

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA



DISERTAČNÍ PRÁCE

**Použití molekulárních markerů v populační
genetice a taxonomii na modelu *Pinus mugo***

Autor disertační práce:

Ing. Martina Beranová

Školitel:

Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

ČESKÉ BUDĚJOVICE

2008

Poděkování:

Děkuji především svému školiteli Prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D. za všestrannou podporu, odborné vedení, cenné rady a poskytnuté zázemí potřebné pro tvorbu disertační práce. Dále pak kolegům za pomoc při řešení problémů a za vytvoření příjemného prostředí v laboratoři.

Tato práce byla podpořena grantem GAČR 521/05/2448.

V Českých Budějovicích dne.....

.....
Ing. Martina Beranová

OBSAH:

1. ÚVOD.....	5
2. CÍLE PRÁCE.....	7
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	8
3.1. Systematické zařazení.....	8
3.2. Variabilita, struktura a nomenklatura	9
3.3. Charakteristika vybraných druhů borovic	13
3.3.1. Rod <i>Pinus</i> L. – borovice	13
3.3.1.1. <i>Pinus sylvestris</i> L. – borovice lesní, sosna.....	15
3.3.1.2. <i>Pinus mugo</i> Turra – borovice kleč, kosodřevina.....	16
3.3.1.3. <i>Pinus rotundata</i> Link. – borovice blatka, borovice bažinná.....	17
3.3.1.4. <i>Pinus uncinata</i> Ramond – borovice pyrenejská	18
3.4. Výskyt vybraných druhů borovic.....	19
3.5. Proces hybridizace u borovic	21
3.5.1. Hybridizace uvnitř agregátu <i>Pinus mugo</i>	23
3.5.1.3. <i>Pinus uncinata</i> × <i>Pinus rotundata</i>	25
3.5.2. Mezdruhová hybridizace vně agregátu <i>Pinus mugo</i>	25
3.5.2.1. <i>Pinus mugo</i> × <i>Pinus sylvestris</i>	26
3.5.2.2. <i>Pinus uncinata</i> × <i>Pinus sylvestris</i>	28
3.5.2.3. <i>Pinus rotundata</i> × <i>Pinus sylvestris</i>	29
3.5.2.4. <i>Pinus mugo</i> × <i>Pinus rotundata</i> × <i>Pinus sylvestris</i>	29
3.5.3. Fertilita a sterilita mezdruhových hybridů u borovic	30
3.6. Genetická variabilita a využití metod molekulárních markerů	31
3.6.1. Charakteristika molekulárních markerů:	32
3.6.1.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)	33
3.6.1.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	34
3.6.1.3. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	34
3.6.1.4. SSRs (Simple Sequence Repeats) – mikrosatelity	35
3.6.1.5. Sekvenování DNA	37
4. MATERIÁL A METODY.....	40
4.1.1. Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)	42
4.1.2. Metoda extrakce DNA s CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid)	43
4.2. RAPD analýza	44
4.3. AFLP analýza	45
4.4. SSR analýza	48
4.5. Klonování a sekvenování.....	49
4.6. Elektroforéza v agarózovém gelu	50
5. VÝSLEDKY	52
5.1. RAPD analýza	52
5.2. AFLP analýza	53
5.3. SSR analýza	54
5.4. Sekvenování.....	75
5.5 Morfologie.....	79

6. DISKUSE	81
6.1. Název <i>Pinus mugo</i> Turra	82
6.2. Nomenklatura monokormních forem	82
6.3. Využití analýz molekulárních markerů pro hodnocení agregátu <i>Pinus mugo</i> .	84
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	90

1. ÚVOD

V Evropě, ale i na celé severní polokouli je borovice jedním z nejrozšířenějších rodů jehličnanů. Zahrnuje keřovité i stromové formy a může růst v naprosto odlišných přírodních podmínkách, včetně tundry, rašelinišť, stepí a hor. Na těchto územích mohou vznikat velmi rozdílné ekotypy s rozdílnou morfologií, které pak komplikují otázku taxonomického zařazení.

Spontánní hybridizace a procesy s ní spojené jsou významnými evolučními faktory vzniku nových druhů, resp. poddruhů, či dalších hierarchicky nižších taxonomických kategorií rostlin nebo živočichů. Výjimkou nejsou ani zástupci rodu *Pinus*. Je známo mnoho příkladů vzniku mezidruhových hybridů v rámci rodu z celého světa, které jsou intenzivně sledovány. Hybridogenní charakter sledovaných populací se v současnosti vyhodnocuje především molekulárně-biologickými metodami.

Hybridizace byla popsána mnohými autory a to nejen na území České republiky (BUSINSKÝ 1999, BUSINSKÝ & WEGER 1995, HOLUBIČKOVÁ 1965), ale i na území jiných států, např. bývalého Sovětského svazu (POLITOV et al. 1999, GONCHARENKO et al. 1995), Polska (SIEDLEWSKA & PRUS-GŁOWACKI 1995, BACZKIEWICZ & PRUS-GŁOWACKI 1997), Slovenska (KORMUŤÁK 1990, STASKIEWICZ 1993), Švýcarska (NEET-SARQUEDA 1994), Německa (SCHMID 2000) a Dánska (CHRISTENSEN & DAR 1997).

Zjednodušeně lze říci, že celá problematika, zabývající se hybridními populacemi rodu *Pinus*, se týká pouze dvou taxonomických okruhů, a to *Pinus sylvestris* L. a *P. mugo* Turra, pojaté jako agregát tří samostatných druhů. I přes jednoduché základní vymezení je značně komplikované taxonomické hodnocení hybridních populací i samotných výchozích taxonů.

Agregát neboli komplex *P. mugo* je tedy podle moderní taxonomie reprezentován souborem tří základních druhů, resp. mikrospecií:

- *Pinus mugo* Turra (1772)
- *Pinus uncinata* Ramond in Lamarck et De Candolle (1805)
- *Pinus rotundata* Link (1827)

Jmenované tři druhy tvořící agregát *P. mugo* byly v převážné části starší literatury hodnoceny jako vnitrodruhové taxony nejčastěji v kategorii odrůd nebo v extrémních případech jen v kategorii forem. Nejvíce problémů je způsobeno hlavně velkým

množstvím taxonů v minulosti velmi neurčitě popsanych. Autoři dřívější doby pohlíželi na agregát *P. mugo* jako na jediný polymorfní druh členěný zejména na základě morfologie habitu jedinců. Dalším důvodem výrazných neshod je existence spontánní hybridizace či introgrese v mnoha částech geografického rozložení a vznik hybridních rojů. Specializovaná evropská literatura obsahuje velké množství nejednotných informací o jednotlivých druzích tohoto komplexu. Mnoho informací je uváděno pod různými, často neznámými nebo běžně nepoužívanými vědeckými názvy a tak vzniká zmatek a omyly jak v literatuře odborné, tak v literatuře populárně naučné a komerční. Tato fakta následně komplikují vzájemnou komunikaci týkající se profesionálních či vědeckých zájmů.

Do této studie jsou zařazeny původní hybridní populace výchozích druhů *Pinus mugo*, *P. rotundata* a *P. sylvestris* a pro komplexnost agregátu *P. mugo* je zahrnut u nás nepůvodní druh *Pinus uncinata*.

Klasifikace použitá v této disertační práci vychází z BUSINSKÉHO (1999). Touto prací bych ráda přispěla k objasnění taxonomie užitím molekulárních genetických markerů.

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Optimalizovat techniky molekulárních markerů, zhodnotit a posoudit vhodnost jednotlivých metod:
 - RAPD (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA)
 - AFLP (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)
 - SSR (**S**imple **S**equence **R**epeats)
 - sekvenování

- 2) Posoudit míru vnitrodruhové a mezidruhové variability.

- 3) Posoudit zda taxony definované podle morfologických znaků jsou rozlišovány i na základě molekulárních markerů.

- 4) Ujasnit taxonomické a terminologické problémy na základě výsledků molekulární analýzy, posoudit korelaci morfologické a genetické variability.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Systematické zařazení

- ▲ Říše: rostliny (*Planta*)
- ▲ Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)
- ▲ Oddělení: jehličnany (*Pinophyta*)
- ▲ Třída: jehličnany (*Pinopsida*)
- ▲ Řád: borovicotvaré (*Pinales*)
- ▲ Čeleď: borovicovité (*Pinaceae*)
- ▲ Rod: borovice (*Pinus*)
- ▲ Druh: borovice kleč, kosodřevina (*Pinus mugo*)

Rod *Pinus* je v rámci rostlin nahosemenných (*Pinophyta*) nejrozsáhlejším rodem, obsahuje kolem sta druhů široce rozšířených na severní polokouli a v některých tropických a subtropických oblastech (ARNOLD et al. 1999). Je rozdělen na dva monofyletické podrody (subgenus *Pinus* a subgenus *Strobus*), event. dále na sekce a série, nověji dělí BUSINSKÝ (1999) podrody na nižší jednotky (MUSIL 2003):

- ✓ Podrod *Pinus* (syn. *Diploxylon*), tzv. „tvrdé (smolnaté či žluté) borovice“. Jehlice jsou po 2-3 na brachyblastu. Přechod mezi jarním a letním dřevem je náhlý. Jen vzácně jsou jehlice po 5-8 ve svazečku. Každá jehlice má dva cévní svazky. Pochvy svazečků jehlic jsou převážně vytrvalé. Semenné šupiny šišek bývají v apofýze zesílené, často s hrotem. Oddělitelné křídlo objímá semeno „klíšťkovitě“, v křídle bývá očko. Podrod *Pinus* zahrnuje asi 2/3 druhů z celého rodu.
- ✓ Podrod *Strobus* (syn. *Haploxylon*), tzv. „měkké borovice“. Jehlice jsou převážně po 5 na brachyblastu. Přechod mezi jarním a letním dřevem je pozvolný. Jehlice mají kolísavý počet, v rozmezí 1-5. Každá jehlice má jeden cévní svazek. Pochvy svazečků jehlic jsou opadavé. Semenné šupiny šišek jsou většinou v apofýze relativně nezesílené a bez hrotu. Semena jsou bezkřídla nebo s malým zbytkovým lemlem (limby), případně s křídlem.

Agregát *Pinus mugo* je reprezentován podle moderní taxonomie souborem tří základních druhů, s následujícími platnými jmény a nejpoužívanějšími synonymy (BUSINSKÝ 1999):

***Pinus mugo* Turra (1764)**

syn. *Pinus mughus* Scopoli (1772)

Pinus pumilio Haenke (1791)

***Pinus uncinata* Ramond in Lamarck et De Candolle (1805)**

syn. *Pinus uncinata* Mill. ex Mirbel (1806)

Pinus mugo var. *rostrata* (Antoine 1840) Hoopes 1941

***Pinus rotundata* Link (1827)**

syn. *Pinus uliginosa* Neumann ex Wimmer (1837)

3.2. Variabilita, struktura a nomenklatura

Na první pohled se může zdát rozdělení komplexu *Pinus mugo* docela jednoduché. V České republice zahrnuje hlavně keřovitou zakrslou borovici (*Pinus mugo* Turra), český název „borovice kleč, kosodřevina“, která roste většinou ve vyšších horských oblastech na minerálních nebo rašelinných půdách; a menší stromovou formu z rašelinišť, která roste ve středních nadmořských výškách a je obvykle nazývána bažinnou nebo rašelinnou borovicí (*Pinus rotundata* Link), český název „borovice blatka“. V západních a jižních částech České republiky, hlavně ve vyšších místech, rostou přechodné růstové formy, které se mohou vyskytovat vedle monokormních stromových borovic 10-17 (až 20) m vysokých: od nízkých, někdy dokonce ležících exemplářů, přes velké keře se vzpřímenými větvemi až po polykormní stromové formy 2-5 (až 10) m vysoké. Někteří autoři (HEJNÝ & SLAVÍK 1997; SKALICKÁ & SKALICKÝ 1997; KUBÁT et al. 2002; BUSINSKÝ 2002) klasifikují tyto formy jako *Pinus x pseudopumilio* (Willk.) G. Beck. (= *P. mugo* x *P. rotundata*) (HAMERNÍK & MUSIL 2007). Česky „borovice kleč rašelinná“, příp. „borovice kleč hybridní“ či „vrchovištní“ (MUSIL 2003).

Dalším stromovým druhem komplexu rostoucím v západních částech (přibližně od severovýchodního Španělska po severozápadní Rakousko) je *Pinus uncinata* Mill. ex

Mirbel, česky „borovice pyrenejská“, „borovice zobanitá“. Platné jméno tohoto taxonu ale pravděpodobně bude *P. uncinata* Ramond (horská borovice sensu stricto), publikované L. F. RAMONDEM v r. 1805, který ji definoval o rok dříve než PH. MILLER (ex MIRBEL) (HAMERNÍK & MUSIL 2007). Systematické zařazení *Pinus uncinata* Ramond mezi ostatní blízce příbuzné druhy rodu *Pinus* bylo již několikrát diskutováno (SANDOZ 1980, 1982; CHRISTENSEN 1987a; BUSINSKÝ 1999). Je považována buď za nezávislý druh nebo za poddruh *P mugo* Turra (MARCYSIAK & BORATYNSKI 2007).

Názvy *Pinus uliginosa* a *P. rotundata* jsou často vyjadřovány jako synonyma. v práci CHRISTENSENA jsou např. považovány za poddruhy *Pinus rotundata*, které vznikly hybridizací mezi *P mugo* a *P. uncinata*. Jiný názor zastává BUSINSKÝ (1999), který tvrdí, že *P. uliginosa* a *P. rotundata* jsou dva odlišné druhy (MARCYSIAK & BORATYNSKI 2007).

Více či méně plynulá skupina přechodných typů také přispěla k problémům komplexu. Vedle variability uvnitř jednotlivých druhů, způsobené např. geografickým rozložením jednotlivých populací, evolucí a rozptřením v postglaciální době, je to způsobeno také hybridizací, ať už z dřívější nebo současné doby. Pozdější hybridizace je většinou spojená s *Pinus sylvestris* L., český název „borovice lesní“ (HAMERNÍK & MUSIL 2007).

Vnitrodruhové odlišení *P. mugo* je velmi sporné i z toho důvodu, že mnoho dřívějších studií na odlišení *P. mugo* od ostatních blízce příbuzných druhů bylo provedeno a aplikováno pouze na části populací a nezahrnovalo celý areál výskytu druhu/agregátu (GUINIER & POURTET 1951; HOLUBIČKOVÁ 1965; BONO et al. 1967; STASZKIEWICZ & TYSZKIEWICZ 1969, 1972, 1976; SZWEYKOWSKI 1969; MUSIL 1977; SZWEYKOWSKI & BOBOWICZ 1977; SANDOZ 1980, 1982; BOBOWICZ et al. 1983; KRZAKOWA et al. 1984; BOBOWICZ & KRZAKOWA 1986, 1988; MAIER 1993; MINGHETTI 1997; BUSINSKÝ 1999; BORATYŃSKA et al. 2004). Mimořádné problémy uvnitř komplexu, především morfologické, spojené s rozdělením jednotlivých taxonomických charakteristik (hlavě tvar šišek, velikost jejich semen a celkový růstový habitus), vedou k popisu velkého množství druhů, často taxonomicky méně zajímavých nebo nesrozumitelných. Charakteristika těchto druhů byla založena na tvrzeních, která nebyla dostatečně prozkoumána. Logickým důsledkem rozdílnosti komplexu bylo vytvoření mnoha „systematických názvů“ (včetně synonym) (MUSIL 2003).

Interpretace a umělá klasifikace jako důsledek složité fylogeneze nominálního podrodu *Pinus* ve střední Evropě byly do začátku druhé poloviny tohoto století zatíženy zejména širokým taxonomickým pojetím. Pokud se autoři dřívější doby dívali na agregát *P. mugo* jako na jediný polymorfní druh členěný do složitěho systému vnitrodruhových taxonů zejména na základě morfologie habitu jednotlivých jedinců, pak jejich klasifikace musela být nepřirozeně komplikovaná a dnes se jeví nejednoznačná a nevěrohodná. Příkladem zde může být citace z monografického zpracování rodu *Pinus* prof. F. A. NOVÁKEM z roku 1942 (publ. in KLIKA et al. 1953: 231): „*Pinus mugo* je druh velice variabilní, všechny formy jsou v něm spojeny vzájemnými přechody, a to nejen v jedné linii, nýbrž všechny navzájem. Proto je systematické rozčlenění druhu velice obtížné, ne-li veskrze umělé“ (BUSINSKÝ 1999). Kromě nepřirozeně širokého druhového pojetí byla dřívější klasifikace agregátu *P. mugo* zatížena chybnou interpretací starých jmen, při níž autoři docházeli k závěrům, dnes znějícím možná až kuriózně. Příkladem může být opět F. A. NOVÁK v citované knize, který rozlišuje v široce pojatém druhu *Pinus mugo* tzv. „kosodřevinu pyrenejskou“ pod jménem *P. mugo* subsp. *mugus* (Scop.) var. *typica* (Beck) a „borovici kleč rašelinnou“ pod jménem *P. mugo* subsp. *uncinata* (Ramond) Domin. Přitom první jméno reprezentuje typickou *P. mugo*, která nikde v Pyrenejích neroste a druhé jméno naopak představuje západoevropský (zejména pyrenejský) taxon, který neroste na rašeliništích. Tamtéž je citován převzatý údaj hodnocený podle uvedeného názvosloví: „Podle SULMY (1929) ve východních Karpatech převládá kosodřevina pyrenejská a tvoří přechody ke kosodřevině nízké (*P. pumilio*), která převažuje v západní části Karpat“ (BUSINSKÝ 1999).

Důvody zmíněné nejednotnosti a omylů při hodnocení taxonů a interpretaci hybridizace u evropských druhů rodu *Pinus* lze shrnout do následujících bodů:

1. Agregát *P. mugo* je souborem geneticky blízkých druhů relativně nízkého fylogenetického stáří, u kterých proces speciace dosud nedosáhl takového stupně evoluce a znakové kvality, jako u zbývajících devíti evropských druhů borovic (avšak již vyššího stupně, než například u taxonů příslušících k polymorfnímu druhu *P. nigra* Arnold, který se dnes rozpadá na řadu poddruhů, dosud nedostatečně diferencovaných pro adekvátní použití druhové klasifikace); naproti tomu evropské populace *P. sylvestris* reprezentují

(kromě severní Skandinávie) pouze nominální poddruh, i když velmi variabilní, a tak představující řadu odrůd (z nichž některé se podílejí na hybridizaci s *P. mugo* agg.).

2. Znaková diference mezi zástupci agregátu *P. mugo* je nevýrazná, jednotlivé diakritické znaky bývají u některých jedinců nedostatečně vyvinuty – pro determinaci zejména hybridních populací je nutné používat soubory znaků z více jedinců; determinace vzorků jednotlivých jedinců bez znalosti populačního kontextu je problematická a nevěrohodná.

3. V podmínkách střední Evropy se v některých oblastech zachovaly jen fragmenty populací. U mnoha došlo ke zpomalení nebo změně směru spontánních procesů v důsledku antropických vlivů (zejména kácení, přeměna biotopů, odvodňování, výsadby cizích proveniencí, globální změny) a k podstatnému zhoršení čitelnosti projevů spontánní evoluce.

4. Nedostatečná komplexnost a nadhled při taxonomických studiích a revizích zabývajících se touto problematikou – většina autorů vycházela z morfologického hodnocení jedince podle uměle stanovených znakových priorit; zde je však nutné vycházet z mikroevoluce sympatrických populací, hybridizačních procesů, populační variability a ekologických vazeb; rovněž bádání s těžištěm v herbářovém studiu na úkor studiu terénnímu vede u této skupiny ke zkresleným závěrům.

5. K obecnému pochopení rozsahu mezidruhové hybridizace došlo až v nedávné době, kdy byly využity poznatky moderní populační genetiky (BUSINSKÝ 1999).

V současnosti ještě nejsou dokončeny všechny charakteristiky agregátu, stejně jako není dokončen výzkum jejich čtvrtohorního vývoje. Není ujasněno, zda považovat tuto skupinu za:

- ⇒ jeden druh (*Pinus mugo* sensu lato) rozdělený do dvou, třech nebo dokonce více poddruhů;
- ⇒ nebo za dva druhy (*Pinus mugo* (sensu stricto) a *P. uncinata* (sensu lato)) s více či méně přechodnými populacemi nebo hybridy, (včetně hybridů s *P. sylvestris*);

⇒ nebo dokonce za tři druhy (*P. mugo* sensu stricto, *P. rotundata* a *P. uncinata* sensu stricto) s hybridy uvnitř tohoto komplexu (HAMERNÍK & MUSIL 2007).

Není jednotný názor, jestli *Pinus rotundata* je nebo není samostatný, taxonomicky malý, druh, ačkoliv by mohl mít hybridogenní původ nebo by mohla být potomkem nějakých velmi starých předků nebo jestli nepředstavuje hybrid mezi *Pinus mugo* × *P. uncinata* (hybrid na druhové úrovni, HOLUBIČKOVÁ (1965) nebo na poddruhové úrovni CHRISTENSEN (1987 a,b,c)) nebo dokonce hybrid *P. mugo* × *P. sylvestris* (starší polští autoři STASZKIEWICZ, TYSZKIEWICZ 1969, 1972) nebo jestli nepochází ze současných hybridů (HAMERNÍK & MUSIL 2007).

BUSINSKÝ (1999) předběžně zhodnotil a vyseletoval populace vhodné pro další detailní studie (speciálně pro marginální oblasti). Pokud je přehlížen předpoklad hybridů, extrémní formy skupiny *P. sylvestris* by měly být identifikovány podle následujícího klíče:

- 1 šištice viditelně ohnuté nazpátek, na dlouhé stopce, jehlice naředle zelené – *P. sylvestris*
1* šištice přímé, na krátké stopce, jehlice tmavě zelené

- 2 křovinná konstituce se vzestupnými hlavními větvemi, hlavní kmen chybí, šišky aktinomorfní – *P. mugo*
2* stromová konstituce, kmen jednoduchý, středový, šišky více méně zygomorfní – 3

- 3 šišky mírně zygomorfní; rostou na rašeliništích v nižší nebo stření nadmořské výšce, východně – *P. rotundata*
3* šišky velmi viditelně zygomorfní, rostou v suchých horských oblastech, západně – *P. uncinata* (BUSINSKÝ 1999).

3.3. Charakteristika vybraných druhů borovic

3.3.1. Rod *Pinus* L. – borovice

Pinus = latinský název některých borovic (původně i jiných jehličnatých dřevin); pochází z názvu picnus: latinsky pix, picis = smůla, pryskyřice; v překladu tedy přibližně

„pryskyřici poskytující“; nebo z keltského pin = kopec či hlava a z latinského názvu pinie?; anglicky: pine; francouzsky: pin (snad také keltského původu); německy: Kiefer, Föhre; rusky: sosna; polsky: sosna (MUSIL 2003).

Rod *Pinus* – borovice je jedním z nejvýznamnějších druhů jehličnanů z hlediska dřevařského. Zahnuje vždyzelené stromy, méně často keře, s přeslenitým větvením. Jehlice vyrůstají ve svazečku na malých zkrácených výhonech (brachyblastech), obvykle po 2, 3, 5, výjimečně i po 1, 4, 6-8. v 1. roce života má semenáček nejprve přeslen 3-18 jehlicovitých děloh, na něž navazují jednotlivé, ve spirále umístěné pilovité primární jehlice (tedy nikoli ještě jehlice ve svazečcích – a jen asi do 3 let)

Šišťice se vytvářejí na letorostech. Samčí obvykle na jejich bázi, na místě brachyblastů, v dolní části koruny; samičí pod vrcholovým pupenem, v dostatečně osvětlené (převážně horní) části stromu. v době květu bývají semenné šupiny obvykle červené, na bázi jsou srostlé s podpůrnou šupinou. Osa samičí šišťice je nejprve vzpřímená, u mnoha druhů se však již v prvním roce začíná ohýbat nazpět (MUSIL 2003).

K oplodnění dochází po dlouhém období klidu, v mírném klimatickém pásu, asi jeden rok po opylení. Od té doby šišky znovu rostou – do konečné velikosti šišky dozrají po 15-16 měsících po opylení, ve 2.(-3.) kalendářním roce (jen výjimečně už v roce prvním). Povrch uzavřených dozrálých šišek je tvořen především štítky (apofýzami) semenných šupin, majícími na vrcholu pupek (umbo), případně i s hrotem (mucro); bývají to důležité znaky pro určování jednotlivých taxonů. Podpůrné šupiny jsou v době zralosti zakrnělé (HECKER 1991). Některá stádia mezi kvetoucí samičí šišťicí a dozrálou šiškou bývají označována termínem „konelety“ (BUSINSKÝ 1999).

Semena mají křídlo, méně často jsou ± bezkřídla (např. limby, pinie). Křídlo bývá oddělitelné, typu „kleštiček“ (např. u sosny) – nebo přirostlé (např. u vejmutovky).

Rod *Pinus* je nejpočetnějším rodem nahosemenných rostlin. Popsáno je na 100(-120) druhů borovic rostoucích prakticky od mořské hladiny po 4000(-4300) m n. m. (nejvýše vystupují v Mexiku, resp. v Číně), od tropů až téměř po subarktickou oblast. Pouze *P. merkusii* překračuje v horách Sumatry rovník. Jen asi čtyři druhy jsou vysloveně keřovité. Celkový areál rodu je na severní polokouli druhým největším – po dubu, který má asi 600 druhů. v České republice rostou autochtonně jen tři druhy: *P. sylvestris*,

P. rotundata a *P. mugo*; hojněji se ještě vyskytuje hybrid posledních dvou *P.x pseudopumilio* (MUSIL 2003).

Borovice jsou vytrvalé druhy s dlouhou životností, charakteristické vysokým poměrem křížitelnosti mezi sebou. (KUTIL & WILLIAMS 2001). Středoevropské borovice jsou heterogenní a tvrdé (*Diploxylon*), jsou považovány za pozůstatek druhů z třetihor, které mají různý evoluční původ (KLAUS 1989). Borovice se různě rozmístily po středozemní oblasti a vykazují tak vysokou ekologickou plasticitu (BARBÉRO et al. 1998).

Borovice je jedním z nejvíce rozšířených rodů jehličnatých dřevin jak v Evropě, tak na celé severní polokouli (PRAVDIN 1964, CRITCHFIELD & LITTLE 1966). Zahrnuje stromové i keřovité růstové formy a může růst v absolutně odlišných ekologických podmínkách, včetně extrémů jako jsou hranice tundry, rašeliniště, stepi a hory. Takto široká ekologická valence může příznivě ovlivňovat formování vzniku nových ekotypů borovic (GONCHARENKO et al. 1994). Rozdílné morfologické variety rodu *Pinus* (sensu lato) se formují do specifických ekotypů a tak vzniká mnoho taxonomických problémů (MÁNEK & EŠNEROVÁ 2004).

3.3.1.1. *Pinus sylvestris* L. – borovice lesní, sosna

Velmi odolná, rychle rostoucí dvou jehličná eurasijská borovice. Mezi stromovými dřevinami má nejrozsáhlejší areál, s největší ekologickou amplitudou, těžišť areálu je v severní Asii.

Je to vyšší strom, až 40 m vysoký. Na extrémních stanovištích může být i podstatně nižší, někdy dokonce jen keřovitého vzrůstu (např. na hranici tundry a lesotundry).

Dosažitelný věk je 300(-584) let.

Koruna je v severní a severovýchodní části evropského areálu spíše štíhlá, s jemným větvením, v části střední a jižní přibývají a posléze i převažují jedinci s klenutou až deštníkovitou korunou (dědičný znak!), se silnými větvemi. Jehlice opadávají po (2-)3(-4) letech.

Kmen je přímý, větvený až v horní čtvrtině. Na extrémních stanovištích bývá často křivolaký. v dolní části je krytý silnou, rozpukanou borkou, v části horní se tenká borka odlupuje v papírovitých lístcích a je rezavě červená či oranžová. Hrubší borka bývá úzce šupinovitá, lasturovitá či široce deskovitá. Dřevo je měkké, s jádrem. (SVOBODA 1953)

Kořenový systém je mohutný, většinou se zachovalým kúlovým kořenem, který je 1,5 - 3 m hluboko (v suchých, písčitých půdách ještě hlouběji); časté jsou i boční kořeny. Horizontální kořeny rostou ve vrstvě do 20 cm pod půdním povrchem. Kořenový systém velmi dobře kotví nadzemní část v zemi. Borovice lesní netrpí vývraty a je proto považována za zpevňovací dřevinu.

K odkvětu dochází v červnu až počátkem července. i když je borovice lesní jednodomá, může na některých stromech převládat jedno pohlaví.

Diverzita uvnitř taxonu je extrémně veliká. Hospodářsky významná je např. velká růstová variabilita, lišící se jak podle místa zeměpisného původu, tak i podle stanoviště.

Borovice lesní (jako druh) je adaptována na velmi široký klimatický rozsah. Roste na územích s délkou vegetační doby 90-120 dnů (výjimečně i méně), s průměrnými ročními srážkami 200-1780 mm. Převážnou část areálu je možno charakterizovat jako kontinentální nebo alespoň kontinentálně laděnou.

Na extrémních stanovištích je schopna plnit půdoochranné a rekultivační úlohy (MUSIL 2003).

3.3.1.2. *Pinus mugo* Turra – borovice kleč, kosodřevina

Kleč *P. mugo* (sensu stricto) je jeden ze čtyř druhů borovic rostoucích výhradně keřovitě. Je součástí agregátu (species aggregatum), tj. velkého či „souborného druhu“ (komplexu několika malých, „drobných druhů“, mikrospecies). Spolu se dvěma stromovými „drobnými druhy“ – borovicí blatkou a borovicí pyrenejskou – a také s několika kříženci (ustálenými i primárními). Naše autochtonní populace kleče – kosodřeviny se vyskytují pouze v Čechách (MUSIL 2003).

Borovice kleč je menší či větší keř, vysoký jen několik málo decimetrů až 2,5 m, v příznivějších podmínkách v kultuře i 3-4 m 10 s některými kmeny pokřivenými. Větve jsou dlouhé a jejich spodní část spočívá u země, zatímco konec je vzpřímený. Jehlice jsou ve svazečku po dvou. Samičí šištice jsou symetrické a mají úzkou apofýzu s centrálním středem (GAUSSEN et al. 1993). Na hřebenech hor může působit jako limitující faktor růstu malá výška sněhové pokrývky, nad níž je kleč vystavena totálnímu obrusu sněhovými krystalky, podobně může působit i okus zvěří či dobytkem.

Dosažitelný věk je až několik set let.

Dřevo je těžké, tvrdé, houževnaté a silně pryskyřičné, má červenohnědé jádro.

Kořenový systém má mohutné postranní kořeny, které dobře zpevňují půdu, kůlový kořen chybí.

Druh je to značně variabilní jak ve vzrůstu (různé ekomorfózy), tak v délce jehlic a ve tvaru šišek.

Kleč není tolerantní k zástině, je silně světlomilná. Na přelomu pleistocénu a holocénu měla zřejmě mnohem větší rozšíření než dnes; rostla pravděpodobně i v nejnižších polohách. Avšak návratem stromových dřevin schopných obnovy i ve větším či menším zastínění pro ni zbyly jen méně příznivé lokality a území nad horní hranicí lesa. Tam je schopna vyrovnat se i s rozmanitým množstvím přístupné vody. Roste jak na vápencích, na vysýchavých, mělkých podkladech, tak i na rašelinách, bez ohledu na geologické podloží. v nižších polohách se objevuje především v surových, klimaticky inverzních podmínkách soutěsek a skal.

Značně tolerantní je i k emisím, má půdoochrannou a vodohospodářskou funkci (MUSIL 2003). *Pinus mugo* je velmi důležitá pro horské oblasti i z hlediska ekologického, kde jsou tyto druhy nedílnou součástí náchylných ekosystémů (VORNAM at al. 2004).

3.3.1.3. *Pinus rotundata* Link. – borovice blatka, borovice bažinná

Stromová, dvou jehličná borovice. V rámci agregátu *P. mugo* má blatka nejmenší, reliktní areál, nacházející se ve středu Evropy, hlavně Alp, a naopak největší ekologickou „specializaci“ (v postglaciálním vývoji uhájila existenci prakticky jen na rašelinistích).

Je to strom malého až středního vzrůstu, výška 10-13(až 20) m. v dospělosti má téměř vždy jen jediný, přímý kmen; koruna je úzká, válcovitá, zašpičatělá, jemně větvená.

Dřevo je tuhé, se slabě patrným jádrem, málo pryskyřičné. Borka je nejpodobnější borce smrkové.

Kořenový systém bývá malý, do hloubky obvykle limitovaný hladinou podzemní vody.

Blatka dnes vytváří porosty výlučně na rašelinistích, nejčastěji přechodových, vzácně na obvodu vrchovišť. Často roste ve společenstvech s břízou pýřitou, na sušších místech přistupuje borovice lesní, příp. i smrk ztepilý. Na méně zamokřených

a úrodnějších stanovištích by rostla blatka relativně lépe, avšak ve volné přírodě podléhá konkurenci vyšších stromů.

Hlavní význam je podrostotvorný, s půdoochrannou funkcí. Je značně odolná k emisím (MUSIL 2003).

3.3.1.4. *Pinus uncinata* Ramond – borovice pyrenejská

Stromový, 15(-25) m vysoký dvou jehličný taxon, dlouhověký, klimaticky odolný, jeden ze tří mikrospecies tvořících agregát (MUSIL 2003).

Má rovný a vzpřímený kmen. Samičí jehlice jsou silně asymetrické a mají tlustou zahnutou apofýzu se středem na špičce (GAUSSEN et al. 1993).

Ačkoli byla popsána již dříve, bývá tato borovice dodnes dost často spojována s příbuznou borovicí blatkou *P. rotundata* (MUSIL 2003).

Roste převážně na nerašelinných, extrémních, často neplodných, suchých, skalnatých půdách a sutích, obvykle na vápenatých horninách (vápence, sádrovce) – ale i na kyselých žulách, kvarcitech apod. (JACAMON 1992).

Pinus uncinata může mít původ v dlouhém období raného pleistocénu (starší oddělení čtvrtohor) (SANDOZ 1983, CHRISTENSEN 1987a).

Využívá se k protieroznímu zalesňování vysoko položených a málo produktivních poloh (MUSIL 2003).

Morfologické a ekologické charakteristiky však nemusí být tak zřetelné a tak systematicky zůstává komplex proměnlivý (SANDOZ 1987). Podle SANDOZE je jako rozlišující znak více spolehlivý počet a velikost hypodermálních a endodermálních buněk, i když jeho hypotéza je stěží použitelná pro praktické účely. Ostatní morfometrické znaky, které jsou známy k odlišení těchto druhů, jsou délka jehlic a vzdálenost cévních svazků (BORATYŇSKA & BOBOWICZ 2001).

Důležitou rolí komplexu je hlavně ochrana proti půdním erozím a zpomalení lavin. Jehlice jsou zdrojem oleje (STEVANOVIC et al. 2005), jarní pupeny jsou běžně používány v medicíně (HIPPELI et al. 2004, GRABMANN et al. 2005) a pro produkci likérů. I když je dřevo těžké a tvrdé, je využíváno jen zřídka kvůli malé velikosti a pomalému růstu stromů. Stromy mají využití i jako okrasné, hlavně ve střední a severní Evropě (MONTELEONE et al. 2005).

3.4. Výskyt vybraných druhů borovic

Pinus sylvestris je rozšířena ve značné části Eurasie, je to borovice s největším areálem na světě: od Atlantiku prochází Evropou přes celou Sibiř až téměř k Pacifiku, tj. od Skotska, resp. od severozápadní části Pyrenejského poloostrova až k moři Ochotskému, nejjihněji zasahuje v Sierra Nevadě (nejvyšší španělské kontinentální pohoří, leží v mediteránu na 37° s. š.), nejseverněji ve Skandinávii, kde dosahuje až za severní polární kruh, na hranici tundry a lesotundry (70° S. 3.) (MUSIL 2003).

SVOBODA (1953) člení borovici lesní do 3 skupin: na klimatypy severské, stepní a horské. Maximum výskytu borovice lesní je v severní části areálu (severská borovice lesní), roste hlavně v nížinách, na chudých, písčitých podkladech dostatečně zásobených vláhou, příp. až na bažinatých, převážně rozlehlých porostech v pásmu smrku. v severní Evropě je převládajícím lesním druhem. v evropské části Ruska roste na značně rozsáhlém území, od tundry na severu po stepi na jihu. Největší rozlohy zaujímá na Sibiři, kde se vyskytuje od nížin po dolní části hor.

V západní a jižní části areálu, tedy na území ČR, je rozšířena jen ostrůvkovitě na extrémních reliktních stanovištích, souvislé lesní pásmo tu nevytváří (MUSIL 2003).

Pinus mugo roste v horách střední a jihovýchodní Evropy, s těžištěm výskytu nad horní hranicí lesa (ale i těsně pod ní). Roste v Alpách počínaje středním Švýcarskem, odkud jde směrem východním, vyskytuje se v severní předalpské oblasti (včetně hraničních území ČR a jižního okraje Polska), v Karpatech, dále na Balkáně v Dinaridech, v Rodopském systému a v systému Staré Planiny. Nejsevernější výskyt kosodřeviny je v Krkonoších (už na polské straně), nejjihnější v Rodopech.

Původní rozšíření kleče v České Republice je pouze v subalpínském a supramontánním stupni západních Sudet a ve vrcholové části Šumavy, tj. v krkonoško-jizerskohorské a šumavské oblasti. Nepočítáme-li drobnější keře, je kleč hlavní dřevinou nad horní hranicí lesa v Krkonoších, na půdě minerální i na vrchovištích. Vyskytuje se tu (stejně jako v Jizerských horách) také pod horní hranicí lesa, na vrchovištích smrkového, tj. supramontánního vegetačního stupně. Na Šumavě kleč roste pouze jako tzv. vrcholový

fenomén v klimaticky inverzních ledovcových karech – jen na minerální půdě skalnatých míst a srázných svahů nejvyšších poloh, v supramontánním vegetačním stupni.

Směs křovinných a klečových porostů – s jedním nebo více poléhavými kmeny a vystoupavými větvemi – je na vrchovištích od Krušných hor přes Slavkovský les, Šumavu až po hory Novohradské – je rovněž autochtonní (GOLDE 2000). Dnes však tyto populace bývají považovány za samostatný hybridogenní taxon *Pinus x pseudopumilio* (Willk.) Beck (= *P. mugo* x *P. rotundata*) (MUSIL 2003).

Pinus rotundata je rozšířena ve střední Evropě, v malých ostrůvcích i na rašeliništích, přibližně od severního okraje Alp po střední části Krušných hor, dále po Sasko a polské Slezsko, na východ nejdál po rašeliniště Rejvíz (BUSINSKÝ 1999) na severovýchodním okraji Hrubého Jeseníku (české Slezsko), na západ po Schwarzwald, Juru (FRELÉCHOUX et al., 2000) – resp. po Vogézy (Vosges) a Francouzské středohoří (Massif Central – DEBAZAC 1991).

V České Republice je rozšířena v západních a jižních Čechách, od Třeboňské pánve přes Šumavu po Krušné hory, na Moravě pouze u Velkého Dářka ve Žďárských vrších, v českém Slezsku jen na Rejvízu (MUSIL 2003).

Pinus uncinata Ramond má reliktní areál v jihozápadní Evropě, kolem horní hranice lesa (MUSIL 2003), nejvíce na skalách a sutích (vápenec nebo křemičitan). Tak se liší od rašelinných borovic ne pouze v geografickém umístění a nadmořské výšce, ale i v ekologických požadavcích. Nejvíce se nachází ve východních Pyrenejích (kde dosahuje maximálních dimenzí), v západních i středních Alpách (zde samostatně nebo ve směsi s modřínem a limbou, na výslunných svazích), vzácně na hřebenech Jury (DEBAZAC 1991) a ve Francouzském středohoří.

V Pyrenejích tvoří tato borovice horní hranici lesa i horní hranici stromovou ve výškách 1600-2000(-2350) m n. m. Z nejvyšších poloh tohoto pohoří jsou popisovány i typy vícekmenné a keřovito-klečovitě (CAMARERO et al., 2000). Nejjižněji se vyskytuje v horách Sierra de Gudar (40-41° s. š.). v Alpách je borovice pyrenejská uváděna z oblastí mezi 1500-2700 m n. m (MUSIL 2003).

3.5. Proces hybridizace u borovic

Přírodní hybridizace je jedním z nejvýznamnějších evolučních procesů vedoucí k tvorbě nových druhů (ARNOLD 1997) a k adaptaci rostlinných i živočišných druhů (LEWONTIN & BIRCH 1966, ARNOLD 1997). Je mnoho příkladů, které dokazují, že hybridní genotypy mohou mít rovnocenný nebo dokonce vyšší zdatnost (kondici) ve srovnání s rodičovskými druhy a mohou být v určitém prostředí zvýhodněny. Dokonce i v případě počáteční snížené plodnosti nebo životaschopnosti hybridů v prvních populacích může tok genů pokračovat ve spojení populací a šíření hybridních druhů (ARNOLD et al. 1999).

Mezi příbuznými druhy rodu *Pinaceae* je hybridizace žádoucí (např. STASZKIEWICZ & TYSZKIEWICZ 1969, BOBOWICZ 1990, VIEWEGH & CAMBALOWA 1993). Experimenty s umělou mezidruhovou hybridizací prokázaly dědičnost fenotypových znaků včetně rezistence k patogenům (KORMUŤÁK & LANÁKOVÁ 1988, PRUS-GŁOWACKI & STEPHAN 1998). Pomocí DNA markerů bylo zkoumáno mnoho taxonomických vztahů a ukázalo se, že je lze využít pro diferenciaci druhů i pro identifikaci hybridů (WAGNER et al. 1987, SZMIDT & WANG 1991, HIPKINS et al. 1994, BUCCI et al. 1998, GERMANO & KLEIN 1999).

Hybridizace může změnit velikost genomu, aniž by došlo ke změně v počtu chromozomů. Velikost jaderného genomu u borovic je neobvykle variabilní (HALL et al., 2000). Velikost hybridního genomu by mohla být změněna amplifikací DNA u všech chromozomů. Amplifikace v jednotlivých chromozomech se vyskytuje u krátkých segmentů, pravděpodobně nekódující DNA (BRANDHAM & DOHERTY, 1998). Duplikace krátkých segmentů bez polyploidizace je kontrolována elementy v genomu, které detekují, kvantifikují a regulují obsah DNA podle přesně stanovených limitů (KEYL 1965). Amplifikace krátkých segmentů je přiměřeně rozdělena, aby se dodržela uniformita a neměnila homologní párování (BRANDHAM & DOHERTY 1998). Největší rozdíly ve velikosti genomu se vyskytují v hybridech srovnatelných s jejich rodičovskými druhy. Tyto rozdíly jsou vysvětlovány fylogenetickou vzdáleností mezi rodičovskými druhy (WILLIAMS et al. 2002).

Uniformita v počtu chromozomů a morfologii je dosažena procesem selekce, která silně ovlivňuje mezidruhovou hybridizaci u jehličnanů, ale není úplně vhodná kvůli rozdílným velikostem genomu. Všechny borovice mají základní chromozomové číslo 12

(SAYLOR 1961; DOUDRICK et al. 1995), ale obsah jaderné DNA mezi druhy se pohybuje od 19 do 31pg-C⁻¹ (JOYNER et al. 2001).

Počet chromozomů u hybridů borovic je neměnný. U F1 dospělých hybridů nebyly při umělé hybridizaci během meiózy zaznamenány ani chromozomové abnormality ani nové uspořádání chromozomů (SAX 1960).

Abnormality při meióze jsou běžné během mikrosporogeneze a mohou mít za následek zakrnělý (SAYLOR & SMITH 1966), někdy i sterilní pyl (SAX 1960).

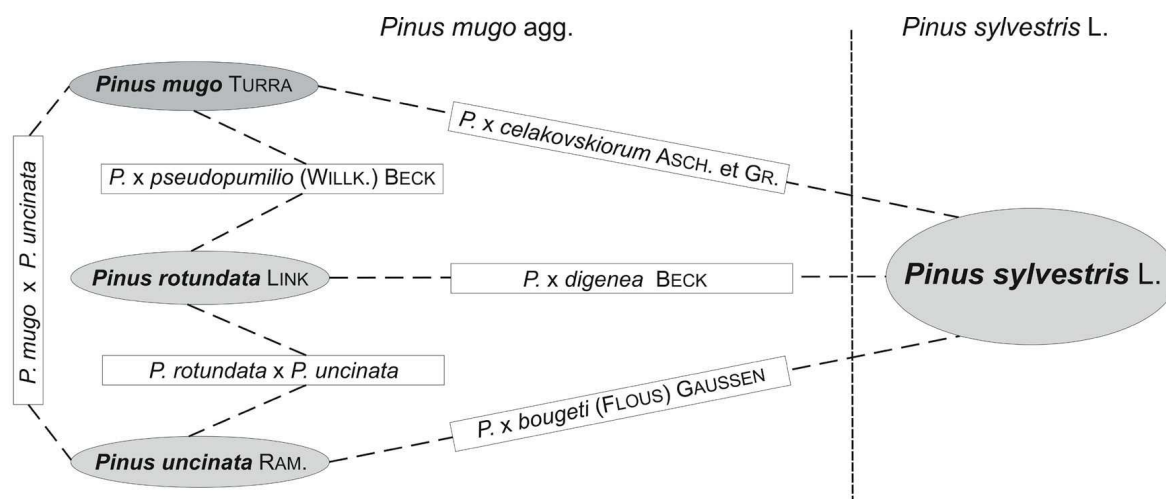
Selekce u dospělých F1 hybridů může omezit genotypové rozdíly během meiózy. Genotypové změny se mohou vyskytovat, pokud jsou dva příbuzné homologní genomy spojeny do jedné buňky a způsobí tak eliminaci chromozomu nebo dokonce polyploidii (MCCLINTOCK 1984). U borovic mohou být změny genotypu studovány, protože u nich nejsou známy žádné post-zygotické bariéry, které by zabraňovaly reprodukci. Pre-zygotické bariéry, jako je pylová sterilita, jsou při mezidruhové hybridizaci běžným jevem (např. MCWILLIAM 1959). Tak mohou vzniknout životaschopné, plodné mezidruhové hybridy mezi blízkými druhy (RIGHTER & DUFFIELD 1951).

Navzdory stálosti karyotypu a absenci genotypových změn není známo, jestli je obsah hybridního genomu podobný rodičovským druhům (WILLIAMS et al. 2002).

Přímou selekcí může u borovic dojít také ke vzniku nových druhů. Pokud jsou rodičovské druhy sympatrické, mohou být nové druhy homoploidní (WANG, SZMIDT & SAVOLAINEN 2001); polyploidní hybridy jsou vzácné a letální (KHOSHOO 1959). U nových homoploidních hybridů může být plodnost ve srovnání s rodiči buď vysoká nebo nízká (BUERKLE et al. 2000) podle toho, jak je proměnlivá úroveň plodnosti u dospělých F1 hybridů borovic (SAYLOR & SMITH 1966).

Hybridizace byla u některých druhů borovic prokázána. Mezi tyto druhy patří např. *P. halepensis* a *P. brutia* v Turecku (BUCCI et al. 1998), *P. contorta* a *P. banksiana* v Kanadě (WAGNER et al. 1987), *P. pumila* a *P. pentaphylla* v Japonsku (WATANO et al. 1996) nebo *P. taeda* a *P. echinata* v USA (CHEN et al. 2004). V rámci rodu *Pinus* byla introgresivní hybridizace popsána mnohými autory, to nejen v rámci České republiky (BUSINSKÝ 1999, BUSINSKÝ & WEGER 1995, HOLUBIČKOVÁ 1965) ale také z mnoha jiných zemí jako např. zemí bývalého Sovětského svazu (POLITOV et al. 1999, GONCHARENKO et al. 1995), Polska (SIEDLEWSKA & PRUS-GŁOWACKI 1995, BACZKIEWICZ & PRUS-GŁOWACKI 1997), Slovenska (KORMUŤÁK 1990, STASKIEWICZ 1993), Švýcarska (NEET-

SARQUEDA 1994), Německa (SCHMID 2000) a Dánska (CHRISTENSEN 1997). Na druhé straně někteří autoři s popisy introgresivních hybridů nesouhlasí a odmítají tuto hypotézu i na základě molekulárních markerů (FILPPULA et al. 1992, NEET-SARQUEDA 1994).



Obr. 1: Jedna z možností zařazení agregátu *Pinus mugo* včetně hybridizace uvnitř agregátu ve vztahu k *P. sylvestris* (HAMERNÍK, MUSIL 2007).

3.5.1. Hybridizace uvnitř agregátu *Pinus mugo*

Taxonomická struktura hybridních populací borovic a jejich výchozích, resp. mateřských druhů se jeví značně komplikovaná. Ve skutečnosti je však základní situace velmi jednoduchá vzhledem k nápadným morfologickým – diakritickým znakům v kombinaci s ekologickými požadavky a geografickým rozšířením u čtyř výchozích druhů, které se jako jediné podílejí na tvorbě všech středoevropských hybridních populací borovic patřících do rámce příbuzenské skupiny *Pinus mugo* agg. a *P. sylvestris* (tj. kromě ojedinělé hybridizace *P. sylvestris* s druhem *P. nigra* Arnold, patřícím do jiné příbuzenské skupiny) (BUSINSKÝ 1999).

3.5.1.1. *Pinus mugo* × *Pinus uncinata*

(Tato hybridní kombinace se nevyskytuje na území Česka ani Slovenska.)

Druh *Pinus mugo* vytváří rozsáhlou kontaktní hybridizační zónu s *P. uncinata* s těžištěm v jižní polovině Švýcarska, zejména ve výškách mezi 1600 a 1900 m n. m. Poslední populace této hybridní kombinace směrem k východu dosahují zhruba 11°

východní délky a na sever jsou omezeny středními horskými polohami Alp, ze kterých se nikde nevymykají (BUSINSKÝ 1999).

3.5.1.2. *Pinus mugo* × *Pinus rotundata*

Tato druhá hybridní kombinace má naopak těžiště svého rozšíření v západních a jižních Čechách a je označována jménem *Pinus* × *pseudopumilio* (Willk.) Beck (1888) a někdy používaným českým ekvivalentem „rašelinná kleč“ (BUSINSKÝ 1999). Habitem má blíže k prvnímu z rodičů – *P. mugo*, tvarem šišek ke druhému – *P. rotundata*. K jejímu vzniku došlo pravděpodobně před více než devíti tisíci lety (MUSIL 2003).

V některých oblastech vytváří tento hybridní taxon rozsáhlé populace, ve kterých byly dlouhodobou introgresivní hybridizací zcela nebo téměř vytlačeny rodičovské druhy. Takovéto populace jsou nejčastější na vrchovištních rašeliništích Krušných hor, kde už rodičovský druh *P. mugo* nikde neroste a *P. rotundata* se zachovala jen vzácně na několika málo lokalitách v západní části pohoří (např. Kovářská). Dalším územím s výskytem *P. × pseudopumilio* je Šumava, kde však taxon roste jen na vrchovištích ve vyšších polohách (např. v okolí Kvildy a Modravy), zatímco na přechodových rašeliništích v údolí Vltavy je zastoupen v převaze nebo pouze druh *P. rotundata* (např. Velká niva u Lenory nebo Malý luh u Dobré). Dále je tento hybridní taxon znám z našeho území ještě z rašeliniště Lysina u Kladské ve Slavkovském lese a z Novohradských hor. Izolovaný výskyt se nachází na polské straně Orlických hor (na rašeliništích Czarne Bagno a Topielisko severně pod masivem Deštná) ve vzdálenosti 2 až 3 km od našich hranic. Mimo území zmíněných pohraničních hor Čech se taxon *P. × pseudopumilio* vyskytuje ještě v horním Bavorsku, podél severních okrajů rakouských Alp. Naproti tomu údaje z oblasti Oravy (NOVÁK in KLIKA et al. 1953, VESELÝ 1954, FUTÁK 1966, DOSTÁL 1989), z úpatí Západních a Belanských Tater (JASIČOVÁ in FUTÁK 1966, DOSTÁL 1989) a polské části Karpat (NOVÁK in KLIKA et al. 1953) jsou opět záměny za mezidruhové hybridy kombinace *P. mugo* × *P. sylvestris*, publikované většinou současně s chybnými údaji o výskytu blatky tamtéž.

Vzhledem k rozsahu hybridních populací, jejich variabilitě a absenci jednoho nebo obou rodičovských druhů se předpokládá, že k počáteční hybridizaci mezi *P. mugo* a *P. rotundata* zde došlo už začátkem holocénu. Zvýšený stupeň variability populací

P. × pseudopumilio je patrný ve srovnání s variabilitou čistých populací obou rodičovských druhů (v případě *P. rotundata* myšleno neovlivněným genotypem *P. mugo* bez ohledu na vliv genotypu *P. sylvestris*). Nejnápadnější je variabilita v charakteru růstu od jedinců keřovitých s mnoha obloukovitými větvemi s převládající šířkou, přes nejčtenější formy polykormní až po monokormní jedince s převažující výškou, ale většinou ještě s dlouze obloukovitými větvemi (BUSINSKÝ 1999).

3.5.1.3. *Pinus uncinata* × *Pinus rotundata*

(Tato hybridní kombinace se nevyskytuje na území Česka ani Slovenska.)

Přestože nikde, ani v oblasti Alp nedochází k přímému styku areálů těchto dvou druhů (respektive nikde se nevyskytuje populace s převahou fenotypově čisté *P. uncinata* v blízkosti populace s převahou *P. rotundata*), existuje jisté tranzitní území, kde se vyskytují komplikované hybridní roje se zjevnou účastí obou druhových genotypů hybridně kombinovaných ještě druhem *P. sylvestris* a snad i *P. mugo*. Tato území se nacházejí v oblasti západních Tyrol v Rakousku a jejich skutečný rozsah, ani podrobné fenotypové zastoupení těchto druhů nebylo dosud prozkoumáno (BUSINSKÝ 1999).

3.5.2. Mezidruhová hybridizace vně agregátu *Pinus mugo*

Kromě nepotvrzených údajů o možném křížení *Pinus mugo*, resp. *P. uncinata* s nikoli blízce příbuzným druhem *P. nigra* Arnold, eventuálně *P. heldreichii* Christ (MIROV 1967, BUSINSKÝ 1989) je známa spontánní hybridizace některého ze zástupců *P. mugo* agg. v přírodě jen s druhem *P. sylvestris* L. Přitom *P. sylvestris* je v rámci svého světového areálu (největšího v celém rodu) svým způsobem též taxonomicky komplikovaným druhem (PRAVDIN 1964), ale z hlediska jeho evropského zastoupení je poměrně homogenní. Autochtonní populace jsou ve vztahu k celkové variabilitě druhu rozhodně taxonomicky jednotné a lze je rozlišovat nanejvýš v hodnotě variet, nebo lépe jen jako odlišné populace nebo soubory populací, případně ekotypy. Pokud se týká hybridizace mezi agregátem *P. mugo* a *P. sylvestris*, je rozhodně mnohem častější než se dosud udávalo (BUSINSKÝ 1999).

3.5.2.1. *Pinus mugo* × *Pinus sylvestris*

Z hlediska genetického, ekologického a i z aspektu praktické využitelnosti je nejzajímavější hybridní kombinace *Pinus mugo* × *P. sylvestris*. Výchozí druhy této kombinace jsou vzájemně příbuzensky nejvzdálenější a morfologicky nejodlišnější. Poprvé byl prokazatelně hybrid těchto dvou druhů v úzkém pojetí popsán v roce 1897 ASCHERSONEM a GRAEBNEREM pod jménem *Pinus* × *celakovskiorum* A. et Gr., český název „borovice Čelakovských“, (HAMERNÍK & MUSIL 2007) z morény pod Plešným jezerem na Šumavě. Starší jméno *P. × rhaetica* Brügger (1864) (BUSINSKÝ 1999), v Čechách běžně známá pod názvem „borovice zkřížená“ (HAMERNÍK & MUSIL 2007), často používané pro tuto hybridní kombinaci (CHRISTENSEN 1987a, b, c, STASZKIEWICZ 1993a, b, 1994) je založené na kříženci *P. sylvestris* var. *engadinensis* a *P. mugo* patrně s introgrésí *P. uncinata* nalezeném ve Švýcarsku (SKALICKÝ IN HEJNÝ & Slavík 1988).

Mezidruhovité hybridy rodu *Pinus* se v přírodě vyskytují příležitostně. V posledních desetiletích vzniklo mnoho takových hybridů i umělým způsobem (SAX 1960).

Tok genů z *P. sylvestris* do komplexu *P. mugo* byl ověřen v několika studiích. Byl zkoumán na základě morfologických znaků (CHRISTENSEN & DAR 1997; LAURANSON-BROYER, KRZAKOWA & LEBRETON 1997; BORATYŃSKA et al. 2003), isoenzymů (NEET-SARQUEDA, PLUMETTAZ CLOR & BECHOLEY 1988; NEET-SARQUEDA 1994; SIEDLEWSKA & PRUS-GŁOWACKI 1995; PRUS-GŁOWACKI, BUJAS & RATYŃSKA 1998; LEWANDOWSKI et al. 2002) a DNA (FILPPULA, SZMIDT & SAVOLAINEN 1992; ODRZYKOSKI 2002; WACHOWIAK 2003).

P. sylvestris je jedním z nejrozšířenějších lesních druhů v Evropě a Asii, zatímco *P. mugo* je endemický druh typický pro horské oblasti Evropy (CRITCHFIELD & LITTLE 1971). Současné rozšíření borovice lesní je výsledkem postglaciální migrace z několika ledových refugií (oblastí se stálým klimatem) (WILLIS & ANDEL 2004, CHEDDADI et al. 2006). Předpokládá se, že rekolonizace vytvořila zóny druhotného kontaktu mezi izolovanými populacemi z oblastí bez ledu, které přežily poslední ledové maximum, s populacemi jižních refugií. Tím, že se *P. mugo* a *P. sylvestris* překrývají v některých částech oblastí jejich rozšíření, byla podpořena hybridizace mezi druhy a to přispělo k většímu rozrůznění uvnitř komplexu *P. mugo* (CHRISTENSEN 1987a).

V podmínkách střední Evropy se kontaktní zóny těchto dvou druhů nacházejí ve dvou hlavních typech biotopů – na rašeliništích a na skalnatých výbězcích nejčastěji vápencových hornin často s inverzním mikroklimatickým efektem. Jak uvádí BUSINSKÝ (1999), ke vzájemnému kontaktu populací druhů *Pinus mugo* Turra a *Pinus sylvestris* L. dochází v lokalitách s extrazonálním výskytem kosodřeviny pod jejím hlavním výškovým pásmem rozšíření (ČAMEK & KORMUŤÁK 2007).

V současnosti se *P. sylvestris* a *P. mugo* vyskytují většinou alopatricky. Některé sympatrické populace těchto druhů byly nalezeny na nízko ležících rašeliništích z doby postglaciální. Přírodní hybridizace mezi druhy byla studována na několika populacích, avšak biometrické studie byly limitovány nedostatkem diagnostických charakteristik vhodných pro identifikaci hybridů (CHRISTENSEN & DAR 1997). Hybridní rodiny byly charakterizovány podle morfologie a anatomie jehlic (CHRISTENSEN & DAR 1997; BOBOWICZ et al. 2000), v menším rozsahu také podle proteinů a isoenzymů (PRUS-GŁOWACKI & STEPHAN, 1998). Nicméně, nejsou dostupná data, která by stanovila stupeň křížitelnosti mezi rodičovskými druhy (KORMUŤÁK et al. 2005).

Studium hybridizace těchto druhů bylo prováděno prostřednictvím umělého křížení. Tyto experimenty také napomohly stanovení fylogenetických vztahů a k určení účelu pěstování (KORMUŤÁK & LANÁKOVÁ 1988; PRUS-GŁOWACKI & STEPHAN 1998). Produkce plných semen je většinou používána jako měřítko úspěšného křížení (WACHOWIAK et al. 2005).

Jak bylo uvedeno výše, ke vzájemnému kontaktu populací druhů *Pinus mugo* a *P. sylvestris* dochází na lokalitách s extrazonálním výskytem kleče pod jejím hlavním výškovým pásmem rozšíření. Obráceně by mohlo dojít ke kontaktu při extrazonálním výskytu *P. sylvestris* ve směru nad hlavní pásmo jejího rozšíření. v tomto opačném smyslu jsou však ekologické podmínky pro existenci druhu vždy limitní, neumožňují existenci více než jednotlivých individuů a nebývají zde ani splněny biologické podmínky pro mezidruhovou hybridizaci. V prostředí střední Evropy se hybridogenně úspěšné kontaktní zóny těchto dvou druhů nacházejí ve dvou hlavních typech biotopů – jednak na rašeliništích a jednak na skalních výchozech nejčastěji vápencových hornin často s inverzním mikroklimatickým efektem. V rámci bývalého Československa je v současnosti známa tato hybridní kombinace z následujících lokalit:

Česká republika

Šumava – balvanitá moréna pod Plešným jezerem (okolo 1080 m n. m.).

Slovensko

Orava - rašeliniště okolo Suché Hory u hranic s Polskem (740 m n. m.),- rašeliniště Tisovnica u Oravské Polhory (750 m n. m.);

Západní Tatry – západní úpatí skupiny Osobitá, rašeliniště Medzi bormi nad Zubercom (840 m n. m.);

Malá Fatra – oblast Vrátné doliny, Sokolie – vápencová skalní bradla masivu Obšívanka – Tiesňavy (1000–1100 m n. m.).

Z uvedených míst výskytu se pouze na lokalitách Tisovnica a Medzi bormi nacházejí bohatší hybridní roje s pokročilou introgresí, zatímco v ostatních lokalitách jen jednotlivá hybridní individua. Přesto genetický význam těchto jednotlivých hybridů je značný, protože jsou většinou fertillní a mohou dát základ flexibilnímu potomstvu s velkou ekologickou tolerancí a navíc značnou tvarovou diverzitou. Poslední uvedená lokalita v Malé Fatře je výjimečná ekologicky (vápencové skály) a mimo region Alp zatím není známa jiná lokalita tohoto stanovištního typu (BUSINSKÝ 1999).

3.5.2.2. *Pinus uncinata* × *Pinus sylvestris*

(Tato hybridní kombinace se nevyskytuje na území Česka ani Slovenska.)

Hybridní roje této druhové kombinace byly studovány např. v Pyrenejích (PROBST 1983) Jejich výskyt je bezpečně prokázán na více místech západních Alp (jihovýchodní Francie, Švýcarska i severozápadní Itálie), ale není dosud komplexně vyhodnocen. Ukázkový hybridní roj této kombinace byl nalezen též v masivu Pearroya (2019 m) v provincii Teruel ve východním Španělsku, kde se vyskytuje k jihozápadu předsunutá, zcela izolovaná populace *P. uncinata*. Přestože tato hybridní kombinace nezasahuje do blízkosti území našeho státu, má teoretický význam pro pochopení taxonomických souvislostí řešené problematiky a dokazuje komplikovanost hybridizace dvou druhových komplexů borovic ve střední Evropě a rovněž nedocnění jejího praktického významu (BUSINSKÝ 1999).

3.5.2.3. *Pinus rotundata* × *Pinus sylvestris*

Tato mezidruhová hybridní kombinace byla popsána poprvé v roce 1888 pod jménem *Pinus* × *digenea* Beck z rakouského pohraničí Třeboňské pánve. Dnes je potvrzen její výskyt prakticky ze všech nalezišť se společným výskytem obou druhů, buď jen v jednotlivých exemplářích (např. Malý luh u Volar, Rejvív v Jeseníkách) nebo v rozsáhlých hybridních rojích (Podkovák na Tachovsku, Červené blato na Třeboňsku, Dárko u Žďáru nad Sázavou). V důsledku celkové tendence vysušování zejména přechodových rašelinišť (a už přeměnou okolních porostů nebo přímým odvodňováním) se postupně zvýhodňují rašelinné biotopy v nižších nadmořských výškách ve prospěch *P. sylvestris* oproti *P. rotundata*. To podporuje expanzi borovice lesní do stále izolovanějších populací blatky, čímž se zesiluje proces introgresivní hybridizace, ve kterém jsou flexibilnější hybridní genotypy mnohem úspěšnější než vysoce specializované genotypy blatky. K tomuto genetickému ohrožení druhu *P. rotundata* dochází na většině nalezišť a mnohde je už podíl fenotypově čistých jedinců blatky velmi nízký a je často udržován jen existencí starších stromů, zatímco téměř veškeré potomstvo vykazuje hybridní původ (BUSINSKÝ 1999).

3.5.2.4. *Pinus mugo* × *Pinus rotundata* × *Pinus sylvestris*

(= *P.* × *pseudopumilio* × *P. sylvestris*)

Na území Šumavy bylo v posledních letech nalezeno několik významných populací polyhybridního komplexu vzniklého postupnou hybridogenezí dokonce tří výchozích druhů borovic. Jde o populace nacházející se na Chalupské slati u Borové Lady (910 m n. m.), na Splavském (Kunžvartském) rašeliništi u Strážného (810 m n. m.), na Malé nivě u Lenory (750 m n. m.) a na Mrtvém luhu u soutoku Teplé a Studené Vltavy (740 m n. m.). Z křížení druhů *Pinus mugo* a *P. rotundata*, započatého v dřívějších obdobích holocénu, zde povstal rozsáhlou introgresivní hybridizací, tak jako i v jiných územích, variabilní soubor genotypů zařaditelný pod nothospecies se jménem *P.* × *pseudopumilio*, přestože část jedinců zde dosud vykazuje fenotyp typické *P. rotundata* (v minimální míře na nejvýše položené lokalitě Chalupská slat' a s přibývajícím množstvím na níže položených lokalitách). Ve všech jmenovaných lokalitách jsou však dnes též příhodné podmínky pro

rozvoj sympatrické populace *P. sylvestris* i pro vzájemnou hybridizaci obou taxonů. Tato hybridizace je zjevně sekundární, probíhající recentně v prvních generacích a byla patrně započata nebo alespoň podpořena změnou vodního režimu (zejména prvních dvou lokalit) a následnou expanzí *P. sylvestris* do rašelinného ložiska obývaného rozsáhlou populací hybridního taxonu *P. × pseudopumilio*.

V dubnu 1993 byl rovněž potvrzen výskyt této hybridní trojkombinace v malé populaci *P. × pseudopumilio* v Krušných horách v sedle masivu Klínovce mezi horami Macecha (1113 m) a Meluzína (1094 m) ve výšce 1040 m n. m., nálezem široce keřovitého, přes 50 let starého jedince s jednoznačným hybridním ovlivněním druhem *P. sylvestris*, pravděpodobně druhotným zanesením pylu z větší vzdálenosti. Výskyt této hybridní trojkombinace je nanejvýš pravděpodobný v dalších lokalitách taxonu *P. × pseudopumilio* v Krušných horách a rovněž ve Slavkovském lese (BUSINSKÝ 1999).

3.5.3. Fertilita a sterilita mezidruhových hybridů u borovic

V rámci rodu *Pinus* je většina získaných mezidruhových hybridů životaschopná a relativně fertilní, i když se mezi některými druhy vyskytují překážky jejich vzájemné křížitelnosti (SAX 1960). Toto omezení se představuje ve formě zábrany úspěšné hybridizace některých druhů, způsobené existencí inkompatibility (KORMUŤÁK 1974). V rámci rodu *Pinus* je hybridizační proces poznamenán vlivem takových faktorů jako je neproniknutí pylové láčky až k archegóniu, neschopnost spermatického jádra oplodnění a odumření zygoty ve stádiu proembrya (SARVAS 1962).

Pokusy s umělou hybridizací druhů *Pinus mugo* Turra a *P. sylvestris* L. dokázaly relativně vysoký stupeň křížitelnosti těchto druhů. Hybridní semena kříženců *P. mugo* Turra a *P. sylvestris* L. vykazují vysoký potenciál klíčivosti v porovnání se semeny vzniklými samoopylením, vnitrodruhovým křížením anebo přirozeným opylením. Reciprokým křížením bylo dosaženo mírně nižší hodnoty klíčivosti (KORMUŤÁK et al., 2005).

FEČKOVÁ (2005) analyzovala hybridní semena z kontrolované hybridizace *P. sylvestris* L. x *P. mugo* Turra, která vykazovala vysoké procento klíčivosti. Podařilo se jí získat i hybridní semena, která souhlasí s výsledky předcházejících studií (KORMUŤÁK

& LANÁKOVÁ, 1988). Svědčí to o vzájemné křížitelnosti obou druhů a o možnosti toku genů v obou směrech.

Reálnou příčinou sterility mezidruhových hybridů rodu *Pinus* jsou i poruchy v průběhu meiotického cyklu. SAYLOR & SMITH (1966) sledovali průběh redukčního dělení u 21 druhů a 22 mezidruhových hybridů. Autoři udávají nejčastěji se vyskytující poruchy v průběhu meiózy:

- neukončení terminace chiasmat způsobené neúplným oddělením chromozomových ramen v anafázi I,
 - narušená tvorba bivalentů v metafázi I,
 - předčasná separace chromozomů v anafázi I,
 - opoždění rozchodu některých chromozomů k pólům buňky v telofázi I a II,
- výskyt inverzních mostů s chromozomovými fragmenty, nebo bez nich v telofázi I, metafázi II a telofázi II,
 - výskyt mikrojader ve stádiu diád a tetrad.

Všeobecně se předpokládá, že sledované hybridní populace vykazují nižší míru plodnosti jako kontrolní populace „čistých“ druhů (ČAMEK & KORMUŤÁK 2007).

3.6. Genetická variabilita a využití metod molekulárních markerů

Pinus sylvestris L. je nejrozšířenější ze všech borovic. Protože je významná jak z hlediska ekologického, tak i ekonomického, je široce studována její genetika. Je zajímavý přenos některých informací do ostatních druhů, stejně jako z ostatních druhů do *P. sylvestris*. Druhy jsou adaptovány širokému rozsahu prostředí, hlavně klimatickým podmínkám a geneticky vykazují mezi populacemi výrazné rozdíly (MIKOLA 1982; HURME et al. 1997).

Všechny druhy borovic mají 12 chromozomů s podobnou morfologií (SAX & SAX 1933), ale velikost genomu se mezi jednotlivými druhy liší (WAKAMIYA et al. 1993). Genom je veliký, v rozsahu 20 až 32 pg (WAKAMIYA et al. 1993), obsahuje velké množství opakujících se sekvencí (KRIEBEL 1985) a poskytuje velký komplex genových rodin (KINLAW & NEALE 1997).

Eurasijské tvrdé borovice mají odlišnou genetickou variabilitu a populační strukturu. Vysoce heterozygotní druhy, jako *Pinus sylvestris* (PRUS-GLOWACKI & STEPHAN 1994), jsou sympatrické s druhy vykazujícími pozoruhodný nedostatek polymorfismu, např. s *P. pinea* (FALLOUR et al. 1997).

Část genetických map jehličnanů je vytvořena za pomoci isoenzymů (např. RUDIN & EKBERG 1978). Počet lokusů je nízký, ale ortologní lokusy mohou být obvykle identifikovány bez problémů i v rozdílných druzích (např. CONKLE 1981).

Genetické mapy *Pinus sylvestris* jsou konstruovány na základě ESTP (expressed sequence tag polymorphism) markerů a ostatních genových markerů jako AFLP a mikrosatelitů (KOMULAINEN et al. 2003). Skládají se z ortologních markerů a jsou využitelné pro studium evoluce a pro mapování kvantitativních znaků. Porovnáváním map se ukazuje, že mezi rozdílnými skupinami organismů se vývoj chromozomů výrazně liší. Např. geny druhů *Brassica* a *Arabidopsis* jsou velmi odlišné (LAGERCRANTZ 1998), zatímco chromozomy druhů rodu *Pinus* a vůbec celé čeledi *Pinaceae* se vyvíjejí velmi pomalu (PRAGER et al. 1976; DEVEY et al. 1999; BROWN et al. 2001).

3.6.1. Charakteristika molekulárních markerů:

DNA markery jsou markery na úrovni DNA. Umožňují jednoduše detekovat odlišnosti v primární genetické informaci, kterou DNA nese. DNA markerovací systémy jsou založeny na polymorfismu v sekvencích DNA u analyzovaných jedinců (populací) (ČURN 1998). Je prokázáno, že v průměru 50% lokusů rostlinných druhů je polymorfních (CHLOUPEK 1995).

1. proteiny – isozymy

2. DNA markery

a) RFLP(**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)

b) založené na PCR – analýza fragmentů DNA

Metody molekulárních markerů založené na technice PCR mají široké spektrum využití. Lze tak získat např.:

- údaje o pořadí nukleotidů – sekvence
- analýzu celého genomu – délkový polymorfismus fragmentů
 - RAPD (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**NA)
 - AFLP (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism)
- informace z konkrétních částí genomu
 - PCR-RFLP (**P**olymerase **C**hain **R**eaction - RFLP)
 - mikrosatelity (**S**imple **S**equence **R**epeats - SSRs)
 - SSCP (**S**ingle **S**train **C**onformation **P**olymorphism)

3.6.1.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Zavedení polymerázové řetězové reakce - PCR (SAIKI et al. 1985) a rychlý rozvoj této techniky na přelomu 80. a 90. let výrazně zjednodušil řadu protokolů používaných v molekulární biologii. Principem je denaturace DNA (oddělování komplementárních vláken) a její renaturace (jejich opětovné spojování) v kombinaci se syntézou DNA katalyzovanou specifickou DNA polymerázou (Taq-polymerázou), která je rezistentní ke zvýšené teplotě, protože pochází z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. Cyklus sestává ze tří krátkých fází, během nichž se střídají teploty. v první fázi dochází při teplotě 92-96°C k denuraci vzorku DNA. Ve druhé fázi se teplota snižuje na 35-65°C a dochází k navázání syntetických oligonukleotidů (krátkých úseků jednovláknové DNA) komplementárních k oběma vláknům okrajových úseků DNA, která má být amplifikována. Ve třetí fázi se teplota snižuje na 72°C, kdy je aktivita Taq-polymerázy optimální a dochází ke „kopírování“ DNA. Po 30-50 cyklech je ve vzorku přítomna v podstatě jen amplifikovaná DNA, kterou lze detekovat elektroforeticky (ONDŘEJ & DROBNÍK 2002). Velmi často je nezbytné optimalizovat složení reakční směsi tak, aby výtěžky byly dostatečně vysoké a spolehlivé (VONDREJS & ŠTORCHOVÁ 1997). Produkty PCR se hromadí teoreticky geometrickou řadou (RACLAVSKÝ 1998). PCR má velmi široké využití: často nahrazuje používání genových knihoven, zjednodušeně klonování genů, umožňuje detekci patogenů, transgenů a umožňuje amplifikovat DNA z celého genomu (ONDŘEJ & DROBNÍK 2002).

3.6.1.2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Polymorfismus náhodně amplifikované DNA je technika založená na technologii PCR. Jsou používány náhodně generované krátké primery – o délce 6-10 nukleotidů (ČURN & SÁKOVÁ 1996).

RAPD primer hybridizuje k několika tisícům oblastí DNA, avšak ne všechny hybridizace vedou k tvorbě PCR produktu. Metoda umožňuje použití několika primerů k vytvoření velkého množství různých PCR produktů pocházejících z různých oblastí studovaného genomu (EDWARDS 1998). Během reakce dochází k amplifikaci řady produktů, lišících se délkou a interním nukleotidovým složením. Fingerprint genomu je získán po gelové elektroforéze a vizualizaci produktů (ČURN & SÁKOVÁ 1996).

RAPD technika umožňuje analyzovat větší množství lokusů a tak dokazuje kompletnější zhodnocení genomu ve srovnání s ostatními biochemickými a molekulárními markery. Má několik dalších výhod, např. nízké náklady, rychlost, je požadováno malé množství DNA a vysoká možnost detekce polymorfismu. Může být intenzivně využívána k úspěšné detekci rozdílů mezi rostlinnými populacemi (ETISHAM-UL-HAQ et al. 2001), druhy (ROMAN et al. 2003) a hybridy (TRIST et al. 2000, RAJORA & RAHMAN 2003). RAPD má také svoje nevýhody, nejvýznamnější je dominantní exprese alel a nízká úroveň reprodukovatelnosti. Brání přímému odhadu frekvence alel v diploidech a proto zdůrazňuje genetickou variabilitu a diferenciaci (LYNCH & MILLIGAN 1994, SZMIDT et al. 1996).

3.6.1.3. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů je metoda kombinující restriční štěpení DNA (technika RFLP) a amplifikaci DNA (technika PCR) (GRAMAN et al. 1999). Vychází z toho, že metoda RFLP dává poměrně málo proužků a tedy malou variabilitu a rozlišovací schopnost (ONDŘEJ & DROBNÍK 2002). Oproti metodám RFLP a RAPD má řadu výhod, mezi nejdůležitější patří generování velkého množství markerů (ČURN & SÁKOVÁ 1996). AFLP markery jsou dominantní.

Princip AFLP metody je založen na selektivní amplifikaci podskupiny restričních fragmentů získaných ze směsi DNA fragmentů připravených štěpením genomické DNA prostřednictvím restričních endonukleáz. Délkový polymorfismus selektivně

amplifikovaných DNA fragmentů je detekován po separaci v polyakrylamidovém gelu (PAGE) (MATTHES et al. 1998) nebo s použitím kapilární elektroforézy. Metoda zahrnuje čtyři kroky (VOS et al. 1995):

1. rektrikce DNA a ligace oligonukleotidových adapterů
2. preselektivní amplifikace
3. selektivní amplifikace
4. elektroforetická separace amplifikovaných fragmentů s následnou detekcí

3.6.1.4. SSRs (Simple Sequence Repeats) – mikrosatelity

Mikrosatelity jsou velmi krátké repetitivní sekvence rozptýlené po eukaryotním genomu (LITT & LUTY 1989). Jsou tvořeny tandemově se opakujícími krátkými sekvencními motivy (BRAATEN et al. 1988) s délkou 2-6 bází (např. motivy $(CA)_n$ $(CAA)_n$), vykazují rozsáhlý polymorfismus daný délkou opakování krátkých motivů a představují stabilní kodominantní systém využitelný pro identifikaci genotypů a mapování rostlinného genomu (MORGANTE & OLIVIERI 1993). Mikrosatelitové markery získáme PCR reakcí s primery, které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem. Sekvence primerů se získávají prohledáváním známých sekvencí obsažených v různých databázích (např. EMBL nebo GenBank, ty však obsahují především sekvence modelových organismů, kulturních plodin a hospodářských zvířat) nebo z již opublikovaných prací anebo *de novo* izolací z genomových knihoven (TAUTZ 1989)

Mikrosatelity byly nalezeny v nekódujících i v kódujících oblastech genů. Byly zjištěny konzervativní motivy mikrosatelitů vyskytující se v genomech různých organismů. Např. poly(TG) motiv se nachází v oblasti rRNA transkripční jednotky u myši, krysy a člověka (BRAATEN et al. 1988). Na rozdíl od minisatelitů jsou amplifikovány pomocí PCR a jsou zjištěné elektroforézou (ŘEHOUT et al. 2000).

V současnosti se mikrosatelity uplatňují především při analýzách genetické struktury populací (např. GUSTAFSSON 2000) a při popisu a odlišení hybridních druhů od druhů rodičovských.

Mikrosatelity u jehličnanů (borovic)

Cross-amplifikace mezi jehličnany je velmi významný, protože vývoj nových mikrosatelitních markerů pro každý druh je značně nákladný. Křížení druhů s ortologními mikrosatelitními regiony přináší cenné informace o mutačních a evolučních procesech, které tyto lokusy ovlivují (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al. 2004).

Cross-amplifikace mezi příbuznými druhy je jednou z nejvíce nadějných metod (ECHT et al. 1999; KUTIL & WILLIAMS 2001; SHEPHERD et al. 2002).

Mikrosatelity mohou být využity i pro tvorbu genetických map, pro konzervaci genů a pro ověření kvantitativních znaků (DEVEY et al. 1999; MEKSEM et al. 2001) a jsou třeba k upřesnění evolučních otázek souvisejících s tokem genů a s adaptací na úrovni ekosystému (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al. 2004).

V kontrastu s ostatními rostlinnými druhy je v *Pinaceae* několik polymorfních jednoduchých kopií jaderných mikrosatelitních markerů nebo jednoduchých opakujících se sekvencí. Genom borovic je charakterizován velkým množstvím opakujících se sekvencí (KRIEBEL 1985; KAMM et al. 1996; KOSSACK & KINLAW 1999; ELSIK & WILLIAMS 2000) a to je hlavní problém vývoje markerů. Komplikovanost genomu jehličnatých druhů má za následek, že cross-amplifikace mezi druhy je obecně slabá a výsledkem může být velký podíl neúspěšné amplifikace, nespecifická amplifikace, více proužků na gelu nebo nedostatek polymorfismu (ECHT et al. 1999; MARIETTE et al. 2001).

Jednoduché opakující se sekvence byly nalezeny ve všech oblastech genomu, včetně kódujících oblastí (TOTH et al. 2000). S vývojem cDNA knihovny obohacené o mikrosatelity poukazuje SCOTTI et al. (2000) na přítomnost mikrosatelitů uvnitř kódujících oblastí u *Picea abies*, druhu náležícímu k *Pinaceae*. Dostupnost expressed sequence tags (ESTs) z velkého sekvenačního projektu je potenciálně hodnotný zdroj SSRs, který může být využit i v méně vybavených laboratořích. Z EST databáze byly získány cDNA – SSRs u několika rostlinných druhů, jako např. vinná réva (SCOTT et al. 2000), obiloviny (TEMNYKH et al. 2000, 2001; CHO et al. 2000; CORDEIRO et al. 2001; KANTETY et al. 2002; EUJAYL et al. 2002; VARSHNEY et al. 2002; GAO et al. 2003) a *Arabidopsis* (CARDLE et al. 2000; MORGANTE et al. 2002). Tyto EST markery jsou velmi dobře využitelné pro cross-amplifikaci mezi příbuznými druhy (EUJAYL et al. 2003; GUPTA et al. 2003).

Kodominantní znaky, reprodukovatelnost a vysoké rozlišení, to všechno přispívá ke stále většímu využívání jaderných mikrosatelitů jako genetických markerů v molekulárních studiích. Jednou hlavní nevýhodou ovšem je, že je potřeba pracovat s primery pro daný studovaný druh (SQUIRRELL at al. 2003). Výhodou kodominantních markerů je, že je lze dobře zdokumentovat (POWELL et al. 1995).

3.6.1.5. Sekvenování DNA

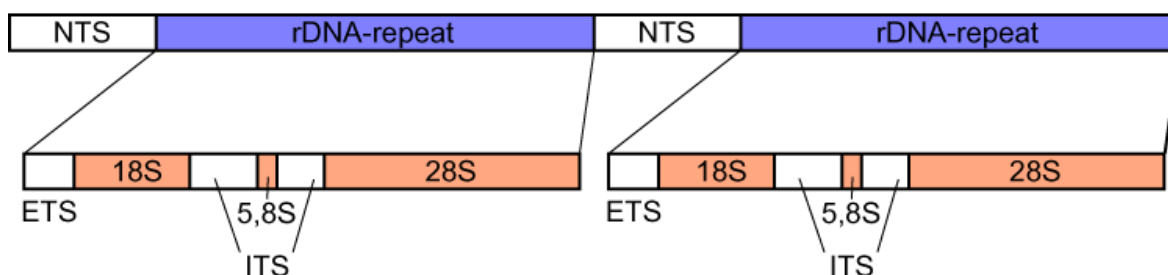
Sekvenování DNA znamená určení nukleotidové sekvence specifické molekuly DNA. Techniky sekvenování byly vyvinuty teprve poměrně nedávno, první publikace vyšly v roce 1977 (MAXAM & GILBERT 1977; SANGER et al. 1977). K určení primární struktury vybrané DNA lze použít dvě různé metody sekvenování:

- ☞ metoda "chemické degradace", známou jako Maxam-Gilbertova metoda (MAXAM & GILBERT, 1977), která je založena na bázově-specifickém chemickém štěpení molekuly DNA, nebo
- ☞ metoda "terminátorů" - "Sangerova neboli dideoxyribonukleotidová metoda" (SANGER et al., 1977), založenou na syntéze DNA pomocí enzymu DNA polymerázy, kdy se do nově syntetizovaných řetězců, kromě klasických nukleotidů (dNTP), začleňují ještě specifické nukleotidy, tzv. dideoxynukleotidy (ddNTP-ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), neboli terminátory.

Výchozím materiálem pro sekvenování jsou dostatečně krátké homogenní úseky nukleových kyselin – rRNA, plazmidy, viry, organelová DNA. Kódující úseky – exony – jsou konzervativnější, zatímco nekódující úseky – introny, spacers – jsou variabilnější. V chloroplastovém genomu je mnoho genů *single-copy*, tzn. pouze jedna kopie v celém genomu, má mnoho konzervativních míst využitelných jako *priming sites* pro PCR amplifikaci úseků mezi nimi, mohou se v něm vyskytovat rozsáhlé delece, inverze (např. 30kb inverze odlišuje mechorosty od cévnatých rostlin) nebo ztráta specifických genů a intronů. V jaderném genomu je mnoho genů v mnoha kopiích (*multiple-copy*), což způsobuje problém s homologií a my nevíme, co vlastně sekvenujeme; nebo obsahuje *low-copy* nebo *single-copy* geny, kde je problém s primery pro studovanou skupinu. Nejrozšířenějším markerem v systematice jsou geny pro rDNA. Obsahují mnoho

tandemových repetic (1-50 tis.), což je cca 10% celkové DNA, a nacházejí se v jednom nebo několika málo chromosomových lokusech. Přepisovaný úsek (ETS-18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S) je oddělený intergenickým spacerem (IGS) (SOLTIS at al. 1998, HOLLINGSWORTH at al. 1999, HALL 2001, FELSENSTEIN 2004, ALVAREZ & WENDEL 2003)

Struktura transkripční jednotky genů pro rRNA:



(<http://www.answers.com/topic/ribosomal-dna?cat=technology>)

EST - *external transcribed spacer*

ITS - *internal transcribed spacer*

IGS - *intergenic spacer* (NTS - *non-transcribed spacer*)

ITS1 (200-300 bp) mají vyšší délkovou variabilitu než ITS2 (180-240 bp). ITS je používán ke zjištění vztahů mezi blízce příbuznými rody i na druhové úrovni, někdy je však málo variabilní. Mají jakousi funkci při formování ribozomových podjednotek, tj. existuje nějaké evoluční omezení ve struktuře a sekvenci (40% ITS2 je konzervováno mezi všemi sekvenovanými krytosemennými a 50% ITS2 je možno alignovat na úrovni čeledí a vyšší). U nahosemenných jsou mnohem delší (1550-3125 bp u *Pinaceae*) a vykazují výraznou délkovou variabilitu (SOLTIS at al. 1998, HOLLINGSWORTH at al. 1999, HALL 2001, FELSENSTEIN 2004, ALVAREZ & WENDEL 2003).

ETS se vyvíjí nejméně stejně rychle jako ITS a je 258-635 bp dlouhý. Při sekvenování vzniká problém, protože chybí konzervovaný úsek na 5'konci spaceru (SOLTIS at al. 1998, HOLLINGSWORTH at al. 1999, HALL 2001, FELSENSTEIN 2004, ALVAREZ & WENDEL 2003).

Sekvenování celých genomů musí být nutně spojeno s vytvářením molekulárně genových databází, které umožňují uchovávat, organizovat a zpřístupňovat sekvenční data, porovnávat sekvence celého genomu s již dříve zjištěnými sekvencemi jednotlivých genů jiných organismů se známou funkcí. To umožňuje získaným, zatím neznámým, sekvencím přiřazovat pravděpodobné funkce a vyhledávat v genomu sekvence, které jsou pravděpodobně homologní genům, jež byly poznány jinde. V současné době byly sekvenovány genomy četných mikroorganismů, z eukaryontních genomů byl do konce roku 2000 sekvenován genom kvasinky, hlístice, octomilky a v neposlední řadě genom člověka (ONDŘEJ & DROBNÍK 2002).

4. MATERIÁL A METODY

Hlavním zdrojem dat byla analýza vzorků přírodních populací. Populační vzorky byly odebírány z fenotypicky reprezentativních dospělých a plodných jedinců v počtu 25 až 50 z populace (odběry vzorků ze všech analyzovaných populací zajistil v rámci projektu GAČR 521/05/2448 Ing. Roman Businský z Výzkumného ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v Průhonicích.). Z každého jedince bylo odebráno po jednom vzorku v podobě bujněji rostoucí koncové větvičky s nejméně dvěma ročníky jehlic. Seznam všech populací je uveden v Tab. 1.

Extrahovaná DNA byla uchovávána v mrazicím boxu při teplotě -20°C.

Tab. 1: Přehled sledovaných populací. **U** – *Pinus uncinata*, **R** – *P. rotundata*, **M** – *P. mugo*, **S** – *P. sylvestris*, **N** – *P. nigra*, **PSP** – *P. pseudopumilio*.

Číslo populace	Taxon	Typ	Lokalita	Populace
1	U	'rock tree type'	Francie, Pyrénées Orientales, oblast Font-Romeu, Mont Louis, La Cabanasse, cca 1600 m (druhotná lokalita populace vypěstované ze semen vyšetých 1960 uvedeného původu: Z Čechy, Plzeň – Bolevec, Arboretum Sofronka	33 plodných jedinců, starých 42 let
2	R	'peatbog tree type'	Německo, jižní Bavorsko, oblast Allgäu, Kempten, rašeliniště "Teufelsküche" v lesním komplexu Kempter Wald Z od obce Görisried, 910-915 m	41 jedinců, pouze plodných, starších 70 let
3	R	'peatbog tree type'	Slezsko, Hrubý Jeseník, Rejvíz, NPR Rejvíz ; V část u Z okraje Malého mechového jezírka, 745 m.	cca 31 plodných jedinců
4	M	'prostrate frutescent type'	Slovensko, Nízké Tatry – centrální hřeben, skupina Prašivá, Liptovská Lúžna (okr. Liptovský Mikuláš), Veľká hoľa , 1640 m, S svah SZ pod vrcholem hory, 1590-1640 m.	52 plodných starších jedinců
5	S	<i>Pinus sylvestris</i> L.	Slovensko, okr. Liptovský Mikuláš, Demänová, Nízké Tatry – S výběžek masivu Krakova hoľa zv. Demänovská hora , 1304 m	47 plodných jedinců, ve stáří okolo 100 let a více
6	PSP	'infragroup hybrid' ?	Německo, Baden-Württemberg, S část pohoří Schwarzwald, rašeliniště (NSG) Wildseemoor 7 km JZ od Bad Wildbad, 900-908 m, území cca 1,5 × 1,5 km	47 jedinců pouze plodných, relativně starších
7	M	'prostrate frutescent type'	S Čechy, Krkonoše , Špindlerův Mlýn, pohraniční hřeben zv. Stříbrný hřbet – J až JZ svah temene hory Smogornia (k. 1490 m), 1450-1490 m (střed plochy s odběry vzorků)	45 jedinců, pouze plodných, ve stáří přes 100 let
8	S	<i>Pinus sylvestris</i> L.	stř. Čechy, okr. Příbram, Brdy, masiv Třemšín, skanaté žebro Z od S hřebene zvaného Hřebence. PP Hřebenec (reliktní bor), 730-745 m	36 plodných jedinců, starších 100 let
9	PSP	'infragroup hybrid' ?	Polsko, Góry Bystrzyckie, Duszniki Zdrój – Zieleniec, Torfowisko pod Zieleniecem , S část zv. Topielisko, 760 m; rozsah po délce od JV po S okraj	33 jedinců, pouze plodných, starších 50 let

10	R	'peatbog tree type'	Z Čechy, Český les, okr. Tachov, 3 km ZJZ od obce Lesná (katastr samoty Jedlina), PR Farské bažiny , 732 m; střed oploceného jádra rašeliniště	36 jedinců, pouze plodných, starších 50 let
11	R	'peatbog tree type'	J Čechy, okr. Jindřichův Hradec, Chlum u Třeboně, katastr Nová Ves u Klikova, PR Široké blato , 496 m; SV část rezervace (těžiště odběrů vzorků blatky)	31 jedinců, pouze plodných, starších 50 let
12	S	<i>Pinus sylvestris</i> L.	J Čechy, okr. Jindřichův Hradec, Chlum u Třeboně, katastr Nová Ves u Klikova, PR Široké blato , 495-498 m; SV a JZ okraje rezervace	30 jedinců, pouze plodných, obvykle starších 100 let
13	R	'peatbog tree type'	Z Morava, Žďárské vrchy, okres Žďár nad Sázavou, Radostín, NPR Dářko , 620 m, střed SV kvadrantu s reprezent. starším blatkovým porostem	42 jedinců, pouze plodných, ve stáří přes asi 70 let
14	R	'peatbog tree type'	Polsko, kraj Dolny Slask, Wegliniec , komplex rašelinišť S od nádraží vč. REZ "Torfowisko pod Weglincem", 195 m, střed slatin a oplocená plocha REZ	31 jedinců, pouze plodných, ve stáří přes asi 50 let
15	R	'peatbog tree type'	Polsko, Góry Stolowe, Szczytna – Batorow, Wielkie Torfowisko Batorowskie , 711 m; severní okraj centrální části (těžiště odběrů vzorků blatky)	28 jedinců, pouze plodných, starších 70
16	M	'prostrate frutescent type'	Rakousko, Tirol, Reutte, Ammergauer Alpen , hor. skupina Hochplatte (2082 m), hora Schäferblasse, 1764 m	35 plodných dospělých jedinců
17	U	'rock tree type' (oblast lokality neotypu <i>Pinus rotundata</i> Link)	Rakousko, Tirol, Reutte, okolí jezera Plansee , SZ úpatí hory Spiess (1846 m), zarostlé šterkové boční valy podél spodní části erozního žlebu, 980-1050 m	42 jedinců, pouze plodných, ve stáří min. okolo 100 let
18	S	<i>Pinus sylvestris</i> L.	Rakousko, Tirol, Reutte, Tannheimer Berge, J svah mezi serpentini silnice S nad obcí Weissenbach am Lech	40 jedinců s odhadnutým stářím asi 80-120 let
19	R	'peatbog tree type'	Švýcarsko, Neuchatel, pohoří Jura, pánevní rašeliniště J od obce Ponts de Martel, rašelinný bor v REZ Bois des Lattes , 1000-1005 m	45 jedinců, pouze plodných, starších než 100 let
20	N	<i>Pinus nigra</i> J. F. Arnold subsp. <i>nigra</i> – outgroup	Albánie, okres Erseke, Z část pohoří Pindos , Z úpatí hory Kamenikut, okolo 1100 m	35 plodných jedinců
21	N	<i>Pinus nigra</i> J. F. Arnold subsp. <i>pallasiana</i> (Lamb.) Holmboe – outgroup	Turecko, provincie Bursa, JV část pohoří Uludag , JV svah, 1330 m	
22		'suberect frutescent type'	Bulharsko, S část pohoří Pirin , dolina Bela reka, S-V expozice, vápenec, 1970-2020 m	45 starších plodných jedinců
23		'suberect frutescent type'	Z Čechy, Krušné hory, okr. Chomutov, Hora Sv. Šebestiána , Polské rašeliniště, 830 m	43 plodných starších jedinců
24		'prostrate frutescent type'	Itálie, Veneto, hor. skupina Dolomiti, Belluno Prov., Cortina d'Ampezzo, Passo di Falzarego , V svah hory Sasso di Stria, vápenec, 2050-2300 m	46 plodných starších jedinců
25		'infragroup hybrid'	Itálie, Lombardia, Bormio , hor. skupina Ortles, Valle di Braulio, SZ svah, vápenec, 1800 m	43 starších jedinců
26		'prostrate frutescent type'	Itálie, Abruzzo, S část pohoří Maiella , hřeben hory Maielletta, V expozice, vápenec, 2080-2130 m	48 jedinců starších než cca 50 let
27		'peatbog tree type'	Německo, Sasko, Erzgebirge, Marienberg, rašeliniště (NSG) Mothäuser Heide , 2 km SZ od obce Kühnhaide, 763 m	5 plodných starších jedinců

4.1. Extrakce genomové DNA

Extrakty pro připravované analýzy DNA byly zpracovávány z pupenů pomocí komerčních izolačních kitů či CTAB metody.

4.1.1. Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK)

Metoda je založena na principu purifikace DNA pomocí speciálních mikrokolon. Rostlinná tkáň může být rozdrčena v tekutém dusíku nebo homogenizátorkem přímo v mikrozkuhavce. Maximální množství rostlinné tkáně, které můžeme použít, je 100 mg.

V mikrozkuhavce bylo zhomogenizováno cca 60 mg rostlinné tkáně. Homogenát byl přenesen do 1,5 ml Reaction tube a bylo přidáno 400 μ l Lysis Buffer P a 20 μ l proteinázy K. Směs byla protřepána (vortexována) a ponechána 30 min. inkubovat při 65°C (během inkubace 2–3krát promícháno). Mezitím byly připraveny Spin Filter do 2,0 ml Receiver Tube. Vzorky byly přeneseny na Spin Filter a odstředěny 10 min. při 12000 rpm. Pokud to bylo nutné, bylo přidáno 40 μ l Rnázy A (10mg/ml), vortexováno a necháno 5 min. inkubovat při pokojové teplotě. Potom byl přidán 200 μ l Binding Buffer P a znovu vortexováno.

Nové Spin Filter byly umístěny do 2,0 ml Receiver Tube, vzorky na něj byly přeneseny, 1 min. inkubovány a odstředěny 1 min. při 12000 rpm. Filtrát byl odstraněn a Spin Filter umístěn zpět do 2,0 ml Receiver Tube. Poté bylo přidáno 550 μ l Wash Buffer I a odstředěno 1 min. při 12000 rpm. Filtrát byl odstraněn a Spin Filter umístěn zpět do 2,0ml Receiver Tube. Bylo přidáno 550 μ l Wash Buffer II a odstředěno 1 min. při 12000 rpm. Filtrát byl odstraněn a Spin Filter umístěn zpět do 2,0 ml Receiver Tube. Krok byl ještě jednou zopakován, odstředění trvalo 2 min. při 12000 rpm kvůli odstranění ethanolu.

Spin Filter byly umístěny do nových 1,5 ml Receiver Tube a bylo přidáno 50–100 μ l Elution Buffer D predehřátého na 65°C . Inkubace trvala 3 min. při pokojové teplotě a odstředění 1 min. při 10000 rpm.

4.1.2. Metoda extrakce DNA s CTAB (cetyltrimetylamoniumbromid)

Tato metoda slouží k extrakci velkého objemu DNA pro účely standardizace metod nebo pro účely AFLP analýzy

Metoda je založena na schopnosti CTAB vytvářet komplex s nukleovými kyselinami, který je při vysoké koncentraci solí rozpustný (0,7 M NaCl), ale při snížené koncentraci solí (0,45 M NaCl) vytváří sraženinu (MURRAY & THOMPSON 1980). CTAB zároveň působí jako detergenční činidlo, které uvolňuje DNA z membrán a proteinů. Na základě rozdílné rozpustnosti CTAB v porovnání s DNA je lze oddělit a získat dostatečně čistou rostlinnou DNA.

Rostlinná tkáň, ze které chceme izolovat DNA, byla rozdrčena v 1,5 ml mikrocentrifugačních zkumavkách (eppendorfkách) - cca 100 mg.. Pro lepší drčení tkáně byl přidán sterilní křemičitý písek.

Ke každému vzorku bylo přidáno 500 μ l přehřátého pufru (2x CTAB a 1% merkaptoetanol), tkáň byla rozdrčena a promíchána s pufrem. Bylo necháno 45 minut inkubovat při 65 °C. Během inkubace bylo každých cca 15 minut lehce promícháno. Poté bylo přidáno 500 μ l směsi fenol-chloroformu-IAA, 10 minut protřepáváno a odstředěno 5 minut maximální rychlostí při pokojové teplotě. Do nových mikrozkuvek byla odpipetována vodní fáze a bylo přidáno 500 μ l směsi chloroformu-IAA, 10 minut protřepáváno a odstředěno 5 minut maximální rychlostí při pokojové teplotě. Do nových mikrozkuvek byla přepipetována vodní fáze, byly přidány 2/3 objemu isopropanolu (přibližně 250 μ l), 2–3x lehce promícháno a uloženo na 30 minut do mrazáku (-20 °C). Pak byly vzorky odstředěny 5 minut při maximální rychlosti. DNA by se měla zachytit na dně mikrozkuvky. Supernatant byl odstraněn a pelet usušen, bylo přidáno 300 μ l 1x TE a necháno 30–60 minut inkubovat při 37 °C. Poté bylo přidáno 20 μ l 7,5 M octanu sodného a 600 μ l ledového (z mrazáku) 100 % ethanolu a 2–3x lehce promícháno. Vzorky byly vloženy do mrazáku (-20 °C) minimálně na 20 minut, maximálně na 12 hodin (větší výtěžnost DNA).

Vzorky z mrazáku byly 10 minut odstředěny maximální rychlostí při 4°C. DNA by měla vytvořit viditelný pelet na dně mikrozkuvky. Supernatant byl odstraněn (2x pipetováno) a ponechán dobře usušit. Bylo přidáno 400 μ l ledového 70 % ethanolu, 2 – 3x lehce promícháno a odstředěno 2 minuty maximální rychlostí při teplotě 4 °C. Okamžitě

byl odstraněn všechn supernatant. Vzorke byly ponechány dobře usušit (cca 10 min). Podle množství peletu (DNA) bylo přidáno 20–200 μ l 1x TE pufru nebo sterilní vody.

4.2. RAPD analýza

PCR reakce byla prováděna v objemu 25 μ l obsahující 2x PPP master mix Top Bio, 10 pM primeru (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

12,5 μ l PPP master mixu

1 μ l DNA

2 μ l primeru

dH₂O voda do objemu 25 μ l (9,5 μ l)

Amplifikace DNA probíhala v termocykleru PTC-100 (MJ Research) nebo T1 Biometra.

Teplotní profil reakce:

- počáteční denaturace: 3 min. při 94°C
- 45 cyklů: 1 min. při 94°C
2 min. při 35°C
3 min. při 72°C
- konečná elongace: 10 min. při 72°C

PCR produkty byly analyzovány elektroforézou na 1,5% agarózových gelech v 1x TBE pufru (54 g Tris, 27,5 g kyselina boritá, 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0) a detekovány barvením ethidium bromidem. Doba trvání elektroforézy byla při napětí 70V 2,5-3 hodiny. Gely byly fotografovány pod UV světlem pomocí DIGITAL IMAGE system. RAPD profily byly zaznamenány pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System Jako marker byl používán 100 bp marker (NEB).

4.3. AFLP analýza

Restrikce genomické DNA a ligace adaptorů (restrikčně ligační krok):

Restrikce (50 µl celkový objem):

40 µl vzorku DNA + 1x R/L pufr, 5 U EcoRI, 5 U MseI

Na 1 vzorek: 4 µl H₂O, 5 µl 10x R/L pufru, 0,25 µl EcoRI = 5 U, 0,5 µl MseI = 5 U

(10 µl restrikčního master mixu bylo přidáno ke 40 µl templátu DNA, promícháno a štěpeno 16 h při 37°C)

Ligace (60 µl celkový objem):

50 µl restrikční směsi + 1x R/L pufr, 5 pmol EcoRI 3' adaptor, 5 pmol EcoRI 5' adaptor, 50 pmol MseI 3' adaptor, 50 pmol MseI 5' adaptor, 1,2 pmol ATP, 1 U T4 DNA ligáza

Na 1 vzorek: 1 µl 10x RL pufru, 0,1 µl EcoRI-3' adaptoru = 5 pmol, 0,1 µl EcoRI-5' adaptoru = 5 pmol, 0,2 µl Mse-3' adaptoru = 50 pmol, 0,2 µl Mse-5' adaptoru = 50 pmol, 1,2 µl 10mM ATP, 1 µl (1 U) T4 Ligase, 6,2 µl vody.

(10 µl ligačního master mixu se přidá k 50 µl restrikční směsi, promíchá se a inkubuje se 3 h při 37°C)

R/L směs byla po ukončení ligace naředěna 10x T0.1E puftrem (540 µl T0.1E pufru + 60 µl R/L směsi)

Pre-selektivní amplifikace (+1/+1) PCR

Preselektivní amplifikace (50 μ l celkový objem):

5 μ l vzorku (10x naředěný vzorek po R/L), 1x PCR pufr, 4 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP's, 75 ng EcoRI-A primeru, 75 ng MseI-A primeru, 1 U Taq DNA polymerázy

Na 1 vzorek: 5 μ l vzorku, 5 μ l PCR pufru, 2 μ l 50 mM MgCl₂, 1 μ l 10 mM dNTP's, 0,15 μ l EcoRI-A primeru (500 ng/ μ l), 0,15 μ l MseI-A primeru (500 ng/ μ l), 0,2 μ l Taq (5 U/), 36,5 μ l vody.

(45 μ l PCR master mixu bylo přidáno k 5 μ l vzorku)

Preselektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- | | | |
|------------------------|-------|------|
| • počáteční denaturace | 2 min | 94°C |
| • 30 cyklů: | 30 s | 94°C |
| | 30 s | 60°C |
| | 1 min | 72°C |
| • konečná elongace | 9 min | 72°C |
| • stop | - | 4°C |

Po ukončení preselektivní amplifikace bylo 40 μ l reakční směsi 20 x naředěno (860 μ l TE + 40 μ l templátu).

10 μ l nenaředěného PCR produktu bylo použito na elektroforézu (1,2% agarozový gel v 1x TBE/TAE pufru), pro ověření R/L a Pre-Amp kroku – přítomnost fragmentů o velikosti 0 – 400 bp.

Selektivní amplifikace (+3/+3) PCR - SRFA

Selektivní amplifikace (10 μ l celkový objem):

2,5 μ l vzorku (20x naředěný vzorek po Pre-Amp), 1x PCR pufr, 1,5 mM MgCl₂,
200 μ M dNTP's, 5 ng EcoRI-ANN-FAM primeru, 30 ng MseI-ANN primeru, 0,5
U Taq DNA polymerázy

Na 1 vzorek: 2,5 μ l vzorku, 1 μ l PCR pufru, 0,2 μ l 10 mM dNTP's, 0,087 μ l
EcoRI-ANN-FAM primeru (10000 pmol), 0,095 μ l MseI-ANN primeru (316 ng/ μ l), 0,1 μ l
Taq (5 U/ μ l), 6,018 μ l vody

(7,5 μ l PCR master mixu bylo přidáno k 2,5 μ l vzorku)

Selektivní amplifikace – teplotní profil PCR reakce:

- | | | |
|------------------------|--------|--------------------|
| • počáteční denaturace | 2 min | 94°C |
| • 10 cyklů: | 30 s | 94°C |
| | 30 s | 65°C (-1°C/cyklus) |
| | 1 min | 72°C |
| • 25 cyklů: | 30 s | 94°C |
| | 30 s | 56°C |
| | 1 min | 72°C |
| • konečná elongace | 15 min | 72°C |
| • stop | - | 4°C |

Příprava vzorků na fragmentační analýzu:

Vzorky byly připraveny do 96 jamkových destiček (ABI):

11 μl formanidu, 0,4 μl 400 HD Rox Size Standard (ABI), 1,0 μl vzorku (po SRFA)

Vzorky byly důkladně promíchány - bez bublinek a byly v cykleru denaturovány – 4 min při 95°C. Ihned (!) po ukončení denaturace byly položeny na nejméně 2 minuty do cold bloku vychlazeného na -20°C. Fragmentační analýza byla provedena na genetickém analyzátoru ABI 3130, na ÚMBR AV ČR.

4.4. SSR analýza

PCR reakce byla prováděna v objemu 25 μl obsahující 2x PPP master mix Top Bio, 10 pM primeru (Invitrogen) a 25 ng templátové DNA.

Schéma pipetování – systém PPP MM Top-Bio:

12,5 μl PPP master mixu

1 μl DNA

0,25 μl primeru forward

0,25 μl primeru reverse

dH₂O voda do objemu 25 μl (11 μl)

Amplifikace DNA probíhala v termocykleru PTC-100 (MJ Research) nebo T1 Biometra.

Teplotní profil reakce:

- počáteční denaturace: 10 min. při 94°C
- 35 cyklů:
 - 1 min. při 94°C
 - 1 min. při 55-65°C
 - 1 min. při 72°C
- konečná elongace: 3 min. při 72°C

Teplota nasedání primerů byla upravena podle použitých primerů: 55-65°C.

PCR produkty byly analyzovány elektroforézou na 2% agarózových gelech v 1x TBE pufru (54 g Tris báze, 27,5 g kyselina boritá, 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0) a detekovány barvením ethidium bromidem. Doba trvání elektroforézy byla při napětí 90V 1,5 - 2 hodiny. Gely byly fotografovány pod UV světlem pomocí DIGITAL IMAGE system, profily jsou zaznamenány pomocí Epson Ultra Cam 3100Z Imaging System. Jako marker byl používán 100 bp marker (NEB).

4.5. Klonování a sekvenování

Pro klonování byl použit komerční kit TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen).

Pro klonování byla nejprve vytvořena reakční směs smícháním 1,4 µl čerstvého PCR produktu, 0,3 µl roztoku solí a 0,3 µl TOPO vektoru. K doplnění do celkového objemu byla použita sterilní voda. Směs byla velmi opatrně zamíchána a po inkubaci 5 min. při pokojové teplotě byl vzorek vložen na led.

K vzorku bylo přidáno 17 µl buněk *E. coli Top 10 One Shot Chemically Competent* (Invitrogen) a celá směs byla zamíchána a inkubována 5 min. při pokojové teplotě, poté 30 min. na ledu. Po inkubaci byly buňky podrobeny teplotnímu šoku – byly vloženy na 30 vteřin do vodní lázně zahřáté na 42°C a poté ihned přeneseny na led aniž by byla směs protřepána. Na ledu byl vzorek 2 – 3 min., potom bylo přidáno 150 µl SOC média a vzorek byl vložen na třepačku na 1 hodinu při 37°C. Poté byl vzorek vyset na předeřátou misku (37°C) s tuhým LB médiem (10 g baktotrypton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl) + 40 µl Xgal + 10 µl IPTG, miska byla vložena na noc do termostatu s 37°C, některé bílé kolonie byly přeočkovány druhý den do tekutého LB média s 12 µl ampicilinu a kultivovány opět v termostatu při 37°C po dobu 16 hodin.

Následující den byla provedena z narostlé kultury izolace plazmidů pomocí komerčního kitu (INVITEK Plasmid Invisorb Spin Mini Kit) a plazmid byl z vektoru vyštěpen pomocí *EcoR* I.

Pro sekvenování byla reakční směs tvořena z mixu, pufru (200 mM Tris HCl, 5 mM MgCl₂), DNA (PCR-produkt) a primeru. Zbytek do celkového objemu vzorku 20 µl byl doplněn sterilní vodou. Reakční směs byla vložena do termocykleru s teplotním profilem:

- 30 cyklů: 10 s při 96°C
 5 s při 50°C
 4 min. při 60°C
- konečná elongace: 5 min. při 60°C

Pro vlastní sekvenování bylo nutné oddělit volné značené nukleotidy, které by tvořily vysoké pozadí signálu. Po ukončení reakce byl ke vzorku přidán 70% izopropanol, směs byla promíchána a inkubována 15 min. při pokojové teplotě. Po odstředění při maximálních otáčkách byl sediment promyt 200 μ l 70% izopropanolu. Směs byla dobře promíchána a poté odstředěna. Vzniklá sraženina byla vysušena a vzorek byl analyzován na automatickém sekvenátoru (ABI 3130).

4.6. Elektroforéza v agarózovém gelu

Příprava gelu:

1. Agaróza byla smíchána s vodou a pufrem v příslušném poměru v širokohrdlé erlenke a rozvařena v mikrovlnné troubě (2+1 min na max výkon, nesmí zpěnit); agaróza musí být dokonale rozpuštěná, během rozvaření bylo nutné s erlenkou několikrát zamíchat.
2. Roztok agarózy byl zchlazen na cca 55°C, bylo přidáno odpovídající množství ethidium bromidu, důkladně promícháno a nalito do připravené vaničky; nalévací vanička musela být dokonale vyrovnaná do vodorovné polohy; agarózu bylo nutné nalévat opatrně a plynule, bez tvorby bublin, případné bubliny bylo zapotřebí eliminovat.
3. Po nalití agarózy byl do vaničky umístěn hřebínek a gel se nechal 30-60 min ztuhnout.
4. Ztuhlý gel byl umístěn do elektroforetické vany a pod hladinou pufru byly do jamek vkládány vzorky.

1,5 %

Objem	Agaróza	5 x TBE	Voda	Et. bromid
50 ml	0,75 g	10 ml	40 ml	1,5 µl
100 ml	1,5 g	20 ml	80 ml	2 µl
200 ml	3 g	40 ml	160 ml	4 µl

2 %

Objem	Agaróza	5 x TBE	Voda	Et. bromid
50 ml	0,5 g	10 ml	40 ml	1,5 µl
100 ml	1 g	20 ml	80 ml	2 µl
200 ml	2 g	40 ml	160 ml	4 µl

5. VÝSLEDKY

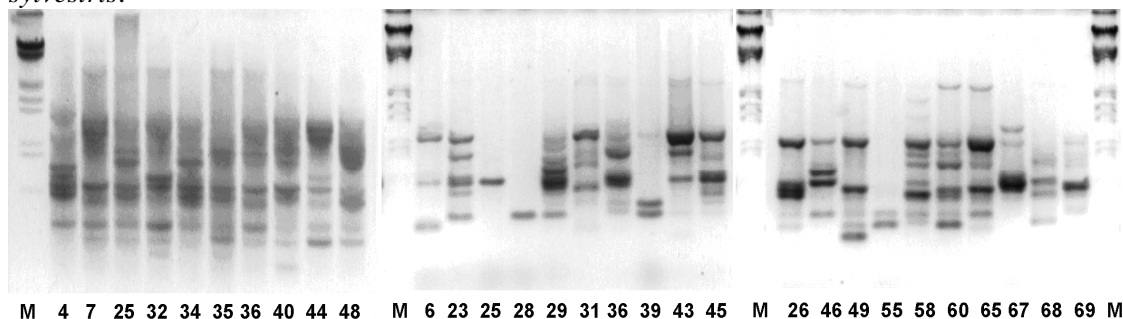
5.1. RAPD analýza

RAPD analýza byla provedena celkem se 60 primery – náhodné primery Operon, kity OP-A, OP-B a OP-F. Pro získané výsledky je charakteristická velmi vysoká variabilita v rámci jednotlivých geografických populací i mezi populacemi navzájem. Příkladem výsledků je spektrum RAPD fragmentů a dendrogram uvedený na následujících obrázcích (Obr. 2, Obr. 3), na němž je patrné velmi polymorfní spektrum fragmentů a prolínání jednotlivých populací po digitální analýze gelů a jejich statistickém zpracování.

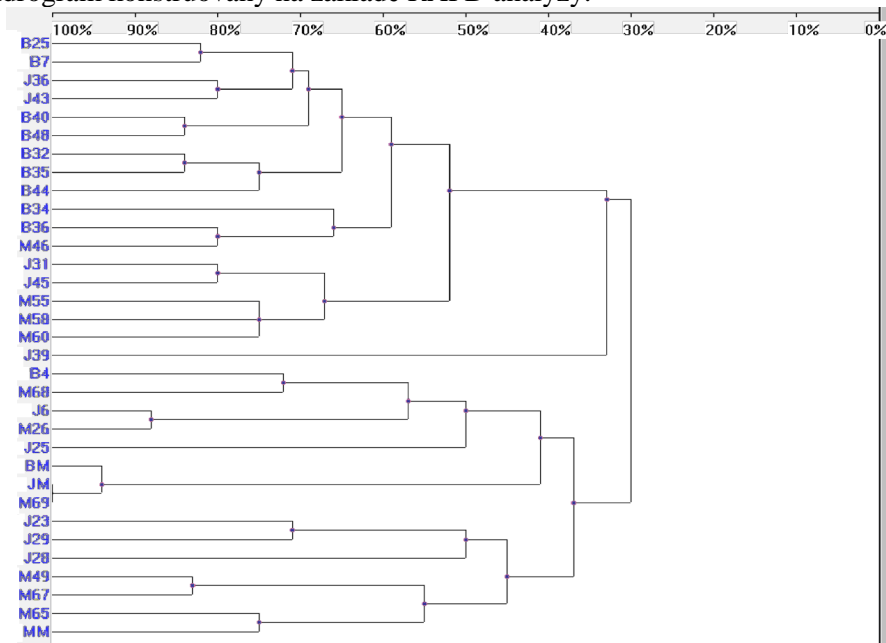
Přestože je spektrum fragmentů velmi bohaté, výsledky nejsou reprodukovatelné, protože jsou jednotlivé fragmenty špatně čitelné.

Ačkoliv byly extrakce DNA prováděny vždy ze zdravého materiálu (z omytých jehlic nebo z vnitřku pupenů), bylo zjištěno, že jsou vzorky kontaminovány houbami. RAPD analýza je založena na amplifikaci s nescifickými primery, proto není dále v disertační práci hodnocena.

Obr. 2: Spektrum RAPD fragmentů (primer OPA-19) u vybraných jedinců 3 populací *Pinus sylvestris*.



Obr. 3: Dendrogram konstruovaný na základě RAPD analýzy.



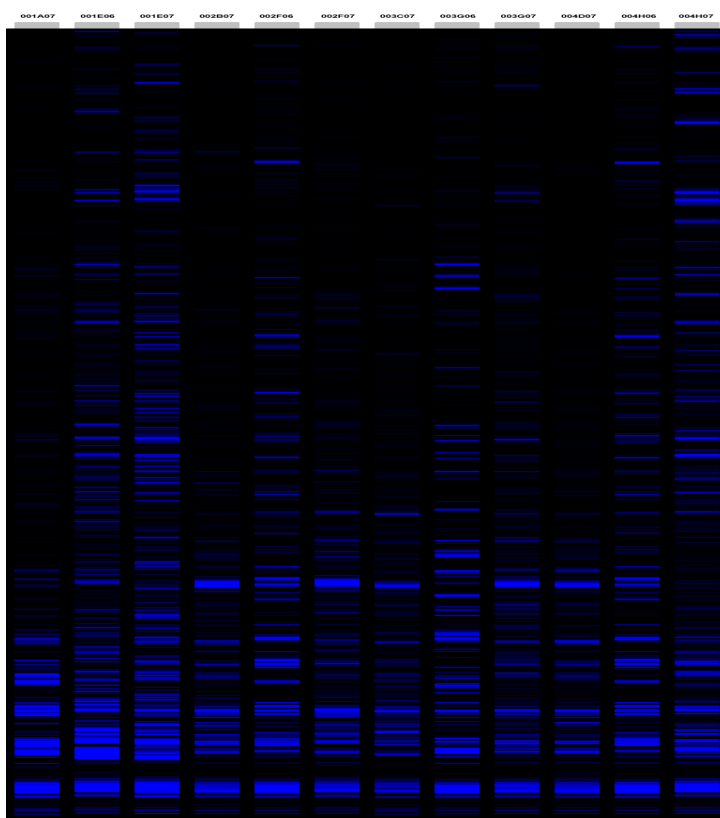
5.2. AFLP analýza

Metoda byla optimalizována, oproti RAPD analýze poskytuje dobře čitelné a opakovatelné spektrum fragmentů, ale jak již bylo uvedeno, z důvodu přítomnosti cizorodé DNA byla z výsledného hodnocení vyřazena i tato metoda. Nebyly nalezeny vzorky, které by nebyly kontaminovány.

Pro vlastní optimalizaci bylo použito 5 kombinací primerů, které poskytly dobře detekovatelné spektrum fragmentů.

Na Obr. 4 je ukázka výsledku AFLP analýzy, 4 vzorky ze třech populací (Pop1 – 3). Při srovnání vzorků náležejících stejné populaci je patrné bohaté spektrum amplifikovaných fragmentů a vysoká míra vnitropopulační variability. AFLP metoda byla optimalizována a v případě získání vzorků bez kontaminace houbami je použitelná pro analýzu genetické variability u borovic.

Obr. 4: Spektrum AFLP fragmentů.



5.3. SSR analýza

SSR analýza pracuje se specifickými primery, proto mohla být k práci použita a hodnocena. Pro ověření vhodnosti použitých mikrosatelitů byla provedena amplifikace s DNA řepky, brambor, tabáku a entomopatogenních a mykorrhizních hub – ve všech případech byly získány negativní výsledky, tj. nedocházelo k žádné amplifikaci a byla ověřena specifičnost použité metody.

Pro přesné analýzy bylo nutné nejprve optimalizovat podmínky pro reakci. Jednalo se zejména o zvolení časově teplotního profilu reakce, kdy každý primer vyžaduje jinou teplotu nasedání na DNA.

Pro analýzu mikrosatelitů bylo použito 12 primerových párů: Powell (POWELL et al 1995), SPAC11.4, SPAC 11.6, SPAC11.8, SPAC12.5, SPAG3.7, SPAG7.14, SPAC11.5 (SORANZO et al. 1998), PtTX3032, PtTX3107, PtTX3116, PtTX4001, PtTX4011 (AUCKLADN et al 2001). Podrobné informace o sekvencích a teplotních profilech jsou uvedeny v práci „Conifer microsatellite handbook“ (AUCKLADN et al 2001). Každý primer byl testován na několika náhodně vybraných vzorcích od všech populací a po prvotním

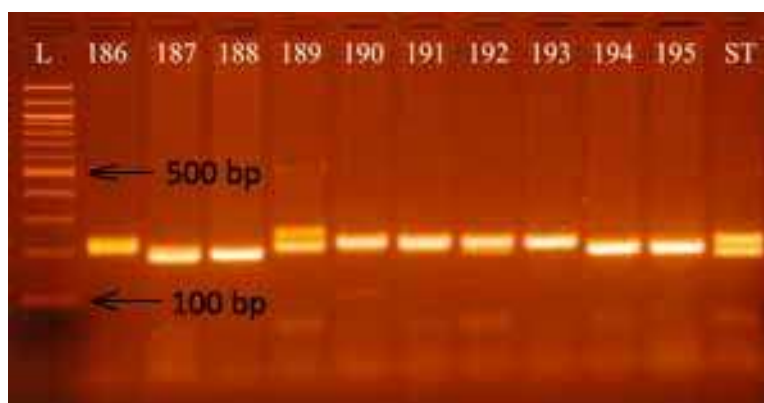
screeningu byly pro vlastní analýzu vybrány primery na základě toho, že amplifikovaly spolehlivě reprodukovatelné spektrum fragmentů u všech taxonů: SPAG7.14, PtTx3116, SPAC11.6 - viz Tab. 2. Všechny vzorky byly pak analyzovány a hodnoceny s těmito primery.

Tab. 2: Specifické primery vybrané pro další analýzy, jejich sekvence a optimalizované teploty nasedání na DNA

Název primeru	Sekvence 5'→3'	Teplota nasedání primeru
SPAG7.14F SPAG7.14R	TTC GTA GGA CTA AAA ATG TGT G CAA AGT GGA TTT TGA CCG	60°C
PtTx3116F PtTx3116R	CCT CCC AAA GCC TAA AGA AT CAT ACA AGG CCT TAT CTT ACA GAA	55°C
SPAC11.6F SPAC11.6R	CTT CAC AGG ACT GAT GTT CA TTA CAG CGG TTG GTA AAT G	55°C

Fragmenty byly analyzovány na 2% agarózovém gelu. Ukázkou optimalizace této metody je Obr. 5 ukazující amplifikaci s primerem SPAG7.14 na populaci č. 17 – *Pinus uncinata*. Jako standardní vzorek u každého gelu byla použita DNA z *P. uncinata* z populace č. 1.

Obr. 5: 2% agarózový gel: **L** – 1kb ladder, **ST** – standardní vzorek.



Polymorfismus mikrosatelitních markerů byl analyzován u těchto 3 primerů (SPAG7.14, PtTx3116, SPAC11.6), které poskytovaly stabilní, opakovatelné a čitelné

spektrum fragmentů o délce 110-280 bp. Dále jsou prezentovány výsledky pouze s těmito primery. Počet možných pozic a počet mikrosatelitů udává Tab. 3.

Tab. 3: Počet možných pozic na agarózovém gelu, maximální a minimální počet amplifikovaných mikrosatelitních fragmentů.

Primer	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
Počet pozic	6	9	5
Max. počet fragmentů	3	4	4
Min. počet fragmentů	1	1	1

Následující tabulky (Tab. 4a-4z) zahrnují zpracování primárních dat analýzy mikrosatelitů podle elektroforetických gelů.

Tab. 4a ukazuje data populace č. 1 – *Pinus uncinata* z oblasti Francie, Pyrénées Orientales, oblast Font-Romeu, Mont Louis, La Cabanasse. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, maximálně byly amplifikovány 2 fragmenty, minimálně 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve všech 5 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4a: Populace č. 1 – *Pinus uncinata* – Francie.

Označení	SPAG7.14					PtTx3116					SPAC11.6									
P01-01	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
P01-02	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
P01-03	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1
P01-04	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
P01-05	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
P01-06	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1
P01-07	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1
P01-08	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
P01-09	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
P01-10	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1
P01-11	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
P01-12	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
P01-13	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
P01-14	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
P01-15	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

Tab. 4b ukazuje data populace č. 2 – *P. rotundata* z oblasti Německa, jižní Bavorsko, oblast Allgäu, Kempten, rašeliniště “Teufelsküche” v lesním komplexu Kempter Wald. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4b: populace č. 2 – *P. rotundata* – Německo.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P02-01	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P02-02	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 1	0 0 1 0 1
P02-03	0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 1 0 1
P02-04	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 1 0 1
P02-05	0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 1 0 1
P02-06	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P02-07	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 1 1
P02-08	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 0 1 0 1
P02-09	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P02-10	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 1 1 1
P02-11	1 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P02-12	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P02-13	1 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P02-14	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P02-15	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 1 0 0 0	0 1 0 0 1

Tab. 4c ukazuje data populace č. 3 – *P. rotundata* z oblasti Slezska, Hrubý Jeseník, NPR Rejvíz. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4c: Populace č. 3 – *P. rotundata* – Slezsko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P03-01	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 1 0 0 1
P03-02	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 1 0 1
P03-03	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 0 0 0 1
P03-04	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P03-05	0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 1 0 1
P03-06	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P03-07	0 1 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 1 1 0 1
P03-08	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 1 1 0 1
P03-09	0 0 0 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P03-10	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 0 1
P03-11	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 0 0 0 1
P03-12	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P03-13	0 1 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P03-14	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 1 0 0 1
P03-15	0 0 0 1 0 0	0 0 0 1 1 0 0 0 0	0 1 1 0 1

Tab. 4d ukazuje data populace č. 4 – *P. rotundata* z oblasti Slovenska, Nízke Tatry – centrální hřeben, Liptovská Lúžna (okr. Liptovský Mikuláš), Veľká hoľa. U príměru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U príměru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U príměru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4d: Populace č. 4 – *P. mugo* – Slovensko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P04-01	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1
P04-02	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 1 0 1 1 0	0 0 0 0 1
P04-03	0 0 0 0 1 1	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P04-04	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P04-05	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P04-06	1 1 0 0 0 0	0 0 0 0 1 1 0 0 0	0 1 1 0 1
P04-07	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P04-08	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 0 1 0 1
P04-09	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P04-10	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P04-11	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P04-12	0 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P04-13	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P04-14	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 1 0 0 0	0 0 0 0 1
P04-15	0 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1

Tab. 4e ukazuje data populace č. 5 – *P. rotundata* z oblasti Slovenska, okres Liptovský Mikuláš, Demänová, Nízke Tatry. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve všech 5 pozicích, max. byly amplifikovány 4 fragmenty, min. 2 fragmenty.

Tab. 4e: Populace č. 5 – *P. silvestris* – Slovensko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P05-01	0 0 0 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 1 1 0 1
P05-02	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 0 1 0 1
P05-03	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 1 0 0 1
P05-04	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P05-05	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 1 1 0 1
P05-06	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	1 0 1 0 1
P05-07	0 0 1 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 1 0	1 0 1 1 1
P05-08	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1 0 0 1 0	1 0 1 0 1
P05-09	0 1 1 0 0 0	0 0 0 1 0 1 1 0 0	1 0 1 0 1
P05-10	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P05-11	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 0 1 0 1
P05-12	0 1 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	1 0 1 0 1
P05-13	0 0 1 0 0 0	0 0 0 1 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P05-14	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	1 0 0 0 1
P05-15	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 1 1 1

Tab. 4f ukazuje data populace č. 6 – *P. pseudopumilio* z oblasti Německa, Baden-Württemberg, severní část pohoří Schwarzwald. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve všech 5 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4f: Populace č. 6 – *P. pseudopumilio* – Německo.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P06-01	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 1
P06-02	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	1 1 0 0 1
P06-03	0 1 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1
P06-04	0 0 0 0 1 1	0 0 0 0 0 0 0 1 0	1 1 0 0 1
P06-05	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 1
P06-06	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 1	0 0 1 0 1
P06-07	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1
P06-08	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 1 0	1 0 1 0 1
P06-09	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 1 1
P06-10	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1

Tab. 4g ukazuje data populace č. 7 – *P. mugo* z oblasti severních Čech, Krkonoše, Špindlerův Mlýn, pohraniční hřeben zv. Stříbrný hřbet. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 6 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve všech 5 pozicích, max. byly amplifikovány 4 fragmenty, min. 2 fragmenty.

Tab. 4g: Populace č. 7 – *P. mugo* – severní Čechy.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P07-01	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 1
P07-02	0 0 0 0 1 1	0 0 0 0 1 0 0 0 0	1 0 0 0 1
P07-03	0 0 0 0 1 1	0 0 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 1
P07-04	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P07-05	0 0 0 0 0 1	1 0 0 1 1 0 0 0 0	1 0 1 0 1
P07-06	0 0 1 0 1 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	1 0 1 1 1
P07-07	0 0 0 1 1 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P07-08	0 0 0 0 0 1	1 0 1 0 1 0 0 0 0	0 1 0 1 1
P07-09	0 0 1 0 0 1	0 0 1 0 0 1 0 0 0	0 1 0 0 1
P07-10	0 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	1 0 0 1 1

Tab. 4h ukazuje data populace č. 8 – *P. sylvestris* z oblasti středních Čech, okres Příbram, Brdy, masiv Třemšín. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve všech 5 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4h: Populace č. 8 – *P. sylvestris* – střední Čechy.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P08-01	0 0 0 0 1 0	0 1 1 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P08-02	0 0 0 1 0 0	0 0 1 1 0 0 0 0 0	1 0 1 0 1
P08-03	0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P08-04	0 0 1 0 1 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P08-05	0 0 1 0 1 0	0 1 1 0 1 0 0 0 0	0 1 1 0 1
P08-06	0 0 1 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P08-07	0 0 0 1 1 0	0 0 1 0 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P08-08	0 0 0 0 1 1	1 0 1 0 0 0 0 0 0	1 0 0 0 1
P08-09	0 0 1 0 0 0	0 1 1 0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P08-10	0 1 0 0 1 0	1 0 1 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1

Tab. 4ch ukazuje data populace č. 9 – *P. pseudopumilio* z oblasti Polska, Góry Bystrzyckie, Duszniki Zdrój – Zieleniec, Torfowisko pod Zieleniecem. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4ch: Populace č. 9 – *P. pseudopumilio* – Polsko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P09-01	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 0 0 0 1
P09-02	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P09-03	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P09-04	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 1 1 0	0 0 1 0 1
P09-05	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 1 1 0 0 0	0 1 0 0 1
P09-06	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 0 1 0 1
P09-07	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 1 0 0 1
P09-08	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1
P09-09	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 1 1 0	0 1 0 0 1
P09-10	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1

Tab. 4i ukazuje data populace č. 10 – *P. rotundata* z oblasti západních Čech, Český les, okres Tachov, PR Farské bažiny. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 2 fragmenty.

Tab. 4i: Populace č. 10 – *P. rotundata* – západní Čechy.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P10-01	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P10-02	0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P10-03	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P10-04	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 1 1 0	0 0 1 0 1
P10-05	0 0 0 0 1 0	0 0 0 1 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P10-06	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P10-07	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P10-08	0 0 0 0 1 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 1 1 0 1
P10-09	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P10-10	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1

Tab. 4j ukazuje data populace č. 11 – *P. rotundata* z oblasti jižních Čech, okres Jindřichův Hradec, Chlum u Třeboně, PR Široké blato. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 2 fragmenty.

Tab. 4j: Populace č. 11 – *P. rotundata* – jižní Čechy.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P11-01	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 1 0 1	0 0 0 1 1
P11-02	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 0 0 1	0 0 1 0 1
P11-03	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P11-04	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 0 1 0 1
P11-05	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 1 1
P11-06	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P11-07	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P11-08	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 0 1 1
P11-09	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 0 1 0 1
P11-10	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 1 0 1

Tab. 4k ukazuje data populace č. 12 – *P. sylvestris* z oblasti jižních Čech, okres Jindřichův Hradec, Chlum u Třeboně, PR Široké blato. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 2 fragmenty.

Tab. 4k: Populace č. 12 – *P. sylvestris* – jižní Čechy.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P12-01	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 1 0 0 1
P12-02	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 1 0 0 1
P12-03	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 1 1 0 1
P12-04	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 1 1 0 1
P12-05	0 0 1 0 0 1	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P12-06	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P12-07	0 0 1 0 0 1	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P12-08	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 0 1 0 1
P12-09	0 0 1 0 0 1	0 0 0 0 1 0 0 0 0	1 0 0 0 1
P12-10	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 1 0 0 1

Tab. 4l ukazuje data populace č. 13 – *P. rotundata* z oblasti západní Moravy, Žďárské vrchy, okres Žďár nad Sázavou, NPR Dářko. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4l: Populace č. 13 – *P. rotundata* – západní Morava.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P13-01	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 1 1 0	0 0 1 0 1
P13-02	1 0 0 1 0 0	0 0 0 1 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P13-03	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P13-04	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P13-05	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P13-06	0 0 0 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P13-07	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P13-08	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P13-09	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1 1 0 0 0	0 1 0 0 1
P13-10	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1

Tab. 4m ukazuje data populace č. 14 – *P. rotundata* z oblasti Polska, kraj Dolny Slask, Wegliniec. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 6 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4m: Populace č. 14 – *P. rotundata* – Polsko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P14-01	0 0 0 0 0 1	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 1 1 0 1
P14-02	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 0 1
P14-03	0 0 0 1 0 1	0 1 0 0 0 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P14-04	0 0 0 0 1 0	1 0 0 1 0 1 0 0 0	0 1 0 0 1
P14-05	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P14-06	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 0 1
P14-07	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 1 0 0 1
P14-08	0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 1 0 0 1
P14-09	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 0 1
P14-10	0 0 0 1 1 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1

Tab. 4n ukazuje data populace č. 15 – *P. rotundata* z oblasti Polska, Góry Stolowe, Wielkie Torfowisko Batorowskie. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4n: Populace č. 15 – *P. rotundata* – Polsko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P15-01	0 0 0 0 1 1	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P15-02	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P15-03	0 0 1 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1
P15-04	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P15-05	0 0 1 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P15-06	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P15-07	0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 1 0 0 1
P15-08	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P15-09	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 1
P15-10	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1

Tab. 4o ukazuje data populace č. 16 – *P. mugo* z oblasti Rakouska, Tirol, Ammergauer Alpen, hora Schäferblasse. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4o: Populace č. 16 – *P. mugo* – Rakousko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P16-01	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 1
P16-02	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P16-03	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 1
P16-04	0 1 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P16-05	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 1
P16-06	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P16-07	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 1 0 0 1
P16-08	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	1 1 0 0 1
P16-09	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P16-10	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 1

Tab. 4p ukazuje data populace č. 17 – *P. uncinata* z oblasti Rakouska, Tirol, okolí jezera Plansee. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve všech 5 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 2 fragmenty.

Tab. 4p: Populace č. 17 – *P. uncinata* – Rakousko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P17-01	0 0 0 0 1 0	0 1 0 0 1 0 0 0 0	1 1 0 0 1
P17-02	0 0 0 0 0 1	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P17-03	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 1 0 0 1
P17-04	0 0 1 0 1 0	0 1 0 0 1 0 1 0 0	0 0 0 1 1
P17-05	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 1 0 0 1
P17-06	0 0 0 1 0 0	0 0 0 1 0 1 0 0 0	0 1 0 0 1
P17-07	0 0 0 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P17-08	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	1 1 0 0 1
P17-09	0 0 0 0 0 1	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P17-10	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1

Tab. 4q ukazuje data populace č. 18 – *P. sylvestris* z oblasti Rakouska, Tirol, Reutte, Tannheimer Berge, jižní svah mezi serpentinami silnice, severně nad obcí Weissenbach am Lech. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 2 fragmenty.

Tab. 4q: Populace č. 18 – *P. sylvestris* - Rakousko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P18-01	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	1 0 1 0 1
P18-02	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 1 0 1
P18-03	0 0 1 0 0 0	0 0 0 1 0 0 1 0 0	0 1 0 0 1
P18-04	0 0 0 1 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P18-05	0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P18-06	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	1 0 1 0 1
P18-07	0 0 1 0 1 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P18-08	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 1 0 0 1
P18-09	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 1 0 0 1
P18-10	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 1 1 0 1

Tab. 4r ukazuje data populace č. 19 – *P. rotundata* z oblasti Švýcarska, Neuchatel, pohoří Jura, rašelinný bor v REZ Bois des Lattes. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve všech 5 pozicích, max. byly amplifikovány 4 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4r: Populace č. 19 – *P. rotundata* – Švýcarsko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P19-01	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 0 0 0 1
P19-02	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 1 1 1
P19-03	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 0 1 0 1
P19-04	0 0 1 0 0 0	0 0 0 1 0 0 0 0 0	0 1 1 1 1
P19-05	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1 0 0 0 0	0 1 1 0 1
P19-06	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 1 1 0 1
P19-07	0 0 0 0 0 1	0 0 0 1 0 0 0 0 0	1 0 1 0 1
P19-08	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P19-09	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 0 1 0 0	1 0 0 0 1
P19-10	0 1 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1

Tab. 4s ukazuje data populace č. 20 – *P. nigra* z oblasti Albánie, okres Erseke, západní část pohoří Pindos. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 7 pozicích, max. byly amplifikovány 4 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů pouze v 1 pozici.

Tab. 4s: Populace č. 20 – *P. nigra* – Albánie.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P20-01	0 0 0 1 0 1	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P20-02	0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P20-03	0 0 0 0 1 0	1 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1
P20-04	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1
P20-05	0 0 0 1 0 1	0 1 0 0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1
P20-06	0 1 0 0 1 0	1 1 0 1 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1
P20-07	0 0 0 0 0 1	1 1 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1
P20-08	0 0 1 0 1 0	0 1 1 0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 1
P20-09	0 0 0 0 1 0	0 1 1 0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1
P20-10	0 0 0 1 0 1	1 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1

Tab. 4t ukazuje data populace č. 21 – *P. nigra* z oblasti Turecka, provincie Bursa, jihovýchodní část pohoří Uludag. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 6 pozicích, max. byly amplifikovány 4 fragmenty, min. 2 fragmenty. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů pouze v 1 pozici.

Tab. 4t: Populace č. 21 – *P. nigra* – Turecko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P21-01	0 0 0 1 0 1	1 0 1 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P21-02	0 0 0 1 0 1	0 1 1 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P21-03	0 0 0 0 0 1	0 0 1 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P21-04	0 0 0 0 1 0	1 1 0 0 1 0 0 0 0	0 0 0 0 1
P21-05	0 0 0 0 1 0	1 0 1 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P21-06	0 0 0 1 0 0	1 0 0 1 0 0 0 0 0	0 0 0 0 1
P21-07	0 0 0 0 1 0	1 1 1 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P21-08	0 0 0 0 0 1	1 0 1 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P21-09	0 0 0 0 1 0	1 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1
P21-10	0 0 0 0 1 0	1 0 1 0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1

Tab. 4u ukazuje data populace č. 22 – z oblasti Bulharska, severní část pohoří Pirin, dolina Bela reka. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 6 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 4 fragmenty, min. 2 fragmenty.

Tab. 4u: Populace č. 22 – Bulharsko.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P22-01	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 1 0 0 1
P22-02	0 0 0 0 0 1	0 0 1 0 0 0 0 1 1	1 1 0 0 1
P22-03	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 1	0 1 0 0 1
P22-04	0 0 0 1 1 0	1 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P22-05	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 0 1	1 0 1 0 1
P22-06	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 1
P22-07	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 0 1	1 1 1 0 1
P22-08	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	1 0 1 0 1
P22-09	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	1 0 1 0 1
P22-10	0 1 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 1 0 0 1

Tab. 4v ukazuje data populace č. 23 – z oblasti západních Čech, Krušné hory, okres Chomutov, Hora Sv. Šebestiána. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů v 5 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4v: Populace č. 23 – západní Čechy.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P23-01	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 1	0 1 0 0 1
P23-02	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 1 0 0 1
P23-03	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	1 0 0 0 1
P23-04	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 1
P23-05	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	1 0 0 0 1
P23-06	0 0 1 0 1 0	0 0 1 0 0 1 0 0 0	0 1 0 0 1
P23-07	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 1 0 0 1
P23-08	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 0 1 0 1
P23-09	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 1
P23-10	0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 1 0 0 1	0 0 1 0 1

Tab. 4w ukazuje data populace č. 24 – z oblasti západních Itálie, Veneto, horská skupina Dolomiti, Passo di Falzarego. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment.

Tab. 4w: Populace č. 24 – Itálie.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P24-01	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 1 0 0 1
P24-02	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 0 1 0 1
P24-03	0 0 0 0 0 1	0 0 0 1 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P24-04	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 1
P24-05	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P24-06	0 0 1 0 0 1	0 0 0 0 1 0 0 1 0	0 1 0 0 1
P24-07	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 1
P24-08	0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 1 0 0 1
P24-09	0 0 1 0 0 1	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 1 0 0 1
P24-10	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 1 1 0 0 0	0 0 1 0 1

Tab. 4x ukazuje data populace č. 25 – z oblasti Itálie, Bormio, horská skupina Ortles, Valle di Braulio. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 2 fragmenty.

Tab. 4x: Populace č. 25 – Itálie.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P25-01	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 1 0 0 1
P25-02	0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P25-03	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 0 0 1 1
P25-04	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P25-05	0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 0 0 1 1 0	0 1 0 0 1
P25-06	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P25-07	0 0 0 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P25-08	0 0 1 0 0 1	0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 1 1 1
P25-09	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 0 1 1 0	0 0 1 0 1
P25-10	0 0 1 0 0 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 1 1 0 1

Tab. 4y ukazuje data populace č. 26 – z oblasti Itálie, Abruzzo, severní část pohoří Maiella. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 2 fragmenty.

Tab. 4y: Populace č. 26 – Itálie.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P26-01	0 0 0 0 1 1	0 0 0 0 0 1 0 1 0	1 0 1 0 1
P26-02	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P26-03	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 0 1 0 1
P26-04	0 0 0 0 0 1	0 0 0 0 0 1 1 0 0	0 0 1 0 1
P26-05	0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 1 1 0 0	1 0 0 0 1
P26-06	0 0 1 0 0 1	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 1 0 1
P26-07	0 0 0 1 0 1	0 0 0 0 0 0 0 1 0	0 1 0 0 1
P26-08	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 1 0 0	1 0 1 0 1
P26-09	0 0 1 0 0 1	0 0 0 0 0 1 0 0 0	1 0 0 0 1
P26-10	0 0 0 1 1 0	0 0 0 0 0 1 0 1 0	0 1 1 0 1

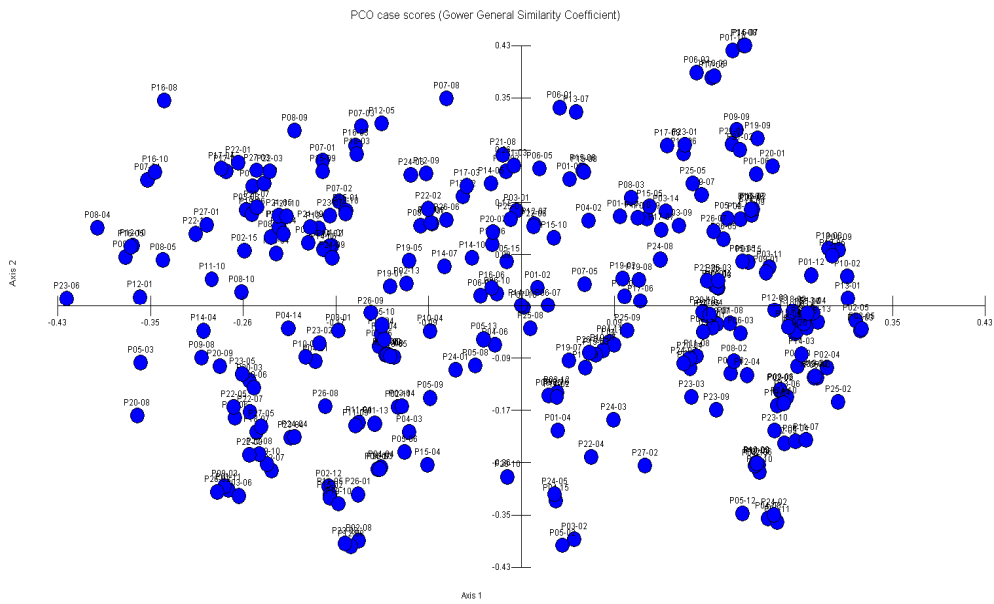
Tab. 4z ukazuje data populace č. 27 – z oblasti Německa, Sasko, rašeliniště Mothäuser Heide. U primeru SPAG7.14 byla z 6 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 3 pozicích, max. byly amplifikovány 2 fragmenty, min. 1 fragment. U primeru PtTx3116 byla z 9 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 2 pozicích, amplifikován byl 1 fragment. U primeru SPAC11.6 byla z 5 možných pozic detekována přítomnost fragmentů ve 4 pozicích, max. byly amplifikovány 3 fragmenty, min. 2 fragmenty.

Tab. 4z: Populace č. 27 – Německo.

Označení	SPAG7.14	PtTx3116	SPAC11.6
P27-01	0 0 1 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	1 0 0 0 1
P27-02	0 0 1 1 0 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 0 1 0 1
P27-03	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 1 0 0 1
P27-04	0 0 1 1 0 0	0 0 0 0 0 0 1 0 0	0 0 1 0 1
P27-05	0 0 0 0 1 0	0 0 0 0 0 1 0 0 0	0 1 1 0 1

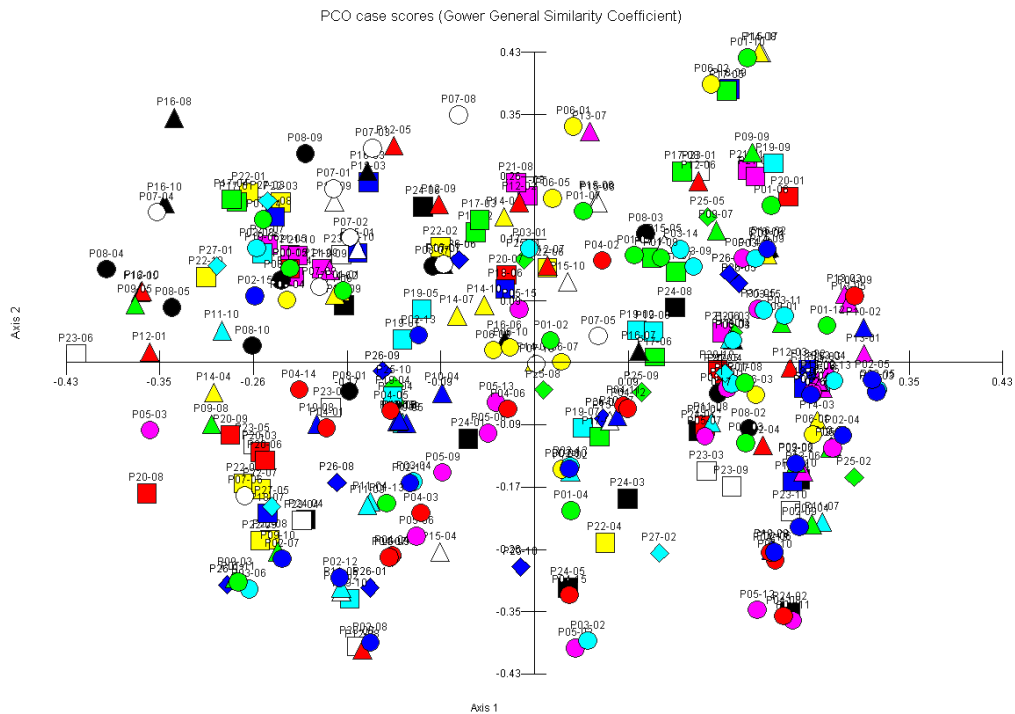
Pro další hodnocení byla použita analýza hlavních komponent (PCO – Principle Coordinate Analysis). Následující obrázek (Obr. 6) zahrnuje variabilitu všech sledovaných jedinců i taxonů. Každý bod představuje jeden mikrosatelitní fenotyp. Jednotlivé body jsou rozptýleny rovnoměrně v bloku, nedošlo k žádnému seskupení v celém souboru sledovaných jedinců – ani podle geografické polohy ani podle taxonu.

Obr. 6: PCO všech sledovaných jedinců i taxonů.



Obr. 7 představuje třídění podle jednotlivých populací, každá barva znázorňuje jinou populaci. Všechny populace jsou rovnoměrně rozptýleny, není patrné výrazné shlukování v jakékoliv části celého souboru.

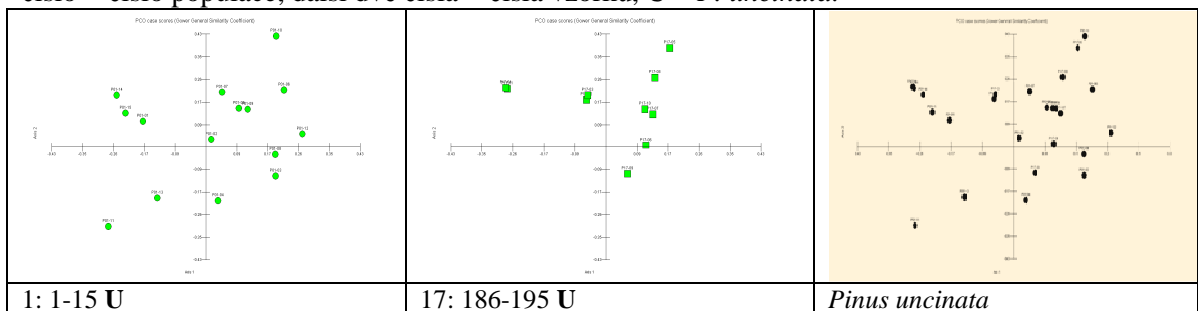
Obr. 7: PCO všech sledovaných jedinců i taxonů, barevně jsou odlišeny jednotlivé populace.



Následující obrázek (Obr. 8) je rozčleněn do několika částí. Každá část zahrnuje jednu populaci, barevně odlišené části na konci tabulky označují PCO celých taxonů.

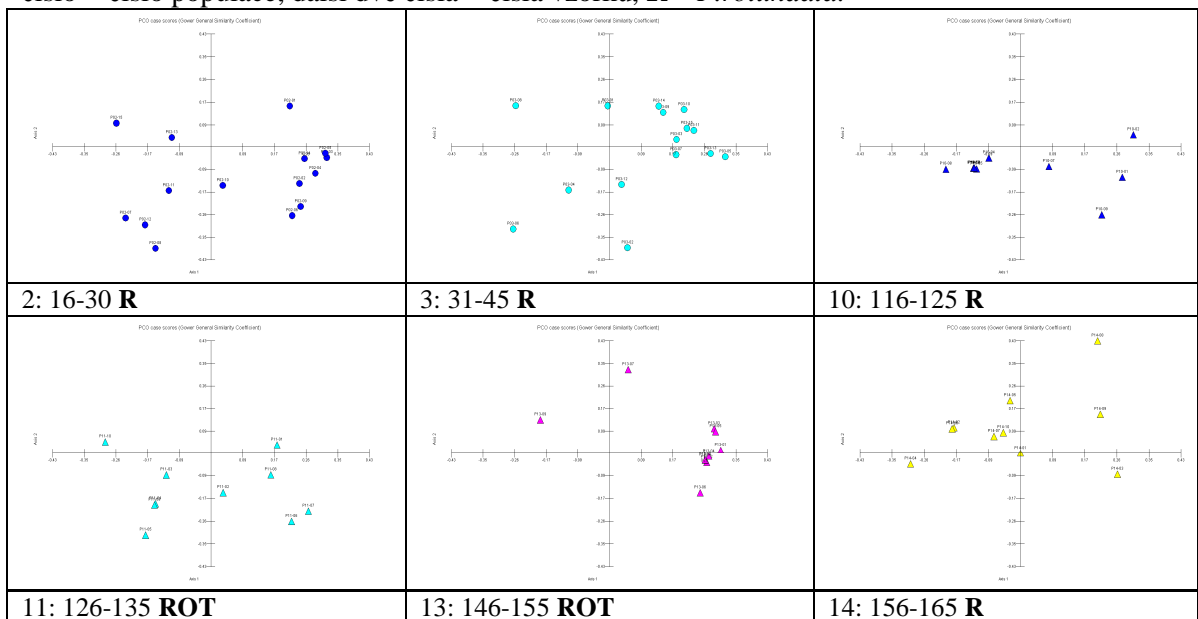
Obr. 8a – *Pinus uncinata*: Zatímco 1. populace z Francie je rovnoměrně rozptýlena po celém souboru, 17. populace z Rakouska se vyskytuje více nad osou x. Pokud se sloučí dohromady, pokrývají celý soubor rovnoměrně.

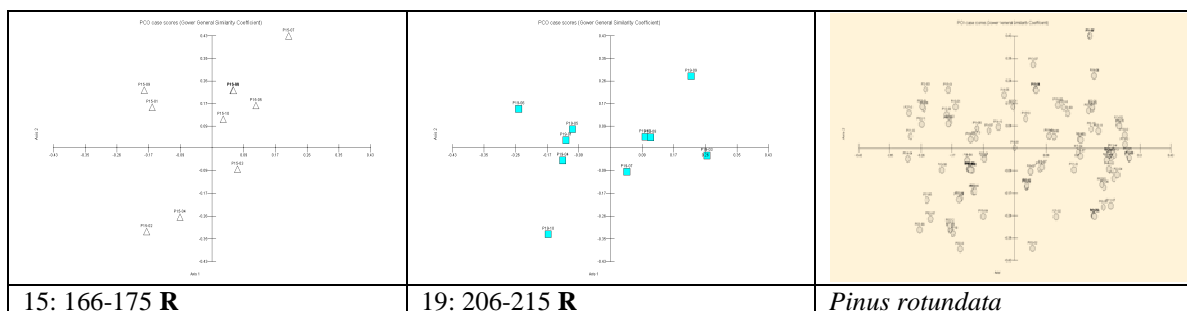
Obr. 8a: Výsledky analýz PCO u *Pinus uncinata*. Barevně je odlišený souhrn celého taxonu. První číslo = číslo populace, další dvě čísla = čísla vzorků, **U** – *P. uncinata*.



Obr. 8b – *P. rotundata*: Ačkoliv některé z populací *P. rotundata* mají tendenci shlukovat se v určité části souboru, nelze s jistotou tvrdit, že lze tímto způsobem od sebe odlišit populace z určitého území.

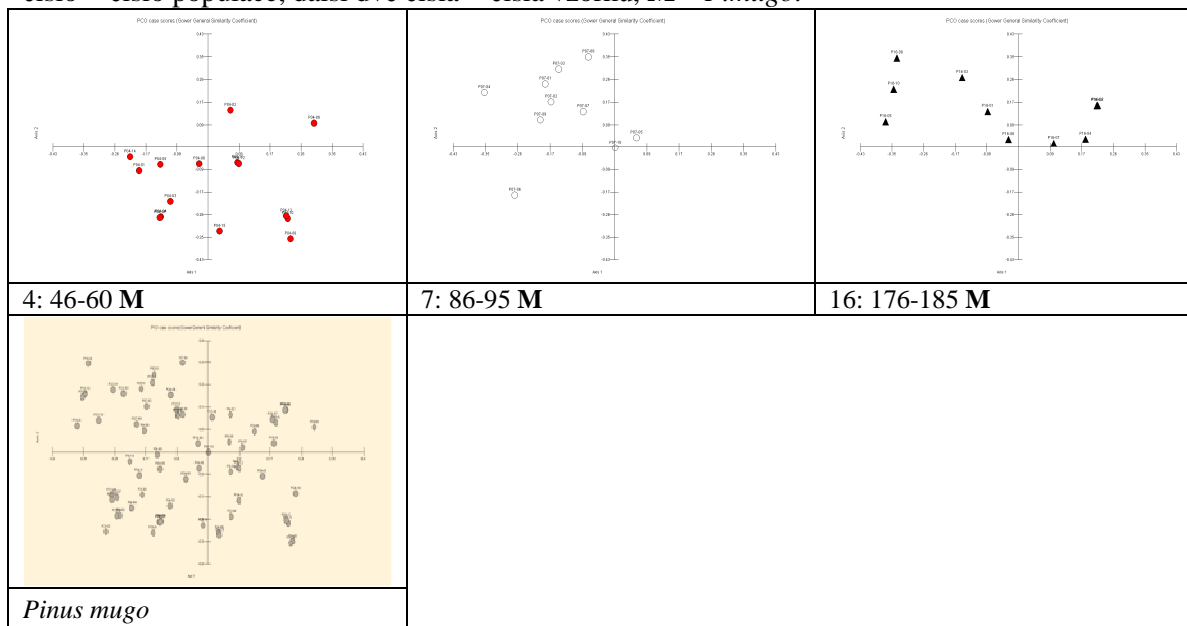
Obr. 8b: Výsledky analýz PCO u *Pinus rotundata*. Barevně je odlišený souhrn celého taxonu. První číslo = číslo populace, další dvě čísla = čísla vzorků, **R** – *P. rotundata*.





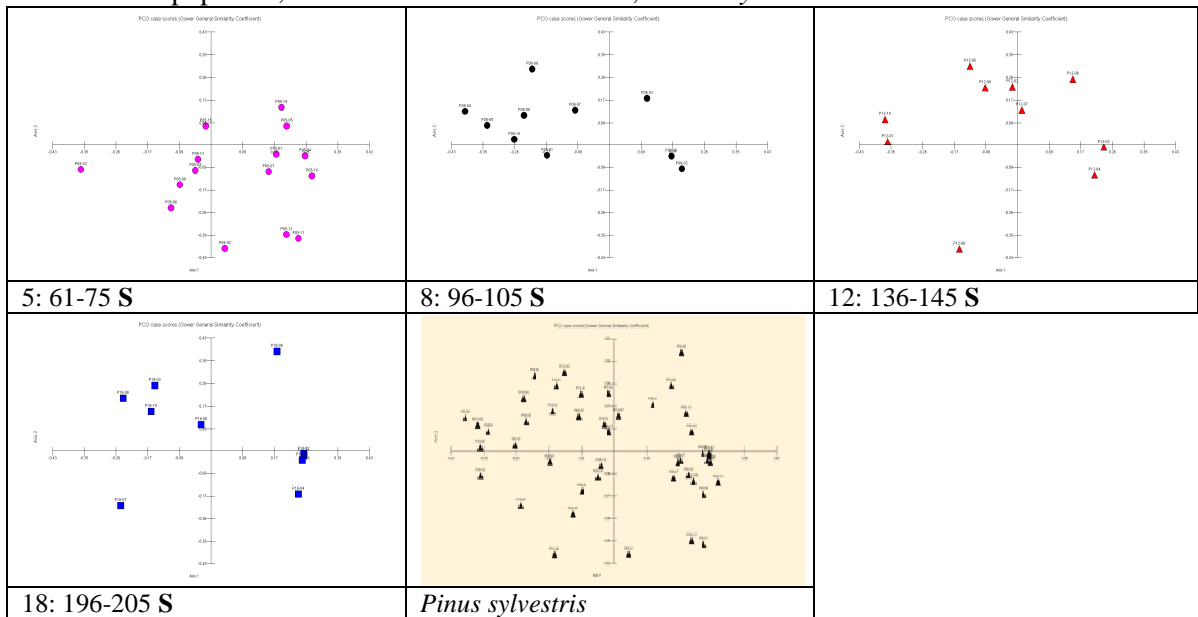
Obr. 8c – *P. mugo*: Vykazuje určitý trend rozdělení podle území. 4. populace ze Slovenska se vyskytuje více pod osou x , 16. populace z Rakouska má všechny body nad osou x a 4. populace z České Republiky má tendenci vyskytovat se většinou nad osou x a navíc vlevo od osy y . Po sloučení ale opět dochází k rovnoměrnému rozložení po celém souboru.

Obr. 8c: Výsledky analýz PCO u *Pinus mugo*. Barevně je odlišený souhrn celého taxonu. První číslo = číslo populace, další dvě čísla = čísla vzorků, **M** – *P. mugo*.



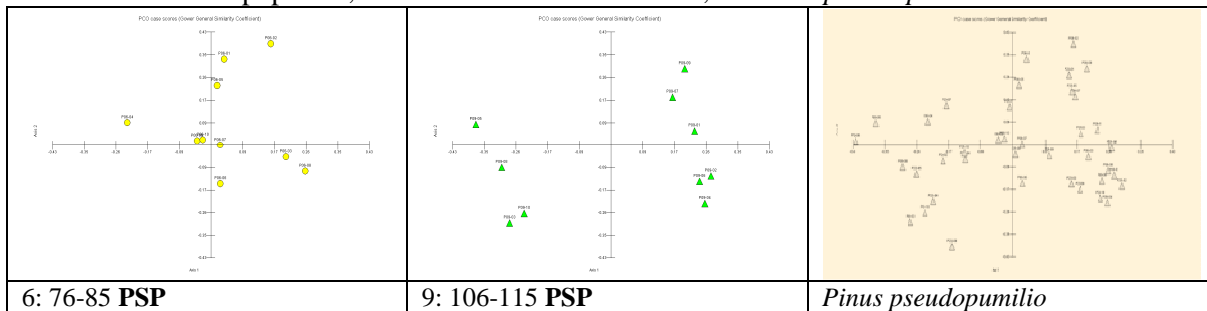
Obr. 8d – *P. sylvestris*: Stejně jako *P. mugo* vykazují české populace (8, 12) *P. sylvestris* určitou tendenci shlukovat se spíše nad osou x a populace ze Slovenska (5) pod osou x , ale výsledek po sloučení populací je stejný.

Obr. 8c: Výsledky analýz PCO u *Pinus sylvestris*. Barevně je odlišený souhrn celého taxonu. První číslo = číslo populace, další dvě čísla = čísla vzorků, **M** – *P.sylvestris*.

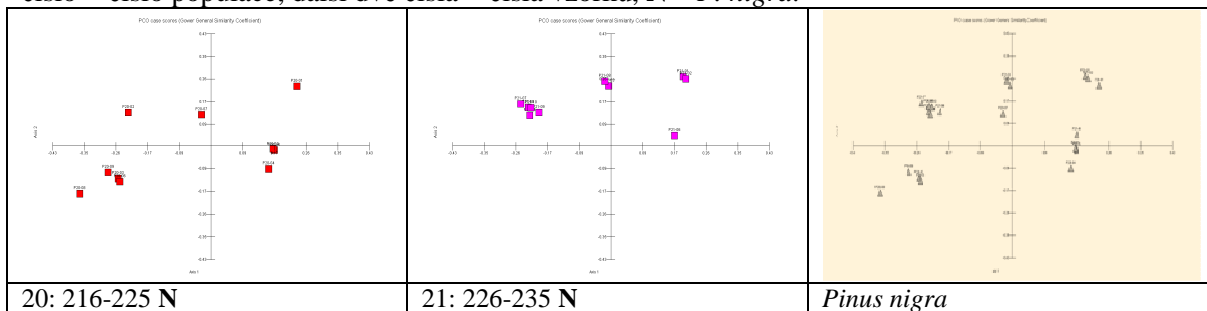


Ani u ostatních populací (Obr. 8d – 8f) není žádný trend rovnoměrného uspořádání v bloku, a pokud se sloučí dohromady, plynule pokrývají celý rozsah variability agregátu.

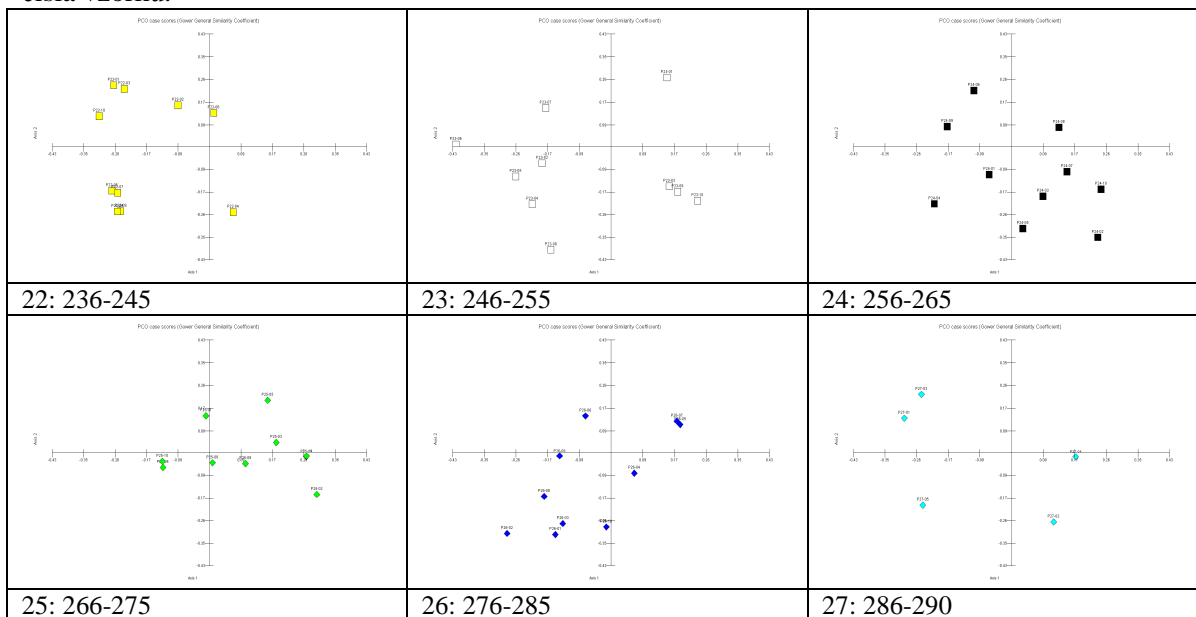
Obr. 8d: Výsledky analýz PCO u *Pinus pseudopumilio*. Barevně je odlišený souhrn celého taxonu. První číslo = číslo populace, další dvě čísla = čísla vzorků, **PSP** – *P.pseudopumilio*.



Obr. 8e: Výsledky analýz PCO u *Pinus nigra*. Barevně je odlišený souhrn celého taxonu. První číslo = číslo populace, další dvě čísla = čísla vzorků, **N** – *P. nigra*.



Obr. 8f: Výsledky analýz PCO u ostatních taxonů. První číslo = číslo populace, další dvě čísla = čísla vzorků.



V celém sledovaném souboru je velký rozsah variability a žádná z populací ani ze sledovaných taxonů nevykazuje výrazné shlukování v určité části. Rozsah variability je, jak v rámci jednotlivých populací, tak v rámci jednotlivých taxonů, rovnoměrně rozptýlen po celém souboru, což ukazuje na velmi vysokou vnitropopulační variabilitu. Vnitropopulační variabilita je dokonce vyšší než variabilita mezi taxony, tzn., že překryje rozdíly mezi taxony.

Populace odebírány z celého areálu, kde se daný agregát vyskytuje, proto lze říci, že je postihnuta variabilita na celém území výskytu agregátu, tedy na území Evropy.

Variabilita po jednotlivých mikrosatelitech je rovněž velmi vysoká a odpovídá výsledkům, které byly dosaženy pro všechny mikrosatelity dohromady, což opět ukazuje na velmi vysokou vnitropopulační variabilitu a velký rozsah přesahující rámec druhu.

Protože nelze spolehlivě odlišit jednotlivé taxony, bylo přistoupeno k optimalizaci sekvenační analýzy a k sekvenování úseků genů pro ribozomální RNA.

5.4. Sekvenování

Vzhledem k tomu, že je tato metoda velmi nákladná a byla zjištěna vysoká vnitropopulační variabilita, byla vypracována jen pilotní studie, která měla za cíl optimalizovat metodu a prokázat její vhodnost pro další využití. Kompletní zpracování by vyžadovalo sekvenování ve stejném rozsahu jako byly zpracovány mikrosatelity.

Požadavek na optimalizaci byl splněn, tzn., že jsou nalezeny vhodné primery, je nalezena vhodná metoda pro amplifikaci, po počátečních obtížích se již daří fragmenty genů pro ribozomální RNA amplifikovat a sekvenovat a jsou nalezeny první sekvence potvrzující rozdíly mezi taxony.

Pro analýzu byly zvoleny 4 populace po dvou náhodně vybraných rostlinách.

Pro sekvenování byly použity jaderné ITS (Internal Transcribed Spacer) se dvěma typy primerů: ITS1 a ITS4 (WHITE et al, 1990) jako primery obecné a ITS5 (WHITE et al, 1990) a 26S25R (NICKRENT et la. 1994) jako primery specifické pro borovice (Tab. 5).

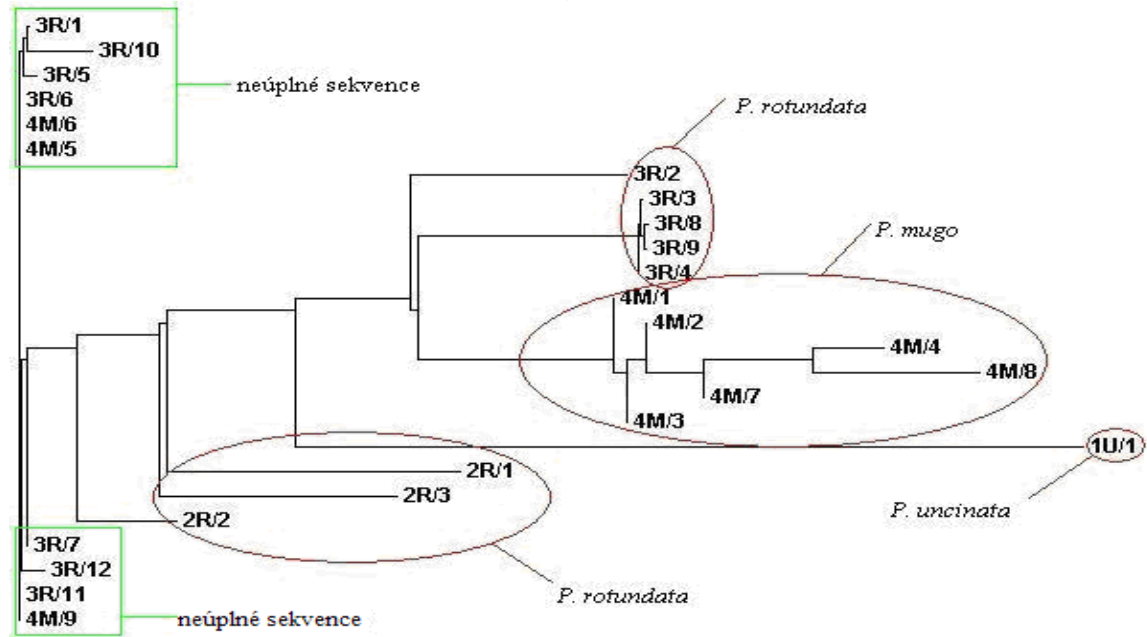
Tab. 5: Primery a jejich sekvence použité pro sekvenování.

Název primeru	Sekvence 5'→3'
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G
26S25R	TAT GCT TAA ACT CAG CGG GT

Po prvotním vyhodnocení všech vzorků s obecnými i specifickými primery bylo zjištěno, že s obecnými primery se amplifikují i houby, kterými byly borovice napadeny, nejčastěji byl zaznamenán výskyt *Hormonema dematioides* a zatím neidentifikovaných *ascomycet* (dle databáze GeneBank). U specifických primerů byly u všech vzorků amplifikovány sekvence z borovic. Při dalším hodnocení v databázi: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/> byly tedy srovnávány již fragmenty, kde byly použity primery specifické.

Phylogram 1 zahrnuje hodnocení vzorků všech 4 vybraných populací (*Pinus uncinata*, *P. rotundata* (2x), *P. mugo*). Každá populace tvoří samostatný shluk, přičemž *P. uncinata* je ve větší vzdálenosti od obou populací *P. rotundata* i od *P. mugo*. Populace č. 2 *P. rotundata* pocházející z České Republiky a populace č. 3 *P. rotundata* pocházející z Německa se mezi sebou rovněž výrazně liší, to ukazuje na širokou variabilitu na úrovni tohoto hybridogenního druhu a na výraznou odlišnost populací pocházejících z různých geografických oblastí. Phylogram dále ukazuje neúplné sekvence, které nebyly hodnoceny.

Phylogram 1: Všechny osekvenované populace se specifickými primery. **1U** – *Pinus uncinata*, **2R** – *P. rotundata*, **3R** – *P. rotundata*, **4M** – *P. mugo*.



Důkazem výskytu velmi konzervativních bloků je Obr. 9. Tato doména může být společná pro více taxonů v rámci agregátu *P. mugo*.

Obr. 9: Ukázka konzervativní domény po osekvenování všech fragmentů. **1U** – *Pinus uncinata*, **2R** – *P. rotundata*, **3R** – *P. rotundata*, **4M** – *P. mugo*.

CLUSTAL 2.0.5 multiple sequence alignment

```

3R/2      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTATTGGTTCGGGTTGGTTGGG-TGT-CGATTG 101
4M/4      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTATTGGTTCGGGTTGGTTGGG-TGT-CGATTG 76
4M/7      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTATTGGTTCGGGTTGGTTGGG-TGT-CGATTG 101
3R/10     A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTTTTTTTGGTTCGGGTTGGTTGGG-TGT-CGATTG 101
4M/2      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTCGGGTTGGTTGGG-TGT-CGATTG 101
4M/1      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTCGGGTTGGTTGGG-TGT-CGATTG 101
4M/3      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTCGGGTTGGTTGGG-TGT-CGATTG 101
3R/3      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTATAGCAGGGGTTTGTGGCC-GAT-TTTTCG 100
3R/9      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTATAGCAGGGGTTTGTGGCC-GAT-TTTTCG 98
3R/8      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTATAGCAGGGGTTTGTGGCC-GAT-TTTTCG 101
3R/4      A-GGATCATTGATASCAGGGGTTTTCTTTATAGCAGGGGTTTGTGGCC-GAT-TTTTCG 101
3R/1      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTTGGGTTGGTTGGG-TGTGCCATCG 102
3R/5      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTTGGGTTGGTTGGG-TGTGCCATCG 102
4M/5      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTTGGGTTGGTTGGG-TGTGCCATCG 103
4M/6      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTTGGGTTGGTTGGG-TGTGCCATCG 102
3R/11     A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTTGGGTTGGTTGGG-TGTGCCATCG 102
4M/9      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTTGGGTTGGTTGGG-TGTGCCATCG 102
3R/6      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTTGGGTTGGTTGGG-TGTGCCATCG 102
3R/12     A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTTGGGTTGGTTGGG-TGTGCCATCG 102
3R/7      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTTGGGTTGGTTGGG-TGTGCCATCG 102
2R/1      A-GAATCATTGATTGAAGGGTTTTCTTTTGGTTTGGGTTGGTTGGG-TGTGCCATCG 103
2R/2      A-GGATCATTGATAGCAGGGGTTTTCTTTTGGTTTGGGTTGGTTGGG-TGTGCCATCG 102
2R/3      AAGGATCATTGATWGCAGGGGTTT-MTTTTTGGTT-KMKTTGGTTGAG-YGTCCATCG 98
4M/8      A-GSATCAWTGAYAGCAGTGGTTTTTCWTTAKTGGTTSGGGTTGGKWWGG-YGT-CGAYWG 76
1U/10     ATTGAGCGTCGCGGTCACACGCGCCCTCAATTGTACCGGCCGAKCACYCTATSTCCYAG 120
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

Phylogram 2. je výsledkem zkompletovaných úplných sekvencí populací č. 3 a č. 4: *P. rotundata* a *P. mugo*. Oba druhy jsou velmi zřetelně odlišeny. Na Obr. 10 jsou vyobrazeny jejich sekvence.

Phylogram 2: 4M – *P. mugo*, 3R – *P. rotundata*



Obr. 10: Sekvence populací č. 3 – *P. rotundata* a č. 4 – *P. mugo*:

CLUSTAL 2.0.5 multiple sequence alignment

```

4/11HB      GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTACCGTAGGTGAACCTGCGGTAGGATCATTGATAGCA 60
4/17A      GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTACCGTAGGTGAACCTGCGGTAGGATCATTGATAGCA 60
3/8PB      -GAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTACCGTAGGTGAACCTGCGGTAGGATCATTGATAGCA 59
3/20H      GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTACCGTAGGTGAACCTGCGGTAGGATCATTGATAGCA 60
*****

4/11HB      GGGGTTTTCTTTTTTGGTTCGGGTT---GGTTGGGTGTCGATTGCAATGTGGGA----- 111
4/17A      GGGGTTTTCTTTATTGGTTCGGGTT---GGTTGGGTGTCGATTGCAATGTGGGA----- 111
3/8PB      GGGGTTTTCTTTATAGCAGGGGTTTTGTGGCCGATTTTTTCGGTAGTACGTGGAACGACT 119
3/20H      GGGGTTTTCTTTATAGCAGGGGTTTTGTGGCCGATTTTTTCGGTAGTACGTGGAACGACT 120
*****

4/11HB      CTTTGTGGTGCCTCTCTAGGGGAGCG---GGTTTGGTGTTTGGCGGGAAACATCGTTGGT 167
4/17A      CTTTGTGGTGCCTCTCTAGGGGAGCG---GGTTTGGTGTCTTGGCGGGAAACATCGTTGGT 167
3/8PB      CTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGTTACGATGAAGAACGTAGCGA-AATGCGATACTT 178
3/20H      CTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTTGTTACGATGAAGAACGTAGCGA-AATGCGATACTT 179
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

4/11HB      TGCTTGTCTCGAGGTAACGCTTGATTTTTT-CGTGTGTGCTTGC AAGCCATGCTTGTG-- 224
4/17A      TGCTTGTCTCGAGGTAACGCTTGATTTTTT--CGTGTGTGCTTGC AAGCCATGCTTGTG-- 223
3/8PB      AGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAATCATCGAGTTTTTGAACGCAATTTGCGCCCGAGGC 238
3/20H      AGTGTGAATTGCAGAAATCCCGTGAATCATCGAGTTTTTGAACGCAATTTGCGCCCGAGGC 239
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

4/11HB      CTTGTCCA---CCCATCC-TTTGTTTTTC---TCCCCCCC AATGTGTTTC-TGTAGGG 276
4/17A      CTTGTCCA---CCCATCC-TTTGTTTTTC---TCCCCCCC -AATGTGCTTC-TGCAGGG 274
3/8PB      CTCGGTCGAGGGCACGTCTGTCTGGGCGTCGCATCCCATTC AAACGCGCTCCCTGCAATG 298
3/20H      CTCGGTCGAGGGCACGTCTGTCTGGGCGTCGCATCCCATTC AAACGCGCTCCCTGCAATG 299
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

4/11HB      GGTTCGG AAGCCTGTTTCTAGGGAGCCCTTCCGACGATCTGTTCCGGCCGGGCGTGTTGC 336
4/17A      GGTTCGG AAGCCTGTTTCTTGGGAGCCCTTCCGACGAACTGTTCCGGCCGGGCGATGTTGC 334
3/8PB      TGCTAGGGAGCAGCGGAGCTGGTCCGTCGCCCGTGC GGTGCGGTTGGCTGAAATACC 358
3/20H      TGCTAGGGAGCAGCGGAGCTGGTCCGTCGCCCGTGC GGTGCGGTTGGCTGAAATACC 359
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

4/11HB      TGCAGAG-----TTGAGGTGC---TTGGTAAAAA-----CGATGGATAAAT-- 374
4/17A      TGCAGAG-----TTGAGGTGC---TTGGTAAAAA-----CGATGGATAAAT-- 372
3/8PB      TCAAGCGATGTTTCGTGGCGCGCGTCGGCGAGCGGTGATCTTGTCCCCTTGGATGGGCAG 418
3/20H      TCAAGCGATGTTTCGTGGCGCGCGTCGGCGAGCGGTGATCTTGTCTCCTTGGATGGGCAG 419
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

4/11HB      TCGGACTCATTTCGTAGCGGGCTTTGTGTGGCATCGCTCGAACTTGCTTTTCTCTCTCTTG 434
4/17A      TTGGACTCATTTCGTAGCGG-----CATCGCTCGAACTTGCTTTGCTCTCTCTTG 421
3/8PB      TCAACGTTAGCCGATGCGGGCTTTGTGTGGCATCGCTCGAACTTGCTTTGCTCTCTCTTG 478
3/20H      TCGGCGTTAGCCGATGCGGGCTTTGTGTGGCATCGCTCGAACTTGCTTTGCTCTCTCTTG 479
          *      * *      **      ***      *****
          *      * *      **      ***      *****

4/11HB      TCCTCCCATGGGGTAGGGTGGATTTAGCTCCAACCTTTGCGACCTCAGCTCAGGCGAGAAC 494
4/17A      TCCTCCCATGGGGTAGGACGGATTTAGCTCCAACCTTTGCGACCTCAGCTCAGGCGAGAAC 481
3/8PB      TCCTCCCATGGGGTAGGGCGGATTTAGCTCCAACCTTTGCGACCTCAGCTCAGGCGAGAAC 538
3/20H      TCCTCCCATGGGGTAGGGCGGATTTAGCTCCAACCTTTGCGACCTCAGCTCAGGCGAGAAC 539
          *****
          *****

4/11HB      ACCCGCTGAGTTTAAGCAT- 513
4/17A      ACCCGCTGAGTTTAAGCATA 501
3/8PB      ACCCGYTGAGTTTAAGCATA 558
3/20H      ACCCGCTGAGTTTAAGCATA 559
          *****
          *****

```

Tato metoda by měla dále směřovat k tomu, aby byla pokryta větší část genů pro ribozomální RNA, protože se jeví jako nejvhodnější z použitých metod, poskytuje nejpřehlednější výsledky a oproti SSR analýze a analýze nespécifických markerů poskytuje výsledky, které ukazují na odlišnosti mezi taxony/populacemi. Po osekvenování delších úseků ribozomálních genů (LSU, SSU, ITS) může poskytnout data pro odlišení jednotlivých druhů sledovaného agregátu *Pinus mugo*.

5.5 Morfologie

Další možností by bylo vložit do tohoto hodnocení i morfologická data, ale ta ještě nejsou zpracovaná a dostupná. Až budou zhotovená morfologická měření, bylo by možné sloučit je s těmito výsledky. Zatím není morfologie jednoznačná, proto se přistoupilo ke genetickým analýzám. Následující morfologické studie jsou prováděny v rámci výzkumného projektu Výzkumného ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví Průhonice (BUSINSKÝ & KIRSCHNER 2007) a po jejich ukončení budou provedeny statistické analýzy molekulárních a morfologických dat.

Příkladem hodnocení morfologických znaků je Tab. 6 (podle BUSINSKÝ & KIRSCHNER 2007).

Tab. 6: Morfologické a ekologické charakteristiky agregátu *P. mugo* převzaté z literatury. Úroveň vlastností jednotlivých charakteristik: +++ (vysoká), ++ (střední), + (nízká), - (není považováno za významné).

Hodnocený znak /Autor a publikace	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
Charakter jehlic	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Symetrie šišky	++	++	++	++	+++	+++	+	+++	+++	-	++
Tvar apofýzy	+++	+++	+	+++	++	+++	++	+++	++	+++	++
Habitus stromu	+	++	+++	++	++	++	+++	-	+++	++	+++
Ekologické požadavky	+	+	-	+	+	-	++	+	++	-	+
Počet zjištěných druhů	1	3	2	1	2	2	2	1	3	2	3

- (1) NOVÁK 1953
- (2) GAUSSEN 1960
- (3) HOLUBIČKOVÁ 1965
- (4) ZOLLER 1981
- (5) SENETA 1981
- (6) KRÜSSMANN 1983
- (7) FARJON 1984
- (8) CHRISTENSEN 1987a
- (9) SKALICKÝ 1988
- (10) GAUSSEN et al. 1993
- (11) BUSINSKÝ 2002

6. DISKUSE

Problematikou taxonomického pojetí agregátu *Pinus mugo* se zabýval zejména CHRISTENSEN (1987a), který se zaměřil hlavně na nomenklatorické otázky, vymezení jednotlivých druhů a synonymiku. Jeho studie pak doplňují současnější publikované práce (NEET-SARQUEDA 1994, SIEDLEWSKA & PRUS-GŁOWACKI 1995, PRUS-GŁOWACKI et al. 1998, LEWANDOWSKI et al. 2000, BORATYŃSKA & BOBOWICZ 2001, BORATYŃSKA et al. 2003, 2004, 2005, atd.). Z publikovaných studií plyne závěr, že počet druhů není hlavním kritériem pro hodnocení taxonomie tohoto okruhu borovic. Důležitou roli hraje rozmístění a vzájemné vztahy přírodních populací. Práce CHRISTENSENA (1987a, b) je významná i pro současné výzkumy, protože předem upustil od hodnocení taxonomie podle celkového habitu jako hlavního kritéria pro určování druhů. Každý taxon, který definoval, mohl mít jak keřovitý tak stromový habitus, dokonce i uvnitř skupiny *Pinus mugo*. Dalším kritériem, které nepovažoval za zásadní z hlediska rozlišení jednotlivých druhů, jsou jejich ekologické požadavky.

Několik prací ukazuje, že nehybridní monokormní formy jsou od *P. mugo* separovány. Jedna z nejzajímavějších byla publikována polskými autory, kteří pracovali s *P. uncinata* (subsp. *uncinata*) a s bažinnou borovicí (subsp. *uliginosa*), které jsou od lokalit s výskytem *P. mugo* poměrně vzdálené, a srovnávali je s ostatními druhy komplexu (BORATYŃSKA & BOBOWICZ 2001, BORATYŃSKA et al. 2003 – tvar jehlic, KRZAKOWA et al. 1984 - tvar semen a analýza pomocí izoenzymů, SIEDLEWSKA & PRUS-GŁOWACKI 1995, LEWANDOWSKI et al. 2002 - izoenzymy). Posledně jmenovaná práce nedokumentuje pouze charakteristiku subalpinských forem, ale také je schopna rozlišit subsp. *uncinata* (skalnatou/suťovou formu) od subsp. *uliginosa* (bažinné formy). Podobnost mezi hlavními stromovými taxony je mnohem vyšší než mezi *P. mugo* a stromovými formami jako celku (PRUS-GŁOWACKI et al. 1998, LEWANDOWSKI et al. 2000). Úvaha, že bažinné borovice jsou výsledkem hybridizace mezi *P. sylvestris* a *P. mugo* (STASZKIEWICZ & TYSZKIEWICZ 1972, STASZKIEWICZ 2001) může být zamítnuta na základě studia jehlic, anatomie listů a kůry, ale také na základě předběžných výsledků DNA analýz.

Polští autoři v jejich početných studiích (např. reprezentativní studie PRUS-GŁOWACKI et al. 1998, nebo později LEWANDOWSKI et al. 2000, 2002, BORATYŃSKA et al. 2003, BORATYŃSKI et al. 2003) považují bažinné borovice za odlišné druhy, protože

v Polsku reprezentují bažinné druhy velmi jasně oddělené populace a nejsou přítomny přechodné druhy mezi subsp. *uncinata* a subsp. *uliginosa* (BORATYŃSKI 1994). V současných českých studiích dospěli autoři jako SKALICKÝ (1988) a BUSINSKÝ (1998, 2002) ke stejnému závěru, ale pro ten samý taxon použili název *P. rotundata*.

6.1. Název *Pinus mugo* Turra

Název *Pinus mugo* byl studován CHRISTENSENEM (1987a), který ho označil za neotyp z Monte Baldo (nad Lago di Garda) v severní Itálii. Neotyp byl později nahrazen lektotypem, který určili MINGHETTI & NARDI (1999), exemplářem ze stejných horských regionů v okolí Verony. Navzdory dosti povrchovému určení byl lektotyp určen v souladu s ustanoveními ICBN.

Ti samí autoři (MINGHETTI & NARDI 1999) zároveň navrhli, aby byl název *P. mugo* zachován jako název „chráněného“ typu, který nebyl schválen Committee for Spermatophyta (BRUMMITT 2001). Autoři založili své úvahy na předpokladu (následovali CHRISTENSENA 1987a), že komplex *P. mugo* reprezentuje formy soustředěné mezi západními extrémy - subsp. *uncinata*, a východními extrémy - subsp. *mugo*. Co se týká morfologie, je *P. mugo* od monokormních stromových forem separován.

V horách nad Veronou se vyskytuje keřovitá forma *P. mugo* docela běžně, ž čehož BUSINSKÝ & KIRSCHNER (2007) vyvozují, že lokální populace patřící k agregátu *P. mugo* vykazují velmi vysokou variabilitu u tvaru šišek a jehlic (MINGHETTI 1997), což odpovídá výsledkům BORATYŃSKÉ et al. (2005).

6.2. Nomenklatura monokormních forem

a) Název *Pinus rotundata* Link.

Nejvíce zdrojů uvádí, že název byl publikován v roce 1830. SKALICKÝ (1988) ale upozorňuje na dřívější publikace zmiňující tento název (Flora 10/1: 218, 1827). Ve skutečnosti byly obě publikace napsány ve stejný čas, ale jedna z nich byla pozdržena (a rozšířena o mnoho poznámek a korektur) a vydána později v r. 1830. Dřívější publikace byly z hlediska oprávněnosti tohoto názvu přezkoumány. Název formy *P. rotundata* byl oficiálně schválen jako druh a mnoho morfologických zpráv to plně akceptuje. Jsou

názory, které zpochybňují oficiální název, ale podobná tvrzení lze najít i ve starší botanické literatuře a nemělo by to ohrozit oficiální status názvu.

Přídomek *rotundata* je v literatuře široce používán pro rašelinnou borovici ze severních výběžků Alp. Taxonomické pojetí se ale značně liší, někteří autoři uznávají *P. rotundata* jako samostatný druh (SKALICKÝ 1988, PRUS-GLOWACKI et al. 1998, LEWANDOWSKI et al. 2000, BUSINSKÝ 1998, 2002), mnoho autorů považuje tyto rašelinné formy za hybridy nebo hybridogenní derivát *P. mugo* a *P. uncinata* (ZOLLER 1981, CHRISTENSEN 1987a, GAUSSEN et al. 1993, SCHUBERT & VENT 1994, POLATSCHEK 1997, WISSKIRCHEN & HAEUPLER 1998, DÖRR & LIPPERT 2001, JÄGER & WERNER 2002, OSWALD 2005), většinou je však označována za poddruh nebo varietu. Většina autorů charakterizuje borovici '*rotundata*' jako rašelinný nízký strom nebo keř se zygomorfními šiškami a stočenými apofýzami.

b) Korektní názvy pro stromové rašelinné formy

BUSINSKÝ & KIRSCHNER (2007) sestrojili stručný přehled názvů pro úzce vymezenou skupinu stromových rašelinných forem borovic:

Pinus hartenbergiensis Liebich 1832

Pinus uliginosa Neumann in Wimmer 1838

Pinus mugus var. *uliginosa* (Neuman) K. Koch 1840

Pinus uncinata subsp. *uliginosa* (Neumann) Businský

Pinus hartenbergiensis Liebich

Na druhové úrovni je *Pinus hartenbergiensis* nejstarší název rašelinné stromové formy. Byla popsána LIEBICHEM (1832), který prováděl výzkumy v okolí Oloví (rašelinný les mezi oblastmi Studenec a Liboc), západní Čechy (uvedeno též v SKALICKÁ & SKALICKÝ 1987, BUSINSKÝ & KIRSCHNER 2007).

Pinus uncinata subsp. *uliginosa*

BUSINSKÝ & KIRSCHNER (2007) uvádějí, že *Pinus uncinata* je odlišný druh od *P. mugo*. Nicméně extrémní ekogeografické formy jsou, v rámci nashromážděných dat u monokormních stromových forem, propojeny četnými formami přechodnými. Je-li

rašelinná borovice pojmenována na úrovni poddruhu, má přednost název *uliginosa*. Pojmenování *P. rotundata* patří k přechodným druhům mezi poddruhy *uncinata* a *uliginosa*.

Název *Pinus uliginosa* byl publikován F. WIMMEREM (1838) ve spolupráci s Neumannem. Název tedy musí být citován jako *Neumann in Wimmer*.

Samotný neotyp populace je, navzdory jejich špatné zdravotní kondici, složen z dobře vyvinutých stromů, bez zřejmého vlivu hybridizace s *P. sylvestris*. Ve všech ohledech, je neotyp velmi dobrým zástupcem rašelinných stromových forem a název *P. uliginosa* má tedy bezpečnou taxonomickou interpretaci.

6.3. Využití analýz molekulárních markerů pro hodnocení agregátu *Pinus mugo*

Borovice jsou považovány za jeden z nejvíce geneticky variabilních rostlinných rodů. Morfologické analýzy se prozatím jeví jako méně vhodné pro vyhodnocování tak složitého agregátu jako je *Pinus mugo*. Vzhledem k obrovskému rozsahu různých názvů a jejich synonym, které používají různí autoři, je velmi obtížné jednotlivé druhy od sebe odlišit pouze na základě morfologie. Proto bylo v této práci přikročeno k možnosti využití technik molekulárních markerů.

LEWANDOWSKI et al. (2002) potvrdil vysokou úroveň diverzity, když analyzoval 15 alozymových lokusů v některých přírodních polských populacích blízké příbuzných druhů borovic (*P. uliginosa*, *P. sylvestris* a *P. mugo*). Tato studie se týkala 17 populací *P. mugo* z Bulharska. Genová diverzita, odhadovaná pomocí analýzy alozymů, byla podobná pro několik populací stejných druhů v centrální a západní Evropě, ale nižší než pro evropské borovice se souvislým rozsahem (SLAVOV & ZHELEV 2004). Nízká úroveň genetické diverzity popsaná v této studii může být částečně vysvětlena faktem, že byly odebrány vzorky uvnitř hlavní oblasti rozšíření těchto druhů.

Detekcí genetické divergence na základě RAPD markerů u borovic se zabývali např. LEE et al. (2002), kteří analyzovali vzorky borovice osinaté (*Pinus longaeva*) z White Mountains, California, USA. Průměrný počet alel na lokus byl 1.90, 84,3% lokusů bylo polymorfních a předpokládaná heterozygotnost byla 0.321. V práci MONTELEONE, FERRAZZINI & BELLETTI (2006) použili RAPD markery pro analýzu *P. mugo*. Hodnota

vnitropopulační variability byla mezi 15 studovanými populacemi z Alp vysoká, ačkoliv nenalezli žádné rozdíly mezi průměrnými hodnotami poddruhů. Statistickým zpracováním zjistili větší rozdíly uvnitř populací (76.9% a 77.5%) než mezi nimi. Taková genetická struktura je u jehličnanů s širokým rozšířením běžná. Kromě toho je mírná genetická variabilita požadována u druhů charakteristických vytrvalým růstem a cizosprášením, kde se semena a pyl rozšiřují větrem či pomocí zvířat, jako např. u *P. mugo* (KOSKI 1970, LEDIG 1998). Tok genů může být detekován pomocí frekvencí alel, vysoké migrace a nízkou úrovní populační diference (MUONA & HARJU 1989, BEAULIEU & SIMON 1994, GONCHARENKO et al. 1994). LEE et al. (2002) uvádí průměrný odhad genetické diference mezi některými populacemi borovic 0,27. MONTELEONE, FERRAZZINI & BELLETTI (2006) našli největší genetickou variabilitu na základě RAPD analýzy uvnitř populací, ale fenotypická struktura populací odpovídala nepatrně nižším hodnotám.

V této práci nebylo možné RAPD analýzu plně využít, protože DNA našich vzorků byla kontaminována houbami a proto by závěry byly velmi zkreslené.

Podobně jako u RAPD analýzy nebyla v disertační práci ani metoda AFLP podrobněji hodnocena z důvodu kontaminace cizorodou DNA. Všechny metody založené na amplifikaci s nespecifickými primery nemají v tomto případě odpovídající vypovídající charakter.

Nicméně byly publikovány práce na jiných druzích borovic, u nichž bylo možno tuto metodu využít. Např. CATO et al. (1999) využily AFLP k produkci vazbových genetických map u druhu *P. radiata*. Velký genom vyžadoval větší selekci v pre-amplifikačních a selektivních amplifikačních krocích v protokolu AFLP, ale vytvořili reprodukovatelný AFLP profil. Získali asi 41,3 AFLP fragmentů na gelu, z nichž 48,4% bylo polymorfních a zjistili tak, že úroveň polymorfismu je asi 3x vyšší než u RAPD markerů. Úspěšně tedy vytvořili protokol potřebný pro tvorbu vazbových genetických map u *P. radiata*. LERCETEAU & SZMID (1999) použili AFLP u *P. sylvestris* a srovnávali ji s *P. merkusii* a *P. gerardiana*. Došli k závěru, že *P. sylvestris* a *P. merkusii* jsou taxonomicky blíže k *Picea albies* než k *P. gerardiana*.

AFLP umožňuje rychle vytvořit velký počet markerů, tak může být analyzována větší část genomu. Z toho důvodu by mohly být výsledky více reprezentativní při pohledu

na genom jako na celek. Jejich dominance ale pravděpodobně úplně neodráží genetické vztahy.

Mikrosatelity jaderného genomu borovic byly jako první srovnávány s výsledky publikovanými u ostatních rostlinných druhů. U dvouděložných druhů byly popsány cDNA-SSR např. u *Vitis vinifera* (SCOTT et al. 2000) a u *Arabidopsis thaliana* (CARDLE et al. 2000; MORGANTE et al. 2002). Nejvíce se opakující sekvence – např. AG, AT, AAG, AGG a AGC našli CHAGNÉ et al. (2004) také v borovicích ve vysokých frekvencích, ale nejastěji se opakující motiv CCG u jednoděložných druhů (VARSHNEY et al. 2002) našli v borovicích poměrně vzácně (5.2 a 7.2% v *P. pinaster* a *P. taeda*). Tyto výsledky ukazují, že skladba SSR u nahosemenných rostlin je více podobná rostlinám dvouděložným než jednoděložným.

GONZÁLEZ-MARTÍNEZ et al. (2004) studovali cross-amplifikaci u eurasijských borovic a zjistili, že nejvýhodnější přenos jaderných mikrosatelitů je uvnitř jejich vlastní podseky. U *P. sylvestris* je to tedy podseky *Pinus*, ale některé mikrosatelity z *P. taeda* (podseky *Australes*) byly amplifikovány i v jiných podsekcích: *Pinus* (36–53%), *Pineae* (36%) a *Pinaster* (36–42%). Relativně dobrý poměr cross-amplifikace zjistili z *P. taeda* do *P. sylvestris* a *P. uncinata* (53%). ECHT et al. (1999) úspěšně přenesl 80% mikrosatelitů v rámci podrodu *Strobus*, ale pouze 29% mezi podrody *Strobus* a *Pinus*. KUTIL & WILLIAMS (2001) dosáhli dokonce 100% cross-amplifikace z *P. taeda* (podseky *Australes*) do blízce příbuzné *P. palustris* ze stejné podseky, ale jen 47% do *P. halepensis* (podseky *Pinaster*)

Mikrosatelity jsou asi z 40% polymorfní a vykazují přiměřenou úroveň heterozygotnosti (0,29-0,93). Jsou proto hodnotným zdrojem pro populační genetické studie, hlavně u druhů, pro které nejsou mikrosatelitní markery dostupné (*P. nigra*, *P. uncinata* a *P. canariensis*) nebo u druhů vzácných (*P. pinaster*), dále pak pro odlišení jednotlivých druhů mezi sebou a v neposlední řadě pro výzkum hybridizace mezi blízce příbuznými druhy.

V této práci bylo testováno celkem 12 mikrosatelitních markerů, pro komplexní zhodnocení byly vybrány 3 markery: SPAG7.14, PtTx3116, SPAC11.6. Tyto markery spolehlivě amplifikovaly fragmenty u všech zkoumaných druhů, resp. populací z různých oblastí celé Evropy, tedy *P. sylvestris*, *P. mugo*, *P. rotundata*, *P. uncinata* a v menším

počtu i *P. pseudopumilio* a *P. nigra*. Na základě výsledků po gelové elektroforéze a následně PCO byla zjištěna velmi vysoká vnitrodruhová i mezidruhová variabilita. Výsledky v podstatě odpovídají zjištěním MONTELEONE, FERRAZZINI & BELLETTI (2006), kteří rovněž v této předkládané práci zjistili velmi vysokou vnitropopulační variabilitu, která stírá rozdíly nejen mezi populacemi, ale i jednotlivými taxony.

Další metodickým postupem, který byl v této práci použit, bylo sekvenování částí genů pro ribozomální RNA. V této práci byly použity 4 náhodně vybrané populace pro sekvenování (1 – *P. uncinata*, 2 – *P. rotundata*, 3 – *P. rotundata*, 4 – *P. mugo*) a byly sekvenovány s obecnými (ITS1, ITS4) i se specifickými primery (ITS5, 26S25R). Analýzy s obecnými primery vedly většinou k amplifikaci sekvencí houbové DNA (houby jako endofyty, přirozeně se vyskytující v jehlicích či pupenech). Právě z důvodu zjištěné vysoké míry kontaminace houbami nebylo možné použít nespecifické markerovací techniky, jako je RAPD nebo AFLP. Při amplifikaci se specifickými primery byly amplifikovány úseky DNA z borovic. Pro *P. mugo* zatím nebyly popsány sekvence a nebyla popsána ani metoda sekvenování pro tento taxon, nelze ji tedy porovnávat s jinými autory.

ZÁVĚR:

- 1) Všechny použité metody molekulárních markerů se podařilo optimalizovat. Ačkoliv byly izolace prováděny vždy ze zdravého materiálu, byla nalezena houbová kontaminace a proto nebyly metody RAPD a AFLP v disertační práci dále hodnoceny. Tyto metody pracují s nespecifickými primery, tedy se směsí DNA, a výsledky by mohly být zkresleny. SSR metoda je založena na amplifikaci se specifickými primery a po její optimalizaci byly vybrány 3 primery (z 12), které spolehlivě amplifikovaly určité spektrum fragmentů: SPAG7.14, PtTx3116, SPAC11.6. Aby byla vyloučena amplifikace s cizorodou DNA, byly tyto primery testovány např. na DNA izolované z řepky, tabáku nebo hub. Pro sekvenování byly použity jak primery obecné (ITS1, ITS4), tak primery specifické pro borovice (ITS5, 26S25R). Téměř všechny vzorky amplifikované s obecnými primery byly po osekvenování vyhodnoceny jako houbová DNA, avšak amplifikace se specifickými primery potvrdila DNA borovic. Po vyhodnocení bylo možno jednotlivé druhy/populace od sebe odlišit, což vede k závěru, že by metoda sekvenování mohla být využita ve větší míře i v budoucnu. Protože je tato metoda finančně dosti nákladná a byla zjištěna velká vnitropopulační variabilita, byly použity pouze 4 populace (z 27) pro její optimalizaci.
- 2) Při posouzení míry variability byl postižen celoevropský areál, resp. reprezentativní vzorek z celoevropského areálu. Vnitropopulační variabilita je velmi vysoká, dokonce větší než mezi taxony. Populace jsou rovnoměrně rozptýlené v rámci evropského areálu a podle výsledků PCO jsou i taxony rovnoměrně rozptýleny v rámci celého souboru. Nelze tedy spolehlivě odlišit co připadá jednotlivým taxonům a co jednotlivým populacím, což ukazuje na obrovskou vnitřní variabilitu druhu.
- 3) Výzkumem morfologických znaků se u nás zabývají hlavně ve Výzkumném ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví v Průhonících. Prozatím není morfologie jednoznačná a nejde tedy posoudit, zda odpovídají výsledky molekulárních analýz výsledkům analýz morfologických.

- 4) Na základě fingerprintových technik nelze ujasnit taxonomické a terminologické problémy, protože se jednotlivé taxony překrývají. Překryv markerů fingerprintů je téměř 100%. Šance by mohla být v sekvenování, kde se projevuje, že skupiny jsou od sebe odlišné a je otázkou, zda jsou od sebe odlišné i populace či taxony.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alvarez I., Wendel J. F. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29:417–434.
- Arnold M. L. (1997): *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press, New York, Oxford 3–10.
- Arnold M. L., Bilger M. R., Burke J. R., Hempel A. L., Williams J. H. (1999): Natural hybridisation: how low can you go and still be important? *Ecology* 80(2):371–381.
- Ascherson P., Graebner P. (1897): *Synopsis der mitteleuropäischen Flora*, vol. 1. Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- Baczkiewicz A., Prus-Głowacki W. (1997): Variability of *Pinus mugo* Turra clones from Ostry Wierch peat bog. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 66(1):79–82.
- Barbéro M., Loisel R., Quézel P., Richardson D. M., Romane F. (1998): Pines of the Mediterranean basin. In: Richardson D. M. (ed) *Ecology and biogeography of Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge 153–170.
- Beaulieu J., Simon J. P. (1994): Genetic structure and variability in *Pinus strobus* in Quebec. *Canadian Journal of Forest Research* 24:1726–1733.
- Bobowicz M. A. (1990): The hybrids of *Pinus mugo* Turra \times *Pinus sylvestris* L. from Bór na Czerwonem' reservation in the Nowy Targ Valley. University of Adam Mickiewicz, Poznań, Series Biologia 40:1–284.
- Bobowicz M. A., Krzakowa M. (1986): Anatomical differences between *Pinus mugo* Turra populations from the Tatra Mts. expressed in needle traits and in needle and cone traits together. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 55:275–290.
- Bobowicz M. A., Krzakowa M. (1988): Variability of *Pinus mugo* Turra individuals from Hala Gąsienicowa in Tatra Mts expressed in needle traits with reference to cone characters. *Bulletin de la Société des amis des sciences et des lettres Poznań, Sér. D, Science Biology* 26: 87–98.
- Bobowicz M. A., Stephan B. R., Prus-Głowacki W. (2000): Genetic variation of F1 hybrids from controlled crosses between *Pinus montana* var. *rostrata* and *Pinus sylvestris* in anatomical needle traits. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 69: 207–214.
- Bobowicz M. A., Szweykowski J., Koźlicka M. (1983): The variability of morphological traits in the population of *Pinus mugo* Turra on Borowina Peat Bog in the Izerskie Mts. (SW Poland). *Bulletin de la Société des amis des sciences et des lettres Poznań, Sér. D, Science Biology* 22: 83–105.
- Bono G., Barbero M., Poirion L. (1967): Groupements de “*Pinus mugo*” Turra (“*Pinus mughus* Scop.”) dans les Alpes maritimes et ligures. *Allionia* 13:55–80.
- Boratyńska K., Bobowicz M. A. (2001): *Pinus uncinata* Ramond taxonomy based on needle characters. *Plant Systematics and Evolution* 227(3-4):183–194.

- Boratyńska K., Boratyński A., Lewandowski A. (2003): Morphology of *Pinus uliginosa* (Pinaceae) needles from populations exposed to and isolated from the direct influence of *Pinus sylvestris*. Botanical Journal of the Linnean Society 142:83-91.
- Boratyńska K., Marcysiak K., Boratyński A. (2005): *Pinus mugo* (Pinaceae) in the Abruzzi Mountains: high morphological variation in isolated populations. Botanical Journal of the Linnean Society 147:309-316.
- Boratyńska K., Muchewicz E., Drojma M. (2004): *Pinus mugo* Turra geographic differentiation based on needle characters. Dendrobiology 51: 9-17.
- Boratyński A. (1994): Protected and deserving protection trees and shrubs from the Polish part of Sudety Mts. with its prealps. 7. *Pinus mugo* Turra and *Pinus uliginosa* Neumann. [Chronione i godne ochrony drzewa i krzewy polskiej części Sudetów, Pogórza i Przedgórze Sudeckiego. 7. *Pinus mugo* Turra i *Pinus uliginosa* Neumann.] Arboretum Kórnickie 39:63–85.
- Boratyński A., Boratyńska K., Lewandowski A., Golab Z., Kiciński P. (2003): Evidence of the possibility of natural reciprocal crosses between *Pinus sylvestris* and *P. uliginosa* based on the phenology of reproductive organs. Flora 198:377-388.
- Braaten D. C., Thimas J. R., Little R. D., Dickson K. R., Goldberg I., Schlessing D. (1988): Locations and contexts or sequences that hybridize to poly(dG-dT) (dC-dA) in mammalian ribosomal DNAs and two X-linked genes. Nucleic Acid Research 16:865-881.
- Brandham P. E., Doherty M. J. (1998): Genome size variation in the *Aloaceae*, an angiosperm family displaying karyotypic orthoselection. Annals of Botany 82:67–73.
- Brown G. R., Kadel III E. E., Bassoni D. A., Kiehne K. L., Temesgen B., van Buijtenen J. P., Sewell M. M., Marshall K. A., Neale D. B. (2001): Anchored reference loci in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) for integrating pine genomics. Genetics 159:799-809.
- Brummitt R. K. (2001): Report of the Committee for Spermatophyta: 51. [Proposals to conserve or reject, No. 1416] Taxon 50: 560.
- Bucci G., Anzidei M., Madaghiele A., Vendramin G. G. (1998): Detection of haplotypic variation and natural hybridisation in halepensis-complex pine species using chloroplast simple sequence repeat (SSR) markers. Molecular Ecology 7:1633–1643.
- Buerkle C. A., Morris R. J., Asmussen M. A., Rieseberg L. H. (2000): The likelihood of homoploid hybrid speciation. Heredity 84:44–451.
- Businský R. (1989): Beitrag zur Taxonomie und Nomenklatur von *Pinus heldreichii* Christ und *P. leucodermis* Antoine sowie des Kultivars *Smidtii*. Mitteilungen der Deutschen dendrologischen Gesellschaft 79:91–106.
- Businský R. (1998): *Pinus mugo* agg. in former Czechoslovakia – taxonomy, distribution, hybrid populations and endangering. Zprávy Čes. Bot. Společ., Praha 33:29-52.
- Businský R. (1999): Taxonomická studie agregátu *Pinus mugo* a jeho hybridních populací. Acta Průhoniceana 68:123-144.
- Businský R. (2002): *Pinaceae* Lindl. – borovicovitě. In: Kubát K. et al. (eds.), Klíč ke květeně České republiky. Praha, Academia 94–98.

- Businský R., Kirschner J. (2007): The *Pinus mugo* Complex - Principles of Taxonomic Evaluation and Nomenclatural Notes. Preslia, Praha 79.
- Businský R., Weger J. (1995): Genetická analýza jedinců přirozené hybridní populace borovic (*Pinus sylvestris* × *Pinus rotundata*) na rašeliništi Podkovák metodou elektroforézy izoenzymů – modelová studie. Acta Průhoniana 62:47–52.
- Camarero J., Gutiérrez E., Fortin M. J., (2000): Spatial pattern of subalpine forest-alpine grassland ecotones in the Spanish Central Pyrenees. Forest Ecology and Management 134(1/3):1-16.
- Cardle L., Ramsay L., Milbourne D., Macaulay M., Marshall D., Waugh R. (2000): Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants. Genetics 156:847–854.
- Conkle M. T. (1981): Isozyme variation and linkage in six conifer species. Isozymes in North American Forest Trees and Forest Insects. Berkeley California 11–17.
- Cordeiro G. M., Casu R., McIntyre C. L., Manners J. M., Henry R. J. (2001): Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross-transferable to erianthus and sorghum. Plant Science 160:1115–1123.
- Critchfield W. B., Little E. L. (1966): Geographic distribution of the *Pinus* of the world. Miscellaneous Publication. US Department for Agriculture 991, Washington.
- Critchfield W. B., Little E. L. (1971): Geographic distribution of the pines of the world. US Department of Agriculture Forest Service 991, Washington.
- Čamek V., Kormuták A. (2007): Niektoré ukazovatele plodivosti kosodreviny *Pinus mugo* Turra vo vrátnej doline posudzované vo vzťahu k mezidruhovým hybridom *P. mugo* Turra x *P. sylvestris* L. Sborník 8. vedecká konferencia doktovandov a mladých vedeckých pracovníkov 18.–19. 4. FPV UKF Nitra 30-35.
- Čurn V., Sáková L. (1996): Speciální genetika rostlin. JU ZF - České Budějovice.
- Čurn V., Sáková L. (1998): Molekulární biologie. Skripta, České Budějovice, ZF JU, 148 s.
- Debezac E. F. (1991): Manuel des conifères. 2^e édition. Nancy, E. N. G. R. E. F.: 172 s.
- Devey M. E., Sewell M. M., Uren T. L., Neale D. B. (1999): Comparative mapping in loblolly and radiata pine using RFLP and microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics 99:656–662.
- Devey M. E., Sewell M. M., Uren T. L., Neale D. B. (1999): Comparative mapping in loblolly and radiata pine using RFLP and microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics 99:656–662.
- Dörr E. W., Lippert W. (2001): Flora des Allgäus und seiner Umgebung 1 810 s.
- Dostál J. (1989): Nová květena ČSSR 1. Academia Praha 710 s.
- Doudrick R. L., Heslop-Harrison J. S., Nelson C. D., Schmidt T., Nance W. L., Schwarzacher T. (1995): Karyotype of slash pine (*Pinus elliotii* var. *elliotii*) using patterns of fluorescence in situ hybridization and fluorochrome banding. Journal of Heredity 86:289–296.

- Edwards K. J. (1998): Randomly amplified polymorphic DNAs (RAPDs), In: Karp A., Isaac P. G., Ingram D. S. (eds). *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, Champan and Hall, Cambridge 1:171-175.
- Echt C. S., Vendramin G. G., Nelson C. D., Marquardt P. (1999): Microsatellite DNA as shared genetic markers among conifer species. *Canadian Journal For Research* 29:365–371.
- Elsik C. G., Williams C. G. (2000): Retroelements contribute to the excess low-copy number DNA in pine. *Molecular Genetics and Genomics* 264:47–55.
- Etisham-UI-Haq M., Allnutt T. R., Smith-Ramirez C., Gardner M. F., Armesto J. J., Newton A. C. (2001): Patterns of genetic variation in *in situ* and *ex situ* populations of the threatened Chilean vine, *Berberidopsis corallina*, detected Using RAPD markers. *Annals of Botany* 87:813–821.
- Eujayl I., Sledge M. K., Wang L., May G. D., Chekhovskiy K., Zwonitzer J. C., Mian M. A. R. (2003): *Medicago trunculata* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 108:414–422.
- Eujayl I., Sorrells M. E., Baum M., Wolters P., Powell W. (2002): Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 104:399–407.
- Fallour D, Fady B, Lefevre F (1997): Study on isozyme variation in *Pinus pinea* L.: Evidence for low polymorphism. *Silvae Genetica* 46:201–207.
- Farjon A. (1984): *Pines: drawings and descriptions of the genus Pinus*. E. J. Brill / Dr. W. Backhuys, Leiden, 220 s.
- Fečková M. (2005): Polymorfizmus chloroplastovej DNA pri vybraných druhoch rodu *Pinus*. Dizertačná práca, Nitra, Ústav genetiky a biotechnológií rastlín, 118 s.
- Felsenstein J. (2004): *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 664 s., ISBN 0-87893-177-5.
- Filppula S., Szmidt A. E., Savolainen O. (1992): Genetic comparison between *Pinus sylvestris* and *Pinus mugo* using isozymes and chloroplast DNA. *Nordic Journal of Botany* 12:381–386.
- Freléchoux F., Buttler A., Schweingruber F. H., Gobat J. M. (2000): Stand structure, invasion, and growth dynamics of bog pine (*Pinus uncinata* var. *rotundata*) in relation to peat cutting and drainage in the Jura mountains, Switzerland. *Canadian Journal of Forest Research*, 30, 7:1114–1126.
- Futák J. (1966): Ophioglossaceae Kaulfuss. In Futák J., Jasičová M., Schidlay E. (eds): *Flóra Slovenska II*. Bratislava, Vydavateľstvo SAV 89–101.
- Gao L., Tang J., Li H., Jia J. (2003): Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches. *Molecular Breeding* 12:245–261.
- Gaussen H. (1960): *Les gymnospermes actuelles et fossiles*. Fasc. VI, Ch. XI. Généralités, Genre *Pinus*. – *Trav Lab. Forest Toulouse* 2:1-272.

- Gaussen H., Heywood V. H., Chater A. O. (1993): *Pinus* L. In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burgess N. A., Valentine D. H., Walter S. M., Webb D. A. (eds.). *Flora Europea*, Cambridge University Press UK 40–44.
- Germano J., Klein A. S. (1999): Species-specific nuclear and chloroplast single nucleotide polymorphisms to distinguish *Picea glauca*, *P. mariana* and *P. rubens*. *Theoretical and Applied Genetics* 99:37–49.
- Golde A. (2000): Die Moorpopulation der Berg-Kiefer (*Pinus mugo* agg.) in Sachsen. *Mitteilungen der Deutschen dendrologischen Gesellschaft* 85:23-38.
- Goncharenko G. G., Silin A. E., Padutov V. E. (1994): Intra- and interspecific genetic differentiation in closely related pines from *Pinus* subsection *Sylvestres* (*Pinaceae*) in former Soviet Union. *Plant Systematics and Evolution* 194:39–45.
- Goncharenko G. G., Zadička I. V., Birgelis J. J. (1995): Genetic structure, diversity and differentiation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) in natural populations of Latvia. *Forest Ecology and Management* 72:31–38.
- González-Martínez S. C., Robledo-Arnuncio J. J., Collada C., Díaz A., Williams C. G., Alía R., Cervera M. T. (2004): Cross-amplification and sequence variation of microsatellite loci in Eurasian hard pines. *Theoretical and Applied Genetics* 109:103–111.
- Graman J. et al., Černý et al., Houba M., Beran J. (1996): *Semenářství – JU ZF, České Budějovice*.
- Graßmann J., Hippeli S., Spitzenberger R., Elstner E. F. (2005): The monoterpene terpinolene from the oil of *Pinus mugo* L. in concert with α -tocopherol and β -carotene effectively prevents oxidation of LDL. *Phytomedicine* 12:416–423.
- Guinier P., Pourtet J. (1951): Les variations du *Pinus montana* Miller du Tyrol au Briançonnais. *Bulletin de la Société Botanique France* 98:123–127.
- Gupta P. K., Rustgi S., Sharma S., Singh R., Kumar N., Balyan H. S. (2003): Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics* 270:315–323.
- Gustafsson L. (2000): En skogshistorisk jämförelse mellan två närbelägna landskap med olika mångfald i östra Småland. Examensarbete nr 15. Institutionen för sydsvensk skogsvetenskap. SLU Almaro, Sweden (in Swedish with English abstract).
- Hall B. G. (2001): *Phylogenetic trees made easy: A how-to manual*. Sunderland (Massachusetts). Sinauer Associates 221 s.
- Hall S. E., Dvorak W. S., Johnston J. S., Price H. J., Williams C. G. (2000): Flow cytometric analyses of DNA content in tropical and temperate New World pines. *Annals of Botany* 86:1081–1086.
- Hamerník J., Musil I. (2007): The *Pinus mugo* complex – its structuring and general overview of the used nomenclature. *Journal of Forest Science* 53, (6):253—266.
- Hecker U. (1991): Zur Biologie der Kiefernzapfen. *Mitteilungen der Deutschen dendrologischen Gesellschaft* 80:73-86.

- Hejný S., Slavík B. (eds.) (1997): Květena České (socialistické) republiky 1. 2. Praha, Academia 557 s.
- Hipkins V. D., Krutovskii K. V., Strauss S. H. (1994): Organelle genomes in conifers: structure, evolution, and diversity. *Forest Genetics* 4:179–189.
- Hippeli S., Graßmann J., Vollmann R., Elstner E. F. (2004): *Pinus mugo* oil: a possible mechanism of antiinflammatory action. *Pharmazeutische Zeitung* 149:35–36.
- Hollingsworth P. M., Bateman R. M., Gornall R. J. (1999): *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Taylor and Francis, London.
- Holubičková B. (1965): A study of the *Pinus mugo* complex (Variability and diagnostic value of characters in some Bohemian populations). *Preslia* 37:276–288.
- Hurme P., Repo T., Savolainen O., Pääkkönen T. (1997): Climatic adaptation of bud set and frost hardiness in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Canadian Journal for Research* 27:716–723.
- Chagné D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M. T., Vendramin G. G., Garcia V., Frigerio J.-M., Echt C., Richardson T., Plomion C. (2004): Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics* 109:1204–1214.
- Cheddadi R., Vendramin G. G., Litt T., Francois L., Kageyama M., Lorentz S., Laurent J. M., de Beaulieu J. L., Sadori L., Jost A., Lunt D. (2006): Imprints of glacial refugia in the modern genetic diversity of *Pinus sylvestris*. *Global Ecology and Biogeography Letters* 15:271–282.
- Chen J. W., Tauer C. G., Bai G. H., Huang Y. H., Payton M. E., Holley A. G. (2004): Bidirectional introgression between *Pinus taeda* and *Pinus echinata*: evidence from morphological and molecular data. *Canadian Journal for Research* 34(12):2508–2516.
- Chloupek O. (1995): *Genetická diverzita, šlechtění a semenářství*. 1. vyd. Praha: Academia. 186 s. ISBN 80-206-0434-0.
- Cho Y. G., Ishii T., Temnykh S., Chen X., Lipovich L., McCough S. R., Park W. D., Ayer N., Cartinhour S. (2000): Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa*). *Theoretical and Applied Genetics* 100:713–722.
- Christensen K. I. (1987a): A morphometric study of the *Pinus mugo* Turra complex and its natural hybridization with *P. sylvestris* L. (*Pinaceae*). *Feddes Repertorium* 98:11–12, 623–635.
- Christensen K. I. (1987b): Taxonomic revision of the *Pinus mugo* complex and *P. × rhaetica* (*P. mugo* × *sylvestris*) (*Pinaceae*). *Nordic Journal of Botany* 7(4):383–408.
- Christensen K. I. (1987c): Atypical cone and leaf character states in *Pinus mugo* Turra, *P. sylvestris* L. and *P. × rhaetica* Brügger (*Pinaceae*). *Gleditschia* 15:1–5.
- Christensen K. I., Dar G. H. (1997): A morphometric analysis of spontaneous and artificial hybrids of *Pinus mugo* × *P. sylvestris* (*Pinaceae*). *Nordic Journal of Botany* 17:77–86.
- Jacamon M. (1992): *Guide de dendrologie*. Third edition, École nationale du génie rural, des eaux et des forêts, Nancy 349 s.

- Jäger E. J., Werner K. (2002): Exkursionsflora von Deutschland [Rothmaler W., Begr., 9. Ed.] 4, Gefäßpflanzen: Kritischer Band. Spektrum, Akademie Verl., Heidelberg & Berlin.
- Joyner K. L., Wang X. S., Johnston J. S., Price H. J., Williams C. G. (2001): DNA content for Asian pines parallels New World relatives. *Canadian Journal of Botany* 79:179–191.
- Kamm A., Doudrick R. L., Heslop-Harrison J. S., Schmidt T. (1996): The genomic and physical organization of Ty1- copia-like sequences as component of large genomes in *Pinus elliottii* var. *elliottii* and other gymnosperms. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93:2708–2713.
- Kantety R. V., LaRota M., Matthews D. E., Sorrells M. E. (2002): Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum wheat. *Plant Molecular Biology* 48:501–510.
- Keyl H. G. (1965): A demonstrable local and geometric increase in the chromosomal DNA of *Chironomus*. *Experientia* 21:191–193.
- Khoshoo T. N. (1959): Polyploidy in gymnosperms. *Evolution* 13:24–29.
- Kinlaw C. S., Neale D. B. (1997): Complex gene families in pine genomes. *Trends in Plant Science* 2:356–359.
- Klaus W. (1989): Mediterranean pines and their history. *Plant Systematics and Evolution* 162:133–163.
- Klika J., Novák F. A., Šiman K., Kavka B. (1953): Jehličnaté. ČSAV, Praha. (Novák F. A.: *Pinus* 129–258.).
- Komulainen P., Brown G. R., Mikkonen M., Karhu A., García-Gil M. R., O'Malley D., Lee B., Neale D. B., Savolainen O. (2003): Comparing EST-based genetic maps between *Pinus sylvestris* and *Pinus taeda*. *Theoretical and Applied Genetics* 107:667–678.
- Kormuťák A. (1974): Niektoré aspekty inkompatibility druhov rodu *Pinus* a *Abies*. Kandidátská dizertačná práca, Arboretum Mlyňany, Ústav dendrobiológie SAV 159 s.
- Kormuťák A. (1990): Hybridological relationships between some pines of the subgenus *Diploxylon*. *Biológia* 45:907–915.
- Kormuťák A., Lanáková M. (1988): Biochemistry of reproductive organs and hybridological relationships of selected pine species (*Pinus* sp.). *Acta Dendrobiologica* 1:7–103.
- Kormuťák A., Ostrolucká M., Vooková B., Preťová A., Fečková M. (2005): Artificial Hybridization of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus mugo* Turra. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47/1:129–134.
- Koski V. (1970): A study of pollen dispersal as a mechanism of gene flow in conifers. *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae* 70. 78 s.
- Kossack D. S., Kinlaw C. S. (1999): IFG, a gypsy-like retrotransposon in *Pinus* (*Pinaceae*), has an extensive history in pines. *Plant Molecular Biology* 39:417–426.

- Kriebel H. B. (1985): DNA sequence components of the *Pinus strobus* nuclear genome. Canadian Journal for Research 15:1–4.
- Krüssmann G. (1983): Handbuch der Nadelgehölze. 2. Ed. – Paul Parey, Berlin, Hamburg 396 s.
- Krzakowa M., Naganowska B., Bobowicz M. A. (1984): Investigations on taxonomic status of *Pinus uliginosa* Naumann. Bulletin de la Société des amis des sciences et des lettres Poznań, Série. D, Science Biology 24:87–96.
- Kubát K. (eds.) (2002): Klíč ke květeně České republiky. Praha, Academia 928 s.
- Kutil B., Williams C. G. (2001): Triplet-repeat microsatellites shared among hard and soft pines. Journal of Heredity 92:327–332.
- Lauranson-Broyer J., Krzahowa M., Lebreton P. (1997): Reconnaissance chimiosystématique et biométrique du Pin de tourbière *Pinus x uliginosa* (Neumann). C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie 320:557–565.
- Ledig F. T. (1998): Genetic variation in *Pinus*. In: Richardson D. M. (eds.). Ecology and biogeography of *Pinus*. Cambridge University Press, Cambridge, UK 251–280.
- Lee S. W., Ledig F. T., Johnson D. R. (2002): Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus longaeva* (*Pinaceae*) of the White Mountains, California. American Journal of Botany 89:566–577.
- Lewandowski A., Boratyński V., Mejnartowicz L. (2000): Allozyme investigations on the genetic differentiation between closely related pines – *Pinus sylvestris*, *P. mugo*, *P. uncinata*, and *P. uliginosa* (*Pinaceae*). Plant Systematics and Evolution 221: 15–24.
- Lewandowski A., Samočko J., Boratyńska K., Boratyński A. (2002): Genetic differences between two Polish populations of *Pinus uliginosa*, compared to *P. sylvestris* and *P. mugo*. Dendrobiology 48:51–57.
- Lewontin R. C., Birch L. C. (1966): Hybridisation as a source of variation for adaptation to new environment. Evolution 20:315–336.
- Liebich C. (1832): Die *Pinus hartenbergiensis*. Allgemeine Forst und Jagdzeitung Journal, Praha 2:42–45.
- Link J. H. (1830): Über die Familie *Pinus* und die Europäischen Arten derselben. Auserlesene Abhandlungen, welche an die Königl. Akademie der Wissenschaften Berlin 1827:157–191.
- Litt M., Luty J. A. (1989): A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. American Journal of Human Genetics 44:397–401.
- Lynch M., Milligan B.G. (1994): Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Molecular Ecology 3:91–99.
- Maier J. (1993): Zapfenuntersuchungen der *Pinus mugo* Turra. Mitteilungen der Deutschen dendrologischen Gesellschaft 81:5–12.

- Mánek J., Ešnerová J. (2004): Isoenzymové rozlišení borovic *Pinus mugo* Turra a *Pinus × pseudopumilio* (Willk.) Beck. Aktuality šumavského výzkumu II:151-157.
- Marcysiak K., Boratynski A. (2007): Contribution on the taxonomy of *Pinus uncinata* (*Pinaceae*) based on cone characters. *Plant Systematics and Evolution* 264:57–73.
- Mariette S., Chagné D., Decroocq S., Vendramin G. G., Lalanne C., Madur D., Plomion C. (2001): Microsatellite markers for *Pinus pinaster* Ait. *Annals of Forest Science* 58:203–206.
- Matthes M. C., Daly A., Edwards K. J. (1998): Amplified fragment length polymorphism (AFLP), In: Karp A., Isaac P. G., Ingram D. S. (eds). *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, Champan and Hall, Cambridge 1(99):183-190.
- Maxam A. M., Gilbert W. (1977): *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74:560-564.
- McClintock B. (1984): The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226:792–801.
- McWilliam J. R. (1959): Interspecific incompatibility in *Pinus*. *American Journal of Botany* 46:425–433.
- Meksem K., Njiti V. N., Banz W. J., Iqbal M. J., Kassem MyM., Hyten D. L., Yuang J., Winters T. A., Lightfoot D. A. (2001): Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1:38–44.
- Mikola J. (1982): Bud-set phenology as an indicator of climatic adaptation of Scots pine in Finland. *Silva Fennica* 16:178-184.
- Minghetti P. (1997): Contributo alla conoscenza di *Pinus mugo* agg. in Trentino (Italia): un approccio biometrico. *Webbia* 52(1):67-85.
- Minghetti P., Nardi E. (1999): Lectotypification of *Pinus mugo* Turra (*Pinaceae*). *Taxon* 48:465-469.
- Mirov N. T. (1967): *The Genus Pinus*. The Ronald Press Comp. New York. 610 s.
- Monteleone I., Ferrazzini D., Belletti P. (2006): Effectiveness of neutral RAPD markers to detect genetic divergence between the subspecies *uncinata* and *mugo* of *Pinus mugo* Turra. *Silva Fennica* 40(3):391–406.
- Morgante M., Hanafey M., Powell W. (2002): Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* 30:194–200.
- Morgante M., Olivieri A. M. (1993): PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3:175–182.
- Mount D. W. (2004): *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*, 2nd ed., ISBN 0-87969-712-1.
- Muona O., Harju A. M. (1989): Effective populations size, genetic variability and mating system in natural stands and seed orchards of *Pinus sylvestris*. *Silvae Genetica* 38:221–228.

- Musil I. (1977): Variabilita znaků jehlic u komplexu *Pinus mugo* a u *Pinus sylvestris*. *Preslia* 49:23–32.
- Musil I. (2003): Lesnická dendrologie 1. Jehličnaté dřeviny, přehled nahosemenných (i výtrusných) dřevin. Česká zemědělská univerzita v Praze 3:45–79.
- Neet-Sarqueda C. (1994): Genetic Differentiation of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus mugo* aggr. populations in Switzerland. *Silvae Genetica* 43(4):207–215.
- Neet-Sarqueda C., Plumettaz Clor A. C., Becholey I. (1988): Mise en evidence de l'hybridation introgressive entre *Pinus sylvestris* L. et *Pinus uncinata* DC. en Valais (Suisse) par deux methods multivariees. *Botanica Helvetica* 98:161–169.
- Nickrent D. L., Starr E. M. (1994): High rates of nucleotide substitution in nuclear small-subunit (18S) rDNA from holoparasitic flowering plants. *Journal of Molecular Evolution* 39:62–70.
- Odrzykoski I. J. (2002):. Badania nad zmiennością genetyczną kosodrzewiny (*Pinus mugo*) z wykorzystaniem markerów biochemicznych i molekularnych. [Research on genetic variability of dwarf mountain pine (*Pinus mugo*) with the use of biochemical and molecular markers.]. Wyd Nauk UAM, Poznań (in Polish, with English summary).
- Ondřej M., Drobník J. (2002): Transgenozie rostlin. Academia, 316 s., ISBN: 80-200-0958-2.
- Oswald K. (2005): *Pinaceae*. – In: Fischer, M. A. [ed.], *Exkursionflora von Österreich, Liechtenstein und Südtirol*, Linz (2)251–253.
- Polatschek A. (1997): *Flora von Nordtirol, Osttirol und Vorarlberg*. Athesia Tyrolia Druck, Innsbruck.
- Politov D. V., Belokon M. M., Maluchenko O. P. (1999): Genetic evidence of natural hybridization between Siberian stone pine, *Pinus sibirica* Du Tour, and dwarf Siberian pine, *P. pumila* (Pall.) Regel. *Forest Genetics* 6:41–48.
- Powell W., Morgante M., McDevitt R., Vendramin G. G., Rafalski J. A. (1995): Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 92:7759–7763.
- Prager E. M., Fowler D. P., Wilson A. C. (1976): Rates of evolution of conifers. *Evolution* 30:637–649
- Pravdin L. F. (1964): *Borovice lesní. Variabilita, vnitrodruhová taxonomie a šlechtění*. Nauka, Moskva.
- Probst A. (1983): Variation intraspecificque et introgression entre *Pinus uncinata* Ram. et *Pinus sylvestris* L. en Foret d'Osseja (Pyrénées – Orientales). Université Paul Sabatier de Toulouse en vue de l'obtention du doctorat de troisième cycle. 223 s.
- Prus-Głowacki W., Bujas E., Ratynska H. (1998): Taxonomic position of *Pinus uliginosa* Neumann as related to other taxa of *Pinus mugo* complex. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 67:269–274.

- Prus-Głowacki W., Stephan B. R. (1998): Immunochemical and isoenzymatic characterization of hybrids from controlled crosses between *Pinus montana* var. *rostrata* and *Pinus sylvestris*. *Forest Genetics* 5:155–163.
- Raclavský V. (1998): Úvod do základních metod molekulární genetiky. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Rajora P., Rahman H. (2003): Microsatellite DNA and RAPD fingerprinting, identification and genetic relationships of hybrid poplar (*Populus × canadensis*) cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 106:470–477.
- Righter F. I., Duffield J. W. (1951): A summary of interspecific crosses in the genus *Pinus* made at the Institute of Forest Genetics. *Journal of Heredity* 42:75–80.
- Roman B., Alfaro C., Torres A. M., Moreno M. T., Satovic Z., Pujadas A., Rubiales D. (2003): Genetic relationships among *Orobanche* species as revealed by RAPD analysis. *Annals of Botany* 91:637–642.
- Rudin D., Ekberg I. (1978): Linkage studies in *Pinus sylvestris* L. using macrogametophyte allozymes. *Silvae Genetica* 27:1–12
- Řehout V., Neubauerová V., Čítek J., Košvanec K.(2000): Molekulárně genetické markery skotu a jejich využití pro studium genetické diverzity populací a MAS. *Acta Fytotechnica et Zootechnica - abstrakty z mezinárodní konferencie "XIX. Dni genetiky" 3, s. 7.*
- Saiki T., Kobayashi Y., Kawagoe K., Beppu T. (1985): *Dictyoglomus thermophilum* gen. nov., sp. nov., a chemoorganotrophic, anaerobic, thermophilic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* (35):253-259.
- Saiky R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arenheim N. (1985): Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.
- Salemi M., Vandamme A. M. (2003): *The phylogenetic handbook. A practical approach to DNA and protein phylogeny.* Cambridge University Press.
- Sandoz H. (1980): Le Pin de montagne de Miller (*Pinus montana* Miller) et le Pin mugo de Turra (*Pinus mugo* Turra): mythes ou réalités? *Revue Forestiere France* 32:453–456.
- Sandoz H. (1982): Le complexe des Pins dit “de montagne”. Analyse historique des principaux binomes utilisés: *Pinus montana* Miller, *Pinus mugo* Turra, *Pinus mughus* Scopoli, *Pinus pumilio* Haenke et *Pinus uncinata* Ramond. *Revue générale de Botanique* 89:121–129.
- Sandoz H. (1983): Considérations sur la genese du Pin mugho (*Pinus mughus* Scopoli), son berceau probable, sa repartition ancienne et actuelle. *Revue générale de Botanique* 90:131–151.
- Sandoz, H. (1987): *Recerches taxonomiques, biogéographiques et phytoécologiques sur les principaux conifères subalpins des Alpes: Mélèze d'Europe, Pin cembro, Pin à crochets et Pin mugo.* Thèse Doctoral, University Marseille, France.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 74:5463-5467.

- Sarvas R. (1962): Investigation on the flowering and seed crop of *Pinus sylvestris*. *Communicationes Instituti Forestalis Fenniae* 53:1-198.
- Sax K. (1960): Meiosis in interspecific Pine hybrids. *Forest Science* 6(2):135-138.
- Sax K., Sax H. J. (1933): Chromosome number and morphology in the conifers. *Journal of the Arnold Arboretum* 14:356-375.
- Saylor L. C. (1961): A karyotypic analysis of selected species of *Pinus*. *Silvae Genetica* 10:77-84.
- Saylor L. C., Smith B. W. (1966): Meiotic irregularity in species and interspecific hybrids of *Pinus*. *American Journal of Botany* 53:453-468.
- Scott K. D., Egger P., Seaton G., Rossetto M., Ablett E. M., Lee L. S., Henry R. J. (2000): Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 100:723-726.
- Scotti I., Magni F., Fink R., Powell W., Binelli G., Hedley P. E. (2000): Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome* 43:41-46.
- Seneta W. (1981): *Drzewa i krzewy iglaste [Coniferous trees and shrubs]*. Warszawa 560 s.
- Shepherd M., Cross M., Maguire T. L., Dieters M. J., Williams C. G., Henry R. J. (2002): Transpecific microsatellites for hard pines. *Theoretical and Applied Genetics* 104:819-827.
- Schmid J. (2000): DNA- und Isoenzym- Polymorfismem in populationen des Berg-Kiefern-Komplex, *Pinus mugo* s.l. Ms., PhD. thesis, Der Fakultät für Biologie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg 155 s.
- Schubert R., Vent W. (1994): *Exkursionflora von Deutschland [Rothmaler, W., Begr.] 4, Gefäßpflanzen: Kritischer Band*. Gustav Fischer, Jena & Stuttgart 811 s.
- Siedlewska A., Prus-Głowacki W. (1995): Genetic structure and taxonomic position of *Pinus uliginosa* Neumann population from Wielkie Torfowisko Batorowskie in Stolowe Mts. (locus classicus). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 64:51-58.
- Skalická A., Skalický V. (1987): Taxonomic and nomenclatoric notes on the treatment of Coniferae for the Flora of Czech socialist republic. *Novitates Botanicae Universitatis Carolinae, Praha* 3:53-62.
- Skalická A., Skalický V. (1997): *Pinus* L. – borovice. In: Hejný S., Slavík B. (eds.): *Květena České republiky*. 2. vyd. Praha, Academia 289-308.
- Skalický V. (1988): *Pinus sylvestris*, *P. mugo*, *P. rotundata* and its hybrids. – In: Hejný S., Slavík B. [eds.], *Květena České socialistické republiky [Flora of the Czech Socialist Republic]* 1. Academia, Praha 289-308.
- Slavov G. T., Zhelev P. (2004): Allozyme variation, differentiation and inbreeding in populations of *Pinus mugo* in Bulgaria. *Canadian Journal of Forest Research* 34:2611-2617.
- Soltis D. E., Solits P.S., Doyle J.J. (eds) 1998. *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*. Boston: Kluwer Acad Publishers.

- Soranzo N., Provan J., Powell W. (1998): Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology* 7:1260–1261.
- Squirrell J., Hollingsworth P. M., Woodhead M., Russell J., Lowe A. J., Gibby M., Powell W. (2003): How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants? *Molecular Ecology* 12:1339–1348.
- Staszkiewicz J. (1993a): Variability of *Pinus mugo* × *Pinus sylvestris* (*Pinaceae*) hybrid swarm in the Tisovnica Nature Reserve (Slovakia). *Polish Botanical Studies* 5:33–41.
- Staszkiewicz J. (1993b): Plant communities of the Tisovnica Nature Reserve in the Upper Orava region (Slovakia). *Polish Botanical Studies* 5:43–47.
- Staszkiewicz J. (1994): Zrżnicowanie populacji *Pinus* × *rhaetica* (*Pinaceae*) w rezerwacie „Medzi bormi“ w Słowacji. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 1:223–233.
- Staszkiewicz J. (2001): *Pinus* × *rhaetica* Brügger. In: Kazmierczakowa, R., Zarzycki, K., Polska czerwona księga roślin 65–66. Polska Akademia Nauk, Krakow.
- Staszkiewicz J., Tyszkiewicz M. (1969): Natural hybrids of *Pinus mugo* Turra × *Pinus sylvestris* L. in Kotlina Nowotarska (in Polish). *Fragmenta Floristica et Geobotanica*. 15(2):187–212.
- Staszkiewicz J., Tyszkiewicz M. (1972): Variability of the natural hybrids of *Pinus sylvestris* L. × *Pinus mugo* Turra (= *P. × rotundata* Link) in south-western Poland and in some selected localities of Bohemia and Moravia. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 18(2):173–191.
- Staszkiewicz J., Tyszkiewicz M. (1976): Zmienność populacyjna i osobnicza szyszek kosodrzewiny (*Pinus mugo* Turra) ze szczególnym uwzględnieniem materiałów z Karpat. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 22:19–29.
- Stevanovic T., Garneau F. X., Jean F. I., Gagnon H., Vilotic D., Petrovic S., Ruzic N., Pichette A. (2005): The essential oil composition of *Pinus mugo* Turra from Serbia. *Flavour and Fragrance Journal* 20:96–97.
- Sulma T. (1929): Kosodrzewina i jej zespoły w Gorganach. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 6:105–137.
- Svoboda P. (1953): Lesní dřeviny a jejich porosty. Část 1. SZN, Praha 1-412.
- Szmidt A. E., Wang X. R. (1991): DNA markers in forest genetics. In: Müller-Starck G., Ziehe M. (eds.) Genetic variation in European populations of forest trees. Sauerländer's Verlag, Frankfurt am Main 79–94.
- Szmidt A. E., Wang X. R., Lu M. Z. (1996): Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* 76:412–420.
- Szweykowski J. (1969): The variability of *Pinus mugo* Turra in Poland. *Bulletin de la Société des amis des sciences et des lettres Poznań, Sér. D, Science Biology* 10:39–54.
- Szweykowski J., Bobowicz M. A. (1977): Variability of *Pinus mugo* Turra in Poland IV. Needles and cones in some Polish populations. *Bulletin de la Société des amis des sciences et des lettres Poznań, Sér. D, Science Biology* 17:3–14.

- Tautz D. (1989): Hypervariable simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Research* 17:6463-6471.
- Temnykh S., DeClerck G., Lukashova A., Lipovich L., Cartinhour S., McCouch S. (2001): Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genetical Research* 11:1441–1452.
- Temnykh S., Park W. D., Ayres N., Cartinhour S., Hauck N., Lipovich L., Cho Y. G., Ishii T., McCough S. R. (2000): Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100:697–712.
- Toth G., Gaspari Z., Jurka J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genetical Research* 10:967– 981.
- Triest L., De Greef B., De Bondt R., Van Lycken J. (2000): RAPD of controlled crosses and clones from the field suggests that hybrids are rare in the *Salix alba* – *Salix fragilis* complex. *Heredity* 84:555–563.
- Varshney R. K., Thiel T., Stein N., Langridge P., Graner A. (2002): In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cell and Molecular Biology* 7:537–546.
- Veselý J. (1954): Ochrana československé přírody a krajiny II. (část speciální). SAV Praha.
- Viewegh J., Cambalowa H. (1993): Variableness of hybrid swarm *Pinus cekekovskiorum* A. et Gr. processed with some cluster analyses methods. *Biológia Bratislava* 48:39–44.
- Vondrejs V., Štorchová Z. (1997): Genové inženýrství I., Karolinum, UK – Praha.
- Vornam B., Kuchma O., Kuchma N., Arkhipov A., Finkeldey R. (2004): *European Journal of Forest Research* 123:245-248.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Por J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23:4407-4414.
- Wagner D. B., Furnier G. R., Saghai-Marooof M. A., Williams S. M., Dancik P. B., Allard R. W. (1987): Chloroplast DNA polymorphism in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 84:2097–2100.
- Wachowiak W., Lewandowski A., Prus-Głowacki W. (2005): Reciprocal controlled crosses between *Pinus sylvestris* and *P. mugo* verified by a species-specific cpDNA marker. *Journal of Applied Genetics* 46(1):41-43.
- Wakamiya I., Newton R. J., Johnston J. S., Price H. J. (1993): Genome size and environmental factors in the genus *Pinus*. *American Journal of Botany* 80:1235–1241.
- Wang X. R., Szmidt A. E., Savolainen O. (2001): Genetic composition and diploid hybrid speciation of a high mountain pine, *Pinus densata*, native to the Tibetan Plateau. *Genetics* 159:337–346.

Watano Y., Imazu M., Shimizu T. (1996): Spatial distribution of *cp*DNA and *mt*DNA haplotypes in a hybrid zone between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (*Pinaceae*). *Journal of Plant Research* 109:403–408.

White T. J., Bruns T., Lee S. , Taylor. J. W. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. Academic Press, Inc., New York. ©W^o 315-322.

Williams C. G., Joyner K. L., Auckland L. D., Johnston S., Price H. J. (2002): Genomic consequences of interspecific *Pinus* spp. hybridization. *Biological Journal of the Linnean Society* 75:3–508.

Willis K. J., Andel T. H. (2004): Trees or no trees? The environmental of central and eastern Europe during the last glaciation. *Quaternary Science Reviews* 23:2369–2387.

Wimmer F. (1838): *Verhandlungen der botanischen Section in den Jahren 1836 und 1837*. Uebers. *Arbeiten Veränd. Schles. Vaterl. Kult.* 1837: 93-98.

Wisskirchen R., Haeupler H. (1998): *Die Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands*, Bd. 1: Standardliste der Farn- und Blütenpflanzen Deutschlands. Ulmer, Stuttgart (Hohenheim).

Zoller H. (1981): *Pinus* L., Kiefer.: 4. *Pinus mugo*. – In: Markgraf F., Zoller H.: *Illustrierte Flora von Mitteleuropa* Paul Parey, Berlin I/2:98–104.

<http://botany.natur.cuni.cz/fer/markers/>