

**UNIVERZITA KONŠTANTÍNA FILOZOFA V NITRE**  
**FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED**

**INTROGRESÍVNA HYBRIDIZÁCIA DRUHOV PINUS  
SYLVESTRIS L. A PINUS MUGO TURRA ZISŤOVANÁ  
POMOCOU CHLOROPLASTOVEJ DNA A FERTILITY  
PEĽU**

**Rigorózna práca**

Študijný program: Aplikovaná biológia

Školiace pracovisko: KBG FPV UKF v Nitre

Školiteľ: RNDr. Andrej Kormuťák, DrSc.

**Nitra 2011**

**Mgr. Martina Braná**

## ABSTRAKT

BRANÁ, Martina, Mgr.: Introgresívna hybridizácia druhov *Pinus sylvestris* L. a *Pinus mugo* Turra zisťovaná pomocou chloroplastovej DNA a fertility peľu. Rigorózna práca. Univerzita Konštantína Filozofa v Nitre. Fakulta prírodných vied, Katedra botaniky a genetiky. Školiteľ: RNDr. Andrej Kormuťák, DrSc. Stupeň odbornej kvalifikácie: Doktor prírodných vied v odbore „Biológia“. Nitra: FPV, 2011. 79 s.

Na Slovensku sa predpokladá výskyt spontánnych medzidruhových hybridov *Pinus sylvestris* a *Pinus mugo*, ktoré na severnej Orave vytvárajú hybridné roje. Hybridný charakter týchto populácií bol postulovaný na základe morfometrických vlastností ihlič a šišíek. V predkladanej práci sme sa zamerali na overenie existencie a rozsahu introgresívnej hybridizácie v hybridných populáciách Habovka a Obšivanka s využitím molekulárnej analýzy chloroplastovej DNA (cpDNA). Druhovo špecifické restričné profily vygenerované štiepením PCR produktov segmentu *trnV-trnH* cpDNA endonukleázou *Hinf* I spoľahlivo identifikovali haplotypy *P. sylvestris* a *P. mugo*. V oboch sledovaných lokalitách sme medzi semenami toho istého jedinca rozlíšili embryá s haplotypom *P. sylvestris*, ako aj embryá s haplotypom *P. mugo*. Výsledky restričnej analýzy jednoznačne potvrdili prebiehajúci proces introgresie medzi druhmi *P. sylvestris* a *P. mugo* na oboch lokalitách. Proces introgresie prebieha na sledovaných lokalitách v oboch smeroch, keďže embryá vykazovali znaky vnútrodruhovej aj z medzidruhovej hybridizácie. Proces spontánnej hybridizácie je intenzívnejší na lokalite Habovka (45,00- 11,25%) ako na lokalite Obšivanka (2,85- 30,00%), pričom na lokalite Habovka je väčší počet hybridných jedincov *P. sylvestris* x *P. mugo* (45%) a na lokalite Obšivanka naopak jedincov *P. mugo* x *P. sylvestris* (30%). Hodnotili sme taktiež životaschopnosť peľu z hľadiska klíčivosti a dĺžky peľových vrecúšok klíčiacych peľových zrn hybridných rojov Habovka, Suchá Hora a Tisovnica, ako aj rodičovských druhov *P. sylvestris* z lokality Hruštín a *P. mugo* z lokality Vrátna dolina. V rámci klíčivosti peľových zrn sme pozorovali nízke rozdiely medzi hybridnými a kontrolnými populáciami, pričom najvyššiu klíčivosť vykazovali jedinci z kontrolnej populácie Vrátna dolina (94,68%) a najnižšiu z hybridnej populácie Suchá Hora (86,19%). Signifikantné rozdiely sme pozorovali pri dĺžke peľových vrecúšok klíčiacych peľových zrn. Kontrolné populácie dosahovali značne vyššie hodnoty (123-133,4  $\mu\text{m}$ ) ako hybridné populácie (102,67-103,04-105,88  $\mu\text{m}$ ), čo potvrdzuje zníženú vitalitu peľu

v hybridných populáciách. Získané výsledky prispievajú ku konkretizácii údajov o diverzite a genofonde borovic na našom území.

**Kľúčové slová:** *Pinus sylvestris*, *Pinus mugo*, introgresia, cpDNA, fertilita

## ABSTRACT

BRANÁ, Martina, Mgr.: Introggression between *Pinus sylvestris* L. and *Pinus mugo* Turra as revealed by chloroplast DNA and pollen fertility. Rigorous Thesis. Constantine the Philosopher University in Nitra. Faculty of Natural Sciences. Department of Botany and Genetics. Supervisor: doc. RNDr. Anna Preťová, DrSc. Degree of Qualification: Doctor of Natural Sciences in specialization „Biology“. Nitra: FNS, 2011. 79 p.

There is expectation of incidence of spontaneous interspecific hybrids of *Pinus sylvestris* and *Pinus mugo* in Slovakia which produce hybrid swarms in northern Orava. Postulated hybrid nature of the swarms is based on morphometric traits of needles and cones. In the present work, we focused on verifying the existence and extent of introgressive hybridization in hybrid populations Habovka and Obšivanka using molecular analysis of chloroplast DNA (cpDNA). Molecular evidence for *P. sylvestris* and *P. mugo* in the putative hybrid swarm populations of the species was provided using PCR-RFLP analysis of the cpDNA *trnV-trnH* region. Species-specific restriction profiles generated by *Hinf*I digestion of cpDNA products reliably identified *P. sylvestris* and *P. mugo* haplotypes. At both sites there were among the seeds of one mother individual the embryos with haplotype *P. sylvestris* and those with haplotype *P. mugo*. Results of restriction analysis clearly confirmed the ongoing introgressive process between species *P. sylvestris* and *P. mugo* at both sites. Introgressive process takes place at study sites in both directions, as evidenced by the embryos showing signs of intra- and interspecific hybridization. The process of spontaneous hybridization is more intensive on the site Habovka (45,00 to 11,25%) than on the site Obšivanka (2,85 to 30,00%). There is a higher number of *P. sylvestris* x *P. mugo* individuals on the locality Habovka (45%), whereas the locality Obšivanka contains a higher number of *P. mugo* x *P. sylvestris* trees (30%). We have also evaluated the viability of pollen in terms of pollen germination and pollen tube length in individuals from hybrid swarms Habovka, Suchá Hora and Tisovnica as well as the parental species *P. sylvestris* from Hruštín a *P. mugo* from Vrátna dolina. In germinating pollen, we observed small differences between hybrid and control populations, the highest germination showed the individuals in control population Vrátna dolina (94,68%) and lowest in the hybrid population Suchá Hora (86,19%). Significant differences were observed in pollen tube length. The control populations reached significantly higher values (123 to 133.4  $\mu\text{m}$ ) in comparison with

populations (102,67-103,04-105,88  $\mu\text{m}$ ). This finding indicates the reduced vitality of pollen in hybrid populations. Obtained results contribute to the implementation of data about diversity and genetic pools of pines in our area.

**Keywords:** *Pinus sylvestris*, *Pinus mugo*, introgression, cpDNA, pollen fertility

# OBSAH

ÚVOD .....	12
1 PREHĽAD LITERATÚRY.....	14
1.1 Stručná charakteristika rodu <i>Pinus</i> .....	14
1.2 Stručná charakteristika druhu <i>Pinus mugo Turra</i> .....	18
1.3 Stručná charakteristika druhu <i>Pinus sylvestris L.</i> .....	18
1.4 Hybridizácia a introgresívna hybridizácia v rode <i>Pinus</i> .....	19
1.5 Príklady prirodzenej hybridizácie a introgresie v rode <i>Pinus</i> .....	21
1.6 Hybridné populácie druhov <i>Pinus sylvestris L. a Pinus mugo Turra</i> .....	23
1.7 Fertilita, sterilita a inkompatibilita u medzidruhových hybridov rodu <i>Pinus</i> .....	25
1.8 Poruchy rozmnožovania v rode <i>Pinus</i> .....	27
1.9 Chloroplastová DNA (cpDNA).....	28
1.10 Markery cpDNA .....	29
1.11 Využitie cpDNA pri hodnotení hybridizácie a introgresie v rode <i>Pinus</i> ...	30
2 CIEĽ PRÁCE .....	34
3 MATERIÁL A METÓDY.....	35
3.1 Stručná charakteristika lokalít vybraných na hodnotenie intogresie.....	35
3.2 Sledovanie introgresie u predpokladaných hybridných populácií pomocou segmentu cpDNA <i>trnV-trnH</i> .....	36
3.2.1 Extrakcia DNA z ihlíc .....	37
3.2.2 Extrakcia DNA z embryí.....	38
3.2.3 PCR-RFLP analýza .....	39
3.2.4 Elektroforéza .....	39
3.3 Stručná charakteristika lokalít vybraných na hodnotenie životaschopnosti peľu.....	40

3.4	Stanovenie životaschopnosti peľu v predpokladaných hybridných populáciách.....	41
3.5	Štatistické vyhodnotenie výsledkov .....	41
4	VÝSLEDKY.....	42
4.1	Overenie introgresívnej hybridizácie u predpokladaných hybridných populácií pomocou segmentu cpDNA <i>trnV-trnH</i> .....	42
4.2	Hodnotenie životaschopnosti peľu u hybridných populácií a kontrolných populácií .....	45
5	DISKUSIA.....	59
6	ZÁVER.....	63
7	PRÍNOS PRÁCE .....	64
8	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY.....	65
9	PRÍLOHY .....	75

## ZOZNAM OBRÁZKOV, TABULIEK A GRAFOV

**Obrázok 1:** Lokalita Habovka (Kormuťák, 2009)

**Obrázok 2:** Lokalita Obšívanka (Kormuťák, 2009)

**Obrázok 3:** Lokalita Roháče (Kormuťák, 2009)

**Obrázok 4:** Lokalita Hruštín (Kormuťák, 2009)

**Obrázok 5:** Lokalita Suchá Hora (Kormuťák, 2009)

**Obrázok 6:** Lokalita Vrátna dolina (Kormuťák, 2009)

**Obrázok 7:** PCR produkty získané pomocou primera cpDNA (1-3); m- marker (Kormuťák, Braná, 2011)

**Obrázok 8:** PCR produkt a restrikčné profily *trnV-trnH* / *Hinf* I 13 jedinov s haplotypom *P. mugo*; PCR- PCR produkt, PM- *Pinus mugo*, m- marker (Kormuťák, Braná, 2011)

**Obrázok 9:** Restrikčné profily *trnV-trnH* / *Hinf* I 14 jedincov s haplotypom *P. sylvestris* a *P. mugo*; PS- *Pinus sylvestris*, PM- *Pinus mugo*, m- marker (Kormuťák, Braná, 2011)

**Obrázok 10:** Paternálny charakter dedenia cpDNA u ihličnanov ilustrovaný reštrikčnými profilmi *trnV-trnH*/ *Hinf*I u materského jedinca *P. sylvestris* (PS) a otcovského jedinca *P. mugo* (PM) a ich hybrid (H), m – markér (Kormuťák, Braná, 2011)

**Obrázok 11:** Znížená klíčivosť peľových zrn (Kormuťák, Braná, 2011)

**Obrázok 12:** Zvýšená klíčivosť peľových zrn (Kormuťák, Braná, 2011)

**Obrázok 13:** Disifonicky klíčiace peľové zrno (Kormuťák, 2011)

**Obrázok 14:** Peľové zrná s rozvetvenými peľovými vrecúškami (Kormuťák, 2011)

**Tabuľka 1:** Klasifikácia rodu *Pinus* podľa Frankisa (1999,2002)

**Tabuľka 2:** Klasifikácia rodu *Pinus* podľa Price *et al.* (1998)

**Tabuľka 3:** Zoznam lokalít vybraných na hodnotenie intogresie a ich umiestnenie

**Tabuľka 4:** Zoznam lokalít vybraných na hodnotenie životaschopnosti peľu a meranie dĺžky peľových vrecúšok

**Tabuľka 5:** Tok génov medzi *P. mugo* a *P. sylvestris* v hybridných populáciách Habovka a Obšívanka a v kontrolných populáciách Hruštín a Roháče



**Tabuľka 6:** Životaschopnosť peľu v priebehu krátkodobého uskladnenia pri - 20°C (Spojené hodnoty peľových zŕn *P. sylvestris* a *P. mugo*)

**Tabuľka 7:** Variačná analýza klíčivosti peľových zŕn počas uskladnenia

**Tabuľka 8:** Variačná analýza dĺžky peľových vrecúšok počas uskladnenia

**Tabuľka 9:** Priemerná životaschopnosť peľových zŕn podľa druhov za celé obdobie uskladnenia

**Tabuľka 10:** Životaschopnosť peľu hybridných rojov a čistých rodičovských populácií *P. sylvestris* a *P. mugo*

**Tabuľka 11:** Podiel peľových zŕn s disifonickými a rozvetvenými peľovými vrecúškami pri jednotlivých hybridných rojoch a rodičovských populácií *P. sylvestris* a *P. mugo*

**Tabuľka 12:** Variačná analýza klíčivosti peľu v populáciách

**Tabuľka 13:** Variačná analýza peľových zŕn s disifonickými a rozvetvenými peľovými vrecúškami v populáciách

**Tabuľka 14:** Variačná analýza dĺžky peľových vrecúšok v populáciách

**Tabuľka 15:** Počty jedincov v jednotlivých lokalitách podľa % klíčivosti

**Tabuľka 16:** Počty jedincov v jednotlivých lokalitách podľa dĺžky peľových vrecúšok v  $\mu\text{m}$

**Tabuľka 17:** Životnosť peľu jednotlivých stromov populácie Hruštín

**Tabuľka 18:** Životnosť peľu jednotlivých stromov populácie Vrátna dolina

**Tabuľka 19:** Životnosť peľu jednotlivých stromov populácie Habovka

**Tabuľka 20:** Životnosť peľu jednotlivých stromov populácie Suchá Hora

**Tabuľka 21:** Životnosť peľu jednotlivých stromov populácie Tisovnica

**Graf 1:** Početnosť jedincov lokality Hruštín na základe % klíčivosti

**Graf 2:** Početnosť jedincov lokality Vrátna dolina na základe % klíčivosti

**Graf 3:** Početnosť jedincov lokality Habovka na základe % klíčivosti

**Graf 4:** Početnosť jedincov lokality Suchá Hora na základe % klíčivosti

**Graf 5:** Početnosť jedincov lokality Vrátna dolina na základe % klíčivosti

**Graf 6:** Početnosť jedincov lokality Hruštín na základe dĺžky peľových vrecúšok

**Graf 7:** Početnosť jedincov lokality Vrátna dolina na základe dĺžky peľových vrecúšok

**Graf 8:** Početnosť jedincov lokality Habovka na základe dĺžky peľových vrecúšok

**Graf 9:** Početnosť jedincov lokality Suchá Hora na základe dĺžky peľových vrecúšok

**Graf 10:** Početnosť jedincov lokality Tisovnica na základe dĺžky peľových vrecúšok

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

<b>ATP</b>	adenozíntrifosfát
<b>bp</b>	bázový pár
<b>C</b>	cytozín
<b>cpDNA</b>	chloroplastová DNA
<b>CTAB</b>	cetyl trimetylamónium bromid
<b>DNA</b>	kyselina deoxyribonukleová
<b>dNTP</b>	deoxyribonukleotid trifosfáty
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EDTA</b>	kyselina etyléndiaminotetraoctová
<b>EtBr</b>	etídium bromid
<b>EtOH</b>	etanol
<b>G</b>	guanín
<b>IDH marker</b>	marker izocitrát-dehydrogenázy
<b>kb</b>	kilobázy
<b>KCl</b>	chlorid draselný
<b>M</b>	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	chlorid horečnatý
<b>mtDNA</b>	mitochondriálna DNA
<b>N<sub>2</sub></b>	dusík
<b>NaCl</b>	chlorid sodný
<b>PAGE</b>	polyakrylamidová elektroforéza
<b>PCR</b>	polymerázová reťazová reakcia
<b>PCR-RFLP</b>	polymerázová reťazová reakcia a polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov
<b>pH</b>	záporný dekadický logaritmus koncentrácie H <sup>+</sup> iónov
<b>RNA</b>	kyselina ribonukleová
<b>rRNA</b>	ribozómová RNA
<b>rpm</b>	revolutions per minute (otáčky za minútu)
<b>SSR marker</b>	single sequence repeat marker (marker jednoduchých sekvenčných repetícií)
<b>T</b>	tymín

<b>TAE</b>	tlmivý roztok tris-acetát-EDTA
<b>TBE</b>	tlmivý roztok tris-borát-EDTA
<b>TE</b>	tlmivý roztok tris-EDTA
<b>Tris</b>	Tris (hydroxymetyl) aminometán
<b>Tris-HCl</b>	Tris (hydroxymetyl) aminometán hydrochlorid
<b>tRNA</b>	transferová RNA
<b>U</b>	jednotka aktivity enzýmu
<b>UV</b>	ultrafialové žiarenie

## ÚVOD

Z hľadiska evolúcie je hybridizácia a procesy s ňou spojené významným faktorom, pretože umožňuje formovanie nových taxonomických skupín a tým aj vznik nových druhov. Hybridizácia je proces, pri ktorom splývajú gaméty s rozdielnym genetickým obsahom a jej výsledkom je hybrid. Prirodzený hybrid vzniká ako výsledok kríženia jedincov z dvoch populácií alebo skupín populácií, ktoré sú od seba odlišiteľné pomocou jedného alebo viacerých dedičných znakov (Arnold, 1997). Introgresívna hybridizácia na rozdiel od primárnej hybridizácie je proces, kedy sa prenáša genetická informácia medzi jedincami dvoch populácií alebo skupín populácií prostredníctvom hybridizácie a následne prostredníctvom opakujúceho sa kríženia s rodičovskými generáciami.

Ihličnany sú z evolučného hľadiska pokladané za fylogeneticky starú vetvu a od druhohôr sa vyvíjajú prakticky až po súčasnosť, pričom evolučné zmeny u nich prebiehajú relatívne pomaly. V rode *Pinus* je známych viacero príkladov spontánneho vzniku medzidruhových hybridov borovíc v rôznych častiach sveta, ktoré vytvárajú viac alebo menej zreteľné hybridné zóny, resp. hybridné roje.

Aj pre Slovensko je charakteristický výskyt sympatrických druhov borovíc, resp. komplexov *Pinus sylvestris* a *Pinus mugo*, ktoré spontánne vytvárajú hybridné roje na rašeliniskách severnej Oravy, konkrétne na lokalitách Tisovnica, Habovka, Suchá Hora a taktiež aj na lokalite Obšívanka pri Terchovej. Problematika výskytu spontánnych medzidruhových hybridov *P. sylvestris* a *P. mugo* sa na Slovensku začala intenzívnejšie študovať v 70. – 80. rokoch 20. storočia. Hybridný charakter týchto populácií sa postuloval na základe morfológických a anatomických znakov ihlíc a šišíek. Molekulárna diagnostika týchto rojov založená na analýze chloroplastovej DNA (cpDNA) pomocou molekulárnych markérov, spolu s hodnotením fertility peľu hybridných jedincov, ako aj rodičovských druhov, je prostriedkom overenia existencie a rozsahu introgresívnej hybridizácie v týchto populáciách. Overenie introgresie a jej rozsahu v predpokladaných hybridných populáciách a hodnotenie fertility peľu hybridova rodičovských druhov je významným príspevkom ku konkretizácii údajov o diverzite a genofonde borovíc na našom území.

Touto cestou vyjadrujem úprimné poďakovanie môjmu školiteľovi RNDr. Andrejovi Kormuťákovi, DrSc. za odborné vedenie, osobný prístup a všestrannú pomoc

pri experimentálnych prácach, ako aj cenné rady a pripomienky, ktoré mi poskytol pri vypracovaní predkladanej rigorózneho práce.

# 1 PREHĽAD LITERATÚRY

## 1.1 Stručná charakteristika rodu *Pinus*

Analýza fosílnych šišíek naznačuje, že rod *Pinus* je pravdepodobne predkom ostatných rodov čeľade *Pinaceae*, ktoré sa vyvinuli z rodu *Pinus* počas treťohôr (White *et al.*, 2009). Rod *Pinus*, najväčší rod čeľade *Pinaceae* a jediný rod podčeľade *Pinoideae* zahŕňa asi 115 druhov vyskytujúcich sa v Európe, severnej a južnej Ázii, severnej a strednej Amerike a v severnej Afrike. Je jedným z najviac rozšírených rodov ihličnatých drevín na severnej pologuli s prednostným výskytom v miernom klimatickom pásme, resp. s obmedzeným výskytom v subtropickom pásme a v trópoch (Farjon, 1984). Severnú hranicu prirodzeného výskytu dosahuje rod *Pinus* čiastočne aj v boreálnej oblasti. Z hľadiska nadmorskej výšky má rod *Pinus* areál výskytu od úrovne hladiny mora až po 4000 m n.m., v niektorých častiach Ázie sa vyskytuje až v 4200 m n.m.

Zástupcovia rodu *Pinus* tvoria rozsiahle borovicové lesy, ktoré sa pre svoje široké využitie radia k hospodársky najvýznamnejším ihličnatým drevinám.

*Pinus* je najstarší paleobotanicky spoľahlivo dokázaný rod čeľade *Pinaceae*, má najviac druhov a najväčší areál rozšírenia (Novák, 1972). Z evolučného hľadiska je považovaný za fylogeneticky starú vetvu, ktorá sa vyvíja až do súčasnosti a je charakteristický značnou variabilitou, ktorá je príčinou rôznych systematických klasifikácií v rámci rodu *Pinus*. Systematicky sa rod *Pinus* začleňuje nasledovne:

Ríša:	<i>Regnum vegetabile (Plantae)</i>
Podríša:	<i>Telomophyta (Cormobionta)</i> - telómové rastliny
Oddelenie:	<i>Spermatophyta</i> - semenné rastliny
Pododdelenie:	<i>Gymnospermatophytina (Gymnospermae)</i> - nahosemenné rastliny
Trieda:	<i>Pinopsida</i> - ihličnany
Čeľaď:	<i>Pinaceae</i> - borovicovité
Rod:	<i>Pinus</i> - borovice

Rod *Pinus* zahŕňa dva obvykle akceptované podrody a to podrod *Pinus* (tvrdé borovice- Diploxylon) a podrod *Strobus* (mäkké borovice- Haploxylon). Niektoré druhy podrodu *Strobus* sú zaradované do tretieho podrodu *Ducampopinus*. Klasifikácia rodu *Pinus* podľa Frankisa (1999, 2002) je uvedená v Tabuľke 1.

**Tabuľka 1:** Klasifikácia rodu *Pinus* podľa Frankisa (1999,2002)

Sekcia	Podsekcia	Druh
Podrod <i>PINUS</i> (Typické, ťažké borovice)		
<i>PINUS</i>	<i>Pinus</i>	<i>P. sylvestris</i> , <i>P. densiflora</i> , <i>P. tabuliformis</i> , <i>P. mugo</i> , <i>P. nigra</i> , <i>P. khasya</i> , <i>P. resinosa</i>
<i>PINEA</i>	<i>Pineae</i>	<i>P. pineae</i>
	<i>Pinaster</i>	<i>P. pinaster</i> , <i>P. canariensis</i> , <i>P. brutia</i> , <i>P. latteri</i> , <i>P. merkusii</i>
<i>TRIFOLIAE</i>	<i>Leiophyllae</i>	<i>P. leiophylla</i> , <i>P. lumholtzii</i>
	<i>Australes</i>	<i>P. palustris</i> , <i>P. glabra</i> , <i>P. caribea</i> , <i>P. elliottii</i> , <i>P. clausa</i> , <i>P. tadea</i> , <i>P. rigida</i>
	<i>Contortae</i>	<i>P. contorta</i> , <i>P. banksiana</i>
	<i>Oocarpae</i>	<i>P. attenuata</i> , <i>P. muricata</i> , <i>P. radiata</i> , <i>P. greggii</i> , <i>P. oocarpa</i> , <i>P. jaliscana</i>
	<i>Ponderosae</i>	<i>P. sabiniana</i> , <i>P. coulteri</i> , <i>P. cooperi</i> , <i>P. hartwegii</i> , <i>P. devoniana</i> , <i>P. apulcensis</i>
Podrod <i>DUCAMPOPINUS</i>		
<i>PARRYA</i>	<i>Nelsonianae</i>	<i>P. nelsonii</i>
	<i>Krempfianae</i>	<i>P. krempfii</i>
	<i>Gerardianae</i>	<i>P. gerardiana</i> , <i>P. bungeana</i> , <i>P. squamata</i>
	<i>Rzedowskianae</i>	<i>P. pinceana</i> , <i>P. rzedowskii</i> , <i>P. maximartinezii</i>
	<i>Cembroides</i>	<i>P. monophylla</i> , <i>P. edulis</i> , <i>P. remota</i> , <i>P. discolor</i> , <i>P. johannis</i> , <i>P. cembroides</i>
	<i>Balfourianae</i>	<i>P. balfouriana</i> , <i>P. longaeva</i> , <i>P. aristata</i>
Podrod <i>STROBUS</i> (Biele, mäkké borovice)		
<i>QUINQUEFOLIAE</i>	<i>Strobi</i>	<i>P. strobus</i> , <i>P. monticola</i> , <i>P. peuce</i> , <i>P. wangii</i> , <i>P. wallichiana</i> , <i>P. chiapensis</i>
	<i>Cembrae</i>	<i>P. cembra</i> , <i>P. sibirica</i> , <i>P. albicaulis</i> , <i>P. loraiensis</i>

Prírodná hybridizácia nastáva medzi druhmi rodu *Pinus* hlavne v rámci podsekcí (Critchfield, 1975), preto aj ich systematická klasifikácia je čiastočne založená na krížení. Tradičné klasifikácie rodu *Pinus* sa odvíjajú od morfológických znakov, hlavne od charakteristík ihlíc a reprodukčných orgánov (šišky a semená). Rôzni autori sa snažia o spresnenie tradičných klasifikácií na základe využitia krížiteľnosti a fyto genetických a biochemických vlastností druhov. Na základe týchto vlastností Price *et al.* (1998) uvádza pri taxonomickej klasifikácii druhov v rode *Pinus* 2 podrody, 4 sekcie a 17 subsekcí (Tabuľka 2).

**Tabuľka 2:** Klasifikácia rodu *Pinus* podľa Price *et al.* (1998)

<b>Podrod</b>	<b><i>Pinus</i></b>			
<b>Sekcia</b>	<b><i>Pinus</i></b>			
<b>Podsekcia</b>	<b><i>Pinus</i></b>		<b>Podsekcia</b>	<b><i>Canarienses</i></b>
<b>Druh</b>	<i>densata</i> <i>densiflora</i> <i>heldreichii</i> <i>hwangshanensis</i> <i>khasya</i> <i>luchuensis</i> <i>massoniana</i> <i>merkusii</i> <i>mugo</i> <i>nigra</i>	<i>pinaster</i> <i>resinosa</i> <i>sylvestris</i> <i>tabuliformis</i> <i>taiwanensis</i> <i>thunbergii</i> <i>tropicalis</i> <i>uncinata</i> <i>yunnanensis</i>	<b>Druh</b>	<i>canariensis</i> <i>roxburghii</i>
			<b>Podsekcia</b>	<b><i>Halepensis</i></b>
			<b>Druh</b>	<i>brutia</i> <i>halepensis</i>
			<b>Podsekcia</b>	<b><i>Pineae</i></b>
			<b>Druh</b>	<i>pinea</i>
<b>Sekcia</b>	<b><i>Novodobé tvrdé borovice</i></b>			
<b>Podsekcia</b>	<b><i>Contortae</i></b>	<b>Podsekcia</b>	<b><i>Ponderosae</i></b>	
<b>Druh</b>	<i>banksiana</i> <i>clausa</i> <i>contorta</i> <i>virginiana</i>	<b>Druh</b>	<i>cooperi</i> <i>durangensis</i> <i>engelmannii</i> <i>jeffreyi</i> <i>ponderosa</i> <i>washoensis</i> <i>Skupina Montezumae</i> <i>devoniana</i> <i>donnell-smithii</i> <i>hartwegii</i> <i>montezumae</i> <i>Skupina Pseudostrobus</i> <i>douglasiana</i> <i>maximinoi</i> <i>nubicola</i> <i>pseudostrobus</i>	
<b>Podsekcia</b>	<b><i>Australes</i></b>			
<b>Druh</b>	<i>caribaea</i> <i>cubensis</i> <i>echinata</i> <i>elliottii</i> <i>glabra</i> <i>occidentalis</i> <i>palustris</i> <i>pungens</i> <i>rigida</i> <i>serotina</i> <i>taeda</i>			



Podsekcja	<b><i>Oocarpae</i></b>		<i>Skupina Sabinianae</i>	
Druh	<i>Skupina Oocarpa</i> <i>greggii</i> <i>jaliscana</i> <i>oocarpa</i> <i>patula</i> <i>praetermissa</i> <i>pringlei</i> <i>tecunumanii</i> <i>Skupina Teocote</i> <i>herrerae</i> <i>lawsonii</i> <i>teocote</i>	Podsekcja	<i>coulteri</i> <i>sabiniana</i> <i>torreyana</i>	
		Druh	<b><i>Attenuatae</i></b> <i>attenuata</i> <i>muricata</i> <i>radiata</i>	
		Podsekcja	<b><i>Leiophyllae</i></b>	
		Druh	<i>leiophylla</i> <i>lumholtzii</i>	
<b>Podrod</b>	<b><i>Strobis</i></b>			
Sekcja	<b>Parrya Mayr</b>			
Podsekcja	<b><i>Balfourianae</i></b>	Podsekcja	<b><i>Cembroides</i></b>	
Druh	<i>aristata</i> <i>balfouriana</i> <i>longaeva</i>	Druh	<i>cembroides</i> <i>culminicola</i> <i>discolor</i> <i>edulis</i> <i>johannis</i> <i>juarezensis</i> <i>maximartinezii</i> <i>monophylla</i> <i>nelsonii</i> <i>pinceana</i> <i>remota</i>	
Podsekcja	<b><i>Krempfianae</i></b>			
Druh	<i>krempfii</i>			
Podsekcja	<b><i>Rzedowskianae</i></b>			
Druh	<i>rzedowskii</i>			
Podsekcja	<b><i>Gerardianae</i></b>			
Druh	<i>bungeana</i> <i>gerardiana</i> <i>squamata</i>			
Sekcja	<b><i>Strobis</i></b>			
Podsekcja	<b><i>Strobi</i></b>		Podsekcja	<b><i>Cembrae</i></b>
Druh	<i>armandii</i> <i>ayacahuite</i> <i>bhutanica</i> <i>chiapensis</i> <i>dabeshanensis</i> <i>dalatensis</i> <i>fenzeliana</i> <i>flexilis</i>	<i>lambertiana</i> <i>monticola</i> <i>morrisonicola</i> <i>parviflora</i> <i>peuce</i> <i>strobis</i> <i>wallichiana</i> <i>wangii</i>	Druh	<i>albicaulis</i> <i>cembra</i> <i>koraiensis</i> <i>pumila</i> <i>sibirica</i>

## 1.2 Stručná charakteristika druhu *Pinus mugo* Turra

*Pinus mugo* je komplex borovice horskej, v rámci ktorého sa vyskytuje extrémna variabilita. Práve nejednotnosť v klasifikácii spôsobuje, že táto skupina ani v súčasnosti nie je taxonomicky dostatočne definovaná. Problematikou systematickej klasifikácie agregátu *Pinus mugo* agg. sa podrobne zaoberá Businský (1999), ktorý ho chápe ako agregát troch samostatných druhov, resp. mikrospecii a to:

*Pinus mugo* Turra (1764)

syn. *Pinus mughus* Scopoli (1772)

syn. *Pinus pumilio* Haenke (1791)

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

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

syn. *Pinus mugo* var. *rostrata* Antoine (1840)

*Pinus rotundata* Link (1827)

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

Podľa Businského (1999) sa z agregátu *Pinus mugo* na území Slovenska nachádzajú iba dva z uvedených druhov, a to *Pinus mugo* s. str. a *Pinus rotundata*.

Borovica horská je drevina horského typu, má disjunktívny areál a na Slovensku sa nachádza v mnohých ostrovčekovitých výskytoch. Rastie na minerálnom podklade na hornej hranici lesa, prípadne nad touto hranicou, ale i na rašelinnom podklade v nižších nadmorských výškach. Obyčajne rastie v nízkom krovitom tvare s nepravidelne rozkonárenými konármi, ktoré sú poliehavé, ale aj kosákovito vystupujúce až vzpriamené. Na severe Slovenska vytvára hybridné roje s *Pinus sylvestris*.

V súčasnosti sa v slovenskej botanickej nomenklatúre najčastejšie používa ako vedecký názov našej kosodreviny pomenovanie borovica horská, avšak používa sa taktiež názov borovica kosodrevinová (kosodrevina) (Somora, 1981) a kosodrevina pravá (Futák *et al.*, 1966).

## 1.3 Stručná charakteristika druhu *Pinus sylvestris* L.

Borovica lesná je drevina kontinentálnej klímy. Vďaka svojej schopnosti osídľovať rozmanité územia a schopnosti rásť v rôznych podmienkach má široký areál výskytu, zaberá väčšiu časť Európy a severnej Ázie. Na základe schopnosti prispôbovať sa mnohým ekologickým podmienkam sa u borovice lesnej vytvorila značná

vnútrodruhová premenlivosť, ktorej následkom je existencia rôznych rás, ktoré sa odlišujú charakterom, vzrastom, farbou ihlíc a veľkosťou i tvarom šišíek. Zväčša sú to stromy vysoké 25- 45 m, obyčajne viac ako polovica kmeňa je bez konárov, koruna je oblá a vzdušná. Táto drevina vytvára čisté porasty, boriny, vyskytuje sa v zmiešaných lesoch a je schopná rásť i na rašeliniskách. Vďaka svojmu značnému hospodárskemu významu bola umelo vysádzaná aj na území Slovenska a to napríklad v oblasti Choča alebo na Záhori.

Businský (1999) uvádza, že *Pinus sylvestris* L. je v rámci svojho areálu rozšírenia taxonomicky komplikovaným druhom a jeho variabilita súvisí s jej kozmopolitným rozšírením v severnom miernom klimatickom pásme. Z hľadiska európskeho areálu tohto druhu je však druhom pomerne homogénnym. Slovenské autochtónne populácie borovice lesnej sú rozhodne taxonomicky jednotné vo vzťahu k celkovej variabilite druhu a možno ich rozlišovať nanajvýš ako odlišné populácie alebo súbory populácií, prípadne ekotypy (Businský, 1999).

#### **1.4 Hybridizácia a introgresívna hybridizácia v rode *Pinus***

Proces hybridizácie medzi druhmi je významným evolučným faktorom, pri ktorom vznikali a neustále vznikajú nové druhy a poddruhy ako aj nižšie taxonomické kategórie, čím sa rozširuje genetická variabilita a adaptabilita organizmov. Pri tomto krížení, resp. oplodňovaní sa spájajú geneticky rozdielne gaméty jedincov patriacich do odlišných populácií. Hybridizácia sa vyskytuje takmer u všetkých rastlinných druhov, hlavne u mnohých lesných druhov (Wright, 1978).

V prírode je bežné, že dva rozdielne druhy vytvoria hybridné potomstvo, ktoré sa stáva reprodukčne izolované od rodičovskej generácie a tak vznikajú unikátne nové druhy, resp. medzidruhové hybridy. Podľa Stebbinsa (1950), dôkladné štúdium mnohých skupín vyšších rastlín z karyologického i systematického hľadiska definitívne preukázalo, že medzidruhové hybridy sú v prírode bežné. Navyše, počet hybridov v ďalších generáciách stúpa, pričom častokrát sú značne odlišné od skupín, ku ktorým patria. Medzidruhové hybridy F1 generácie sú často sterilné a vytvárajú slepé vývojové konce. Hybridy v rode *Pinus* sú však zväčša fertílne, preto hybridizácia a introgresívna hybridizácia sú významnou súčasťou evolučnej histórie borovíc (White *et al.*, 2009). Fertílne hybridy sa môžu ďalej krížiť s inými hybridmi alebo s rodičovskými jedincami a vytvárať tak populáciu s čistými rodičovskými druhmi a s hybridmi rôznych stupňov,

hybridný roj. Hybridný roj tvoria morfológicky rozdielne hybridy, ktoré sú výsledkom kríženia dvoch druhov s nasledujúcimi spätnými krížzeniami ďalších generácií hybridného potomstva. Hybridné roje sa zvyčajne nachádzajú na takých ekologických nikách, kde čisté druhy nemôžu prežiť, napríklad rašeliny a vlhké pôdy (Staszkiwicz, 1993). Opakované spätné kríženia hybridov s rodičovskými druhmi vyúsťujú v prenos génov z jedného rodičovského druhu k inému, čím dochádza k introgresívnej hybridizácii- introgresii.

Rod *Pinus* zahŕňa viac ako 100 druhov, ktorých areály výskytu sú zväčša sympatrické. V sympatrických populáciách dochádza často k náhlemu vzniku nových druhov, čo je spojené s genetickými zmenami, ktoré zapríčiňujú reprodukčnú izoláciu časti jedincov v populácii. Jedná sa o javy súvisiace s krížením: apomixia, aneuploidia, polyploidia. Na vznik sympatrických druhov môže mať vplyv aj genetický drift, spôsobujúci genetické modifikácie v genofonde a následnú reprodukčnú izoláciu populácie. Spontánna hybridizácia sympatrických druhov borovíc má kolísavý priebeh formujúci viac či menej zreteľne ohraničené hybridné zóny (Kormuťák *et al.*, 2009). Hybridné zóny sú ideálnymi oblasťami, v ktorých sa skúmajú evolučné procesy vzniku nových druhov (Hewitt, 1988).

Primárne hybridné zóny sú miesta, kde sa areály výskytu druhov dotýkajú a dochádza medzi nimi k toku génov. Takéto hybridné zóny sa v prírode vyskytujú zriedkavo, pretože pri veľkom toku génov by nový druh vzniknúť nemohol, resp. by splynul s pôvodnými druhmi. Sekundárne hybridné zóny sa vytvárajú pri kontakte druhov, ktoré majú čiastočne vytvorené rozmnožovacie bariéry a vznikajú v mieste dotyku oboch areálov. Tieto zóny vytvárajú zväčša úzke dlhé línie. V miestach hybridných zón dochádza ku kríženiu medzi jedincami patriacimi k dvom rôznym druhom, často i k introgresii. Hybridné zóny môžu byť jasne ohraničené, často však sú ich okrajové časti nejasné.

Medzi populáciami, ktoré sú charakterizované čiastočnou reprodukčnou izoláciou, sa výskyt hybridov v prírode predpokladá ako dôsledok introgresie. Podľa Arnolda *et al.* (1991) je introgresia jednak výsledkom prírodnej hybridizácie a tiež prechodný krok pre ďalšie evolučné udalosti, ako aj súťaž o formovanie druhu. Je tiež výsledkom prekonania izolačných bariér medzi dvoma izolovanými druhmi a ich následným zlúčením. Stebbins (1950) uvádza, že introgresívna hybridizácia v populáciách závisí od podstatnej vlastnosti typickej pre tento proces, a to že introgresia sa vyskytne len v tej časti geografického rozšírenia určitých druhov, ktorá zasahuje do areálu blízko

príbuzných druhov a len vtedy, keď ekologické podmienky daného stanovišťa umožnia ustálenie druhov vzniknutých introgresiou. Príležitostná introgresia medzi druhmi a tvorba nových adaptácií na nové podmienky prostredia v ďalších generáciách hybridných jedincov môžu totiž prevyšovať nevýhody spojené so sterilitou hybridného potomstva. Adaptívna introgresia môže pôsobiť na izolačné mechanizmy, resp. uvoľniť ich a tým prispievať k určitej stabilite hybridnej zóny. Introgresia sa v prírode prejavuje výskytom a udržiavaním hybridných populácií, resp. hybridných rojov.

## 1.5 Príklady prirodzenej hybridizácie a introgresie v rode *Pinus*

Hybridný charakter jedincov bol v minulosti určovaný hlavne na základe morfológických znakov, resp. charakteristík ihlíc a šišíek, ako aj celkového habitusu jedincov. V súčasnosti sa do popredia dostávajú biochemické a molekulárne metódy vykonávané pomocou izoenzýmov, imunologických testov a DNA sekvencií jadrového, chloroplastového a mitochondriálneho genómu (White *et al.*, 2009).

Prvým nájdeným prírodným hybridom borovíc bol kríženec druhov *Pinus jeffrey* x *P. coulteri* (Chira, 1971). V Európe bol prvým nájdeným spontánnym hybridom borovíc kríženec druhov *Pinus nigra* x *P. sylvestris* v Rakúsku (Vidakovič, 1974). Dnes je na svete známych viacero príkladov spontánnych medzidruhových hybridov v rode *Pinus*. V Severnej Amerike dochádza ku kríženiu medzi druhmi *Pinus taeda* x *P. palustris* (Namkoong, 1966a) a *Pinus taeda* x *P. echinata* (Zobel, 1953), na západe Ameriky bola zistená prírodná hybridizácia medzi druhmi *Pinus ponderosa* x *P. jeffrey* (Conkle a Critchfield, 1998), v centrálnej Amerike a Mexiku medzi druhmi *Pinus montezumae* x *P. hartwegii* (Matos a Schaal, 2000). Jednými z najlepšie preštudovaných hybridov v rode *Pinus* sú hybridy *Pinus contorta* x *P. banksiana* v západnej Kanade, ktoré vznikli formou introgresie v kontaktných sympatrických zónach týchto druhov borovíc (Wagner *et al.*, 1987). Fakt, že hybridizácia v rode *Pinus* často vedie k vzniku nových druhov potvrdzuje *Pinus densata* Masters, terciárny hybrid medzi ázijskými druhmi *Pinus tabulaeformis* a *P. yunnanensis*. *Pinus tabulaeformis* je druh vyskytujúci sa v severnej a centrálnej časti Číny, zatiaľ čo *Pinus yunnanensis* sa vyskytuje v juhozápadnej časti Číny. V súlade s niektorými autormi sa počas terciárnej periódy tieto dva druhy stretli v severnom Yunnane a formovali prírodný hybridný druh, *Pinus densata* Masters. Dnes sa *Pinus densata* vyskytuje vo vysokohorských polohách, kde žiaden z predpokladaných rodičovských druhov nemôže normálne rásť. *Pinus*

*tabulaeformis* sa očividne líši od *Pinus yunnanensis* s ohľadom na alozýmové zloženie, zatiaľ čo *Pinus densata* je prechodnou formou medzi dvoma predpokladanými rodičovskými druhmi. Wang *et al.* (1990) sledovali v populáciách týchto troch druhov alozýmové rozdiely na 13 lokusoch. Hybridný pôvod *Pinus densata* bol skúmaný cez analýzu alozýmov, cpDNA RFLP a mt DNA (Wang a Szmidt, 1990, 1994; Wang *et al.* 1990, 2001; Yu *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2002). Porovnanie chloroplastovej génovej diverzity u troch druhoch borovíc odhalilo najvyššiu mieru diverzity u *Pinus densata*, najnižšiu u *Pinus tabulaeformis* a strednú u *Pinus yunnanensis*. Spoločná cpDNA a mtDNA potvrdzujú existenciu obojsmerného génového toku medzi *Pinus tabulaeformis* a *Pinus yunnanensis* počas hybridizácie a speciácie *Pinus densata*. V súčasnosti majú populácie vysokohorskej borovice stabilizovanú hybridnú povahu (Wang *et al.*, 2001).

Druhy *Pinus pumilla* a *P. parviflora* var. *pentaphylla* vytvárajú hybridné populácie v Japonsku na ostrovoch Honšú a Hokkaido (Watano *et al.*, 2004). Identifikáciou druhov *Pinus brutia* Ten. a *Pinus halepensis* Mill. a ich predpokladaných medzidruhových hybridov na ostrove Rodos v Grécku sa s použitím morfológických, anatomických a izoenzymových markérov zaoberali Panetsos *et al.* (1997). *Pinus halepensis* má širší výskyt ako *Pinus brutia*. Izolovaný výskyt jedného druhu vo vnútri prirodzeného areálu druhého druhu bol prisudzovaný ľudskému vplyvu. Tieto dva druhy si okrem priestorovej izolácie vyvinuli iné typy bariér, napríklad prevenciu fertilizácie v prípade, že *Pinus halepensis* je materský rodič, redukciu životaschopnosti embryí u hybridných semien, nízku toleranciu na teplotu a rozdielny čas kvitnutia. Môžu byť teda považované za dva dobre ustálené druhy. Umelá hybridizácia však preukázala, že s prispením ľudského zásahu tieto dva druhy môžu byť úspešne krížené a dokonca na miestach, kde prichádzajú tieto dva druhy do kontaktu, môžu byť formované spontánne hybridy (Panetsos, 1975). *Pinus montana* Mill. (z komplexu *Pinus mugo*) a *Pinus sylvestris* L. sa vyskytujú sympatricky v európskych horách od Pyrenejí cez Alpy až po Karpaty (Prus- Glowacki a Stephan, 1998). Predpokladané hybridy týchto druhov boli nájdené v hybridných rojoch (Marcet, 1967; Staszkiwicz a Tyszkiewicz, 1972). Jedince z týchto populácií sú morfológicky veľmi variabilné a vytvárajú prechodné formy medzi *Pinus montana* a *P. sylvestris* a niektorými znakmi sa podobajú buď na jedného, alebo druhého rodiča. K hybridizácii dochádza aj medzi druhmi *Pinus uliginosa* a *P. sylvestris*. Ich hybridizáciou v sympatrických populáciách sa zaoberali Wachowiak *et al.* (2005). *Pinus uliginosa* Neumann, druh vyskytujúci sa na

rašelinových a močiarnych stanovištiach, je v mnohých častiach Európy ojedinelý, alebo dokonca vyhynutý. Je predpoklad, že medzi *Pinus uliginosa* a *P. sylvestris* dochádza k hybridizácii, ale vplyv hybridizácie na narušenie génového fondu *Pinus uliginosa* je neznámy. Krížiteľnosť medzi týmito dvoma druhmi bola analyzovaná v sympatrickej populácii v rezervácii Węgliniec v Poľsku.

V prírode dochádza k tvorbe hybridov medzi druhmi v rámci podrodu *Haploxyylon*, ako aj medzi druhmi podrodu *Diploxyylon*. Avšak nebol zaznamenaný prípad, kedy by dochádzalo ku kríženiu medzi druhmi patriacimi do rozdielnych poddruhov. Z genetického hľadiska sa oba podrody rodu *Pinus* vyznačujú vzájomnou úplnou reprodukčnou izoláciou a dodnes nie je zaznamenaný jediný existujúci prípad medzidruhového hybridu rodičovských druhov, z ktorých jeden by patril do podrodu *Haploxyylon* a druhý do podrodu *Diploxyylon* (Mirov, 1967; Kormuťák a Lanáková, 1988).

## **1.6 Hybridné populácie druhov *Pinus sylvestris* L. a *Pinus mugo* Turra**

V podmienkach strednej Európy hybridné populácie borovíc tvoria blízko príbuzné druhy *Pinus mugo* a *Pinus sylvestris* (Businský, 1999). Základným predpokladom pre vznik medzidruhových hybridov je dotýkanie, resp. prekrývanie sa areálov výskytu oboch spomínaných druhov v kontaktných zónach, ktoré sa nachádzajú v dvoch hlavných typoch biotopov – na rašeliniskách a taktiež na skalných výbežkoch najčastejšie vápencových hornín často s inverzným mikroklimatickým efektom (Businský, 1999). Na Slovensku sú to lokality severnej Oravy Habovka, Tisovnica a Suchá Hora na rašeliniskách a lokalita Obšívanka na vápencovom podloží. V rámci strednej Európy sa hybridy *Pinus mugo* x *P. sylvestris* vyskytujú vo Švajčiarsku (Net-Sarqueda *et al.*, 1988), Bulharsku (Dobrinov a Jaghizid, 1971) a v Poľsku (Stazskiewicz a Tyszkiewicz, 1969; Bobowicz *et al.*, 2000).

*Pinus sylvestris* je všeobecne rozšírený druh, ktorý je hlavnou zložkou lesov v Európe a Ázii. *Pinus mugo* je endemický druh európskych horských oblastí a tiež sa vyskytuje na rašeliniskách a močariskách z postglaciálnej periódy (Critchfield a Little, 1966). V sympatrických populáciách týchto druhov sa vyskytujú jedince so zmiešaným fenotypovým charakterom. Štúdium hybridizácie *Pinus mugo* a *Pinus sylvestris* boli vykonané pomocou umelého kríženia. Tieto experimenty boli tiež vykonané na určenie

fylogenetických vzťahov medzi druhmi borovic a pre krížiteľské zámery (Kormuťák a Lanáková, 1988 ; Prus- Glowacki a Stephan, 1998).

Na overenie hybridného pôvodu sadeníc z kontrolného recipročného kríženia medzi *Pinus mugo* a *Pinus sylvestris* bol použitý druhovo špecifický markér cpDNA z *trnL-trnF* oblasti (Wachowiak *et al.*, 2000). Bol dokázaný veľmi nízky stupeň krížiteľnosti medzi týmito dvoma druhmi. *Pinus mugo* ako maternálny jedinec a *Pinus sylvestris* ako donor peľu počas trojročného výskumu boli schopné vyprodukovať iba tri zrelé šišky, aj to všetky s nevyvinutými semenami (Wachowiak *et al.*, 2005). V kríženiach, kde vystupoval *Pinus sylvestris* ako maternálny jedinec, 70% šišíek dospelo do zrelosti, ale väčšina z nich obsahovala prázdne alebo nevyvinuté semená. Až v roku 2001 sa podarilo získať štyri plné semená. Dve z nich pochádzali z jedinca *Pinus sylvestris* spoločne s 254 prázdnyimi semenami, kým ostatné dve spolu s 182 prázdnyimi semenami pochádzali z druhého jedinca. Kríženie medzi *Pinus mugo* ako donora peľu a *Pinus sylvestris* ako semenného jedinca je teda možné napriek nízkej efektivite tohto procesu. Aj napriek absencii plných semien v recipročnom krížení nie je vylúčená možnosť hybridizácie, kedy bude vystupovať *Pinus mugo* ako semenný jedinec a *Pinus sylvestris* ako donor peľu.

Overenie hybridného charakteru prirodzených hybridov *Pinus mugo* x *P. sylvestris* bolo zisťované analýzami cpDNA (Kormuťák *et al.*, 2001; Wachowiak *et al.*, 2005), ale tiež pomocou izoenzymových markerov (Siedlewska a Prus-Glowacki, 1994; Lewandowski *et al.*, 2002; Maňka, 2009), morfológie a anatómie ihlič a fenológie reprodukčných orgánov (Stazkiewicz, 1996; Bobowicz *et al.*, 2000).

Napriek tomu, že niektorí autori sa prikláňali k názoru, že medzi druhmi *Pinus mugo* a *P. sylvestris* nemôže dochádzať k hybridizácii a vzniku hybridov pre ich neprekrývajúce sa areály a nerovnaký čas kvitnutia (Somora, 1981), je potvrdené, že hybridné roje medzi vyššie uvedenými taxónmi sa na Slovensku naozaj vyskytujú. Podľa Businského (1999) ku vzájomnému stretu populácií druhov *Pinus mugo* Turra a *Pinus sylvestris* L. dochádza na lokalitách s extrazonálnym výskytom borovice horskej pod jej hlavným výškovým pásmom rozšírenia a extrazonálnym výskytom *Pinus sylvestris* v smere nad pásmo jej hlavného rozšírenia.



## 1.7 Fertilita, sterilita a inkompatibilita u medzidruhových hybridov rodu *Pinus*

V procese medzidruhovej hybridizácie dochádza ku kombináciám vlastností za vzniku takých vlastností organizmov, aké sa nevyskytujú u čistých druhov. Nové kombinácie vlastností u medzidruhových hybridov umožňujú vyššiu flexibilitu a adaptabilitu potomstiev k rôznym zmenám prostredia. Medzidruhová hybridizácia však predpokladá absenciu prekážok krížiteľnosti medzi druhmi. Pri medzidruhovej hybridizácii v rode *Pinus* dochádza často k tzv. nekrížiteľnosti. Inkompatibilita je neschopnosť samčích a samičích pohlavných buniek dosiahnuť oplodnenie. Zakladá sa teda na neschopnosti určitých gametických spojení, kedy sa v týchto kombináciách nevytvárajú normálne zygoty. Gamety však sú úplne životaschopné a funkčieschopné a v inej kombinácii tvoria normálne sa vyvíjajúce zygoty (Dubovský a Maršálek, 1968). Chira (1971) uvádza niekoľko príčin nekrížiteľnosti- inkompatibility lesných drevín:

Príčiny nekrížiteľnosti spôsobené vonkajšími vplyvmi:

- Geografická vzdialenosť
- Rozdielny čas kvitnutia generatívnych orgánov
- Klimatické vplyvy

Príčiny nekrížiteľnosti vnútorné:

- Mechanické: rozličná veľkosť peľu, mikropyly a oplodňovacej komôrky
- Stimulačné a inhibičné účinky nucellusu na peľ a opačne
- Rozdielnosť v počte a morfológii chromozómov
- Neschopnosť rastu peľového vrecúška na ľubovolnú dĺžku

Inkompatibilitu je nutné odlišovať od sterility, ktorú spôsobuje absolútna neschopnosť oplodnenia príslušnými gametami. Krížením môže dochádzať aj k narušeniu adaptívnych schopností a hybridy, ktoré vznikajú môžu byť menej schopné ako rodičovské druhy. Greguss (1995) tvrdí, že táto znížená schopnosť kríženia sa navonok prejavuje v zníženej tvorbe semien, vo zvýšenej frekvencii abnormálnych alebo podradnejších semenáčikov a v zníženej vitalite. Medzidruhové hybridy rastlín môžu byť podľa Stebbinsa (1950) rozdelené do dvoch skupín. Tie, ktoré sú schopné produkovať životaschopný peľ a semená na úrovni jedincov F1, alebo spätným krížením s rodičovskými druhmi a tie, ktoré sú sterilné s výnimkou príležitostnej produkcie allopolyploidných derivátov.

Zvyčajne je sterilita medzidruhovej F1 generácie vyššia ako u vnútrodruhových hybridov, nemusí to však byť pravidlom. Charakteristickou črtou sterility medzidruhových hybridov je to, že je prítomná vždy a že sa relatívne málo líši v závislosti od toho, ktoré jedince z rodičovských druhov boli použité pri krížení (Stebbins, 1950).

Podľa Stebbinsa (1950) tiež sterilita znižuje, resp. redukuje vo väčšej či menšej miere reprodukčnú schopnosť hybridov v F1 generácii, aj keď sa sterilita nedá považovať za charakteristickú vlastnosť hybridov. Frekvencia hybridov u rastlinných druhov je vyššia hlavne vďaka ich dlhovekosti a spôsobom reprodukcie. U rastlinných skupín sa individuálne genotypy uchovávajú počas roka vo väčších množstvách a tiež sa môžu šíriť na väčšie územia. Preto sú selekčné nevýhody relatívne malej fertility peľu a semien nižšie, ako u organizmov, ktorých genotypy majú limitovaný životný priestor (Stebbins, 1950). Spravidla viacej prípadov spontánnych hybridov sa vyskytuje u viacročných rastlín, ako u jednoročných rastlín. Medzidruhové krížence a ich potomkovia majú zväčša nižšiu biologickú zdatnosť ako ostatní členovia populácie a bývajú preto postupne eliminované z populácie prirodzeným výberom. Niektoré gény pochádzajúce od cudzieho druhu však v tomto genofonde zostanú a môžu sa stať v budúcnosti dôležitým zdrojom genetického polymorfizmu (Flegr, 2005).

Vznikom nových druhov a krížením jedincov patriacim k populáciám na jednom území, alebo k populáciám, ktoré sa dotýkajú, dochádza k vzniku medzidruhových krížencov, ktoré môžu oslabovať, alebo postupne stierať hranice medzi týmito populáciami. Tomuto procesu však zabraňujú prirodzené bariéry, ktoré sú viac či menej rozpoznateľné. Nejde však len o geografické bariéry, ale aj o takzvané reprodukčno - izolačné mechanizmy. Podľa Flegra (2005) vďaka týmto mechanizmom existujú medzi vznikajúcimi druhmi vnútorné predzygotické a postzygotické reprodukčné bariéry.

Arnold (2006) definoval štyri úrovne bariér, ktoré zabraňujú toku génov a to ekologickú, konkurenciu gamiet, životaschopnosť hybridov a plodnosť hybridov. Napriek tejto klasifikácii bariér autor uvádza, že tok génov medzi druhmi sa môže vyskytovať aj napriek veľmi silnej reprodukčnej izolácii. U druhov *Pinus sylvestris* a *Pinus mugo* významnú rolu zohráva nerovnaká doba kvitnutia, výskyt druhov v rozdielnych nadmorských výškach, redukovaný počet semien a ich životaschopnosť, ale aj rozdielne ekologické podmienky a určitá stagnácia v rámci vývinových štádií.

Príčiny neplodnosti u hybridov teda môžu byť rôzne. Často dochádza k nenormálnemu vývinu pohlavných orgánov, a to u samčích aj samičích jedincov.

Tyčinky nedozrievajú, peľnice sa neotvárajú a zárodočné vaky majú zníženú schopnosť funkcie. V iných prípadoch vznikajú hlavne poruchy meiotického cyklu (Dubovský a Maršálek, 1968). Poruchy v priebehu meiózy sa vyskytujú v peľových materských bunkách. Frekvencie porúch redukčného delenia súvisia s predčasnou separáciou chromozómov, výskytom nespárovaných chromozómov a chromozómových zlomov, ako aj výskytom porúch vo formovaní jadierka v štádiu diád a tetrád.

V rámci rodu *Pinus* je väčšina získaných medzidruhových hybridov životaschopná a relatívne fertílne, aj keď sa medzi niektorými druhmi vyskytujú prekážky ich vzájomnej krížiteľnosti (Sax, 1960). Neúspechy pri medzidruhovej hybridizácii sú spôsobené embryologickými poruchami. Ide hlavne o degeneráciu hybridného embrya v štádiu proembrya, resp. v jeho neskorších vývinových štádiách. Často dochádza k nepreniknutiu peľového vrecúška až k archegóniu, neschopnosti spermatického jadra k oplodneniu a odumretiu zygoty v štádiu proembrya. Mirov (1967) uvádza, že neschopnosť peľového vrecúška prerásť nucellom vajíčka je najvýznamnejšou prekážkou úspešnej hybridizácie sympatrických druhov borovic podrodu *Diploxylon*.

## 1.8 Poruchy rozmnožovania v rode *Pinus*

Stromy sú generácia sporofytu a nesú samčie a samičie šištice. Samičie šištice predstavujú megasporofyl s dvoma vajíčkami. Vajíčko vyrastá z placenty a najskôr sa rozrastá nucellus s jednou väčšou materskou bunkou megaspóry. Po redukčnom delení vznikajú 4 haploidné bunky, z ktorých iba jedna tvorí samičí gametofyt. Megaspóra sa delí a dáva vznik haploidnému pletivu- endospermu. V ňom sa v prípade borovic zakladajú dve archegóniá, ktoré obsahujú veľkú vaječnú a malú bunku (Bobák *et al.*, 1992). Samčie šištice sú tvorené súborom mikrosporofylov, ktoré nesú dve mikrosporangia- prašné púzdra s peľovými zrnami. Po diferenciácii sa peľové zrná uvoľňujú, roznášajú a uchytávajú na vajíčkach. Peľové vrecúško prerastá nucelleom, dostáva sa k vaječnej bunke, spýva s ňou a vzniká zygota. Zo zygoty sa ďalej vyvíja semeno.

U hybridov v rode *Pinus* sa v rámci poruchy oplodnenia a embryogenézy často vyskytujú prázdne a nedokonale vyvinuté semená, čo súvisí s inkompatibilitou a sterilitou hybridných jedincov (Kormuťák, 1974). Tvorba prázdnych semien bez endospermu, resp. embryí môže mať veľa príčin, nakoľko vývin embrya je dynamický proces, ktorý sa môže narušiť v rôznom štádiu embryogenézy. Poruchy môžu nastať pri

oplodnení a vývine vajíčka, degeneráciou embrya pri vývine semena a aj v čase embryogenézy. Samotná dĺžka vývinu vaječnej bunky lesných drevín sa odlišuje od vývinu peľu. U borovic trvá tento vývin až 22 mesiacov (Chira, 1971). Aby mohlo dôjsť k splynutiu pohlavných buniek, musí peľové zrno naklíčiť a prerásť až k samičej gaméte. Opelenie nahosemenných rastlín sa odohráva priamo na vajíčku. Po opelení možno pozorovať v nucelluse rast peľového vrecúška. Chira (1971) zistil, že na rast peľového vrecúška čerstvého a rok uskladneného peľu vplýva teplota. Vyššie stále i premenlivé teploty nepriaznivo ovplyvňujú klíčenie peľu borovic. Aj rozličná veľkosť peľu je jedna z príčin nekrížiteľnosti pri medzidruhovej hybridizácii v rode *Pinus*.

## 1.9 Chloroplastová DNA (cpDNA)

Genetický materiál rastlinných buniek je lokalizovaný okrem jadra aj v mimojadrových štruktúrach, mitochondriách a chloroplastoch. Podľa endosymbiotickej teórie sa obe tieto organely vyvinuli z prokaryotických buniek, ktoré si vytvorili z hostiteľskou bunkou symbiotický vzťah, pričom si však zachovali svoj genóm a funkcie. V prípade chloroplastov ide o využívanie energie slnečného svetla k syntéze organických molekúl z vody a oxidu uhličitého v procese fotosyntézy.

Chloroplastová DNA (cpDNA) je tvorená kruhovou molekulou. U vyšších rastlín sa veľkosť typickej cpDNA pohybuje v rozmedzí od 120 do 160 kb (Snustad a Simmons, 2009). Krupkin *et al.* (1996) uvádza pre druhy *Pinus sylvestris* a *P. ponderosa* dĺžku cpDNA 120 kb. Počet molekúl cpDNA v bunke závisí od počtu chloroplastov a počtu molekúl cpDNA v chloroplastoch. Podľa Rosypala (1983) sú na cpDNA obvykle lokalizované tieto gény:

- Gény prepisované do 30 až 40 druhov tRNA a 1 až 5 druhov rRNA
- Asi 20 génov kódujúcich ribozómové proteíny
- 3 gény kódujúce podjednotky komplexu ATP-ázy
- Gén kódujúci veľký protomér ribulóza- 1,5 bisfosfátkarboxylázy
- Gény kódujúce elongačné faktory *EF-G* a *EF-T*
- Gény kódujúce tri protoméry cytochrómu *b/f*
- Gény kódujúce niektoré polypeptidy fotosystému I a II

Celkovo bola doposiaľ určená kompletná sekvencia viac ako 100 molekúl cpDNA (Snustad a Simmons, 2009). Väčšina molekúl cpDNA nesie pár veľkých invertovaných repetícií, ktoré obsahujú gény pre rRNA.

Vývoj funkčných chloroplastov závisí na expresii jadrových, ako aj chloroplastových génov. Aby mohli byť plastidy nositeľmi vlastnej genetickej informácie, musí byť aspoň niektorá ich zložka kontinuálna, t.j. vznikajú z plastidov a prenášať sa z plastidov do plastidov, z bunky do bunky a z generácie do generácie. Plastidy sa nachádzajú i vo vajej bunke a niekedy aj v peľovom zrne (Hraška *et al.*, 1990). Chloroplasty sa dedia väčšinou maternálne, v prípade ihličnanov však paternálne.

## 1.10 Markery cpDNA

Genetický marker je znak, ktorý slúži na hodnotenie genetickej premenlivosti. Zvyčajne sa využívajú genómové markery, teda markery jadrovej, mitochondriálnej a chloroplastovej DNA. Genetické markery môžu byť použité pri štúdiu genetiky organizmov, vrátane stromov, na úrovni jednotlivých génov. White *et al.* (2009) rozdeľujú DNA markery do dvoch základných skupín:

- DNA markery založené na DNA- DNA hybridizácii
- DNA markery založené na amplifikácii DNA sekvencií za použitia PCR

Reštrikčné fragmenty organelových genómov (cpDNA a mtDNA) sa osvedčili ako významné nástroje vo výskumoch systematickej príbuznosti ako aj prirodzenej introgresie pri viacerých druhoch ihličnanov (Kondo *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2003; Kormuťák *et al.*, 2001, 2005, 2008). Komplementárna vlastnosť bázoového párovania umožnila rozvinúť metódy, pri ktorých môže byť použitý na odhalenie polymorfizmov v sekvenčných homológoch malý úsek DNA. Genetický systém využívajúci tento prístup sa nazýva detekcia polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP) (White *et al.* 2009). Táto technika bola používaná aj pri štúdiu dedenia cpDNA u ihličnanov. RFLP markery sú segmenty DNA, ktoré sa líšia medzi druhmi v dôsledku výskytu mutácií v DNA. Markery môžu byť využité jednak ako genetické markery naznačujúce dedenie znakov viazaných na cpDNA na potomstvo pri vnútrodrohových či medzidrohových kríženiach a na posúdenie rozsahu genetickej variability cpDNA (Strauss *et al.*, 1989). PCR- RFLP je aplikácia štandardnej PCR na zistenie mutácie v sekvencii PCR produktu, ktorá vedie k zmene reštrikčného miesta. Určitý úsek DNA, v ktorom sa nachádza známa mutácia, meniaci reštrikčné miesto amplifikuje a potom sa produkt štiepi reštrikčnou endonukleázou. Prítomnosť mutácie, teda vznik alebo zánik reštrikčného miesta sa prejaví prítomnosťou fragmentov odlišnej dĺžky (Bauerová *et al.*, 2008). Chloroplastový

genóm je relatívne malý, čo umožňuje štiepenie tohto genómu pomocou restriktčných endonukleáz a klonovanie jednotlivých častí genómu. Restriktčné endonukleázy (restriktázy) rozoznávajú špecifické nukleotidové sekvencie na DNA a pri nájdení tejto sekvencie štiepia obe vlákna DNA (Bauerová *et al.*, 2008).

DNA rastlín je možné získať zo živých i mŕtvych pletív, pričom pre väčšinu analýz založených na DNA markeroch sú potrebné len nanogramové množstvá DNA (Parker *et al.*, 1998).

### **1.11 Využitie cpDNA pri hodnotení hybridizácie a introgresie v rode *Pinus***

V porovnaní s jadrovým genómom, chloroplastový genóm počas evolúcie podliehal omnoho pomalšiemu vývoju, je menej zložitý a preto umožňuje sledovanie fylogeniezy mnohých druhov. Na rozdiel od jadrového genómu sú genómy chloroplastov haploidné, uniparentálne dedené a nepodliehajú sexuálnej rekombinácii. Keďže rýchlosť mutácií chloroplastových génov v čase je pomalšia ako rýchlosť mutácií génov jadrovej DNA, poradie génov v cpDNA je vysoko stabilné. V rode *Pinus* bola pozorovaná značná genetická diverzita cpDNA. Pretože chloroplastové gény sa vyznačujú pomalou sekvenčnou evolúciou, gény ako *rbcL*, *psbA*, *psbD* a mnohé ďalšie gény kódujúce rozdielne tRNA sú často používané pre fylogenetické štúdium (Frascaria *et al.*, 1993).

Variabilita sekvencií chloroplastovej DNA bola zistená na základe elektroforetického štúdia rôznych fragmentov cpDNA po pôsobení restriktčnej endonukleázy, čo umožňuje okrem iného aj určenie taxonomického postavenia jedincov blízko príbuzných druhov a hybridov v oblastiach, kde sa prekrývajú areály výskytu viacerých druhov ihličnanov. U väčšiny nahosemenných rastlín sú maternálne a paternálne dedené cytoplazmatické markéry ukazovateľmi distribúcie semien a pelu. Oba cytoplazmatické genómy sú nerekombinantné haplotypy a majú pomalé tempo evolúcie sekvencií, čo umožňuje ľahkú selekciu druhovo – špecifických markérov a následné rozlíšenie rodičovských druhov (Wolfe *et al.*, 1987). V súčasnosti majú molekulárne markéry najlepší predpoklad byť prostriedkom pre analýzu nejasných prípadov introgresie (Rieseberg *et al.*, 1988; Doebley, 1989). Paternálne prenášané cpDNA markéry môžu byť použité na identifikáciu hybridných jedincov a zhodnotenie súčasných reprodukčných bariér medzi čistými druhmi. U väčšiny nahosemenných

rastlín je plastidový genóm dedený paternálne. Aplikácia druhovo diagnostických cpDNA markérov v analýzach haplotypov rodičovských jedincov a F1 generácii sa používa na odhalenie kríženia medzi druhmi, či už jednotlivu alebo v kombinácii s inými ukazovateľmi.

Song *et al.* (2003) sa zaoberali analýzou sekvencie a reštrikčného miesta paternálne dedeného chloroplastového *rbcL* génu a maternálne dedeného mitochondriálneho génu *nad1* z rovnakej skupiny populácií a jedincov medzi *Pinus tabulaeformis* a *Pinus yunnanensis*. Skúmali otcovské zloženie populácií *Pinus densata* založenej na sekvencii chloroplastového *rbcL* génu. Boli nájdené dve variabilné miesta a tri chlorotypy na *rbcL* géne. *Pinus densata* zahŕňa tri chlorotypy, pričom dva (TT, GC) sú charakteristické pre rodičovské druhy. Tretí chlorotyp (TC), bol značne rozšírený v 7 z 10 analyzovaných populácií *Pinus densata*. Môže predstavovať mutačný typ, alebo mohol byť získaný z vyhynutých rodičov. U rodičovských druhov chýbal. Jeho extenzívnu distribúciu vysvetľujú Song *et al.* (2003) štyrmi hypotézami.

1. Chlorotyp TC môže pochádzať z cpDNA pôvodného otca. V tomto prípade by starootcovské jedince z populácií *Pinus tabulaeformis* a *Pinus yunnanensis* museli obsahovať TC chlorotyp, čo však absencia tohto typu v súčasných populáciách týchto druhov robí túto hypotézu málo pravdepodobnou. TC chlorotyp vyskytujúci sa u pár jedincov v okrajových populáciách *Pinus yunnanensis* je pravdepodobne výsledkom spätného kríženia medzi *Pinus densata* a *Pinus yunnanensis*.

2. Tento chlorotyp môže byť výsledkom intermolekulárnej rekombinácie medzi chlorotypmi TT a GC, čo je však tiež nepravdepodobné, nakoľko chloroplasty sa nededia biparentálne a aj rekombinácie cpDNA sú veľmi ojedinelé.

3. Chlorotyp mohol byť získaný od iných, už vyhynutých druhov, ktoré sa podielali na speciácii druhu *Pinus densata*. Pri analýze cpDNA – RFLP Wang a Szmidt (1994) našli existenciu nového chlorotypu v každej analyzovanej hybridnej populácii.

4. Chlorotyp TC môže byť produktom mutácie.

Distribúcia chlorotypov spolu s mitotypmi indikuje, že významný zakladajúci efekt a spätné kríženia sa odohrali počas založenia populácie hybridnej borovice. Tak *Pinus tabulaeformis* ako aj *Pinus yunnanensis* sa prejavovali ako materský, aj ako otcovský druh, čo znamená, že v minulosti existoval obojsmerný génový tok medzi dvoma rodičovskými druhmi.

Introgresívnu hybridizáciu medzi druhmi *Pinus taeda* L. a *Pinus echinata* Mill. popisuje Chen *et al.* (2002), ktorí použili kombinovaný prístup pri skúmaní

hybridizácie medzi oboma druhmi, zahrňujúci morfológické znaky, alozýmový markér IDH, paternálne dedený cpDNA markér a SSR markéry.

Dedičnosť založená na chloroplastových genómoch *Pinus echinata* Mill., *Pinus taeda* L. a *Pinus elliotti* Engelm. bola skúmaná prostredníctvom analýzy polymorfizmu medzigénovej oblasti *trnL-trnF*. Medzi týmito tromi blízko príbuznými druhmi sa uvedený segment cpDNA značne odlišuje (Chen *et al.*, 2002). Natívna polyakrylamidová elektroforéza *trnL-trnF* medzigénovej oblasti dokázala, že hybridy F1 generácie z kríženia medzi *Pinus elliotti* (semená) a *Pinus echinata* (peľ) vykazujú profil *Pinus echinata*, čím sa potvrdilo, že chloroplastový genóm je u druhov rodu *Pinus* dedený paternálne.

Zhodnotením reprodukčných bariér medzi blízko príbuznými druhmi v rode *Pinus* s použitím DNA markérov sa zaoberali Wachowiak *et al.* (2005). Hypotéza prirodzenej hybridizácie bola testovaná umelým krížením, pričom DNA markéry boli navrhnuté na overenie úspešnosti umelej hybridizácie. Tieto experimenty boli tiež použité na stanovenie dedičnosti fenotypových znakov zahrňujúcich rezistenciu na patogény (Kormuťák a Lanáková, 1988; Prus-Głowackia a Stephan, 1998). Kontrolné kríženie medzi 12 klonmi *Pinus montana* var. *rostrata* (z komplexu *Pinus mugo*) a ôsmymi klonmi *Pinus sylvestris* odhalilo, že len dva jedince *Pinus sylvestris* úspešne oplodnili *Pinus montana* (Wachowiak *et al.*, 2005). Išlo o medzidruhové kríženie a v prípade *Pinus sylvestris* aj o vnútrodruhové kríženie. Na overenie druhovej čistoty rodičovských klonov boli použité dva druhovo diagnostické cpDNA markéry, a to *DraI* restriktčné miesto polymorfizmu v *trnL-trnF* oblasti (Wachowiak *et al.*, 2000) a mikrosatelitná oblasť Pt 41093, ktorú charakterizoval Vendramin *et al.* (1996). Týmito markérmí bolo jednoznačne potvrdené, že všetky materské jedince *Pinus montana* patria do komplexu *Pinus mugo*. Toto potvrdzuje ich druhovú čistotu, ako aj blízke genetické vzťahy v komplexe *mugo*. Šesť klonov *Pinus sylvestris* nieslo očakávaný haplotyp *Pinus sylvestris*. Dva klony *Pinus sylvestris*, ktoré úspešne oplodnili *Pinus montana* vykázali chloroplastový haplotyp komplexu *Pinus mugo*. Vysoká polymorfnosť cpDNA mikrosatelitných markérov u rodičov a potomstva vylúčila kontamináciu cudzím peľom a potomstvo všetkých kombinácií kríženia môžu byť jednoznačne priradené k jednotlivým donorom peľu. Wachowiak *et al.* (2005) usúdili, že dva klony úspešné v krížení reprezentujú fertílne hybridy medzi dvoma druhmi, pričom *Pinus mugo* je donorom peľu.



Polymorfizmus medzi *Pinus uliginosa* a *Pinus sylvestris* bol odhalený v *trnF-trnL* oblasti cpDNA. PCR- RFLP analýza jedincov *Pinus uliginosa* z dvoch izolovaných populácií odhalila *DraI* restričné miesto v tejto oblasti (Wachowiak *et al.*, 2005) napriek tomu, že v prdchádzajúcich výskumoch sa *DraI* restričné miesto nevyskytovalo v rámci v *trnF-trnL* oblasti cpDNA (Wachowiak *et al.*, 2000). Vzhľadom na to, že cpDNA sa prenáša u *Pinaceae* paternálne, vyvinutý PCR- RFLP marker je použiteľný na identifikáciu taxónov zúčastnených na fertilizácii. Premennivosť v druhovej diagnostike cpDNA haplotypov sadeníc a rodičovských jedincov bola naznačovaná aj u *Pinus uliginosa*, aj u *Pinus sylvestris*. Bolo to spôsobené recipročnou hybridizáciou medzi druhmi a produkciou hybridných semien v analyzovanej populácii. Hoci sa hybridizácia medzi *Pinus uliginosa* ako donorom peľu a *Pinus sylvestris* ako semenného jedinca javila ako obmedzená, bolo nájdených viac ako 2% hybridov v analyzovanej skupine potomkov *Pinus sylvestris*. Nízka frekvencia hybridizácie vytvára možnosť, že hybridné jedince sa môžu vyskytovať v sympatrických populáciách týchto druhov. Analýza cpDNA a biometrické štúdiá vykazovali druhovú čistotu u analyzovaných rodičovských jedincoch *Pinus uliginosa*. A predsa je možná existencia neobjavených hybridných jedincov v blízkom okolí rezervácie. V analyzovanej populácii teda prebieha ojedinelá hybridizácia medzi druhmi, menej obmedzená je ak *Pinus sylvestris* vystupuje ako semenný jedinec a génový tok medzi nimi je možný v oboch smeroch. Medzidruhové bariéry zamedzujú hybridizácii, teda peľové kríženie nepredstavuje nebezpečenstvo narušenia genofondu *Pinus uliginosa*.

Sympatrické populácie druhov *Pinus mugo* a *Pinus sylvestris* v strednej Európe boli podrobené analýzam cpDNA, ktoré potvrdili hybridný pôvod semien a prebiehajúcu introgresiu na základe špecifických cpDNA markérov (Wachowiak *et al.*, 2005a, 2005b, 2006a, 2006b, 2008; Kormuťák *et al.*, 2001, 2005, 2008).

## 2 CIEĽ PRÁCE

Hlavný cieľ práce spočíva v definovaní rozsahu introgresívnej hybridizácie predpokladaných hybridných rojov na lokalitách Habovka a Obšívanka na základe využitia druhovo- špecifických markérov cpDNA *Pinus sylvestris* a *Pinus mugo*.

V spojitosti s hlavným cieľom v práci posudzujeme životaschopnosť peľu hybridných rojov na lokalitách Habovka, Suchá Hora a Tisovnica a na kontrolných rodičovských populáciách na lokalitách Hruštín a Vrátna dolina. V rámci životaschopnosti peľu sa zameriavame hlavne na hodnotenie klíčivosti a meranie dĺžky peľových vrecúšok klíčiacich peľových zrn.

### 3 MATERIÁL A METÓDY

#### 3.1 Stručná charakteristika lokalít vybraných na hodnotenie intogresie

V práci sme sa zamerali na vybrané populácie borovice horskej (*Pinus mugo* Turra) a borovice lesnej (*Pinus sylvestris* L.) a ich predpokladané hybridné roje. Boli použité jedince hybridných rojov na lokalitách severnej Oravy, konkrétne na rašelinisku v Habovke – Medzi Bormi (Obrázok 1) a na vápencovom podklade na Obšívanke pri Terchovej (Obrázok 2). Ako kontrolné populácie boli použité populácia kosodreviny *Pinus mugo* z lokality Roháče v Západných Tatrách (Obrázok 3) a kontrolná populácia *Pinus sylvestris* lokality Hruštín (Obrázok 4). Zoznam a lokalizácia sledovaných lokalít sú uvedené v Tabuľke 3.



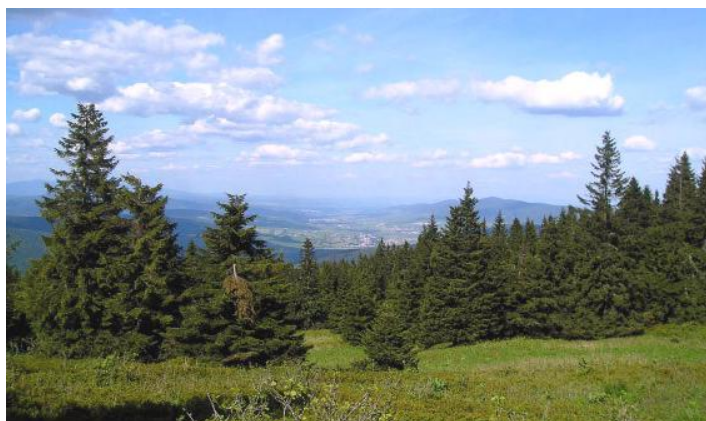
**Obrázok 1:** Lokalita Habovka (Kormuťák, 2009)



**Obrázok 2:** Lokalita Obšívanka (Kormuťák, 2009)



**Obrázok 3:** Lokalita Roháče (Kormuťák, 2009)



**Obrázok 4:** Lokalita Hruštín (Kormuťák, 2009)

**Tabuľka 3:** Zoznam lokalít vybraných na hodnotenie intogresie a ich umiestnenie

Druhy/ Hybridy	Lokalita	Nadmorská výška (m n.m.)	Zemepisná šírka	Zemepisná dĺžka
<i>P. sylvestris</i>	Hruštín	800	49° 19' 52"	19° 20' 53"
<i>P. mugo</i>	Roháče	1 600	49° 12' 27"	19° 44' 30"
Hybridný roj	Habovka	815	49° 16' 25"	19° 37' 14"
Hybridný roj	Obšívanka	1172	49° 14' 45"	19° 01' 24"

### 3.2 Sledovanie intogresie u predpokladaných hybridných populácií pomocou segmentu cpDNA *trnV-trnH*

Pri molekulárnej diagnostike jedincov z kontrolných populácií sa ako materiál použili čerstvo vyrašené ihlice, ktoré boli po zbere v jarnom období 2010 zmrazené pri

teplote  $-80^{\circ}\text{C}$  až do ich laboratórneho spracovania. Z oboch kontrolných populácií sme analýze podrobili po 10 jedincov. Na lokalite Habovka sme podrobili analýze 10 jedincov, zatiaľ čo na lokalite Obšivanka 19 jedincov. DNA ihlíc sme používali pri určovaní haplotypov jednotlivých stromov. Z uvedených jedincov sme v jesennom období 2010 zozbierali aj zrelé šišky, ktorých embryá sme použili pri určovaní rozsahu introgresívnej hybridizácie a to na základe porovnania haplotypov cpDNA príslušného materského jedinca a haplotypov jeho embryí. Celkovo sme použili 10-15 embryí/strom.

### 3.2.1 Extrakcia DNA z ihlíc

Ihlice slúžili ako východiskový materiál pri extrakcii DNA, ktorú sme uskutočnili pomocou CTAB metódy podľa Murray a Thompson (1980):

- 0,5 g ihlíc sa rozdrví v tekutom  $\text{N}_2$
- po pridaní 7 ml extrakčného pufu sa ihlice zhomogenizujú, homogenát sa prefiltruje cez Miracloth
- centrifugácia pri 12 500 rpm/20 min./ $4^{\circ}\text{C}$
- resuspendácia sedimentu v 350  $\mu\text{l}$  resuspendačného pufu, po pridaní 25  $\mu\text{l}$  20% sarkosylu inkubácia 45 minút pri izbovej teplote
- po pridaní 70  $\mu\text{l}$  5M NaCl premiešanie, následné pridanie 55  $\mu\text{l}$  8,6% CTAB, premiešanie a inkubácia 30 minút pri  $65^{\circ}\text{C}$
- po pridaní 600  $\mu\text{l}$  zmesi chloroform-izoamylalkohol v pomere 24:1 premiešanie
- centrifugácia /10 min./ $4^{\circ}\text{C}$
- po opätovnom pridaní 600  $\mu\text{l}$  zmesi chloroform-izoamylalkohol v pomere 24:1 premiešanie
- pridá sa 400  $\mu\text{l}$  izopropanolu ( $-20^{\circ}\text{C}$ )
- centrifugácia pri 12 000 rpm/10 min./ $4^{\circ}\text{C}$
- po pridaní 1 ml 10 mM octanu amonného v 76% EtOH sa zmes nechá stáť pri izbovej teplote 1 až 2 hodiny
- centrifugácia pri 12 000 rpm/10 min./ $4^{\circ}\text{C}$
- k zrazenine sa pridá 1 ml 70% EtOH, premieša sa a nechá stáť 10 minút
- centrifugácia pri 12 000 rpm/10 min./ $4^{\circ}\text{C}$ , supernatant sa zleje a špičkou sa odsaje EtOH
- otvorené eppendorfký sa nechajú 5-10 minút vysušiť pri  $60^{\circ}\text{C}$

- zrazenina DNA sa rozpustí v 100 µl TE pufru s obsahom RNA-zy pri teplote 37°C počas 30 minút a následne cez noc v chladničke

Extrakčný pufor: 50mM Tris-HCl, pH 8,0 s obsahom 300mM sorbitolu; 5mM EDTA.Na<sub>2</sub>; 10% PEG 3350; 0,1% BSA; 0,1% 2-merkaptoetanolu; 0,1% spermidinu; 0,1% sperminu

Resuspendačný pufor: 50mM Tris-HCl, pH 8,0 s obsahom 350mM sorbitolu; 25mM EDTA.Na<sub>2</sub> a 0,1% 2-merkaptoetanolu

TE-pufor: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

### 3.2.2 Extrakcia DNA z embryí

Na izoláciu DNA z embrií sme použili jedince hybridných rojov Habovka a Obšívanka a jedince z kontrolných lokalít Hruštín (*P. sylvestris*) a Roháče (*P. mugo*). Samotná izolácia bola vykonaná pomocou izolačného kitu SiMax™ Genomic DNA Extraction kit (SBS Genetech Co., Ltd., Peking) podľa protokolu izolácie genomickej DNA z rastlinných pletív:

- embryo extirpované z klíčiaceho semena sa zhomogenizuje v 0,5 ml CTAB extrakčnom pufri, predhriatom na 65°C vo odnom kúpeli
- homogenát sa inkubuje 20 minút pri 65°C vo odnom kúpeli a potom sa k vzorke pridá 1 ml GN binding pufru
- po premiešaní sa vzniknutá horná zmes prenesie do komplexu Miniprep spin tube/Collection tube
- po 5 minútach stávia centrifugácia 30 sek. pri 13 000 rpm, tekutina z Collection tube sa odstráni
- zvyšok lyzátu sa znova prenesie do rovnakej spin kolónky, po 5 minútach stávia centrifugácia 30 sek. pri 13 000 rpm, tekutina z Collection tube sa opäť odstráni
- do spin kolónky sa pridá 0,5 ml Washing pufru, centrifugácia 30 sek. pri 13 000 rpm, krok sa opakuje 2 krát, pretečený Washing pufer sa vždy odstráni
- centrifugácia 30 sek. pri 13 000 rpm
- spin kolónka sa vloží do novej 1,5 ml mikroskúmavky a nechá sa postáť 3 min. s otvoreným vekom
- do stredu spin kolónky sa pridá 50 µl TE pufru predhriatom na 65°C vo odnom kúpeli  
a nechá sa postáť 3 min. pri izbovej teplote
- centrifugácia 1 min. pri 13 000 rpm

- izolovaná DNA je vhodná na ďalšie spracovanie (PCR-RFLP)

CTAB extrakčný pufor: 10 ml 1 mol/L Tris-HCl (pH 7,6), 14 ml 5 mol/L EDTA (pH 8,0); 1g DTT a 1g CTAB, H<sub>2</sub>O

### 3.2.3 PCR-RFLP analýza

PCR umožňuje selektívne namnoženie, resp. amplifikáciu požadovaného úseku DNA in vitro do miliónového počtu kópií. Amplifikácia DNA v PCR je cyklický proces, v ktorom sa 20 až 40 krát opakujú tri základné kroky: denaturácia dvojvláknovej DNA, hybridizácia- pripojenie primerov, resp. annealing primerov a polymerizácia, syntéza nových vlákien. PCR RFLP sa využíva na detekciu polymorfizmov v amplifikovanej DNA. U jedincov kontrolných populácií i hybridných rojov sme analyzovali cpDNA ihlíc a následne aj cpDNA embryí. Segment *trnV-trnH* cpDNA sme amplifikovali pomocou PCR za použitia primerov o sekvencii 5'-GCTCAGCAAGGTAGAGCACC-3' a 5'-CTTGGTCCACTTGGCTACGT-3' (Parducci a Szmitd, 1999). Všetky PCR reakcie prebiehali v 25μl reakčnej zmesi, ktorá pozostávala z 10 x PCR pufru (200 Mm Tris-HCl, pH8,4, 500 mM KCl); 1,5mM MgCl<sub>2</sub>; 64μM dNTP; 0,8 mM jednotlivých primerov; 1U Taq- polymerázy (Finnzymes) a 15-20 ng DNA.

Amplifikácia segmentu prebiehala v termocykléri BIOMETRA pri 35 cykloch s použitím daného teplotného profilu:

94°C 4 min. – počiatočná denaturácia

93°C 1 min. – denaturácia

56°C 1 min. (cpDNA) – annealing

72°C 2 min. – extenzia, syntéza vlákna DNA

72°C 10 min. – ukončenie syntézy vlákna DNA

PCR produkt segmentu *trnV-trnH* cpDNA sa následne podrobil štiepeniu endonukleázou *Hinf*I.

### 3.2.4 Elektroforéza

Úspešnosť amplifikácie sa overila nanesením 3μ PCR produktu na 1% agarózový gel s obsahom EtBr (0,5 mg. MI<sup>-1</sup>) a následnou elektroforézou v 1x TAE alebo TBE pufrí, pH 8,0. Elektroforéza je fyzikálno-chemická metóda, ktorá slúži na separáciu látok nesúcich elektrický náboj. Pomocou UV svetla s vlnovou dĺžkou 360 nm a porovnaním so štandardným 1 kb markérom (Eurogentec) sa určila veľkosť amplifikovaných fragmentov, ktoré sa následne podrobili štiepeniu pomocou

endonukleázy *Hinf*I. Vzniknuté fragmenty sa elektroforeticky odseparovali v 2,5% agarózovom géli, prípadne aj pomocou PAGE v 8% polyakrylamidovom géli. Gély sa po vyfarbení etídium bromidom (EtBr) fotograficky zdokumentovali.

### **3.3 Stručná charakteristika lokalít vybraných na hodnotenie životaschopnosti peľu**

Pri stanovení životaschopnosti peľu sme použili peľ z predpokladaných hybridných populácií Habovka, Suchá Hora (Obrázok 5) a Tisovnica a z kontrolných populácií *Pinus sylvestris* v Hruštíne a *Pinus mugo* z lokality Kraviarske vo Vrátnej doline (Obrázok 6). Zoznam a lokalizácia sledovaných lokalít sú uvedené v Tabuľke 4.



**Obrázok 5:** Lokalita Suchá Hora (Kormuťák, 2009)



**Obrázok 6:** Lokalita Vrátna dolina (Kormuťák, 2009)



**Tabuľka 4:** Zoznam lokalít vybraných na hodnotenie životaschopnosti peľu a meranie dĺžky peľových vrecúšok

Druhy/ Hybridy	Lokalita	Nadmorská výška (m n.m.)	Zemepisná šírka	Zemepisná dĺžka
<i>P. sylvestris</i>	Hruštín	800	49° 19' 52"	19° 20' 53"
<i>P. mugo</i>	Vrátna dolina	1 230	49° 13' 20"	19° 02' 05"
Hybridný roj	Habovka	815	49° 16' 25"	19° 37' 14"
Hybridný roj	Suchá Hora	765	49° 23' 20"	19° 47' 11"
Hybridný roj	Tisovnica	810	49° 20' 32"	19° 45' 51"

### 3.4 Stanovenie životaschopnosti peľu v predpokladaných hybridných populáciách

V kontrolných populáciách bol peľ zozbieraný z 21 jedincov *P. sylvestris* (Hruštín) a 20 jedincov *P. mugo* (Vrátna dolina). Počet jedincov hybridných populácií, z ktorých bol zozbieraný peľ činil 21 v Habovke, 19 v Suchej Hore a 21 v Tisovnici. Peľ bol zozbieraný v období 30.5.- 8.6. 2011 a po vysušení a preosiatí bol uskladňovaný pri -20°C. Po týždňovom uskladnení sme začali s testovaním jeho kvality, a to nakličovaním in vitro na kultivačnom médiu s 1,5 % agarom a 10% obsahom sacharózy pri 25-26°C, po dobu 48 hodín. Každú vzorku (jedinca) sme vyhodnotili v trojnásobnom opakovaní za použitia 100 peľových zrn každého opakovania pri hodnotení klíčivosti a 30 peľových zrn pri hodnotení dĺžky peľových vrecúšok. Sledovali sme vitalitu peľu a dynamiku klíčenia peľu. Meranie sa uskutočnilo mikroskopicky na vzorkách peľu z jednotlivých stromov každej sledovanej populácie pri zväčšení 10 x 7.

### 3.5 Štatistické vyhodnotenie výsledkov

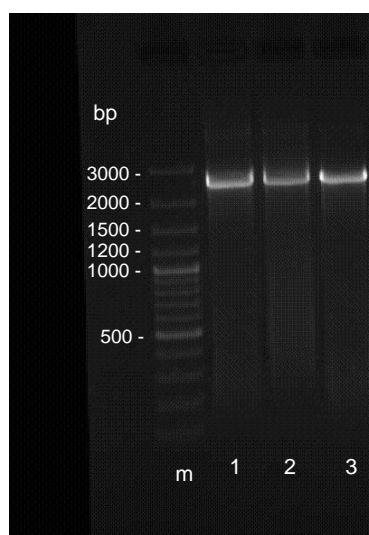
Porovnávací analýza získaných výsledkov z hodnotenia ukazovateľov fertility predpokladaných hybridných rojov a populácií rodičovských druhov sa vykonala jednoúrovňovou a dvojúrovňovou variačnou analýzou (ANOVA) s využitím softvéru Prism5 (GraphPad Software, Inc.).

## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Overenie introgresívnej hybridizácie u predpokladaných hybridných populácií pomocou segmentu cpDNA *trnV-trnH*

Molekulárny dôkaz prebiehajúcej introgresie medzi druhmi *Pinus sylvestris* a *P. mugo* na dvoch predpokladaných hybridných lokalitách severného Slovenska bol vykonaný pomocou PCR-RFLP analýzy cpDNA.

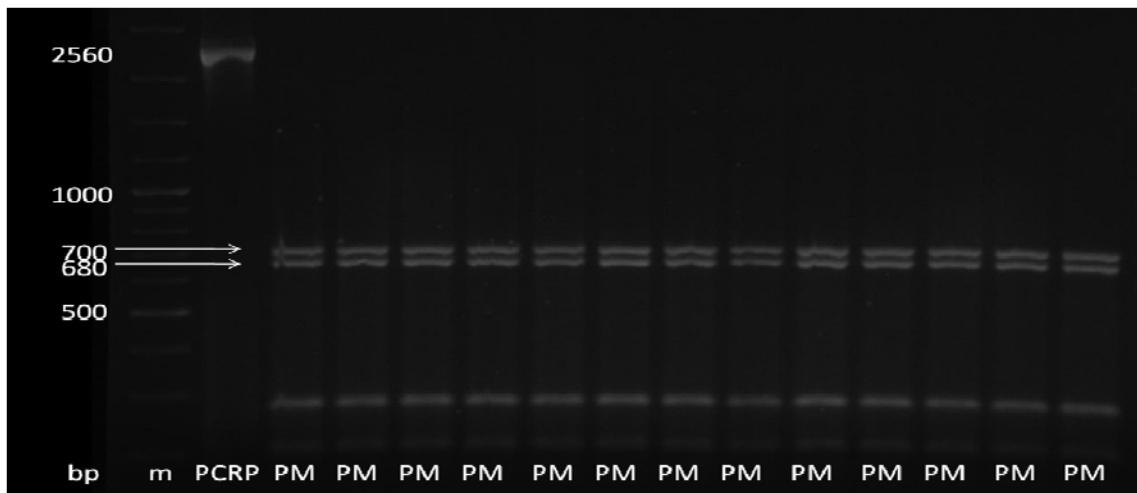
PCR-RFLP analýza cpDNA zahŕňala 10 jedincov predpokladaného hybridného roja Habovka (100 embryí) a 19 jedincov predpokladaného hybridného roja Obšivanka (185 embryí) spolu s 10 jedincami kontrolnej populácie *Pinus mugo* z lokality Roháče (100 embryí) a 10 jedincami kontrolnej populácie *Pinus sylvestris* z lokality Hruštín (153 embryí). Molekulárna analýza sa zakladala na paternálnom spôsobe dedenia cpDNA u ihličnanov a na druhovo-špecifických restričných profiloch segmentu cpDNA *trnV-trnH*. Jednotlivé haplotypy predpokladaných hybridných populácií boli porovnávané s charakteristickými haplotypmi rodičovských druhov *Pinus mugo* a *Pinus sylvestris*. Výsledkom amplifikácie *trnV-trnH* segmentu cpDNA bol PCR produkt o veľkosti 2560 bp (Obrázok 7).



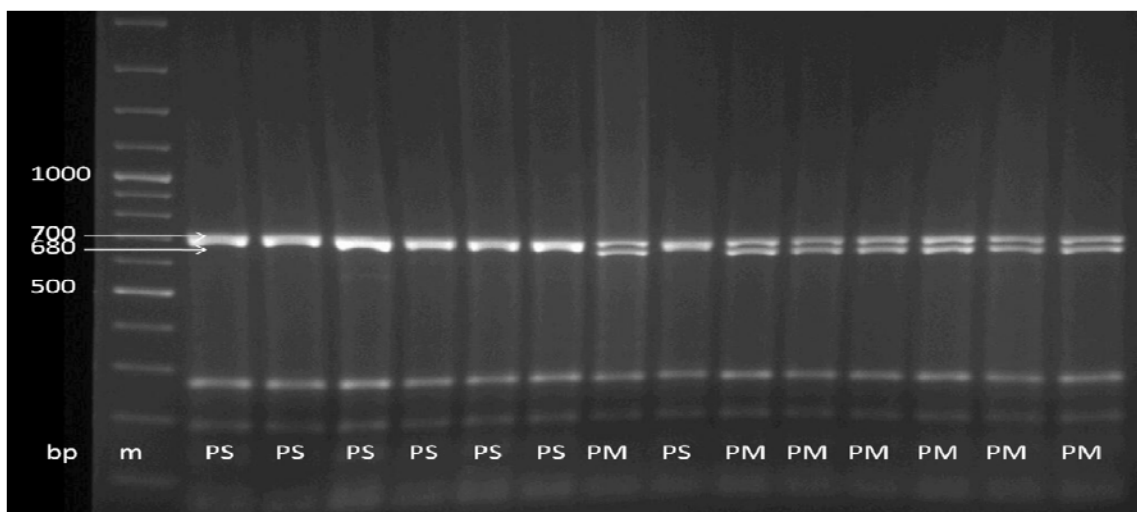
**Obrázok 7:** PCR produkty získané pomocou primera cpDNA (1-3); m- marker (Kormuťák, Braná, 2011)

PCR produkt po štiepení endonukleázou *HinfI* produkoval dve rozdielne restričné spektrá, ktoré sa líšili prítomnosťou fragmentu o veľkosti 680 bp pri druhu *P. sylvestris*,

kým restričné spektrum *P. mugo* vykazovalo iba prítomnosť fragmentu o veľkosti 700 bp (Obrázok 8 a 9).



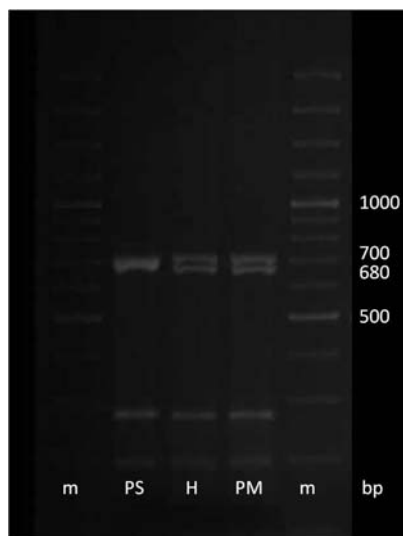
**Obrázok 8 :** PCR produkt a restričné profily *trnV-trnH / Hinf I* 13 jedincov s haplotypom *P. mugo*; PCR- PCR produkt, PM- *Pinus mugo*, m- marker (Kormuťák, Braná, 2011)



**Obrázok 9 :** Restričné profily *trnV-trnH / Hinf I* 14 jedincov s haplotypom *P. sylvestris* a *P. mugo*; PS- *Pinus sylvestris*, PM- *Pinus mugo*, m- marker (Kormuťák, Braná, 2011)

Nakoľko sme medzi semenami toho istého jedinca rozlíšili embryá s haplotypom *Pinus sylvestris*, ako aj embryá s haplotypom *Pinus mugo*, výsledky restričnej analýzy jednoznačne potvrdili prebiehajúci proces introgresie medzi druhmi *P. sylvestris* a *P. mugo* na oboch lokalitách predpokladaných hybridných rojov v Habovke a Obšivanke. Proces introgresie prebieha na sledovaných lokalitách v oboch smeroch, keďže embryá vykazovali znaky vnútrodruhovej, ako aj medzidruhovej hybridizácie. Na základe percentuálneho podielu hybridných embryí *P. sylvestris* x *P. mugo* a *P. mugo* x *P.*

*sylvestris* sme zistili, že proces spontánnej hybridizácie je intenzívnejší na lokalite Habovka (45,00 – 11,25 %) ako na lokalite Obšívanka pri Terchovej (2,85 – 30,00 %). Na lokalite Habovka je väčší tok génov v smere *P. sylvestris* x *P. mugo*, čiže na tejto lokalite sa vyskytuje viacero hybridných jedincov *P. sylvestris* x *P. mugo* (45%). Naopak, na lokalite Obšívanka je tok génov väčší v smere *P. mugo* x *P. sylvestris* (30% jedincov). Paternálny charakter dedenia cpDNA ilustrovaný reštrikčnými profilmi *trnV-trnH/ HinfI* u materského jedinca *P. sylvestris* a otcovského jedinca *P. mugo* a ich hybrid sú znázornené na Obrázku 10.



**Obrázok 10 :** Paternálny charakter dedenia cpDNA u ihličnanov ilustrovaný reštrikčnými profilmi *trnV-trnH/ HinfI* u materského jedinca *P. sylvestris* (PS) a otcovského jedinca *P. mugo* (PM) a ich hybrid (H), m – markér (Kormuťák, Braná, 2011)

**Tabuľka 5:** Tok génov medzi *P. mugo* a *P. sylvestris* v hybridných populáciách Habovka a Obšívanka a v kontrolných populáciách Hruštín a Roháče

Lokalita	Rok	Jedinec		Celkový počet analyzovaných embryí	Haplotyp embryí		Hybridné embryá (%)
		Haplotyp	Počet		<i>P. sylvestris</i>	<i>P. mugo</i>	
Habovka	2010	<i>P. sylvestris</i>	2	20	11	9	45
		<i>P. mugo</i>	8	80	9	71	11,25
Obšívanka	2010	<i>P. sylvestris</i>	18	175	170	5	2,85
		<i>P. mugo</i>	1	10	3	7	30
Hruštín	2009	<i>P. sylvestris</i>	10	153	153	0	0
Roháče	2009	<i>P. mugo</i>	10	100	0	100	0

Počet sledovaných jedincov a podiel hybridných embryí, resp. tok génov v rámci populácií je znázornený v Tabuľke 5. V rámci kontrolných populácií dokázala analýza cpDNA z ihlíc a embryí výlučne haplotypy jedincov *P. sylvestris* na lokalite Hruštín a haplotypy *P. mugo* na lokalite Roháče, čo znamená, že na týchto lokalitách sa nachádzajú výhradne druhovo čisté jedince.

#### **4.2 Hodnotenie životaschopnosti peľu u hybridných populácií a kontrolných populácií**

Pri hodnotení klíčivosti peľu a meraní peľových vrecúšok sme použili jedince z predpokladaných hybridných rojov na lokalitách Habovka (21 jedincov), Suchá Hora (19 jedincov) a Tisovnica (21 jedincov) a jedince z kontrolných populácií *P. sylvestris* Hruštín (21 jedincov) a *P. mugo* Vrátna dolina (20 jedincov). Každého jedinca sme vyhodnotili v trojnásobnom opakovaní pri hodnotení klíčivosti a pri hodnotení dĺžky peľových vrecúšok sme vyhodnotili 30 peľových zrn v každom z troch opakovaní u jednotlivých jedincov.

Pri sledovaní vplyvu uskladnenia na klíčivosť a dĺžku peľových vrecúšok sme vyhodnocovali životaschopnosť peľu z populácií *P. sylvestris* a *P. mugo*. Peľ bol z lokalít zozbieraný v období 30.5.- 8.6. 2011, spracovaný sušením a preosievaním a následne uskladnený pri teplote – 20°C. Vplyv uskladnenia sme sledovali v troch opakovaniach. Prvá kontrola sa uskutočnila po vysušení a preosianí na čerstvom pele 14.6. 2011, druhá po 10 dňoch uskladnenia pri -20°C 25.6. 2011 a tretia po ďalšom uskladnení pri -20°C 6.7. 2011.

Najvyššie hodnoty klíčivosti vykazoval čerstvý peľ- viac ako 95%. Pri prvej kontrole hodnoty klíčivosti peľu mierne poklesli (91,5%), ale pri druhej kontrole opäť stúpili (93,83%). Rovnakú tendenciu mali aj hodnoty pri meraní dĺžky peľových vrecúšok. Pri čerstvom peľi sme namerali priemernú dĺžku peľového vrecúška skoro 160 µm, po desiatich dňoch priemerná dĺžka značne poklesla (112,38 µm). Po 20 dňoch priemerná dĺžka peľového vrecúška opäť stúpila a dosahovala najvyššie hodnoty (173,58 µm) Výsledky hodnotenia životaschopnosti peľu počas uskladnenia sú znázornené v Tabuľke 6.

**Tabuľka 6:** Životaschopnosť peľu v priebehu krátkodobého uskladnenia pri - 20°C (Spojené hodnoty peľových zŕn *P. sylvestris* a *P. mugo*)

<i>P. sylvestris</i> + <i>P. mugo</i>	Klíčovosť (%)		Dĺžka peľových vrecúšok (µm)	
	Priemer ± s.o.	DT	Priemer ± s.o.	DT
Čerstvý peľ	95,16 ± 4,16	A	159,92 ± 52,00	B
Uskladnený 10 dní	91,50 ± 5,46	B	112,38 ± 39,46	C
Uskladnený 20 dní	93,83 ± 5,19	AB	173,58 ± 47,84	A

DT- Duncanov test

Pri hodnotení klíčivosti peľových zŕn počas uskladnenia pomocou variačnej analýzy sme zistili vysoko štatistický vplyv typu vzorky na klíčivosť (0,0001), čiže v rámci klíčivosti sa odlišujú peľové zrná jedincov populácií *P. sylvestris* a *P. mugo*. Štatisticky významná hodnota (0,0472) sa preukázala aj v rámci vplyvu uskladnenia na klíčivosť peľu. Avšak závislosť medzi typom vzorky a uskladnením je štatisticky nepreukazná (0,7576). Hodnoty v závislosti na type vzorky a uskladnení pri klíčivosti peľových zŕn sú znázornené v Tabuľke 7.

**Tabuľka 7 :** Variačná analýza klíčivosti peľových zŕn počas uskladnenia

Zdroj variability	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F-hodnota	Pv > F	Koeficient variancie (%)
Vzorka	1	0,14333759	0,14333759	43,18	0,0001	71,98
Uskladnenie	2	0,02642449	0,01321224	3,98	0,0472	9,30
Vzorka/ Uskladnenie	2	0,00188591	0,00094295	0,28	0,7576	0,36
Chyba	12	0,0398315				15,10
Spolu	17	0,21147948				

Pri hodnotení dĺžky peľových vrecúšok pomocou variačnej analýzy v súvislosti s uskladnením sa preukázali štatisticky významné hodnoty aj pri sledovaní typu vzorky (0,0001) aj pri sledovaní vplyvu uskladnenia (0,0001). To znamená, že na dĺžku peľových vrecúšok vplýva, či peľ pochádza z jedincov *Pinus sylvestris*, alebo *Pinus mugo*, ako aj samotné uskladnenie. Na rozdiel od klíčivosti, na dĺžku peľových vrecúšok štatisticky významne vplýva aj súvislosť medzi typom vzorky a uskladnením (0,0482). Hodnoty v závislosti na type vzorky a uskladnení pri dĺžke peľových vrecúšok sú znázornené v Tabuľke 8.

**Tabuľka 8:** Variačná analýza dĺžky peľových vrecúšok počas uskladnenia

Zdroj variability	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F-hodnota	Pv > F	Koeficient variancie (%)
Vzorka	1	84225,06	84225,06	41,79	0,0001	8,36
Uskladnenie	2	371498,13	185749,06	92,17	0,0001	29,80
Vzorka/ Uskladnenie	2	12294,17	6147,08	3,05	0,0482	1,47
Chyba	534					60,19
Spolu	539					

Z Tabuľky 9 vyplýva, že priemerná životaschopnosť peľových zŕn počas celej doby uskladnenia sa výrazne odlišuje pri porovnaní populácie *P. sylvestris* a populácie *P. mugo*. Tieto dva druhy sa výrazne odlišujú v klíčivosti počas uskladnenia, pričom môžeme konštatovať, že klíčivosť jedincov *P. mugo* (97,44%) je vyššia ako klíčivosť jedincov *P. sylvestris* (89,95%). Podobné výsledky sú zrejmé aj pri meraní dĺžky peľových vrecúšok počas uskladnenia. Pri každom jedincovi sa sledovalo 30 peľových zŕn. Jedince populácie *P. mugo* sú charakteristické dlhšími peľovými vrecúškami klíčiach zŕn, dosahujú priemernú hodnotu vyše 160  $\mu\text{m}$ . Priemerná hodnota dĺžky peľových vrecúšok jedincov *P. sylvestris* je iba niečo vyše 136  $\mu\text{m}$ .

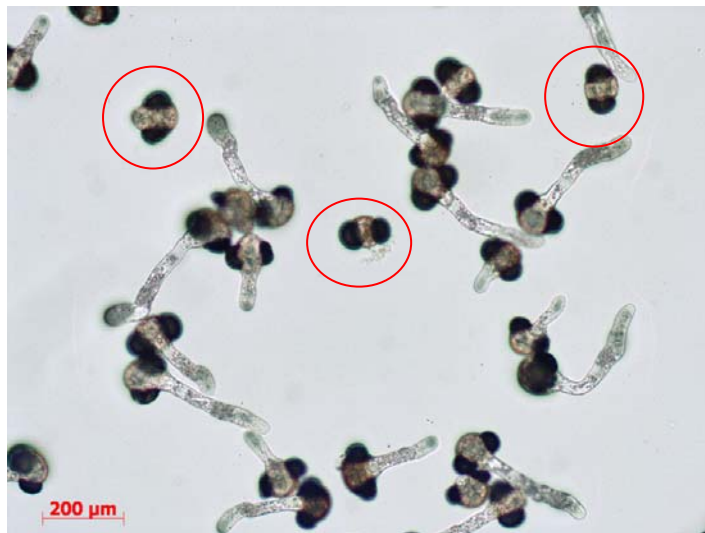
**Tabuľka 9:** Priemerná životaschopnosť peľových zŕn podľa druhov za celé obdobie uskladnenia

Populácia	Lokalita	Klíčivosť (%)					Dĺžka peľových vrecúšok ( $\mu\text{m}$ )				
		N	Priemer $\pm$ s.o.	min	max	DT	N	Priemer $\pm$ s.o.	min	max	DT
<i>P. sylvestris</i>	Hruštín	9	89,95 $\pm$ 3,71	82	94	B	270	136,14 $\pm$ 51,05	17	328	B
<i>P. mugo</i>	Vrátna	9	97,44 $\pm$ 1,66	95	100	A	270	161,12 $\pm$ 53,10	51	323	A

DT- Duncanov test, N pri klíčivosti- počet jedincov, N pri dĺžke peľových vrecúšok- počet sledovaných peľových zŕn

Pri analyzovaní životaschopnosti peľu hybridných rojov a čistých rodičovských populácií *P. sylvestris* a *P. mugo* sme zistili minimálne rozdiely. Analyzovali sme každého jedinca v troch opakovaníach (Habovka 21 x 3, Suchá Hora 19 x 3, Tisovnica 21 x 3, Hruštín 21 x 3, Vrátna dolina 20 x 3). Výnimkou boli hybridná populácia Tisovnica a kontrolná populácia Vrátna dolina, kde sme pozorovali zvýšenú klíčivosť peľových zŕn. Najvyšší podiel klíčiach peľových zŕn sme zaznamenali v populácii Vrátna dolina (94,68%) a najnižší v populácii Suchá Hora (86,19%). Na Obrázku 11 je

znázornený príklad jedinca so zníženou klíčivosťou peľových zŕn, pričom v červených krúžkoch sú zvýraznené neklíčiace peľové zrná. Obrázok 12 naopak ilustruje jedinca s vysokou klíčivosťou peľových zŕn. Aj pri analyzovaní hodnôt dĺžky peľových vrecúšok sme zistili minimálne rozdiely medzi hybridnými populáciami. Vyhodnotili sme 30 peľových zŕn v každom z troch opakovaní u jednotlivých jedincov. Jedinci kontrolných populácií boli charakteristickí peľovými zrnami s dlhšími peľovými vrecúškami v porovnaní s jedincami hybridných populácií, pričom priemerne najdlhšie peľové vrecúška sme pozorovali u jedincov z kontrolnej populácie *Pinus mugo* Vrátna dolina (133,84  $\mu\text{m}$ ) a najkratšie v populácii Suchá Hora (102,67  $\mu\text{m}$ ). Hodnoty klíčivosti a dĺžky peľových vrecúšok porovnávané medzi sledovanými populáciami sú znázornené v Tabuľke 10.



Obrázok 11 : Znížená klíčivosť peľových zŕn (Kormuťák, Braná, 2011)



Obrázok 12 : Zvýšená klíčivosť peľových zŕn (Kormuťák, Braná, 2011)



**Tabuľka 10:** Životaschopnosť peľu hybridných rojov a čistých rodičovských populácií *P. sylvestris* a *P. mugo*

Populácia	Lokalita	Klíčovosť (%)			Dĺžka peľových vrecúšok (µm)		
		N	Priemer ± s.o.	DT	N	Priemer ± s.o.	DT
<i>P. sylvestris</i>	Hruštín	63	88,26 ± 7,66	B	1890	123,00 ± 43,36	B
<i>P. mugo</i>	Vrátna	60	94,68 ± 3,88	A	1800	133,84 ± 44,89	A
Hybridný roj	Habovka	63	87,65 ± 19,73	C	1890	105,88 ± 50,14	C
Hybridný roj	Suchá Hora	57	86,19 ± 19,36	C	1710	102,67 ± 38,34	D
Hybridný roj	Tisovnica	63	94,52 ± 4,89	A	1890	103,04 ± 40,12	D

DT- Duncanov test, N pri klíčivosti- počet jedincov jednotlivých populácií x 3 opakovania, N pri dĺžke peľových vrecúšok- počet jedincov v troch opakovaniach x počet meraných peľových vrecúšok (30)

Pri sledovaní klíčivosti sme sa zamerali aj na hodnotenie podielu peľových zŕn s disifonickými a rozvetvenými peľovými vrecúškami pri jednotlivých hybridných rojoch a rodičovských populácií *P. sylvestris* a *P. mugo* (Tabuľka 11). Z nášho pozorovania vyplýva, že v hybridných populáciách Habovka a Suchá Hora bol nižší výskyt peľových zŕn s disifonickými a rozvetvenými peľovými vrecúškami, ako v kontrolných populáciách Hruštín a Vrátna dolina. Výnimku tvorí hybridná populácia Tisovnica, kde podiel peľových zŕn s disifonickými a rozvetvenými peľovými vrecúškami dosahoval hodnoty ako v kontrolných populáciách. Po porovnaní medzi populáciami môžeme konštatovať, že najvyšší podiel peľových zŕn s disifonickými a rozvetvenými peľovými vrecúškami bol zaznamenaný v rámci populácie Vrátna dolina (25,75%) a najnižší v rámci populácie Suchá Hora (14,15%). Na Obrázku 13 je v krúžku demonštrované disifonicky klíčiace peľové zrno a na Obrázku 14 sú demonštrované rozvetvené peľové vrecúška klíčiacych zŕn.



Obrázok 13 : Disifonicky klíčiace peľové zrná (Kormuťák, 2011)



Obrázok 14 : Peľové zrná s rozvetvenými peľovými vrecúškami (Kormuťák, 2011)

Tabuľka 11: Podiel peľových zrn s disifonickými a rozvetvenými peľovými vrecúškami pri jednotlivých hybridných rojoch a rodičovských populáciách *P. sylvestris* a *P. mugo*

Populácia	Lokalita	Disifonické a rozvetvené peľové vrecúška (%)		
		N	Priemer ± s.o.	DT
<i>P. sylvestris</i>	Hruštín	63	22,49 ± 12,17	B
<i>P. mugo</i>	Vrátna	60	25,75 ± 13,15	A
Hybridný roj	Habovka	63	15,28 ± 13,31	C
Hybridný roj	Suchá Hora	57	14,15 ± 10,82	C
Hybridný roj	Tisovnica	63	23,50 ± 19,96	B

DT- Duncanov test, N - počet jedincov jednotlivých populácií x 3 opakovania

Variačnou analýzou klíčivosti peľu (Tabuľka 12) sme medzi populáciami dokázali vysokú štatistickú preukaznosť (0,0241), avšak v rámci klíčivosti je najväčšia variabilita medzi jedincami, tzv. individuálna variabilita (0,0001). To dokazuje, že genetická dispozícia jednotlivých jedincov má väčší vplyv na klíčivosť peľových zŕn ako samotná populácia.

**Tabuľka 12:** Variačná analýza klíčivosti peľu v populáciách

Zdroj variability	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F-hodnota	Pv > F	Koeficient Variancie (%)
Populácia	4	1,06663077	0,26665769	2,94	0,0241	8,02
Jedinec/ Populácia	97	8,785622	0,09057342	25,9	0,0001	82,09
Chyba	204	0,71340638	0,00349709			9,87
Spolu	305	10,56565914				

Variačná analýza peľových zŕn s disifonickými a rozvetvenými peľovými vrecúškami v populáciách (Tabuľka 13) dokázala vysokú variabilitu medzi populáciami (0,0315), avšak variabilita medzi jednotlivými jedincami v populáciách je značne vyššia (0,0001).

**Tabuľka 13:** Variačná analýza peľových zŕn s disifonickými a rozvetvenými peľovými vrecúškami v populáciách

Zdroj variability	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F-hodnota	Pv > F	Koeficient variancie (%)
Populácia	4	6467,55	1616,88	2,77	0,0315	7,20
Jedinec/ Populácia	97	56627,84	583,79	23,68	0,0001	81,97
Chyba	204	5029,33	24,65			10,82
Spolu	305	68124,73				

Pri hodnotení dĺžky peľových vrecúšok klíčiach peľových zŕn v populáciách pomocou variačnej analýzy (Tabuľka 14) sme zistili značnú variabilitu ako medzi populáciami (0,0001), tak i medzi jednotlivými jedincami (0,0001).

**Tabuľka 14:** Variačná analýza dĺžky peľových vrecúšok v populáciách

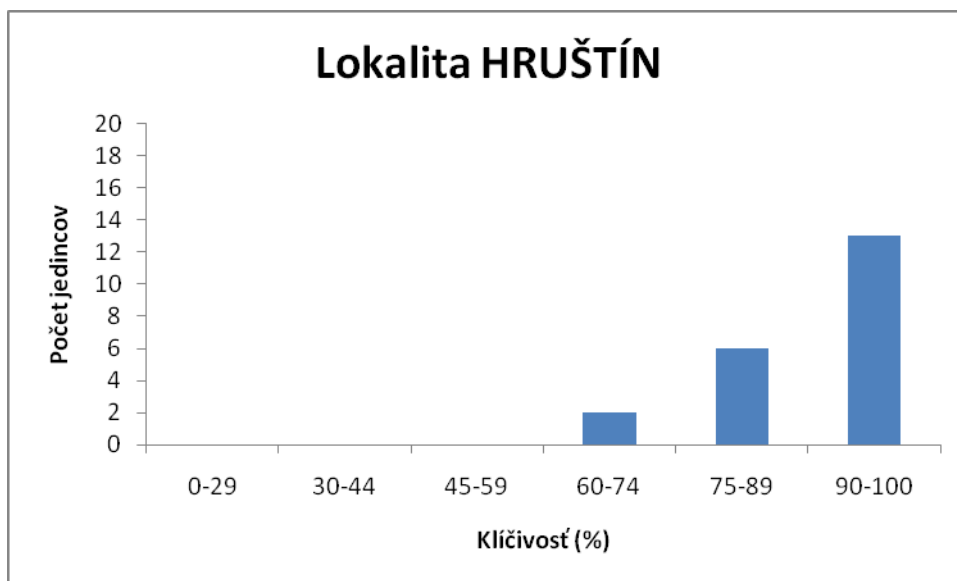
Zdroj variability	Stupne voľnosti	Suma štvorcov	Priemerný štvorec	F-hodnota	Pv > F	Koeficient Variancie (%)
Populácia	4	1432014,073	358003,518	7,65	0,0001	7,97
Jedinec/ Populácia	97	4537329,063	46776,588	32,8	0,0001	24,08
Chyba	9078	12944505,88	1425,92			67,93
Spolu	9179	18913849,01				

V práci sme sa zamerali aj na sledovanie početnosti klíčiach jedincov v rámci populácií a dĺžku ich peľových vrecúšok. V každej populácii sme hodnotili každého jedinca: *P. sylvestris* Hruštín- 21jedincov, *P. mugo* Vrátna dolina- 20 jedincov, Habovka- 21 jedincov, Suchá Hora- 19 jedincov, Tisovnica- 21 jedincov. Pri hodnotení klíčivosti sme vytvorili 6 kategórií pre každú lokalitu, pričom do úvahy sme brali najnižšiu a najvyššiu hodnotu klíčivosti pre všetky populácie v % (Tabuľka 15). Podľa počtu jedincov spadajúcich do jednotlivých kategórií podľa % klíčivosti sme vytvorili grafy početnosti.

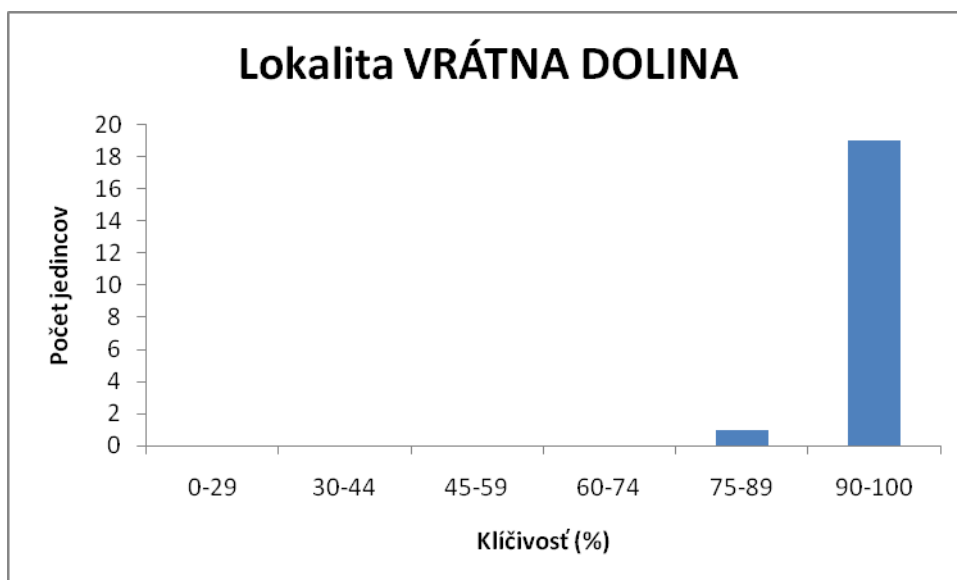
**Tabuľka 15:** Počty jedincov v jednotlivých lokalitách podľa % klíčivosti

Kategória (%)	Počet jedincov v jednotlivých lokalitách				
	HR	V	H	SH	T
0 -29	0	0	1	1	0
30- 44	0	2	0	0	0
45 -59	0	1	0	0	0
60- 74	2	1	0	0	0
75- 89	6	0	7	7	3
90- 100	13	17	11	11	18

Kontrolná populácia *P. sylvestris* Hruštín je charakteristická nulovým počtom jedincov v prvých troch kategóriách. Dvaja jedinci tejto lokality dosahujú klíčivosť 60- 74%, šiesti jedinci 75- 89% a najväčší počet jedincov dosahuje 90- 100% klíčivosť (Graf 1). V kontrolnej populácii *P. mugo* Vrátna dolina sme pozorovali výskyt jediného jedinca s 75- 89% klíčivosťou, ostatní jedinci v tejto populácii dosahovali 90- 100 % klíčivosť (Graf 2).

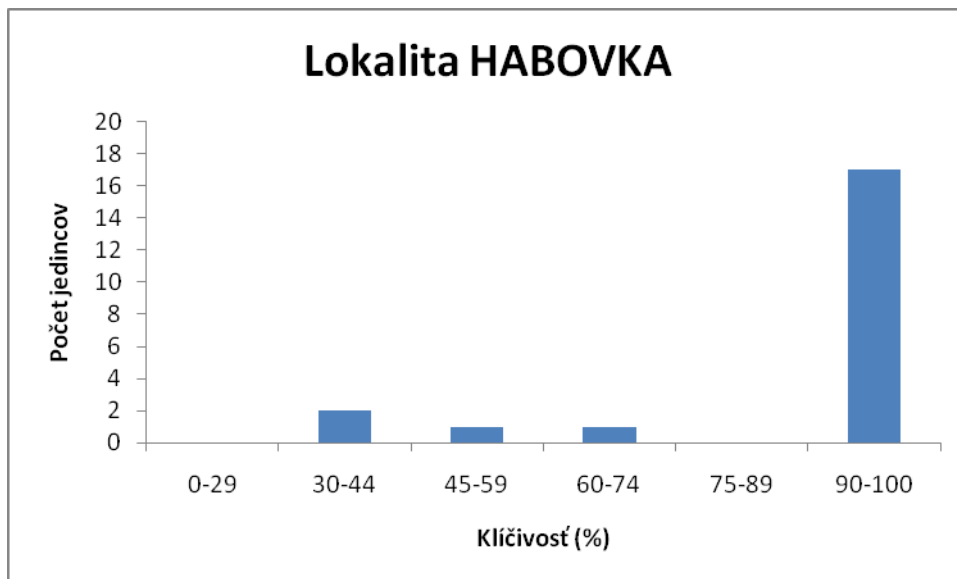


**Graf 1:** Početnosť jedincov lokality Hruštín na základe % klíčivosti

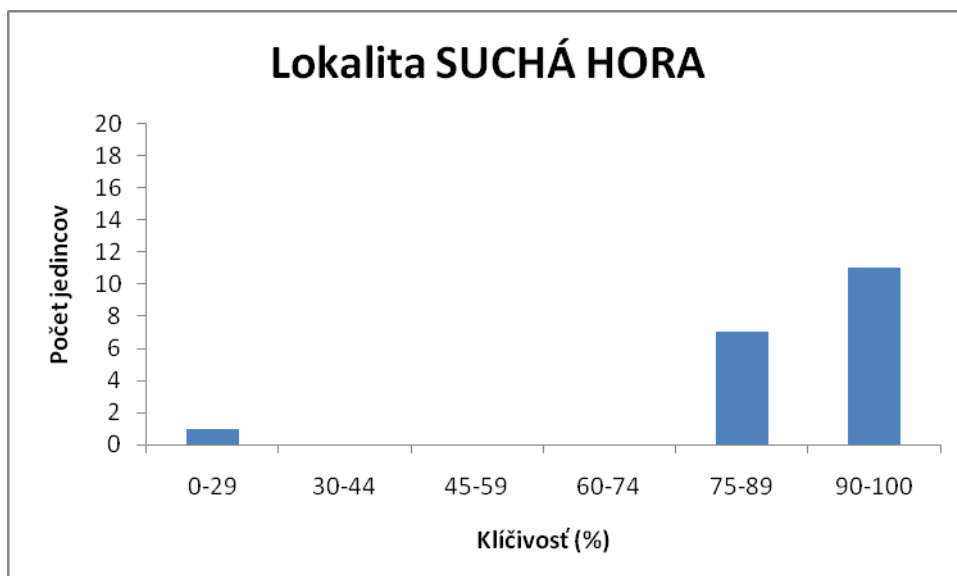


**Graf 2:** Početnosť jedincov lokality Vrátna dolina na základe % klíčivosti

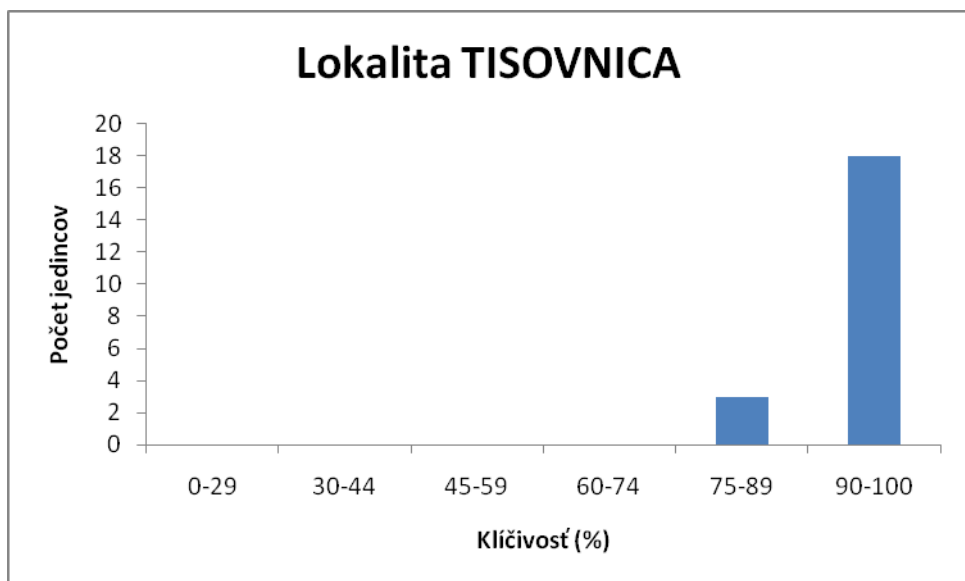
Dva jedince hybridnej populácie Habovka dosahovali 30-44 % klíčivosť, v kategórii 45-59 % a 60- 74% sme pozorovali výskyt po jednom jedincovi. Najviac jedincov malo 90-100 % klíčivosť (Graf 3). Na lokalite Suchá Hora spomedzi všetkých analyzovaných jedincov iba jeden dosahoval hodnoty veľmi nízkej klíčivosti 0- 29%, ostatné analyzované jedince spadali do kategórií klíčivosti 75-89 % (7 jedincov) a 90-100 % (11 jedincov) (Graf 4). Sledované jedince lokality Tisovnica dosahovali hodnoty klíčivosti 75-89 % (3 jedince), ostatné jedince (18) dosahovali hodnoty klíčivosti 90-100 % (Graf 5).



**Graf 3:** Početnosť jedincov lokality Habovka na základe % klíčivosti



**Graf 4:** Početnosť jedincov lokality Suchá Hora na základe % klíčivosti



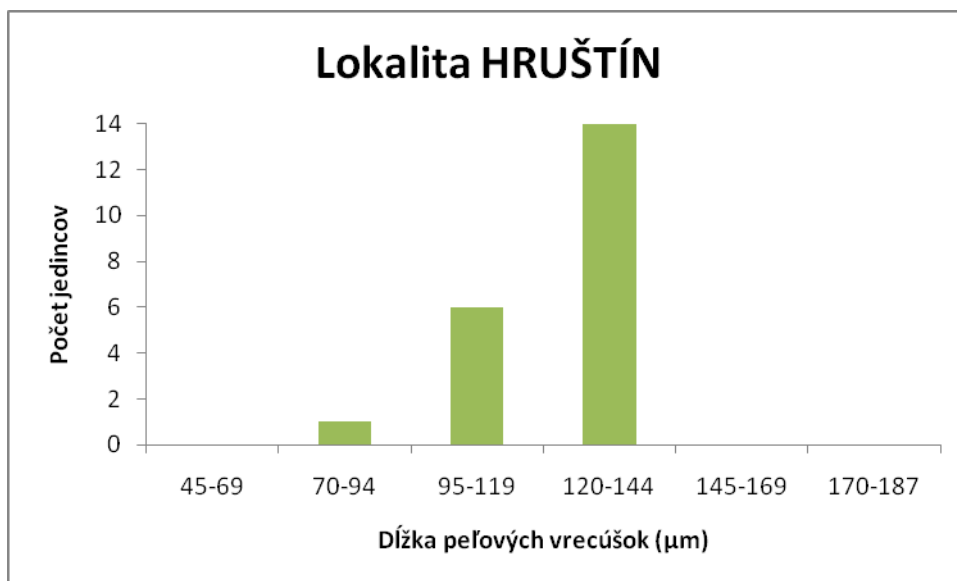
**Graf 5:** Početnosť jedincov lokality Vrátna dolina na základe % klíčivosti

Podobne ako pri hodnotení klíčivosti, aj pri hodnotení dĺžky peľových vrecúšok jednotlivých jedincov v rámci všetkých populácií sme vytvorili 6 kategórií pre všetky populácie, pričom do úvahy sme brali najnižšiu a najvyššiu hodnotu dĺžky peľových vrecúšok v  $\mu\text{m}$  (Tabuľka 16). Podľa počtu jedincov spadajúcich do jednotlivých kategórií podľa dĺžky peľových vrecúšok v  $\mu\text{m}$  sme vytvorili grafy početnosti.

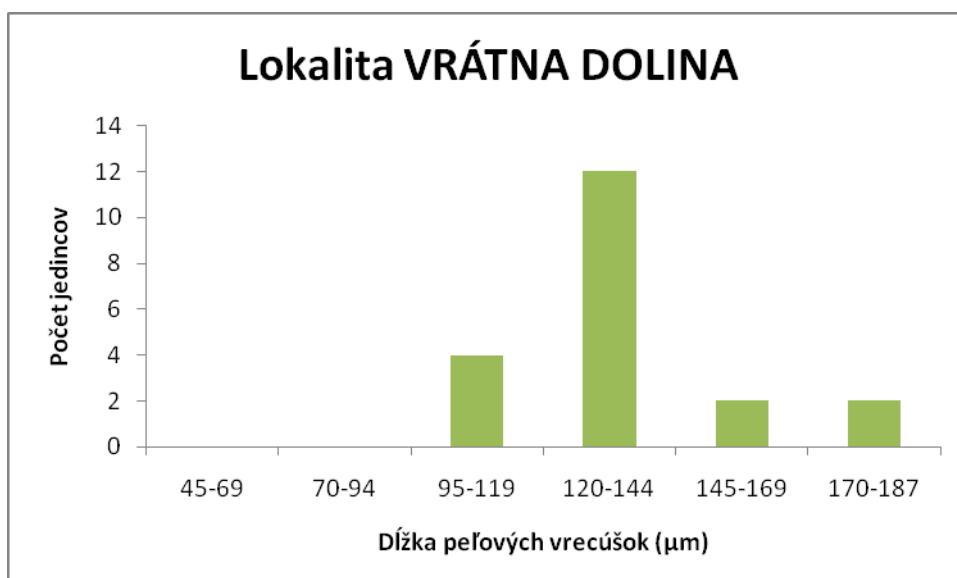
**Tabuľka 16:** Počty jedincov v jednotlivých lokalitách podľa dĺžky peľových vrecúšok v  $\mu\text{m}$

Kategória ( $\mu\text{m}$ )	Počet jedincov v jednotlivých lokalitách				
	HR	V	H	SH	T
45- 69	0	0	4	0	1
70- 94	1	0	5	7	5
95- 119	6	4	4	11	10
120- 144	14	12	5	1	5
145- 169	0	2	3	0	0
170- 187	0	2	0	0	0

Analyzovaní jedinci druhu *P. sylvestris* (Hruštín) dosahovali hlavne stredné hodnoty dĺžky peľových vrecúšok 95- 119  $\mu\text{m}$  (6 jedincov) a 120- 144  $\mu\text{m}$  (14 jedincov) , iba jeden analyzovaný jedinec dosahoval nižšie hodnoty dĺžky peľových vrecúšok 70- 94  $\mu\text{m}$  (Graf 6). Jedinci druhu *P. mugo* (Vrátna dolina) dosahovali spomedzi všetkých jedincov v jednotlivých populáciách najvyššie hodnoty dĺžky peľových vrecúšok 155- 169  $\mu\text{m}$  (2 jedince) a 170-187  $\mu\text{m}$  (2 jedince). Ostatné jedince v tejto kontrolnej populácii dosahovali stredné hodnoty dĺžky peľových vrecúšok (Graf 7).



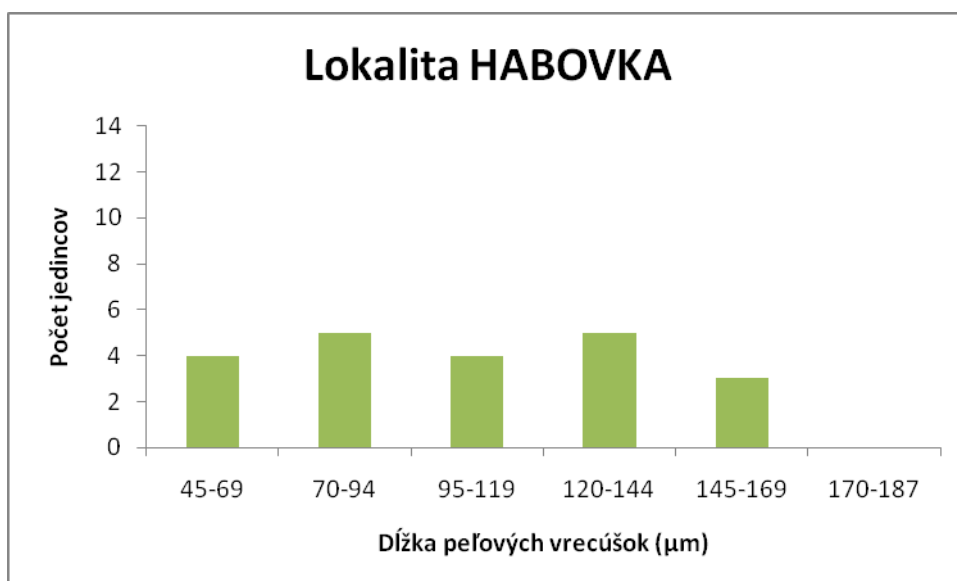
**Graf 6:** Početnosť jedincov lokality Hruštín na základe dĺžky peľových vrecúšok



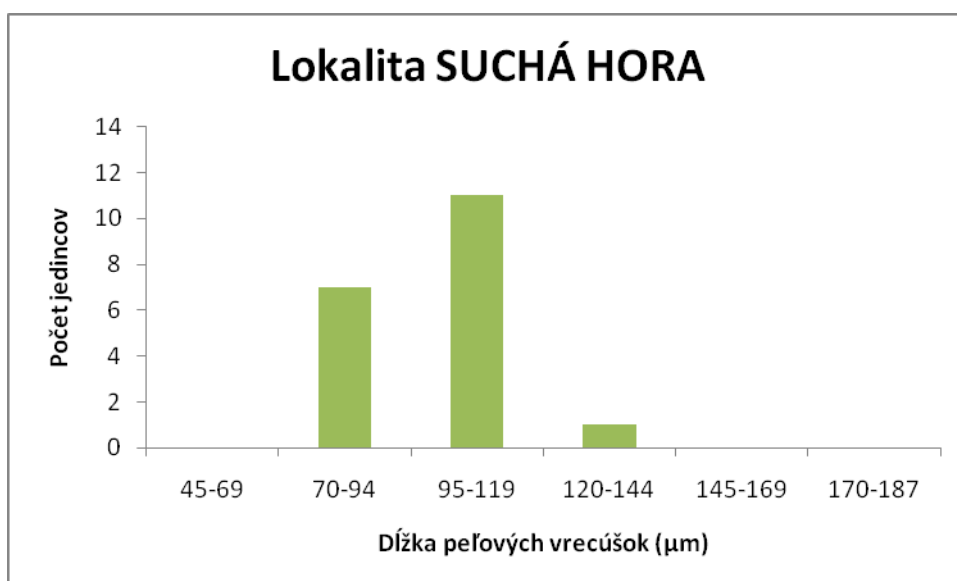
**Graf 7:** Početnosť jedincov lokality Vrátna dolina na základe dĺžky peľových vrecúšok

Medzi jedincami hybridnej populácie Habovka sme pozorovali najväčšie rozpätie jedincov do zadaných kategórií od najnižších hodnôt dĺžky peľových vrecúšok 45- 69 µm (4 jedince) až po vysoké hodnoty 145- 169 µm (3 jedince) (Graf 8). Jedinci hybridnej populácie Suchá Hora dosahovali stredné hodnoty dĺžky peľových vrecúšok od 70- 94 µm po 120- 144 µm (Graf 9), rovnako ako aj analyzovaní jedinci populácie Tisovnica (Graf 10). Individuálne hodnoty jednotlivých jedincov každej lokality sú zobrazené v Tabuľke 17, Tabuľke 18, Tabuľke 19, Tabuľke 20 a Tabuľke 21 v kapitole Prílohy.

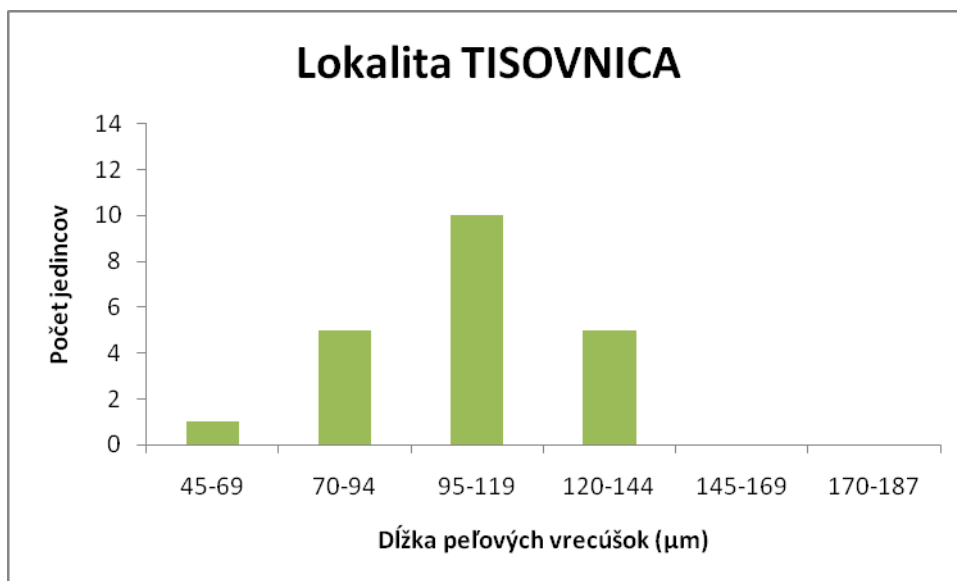




**Graf 8:** Početnosť jedinců lokality Habovka na základe dĺžky peľových vrecúšok



**Graf 9:** Početnosť jedinců lokality Suchá Hora na základe dĺžky peľových vrecúšok



**Graf 10:** Početnosť jedincov lokality Tisovnica na základe dĺžky peľových vrecúšok

## 5 DISKUSIA

Spontánna hybridizácia v rode *Pinus* je dôležitým faktorom ovplyvňujúcim evolúciu a ekológiu populácií borovíc. Hybridizácia medzi druhmi *Pinus sylvestris* a *Pinus mugo* bola v minulosti predpokladaná na základe habitusu jedincov. Avšak nájdením DNA markerov paternálne dedenej cpDNA pre druh *P. sylvestris* a pre komplex druhu *P. mugo* sa situácia výrazne zmenila. Metódy využívajúce druhovo-špecifické markery umožňujú overenie výsledkov kríženia a hybridizácie medzi druhmi. Wachowiak *et al.* (2005b) použili druhovo-špecifické markery cpDNA *trnL-trnF/ Dra I* na overenie hybridného pôvodu sadeníc z kontrolovaného recipročného kríženia medzi *P. sylvestris* a *P. mugo*, pričom preukázali nízky stupeň kompatibility medzi sledovanými druhmi. Počas trojročného experimentu nezistili u hybridov vznik plných semien v kombinácii *P. mugo* ako donor semien a *P. sylvestris* ako donor peľu. V jednom prípade, pri reciprokej kombinácii, kde ako donor peľu vystupoval druh *P. mugo* sa vyvinuli 4 plné semená (1%). Kritériom úspešného kríženia je práve vývin plných semien u hybridov. Aj keď sa v kontrolnom recipročnom krížení prejavil nízky stupeň krížiteľnosti (1%), dokázali, že v prípade *P. mugo* ako donora peľu je krížiteľnosť možná, aj keď s malým účinkom. Autori teda pozorovali hybridizáciu iba v jednom smere, aj keď nevyklúčujú možnosť, že hybridizácia medzi týmito druhmi môže prebiehať aj v opačnom smere, kde ako donor peľu vystupuje *P. sylvestris*. Rovnako Wachowiak *et al.* (2005a) využili restričné spektrum *trnL-trnF/ Dra I* na overenie hybridizácie medzi druhmi *P. uliginosa* (patrí do komplexu *P. mugo*) a *P. sylvestris*. *DraI* restričné miesto je typické pre druhy z komplexu *P. mugo*, ale u *P. sylvestris* pozorované nebolo. Pomocou diagnostiky založenej na *DraI* restričnom mieste autori zistili, že hybridizácia medzi *P. uliginosa* a *P. sylvestris* prebieha v oboch smeroch. Na základe toho zistenia nemôžeme považovať jednosmerný tok génov medzi druhmi *P. sylvestris* a komplexu *P. mugo* za nemenné pravidlo. Toto tvrdenie opierame o nami získané výsledky, z ktorých taktiež vyplýva, že medzi druhmi *P. sylvestris* a *P. mugo* na lokalitách Habovka a Obšivanka prebieha proces spontánnej introgesie v oboch smeroch. Na týchto lokalitách sme pomocou *trnV-trnH/ Hinf I* restričného spektra potvrdili hybridný charakter jedincov, ako aj hybridný charakter embryí a ich genetickú identitu s materským jedincom. Zistili sme, že proces spontánnej hybridizácie je intenzívnejší na lokalite Habovka (45- 11,25%) ako na lokalite Obšivanka (2,85-

30,00%), čo korešponduje s výsledkami, ku ktorým dospel Čamek (2009). Pre porovnanie, Čamek vo vzorke semien zozbieraných v roku 2008 zistil na základe percentuálneho výskytu hybridných embryí na lokalite Habovka 27,6 – 53,9 % a na lokalite Obšívanka 28 – 33,3 %. Podľa našich zistení na lokalite Habovka je väčší počet hybridných embryí *P. sylvestris* x *P. mugo* (45%) a na lokalite Obšívanka naopak jedincov *P. mugo* x *P. sylvestris* (30%). Avšak Čamek (2009) vo svojej práci prezentuje na lokalite Habovka vyšší podiel hybridných embryí *P. mugo* x *P. sylvestris* ako *P. sylvestris* x *P. mugo* a na lokalite Obšívanka pomer oboch typov embryí porovnateľný. Tento fakt si vysvetľujeme medziročnou variabilitou spôsobenou rozdielnymi klimatickými podmienkami, ktoré nie v rozhodujúcej, ale v značnej miere ovplyvňujú najmä procesy opelenia. Rovnako i Kormuťák *et al.* (2005) potvrdili intenzívnu introgresiu medzi *P. sylvestris* a *P. mugo* na lokalitách Habovka a Suchá Hora, čo potvrdzuje vzájomnú krížiteľnosť týchto druhov a naznačuje tok génov v oboch smeroch.

U hybridov sa všeobecne predpokladá vyššia životaschopnosť, ako výsledok heterózy, fenoménu hybridnej zdatnosti (Snustad, Simmons, 2009). Zároveň sú hybridné jedince charakteristické zníženou fertilitou, resp. čiastočnou sterilitou. Avšak sterilita je častý jav aj medzi „čistými druhmi“ rodu *Pinus*. Ako tvrdí Sax (1960), v rámci rodu *Pinus* je väčšina získaných medzidruhových hybridov životaschopná a relatívne fertílne, aj keď sa medzi niektorými druhmi vyskytujú prekážky ich vzájomnej krížiteľnosti. Kríženie medzi druhmi prebieha v rámci podrodov, ale nikdy nedochádza ku kríženiu medzi druhmi z rozdielnych podrodov. Borovice podrodu Haploxyton sú náchylné na medzidruhové kríženie, avšak s vysokou mierou úmrtnosti embryí ako hlavnou reprodukčnou bariérou medzi druhmi (Kriebel, 1972). U tvrdých borovic podrodu Diploxyton, kde patria i *P. sylvestris* a *P. mugo*, je najvýznamnejším faktorom reprodukčnej izolácie medzi druhmi gametofytická inkompatibilita. Wright (1959) a Gabriel (1957) v 55 pokusoch s druhmi tvrdých borovic sledovali 31 hybridov, ktoré zlyhali v tvorbe semien, avšak 23 hybridov a 1 predpokladaný hybrid boli v tvorbe semien úspešní. Sax (1960) tvrdí, že gametická sterilita hybridov môže byť skôr spôsobená genetickou inkompatibilitou, ako poruchami meiózy. Zlyhanie v produkcii semien je podľa Saxa (1960) zapríčinené neschopnosťou peľových vrecúšok prerásť do archeónia samičieho kvetu, alebo chemickými rozdielmi medzi peľom a nucelárnym tkanivom dvoch druhov. Priebeh meiózy autor sledoval na príklade druhu *Pinus parviflora* a troch medzidruhových hybridov: *P. griffithii* x *P. strobus*, *P. parviflora* x *P.*

*strobilus* a *P. balfouriana* x *P. parviflora*. Zistil, že priebeh meiózy bol v podstate totožný u hybridných jedincov ako u rodičovských druhov s tým rozdielom, že u hybridov sa objavila vyššia peľová sterilita. Štrukturálne zmeny chromozómov nie sú také podstatné, ako izolačné mechanizmy u druhov *Pinus*, teda genetická rozdielnosť inhibuje gametický rozvoj. Rovnako i Saylor a Smith (1966) pozorovali meiózu v rode *Pinus* u 21 druhovo „čistých“ jedincov a 22 medzidruhových hybridov. Zistili, že poruchy v priebehu meiózy sa vyskytujú v peľových bunkách sledovaných druhov aj hybridov, pričom frekvencia porúch bola vyššia u hybridných jedincov. Dochádzalo hlavne k predčasnej separácii chromozómov, výskytu nespárených chromozómov a chromozómových zlomov a k poruchám formovania jadierka v štádiu diád a tetrad. Hybridy, u ktorých bolo zistených najviac porúch redukčného delenie, produkovali najviac sterilných peľových zrn. Peľ má dominantný význam pri výmene génov. Znížená životaschopnosť medzidruhových hybridov *P. sylvestris* a *P. mugo* je v súčasnosti už čiastočne potvrdená (Kormuťák *et al.*, 2007).

V rámci hodnotenia životaschopnosti peľu sme potvrdili, že dĺžka peľových vrecúšok je hlavným ukazovateľom vitality peľu. Hodnoty dĺžky peľových vrecúšok v kontrolných populáciách s rodičovskými druhmi boli značne vyššie, ako hodnoty dĺžky peľových vrecúšok klíčiach peľových zrn u hybridných jedincov. Štatistická analýza potvrdila štatisticky významné rozdiely ako na úrovni jedincov, tak i na úrovni populácií. Aj Kormuťák *et al.* (2008) zistili, že priemerná dĺžka peľových vrecúšok u jedincov kontrolnej populácie *P. mugo* dosiahla hodnotu 80,41  $\mu\text{m}$ , pričom u jedincov hybridnej populácie Habovka bol priemer 67,79  $\mu\text{m}$  a u jedincov hybridnej populácie Suchá Hora len 55,44  $\mu\text{m}$ . Čamek (2009) rovnako potvrdil značné rozdiely v dĺžke peľových vrecúšok v porovnaní hybridných a kontrolných populácií. Pri hodnotení klíčivosti sme zaznamenali istú štatistickú preukaznosť aj medzi populáciami, avšak štatisticky markantné rozdiely sa prejavili medzi jedincami. Individuálna variabilita má na klíčivosť väčší vplyv ako populácia. Kormuťák *et al.* (2008) zaznamenali, že z celkového podielu 62,24% a 67,21% klíčiach peľových zrn hybridných populácií oproti 70,46% klíčiach peľových zrn *P. mugo* vyplýva redukcia životaschopnosti peľu o 5% v prípade hybridného roja v Suchej Hore a o 12% v prípade hybridného roja v Habovke vzhľadom na životaschopnosť peľu *P. mugo* z Roháčov. Štatisticky významné rozdiely preukázali iba na úrovni jedincov a nie medzi populáciami. Ostroľucká a Fleischer (1995) sledovali medziročnú a stanovištnú variabilitu klíčivosti peľu *P. mugo* na 7 lokalitách Vysokých Tatier. Autori zaznamenali priemernú klíčivosť

peľových zŕn v rozmedzí 48 – 76 % a priemernú dĺžku peľových vrecúšok v rozmedzí 82 – 123  $\mu\text{m}$ . Chira (1971) udáva hodnotu priemernej klíčivosti čerstvo zozbieraného peľu druhu *P. mugo* 60 %. Vysoké rozdiely v percentuálnych podieloch klíčivosti medzi nami získanými údajmi a údajmi od vyššie uvedených autorov sú pravdepodobne spôsobené metódou nakličovania peľových zŕn. V našej práci sme pri nakličovaní peľu použili ako kultivačné médium 1,5% agar s 10% obsahom sacharózy, Ostrolucká a Fleischer (1995) 1% agar s 7% obsahom sacharózy a Chira (1971) 1% agar s len 2% obsahom sacharózy.

## 6 ZÁVER

Význam hybridizácie a následného vzniku nových druhov v prírode je nesporný. Introgresívnou hybridizáciou dochádza k prenosu génov z jedného druhu na druhý a ich postupnej adaptácii. Hybridné potomstvo druhov *Pinus sylvestris* a *Pinus mugo* je relatívne ferlilné a odolné, schopné osídlovať stanovištia, kde sa rodičovské druhy nevyskytujú. Tieto vlastnosti sa môžu prejavovať v ďalšom prežívaní hybridov v prírode. Výsledky prezentované v predkladanej práci dokazujú existenciu introgresívnej hybridizácie v oboch smeroch na sledovaných lokalitách. Avšak definitívne zhodnotenie týchto populácií ako hybridných rojov by si vyžadovalo molekulárnu diagnostiku založenú na paralelnej analýze maternálne dedenej mtDNA a paternálne dedenej cpDNA, ktorá je účinným prostriedkom overenia ich hybridného charakteru, ako aj druhovej čistoty jednotlivých jedincov. Takáto molekulárna diagnostika môže s definitívnou platnosťou zodpovedať otázku genetického statusu doposiaľ iba predpokladaných hybridných rojov borovice na našom území. Výsledky získané pri sledovaní životaschopnosti peľu potvrdili, že predpokladané hybridné jedince produkujú menej vitálny peľ a podávajú dôkaz o čiasotčnej fertilitate hybridných jedincov spôsobenej gametofytickou inkompatibilitou a abortívnou embryogenezou. Tieto poznatky podporujú názor, že sa skutočne jedná o hybridné jedince vytvárajúce hybridné roje.

## 7 PRÍNOS PRÁCE

V minulosti sa hybridný charakter jedincov predpokladal len na základe ich habitusu a anatomických znakov ihlíc a šišíek. Až molekulárnymi analýzami založenými na druhovo- špecifických markeroch sa črtajú nové možnosti v sledovaní hybridných a introgresívnych procesov v rôznych populáciách.

V predkladanej práci sme sa zamerali na predpokladané hybridné roje na severe Slovenska a na lokalitách Habovka a Obšívanka sme pomocou markea cpDNA potvrdili introgresívnu hybridizáciu a tok génov v oboch smeroch. Práca poskytuje taktiež poznatky o životaschopnosti peľu predpokladaných hybridných jedincov a rodičovských druhov. Naše zistenia v korelácii so zisteniami iných autorov zaoberajúcimi sa danou problematikou môžu vytvoriť ucelený obraz o predpokladaných hybridných rojoch na Slovensku.

Veríme, že naše výsledky prispievajú ku konkretizácii údajov o diverzite a genofonde borovíc na našom území.



## 8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

ARNOLD, M.L. Natural hybridization and evolution. Oxford series in Ecology and Evolution. Oxford: Oxford University Press, 1997. 232 p. ISBN 0195099753

ARNOLD, M.L. Evolution Through Genetic Exchange. Oxford: Oxford University Press, 2006. 252 p. ISBN 0-19-857006-6; 978-0-19-857006-6

ARNOLD, M.L. – BUCKNER C.M. – ROBINSON J.J. Pollen mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1991. vol. 88, p. 1398-1402

BAUEROVÁ, M. – BAUER, M. – OMELKA, R. – MICHALÍK, I. – CHRENEK, P. – HRUBÍKOVÁ, K. – UHRÍN, P. Metódy analýzy génov a genómov. FPV UKF v Nitre, 2008. 197 s. ISBN 978-80-8094-408-7

BOBÁK, M. – HUDÁK, J. – LUX, A. – SEKERKA, V. – SLADKÝ, Z. – ZÁBORSKÝ, J. Botanika- Anatómia a morfológia rastlín. Bratislava: Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 1992. 395 s. ISBN 80-08-00687-0

BOBOWICZ, M. A. – STEPHAN, B. R. – PRUS-GLOWACKI, W. Genetic variation of F<sub>1</sub> hybrids from controlled crosses between *Pinus montana* var. *rostrata* and *Pinus sylvestris* in anatomical needle traits. In: *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2000. vol. 69, p. 207-214

BUSINSKÝ, R. Taxonomic assay in the *Pinus mugo* complex and its hybrid populations [Taxonomická studie agregátu *Pinus mugo* a jeho hybridných populácií]. In: *Acta Průhoniana*, 1999. vol. 68, p. 123-143

CRITCHFIELD, W. B. Interspecific hybridization in *Pinus*: A summary review. Proc. 14th Meeting of Canadian Tree Improv. Assoc., Part 2, Aug. 28-30 1973, 1975. p. 99-105

CRITCHFIELD, W.B. – LITTLE, E.L. Geographic distribution of the pines of the world. US Department of Agriculture, Forest Service Miscellaneous Publication 991, 1966. p. 1-97

CRONKLE, M. – CRITCHFIELD, W.B. Genetic variation and hybridization of ponderosa pine. In: *Proceedings of Ponderosa Pine- The species and its Management Symposium*. Washington State University, Pullman, WA, 1998. p. 27-43

ČAMEK, V. Plodivosť predpokladaných hybridných rojov borovice lesnej (*Pinus sylvestris* L.) a borovice horskej (*Pinus mugo* Turra) na Slovensku. Autoreferát dizertačnej práce. Nitra: KBG FPV UKF v Nitre, 2009. 32 s.

DOBRINOV, I. – JAGHIZID, G. Spontaneous hybrids between *Pinus sylvestris* and *Pinus mugo* in Bulgaria. In: *Gorsko Stop.*, vol. 11, 1971. p. 28 - 30

DOEBLEY, J. Molecular evidence for a missing wild relative of maize and the introgression of its chloroplast genome into *Zea perennis*. In: *Evolution*, vol. 43, 1989. p. 1555-1559

DUBOVSKÝ, J. – MARŠÁLEK, L. Genetika rastlín. Bratislava: Slovenské vydavateľstvo pôdohospodárskej literatúry, 1968. 411 s.

FARJON, A. Pines: drawings and descriptions of the genus. Leiden: Brill and Backhyus. 1984. URL: <http://www.biologie.ini-hamburg.de/online/earle/pi/pin/index.htm>

FLEGR, J. Evoluční biologie. Praha: Academia, 2005. 559 s. ISBN 80-200-1270-2

FRANKIS, M. Clasification of the genus *Pinus*. Newcastle, UK, 1999, 2002. URL: <<http://www.pinetum.org/Lovett/clasification.htm>>

FRASCARIA, N. – MAGGIA, L. – MICHAUD, M. – BOUSQUET, J. The *rbcL* gene sequence from chestnut indicates a slow rate of evolution in the *Fagaceae*. In: *Genome*, vol. 36, 1993. p. 668-671

FUTÁK, J. – JASOVIČOVÁ, M. – SCHIDLAY, E. Flóra Slovenska II. – Pteridophyta, Coniferophytina, Bratislava: Vyd. SAV, 1966. 352 s.

GABRIEL, W.J. Species hybridization in the hard pines, serie Sylvestres. In: *Silvae Genetica*, vol. 7, 1957. p. 109- 136

GREGUSS, L. 1995. Medzidruhová hybridizácia lesných drevín v meniacich sa ekologických podmienkach. In: *Lesnictví- Forestry*, vol. 41, nr. 11, 1995. s. 531-534

HEWITT, G.M. Hybrid zones- Natural laboratories for evolutionary studies. In: *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 3, 1998. p. 158-167

HRAŠKA, Š. – BEŽO, M. – JANDURA, B. – MARŠÁLEK, L. Genetika rastlín. Bratislava: Príroda, 1990. 320 s. ISBN 80-07-00238-3

CHEN, J. - TAUER, C.G.- HUANG, Y. Paternal chloroplast inheritance patterns in pine hybrids detected with *trnL-trnF* intergenic region polymorphism. In: *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 104, 2002. p. 1307-1311.

CHIRA, E. Metódy cytogenetiky v šľachtení lesných drevín. Bratislava: Príroda, 1971. 111 s.

KONDO, T. – ISHIBASHI, T. – SHIBATA, M. – HIRAI, A. Isolation of chloroplast DNA from *Pinus*. In: *Plant Cell Physiol.*, vol. 27, 1986. p. 741-744

KORMUŤÁK, A. Niektoré aspekty inkompatibility druhov rodu *Pinus* a *Abies*: Kandidátska dizertačná práca. Arborétum Mlyňany – Ústav dendrobiológie SAV, 1974. 159 s.

KORMUŤÁK, A. - LANÁKOVÁ, M. Biochemistry of reproductive organs and hybridological relationships of selected pine species (*Pinus* sp.). In: *Acta Dendrobiologica*, vol. 1, 1988. p. 7-103

- KORMUŽÁK, A. – SALAJ, T. – DOBROTOVÁ, M. – VOOKOVÁ, B. Genetic structure of putative hybrid complex *Pinus mugo* x *P. sylvestris* as revealed by restriction analysis of chloroplast DNAs. In: *Biotechnologické metódy v šľachtení rastlín*, BIOS 2001: Zborník referátov zo VII. Vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou, 26. 9. 2001, Nitra, Nitra: SPU, 2001, s. 15-18
- KORMUŽÁK, A. – OSTROLUCKÁ, M. – VOOKOVÁ, B. – PREŤOVÁ, A. – FEČKOVÁ, M. Artificial hybridization of *Pinus sylvestris* L. and *Pinus mugo* Turra. In: *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, vol. 47(1), 2005. p. 129-134
- KORMUŽÁK, A. – BOHOVIČOVÁ, J. – VOOKOVÁ, B. - GÖMÖRY, D. Pollen viability in hybrid swarm populations of *Pinus mugo* TURRA and *P. sylvestris* L. In: *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, vol. 49(1), 2007a, s. 61-66
- KORMUŽÁK, A. – DEMANKOVÁ, B. – GÖMÖRY, D. Spontaneous hybridization between *Pinus sylvestris* L. and *P. mugo* Turra in Slovakia. In: *Sylvae Genetica*, vol. 57(2), 2008. p. 76-82
- KORMUŽÁK, A.- VOOKOVÁ, B.- ČAMEK, V.- BOLEČEK, P.- GÖMÖRY, D. Pollen size and viability in hybrid swarm populations of *Pinus mugo* Turra and *P. sylvestris* L. In: *Thaiszia- Journal of botany* vol. 18, 2008. p. 93-100
- KORMUŽÁK, A. – MAŇKA, P. – VOOKOVÁ, B. – SALAJ, T. – ČAMEK, V. – BOLEČEK, P. – GÖMÖRY, D. Seed quality in hybrid swarm populations of *Pinus mugo* Turra and *P. sylvestris* L. In: *Plant Syst. Evol.*, vol. 277, 2009. p. 245-250
- KRIEBEL, H. B. The timing of the incompatibility reaction in interspecific crosses of *Pinus strobus* L., Proc. 14th IUFRO Congress, Munich, 1967, Part III, Sect. 22, 1967. p. 77-87
- KRUPKIN, A. B. – LISTON, A. – STRAUSS, S. H. Phylogenetic analysis of hard pines (*Pinus* subgenus *Pinus*) from chloroplast DNA restriction site analysis. In: *Am. J. Bot.*, vol. 83, 1996. p. 489-498

- LEWANDOWSKI, A. – SAMOČKO, J. – BORATYŃSKA, K. – BORATYŃSKI, A. Genetic differences between two Polish populations of *Pinus uliginosa*, compared to *P. sylvestris* and *P. mugo*. In: *Dendrobiology*, vol. 48, 2002. p. 51-57
- MAŇKA, P. Genetická štruktúra hybridogénnych populácií *Pinus mugo* x *Pinus sylvestris* zisťovaná pomocou izoenzymových markerov: Dizertačná práca. Nitra: Ústav genetiky a biotechnológií rastlín, 2009. 170 s.
- MARCET, E. Über den nachweis spontaner hybriden von *Pinus mugo* Turra und *Pinus sylvestris* auf grund von Nadelmerkmalen. In: *Ber. Schweiz. Bot. Ges.*, vol. 77, 1967. p 314-361
- MATOS, J.A. – SCHAAL, B.A. Chloroplast evolution in the *Pinus montezumae* complex: A coalescent approach to hybridization. *Evolution* 54, 2000. p. 1218- 1233
- MIROV, N.T. The genus *Pinus*. New York: Ronald Press, 1967. 602 p.
- MURRAY, M. G. – THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. In: *Nucleic Acid Research*, vol. 8, 1980. p. 4321 - 4325
- NAMKOONG, G. Statistical analysis of introgression. *Biometrics* 22, 1966a. p. 488-502
- NET-SARQUEDA, C. – PLUMETTAZ CLOT, A. C. – BÉCHOLEY, I. Mise en évidence de l' hybridation introgressive entre *Pinus sylvestris* L. et *Pinus uncinata* DC. En Valais (Suisse) par deux méthodes multivarieés. In: *Botanica Helvetica*, vol. 98, 1988. p. 161-169
- NOVÁK, F.A. Vyšší rostliny 1. 2. vyd. Praha : Academia, 1972. 506 s.
- OSTROLUCKÁ, M. G. – FLEISCHER, P. Pollen vitality monitoring in the Tatra biosphere reserve. In: *Ekológia*, vol. 14, 1995. p. 391-397
- PANETSOS, K.P. Natural hybridization between *Pinus brutia* and *Pinus halepensis* in Greece. In: *Silvae Genetica*, vol.24 , no. 5-6, 1975. p. 163-168

PANETSOS, K.P. - SCALTSOYIANNES, A. - ARAVANOPOULOS, F.A. - DOUNAVI, K. - DEMETRAKOPOULOS, A. Identification of *Pinus brutia* Ten., *Pinus halepensis* Mill. And Their Putative Hybrids. In: *Silvae Genetica*, vol.46, no. 5, 1997. p. 253-257

PARDUCCI, L. – SZMIDT, A. PCR-RFLP analysis of cpDNA in the genus *Abies*. In: *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 98, 1999. p. 802 - 808

PARKER, P. G. – SHOW, A. A. – SCHUG, M. D. – BOSTON, G. C. – FUERST, P. A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. In: *Ecology*, vol. 79, 1998. p. 361-382

PRICE, R. A. – LISTON, A. – STRAUSS, S. H. Phylogeny and systematics of *Pinus*. In: *Richardson, D. M.: Ecology and Biogeography of Pinus*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. p. 49-68. ISBN 0-521-55176-5.

PRUS- GLOWACKI, W. – STEPHAN, B. R. Immunochemical and isoenzymatic characterization of hybrids from controlled crosses between *Pinus montana* var. *rostrata* and *Pinus sylvestris*. In: *Forest Genetics*, vol. 5, 1998. p. 155-163

RIESEBERG, L.H. - SOLTIS, D.E. - PALMER, J.D. A molecular reexamination of introgression between *Helianthus annuus* and *H. bolanderi*. In: *Evolution*, vol. 42, 1988. p. 227-238

ROSYPAL, S. – ROSYPALOVÁ, A. – VONDREJS, V. Molekulární genetika. Státní pedagogické nakladatelství Praha. 1983. 352 s, ISBN 80-04-23117-9

SAX, K. Meiosis in interspecific Pine hybrids. In: *Forest Science*, vol. 6(2), 1960. p. 135-138

SAYLOR, L. C. – SMITH, B. W. Meiotic irregularity in species and interspecific hybrids of *Pinus*. In: *Amer. J. Bot.*, vol. 53, 1966. p. 453-468

SIEDLEWSKA, A. – PRUS-GLOWACKI, W. Genetic structure and taxonomic position of *Pinus uliginosa* Neumann population from Wielkie Torfowisko Batorowskie in Stołowe Mts. (*Locus classicus*). In: *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, vol. 64(1), 1994-1995. p. 51-58

SNUSTAD, D.P. – SIMMONS, M.J. Genetika. Brno: Masarykova Univerzita, 2009, s. 871, ISBN 978-80-210-4852-2

SOMORA, J. Kosodrevina (*Pinus mugo* TURRA) v Tatranskom národnom parku (rozšírenie, vzrastové formy). In: *Zborník prác o Tatranskom národnom parku*, 22, 1981, s. 31-76

SONG B.-H. - WANG X.-Q. - WANG X.-R. - SUN L.-J. - HONG D.-Y. - PENG P.-H. 2002. Maternal lineages of *Pinus densata*, a diploid hybrid. In: *Molecular ecology*, vol. 11, 2002. p. 1057-1063

SONG, B. H. – WANG, X. Q. – WANG, X. R. – DING, K. I. – HONG, D. Y. Cytoplasmic composition in *Pinus densata* population establishment of the diploid hybrid pine. In: *Mol. Ecol.*, vol. 12, 2003. p. 2995 - 3001

STASZKIEWICZ, J. Variability of *Pinus mugo* x *Pinus sylvestris* (*Pinaceae*) hybrid swarm in the Tisovnica nature reserve (Slovakia). In: *Polish Botanical studies*, vol. 5, 1993. p. 33-41

STAZSKIEWICZ, J. Natural hybrids of *Pinus mugo* x *Pinus sylvestris* (*Pinaceae*) in Tatra Mountains. In: *Fragmenta Floristica et Geobotanica*, Series Polonica 3, 1996. p. 23 - 30

STAZSKIEWICZ, J. – TYSZKIEWICZ, M. Natural hybrids of *Pinus mugo* Turra x *Pinus sylvestris* L. in Nowy Targ Valley. In: *Fragmenta Floristica et Geobotanica*, vol. 15, 1969. p. 187-212

STASZKIEWICZ, J. – TYSZKIEWICZ, M. Zmienność naturalnych mieszańców *Pinus sylvestris* L. x *P. mugo* Turra (= *P. rotundata* Link) w południowo- zachodniej Polsce

oraz na wybranych stanowiskach Czech i Moraw. In: *Fragmenta Floristica et Geobotanica*, vol. 19, 1972. p. 173-191

STEBBINS, G.L. Variation and Evolution in Plants. New York : Columbia University Press, 1950. 643 p.

STRAUSS, S. H. – NEALE, D. B. – WAGNER, D. B. Genetics of the chloroplast in conifers: biotechnology research reveals some surprises. In: *J. Forestry*, vol. 87, 1989. p. 1-13

VENDRAMIN, G. G. – LELLI, L. – ROSSI, P. – MORGANTE, M. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. In: *Molecular Ecology*, vol 5, 1996. p. 111-114

VIDAKOVIĆ, M. (1974): Genetics of european Black pine (*Pinus nigra* ARN.). *Annales Forestales* 6/3, Zagreb, Academia Scientiarum et Artium Slavorum Meridionalium, 1974. p. 57-86

WAGNER, D. B. – FURNIER, G. R. – SAGHAI-MAROOF, M. A. – WILLIAMS, S. M. – DANCİK, B. P. – ALLARD, R. W. Chloroplast DNA polymorphism in lodgepole pines and jack pines and their hybrids. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, 1987. p. 2097-2100

WACHOWIAK, W. – LESNIEWICZ, K. – ODRZKOSKI, I. – AUGUSTINIAK, H. – PRUS-GLOWACKI, W. Species-specific cpDNA markers useful for studies on the hybridisation between *Pinus mugo* x *Pinus sylvestris*. In: *Acta Soc. Bot. Pol.*, vol. 69, 2000. p. 273 – 276

WACHOWIAK, W. – CELIŃSKI, K. - PRUS-GLOWACKI, W. Evidence of natural reciprocal hybridisation between *Pinus uliginosa* and *P. sylvestris* in the sympatric population of the species. In: *Flora*, vol.200, 2005a. p. 563-568



WACHOWIAK, W. – LEWANDOWSKI, A. - PRUS-GLOWACKI, W. Reciprocal controlled crosses between *Pinus sylvestris* and *P. mugo* verified by a species-specific cpDNA marker. In: *J. Appl. Genet.*, vol. 46, nr. 1, 2005b. p. 41-43

WACHOWIAK, W. – ODRZYKOSKI, I. – MYCZKO, L. - PRUS-GLOWACKI, W. Lack of evidence on hybrid swarm in the sympatric population of *Pinus mugo* and *Pinus sylvestris*. In: *Flora*, vol. 201, 2006a. p. 307-316

WACHOWIAK, W. – STEPHAN, B.R. – SCHULZE, I. - PRUS-GLOWACKI, W. – ZIEGENHAGEN, B. A critical evaluation of reproductive barriers between closely related species using DNA markers- a case study in *Pinus*. In: *Plant Systematics and Evolution*, vol. 257, 2006b. p. 1-8

WACHOWIAK, W. - PRUS-GLOWACKI, W. Hybridisation processes in sympatric populations of pines *Pinus sylvestris* L., *P. mugo* Turra and *P. uliginosa* Neumann. In: *Plant Syst. Evol.*, vol. 271, 2008. p. 29-40

WANG X.-R. - SZMIDT A.E. Evolutionary analysis of *Pinus densata* (Masters), a putative Tertiary hybrid. 2. A study using species – specific chloroplast DNA markers. In: *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 80, 1990. p. 641-647

WANG X.-R. - SZMIDT A.E. Hybridization and chloroplast DNA variation in a *Pinus* species complex from Asia. In: *Evolution*, vol. 48, 1994. p. 1020-1031

WANG X.-R. - SZMIDT A.E. – LEWANDOWSKI, A. – WANG Z.-R. Evolutionary analysis of *Pinus densata* Masters, a putative Tertiary hybrid. 1. Allozyme variation. In: *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 80, 1990. p. 635-640

WANG X.-R. - SZMIDT A.E. – SAVOLAINEN, O. Genetic composition and diploid hybrid speciation of a high mountain *Pinus densata*, native to the Tibetan Plateau. In: *Genetics*, vol. 159, 2001. p. 337-346

WATANO, Y. – KANAI, A. – TANI, N. Genetic structure of hybrid zones between *Pinus pumila* and *Pinus parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae). In: *American Journal of Botany*, vol. 91, 2004. p. 65 – 72

WOLFE, K.H. - LI, W-H - SHARPE, P.M. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondria, chloroplast, nuclear DNAs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 84, 1987. p. 9054-9058

WRIGHT, J. W. Species hybridization in the white pines. In: *For. Sci.*, vol. 5, 1959. p. 210-222

WRIGHT, S. *Evolution and the Genetics of Populations. Variability Within and Among Populations.* University of Chicago Press, Chicago, IL. Vol. 4, 1978.

WRIGHT T.W. – ADAMS, W.T. – NEALE, D.B. *Forest genetics.* Trowbridge: Cromwell Press Group. 2009. 682 p.

YU, H. – GE, S. – HONG, D.-Y. 2000. Allozyme diversity and population genetic structure of *Pinus densata* Masters in northwestern Yunnan, China. In: *Biochemical Genetics*, vol. 38, 2000. p. 139-147

ZOBEL, B. Are there natural loblolly- shortleaf pine hybrids? In: *Journal of Forestry* 51, 1953. p. 494- 495

## 9 PRÍLOHY

Tabuľka 17: Životnosť peľu jednotlivých stromov populácie Hruštín

Jedinec	Klíčivosť (%)			Dĺžka peľových vrecúšok ( $\mu\text{m}$ )		
	Priemer $\pm$ s.o.	min.	max.	Priemer $\pm$ s.o.	min.	max.
HR1	92,00 $\pm$ 3,60	88	95	123,15 $\pm$ 69,67	51	680
HR2	86,33 $\pm$ 3,06	83	89	138,83 $\pm$ 40,87	51	238
HR3	68,66 $\pm$ 6,66	61	73	109,93 $\pm$ 32,85	51	187
HR4	90,66 $\pm$ 2,08	89	93	140,91 $\pm$ 41,66	68	255
HR5	93,66 $\pm$ 1,53	92	95	120,70 $\pm$ 42,72	34	238
HR6	90,66 $\pm$ 2,08	89	93	94,25 $\pm$ 30,28	51	170
HR7	83,66 $\pm$ 4,73	80	89	144,88 $\pm$ 51,42	68	255
HR8	90,00 $\pm$ 0,00	90	90	134,49 $\pm$ 42,69	68	255
HR9	87,66 $\pm$ 2,89	86	91	129,20 $\pm$ 38,29	68	238
HR10	93,33 $\pm$ 2,31	92	96	134,86 $\pm$ 40,20	68	221
HR11	68,66 $\pm$ 6,66	61	73	125,99 $\pm$ 38,72	68	238
HR12	91,33 $\pm$ 3,06	88	94	122,40 $\pm$ 40,39	51	238
HR13	92,33 $\pm$ 3,79	88	95	114,28 $\pm$ 38,14	51	204
HR14	90,66 $\pm$ 1,53	89	92	113,14 $\pm$ 40,55	34	238
HR15	93,66 $\pm$ 1,53	92	95	127,31 $\pm$ 38,67	51	238
HR16	93,66 $\pm$ 4,16	89	97	122,21 $\pm$ 38,99	51	204
HR17	91,33 $\pm$ 4,73	86	95	133,73 $\pm$ 46,73	51	255
HR18	88,33 $\pm$ 1,53	87	90	103,51 $\pm$ 26,80	51	187
HR19	94,33 $\pm$ 1,53	93	96	114,84 $\pm$ 29,86	68	187
HR20	86,33 $\pm$ 4,62	81	89	100,30 $\pm$ 41,41	34	204
HR21	86,33 $\pm$ 6,35	79	90	134,11 $\pm$ 45,83	34	238

**Tabuľka 18:** Životnosť peľu jednotlivých stromov populácie Vrátna dolina

Jedinec	Kľíčivosť (%)			Dĺžka peľových vrecúšok ( $\mu\text{m}$ )		
	Priemer $\pm$ s.o.	min.	max.	Priemer $\pm$ s.o.	min.	max.
V1	91,00 $\pm$ 1,73	90	93	144,88 $\pm$ 37,73	68	255
V2	96,66 $\pm$ 1,53	95	98	186,43 $\pm$ 47,50	85	289
V3	98,66 $\pm$ 1,53	97	100	98,22 $\pm$ 20,82	51	136
V4	97,00 $\pm$ 3,00	94	100	134,49 $\pm$ 40,10	68	255
V5	94,33 $\pm$ 4,51	90	99	122,21 $\pm$ 34,56	51	221
V6	98,00 $\pm$ 1,00	97	99	130,71 $\pm$ 38,02	68	238
V7	92,66 $\pm$ 3,21	89	95	176,99 $\pm$ 43,98	51	289
V8	97,66 $\pm$ 1,53	96	99	120,70 $\pm$ 30,59	51	187
V9	84,66 $\pm$ 4,04	80	87	161,69 $\pm$ 48,70	68	306
V10	92,66 $\pm$ 1,15	92	94	118,24 $\pm$ 37,18	51	204
V11	95,00 $\pm$ 4,58	90	99	143,93 $\pm$ 51,55	51	272
V12	95,00 $\pm$ 2,65	92	97	165,84 $\pm$ 45,11	68	255
V13	94,66 $\pm$ 1,53	93	96	132,79 $\pm$ 35,94	51	221
V14	92,66 $\pm$ 3,05	90	96	128,82 $\pm$ 38,39	51	238
V15	94,66 $\pm$ 2,31	92	96	95,20 $\pm$ 25,84	51	170
V16	97,33 $\pm$ 3,78	93	100	112,39 $\pm$ 36,55	68	255
V17	97,00 $\pm$ 1,73	95	98	121,83 $\pm$ 34,21	51	204
V18	92,00 $\pm$ 4,00	88	96	129,76 $\pm$ 38,09	51	221
V19	95,00 $\pm$ 1,73	93	96	128,63 $\pm$ 39,32	51	221
V20	97,00 $\pm$ 1,00	96	98	123,15 $\pm$ 35,16	68	238

**Tabuľka 19:** Životnosť peľu jednotlivých stromov populácie Habovka

Jedinec	Klíčivosť (%)			Dĺžka peľových vrecúšok ( $\mu\text{m}$ )		
	Priemer $\pm$ s.o.	min.	max.	Priemer $\pm$ s.o.	min.	max.
H1	96,33 $\pm$ 0,58	96	97	55,34 $\pm$ 17,76	34	136
H2	92,33 $\pm$ 3,21	90	96	149,41 $\pm$ 35,90	51	255
H3	93,00 $\pm$ 5,00	88	98	86,88 $\pm$ 39,19	34	204
H4	98,00 $\pm$ 1,73	96	99	159,61 $\pm$ 37,25	85	255
H5	97,33 $\pm$ 1,53	96	99	137,13 $\pm$ 49,40	51	255
H6	99,00 $\pm$ 1,00	98	100	100,86 $\pm$ 50,76	34	272
H7	36,66 $\pm$ 1,53	35	38	121,83 $\pm$ 48,84	34	221
H8	66,33 $\pm$ 6,66	62	74	124,10 $\pm$ 46,95	34	255
H9	57,00 $\pm$ 6,08	50	61	50,81 $\pm$ 24,90	17	119
H10	97,66 $\pm$ 0,58	97	98	146,01 $\pm$ 48,48	51	289
H11	97,66 $\pm$ 1,53	96	99	93,88 $\pm$ 41,35	34	204
H12	95,66 $\pm$ 1,53	94	97	76,12 $\pm$ 33,93	34	187
H13	98,00 $\pm$ 0,00	98	98	119,38 $\pm$ 35,86	51	204
H14	97,33 $\pm$ 1,53	96	99	92,75 $\pm$ 38,41	34	221
H15	97,66 $\pm$ 1,53	96	99	68,76 $\pm$ 25,34	34	153
H16	97,00 $\pm$ 1,73	96	99	137,70 $\pm$ 34,85	51	238
H17	37,66 $\pm$ 6,43	33	45	133,73 $\pm$ 41,89	51	221
H18	97,00 $\pm$ 1,00	96	98	107,66 $\pm$ 45,66	34	238
H19	96,33 $\pm$ 1,53	95	98	92,93 $\pm$ 32,75	34	187
H20	97,00 $\pm$ 1,73	95	98	53,64 $\pm$ 21,15	17	119
H21	95,66 $\pm$ 4,04	91	98	115,03 $\pm$ 41,41	51	255

**Tabuľka 20:** Životnosť peľu jednotlivých stromov populácie Suchá Hora

Jedinec	Kľíčivosť (%)			Dĺžka peľových vrecúšok ( $\mu\text{m}$ )		
	Priemer $\pm$ s.o.	min.	max.	Priemer $\pm$ s.o.	min.	max.
SH1	94,00 $\pm$ 2,00	92	96	106,34 $\pm$ 31,16	51	187
SH2	94,33 $\pm$ 4,50	90	99	91,80 $\pm$ 24,55	34	136
SH3	92,66 $\pm$ 4,04	89	97	101,81 $\pm$ 26,05	51	170
SH4	95,66 $\pm$ 3,21	92	98	99,55 $\pm$ 31,78	34	204
SH5	93,66 $\pm$ 3,51	90	97	90,66 $\pm$ 29,06	34	170
SH6	8,33 $\pm$ 2,52	6	11	114,84 $\pm$ 33,55	68	204
SH7	88,33 $\pm$ 1,53	87	90	113,33 $\pm$ 39,23	51	221
SH8	80,33 $\pm$ 2,08	78	82	117,68 $\pm$ 46,24	51	221
SH9	84,33 $\pm$ 4,04	80	88	82,55 $\pm$ 33,18	34	221
SH10	90,00 $\pm$ 3,43	86	92	105,97 $\pm$ 42,72	34	221
SH11	81,66 $\pm$ 3,05	79	85	111,63 $\pm$ 37,97	51	187
SH12	92,00 $\pm$ 3,00	89	95	76,69 $\pm$ 29,74	34	204
SH13	88,66 $\pm$ 1,53	87	90	111,63 $\pm$ 37,02	51	204
SH14	96,66 $\pm$ 2,31	94	98	102,75 $\pm$ 39,31	51	204
SH15	91,66 $\pm$ 2,52	89	94	112,77 $\pm$ 36,08	51	204
SH16	95,66 $\pm$ 0,58	95	96	141,10 $\pm$ 44,83	51	238
SH17	82,66 $\pm$ 6,66	75	87	82,73 $\pm$ 27,11	34	187
SH18	97,66 $\pm$ 1,15	97	99	93,50 $\pm$ 39,09	34	221
SH19	89,33 $\pm$ 1,53	88	91	93,50 $\pm$ 36,96	34	187

**Tabuľka 21:** Životnosť peľu jednotlivých stromov populácie Tisovnica

Jedinec	Klíčivosť (%)			Dĺžka peľových vrecúšok ( $\mu\text{m}$ )		
	Priemer $\pm$ s.o.	min.	max.	Priemer $\pm$ s.o.	min.	max.
T1	94,66 $\pm$ 1,53	93	96	106,91 $\pm$ 37,82	51	221
T2	98,00 $\pm$ 2,65	95	100	116,16 $\pm$ 35,33	51	204
T3	97,66 $\pm$ 1,53	96	99	133,16 $\pm$ 35,97	68	255
T4	99,33 $\pm$ 0,58	99	100	111,44 $\pm$ 34,86	68	221
T5	90,66 $\pm$ 1,53	89	92	45,52 $\pm$ 19,04	17	119
T6	99,33 $\pm$ 1,15	98	100	127,69 $\pm$ 36,42	68	221
T7	96,33 $\pm$ 1,15	95	97	137,13 $\pm$ 42,62	68	255
T8	96,00 $\pm$ 1,73	94	97	117,30 $\pm$ 51,22	34	272
T9	96,00 $\pm$ 1,00	95	97	125,23 $\pm$ 35,08	51	204
T10	93,33 $\pm$ 4,16	90	98	79,14 $\pm$ 33,15	34	187
T11	84,66 $\pm$ 2,30	82	86	73,66 $\pm$ 23,36	34	136
T12	90,66 $\pm$ 1,15	90	92	84,05 $\pm$ 33,94	34	170
T13	98,66 $\pm$ 0,58	98	99	111,06 $\pm$ 33,54	51	204
T14	98,33 $\pm$ 0,58	98	99	122,40 $\pm$ 30,50	51	204
T15	96,33 $\pm$ 2,31	95	99	106,72 $\pm$ 30,69	51	187
T16	94,33 $\pm$ 1,53	93	96	96,90 $\pm$ 31,77	34	187
T17	99,66 $\pm$ 0,58	99	100	107,29 $\pm$ 28,90	51	204
T18	92,00 $\pm$ 1,00	91	93	101,62 $\pm$ 34,19	34	187
T19	97,00 $\pm$ 1,73	95	98	98,98 $\pm$ 34,34	34	204
T20	89,66 $\pm$ 3,06	87	93	81,03 $\pm$ 27,21	34	187
T21	82,33 $\pm$ 1,15	81	83	80,46 $\pm$ 22,90	34	170