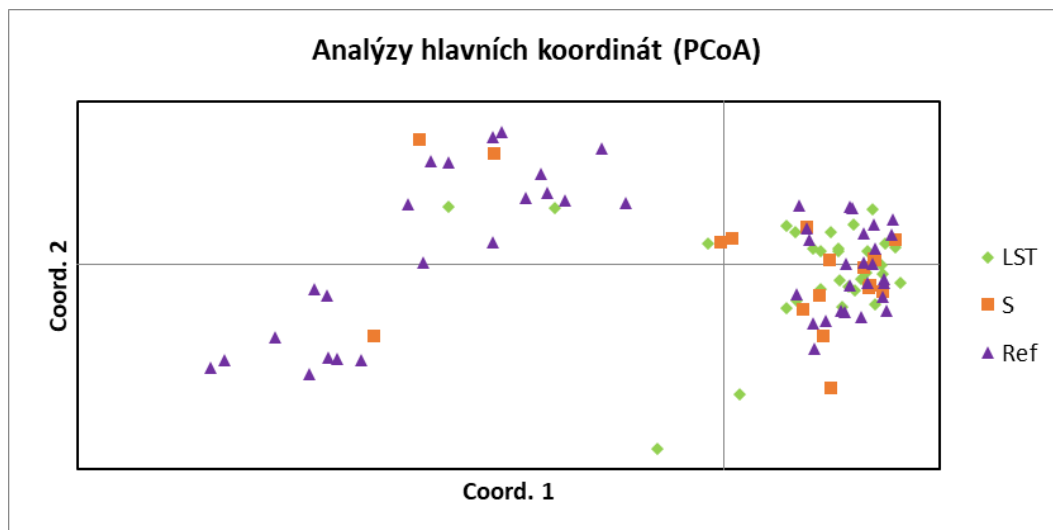
Pokud je pozorovaná heterozygotnost vyšších hodnot než očekávaná ($H_o > H_e$), může to být způsobené příbuzenským křížením. V tomto případě to platí pro populace LTS H_o 0,620 s odchylkou 0,066 a H_e 0,642 s odchylkou 0,063. Druhá populace S H_o 0,684 s odchylkou 0,068 a H_e 0,657 s odchylkou 0,055. Referenční populace má opačný trend, H_o 0,620 a odchylku 0,073; H_e 0,657 s odchylkou 0,054. V celkovém součtu je H_o 0,641 0,039 a H_e 0,652 0,032.

V posledním sloupci jsou hodnoty fixačního indexu, který vychází ze vztahu k HW rovnováze, tedy pokud se hodnota rovná 0, je v souladu s HW. Pro první populaci nabývá hodnoty 0,073 s odchylkou 0,088. U druhé populace je nejnižší a to 0,002 s odchylkou 0,097. Referenční populace má nejvyšší hodnotu 0,0117 s odchylkou 0,110. Celkový průměr pro všechny populace je 0,064 s odchylkou 0,056. Celkový grafický výstup v grafu č. 7. znázorňuje stejný trend napříč všemi populacemi pro všechny sledované parametry.



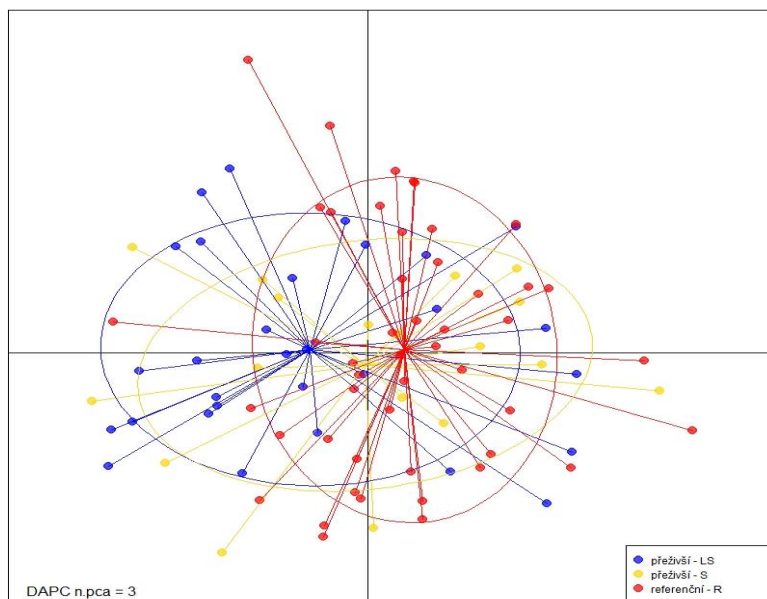
Graf 8: AMOVA

Analýza molekulární variance se využívá pro stupeň genetické diferenciace napříč populacemi vycházející z genetické vzdálenosti a celkového počtu 999 permutací. Graf č. 8 vyobrazuje varianci mezi jednotlivci 17 %, mezi populacemi 2 %, v rámci jednotlivců 81%. Nejvyšší hodnotu variance nabývá v rámci jednotlivců, a to poukazuje na nízkou diferenciaci populace smrku ztepilého.



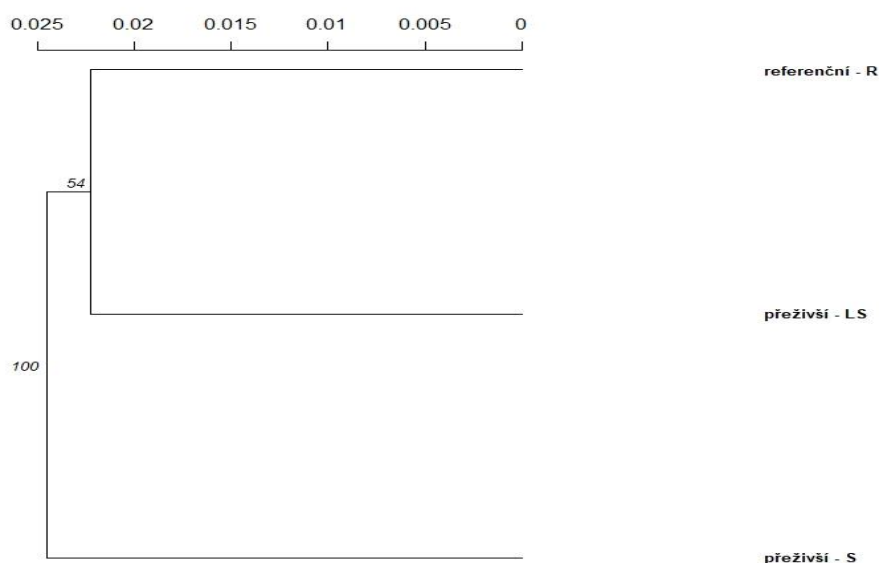
Graf 9: Analýza hlavních koordinát pro jedince

Analýza hlavních koordinát (graf č. 9) vyobrazuje příbuznost mezi jednotlivými vzorky. Tento soubor vzorků sice znázorňuje odlišnosti na ose x mezi pravou a levou částí, ale nedá se konstatovat genetická diferenciace, pokud je většina ze všech jedinců soustředěna do pravé části grafu.



Obrázek 8: Klastrovací analýza metodou *Discriminant analysis of principle components*

Rozdělení tří populací a tedy celkového počtu 96 vzorků v rámci klastrové analýzy zobrazuje obrázek č. 8. Vysoký překryv populací značí minimální genetickou diferenciaci mezi populacemi. Referenční populace má posun k pravé části, to může být způsobeno zatím neuskutečněnou přírodní selekcí.



Obrázek 9: Dendrogram metodou UPGMA s využitím Neiovy genetické vzdálenosti

Dendrogram (obrázek č. 9) vychází ze shluků klastrové analýzy pro populace a znázorňuje vyšší podobnost mezi jedinci z jedné geografické oblasti, než mezi odolnostními a referenční populací. Hlavním výstupem této analýzy je vyšší příbuznost geograficky bližších populací LS a R má na genetickou strukturu vyšší vliv, než dělení populací na přeživší a referenční.

Pro jednotlivce byl vytvořen klastrovací dendrogram, který je celý uvedený v příloze č. 50. K vytvoření byl použit model cílený na mikrosatelitová data (Bruvo et al., 2004). Klastrovací diagram bere v úvahu mutační procesy, proto výsledky této metody zobrazují reálnou situaci více exaktně, než jiné metody. Podle výsledků dendrogramu jsou nejpříbuznější jedinci z různých populací vzdáleni pár desítek metrů 120-220. V některých případech je taková vzdálenost větší i než 40 km.

6 Diskuze

Mezi studovanými populacemi jsou výsledky sledovaných heterozygotností pro všechny populace (H_e 0,652) > (H_o 0,641) a tím korelují s ostatními studii Cvjetkovič et al., (2017), Stojnić (2019), Caré (2018). Máchová, Trčková a Cvrčková (2018) popisuje zjištěnou H_e 0,78 a H_o 0,71. Stejně tak Bínová et al., (2020) zjištěná H_e 0,705; H_o 0,601. Pokud je pozorovaná heterozygotnost (H_o) nižší než očekávaná (H_e), můžeme tento vliv přisuzovat faktorům jako je příbuzenské křížení nebo malá vzdálenost mezi jedinci. S tímto faktem korelují i další výsledky. Ovšem srovnání mezi populacemi má jednu výjimku, kde u druhé populace S je H_o vyšší než H_e a tím předpokládá vyšší míru genového toku na krátké vzdálenosti.

Genetická variabilita podle F_{st} které nabývá hodnoty od 0,009 – 0,025 s průměrem 0,016, je tedy vyšší, než u Bínová et al., (2020), kde F_{st} nabývala průměrné hodnoty 0,008 nebo u Máchové, Trčkové a Cvrčkové (2018) = 0,011. Zjištěný výsledek je nižší než ve studiích Nowakowska (2009) = 0,088; Heuertz (2006) = 0,117; Cvjetkovič (2017) = 0,014. Tollefsrud et al., (2009) = 0,029. Existují i publikované články, kde F_{st} měla mnohem nižší hodnoty (Unger, Konrad a Geburek, 2011) = 0,002. Nízká hodnota tedy poukazuje na nízkou diferenciaci analyzovaných populací.

Migrační koeficient $Nm = 18,56$ vyjadřuje vysokou míru genového toku stejně tak jako ve studiích Verbylaité (2017). $Nm = 71,4$ nebo Nowakowska et al., (2009) $Nm = 18,678$; Bínová et al., (2020) = 56,656. Vysoká hodnota koeficientu může být důsledkem krátké přenosové vzdálenosti mezi sledovanými jedinci. O takové hypotéze vypovídají i provedené klastrovací analýzy a dendrogramy, kdy jsou si dva jedinci ze dvou různých populací nejpříbuznější, ale geografická vzdálenost je pár desítek metrů např. R35 a LS26 mají vzdálenost 220 m, nebo R15 a LS12 140 m, ale vzdálenost mezi nejpříbuznějšími může být i více než 40 km např. R29 a S68, kdy jejich vzdálenost je 46 km.

Původně bylo plánováno využití 18 primerů, jak je zmíněno výše. 3 lokusy v prvním multiplexu nebyly hodnoceny, protože jejich výsledky nebyly hodnotitelné. Vyhodnocováno bylo celkem 15 lokusů od 7 autorů: Besnard et al., (2003), Rungis et al., (2004), Pfeiffer et al. (1997), Scotti et al., (2002), Vendramin et al., (1996), Scotti et al., (2000), Fluch et al., (2011), většina těchto lokusů je hojně využívána ve výzkumech např. Meloni et al., (2007) nebo (Maghuly et al., 2006).

I to je dostatečný počet pro vytvoření genetické analýzy, Cvejtkovič et al., (2017) používají 11 lokusů, stejně tak Caré et al., (2018), nebo Meloni et al., (2007) využívají 7 lokusů dokonce Maghuly et al., (2006) pouze 5 lokusů. Tedy i menší počet lokusů dokáže poskytnout relevantní výsledky. U 7 lokusů vyšly výsledky negativně v rozmezí F_{is} (0,540-0,032) a F_{it} (0,528-0,015) konkrétně Pt71936; paGB; PA33 WS0073.H08; PAAC23; WS0092.A19; PA_56. Negativní hodnota F_{is} je výsledkem přebytku heterozygotů, která sama o sobě znázorňuje odchylku od Hardy-Weinbergovi rovnováhy. Pokud je u F_{it} významná diferenciace od F_{st} může to být díky rozdílným frekvencím alel. V tomto případě nabývá F_{it} 0,077 a F_{st} 0,016.

Zbýlých 8 lokusů Pt 63718; EATC1E03; WS00716.F13; EATCD02A; WS00019.F22; pa28; WS0023.B03; PAAC3 mělo pozitivní výsledky F_{is} (0,059-0,338) a F_{it} (0,075-0,345). U lokusu Pt 63718 dochází ke zkreslení, protože se zde nachází pouze čtyři alely a tento lokus není variabilní, proto hodnoty F_{it} a F_{is} nabývají hodnoty 1.

Neutrální mikrosatelitové markery SSRs detekují polymorfní lokusy s jednoduchou mendelovskou dědičností. Nejvíce polymorfním lokusem byl PAAC3 s celkovým počtem 32 alel, Bínová et al., (2020) popisuje lokus PAAC23 jako nejvíce polymorfní s počtem 36 alel nebo Máchová, Trčková a Cvrčková (2018) popisují největší polymorfismus na lokusu PAAC19 se 38 alelami. Průměrný počet vzorků (N) dosahoval hodnoty 28,6; Máchová, Trčková a Cvrčková (2018) 34,7; Bínová et al., (2020) 145,3. Průměrný počet alel na lokus byl 7,9; tedy nižší ve srovnání s Bínovou et al., (2020) = 14,211 nebo Máchovou, Trčkovou a Cvrčkovou (2018) = 14,5 - tento výsledek je o poznání nižší a ovlivněn volbou markerů. Dalším srovnávacím parametrem je efektivní počet alel (N_e) 4,47 je opět

nižší hodnota, než u Máchové, Trčkové a Cvrčkové (2018) = 8,8 ale je blíže Bínové et al., = 5,943 pro dosažení parametru *He* je tedy potřeba menší množství alel, než u Máchové, Trčkové a Cvrčkové (2018). Výskyt specifických alel pro první populaci byl 15, pro druhou 6 a u třetí dokonce 22. Specifickou alelou je myšlena taková alela, která se vyskytuje pouze jednou napříč všemi populacemi. Právě specifická alela by mohla mít za následek vyšší odolnost, stejně jako popisuje Miguel et al., (2016), kdy specifická alela zvyšuje produkci katechinu a tím se snižuje pravděpodobnost napadení kořenovníkem smrkovým (*Heterobasidion parviporum*)

Využité markery jsou velmi hojně používány Acheré et al., (2004); Shi et al., (2014) a další. Použití SSRs není tak finančně náročné, náklady jsou v řádu desítek korun na jeden vzorek. Nevýhodou těchto markerů jsou nulové alely, které mohou zkreslit svým výskytem výsledky, kdy z homozygota mohou vytvořit heterozygota.

Genetický vliv na odolnost jedinců je v tomto konkrétním případě neprokázaný, stejně jako ve studii (Six, Vergobbi a Cutter, 2018). Ovšem zjištění Zas et al., (2017) nebo Miguel et al., (2016) podporuje tvrzení genetické odolnosti jedinců vůči biotickým škůdcům a doporučují další studie pro zjištění efektivity tohoto vlivu.

7 Závěr

Zpracovaná diplomová práce, která měla za cíl detekovat genetickou variabilitu tří populací smrku ztepilého, má inspiraci v současném stavu smrkových lesů. Analyzovaný soubor vzorků neprokázal výraznou genetickou odlišnost mezi sledovanými populacemi. Vzhledem k využitým neutrálním SSRs markerů byl takový výsledek v očekávání. Přesto práce přináší zajímavé výsledky o genetických parametrech mezi sledovanými populacemi. Výstupem je vyšší pozorovaná heterozygotnost než očekávaná u populace S oproti ostatním. Druhým je největší příbuznost dvou jedinců i přes vzdálenost větší než 40 km. Získané výsledky se zásadním způsobem neliší od již publikovaných článků z České republiky.

Stále je na místě otázka, co způsobuje vyšší odolnostní potenciál jedinců. Pro další studie nastává domněnka, zda by větší soubor vzorků zásadně změnil tyto publikované výsledky. V každém případě již existují zahraniční studie, které také nenesou jednotný názor na tuto problematiku.

Doporučením pro budoucí studie je využití více specifických a sofistikovaných nástrojů, jako je genotypování pomocí SNP (single nucleotide polymorphisms) markerů, které mají větší schopnost detekce mezi jedinci druhu a mohou odhalit genetické odlišnosti. Díky efektivní metodě sekvenování je získání informací vyšší než u SSRs. Mikrosatelity jsou vhodnější pro využití při sledování geograficky menších oblastí 50-100 km. Oproti tomu SNP mají schopnost detekce genetické struktury populací na větších vzdálenostech (1000 km). Využití SNP by mohlo objasnit otázku, jakou roli hraje přirozený tok genů v rámci populací.

V celkovém souhrnu z toho tedy plyne potřeba, dále sledovat a hledat příčiny odolnosti jedinců, protože genetická diferenciacce mezi odolnostní a referenční populací nebyla pomocí mikrosatelitů odhalena. Z toho důvodu je třeba využít sofistikovanější metody.

8 Použitá literatura

ADDGENE, 2020. *How to Design a Primer*. Wartertown.

ACHERÉ, V. et al., 2004. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers. *Theoretical and Applied Genetics*. **108**(8), 1602-1613. ISSN 0040-5752. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-004-1587-y

ALBERT, M. a M. SCHMIDT, 2010. Climate-sensitive modelling of site-productivity relationships for Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) and common beech (*Fagus sylvatica* L.). *Forest Ecology and Management*. **259**(4), 739-749. ISSN 03781127. Dostupné z: doi:10.1016/j.foreco.2009.04.039

ANDROSIUK, P. et al., 2013. Genetic status of Norway spruce (*Picea abies*) breeding populations for northern Sweden. *Silvae Genetica* [online]. **62**(1-6), 127-136 [cit. 2021-03-21]. ISSN 00375349. Dostupné z: doi:10.1515/sg-2013-0017

ASLAM, Abdul Qayyum et al., 2017. Vulnerability and impact assessment of extreme climatic event: A case study of southern Punjab, Pakistan. *Science of The Total Environment*. **580**, 468-481. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2016.11.155

ATKIN, Owen, 2015. New Phytologist and the 'fate' of carbon in terrestrial ecosystems. *New Phytologist* [online]. **205**(1), 1 [cit. 2021-03-06]. ISSN 0028646X. Dostupné z: https://www-jstor-org.infozdroje.czu.cz/stable/newphytologist.205.1.1?seq=1#metadata_info_tab_contents

AVERY, Oswald T., Colin M. MACLEOD a Maclyn MCCARTY, 1944. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *Journal of Experimental Medicine*. **79**(2), 137-158. ISSN 1540-9538. Dostupné z: doi:10.1084/jem.79.2.137

BAIER, P, 1996. Defence reactions of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) to controlled attacks of *Ips typographus* (L.) (Col., Scolytidae) in relation to tree parameters. *Journal of Applied Entomology*. **120**(1-5), 587-593. ISSN 09312048. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0418.1996.tb01656.x

BALOGH, Sharleen L. et al., 2018. Single-generation effects on terpenoid defenses in lodgepole pine populations following mountain pine beetle infestation. *PLOS ONE*. **13**(5). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0196063

BESNARD, G. et al., 2003. PRIMER NOTE A set of cross-species amplifying microsatellite markers developed from DNA sequence databanks in *Picea* (Pinaceae). *Molecular Ecology Notes* [online]. **3**(3), 380-383 [cit. 2021-03-25]. ISSN 14718278. Dostupné z: doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00456.x

BÍNOVÁ, Zuzana et al., 2020. Genetic Structure of Norway Spruce Ecotypes Studied by SSR Markers. *Forests* [online]. **11**(1), 110-110 [cit. 2021-04-06]. ISSN 19994907. Dostupné z: doi:10.3390/f11010110

BOONE, Celia K. et al., 2013. Bacteria Associated with a Tree-Killing Insect Reduce Concentrations of Plant Defense Compounds. *Journal of Chemical Ecology*. **39**(7), 1003-1006. ISSN 0098-0331. Dostupné z: doi:10.1007/s10886-013-0313-0

BRUVO, R. et al., 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular ecology*. **13**(7), 2101-6. ISSN 09621083. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x

BURCZYK, J, A LEWANDOWSKI a W CHALUPKA, 2004. Local pollen dispersal and distant gene flow in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Forest Ecology and Management* [online]. **197**(1), 39-48 [cit. 2021-03-17]. ISSN 03781127. Dostupné z: doi:10.1016/j.foreco.2004.05.003

CARÉ, Oliver et al., 2018. High Morphological Differentiation in Crown Architecture Contrasts with Low Population Genetic Structure of German Norway Spruce Stands. *Forests*. **9**(12). ISSN 1999-4907. Dostupné z: doi:10.3390/f9120752

CVJETKOVIC, Branislav et al., 2017. Norway spruce (*Picea abies* Karst.) variability in progeny tests in Bosnia and Herzegovina. *Genetika*. **49**(1), 259-272. ISSN 0534-0012. Dostupné z: doi:10.2298/GENSR1701259C

ČERMÁK, Petr, 2007. Defoliace a radiální růst ukazatelé vitality smrku ztepilého. *Lesnická práce* [online]. **86**(11), 14-15 [cit. 2021-03-04]. Dostupné z: <http://www.lesprace.cz/casopis-lesnicka-prace-archiv/rocnik-86-2007/lesnicka-prace-c-11-07/defoliace-a-radialni-rust-ukazatele-vitality-smrku-ztepileho>

DE LA TORRE, Amanda R. et al., 2019. Genomic architecture of complex traits in loblolly pine. *New Phytologist* [online]. **221**(4), 1789-1801 [cit. 2021-03-17]. ISSN 0028646X. Dostupné z: doi:10.1111/nph.15535

DE SOUSA, S.N., R. KINKELDEY a O. GAILING, 2005. Experimental verification of microsatellite null alleles in Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.): implications for population genetic studies. *Plant molecular biology reporter* [online]. **23**(2), 113-119 [cit. 2021-04-04]. ISSN 07359640. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com/infodroje.czu.cz/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=6&sid=f93084f7-fb8b-4abe-933d-36de805aa4f1%40sessionmgr4007>

DOLEŽAL, Tomáš, 2019. Variabilita DNA. *Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích: Přírodovědecká fakulta* [online]. České Budějovice [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://www.prf.jcu.cz/zmb/menu/variabilita-dna.html>

EDWARDS, M. C. a R. A. GIBBS, 1994. Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR methods and applications* [online]. **3**(4), S65-75 [cit. 2021-04-08]. ISSN 10549803. Dostupné z: doi:10.1101/gr.3.4.s65

ERBER, Aleš, 2019. ZACHRÁNÍ SEDLÁCI SVÉ LESY?: Eliminace hospodářských škod při obnově lesa. *Selská revue*. Praha: Asociace soukromého zemědělství ČR, **2**(4), 66-67.

ERBILGIN, Nadir et al., 2017. Weathering the storm: how lodgepole pine trees survive mountain pine beetle outbreaks. *Oecologia*. **184**(2), 469-478. ISSN 0029-8549. Dostupné z: doi:10.1007/s00442-017-3865-9

ERIKSSON, Gösta, Inger EKBERG a David CLAPHAM, 2013. *Genetics applied to forestry: an introduction*. 1. Uppsala: Department of Plant Biology and Forest Genetics, Swedish University of Agricultural Sciences. ISBN 978-91-576-9187-3.

FLUCH, Silvia et al., 2011. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). *BMC Research Notes* [online]. **4**(1), 401-406 [cit. 2021-03-25]. ISSN 17560500. Dostupné z: doi:10.1186/1756-0500-4-401

FOIT, Tomáš, 2019. Přestavba lesa lovem aneb myslivost jako klíčový pěstební úkon. *Lesnická práce* [online]. **98**(8), 26-29 [cit. 2021-03-20]. Dostupné z: <https://prosilvabohemica.cz/wp-content/uploads/2019/08/1908-Lp-26-29-Foit.pdf>

FÜHRER, Erwin, Ludwig WIENER a Bernadette HAUSMANN, 1992. Dynamik von Terpen-Mustern und Borkenkäfer- Befall an Fangbaum-Fichten unterschiedlichen Kronen-Zustandes (Coleoptera: Scolytidae). *Entomologia Generalis*. **17**(3), 207-218. ISSN 0171-8177. Dostupné z: doi:10.1127/entom.gen/17/1992/207

GALOVIC, Vladislava et al., 2015. Genetic differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) trees with diferent crown types from the mountain Golija. *Genetika*. **47**(3), 849-861. ISSN 0534-0012. Dostupné z: doi:10.2298/GENSR1503849G

GRONAU, Ilan a Shlomo MORAN, 2007. Optimal implementations of UPGMA and other common clustering algorithms. *Information Processing Letters*. **104**(6), 205-210. ISSN 00200190. Dostupné z: doi:10.1016/j.ipl.2007.07.002

HÁJKOVÁ, L. et al., 2012. The temporal and spatial variability of phenological phases of the Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karsten) in the Czech Republic / Časová a prostorová variabilita nástupu fenologických fází smrku ztepilého (*Picea abies* (L.) Karsten) v České republice. *Folia Oecologica (Slovak Republic)* [online]. **39**(1), 10-20 [cit. 2021-03-23]. ISSN 13365266. Dostupné z: http://ife.sk/wp-content/uploads/2016/10/Hajkova_web.pdf

HANEWINKEL, Marc, Susan HUMMEL a Dominik A. CULLMANN, 2010. Modelling and economic evaluation of forest biome shifts under climate change in Southwest Germany. *Forest Ecology and Management*. **259**(4), 710-719. ISSN 03781127. Dostupné z: doi:10.1016/j.foreco.2009.08.021

HARRIS, Randall K., 2019. DNA structure and function. *Salem Press Encyclopedia of Health* [online]. [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <http://eds.b.ebscohost.com/eds/eds/detail/detail?vid=7&sid=94da71d3-9178-48da-9ae7-3f81d24262a2%40sessionmgr4006&bdata=Jmxhbmc9Y3Mmc2l0ZT1lZHMtbG12ZQ%3d%3d#AN=94416454&db=ers>

HEUERTZ, M. et al., 2006. Multilocus patterns of nucleotide diversity, linkage disequilibrium and demographic history of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. *Genetics* [online]. **174**(4), 2095-105 [cit. 2021-03-17]. ISSN 00166731. Dostupné z: doi:10.1534/genetics.106.065102

HILMERS, Torben et al., 2019. The productivity of mixed mountain forests comprised of *Fagus sylvatica*, *Picea abies*, and *Abies alba* across Europe. *Forestry: An International Journal of Forest Research*. **92**(5), 512-522. ISSN 0015-752X. Dostupné z: doi:10.1093/forestry/cpz035

HILMERS, Torben et al., 2020. Assessing transformation scenarios from pure Norway spruce to mixed uneven-aged forests in mountain areas. *European Journal of Forest Research* [online]. **139**(4), 567-584 [cit. 2021-04-05]. ISSN 16124669. Dostupné z: doi:10.1007/s10342-020-01270-y

HLÁSNY, T. et al., 2021. Devastating outbreak of bark beetles in the Czech Republic: Drivers, impacts, and management implications. *Forest Ecology and Management*. **490**. ISSN 03781127. Dostupné z: doi:10.1016/j.foreco.2021.119075

HUANG, J. et al., 2019. Eyes on the future - evidence for trade-offs between growth, storage and defense in Norway spruce. *The New phytologist* [online]. **222**(1), 144-158 [cit. 2021-03-06]. ISSN 14698137. Dostupné z: doi:10.1111/nph.15522

CHLUMSKÝ, Jan, 2015. Analýza mikrosatelitů. *Laboratoř molekulární biologie rostlin PřF JU* [online]. České Budějovice [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://botanika.prf.jcu.cz/laboratory/mikrosatelity.html>

JACTEL, Hervé et al., 2009. The influences of forest stand management on biotic and abiotic risks of damage. *Annals of Forest Science*. **66**(7), 701-701. ISSN 1286-4560. Dostupné z: doi:10.1051/forest/2009054

JAKUŠ, R. et al., 2011. Characteristics of Norway spruce trees (*Picea abies*) surviving a spruce bark beetle (*Ips typographus* L.) outbreak. *Trees structure and function* [online]. **25**(6), 965-973 [cit. 2021-03-06]. ISSN 09311890. Dostupné z: doi:10.1007/s00468-011-0571-9

JANDA, Pavel et al., 2019. Drivers of basal area variation across primary late-successional *Picea abies* forests of the Carpathian Mountains. *Forest Ecology and Management*. **435**, 196-204. ISSN 03781127. Dostupné z: doi:10.1016/j.foreco.2018.12.045

JARNE, Philippe a Pierre J.L. LAGODA, 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology* [online]. **11**(10), 424-429 [cit. 2021-04-04]. ISSN 01695347. Dostupné z: doi:10.1016/0169-5347(96)10049-5

JOMBART, T., S. DEVILLARD a F. BALLOUX, 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics* [online]. **11**, 94 [cit. 2021-04-15]. ISSN 14712156. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2156-11-94

JOMBART, Thibaut, 2008. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*. **24**(11), 1403-1405. ISSN 1460-2059. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/btn129

KOLEJKA, Jaromír et al., 2010. POLOMY NA ŠUMAVĚ ZPŮSOBENÉ ORKÁNEM KYRILL A SPOLUÚČAST RELIÉFU NA POŠKOZENÍ LESA. *GEOMORPHOLOGIA SLOVACA ET BOHEMICA*. (2).

KRÁSA, Petr, 2007. PICEA ABIES (L.) H. Karst. – smrk ztepilý / smrek obyčejný. *Botany.cz* [online]. [cit. 2020-10-20]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/picea-abies/>

KŘÍSEK, Štěpán a Milan ŽÁRNÍK, 2007. Aktuální versus přirozené rozšíření smrku ztepilého v ČR aneb kolik je přirozených smrčín? *Vesmír*. **86**(12), 778-779.

KŘÍSTEK, Štěpán a Jaroslav HOLUŠA, 2014. Abiotické poškození smrkových porostů ve střední Evropě: příkladová studie sněhových polomů z let 2005–2011 v Moravskoslezských Beskydech / Abiotic damage of spruce stands in central Europe. *Forestry Journal*. **60**(4), 214-222. ISSN 0323-1046. Dostupné z: doi:10.1515/forj-2015-0003

KUNT, Miroslav, 2007. Picea abies. *Dendrologie online* [online]. [cit. 2020-11-09]. Dostupné z: <http://database.dendrologie.cz/index.php?menu=5&id=29146>

LARCHER, Walter, 1988. *Fyziologická ekologie rostlin*. 1. Praha: Academia, 368 s. ISBN 21-102-88.

LI, H. et al., 2013. A high-throughput, high-quality plant genomic DNA extraction protocol. *Genetics and Molecular Research*. **12**(4), 4526-4539. ISSN 16765680. Dostupné z: doi:10.4238/2013.October.15.1

LI, You-chun et al., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms. *Molecular Ecology* [online]. **11**(12), 2453-2465 [cit. 2021-04-04]. ISSN 09621083. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-294X.2002.01643.x

LORENC, František, 2019. Kromě kůrovce ohrožuje smrky také václavka, borovice čelí plošnému usychání. In: *Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti* [online]. Strnady: VÚHLM [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <https://www.vulhm.cz/krome-kurovce-ohrozuje-smrky-take-vaclavka-borovice-celi-plosnemu-usychani/>

MAGHULY, F. et al., 2006. Genetic diversity in managed subpopulations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Forest Ecology and Management*. **222**(1-3), 266-271. ISSN 03781127. Dostupné z: doi:10.1016/j.foreco.2005.10.025

MAGHULY, F. et al., 2006. Genetic diversity in managed subpopulations of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Forest Ecology and Management* [online]. **222**(1), 266-271 [cit. 2021-03-21]. ISSN 03781127. Dostupné z: doi:10.1016/j.foreco.2005.10.025

MÁCHOVÁ, Pavlína, Olga TRČKOVÁ a Helena CVRČKOVÁ, 2018. Use of Nuclear Microsatellite Loci for Evaluating Genetic Diversity of Selected Populations of *Picea abies* (L.) Karsten in the Czech Republic. *Forests*. **9**(2). ISSN 1999-4907. Dostupné z: doi:10.3390/f9020092

MCPHERSON, Michael J. a Simon Geir MOLLER, 2006. *PCR*. 2nd ed. New York: Taylor & Francis Group. ISBN 04-153-5547-8.

MEHRA, P. N. a T. N. KHOSHOO, 1956. Cytology of conifers. I. *Journal of Genetics*. **54**(1), 165-180. ISSN 0022-1333. Dostupné z: doi:10.1007/BF02981708

MELONI, Marilena, Davide PERINI a Giorgio BINELLI, 2007. The distribution of genetic variation in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations in the western Alps. *Journal of Biogeography*. **34**(6), 929-938. ISSN 0305-0270. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2699.2006.01668.x

MIGUEL, Nemesio-gorriz et al., 2016. Different Alleles of a Gene Encoding Leucoanthocyanidin Reductase (PaLAR3) Influence Resistance against the Fungus *Heterobasidion parviporum* in *Picea abies*. *Plant Physiology* [online]. **171**(4), 2671 [cit. 2021-04-17]. ISSN 00320889. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/content/plantphysiol/171/4/2671.full.pdf>

MLYNÁŘ, Patrik, 2019. *Metodický pokyn ke snížení početních stavů spárkaté zvěře* [online]. In: . Praha: MZE, s. 1-4 [cit. 2021-03-20]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/633002/Methodicky_pokyn_ke_snizovani_pocetnich_stavu_NM.pdf

MODLINGER, Roman a Vítězslava PEŠKOVÁ, 2017. Kloubnatka smrková nadále ohrožuje lesy Krušných hor. In: *Lesnická práce* [online]. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce [cit. 2021-03-10]. Dostupné z: <http://www.silvarium.cz/lesnictvi/kloubnatka-smrkova-nadale-ohrozuje-lesy-krusnych-hor>

MORSE, Alison M. et al., 2009. Evolution of Genome Size and Complexity in Pinus. *PloS one* [online]. **4**(2) [cit. 2021-03-17]. ISSN 19326203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0004332](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004332)

MUSIL, Ivan, Jan HAMERNÍK a Gabriela LEUGNEROVÁ, 2002. *Lesnická dendrologie 1: jehličnaté dřeviny : přehled nahosemenných (i výtrusných) dřevin*. 2. Praha: Česká zemědělská univerzita. ISBN 80-213-0992-X.

MZE, 2019. *ZPRÁVA O STAVU LESA A LESNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ ČESKÉ REPUBLIKY V ROCE 2019*. 1. Praha: MZE. ISBN 978-80-7434-571-5.

NEI, Masatoshi, 1972. Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist*. **106**(949), 283-292. ISSN 00030147.

NEUNER, Susanne et al., 2015. Survival of Norway spruce remains higher in mixed stands under a dryer and warmer climate. *Global Change Biology*. **21**(2), 935-946. ISSN 1354013. Dostupné z: [doi:10.1111/gcb.12751](https://doi.org/10.1111/gcb.12751)

NOWAKOWSKA, Justyna, 2009. Mitochondrial and nuclear DNA differentiation of *Picea abies* populations in Poland. *Dendrobiology*. **61**, 119-129.

NOŽIČKA, Josef, 1972. *Původní výskyt smrku v českých zemích*. 1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství.

NYSTEDT, Björn et al., 2013. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature* [online]. **497**(7451), 579-584 [cit. 2021-03-17]. ISSN 00280836. Dostupné z: [doi:10.1038/nature12211](https://doi.org/10.1038/nature12211)

PAULE, Ladislav a I. HAMPLOVÁ, 1992. *Genetika a šľachtenie lesných drevín / Ladislav Paule / I. Hamplová ... [aj.]*. ISBN 8007004092.

PEAKALL, R. a P. E. SMOUSE, 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*. **28**(19), 2537-2539. ISSN 1367-4803. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bts460

PETIT, R.J. et al., 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular ecology* [online]. **14**(3), 689-701 [cit. 2021-03-07]. ISSN 09621083. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-294X.2004.02410.x?sid=EBSCO%3Aedsagr>

PETTERSSON, Marie et al., 2008. Mini-seedlings of *Picea abies* are less attacked by *Hylobius abietis* than conventional ones: Is plant chemistry the explanation? *Scandinavian Journal of Forest Research*. **23**(4), 299-306. ISSN 0282-7581. Dostupné z: doi:10.1080/02827580802203560

PFEIFFER, Antonella, Angelo M. OLIVIERI a Michele MORGANTE, 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*. **40**(4), 411-419. ISSN 0831-2796. Dostupné z: doi:10.1139/g97-055

PFEIFFER, A., A.M. OLIVIERI a M. MORGANTE, 1997. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome* [online]. **40**(4), 411-419 [cit. 2021-03-25]. ISSN 08312796. Dostupné z: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301791967>

PIRAS, Monica et al., 2016. Impacts of climate change on precipitation and discharge extremes through the use of statistical downscaling approaches in a Mediterranean basin. *Science of The Total Environment*. **543**, 952-964. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2015.06.088

PLÍVA, Karel, 2000. *Trvale udržiteľné obhospodarování lesů podle souborů lesních typů*. Brandýs nad Labem: Ústav pro hospodářskou úpravu lesů.

PLOMION, Christophe et al., 2018. Oak genome reveals facets of long lifespan. *Nature Plants* [online]. **4**(7), 440-452 [cit. 2021-04-15]. ISSN 20550278. Dostupné z: doi:10.1038/s41477-018-0172-3

POLENO, Zdeněk a Stanislav VACEK, 2011. *Pěstování lesů*. 2., upr. a dopl. vyd. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce. ISBN 978-808-7154-991.

PRETZSCH, Hans et al., 2015. Long-term stand dynamics of managed spruce–fir–beech mountain forests in Central Europe: structure, productivity and regeneration success. *Forestry*. **88**(4), 407-428. ISSN 0015-752X. Dostupné z: doi:10.1093/forestry/cpv013

RELICHOVÁ, Jiřina, 1997. Genetická variabilita. In: *Vesmír* [online]. [cit. 2021-03-16]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1997/cislo-7/geneticka-variabilita.html>

RUNGIS, D. et al., 2004. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theoretical and applied genetics* [online]. **109**(6), 1283-1294 [cit. 2021-03-25]. ISSN 00405752. Dostupné z: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300961144>

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RYCHTECKÁ, Petra a Naděžda URBAŇCOVÁ, 2008. Škodliví činitelé lesa v letech 1996–2006 – I. část: Abiotičtí a antropogenní činitelé. *Lesnická práce*. Kostelec nad Černými lesy: Lesnická práce, **87**(6), 14-15.

SANGER, F., S. NICKLEN a A. R. COULSON, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **74**(12), 5463-5467. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.74.12.5463

SAVOLAINEN, Outi, Tanja PYHÄJÄRVI a Timo KNÜRR, 2007. Gene Flow and Local Adaptation in Trees. *Annual review of ecology, evolution, and systematics* [online]. **38**(12), 595-619 [cit. 2021-03-09]. ISSN 1543592X. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095646

SCOTTI, I et al., 2000. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome*. **43**(1), 41-46. ISSN 0831-2796. Dostupné z: doi:10.1139/g99-095

SCOTTI, I. et al., 2002. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*. **106**(1), 40-50. ISSN 0040-5752. Dostupné z: doi:10.1007/s00122-002-0986-1

SCOTTI, Ivan et al., 2006. Population genetics of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation. *Annals of Forest Science* **5** (63), 485-491. (2006) [online]. 485-491 [cit. 2021-04-04]. ISSN edsagr. Dostupné z: doi:10.1051/forest:2006029

SEIDL, Rupert, Werner RAMMER a Manfred J. LEXER, 2011. Adaptation options to reduce climate change vulnerability of sustainable forest management in the Austrian Alps. *Canadian journal of forest research* [online]. **41**(4), 694-706 [cit. 2021-04-05]. ISSN 00455067. Dostupné z: doi:10.1139/x10-235

SELKOE, Kimberly A. a Robert J. TOONEN, 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters* [online]. **9**(5), 615-629 [cit. 2021-04-04]. ISSN 1461023X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x

SHI, Yong-Zhong et al., 2014. Highly Informative Single-Copy Nuclear Microsatellite DNA Markers Developed Using an AFLP-SSR Approach in Black Spruce (*Picea mariana*) and Red Spruce (*P. rubens*). *PLoS ONE*. **9**(8). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0103789

SCHUELER, Silvio et al., 2013. Adaptive genetic diversity of trees for forest conservation in a future climate: a case study on Norway spruce in Austria. *Biodiversity and Conservation*. **22**(5), 1151-1166. ISSN 0960-3115. Dostupné z: doi:10.1007/s10531-012-0313-3

SIX, Diana L., Clare VERGOBBI a Mitchell CUTTER, 2018. Are Survivors Different? Genetic-Based Selection of Trees by Mountain Pine Beetle During a Climate Change-Driven Outbreak in a High-Elevation Pine Forest. *Frontiers in Plant Science*. **9**. ISSN 1664-462X. Dostupné z: doi:10.3389/fpls.2018.00993

SOFTGENETICS, 2012. *Genemarker: The Biologist Friendly Software*. State Collage PA.

SOKAL, Robert a Charles MICHENER, 1958. A statistical Method for Evaluating Systematic Relationships. *Science Bulletin*. **38**(22), 1409-1437.

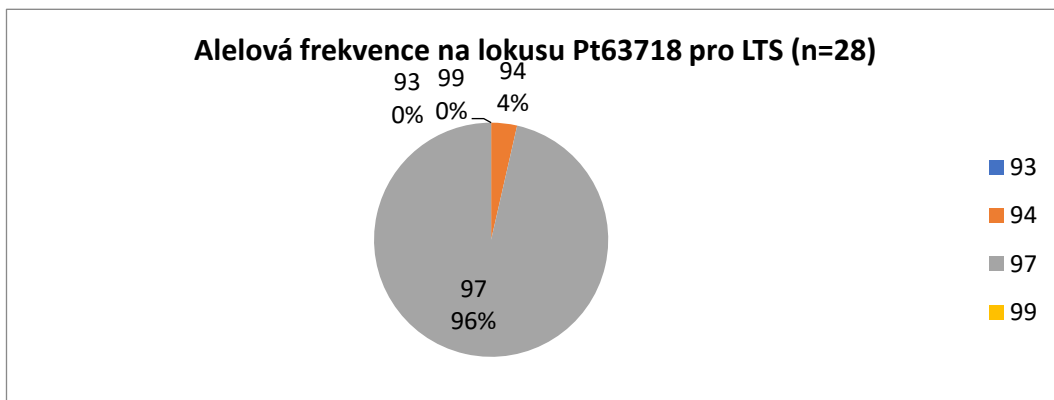
SPIECKER, Heinrich, 2004. Norway Spruce conversion - options and consequences. *Norway Spruce conversion - options and consequences / edited by Heinrich Spiecker ... [et al.]*. ISBN 9004137289. ISSN 12388785.

STOJNIĆ, Srđan et al., 2019. Assessment of Genetic Diversity and Population Genetic Structure of Norway Spruce (*Picea abies* (L.) Karsten) at Its Southern Lineage in Europe. Implications for Conservation of Forest Genetic Resources. *Forests*. **10**(3). ISSN 1999-4907. Dostupné z: doi:10.3390/f10030258

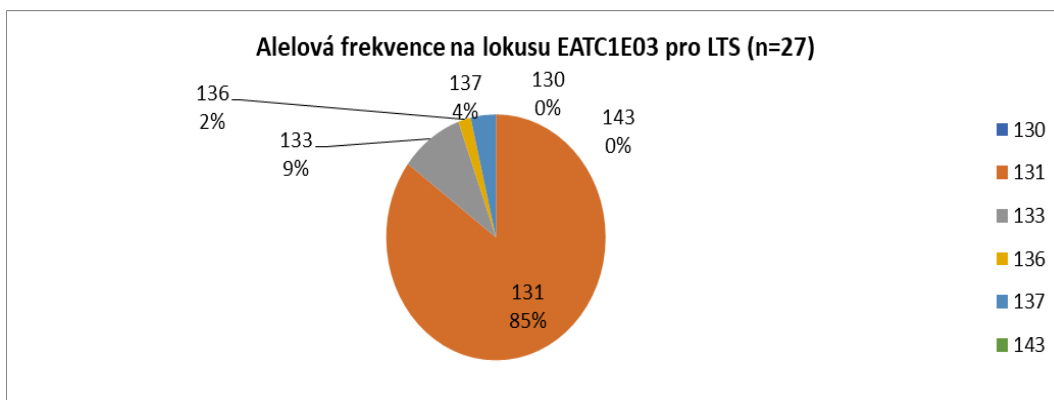
SVOBODA, Pravdomil, 1953. *Lesní dřeviny a jejich porosty. Část I, [Jehličnaté] / Pravomil Svoboda* [online]. 1. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. ISBN 88–149.

Přílohy

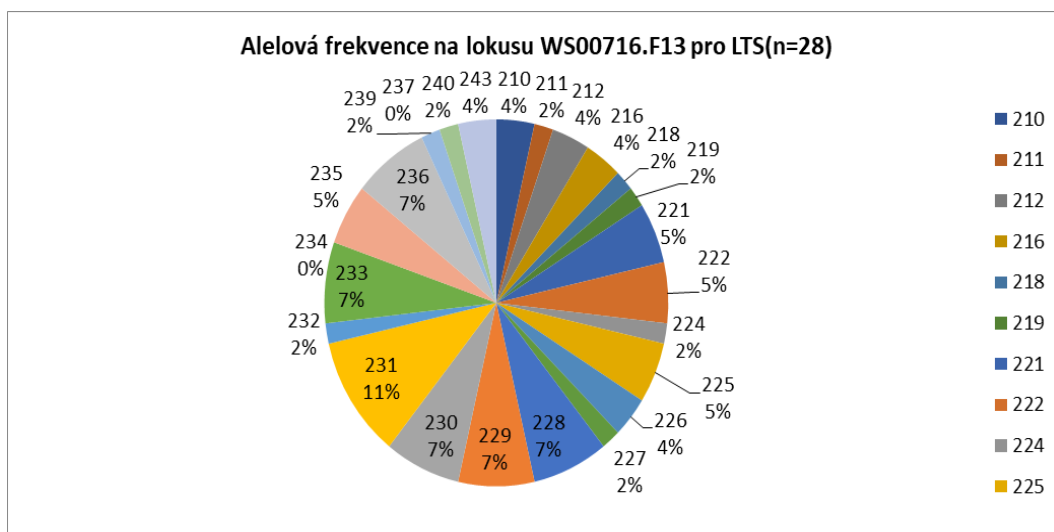
Lokusy první populace:



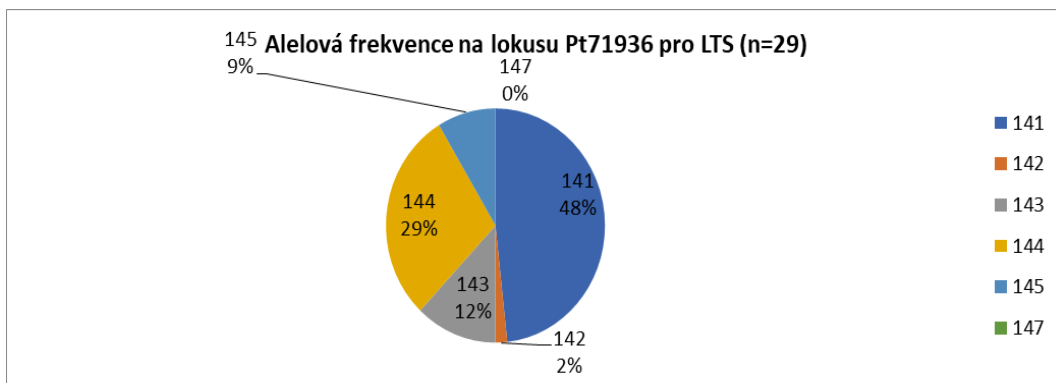
Příloha 1: Frekvence lokusu Pt 63718 pro LTS



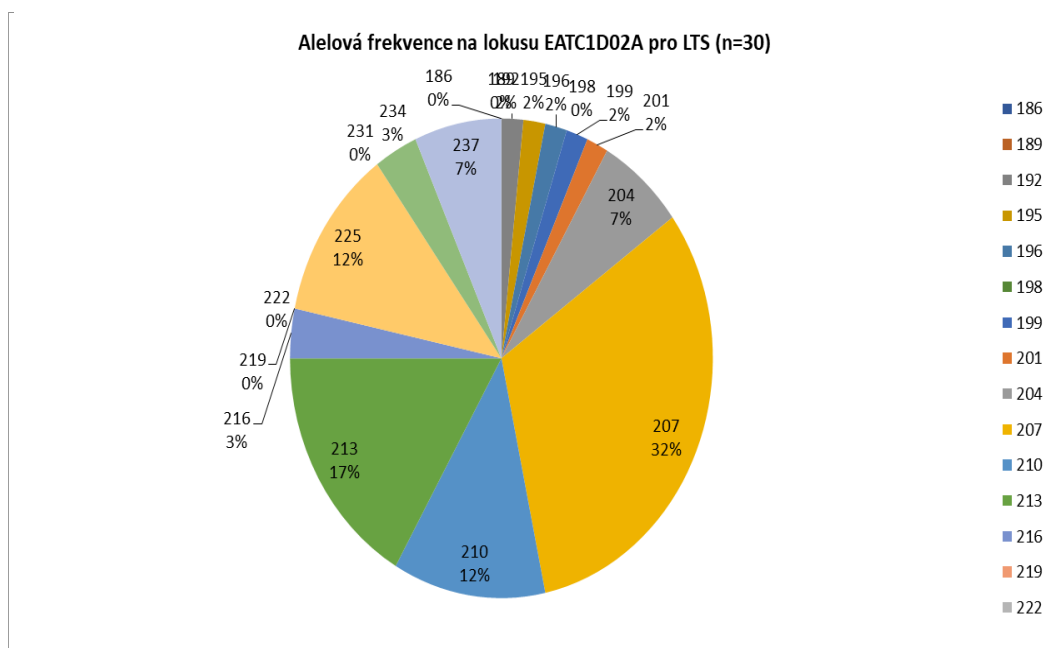
Příloha 2: Frekvence lokusu EATC1E03 pro LTS



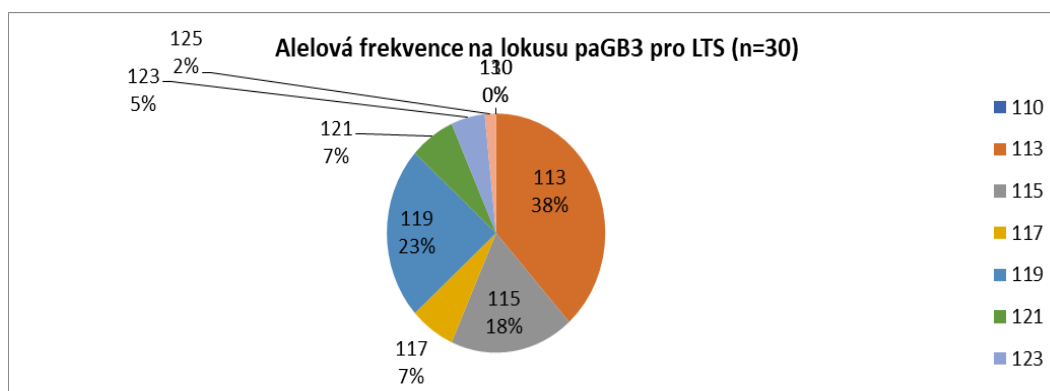
Příloha 1: Frekvence lokusu WS00716.F13 pro LTS



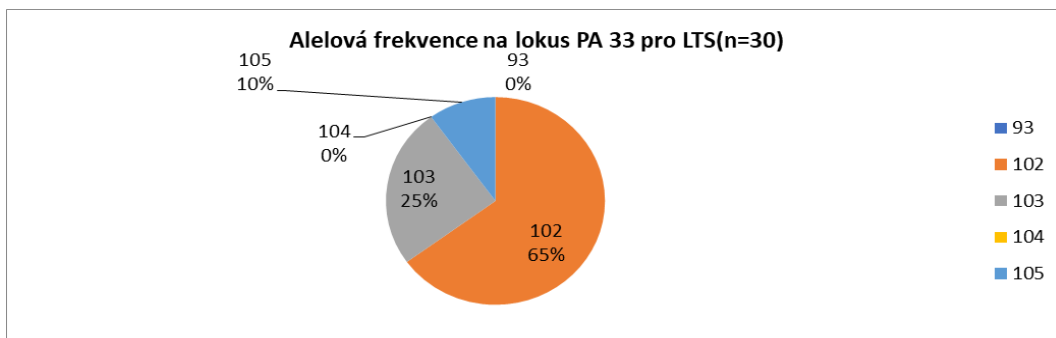
Příloha 2: Frekvence lokusu Pt71936 pro LTS



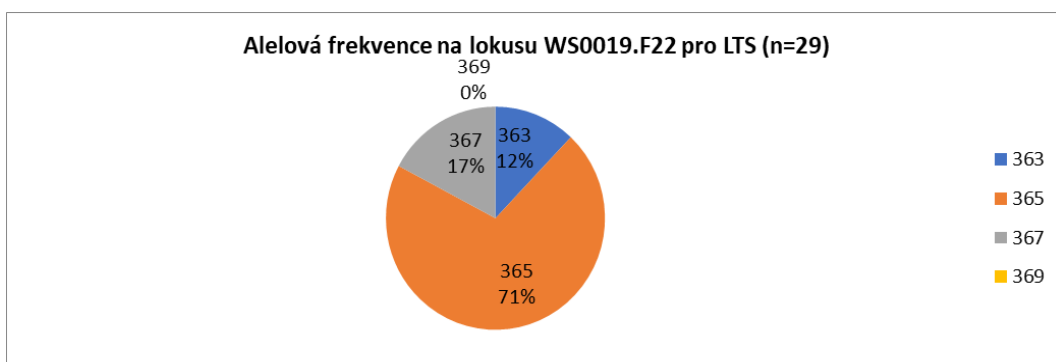
Příloha 3: Frekvence lokusu EATC1D02A pro LTS



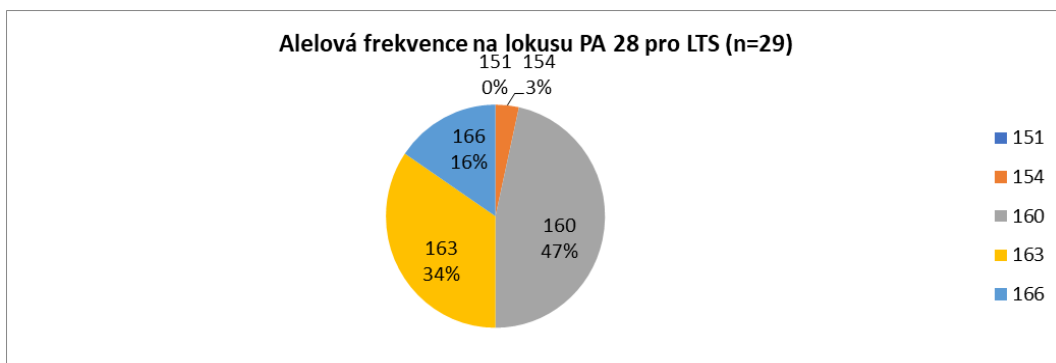
Příloha 4: Frekvence lokusu paGB3 pro LTS



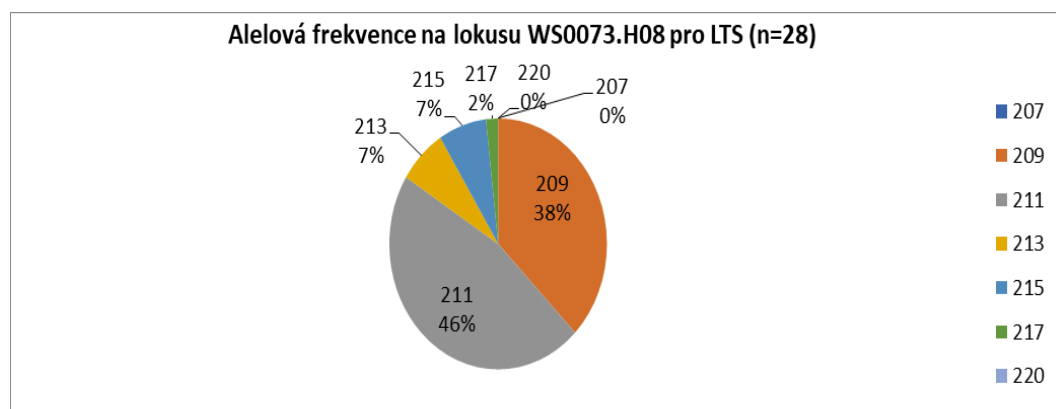
Příloha 5: Frekvence lokusu PA 33 pro LTS



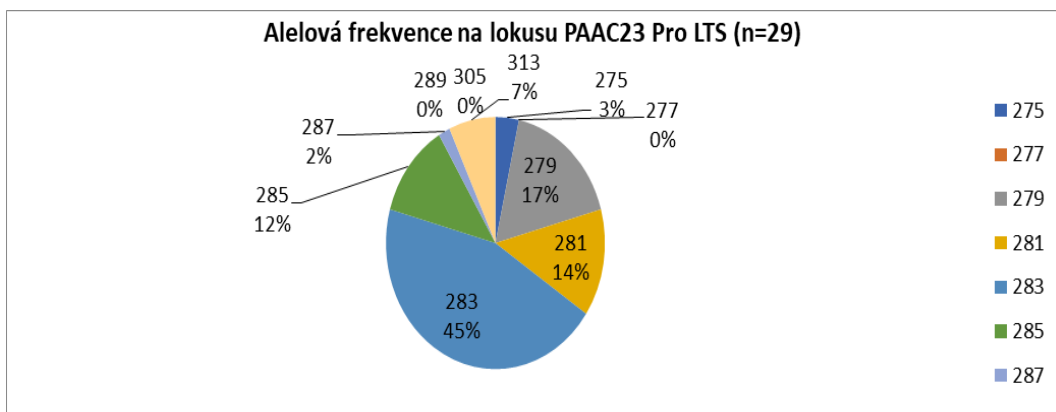
Příloha 6: Frekvence lokusu WS0019.F22 pro LTS



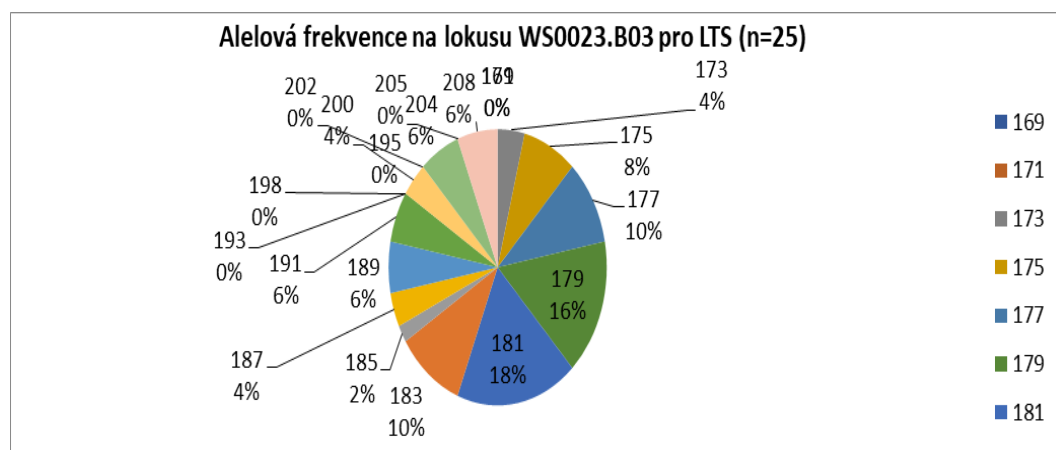
Příloha 7: Frekvence lokusu PA 28 pro LTS



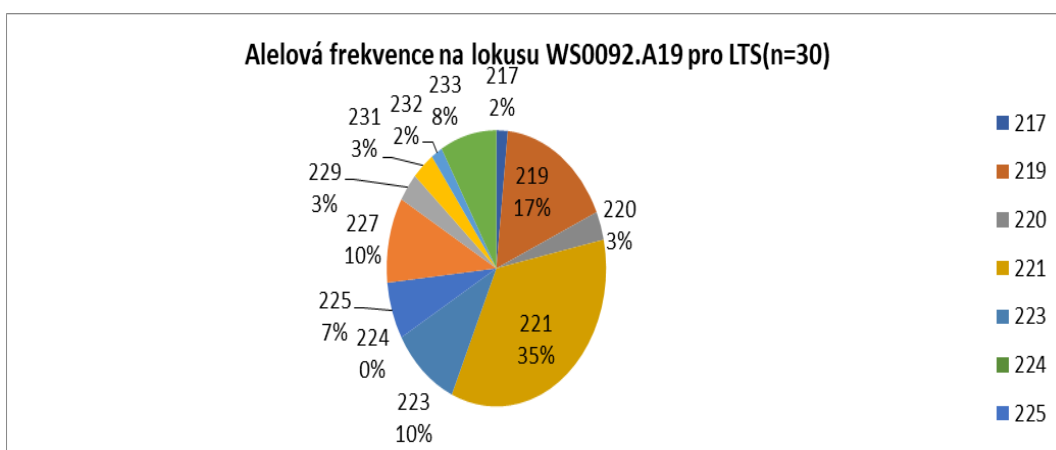
Příloha 8: Frekvence lokusu WS0073.H08 pro LTS



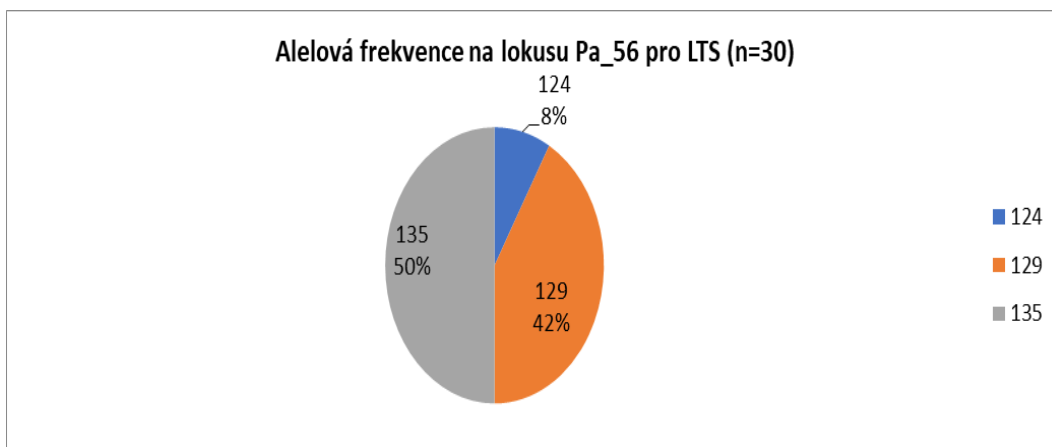
Příloha 9: Frekvence lokusu PAAC23 pro LTS



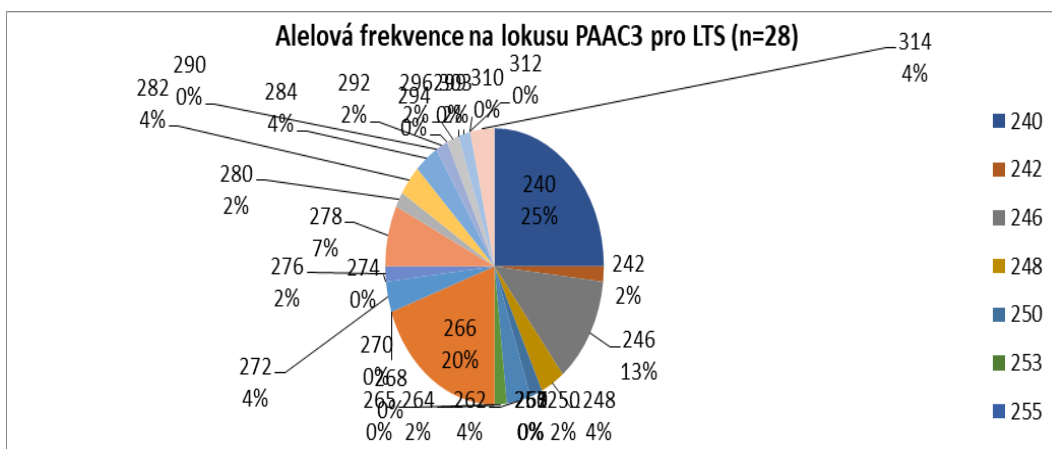
Příloha 10: Frekvence lokusu WS0023.B03 pro LTS



Příloha 11: Frekvence lokusu WS0092.A19 pro LTS

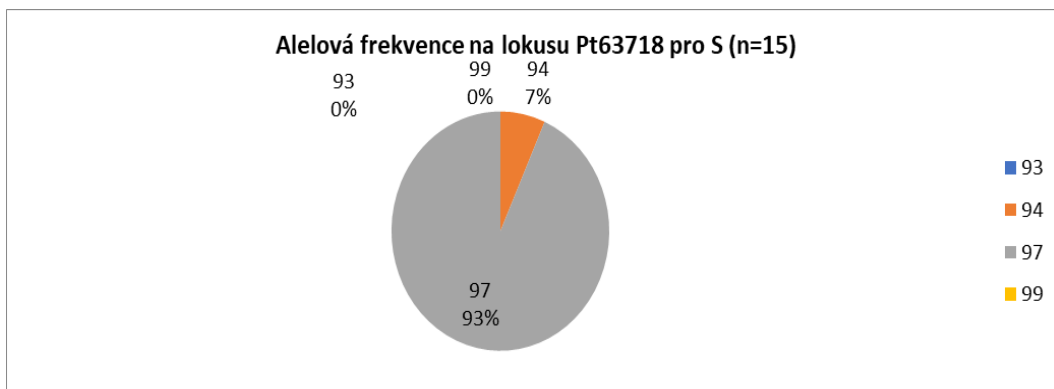


Příloha 12: Frekvence lokusu PA_56 pro LTS

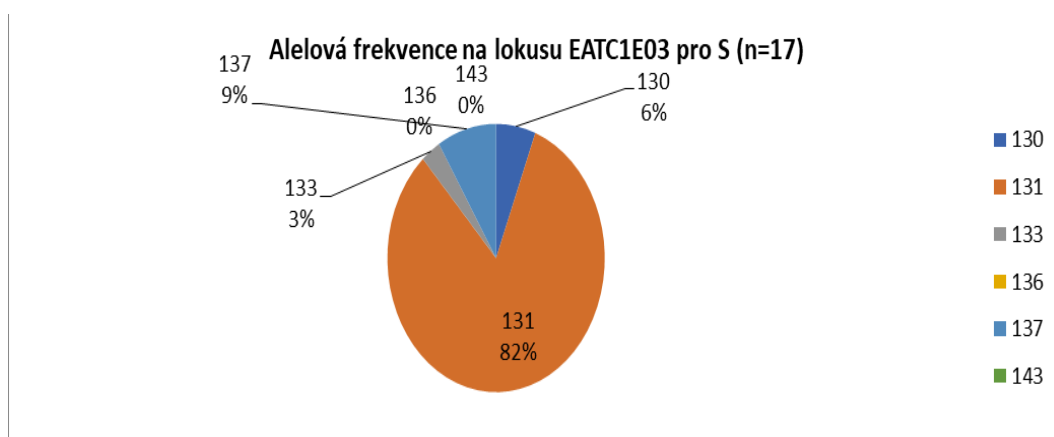


Příloha 13: Frekvence lokusu PAAC3 pro LTS

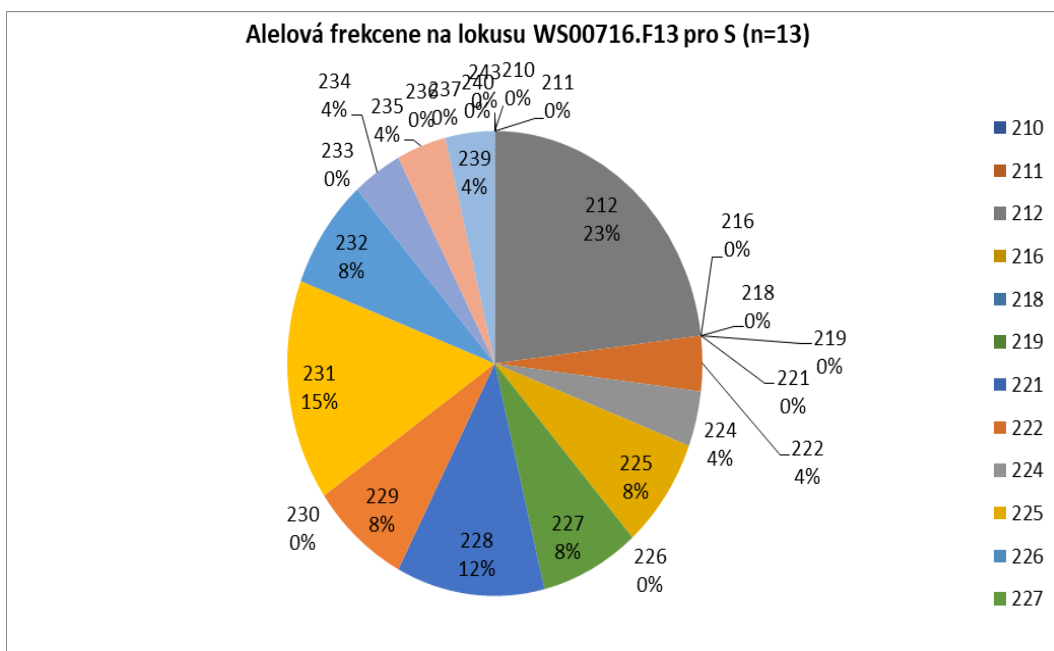
Lokusy druhé populace



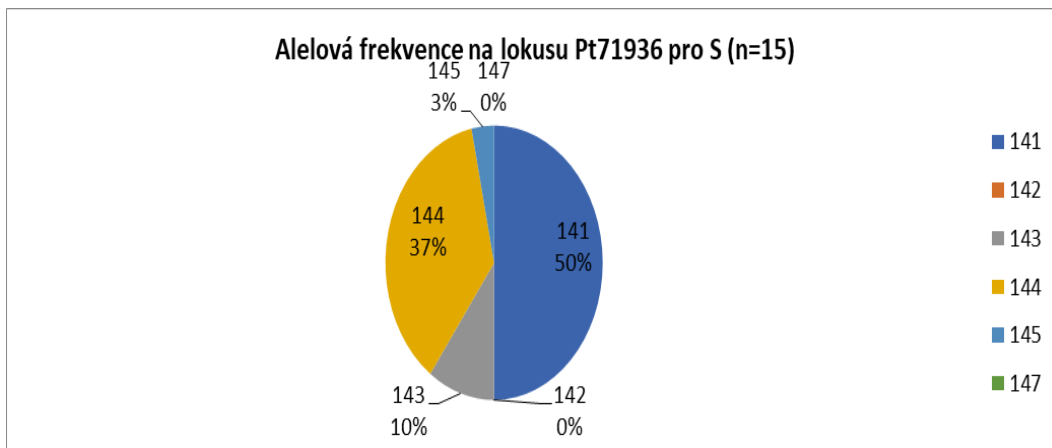
Příloha 14: Frekvence lokusu Pt63718 pro S



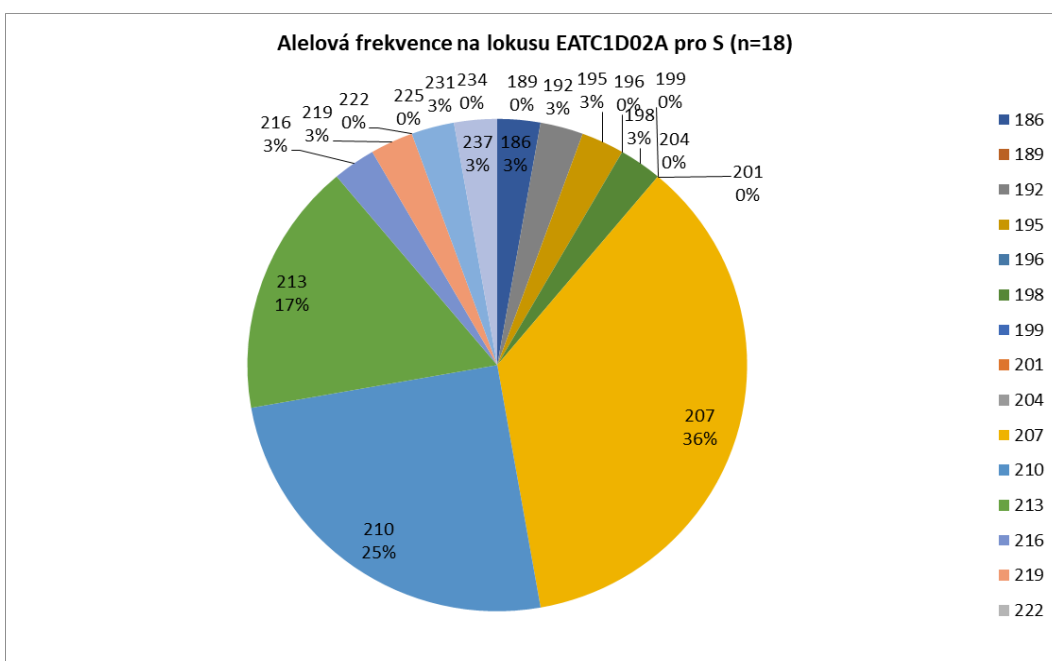
Příloha 15: Frekvence lokusu EATC1E03 pro S



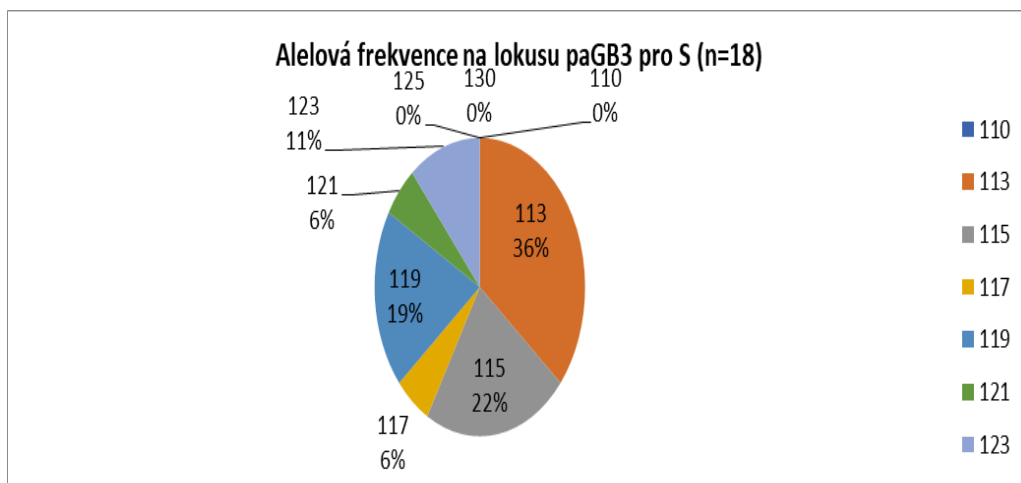
Příloha 16: Frekvence lokusu WS00716.F13 pro S



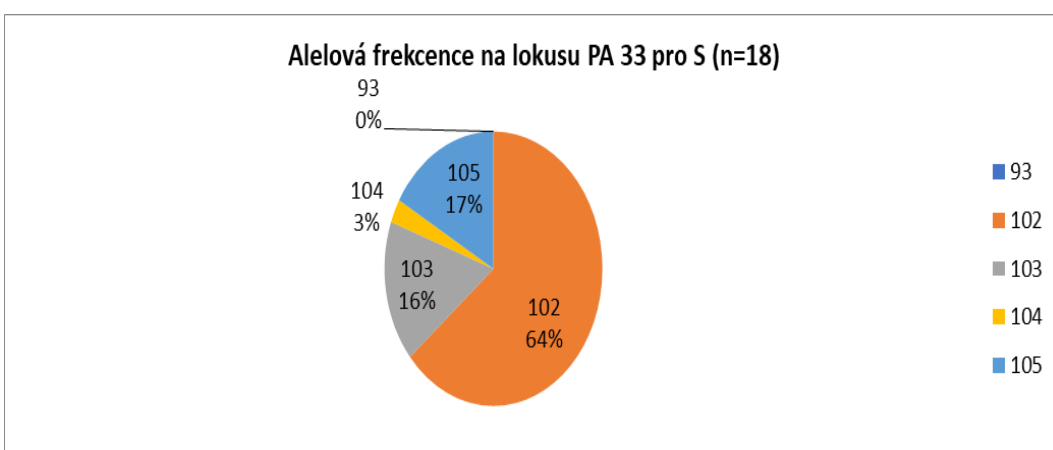
Příloha 17: Frekvence lokusu Pt71936 pro S



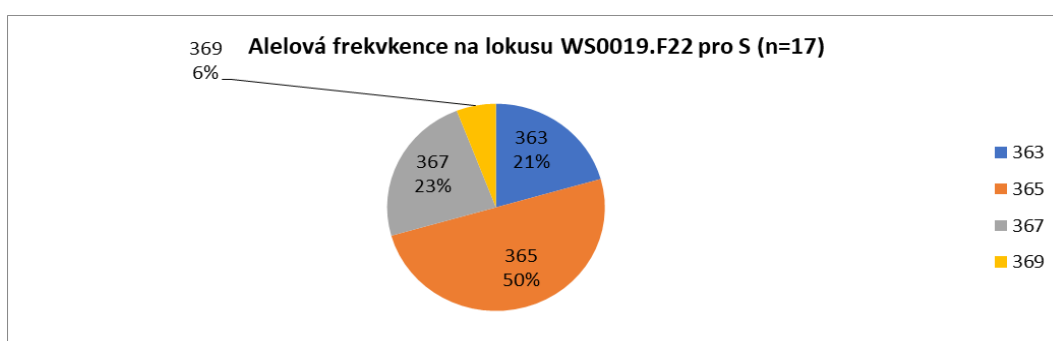
Příloha 18: Frekvence lokusu EATC1D02A pro S



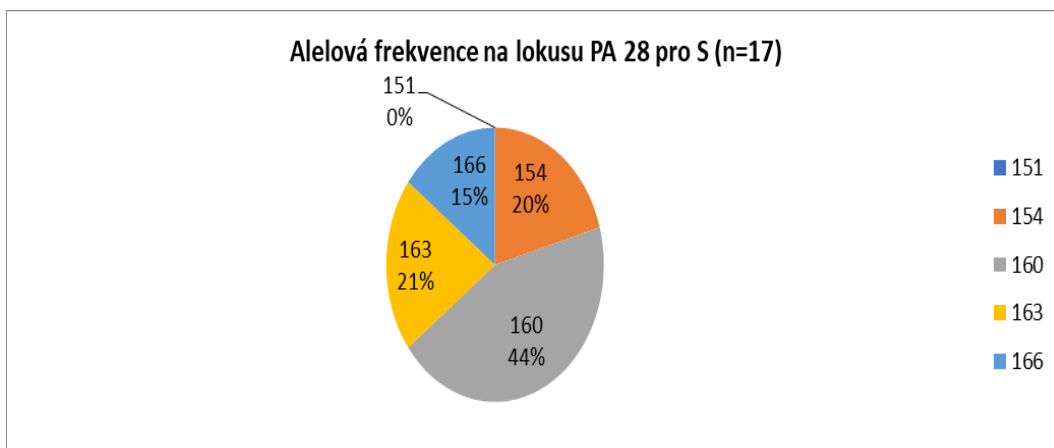
Příloha 21: Frekvence lokusu paGB3 pro S



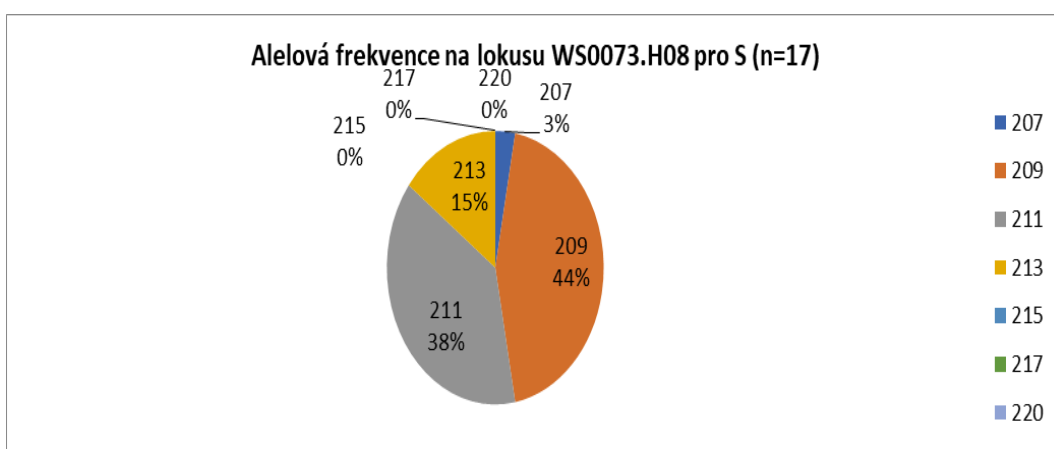
Příloha 22: Frekvence lokusu PA 33 pro S



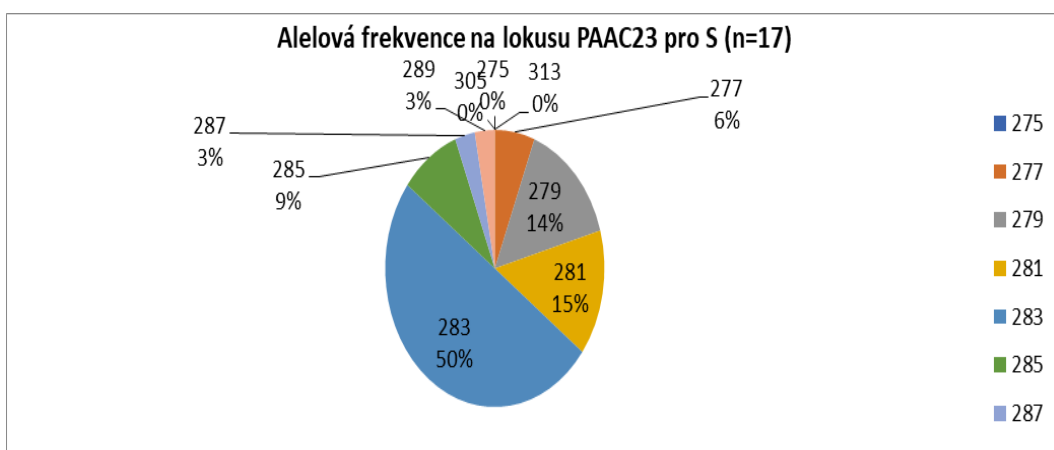
Příloha 19: Frekvence lokusu WS0019.F2 pro S



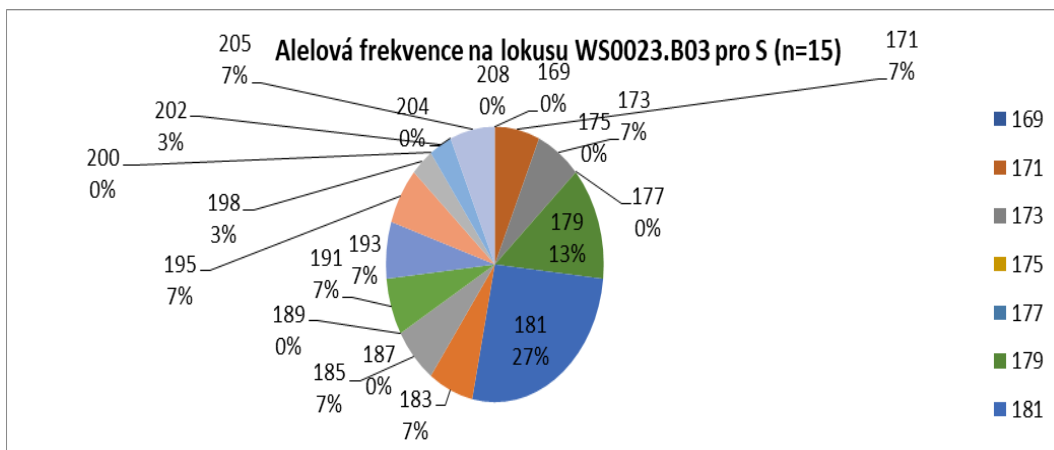
Příloha 20: Frekvence lokusu PA 28 pro S



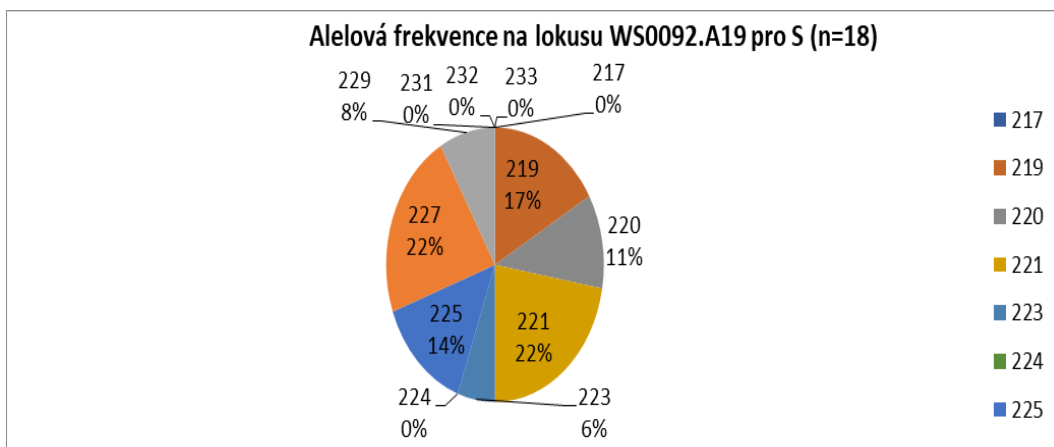
Příloha 21: Frekvence lokusu WS0073.H08 pro S



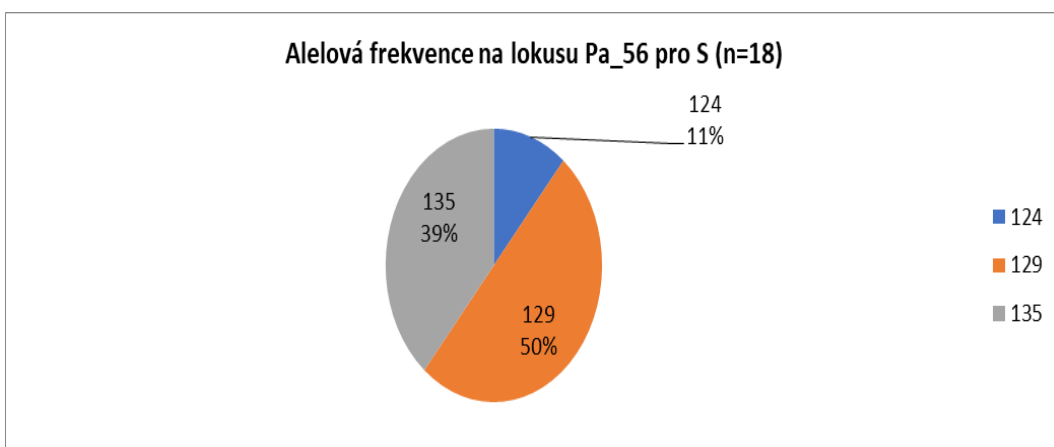
Příloha 22: Frekvence lokusu PAAC23 pro S



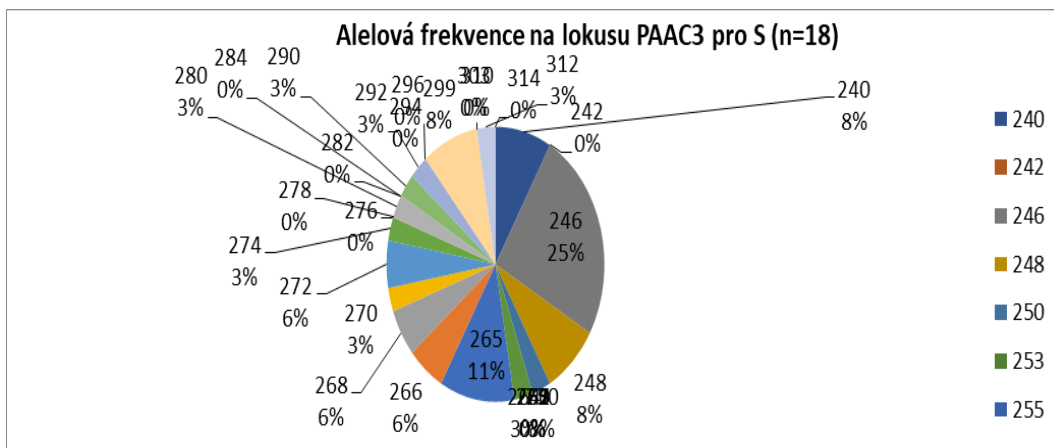
Příloha 23: Frekvence lokusu WS0023.B03 pro S



Příloha 24: Frekvence lokusu WS0092.A19 pro S

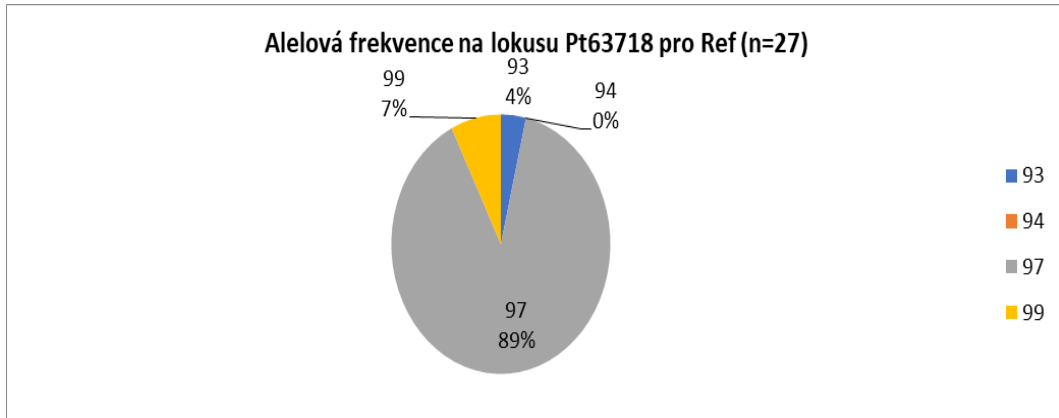


Příloha 25: Frekvence lokusu Pa_56 pro S

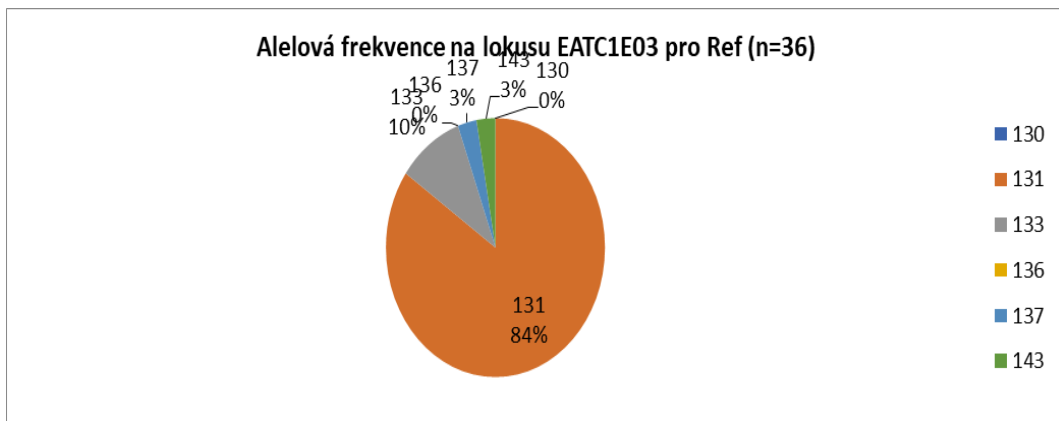


Příloha 26: Frekvence lokusu PAAC3 pro S

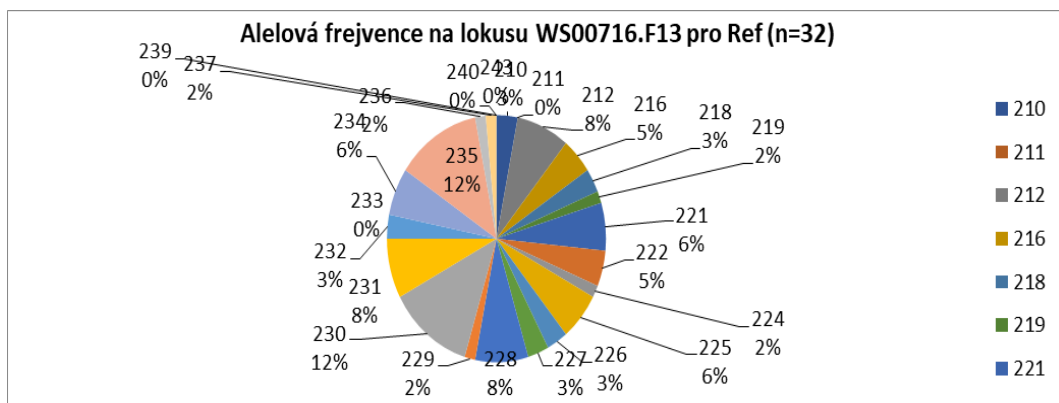
Třetí populace



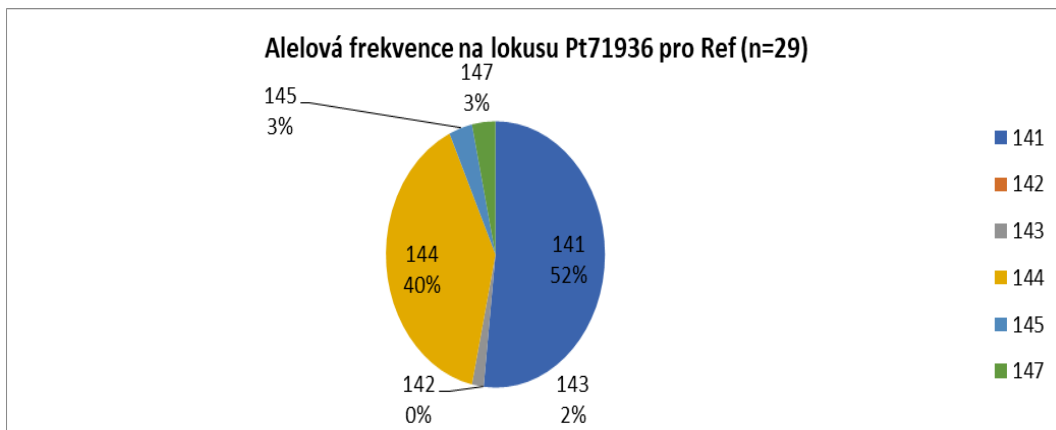
Příloha 27: Frekvence lokusu Pt63718 pro Ref



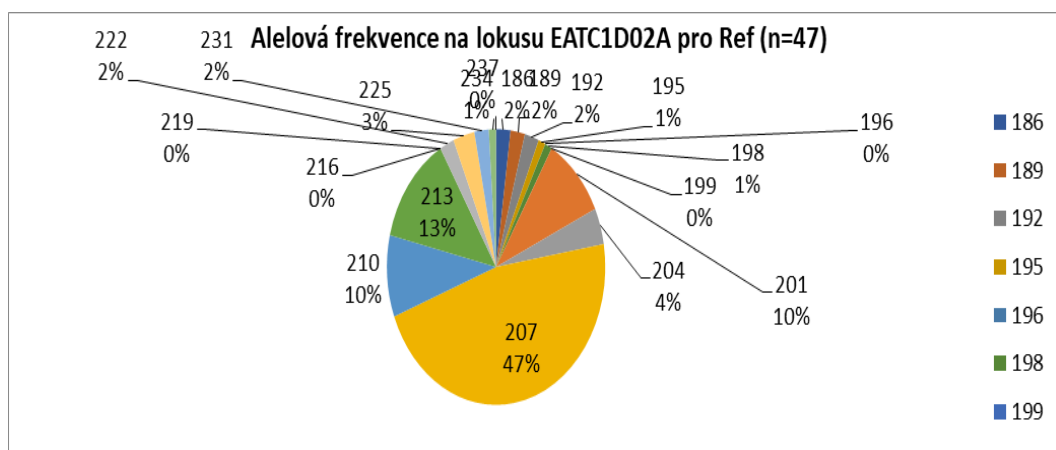
Příloha 28: Frekvence lokusu EATC1E03 pro Ref



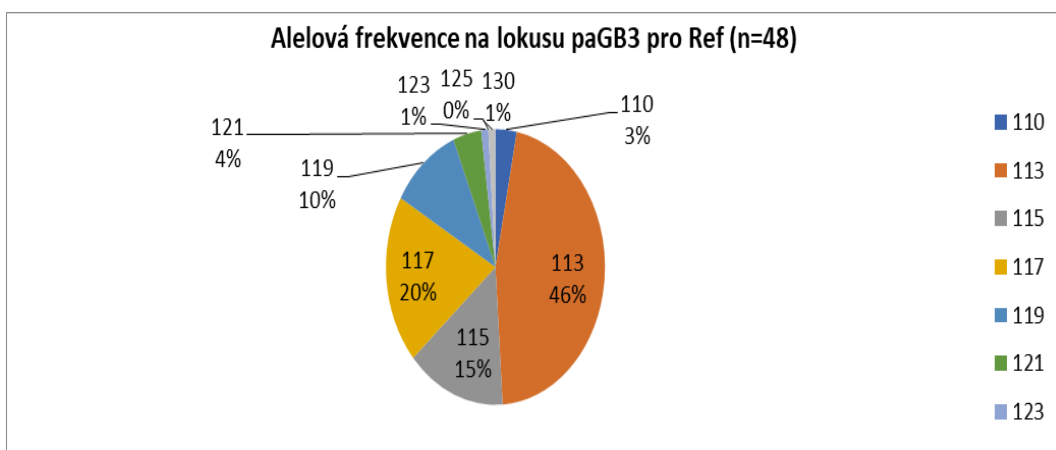
Příloha 29: Frekvence lokusu WS00716.F13 pro Ref



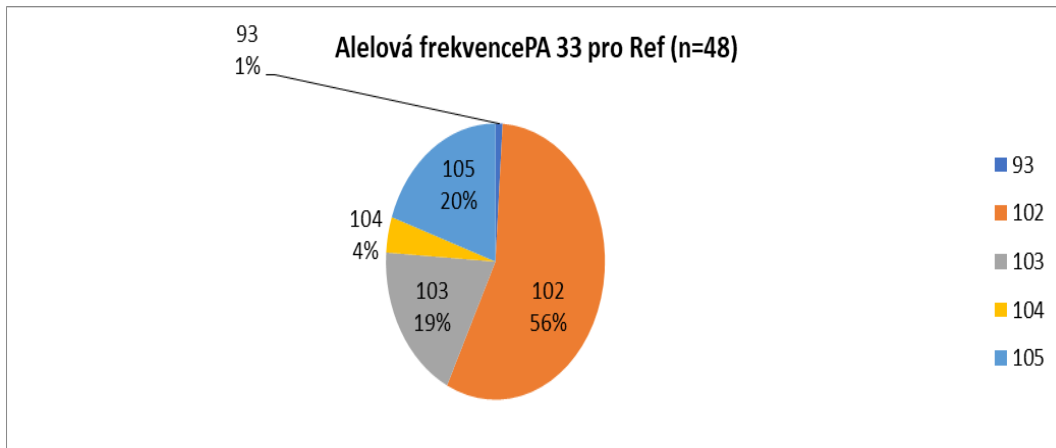
Příloha 30: Frekvence lokusu Pt71936 pro Ref



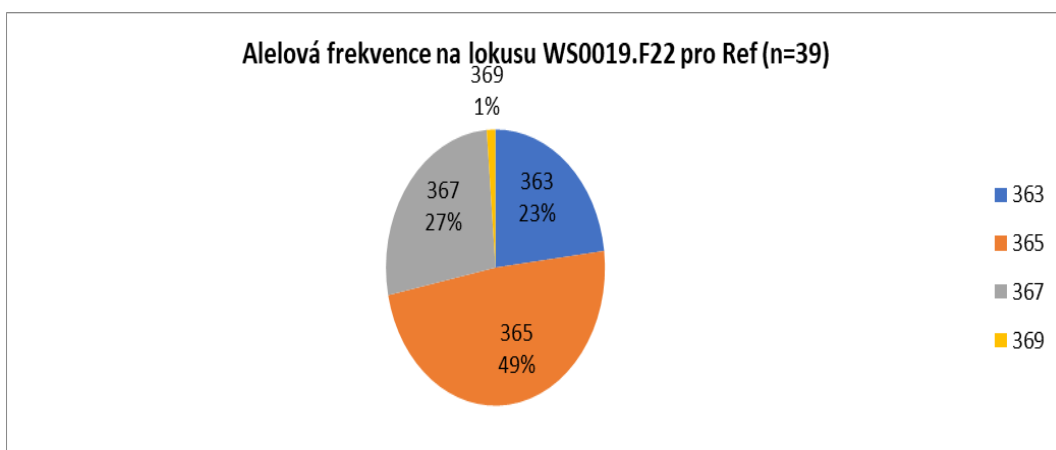
Příloha 31: Frekvence lokusu EATC1D02A pro Ref



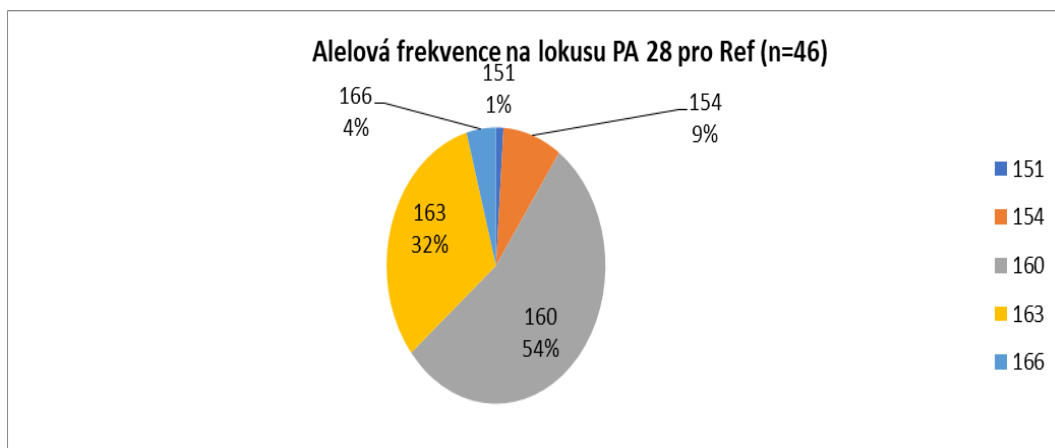
Příloha 32: Frekvence lokusu paGB3 pro Ref



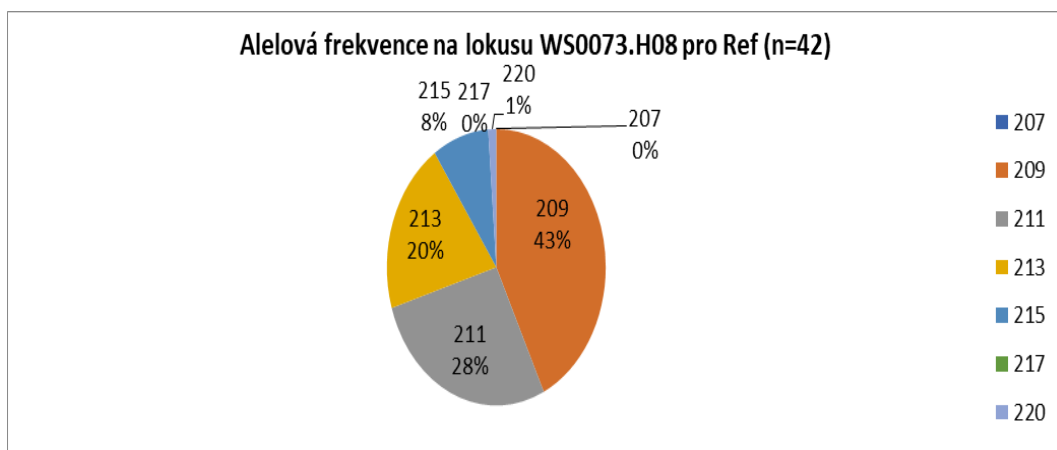
Příloha 33: Frekvence lokusu PA 33 pro Ref



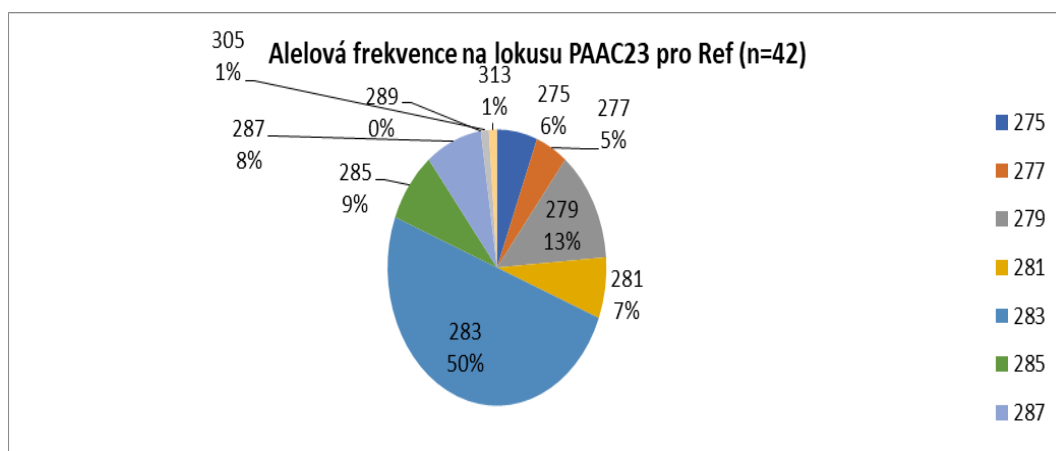
Příloha 34: Frekvence lokusu WS0019.F22 pro Ref



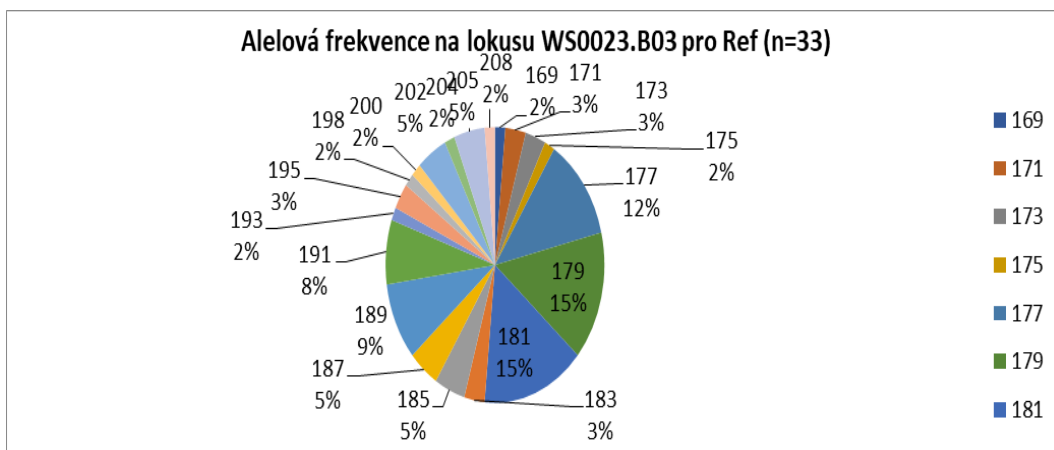
Příloha 35: Frekvence lokusu PA 28 pro Ref



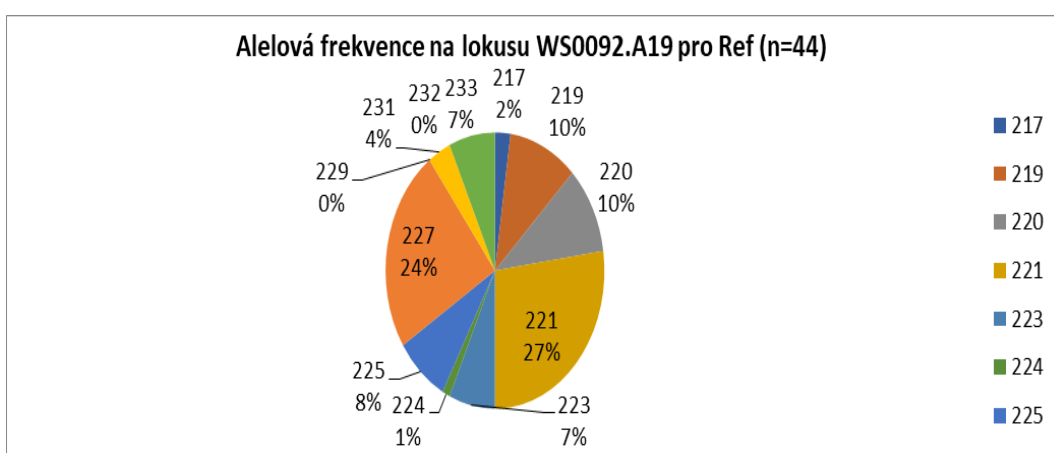
Příloha 36: Frekvence lokusu WS0073.H08 pro Ref



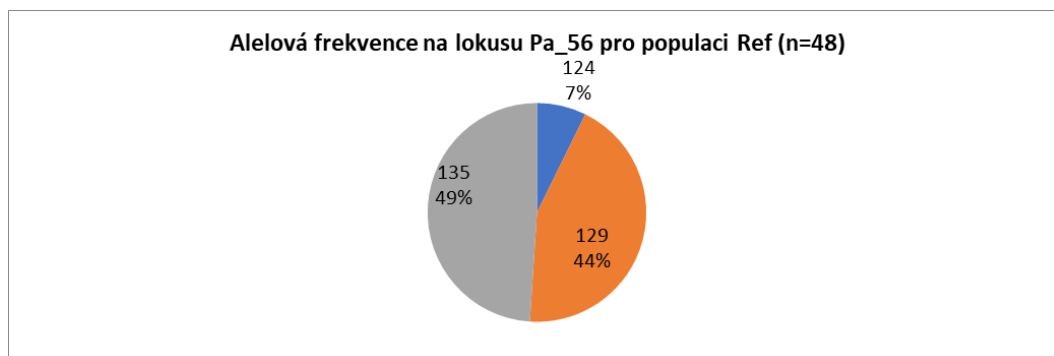
Příloha 37: Frekvence lokusu PAA23 pro Ref



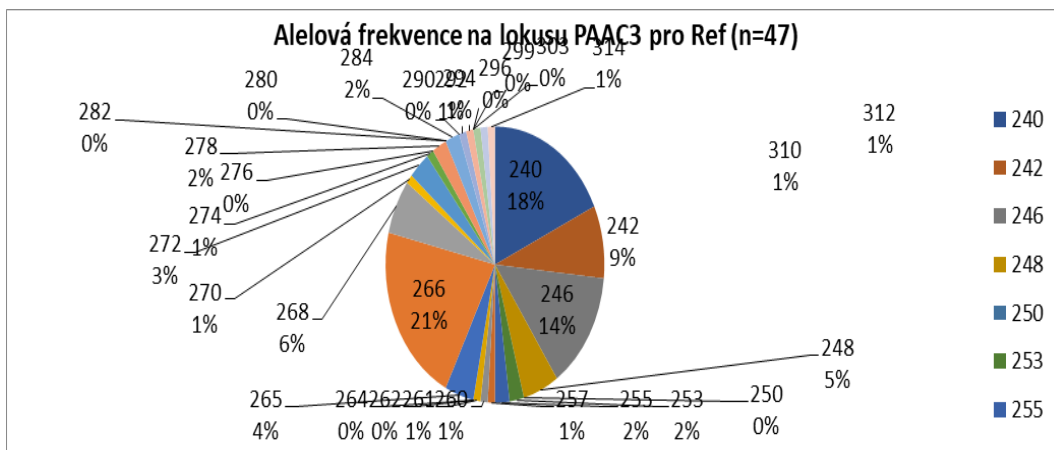
Příloha 42: Frekvence lokusu WS0023.B03 pro Ref



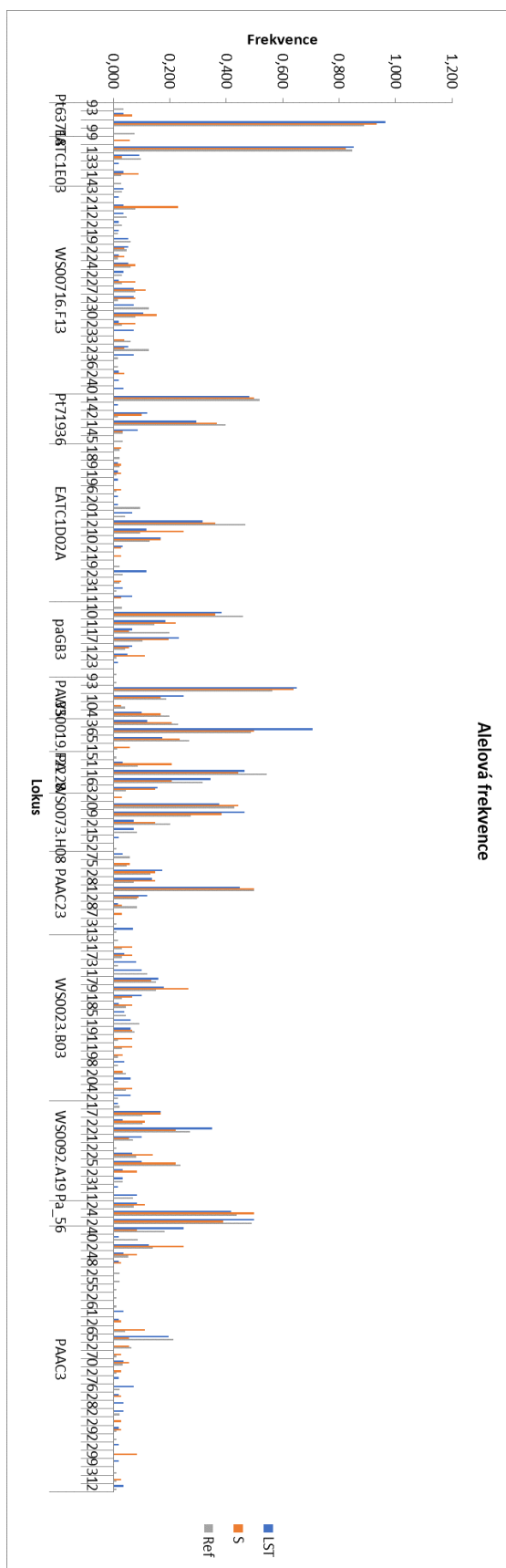
Příloha 43: Frekvence lokusu WS0092.A19 pro Ref



Příloha 44: Frekvence lokusu Pa_56 pro Ref



Příloha 38: Frekvence lokusu PAAC3 pro Ref



Priloha 39: Alelová frekvence pro všechny lokusy

DNA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3	1	1	1,2	2,1	1,1	1,1	1	1,1	1,3	1	1,5
B	1,1	1,2	1	1	2,3	1,2	1,1	1,1	1	0,8	1	2,7
C	4,7	1,1	1,3	2,6	1	1,3	2,1	1,3	1,1	1,2	1,3	1,3
D	1,1	4,7	1,2	3,1	3,1	1,1	1,3	4	3	2,7	4,2	1,6
E	3,1	2,1	5,2	4,1	0,9	3,9	2,1	1,4	5,3	2,7	3,9	1,2
F	4,5	6,4	3,8	8,6	7,1	0,9	0,8	2,8	1,2	2,3	1,6	0,6
G	2,6	2,1	11,1	1,7	2	3,9	1,5	0,8	2,2	4,1	2,1	7,5
H	3,2	3	5,9	3,8	2,5	2,4	4,3	0,8	3,2	3,9	4	12,5

Příloha 40: Tabulka s objemy DNA

H2O	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	17	19	19	18,8	17,9	18,9	18,9	19	18,9	18,7	19	18,5
B	18,9	18,8	19	19	17,7	18,8	18,9	18,9	19	19,2	19	17,3
C	15,3	18,9	18,7	17,4	19	18,7	17,9	18,7	18,9	18,8	18,7	18,7
D	18,9	15,3	18,8	16,9	16,9	18,9	18,7	16	17	17,3	15,8	18,4
E	16,9	17,9	14,8	15,9	19,1	16,1	17,9	18,6	14,7	17,3	16,1	18,8
F	15,5	13,6	16,2	11,4	12,9	19,1	19,2	17,2	18,8	17,7	18,4	19,4
G	17,4	17,9	8,9	18,3	18	16,1	18,5	19,2	17,8	15,9	17,9	12,5
H	16,8	17	14,1	16,2	17,5	17,6	15,7	19,2	16,8	16,1	16	7,5

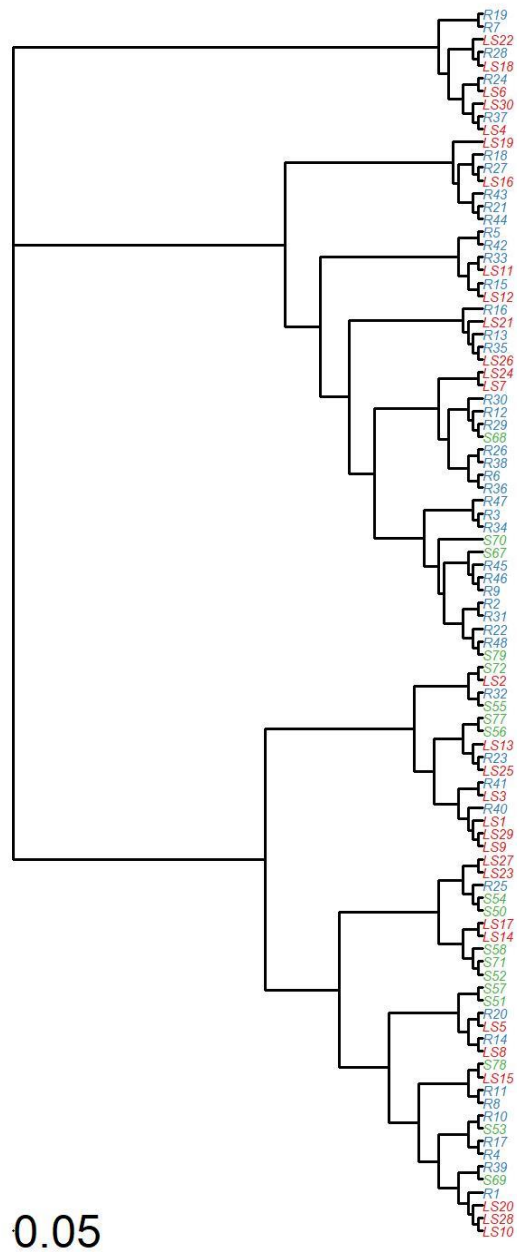
Příloha 41: Tabulka s objemy ultračisté vody

Sample ID	Acid	260/281
R_10_I.eluce	346,7ng/μl	1,86
R_114_I.eluce	394,3ng/μl	1,88
R_15_I.eluce	392,8ng/μl	1,88
R_57_I.eluce	333,9ng/μl	1,9
R_86_I.eluce	186,1ng/μl	1,9
R_5_I.eluce	376,5ng/μl	1,88
R_3_I.eluce	374,4ng/μl	1,88
R_2_I.eluce	407,1ng/μl	1,87
R_92_I.eluce	368,1ng/μl	1,89
R_77_I.eluce	304,9ng/μl	1,9
R_88_I.eluce	406,3ng/μl	1,87
R_112_I.eluce	480,7ng/μl	1,87
R_19_I.eluce	372,8ng/μl	1,89
R_113_I.eluce	344,7ng/μl	1,89
R_109_I.eluce	395,9ng/μl	1,89
R_28_I.eluce	384,8ng/μl	1,89
R_22_I.eluce	668,6ng/μl	1,88
R_117_I.eluce	505,2ng/μl	1,85
R_131_I.eluce	368,1ng/μl	1,87
R_58_I.eluce	365,8ng/μl	1,88
R_62_I.eluce	389,4ng/μl	1,89
R_52_I.eluce	482,9ng/μl	1,87
R_48_I.eluce	412ng/μl	1,88
R_39_I.eluce	512,1ng/μl	1,87
R_108_I.eluce	312,9ng/μl	1,88
R_85_I.eluce	351,1ng/μl	1,87
R_4_I.eluce	316,1ng/μl	1,87
R_129_I.eluce	257,7ng/μl	1,88
R_43_I.eluce	175,9ng/μl	1,88
R_91_I.eluce	297,1ng/μl	1,87
R_53_I.eluce	186,3ng/μl	1,86
R_25_I.eluce	196,5ng/μl	1,88
R_135_I.eluce	351,1ng/μl	1,88
R_126_I.eluce	327,9ng/μl	1,88
R_121_I.eluce	319,6ng/μl	1,89
R_71_I.eluce	186,3ng/μl	1,9

R_122_I.eluce	360,6ng/μl	1,88
R_34_I.eluce	248,5ng/μl	1,89
R_12_I.eluce	341,2ng/μl	1,89
R_99_I.eluce	151,3ng/μl	1,88
R_69_I.eluce	391,3ng/μl	1,87
R_106_I.eluce	350ng/μl	1,89
R_18_I.eluce	303,7ng/μl	1,86
R_73_I.eluce	319,3ng/μl	1,87
LS_34_I.eluce	79,5ng/μl	0
LS_23_I.eluce	94,7ng/μl	1,89
LS_32_I.eluce	146,6ng/μl	1,88
LS_21_I.eluce	128,6ng/μl	1,86
S_67_I.eluce	84,6ng/μl	1,82
S_56_I.eluce	76,7ng/μl	1,86
LS_18_I.eluce	130,5ng/μl	1,82
LS_38_I.eluce	129ng/μl	1,86
S_53_I.eluce	101,6ng/μl	1,89
LS_25_I.eluce	189,3ng/μl	1,88
LS_14_I.eluce	100,5ng/μl	1,88
LS_40_I.eluce	75,4ng/μl	1,89
LS_33_I.eluce	149,7ng/μl	1,86
LS_39_I.eluce	110,8ng/μl	1,88
LS_10_I.eluce	158ng/μl	1,87
LS_16_I.eluce	88,5ng/μl	1,91
LS_19_I.eluce	191,6ng/μl	1,94
LS_17_I.eluce	105,1ng/μl	1,89
LS_12_I.eluce	97,8ng/μl	1,89
R_101_I.eluce	421,6ng/μl	1,88
R_32_I.eluce	428,3ng/μl	1,91
R_81_I.eluce	479,8ng/μl	1,89
R_36_I.eluce	284,5ng/μl	1,89
R_40_I.eluce	333,4ng/μl	1,88
R_103_I.eluce	346,3ng/μl	1,87
LS_22_I.eluce	105,1ng/μl	0
LS_30_I.eluce	53,3ng/μl	1,84
LS_36_I.eluce	62,8ng/μl	1,86
LS_37_I.eluce	36,1ng/μl	1,86

LS_41_I.eluce	46,3ng/μl	1,87
LS_44_I.eluce	56,4ng/μl	1,82
S_72_I.eluce	102,4ng/μl	1,83
S_79_I.eluce	259,5ng/μl	1,75
S_71_I.eluce	99,8ng/μl	1,85
S_55_I.eluce	181,3ng/μl	1,85
S_51_I.eluce	96,9ng/μl	1,88
S_68_I.eluce	103,2ng/μl	1,86
S_50_I.eluce	67,4ng/μl	1,88
S_57_I.eluce	126,7ng/μl	1,83
S_70_I.eluce	188,8ng/μl	1,82
S_58_I.eluce	262,8ng/μl	1,86
S_69_I.eluce	240,7ng/μl	1,84
S_52_I.eluce	196,3ng/μl	1,65
S_54_I.eluce	169,2ng/μl	1,87
S_78_I.eluce	93,4ng/μl	1,87
LS_1_I.eluce	144,9ng/μl	1,84
LS_7_I.eluce	126,3ng/μl	1,84
LS_2_I.eluce	31,9ng/μl	1,89
LS_47_I.eluce	101,4ng/μl	1,82
LS_8_I.eluce	134,9ng/μl	1,78
LS_24_I.eluce	151,2ng/μl	1,85

Příloha 42: Výsledky NanoDropu



Příloha 43: Klastrovací dendrogram

přeznačeno	original	přeznačeno	original	přeznačeno	original
LS1	LS_10	S52	S_52	R2	R_18
LS2	LS_12	S53	S_53	R3	R_19
LS3	LS_14	S54	S_54	R4	R_22
LS4	LS_16	S55	S_55	R5	R_28
LS5	LS_17	S56	S_56	R45	R_2
LS6	LS_18	S57	S_57	R6	R_32
LS7	LS_19	S58	S_58	R7	R_34
LS8	LS_1	S67	S_67	R8	R_36
LS9	LS_21	S68	S_68	R9	R_39
LS10	LS_22	S69	S_69	R46	R_3
LS11	LS_23	S70	S_70	R10	R_40
LS12	LS_24	S71	S_71	R11	R_43
LS13	LS_25	S72	S_72	R12	R_48
LS14	LS_28	S77	S_77	R47	R_4
LS15	LS_2	S78	S_78	R13	R_52
LS16	LS_32	S79	S_79	R14	R_53
LS17	LS_33	R29	R_101	R15	R_57
LS18	LS_34	R30	R_103	R16	R_58
LS19	LS_35	R31	R_106	R48	R_5
LS20	LS_36	R32	R_108	R17	R_62
LS21	LS_37	R33	R_109	R18	R_69
LS22	LS_38	R43	R_10	R19	R_71
LS23	LS_40	R34	R_112	R20	R_73
LS24	LS_41	R35	R_113	R21	R_77
LS25	LS_44	R36	R_114	R22	R_81
LS26	LS_46	R37	R_121	R23	R_85
LS27	LS_47	R38	R_122	R24	R_86
LS28	LS_48	R39	R_126	R25	R_88
LS29	LS_7	R40	R_129	R26	R_91
LS30	LS_8	R44	R_12	R27	R_92
S50	S_50	R41	R_131	R28	R_99
S51	S_51	R42	R_135		
S52	S_52	R1	R_15		

Příloha 44: Přeznačené vzorky pro mapové výstupy a klastrovací analýzy