

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Geografická partenogeneze v tetraploidním komplexu
*Rubus ser. Glandulosi***

Bakalářská práce

Věra Forejtová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: doc. RNDr. Bohumil Trávníček, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Michal Sochor, Ph.D.

Olomouc 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Bohumila Trávníčka, Ph.D. a Mgr. Michala Sochora, Ph.D. a s použitím uvedené literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu práce doc. RNDr. Bohumilu Trávníčkovi, Ph.D. a konzultantovi Mgr. Michalu Sochorovi, Ph.D. za odborné vedení a všestrannou pomoc. Také bych chtěla poděkovat RNDr. Michalu Hronešovi, Ph.D. za pomoc při měření na průtokovém cytometru. Své rodině bych chtěla poděkovat za podporu a pomoc při sběru vzorků.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Věra Forejtová

Název práce: Geografická partenogeneze v tetraploidním komplexu *Rubus* ser. *Glandulosi*

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra botaniky PřF UP

Vedoucí práce: doc. RNDr. Bohumil Trávníček, Ph.D.

Rok obhajoby: 2019

Abstrakt:

Rod *Rubus* je jedním z druhově nejbohatších rodů české květeny. U většiny druhů podrodu *Rubus* převažuje fakultativní apomixe (pseudogamie). Jednou z výjimek je ser. *Glandulosi*, jejíž zástupci se rozmnožují převážně sexuálně. Z předchozího výzkumu je známo, že poměr sexuálního rozmnožování a apomixe se u tohoto taxonu geograficky liší (tzv. geografická partenogeneze). Cílem této práce bylo provést analýzu semen *R. ser. Glandulosi* z různých (dosud neanalyzovaných) regionů metodou průtokové cytometrie. Byla vypočítána ploidie embrya a endospermu a z poměru ploidií byl určen způsob vzniku semen. Byly zjištěny čtyři způsoby vzniku semen: sexuální (cca 83 %), apomiktický (cca 13 %) a dvě odchylky. Jedinci byli dále klasifikováni podle podílu apomiktických semen. Většina jedinců (cca 73 %) byla sexuální (tj. podíl sexuálně odvozených embryí ≥ 90 %), cca 22 % jedinců bylo fakultativně apomiktických (≥ 50 % apomikticky odvozených embryí), pouze dva jedinci byli fakultativně sexuální (intermediární podíl). Fakultativně apomiktičtí jedinci se vyskytovali zejména v oblasti podél hranic České republiky s Německem a Polskem, zatímco ve zbylých regionech převažovali sexuální jedinci. Tyto výsledky potvrzují, že se u ostružiníků ser. *Glandulosi* uplatňuje geografická partenogeneze.

Klíčová slova: apomixe, FCSS, ostružiník, reprodukce, *Rubus*

Počet stran: 50

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographic identification

Author's first name and surname: Věra Forejtová

Title of thesis: Geographical parthenogenesis in the tetraploid complex of *Rubus* ser. *Glandulosi*

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacky University

Supervisor: doc. RNDr. Bohumil Trávníček, Ph.D.

The year of presentation: 2019

Abstract:

The genus *Rubus* is one of the species-richest genera in the Czech flora. In most species of subgenus *Rubus*, facultative apomixis (pseudogamy) predominates. One exception is ser. *Glandulosi*, whose members reproduce predominantly sexually. It is known from previous research that proportion of sexual and apomictic reproduction differs geographically (so-called geographical parthenogenesis). The aim of this thesis was to analyse seeds of *R. ser. Glandulosi* from different (not yet analysed) regions by flow cytometry. Ploidy levels of embryo and endosperm were estimated, and mode of reproduction was subsequently determined for each seed. Four modes of reproduction were detected: sexual (approx. 83 %), apomictic (approx. 13 %) and two deviations. Individuals were classified by proportion of apomictic seeds. Most individuals (approx. 73 %) were sexual (i. e. proportion of sexually derived embryos ≥ 90 %), approx. 22 % of individuals were facultatively apomictic (≥ 50 % apomictically derived embryos), only two individuals were facultatively sexual (intermediate proportion). Facultatively apomictic individuals occurred mainly along borders of the Czech Republic with Germany and Poland and sexual individuals occurred mainly in the remaining studied regions. These results confirm that geographical parthenogenesis occurs in *R. ser. Glandulosi*.

Keywords: apomixis, FCSS, brambles, reproduction, *Rubus*

Number of pages: 50

Number of appendices: 0

Language: Czech

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Cíle práce	9
3. Literární přehled.....	10
3.1. Charakteristika rodu <i>Rubus</i>	10
3.1.1. Charakteristika <i>Rubus ser. Glandulosi</i>	12
3.2. Rozmnožování krytosemenných rostlin	14
3.2.1. Generativní rozmnožování	14
3.2.2. Apomixe	17
3.3. Klasifikace apomiktů	20
3.4. Geografická partenogeneze	22
3.5. Průtoková cytometrie.....	24
4. Materiál a metody	27
4.1. Rostlinný materiál.....	27
4.2. Příprava a analýza vzorku.....	30
5. Výsledky	33
6. Diskuse.....	38
6.1. Variabilita v ploidii embrya a endospermu u jednotlivých způsobů reprodukce	38
6.2. Geografická partenogeneze na studovaném území	39
6.3. Hypotézy vysvětlující geografickou partenogenezi	40
7. Závěr	43
8. Literatura.....	44

1. Úvod

Rožmnořování (u rostlin i řivočichů) můžeme rozdělit na pohlavní (sexuální) a nepohlavní (asexuální). Oba typy rořmnořování mají své výhody i nevýhody. Sexuální rořmnořování umožňuje udržovat genetickou variabilitu v populaci a je výhodné v proměnlivém prostředí, nevýhodou však může být potřeba partnera a (u rostlin) opylovače. Při nepohlavním rořmnořování vznikají geneticky stejní jedinci (klony). Jedním ze způsobů nepohlavního rořmnořování je apomixe (v dnešním pojetí agamospermie), tj. klonální rořmnořování prostřednictvím semen. Nevýhodou je nízká variabilita potomků (způsobená jen náhodnými mutacemi), proto je apomixe u naprosté většiny rostlin pouze částečná (fakultativní) (Asker & Jerling 1992).

Rod ostruřiník (*Rubus* L.) je jedním z nejrořsáhlejších (v České republice roste min. 133 druhů; Danihelka et al. 2012, Velebil et al. 2016) a z hlediska taxonomie a obtížnosti určování jedním z nejkomplikovanějších rodů české květeny. Způsoby reprodukce v rodu *Rubus* jsou velmi variabilní. Ostruřiníky se rořmnořují sexuálně, apomikticky i vegetativně (Thompson 1997). Apomixe se z domácích podrodů vyskytuje pouze u podrodu *Rubus* a je fakultativní. Jedná se o pseudogamii, tj. tvorbu semen, kdy embryo sice vzniká partenogeneticky, ale pro vznik endospermu je vyřadováno oplození (Asker & Jerling 1992). U většiny zástupců tohoto podrodu sice občas dochází k sexuálnímu rořmnořování, ale apomixe převařuje.

Převahou sexuálního rořmnořování se však od ostatních skupin podrodu *Rubus* liší ostruřiníky ser. *Glandulosi* (Wimm. et Grab.) Focke. Její zástupci se díky vysoké sexualitě často kříží s ostruřiníky z jiných sérií, což je také jeden z důvodů jejich vysoké variability. Bylo zjiřtěno (řarhanová et al. 2012), že se v této sérii uplatňuje tzv. geografická partenogeneze, která je známá i u řady jiných rodů (např. *Ranunculus* L., Hörandl & Paun 2007; *Taraxacum* F. H. Wigg., van Dijk 2003). Tento termín označuje jev, kdy se geograficky liší podíl obou typů rořmnořování. Existuje mnoho hypotéz vysvětlujících tento fenomén. Geografická partenogeneze je způsobena rozdílnými ekologickými podmínkami v různých regionech a podílí se na ní více faktorů (Hörandl 2006). Zřejmě také souvisí s rozsahem zalednění v období pleistocénu, protože v tomto období vznikly apomiktické linie (Carman 1997). Problematika geografické partenogeneze je však (zejména u ser. *Glandulosi*) zatím málo prořkoumaná.

Rozlišit způsob rozmnožování je možné metodou průtokové cytometrie (FCM, flow cytometry). Metoda se využívá např. v genetice, imunologii, biochemii (Robinson & Grégori 2007) a poslední dobou se používá také pro určení ploidie a obsahu jaderné DNA u rostlin. Modifikace FCM metody, FCSS (flow cytometry seed screen; Matzk et al. 2000), se využívá k analýze semen. Průtokový cytometr měří relativní fluorescenci jader embrya a endospermu analyzovaného semene oproti standardu. Jako standard se používá biologicky podobný materiál, např. *Pisum sativum* L. (Greilhuber et al. 2007). Cytometr je propojený s počítačem a výsledky se zobrazují ve formě histogramu. Pomocí FCSS metody lze odhadnout ploidii embrya a endospermu semene a z toho odvodit způsob reprodukce (Matzk et al. 2000).

2. Cíle práce

Cílem této práce je vypracovat literární rešerši k problematice apomixe a geografické partenogeneze se zaměřením na taxon *Rubus* ser. *Glandulosi*, podílet se na sběru materiálu v terénu a provést analýzu získaných semen metodou průtokové cytometrie (FCSS).

3. Literární přehled

3.1. Charakteristika rodu *Rubus*

Ostružiník (*Rubus*) z čeledi růžovitých (Rosaceae) je druhově velmi bohatý a taxonomicky obtížný rod, vyskytující se na všech kontinentech kromě Antarktidy (Holub 1995). Název rodu je odvozen z latinského výrazu *ruber* – červený (Koblížek 2006). Věda zabývající se ostružiníky se nazývá batologie, řecké slovo *batos* znamená ostružiník (Trávníček et al. 2000a).

Rod se skládá z 12–13 podrodů, z toho v české flóře se vyskytuje pět podrodů (Holub 1995), z nichž původní jsou *Chamaerubus* Kuntze, *Cylactis* (Raf.) Focke, *Idaeobatus* Focke a *Rubus* a druhy z nepůvodního podrodu *Anoplobatus* (Focke) Focke jsou někdy pěstovány (Trávníček et al. 2000a). Podrod *Rubus* v ČR se dělí na sekce *Rubus*, *Corylifolii* Lindl. a *Caesii* Lej. et Courtois (Trávníček et al. 2000b). Sekce *Rubus* se skládá z podsekcí *Rubus* a *Hiemales* E. H. L. Krause; podsekcce *Hiemales* zahrnuje 13 sérií vyskytujících se v české flóře, mezi nimi i ser. *Glandulosi* (Trávníček et al. 2000b).

Odhady o počtu druhů rodu *Rubus* se liší, podle různých taxonomických pojetí se jedná o stovky až tisíce druhů (1 000–1 200 druhů, Holub 1995). V české flóře je nyní známo 133 druhů (Danihelka et al. 2012, Velebil et al. 2016), z toho 14 druhů je nepůvodních (Danihelka et al. 2012).

Základní chromozomové číslo u rodu *Rubus* je $x = 7$ (Trávníček et al. 2000b). Ploidie je v rozmezí $2x$ – $14x$, příp. $18x$ (Thompson 1997). Většina druhů je polyploidních. Evropské druhy jsou diploidní až hexaploidní, tetraploidní převažují (Thompson 1997, Krahulcová et al. 2013). V Evropě se vyskytuje několik diploidních druhů z podrodu *Rubus* – *R. incanescens* Bertol. (Gustafsson 1942), *R. canescens* DC., *R. ulmifolius* Schott, *R. sanctus* Schreb., ale většina druhů podrodu *Rubus* je polyploidních (Thompson 1997).

Druhy z podrodů *Chamaerubus*, *Cylactis* a *Idaeobatus* se rozmnožují sexuálně (Trávníček et al. 2000a). Ostružiníky z podrodu *Rubus* jsou fakultativně apomiktické; ve většině skupin převažuje apomixe (přesněji agamospermie), v některých (např. *R. ser. Glandulosi*) sexuální rozmnožování (Trávníček et al. 2000a). Ostružiníky podrodu *Rubus* se také mohou šířit vegetativně (Thompson 1997).

Při sexuálním rozmnožování u fakultativně apomiktických ostružiníků podrodu *Rubus* dochází ke křížení jednotlivých linií a genotyp vzniklého potomstva se poté může stabilizovat

apomixí. Tento biotyp se může vyskytovat lokálně na omezeném území nebo se může široce rozšířit (Trávníček & Havlíček 2002). Existence lokálních typů, které se neklasifikují jako druhy a které nelze k rozlišovaným druhům přiřadit, vysoký počet rozlišovaných druhů a v neposlední řadě proměnlivost morfologických znaků vlivem podmínek prostředí (např. světla) jsou faktory, které znesnadňují určování a klasifikaci ostružiníků (Holub 1995).

Ostružiníky jsou ekologicky poměrně rozdílné a lze je rozdělit na nemofilní (vyskytující se v lesním prostředí) a thamnofilní (vyskytující se v nelesním prostředí, např. na mezích, v křovinách a lesních okrajích) ekoelementy. Druhy patřící do podrodu *Rubus* jsou do jisté míry synantropní (Holub 1995).

Ostružiníky jsou zpravidla keře se vzpřímenými, poléhavými nebo plazivými a na vrcholu často kořenujícími prýty, případně vytrvalé byliny. Prýty keřů jsou obvykle dvouleté, vysokoobloukovité, poléhavé nebo plazivé, na průřezu oblé či hranaté a zpravidla jsou pokryty jedním či více typy ostnů, ostének, stopkatých či přisedlých žlázek či chlupů. Květenství zakončují boční větve vyrůstající z paždí loňských listů (Holub 1995).

Listy jsou většinou složené, trojčetné, dlanitě, znoženě či zpeřeně 4–9četné, nebo jednoduché, a pak obvykle v různé míře členěné; opadavé či přezimující, s palisty na bázi řapíku či vysunutými výše na řapík. Lístky složených listů jsou řapíčkaté nebo přisedlé, s pilovitým či vroubkovaným okrajem. Květy jsou většinou oboupohlavné (vzácněji jednopohlavné, např. u *R. chamaemorus* L.), pětičetné, uspořádané do květenství. Kališní a korunní lístky přisedají k češuli. Kališní lístky jsou vytrvalé, korunní lístky obvykle opadávají. Tyčinky ve více kruzích přisedají na okraj češule. Semeníky obsahují dvě obrácená (anatropní) vajíčka, pouze z jednoho se vyvíjí semeno. Jednosemenné peckovičky tvoří souplodí (malina, ostružina) černé, červené či žluté barvy, často spojené s plodním lůžkem tvaru Jehlanu (Holub 1995).

Ostružiníky se řadí mezi ovocné rostliny a jejich plody se konzumují čerstvé i zpracované např. na šťávy, ovocná vína, džemy, kompoty. Z planých druhů mají chutné plody např. *R. hirtus* agg., *R. pedemontanus* Pinkw., *R. plicatus* Weihe et Nees a *R. sulcatus* Vest (Holub 1995). Různé druhy a kultivary ostružiníků se pěstují v kultuře, např. *R. armeniacus* Focke, *R. allegheniensis* Porter a některé taxonomicky nejasné hybridy (Holub 1995). Ostružiník maliník (*R. idaeus* L.) je starou kulturní rostlinou, ostatní ostružiníky se pěstují až od poloviny 19. století, tj. nejkratší dobu ze všech druhů drobného ovoce (Blatný et al. 1971). Plody maliníku mají vysoký obsah vlákniny a vitaminů, zejména vitaminu C (Blatný et al.

1971), zpracovávají se na sirup a přidávají se do průmyslově vyráběných čajů (Kresánek & Kresánek 2008). Šťávu z plodů ostružiníků (*R. fruticosus* agg.) lze využít při léčbě zvětšení štítné žlázy – strumy (Kresánek & Kresánek 2008).

Listy ostružiníků obsahují třísloviny, organické kyseliny a vitamin C (Holub 1995). Využívají se v domácích, farmaceutických a komerčních čajových směsích (Holub 1995) a v lidovém léčení, např. čaj z listů ostružiníků (*R. fruticosus* agg.) se užívá při kašli, nachlazení a kožních vyrážkách a čaj z listů maliníku (*R. idaeus*) proti bolesti v krku a angíně a má také dietetické a žlučopudné účinky (Kresánek & Kresánek 2008). *Rubus laciniatus* Willd. a *R. phoenicolasius* Maxim. lze pěstovat jako okrasné rostliny (Holub 1995). Některé pěstované druhy se v mnoha částech světa staly invazními; *R. armeniacus* např. v USA (Caplan & Yeakley 2006) a ve Švédsku (Tyler et al. 2015), *R. laciniatus* a *R. praecox* Bertol. s. l. (Bruckart et al. 2017) a *R. niveus* Thunb. na Galapágách (Rentería et al. 2012).

3.1.1. Charakteristika *Rubus* ser. *Glandulosi*

Série *Glandulosi* patří do podrodu *Rubus*, sekce *Rubus* a podsekce *Hiemales* (Trávníček et al. 2000b). Ostružiníky ser. *Glandulosi* jsou většinou tetraploidní ($2n = 4x = 28$), pentaploidní druhy jsou vzácnější (Trávníček et al. 2000b). Jediným diploidním druhem je kavkazský druh *R. moschus* Juz. (Sochor & Trávníček 2016). Pro *R. pedemontanus* se udává pentaploidie nebo méně tetraploidie (Thompson 1997, Krahulcová et al. 2013), pro *R. guentheri* Weihe tetra-, penta- či hexaploidie (Kurtto et al. 2010, Krahulcová et al. 2013). Ostružiníky ser. *Glandulosi* jsou na rozdíl od většiny ostatních sérií podrodu *Rubus* převážně sexuální, ale poměr sexuálního a apomiktického rozmnožování se i vlivem rozdílných ekologických podmínek v různých oblastech geograficky liší (tzv. geografická partenogeneze, Šarhanová et al. 2012).

Ostružiníky ser. *Glandulosi* rostou zejména v lesích, na lesních okrajích a světlinách (Holub 1995), především v chladnějších oblastech, v druhotných jehličnatých lesích i v nižších polohách (Trávníček et al. 2000b). Vyskytují se zejména ve střední až severozápadní Evropě a na Balkánském poloostrově (Kurtto et al. 2010). Mezi druhy vyskytující se v České republice patří *R. pedemontanus*, který kromě ČR roste zejména v Polsku a Německu, dále *R. guentheri* vyskytující se v severních Čechách, Polsku a Německu, *R. hercynicus* G. Braun v severních Čechách při hranicích s Německem a Polskem, *R. siemianicensis* Sprib. na Moravě, ve Slezsku a v Polsku a *R. holzfussii* Sprib. na Moravě (Kurtto et al. 2010). *Rubus lusaticus* Rostock se vyskytuje v Labských pískovcích,

R. lividus G. Braun roste pravděpodobně jen na dvou lokalitách v Podkrušnohoří a v Jizerských horách, *R. barberi* H. E. Weber na dvou lokalitách v Jizerských horách a nepůvodní *R. moschus* je pěstován (Holub 1995). Název *R. hirtus* agg. se často používá pro morfologicky rozdílné, neklasifikovatelné lokální biotypy s dlouze stopkatými, tmavými žlázkami; tento taxon je rozšířený zejména ve střední Evropě a na Balkánském poloostrově (Kurtto et al. 2010).

Prýty u zástupců *R. ser. Glandulosi* (Obr. 1) jsou poléhavé či plazivé, obvykle oblé, poměrně tenké, po celé ploše pokryté téměř oblými, štíhlými ostny, které přecházejí ve žláznaté ostence, štětiny a stopkaté žlázky. Listy jsou většinou trojčetné, s niťovitými čárkovitými palisty umístěnými výše na řapíku. Mohou kvést na loňských i letošních prýtech, vzhled květenství se liší – na letošních prýtech je objemnější a s více listy než na loňských prýtech (Holub 1995).



Obr. 1. – *Rubus ser. Glandulosi*; a – jednoletý prýt, b – detail stonku (foto V. Forejtová).

Kvůli velké variabilitě a existenci různých morfortypů v důsledku časté hybridizace (velký podíl sexuální reprodukce) se populace *R. ser. Glandulosi* převážně nedají určovat do druhu,

navíc se mohou křížit i s ostružiníky jiných sérií (Trávníček et al. 2000b). Díky intenzivnímu vegetativnímu rozmnožování tvoří často rozsáhlé porosty (Obr. 2) (Holub 1995).



Obr. 2. – Porost ostružiníku *Rubus ser. Glandulosi* (foto V. Forejtová).

3.2. Rozmnožování krytosemenných rostlin

Rozmnožování zajišťuje zachování populací rostlin. Rozlišujeme pohlavní (sexuální) a nepohlavní (asexuální) rozmnožování, které zahrnuje vegetativní rozmnožování a agamospermiu. Většina krytosemenných rostlin se rozmnožuje sexuálně, nicméně u mnoha druhů je sexuální rozmnožování kombinováno s asexuálním rozmnožováním (Asker & Jerling 1992).

3.2.1. Generativní rozmnožování

Generativní rozmnožování je rozmnožování semeny. Probíhá v generativní fázi vývoje rostliny, kdy dochází ke změně vývojového programu meristémů (vegetativní meristém se mění na květní meristém) a následné tvorbě tyčinek a plodolistů, které jsou často kryty obaly. Soubory tyčinek a plodolistů (jsou často považované za sporofyly – mikrosporofyly a megasporofyly) dohromady s obaly tvoří květy (Rosypal 2003).

Soubory tyčinek tvoří andreceum, soubory plodolistů tvoří gyneceum. Květní obal (periant) může mít podobu okvětí (perigon) nebo ho lze rozlišovat na kalich (calyx) a korunu (corolla) (Rosypal 2003).

Prašná pouzdra (mikrosporangia) tyčinek vystylá tzv. tapetum. V prašných pouzdrech se nachází mikrosporocyty, jejichž dělením vznikají mikrospory (pylová zrna). Mikrospory kryje vnější blána (exina), obsahující sporopolenin a proteiny, a vnitřní blána (intina), jež obsahuje celulózu a pektiny. Dělením mikrospory se tvoří buňka vegetativní (láčková) a generativní, jejímž dělením se posléze tvoří dvě buňky spermatické. Pyl je různým způsobem přenášen na bliznu pestíku – nejčastěji větrem (anemofilie), hmyzem (entomofilie) a vodou (hydrofilie) (Rosypal 2003).

Gyneceum je buď tvořeno volnými plodolisty (někdy jediným plodolistem), a pak se nazývá apokarpní, nebo tvoří více či méně kompaktní útvar vzniklý srůstem více plodolistů jednoho květu (gyneceum cenokarpní). Pestík může být tedy jednoplodolistový nebo víceplodolistový, skládá se z bazální části (semeníku), kde vznikají vajíčka, a apikální části – čnělky s bliznou. V plodolistech se nacházejí placenty, jejichž meristemickým dělením se tvoří vajíčka (megasporangia s integumenty) (Rosypal 2003).

Vajíčko je spojeno s placentou pomocí poutka (funiculus). Poutkem prochází cévní svazek, který se větví v bazální části vajíčka zvané chaláza. Vajíčko je kryto obaly (integumenty); vajíčka mohou být bitegmická (dva obaly), unitegmická (jeden obal), případně ategmická (bezobalná). Na apikálním pólu vajíčka se nachází otvor klový (mikropyle). Integumenty kryjí nucellus, z něhož se vyvíjí zárodečný vak (Vinter 2013).

Meiotickým dělením megasporocytu, jenž se nachází ve sporogenním pletivu (nucellu), se tvoří čtyři haploidní buňky, z nichž tři zanikají. Buňka, která je nejvíce vzdálená od mikropyle (otvoru klového) se dále vyvíjí. Jejím mitotickým dělením vzniká zralý zárodečný vak (samičí gametofyt). Nejčastějším typem zárodečného vaku je typ *Polygonum*, vyskytující se asi u 70 % krytosemenných rostlin. Tvoří se z jedné megaspory (je monosporický). Obsahuje tři antipody (buňky protistojné), nacházející se v chalazální oblasti, v mikropylární oblasti se nacházejí dvě synergidy (buňky pomocné) a oosféra (vaječná buňka, samičí gameta). Ve středu zárodečného vaku se tvoří centrální diploidní jádro zárodečného vaku, které vzniká splynutím dvou pólových jader (Vinter 2013).

Při opylení dochází k přenosu pylu na bliznu pestíku; pylová zrna se následně hydratují a vyklíčí v pylovou láčku (siphon) (Vinter 2013). Pylová láčka vzniká z vegetativní buňky

a díky ní se spermatické buňky dostanou k zárodečnému vaku (Rosypal 2003). Synergidy vytvářejí filiformní aparát, který produkuje látky usměrňující růst pylové láčky do zárodečného vaku (Vinter 2013). Do zárodečného vaku obvykle proroste pouze jedna pylová láčka (Rosypal 2003). Ta poté vyloučí svůj obsah do jedné synergidy, která nakonec zaniká programovanou buněčnou smrtí včetně degenerovaného vegetativního jádra pylové láčky (Vinter 2013).

Při sexuálním rozmnožování je oplození dvojitě; splynutím jedné spermatické buňky s oosférou vzniká zygota a z ní poté embryo, splynutím druhé spermatické buňky s centrálním jádrem zárodečného vaku vzniká endosperm (Vinter 2013). Při apomixi (agamospermii) vzniká embryo partenogeneticky, ale endosperm se většinou vyvíjí až po splynutí spermatické buňky s centrálním jádrem zárodečného vaku (pseudogamie) (Asker & Jerling 1992).

Podle původu přenášeného pylu rozlišujeme cizosprašnost a samosprašnost. Cizosprašnost (allogamie) je opylení pylem jiného jedince daného druhu. Rostliny jsou zpravidla oboupohlavné (květy jsou jednodomé), oddělení pohlaví (dvoudomost) je u rostlin na rozdíl mnoha skupin živočichů málo časté (Briggs & Walters 2001).

Samosprašnost (autogamie) je opylení vlastním pylem, buď z téhož květu (idiogamie), nebo z jiného květu téhož jedince (geitonogamie). U některých druhů se vyvinuly tzv. kleistogamické květy, které se vůbec neotvírají a jsou tedy samosprašné. Výskyt kleistogamie může být sezónní, např. u některých violek (*Viola L.*) (Vinter 2013).

U mnohých rostlin se proti samoopylení vyvinuly různé adaptivní mechanismy. Tyčinky a pestík v témže květu mohou dozrávat v různou dobu (dichogamie). Při proterandrii (prvoprašnost) dozrávají dříve tyčinky, při proterogynii (prvobliznost) dozrává dříve pestík. Další mechanismy bránící samoopylení jsou různá velikost bliznových bradavek a pylových zrn, neklíčivost pylových zrn nebo zabránění růstu pylové láčky (Rosypal 2003).

Po oplození z vajíčka vzniká semeno a z pestíku se tvoří plod (fructus). Ze zygoty se mitotickým dělením tvoří embryo (zárodek). Embryo je obklopeno endospermem, který vyživuje embryo a obsahuje škrob, příp. zásobní lipidy. V případě zárodečného vaku typu *Polygonum* je embryo obvykle diploidní a endosperm triploidní (Vinter 2013).

Výhodou cizosprašného sexuálního rozmnožování je vysoká genetická diverzita potomků, nevýhodou je potřeba partnera a opylovače (Hörandl 2006). Při samosprašnosti je výhodou

nezávislost na opylovačích a udržení dobře adaptovaných genotypů, nevýhodou je vysoká homozygotnost, nízká variabilita a riziko inbrední deprese (Vinter 2013).

Sexuální rozmnožování je častější než apomixie (agamospermie), což vysvětlují různé hypotézy. Podle „tangled bank“ hypotézy mají sexuální populace geneticky variabilní potomstvo, které je schopné osídlit rozdílné niky a vytlačit v nich obligátní apomikty. Výjimkou jsou prostředí s častými disturbancemi, v nichž se apomikty mohou uplatnit častěji (Bell 1982).

Podle hypotézy „Mullerova rohatka“ sexuální linie zabraňují akumulaci delečních mutací díky vysoké variabilitě a schopnosti rekombinace. U apomiktů se však deleční mutace v dalších generacích postupně akumulují (Muller 1964).

Podle hypotézy „the best man“ mají potomci vzniklí sexuálně v průměru nižší fitness než apomikty. Díky jejich vysoké variabilitě je však vyšší pravděpodobnost, že se mezi nimi najdou jedinci s velmi vysokou fitness (Asker & Jerling 1992).

Podle hypotézy „Červená královna“ se sexuální druhy vyskytují častěji v prostředích s vysokým biotickým stresem vlivem ostatních organismů (např. predátorů a parazitů). Blíže příbuzné apomikty se častěji vyskytují v prostředích, kde biotické interakce nejsou tak moc významné. Sexuální druhy mají v prostředí s vysokým biotickým stresem výhodu oproti apomiktům díky vyšší variabilitě potomstva (Levin 1975, Glesener & Tilman 1978).

3.2.2. Apomixie

Dříve byl pojem apomixie používán pro různé způsoby asexuálního rozmnožování rostlin a zahrnoval vegetativní apomixi a agamospermii. Při vegetativní apomixi se rostliny rozmnožují např. rozrůstáním, fragmentací a pacibulkami. Vegetativní rozmnožování může zajistit přežití a šíření populace, pokud není schopna se rozmnožovat sexuálně. Příkladem druhu, který se rozmnožuje pouze vegetativně, je vodní mor kanadský (*Elodea canadensis* Michx.) (Briggs & Walters 2001).

V současnosti se pojem apomixie obvykle používá jako synonymum pro agamospermii. Agamospermie (apomixie s. str.) je rozmnožování semeny, jejichž zárodek vzniká nepohlavně (Asker & Jerling 1992). Apomixie je u rostlin poměrně častý jev. Vyskytuje se u krytosemenných, kaprad'orostů, ale ne u nahosemenných (Briggs & Walters 2001).

U krytosemenných rostlin se vyskytuje v bazálních liniích, u jednoděložných i dvouděložných, ve 32 z 61 řádů (Hörandl & Hojsgaard 2012).

Agamospermii lze rozdělit na gametofytickou apomixi a adventivní embryonii (sporofytickou apomixi) (Asker & Jerling 1992). Při adventivní embryonii embryo vzniká ze somatické buňky vajíčka – nucellu (nucelární embryonie) či integumentu, což je časté u tropických rostlin, např. u rodu *Citrus* L. a u čeledi Orchidaceae (Asker 1979). Adventivní embryonie vzniká až později ve vývoji vajíčka (Koltunow 1993). Při gametofytické apomixi je zárodečný vak neredukovaný a embryo vzniká z vaječné buňky partenogeneticky (Asker 1979). Gametofytická apomixe se vyskytuje častěji u bylin než u dřevin (Bicknell & Koltunow 2004) a je nejlépe prostudovaným typem apomixe. Většina druhů rostlin (75 %), u nichž se vyskytuje gametofytická apomixe, patří do čeledí Rosaceae, Asteraceae a Poaceae (Bicknell & Koltunow 2004).

Gametofytická apomixe se dále dělí na aposporii a diplosporii; při diplosporii vzniká neredukovaný zárodečný vak z mateřské buňky megaspory, při aposporii ze somatické buňky vajíčka (Asker & Jerling 1992) s velkým jádrem a hustou cytoplazmou (Koltunow 1993). Diplosporie se dále dělí na meiotickou a mitotickou (Koltunow 1993). Diplosporie a aposporie se liší v načasování počátku – diplosporie se spouští současně s diferenciací mateřské buňky megaspory, aposporie až po její diferenciaci (Koltunow 1993). V jednom vajíčku může existovat zároveň sexuální a aposporický zárodečný vak; sexuální se vyvíjí pomaleji kvůli meióze než aposporický (Asker & Jerling 1992). U aposporie se (častěji než u diplosporie) objevují strukturní abnormality (Bicknell & Koltunow 2004). Aposporie se vyskytuje např. u druhů *Hieracium pilosella* L., *Poa pratensis* L. a *Pennisetum squamulatum* Fresen. (van Dijk & Vijverberg 2005). U rodu *Rubus* se vyskytuje aposporie, vzácněji i diplosporie (Gustafsson 1942).

Apomixe může být úplná (obligátní) či kombinovaná se sexuálním rozmnožováním (částečná – fakultativní), obligátních apomiktů u krytosemenných je velmi málo (Asker & Jerling 1992). Vzácně existují i diploidní apomikty, např. *Boechera* Á. Löve et D. Löve (Kantama et al. 2007) a *Paspalum* L. (Siena et al. 2008), ale většina apomiktů je polyploidních; obráceně to však neplatí, většina polyploidů není apomiktických (Asker & Jerling 1992). Diploidní apomikty vznikají pouze jako dihaploidy (Nogler 1984).

Rozlišujeme pseudogamii a autonomní apomixi. Při pseudogamii se vyvíjí embryo bez oplodnění vaječné buňky (partenogeneticky), pro vývoj endospermu je však oplodnění

centrální buňky zárodečného vaku nutné. Embryo se obvykle začíná vyvíjet po začátku vývoje endospermu, např. u rodů *Rubus*, *Ranunculus*, *Hypericum* L. Pseudogamie se vyskytuje u většiny druhů s gametofytickou apomixí, zejména u čeledí Rosaceae a Poaceae. Při autonomní apomixi je vývoj endospermu nezávislý na oplodnění; tento typ apomixe je mnohem méně častý a vyskytuje se zejména u Asteraceae (Asker & Jerling 1992).

Apomixe je způsobená deregulací genů zodpovědných za sexuální rozmnožování a obvykle se dědí dominantně. U většiny druhů zodpovídá za apomixi jeden genový lokus [např. *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf, *Ranunculus auricomus* L., *Paspalum notatum* Flüggé] nebo nízký počet lokusů (např. *Hieracium caespitosum* Dumort. a *Poa pratensis* – dva lokusy, *Taraxacum officinale* agg. – dva nebo tři lokusy) (Ozias-Akins & van Dijk 2007). Pro vznik apomixe jsou nutné tři kroky: 1) vznik neredukované vaječné buňky (apomeióza), 2) vývoj neoplozeného embrya (partenogeneze), 3) pseudogamní či autonomní vývoj endospermu (Hörandl & Paun 2007). Jednotlivé kroky jsou vzájemně nezávislé a jsou často řízeny různými lokusy (Ozias-Akins & van Dijk 2007). Výskyt všech těchto kroků najednou zkombinováním několika mutací je málo častý, což snižuje pravděpodobnost spontánního vzniku apomixe (Hojsgaard & Hörandl 2019).

Existuje několik hypotéz pro vznik apomixe během evoluce. Podle jedné hypotézy vznikla apomixe hybridizací příbuzných druhů, podle jiné došlo k mutaci v jednom nebo několika lokusech, podle další hypotézy došlo díky změnám v DNA metylaci nebo struktuře chromatinu ke vzniku stabilních epialel. K epigenetickým změnám může docházet v několika genech nebo jednom hlavním regulačním genu. Podle poslední hypotézy genom apomiktických rostlin obsahuje faktory specifické pro apomixi, které se nacházejí v části genomu, kde jsou omezené rekombinace (Koltunow & Grossniklaus 2003).

Výhodami apomixe (na rozdíl od sexuálního rozmnožování) je potřeba pouze jednoho rodiče (v případě autonomní apomixe), nižší závislost na opylovačích (u pseudogamních apomiktů je obvykle možné samoopylení), udržování vysoké heterozygotnosti a reprodukční izolace (Hörandl 2010). Apomixe má také výhody před vegetativním rozmnožováním, které jsou dány produkcí semen – ochrana a dormance semen, rozptyl semen a zbavení se chorob, které do semen nestihnou proniknout (Richards 2003). Díky apomixi se mohou rozmnožovat semeny i jedinci s lichým počtem chromozomů (Briggs & Walters 2001). Mezi nevýhody apomixe patří teoreticky vyšší riziko akumulace delečních mutací oproti sexuálnímu rozmnožování (Mullerova rohatka; Muller 1964), nižší genotypová diverzita a nižší schopnost adaptace (Hörandl 2006).

Výzkumu apomixe a její dědičnosti je věnována velká pozornost vzhledem k možnému využití v zemědělství. U ekonomicky významných plodin se však téměř nevyskytuje (s výjimkou některých tropických ovocných stromů a pícninářských trav) (Asker & Jerling 1992). Apomixe se vyskytuje u některých druhů příbuzných pěstovaným plodinám, např. *Tripsacum dactyloides* (L.) L. je příbuzné kukuřici, *Elymus rectisetus* (Nees) Á. Löve et Connor je příbuzný pšenici (Khush et al. 1994). Dále se apomixe vyskytuje u mnoha rodů pícninářských trav, např. *Cenchrus* L., *Eragrostis* Wolf, *Paspalum*, *Poa* L. (Khush et al. 1994). Cílem výzkumu je introdukce apomixe do kulturních rostlin z jejich apomiktických příbuzných a získání apomikticky se rozmnožujících genotypů (Barcaccia & Albertini 2013) nebo indukce apomixe pomocí mutace v sexuálních rostlinách a poté přenos apomixe do kulturních rostlin (Matzk et al. 2000). Apomixe umožňuje stabilizaci genotypu, což by bylo přínosné zejména pro rozmnožování F1 hybridů (Grossniklaus et al. 2001). Využití apomixe v zemědělství u ekonomicky významnějších plodin se dosud nezdařilo (Kandemir & Saygili 2015). Apomiktické plodiny mají potenciál se invazně šířit, což by mohlo být rizikové v případě úniku těchto rostlin do přírody nebo introdukce genu pro apomixi do volně rostoucích příbuzných druhů (Hojsgaard & Hörandl 2019).

3.3. Klasifikace apomiktů

Zvolit kritéria pro vymezení druhů v případě apomiktů je problematické, protože apomikty nevyhovují kritériím tradičních konceptů vymezení druhu, které lze použít u sexuálních organismů (Hörandl 2018). Např. koncept biologického druhu definuje druh jako skupinu populací (či jedinců), které se mohou mezi sebou křížit, ale jsou přitom reprodukčně izolované od jiných takových skupin (Mayr 1992); u apomiktů tento koncept nelze použít, protože při apomixi embryo vzniká asexuálně, takže ke křížení nedochází. Koncept fylogenetického druhu je u apomiktů rovněž problematický, protože apomiktické druhy (vymezené taxonomicky) nemusí být monofyletické (Hörandl 2018). Podle konceptu genetické koheze a tvorby clusterů při sexuálním rozmnožování genový tok omezuje genetickou diverzifikaci a tyto jedinci poté dohromady tvoří cluster. Clustery jsou vzájemně odlišné (geneticky i morfologicky) a nevznikají přechody mezi nimi. Problémem je, že apomikty mohou být více diverzifikované než sexuální linie. Koncept evolučního druhu uznává jako druhy obligátně apomiktické linie, které jsou schopny přežít po dobu srovnatelnou s dobou existence sexuálních linií (Hörandl 2018).

Obecně existují čtyři hlavní principy vymezení druhu u příbuzných sexuálních a apomiktických linií: podle prvního principu jsou zvláště klasifikovány obligátně sexuální druhy a zvláště z nich odvozené apomiktické allopolyploidní linie, které se považují za samostatné jednotky (obvykle druhy). Sexuální druhy lze vymežit podle konceptu biologického druhu či konceptu clusterů. Druhý způsob klasifikuje dohromady sexuálního předka a z nich (často autopolyploidizací) vzniklé apomikty do jednoho taxonu (obvykle druhu). Další způsob sdružuje apomiktické allopolyploidní hybridy do skupin (clusterů), které klasifikuje jako druhy. Poslední způsob klasifikuje obligátně apomiktické linie, které jsou tvořené jedním nebo několika málo klony a často mají nejasný evoluční původ, jako samostatné druhy (agamospecie) (Hörandl 2018).

Kvůli způsobu rozmnožování ostružiníků podrodu *Rubus* (fakultativní partenogeneze) existuje velké množství různých znakově přechodných (hybridogenních) biotypů, což (spolu s plasticitou vlivem prostředí) komplikuje jejich klasifikaci. V minulosti byly proto uplatňovány často velmi rozdílné taxonomické přístupy. Podle názoru častého v 19. století (např. Müller 1859) byly všechny druhy stvořeny Bohem a tento typologický přístup vedl k tomu, že každý (zejména morfologicky) odlišný jedinec byl popisován jako jiný druh. Jiní autoři v 19. století (např. Syme 1864) naopak klasifikovali ostružiníky jako variety nebo poddruhy malého počtu již popsanych druhů. Podle dalších autorů (např. Kuntze 1867) vznikla většina druhů zkřížením malého množství druhů. Sudre (1908–1913) chybně zařazoval jednotlivé jedince a lokální biotypy do druhů, které často měly geograficky vzdálený areál, a klasifikoval je jako jejich vnitrodruhové taxony. Tyto jeho druhy tak byly ve skutečnosti silně polyfyletické. Sudre vytvořil mylný dojem, že všechny ostružiníky lze určit a taxonomicky zařadit. Další přístup hodnotil ostružiníky s ohledem na jejich pylovou fertilitu a velikost jejich areálu (Focke 1877).

Moderní taxonomie ostružiníků uznává několik sexuálních a diploidních druhů jako „biologické druhy“, vedle toho za druhy považuje apomiktické (většinou hybridogenní) linie stabilizované pomocí apomixy, které také chápe jako přirozené přírodní jednotky. Jednotlivé stabilizované apomiktické biotypy jsou klasifikovány podle velikosti areálu do čtyř kategorií: široce rozšířené biotypy mají průměr areálu větší než 500 km, regionální biotypy 50–250 km, lokální biotypy méně než 20 km, individuální biotypy jsou např. i jednotlivé keře (Weber 1996).

Jako druhy jsou v moderní taxonomii ostružiníků (= batologii) obvykle klasifikovány výhradně široce rozšířené a regionální biotypy, tj. biotypy s průměrem areálu větším než

50 km (Weber 1996), ale existují také alternativní názory, které snižují tuto hranici na 20 km (Holub 1997). Tento přístup zabraňuje popisování obrovského množství málo rozšířených (lokálních a individuálních) biotypů, jak k tomu docházelo v minulosti. V moderní botanologii se (až na výjimky) nerozlišují vnitrodruhové taxony, protože mezi jednotlivými biotypy obvykle neexistují vztahy nadřazenosti a podřazenosti (vznikají většinou nezávislou hybridizací) a také původ jednotlivých druhů obvykle nelze zjistit z jejich morfologie (Weber 1996).

3.4. Geografická partenogeneze

Geografická partenogeneze je jev, kdy se blízké příbuzné apomiktické a sexuální linie liší ve svém rozšíření (poloze anebo velikosti areálu) (Vandel 1928). Je známá např. u rodů *Taraxacum* (van Dijk 2003), *Ranunculus* (Hörandl & Paun 2007) a *Rubus* (Šarhanová et al. 2012). Tento jev není zřejmě dán jedním faktorem, ale kombinací více faktorů (Hörandl 2006).

Ve srovnání s jejich příbuznými sexuálními liniemi se apomiktické linie vyskytují častěji ve vyšších nadmořských výškách, zeměpisných šířkách, v sušším nebo narušeném prostředí, na ostrovech (Bierzychudek 1985, Hörandl 2006) a častěji v oblastech v minulosti zaledněných (Kearney 2005). Tento fenomén byl popsán u rostlin i živočichů (např. Asker & Jerling 1992, Kearney 2005, Hörandl 2006).

V severněji položených oblastech severní polokoule je vyšší poměr apomiktických nebo polyploidních druhů k celkovému počtu druhů než v jižnějších oblastech, absolutní počet druhů je zde ovšem nižší. Důvodem je to, že počet sexuálních druhů směrem k severu klesá rychleji než počet apomiktických druhů (Asker & Jerling 1992).

Některé apomiktické polyploidní linie jsou široce rozšířené, zatímco jejich příbuzné sexuální diploidní druhy mají velmi omezený areál, což platí např. u některých sexuálních druhů z okruhu *Ranunculus auricomus* (Hörandl & Paun 2007) nebo u okruhu *Hieracium alpinum* agg. (Mráz et al. 2009). Blízce příbuzné sexuální a apomiktické druhy se také mohou často vyskytovat sympatricky a areál sexuálního druhu leží v centrální části dřívějšího rozšíření (Asker & Jerling 1992), např. u rodů *Paspalum* (Urbani et al. 2002), *Taraxacum*, *Chondrilla* L. (van Dijk 2003) a *Ranunculus* (Hörandl & Paun 2007).

Apomikty se často vyskytují v oblastech ovlivněných zaledněním v pozdním pleistocénu (Kearney 2005), které pokrývalo až 20 % plochy Země. Během pleistocénu došlo k osmi

velkým zaledněním odděleným kratšími obdobími interglaciálu. Během postupujícího zalednění apomiktické druhy migrovaly do jižnějších oblastí a nižších nadmořských výšek, kde se dostávaly do kontaktu se sexuálními druhy. Hybridizací následně vznikaly nové apomiktické linie, které byly schopné se adaptovat na podmínky v odledněných oblastech díky výhodám apomixy a polyploidie (Carman 1997). Apomikty se během interglaciálu šířily zpět do severnějších oblastí, zatímco sexuální linie zůstaly v jižnějších oblastech (Kearney 2005). Vznik apomiktických linií během zalednění potvrdilo více studií (např. Dobeš et al. 2004, Paun et al. 2006).

Geografickou partenogenezí a široké rozšíření apomiktů vysvětlují různé hypotézy. Podle hypotézy „general-purpose genotypes“ (GPG) jsou apomiktické druhy generalisté se širokou ekologickou amplitudou, díky čemuž mohou existovat i v extrémních podmínkách a jsou méně citlivé ke změně podmínek než jejich příbuzné sexuální druhy (Lynch 1984). Hypotéza GPG byla testována u rostlin i živočichů, většina studií ji však nepodporuje nebo jsou výsledky nejednoznačné (např. Kenny 1996, Michaels & Bazzaz 1989).

Další hypotézou je „frozen niche variation“, podle níž apomiktické linie vznikají křížením sexuálních druhů. Tyto linie jsou tedy geneticky rozdílné, mají užší ekologickou niku a každá z linií osidluje část původní niky rodičovských druhů – jsou to tedy specialisté. Apomiktické linie dohromady tak využívají dostupné zdroje mnohem efektivněji než sexuální druhy (Vrijenhoek 1984).

Další vysvětlení geografické partenogeneze souvisí s imigrací, která je v severnějších oblastech výrazně častější než v oblastech jižnějších. Jedinci z apomiktických klonů, adaptovaných pro danou oblast, produkují potomstvo, které je adaptované na podmínky dané oblasti stejně dobře jako mateřský jedinec. Kvůli časté imigraci v severněji položených oblastech však dochází často ke křížení adaptovaných sexuálních jedinců s imigranty, kteří nejsou pro podmínky dané oblasti adaptovaní. Jejich potomstvo tedy nemusí být vhodně adaptované a může být vytlačeno apomikty (Peck et al. 1998).

Apomikty jsou (až na výjimky) polyploidy hybridního původu a široké rozšíření apomiktů a s tím související geografická partenogeneze mohou být způsobeny výhodami polyploidie. Geny mohou získávat nové funkce, protože jsou u polyploidů přítomny ve více kopiích, a potomci vznikají kombinací genetické informace několika jedinců, z těchto dvou důvodů jsou polyploidní jedinci více fyziologicky a ekologicky flexibilní než jejich diploidní rodiče (Bierzychudek 1985). Samotná polyploidie však nemusí vysvětlovat široké rozšíření

apomiktů; např. u *Boechera holboellii* (Hornem.) Á. Löwe & D. Löwe jsou diploidní populace více rozšířené než populace polyploidní (Dobeš et al. 2004).

3.5. Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie (FCM, flow cytometry) je moderní, rychlá a přesná metoda využívaná k určení ploidie a obsahu DNA v jádře, počítání krevních buněk, detekci mikroorganismů, třídění částic a výzkumu buněčného cyklu a genové exprese (Suda 2005). Využívá se např. v genetice, imunologii, biochemii, fyziologii rostlin, molekulární biologii a environmentálních vědách (Robinson & Grégori 2007).

Průtokový cytometr měří některé optické vlastnosti vzorku, nejčastěji intenzitu fluorescence (Suda 2005). Fluorescence je jev, kdy po ozáření dané látky světlem určité vlnové délky tato látka vyzaří světlo větší vlnové délky a nižší energie (Doležel et al. 2007b). K analyzovanému vzorku se přidá fluorescenční barvivo (fluorochrom), které se váže na DNA. Při ozáření světlem určité vlnové délky dochází k excitaci elektronů, jež se však následně vrací do původní energetické hladiny, přičemž se uvolňuje energie ve formě tepla a světla (fluorescence) (Suda 2005).

Mezi fluorochromy patří barviva neselektivně se vážící do struktury DNA, umožňující stanovit její celkové množství (propidium jodid a ethidium bromid), barviva specificky se vážící do míst bohatých na A-T báze, z nichž nejpoužívanější je DAPI (4,6'-diamidino-2-fenylindol), dále DIPI [4',6-bis(2'-imidazoliny-4',5'-H)-2-fenylindol], Hoechst a barviva vážící se do míst bohatých na G-C báze (mitramycin, chromomycin a olivomycin), jež se používají méně kvůli nízké kvalitě analýzy (Suda 2005). Poměr A-T/G-C však zpravidla není u rostlin konstantní a pro odhad velikosti genomu není tedy vhodné používat barviva specificky se vážící na určité báze (Doležel et al. 1998).

K analyzovanému vzorku se přidává standard – biologický materiál, který se srovnává s měřeným vzorkem a používá se i při kalibraci přístroje (Greilhuber et al. 2007). Standard musí být biologicky podobný vzorku (pro rostlinný vzorek nelze použít živočišný standard) a cytologicky homogenní, peaky vzorku a standardu se nesmí překrývat, standard by neměl obsahovat inhibitory fluorescence a měl by mít stálou velikost genomu (Greilhuber et al. 2007). Jedním z nejpoužívanějších standardů je *Pisum sativum*; jeho výhodou je stabilita genomu, snadná dostupnost a velmi nízký obsah inhibitorů (Greilhuber et al. 2007). Dále se

používají *Allium cepa* L., *Vicia faba* L., *Zea mays* L., *Glycine max* (L.) Merr., *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. aj. (Doležel et al. 1998).

Průtokový cytometr má tři hlavní části: průtokovou, optickou a elektronickou a je propojený s počítačem (Robinson & Grégori 2007). V průtokové části je důležitá průtoková komůrka, v níž je vzorek vstříknut do středu proudu a pomocí unášecí kapaliny se jednotlivé částice seřadí a pohybují se jedna za druhou (Robinson & Grégori 2007). Zdrojem excitačního záření v optické části je laser, používaný v kombinaci s fluorochromy propidium jodidem a ethidium bromidem, nebo rtuťová výbojka, používaná s DAPI a Hoechst (Doležel et al. 2007a).

Excitační filtry slouží k výběru určité excitační vlnové délky. Jednotlivé částice postupně procházejí paprskem excitačního záření. Emitované fotony se pomocí filtrů třídí podle své vlnové délky a jsou detekovány fotodetektory. Data jsou převedena do digitální podoby a zobrazí se v počítači v podobě histogramu nebo cytogramu (Robinson & Grégori 2007).

Histogram zobrazuje rozložení fluorescence izolovaných částic. V histogramu se mohou objevit další peaky díky mixoploidii somatických buněk (Matzk et al. 2000). Přesnost měření popisuje variační koeficient (CV, coefficient of variation), který je definován jako poměr směrodatné odchylky a průměrné pozice peaku. Pro přesnou analýzu je žádoucí co nejnižší CV. Příčinou variability fluorescence částic tvořících jednotlivé peaky je různá barvitelnost, chyba přístroje a nestejně podmínky (Suda 2005).

Výhodou FCM je jednoduchost přípravy vzorku a velká rychlost analýzy (lze analyzovat až 100 000 částic/s, Robinson & Grégori 2007) a je potřeba velmi malý vzorek, což je velká přednost v případě ohrožených druhů a jedinců ve fázi raného ontogenetického vývoje (Suda 2005, Suda et al. 2007). Pomocí FCM lze analyzovat vzorky čerstvých pletiv různých rostlinných částí, např. listů, stonků, kořenů, korunních a kališních lístků; nejvhodnější jsou většinou mladé listy, které obsahují málo sekundárních metabolitů (Suda 2005). Dalšími výhodami jsou možnost měření nedělicích se buněk a detekce endopolyploidie a směsných vzorků (Suda 2005, Suda et al. 2007).

Nevýhodou FCM je většinou nutnost používat čerstvý materiál a dále omezená schopnost odlišit aneuploidii. U některých skupin rostlin (Geraniaceae, Rosaceae, některé jehličnany a kaprad'orosty) se vyskytují sekundární metabolity (např. taniny), které zabraňují vazbě fluorochromu na DNA. Problémem je i cena samotného průtokového cytometru, která omezuje větší rozšíření této metody (Suda 2005).

Metoda FCM se zpočátku pro analýzu u rostlin nepoužívala kvůli vysoké ceně přístroje a nutnosti analyzovat vzorek v podobě suspenze částic. Buňky rostlin však mají pevnou buněčnou stěnu a zpravidla tvoří pletiva, volné buňky jsou málo časté. Jednotlivé buňky lze izolovat hydrolýzou pletiv pektinázami. Tento způsob dobře funguje u mladých pletiv, nelze jej však použít u všech druhů rostlin. Problémem jsou sekundární metabolity, které mohou způsobovat autofluorescenci. Dalším způsobem je izolace protoplastů, jež je však časově náročná a rovněž použitelná jen u některých druhů. Dnes nejpoužívanější metodou je homogenizace vzorku (nasekání nejemno pomocí žiletky) v pufru a přefiltrování, čímž získáme suspenzi jader (Doležel et al. 2007b).

Metoda analýzy zralých suchých semen (FCSS, flow cytometry seed screen), kterou jako první použil Matzk et al. (2000), se v současnosti rychle rozvíjí a využívá se k určení způsobu rozmnožování z poměru ploidie embrya a endospermu u jednotlivých druhů, populací a jedinců a ke zjištění odchylek od normálního sexuálního rozmnožování (Matzk 2007). V histogramu lze pozorovat peaky pro embryo, endosperm a použitý standard. Embryo obsahuje mnohem více jader než endosperm, peak embrya je tedy mnohem vyšší než peak endospermu. Výhodou je, že tuto metodu lze použít i u starých, již neklíčivých semen, nelze ji však využít, pokud má embryo a endosperm stejnou ploidii, pokud je ploidie embrya a endospermu stejná při sexuálním a asexuálním rozmnožování a také nelze její pomocí rozlišit aposporii a diplosporii (Matzk 2007).

4. Materiál a metody

4.1. Rostlinný materiál

Pro analýzu byla použita semena *R. ser. Glandulosi* nasbíraná na lokalitách v České republice, Maďarsku, Německu, Polsku, Rakousku, Rumunsku a Slovinsku, v regionech, které dosud nebyly analyzovány a v těch, kde se podle taxonomických údajů dala očekávat přítomnost sexuálních i apomiktických linií (Tab. 1). Materiál sbírali Bohumil Trávníček, Michal Sochor, Martin Dančák, Vojtěch Žíla, Gergely Király, Věra Forejtová, Pavol Eliáš a Michael Hohla v průběhu let 2012–2018. Semena byla sbírána zvlášť z každého jedince, v některých případech byli sbíráni tři jedinci na lokalitu. Ke každému jedinci byl pořízen herbářový doklad, který je uložen v herbáři Katedry botaniky Univerzity Palackého v Olomouci nebo soukromých herbářích sběratelů.

Tab. 1. – Seznam analyzovaných vzorků *R. ser. Glandulosi*; *Gla* – *R. ser. Glandulosi* (neklasifikované biotypy), cf. *her* – *R. cf. hercynicus*, *luc* – *R. lucentifolius*, *el* – *R. elegans*, cf. *obor* – *R. cf. oboranus*, „*ps*“ – *R. „pseudosiemianicensis“* ined., cf. „*ps*“ – *R. cf. „pseudosiemianicensis“*, cf. *guen* – *R. cf. guentheri*, *lus* – *R. lusaticus*, *liv* – *R. lividus*, VF – V. Forejtová, GK – G. Király, MS – M. Sochor, MH – M. Hohla, MD – M. Dančák, PE – P. Eliáš, BT – B. Trávníček, VZ – V. Žíla.

Sběrový kód	Taxon	Zem. šířka	Zem. délka	Lokalita	Sběratel
Bílek 1	<i>Gla</i>	49°42'14" N	15°43'39" E	Česká republika, Českomoravská vrchovina, Bílek u Chotěboře, 500 m ZJZ od žel. st., u lesní cesty	VF
Bílý Kámen 3	<i>Gla</i>	49°26'06" N	15°31'18" E	Česká republika, Českomoravská vrchovina, Bílý Kámen, 1,1 km V od středu obce, u lesní cesty	VF
Csehbánya 1	<i>Gla</i>	47°10'07" N	17°41'07" E	Maďarsko, Csehbánya, 400 m JZ od obce, lesní okraj	GK
Farkasgyepű 1	<i>Gla</i>	47°11'19" N	17°38'37" E	Maďarsko, Kislőd, 1,6 km J od Farkasgyepű, mladý les u silnice č. 83	GK
<i>Gla</i> -Kop-L/12	<i>Gla</i>	49°38'34" N	17°21'40" E	Česká republika, Střední Morava, Sv. Kopeček u Olomouce, 2,2 km SV od baziliky na Sv. Kopečku	MS

Gla-Kop-M/12	<i>Gla</i>	49°38'32" N	17°21'34" E	Česká republika, Střední Morava, Sv. Kopeček u Olomouce, 2 km SV od baziliky na Sv. Kopečku	MS
Gloggnitz 1	<i>Gla</i>	47°41'16" N	15°55'36" E	Rakousko, Dolní Rakousko, Gloggnitz, 350 m JV od Schmalzgrube, jehličnatý les	GK
Graz 1	<i>Gla</i>	47°05'34" N	15°15'24" E	Rakousko, Štýrsko, St. Oswald bei Plankenwarth, 1,8 km SZ od středu obce, mýtina a lesní okraj	GK
Janovice 2	<i>Gla</i>	49°28'31" N	15°49'11" E	Česká republika, Českomoravská vrchovina, Polná-Janovice, 2,7 km VJV od středu obce, okraj lesa	VF
LI02760100	<i>Gla</i>	48°21'20" N	13°42'28" E	Rakousko, Horní Rakousy, St. Willibald, 1,6 km VJV od středu obce, Salletwald, V od Kalchdobl	MH
LI02760179	<i>Gla</i>	48°2'39"N	12°55'3"E	Rakousko, Horní Rakousy, Franking, 500 m SV od Hartberg, Waldrand an der Nordostseite	MH
LI02760285	<i>Gla</i>	47°55'15" N	13°32'8"E	Rakousko, Horní Rakousy, Attersee, 500 m V od Neuhofen	MH
LI02760315	<i>Gla</i>	48°43'46" N	13°53'17" E	Rakousko, Horní Rakousy, Klaffer am Hochficht, Böhmerwald, 600 m J od Holzschlag	MH
LI02760414	<i>Gla</i>	48°29'31" N	13°26'32" E	Německo, Bavorsko, Neuhaus am Inn, 700 m SSV od Vornbach	MH
LI02760421	<i>Gla</i>	48°29'31" N	13°26'32" E	Německo, Bavorsko, Neuhaus am Inn, 700 m SSV od Vornbach	MH
LI02760445	<i>Gla</i>	48°57'49" N	12°4'32"E	Německo, Bavorsko, Pentling, 500 m SZ od středu obce Hohengebraching	MH

LI02760469	<i>Gla</i>	48°57'49" N	12°4'32"E	Německo, Bavorsko, Pentling, 500 m SZ od středu obce Hohengebraching	MH
MD-Gla1/18	<i>Gla</i>	47°47'22" N	13°29'43" E	Rakousko, Burgbachau, 400 m SV od Burggrabenklamm	MD
MD-Gla2/18	<i>Gla</i>	47°38'35" N	13°54'50" E	Rakousko, u jezera Toplitzsee, 400 m SV od obce Gössl	MD
PE 4/3	<i>Gla</i>	49°24'41" N	18°56'29" E	Slovensko, Západní Beskydy, Oščadnica, 2 km Z od Velké Rači, okraj lesa u turistické stezky	PE
PE 2/1	<i>Gla</i>	48°32'23" N	18°49'31" E	Slovensko, Štiavnické vrchy, Hliník nad Hronom, 2 km V od obce, les u silnice do Sklených Teplic	PE
R81/14	<i>Gla</i>	47°25'05" N	23°24'53" E	Rumunsko, lesy mezi obcemi Fericea a Curtuisu Mare, 2,5 km JZ od Curtuisu Mare	BT
R93/15 a R95/15	<i>cf. her</i>	50°48'32" N	14°54'49" E	Česká republika, S Čechy, Bílý Kostel nad Nisou, 1,7 km JZ od středu obce, Dubina	BT, VZ, MS
R141/14	<i>Gla</i>	47°37'36" N	12°14'16" E	Rakousko, 1 km V od obce Ebbs u města Kufstein	BT
R154/18	<i>luc</i>	50°16'04" N	17°40'08" E	Česká republika, Slezsko, 1,4 km J od obce Hlinka, u lesní cesty	BT
R159/18	<i>Gla</i>	50°16'04" N	17°40'08" E	Česká republika, Slezsko, Hlinka, u lesní cesty	BT
R184/13	<i>el</i>	49°02'40" N	08°06'52" E	Z Německo, Freckenfeld, u lesní cesty 2,4 km J od obce u města Karlsruhe	BT
R184/14	<i>Gla</i>	47°25'42" N	09°46'49" E	Rakousko, 100 m S od osady Rickatswende u města Dornbirn	BT
R216/18	<i>Gla</i>	49°53'38" N	18°04'33" E	Česká republika, Slezsko, Háj ve Slezsku, u lesní cesty 300 m JZ od Padařova	BT

R219/18	cf. <i>obor</i>	49°53'38" N	18°04'33" E	Česká republika, Slezsko, Háj ve Slezsku, u lesní cesty 300 m JZ od Padařova	BT
R236/14	<i>Gla</i>	47°04'57" N	09°54'24" E	Rakousko, město Schruns, SZ okraj	BT
R245/18	„ <i>ps</i> “	50°28'23" N	16°28'26" E	Polsko, Slezsko, Raszków, 1,6 km JZ od obce, u lesní cesty	BT
R250/18	cf. „ <i>ps</i> “	50°22'49" N	16°31'40" E	Polsko, Slezsko, Polanica-Zdrój, JV od obce, u lesní cesty	BT
R286/18	<i>Gla</i>	50°14'41" N	17°23'30" E	Česká republika, Slezsko, Zlaté Hory, mýtina 2 km J od středu obce	BT
R288/14	cf. <i>guen</i>	51°00'02" N	14°24'05" E	Česká republika, S Čechy, Šluknovsko, V. Šenov, Z okraj Partyzánského vrchu	BT, MS
R296/14	<i>lus</i>	51°06'18" N	14°45'21" E	Německo, Rosenbach, 200 m V od Georgenberg	BT, MS
R311/13	<i>liv</i>	50°11'10" N	12°17'20" E	Německo, Ašsko, Bären Dorf, křoviny u česko-něm. hranice 650 m J od obce	BT
Söchau 1	<i>Gla</i>	47°03'20" N	16°00'41" E	Rakousko, Štýrsko, Maierhofen, 0,5 km J od obce, Hochgrabenweg, lesní okraj	GK
Szalafő 1	<i>Gla</i>	46°52'27" N	16°18'16" E	Maďarsko, Szalafő, 2,7 km Z od Felsőszér, mýtina	GK
Zemplén 1	<i>Gla</i>	48°25'51" N	21°27'34" E	Maďarsko, Nagyhuta, 2,5 km Z od obce, Kömlösi-völgy, lesní okraj	GK
Žiri 1	<i>Gla</i>	46°04'45" N	14°05'52" E	Slovinsko, Fužine, 0,6 km JJV od středu osady, bukový les	GK

4.2. Příprava a analýza vzorku

Bylo analyzováno 10 živých zralých semen z každého vzorku, případně nižší počet z důvodu vysokého podílu abortovaných semen v nasbíraném vzorku. Každé semeno bylo rozříznuto žiletkou, embryo a endosperm vyjmuty a endokarp odstraněn. Druh *Pisum sativum*

'Ctirad' ($2C = 8,76$ pg; Greilhuber et al., 2007) byl použit jako interní standard. Vnitřek semene a standard byly v Petriho misce dohromady nejemno nasekány žiletkou v 1 ml LB01 pufru s PVP (polyvinylpyrrolidon) a merkaptoethanolem {Doležel et al. 1989; 15 mM Tris [tris-(hydroxymethyl)-aminomethan], 2 mM EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová), 0,5 mM tetrahydrochlorid sperminu, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0,1% Triton X-100 (oktylfenol ethoxylát), 30 g L⁻¹ PVP40 a 550 μL L⁻¹ 2-merkaptoethanol, pH = 8,0}. Vzniklá suspenze jader byla následně přefiltrována přes nylonový filtr o velikosti pórů 42 μm do kyvety a poté bylo přidáno 0,2 ml LB01 pufru a 50 μl barviva DAPI. Vzorek byl promíchán a měřen pomocí průtokového cytometru CyFlow ML (Partec, Münster, Německo) vybaveného LED zdrojem excitačního UV záření (365 nm, 10 mW). Rychlost průtoku byla nastavena kolem 10 jader/s, analyzováno bylo 3 000 jader.

Byly zaznamenány pozice peaku embrya, endospermu a standardu a jejich variační koeficient (CV, coefficient of variation). Při $CV > 5$ bylo využito ořezu dat (gatování). Průměrný CV pro embryo byl 4,77, pro endosperm 4,08 a pro standard 3,63. Ploidie embrya byla vypočítána jako pozice peaku embrya/pozice peaku standardu/0,045, což je koeficient vypočítaný na základě předchozích měření vzorků o známé ploidi, odpovídající relativní fluorescenci jedné chromozómové sady (M. Sochor, osobní sdělení). Ploidie endospermu byla vypočítána podle vzorce: pozice peaku endospermu × ploidiie embrya/pozice peaku embrya.

Podle poměru ploidiie embrya a endospermu byl určen způsob vzniku semene – redukováná oplozená vaječná buňka (sexuální rozmnožování), neredukovaná neoplozená vaječná buňka (normální apomixe) a 2 odchylky – redukováná neoplozená vaječná buňka a neredukovaná oplozená vaječná buňka. Očekávané ploidiie byly následující (za předpokladu účasti redukové mikrospery): při sexuálním rozmnožování ploidiie embrya 4x ($n + n$) a ploidiie endospermu 6x ($2n + n$), při apomixi ploidiie embrya 4x ($2n + 0$) a ploidiie endospermu 10x ($4n + n$), v případě redukové neoplozené vaječné buňky ploidiie embrya 2x ($n + 0$) a ploidiie endospermu 6x ($2n + n$) a v případě neredukované oplozené vaječné buňky ploidiie embrya 6x ($2n + n$) a ploidiie endospermu 10x ($4n + n$). Očekávaný poměr ploidiie embrya a endospermu při sexuálním rozmnožování byl 2:3, při apomixi 2:5, při redukové neoplozené vaječné buňce 1:3, při neredukované oplozené vaječné buňce 3:5.

Podle poměru normálních apomiktických semen byli jedinci zařazeni do tří kategorií. Jedinci s nejvýše 10 % apomiktických semen byli klasifikováni jako sexuální, jedinci s více

než 10 % a méně než 50 % apomiktických semen jako fakultativně sexuální a jedinci s nejméně 50 % apomiktických semen byli klasifikováni jako fakultativně apomiktičtí.

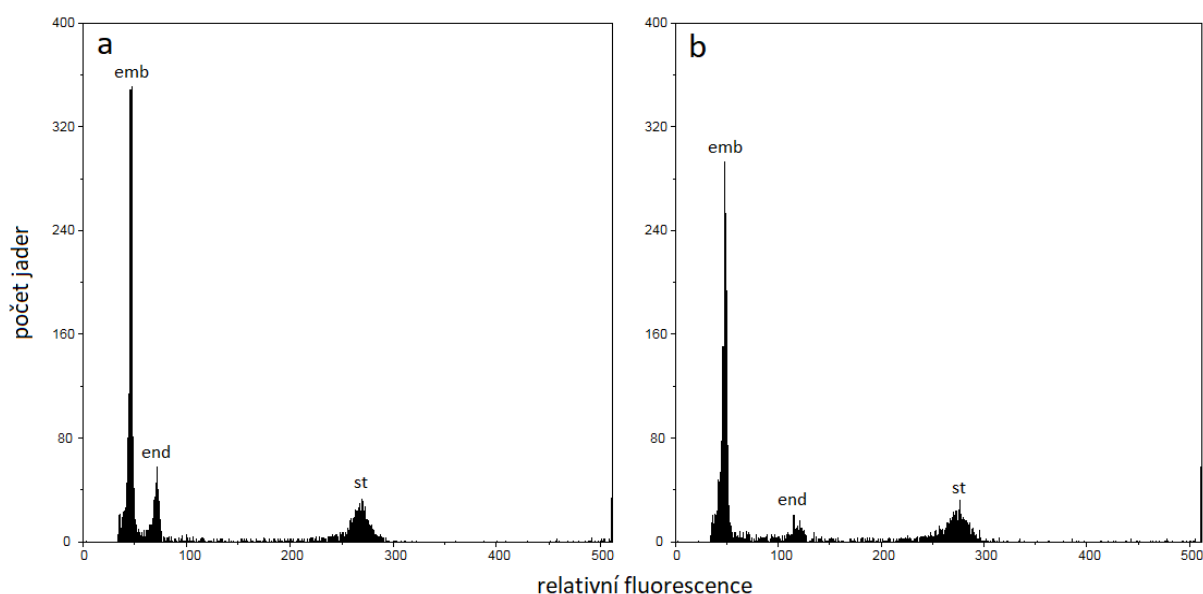
5. Výsledky

Metodou analýzy semen průtokovou cytometrií (FCSS) byla analyzována semena zástupců *Rubus ser. Glandulosi*. Vnitřek semen byl měřen spolu se standardem *Pisum sativum*. Výjimečně byla zjištěna semena bez endospermu, taková byla vyřazena z analýzy. Celkem bylo analyzováno 368 semen ze 41 vzorků (jedinců).

Byly zaznamenány čtyři způsoby vzniku semene: sexuální (redukováná oplozená vaječná buňka; 83,15 % semen), normální apomixe (neredukovaná neoplozená vaječná buňka; 13,04 % semen), neredukovaná oplozená vaječná buňka (2,72 % semen) a redukováná neoplozená vaječná buňka (1,09 % semen).

Semena vyvinutá z redukováné vaječné buňky tvořila 84,24 %, z toho naprostá většina (98,71 %) byla oplozena (normální sex). Semena vyvinutá z neoplozené vaječné buňky tvořila 14,13 %, z nichž 92,31 % bylo neredukovaných (normální apomixe).

U semen vzniklých sexuálně (z red. opl. vaj. buňky) byla ploidie embrya obvykle 4x a ploidie endospermu 6x (96,41 % sexuálních semen). U jednoho semene byla ploidie embrya 3x a endospermu 5x, osm semen mělo ploidii embrya 5x a endospermu 7x. Dvě semena měla ploidii embrya 4x a endospermu 8x. Příklad histogramu pro sexuální semeno ukazuje Obr. 3a.



Obr. 3. – Příklad výsledku FCSS analýzy ve formě histogramu; a – sexuální semeno (embryo 4x, endosperm 6x), b – apomiktické semeno (embryo 4x, endosperm 10x); emb – peak embrya, end – peak endospermu, st – peak standardu *Pisum sativum*.

Semena vzniklá normální apomixí (z nered. neopl. vaj. buňky) měla ploidiu embrya 4x a ploidiu endospermu byla většinou v rozmezí 10x–12x (95,83 % apomiktických semen). Výjimkou byla tři semena s ploidiemi: embryo 4x, endosperm 15x; embryo 5x, endosperm 12x; embryo 4x, endosperm 16x. Příklad histogramu pro apomiktické semeno zobrazuje Obr. 3b.

Čtyři semena vznikla z red. neopl. vaj. buňky (haploidní partenogeneze). Ploidie embrya byla u všech těchto semen 2x a ploidiu endospermu 6x.

Deset semen vzniklo z nered. opl. vaj. buňky. Ploidie embrya u těchto semen vzrostla. Ploidie embrya byla většinou 6x a ploidiu endospermu 9x, 10x či 12x (90 % nered. opl. semen), z toho nejčastěji 10x. Jedno semeno mělo ploidiu embrya 5x a endospermu 15x.

Podíl způsobů vývoje semen se u jednotlivých jedinců výrazně lišil (Tab. 2). Výhradně sexuální semena tvořilo 58,54 % jedinců. Naopak žádné sexuální semeno se neobjevilo u tří jedinců; tyto vzorky však byly relativně malé (jedno až tři semena). U 68,29 % jedinců nebylo zaznamenáno žádné normálně apomiktické semeno. Dva vzorky s malým počtem semen (jedno, resp. tři semena) měly 100% podíl apomiktických semen. Podíl red. neopl. semen byl nejvýše 33,33 % a podíl nered. opl. semen byl většinou do 10 %. Výjimkou byl vzorek se 30 % a malý vzorek (dvě semena) se 100 % nered. opl. semen.

Tab. 2. – Četnost způsobu vývoje semen u jednotlivých vzorků *Rubus ser. Glandulosi*; *Gla* – *R. ser. Glandulosi* (neklasifikované biotypy), cf. *her* – *R. cf. hercynicus*, *luc* – *R. lucentifolius*, *el* – *R. elegans* Hayata, cf. *obor* – *R. cf. oboranus*, „ps“ – *R. „pseudosiemianicensis“* ined., cf. „ps“ – *R. cf. „pseudosiemianicensis“*, cf. *guen* – *R. cf. guentheri*, *lus* – *R. lusaticus*, *liv* – *R. lividus*, red. opl. – redukovaná oplozená vaječná buňka (sexuální rozmnožování), nered. neopl. – neredukovaná neoplozená vaječná buňka (normální apomixe), red. neopl. – redukovaná neoplozená vaječná buňka, nered. opl. – neredukovaná oplozená vaječná buňka.

Vývoj semen (%)

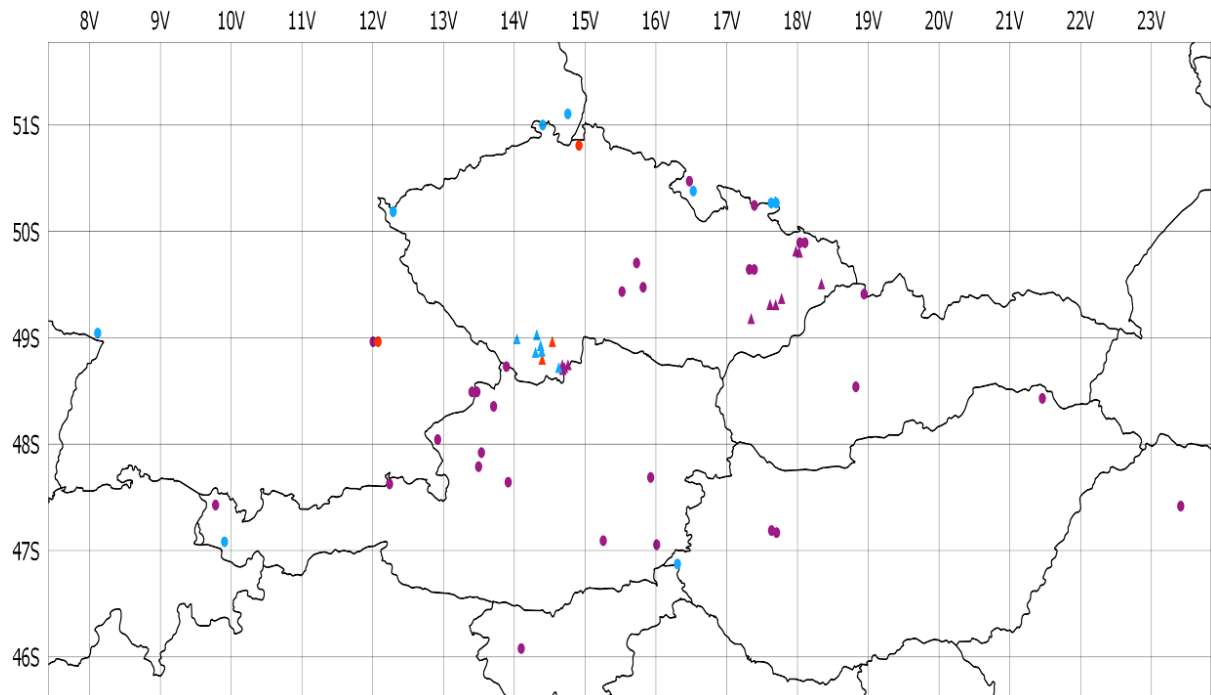
Sběrový kód	Taxon	Počet semen	red. opl.	nered. neopl.	red. neopl.	nered. opl.
Bílek 1	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
Bílý Kámen 3	<i>Gla</i>	10	90,0	0,0	0,0	10,0
Csehábánya 1	<i>Gla</i>	10	90,0	10,0	0,0	0,0

Farkasgyepü 1	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
Gla-Kop-L/12	<i>Gla</i>	16	100,0	0,0	0,0	0,0
Gla-Kop-M/12	<i>Gla</i>	27	92,6	0,0	0,0	7,4
Gloggnitz 1	<i>Gla</i>	6	100,0	0,0	0,0	0,0
Graz 1	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
Janovice 2	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
LI02760100	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
LI02760179	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
LI02760285	<i>Gla</i>	5	100,0	0,0	0,0	0,0
LI02760315	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
LI02760414	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
LI02760421	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
LI02760445	<i>Gla</i>	10	60,0	40,0	0,0	0,0
LI02760469	<i>Gla</i>	3	66,7	0,0	33,3	0,0
MD-Gla1/18	<i>Gla</i>	10	90,0	10,0	0,0	0,0
MD-Gla2/18	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
PE 4/3	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
PE 2/1	<i>Gla</i>	4	100,0	0,0	0,0	0,0
R81/14	<i>Gla</i>	2	100,0	0,0	0,0	0,0
R93/15, R95/15	<i>cf. her</i>	5	60,0	20,0	20,0	0,0

R141/14	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
R154/18	<i>luc</i>	10	10,0	70,0	10,0	10,0
R159/18	<i>Gla</i>	10	20,0	70,0	0,0	10,0
R184/13	<i>el</i>	2	0,0	0,0	0,0	100,0
R184/14	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
R216/18	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
R219/18	<i>cf. obor</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
R236/14	<i>Gla</i>	10	20,0	80,0	0,0	0,0
R245/18	<i>„ps“</i>	10	90,0	10,0	0,0	0,0
R250/18	<i>cf. „ps“</i>	10	20,0	70,0	10,0	0,0
R286/18	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
R288/14	<i>cf. guen</i>	3	0,0	100,0	0,0	0,0
R296/14	<i>lus</i>	4	50,0	50,0	0,0	0,0
R311/13	<i>liv</i>	1	0,0	100,0	0,0	0,0
Söchau 1	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
Szalafö 1	<i>Gla</i>	10	20,0	50,0	0,0	30,0
Zemplén 1	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0
Žiri 1	<i>Gla</i>	10	100,0	0,0	0,0	0,0

Jedinci byli klasifikováni podle podílu normálních apomiktických semen. Většina jedinců (73,17 %) byla klasifikována jako sexuální, 21,95 % jedinců jako fakultativně apomiktičtí a zbylí dva jedinci (4,88 %) jako fakultativně sexuální.

Podíl apomiktického rozmnožování se geograficky lišil (Obr. 4). Fakultativně apomiktičtí jedinci byli zaznamenáni zejména po obou stranách hranice České republiky s Německem a Polskem (a v dřívější studii, Šarhanová et al. 2012, také v jižních Čechách). Na západě Německa, Rakouska a také Maďarska bylo zaznamenáno po jednom fakultativně apomiktickém jedinci. Dva fakultativně sexuální jedinci pocházeli ze severních Čech a z Německa (Bavorska). Ostatní jedinci ze zbývajících regionů byli sexuální.



Obr. 4. – Mapa lokalit vzorků *Rubus ser. Glandulosi*, klasifikovaných podle podílu apomiktických semen; vlastní data (tečky) a data z práce Šarhanová et al. (2012) (trojúhelníky); sexuální (fialově), fakultativně sexuální (červeně), fakultativně apomiktický vzorek (modře).

6. Diskuse

Skutečnost, že jsou ostružiníky značně variabilní ve způsobu rozmnožování, byla již dříve prokázána např. pomocí cytoembryologických metod (např. Pratt & Einset 1955) nebo experimentálním křížením (např. Haskell 1960). Šarhanová et al. (2012) jako první měřili semena ostružiníků metodou FCSS.

Metodou FCSS jsem analyzovala semena *R. ser. Glandulosi* z různých regionů. Potvrdila se převaha sexuálního rozmnožování nad apomixí (83,15 % všech semen a 73,17 % jedinců bylo sexuálních). *Ser. Glandulosi* je jedinou sérií podrodu *Rubus* s převládajícím sexuálním rozmnožováním (Šarhanová et al. 2012). Vyšší podíl sexuality než ostatní série mají také jinak převážně apomiktické *ser. Discolores* (P. J. Müll.) Focke a *ser. Radula* (Focke) Focke (Šarhanová et al. 2017).

6.1. Variabilita v ploidii embrya a endospermu u jednotlivých způsobů reprodukce

Sexuální semena mají obvykle poměr mateřského a otcovského genomu v endospermu 2:1, jiný poměr vede u některých druhů rostlin k aborci semene (Koltunow & Grossniklaus 2003). Sexuální semena nejčastěji vznikla oplozením zárodečného vaku redukovanou diploidní mikrosporou (= pylovým zrnem); vzniklé semeno mělo 4x embryo a 6x endosperm. Protože se *ser. Glandulosi* často kříží se zástupci jiných sérií, např. zkřížením se *ser. Discolores* vznikli v minulosti někteří zástupci *ser. Radula* (Šarhanová et al. 2017), dochází někdy k oplození mikrosporou jiného druhu o jiné ploidii; např. při oplození redukovanou haploidní mikrosporou (pravděpodobně z diploidního *R. idaeus*) vzniklo semeno s ploidií embrya 3x a endospermu 5x a při oplození neredukovanou triploidní mikrosporou vzniklo semeno s 5x embryem a 7x endospermem. Šarhanová et al. (2012) nezjistili u *ser. Glandulosi* žádná sexuální semena s jinými ploidiemi embrya a endospermu (všechna semena měla 4x embryo a 6x endosperm).

Ploidie endospermu apomiktických semen byla velmi variabilní, protože u apomiktů může mít endosperm velmi rozdílný poměr mateřského a otcovského genomu (Šarhanová et al. 2012). Nejčastější byl 10x endosperm, který vzniká při účasti redukované diploidní mikrospory. Endosperm jiných ploidií může vznikat např. po opylení neredukovaným pylem, pylem jiného druhu s jinou ploidií či aneuploidním pylem. Několik semen mělo 11x endosperm, který vzniká oplozením jádra zárodečného vaku triploidní mikrosporou; 12x endosperm může vznikat oplozením buď pomocí jedné neredukované tetraploidní

mikrospory nebo dvěma redukovanými mikrosporami. Může také docházet ke splynutí více jader zárodečného vaku, jak zjistili Pratt & Einset (1955), čímž vzniká endosperm s vysokou ploidií. K tomu došlo u semene s ploidií embrya 4x a endospermu 15x, který vznikl splynutím 12x jádra zárodečného vaku s 3x mikrosporou, a také u semene s ploidií embrya 4x a endospermu 16x, což byla zároveň nejvyšší zjištěná ploidie endospermu. Šarhanová et al. (2012) rovněž zaznamenali vysokou variabilitu ploidie endospermu u apomiktických semen; nejčastější byly ploidie 10x a 12x a vyskytla se i dvě semena s ploidií 14x a 16x. Nejvyšší zjištěná ploidie endospermu u ser. *Glandulosi* tedy byla 16x, celkově v podrodu *Rubus* však zjistili nejvyšší ploidii endospermu 20x.

Podle vlastních výsledků i výsledků z práce Šarhanová et al. (2012) bylo také zjištěno několik semen, jejichž embrya vznikla z redukované neoplozené vaječné buňky nebo neredukované oplozené vaječné buňky. V prvním případě vždy vzniklo 2x (dihaploidní) embryo a 6x endosperm, který vznikl oplozením zárodečného vaku redukovanou diploidní mikrosporou. V druhém případě došlo k oplození vaječné buňky i jádra zárodečného vaku redukovanou diploidní mikrosporou a ploidie embrya byla vždy 6x a ploidie endospermu 10x.

6.2. Geografická partenogeneze na studovaném území

Šarhanová et al. (2012) srovnávali podíl sexuálního a apomiktického rozmnožování u jedinců ze západních Karpat a jižní části Českého masivu (jižních Čech) a zjistili u ser. *Glandulosi* geografickou partenogenezi. Geografická partenogeneze byla známá již dříve v rámci podrodu *Rubus* (Asker & Jerling 1992). Šarhanová et al. (2012) zjistili, že většina semen u většiny mateřských rostlin z jižních Čech byla apomiktická, naproti tomu v Karpatech bylo pouze jediné semeno apomiktické a zbylá semena byla sexuální. Všichni jedinci z Karpat byli tedy klasifikováni jako sexuální, zatímco v jižních Čechách byli zjištěni sexuální, fakultativně sexuální i fakultativně apomiktičtí jedinci (Obr. 4).

Práce Šarhanová et al. (2012) byla pilotní, srovnávala pouze dva regiony v České republice a počet analyzovaných semen v jednotlivých vzorcích byl většinou poměrně malý (3–7). Cílem této bakalářské práce bylo na jejich práci navázat a zaměřit se na větší (dosud neanalyzovanou) část areálu zejména v rámci střední Evropy. Geografickou partenogenezi bylo možné předem předpokládat díky výskytu stabilizovaných apomiktických mikrospécií v některých regionech a na druhou stranu existenci množství neklasifikovatelných biotypů, u nichž se dalo očekávat sexuální rozmnožování.

Podle výsledků této bakalářské práce většina fakultativních apomiktů pocházela z lokalit podél severních hranic České republiky s Německem a Polskem. Tyto vzorky většinou patřily ke stabilizovaným mikrospeciím, u nichž bylo možné předpokládat apomixi. Fakultativně apomiktiční jedinci se dále vyskytli v západním Německu a západním Rakousku. Jeden fakultativně apomiktický jedinec se překvapivě vyskytl také v Maďarsku, což bylo pravděpodobně způsobeno hybridizací s jiným taxonem. Vzorky pocházející ze severozápadního Rakouska a Bavorska byly navzdory předpokladu sexuální (kromě jednoho fakultativně sexuálního vzorku z Bavorska). Některé (především fakultativně apomiktické) vzorky byly bohužel velmi malé (1–5 semen). Převaha fakultativně apomiktických jedinců podél hranic České republiky s Německem a Polskem a v jižních Čechách a převaha sexuálních jedinců v ostatních regionech potvrzují, že se u ser. *Glandulosi* uplatňuje geografická partenogeneze.

6.3. Hypotézy vysvětlující geografickou partenogenezi

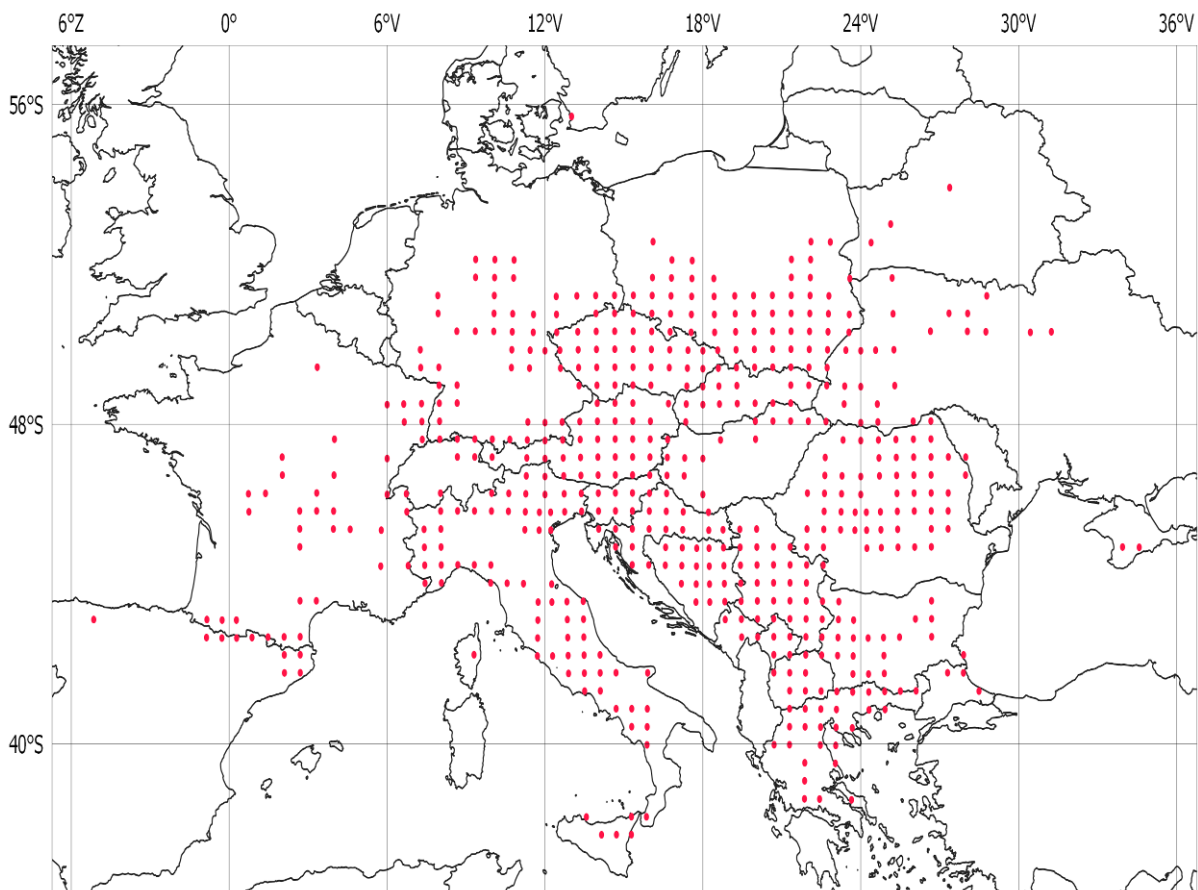
Geografická partenogeneze je obvykle vysvětlována různými hypotézami. Apomikty jsou schopné se rozmnožovat prostřednictvím jednoho jedince (Stebbins 1950), proto mohou rychleji kolonizovat nové prostředí ve srovnání se sexuálními liniemi. Apomiktické linie se vyskytují častěji v prostředí, kde je méně biotických interakcí a sexuální linie naopak tam, kde jsou biotické interakce výraznější (Levin 1975). V severněji položených oblastech může docházet ke křížení sexuálních linií s neadaptovanými imigranty za vzniku hůře adaptovaného potomstva, které je snadněji vytlačeno apomikty (Peck et al. 1998). Podle dalších hypotéz mají apomiktické linie širokou ekologickou amplitudu díky existenci generalistů (Lynch 1984) nebo specialistů (Vrijenhoek 1984).

Pozorovaná geografická partenogeneze u ser. *Glandulosi* může být vysvětlena několika dalšími hypotézami. Šarhanová et al. (2012) uvádějí, že v jižních Čechách, kde zjistili výskyt apomiktických jedinců, rostou také zástupci převážně apomiktické ser. *Radula*. Podle jejich hypotézy mohlo dojít k introgresi apomixe ze ser. *Radula* do ser. *Glandulosi*. Ostružiníky ser. *Radula* rostou hojně mimo jiné i v západním Německu a podhůří Alp (jihovýchodní Německo a severozápadní Rakousko) (Kurtto et al. 2010). Podle výsledků této bakalářské práce však byli jedinci ze severozápadního Rakouska sexuální a v Německu bylo analyzováno poměrně málo vzorků.

Apomixe (především autonomní apomixe) je výhodná např. na okraji areálu, protože apomiktická populace může být založena díky jednomu jedinci (Stebbins 1950). Apomikty

mohou být proto na okraji areálu úspěšnější než jejich příbuzné sexuální linie díky rychlejšímu šíření. Při pseudogamii je ke vzniku endospermu nutné oplození jádra zárodečného vaku. U podrodu *Rubus* je však možné samooplození (Šarhanová et al. 2017), ačkoliv po oplození mikrosporou z jiného jedince se tvoří více semen (Kollmann et al. 2000).

Při sexuálním rozmnožování u malých izolovaných populací na okraji areálu může docházet vlivem genetického driftu a inbreedingu ke snižování heterozygotnosti. V těchto regionech je tedy výhodnější apomixie, která udržuje vysokou heterozygotnost v populaci (Šarhanová et al. 2017). Jižní Čechy se (na rozdíl od druhého zkoumaného regionu – Karpat) nacházejí spíše při okraji areálu *R. ser. Glandulosi* (resp. areálu taxonu *R. hirtus* agg., který zahrnuje různé neklasifikovatelné biotypy; Obr. 5), protože tento taxon se nevyskytuje v některých oblastech na jihu až jihovýchodě Německa (Kurtto et al. 2010). Vzorky z jižních Čech byly převážně apomiktické (Šarhanová et al. 2012) a byly více heterozygotní než vzorky z Karpat (Šarhanová et al. 2017), což podporuje uvedenou hypotézu.



Obr. 5. – Mapa rozšíření taxonu *Rubus hirtus* agg. v Evropě (podle Kurtto et al. 2010, překresleno).

Taxon *R. ser. Glandulosi* je zvláštní tím, že se zde geografická partenogeneze vyskytuje v jedné úrovni ploidie (4x). U ostatních skupin rostlin, které vykazují geografickou partenogenezi, jsou sexuální linie diploidní a apomikty polyploidní, např. *Crepis occidentalis* Nutt. (Asker & Jerling 1992), *Hieracium alpinum* agg. (Hartmann et al. 2017), *Taraxacum officinale* agg. (van Dijk 2003). Geografická partenogeneze může být u těchto taxonů způsobena spíše rozdílnou ploidií (van Dijk 2003).

Výsledky této bakalářské práce pomáhají objasnit geografické rozšíření sexuálního a apomiktického způsobu reprodukce u ser. *Glandulosi*. Příčiny geografické partenogeneze u této skupiny však zatím nejsou zcela jasné a pro testování uvedených hypotéz bude nezbytné získat více dat; např. pro testování hypotézy o introgresi apomixe by bylo vhodné se v budoucnu více zaměřit na vzorky z regionů s častým výskytem ser. *Radula*, jako je např. západní a jihovýchodní Německo, kde bylo dosud analyzováno jen několik vzorků.

7. Závěr

Bakalářská práce shrnuje (formou literárního přehledu) dosavadní znalosti problematiky apomixy a s tím související geografické partenogeneze u skupiny *Rubus* ser. *Glandulosi*. Dále popisuje různé typy reprodukce u krytosemenných rostlin a metodu průtokové cytometrie, která se využívá při určení způsobu reprodukce.

Součástí práce byl i vlastní výzkum, a to určení způsobu reprodukce vzorků semen (včetně tří vlastních vzorků) *R.* ser. *Glandulosi* pocházejících z různých regionů. Pomocí průtokové cytometrie bylo změřeno 368 semen ze 41 vzorků (jedinců). Byly zjištěny čtyři způsoby vzniku semen: sexuální (83,15 % semen), apomiktický (13,04 % semen) a v menší míře dvě odchylky. Většina jedinců (73,17 %) byla klasifikována jako sexuální (tj. podíl sexuálně odvozených embryí ≥ 90 %), 21,95 % jedinců jako apomiktické (≥ 50 % apomikticky odvozených embryí), zbylí jedinci jako fakultativně sexuální (intermediární podíl). Fakultativně apomiktičtí jedinci pocházeli zejména z lokalit kolem hranice České republiky s Německem a Polskem, jedinci z jiných regionů byli většinou sexuální. Lze konstatovat, že výsledky odpovídají geografické partenogenezi, kterou u ser. *Glandulosi* odhalila předchozí studie (Šarhanová et al. 2012).

8. Literatura

- Asker S. (1979): Progress in apomixis research. – *Hereditas* 91: 231–240.
- Asker S. & Jerling L. (1992): *Apomixis in plants*. – CRC Press, Boca Raton.
- Barcaccia G. & Albertini E. (2013): Apomixis in plant reproduction: a novel perspective on an old dilemma. – *Plant Reprod.* 26: 159–179.
- Bell G. (1982): *The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality*. – Croom Helm, Londýn.
- Bicknell R. A. & Koltunow A. M. (2004): Understanding apomixis: recent advances and remaining conundrums. – *Pl. Cell* 16: 228–245.
- Bierzychudek P. (1985): Patterns in plant parthenogenesis. – *Experientia* 41: 1255–1264.
- Blatný C., Sekerka J., Dostál J., Blatná J., Kluczynska J., Košák B., Nuhlíček Č., Králíček J. & Purta M. (1971): *Rybízky, angrešty, maliníky a ostružiníky*. – Academia, Praha.
- Briggs D. & Walters S. M. (2001): *Proměnlivost a evoluce rostlin*. – Univerzita Palackého, Olomouc.
- Bruckart W. L., Michael J. L., Sochor M. & Trávníček B. (2017): Invasive blackberry species in Oregon: their identity and susceptibility to rust disease and the implications for biological control. – *Invasive Plant Sci. Manag.* 10: 143–154.
- Caplan J. S. & Yeakley J. A. (2006): *Rubus armeniacus* (Himalayan blackberry) occurrence and growth in relation to soil and light conditions in Western Oregon. – *Northwest Sci.* 80: 9–17.
- Carman J. G. (1997): Asynchronous expression of duplicate genes in angiosperms may cause apomixis, bispory, tetraspory, and polyembryony. – *Biol. J. Linn. Soc.* 61: 51–94.
- Danihelka J., Chrtek J. jr. & Kaplan Z. (2012): Checklist of vascular plants of the Czech Republic. – *Preslia* 84: 647–811.
- Dobeš C. H., Mitchell-Olds T. & Koch M. A. (2004): Extensive chloroplast haplotype variation indicates Pleistocene hybridization and radiation of North American *Arabis drummondii*, *A. × divaricarpa*, and *A. holboellii* (Brassicaceae). – *Mol. Ecol.* 13: 349–370.

- Doležel J., Binarová P. & Lucretti S. (1989): Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. – *Biol. Plant.* 31: 113–120.
- Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysák M. A., Nardi L. & Obermayer R. (1998): Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. – *Ann. Bot.* 82: 17–26.
- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007a): Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. – *Nat. Protoc.* 2: 2233–2244.
- Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (2007b): Flow cytometry with plants: an overview. – In: Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (eds), *Flow cytometry with plant cells*, p. 41–65, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Focke W. O. (1877): *Synopsis Ruborum Germaniae*. – Bremen.
- Glesener R. R. & Tilman D. (1978): Sexuality and the components of environmental uncertainty: clues from geographic parthenogenesis in terrestrial animals. – *Am. Nat.* 112: 659–673.
- Greilhuber J., Tensch E. M. & Loureiro J. C. M. (2007): Nuclear DNA content measurement. – In: Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (eds), *Flow cytometry with plant cells*, p. 67–101, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Grossniklaus U., Nogler G. A. & van Dijk P. J. (2001): How to avoid sex: the genetic control of gametophytic apomixis. – *Pl. Cell* 13: 1491–1497.
- Gustafsson Å. (1942): The origin and properties of the European blackberry flora. – *Hereditas* 28: 249–277.
- Hartmann M., Štefánek M., Zdvorač P., Heřman P., Chrtěk J. & Mráz P. (2017): The Red Queen hypothesis and geographical parthenogenesis in the alpine hawkweed *Hieracium alpinum* (Asteraceae). – *Biol. J. Linn. Soc.* 122: 681–696.
- Haskell G. (1960): Role of the male parent in crosses involving apomictic *Rubus* species. – *Heredity* 14: 101–113.
- Hojsgaard D. & Hörandl E. (2019): The rise of apomixis in natural plant populations. – *Front. Plant. Sci.* 10: 1–13.

- Holub J. (1995): 4. *Rubus* L. – ostružiník (maliník, moruška, ostružinec, ostružiníček). – In: Slavík B. (ed.), Květena České republiky 4, p. 54–206, Academia, Praha.
- Holub J. (1997): Some considerations and thoughts on the pragmatic classification of apomictic *Rubus* taxa. – Osnabrücker Naturwiss. Mitt. 23: 147–155.
- Hörandl E. (2006): The complex causality of geographical parthenogenesis. – New Phytol. 171: 525–538.
- Hörandl E. (2010): The evolution of self-fertility in apomictic plants. – Sex. Plant Reprod. 23: 73–86.
- Hörandl E. (2018): The classification of asexual organisms: old myths, new facts, and a novel pluralistic approach. – Taxon 67: 1066–1081.
- Hörandl E. & Hojsgaard D. (2012): The evolution of apomixis in angiosperms: a reappraisal. – Plant Biosyst. 146: 681–693.
- Hörandl E. & Paun O. (2007): Patterns and sources of genetic diversity in apomictic plants: implications for evolutionary potentials. – In: Hörandl E., Grossniklaus U., van Dijk P. J. & Sharbel T. F. (eds), Apomixis: evolution, mechanisms and perspectives, p. 169–174, A. R. G. Gantner Verlag, Rugell.
- Kandemir N. & Saygili I. (2015): Apomixis: new horizons in plant breeding. – Turk J. Agric. For. 39: 1–8.
- Kantama L., Sharbel T. F., Schranz M. E., Mitchell-Olds T., de Vries S. & de Jong H. (2007): Diploid apomicts of the *Boechera holboellii* complex display large-scale chromosome substitutions and aberrant chromosomes. – PNAS 104: 14026–14031.
- Kearney M. (2005): Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis. – Trends Ecol. Evol. 20: 495–502.
- Kenny N. T. (1996): A test of the general-purpose genotype hypothesis in sexual and asexual *Erigeron* species. – Am. Midl. Nat. 136: 1–13.
- Khush G. S., Brar D. S., Bennett J. & Virmani S. S. (1994): Apomixis for rice improvement. – In: Khush G. S. (ed.), Apomixis: exploiting hybrid vigor in rice, p. 1–21, IRRI, Los Baños.
- Koblížek J. (2006): Jehličnaté a listnaté dřeviny našich zahrad a parků. – Sursum, Tišnov.

- Kollmann J., Steinger T. & Roy B. A. (2000): Evidence of sexuality in European *Rubus* (Rosaceae) species based on AFLP and allozyme analysis. – *Am. J. Bot.* 87: 1592–1598.
- Koltunow A. M. (1993): Apomixis – embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. – *Pl. Cell* 5: 1425–1437.
- Koltunow A. M. & Grossniklaus U. (2003): Apomixis: a developmental perspective. – *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 547–574.
- Krahulcová A., Trávníček B. & Šarhanová P. (2013): Karyological variation in the genus *Rubus*, subgenus *Rubus*: new data from the Czech Republic and synthesis of the current knowledge of European species. – *Preslia* 85: 19–39.
- Kresánek J. & Kresánek J. (2008): Atlas léčivých rostlín a lesných plodov. – Osveta, Martin.
- Kuntze O. (1867): Reform deutscher Brombeeren. – Verlag von Wilhelm Engelmann, Lipsko.
- Kurtto A., Weber H. E., Lampinen R. & Sennikov A. N. (eds) (2010): Atlas Florae Europaeae. Distribution of vascular plants in Europe. 15. Rosaceae (*Rubus*). The Committee for Mapping the Flora of Europe & Societas Biologica Fennica Vanamo, Helsinki.
- Levin D. A. (1975): Pest pressure and recombination systems in plants. – *Am. Nat.* 109: 437–451.
- Lynch M. (1984): Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. – *Q. Rev. Biol.* 59: 257–290.
- Matzk F. (2007): Reproduction mode screening. – In: Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (eds), *Flow cytometry with plant cells*, p. 131–152, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Matzk F., Meister A. & Schubert I. (2000): An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. – *Plant J.* 21: 97–108.
- Mayr E. (1992): A local flora and the biological species concept. – *Am. J. Bot.* 79: 222–238.
- Michaels H. J. & Bazzaz F. A. (1989): Individual and population responses of sexual and apomictic plants to environmental gradients. – *Am. Nat.* 134: 190–207.
- Mráz P., Chrtek J. & Šingliarová B. (2009): Geographical parthenogenesis, genome size variation and pollen production in the arctic-alpine species *Hieracium alpinum*. – *Bot. Helv.* 119: 41–51.

- Müller P. J. (1859): Versuch einer monographischen Darstellung der gallo-germanischen Arten der Gattung *Rubus*. – Buchdruckerein von D. Kranzbühler jun., Neustadt a. d. H.
- Muller H. J. (1964): The relation of recombination to mutational advance. – *Mutat. Res.* 1: 2–9.
- Nogler G. A. (1984): Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. – *Bot. Helv.* 94: 411–422.
- Ozias-Akins P. & van Dijk P. J. (2007): Mendelian genetics of apomixis in plants. – *Annu. Rev. Genet.* 41: 509–537.
- Paun O., Stuessy T. F. & Hörandl E. (2006): The role of hybridization, polyploidization and glaciation in the origin and evolution of the apomictic *Ranunculus cassubicus* complex. – *New Phytol.* 171: 223–236.
- Peck J. R., Yearsley J. M. & Waxman D. (1998): Explaining the geographic distributions of sexual and asexual populations. – *Nature* 391: 889–892.
- Pratt Ch. & Einset J. (1955): Development of the embryo sac in some American blackberries. – *Am. J. Bot.* 42: 637–645.
- Rentería J. L., Gardener M. R., Panetta F. D., Atkinson R. & Crawley M. J. (2012): Possible impacts of the invasive plant *Rubus niveus* on the native vegetation of the Scalesia forest in the Galapagos islands. – *PLoS ONE* 7: 1–9.
- Richards A. J. (2003): Apomixis in flowering plants: an overview. – *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 358: 1085–1093.
- Robinson J. P. & Grégori G. (2007): Principles of flow cytometry. – In: Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (eds), *Flow cytometry with plant cells*, p. 19–40, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Rosypal S. (2003): *Nový přehled biologie*. – Scientia, Praha.
- Siena L. A., Sartor M. E., Espinoza F., Quarín C. L. & Ortiz J. P. A. (2008): Genetic and embryological evidences of apomixis at the diploid level in *Paspalum rufum* support recurrent auto-polyploidization in the species. – *Sex. Plant Reprod.* 21: 205–215.

- Sochor M. & Trávníček B. (2016): Melting pot of biodiversity: first insights into the evolutionary patterns of the Colchic bramble flora (*Rubus* subgenus *Rubus*, Rosaceae). – Bot. J. Linn. Soc. 181: 610–620.
- Stebbins G. L. (1950): Variation and evolution in plants. – Columbia University Press, New York.
- Suda J. (2005): Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. – Živa 1: 46–48.
- Suda J., Kron P., Husband B. C. & Trávníček P. (2007): Flow cytometry and ploidy: applications in plant systematics, ecology and evolutionary biology. – In: Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (eds), Flow cytometry with plant cells, p. 103–130, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- Sudre H. (1908–1913): Rubi Europae. – Paříž.
- Syme J. T. B. (1864): *Rubus* L. – In: Syme J. T. B., Smith J. E. & Sowerby J. (eds), English Botany 3, p. 157–197, Londýn.
- Šarhanová P., Sharbel T. F., Sochor M., Vašut R. J., Dančák M. & Trávníček B. (2017): Hybridization drives evolution of apomicts in *Rubus* subgenus *Rubus*: evidence from microsatellite markers. – Ann. Bot. 120: 317–328.
- Šarhanová P., Vašut R. J., Dančák M. & Trávníček B. (2012): New insights into the variability of reproduction modes in European populations of *Rubus* subgen. *Rubus*: how sexual are polyploid brambles? – Sex. Plant Reprod. 25: 319–335.
- Thompson M. M. (1997): Survey of chromosome numbers in *Rubus* (Rosaceae: Rosoideae). – Ann. Mo. Bot. Gard. 84: 128–164.
- Trávníček B. & Havlíček P. (2002): *Rubus* – ostružiník. – In: Kubát K., Hrouda L., Chrtěk J. jun., Kaplan Z., Kirschner J. & Štěpánek J. (eds), Klíč ke květeně České republiky, p. 329–376, Academia, Praha.
- Trávníček B., Havlíček P. & Krahulcová A. (2000a): Ostružiníky – pozoruhodné rostliny naší přírody (I). – Živa 3: 113–115.
- Trávníček B., Havlíček P. & Krahulcová A. (2000b): Ostružiníky – pozoruhodné rostliny naší přírody (II). – Živa 4: 156–158.

- Tyler T., Karlsson T., Milberg P., Sahlin U. & Sundberg S. (2015): Invasive plant species in the Swedish flora: developing criteria and definitions, and assessing the invasiveness of individual taxa. – *Nord. J. Bot.* 33: 300–317.
- Urbani M. H., Quarin C. L., Espinoza F., Penteadó M. I. O. & Rodrigues I. F. (2002): Cytogeography and reproduction of the *Paspalum simplex* polyploid complex. – *Plant Syst. Evol.* 236: 99–105.
- Vandel A. (1928): La parthénogenèse géographique. Contribution à l'étude biologique et cytologique de la parthénogenèse naturelle. – *Bull. Biol. Fr. Belg.* 62: 164–281.
- van Dijk P. J. (2003): Ecological and evolutionary opportunities of apomixis: insights from *Taraxacum* and *Chondrilla*. – *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 358: 1113–1121.
- van Dijk P. J. & Vijverberg K. (2005): The significance of apomixis in the evolution of the angiosperms: a reappraisal. – In: Bakker F. T., Chatrou L. W., Gravendeel B. & Pelsers P. B. (eds), *Plant species-level systematics: new perspectives on pattern & process*, p. 1–16, Gantner Verlag, Rugell.
- Velebil J., Trávníček B., Sochor M. & Havlíček P. (2016): Five new bramble species (*Rubus*, Rosaceae) in the flora of the Czech Republic. – *Dendrobiology* 75: 141–155.
- Vinter V. (2013): Přehled morfologie cévnatých rostlin. – Univerzita Palackého, Olomouc.
- Vrijenhoek R. C. (1984): Ecological differentiation among clones: the frozen niche variation model. – In: Wöhrmann K. & Loeschke V. V. (eds), *Population biology and evolution*, p. 217–231, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Weber H. E. (1996): Former and modern taxonomic treatment of the apomictic *Rubus* complex. – *Folia Geobot. Phytotax.* 31: 373–380.