



VÚKOZ, v.v.i.,

**Výzkumný ústav SILVA TAROUCY
pro krajinu a okrasné zahradnictví, v.v.i.**

Květnové náměstí 391, Průhonice, PSČ 252 43
Česká republika

Certifikovaná metodika č. 1/2011–063

**Metodika komplexní ochrany ohrožené borovice blatky (*Pinus uncinata*
subsp. *uliginosa*) na příkladu populace v přírodní rezervaci
Borkovická blata**

Metodika byla vypracována v rámci řešení projektu výzkumu a vývoje MŽP SP/2d4/83/07: „Záchrana genetické diverzity borovice blatky (*Pinus uncinata* subsp. *uliginosa*), subendemitu ČR, v centru jejího areálu kombinovanou metodou biomonitoringu, kontrolovaného opylení a mikropropagace“.

Vypracovali pracovníci VÚKOZ, v.v.i.:

RNDr. Hana Vejsadová, CSc. – hlavní řešitel

Ing. Roman Businský

Ing. Miroslava Lukášová

doc. Ing. Tomáš Vrška, Dr.

Ing. Libor Hort

Ing. Pavel Unar

Ing. Kamil Král, Ph.D.

Ing. David Janík

Statutární zástupce VÚKOZ, v.v.i.:

Doc. Ing. Ivo Tábor, CSc.

– pověřený řízením organizace

Rozdělovník:

VÚKOZ, v. v. i. – 1x

MŽP ČR – 1x

Oponent státní správy: Ing. Jan Šíma, MŽP ČR – 1x

Odborný oponent: RNDr. Štěpán Husák, CSc., Botanický ústav AV ČR, v.v.i., Třeboň, – 1x

Průhonice dne 29.7.2011

OBSAH

1	Cíl metodiky	3
2	Postup řešení	3
2.1	Výběr vhodné populace borovice blatky	3
2.2	Zjištění prostorové a věkové struktury porostů borovice blatky	4
2.2.1	Analýza synuzie dřevin	4
2.2.2	Měření hladiny podzemní vody	5
2.2.3	Fytcenologické snímky	5
2.3	Získání geneticky čistého osiva borovice blatky	6
2.3.1	Identifikace borovice blatky a jejich hybridů podle fenotypu	6
2.3.2	Identifikace borovice blatky a jejich hybridů podle genotypu	7
2.4	Vypracování mikropropagační metody u borovice blatky	9
2.4.1	Odběr semen na lokalitě a uskladnění semen	9
2.4.2	Sterilní výsev	9
2.4.3	Odvození <i>in vitro</i> kultur	9
2.4.4	Aklimatizace <i>in vitro</i> rostlin	10
2.4.5	Dopěstování rostlin v podmínkách <i>ex situ</i>	10
2.5	Souhrn dosažených výsledků	11
2.5.1	Vyhodnocení aktuálního stavu sledované populace	11
2.5.2	Výběr reprezentativních stromů	11
2.5.3	Použití geneticky ověřeného osiva	11
3	Praktická doporučení pro záchranu borovice blatky	13
3.1	Revitalizace původní populace na Borkovických blatech	13
3.2	Doporučený management pro Borkovická blata	13
3.2.1	Netěžená část	13
3.2.2	Vytěžená část	14
4	Srovnání novosti postupů (přínos metodiky)	15
5	Popis uplatnění metodiky	15
6	Citovaná literatura	15
7	Dedikace	17
8	Foto přílohy	18

1 CÍL METODIKY

Cílem metodiky je předložit standardní postupy pro komplexní ochranu ohroženého taxonu borovice blatky – *Pinus uncinata* subsp. *uliginosa* (Neumann) Businský – na modelovém příkladu populace v přírodní rezervaci (PR) Borkovická blata. Jedná se o praktické využití námi vypracovaných doporučení pro vhodný management sledovaného území použitelný i pro většinu dalších populací uvedeného taxonu u nás.

Metodika je výstupem projektu výzkumu a vývoje MŽP SP/2d4/83/07: „Záchrana genetické diverzity borovice blatky (*Pinus uncinata* subsp. *uliginosa*), subendemitu ČR, v centru jejího areálu kombinovanou metodou biomonitoringu, kontrolovaného opylení a mikropropagace“. Předmětem výzkumu bylo v první řadě analyzovat narušenou zbytkovou populaci borovice blatky zejména z hlediska potenciálu jejího přežití pro poskytnutí reprodukčního materiálu. Následným dílčím cílem bylo posílit genofond borovice blatky v České republice o geneticky čisté potomstvo kombinovanou metodou biomonitoringu, kontrolovaného opylení (sprášení), DNA analýz a mikropropagace. Analýzy DNA mají ověřit genetickou čistotu otcovské linie reprezentativních jedinců vybraných podle fenotypu pro následující použití. Vybraní mladí jedinci tvořili výchozí materiál pro kontrolované opylení a získání geneticky čistého osiva pro reprodukci borovice blatky v podmínkách *ex-* a *in situ*. Vybraní starší jedinci reprezentují původní zbytek přirozené populace na lokalitě a představují genetický potenciál pro záchranu místního genofondu blatky metodami lesnického šlechtitelství.

2 POSTUP ŘEŠENÍ

2.1 Výběr vhodné populace borovice blatky

Borovice blatka byla u nás donedávna uváděna pod vědeckým jménem *Pinus rotundata* Link (Skalický 1988, Businský 1998, 2002). Avšak podrobný výzkum relevantních populací v rámci celého areálu příslušného agregátu *Pinus mugo* Turra v nedávných letech odhalil, že toto jméno se vztahuje k jinému taxonu, nezasahujícímu na naše území ani do jeho blízkosti. V návaznosti na toto zjištění byla borovice blatka nově přehodnocena (Businský a Kirschner 2006) jako *Pinus uncinata* subsp. *uliginosa* (Neumann) Businský a svým přirozeným rozšířením definována jako subendemit České republiky s přesahem do Rakouska, Německa a Polska, celkově do maximální vzdálenosti okolo 30 km od našich hranic (Businský 2008, Businský 2009, Businský a Kirschner 2010). Všechny zahraniční lokality tohoto taxonu s výskytem fenotypově „čistých“ nehybridních jedinců (celkem méně než 15) jsou nepočetné zbytkové populace, případně okrajové části českých populací. Převážná část všech rozsáhlejších populací blatky je soustředěna na území Čech, z čehož největší počet lokalit, resp. dílčích populací se nachází v Třeboňské pánvi v rozmezí 420 až 500 m n. m. a na Šumavě v údolí Vltavy mezi 720 a 780 m n. m. Spolu s izolovanými populacemi v předhoří Krušných hor, ve Žďárských vrších a v Hrubém Jeseníku jde o jediné početnější populace taxonu borovice blatka. Malý areál rozšíření blatky a její výrazná ekologická specializace na přechodová rašeliniště jsou základní důvody jejího existenčního ohrožení. K nim přistupuje dlouhodobě probíhající genetická eroze způsobená spontánní mezidruhovou hybridizací s ekologicky flexibilní borovicí lesní, *Pinus sylvestris* L. (Businský 1998, Businský a Kirschner 2010). Tato hybridizace se projevuje výrazněji v nižších

nadmořských výškách, tedy právě v centru areálu blatky v Třeboňské pánvi, kde došlo k největšímu narušení až likvidaci blatkových rašelinišť jejich odvodňováním a těžbou rašeliny.

Jedním ze zde nejrozsáhlejších rašeliništních komplexů (původně téměř 900 ha, viz Dohnal et al. 1965) byla tzv. Soběslavská (někdy též Veselská) blata na severním okraji Třeboňské pánve, z nichž po dlouhodobé těžbě rašeliny od r. 1956 do druhé poloviny 70. let zůstalo zachováno původní rašelinné těleso s blatkovým porostem jen na fragmentu reprezentujícím jádrovou část dnešní přírodní rezervace Borkovická blata (PR o celkové rozloze 55 ha). Tato populace reprezentuje nejnižší položený výskyt blatky v ČR, ve 423 m n. m. Tak jako v jiných populacích blatky v Třeboňské pánvi byl i zde v posledních letech zjištěn hromadný úhyn starších stromů blatky vlivem kůrovcové invaze, zde konkrétně posílené prosvětlením části porostů ve snaze potlačit konkurenční dřeviny. Dlouhodobé narušení vodního režimu blatkových biotopů, genetická eroze vlivem křížení s borovicí lesní (vysazenou obvykle v okolních lesních porostech) a invaze kalamitních hmyzích škůdců na oslabených zbytcích populace blatky jsou tři hlavní faktory recentního ohrožení přirozených blatkových populací v nižších polohách.

2.2 Zjištění prostorové a věkové struktury porostů borovice blatky

Prostorová a věková struktura porostů borovice blatky v PR Borkovická blata byla zjišťována v části území, kde neproběhla plošná těžba rašeliny (obr. 1). Tato část PR obsahuje fragment původní populace taxonu. Po ukončení těžby rašeliny byla k původní rezervaci připojena část vytěžené plochy (obr. 2). Toto území sloužilo jako srovnávací plocha při šetření průběhu výšky hladiny podzemní vody během vegetační sezony 2008 a při porovnání stavu fytoocenóz na těžbou nedotčené a vytěžené (později do PR začleněné) části lokality.

2.2.1 Analýza synuzie dřevin

Pro popis stavu dřevinných pater byla použita metodika monitoringu přirozených lesů České republiky (<http://www.pralesy.cz>). Metoda zahrnuje šetření na síti kruhových inventarizačních ploch a šetření na jádrových územích. S ohledem na velikost monitorované plochy, proměnlivost stanovištních a porostních poměrů byla stanovena vzdálenost mezi inventarizačními plochami 88,5 m. Monitorované území (28,74 ha) bylo pokryto 38 inventarizačními plochami. Intenzita vzorkování byla 6,6%. V monitorované ploše byla vymezena dvě jádrová území reprezentující odlišné typy lesních porostů. První jádrové území (A) představuje fragment dochovaného porostu borovice blatky. Druhé jádrové území (B) zachycuje porost s dominantním smrkem ztepilým a pouze roztroušenými jedinci borovice blatky v podúrovni. Jádrová území jsou obdélníkového tvaru o rozměrech 50 x 100 m. Jejich celková výměra je 1 ha (2 x 0,5 ha). Na těchto plochách byly zaznamenány všechny stojící a ležící stromy od výčetní tloušťky 70 mm, přirozené zmlazení dřevin a významné topografické objekty. Pro výpočet růstových charakteristik na jádrových územích byl použit SW PraleStat (<http://www.pralestat.wz.cz>). Terénní měření byla realizována za použití technologie Field-Map (<http://www.fieldmap.cz>). Věková struktura hlavních dřevin byla stanovena na základě analýzy vývrtů pořízených v obou jádrových územích. Vzorky byly odebírány ve výšce 1,3 m ze stromů o minimální výčetní tloušťce 7 cm. Výběr nepreferoval žádnou zastoupenou dřevinu. Pro analýzu bylo použito 115 vzorků z jádrového území A a 70 vzorků z jádrového území B.

Na monitorované ploše bylo zjištěno, že podle počtu živých stromů je borovice blatka stále dominantní dřevinou. Její zastoupení představuje 34,4% celkového stromového

inventáře. Následující dřeviny jsou břízy (b. převislá a b. pýřitá) – 33,2%, smrk ztepilý – 30,6% a borovice lesní – 1,8%. Z pohledu hmotnatosti je dominantní smrk ztepilý – 41,3% celkové zásoby. Následují borovice blatka 31,5%, břízy 18,3% a borovice lesní 8,9% celkové zásoby. Zcela dominantní je zastoupení borovice blatky v počtu a objemu mrtvých stojících i ležících kmenů. Ve zmíněných charakteristikách dosahuje blatka 86 – 95% zastoupení.

Rozložení počtu jedinců v tloušťkových třídách a sumarizace zmlazení hlavních dřevin prozrazují, že stávající podmínky konkurenčně zvýhodňují smrk ztepilý a břízy na úkor blatky. Blatka počtem jedinců v tloušťkové třídě 70–120 mm ztrácí nejen vzhledem ke smrku a břízám, ale i vzhledem k vlastnímu zastoupení v tloušťkové třídě 121 – 170 mm. Absenci mladých jedinců potvrzuje údaj o přirozeném zmlazení. V celkové sumě mladých jedinců (jedinci od 0,1 m výšky až do 6, 9 cm výčetní tloušťky) představuje blatka pouze zlomek počtu jedinců smrku a bříz. V kategorii 0,1–0,5 m blatka prakticky chybí.

Šetření na jádrových územích ukázalo, že obě plochy prošly poněkud rozdílným vývojem. Zatímco jádrové území A bylo nejdříve obsazované pouze blatkou (1881–1930) a později prošlo (od r. 1970) vlnou nárostů bříz a smrku, v jádrovém území B se blatka, smrk a břízy vyskytovaly současně. Obnova blatky a smrku pokračuje do 1970. V následujícím období už dominují břízy, smrk se obnovuje kontinuálně, ale blatka se dále nezmlazuje. Ačkoliv jsou tedy rozdíly v současné dřevinné skladbě obou jádrových území výsledkem dlouhodobého vývoje, přibližně od roku 1970 lze pozorovat společný trend zmlazování smrku a bříz bez účasti blatky.

2.2.2 Měření hladiny podzemní vody

Pro měření hladiny podzemní vody byly použity perforované plastové trubky zapuštěné 2 m pod úroveň terénu. Hladina byla odečítána pomocí hladinoměru. Čtyři sondy byly instalovány v monitorované části lokality. Jedna byla umístěna na vytěžené ploše. Záznam výšky hladiny podzemní vody byl pořizován minimálně 1x/ měsíc.

Hladina podzemní vody ve sledovaném období (vegetační sezona 2008) byla nejvyšší v průběhu jara, kdy se v monitorovaném území pohybovala v rozmezí 50–70 cm pod povrchem. V dalším období byl zaznamenán setrvalý pokles trvající až do podzimních měsíců. Naměřená minima se pohybovala v intervalu 93–116 cm pod povrchem. Kontrolní sonda ve vytěžené části vykazovala v průběhu sezony výrazně menší rozptyl naměřených hodnot (20–46 cm) Nejvyšší hladina byla naměřena v březnu, minimální v srpnu.

2.2.3 Fytocenologické snímky

Fytocenologické snímky byly pořízeny v průběhu června 2008 na 15 inventarizačních plochách a v okolí instalovaných sond na měření hladiny podzemní vody. Celkově bylo pořízeno 20 fytocenologických snímků pokrývajících rozdílnost stanovištních a porostních poměrů monitorované lokality včetně srovnávacího snímku v okolí sondy na vytěžené ploše.

V rámci snímkových ploch v monitorovaném území dominuje smrk ztepilý prakticky ve všech dřevinných etážích. V bylinném patru je nejčastěji a nejhojněji doprovázen brusnicí borůvkou (*Vaccinium myrtillus*), b. brusinkou (*V. vitis-idaea*), b. vlochyní (*V. uliginosum*), rojovníkem bahenním (*Ledum palustre*) a bezkolencem modrým (*Molinia caerulea*). Snímek pořízený v okolí kontrolní sondy ve vytěžené části lokality zaznamenává díky vyšší hladině podzemní vody druhy typické pro podmáčená rašelinná stanoviště jako je: rosnatka okrouhlolistá (*Drosera rotundifolia*), suchopýr úzkolistý (*Eriophorum angustifolium*), sítina článkovaná (*Juncus articulatus*) a další.

Borovice blatka je běžnou součástí synuzie dřevin v daném souboru snímků. Její přítomnost však výrazně klesá směrem k nižším etážím. V etáži obsahující jedince do 20 cm výšky byla nalezena pouze na kontrolním snímku na vytěžené části lokality.

2.3 Získání geneticky čistého osiva borovice blatky

Nezbytnou podmínkou získání geneticky čistého osiva borovice blatky je použití metody kontrolovaného opylení (sprášení), která je u větrosprašných rostlin jedinou metodou vytváření potomstev z rodičů známého původu. Tato metoda, převzatá u borovic z kalifornského výzkumného ústavu v Placerville (Wakeley a Campbell 1954), byla úspěšně používána v 60. letech na pracovišti VÚLHM v arboretu Sofronka v Plzni – Bolevci (Kaňák 1965, 1968). Metoda spočívá v předčasném odběru prašниковých šištic, v izolaci vyvíjejících se samičích šištic ochrannými obaly v terénu a nakonec v umělém opylení pylem známého původu.

V praxi je nutné sledovat fenologii vývoje reprodukčních orgánů jedinců určených k provedení kontrolovaného opylení. To by mělo být u blatky realizováno přibližně od poloviny května do poloviny června v závislosti na nadmořské výšce lokality (pokud uvažujeme o použití této metody obecně) a průběhu jarního počasí. Prvním krokem v sérii potřebných úkonů je izolace konce větvi s prorůstajícími mladými výhony, na jejichž koncích začínají být vedle pupenů zřetelné zárodky samičích šištic. K izolaci je vhodné použít polopropustné průsvitné materiály (např. uzenářské střívko); při upevňování sáčků musíme ponechat nahoře volný prostor pro růstové prodloužení výhonů, které odhadneme podle délky příslušných loňských internodií. Druhým krokem je odběr prašnikových šištic. Ideální je fenofáze zavřených šištic nedlouho před začátkem uvolňování pylu, případně i doba, kdy dochází k pukání prašných váčků na šišticích. Prašnikové šištice odebíráme nejlépe do plastových sáčků se zipem (obr. 3) a označené uložíme do chladničky do doby jejich dozrání a použití. Nejpřesněji načasovaný by měl být třetí krok spočívající ve vlastním opylení zaizolovaných samičích šištic. Ty musejí být plně rozvinuté ve fázi receptivní pro příjem pylu. Ten vyfoukneme do prostoru izolačního sáčku plastovou Pasteurovou pipetou a otvor v sáčku pak zalepíme proti případné kontaminaci cizím pylem. Přibližně za měsíc odstraníme izolační sáčky, zkontrolujeme opylené jarní samičí šištice, ze kterých se vytvářejí šištice prvního roku (konelety) a větve označíme. Konelety ponecháme přirozenému vývoji až do konce léta následujícího roku, protože vývoj šišek borovic (kromě několika výjimek mimo střední Evropu) je dvouletý. Obvykle v druhé polovině září (v letech s průměrným průběhem počasí) v podmínkách na Borkovických blatech (nebo trochu později ve vyšších polohách) otrháme dozrávající šišky před jejich přirozeným otevřením. Ty pak necháme volně otevřít na suchém místě v pokojové teplotě nebo neochotně se otevírající šišky některých jedinců s pozdější fenologií otevřeme po několika hodinách v termostatu při teplotě 50–60°C.

2.3.1 Identifikace borovice blatky a jejich hybridů podle fenotypu

Borovice blatka je součástí agregátu (taxonomické skupiny) *Pinus mugo* Turra. V rámci tohoto agregátu existuje několik morfologických znaků, podle kterých jednotlivé zástupce vzájemně neodlišíme, ale lze je s úspěchem použít k odlišení od nejbližšího příbuzného druhu borovice lesní, *Pinus sylvestris* L. Protože v PR Borkovická blata, jakož i v celé Třeboňské pánvi a zároveň na většině lokalit blatky (kromě několika nejvýše položených v oblasti Šumavy, Slavkovského lesa a Krušných hor) se z agregátu *P. mugo* vyskytuje jen

taxon *Pinus uncinata* subsp. *uliginosa* (borovice blatka), uvádíme níže (tab. 1) pouze přehled vnějších rozdílných morfologických znaků mezi borovicí lesní a blatkou.

Kromě uvedených vnějších morfologických znaků existuje několik znaků v anatomii jehlic, kterými se oba taxony borovic liší (Businský a Kirschner 2010). Tyto znaky jsou však pozorovatelné jen mikroskopem a nejsou vhodné pro terénní identifikaci. V podstatě lze shrnout, že typická (charakteristicky vyvinutá) borovice lesní a blatka jsou vzhledově velmi odlišné entity, takže i identifikace vzájemných hybridů první generace je podle přechodných znaků s jistými zkušenostmi relativně snadná. Avšak identifikace hybridních jedinců následných generací nebo některých jedinců z hybridních rojů (resp. populací s dlouho, tj. po mnoho generací, probíhajícím procesem mezidruhové hybridizace) může být problematická.

Tab. 1 Přehled vnějších morfologických znaků u borovice lesní a borovice blatky.

Morfologický znak	Borovice blatka	Borovice lesní
Opylené samičí šištice – konelety (hodnotitelné přibližně od srpna do března následujícího roku):	(polo)vzpřímené na krátkých stopkách s odklonem od osy výhonu do cca 45°	dolů ohnuté okolo 180° od osy výhonu na dlouhých stopkách
Apofýzy dozrálých šišek:	světle až kaštanově hnědé, lesklé	okrové s šedavým nádechem, matné
Barva jehlic, resp. olistění:	tmavě až světle zelená	šedavě světle zelená
Borka:	černavě nebo šedavě hnědá, odlučující se v malých ploškách	zprvu (na větvích a v horní části kmene) oranžově hnědá, papírově tenká a loupavá v plátech, později (v dolní části kmene) tvořící silná šedá žebra
Koruna plně vyvinutého dospělého stromu:	kuželovitá, s hustou texturou větví všech řádů	nepravidelně vejcovitá nebo válcovitá, s řídkými kosterními větvemi a středně hustou texturou koncových větví

2.3.2 Identifikace borovice blatky a jejich hybridů podle genotypu

Evidentní a stabilní rozdíly v genotypu jedinců z agregátu *Pinus mugo* a jedinců *Pinus sylvestris* byly nalezeny pouze na chloroplastové DNA (cpDNA) (Wachowiak et al. 2000, 2006). Chloroplasty patří mezi tzv. semiautonorní buněčné organely, které nesou vlastní genetickou informaci, nezávislou na jaderné DNA. Dědičnost cpDNA při pohlavním rozmnožování souvisí se způsobem přenosu semiautonorních organel z pohlavních buněk do vznikající zygoty. Jedná se tedy o mimojadernou dědičnost. U nahosemenných rostlin se cpDNA přenáší pouze ze samčích pohlavních buněk. Tzn., že všechna chloroplastová DNA v potomstvu pochází z pylového zrna (dědí se paternálně, samičí chloroplasty vůbec nevstupují do zygoty). Pomocí chloroplastových molekulárně genetických markerů lze tedy prokázat genetickou introgresi vzniklou opylením mateřského stromu *Pinus uncinata* subsp. *uliginosa* pylem jedince *P. sylvestris*.

Hybridní potomstvo borovice blatky vzniklé sprášením borovicí lesní můžeme prokázat dvěma různými způsoby:

1. Analýzou polymorfismu cpDNA v oblasti trnL-trnF

Pomocí metody PCR-RFLP lze detekovat jednonukleotidový restriční polymorfismus. Wachowiak et al. (2000) popsal odlišná restriční místa u *P. sylvestris* a *P. mugo*. Protokol použitelný pro odlišení druhu *P. sylvestris* a *P. uncinata* subsp. *uliginosa* shrnuly Vejsadová a Lukášová (2010). K amplifikaci nekódující oblasti cpDNA použijeme univerzální primery (primer 1: 5'-CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG-3' a primer 2: 5'-ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG-3'). PCR směs ve finální koncentraci obsahuje 10 ng celkové DNA, 2.5mM MgCl₂, 100μM dNTP, 0.2μM každého primeru, 0.25 U Taq polymerázy a 1 × koncentrovaný reakční pufr. Teplotní program PCR se skládá z počáteční denaturace 5 min při 96°C, následuje 35 opakovaných cyklů: 30 s při 94°C, 60 s při 53°C, 90 s při 72°C, zakončeno 10 min inkubací při 72°C. K restričnímu štěpení odebereme 10 μl PCR produktu, inkubujeme přes noc při 37°C s enzymem *Dra*I. Vzorky pak analyzujeme nanesením směsi na 2% agarosový gel a elektroforetickým rozdělením v TBE pufru.

Enzym nalezne restriční místo pouze u *P. uncinata* subsp. *uliginosa*, u *P. sylvestris* zanechá úsek neštěpený. Po rozdělení vzorků na horizontálním agarózovém gelu se rozdílily ve velikosti fragmentů snadno detekují a identifikujeme odlišné haplotypy. Haplotyp *P. sylvestris* (haplotyp S) zůstává digescí nedotčený, na gelu je viditelný jeden amplifikovaný fragment cpDNA v délce cca 1030 bp. Naproti tomu haplotyp *P. uncinata* subsp. *uliginosa* (haplotyp M) vykazuje na gelu rozštěpenou cpDNA, viditelné jsou dva proužky o velikostech cca 800 bp a 250 bp.

Hodnocení druhové příslušnosti (+ fragment přítomen, – fragment nepřítomen)

Druh	Fragment 1030 bp	Fragment 800 bp
<i>Pinus sylvestris</i>	+	–
<i>P. uncinata</i> subsp. <i>uliginosa</i>	–	+

2. Analýzou mikrosatelitové oblasti cpDNA Pt41093

Lokus mikrosatelitové oblasti chloroplastové DNA Pt41093 lze použít jako druhově specifický marker pro odlišení *P. sylvestris* a *P. mugo* (Wachowiak et al. 2006). Protokol použitelný pro odlišení druhu *P. sylvestris* a *P. uncinata* subsp. *uliginosa* shrnuly Vejsadová a Lukášová (2010). Z izolované celkové DNA pomocí PCR namnožíme úsek cpDNA Pt41093. Použijeme primery podle Vendramina et al. 1996 (primer 1: 5'-TCC CGA AAA TAC TAA AAA AGC A-3' a primer 2: 5'-CTC ATT GTT GAA CTC ATC GAG A-3'). PCR směs ve finální koncentraci obsahuje 10 ng celkové DNA, 2.5mM MgCl₂, 100μM dNTP, 0.2μM každého primeru, 0.25 U Taq polymerázy a 1 × koncentrovaný reakční pufr. Teplotní program PCR se skládá z počáteční denaturace 5 min při 95°C a 5 min při 80°C, následuje 25 opakovaných cyklů: 60 s při 94°C, 60 s při 55°C, 60 s při 72°C, zakončeno 8 min inkubací při 72°C. Vzorky pak analyzujeme nanesením na 8% polyakrylamidový vertikální gel a elektroforetickým rozdělením v TBE pufru. Po obarvení stříbrem se ukáží mezidruhové rozdíly v délce namnoženého fragmentu. V případě *P. sylvestris* tento mikrosatelitový úsek cpDNA vykazuje délku 78 až 82 bp (< 82), kdežto u *P. uncinata* subsp. *uliginosa* se délka fragmentu pohybuje mezi 86 až 92 bp (> 86).

Hodnocení druhové příslušnosti (+ fragment přítomen, – fragment nepřítomen)

Druh	Fragment < 82 bp	Fragment > 86 bp
<i>Pinus sylvestris</i>	+	–
<i>P. uncinata</i> subsp. <i>uliginosa</i>	–	+

2.4 Vypracování mikropropagační metody u borovice blatky

Mikropropagace je často využívanou technikou zvláště pro množení dřevin. *In vitro* regenerace u druhů jehličnatých dřevin je účinným prostředkem pro namnožení velkého objemu geneticky čistého materiálu. Jak uvádí Malá et al. (1999), lze orgánové kultury dřevin pěstované *in vitro* pokládat za geneticky stabilní, protože nedochází k chromozómovým změnám. Klonový materiál lze množit dvěma způsoby: indukcí organogeneze nebo somatické embryogeneze na primárním explantátu. Metoda organogeneze je u jehličnatých stromů podstatně obtížnější než u listnatých druhů. Úspěšnost způsobu regenerace explantátů u borovic závisí na mnoha faktorech jako je stáří a fyziologický stav donorového jedince, doba odběru, způsob uchovávání výchozího materiálu, technika povrchové sterilizace, typ použitého explantátu a růstových vlastnostech studovaného druhu (Libby a Ahuja 1993, Aitken-Christie 1984). U *Pinus sylvestris* a *P. nigra* byla iniciována organogeneze přes indukcí axilárních pupenů a prýtů (Chalupa 1986, Salajová 1992, Sul a Korban 2004). U dospělých stromů borovice blatky byla iniciace morfogeneze velmi obtížná, podařilo se iniciovat organogenezi u izolovaných zimních pupenů, avšak odvodit sekundární kultury se nepodařilo (Vejsadová a Šedivá 2002). Pro indukcí organogeneze u blatky byly proto použity jako výchozí explantáty vrcholové části hypokotylu s děložním nodem, které byly odřezány z naklíčených zralých semen (Vejsadová et al. 2008, Vejsadová a Lukášová 2010).

Mikropropagační postupy zahrnující indukcí organogeneze, tvorbu prýtů i kořenů, podmínky účinné aklimatizace *in vitro* rostlin i jejich dopěstování v podmínkách *ex situ* jsou uvedeny v následujících bodech.

2.4.1 Odběr semen na lokalitě a uskladnění semen

Semena byla v době zralosti odebrána z fenotypově a geneticky ověřených výběrových stromů borovice blatky na Borkovických blatech. Odebraná semena byla uskladněna v označených papírových sáčcích v uzavřeném boxu se silikagelem v chladové místnosti při teplotě 6–8 °C.

2.4.2 Sterilní výsev

Z důvodu urychlení klíčení, byla zralá semena namočena do vody a ponechána po dobu 3 dnů v lednici při teplotě 4 °C. Poté byla v laminárním boxu sterilizována 7,2% roztokem chlornanu vápenatého [Ca (ClO)₂] po dobu 30 min s krátkým předošetřením 70% ethanolem. Jako výsevní médium bylo použito MS (Murashige a Skoog 1962) médium s ¹/₁₀ koncentrací solí bez vitaminů zpevněné 7 g/l agar (Sigma). pH média bylo upraveno před autoklávováním na 6,5. Semena klíčila ve zkumavkách na zešíkmeném agarovém médiu při konstantní teplotě a za tmy v termostatu (22 ± 2 °C).

2.4.3 Odvození *in vitro* kultur

- *Iniciační fáze (indukce organogeneze)*
Jako primární explantát byla použita vrcholová část hypokotylu s kotyledony a nodem z 8–12 týdnů starých semenáčů. Explantáty byly přeneseny na tři iniciační média Westwaco WV5 (Duchefa), WPM (Lloyd a McCown 1980, Duchefa) a MS (Murashige a Skoog 1962) médium s plnou koncentrací solí. Média obsahovala směs vitaminů, cytokinin benzyladenin (BA) v koncentraci 5 a 10 mg/l, 3% sacharózu a 7,5 g/l Phytoagar (Duchefa). Hodnoty pH byly upraveny před autoklávováním na 5,6.
- *Multiplikační fáze (tvorba výhonů)*
Po 4 týdnech kultivace na iniciačních médiích byly výhony přeneseny na multiplikační média (WV5, WPM a MS) bez růstových regulátorů s 2,5% sacharózou, aktivním uhlím (Sigma-Aldrich) v koncentraci 5 g l⁻¹ a 7,5 g l⁻¹ agarem (Phytoagar Duchefa). Hodnoty pH byly u všech médií upraveny na 5,6 před autoklávováním. Vyvinuté svazky jehlic s brachyblasty byly odřezány z multiplikujících kultur a dále kultivovány na médiích shodného složení, bez růstových regulátorů nebo při nízké koncentraci BA (0,1 a 0,5 mg/l). Subkultivace byla prováděna ve 4–6 týdenních intervalech. Multiplikující kultury (obr. 4) byly pěstovány ve sklenicích (250 ml) s plastovým uzávěrem ve světelně a teplotně kontrolované místnosti (16 h fotoperioda, teplota den/noc 23/19 °C a osvětlení 55 μmol m⁻² s⁻¹).
- *Zakořeňovací fáze (iniciace kořenových primordií a růst kořenů)*
Pro indukci a vývoj výhonů u borovice blatky se nejvíce osvědčilo médium Westwaco WV5 firmy Duchefa – tvorba výhonů byla průkazně vyšší než na zbývajících dvou médiích. Proto i pro zakořeňování výhonů (obr. 5) bylo použito Westwaco médium s poloviční koncentrací solí, 1% sacharózou, aktivním uhlím (2 g/l, firma Sigma-Aldrich), kyselinou indolylmáseľnou (IBA) v koncentraci 0,1 mg/l, 8 g/l agarem (Phytoagar Duchefa) a s pH 5,6.

2.4.4 Aklimatizace *in vitro* rostlin (převod kultur do nesterilního prostředí)

Kořeny intaktních rostlin byly důkladně opláchnuty od zbytku agaru destilovanou vodou a poté byly vysazeny do malých květináčů (50 ml) s obsahem směsi rašelina:agropelit v poměru 1:1 (obr. 6). Rostliny byly zalévány po dobu jednoho týdne 10x naředěným MS živným roztokem, poté destilovanou vodou. Vysoká vlhkost vzduchu (90–95%) nutná pro kultivaci *ex vitro* rostlin byla zajištěna umístěním květináčů do plastového minipařeniště MINIPA-R od firmy FIMA zakrytým nízkým čirým víkem (rozměry 38,5×25×17,5 cm). Postupně byla vlhkost snižována překrytím rostlin vyšším víkem s ventilací na hodnoty okolního vzduchu.

2.4.5 Dopěstování rostlin v podmínkách *ex situ*

Po 3–4 měsících aklimatizace budou geneticky ověřené klony z výběrových stromů borovice blatky dopěstovány ve skleníku a na otevřeném záhoně až do výsadby schopných sazenic (1–2 roky). Podle potřeb státní správy budou připraveny k repatriaci na Borkovická blata nebo rekonstrukci semenného sadu u obce Mažice. Pro dlouhodobé uchování vybraných klonů blatky je k dispozici stávající genobanka *in vitro*.

2.5 Souhrn dosažených výsledků

2.5.1 Vyhodnocení aktuálního stavu populace borovice blatky (v PR Borkovická blata)

Plošnou těžbou ložiska rašeliny v letech 1956 až 1980 došlo na Borkovických blatech k významnému snížení úrovně povrchu terénu. Netěžená část území se po ukončení těžby ocitla cca 1–1,5 m nad úrovní těženého rašeliniště. S tím úzce souvisí pokles hladiny podzemní vody a pravděpodobná ztráta kontaktu kořenů blatky s podzemní vodou. Změna stanovištních podmínek konkurenčně zvyhodňuje smrk ztepilý a břízu převislou na úkor borovice blatky. To se aktuálně odráží v relativně vyrovnaném poměru zastoupení živých jedinců těchto dřevin, celkově vyšší hmotnosti smrku, výrazně dominantním zastoupení blatky v počtu i objemu mrtvých stromů, nízkém zastoupení mladých jedinců blatky vzhledem k vyšším tloušťkovým třídám a praktické absenci jejího přirozeného zmlazení. Bylinné patro je ochuzené o druhy náročnější na obsah vody v substrátu.

Naproti tomu plocha těžbou opuštěná má stabilnější a výše položenou hladinu podzemní vody. To se projevuje jak přítomností řady mokřadních druhů, tak i odrůstajícími mladými jedinci borovice blatky nalétávající z přilehlých porostů. Z výše uvedeného vyplývá, že netěžená plocha se zbytkem původní populace borovice blatky má dnes hodnotu genové banky. Lze však předpokládat, že důsledkem jejího oslabení, způsobeným změnou vlhkostních podmínek a nástupem konkurenčních dřevin bude pokračovat ústup borovice blatky z netěžené části území. V dlouhodobějším výhledu lze existenci borovice blatky předpokládat pouze na ploše s vytěženou rašelinou.

2.5.2 Výběr reprezentativních stromů borovice blatky v PR Borkovická blata

Ve sledované lokalitě byla vybrána a viditelně označena série reprezentativních stromů (tab. 2), která obsahuje celkem 32 starších jedinců s obvodem kmene mezi 70 a 120 cm ve výčetní výšce. Tyto stromy jsou součástí souboru jedinců, který by měl co nejlépe reprezentovat genofondovou základnu taxonu v populaci, vázanou ve starší generaci.

2.5.3 Použití geneticky ověřeného osiva

Technikou kontrolovaného opylení byla získána semena borovice blatky, jejichž čistota byla ověřena geneticky. Výsledky z DNA analýz potvrdily funkčnost chloroplastových markerů jako spolehlivých identifikátorů haplotypu borovice blatky nebo borovice lesní po otcovské linii. Byla založena *in vitro* genobanka (klonový archív z výběrových stromů geneticky ověřené borovice blatky) jako výchozí zdroj reprodukce blatky pro případné posílení původních populací na vybraných lokalitách i v semenném sadu. Zralá semena z označených výběrových stromů jsou dlouhodobě uchována v semenné bance ve VÚKOZ, v.v.i.

Tab. 2 Přehled reprezentativních stromů borovice blatky vybraných v PR Borkovická blata v letech 2007–2009

Označení	Obvod kmene	Poznámka	Lokalizace (WGS-84)
BRK-01	72 cm	knlt intermed., jinak typická	plocha C, označeno v terénu
BRK-02	84 cm	typická, šikmá	N49 14 24.90 E014 37 38.54
BRK-03	77 cm	typická, štíhlý vrchol koruny	plocha C, označeno v terénu
BRK-04	85 cm	typická, mírně prohnutá	plocha C, označeno v terénu
BRK-05	85 cm	typická, od 5 m dva kmeny a jeden výše znovu rozdvojen	N49 14 28.57 E014 37 22.75
BRK-06	92 cm	–bez specifikace	N49 14 20.9 E014 37 40.5
BRK-07	81 cm	široká špičatá koruna	40 m SV od BRK-10
BRK-08	83 cm	knlt ± nahn., jinak typická	10 m SZ od BRK-07
BRK-09	90 cm	–bez specifikace	10 m J od BRK-08
BRK-10	91 cm	v. 15 m, holý kmen do 8,5 m, lehký odklon knlt	N49 14 19.71 E014 37 36.30
BRK-11	93 cm	v. 14 m, kužel. koruna, hybridní ve všech znacích!	N49 14 18.82 E014 37 38.18
BRK-12	81 cm	–bez specifikace	N49 14 27.05 E014 37 25.53
BRK-13	70 cm	štíhlá kor.	17 m JJZ od H3
BRK-14	91 cm	šir. kužel./ knlt ± nahn.	N49 14 26.27 E014 37 17.01
BRK-15	84 cm	knlt ± ohnuté, jinak typická	N49 14 31.82 E014 37 11.33
BRK-16	103 cm	typická	N49 14 31.29 E014 37 04.30
BRK-17	95 cm	typická	N49 14 32.26 E014 37 03.47
BRK-18	109 cm	typická; 2 km.od 10m, málo plod.	N49 14 32.01 E014 37 03.18
BRK-19	93 cm	typická, štíhlá kor.; č. 014 45	N49 14 32.26 E014 37 00.94
BRK-20	120 cm	typická, foto !; č 50	N49 14 31.35 E014 36 58.24
BRK-21	76 cm	štíhlá kor., někt. knlt nahn.; 023/54	N49 14 29.07 E014 37 01.14
BRK-22	105 cm	typická, někt. knlt náznak nahn.	N49 14 25.21 E014 37 26.44
BRK-23	107 cm	košatá, větve od 4,5 m, subsymtr.š.	N49 14 23.42 E014 37 23.71
BRK-24	113 cm*	=X8; 5 kmenů z různé výšky (*113cm hlavní)	N49 14 32.22 E014 36 59.07
BRK-25	85 cm	=X5	N49 14 31.84 E014 37 05.71
BRK-26	110+88 cm*	=X9; v.19 m,*cm ve 150cm, 2 km. od báze, řídká, „20% sylvestris“	N49 14 33.63 E014 36 59.86
BRK-27	82 cm	=X7; v. 18 m, šikmá, nekvalitní, š. typ uncinata = CSx09/ 2-01// 5-01	N49 14 32.65 E014 36 56.12
BRK-28	89 cm	=X6; v.18,5 m, štíhlá kor. (nejZ gnf. strom)	N49 14 32.43 E014 36 54.47
BRK-29	77 cm	=X4; v.12,5 m, hustě kužel., přev.samčí, špič. kužel. apof.,velmi typická ale knlt ± nahn.	N49 14 26.91 E014 37 19.56
BRK-30	83 cm	v.15 m, hustě kužel.,šikmá, typická ale knlt nahn.	N49 14 27.74 E014 37 18.48
BRK-31	73 cm	=X3; v.13,5 m, úzce kužel.vrchol, zcela typická	N49 14 27.05 E014 37 18.63
BRK-32	85 cm	v.12 m, mladší,intern.zpoč.řídké až 35cm, typický habitus ale někt. knlt nahn.	N49 14 27.95 E014 37 21.16

Použité zkratky: knlt = jednoleté samičí šištice, konelety (nahn. = nahnuté); v. = výška stromu

3 PRAKTICKÁ DOPORUČENÍ PRO KOMPLEXNÍ OCHRANU BOROVICE BLATKY V PR BORKOVICKÁ BLATA

Po komplexním a detailním studiu borovice blatky ve sledovaném území i v laboratořích VÚKOZ, v.v.i. můžeme formulovat praktická doporučení pro komplexní ochranu borovice blatky v PR Borkovická blata.

3.1 Revitalizace původní populace na Borkovických blatech

Životaschopnost blatkových porostů je úzce spjata s výškou hladiny podzemní vody. Její dlouhodobý (pravděpodobně trvalý) pokles v důsledku těžby rašeliny se projevil chřadnutím značného procenta dospělých stromů a ztrátou schopnosti konkurovat smrku a břízám v měnících se podmínkách. Účinná revitalizace původní populace na těžbou uchráněném fragmentu Borkovických blat je vzhledem ke stupni narušení místního ekosystému i samotné populace dnes již nereálná. Probírky doprovodných dřevin v původním blatkovém boru sice usnadňují odrůstání mladých blatek (i když často hybridně ovlivněných), na druhou stranu ale zesilují stresový tlak na staré matečné stromy již dříve oslabené poklesem hladiny podzemní vody. Mnoho těchto fyziologicky oslabených stromů pak podléhá invazi kůrovcovitých brouků.

3.2 Doporučený management pro Borkovická blata

Rašelinistní komplex na území PR je tvořen jednak staršími lesními porosty a jednak sníženou plochou po vytěžení hlavního rašelinného ložiska. Část s lesními porosty (viz „netěžená část“) je tvořena původním blatkovým borem s různým zastoupením doprovodných dřevin a plášťovými porosty (převážně kulturní smrčina, místy s významným podílem borovice lesní). Otevřená snížená plocha (viz „vytěžená část“) s mělkou vrstvou zbytkové rašeliny a zmokřenými místy představuje 30 let od ukončení těžby spontánně zarůstající biotop osídlovaný místní flórou a faunou. Z dřevin osídlují plochu druhy počátečních sukcesních fází, tj. kromě borovice lesní a blatky zejména bříza a několik druhů vrb.

3.2.1 Netěžená část

- Každoročně kontrolovat zdravotní stav vybraných reprezentativních jedinců *Pinus uncinata* subsp. *uliginosa*, ze kterých bude odebrán reprodukční materiál pro obnovu populace.
- Metodami metodami vegetativního množení a kontrolovaného opylování zajistit co nejvíce reprodukčního materiálu s maximální genetickou čistotou.
- V intervalu 10 let opakovat šetření statistické inventarizace a porovnáním výsledků více specifikovat trend vývoje dochovaného fragmentu blatkového boru a pokračovat v monitorování hladiny podzemní vody. Součástí opakovaných šetření musí být sledování vývoje a stavu bylinného patra na vybraných inventarizačních plochách a v okolí sond.
- Pokračovat v šetrném uvolňování dosud přežívajících blatek (fenotypově čistých) včetně mladých jedinců pocházejících jak z přirozeného zmlazení (dokud podmínky na lokalitě byly příznivější), tak i z umělých výsadeb realizovaných za účelem

zastavení ústupu blatky v zájmové lokalitě (jemnější uvolňování sníží riziko stresu z náhlé změny mikroklimatických podmínek). Šetrné uvolňování by se mělo omezit na pokácení vitálních stromů smrku, případně břízy a borovice lesní v blízkosti cenných jedinců blatek. Hmota pokácených stromů musí být ponechána na místě, nanejvýš lze doporučit odřezání trčících kosterních větví z korun pokácených smrků pro omezení stínění a urychlení rozkladu.

- Důrazně doporučujeme neprovádět plošné ani individuální mechanické probírky, případně chemickou likvidaci keřového podrostu (zvláště krušiny olšové) a mladých listnatých dřevin (břízy), protože toto nešetrné uvolňování negativně ovlivňuje mikroklima blatkových porostů, případně způsobuje přímé hynutí mladých blatek (jako následek dřívější aplikace herbicidu).
- Oblast monitoringu rozšířit o sledování růstu a životaschopnosti mladých exemplářů blatky v různých podmínkách (uvolněná, managementem udržovaná plocha, částečný zástín mateřským porostem).

3.2.2 Vytěžená část

- Ověřit genetickou čistotu nárostů blatky, najít a zmapovat fenotypově čisté jedince.
- Na podkladě leteckých snímků monitorovat samovolné šíření dřevin na vytěžené ploše.
- Vybrat segmenty s podobným vývojem a specifikovat druhy zastoupených dřevin, jejich velikost a plochu jednotlivých segmentů. Šetření opakovat alespoň 1x za 3 – 5 let.
- V provozních podmínkách napěstovat sadební materiál 2/0 z čistého osiva ze semenné banky VÚKOZ, v.v.i. nebo z *in vitro* genobanky.
- Výsadby sazenic provádět přímo na vytěžených plochách, zejména tam, kde se blatka nemůže šířit samovolně náletem z mateřského porostu. Plochy vhodné pro výsadbu je nutné předem vyhledat, jejich hranice v terénu stabilizovat a aktuální stav jednotlivých ploch detailně popsat a jejich polohu zakreslit do mapové dokumentace (rezervační kniha).
- Vzhledem k experimentálnímu charakteru a potenciální uplatnitelnosti uvedeného postupu i na jiných lokalitách, je třeba vést pro každou dosazovanou plochu záznamy o použitém sadebním materiálu (věk, velikost, způsob školkování atd.) a počtu použitých sazenic.
- Alespoň 1x/rok provádět kontrolu výsadeb tzn. zaznamenávat počet živých a uhynulých sazenic, charakterizovat a kvantifikovat případné poškození, výšku výsadeb, přírůsty.
- Sledovat vývoj vegetace na vysazovaných plochách a reakci výsadeb na případné změny prostředí jako je šíření náletových dřevin, rozrůstání porostů rákosu apod. Vhodnými managementovými zásahy (pročistky, prořezávky) mladé borovice blatky podporovat.
- Rozšířit plochu monitorovanou metodou statistické inventarizace i na vytěženou část chráněného území za účelem vyhodnocení změn na celé ploše PR (včetně opakovaných fytoecologických zápisů na trvalých plochách fixovaných jako středy inventarizačních ploch).

4 SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ (PŘÍNOS METODIKY)

Vlastní výzkum byl zaměřen na vybranou konkrétní lokalitu. Navrhovaná opatření sledují cíl podpory jedinečné populace borovice blatky v konkrétních ekologických podmínkách. Závěry a doporučení managementu nelze tedy bezvýhradně zobecnit a aplikovat v jiných územích, jejich základní principy jsou však přenositelné. Naopak široké uplatnění mají ověřené postupy identifikace fenotypově i genotypově čistých jedinců, metody získání geneticky čistého osiva či sadebního materiálu a v neposlední řadě metody monitoringu založeného na bázi statistické inventarizace. Komplexní zpracování problematiky ochrany genofondu borovice blatky je svým způsobem zcela ojedinělé. V Rakousku, Německu ani jinde nebyly v posledních desetiletích publikovány žádné studie zabývající se borovicí blatkou v jejím současném taxonomickém vymezení tj. mimo region Alp, případně Schwarzwald. Publikované výsledky programů zaměřených na ochranu genetické diverzity borovice blatky nebyly zjištěny ani v polské literatuře.

5 POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Obecně může být metodika uplatněna v ochranářské a lesnické praxi, podpoří rozvoj a uchování genových zdrojů lesních dřevin. Hlavním uživatelem metodiky bude správce lesního území Borkovické blato, což je podnik Lesy České republiky, s.p., Lesní správa Jindřichův Hradec. Přírodní rezervace je organizačně začleněna do revíru Soběslav.

Metodika je také určena pro ústřední orgány státní správy jako je MŽP ČR a MZe ČR. Je využitelná ve vědeckých a odborných institucích zaměřených na ochranu přírody spojenou se záchranou zvláště chráněných a ohrožených druhů rostlin, jejichž zřizovatelem je Ministerstvo životního prostředí (Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky, Správa Krkonošského národního parku a Správa Národního parku a chráněné krajinné oblasti Šumava). Dalšími uživateli jsou rovněž regionální orgány státní správy na úseku ochrany přírody (krajské úřady). Mohou ji však využít i specializovaná pracoviště AV ČR a lesnických fakult našich univerzit. Geneticky čisté klony a semenný materiál borovice blatky bude prioritně použit pro posílení původní populace, ale může být využit jako genetický zdroj i pro jiné účely např. rekonstrukci semenného sadu blatky u obce Mažice, založeného z nevhodně vybraného materiálu na Borkovických blatech.

6 CITOVANÁ LITERATURA

- Aitken-Christie J. (1984): Micropropagation of *Pinus radiata*. *Plant Propagators*, 30: 9–11.
- Businský R. (1998): Agregát *Pinus mugo* v bývalém Československu – taxonomie, rozšíření, hybridní populace a ohrožení [The *Pinus mugo* complex in former Czechoslovakia – taxonomy, distribution, hybrid populations and endangering]. *Zprávy Čes. Bot. Společ.*, Praha, 33/1: 29–52.
- Businský R. (2002): *Pinaceae* Lindl., borovicovité. – In: Kubát K. et al. [eds.], Klíč ke květeně České republiky. [Key to the Flora of the Czech Republic.]. Academia, Praha, pp. 94–100.
- Businský R. (2008): The genus *Pinus* L., pines: contribution to knowledge. A monograph with cone drawings of all species of the world by Ludmila Businská. *Acta Pruhoniciana*, 88: 1–126, 73 figs, 42 photos.

- Businský R. (2009): Borovice blatka v novém pojetí [A new concept in bog pine]. Zprávy Čes. Bot. Společ., Praha, 44/1: 35–43.
- Businský R., Kirschner J. (2006): Nomenclatural Notes on the *Pinus mugo* Complex in Central Europe. Phytotaxa, Annales Rei Botanicae (Horn, Austria), 46: 129–139.
- Businský R., Kirschner J. (2010): *Pinus mugo* and *P. uncinata* as parents of hybrids. A taxonomic and nomenclatural survey. Phytotaxa (Horn, Austria), 50/1: 27–57.
- Dohnal Z., Kunst M., Mejstřík V., Raučina Š., Vydra V. (1965): Československá rašeliniště a slatiniště. ČSAV, Praha.
- Chalupa V. (1986): Rozmnožování jehličnatých stromů *in vitro*. Lesnictví, 32: 997–1010.
- Kaňák K. (1965): Methods of controlled pollination of pines used at Arboretum Bolevec. Commun. Inst. Forest. Czechoslov., Zbraslav – Strnady, 4: 127–139.
- Kaňák K. (1968): Metody kontrolovaného opylení borovic. Práce VÚLHM, Zbraslav – Strnady, 35: 19–45.
- Libby W. J., Ahuja M. R. (1993): Micropropagation and clonal options in forestry. –In: Micropropagation of Woody Plants, ed., Ahuja, M. R. Kluwer Acad. Publishers, 1993, pp 425–442.
- Lloyd G., McCown B. (1980): Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proceedings International Plant Propagators' Society, 30: 421–427.
- Malá J., Cvrčková H., Máchová P., Šíma P. (1999): Využití mikropropagace při záchraně cenných populací ušlechtilých listnatých lesních dřevin. Zprávy lesnického výzkumu, 44: 6–11.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473–497.
- Salajová T. (1992): Plantlet regeneration from axillary shoots of *Pinus nigra* ARN. Biologia, 47: 15–19.
- Skalický V. (1988): *Pinus sylvestris*, *P. mugo*, *P. rotundata* a jejich kříženci. – In: Hejný S., Slavík B. (eds.), Květena České socialistické republiky 1. Academia, Praha, pp. 289–308.
- Sul I. W., Korban S. S. (1998): Effects of media, carbon sources and cytokinins on shoot organogenesis in the Christmas tree Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 73: 822–827.
- Unar P., Janík D., Souček J., Vrška T., Hort L., Král K.: Bog pine forests in mined peatbogs - is the conservation of undisturbed fragments sufficient? Applied Vegetation Science. *submitted 06-2011*
- Vejsadová H., Šedivá J. (2002): Mikropropagace ohroženého druhu borovice blatky (*Pinus rotundata* Link). Acta Pruhoniciana, 73: 37–47.
- Vejsadová H., Vlašínová H., Havel L. (2008): Preservation of a rare bog pine genotype using micropropagation techniques. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, LVI, 4: 197–206.
- Vejsadová H., Lukášová M. (2010): Shoot organogenesis induction from genetically verified individuals of endangered bog pine (*Pinus uncinata* subsp. *uliginosa*). Journal of Forest Science, 56/8: 341–347.
- Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P., Morgante M. (1996): A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. Molecular Ecology, 5: 595–598.
- Wachowiak W., Leśniewicz K., Odrzykoski I.J., Augustyniak H., Prus-Głowacki W. (2000): Species specific cpDNA markers useful for studies on the hybridisation between *Pinus mugo* and *P. sylvestris*. Acta Societatis Botanicorum Polonia, 69: 273–276.

- Wachowiak W., Stephan B.R., Schulze I., Prus-Głowacki W., Ziegenhagen B. (2006): A critical evaluation of reproductive barriers between closely related species using DNA markers – a case study in *Pinus*. *Plant Systematics and Evolution*, 257: 1–8.
- Wakeley P. C., Campbell, T. E. (1954): Some New Pine Pollination Techniques. U.S. Dept. Agr. For. Ser. – South For. Exp. Sta. "Ocas Paper", 136, August 1954.

7 DEDIKACE

Metodika byla zpracována ve Výzkumném ústavu Silva Taroucy pro krajinu a okrasné zahradnictví, v. v. i. v Průhonících v rámci řešení (2007–2011) projektu výzkumu a vývoje MŽP SP/2d4/83/07: „Záchrana genetické diverzity borovice blatky (*Pinus uncinata* subsp. *uliginosa*), subendemitu ČR, v centru jejího areálu kombinovanou metodou biomonitoringu, kontrolovaného opylení a mikropropagace“.

Naše poděkování patří také garantům tohoto projektu (Ing. Petr Mokrejš, RNDr. Václav Braun, Mgr. Květa Černá z MŽP) a oponentům výročních zpráv (RNDr. Štěpán Husák, CSc., Botanický ústav AVČR v Třeboni a Mgr. Daniela Pavingerová, CSc., ÚMBR AVČR v Českých Budějovicích).

8 FOTO PŘÍLOHY

- Obr. 1 Monitorovaná plocha na podkladu leteckého snímku
- Obr. 2 PR Borkovická blata – přehledová mapa
- Obr. 3 Odběr prašnickových šištic z vybraných stromů v PR Borkovická blata
- Obr. 4 Multiplikující *in vitro* kultury borovice blatky
- Obr. 5 Tvorba kořenů u výhonů v *in vitro* podmínkách
- Obr. 6 *Ex vitro* aklimatizované rostliny