

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra botaniky



**Srovnání reprodukčního způsobu a velikosti genomu
u vybraných zástupců rodů *Taraxacum* a *Rubus*
pomocí průtokové cytometrie**

Bakalářská práce

Filip Šindelář

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie a ekologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **RNDr. Luboš Majeský, Ph.D.**

Konzultant: **Mgr. Michal Sochor, Ph. D.**

Olomouc 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením RNDr. Ľuboše Majeského, Ph. D. a s použitím uvedené literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat RNDr. Luboši Majeskému, Ph. D. a Mgr. Michalovi Sochorovi, Ph. D. za trpělivost, odborné vedení, cenné rady a všestrannou pomoc při psaní této práce s velmi zajímavým tématem.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Filip Šindelář

Název práce: Srovnání reprodukčního způsobu a velikosti genomu u vybraných zástupců rodů *Taraxacum* a *Rubus* pomocí průtokové cytometrie

Typ práce: bakalářská

Pracoviště: Katedra botaniky

Vedoucí práce: RNDr. Luboš Majeský, Ph. D.

Rok obhajoby práce: 2018

Abstrakt:

Rody *Taraxacum* a *Rubus* patří mezi rostlinné skupiny s celosvětovým rozšířením a rostoucí v mnoha rozdílných ekologických podmínkách. V obou rodech jsou popsány stovky druhů. Oba rody mají složitou taxonomii a evoluci vlivem opakovaného křížení a koexistence jedinců se sexuálním a apomiktickým rozmnožováním. V průběhu evoluce došlo k vytvoření složitých „síťových“ vztahů a vytváření vysoké variability morfologických znaků. Tato bakalářská práce má za cíl připravit literární přehled o rodech *Taraxacum* a *Rubus* a metodě stanovení velikosti genomu a reprodukčního způsobu pomocí průtokové cytometrie. Stanovit velikost genomu a reprodukční způsob lze velmi efektivně s využitím průtokové cytometrie. Tato metoda využívá zralých semen a výsledkem je histogram na obrazovce počítače.

Klíčová slova: *Taraxacum*, *Rubus*, apomixie, průtoková cytometrie

Počet stran: 58

Počet příloh: 11

Jazyk: Čeština

Bibliographic identification

Author's first name and surname: Filip Šindelář

Title of thesis: Comparison of reproduction mode and genome size in selected representatives of the genera *Taraxacum* and *Rubus* by means of flow cytometry

Type of thesis: bachelor

Department: Department of Botany

Supervisor: RNDr. Ľuboš Majeský, Ph. D.

The year of presentation: 2018

Abstract:

The two genera *Taraxacum* and *Rubus* belong among the plant groups with global distribution growing in many different ecological conditions. In both genera hundreds of species were described. Both genera have very intricate taxonomy and evolution due to the repeated hybridization and coexistence of individuals with sexual and apomictic reproduction. During the evolution a complex reticular relationships and a high variability of morphological characters were created. This bachelor thesis aims to prepare an overview about the genera *Taraxacum* and *Rubus* and the flow cytometric method of genome size and reproduction mode assessment. Determining the size of genome and reproduction mode can be very effective using flow cytometry. This method uses mature seeds and result is a histogram on computer screen.

Keywords: *Taraxacum*, *Rubus*, apomixis, flow cytometry

Number of pages: 58

Number of appendices: 11

Language: Czech

Obsah

1. Úvod	
2. Cíl práce	
3. Literární přehled.....	9
3.1. Botanická charakteristika rodu <i>Taraxacum</i>	9
3.1.1. Název, popis, využití.....	9
3.1.2. Taxonomie	13
3.1.3. Evoluce	16
3.2. Botanická charakteristika rodu <i>Rubus</i>	19
3.2.1. Název, popis, využití.....	19
3.2.2. Taxonomie	22
3.2.3. Evoluce	25
3.3. Reprodukce rostlin.....	28
3.3.1. Pohlavní rozmnožování rostlin	28
3.3.2. Apomixe.....	30
3.3.3. Srovnání studovaných skupin a jejich specifika	32
3.4. Průtoková cytometrie.....	34
3.4.1. Popis základních principů metody	34
3.4.2. Stanovení velikosti genomu	37
3.4.3. Popis stanovení reprodukčního způsobu.....	40
4. Závěr	
5. Literatura	
6. Přílohy	

1. Úvod

Rod *Taraxacum* je ekologicky variabilní a široce rozšířený (Mogie & Ford 1988). Je složený ze sexuálních diploidních a apomiktických polyploidních taxonů, které mají velmi složitou síťovou evoluci (Kirschner & Štěpánek 1994), což ztěžuje rekonstrukci fylogenetických vztahů v rodu (Záveská Drábková & al. 2009). Apomixe v rodě je obligátní (Richards 1973). Rod má velice komplikovanou taxonomickou strukturu založenou na morfologii a kvůli nízké morfologické diferenciaci taxonů se používá supraspecifické dělení do sekcí (Kirschner & Štěpánek 1996; Batoušek & al. 2010).

Rod *Rubus* je druhově také velice početný a zástupci rodu se vyskytují po celém světě vyjma Antarktidy (Holub 1995). Ostružiníky rostou na místech s různou ekologií (Holub 1995). Nynější druhy ostružiníků jsou produktem složitých křížení a zpětných křížení, která vedla ke vzniku polyploidních typů, které se rozmnožují pomocí fakultativní apomixe (Holub 1995). Složitá taxonomie je postavená prakticky jedině na morfologických znacích (Krahulcová & al. 2013). Hlavní systematické členění rodu je na morfologicky relativně dobře vymezené podrody (Trávníček & al. 2000a).

Průtoková cytometrie se využívá v mnoha biologických oborech (Suda 2005). Jednou z aplikací průtokové cytometrie je určení velikosti genomu podle poloh G1 a G2 píků a zjištění způsobu rozmnožování podle ploidie endospermu a embrya ze zralých semen (Suda 2005). Příprava vzorku pro průtokovou cytometrii trvá pouze pár minut. Analýza netrvá dlouho a reprezentativní počet jader lze měřit v krátkém čase (Doležel & al. 2007).

2. Cíl práce

Připravit literární přehled k diplomové práci, která se bude zabývat stanovením velikosti genomu a reprodukčního způsobu vybraných taxonů z rodů *Taraxacum* a *Rubus*.

3. Literární přehled

3.1. Botanická charakteristika rodu *Taraxacum* F. H. Wigg.

3.1.1. Název, popis, využití

Název rodu je odvozený z řečtiny, *taraxis* = zánět očí a *akeomai* = hojivý a ukazuje na využívání rostlin tohoto rodu už od dávných dob (Batoušek & al. 2010). Rostlina se v češtině běžně označuje jménem pampeliška (Obr. 1) (Čihař 2002).



Obrázek 1: Habitus rostliny.

Zdroj: <http://survivalgardener.com/wp-content/uploads/2015/11/dandelion-picture.jpg>.

Jedná se většinou o krátkodobě vytrvalé byliny s mléčnicemi ve všech částech (Batoušek & al. 2010). Rostliny mají na povrchu málo nebo hodně jednoduchých, většinou mnohobuněčných a pokroucených bělavých chlupů, ve vzácných případech mohou být lysé (Batoušek & al. 2010). Kořen má světle hnědé zbarvení (Kremer 2004), je větvenovitý, relativně tlustý, s kořenovou hlavou jednoduchou nebo větvenou, někdy krytou bázemi řapíků odumřelých listů nazývaných tunika (Batoušek & al. 2010). Listy jsou v přízemní růžici, s čepelí většinou kracovitou až peřenosečnou, někdy docela složitě členěnou, v málo případech celistvou, se zřetelnou střední žilkou (Batoušek & al. 2010). Úbory mají rozměry 1 až 6 cm v průměru, světle žluté až zlatožluté, bělavé, oranžové, oranžově červené nebo fialové barvy (Příloha 1) (Batoušek & al. 2010).

Zákrov je víceřadý, mající pokaždé zřetelně rozdílné vnější, zpravidla střechovitě sestavené a do rozdílného stupně odstálé zákrovní listeny a jeden kruh přitisklých vnitřních zákrovních listenů. Lůžko úboru je trochu vypouklé jamkaté, lysé bez plevek. Květy jsou jazykovité, oboupohlavné, s ligulou, která je plochá až podélně žlábkovitá, ve vzácných případech trubičkovitě svinutou nebo i svými okraji srostlou, žlutou na vrcholu s 5 zpravidla malými, někdy různě barevnými zoubky, liguly okrajových květů na spodní straně obvykle s podélným pruhem rozdílné barvy, která je často nafialověle hnědošedá a někdy i červenohnědá (Obr. 2) (Batoušek & al. 2010).



Obrázek 2: Řez úborem zástupce rodu *Taraxacum* a jednotlivý jazykovitý květ z úboru.
Zdroj: <http://www.wikiwand.com/cs/Úbor>.

Prašníky a tyčinky utvářejí trubičku, pyl je většinou vytvořen, ale chybí u některých apomiktických linií. Ramena blizny a vrchní část čnělky mají zbarvení žluté, špinavě žluté až žlutozelené, vně se nacházejí tmavé a světlé vymetací chlupy (Batoušek & al. 2010). Nažky jsou lysé, zobánkaté, s tělem, které je úzce obkruželovité až úzce obvejčité, podélně mělce žebnaté a obvyčně přinejmenším ve vrchní polovině drobně osténkaté, na vrcholu pozvolna či náhle zúžené a přecházející v pyramidu, na kterou navazuje tenký a lámavý zobánek. Chmýr má zbarvení bílé, špinavě bílé až světle narůžověle hnědé, s drsnými paprsky (Batoušek & al. 2010).

Rostlina je velmi početná na živných a svěžích půdách (Kremer 2004). Na loukách a pastvinách se zásobou živin vytváří porosty (Kremer 2004). Rozsah výskytu sahá od nížin až do podhůří (Erdelská & al. 2008)

Velké množství druhů na jaře na pastvinách vytváří významné množství biomasy s nutriční hodnotou. U větších rostlin patřících k různým druhům se sbírají kořeny (*Radix taraxaci*) pro využití v lékařství. Jarní mladé listy se využívají jako zelenina a kvetoucí úbory k výrobě sirupu nazývaného pampeliškový med (Batoušek & al. 2010). Některé druhy a hlavně ze sekce *Taraxacum* (bývalá sekce *Ruderalia*) jsou využívány na výzkumy, jež mají odhalit genetický základ apomixe (Batoušek & al. 2010). Pro farmaceutické potřeby se pampelišky pěstují a farmaceutický výzkum se zaměřuje na zjišťování obsahu účinných látek, jejich účinků a mechanismů působení (Batoušek & al. 2010). Jeden druh pampelišky pocházející ze středoasijských stepí, běžně označován jako „ruská pampeliška = „russian dandelion“ *Taraxacum kok-saghyz* L. E. Rodin (Obr. 3) se od 40. let minulého století pěstuje pro získávání kaučuku (Černý 2012).



Obrázek 3: *Taraxacum kok-saghyz*. Zdroj: <http://old.ibot.cas.cz/en/eupearls>.

3.1.3. Taxonomie rodu

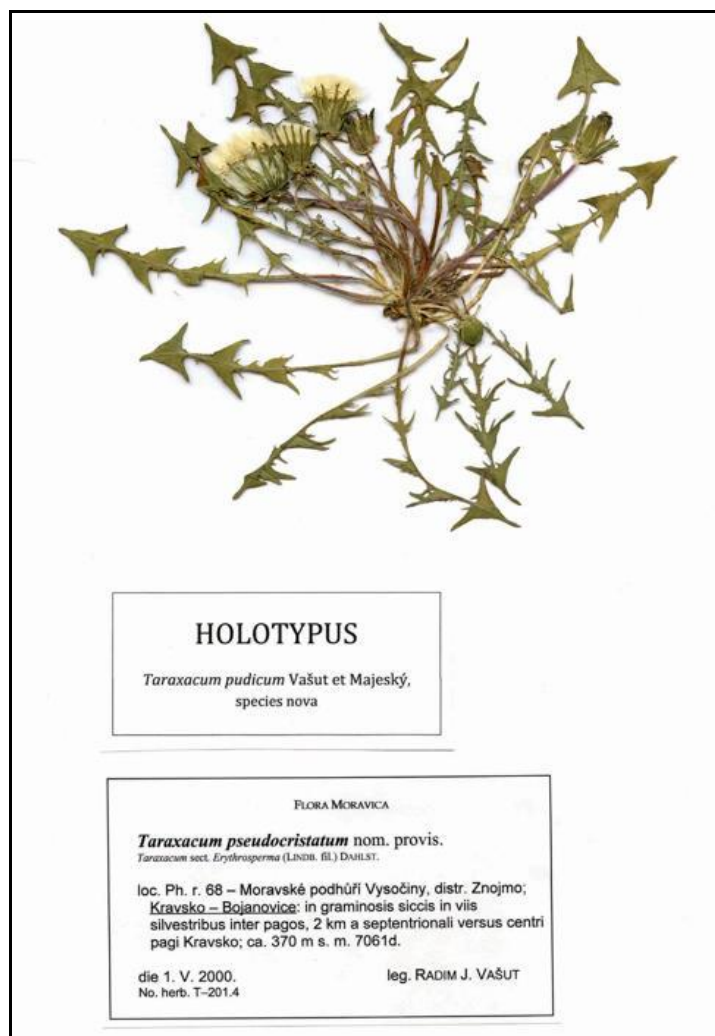
Rod *Taraxacum* je ekologicky variabilní a široce rozšířený (Mogie & Ford 1988). Původní oblast rozšíření je v celé mimotropické Eurasii, arktické oblasti, severní Africe, Severní a Střední Americe, jižních částech Jižní Ameriky, jihovýchodní Austrálie a Nového Zélandu. Sekundárně lidským působením došlo k rozšíření některých druhů některých sekcí po celém světě (Batoušek & al. 2010).

Rod *Taraxacum* obsahuje apomiktické – polyploidní a sexuální – diploidní taxony, které prodělaly velmi složitou síťovou evoluci. Polyploidi se vyznačují obligátní apomixí, což je klonální způsob reprodukce pomocí semen (Asker & Jerling 1992). Rod má velice komplikovanou taxonomickou strukturu (Batoušek & al. 2010). Kvůli složité evoluci, vysokému počtu polyploidních apomiktických druhů a nízké morfologické diferenciaci druhů se proto častěji používá supraspecifické dělení rodu do sekcí. Sekce jsou vytvořené na základě podobné morfologie, ekologie, karyologie a evoluce skupiny taxonů (Příloha 2 a 3) (Kirschner & Štěpánek 1996). V dnešní době se rozlišuje asi 60 sexuálních a více než 2500 apomiktických druhů, které jsou řazené do více než 50 sekcí (Tabulka) (Batoušek & al. 2010). Sexuální druhy jsou chápány jako druhy se širokou morfologickou a genetickou variabilitou, zatímco apomiktické druhy, tradičně označované jako „*mikrospecies*“, jsou chápány jako morfologicky úzce charakterizované homogenní jednotky (Kirschner & Štěpánek 1994).

Tabulka: Některé sekce rodu *Taraxacum*. S - sexuální reprodukce; AS - agamospermie i sexuální reprodukce, zdroj: Kirschner & Štěpánek 1996.

Sekce	Reprodukce	Rozšíření
<i>Alpestris</i> Soest	AS	sexuální taxony ve Východních Karpatech a na Balkáně
<i>Alpina</i> G.E. Haglund	AS	sexuální taxony v Pyrenejích a na Balkáně
<i>Antarctica</i> Hand.-Mazz.	S	sexuální taxony v Jižní Americe
<i>Arctica</i> Dahlst.	AS	sexuální reprodukce vzácná
<i>Biennia</i> R. Doll	?S	nejisté, jediný známý zástupce je pravděpodobně sexuální
<i>Borealia</i> Hand.-Mazz.	AS	sexuální reprodukce vzácná na severu, běžná ve Východní Asii
<i>Calanthodia</i> (Dahlst.) R. Doll	AS	sexuální reprodukce běžná v Severní Číně
<i>Coronata</i> HAND.-Mazz.	?AS	sexuální taxony známé, ale pravděpodobně vzácné
<i>Dioszegia</i> (Heuff.) Heuff.	S	všechny známé taxony se rozmnožují sexuálně
<i>Erythrocarpa</i> Hand.-Mazz.	AS	sexualita vzácná u taxonů v Jižní a Jihovýchodní Evropě
<i>Erythrosperma</i> (H. Lindb.) Dahlst.	AS	sexuální reprodukce většinou v Jihozápadní a Střední Evropě
<i>Glacialia</i> Hand.-Mazz.	S	jediný sexuální druh
<i>Kashmirana</i> Soest ex R. Doll	AS	sexuální reprodukce běžná v Západních Himalájích
<i>Macrocornuta</i> Soest	AS	sexuální reprodukce rozšířená ve Střední Asii
<i>Mongolica</i> (Dahlst.) R. Doll	AS	sexuální reprodukce běžná v Japonsku a Jihovýchodní Číně
<i>Oligantha</i> Soest	AS	sexuální taxony známé ve Východním Středomoří
<i>Orientalia</i> Hand.-Mazz.	AS	sexuální reprodukce známá na Kavkaze
<i>Palustria</i> (H. Lindb.) Dahlst.	AS	vzácná sexuální reprodukce v oblasti Západního Jadranu
<i>Parvula</i> Hand.-Mazz.	AS	sexuální reprodukce známá ve vysokých horách Asie
<i>Piesis</i> A.J. Richards ex Kirschner et Štěpánek	S	autogamní a allogamní diploidí a alogamní tetraploidí
<i>Primigenia</i> R. Doll	?S	jediný zástupce se sexuální reprodukcí
<i>Ruderalia</i> Kirschner, H. Ollg. et Štěpánek	AS	sexuální reprodukce většinou v Jihozápadní a Střední Evropě
<i>Scariosa</i> Hand.-Mazz.	AS	sexuální taxony roztroušené ve Středomoří
<i>Sonchidium</i> (DC.) Kirschner et Štěpánek	AS	sexuální reprodukce vzácně v Anatolii
<i>Tibetana</i> Soest	AS	sexuální reprodukce běžná v Tibetu a přilehlé Číně
<i>Wendelboea</i> (Soest) R. Doll	?S	jediný známý zástupce vyžaduje další studium

Od objevení až do dnešní doby bylo popsáno velké množství apomiktických druhů. Část badatelů dokonce popisovala nové druhy z jedné herbářové položky či jedné lokality. Objevené apomiktické linie byly sporné a neuznávané. Jakýkoli morfologický rozdíl však ještě není důvodem k popisu nového druhu (Vašut & Majeský 2015). Objektivní existenci nového apomiktického druhu potvrzuje v rozlehlých oblastech genetická stabilita způsobená obligátní apomixí (Majeský & al. 2012). U zkoumaného druhu pokládaného za nový dosud nepopsaný je nutné posoudit morfologickou stabilitu v potomstvu, geografickou distribuci, reprodukční způsob a genetickou variabilitu (Obr. 4) (Vašut & Majeský 2015).



Obrázek 4: Nově popsáný druh *Taraxacum pudicum*. Zdroj: Vašut & Majeský 2015.

3.1.4. Evoluce rodu

Složitá evoluce ztěžuje rekonstrukci fylogenetických vztahů v rodu *Taraxacum*. Komplikace při rekonstrukci fylogeneze jsou způsobené zejména 1) nízkou úrovní morfologické diferenciací, 2) převažující apomixí a hybridizací mezi apomikty a sexuály, 3) evolučně starou a komplexní hybriditou, a 4) častou polyploidii (Záveská-Drábková & al. 2009). Všechny doposud popsané polyploidní taxony jsou apomiktické kromě tří tetraploidních druhů sekce *Piesis* (Kirschner & al. 2014). Další obtíží je mnoho taxonomických jednotek, které je nutné vyřešit. U některých sekcí existuje také geografická partenogeneze, kdy sexuální populace jsou omezeny na místní horský či malý jižní geografický areál. Agamospermické deriváty se naopak nacházejí více na severu anebo podél pohoří (Štěpánek & al. 2011; Kirschner & al. 2014).

Hybridizace mezi tetraploidním apomiktickým a diploidním taxonem mohla být nejvíce častým způsobem vzniku hybridogenních skupin v rodu. Toto vysvětlení je však pouze hypotetické, protože je málo důkazů mezi apomiktickými skupinami, které dokumentují tento způsob vzniku apomiktických taxonů. Důvodem je předpokládaný zánik původních forem rodičovských taxonů či jejich geografická vzdálenost a izolovanost (Kirschner & Štěpánek 1996). Rod *Taraxacum* vznikl pravděpodobně v západních Himalájích v průběhu křídy, odkud se postupně šířil dál na východ a západ až nabyl dnešního areálu (Richards 1973). Předpokládá se, že předkové hybridogenních apomiktických skupin se stáhli do geograficky vzdálených oblastí anebo vyhynuly. Potomstvo, které bylo výsledkem vzdálené hybridizace se pak chovalo jako rodičovské pro vznik nových odvozených skupin (Kirschner & Štěpánek 1996).

Část apomiktických klonů pravděpodobně vznikla ve velice daleké minulosti, což lze odvodit podle věku a izolace biotopu, ve kterém žijí či z velikosti a povahy distribuce (Kirschner & Štěpánek 1994). Nynější rozšíření rodu *Taraxacum* souvisí s šířením apomixe pomocí hybridizace prostřednictvím migrace v průběhu ledových dob a zejména po posledním zalednění (Richards 1973). Střídání dob ledových a meziledových způsobilo rozsáhlou migraci, jež vedla k hybridizaci a následně rychlé speciaci (Richards 1973; Kirschner & Štěpánek 1994).

Molekulární výzkumy mají za cíl ve vztahu k systematice vylepšit znalost evoluce a klasifikace srovnáním fenetických stromů s fylogenetickými (Mes & al. 2002). Jaderné sekvence ITS1-5.8S-ITS2 oblasti rDNA (jaderná ribozomální DNA) jsou významným zdrojem fylogeneticky informativních dat u mnoha různých rostlinných skupin (např. Baldwin 1992, Buckler & Holtsford 1996, Rønsted & al. 2002). U polyploidních druhů rodu *Taraxacum* jsou úseky ITS1 a ITS2 výrazně polymorfnější než u sexuálních diploidních a sexuálních tetraploidních druhů, u nichž jsou sekvence téměř homogenizované (Kirschner & al. 2014). I v potomstvu dvou geneticky stejných jedinců dochází ke změně v sekvencích DNA (King & Schaal 1990). To způsobuje kumulace mutací v asexuální linii (Campbell & al. 1997). Hromadění mutací v závislosti na věku jednotlivých linií a zmražený polymorfismus rodičovských taxonů hybridogenních polyploidních apomiktů jsou dva důležité hlavní zdroje polymorfismu při hodnocení evoluce (Příloha 4) (Záveská-Drábková & al. 2009).

Při výzkumu fylogeneze rodu *Taraxacum* se využívá také chloroplastová DNA (cpDNA) jako uniparentální zdroj fylogenetické informace (Příloha 5). Nicméně cpDNA markery se ukázaly jako ne zcela vhodné pro rekonstrukci fylogeneze u rodu s mnohonásobnou hybridizační minulostí (Wittzell 1999; Kirschner & al. 2014). Fylogenetická informace z nekódující cpDNA je narušená homoplasickými indely (Mes & al. 2000). Pomocí některých chloroplastových markerů se podařilo odlišit skupinu „starých haplotypů“

charakteristických pro morfologicky primitivní taxony od „odvozených haplotypů“ charakteristických pro evolučně mladší hybridogenní taxony (Wittzell 1999; Kirschner & al. 2003). Používání cpDNA pro fylogenezi rodu je problematické kvůli opakovaným hybridizačním událostem v mnoha taxonech a nepřítomnosti údajů o přímých rodičích dnes existujících taxonů (Kirschner & al. 2014).

Vzájemné porovnání morfologických dat s informacemi z nrDNA a cpDNA ukazuje jenom velmi malou shodu (Kirschner & al. 2003). Důvody mohou být dva: 1) chybná supraspecifická taxonomie, neboť mnoho sekcí může být para- nebo polyfyletických a 2) výsledky nrDNA neodpovídají ani v jediném případě závěrům z cpDNA (Příloha 4 a 5). Neshoda mezi analýzami poukazuje na opakovanou hybridizaci v průběhu evoluce rodu (Kirschner & al. 2014). Fylogeneze rodu *Taraxacum* zůstává tak alespoň prozatím nedořešená.

3.2. Botanická charakteristika rodu *Rubus* L.

3.2.1. Název, popis, využití

Název *Rubus* je odvozen z barvy plodů a pochází z latinského slova *ruber* – červený (Koblížek 2006). Jedná se o vytrvalé byliny (Holub 1995), polokeře (Pokorný & Fér 1964), keře (Holub 1995) či liány (Brickell 1993) s většinou dvouletými prýty (Obr. 5) (Holub 1995). Kořeny jsou nejčastěji plazivé a občas tvoří kořenové výmladky. Byliny mají mnohdy nedřevnatící lodyhy a dlouhé pozemní prýty, prýty keřů jsou dřevnatící a v prvním roce obvykle bez květů (Holub 1995).



Obrázek 5: Habitus *Rubus laciniatus*.

Zdroj: http://www.zelen.cz/detail_galerie_rostlin/Rubus_laciniatus_ostruzinik_dripeny.

V průběhu druhého roku mají větve, které rostou z paždí loňských listů a jsou zakončené květenstvím. Dvouleté prýty na konci vegetační sezóny odumírají (Holub 1995). Stonky keřů jsou plazivé nebo až poléhavé, nízkoobloukovité nebo vysokoobloukovité, až vzpřímené, ve vrcholové části mnohdy zakořeňující, občas šplhavé, v prvním roce rozvětvené či jednoduché, oblé nebo hranaté, v rozdílné intenzitě chlupaté či lysé, obvykle ostnitě, s plochými nebo žlábkovanými nebo vyklenutými stranami, se stopkatými nebo přisedlými žlázkami a také nežláznaté. Ostny jsou rozdílné či jednoho typu, trichomového původu, často s přechody od robustních dřevnatých ostnů přes osténky, ostence ke stopkatým žlázkám (Holub 1995).

Listy jsou střídavé, jednoduché nebo složené. Jednoduché listy mají rozdílnou míru členění. Složené listy jsou lichozpeřené, trojčetné či znoženě nebo dlanitě pětičetné, opadavé nebo přezimující, řapíkaté. Palisty často nad bází řapíku nahoru vysunuté, nitkovité až vejčité, srostlé s bází řapíku nebo volné. Lístky (přinejmenším koncové) široce kopinaté až okrouhlé, řapíčkaté, na okraji pilovitě zubaté nebo dvakrát pilovitě nebo vroubkované (Holub 1995).

Květenství je koncové, latnaté, řídce chocholíkovité, hroznovité, vzácně květy jsou jednotlivé. Květy většinou pětičetné a vzácně šesti až osmičetné, oboupohlavné, málokdy jednopohlavné. Květ je bez kalíšku. Češule je s květním lůžkem vyhloubeným nebo plochým nebo nejčastěji vypouklým, s nezřetelným okrajovým prstencem, ploše diskovitá či krátce nálevkovitá. Kališní lístky jsou vytrvalé, k češuli přisedlé, trojúhelníkovité až zašpičatěle vejčité, někdy s koncovým přívěskem. Korunní lístky jsou nejčastěji bílé, růžové, červené (Holub 1995) nebo fialové (Větvíčka 2005), nasedající na okraj češule, úzce kopist'ovité až okrouhlé, obvykle opadavé, nezřetelně nebo zřetelně nehetnaté, 3 až 30 mm dlouhé (Příloha 6) (Holub 1995).

Tyčinky jsou ve více kruzích, přisedají na okraj češule, jsou kratší gynecia či jej převyšují, početné (většinou více než 20). Prašníky jsou introrzní a občas chlupaté (Holub

1995). Semeníky jsou volné, mnohdy plstnaté či chlupaté, většinou četné 20 až 50, občas 3 až 8, jednopouzdré. Obsahují dvě obrácená (anotropní) vajíčka, ale jen z jednoho se vyvíjí semeno (Blatný & al. 1971). Blizna je dvoulaločná či kyjovitá (Holub 1995). Za zralosti volné pestíky srůstají v souplodí peckoviček (Novák & Skalický 2012). Plody peckovičky jsou volně spojené v polokulovité, kulovité, vejcovité až válcovité souplodí (malina, ostružina). Peckovičky jsou černé, červené či žluté, vnitřní oplodí je svrasklé nebo hladké, jednosemenné, zpravidla šťavnaté (Příloha 7) (Holub 1995).

V rodu *Rubus* jsou mezi ostružiníky velké rozdíly v ekologii. Podrod *Rubus* má jistý synantropní charakter výskytu (Smejkal & al. 1995). Většina druhů obývá křoviny, lesní okraje, lesní světliny, paseky, prosvětlené lesy, průseky a lemy lesních cest (Holub 1995).

Rod *Rubus* zahrnuje rostliny dávající ovoce vhodné ke konzumaci v čerstvém či různě zpracovaném stavu. Z různých planých druhů se sklízí plody. Dobrá chuť plodů je u druhů jako *Rubus plicatus* Weihe & Nees, *Rubus sulcatus* Vest, *Rubus hirtus* auct. a *Rubus pedemontanus* Pinkw. Často pěstované ostružiníky pro plody jsou *Rubus allegheniensis* Porter, *Rubus armeniacus* Focke a američtí hybridy s neurčitou taxonomií. Z plodů se vyrábí marmelády, džemy, šťávy, želé, sirupy, ovocná (dezertní) vína, likéry a kompoty (Holub 1995). Mladé listy mají hodně vitamínu C, organických kyselin a tříslovin s až 10 % zastoupením gallotaninů. Listy se využívají jako čajovina samostatně či ve směsích pro komerční, léčivé, domácí a farmaceutické čaje. Pro toto využití se listy zpracovávají pomocí fermentace. Plody a listy užívá lidové léčitelství (Holub 1995). Jako okrasné rostliny se pěstují některé druhy, například *Rubus phoenicolasius* Maxim. a *Rubus laciniatus* (Weston) Willd. Ke krytí volných ploch slouží *Rubus moschus* Juz. a *Rubus xanthocarpus* Bureau & Franch. (Holub 1995). V 17. Století se v Evropě pěstovaly dřeviny dovezené ze Severní Ameriky, mezi něž patří *Rubus odoratus* L. (1635) (Větvička 2005).

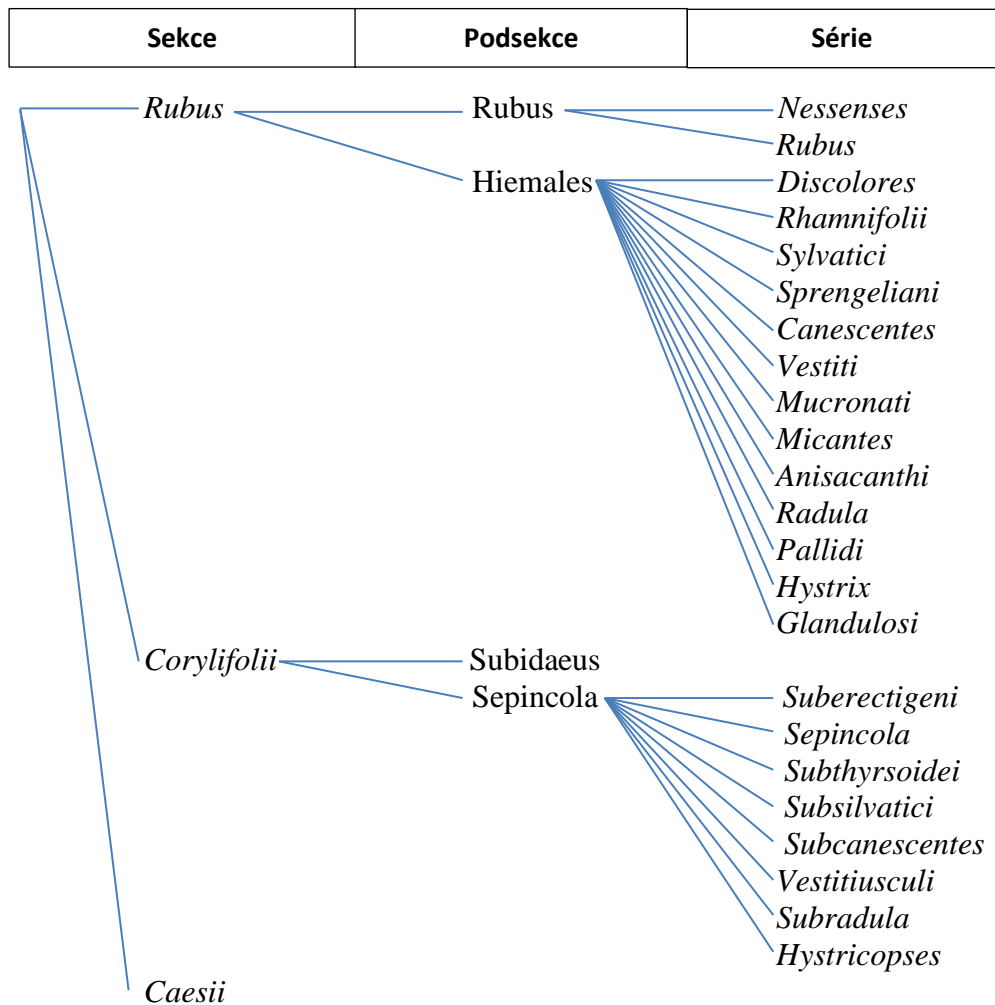
3.2.3. Taxonomie

Jen v Evropě je známo kolem 750 druhů, z nichž naprostá většina je apomiktická, a další stovky dosud popsaných druhů se vyskytují v jiných oblastech světa a způsob jejich reprodukce je většinou málo známý (Kurtto & al. 2010). Zástupci rodu se vyskytují po celém světě vyjma Antarktidy (Holub 1995). Nevyskytuje se v nejsevernějších zeměpisných šířkách (severně od 65-75° severní šířky), v nejvyšších horských polohách a ve velmi suchých polopouštních až pouštních oblastech. V subtropech a tropech zpravidla ostružiníky preferují chladnější stanoviště vyšších nadmořských výšek. Největší počet druhů se nachází v oblasti jihovýchodní Asie, jihovýchodních And, jihovýchodní přímořské části Severní Ameriky a subatlantické, především západní a severozápadní, části temperátního pásu Evropy. V Evropě se hlavně nachází apomiktické druhy (Trávníček & al. 2000a).

Hlavní systematické členění rodu je na 12 až 13 dobře vymezených podrodů. Rozdíly mezi podrody jsou hlavně ve znacích na vegetativních orgánech. Někdy jsou podrody pokládány za samostatné užší rody. Avšak vzájemné hybridizace mezi příslušníky některých podrodů svědčí proti takovému taxonomickému pojetí (Trávníček & al. 2000a). Klasifikace taxonů do intrasubgenerických skupin, a to do série, sekce a podsekce odráží velké morfologické rozdílnosti mezi jednotlivými skupinami v rámci podrodů (Holub 1997). Některé série obsahují taxony, jež ukazují společný biologický charakter. Například série *Glandulosi*, tato skupina má větší měrou vyvinuté sexuální rozmnožování než u dalších skupin ostružiníků (Holub 1995). Ostatní vnitrodruhové jednotky mají ve srovnání s podrody často taxonomicky menší homogenitu, zejména série. Taková klasifikace je více účelová než striktně vědecká (Holub 1995). V rodu *Rubus* je taxonomie postavená prakticky jedině na morfologických znacích (Příloha 8 a 9) (Krahulcová & al. 2013).

Podrod *Rubus* je klasifikovaný podle pravděpodobné vzájemné příbuznosti taxonů vyvozené z podobné morfologie. Podrod *Rubus* se v Evropě dělí na 3 sekce: *Rubus*, *Caesii* a *Corylifolii* (Schéma). Sekce *Rubus* a *Corylifolii* se ještě dále člení na další užší druhové skupiny. Sekce *Rubus* zahrnuje podsektce *Hiemales* a *Rubus*. *Hiemales* se potom člení na série (Trávníček & al. 2000), kdy některé z nich a zejména série *Micantes* jsou silně heterogenní. Umístění některých taxonů do heterogenní série může být sporné (Trávníček & al. 2000b).

Schéma: Taxonomické členění podrodu *Rubus*. Zdroj: Krahulcová & al. 2013.



V moderní taxonomii jsou uznávané tedy kromě striktně sexuálních druhů dobře stabilizované apomiktické druhy s regionálním či větším rozšířením, které jsou pokládány za samostatné druhy. Vlivem podobné morfologie nadzemních orgánů přítomné často i u jednotlivců a lokálních typů, je velikost areálu nejdůležitějším kritériem během rozhodování, jestli má být určitý taxon považován za druh (Holub 1995, Weber 1996). Podle velikosti areálu lze rozlišit tyto jednotky: 1) druh s rozsáhlým areálem, větší než 350 km, 2) regionální druh s areálem přinejmenším v jednom směru 20 až 350 km širokým, 3) lokální typ s rozšířením menším než 20 km, 4) singulární typ s bodovým rozšířením, individuální keře a jejich vegetativní klonální potomstvo. Jen taxony v kategorii 1 a 2 jsou v dnešní botanice pokládány za samostatné druhy (Weber 1996). Pro taxonomickou klasifikaci rodu *Rubus* je také důležitá znalost počtu chromozomů nebo přinejmenším ploidie (Trávníček & al. 2000b).

V Evropě se vyskytuje více než 750 druhů a pouze u 30 % z nich je známá ploidie (Krahulcová & al. 2013). U karyologicky zkoumaných druhů je 80 % tetraploidních ($2n = 28$) (Krahulcová & al. 2013). Evropské ostružiníky mají základní chromozomové číslo $x = 7$ (Thompson 1997, Kollmann & al. 2000). Úroveň ploidie je od diploidů po hexaploidy (Thompson 1997, Kollmann & al. 2000) až oktoploidy (Trávníček & al. 2000b). V méně než dvou procentech druhů se vyskytují také různé vzácné cytotypy (Příloha 11) (Krahulcová & al. 2013).

U endemického druhu *Rubus bohemiicola* Holub & Palek ex Holub byla pozorována translokace v chromozomové sadě, což se projevuje výskytem drobného chromozomového fragmentu a domnělou ztrátou jednoho chromozomu původně tetraploidní sady ($2n = 27$), z čehož vyplývá, že přestavby chromozomů mohly také mít vliv na evoluci rodu (Trávníček & al. 2000b).

3.2.4. Evoluce

Rod *Rubus* se vyformoval pravděpodobně ve třetihorách, a na počátku čtvrtohor byly už hlavní členové podrodů odlišeni. Během dob ledových a meziledových se utvořil velký počet lokálně omezených taxonů (Blatný & al. 1971). Celkem existuje 8 diploidních a obligátně sexuálních druhů v Evropě a okolí. V Makaronézii se vyskytuje *Rubus serrae* Soldano, *Rubus bollei* Focke, *Rubus palmensis* A. Hansen (Matzke-Hajek 2001) a v Zakavkazsku endemický *Rubus moschus* Juz. (Krahulcová & Holub 1997). V Evropě roste diploidní sexuální *Rubus incanescens* Bertol. (Matzke-Hajek 2001), *Rubus canescens* DC., *Rubus ulmifolius* Schott (Holub 1995) a *Rubus sanctus* Schreb. (Weber & al. 1996). Tyhle druhy už byly během posledního glaciálu dávno vyvinuté, ale v průběhu Pleistocénu a zejména Holocénu sloužili jako předci velkého počtu jiných biotypů vytvářejících převážnou část ostružiníkové flóry (Weber 1996). V subatlantické oblasti Evropy se vyskytují z nich odvozené a velice početné apomiktické druhy (Trávníček & al. 2000a). Obrovská morfologická diverzita apomiktů naznačuje, což bylo doloženo i molekulárními markery (Sochor & al. 2015), že na zrodu současné ostružiníkové květeny Evropy se musely podílet již vymřelé druhy (Holub 1995, Trávníček & al. 2000a). Nynější ostružiníky jsou produktem složitých křížení a zpětných křížení, která vedla ke vzniku polyploidních typů. Polyploidní apomikti si zachovávají různou míru sexuality, tzv. residuální sexualitu, která představuje významný potenciál pro hybridizaci s ostatními fakultativně apomiktickými či striktně sexuálními jedinci. Změny v krajině v postglaciálním období zvýšily hybridizační možnosti vlivem změny krajiny lidskou činností, která rozrušila rozlehlé souvislé lesní masivy, což umožnilo kontakt mezi odlišnými předtím rozdělenými taxony (Holub 1995). Na konci doby ledové se zvýšila teplota, což mohlo vyvolat u hybridních ostružiníků sexuální reprodukci. Nárůst apomixe způsobilo poslední geologické ochlazení (Stenberg & al. 2003). Obecně známá geografická

partenogeneze popisuje rozšíření apomiktických druhů oproti nadmořským výškám, vyšším zeměpisným šířkám a vyšší koncentraci v zaledněných oblastech (Kearney 2005). V chladnějších podmínkách převládá apomixie, kdy je možné obnovit sexuální reprodukci v teplejších podmínkách. Tato hypotéza je potvrzena experimenty v zahradě a i ve skleníku, kdy se obnovila sexualita za určitých podmínek. V odezvě na změny životního prostředí se tak může měnit úroveň variability a dynamika toku genů (Šarhanová & al. 2012).

V podrodu *Malachobatus* jsou zastoupeny jen relativně nejprimitivnější typy rostoucí jen výhradně v subtropích a tropech Asie. Dosud se udržely především v prosvětlenějších subtropických deštných lesích. Jsou to stálezelené keře opěrně rostoucí mající silně ostnité prýty, spíše malé květy v latnatých květenstvích, jednoduché listy. V Americe a v Evropě z nich vznikly keře s ostny, s dvouletými prýty a dlanitě uspořádanými listy, patřící do druhově největšího podrodu *Rubus*. Poté na konci doby ledové a po ní, v Evropě vznikl vysoký počet polyploidních apomiktických typů, jenž jsou odolnější i v méně příhodnějších klimatických podmínkách. Ve studenějších mimotropických oblastech se redukovaly ostny u jiných od původního evolučního základu odštěpených skupin. To je pozorovatelné u podrodu *Idaeobatus* a nejvíce u podrodu *Anoplobatus*. V reakci na extrémně studené klima se vytvořily bylinné formy u podrodu *Chamaemorus* a *Cylactis*, jenž jsou převážně bez ostnů. U rodu *Chamaemorus* složeného z jediného druhu (*Rubus chamaemorus* L. – ostružiník moruška) se redukovalo květenství na jen jeden vrcholový květ (Trávníček & al. 2000a).

V podrodu *Rubus* se pořád odehrává proces vzniku nových genotypů. Vytváří je hybridizace a následující rozpad dceřiných generací na různé morfotypy, jenž mohou být následně apomixí stabilizovány. Konkurenčně silní a přizpůsobiví jedinci si můžou ponechat své morfologické rysy a osídlit nový prostor (Holub 1995). Některé biotypy jsou omezené pouze na jeden nebo několik geneticky identických keřů v jedné lokální oblasti. Z velké části se jedná o nedávno stabilizované rostliny, jež mohou směřovat k získání větší distribuce.

Všichni apomiktiční zástupci rodu *Rubus* asi vznikli tímto způsobem (Weber 1996). Vývoj nových taxonů probíhá přes jedince (singulární biotypy), lokální populace, populace se širším rozšířením a vznik vlastního areálu, kde jsou vitální typy již zastoupené mnoha jedinci (Holub 1995). Naprostá většina těchto singulárních typů nicméně nepřesáhne tento první stupeň zrodu nových taxonů. Důvodem je, že individua jsou nedostačujícím způsobem vybavené čelit konkurenci (Holub 1995). Velikost území souvisí mimo jiné s evolučním stářím či biologickou vitalitou. Ve fylogeneticky mladém a částečně i dosti synantropním podrodu *Rubus* prakticky nejsou reliktní typy, které mají druhotně redukovaný areál (Trávníček & al. 2000a).

V několika dalších podrodech rodu *Rubus* (zejména *Malachobatus*, *Idaeobatus*, *Chamaemorus* a *Cylactis*) se vyskytuje apomixie, což ukazuje, že genetická predispozice k apomixi může být mnohem starší než podrod *Rubus*. Tento způsob reprodukce je přítomen kromě evropských ostružiníků i u kavkazských, (Sochor & al. 2015) a ve východní části Severní Ameriky (Einset 1951, Pratt & Einset 1955). Tyto neevropské ostružiníky mohou být aktivní součástí paralelního vývoje podrodu *Rubus*, jenž nastal vlivem genového toku mezi pěstovanými, původními či invazními druhy (Clark & Jasieniuk 2012).

Odhalení klíčových dějů produkujících velkou druhovou rozmanitost a objevení evoluční minulosti v podrodu *Rubus* je možné prostřednictvím ITS a cpDNA molekulárních markerů (Příloha 10) (Sochor & al. 2015). U obou markerů se podařilo objevit pouze šest rodových diploidů z nichž dva jsou již vymřelí, jenž spějí ke všem evropským polyploidním zástupcům (Sochor & al. 2015).

3.3. Reprodukce rostlin

3.3.1. Pohlavní rozmnožování

V rodu *Taraxacum* se diploidní taxony rozmnožují výhradně sexuálně (Richards 1973). Doposud známou výjimku představují tři taxony sekce *Piesis* jenž jsou tetraploidní a rozmnožují se sexuálně (Mogie & Ford 1988; Kirschner & Štěpánek 1988). Všechny sexuální taxony jsou oboupohlavné (Richards 1973). Většina sexuálních taxonů je cizosprašných (Mogie & Ford 1988) a jenom několik druhů je schopných autogamie (Kirschner & Štěpánek 1996, 1988).

V rodu *Rubus* se diploidi rozmnožují sexuálně. Zatímco sexualita u polyploidních taxonů je velmi proměnná (Šarhanová & al. 2012), vlivem působení fakultativní apomixie (Holub 1995). Květy jsou oboupohlavné a méně často jednopohlavné (Holub 1995). Téměř všechny druhy jsou cizosprašné, ale existují i samosprašné (Nybom 1986).

Při pohlavním rozmnožování dochází ke splývání (asimilaci) dvou pohlavních buněk (gamet), tzv. syngamie, za zrodu zygoty. Gamety vznikají mitotickým dělením. Děj, kdy splývají gamety, se nazývá oplození a dochází u něj ke splývání jader a cytoplazmy obou gamet. Jádro zygoty má na rozdíl od jader gamet dvojnásobný počet chromozomů (diploidní počet - $2n$), protože chromozomy se nespojují. První buňkou sporofytu je oplozená zygota. Spermatické buňky se vytvářejí nejčastěji v pylové láčce, jež vzniká při vyklíčení pylového zrna po jeho dopadu na bliznu (Novák & Skalický 2012).

Výhodou pohlavního rozmnožování je pomocí selekce účinné odstraňování škodlivých a šíření prospěšných mutací u většího množství jedinců. Pohlavní rozmnožování dokáže urychlit evoluční vývoj. Vznikají nové unikátní genotypy, které se lépe přizpůsobují novým podmínkám různých stanovišť (Balážová & al. 2016). Pohlavní rozmnožování má i své

nevýhody. Rostlina musí vydávat energii do rozmnožování a vytvoří méně potomků než při apomixi. Tím je dvakrát pomalejší rychlost populačního růstu. Pohlavní rozmnožování vede k zániku spolehlivých kombinací genů. Určité alely mají své výhody pouze v kombinaci s jistými formami jiných genů, ale při výskytu dalších alel jsou nevýhodné (Balážová & al. 2016).

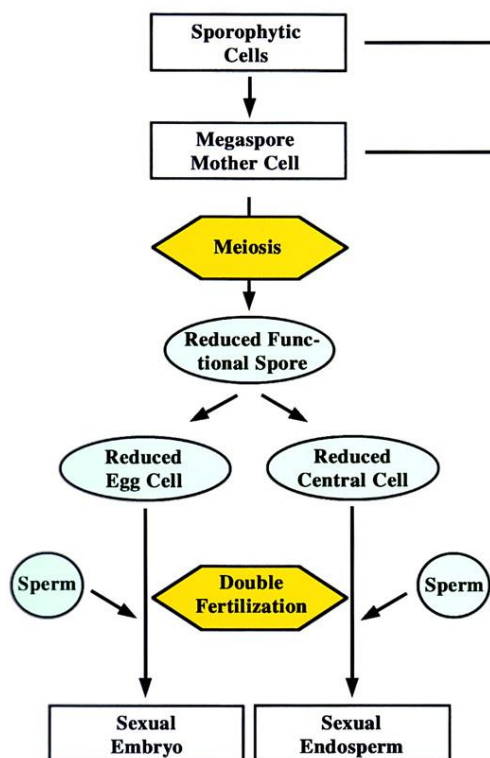
3.3.2. Apomixe

Apomixe je typ nepohlavního rozmnožování, při kterém nedochází ke splývání gamet, přičemž jsou zachované anatomické i morfologické rysy pohlavního rozmnožování (Novák & Skalický 2012). Dochází ke klonální reprodukci pomocí semen (Asker & Jerling 1992). Při apomixi neprobíhá meióza a vývoj je směřován pouze na diplofázi. Existuje mnoho typů apomixe, ale základní rozdělení je podle typu pletiva z jakého pochází buňky, ze kterých se vyvíjí zárodečný vak: 1) gametofytická apomixe – zárodečný vak se vyvíjí přímo z buněk megagametofytu, 2) adventivní embryonie – zárodečný vak se vyvíjí z buněk nucelu nebo obalů vajíčka mimo buněk megagametofytu (Asker & Jerling 1992). Adventivní embryonie je častá u tropických rostlin, např. v rodech jako *Citrus* L., *Mangifera* L. nebo *Eugenia* L. Gametofytická apomixe se dále dělí na aposporii, kdy embryo vzniká ze somatických buněk mimo mateřskou buňku zárodečného vaku a diplosporii, kdy embryo vzniká přímo z neredukované megaspory (Asker & Jerling 1992, Koltunow 1993).

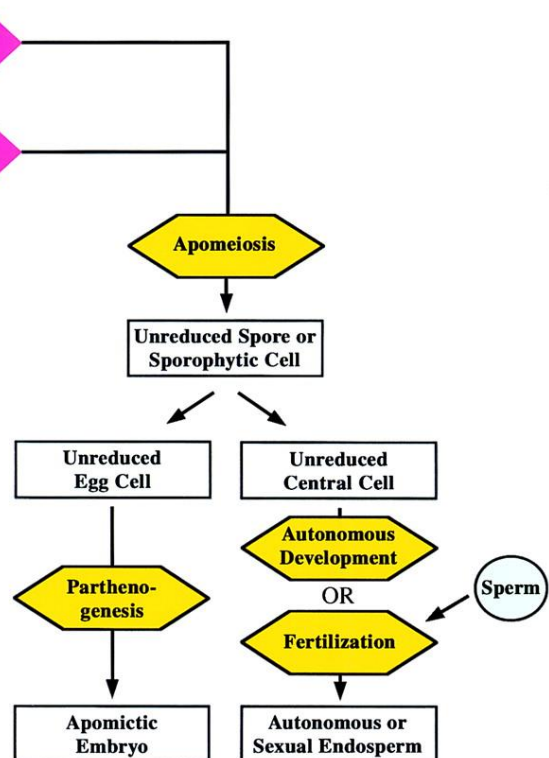
U rodu *Taraxacum* se polyploidní taxony vyznačují obligátní apomixí, která se vyvíjí jako diplosporie (Richards 1973). Z mateřské buňky megaspory vzniká zárodečný vak, ale neprobíhá úplná meióza, není zde redukční dělení a počet chromozomů není redukovaný. Bez účasti samčího gametofytu se vytváří embryo z vaječné buňky partenogeneticky (Batoušek & al. 2010). Endosperm se vyvíjí autonomně bez oplození centrálního jádra druhou spermatickou buňkou (Nogler 1984).

U rodu *Rubus* je apomixe odlišného typu, je fakultativní a probíhá jako pseudogamická aposporie, kdy semena se tvoří partenogeneticky, avšak k tomu je důležitá indukce opylením centrální buňky zárodečného vaku (Holub 1995). Opylení je nezbytné pro vývoj životaschopného semene (Obr. 6). Tento typ apomixe se nazývá pseudogamie (Nybom 1986).

Sexual Reproduction





Gametophytic Apomixis



Obrázek 6: Schéma sexuální a apomiktické reprodukce. Obdélník – neredukovaný stav, hexagon – důležité děje, elipsa – redukovaný stav. Zdroj: Grossniklaus & al. 2001.

3.3.3. Srovnání studovaných skupin a jejich specifika

	rod <i>Taraxacum</i>	rod <i>Rubus</i>
	 (http://www.aphotoflora.com)	 (http://www.zahrada-centrum.cz)
počet sexuálních druhů	asi 60 (Batoušek & al. 2010)	300 až 400 (Holub 1995)
počet apomiktických druhů	více než 2500 (Batoušek & al. 2010)	700 až 800 (Holub 1995)
typ apomixe	autonomní diplosporie (Batoušek & al. 2010)	pseudogamická aposporie (Holub 1995)
schopnost plasticky měnit způsob reprodukce v reakci na okolní podmínky	XXX	známa, např. <i>Rubus bifrons</i> (Šarhanová & al. 2012)
striktní sexuální reprodukce – úroveň ploidie	diploidi a ojediněle tetraploidi (Majeský & al. 2012)	diploidi, tetraploidi, hexaploidi, oktoploidi (Matzke-Hajek 2001)
apomiktická reprodukce – úroveň ploidie	polyploidi (Richards 1973)	polyploidi (Holub 1995)
nejčastější úroveň ploidie	triploidi a tetraploidi (Batoušek & al. 2010)	tetraploidi (Krahulcová & al. 2013)

maximální úroveň ploidie	dodekaploidi (Kirschner & al. 2003)	oktoploidi (Trávníček & al. 2000b)
možnosti křížení	sexuál x sexuál sexuál x apomikt (Richards 1970)	sexuál x sexuál sexuál x apomikt apomikt x apomikt (Holub 1995)
rozsah apomixe	90 % druhů má obligátní apomixi (Richards 1970), vyskytuje se i fakultativní apomixe (Kirschner & Štěpánek 1994)	u většiny převládá fakultativní apomixe (Holub 1995), ojediněle např. u triploidů je apomixe obligátní (Šarhanová & al. 2012)
geografická partenogeneze	ano (Štěpánek & al. 2011)	ano (Kearney 2005)
šíření semen	větrem (Mogie & Ford 1988)	prostřednictvím různých živočichů (Holub 1995)

3.4. Průtoková cytometrie

3.4.1. Popis základních principů metody

Průtoková cytometrie je novou metodou, která našla uplatnění v základním i aplikovaném výzkumu velkého počtu biologických oborů (Obr. 7). Rozsah aplikací je velký a zahrnuje určení ploidie, stanovení obsahu jaderné DNA, analýzu buněčného cyklu, studium genové exprese, atd. (Suda 2005). Jednou z aplikací průtokové cytometrie je určení způsobu rozmnožování podle ploidie endospermu a embrya u zralých semen (Suda 2005).



Obrázek 7: Průtokový cytometr. Zdroj: <http://ucflow.blogspot.cz/>.

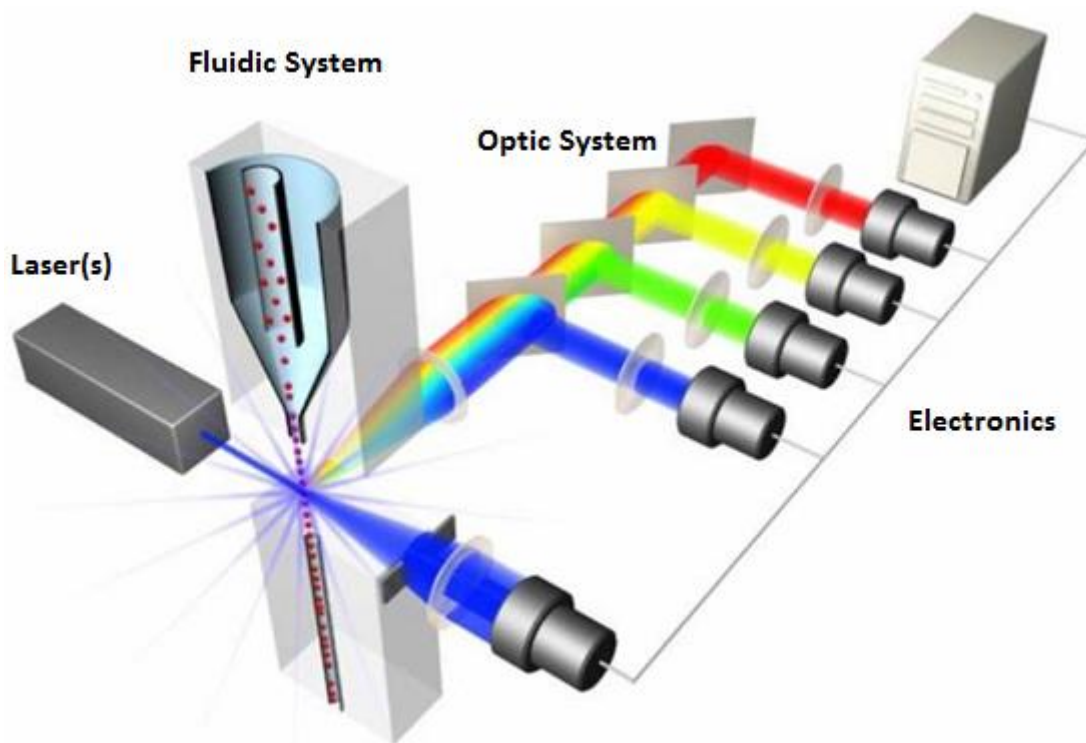
Příprava vzorku pro průtokovou cytometrii trvá pouze pár minut a nepotřebuje drahá reakční činidla. Analýza netrvá dlouho a reprezentativní počet jader lze měřit v krátkém čase. Vzorky se připraví pouze z několika desítek miligramů rostlinných tkání (Doležel & al. 2007). Při odhadu ploidie je výhodné, že tkáně, které obsahují dělicí se buňky, nejsou zapotřebí

(Suda 2005). Před vlastním měřením se musí navázat fluorescenční barvivo (fluorochrom) na DNA studovaného objektu (Suda 2005). Vybraná látka se musí vázat specificky, aby nebarvila další orgány a kvantitativně, aby množství navázaného fluorochromu bylo přímo úměrné množství DNA. Při ozáření fluorescenčního barviva světlem vhodné vlnové délky, dojde k jeho excitaci, elektrony přejdou na vyšší energetickou hladinu. Elektrony se ihned dostávají do původního, základního stavu, protože excitovaný stav není stabilní. Tento děj doprovází uvolnění světelné (= fluorescence) a tepelné energie. Vlivem ztráty tepelné energie má vyzářené světlo delší vlnovou délku než původní excitační záření. Dobře nastavenou kombinací filtrů lze poté obě záření oddělit a průtokový cytometr může měřit fluorescenci (Suda 2005).

Základními částmi každého průtokového cytometru jsou optická soustava, zdroj excitačního světla, průtoková komůrka, soubor fotonásobičů a zesilovačů a část počítačová (Obr. 8). Suspenze částic se přivádí pomocí tenké kapiláry do komůrky o relativně velkém průměru, kterou teče unášecí kapalina (voda nebo slabý roztok solí), která proudí do komůrky pod větším tlakem než vlastní suspenze částic, které se vyskytují pouze v centrální části proudu. Zrychlení vyskytující se při výstupu vodního paprsku z komůrky způsobuje, že částice se pohybují jedna za druhou a jejich proud jde ve vysoké rychlosti ohniskem zdroje excitačního záření (Suda 2005). Proud se pohybuje rychlostí 1 až 10 m/s, což umožňuje analyzovat několik desítek či stovek částic za sekundu (Suda 2004). Zdrojem excitačního světla jsou vysokotlaké rtuťové výbojky a lasery, kdy přístroj může mít oba dva zdroje zároveň (Suda 2005). Optickou soustavu tvoří sada filtrů a zrcadel, které zachycují fluorescenci částic vyslanou po jejich průchodu světelným paprskem. Fotonásobiče přeměňují fluorescenci na pulsy elektrického proudu. Po zvětšení signálu a následném zpracování dochází k jeho digitalizaci a uložení do počítače v podobě histogramu, který ukazuje relativní intenzitu fluorescence jednotlivých měřených částic (Suda 2005).

Při určení ploidie nebo odhadu absolutního množství DNA je nutné využívat standard, což je materiál se zjištěnou velikostí genomu nebo počtem chromozómů (Suda 2005). Dnes se používá interní standardizace (Suda 2005). Vzorek a standard se smíchá, homogenizuje, poté jsou obarveny a změřeny zároveň (Suda 2005).

Průtoková cytometrie má také svá omezení. Je nutné mít čerstvou tkáň, což omezuje dobu transportu vzorků z pole do laboratoře a/nebo jejich uskladnění před analýzou (Doležel & Bartoš 2005). Vadnutí rostlin vede k horší kvalitě získaných histogramů (Suda 2005). V cytosolu buněk se nachází látky, které způsobují narušení barvení DNA a jejich vliv není přesně známý (Doležel & Bartoš 2005). Negativně bývá ovlivněna vazba fluorescenčního barviva na dvoušroubovici DNA sekundárními metabolity některých rostlin (Suda 2005). Může dojít k poklesu pH jaderné suspenze. Slizovité látky v listech vyvolávají tvorbu viskózní směsi, která znemožní filtraci jader přes póry a dochází k tvorbě jaderných shluků (Suda 2005).



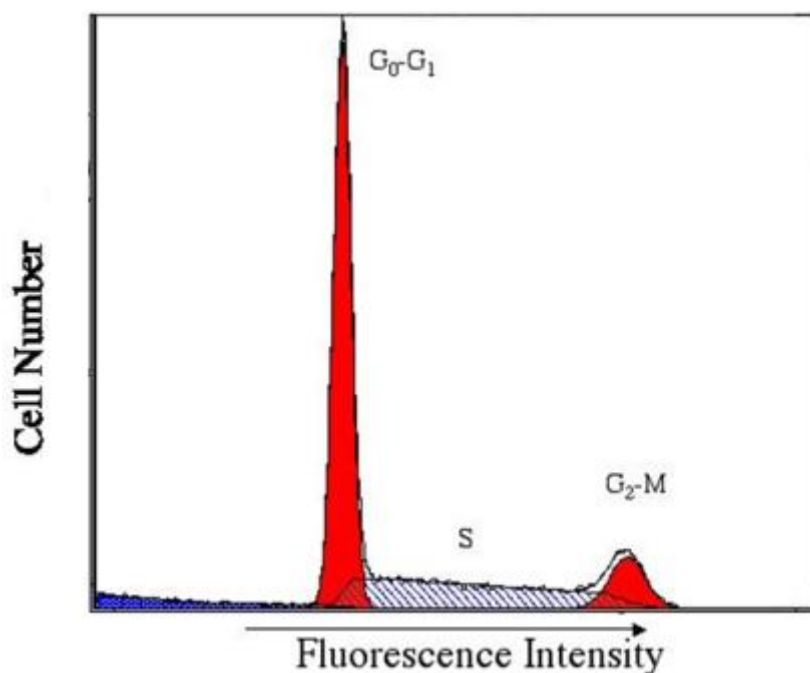
Obrázek 8: Základní komponenty průtokového cytometru.

Zdroj: <https://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>.

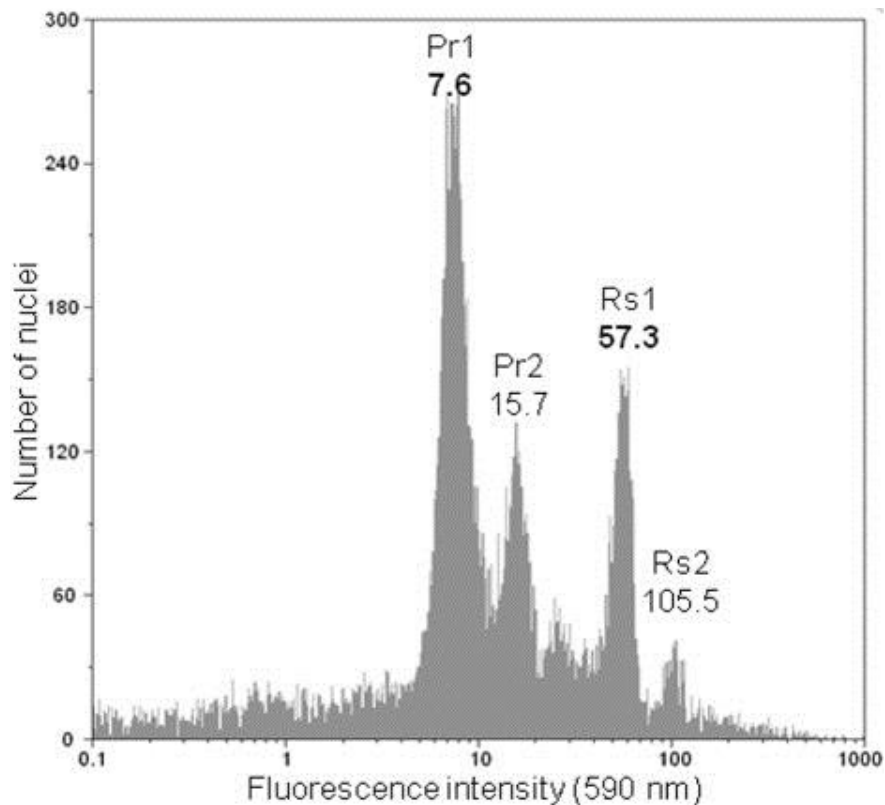
3.4.2. Stanovení velikosti genomu

Výsledkem měření v průtokové cytometrii je histogram, který zobrazuje výrazný pík zobrazující relativní fluorescenci jader patřící buňkám v G1 fázi a ve dvojnásobné vzdálenosti leží menší pík patřící buňkám v G2 fázi (viz Obr. 9). Osa X charakterizující intenzitu fluorescence je relativní, a pozici píku je možné upravit pomocí přístroje. Mezi G1 a G2 píky jsou buňky v rozdílných stupních syntézy DNA. Na levém okraji histogramu se nacházejí rušivé signály nízké fluorescence, které patří poškozeným nebo malým částicím jakými jsou například molekuly chlorofylu (Suda 2005).

Standard užívaný pro stanovení velikosti genomu by měl mít velikost genomu o něco málo větší nebo menší než neznámý měřený vzorek. V obou případech mají jádra standardu a vzorku na histogramech obsahu DNA dva velké píky. Z poměru jejich pozice lze stanovit velikost genomu neznámého vzorku (Obr. 10) (Doležel & al. 2007).



Obrázek 9: Histogram. Zdroj: <https://www.intechopen.com/books/liver-biopsy/the-use-of-flow-cytometric-dna-ploidy-analysis-of-liver-biopsies-in-liver-cirrhosis-and-hepatocellul>.



Obrázek 10: Histogram zobrazuje *Phytophthora ramorum* s G1 (Pr1) a G2 (Pr2) píky, *Raphanus sativus* „Saxa“ s G1 (Rs1) a G2 (Rs2) píky. Zdroj: D’Hondt & al. 2011.

Podle průměrné hodnoty G1 píku lze zjistit absolutní množství DNA (Doležel & al. 2005):

$$\text{Obsah } 2C \text{ DNA vzorku} = \left[\frac{\text{průměr G1 píku vzorku}}{\text{průměr G1 píku standardu}} \right] \times \text{obsah } 2C \text{ DNA standard (pg DNA)}$$

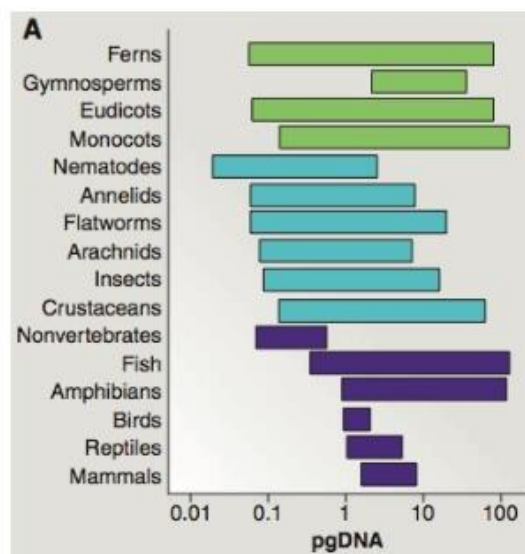
Pomocí vzorce lze vypočítat velikost genomu, tedy počet párů nukleotidů se přepočítá na pikogramy DNA. Při výpočtu obsahu jaderné DNA se přepočítají pikogramy DNA na počet párů nukleotidů, přičemž platí následující vztahy:

$$\text{velikost genomu (bp)} = (0,978 \times 10^9) \times \text{obsah DNA (pg)}$$

$$\text{obsah DNA (pg)} = \text{velikost genomu (bp)} / (0,978 \times 10^9)$$

Přepočítání vychází z průměrné hmotnosti jedné dvojice nukleotidů, která je $1,023 \times 10^{-9}$ pg a 1 pg DNA se pak rovná $0,978 \times 10^9$ párům bází (Doležel & al. 2003).

Stanovení velikosti genomu má základní podmínky, které je třeba dodržovat, aby získaná data byla maximálně přesná. Je nutné mít nízký poměr mezi 2C hodnotami zkoumaných rostlin a interní standard zmenšující potenciální nelinearity měření. Jako standard by se neměli používat takové rostliny, kdy si jsou píky zkoumaných rostlin a standardu blízké nebo překrývající se. Akceptovat pouze analýzy mající píky přibližně ve stejné výšce z důvodu odstranění zkreslení v důsledku různého počtu částic. Je nutné měřit minimálně 5000 částic. Používat identický standard pro všechny taxony určitého rodu nebo analyzovaných skupin pro zjednodušení srovnávací studie. Provést měření množství jaderné DNA přinejmenším třikrát v rozdílné dny, u téhož objektu na stejném přístroji a se stejným standardem (Suda 2004). Cévnaté rostliny mají velkou variabilitu obsahu DNA, která je v rozmezí od 0,1 pg pro některé zástupce Brassicaceae do 125 pg pro *Fritallaria* z čeledi Liliaceae (viz Obr. 11) (Suda 2005).

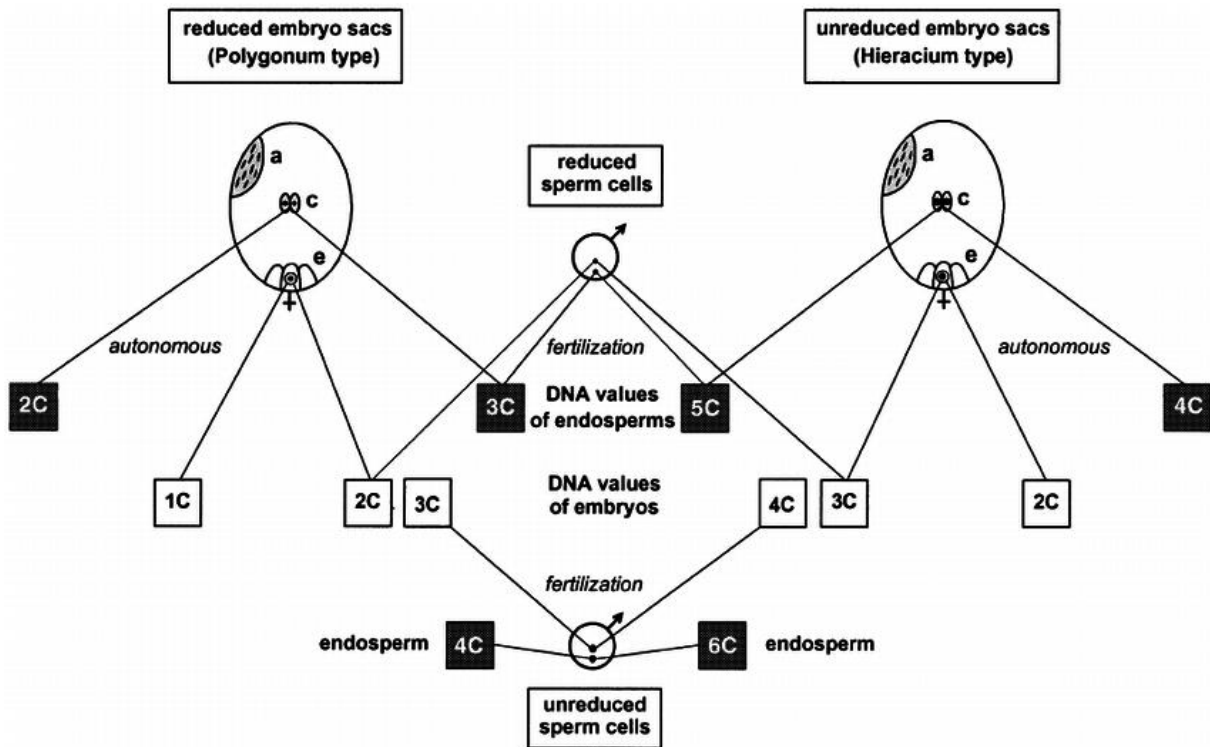


Obrázek 11: Velikost genomu různých organismů.

Zdroj: <https://www.slideshare.net/jrossibarra/jgi-genome-size-impacts-on-plant-adaptation>.

3.4.3. Popis stanovení reprodukčního způsobu

Určení způsobu rozmnožování podle ploidie endospermu a embrya u zralých semen je možné pomocí průtokové cytometrie (Obr.12) (Suda 2005). Při sexuálním rozmnožování dochází ke vzniku gamet s polovičním počtem chromozomů a poté k dvojitému oplodnění pro vznik embrya a endospermu (Matzk 2007). Při dvojitém oplození jedna spermatická buňka splývá s vaječnou buňkou a druhá spermatická buňka s centrálním jádrem zárodečného vaku (Matzk 2007).



Obr. 12: C-hodnoty nereplikovaných jader embrya a endospermu podle toho, jestli byly samčí a/nebo samičí gamety neredukované nebo redukovány a jestli endosperm a/nebo embryo vznikly po oplodnění nebo autonomně. 2C – diploidní, 3C – triploidní, 4C – tetraploidní, 5C – pentaploidní, 6C – hexaploidní, a – antipody, c – centrální buňka se dvěma polárními jádry, e – vaječný aparát s vaječnou buňkou a dvěma synergidami. Zdroj: Matzk & al. 2000.

Z vajíčka vzniká diploidní zygota a z centrální buňky se vyvíjí endosperm (Matzk 2007). Ve většině případů je možné pomocí průtokové cytometrie rozeznat píky patřící embryu a endospermu na histogramu. Embryo má mnohem větší počet jader než endosperm. To se projevuje jako vysoký pík pro embryo a velmi malé píky pro endosperm (Matzk 2007).

Mimo pohlavního rozmnožování může potomstvo vznikat samovolně bez podílu samčího gametofytu tzv. apomikticky (Suda 2005). Při apomixi nesplývají samičí a samčí gamety. Vaječná buňka vytváří samovolně embryo (partenogeneze). Endosperm vzniká z centrálního jadra autonomně bez oplození anebo dochází k oplození centrálního jadra (pseudogamie) (Matzk & al. 2000). Zárodečné vaky mohou tedy být redukované nebo neredukované. Centrální buňky a/nebo vajíčka mohou být oplodněné redukovanými či neredukovanými samčími gametami. Tyto faktory vedou k různým ploidním úrovním v jádrech semených buněk a na základě poměru mezi píky embrya a endospermu lze určit způsob reprodukce. Na histogramu získaném analyzováním sexuálně vzniklého potomstva je poměr embryo:endosperm = 2:3. V případě analyzování potomstva vzniklého apomikticky s autonomním vývinem endospermu, je poměr embryo:endosperm = 1:2 (Matzk 2007).

4. Závěr

Tato bakalářské práce obsahuje informace o názvu, popisu, využití, taxonomii a evoluci rodů *Taraxacum* a *Rubus*. Práce se zabývá u obou rodů pohlavním rozmnožováním a apomixí. Je zde popsán princip fungování průtokové cytometrie a její využití pro určení velikosti genomu a reprodukčního způsobu.

Cílem práce bylo připravit literární přehled k diplomové práci, která se bude zabývat stanovením velikosti genomu a reprodukčního způsobu vybraných taxonů z rodů *Taraxacum* a *Rubus*. Průtoková cytometrie je metoda, jež umožňuje relativně rychle a správně určit velikost genomu a reprodukční způsob u rostlin. Rody *Taraxacum* a *Rubus* patří mezi nejsložitější skupiny rostlin vlivem působení (fakultativní) apomixe, která způsobila uvnitř rodů vzájemné křížení a existenci velkého počtu druhů, jež se od sebe liší malými morfologickými rozdíly. Zástupce obou rodů lze obtížně determinovat a je nelehké u nich odhalit evoluční vývoj.

5. Literatura

ASKER, S. E. & JERLING L. (1992) *Apomixis in plants*. Boca Raton: CRC Press.

BALÁŽOVÁ A., KOLÁŘ F., FÍLA J., MIKÁT M. & BALÁŽ V. (2016) *Rozmnožování z pohledu evoluce: námluvy, sňatky a podvody v říši živočichů a rostlin*. 187s, Praha: Academia.

BALDWIN B. G. (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1: 3-16.

BATOUŠEK P. (2010) *Květena České republiky 8*. Hlavní editorka ŠTĚPÁNKOVÁ J., 706 s., Praha: Academia.

BLATTNÝ C. (1971) *Rybízky, angrešty, maliníky a ostružiníky*. 576 s., Praha: Academia.

BRICKELL Ch. (1993) *Velká encyklopedie květin a okrasných rostlin*. 697 s., Bratislava: Příroda.

BUCKLER, E. S. & HOLTSFORD T. P. (1996) *Zea* systematics: ribosomal ITS evidence. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 612-622.

CAMPBELL Ch. S., WOJCIECHOWSKI M. F., BALDWIN B. G., ALICE L. A. & DONOGHUES M. J. (1997) Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Molecular Biology and Evolution*. 14: 81-90.

CLARK, L. V. & JASIENIUK M. (2012) Spontaneous hybrids between native and exotic *Rubus* in the Western United States produce offspring both by apomixis and by sexual recombination. *Heredity*, 109: 320-328.

ČERNÝ T. (2012) Pampeliška kok-saghyz - alternativa ke kaučukovníku. *Živa*. 60: 279-284.

ČIHAŘ J. (2012) *Příroda v České a Slovenské republice*. 429 s., Praha: Academia.

DOLEŽEL, J., BARTOŠ J., VOGLMAYR H. & GREILHUBER J. (2003) Letter to the Editor: Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry*, 51A: 127-128.

DOLEŽEL J. & BARTOŠ J. (2005) Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, 95: 99-110.

- DOLEŽEL J., GREILHUBER J. & SUDA J. (2007) Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2: 2233-2244.
- EINSET J. (1951) Apomixis in American polyploid blackberries. *American Journal of Botany*, 38: 768-772.
- ERDELSKÁ O., ERDELSKÝ K., KVAČALA M. & DUGAS D. (2008) *Atlas léčivých rostlin*. 215 s., Bratislava: Příroda.
- HOLUB J. (1995) *Rubus L. - ostružiník (maliník, moruška, ostružinec, ostružiniček)*. Květena České republiky 4, s. 54-63. Editor SLAVÍK B., Praha: Academia.
- HOLUB J. (1997) Some considerations and thoughts on the pragmatic classification of apomictic *Rubus* taxa. *Osnabrücker Naturwissenschaftliche Mitteilungen Band*, 23: 147-155.
- KEARNEY M. (2005) Hybridization, glaciation and geographical parthenogenesis. *Trends in Ecology*, 20: 495-502.
- KING L. M. & SCHAAL B. (1990) Genotypic variation within asexual lineages of *Taraxacum officinale*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 998-1002.
- KIRSCHNER J. & ŠTĚPÁNEK J. (1994) Clonality as a part of the evolution process in *Taraxacum*. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, 29: 265-275.
- KIRSCHNER J. & ŠTĚPÁNEK J. (1996) Modes of speciation and evolution of the sections in *Taraxacum*. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, 31: 415-426.
- KIRSCHNER, J. & ŠTĚPÁNEK J. (1998) A revision of *Taraxacum* sect. *Piesis* (Compositae). *Folia Geobotanica*, 33:, 391-414.
- KIRSCHNER, J., ŠTĚPÁNEK J., MES T. H. M., den NIJS J. C. M., OOSTERVELD P., ŠTORCHOVÁ H. & KUPERUS P. (2003) Principal features of the cpDNA evolution in *Taraxacum* (Asteraceae, Lactuceae): a conflict with taxonomy. *Plant Systematics and Evolution*, 239: 231-255.
- KIRSCHNER J., ZÁVESKÁ-DRÁBKOVÁ L., ŠTĚPÁNEK J. & UHLEMANN I. (2014) Towards a better understanding of the *Taraxacum* evolution (Compositae–Cichorieae) on the basis of nrDNA of sexually reproducing species. *Plant Systematics and Evolution*, 301: 1135-1156.

KOBLÍŽEK J. (2006) *Jehličnaté a listnaté dřeviny našich zahrad a parků*. 2., rozš. vyd., 178 s., Tišnov: Sursum.

KOLLMANN J., STEINGER T. & ROY B. A. (2000) Evidence of sexuality in European *Rubus* (Rosaceae) species based on AFLP and allozyme analysis. *American Journal of Botany*, 87: 1592-1598.

KOLTUNOW A. M. (1993) Apomixis: Embryo sacs and embryos formed without meiosis or fertilization in ovules. *Plant Cell*, 5: 1425-1437.

KRAHULCOVÁ A. & HOLUB J. (1997) Chromosome number variation in the genus *Rubus* in the Czech Republic. I. *Preslia*, 68: 241-255.

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.

KREMER B. P. (2004) *Léčivé rostliny: spolehlivé určování podle fotografií a popisů*. 222 s., Praha: Beta-Dobrovský.

KURTTO A., WEBER H. E., LAMPINEN R. & SENNIKOV A. N. (2010) *Atlas florae Europaeae: Distribution of vascular plants in Europe, vol. 15: Rosaceae (Rubus)*. Helsinki: Committee for Mapping the Flora of Europe and Societas Biologica Fennica Vanamo.

MAJESKÝ, L., VAŠUT R. J., KITNER M. & TRÁVNÍČEK B. (2012) The pattern of genetic variability in apomictic clones of *Taraxacum officinale* indicates the alternation of asexual and sexual histories of apomicts. *PLOS ONE*, 7: 1-14.

MATZK F., MEISTER A. & SCHUBERT I. (2000) An efficient screen for reproductive pathways using mature seeds of monocots and dicots. *The Plant Journal*, 21: 97-108.

MATZKE-HAJEK G. (2001) A revision of Macaronesian *Rubus* taxa (Rosaceae). *Edinburgh Journal of Botany*, 58: 371-382.

MATZK F. (2007) *Reproduction Mode Screening. Flow Cytometry with Plant Cells: analysis of genes, chromosomes and genomes*. Pp. 131-146, editors DOLEŽEL J., GREILHUBER J., SUDA J., Weinheim: Wiley.

MES T. H. M., KUPERUS P., KIRSCHNER J., ŠTĚPÁNEK J., ŠTORCHOVÁ H., OOSTERVELD P. & den NIJS J. C. M. (2002) Detection of genetically divergent clone mates in apomictic dandelions. *Molecular Ecology*, 11: 253-265.

MOGIE M. & FORD H. (1988) Sexual and asexual *Taraxacum* species. *Biological journal of the Linnean Society*, 35: 155-168.

NOGLER G. A. (1984) *Gametophytic apomixis. Embryology of angiosperms*. Pp. 475-518, New York: Springer.

NOVÁK J. & SKALICKÝ M. (2012) *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. 3. vyd., 336 s., Praha: Powerprint.

NYBOM H. (1988) Apomixis versus sexuality in blackberries (*Rubus* subgen. *Rubus*, Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 160: 207-218.

POKORNÝ J. & FÉR F. (1964) *Listnáče lesů a parků*. 365 s., Praha: Státní zemědělské nakladatelství).

PRATT Ch. & EINSET J. (1955) Development of the embryo sac in some American blackberries. *American Journal of Botany*, 42: 638-645.

RICHARDS A. J. (1970) Hybridization in *Taraxacum*. *New Phytologist*, 69: 1103-1120.

RICHARDS A. J. (1973) The origin of *Taraxacum* agamospecies. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 66: 189-211.

RØNSTED N., CHASE M. W., ALBACH D. C. & BELLO M. A. (2002) Phylogenetic relationships within *Plantago* (Plantaginaceae): evidence from nuclear ribosomal ITS and plastid trnL-F sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 139: 323-338.

SOCHOR M. (2015) How just a few makes a lot: Speciation via reticulation and apomixis on example of European brambles (*Rubus* subgen. *Rubus*, Rosaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 89: 13-27.

STENBERG P., LUNDMARK M., KNUTELSKI S. & SAURA A. (2003) Evolution of clonality and polyploidy in a weevil system. *Molecular Biology and Evolution*, 20: 1626-1632.

SUDA J. (2004) *An employment of flow cytometry into plant biosystematics: PhD. Thesis. Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Botany*. 50 p.

SUDA J. (2005) Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. *Živa*, 1: 46-48.

ŠARHANOVÁ P., VAŠUT R. J., DANČÁK M., BUREŠ P. & TRÁVNÍČEK B. (2012) New insights into the variability of reproduction modes in European populations of *Rubus* subgen. *Rubus*: how sexual are polyploid brambles? *Sexual Plant Reproduction*, 25: 319-335.

ŠTĚPÁNEK J. (2011) *Taraxacum nigricans*, *T. alpestre* and allies in the *Taraxacum* sect. *Alpestris*: taxonomy, geography and conservation status. *Preslia*, 83: 537-564.

THOMPSON M. M. (1997) Survey of chromosome numbers in *Rubus* (Rosaceae: Rosoideae). *Missouri Botanical Garden Press*, 84: 128-164.

TRÁVNÍČEK B., HAVLÍČEK P. & KRAHULCOVÁ A. (2000) Ostružiníky - pozoruhodné rostliny naší přírody (I). *Živa*, 3: 113- 115.

TRÁVNÍČEK B., HAVLÍČEK P. & KRAHULCOVÁ A. (2000) Ostružiníky - pozoruhodné rostliny naší přírody (II). *Živa*, 4: 156-158.

VAŠUT R. J. & MAJESKÝ L. (2015) *Taraxacum pudicum*, a new apomictic microspecies of *T.* section *Erythrosperma* (Asteraceae) from Central Europe. *Phylotaxa*, 227: 243-252.

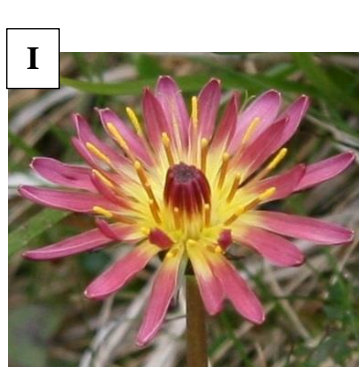
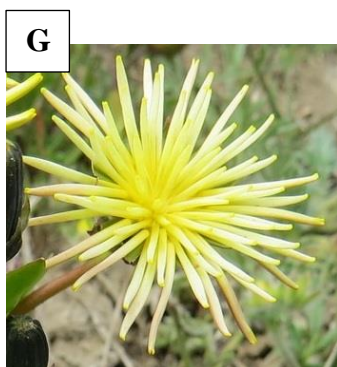
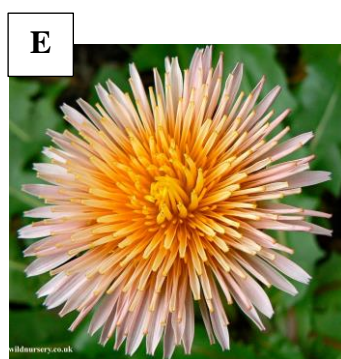
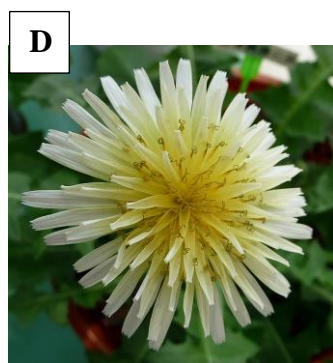
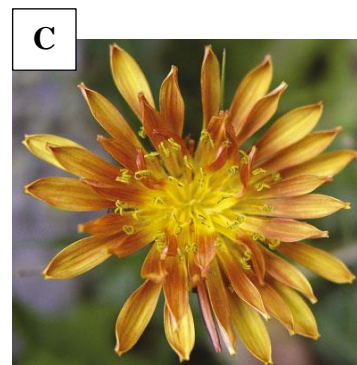
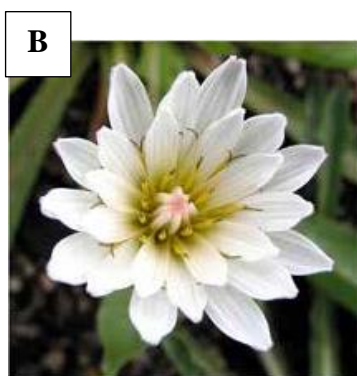
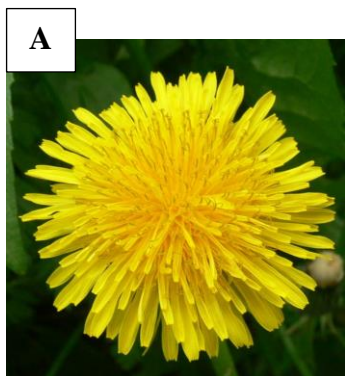
VĚTVIČKA V. (2005) *Stromy a keře*. 288 s., Praha: Aventium.

WEBER H. E. (1996) Former and modern taxonomic treatment of the apomictic *Rubus* complex. *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica*, 31: 373-380.

WITZELL H. (1999) Chloroplast DNA variation and reticulate evolution in sexual and apomictic sections of dandelions. *Molecular Ecology*, 8: 2023-2035.

ZÁVESKÁ-DRÁBKOVÁ L., KIRSCHNER J., ŠTĚPÁNEK J., ZÁVESKÝ L. & VLČEK Č. (2009) Analysis of nrDNA polymorphism in closely related diploid sexual, tetraploid sexual and polyploid agamospermous species. *Plant Systematics and Evolution*, 278: 67-85.

6. Přílohy



Příloha 1: Barva úborů různých druhů pampelišek.

A - *Taraxacum officinale*, B - *Taraxacum virgineum*, C - *Taraxacum haemanthum*, D – *Taraxacum denudatum*, E – *Taraxacum pseudorozeum*, F – *Taraxacum lilacinum*, G – *Taraxacum semitubulosum*, H – *Taraxacum carneocoloratum*, I – *Taraxacum porphyranthum*. Zdroj: <http://www.paukertova.cz/>, Kirschner 2014, <http://www.ibot.cas.cz>, <https://upload.wikimedia.org/>, <http://www.growildnursery.co.uk>, <http://www.srgc.net/>, <http://sadovodka.ru>, <http://science.halleyhosting.com>, <http://www.plantarium.ru>.



Příloha 2: Morfologie listů různých druhů *Taraxacum*.

A – *Taraxacum fasciatum*, B – *Taraxacum contractum*, C – *Taraxacum paucilobum*, D – *Taraxacum skalinskanum*, E – *Taraxacum clarum*, F – *Taraxacum diestematicum*, zdroj: <http://flora.upol.cz/fotogalerie/hledam-druh.html?q=Taraxacum>.



Příloha 3: Morfologie úborů různých druhů *Taraxacum*.

A - *Taraxacum* sect. *Taraxacum* (= *Ruderalia*), B – *Taraxacum alatum*, C – *Taraxacum piceatum*, D – *Taraxacum skalinskanum*, E – *Taraxacum linearisquameum*, F – *Taraxacum clarum*, zdroj: <http://flora.upol.cz/fotogalerie/hledam-druh.html?q=Taraxacum>.

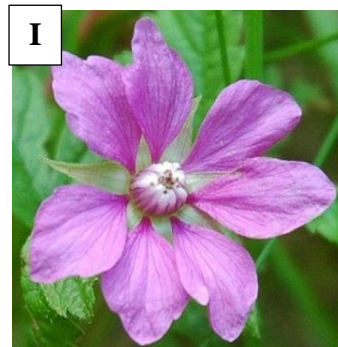
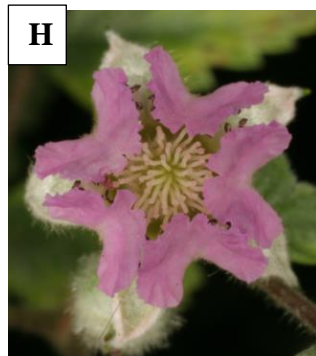
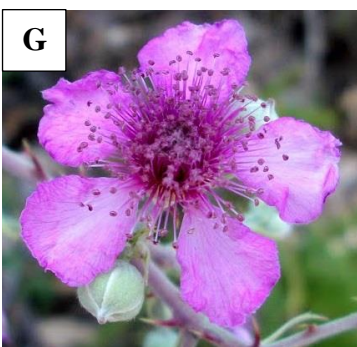
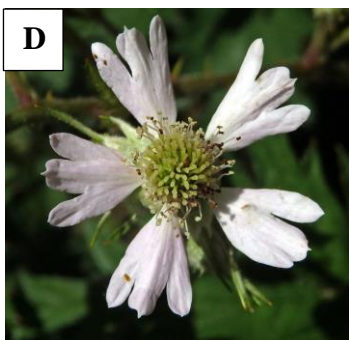
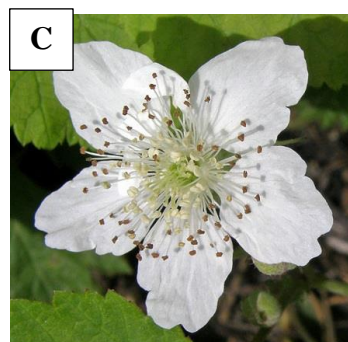
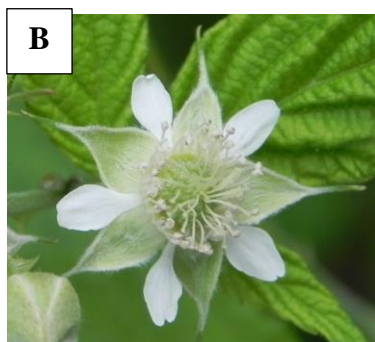


Příloha 4: Kladogram sestavený ze sexuálních druhů na základě sekvencí ITS1-5.8SrDNA-ITS2. Zdroj: Kirschner & al. 2014.



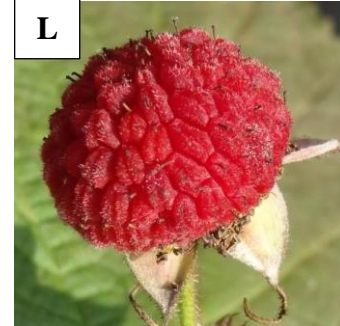
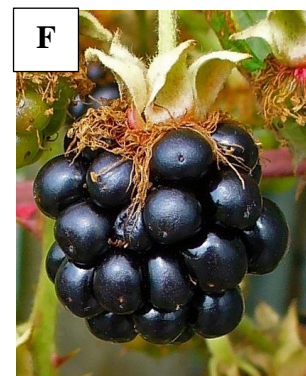
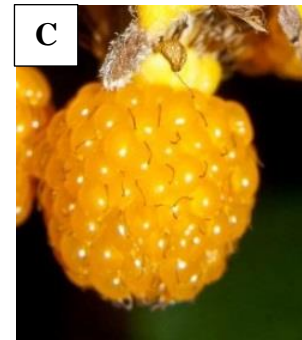
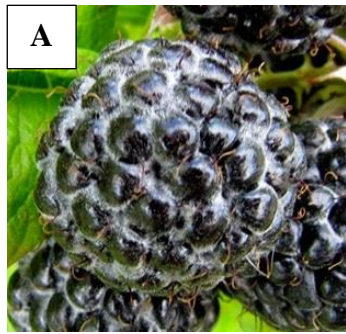
Příloha 5: Kladogram sestavený ze sexuálních druhů na základě sekvencí cpDNA

Zdroj: Kirschner & al. 2014.



Příloha 6: Morfologie květů různých druhů rodu *Rubus*.

A – *Rubus chamaemorus*, B – *Rubus occidentalis*, C – *Rubus caesius*, D – *Rubus laciniatus*, E – *Rubus odoratus*, F – *Rubus phoenicolasius*, G – *Rubus sanctus*, H – *Rubus thibetanus*, I – *Rubus arcticus*. Zdroj: <http://flora.upol.cz>, <http://www.e-herbar.net>, <http://mywildflowers.com>, <http://www.e-herbar.net>, <http://www.carolinanature.com>, <http://www.mah-miyat.ps>, <http://botany.cz>, <https://garden.rcplondon.ac.uk>.



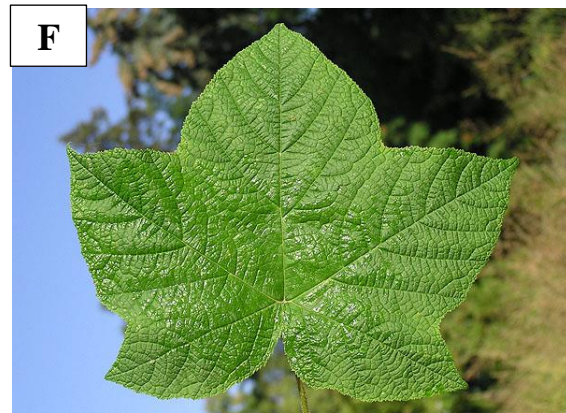
Příloha 7: Morfologie plodů různých druhů rodu *Rubus*.

A – *Rubus occidentalis*, B – *Rubus caesius*, C – *Rubus ellipticus*, D – *Rubus fraxinifolius*, E – *Rubus illecebrosus*, F – *Rubus fruticosus*, G – *Rubus saxatilis*, H – *Rubus rolfei*, I – *Rubus spectabilis*, J – *Rubus rosifolius*, K - *Rubus crataegifolius*, L – *Rubus parviflorus*. Zdroj: <http://www.orchardviewbbniagara.com>, <http://tyazz.over-blog.com>, <http://tropical.theferns.info>, <http://www.biolib.cz>, <https://commons.wikimedia.org>, <http://flora.upol.cz>, <http://calphotos.berkeley.edu>, <https://jcaulstonarboretum.files.wordpress.com>, <https://www.mrusell-photography.com>, <http://www.picture-world.org>, <https://www.flickr.com>, <http://www.eggertbaumschulen.de>.



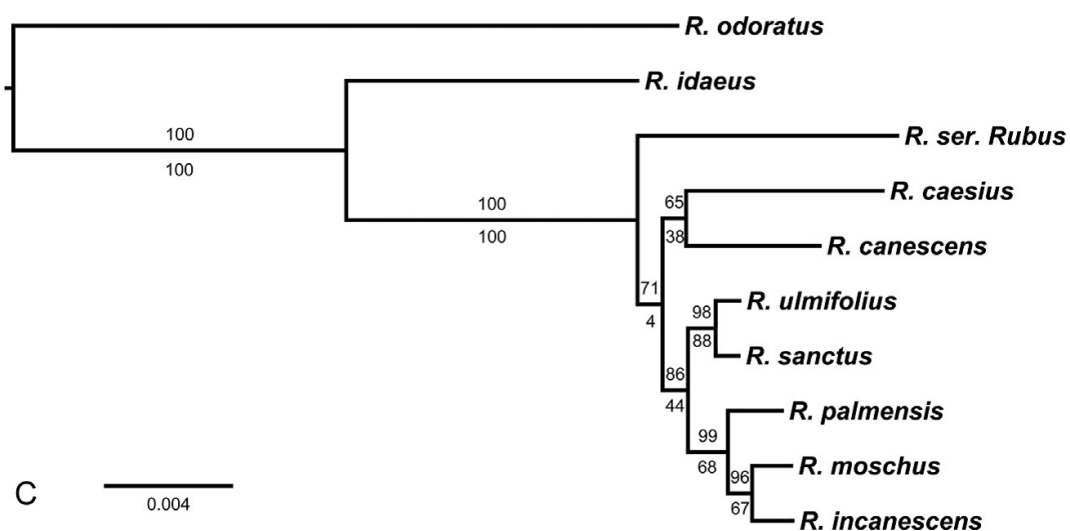
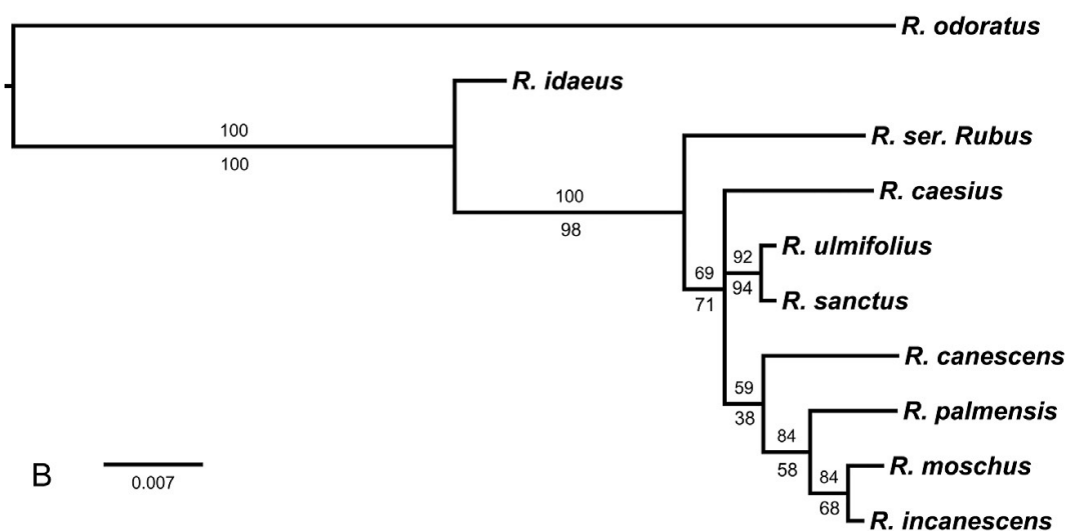
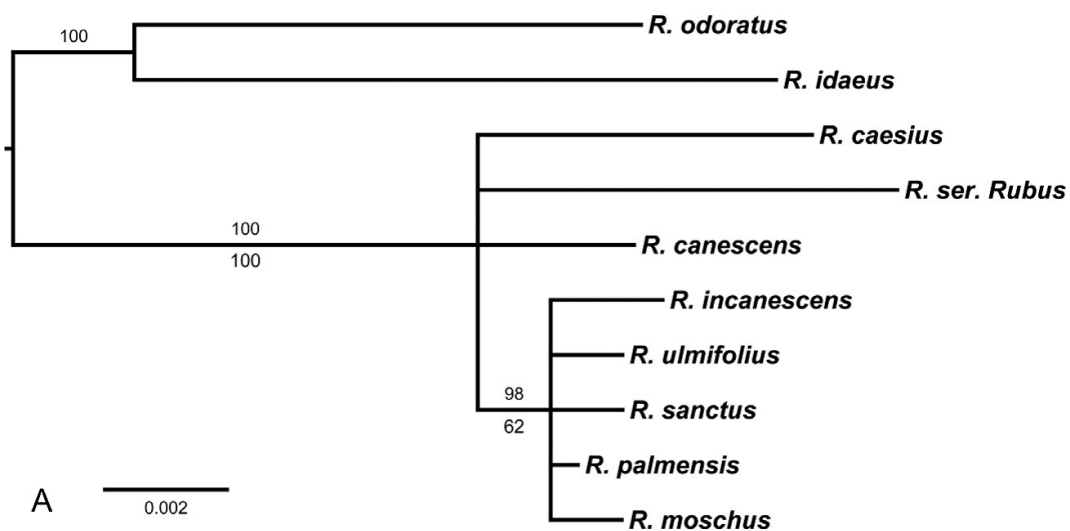
Příloha 8 Morfologie ostnů různých druhů rodu *Rubus*.

A – *Rubus sulcatus*, B – *Rubus franconicus*, C – *Rubus phoenicolasius*, D – *Rubus illecebrosus*, E – *Rubus bambusarum* , F – *Rubus koehleri*. Zdroj: <http://flora.upol.cz>, <http://users.prf.jcu.cz>.

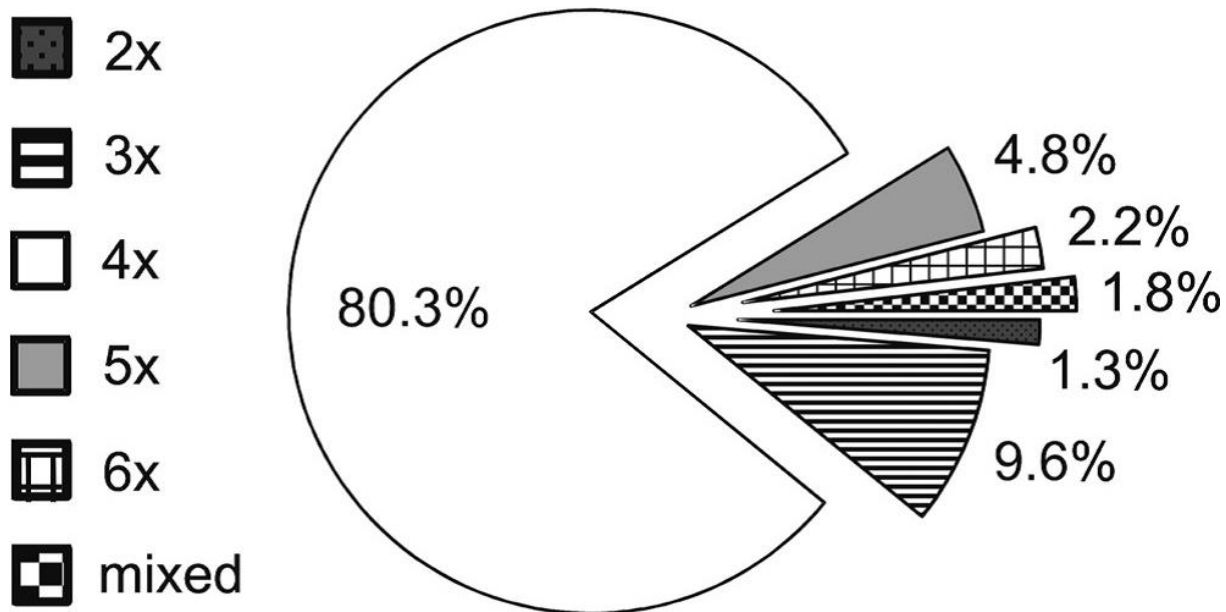


Příloha 9: Morfologie listů různých druhů rodu *Rubus*.

A – *Rubus rolfei*, B – *Rubus cockburnianus*, C – *Rubus lineatus*, D – *Rubus bambusarum*, E – *Rubus laciniatus*, F – *Rubus odoratus*. Zdroj: <http://www.asergeev.com>, <http://flora.upol.cz>, <http://4.bp.blogspot.com>, <http://botanika.borec.cz>.



Příloha 10: Fylogenetické stromy sestavené podle: (A) cpDNA, (B) ITS, (C) kombinace obou. Zdroj: Sochor & al. 2015.



Příloha 11: Četnost ploidních úrovní podrodu *Rubus* v Evropě.

Zdroj: Krahulcová & al. 2013.