

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědná fakulta**

**Katedra botaniky**



**Stanovení velikosti genomu u vybraných druhů rodu *Rubus*  
metodou průtokové cytometrie**

**Bakalářská práce**

**Marcela Tesařová**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie pro víceoborové studium – Biologie

Forma studia: Prezenční

**Vedoucí práce: RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.**

**Konzultantka: Mgr. Petra Šarhanová**

Olomouc 2012

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia podle metodických pokynů vedoucího práce RNDr. Radima J. Vašuta, Ph.D. s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci, 19. dubna 2012

.....

### **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu práce RNDr. Radimu J. Vašutovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Petře Šarhanové z Katedry botaniky Přf UP za odborné vedení a všestrannou pomoc, kterou mi věnovali při vypracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Michaele Jandové za pomoc při měření na průtokovém cytometru.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Marcela Tesařová

Název práce: Stanovení velikosti genomu u vybraných druhů rodu *Rubus* metodou průtokové cytometrie

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: Katedra botaniky

Vedoucí práce: RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2012

Abstrakt:

Tato práce objasňuje variabilitu ve velikosti genomu u vybraných populacích rodu *Rubus*. Na základě dosažených výsledků lze říct, že variabilita mezi jednotlivými populacemi je poměrně malá. Velikost 1Cx u populace B1, B4, Dušná 2 a Rusava 2 se pohybuje v rozmezí 0,390 pg až 0,395 pg. Oproti tomu velikost 1Cx u populace B3, Dušná 1, Ratiboř a Rusava 1 je větší, a pohybuje se v rozmezí od 0,405 pg do 0,413 pg. Dalším dílčím tématem je potvrzení počtu chromozómů tetraploidních jedinců *Rubus bifrons*, pomocí roztlačkových preparátů kořenových špiček, jejichž počet je 28. Absolutní velikost genomu těchto tetraploidních zástupců byla stanovena metodou průtokové cytometrie (barvení PI) na 1,62 pg. Hlavní část práce je pak zaměřena na nalezení vhodného chemického složení pufrů pro průtokovou cytometrii u rodu *Rubus*, kdy se jako nejvhodnější ukázal pufr LB01 s merkaptoethanolem.

Klíčová slova: chemické pufrы, průtoková cytometrie, *Rubus bifrons*, *Rubus ser. Glandulosi*, velikost genomu

Počet stran: 58

Počet příloh: 0

Jazyk: Čeština

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Marcela Tesařová

Title: Analysis of the genome size in selected *Rubus* species using flow-cytometry

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Botany

Supervisor: RNDr. Radim J. Vařut, Ph.D.

The year of presentation: 2012

Abstract:

This thesis clarifies the genome size variability of the chosen populations of the genus *Rubus*. Based on the obtained results, we can state that the variability of genome size among the individual populations is relatively small. The size 1Cx of the B1, B4, Duřná 2 a Rusava 2 is in range from 0,390 pg to 0,395 pg. When compared to 1Cx of the B3, Duřná 1, Ratiboř and Rusava 1 the range is larger and it varies from 0,405 pg to 0,413 pg. Next sub-theme deals with confirming the amount of the chromosomes of the tetraploid specimen *Rubus bifrons*, using the method for making squash preparations of plant root tips, which is 28. The absolute genome size of these tetraploid representatives was determined by the flow cytometry (staining PI) and set to 1,62 pg. The major part of this thesis focuses on finding a suitable chemical composition of buffers for the flow cytometry in the genus *Rubus*, when as the most suitable one was considered buffer LB01 with mercaptoethanol.

Keywords: chemical buffers, flow cytometry, *Rubus bifrons*, *Rubus ser. Glandulosi*, genome size

Number of pages: 58

Number of appendices: 0

Language: Czech

# Obsah

1. Úvod.....	8
2. Cíl práce .....	10
3. Literární přehled.....	11
3.1. Charakteristika čeledi růžovité ( <i>Rosaceae</i> ) .....	11
3.2. Charakteristika rodu <i>Rubus L.</i> .....	12
3.2.1. Morfologický popis rodu <i>Rubus L.</i> .....	13
3.2.2. Význam rodu <i>Rubus L.</i> .....	14
3.3. Rozmnožování cévnatých rostlin.....	14
3.3.1. Apomixie.....	17
3.4. Taxonomické zařazení rodu <i>Rubus ser. Discolores</i> .....	19
3.4.1. Charakteristika druhu <i>Rubus bifrons</i> .....	19
3.5. Charakteristika rodu <i>Rubus ser. Glandulosi</i> .....	20
3.6. Průtoková cytometrie.....	21
3.6.1. Historie cytometrie .....	21
3.6.2. Charakteristika metody .....	22
3.6.3. Instrumentace průtokového cytometru .....	25
3.7. Obsah jaderné DNA a její rozložení.....	27
4. Materiál a metody .....	28
4.1. Rostlinný materiál.....	28
4.2. Cytometrie .....	30
4.2.1. Příprava vzorku .....	30
4.2.2. Stanovení velikosti genomu .....	30
4.3. Roztlakové preparáty kořenových špiček.....	30
4.4. Testování různých chemických pufrů.....	32
5. Výsledky .....	36

5.1.	Roztlakové preparáty kořenových špiček u rodu <i>Rubus</i> .....	36
5.2.	Variabilita ve velikosti genomu u vybraných populací rodu <i>Rubus</i> .....	37
5.3.	Analýza pufrů vybraných zástupců rodu <i>Rubus</i> .....	43
6.	Diskuse.....	48
6.1.	Analýza variability velikosti genomu u vybraných populací rodu <i>Rubus</i> .....	48
6.2.	Analýza chemických pufrů na vybraných zástupcích rodu <i>Rubus</i> .....	50
7.	Závěr .....	53
8.	Literatura.....	54

# 1. Úvod

Čeď rŕovité (*Rosaceae*; řád *Rosales*) představuje kosmopolitní evoluční skupinu s centry druhové diverzity v subtropickém a mírném pásu severní polokoule. Tato čeď zahrnuje téměř všechny růstové formy rostlin, které jsou charakteristické převážně oboupohlavnými květy, jež jsou vždy pětičetné a s větším počtem tyčinek. Gyneceum je apokarpní až subsynkarpní, semeník svrchní až spodní, plodem je měchýřek, peckovice, malvice či nažka (Hendrych 1977). Zvláštností této čeďi je relativně častý výskyt apomixie, což je klonální rozmnořování pomocí semen (bez oplození) (Rosypal 2003). V současné taxonomii čeď rŕovité zahrnuje 3 podčeďi, přibližně 115 rodů a 3500 druhů (Hrouda 2007).

Jedním z apomiktických zástupců této čeďi je rod *Rubus* (ostruřiník, maliník). Tento rod představuje jeden z druhově nejbohatších rodů květeny ČR (Holub 1995). Obecně je tento rod považován za jednu z taxonomicky nejkomplicovanějších skupin v rámci evropské flóry. Taxonomický výzkum v rámci tohoto rodu je zatížen metodologickými chybami z minulosti, které vyplývají z absence znalostí (nebo jejich ignorováním) o biologii a biosystematice rodu. Díky tomu bylo popsáno značné množství lokálních populací na úrovni samostatných druhů. Generování velkého množství nově popsaných taxonů má minimální vědeckou hodnotu neboť není známo jejich mikroevoluční pozadí (např. se může jednat o F<sub>1</sub> hybridy). První změnu přinesl racionální koncept navržený Prof. Heinrichem E. Weberem, který definoval kritéria konceptu druhu v rodu *Rubus* (Weber 1996), a který je uplatňován i v ČR (Holub 1995; Trávníček *et al.* 2005).

Zástupci rodu *Rubus* patří mezi ekonomicky významné rostliny, podobně jako mnoho dalších druhů v čeďi *Rosaceae*. Rekreačně jsou sbírány plody *R. idaeus* (ostruřiník maliník), *R. armeniacus* (ostruřiník sladkoplodý) a *R. allegheniensis* (ostruřiník alleghenský), mnohé druhy se pěstují pro okrasu např. *R. parviflorus*, *R. illecebrosus*, *R. laciniatus* a mnoho dalších (Trávníček *et al.* 2000a).

U ostruřiníků se vyskytuje fakultativní aposporická pseudogamie, která vede ke vzniku klonálního potomstva pomocí semen. Díky zbytkové sexualitě může docházet ke vzájemnému křížení druhů a vzniku nových linií, které jsou následně apomixií stabilizovány. V případě, že se za vhodných podmínek tyto stabilizované typy rozšíří, jsou považovány za samostatné druhy (Weber 1996).



Tato práce se zaměřuje především na vybrané apomiktické taxony rodu *Rubus* (jmenovitě apomiktický druh *R. bifrons* a taxonomickou skupinu apomiktických a sexuálních rostlin označovanou jako *R. ser. Glandulosi*). Tyto dvě morfologicky nápadné skupiny jsou od sebe poměrně dobře rozpoznatelné. Druhy *Rubus ser. Discolores* lze rozpoznat na základě křídově zbarvené plsti na spodní straně listu; patří zde studovaný druh *R. bifrons*. Naopak pro druhy *Rubus ser. Glandulosi* jsou typické plazivé porosty, žláznaté prýty a ostny; jednotlivé populace se jako druhy nerozlišují.

Cílem práce je nalézt nejvhodnější chemické složení pufru pro průtokovou cytometrii ostružiníků a zhodnotit variabilitu ve velikosti genomu studovaných jedinců.

## 2. Cíl práce

Cílem předložené práce bylo zhodnotit variabilitu ve velikosti genomu vybraných druhů rodu *Rubus* a otestovat vhodné chemické složení pufrů na vybraných zástupcích pomocí průtokové cytometrie. Hlavní cíle výzkumu:

1. vypracovat literární rešerši k dané problematice;
2. nalézt vhodné chemické složení pufrů pro průtokovou cytometrii v rodě *Rubus*;
3. stanovit velikost genomu vybraných tetraploidních druhů rodu *Rubus*;
4. porovnat variabilitu ve velikosti genomu na vybraných populacích rodu *Rubus*.

## 3. Literární přehled

### 3.1. Charakteristika čeledi růžovité (*Rosaceae*)

#### Zařazení do systému

Říše: *Plantae*

Podříše: *Embriobionta*

Oddělení: *Magnoliophyta*

Třída: *Rosopsida*

Podtřída: *Rosidae*

Řád: *Rosales*

Čeleď: *Rosaceae* (Hrouda 2007)

Do čeledi růžovité (*Rosaceae*) patří vytrvalé rostliny až keře, zřídka letničky. Listy jsou střídavé, výjimečně vstřícné, většinou palistnaté a složené, vzácně i jednoduché. Květenství je hroznovité, vrcholičnaté nebo se vyskytují květy jednotlivé. Květy jsou cyklické nebo spirocyklické, převážně aktinomorfní, oboupohlavné, vzácně jednopohlavné. Květní obaly jsou 4-6(-8). Počet kališních i korunních lístků je shodný. Tyčinek 1-30(-50). Gyneceum apokarpní, výjimečně pseudokarpní; svrchní semeník. Plodem jsou nažky (oříšky), někdy uzavřené v češuli, popř. souplodí nažek nebo peckoviček. Semena s rovným embryem a s endospermem (Slavík 1995).

Čeleď *Rosaceae* zahrnuje v současné době 3 podčeledi: *Dryadoideae*, *Rosoideae* a *Spiraeoideae*. Původní taxonomie zahrnovala 4 podčeledi, avšak tento systém byl do jisté míry umělý (Potter *et al.* 2007).

Podčeleď *Dryadoideae* je charakteristická fixací dusíku pomocí bakterií rodu *Frankia*, aktinomycety, které tvoří specifický symbiotický vztah s některými cévnatými rostlinami např. *Dryas*. Jsou to byliny, keře nebo malé stromky. Plodem jsou nažky, obsahují sorbitol a kyanogenní glykosidy. Podčeleď zahrnuje pouze 4 rody. Patří zde např. rody *Dryas*, *Cercocarpus*, *Purshia* a další (Potter *et al.* 2007).

Podčeleď *Rosoideae* zatím nemá přesně definované taxonomické vymezení; díky molekulárním analýzám byly z této podčeledi vyřazeny rody *Dryas*, *Purshia* a jiné. Jsou to

především vytrvalé byliny a keře, včetně ovocných rostlin. Gyneceum je tvořeno mnoha plodolisty, obsahují kyselinu ellagovou. Rozmnožování pomocí apomixie je u této podčeledi relativně vzácné, vyskytuje se např. u rodu *Rubus* a v omezené míře v rodech *Potentilla* a *Rosa*. Řadíme zde např. známé rody *Filipendula*, *Potentilla*, *Rosa*, *Rubus* a mnoho dalších (Eriksson *et al.* 2003).

Podčeleď *Spiraeoideae* jsou dřeviny, převážně s jednoduchými listy, méně často s listy složenými. Gyneceum je složeno z 5 a méně plodolistů. Tyto rostliny obsahují sorbitol, kyanogenní glykosidy a flavony. Apomixie je zde poměrně častá (zvláště v tribu *Pyrineae*), převážně se jedná o aposporickou apomixii (*Sorbus*, *Crataegus*, *Amelanchier* aj.). Plodem jsou peckovice a malvice. Patří zde např. rody *Exochorda*, *Sorbaria*, *Spirea*, *Holodiscus* a jiné (Potter *et al.* 2007).

Čeleď růžovité (*Rosaceae*) je rozšířena na obou polokoulích, v tropických pásech jen v horách. Tato čeleď zahrnuje celou řadu léčivých a hospodářsky významných druhů (Slavík 1995).

### 3.2. Charakteristika rodu *Rubus* L.

Rod *Rubus* patří mezi druhově nejbohatší rody v ČR. Zástupci tohoto rodu vykazují variabilní ekologické nároky, mají užší ekologické amplitudy, také se zde ukazuje jistý synantropní charakter jejich výskytu. Většinu druhů nacházíme v prosvětlených lesích, na okrajích lesů, pasekách, kolem lesních cest a křovin. Mnoho druhů ostružiníků je kalcifobních a vyskytují se na silikátových podkladech, některé však vápník v půdě snášejí (Holub 1995).

Rod *Rubus* se řadí k taxonomicky nejproblematictější skupinám v Evropě. Mezi nejkritičtější skupiny patří díky fakultativní aposporické pseudogamii, vysokému stupni hybridizace a rozpadu hybridního potomstva na řadu apomiktických mikrospecií, které mohou v dalším vývoji obnovit zčásti svoji sexualitu. Hybridizace neprobíhá jen uvnitř druhů, ale rovněž mezi druhy, zpravidla formou F<sub>1</sub> kříženců. Evropské druhy podrodu *Rubus* jsou převážně pseudogamicky apomiktické a tedy vyžadují ke vzniku funkčního endospermu oplození centrálního jádra samčí spermatickou buňkou (Holub 1995).

Rozmanitost v chromozomových počtech u našich ostružiníků je značná; je zastoupena celou polyploidní řadou od diploidních (2x) po oktaploidní rostliny (8x) s výjimkou absence heptaploidů (7x). V přírodě převažují tetraploidní druhy, což představuje jakýsi optimální stav pro tuto taxonomickou skupinu, hlavně pro apomiktické druhy sekce *Rubus*. Oproti tomu diploidní sexuální typy převažují u našich zdomácnělých druhů, z původních zástupců je známá u maliníku obecného (*R. idaeus*) a ostružiníku šedavého (*R. canescens*). Centrum rozšíření diploidních zástupců je v Evropě v Mediteránu. Nejvyšší stupeň ploidie je 8x (2n=56) u ostružiníku morušky (*R. chamaemorus*) (Trávníček *et al.* 2000b).

I když se v ČR vyskytují druhy diploidní (rozmnožující se sexuálně), pro většinu našich ostružiníků je typická polyploidie (s ní souběžně přítomná apomixie). Polyploidie představuje přítomnost více než 2 základních chromozomových sad v somatických buňkách. Základní chromosomové číslo u zástupců rodu *Rubus* čítá 7 chromosomů (Trávníček *et al.* 2000b).

### 3.2.1. Morfologický popis rodu *Rubus* L.

Rod *Rubus* je řazen mezi vytrvalé byliny nebo keře, zpravidla s dvouletými prýty. Kořeny jsou plazivé. Byliny často s dlouhými podzemními prýty a nedřevnatějícími lodyhami. V prvním roce zpravidla nekvětou, květenství se tvoří až v roce druhém a na konci tohoto roku prýty také odumírají. Stonky keřů jsou vzpřímené, vysokoobloukovité nebo nízkoobloukovité, poléhavé až plazivé. V prvním roce jednoduché nebo rozvětvené, obvykle ostnitě, hranatě nebo oblé, lysé nebo v různé míře chlupaté. Ostny jsou trichomového původu. Listy střídavé, jednoduché nebo složené - lichozpeřené, 3četné nebo 5četné, řapíkaté, opadavé nebo přezimující. Květenství koncové, hroznovité, latnaté nebo řídce chocholíkaté, vzácně květy jednotlivé. Květy oboupohlavné, zřídka dvoudomé, zpravidla 5četné. Kališní lístky přirostlé k češuli, vytrvalé, trojúhelníkovité až zašpičatěle vejčité. Korunní lístky nasedají na okraj češule, zpravidla opadavé, úzce kopisťovité až okrouhlé; nejčastěji bílé, růžové nebo červené. Tyčinky na okraji češule, zpravidla více než 20, ve více kruzích; gyneceum převyšující nebo kratší. Plodem jsou peckovičky, jednosemenné, obvykle šťavnaté (ostružiny, maliny) (Holub 1995).

Rod *Rubus* je početně velmi rozsáhlý – pravděpodobně čítá 1000 až 1200 druhů, které jsou rozšířeny po celém světě, kromě Antarktidy; v tropických oblastech se vyskytuje jen

v horách (Holub 1995). Početně v rodu převažují apomiktické mikrospecie podrodu *Rubus*, které jsou ale omezeny jen na vybrané evoluční skupiny, proto v rámci fylogeneze rodu představují tyto evoluční linie vedoucí k apomiktickým druhům relativní menšinu (tj. i přestože jsou poččetně největší skupinou v rodu, představují pouze jen omezenou větev celkové evoluce rodu). Centrum diverzity podrodu *Rubus*, ve kterém je přítomna apomixie se nachází v severozápadní Evropě (Trávníček, osobní sdělení).

### 3.2.2. Význam rodu *Rubus* L.

Ostružiníky patří k ovocným rostlinám, plody se konzumují čerstvé nebo se dají různými způsoby zpracovat např. jako šťávy, sirupy, marmelády, kompoty, likéry, vína aj. Plody ostružin jsou zdrojem vitamínů jako je vitamín C (posiluje imunitu), karoteny (mají silné antioxidační účinky a regenerují sliznici) či vitamín B, a řady minerálů – fosfor, draslík, železo, hořčík a vápník. Léčivé účinky jsou posíleny přítomností bioflavonoidů, což jsou látky, které chrání před oxidací (Oberbeil & Lentzová 2003).

Bioflavonoidy posilují a regenerují cévy, zlepšují průtok krve, posilují vazivo, mohou předcházet nádorovým onemocněním a poškození buněk volnými radikály. Také působí detoxikačně a chrání organismus před infekčními onemocněními (Kresánek & Kresánek 2008).

Léčivé účinky mají i listy ostružiníků, obsahují hlavně třísloviny, flavonoidy, menší množství vitamínu C, barviva, pektiny, cukry, kyselinu jantarovou, jablečnou a jiné látky. Čaj z listů působí protizánětlivě, pomáhá při nachlazení, kašli a jako prostředek proti zažívacím potížím. Používá se také jako podpůrná léčba při onemocnění močových a žlučových cest a při cukrovce (Oberbeil & Lentzová 2003).

### 3.3. Rozmnožování cévnatých rostlin

Rozmnožování cévnatých rostlin je jednou z nejdůležitějších podmínek pro zachování určitého druhu. Rozlišujeme dva základní typy rozmnožování: pohlavní a nepohlavní.

V životních cyklech cévnatých rostlin dochází k tzv. metagenezi, střídání gametofytu (pohlavní generace) a sporofytu (nepohlavní generace). V životním cyklu semenných rostlin převažuje sporofyt, gametofyt je na něm zcela závislý. Semenné rostliny jsou heterosporické. Na megasporofylech vznikají v megasporangiích haploidní megaspory. Z megaspory se vyvíjí samičí gametofyt (zárodečný vak), ve kterém se nachází jedna nebo více oosfér. Na mikrosporofylech vznikají mikrosporangia (prašné pouzdra) s mikrosporami. Z mikrospory se vyvíjí samčí gametofyt (vícebuněčné pylové zrno), obsahující samčí gamety (spermatické buňky) (Rosypal 2003).

U krytosemenných rostlin je rozmnožovacím orgánem květ. Na mikrosporofylech (tyčinkách) vznikají mikrosporangia (prašná pouzdra) s mikrosporocyty (mateřské buňky mikrospor). Mikrosporocyty se dělí meiózou za vzniku mikrospor. Zralé mikrospory jsou pokryty dvouvrstevnou blánou – vnější exina (tvořena sporopoleniny a proteiny) a vnitřní intina (obsahující celulózu a pektiny). Mikrospora se dělí na větší buňku vegetativní (láčková) a menší buňky generativní, která se dále dělí na dvě buňky spermatické (Rosypal 2003).

Megasporofyty srůstají a tvoří pestík. Ve spodní části pestíku – semeníku – se tvoří megasporangia (vajíčka) s integumenty. Megasporocyt (jedna z buněk nucellu) se zvětší, prodělá meiózu a dá vznik čtyřem haploidním megasporám, z nichž tři zaniknou. Zbylá megaspora dá vznik samičímu gametofytu (zárodečný vak), což je sedmibuněčná struktura s osmi jádry – tvořena oosférou, dvěma synergidami (pomocné buňky), třemi antipodami (protistožné buňky) a buňkou centrální s dvěma jádry (Rosypal 2003).

Při sexuálním rozmnožování dochází nejprve k opylení. Pylové zrno se zachytí na blizně. U mikrospory praskne exina a z vegetativní buňky se vytvoří pylová láčka, která proniká do zárodečného vaku spolu se spermatickými buňkami. Jedna spermatická buňka oplodní oosféru a vznikne zygota ( $2n$ ). Druhá spermatická buňka splyne s centrální buňkou zárodečného vaku a vznikne endosperm ( $3n$ ). Z integumentů vznikne osemení a z nucellu perisperm. Toto dvojí oplození je charakteristické pro krytosemenné rostliny. Mezi opylením a oplozením může uplynout několik hodin, ale i několik měsíců (Rosypal 2003).

Podle typu opylení dělíme rostliny na cizosprašné (allogamické) a samosprašné (autogamické) (Rosypal 2003).

Allogamie (cizosprašnost) je opylení blizny rostliny pylem jiné rostliny. Je častá v živočišné říši (oddělené pohlaví), nikoli však v rostlinné, kde se dvoudomost vyskytuje

přibližně u 4 % krytosemenných druhů. Vyšší rostliny jsou většinou hermafroditní (oboupohlavné). Allogamie je ovlivněna buď stavbou květu, dozráváním prašníků a blizen v různou dobu, anebo nestejnou velikostí bliznových papil, pylových zrněk a mnoho dalších. Rostliny upřednostňující cizosprašnost mají mechanismy zabraňující samoopylení (Briggs & Walters 2001).

Mezi výhody allogamie patří zvyšování genetické variability a umožnění adaptace rostlin k měnícímu se prostředí. Naopak nevýhodou je vysoká energetická investice při rozmnožování (větší množství biomasy) např. složité květy, nektaria. A také ztráta výhodných genotypů získaných při adaptaci na určité prostředí (Briggs & Walters 2001).

Autogamie (samosprašnost) je opylování rostlin, při němž je pestík opylován pylem, který pochází z téhož květu. U specializovaných květů, které se nikdy neotvírají, se vyvinula úplná forma autogamie tzv. kleistogamie. Obligátně kleistogamické jsou některé trávy, avšak řada druhů je pouze sezónně kleistogamická např. violka (Briggs & Walters 2001).

Výhodou autogamie je možnost rozmnožování v extrémních podmínkách, nízká energetická investice při rozmnožování a uchování dobře adaptovaných genotypů. Nevýhodou je křížení příbuzenských linií, akumulace nevýhodných mutací a snižování počtu heterozygotních jedinců v dalších generacích, což vede k „čistým“ liniím (Briggs & Walters 2001).

Nepohlavní rozmnožování vede ke vzniku nových potomků - klonů, kteří mají identickou genetickou výbavu jako mateřská rostlina. Základním typem je rozmnožování pomocí výtrusů (spor), což jsou haploidní částice vznikající meiotickým dělením ve sporangích (výtrusnicích) (Rosypal 2003).

Zvláštním typem nepohlavního rozmnožování je vegetativní rozmnožování - vzniká při něm nový jedinec ze somatických buněk mateřského jedince, díky čemuž mají shodný genotyp. Také zde nedochází ke kombinování rodičovských genomů ani k redukci počtu chromozomů. Rostliny se vegetativně rozšiřují i cíleně, pomocí specifických rozmnožovacích částic jako jsou šlahouny (jahodník), hlízy (jiřina), oddenky (konvalinka), cibule (sněženka) nebo pomocí regenerace. Regenerační schopnost se prakticky využívá při rozmnožování rostlin metodou *in vitro*. Vegetativní rozmnožování má velký význam také v zemědělství a zahradnictví, kdy jsou cíleně rozmnožovány určité druhy rostlin pomocí řízkování, roubování či očkování (Rosypal 2003).



### 3.3.1. Apomixie

Apomixie neboli agamospermie je označována jako nepohlavní rozmnožování pomocí semen (Asker & Jerling 1992). Nedochozí při ní k oplození (splynutí gamet), pohlavní proces zcela nebo částečně vymizel, přesto apomiktické rostliny vytváří zralá semena. Potomstvo má stejný genotyp jako mateřská rostlina. Apomikticky se rozmnožující rostliny mají všechny výhody týkající se tvorby semen bez rizik spjatých s opylením. Apomixie je poměrně rozšířená u výtrusných (kaprad'orosty) a především krytosemenných rostlin (nejčastěji v čeledi *Rosaceae*, *Asteraceae*, *Poaceae*) (Briggs & Walters 2001). Apomixie se obecně dělí do dvou skupin na gametofytickou a sporofytickou apomixii (Khush 1994).

Při gametofytické apomixii se embrya vyvíjí z neredukovaného zárodečného vaku. Zárodek se vyvíjí partenogeneticky. Gametofytická apomixie může být obligátní (převážně apomiktická) nebo fakultativní (vedle apomixie je zachována možnost sexuálního rozmnožování). Dále je rozdělena do dvou kategorií – diplosporie a aposporie (Briggs & Walters 2001).

Při diplosporii gametofyt vzniká z neredukované megasporu. Oproti aposporii představuje menší odchylku od normálního pohlavního rozmnožování. U některých skupin, například pampelišky (*Taraxacum*) je rozdíl mezi normální meiózou a diplosporii pouze ve vynechání poslední fáze meiózy (Khush 1994).

Při aposporii se zárodečný vak nevyvíjí z mateřské buňky, ale z náhradní somatické buňky. Například u rodu *Poa* (lipnice) a *Rubus* (ostružiník) (Khush 1994).

V některých ojedinělých případech může dojít k aneusporii, kdy mateřská buňka prodělá nepravdělnou meiózu, při které může dojít ke crossing-overům, čímž se zvyšuje variabilita rostlin (toto je v běžných diplosporních a aposporních situacích vyloučeno) (Briggs & Walters 2001).

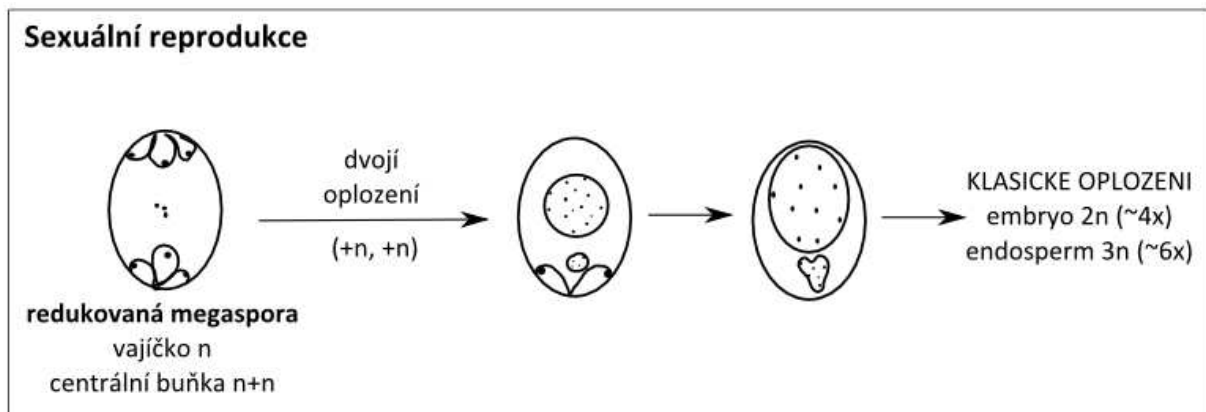
Sporofytická apomixie je také označovaná jako adventivní (náhodná) embryonie. Embryo se vyvíjí mimo zárodečný vak, vzniká z jednotlivých buněk dvou různých somatických tkání – z nucellu a integumentů (Lakshmanan & Ambegaokar 1984). Obvykle se vyskytuje u normálního pohlavního rozmnožování a způsobuje polyembryonii. Tento způsob rozmnožování je běžný např. u citrusových plodů a manga (Khush 1994).

U zde studovaných ostružiníků se vyskytuje fakultativní aposporická pseudogamie.

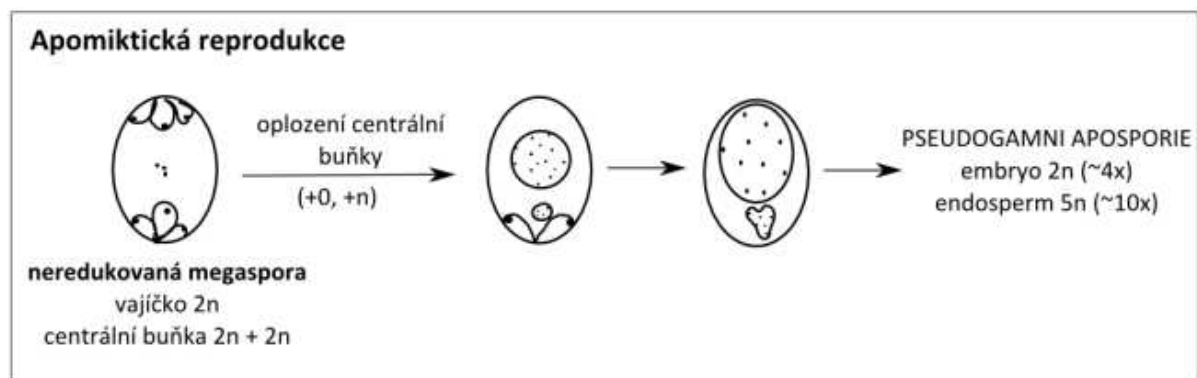
Při pseudogamii dochází k oplození centrálního jádra spermatickou buňkou, což je nutné ke vzniku endospermu a celého embrya (opylení je podmínkou tvorby semen) (Briggs & Walters 2001).

Výhodou apomixie je produkce většího množství potomstva v krátkém časovém horizontu, které je navíc méně ovlivněno klimatickými podmínkami než sexuálními rozmnožováním a není závislé na přítomnosti/absenci opylovače/pylu (Briggs & Walters 2001). Další výhodou je fixace heterozygotní konstituce genomu (Asker & Jerling 1992).

Nevýhodou apomixie je, že nově vzniklé mutace se nesetkají v genomech potomků, tato variabilita je buď omezena, nebo zcela zablokována. Apomixie může být také limitována stárnutím a chorobami (rod *Citrus*) (Briggs & Walters 2001).



Obr. 1 Klasické oplození - vajíčko se vyvíjí oplozením spermatickou buňkou ( $n + n$ ), endosperm se vyvíjí oplozením centrálního jádra druhou spermatickou buňkou ( $2n + n$ ).



Obr. 2 Pseudogamní aposporie – vajíčko se vyvíjí bez oplození ( $2n + 0n$ ), endosperm se vyvíjí oplozením centrálního jádra spermatickou buňkou ( $4n + n$ ).

### 3.4. Taxonomické zařazení rodu *Rubus* ser. *Discolores*

*Rubus* ser. *Discolores* (P.J.Müller) Focke je relativně přirozená skupina ostružiníků. Patří do podrodu *Rubus*, sekce *Rubus a* podsekcce *Hiemales* (Trávníček & Zázvorka 2005). V podsekcce *Hiemales* je možné v ČR vyčlenit 13 sérií. Tato podsekcce zahrnuje druhy, u kterých listy přetrvávají na rostlinách i v zimě; mají obloukovité až poléhavé větve, které na podzim dobře zakořeňují (Trávníček *et al.* 2000a).

Sérii *Discolores* lze snadno odlišit od ostatních skupin podrodů *Rubus*. Listy dospělých jedinců jsou díky ochlupení rubové strany listů šedavé až bělavě plstnaté, na prýtech se nikdy nevyskytují žlázy. Zástupci této série se vyskytují na pasekách, okrajích lesů, někdy i ve volné krajině mimo les. Dávají přednost teplejším oblastem; rostou na sušších půdách, bohatých na minerální látky, které jsou zásadité až mírně kyselé. Jsou rozšířeny ve střední Evropě, často rostou v lokalitách, kde se původně vyskytovaly dubo-habrové lesy (Trávníček & Zázvorka 2005).

V současnosti se v České republice rozlišuje 17 druhů ser. *Discolores*. Tyto druhy mohou být rozděleny do tří skupin. První skupina je tvořena jedním, značně izolovaným druhem *R. bohemiicola*. Jedná se o endemitický druh pro Českou republiku. Tento druh je speciální tím, že má 27 somatických chromosomů a chromosomový fragment. Další skupinu tvoří tetraploidní druhy s 28 somatickými chromosomy, sem patří např. *R. bifrons* nebo *R. praecox*. Poslední skupina je druhově nejpočetnější a zahrnuje všechny triploidní druhy (Trávníček & Zázvorka 2005).

#### 3.4.1. Charakteristika druhu *Rubus bifrons*

*Rubus bifrons* Vest, ostružiník dvojbarevný, je řazen mezi tetraploidní druhy ser. *Discolores* (Trávníček & Zázvorka 2005).

Jedná se o keře vysoké 50 – 100 cm, které tvoří nízké hnízdovité porosty. Prýty voskově ojíňené, našedlé, s drobnými hvězdovitými chlupy. Ostny prýtu přímé, štíhlé, kolmo odstáté, v počtu 10-15(-20). Listy zřetelně znožené, (4-)5četné, kožovité, na lici matně tmavozelené a lysé; žilnatina na rubu je bělavá. Listové okraje jsou zoubkované, s velmi špičatými zuby, protáhlé a směřující do různých stran. Květenství je bohaté, nejčastěji mnohokvěté nebo jehlancovité. Kališní lístky jsou šedoplstnaté, bez osténku. Korunní lístky

eliptické, obvejčité až okrouhlé, typické je růžové zbarvení. Tyčinky jsou delší než gyneceum. Typickým znakem tohoto druhu jsou také žlutavé čnělky. Souplodí je tvořeno polokulovitými až kulovitými, černě zbarvenými plody (Holub 1995).

Tento druh osídluje lesní okraje, křoviny, sušší rumišť, paseky, lomy aj. Vyskytuje se na mírně kyselých až slabě alkalických půdách, taktéž ho můžeme nalézt na silikátových a vápenitých podkladech. Patří mezi thamnofilní ekoelementy (roste na osluněných biotopech).

*R. bifrons* je roztroušeně rozšířen po celém území České republiky. Je to teplomilný druh, avšak jeho výskyt je vázán převážně na okruh mezofytika. Vyskytuje se v jihozápadních a jižních Čechách, od Plzeňské pahorkatiny a Branžovského hvozdu po Klet' a okolí Českých Budějovic, na V okraji Dražanské vrchoviny a v Podbeskydské pahorkatině. Obvykle roste v suprakolinním stupni ve výšce 200 - 600 (-700) m n. m. (Holub 1995).

V celosvětovém měřítku se přirozeně vyskytuje v Evropě od jižní Francie, přes Belgie, Německo, Českou republiku, po Ukrajinu a Rumunsko; dále zasahuje na sever Balkánského a Pyrenejského poloostrova (Kurtto *et al.* 2010). Zavlečen byl do východní části USA (Vašut, osobní sdělení).

### 3.5. Charakteristika rodu *Rubus* ser. *Glandulosi*

Série *Glandulosi* (Wimm. & Grab.) Focke – žláznaté ostružiníky, je charakteristická vysokým podílem sexuálního rozmnožování, které je však kombinováno s apomixií. Díky tomu kvantitativně převažují neklasifikovatelné typy nad rozlišenými druhy. Do této série je řazen například *Rubus glandulosus* (Trávníček *et al.* 2000a). Nejrozšířenější zástupci skupiny v ČR jsou *R. pedomontanus* a taxonomicky nejasný druh *R. hirtus* (ostružiník srstnatý).

Mezi morfologicky významné znaky patří prýty nízkoobloukovité, poléhavé až plazivé, často ojíněné. Jejich ostny jsou štíhlé, téměř oblé, různé velikosti a tvaru, s přechody ke žláznatým pupencům. Listy obvykle jen 3četné (Holub 1995). Na rozdíl od pravých skupin ostružiníků, zde mohou některé prýty vykvétat už 1. rokem (Trávníček *et al.* 2000a). Květenství jemně ostnitá a hustě stopkatě žláznatá, na dvouročních prýtech obvykle kratší, dole latnaté, nahoře hroznovitě; na jednoletých prýtech květenství odlišné, objemné, bohaté, latnaté a velmi prolistěné (Holub 1995).

Zástupci série *Glandulosi* zřejmě sehrávají významnou roli v evoluci ostružiníků, díky málo potlačenému pohlavnímu rozmnožování se mohou častěji křížit nejen vzájemně mezi sebou, ale i se zástupci ostatních sérií, z čehož vyplývá, že se podílejí na vzniku nových genotypů (Trávníček *et al.* 2000b).

Zároveň má většina těchto druhů problém s rozmnožováním, a pokud je v přírodě nalzáme, tak jen velmi málo plodící. Semena jsou také často nevyvinutá a sterilní. Z tohoto důvodu se mohou spíše uplatnit jako dárci pylu při křížení s jinými taxony.

Žláznaté ostružiníky obvykle rostou v lesním podrostu, nevadí jim ani značné zastínění. Tvoří rozsáhlé a husté koberce, hlavně v chladnějších až podhorských oblastech. Někdy je můžeme nalézt i v nižších polohách v druhotných jehličnatých lesích (Trávníček *et al.* 2000a).

Agregátní taxon *Rubus* ser. *Glandulosi* je rozšířený na po celém území České republiky, hlavně v oblastech mezofytika a oreofytika. Převážně se vyskytuje v Českomoravském meziohří, Hanušovicko-rychlebské vrchovině, v Brdech, v Beskydech a v Krušných horách (Holub 1995).

V rámci České republiky se oba taxony (*R. bifrons* i *R. ser. Glandulosi*) mohou na jednotlivých lokalitách setkávat, a také se spolu křížit, což vede ke vzniku morfologicky přechodných typů.

## **3.6. Průtoková cytometrie**

### **3.6.1. Historie cytometrie**

Průtoková cytometrie, stejně jako většina vědeckých vynálezů, má své kořeny zakotvené v minulosti. Vynález mikroskopie, přístroje k počítání krevních částic a vývoj inkoustové tiskárny byly předpokladem pro vývoj prvního průtokového cytometru.

V roce 1934 Andrew Moldavan pocházející z Montrealu, udělal první krok k vytvoření průtokového systému. Navrhl přístroj pro počítání červených krvinek a kvasinek, což bylo umožněno přes kapiláry umístěné na mikroskopickém stolku. Fotodetektor byl připevněn k okuláru, který registroval procházející buňky (Moldavan 1934). Není jasné, zda

Moldavan vynalezl první cytometr, ale technika kterou navrhl se v následujících 30 letech rozvíjela (Givan 2001).

V polovině šedesátých let dvacátého století se Louis Kamensky pokusil vyřešit problém, týkající se automatizace cytologického třídění (Kamensky *et al.* 1965). Vycházel z Moldavanova návrhu a vytvořil cytometr, který je založen na spektrofotometrických měřeních (absorpce UV a rozptyl modrého světla), měřil rychlostí více než 500 buněk za sekundu. V roce 1967 Kamensky a Melamed vytvořily další typ cytometru, který umožňoval podrobnější analýzu pomocí fluorescence (Givan 2001).

V roce 1969 Marvin van Dilla a členové jeho týmu vyvinuly první fluorescenčně-detekční cytometr, který využíval princip hydrodynamické fokusace. Na rozdíl od systémů používající mikroskopy, má tento systém směr osvětlení a směr detekce navzájem kolmý; jako zdroj světla se používal argonový laser (van Dilla *et al.* 1969; Ditrich & Göhde 1969). Průtokové cytometry používané v dnešní době vychází z těchto návrhů (Doležel & Bartoš 2005).

Analýza rostlinných vzorků pomocí průtokové cytometrie zpočátku přinášela řadu problémů. Jedním z nich byla příprava suspenze buněk, tak aby nedošlo k porušení jader. V roce 1973 tuto metodu poprvé úspěšně aplikoval Heller, který provedl pokus na jádrech fazolí. Jejich kořenové špičky byly fixovány v etanolu, a poté enzymaticky ošetřeny pektinázou a pepsinem. Analýza jaderné DNA byla provedena po obarvení preparátu ethidium bromidem.

Skutečný počátek analýzy DNA u rostlin pomocí průtokové cytometrie přinesla až práce Galbraitha *et al.* (1983) a znamenala skutečný počátek analýzy DNA u rostlin pomocí průtokové cytometrie (Doležel & Bartoš 2005).

### **3.6.2. Charakteristika metody**

V současnosti patří průtoková cytometrie (Flow CytoMetry, FCM) mezi perspektivní metody používané v základním i aplikovaném výzkumu. Může být použita např. na stanovení obsahu jaderné DNA, určení ploidie, studiu genové exprese, počítání a určení typu krevních částic, analýzu buněčného cyklu, detekci a charakterizaci mikroorganismů, aj. (Suda 2005).

Měření pomocí průtokové cytometrie se uskutečňuje v pohybu a zaznamenává vybrané optické vlastnosti jednotlivých částic; nejčastěji bývá měřena intenzita fluorescence.

Před vlastním měřením se na dvoušroubovici DNA specificky a kvantitativně (množství fluorochromu se rovná množství DNA) naváže fluorescenční barvivo (fluorochrom). Fluorescenční barvivo ozáříme světlem vhodné vlnové délky, barvivo se excituje (elektrony přejdou do vyšší energetické hladiny), přitom se uvolní tepelná a světelná (= fluorescence) energie. Tento stav je však nestabilní a elektrony se vrátí zpět na základní hladinu. Jelikož se část energie ztrácí ve formě tepla, má vyzářené světlo delší vlnovou délku než původní excitační záření. Díky tomu lze obě záření pomocí filtrů od sebe oddělit a fluorescenci detekovat a následně zobrazit na výstupním počítači (Suda 2005).

V ideálním případě by měla být fluorescence všech jader ve stejné růstové fázi shodná. Ve skutečnosti to tak není a tuto variabilitu popisuje tzv. variační koeficient (CV), vypočítaný jako podíl směrodatné odchylky a průměrné pozice píku. Obvykle se hodnota koeficientu pohybuje v rozmezí 1-10 %, ale pro přesnější měření (např. detekce aneuploidie) by tato hodnota neměla přesáhnout 3 %. Daný koeficient vypovídá o rozlišovací schopnosti konkrétního měření a platí, že za předpokladu stejné velikosti píku lze odlišit objekty, jejichž rozdíl v obsahu DNA odpovídá dvojnásobku CV. Musíme brát v potaz konkrétní studovaný materiál a použité fluorescenční barvivo. Druhy s vysokým obsahem sekundárních metabolitů a s malým množstvím DNA mají koeficient kolem 5 %. Nejlepší měření mají CV slabě přes 0,5 % (Suda 2005).

Aby cytometr správně fungoval, musí se provádět pravidelné optimalizace jeho nastavení, což vede k nízkým hodnotám CV a k potlačení nespecifických signálů pozadí. Důležitá je i kontrola linearit měření (částice s dvounásobným obsahem DNA musí ležet na lineární ose ve dvounásobné vzdálenosti). K tomu slouží kalibrační částice, jejichž fluorescence vykazuje velmi nízké hodnoty rozptylu např. obarvené pstruží nebo kuřecí erytrocyty či uměle vytvořené fluorescenční kuličky (Suda 2005).

Kvalitu analýzy ovlivňuje i fluorescenční barvivo. V cytometrické praxi se používají tři základní skupiny fluorochromů, které se dělí podle způsobu vázání na nukleovou kyselinu. První skupina látek se neselektivně vmezeřuje do dvoušroubovice DNA, což dovoluje stanovit celkové množství nukleové kyseliny. Sem patří např. propidium jodid (PI) a ethidium bromid (EB). Propidium jodid je používanější, protože má histogramy s nižšími CV a je méně toxický. Druhá skupina látek se váže k oblastem DNA bohaté na A-T báze. Nejpoužívanější je DAPI (4,6-diamidino-2-fenylindol). Jejich histogramy se vyznačují vysokou rozlišovací schopností a umožňují detekovat částice lišící se jen nepatrně v množství či složení DNA. Nedá se ale použít pro zjištění absolutního množství DNA. Poslední skupinou jsou

fluorescenční barviva (např. antibiotika mitrmycin, chromomycin), které se váží k úsekům bohatým na G-C báze. V taxonomických studiích se však používají jen ojediněle (Suda 2005).

K tomu abychom správně určili ploidii či absolutní množství DNA studovaného druhu, musíme používat standardy (= materiál se známým počtem chromozómů či známou velikostí DNA). Vlastnosti neznámého objektu můžeme posoudit na základě poměru intenzity fluorescence zkoumaného materiálu a standardu. V současnosti se používá tzv. interní standardizace, kdy je analyzovaný materiál v odpovídajícím poměru smíchán se standardem a oba vzorky jsou homogenizovány, barveny a současně měřeny. Přesnost měření ovlivňuje i poměr fluorescencí mezi standardem a vzorkem (Suda 2005).

Největší přednosti průtokové cytometrie jsou jednoduchá příprava vzorků, rychlost analýz, nedestruktivnost, možnost analyzovat širokou škálu pletiv, nezávislost na dělicích buňkách, snadná detekce subpopulací částic a samozřejmě také nízké finanční náklady analýz, na druhou stranu pořízení vlastního přístroje je velmi nákladné (Suda 2005).

Vlastní cytometrické měření je rychlé a lze při něm analyzovat i několik stovek jader za sekundu. Snadno se tak získávají informace o množství DNA, stupni ploidie nebo dalších vlastnostech zkoumaného vzorku. Cytometrická analýza je schopna změřit 10 000 jader za tři a půl minuty, proto se stala běžnou součástí biosystematických prací (Suda 2005). Ideální rychlost dosahující velké přesnosti je 5 až 10 částic za sekundu (Šarhanová, osobní sdělení).

Průtoková cytometrie je taktéž velmi ohleduplná ke studovaným vzorkům, jelikož na analýzu stačí nepatrná část pletiva a nedochází tak k destrukci celé rostliny. To umožňuje studium rostlin v časných fázích ontogenetického vývoje, či vzácných a ohrožených druhů, u kterých by sběr celé rostliny mohl vést ke zničení studované populace (Suda 2005).

Jádra sloužící k přípravě vzorků se většinou získávají z listových pletiv, hlavně mladých listů, kde je malý obsah sekundárních metabolitů. Pro analýzu lze také využít všechny rostlinné orgány – od kořenů přes lodyhy, kališní a korunní lístky, prašníky i semena. Problém představují pouze dužnaté plody (Suda 2005).

K výhodám průtokové cytometrie patří skutečnost, že metoda dovoluje pracovat s mitoticky neaktivními buňkami, které v diferencovaných pletivech převažují. Díky tomu, že intenzita fluorescence každé částice je snímána samostatně, lze lehce odhalit směsné vzorky, endoreduplikaci či mixoploidii (Suda 2005).

Největším omezením metody je nutnost pracovat s čerstvým, živým materiálem. Už pouhé zvadnutí rostliny se projeví na zhoršení kvality výsledných histogramů. Což snižuje



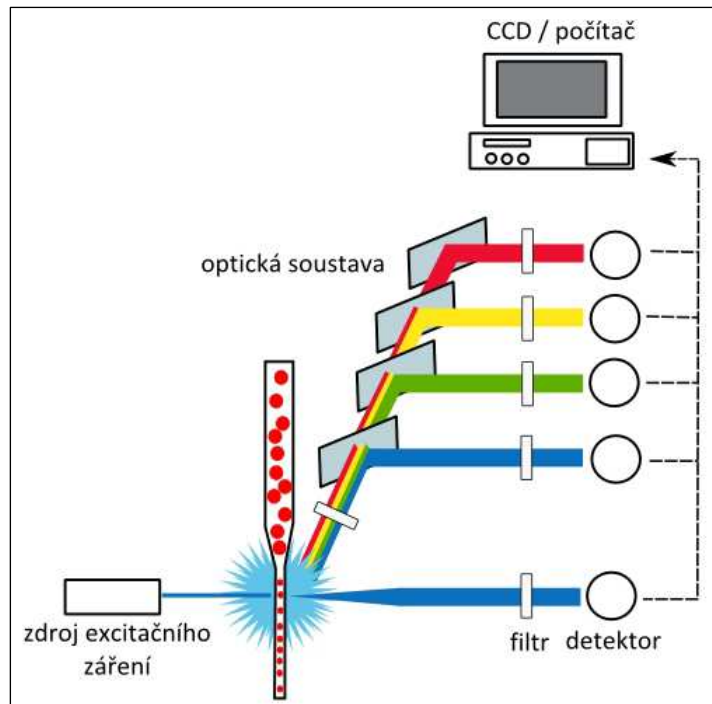
využití FCM v terénní botanické praxi. V chladu lze rostliny skladovat pouze několik dnů, u těch nejodolnějších druhů s tuhými listy až měsíc. Některé druhy umožňují analýzu i po vysušení např. zástupce čeledi vřesovitých (*Ericaceae*), lipnicovitých (*Poaceae*) a šáchorovitých (*Cyperaceae*). Klasické počítání chromozómů v roztlakových preparátech vítězí nad cytometrií v citlivosti detekovat aneuploidní jedince. Problémy přináší také rostliny obsahující sekundární metabolity, které negativně ovlivňují vazbu fluorescenčního barviva na dvoušroubovici DNA např. kakostovité (*Geraniaceae*), růžovité (*Rosaceae*, včetně rodu *Rubus*), dále i rostliny s vysokým obsahem slizových látek v listech např. brutnákovité (*Boraginaceae*). Tato omezení však nejsou nepřekonatelná (Suda 2005).

Jedinečnou aplikaci průtokové cytometrie může být stanovení reprodukčního způsobu na základě určení ploidie embrya a endospermu u zralých semen. Jelikož kromě klasického pohlavního rozmnožování může potomstvo rostlin vznikat samovolně bez účasti otcovské rostliny (apomixie), roli zde mohou hrát i neredukovaná vajíčka či pylová zrna (Suda 2005).

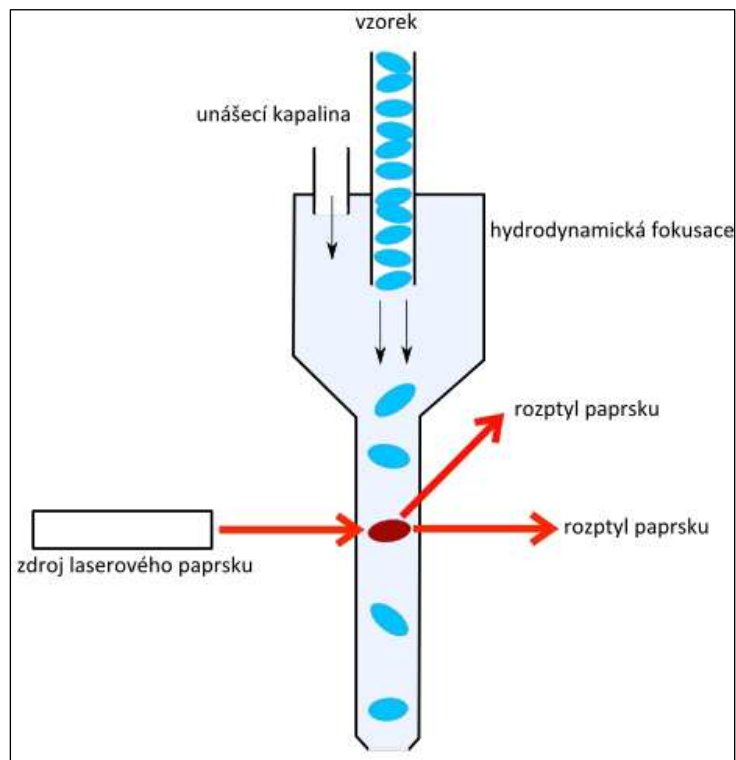
### **3.6.3. Instrumentace průtokového cytometru**

Průtokový cytometr se skládá z průtokové komůrky, optické soustavy, zdroje excitačního světla, souboru fotonásobičů a zesilovačů a části počítačové (Obr. 3)

Jádrem přístroje je průtoková komůrka, která řadí jednotlivé analyzované částice tak, aby se pohybovaly jedna za druhou v úzkém středovém svazku (Suda 2005). Tento proces je spravován fluidikou systému. Do fluidního systému se řadí kromě průtokové komůrky, také nosná kapalina a hydrodynamická fokusace ([www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf](http://www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf)). Hydrodynamická fokusace představuje suspenzi částic, která je přiváděna do komůrky tenkou kapilárou o relativně velkém průměru, kolem které proudí unášecí kapalina. Tato kapalina bývá do komůrky vháněna pod vyšším tlakem než suspenze částic, což nutí všechny částice pohybovat se jen v úzké centrální části proudu. Díky tomu je zabráněno vzniku shluků a částice se pohybují v řadě jedna za druhou k ohnisku zdroje excitačního záření (Obr. 4) (Suda 2005).



Obr. 3 Schéma průtokového cytometru



Obr. 4 Schéma průtokové komůrky

V průtokové cytometrii bývá použito několik zdrojů excitačního světla např. lasery, vysokotlaké rtuťové výbojky (Suda 2005) nebo obloukové lampy ([www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf](http://www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf)).

Fluorescence částic vyzářená po jejich projití světelným paprskem je sbírána optickou soustavou filtrů a zrcadel a převáděna na pulsy elektrického proudu pomocí fotonásobičů. (Suda 2005). Fluorescenční měření v různých vlnových délkách může poskytovat řadu kvantitativních i kvalitativních údajů. Počet detektorů se liší v závislosti na stroji a jeho výrobcu ([www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf](http://www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf)). Po zesílení signálu a dalším zpracování dochází k jeho digitalizaci a následnému uchování v počítači ve formě histogramu zobrazujícího relativní intenzitu fluorescence jednotlivých izolovaných částic (Suda 2005).

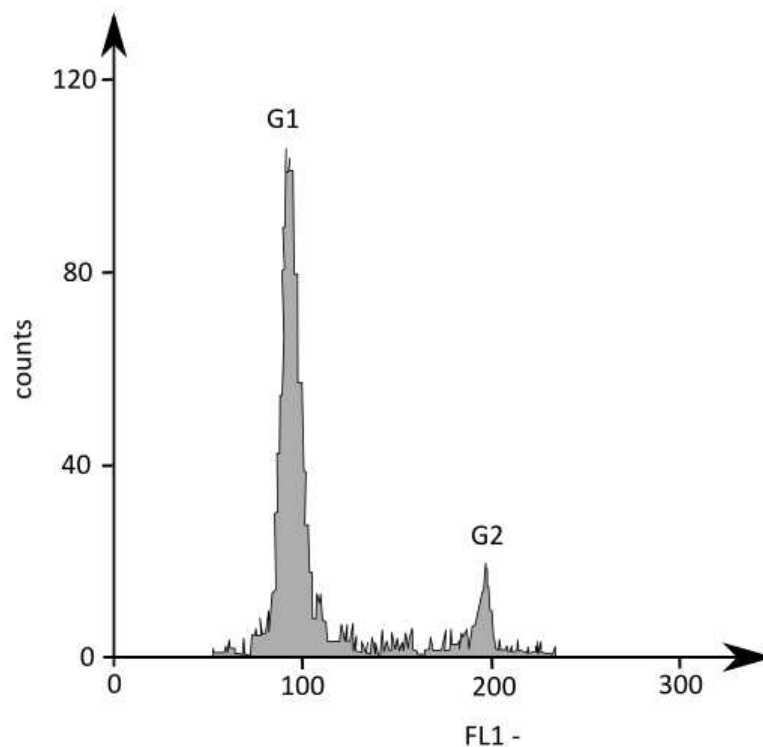
### **3.7. Obsah jaderné DNA a její rozložení**

Během života buňky se její obsah DNA cyklicky mění, což se odráží na výstupech cytometrických analýz. Období mezi dvěma buněčnými děleními se rozděluje do třech fází:

1) fáze růstu (G1 fáze), kdy buňka obsahuje základní množství DNA (2C – hodnota C určuje velikost DNA haploidní chromozomové sádky);

2) fáze, ve které dochází k duplikaci DNA (S fáze), na jejím konci mají buňky dvojnásobné množství DNA (4C);

3) pokračuje fáze růstu, kdy je hladina DNA udržována na dvojnásobné hodnotě (G2 fáze). Následuje mitóza, kdy se obsah DNA mateřské buňky rozdělí mezi dvě buňky dceřiné, kdy je obsah DNA opět 2C (Doležel 1991).



Obr. 5 Typický výstup z průtokového cytometru

Na typickém výstupu z průtokového cytometru vidíme základní pík, který představuje G1 fázi buněčného cyklu. Ve dvojnásobné vzdálenosti můžeme vidět menší pík v G2 fázi. Mezi těmito píky probíhá S fáze. Před základním píkem můžeme pozorovat tzv. šum, který je tvořen zbytky buněčných stěn, autofluorescencí chloroplastů a jiných částí buňky (Obr. 5).

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Rostlinný materiál

Měřené rostliny byly sbírány v letech 2008 - 2010, lokality včetně souřadnic uvádí tabulka číslo 1. Rostlinný materiál byl sbírán pracovníky katedry botaniky PřF UP (Doc. Trávníček, Dr. Vašut, Dr. Dančák) a správnost určení byla revidována Doc. Trávníčkem. *Rubus indusiatus* a *R. vatavensis* byly sesbírány v nadmořské výšce 430-535 m n. m. a *R. ser*

*Glandulosi* až ve výšce 730 m n. m. V případě populací Dušné, Rusavy a B (1-4) bylo na lokalitě sebráno více studovaných rostlin. Z rostlin byly sbírány i semena, která byla později vyseta a po vyklíčení pěstována ve studeném skleníku UP v Olomouci, kde teploty v zimě neklesly pod 4 °C nebo na pozemku v areálu Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Holicích. Velikost genomu všech studovaných vzorků byla zjišťována u rostlin vypěstovaných ve skleníku UP z nasbíraných semen.

Tabulka 1: Popis lokalit a souřadnic jednotlivých populací rodu *Rubus*

populace	taxon	čísla vzorků	lokality	souřadnice
R 56/08	<i>R. vatavensis</i>	1101	Sedlíkovice (Strakonice), les 0,7 km J (-JJZ) obce (Leg. BT)	49°14'39"N 13°59'37"E
R 57/08	<i>R. jari-cimrmanii</i>	343	Paračov (Strakonice), les Hájek 0,8 km JZ obce (Leg. BT)	49°11'38"N 13°59'12"E
R 59/08	<i>R. indusiatus</i>	348	Brusy (Strakonice), les u silnice 0,8 km JZ obce (Leg. BT)	49°17'54"N 14°00'43"E
R 63/08	<i>R. indusiatus</i>	1001	Kladruby (Horažďovice), les 07 km ZSZ obce (Leg. BT)	49°16'18"N 13°45'20"E
R 17/08	<i>R. ser. Glandulosi</i>	370 - 387	Smědeč (Brloh), les u silnice 1,2 km JZ obce (vpravo od silnice ve směru na Ktiš) (Leg. BT)	48°55'47"N 14°08'30"E
Dušná 1+2	<i>R. bifrons</i>	21, 22, 25, 147, 155	Vsetínsko (CHKO Beskydy) JZ lokality Dušná (Leg. MD)	49°22'46.429"N 18°1'14.397"E
Rusava 1+2	<i>R. bifrons</i>	186, 187, 188, 190, 201, 202, 205	Rusava, les SZ od přehrady Rusava (Leg. MD)	49°20'10.810"N 17°43'16.485"E
B 1+3+4	<i>R. bifrons</i>	56, 57, 85, 88, 90, 95, 126, 131, 132, 167, 177, 182, 183, 277, 284, 289, 294, 305, 309, 310, 312, 314, 315, 316, 317, 319, 383	Valašská Bystřice/Rožnov pod Radhoštěm, hřeben vrcholu Hlaváčky, ca. 2 km SV od kostela ve středu obce. (Leg. RJV)	49°25'39.315"N 18°7'36.844"E
Ratiboř 1	<i>R. bifrons</i>	191, 192, 194, 195, 196, 198, 199, 200, 225, 230	Jablůnka, les u řeky Ratibořka, která nedaleko ústí do Vsetínské Bečvy (Leg. MD)	49°22'12.742"N 17°56'23.275"E

## 4.2. Cytometrie

### 4.2.1. Příprava vzorku

Rostlinný materiál byl odebrán ze zelených částí rostlin - listů. Ze středních částí listu byl odebrán vzorek o velikosti 0,5 x 0,5 cm, tak aby neobsahoval střední žilku, a přenesen na Petriho misku. Ke vzorku byl přidán přibližně stejně velký list standardu *Zea mays*, CE-777, (2C = 5,43 pg, Lysák & Doležel 1998). Dále bylo k rostlinnému materiálu přidáno 1000 µl studovaného pufru (v případě pufrů jednosložkových) nebo 500 µl v případě dvousložkového Otta a vzorek i standard byly rozsekány žiletkou. Suspenze jader byla přefiltrována přes nylonový filtr (42 µm) do kyvety. K takto předpřipravenému vzorku bylo přidáno ještě 300 µl daného pufru (jednosložkový) nebo 1000 µl dvousložkového (Otto II.) a po 10 minutách byl vzorek obarven 50 µl PI. Po dalších 5 minutách byl vzorek analyzován pomocí průtokového cytometru a výsledky zaznamenány.

### 4.2.2. Stanovení velikosti genomu

U studovaných jedinců byla stanovena celková velikost genomu (2C) a velikost jedné chromozomové sady (1Cx), která umožnila porovnání různých ploidií.

Velikost genomu studovaných rostlin byla spočítána z poměru píků standardu a studovaného vzorku dle vzorce: absolutní velikost genomu vzorku (2C) = (pozice píku vzorku / pozice píku standardu) x absolutní velikost genomu standardu (2C) [pg DNA].

## 4.3. Roztlakové preparáty kořenových špiček

Pro potvrzení ploidiie u rodu *Rubus* byla použita metoda roztlakových preparátů kořenových špiček barvených pomocí fluorescenčních barviv. Vzhledem k nízké variabilitě ve velikosti genomu byly ke stanovení počtu chromozómů použité dva vzorky s dobře vyvinutými kořenovými špičkami: 147 (Dušná 2) a 202 (Rusava 2). Vzorky roztlakových preparátů byly obarveny příslušnými barvivy a pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan.

### **Příprava roztakového preparátu:**

Ostružiníky jsem vyjmula z květináče a odstříhla asi 1 cm kořínku s viditelnou kořenovou špičkou. Po propláchnutí v destilované vodě jsme je předpůsobily v 0,1% roztoku kolchicinu (navážka 0,1 g kolchicinu na 100 ml vody), ve kterém jsme špičky nechali 2 hodiny. Poté byly kořínky zafixovány ve Farmerově fixáži (96% etanol : ledová kyselina octová - v poměru 3 : 1) po 24 hodin. Takto připravené špičky jsme dále obarvily dle:  
a) Feulgena b) DAPI

#### Barvení dle Feulgena

Kořenové špičky necháme 10 minut v destilované vodě propláchnout, dále je 11 minut hydrolyzujeme v 1M HCl při 60 °C, obarvíme Schiffovým činidlem a hodinu necháme stát ve tmě. Poté na ně necháme 30 minut působit enzymy (2% celulóza/pektináza), promyjeme destilovanou vodou, roztlačíme v 45% kyselině octové a necháme 10-15 minut stát na suchém ledu. Po důkladném promrznutí odloupneme žiletkou krycí sklíčko, promyjeme v etanolové řadě (70%, 90% a 96% roztok) a necháme na vzduchu schnout 10 minut. V mém případě byly vzorky dobarvovány 5 µg/ml DAPI a opět překryty krycím sklíčkem. Až do pozorování v mikroskopu byly vzorky uchovávány ve tmě a analyzovány nejpozději druhý den.

#### Barvení DAPI

Kořenové špičky promyjeme v citrátovém pufru – 3x po 10 minutách, opět necháme působit enzymy celulózu a pektinázu v koncentraci 2% po dobu 80 minut. Znovu promyjeme v citrátovém pufru, roztlačíme v 45% kyselině octové a necháme stát 10-15 minut na suchém ledu. Po promrznutí odloupneme krycí sklíčko, promyjeme v etanolové řadě (70%, 90% a 96%) a necháme na vzduchu schnout 10 minut. Nakonec obarvíme 5 µg/ml DAPI a přikryjeme krycím sklíčkem. Vzorky byly opět až do pozorování uchovány ve tmě, aby nedošlo ke snížení intenzity fluorescence.

#### 4.4. Testování různých chemických pufrů

Ke zjištění vhodnosti různých pufrů pro studium velikosti genomu pomocí průtokového cytometru v rodě *Rubus* jsem vybrala 4 rostliny, které měli vyvinuté i mladé listy. Tři z nich se nacházejí v kultivaci ve studeném skleníku a jeden na pozemku Katedry botaniky UP v Holicích (Obr. 22 a 23). Měřené vzorky listů jsem testovala na několika pufrech: Otto I a II – jedná se o dvousložkový pufr běžně používaný v rostlinné průtokové cytometrii, Tris-MgCl<sub>2</sub>, LB01, LB01 s přidáním merkptoethanolem (nejvíce používaný na katedře botaniky UP), LB01 s polyvinylpyrrolidonem (PVP) a merkptoethanolem a HEPES pufr. Každý vzorek byl změřen 2x.

##### Složení jednotlivých pufrů:

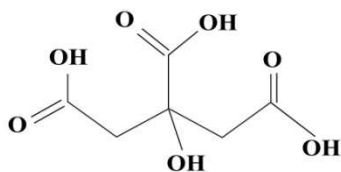
###### Otto I (Otto 1990)

Pro přípravu pufru je potřeba 0,1 M monohydrát kyseliny citronové (4,2 g) a 0,5% Tween 20 (1 ml), oba se rozpustí v destilované vodě, vzniklý roztok se přelije do analytické baňky o objemu 200 ml a doplní se destilovanou vodou po rysku. Poté se přefiltruje přes filtr o velikosti 0,22 µm. Je uchováván v lednici při 4 °C.

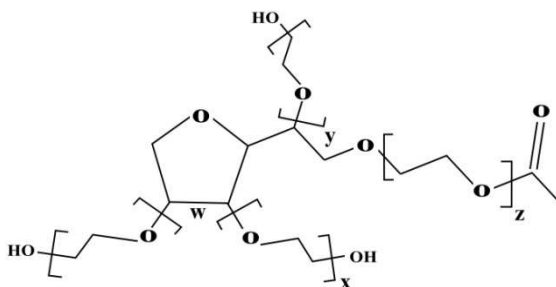
Hlavní chemikálií tvořící pufr Otto I je kyselina citrónová, která slouží k fixaci izolovaných jader a ke zlepšení přístupnosti barviv k chromatinu. Další složkou je Tween 20 [polyoxoethylensorbitanmoholaurát], detergent, který usnadňuje rozrušení cytoplazmy a uvolnění jader, také odstraňuje zbytky cytoplazmy z jejich povrchu, rozptyluje chloroplasty a snižuje tendenci shlukování zbytků cytoplazmy s jádry (Doležel *et al.* 2006).

Je známo, že izolovaná jádra rozsekaná v pufru Otto I mohou stát v pufru delší dobu při pokojové teplotě bez negativního vlivu na obarvení DNA. Naopak, po přidání Otto II by se měl vzorek co nejrychleji změřit, jinak dojde k poškození jader (Doležel & Bartoš 2005).





Obr. 6 Kyselina citrónová



Obr. 7 Tween 20

### Otto II (Doležel & Göhde 1995)

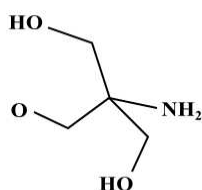
Pufir Otto II je připraven z 0,4 M dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (28,65 g) a destilované vody. Rozpuštěná sůl se přelije do analytické baňky o objemu 200 ml a doplní se po rysku destilovanou vodou. Poté se přefiltruje přes filtr o velikosti 0,22  $\mu\text{m}$ . Je uchováván při pokojové teplotě za tmy.

Ionty hydrogenfosforečnanu sodného slouží v pufru k udržení potřebné iontové síly (Doležel & Bartoš 2005).

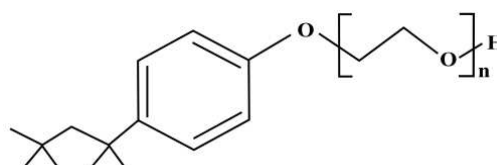
### Tris-MgCl<sub>2</sub> (Pfosser *et al.* 1985)

Tento pufr je připraven z 0,2 M Tris (4,84 g), 4 mM hexahydrátu chloridu hořečnatého (162,64 g) a 0,5% Tritonu X-100 (1 ml). Všechny látky se rozpustí a přelijí do analytické baňky o obsahu 200 ml a dolijí destilovanou vodou. Dále se pH roztoku upraví na 7,5, přefiltruje se přes filtr o velikosti 0,22  $\mu\text{m}$  a uchová v lednici při 4 °C.

Hořečnaté ionty mohou být použity pro stabilizaci jaderného chromatinu. Organická látka Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethan] udržuje stabilní pH pufru, obvykle v rozmezí 7-9. Triton X-100 [oktylphenol ethoxylát] je detergent, který působí obdobně jako Tween 20. Sůl MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O slouží k udržení iontové síly (Doležel & Bartoš 2005).



Obr. 8 Tris

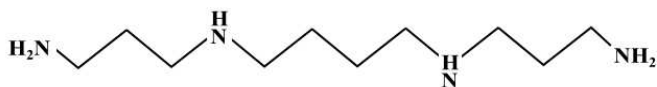


Obr. 9 Triton X-100

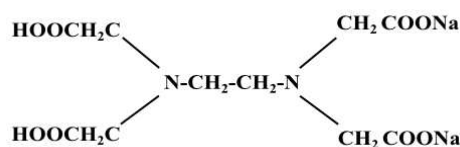
### LB01 (Doležel *et al.* 1989)

Pro přípravu pufru je potřeba 15 mM Tris (363,4 mg), 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA (148,9 mg), 0,5 mM spermin tetrahydrochlorid (34,8 mg), 80 mM chlorid draselný (1,193 g), 20 mM chlorid sodný (233,8 mg) a 0,1% Triton X-100 (200 µl). Všechny chemikálie se rozpustí a přelijí do analytické baňky o objemu 200 ml a dolijí se destilovanou vodou po rysku. Dále se upraví pH roztoku na 8 (pomocí 1 M HCl) a přefiltruje se přes filtr o velikosti 0,22 µm. Nakonec se pufr odpipetuje do menších objemů (10 ml zkumavek) a uchová při teplotě -20°C.

Důležitými složkami tohoto pufru jsou: spermin [N,N'-bis(3-aminopropyl)butan-1,4-diamin], Na<sub>2</sub>EDTA [disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové], anorganické soli a Triton X-100. Spermin může stabilizovat jaderný chromatin. Chelatační činidlo EDTA se používá k navázání dvojmocných kationtů Na<sup>+</sup>. Chelatuje ionty Na<sup>+</sup>, které jsou potřebné jako kofaktor nukleáz. Anorganické soli (NaCl, KCl) slouží k udržení přiměřené iontové síly. Triton X-100 je detergent a působí stejně jako Tween 20 (Doležel & Bartoš 2005).



Obr. 10 Spermin



Obr. 11 EDTA

### LB01 s merkaptoethanolem

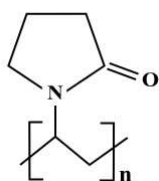
Příprava pufru viz LB01, po úpravě pH se přidá merkaptoethanol 110 µl na 200 ml pufru. Dále se pufr odpipetuje do menších objemů (10 ml zkumavek) a opět se uchová při teplotě -20°C. S merkaptoethanolem se musí pracovat v digestoři, jelikož je tato látka toxická.

Redukční činidlo merkaptoethanol chrání chromatin, působí v jaderné suspenzi jako antioxidant, váže na sebe fenolové sloučeniny, a tím zabraňuje jejich interakci s obarvenou DNA (Doležel & Bartoš 2005). Koncentrace těchto antioxidantů závisí na složení a množství sekundárních metabolitů v jaderné suspenzi (Jedrzejczyk & Sliwiska 2010).

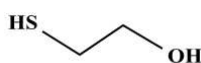
## LB01 s merkptoethanolem a PVP

Příprava pufru viz LB01 s merkptoethanolem, kromě toho se navíc přidá 4 g PVP na 200 ml (20 g/l). PVP se rozpouští už s chemikáliemi při přípravě pufru, merkptoethanol se přidává až nakonec. Pufr se uchovává stejně jako předchozí LB01 pufr.

PVP [polyvinylpyrrolidon] působí na složky pufru podobně jako merkptoethanol. Jelikož fenoly ovlivňují obarvování DNA, může být jejich přítomnost zdrojem stechiometrických chyb v odhadu obsahu jaderné DNA (Thiem & Sliwiska 2002).



Obr. 12 PVP

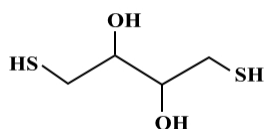


Obr. 13 Merkptoethanol

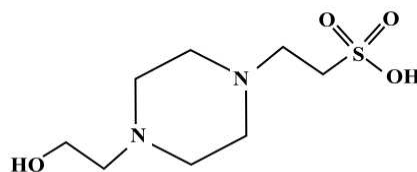
## Hepes pufr (Arumuganathan & Earle 1991)

Pro přípravu pufru je potřeba 10 mM síranu hořečnatého, 50 mM chloridu draselného, 5 mM HEPES a 10% Triton X-100. Tyto látky se rozpustí v destilované vodě a pH roztoku se upraví na 8. Poté se do pufru přidá PVP (20 g/l), dithiothreitol (1 g/l) a Triton X-100 (28 ml/l). Takto připravený pufr se přefiltruje přes filtr o velikosti 0,22  $\mu\text{m}$ . Uchovává se v lednici při 4  $^{\circ}\text{C}$ .

Dithiothreitol [1,4-bis(sulfanyl)butan-2,3-diol] je velmi silné redukční činidlo díky tendenci tvořit šestičlenné kruhy s vnitřní disulfidovou vazbou. Tato látka chrání chromatin a zabraňuje vzájemnému působení mezi fenolovými sloučeninami a obarveným DNA (podobně jako u PVP a merkptoethanolu). Hepes [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethynsulfonová kyselina] slouží k udržení stabilního pH ve fyziologickém roztoku v rozmezí 7-8 (Doležel & Bartoš 2005).



Obr. 14 Dithiothreitol

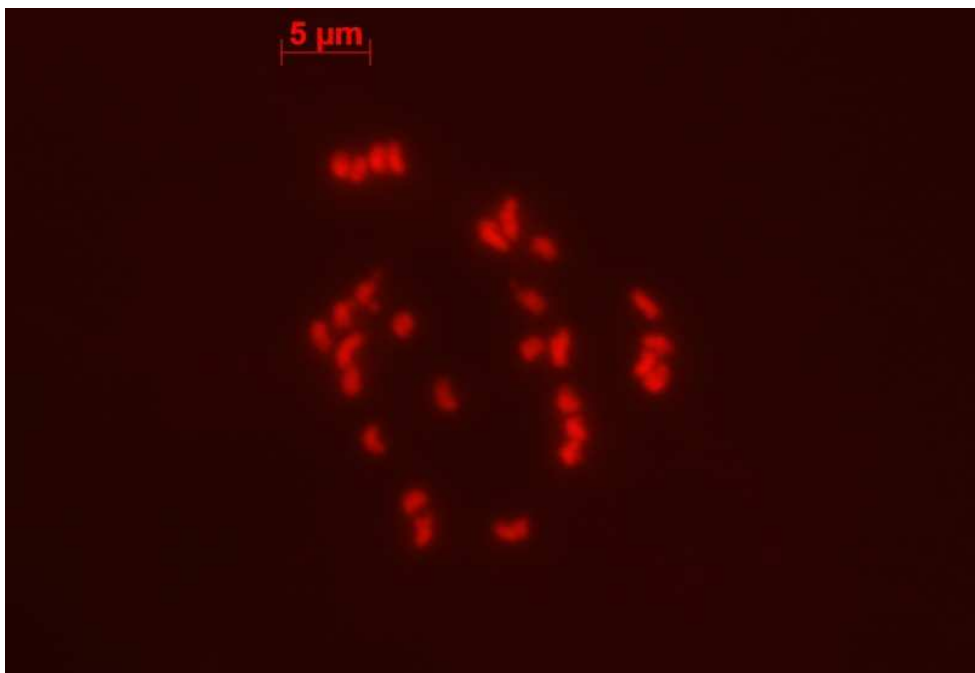


Obr. 15 Hepes

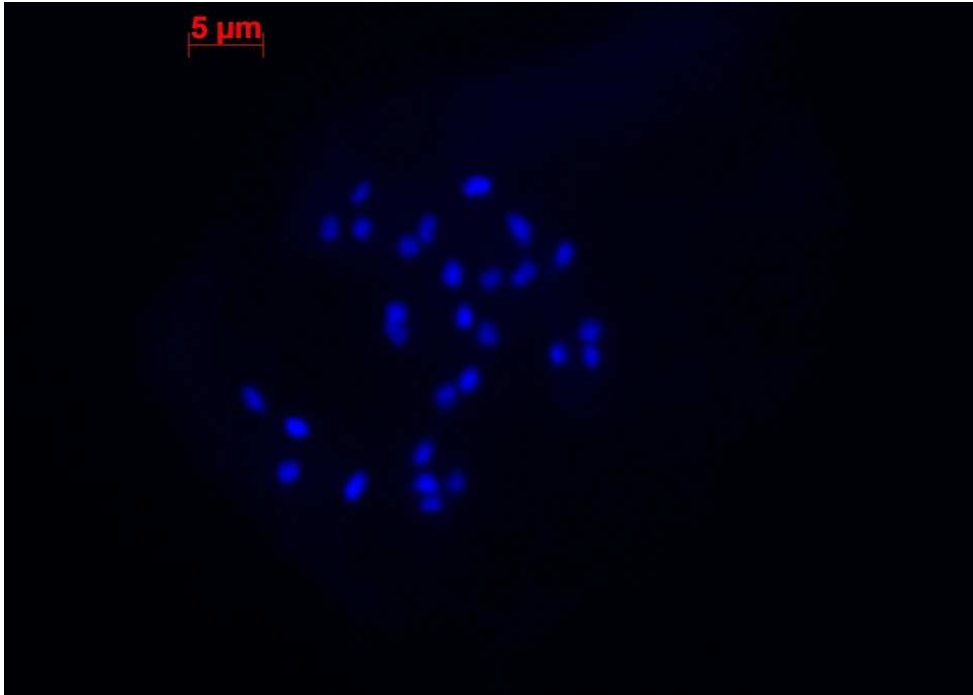
## 5. Výsledky

### 5.1. Roztlakové preparáty kořenových špiček u rodu *Rubus*

K určení počtu chromozomů byly použity dva vzorky 147 a 202. U obou byl pomocí roztlakových preparátů určen počet chromozomů na 28, což odpovídá tetraploidní úrovni (základní chromozomové číslo  $x = 7$ ). U těchto vzorků byla velikost genomu pomocí průtokového cytometru stanovena na 1,62 pg u vzorku č. 202 a 1,63 pg u vzorku č. 147. Velikost genomu pro jednu chromozomovou sadu (1Cx) je 0,41 pg a tato byla využita pro výpočet ploidní úrovně u všech cytometrovaných vzorků. Obr. 16 a 17 ukazují oba typy použitého fluorescenčního barvení – pomocí Shiffova činidla a DAPI.



Obr. 16 Chromozomy kořenových špiček ostružiníku, obarvené Schiffovým činidlem dle Feulgena (vzorek č. 202)



Obr. 17 Chromozomy kořenových špiček ostružiníku, obarvené DAPI (vzorek č.147)

## 5.2. Variabilita ve velikosti genomu u vybraných populací rodu *Rubus*

Celkově byla zjišťována velikost genomu u 71 zástupců druhů *R. bifrons*, *R. indusiatus*, *R. ser. Glandulosi*, *R. vatavensis* a *R. jari-cimrmanii*.

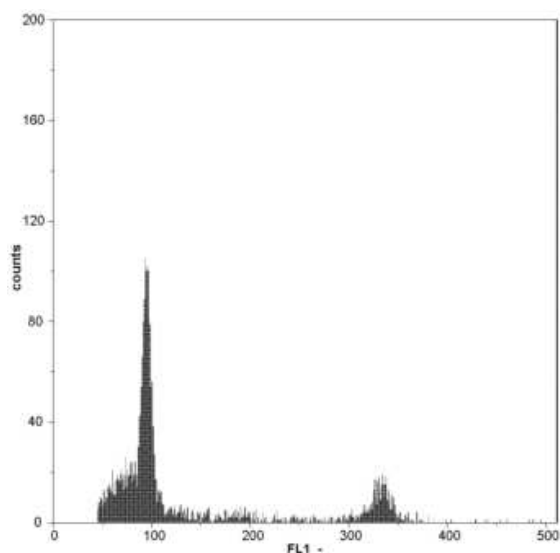
Převážná většina námi studovaných jedinců byla tetraploidní, pouze 6 jedinců bylo hexaploidních (vzorky 379, 384 a 385 – *R. ser. Glandulosi* a 88, 230, 319 – *R. bifrons*).

Celkový přehled naměřených hodnot u studovaných jedinců uvádí tabulka 2. Průměrná celková velikost genomu tetraploidů byla  $1,57 \text{ pg} \pm 0,08$  a pohybovala se v rozmezí 1,42 - 1,80 pg. Průměrná celková velikost genomu hexaploidů byla  $2,33 \text{ pg} \pm 0,11$  (v rozmezí 2,11 – 2,44 pg). Průměrná hodnota 1Cx (velikost genomu jedné chromozomové sady) byla  $0,392 \text{ pg} \pm 0,02$ . Průměrná hodnota CV (= koeficient variability) vzorků byla  $6,05 \pm 1,30$ . CV standardu *Zea mays* odpovídalo hodnotě  $4,54 \pm 1,78$ .

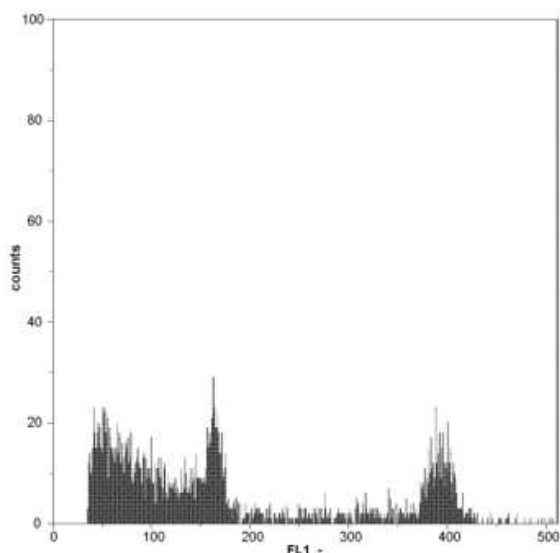
Tabulka 2: Data získána při měření absolutního obsahu DNA pomocí průtokového cytometru. Číslo – číslo rostliny v kultivaci (pracovní označení); 1Cx – velikost genomu jedné chromozomové sady; abs. VG – absolutní velikost genomu dané rostliny.

číslo	taxon	populace	cv standard	cv vzorek	ploidie	1Cx	abs. VG	pufr
309	<i>R. bifrons</i>	B1	3.16	8.65	4x	0.405	1.62	LB01+PVP
316	<i>R. bifrons</i>	B1	2.55	8.20	4x	0.391	1.57	LB01+PVP
284	<i>R. bifrons</i>	B1	4.63	5.23	4x	0.424	1.70	LB01+PVP
314	<i>R. bifrons</i>	B1	3.19	5.23	4x	0.396	1.58	LB01+PVP
289	<i>R. bifrons</i>	B1	3.81	4.06	4x	0.380	1.52	LB01+PVP
312	<i>R. bifrons</i>	B1	4.11	4.53	4x	0.396	1.59	LB01+PVP
317	<i>R. bifrons</i>	B1	3.33	4.21	4x	0.403	1.61	LB01+PVP
310	<i>R. bifrons</i>	B1	4.17	5.10	4x	0.391	1.56	LB01+PVP
305	<i>R. bifrons</i>	B1	3.53	5.05	4x	0.390	1.56	LB01+PVP
294	<i>R. bifrons</i>	B1	4.06	3.85	4x	0.395	1.58	LB01+PVP
315	<i>R. bifrons</i>	B1	3.90	4.31	4x	0.397	1.59	LB01+PVP
383	<i>R. bifrons</i>	B1	3.80	5.14	4x	0.382	1.53	LB01+PVP
277	<i>R. bifrons</i>	B1	4.07	4.23	4x	0.388	1.55	LB01+PVP
319	<i>R. bifrons</i>	B1	3.33	4.79	6x	0.389	2.34	LB01+PVP
90	<i>R. bifrons</i>	B3	5.44	5.39	4x	0.407	1.63	LB01+PVP
88	<i>R. bifrons</i>	B3	7.86	6.36	6x	0.406	2.44	LB01+PVP
95	<i>R. bifrons</i>	B3	5.08	5.80	4x	0.430	1.72	LB01+PVP
85	<i>R. bifrons</i>	B3	6.34	7.32	4x	0.393	1.57	LB01+PVP
126	<i>R. bifrons</i>	B4	3.37	4.10	4x	0.388	1.55	LB01+PVP
57	<i>R. bifrons</i>	B4	6.59	6.72	4x	0.392	1.57	LB01+PVP
56	<i>R. bifrons</i>	B4	5.78	5.70	4x	0.411	1.64	LB01+PVP
183	<i>R. bifrons</i>	B4	6.19	7.10	4x	0.382	1.53	LB01+PVP
182	<i>R. bifrons</i>	B4	6.26	5.61	4x	0.390	1.56	LB01+PVP
167	<i>R. bifrons</i>	B4	6.80	7.80	4x	0.403	1.61	LB01+PVP
131	<i>R. bifrons</i>	B4	7.23	6.62	4x	0.378	1.51	LB01+PVP
132	<i>R. bifrons</i>	B4	6.05	8.13	4x	0.384	1.54	LB01+PVP
177	<i>R. bifrons</i>	B4	14.05	8.33	4x	0.421	1.68	LB01+PVP
21	<i>R. bifrons</i>	Dušná 1	2.16	5.68	4x	0.374	1.50	LB01+PVP
22	<i>R. bifrons</i>	Dušná 1	4.09	6.37	4x	0.437	1.75	LB01+PVP
147	<i>R. bifrons</i>	Dušná 2	3.22	6.87	4x	0.382	1.53	LB01+PVP
155	<i>R. bifrons</i>	Dušná 2	3.23	4.40	4x	0.384	1.54	LB01+PVP
25	<i>R. bifrons</i>	Dušná 2	6.55	8.28	4x	0.419	1.68	LB01+PVP
196	<i>R. bifrons</i>	Ratiboř 1	6.06	6.92	4x	0.449	1.80	LB01+PVP
230	<i>R. bifrons</i>	Ratiboř 1	6.09	6.91	6x	0.407	2.44	LB01+PVP
225	<i>R. bifrons</i>	Ratiboř 1	5.98	5.80	4x	0.409	1.63	LB01+PVP
198	<i>R. bifrons</i>	Ratiboř 1	4.42	6.85	4x	0.421	1.68	LB01+PVP
191	<i>R. bifrons</i>	Ratiboř 1	4.41	6.38	4x	0.397	1.59	LB01+PVP
199	<i>R. bifrons</i>	Ratiboř 1	3.83	4.62	4x	0.400	1.60	LB01+PVP
200	<i>R. bifrons</i>	Ratiboř 1	5.06	7.36	4x	0.408	1.63	LB01+PVP
194	<i>R. bifrons</i>	Ratiboř 1	4.69	6.30	4x	0.399	1.60	LB01+PVP

192	<i>R. bifrons</i>	Ratiboř 1	3.62	5.89	4x	0.423	1.69	LB01+PVP
195	<i>R. bifrons</i>	Ratiboř 1	4.28	5.85	4x	0.414	1.66	LB01+PVP
190	<i>R. bifrons</i>	Rusava 1	2.86	6.67	4x	0.404	1.61	LB01+PVP
187	<i>R. bifrons</i>	Rusava 1	3.81	6.36	4x	0.411	1.64	LB01+PVP
188	<i>R. bifrons</i>	Rusava 1	3.81	6.49	4x	0.419	1.68	LB01+PVP
186	<i>R. bifrons</i>	Rusava 1	3.19	8.56	4x	0.385	1.54	LB01+PVP
202	<i>R. bifrons</i>	Rusava 2	3.15	6.28	4x	0.386	1.54	LB01+PVP
201	<i>R. bifrons</i>	Rusava 2	5.19	6.11	4x	0.397	1.59	LB01+PVP
205	<i>R. bifrons</i>	Rusava 2	4.24	6.36	4x	0.389	1.56	LB01+PVP
343	<i>R. jari-cimrmanii</i>	R57/08	3.87	7.16	4x	0.405	1.62	LB01+PVP
373	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	8.35	8.77	4x	0.378	1.51	LB01+PVP
385	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	7.64	7.85	6x	0.352	2.11	LB01+PVP
379	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	3.51	3.21	6x	0.380	2.28	LB01+PVP
381	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	3.28	6.37	4x	0.361	1.44	LB01+PVP
380	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	2.88	8.02	4x	0.363	1.45	LB01+PVP
375	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	3.92	5.67	4x	0.367	1.47	LB01+PVP
386	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	3.85	5.72	4x	0.356	1.42	LB01+PVP
374	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	3.06	5.31	4x	0.376	1.50	LB01+PVP
387	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	4.74	4.52	4x	0.373	1.49	LB01+PVP
378	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	5.45	7.58	4x	0.356	1.42	LB01+PVP
372	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	3.36	5.07	4x	0.354	1.42	LB01+PVP
377	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	3.36	5.29	4x	0.374	1.50	LB01+PVP
382	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	2.78	5.82	4x	0.384	1.53	LB01+PVP
384	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	3.36	4.33	6x	0.394	2.36	LB01+PVP
383	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	3.47	4.88	4x	0.379	1.52	LB01+PVP
371	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	4.86	4.97	4x	0.379	1.51	LB01+PVP
376	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	3.86	5.79	4x	0.372	1.49	LB01+PVP
370	<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	3.70	5.46	4x	0.375	1.50	LB01+PVP
348	<i>R. indusiatus</i>	R59/08	3.56	5.41	4x	0.359	1.44	LB01+PVP
1001	<i>R. indusiatus</i>	R63/08	2.98	7.38	4x	0.393	1.57	LB01+PVP
1101	<i>R. vatavensis</i>	R56/08	4.09	6.19	4x	0.360	1.44	LB01+PVP
<b>průměrná hodnota</b>			4.54	6.05		0.392		
<b>směrodatná odchylka</b>			1.78	1.30		0.02		



Obr. 18 Vzorek č. 202 bez ořezu



Obr. 19 Vzorek č. 379, který byl následně ořezán

Tabulka 3 uvádí 1Cx hodnoty jednotlivých populací *R. ser. Glandulosi* a *R. bifrons*. Z výsledků je zřejmé, že žláznaté ostružiníky *R. ser. Glandulosi* mají oproti taxonu *R. bifrons* nižší velikost genomu a to 0,371 pg, což odpovídá snížení o 7,4 % oproti průměrné velikosti jedné chromozomové sady u *R. bifrons*.

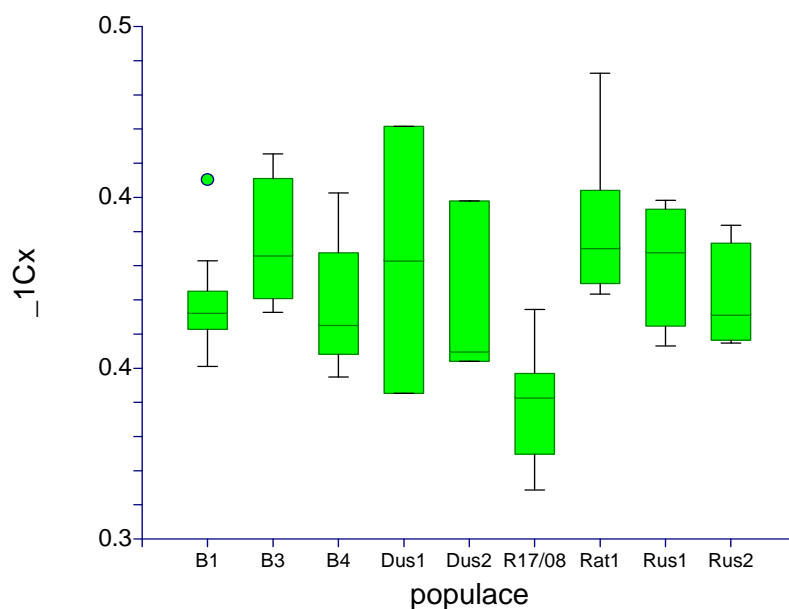
Variabilita v rámci *R. bifrons* neumožňuje jednotlivé populace od sebe odlišit na základě velikosti genomu. Jednotlivé populace je možno na základě velikosti genomu pouze přibližně rozdělit do dvou skupin. Velikost jedné chromozomové sady (1Cx) u populace B1, B4, Dušná 2 a Rusava 2 se pohybuje v rozmezí 0,390 pg až 0,395 pg. Oproti tomu velikost 1Cx u populací B3, Dušná 1, Rusava 1 a Ratiboř je větší a pohybuje se v rozmezí od 0,405 do 0,413 pg. Což je vidět na Obr. 20 krabičkových diagramů.

Tabulka 3: Průměrná velikost jedné chromozómové sady u studovaných populací *R. bifrons* a *R. ser. Glandulosi*.

taxon	populace	průměr 1Cx [pg]	± sm. odch
<i>R. bifrons</i>	B1	0.395	0.010
<i>R. bifrons</i>	B3	0.409	0.013
<i>R. bifrons</i>	B4	0.394	0.013
<i>R. bifrons</i>	Dušná 1	0.405	0.031
<i>R. bifrons</i>	Dušná 2	0.395	0.017
<i>R. bifrons</i>	Ratiboř 1	0.413	0.015
<i>R. bifrons</i>	Rusava 1	0.405	0.013



<i>R. bifrons</i>	Rusava 2	0.390	0.004
<i>R. ser. Glandulosi</i>	R17/08	0.371	0.011



Obr. 20 Variabilita ve velikosti genomu jedné chromozomové sady mezi jednotlivými populacemi

Rovněž v rámci všech studovaných taxonů, jsem zjistila jen malou variabilitu ve velikosti genomu (tabulka 4). Největší průměrnou velikost jedné chromozomové sady má *R. bifrons*  $1Cx = 0,401 \text{ pg} \pm 0,016$ . Nejmenší velikost  $1Cx$  byla zjištěna u jednoho studovaného zástupce *R. vatavensis* ( $1Cx = 0,360 \text{ pg}$ ). Celkově se studované taxony dají rozdělit na ty s menším genomem (*R. ser. Glandulosi*, *R. vatavensis* a *R. indusiatus*) oproti *R. jari-cimrmanii* a *R. bifrons*, které mají genom větší. Je ovšem třeba přihlídnout i na variabilitu uvnitř studovaných taxonů. Například u *R. bifrons* měl jedinec 21 z populace Dušná  $1Cx = 0,374 \text{ pg}$ .

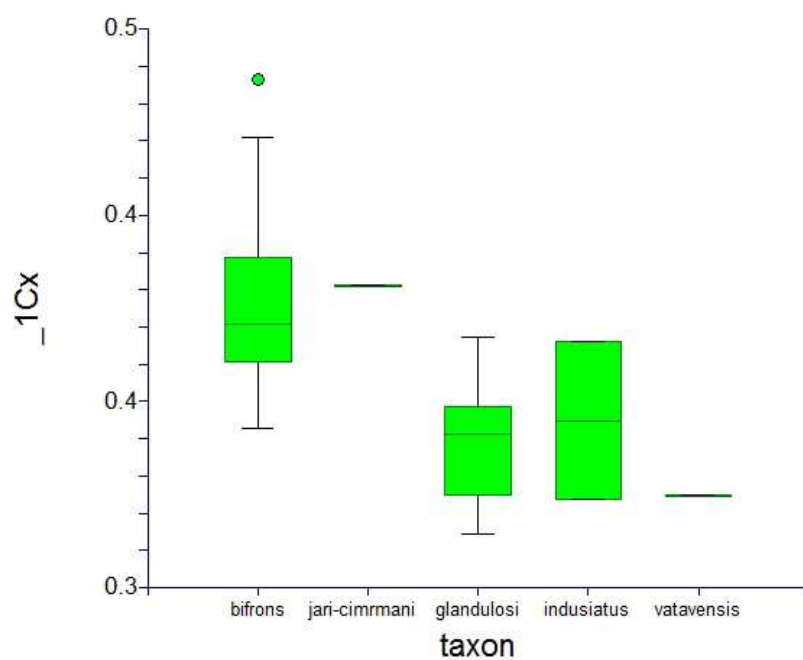
Na Obr. 21 je vidět, že *R. jari-cimrmanii* a *R. vatavensis* byly zastoupeny pouze jedním jedincem, tedy tam žádná variabilita není. Přesto se výrazně odlišují od většiny hodnot ostatních taxonů.

Z obrázku rovněž vyplývá, že taxon *R. bifrons* má vysokou variabilitu, ale zcela jednoznačně se odlišuje od taxonů *R. ser. Glandulosi* a *R. indusiatus*. *Rubus bifrons* má větší

genom než *R. ser. Glandulosi*, a to nejen v průměru, ale i v medianu a celkovém zastoupení všech měření.

Tabulka 4: Průměrná velikost jedné chromozómové sady u studovaných taxonů rodu *Rubus*.

taxon	průměr 1Cx [pg]	± sm. odch
<i>R. bifrons</i>	0.401	0.016
<i>R. ser. Glandulosi</i>	0.371	0.011
<i>R. indusiatus</i>	0.376	0.017
<i>R. vatavensis</i>	0.360	0.000
<i>R. jari-cimrmanii</i>	0.405	0.000



Obr. 21 Variabilita ve velikosti genomu jedné chromozómové sady mezi jednotlivými taxony

### 5.3. Analýza pufrů vybraných zástupců rodu *Rubus*

Pufry byly testovány na čtyřech vzorcích rostlin – č. 117, č. 170, č. 315 (tito jedinci byli pěstováni ve skleníku) a č. 228 (tato rostlina byla pěstována na pozemku). Na obrázcích je jednoznačně vidět, že rostlinám na pozemku (Obr. 23) se dařilo podstatně lépe než rostlinám pěstovaným ve skleníku (Obr. 22). Stejně staré rostliny na pozemku měly podstatně větší počet výhonů a vydatnější olistění.



Obr. 22 Vzorek č. 315 *R. bifrons*



Obr. 23 Vzorek č. 228 *R. bifrons*

Data získaná při měření uvádí tabulka č. 5 a 6. Nejvhodnějším pufrem pro měření listů na FCM je LB01 s merkaptoethanolem (Obr. 24 b), průměrné CV vzorku bylo 4,57. Uspokojivé výsledky poskytl i pufr LB01 (Obr. 24 a) s průměrným CV 5,95.

Pufr Hepes (Obr. 24 d) se jeví jako méně vhodný, přesto poskytl data, která by se dala použít alespoň při určování ploidy v rodě *Rubus*. Případná modifikace tohoto pufru by mohla značně zlepšit výsledek např. přidáním většího množství PVP.

Jako zcela nevhodné se ukázaly pufry  $MgCl_2$  (Obr. 24 e) a Otto I a II (Obr. 24 f). Při použití těchto pufrů bylo pozadí vzorku příliš výrazné a nebylo v něm možné určit pík odpovídající studovanému vzorku.

LB01 s merkaptoethanolem a PVP (Obr. 24 c) poskytl překvapivě velmi špatné výsledky. Průměrné CV standardu bylo sice dobré 4,09; avšak průměrné CV vzorku 21,77 je nepoužitelné, jelikož pozadí vzorku je velmi výrazné, podobně jako u  $MgCl_2$  a Otto I a II. Vzorek č. 315 byl měřen i na absolutní obsah DNA, v tomto případě bylo  $CV = 4,31$  – na tento výsledek byl však použit tzv. gating, proto vyšel tak dobře (stejně jako u většiny ostatních vzorků).

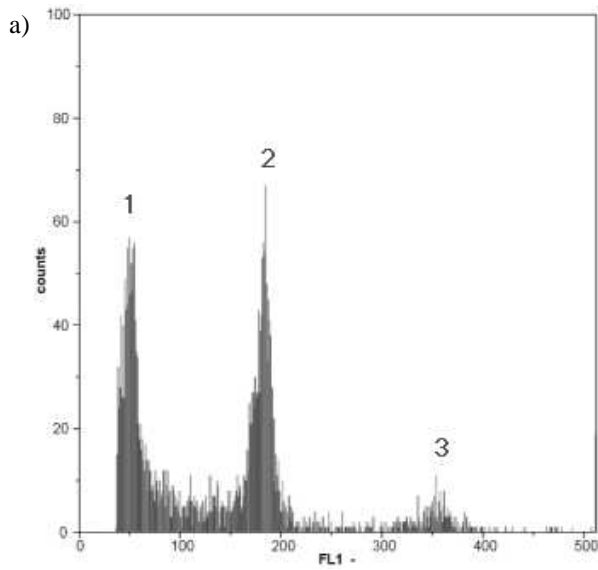
Tabulka 5: Dílčí data zjištěná pomocí testovaných pufrů

číslo	taxon	populace	pufr	cv vzorek	cv standard	gating
315	<i>bifrons</i>	B1	LB01	8,58	1,58	ne
315	<i>bifrons</i>	B1	LB01	6,46	4,75	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	LB01	5,66	4,43	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	LB01	5,23	4,52	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	LB01	6,13	4,18	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	LB01	4,70	3,40	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	LB01	5,66	3,24	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	LB01	5,17	3,48	ne
315	<i>bifrons</i>	B1	LB01 s merk.	5,24	3,51	ne
315	<i>bifrons</i>	B1	LB01 s merk.	4,94	4,49	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	LB01 s merk.	6,54	3,04	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	LB01 s merk.	4,46	2,80	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	LB01 s merk.	4,96	4,15	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	LB01 s merk.	3,73	4,12	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	LB01 s merk.	4,23	3,13	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	LB01 s merk.	3,87	3,20	ne
315	<i>bifrons</i>	B1	LB01 s merk. a pvp	4,15	2,53	ne
315	<i>bifrons</i>	B1	LB01 s merk. a pvp	29,48	4,82	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	LB01 s merk. a pvp	11,41	3,83	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	LB01 s merk. a pvp	24,32	4,06	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	LB01 s merk. a pvp	25,75	3,89	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	LB01 s merk. a pvp	26,96	5,35	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	LB01 s merk. a pvp	26,05	4,48	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	LB01 s merk. a pvp	26,02	3,75	ne
315	<i>bifrons</i>	B1	Hepes	7,14	3,71	ne
315	<i>bifrons</i>	B1	Hepes	8,42	5,83	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	Hepes	7,72	3,91	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	Hepes	9,53	4,32	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	Hepes	5,89	4,44	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	Hepes	5,91	3,76	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	Hepes	6,46	4,02	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	Hepes	6,55	5,41	ne
315	<i>bifrons</i>	B1	Tris - MgCl <sub>2</sub>	x	x	ne
315	<i>bifrons</i>	B1	Tris - MgCl <sub>2</sub>	x	x	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	Tris - MgCl <sub>2</sub>	x	x	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	Tris - MgCl <sub>2</sub>	28,97	5,56	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	Tris - MgCl <sub>2</sub>	x	x	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	Tris - MgCl <sub>2</sub>	25,60	44,82	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	Tris - MgCl <sub>2</sub>	x	x	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	Tris - MgCl <sub>2</sub>	x	x	ne
315	<i>bifrons</i>	B1	Otto I a II	x	x	ne

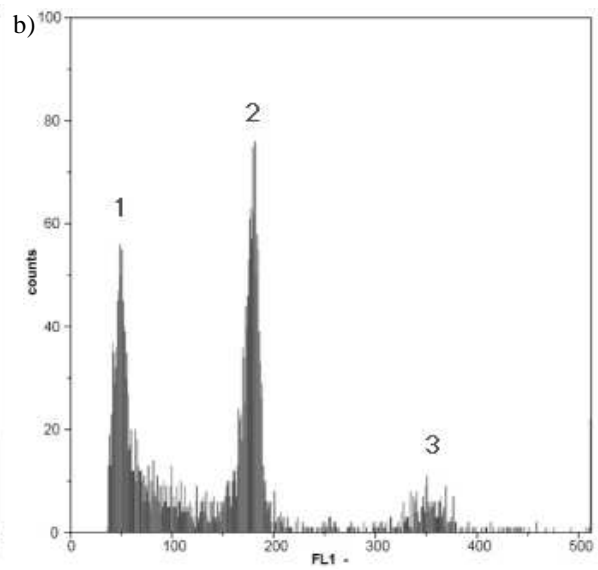
315	<i>bifrons</i>	B1	Otto I a II	23,73	10,91	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	Otto I a II	x	x	ne
228	<i>bifrons</i>	Ratiboř 1	Otto I a II	x	x	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	Otto I a II	x	x	ne
170	<i>bifrons</i>	B4	Otto I a II	22,44	8,93	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	Otto I a II	x	x	ne
117	<i>bifrons</i>	B2	Otto I a II	26,05	13,13	ne

Tabulka 6: Dílčí data zjištěná pomocí testovaných pufrů – průměrné hodnoty

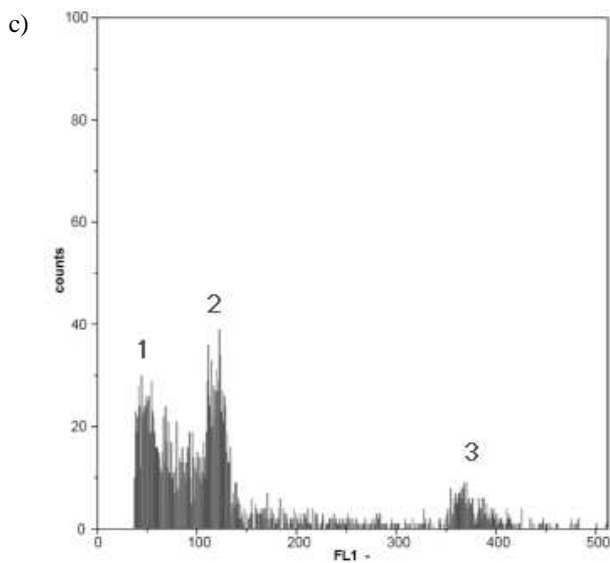
<b>číslo</b>	<b>taxon</b>	<b>pufr</b>	<b>prům. cv vzorku</b>	<b>prům. cv standardu</b>
315	<i>bifrons</i>	LB01	7,52	3,17
228	<i>bifrons</i>	LB01	5,45	4,48
170	<i>bifrons</i>	LB01	5,42	3,79
117	<i>bifrons</i>	LB01	5,42	3,36
315	<i>bifrons</i>	LB01 s merk.	5,09	4,00
228	<i>bifrons</i>	LB01 s merk.	5,50	2,92
170	<i>bifrons</i>	LB01 s merk.	4,35	4,14
117	<i>bifrons</i>	LB01 s merk.	4,05	3,17
315	<i>bifrons</i>	LB01 s merk. a pvp	16,82	3,68
228	<i>bifrons</i>	LB01 s merk. a pvp	17,87	3,95
170	<i>bifrons</i>	LB01 s merk. a pvp	26,36	4,62
117	<i>bifrons</i>	LB01 s merk. a pvp	26,04	4,12
315	<i>bifrons</i>	Hepes	7,78	4,77
228	<i>bifrons</i>	Hepes	8,63	4,12
170	<i>bifrons</i>	Hepes	5,90	4,10
117	<i>bifrons</i>	Hepes	6,51	4,72
315	<i>bifrons</i>	Tris - MgCl <sub>2</sub>	x	x
228	<i>bifrons</i>	Tris - MgCl <sub>2</sub>	28,97	5,56
170	<i>bifrons</i>	Tris - MgCl <sub>2</sub>	25,60	44,82
117	<i>bifrons</i>	Tris - MgCl <sub>2</sub>	26,44	6,11
315	<i>bifrons</i>	Otto I a II	23,73	10,91
228	<i>bifrons</i>	Otto I a II	x	x
170	<i>bifrons</i>	Otto I a II	22,44	8,93
117	<i>bifrons</i>	Otto I a II	26,05	13,13



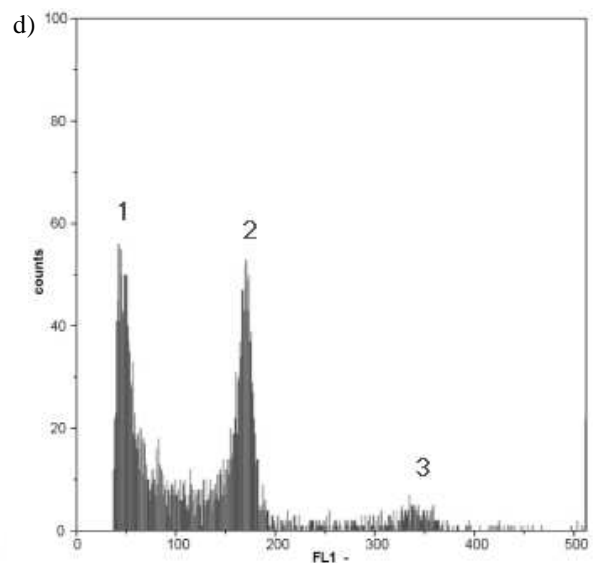
Obr. 24 a) vzorek 117, analýza pufrem LB01;  
 (1) nespecifické pozadí; (2) G<sub>1</sub> pík *R. bifrons*;  
 (3) G<sub>1</sub> pík *Zea mays*



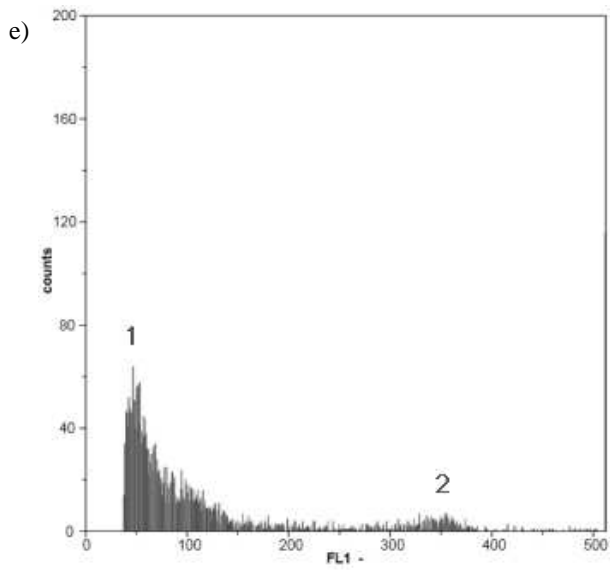
Obr. 24 b) vzorek 117, analýza pufrem LB01  
 s merk.; (1) nespecifické pozadí; (2) G<sub>1</sub> pík *R. bifrons*;  
 (3) G<sub>1</sub> pík *Zea mays*



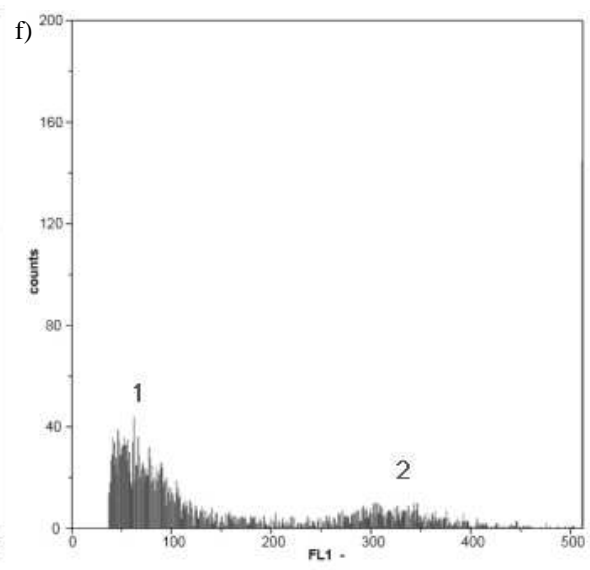
Obr. 24c) vzorek 228, analýza pufrem LB01  
 s merk. a PVP; (1) nespecifické pozadí;  
 (2) G<sub>1</sub> pík *R. bifrons*; (3) G<sub>1</sub> pík *Zea mays*



Obr. 24 d) vzorek 170, analýza pufrem hepes;  
 (1) nespecifické pozadí; (2) G<sub>1</sub> pík *R. bifrons* ;  
 (3) G<sub>1</sub> pík *Zea mays*



Obr. 24 e) vzorek 228, analýza pufrem  $MgCl_2$ ;  
 (1) nespecifické pozadí a  $G_1$  pík *R. bifrons*;  
 (2)  $G_1$  pík *Zea mays*



Obr. 24 f) vzorek 117, analýza pufrem Otto I,II;  
 (1) nespecifické pozadí a  $G_1$  pík *R. bifrons*;  
 (2)  $G_1$  pík *Zea mays*

## 6. Diskuse

### 6.1. Analýza variability velikosti genomu u vybraných populací rodu *Rubus*

Množství jaderné DNA a velikost genomu jsou vhodné doplňující znaky pro charakterizování druhů. Jejich studium přináší rozsáhlé možnosti praktického využití (Bennett & Leitch 2005a). Od počátku 80. let 20. století přibývá výzkumů, které popisují existenci rozdílů ve velikosti genomu mezi jedinci jedné populace nebo mezi populacemi stejného druhu (Ohri 1998). V současnosti se rovněž rozmáhají srovnávací studie v proporci GC/AT bázi na základě použití specificky se vázajících barviv (Holländer & Pohl 1980). Tato metoda byla použita např. při studiu čeledí *Brassicaceae*, *Cyperaceae*, *Poaceae* nebo *Salicaceae* (Bureš *et al.* 2007).

Rostlinný genom je považován za poměrně stabilní a je jedním z významných znaků, který definuje biologický druh (Ohri 1998).

Variabilita ve velikosti genomu v rámci krytosemenných rostlin je obrovská. Nejmenší obsah DNA byl naměřen u *Genlisea margaretae* (genlisej) z čeledi *Lentibulariaceae* - bublinatkovité ( $1Cx = 0,064$  pg) (Greilhuber *et al.* 2006), oproti tomu největší genom má *Fritillaria assyriaca* (řebčík) z *Lilliaceae* ( $1Cx = 127,40$  pg) (Bennett & Leitch 2005b).

Velikost genomu pro dvě chromozomové sady ( $2C$ ) u čeledi *Roseaceae* se pohybuje v rozmezí  $0,20 - 7,30$  pg a je zastoupena různými ploidními stupni. Například v podčeledi *Spiraeoideae* se vyskytují druhy s relativně velkou velikostí genomu, což podporuje teorii o polyploidním původu této podčeledi. Velikost genomu těchto převážně tetraploidních druhů se pohybuje v rozmezí  $2C = 1,15 - 3,17$  pg (Jedrzejczyk & Sliwiska 2010). Tetraploidní druh *Rubus alceifolius* má velikost genomu  $2C = 1,62 - 1,82$  pg (Thiem & Sliwiska 2002), což přibližně odpovídá výsledkům v mé studii druhu *R. bifrons* ( $2C = 1,50 - 1,80$  pg), oproti nim je velikost genomu zástupců *R. ser. Glandulosi* menší ( $2C = 1,42 - 1,57$  pg). Tetraploidní a triploidní druhy *R. alceifolius* mají obsah jaderné DNA  $1,29 - 1,75$  pg, značná rozdílnost obsahu jaderné DNA může být způsobena vnitrodruhovými rozdíly ve velikosti genomu, díky hybridizaci mezi blízkými druhy, což je v rodě *Rubus* časté (Buragohain 2011).



Z čehož vyplývá, že variabilita ve velikosti genomu u zástupců *R. ser. Glandulosi* je relativně malá ( $\pm 0,15$  pg), avšak variabilita u *R. bifrons* je větší ( $\pm 0,3$  pg).

V rodě *Rubus* můžeme nalézt ancestrální diploidní druhy, ale rovněž a převážně odvozené polyploidy od triploidů až po dodekaploidy (Moore 1984). Předpokládá se, že dnešní druhy vznikly crossing-overem z diploidních druhů – hybridizací a následnou polyploidizací (Jennings 1988). Se zvyšující se ploidií u rodu *Rubus* rovněž dochází k nárůstu rozdílů ve velikosti genomu – čím vyšší ploidie, tím větší je rozdíl mezi genotypy stejné ploidie (Meng & Finn 2002).

Rozmanitost v chromozomových počtech u našich ostružiníků je značná, je zastoupena 6 ploidními stupni ( $2x - 8x$ , s výjimkou  $7x$ ) (Trávníček *et al.* 2000b).

Studování zástupci *Rubus bifrons* stejně jako *R. ser. Glandulosi* jsou především tetraploidy s několika hexaploidními výjimkami, což odpovídá předpokládané ploidní úrovni. *R. bifrons* představuje snadno rozpoznatelný tetraploidní druh série *Discolores* (Trávníček & Zázvorka 2005). Ostružiníky ze série *Glandulosi* jsou obvykle tetraploidní, výjimečně pentaploidní (Trávníček, osobní sdělení).

U šesti zástupců zkoumaných druhů jsem detekovala hexaploidní úroveň, která je zjištěna pro tyto druhy zcela nově. Tito jedinci zřejmě vznikly oplozením neredukovaného vajíčka redukovanou spermatickou buňkou, což je proces vyskytující se i u jiných druhů s aposporickou apomixii (Khush 1994; Talent 2009).

Jednotlivé populace se dají na základě velikosti genomu přibližně rozdělit do dvou skupin. Velikost  $1Cx$  u populace B1, B4, Dušná 2 a Rusava 2 se pohybuje v rozmezí 0,390 pg až 0,395 pg. Oproti tomu velikost  $1Cx$  u populací B3, Dušná 1, Rusava 1 a Ratiboř je větší a pohybuje se v rozmezí od 0,405 do 0,413 pg.

Zástupci *R. ser. Glandulosi* mají oproti taxonu *R. bifrons* velikost chromozomové sady menší, a to 0,371 pg. Jedná se však o průměrné hodnoty a mezi jednotlivými jedinci v rámci populace byla variabilita ve velikosti genomu vyšší. Například někteří zástupci skupiny s menším genomem měli velikost vyšší než průměr s genomem větším (např. vzorek č. 284 – B1 = 0,424 pg).

## 6.2. Analýza chemických pufrů na vybraných zástupcích rodu

### *Rubus*

Různé typy pufrů byly vyvinuty tak, aby zachovaly jadernou integritu, chránily DNA před zničením a usnadnily její barvení. Vhodné chemické složení pufrů se liší pro daný druh či tkáň. Obecně se jeví, že LB01 a Otto jsou nejvhodnější pufr pro měření obsahu DNA z listů rostlin, oproti tomu Tris-MgCl<sub>2</sub> je považován za nejhorší (Doležel *et al.* 2006), což se v našem případě zcela nepotvrdilo.

Přestože se LB01 pufr s přidaným PVP nejeví jako nejvhodnější (jak se při srovnání jednotlivých pufrů ukázalo), využila jsem jej ke studiu velikosti genomu (popř. ploidie) v rodě *Rubus*. Pufr LB01 s PVP se běžně používá při stanovení jaderné DNA ostružiníků ze semen, proto se předpokládalo, že tento pufr bude stejně vhodný i pro listy ostružiníků. Analýza pufrů se prováděla až na závěr, kde to vyšlo najevo. Vhodnější by bylo použít pufr LB01 s merkaptoethanolem.

U většiny vzorků musel být použit tzv. gating (ořez píku v počítačovém výstupu analýz, kterým se odstraňuje nespecifické pozadí a snižuje koeficient variability výsledného píku). Vysoký koeficient variability je způsoben přítomností metabolitů zcela běžných v rodě *Rubus*. Tento šum působí značně problémy při výsledné analýze dat, kdy je hodnota průměrné pozice píku zkreslena výrazným nespecifickým pozadím. Některé druhy se podařilo změřit i bez ořezu, kdy například CV vzorku č. 202 bylo pouze 3,21; zřejmě díky nižší přítomnosti sekundárních metabolitů a přesné kalibraci průtokového cytometru. Díky těmto komplikacím je rod *Rubus* řazen mezi problematické druhy při stanovování velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie (Jedrzejczyk & Sliwinska 2010).

Studie *Comparison of Four Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry* z roku 2006 srovnává 4 různé pufr (Galbraith's; LB01; Otto I,II a Tris.MgCl<sub>2</sub>) použité při jaderné izolaci DNA rostlin. Ke studiu bylo použito 7 rostlinných druhů (*Sedum burrito*, *Oxalis pes-caprae*, *Lycopersicon esculentum*, *Celtis australis*, *Pisum sativum*, *Festuca rothmaleri* a *Vicia fabla*). Testovány byly mladé listy těchto druhů (Doležel *et al.* 2006).

Pro druh *Oxalis pes-caprae* autoři uvádějí jako jediný vhodný pufr Otto I.-II. z důvodu kyselé cytoplazmy, která obsahuje kyselinu šřavelovou. *Lycopersicon esculentum*, *Vicia*

*fabla*, *Festuca rothmaleri* a *Pisum sativum* patří mezi dobře měřitelné druhy, pouze *Festuca rothmaleri* se hůře zpracovává, protože má tuhé listy. Nicméně, použitelné výsledky byly naměřeny pomocí pufrů Otto a LB01. *Celtis australis* uvolňuje slizové látky, díky nimž se zvyšuje viskozita vzorku, což zabraňuje uvolňování jader z buněk. Z důvodu vyšší koncentrace detergentu, které ruší slizový účinek látek, uvádějí Doležel et al. jako nejvhodnější pufr Tris-MgCl<sub>2</sub>.

Pufr Otto dosahuje velmi dobrých výsledků při měření vzorků s velmi kyselým cytosolem (pH < 3) (Doležel & Bartoš 2005). Doležel et al. (2006) uvádějí, že kyselina citronová obsažená v pufru zlepšuje přístupnost fluorescenčního barviva k chromatinu a homogenizuje ho, díky čemuž dochází k odstranění rozdílů v intenzitě zabarvení u jader se stejným obsahem DNA, což pak zřejmě vysvětluje nižší hodnoty CV.

Složení pufru Otto zahrnuje detergent Tween 20, který uvolňuje jádra z buněk. Je slabším detergentem než Triton X-100 (LB01, HEPES) a tudíž má nižší schopnost uvolňování jader z buněk (Doležel et al. 2006).

Rostliny, které mají nízký obsah DNA, vysoký obsah vody v listech a obsahují třísloviny, se špatně analyzují s jakýmkoli pufrům např. *Sedum burrito* (rozchodník) (Doležel et al. 2006). Rovněž druhy rostlin obsahující slizové látky, jsou obecně špatně měřitelné, díky zvyšování viskozity vzorku, což brání uvolnění jader z buněk a způsobuje jejich shlukování např. *Celtis australis* (břestovec jižní). Pro takové druhy rostlin se osvědčil pufr Tris-MgCl<sub>2</sub>, zřejmě díky přítomnosti vyšší koncentrace neiontového detergentu, který ruší aglutinační účinek slizovitých sloučenin (Doležel et al. 2006). Rovněž přidání merkptoethanolu může snížit viskozitu suspenze jader, jak bylo zjištěno na Katedře botaniky UP při studiu rodů *Scilla* či *Allium* (Šarhanová, Jandová, osobní sdělení). Všeobecně mnoho rostlinných druhů obsahuje v listech velké množství sekundárních metabolitů např. *Rosaceae* - růžovité, *Geraniaceae* – kakostovité (Suda 2005), *Rubiaceae* - mořenovité, *Solanaceae* - lilkovité, *Ranunculaceae* - pryskyřníkovité (Wink 1997), díky nim se považují za problematické pro měření velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie (Jedrzejczyk & Sliwiska 2010).

Kromě volby vhodného pufru je možné využít k měření jiné, nezelené, části rostlin jako např. semena, kořeny, okvětní lístky, prašníky, listové pochvy apod. Výhodou semen je snadnost jejich uchování. Bylo dokázáno, že ve většině případů poskytují lepší histogramy jader semena než listy. V listech některých druhů, bez přidání antioxidantů, bylo těžké rozlišit vrcholy píků nebo byly vrcholy posunuty díky poklesu fluorescence. Z čehož vyplývá, že

použití semen může značně zjednodušit měření (Jedrzejczyk & Sliwinska 2010). Řadu výhod má také měření obsahu DNA z kořenových meristémů, např. nepřítomnost sekundárních metabolitů a délka skladování, zejména při sběru materiálu, který se nedá ihned změřit. Nevýhodou je však nízká výtěžnost, pro měření je potřeba velké množství materiálu a speciální metody zpracování (Silva *et al.* 2010). V případě problematických druhů je možné pro měření použít také okvětní lístky – např. u *Brassica oleracea* (hlávkové zelí) (Kudo & Kimura 2002) a prašníky např. *Broccoli* (brokolice) (Farnham *et al.* 1998).

Obecně však nelze říct, který pufr je nejvhodnější. Každý působí na konkrétní druh rostlinného pletiva jiným způsobem v závislosti na metabolitech. Naopak lze konstatovat, že některé rostlinné druhy jsou kvůli vysokému obsahu sekundárních metabolitů ke studiu velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie nevhodné.

## 7. Závěr

Bakalářská práce shrnuje údaje o variabilitě ve velikosti genomu na vybraných populacích rodu *Rubus* metodou průtokové cytometrie, která se v současnosti při studiu rostlin zcela běžně využívá.

Cílem práce bylo vypracovat rešerši na dané téma a zjistit, zda existuje variabilita ve velikosti genomu na vybraných populacích rodu *Rubus*. Celkově bylo metodou průtokové cytometrie změřeno 71 zástupců rodu *Rubus*. Většina jedinců odpovídala předpokládané tetraploidní úrovni, pouze 6 zástupců bylo hexaploidních. Variabilita mezi jednotlivými populacemi je poměrně malá. Velikost 1Cx u populace B1, B4, Dušná 2 a Rusava 2 se pohybuje v rozmezí 0,390 pg - 0,395 pg. Oproti tomu velikost 1Cx u populace B3, Dušná 1 a Rusava 1 je vyšší 0,405 pg - 0,413 pg. U jednotlivých taxonů rodu *Rubus* se velikost genomu příliš nelišila. Největší průměrnou velikost genomu mají *R. bifrons* 1Cx = 0,401 pg, oproti tomu nejmenší byla zjištěna u jednoho studovaného zástupce *R. vatavensis* 1Cx = 0,360 pg.

Dále bylo pomocí roztlačkových preparátů zjištěno, že tetraploidní zástupci rodu *Rubus* mají 28 chromozomů a absolutní velikost genomu těchto jedinců byla stanovena na 1,625 pg.

Analýza různých druhů pufrů poskytla zajímavé výsledky, kdy nejvhodnějším pufrem pro měření rostlinných vzorků byl LB01 s merkaptoethanolem, průměrné CV vzorků bylo 4,75. Naopak jako zcela nevhodné se ukázaly pufrы Tris-MgCl<sub>2</sub> a Otto I a II, jelikož jejich chemické složení nebylo schopné odstranit četné metabolity ostružiníků.

## 8. Literatura

- Arumuganathan K. & Earle E. D. (1991): Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry. – *Plant Mol. Biol. Rpt.* 9: 229-241.
- Asker S. E. & Jerling L. (1992): *Apomixis in plants*. – CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 298 p.
- Bennett M. D. & Leitch I. J. (2005a): Plant genome size research: A Field In Focus. – *Annals of Botany* 95: 1-6.
- Bennett M. D. & Leitch I. J. (2005b): Angiosperm DNA C-values diabase (release 6.0, Oct. 2005).
- Briggs D. & Walters S. M. (2001): *Proměnlivost a evoluce rostlin*. – Univerzita Palackého Olomouc.
- Buragohain J. (2011): Genome study of North-East Indian *Rubus alceifolius*. – *Advances in Applied Science Research* 2 (6): 454-459.
- Bureš P., Šmarda P., Hralová I., Helánová K., Fuentes-Soriano S. & Procházková J. (2007): Is GC – content correlated with genome size in plants. – *Plant Genome Horizons – Vistas & Visions*, Royal Botanic Garden Kew, London. 17 p.
- Dittrich W. & Göhde W. (1969): Impuls fluorometrie bei Einzelzellen in Suspensionen. – *Z. naturforsch.* 24b: 360-361.
- Doležel J. (1991): Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. – *Phytochem. Anal.* 2: 143-154.
- Doležel J. & Bartoš J. (2005): Plant DNA Flow cytometry and Estimation of Nuclear Genome size. – *Annals of Botany* 95: 99-100.
- Doležel J., Binarová P. & Lucretti S. (1989): Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. – *Biologia plantarum* 31: 113-120.
- Doležel J. & Göhde W. (1995): Sex determination in dioecious plant *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. – *Cytometry* 19: 103-106.

- Doležel J., Loureiro J., Rodriguez E. & Santos C. (2006): Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. – *Annals of Botany* 98: 679-689.
- Eriksson T., Hibbs M. S., Yoder A. D., Delwiche Ch. F. & Donoghue M. J. (2003): The phylogeny of Rosoideae (Rosaceae) based on sequences of the internal transcribed spacers (its) of nuclear ribosomal DNA and the TRNL/F region of chloroplast DNA. – *Int. J. Sci.* 164 (2): 197-211.
- Farnham M. W., Caniglia E. J. & Thomas C. E. (1998): Efficient ploidy determination of anther - derived *Broccoli*. – *HortScience* 33 (2): 323-327.
- Galbraith D. W., Harkins K.R., Maddox J. R., Ayres N.M., Sharma D. P. & Diroozabady E. (1983): Rapid flow cytometric analysis of the cycle in intact plant tissues. - *Science* 220: 1049-1051.
- Givan A. L. (2001): Flow cytometry: first principles. – Library of Congress, Canada: 15-41
- Greilhuber J., Borsch T., Mueller K., Worberg A., Porembski S. & Barthlott W. (2006): Smallest angiosperm genomes found in *Lentibulariaceae*, with chromosome size of bacterial size. – *Plant Biology* 8 (6): 770-777.
- Hendrych R. (1977): Systém a evoluce vyšších rostlin. – Praha.
- Holländer R. & Pohl S. (1980): Deoxyribonucleic acid base composition of bacteria. – *Zentralbl Bakteriol A* 246 (2): 236-75.
- Holub J. (1995): *Rubus* L. – ostružiník (maliník, moruška, ostružinec, ostružiníček). – In: Slavík B. (ed.), *Květena České republiky* 4: 54-206, Academia, Praha.
- Hrouda L. (2007): Změny ve fylogenetické klasifikaci rostlin. In: Sekerka P.: *Sborník z konference Botanický systém a evidence rostlin v botanických zahradách*. Botanická zahrada hl. m. Prahy.
- Jedrzejczyk I. & Sliwiska E. (2010): Leaves and seeds as materials for flow cytometric estimation of the genome size of 11 *Rosaceae* woody species containing DNA – staining inhibitors. – *Journal of Botany*: 1-9.
- Jennings D. L. (1988): *Blackberries*. – In: *Raspberries and blackberries: Their breeding, disease and growth*: 39-58, Academic Press, London.

- Kamentsky L. A., Melamed M. R. & Derman H. (1965): Spectrophotometer: New instrument for ultrarapid cell analysis. – *Science* 150: 630-631.
- Khush G. S. (1994): Apomixis: exploiting hybrid vigor in rice. – Los Baños, Laguna, IRRI. 78 p.
- Kresánek J. & Kresánek J. ml. (2008): Atlas léčivých rostlín a lesých plodov. – Osvěta, Praha. 424 p.
- Kudo N. & Kimura Y. (2002): Nuclear DNA endoreduplication during petal development in cabbage: relationship between ploidy levels and cell size. – *Journal of Experimental Botany* (53): 1017-1023.
- Kurtto A., Weber H. E., Lampinen R. & Sennikov A. N. (2010): Atlas Florae Europae 15 – Rosaceae (*Rubus*). – Societas Biologica Fennica Vanamo, Helsinki, pp. 362.
- Lakshmanan K. K. & Ambegaokar K. B. (1984): Polyembryony. – In: Johri B. M. (ed) Embryology of angiosperms: 445-474, Springer-Verlag, Berlin.
- Lysák M. A. & Doležel J. (1998): Estimation of nuclear DNA content in *Sesleria* (*Poaceae*). – *Caryologia* 51: 123-132.
- Meng R. & Finn C. E. (2002): Determining ploidy level and nuclear DNA content in *Rubus* by flow cytometry. – *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 127 (5): 767-775.
- Moldavan A. (1934): Photo – electric technice for counting of microscopical cells. – *Science* 80: 188-189.
- Moore J. N. (1984): *Blackberry* breeding. – *HortScience* 19: 183-185.
- Oberbeil K. & MUDr. Lentzová Ch. (2003): Léčba ovocem a zeleninou. – Fortuna Print, Praha. 296 p.
- Ohri D. (1998): Genome size variation and plant systematics. – *Annals of Botany* 82 (suppl. A): 75-83.
- Otto F. (1990): DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. – In: Crissman H. A. & Darzynkiewicz Z. (eds.): *Methods in Cell Biology*. Vol 33. – Academic Press, New York. 105-110.



- Pfossen A., Amon A., Lelley T. & Heberle-Bors E. (1985): Evaluation of sensitivity of flow cytometry in detecting aneuploidy in wheat using disomic and ditelosomic wheat addition lines. – *Cytometry* 21: 387-393.
- Potter D., Erikson T., Evans R. C., Oh S., Smedmark J. E. E., Morgan D. R., Kerr M., Robertson K. R., Arsenault M., Dickinson T. A. & Campbell C. S. (2007): Phylogeny and classification of *Rosaceae*. – *Pl. Syst. Evol.* 266: 5-43.
- Rosypal S. (2003): *Nový přehled biologie*. – Scientia, Praha. 796 p.
- Silva T. C. R., Abreu I. S. & Carvalho C. R. (2010): Improved and reproducible flow cytometry methodology for nuclei isolation from single root meristem. – *Journal of Botany* 2010: 1-7.
- Slavík B. (1995): *Květena České republiky 4*. – Academia, Praha. 529 p.
- Suda J. (2005): Co se skrývá za rostlinnou průtokovou cytometrií. – *Živa* 1: 46-48.
- Talent N. (2009): Evolution of gametophytic apomixis in flowering plants: an alternative model from *Maloid Rosaceae*. – *Theory Biosci.* 128: 121-138.
- Thiem B. & Sliwiska E. (2002): Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) in vitro cultures. – *Plant Science* 164: 129-134.
- 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.
- Trávníček B., Oklejewicz K. & Zielinski J. (2005): *Rubus ambrosius* (*Rubus* subsect. *Rubus*, *Rosaceae*), a new bramble species from the eastern part of central Europe. – *Folia Geobotanica* 40: 421-434.
- Trávníček B. & Zázvorka J. (2005): Taxonomy of *Rubus* ser. *Discolores* in the Czech republic and adjacent regions. – *Preslia*, Praha, 77: 1-88.
- Van Dilla M. A., Trujilo T. T., Mullaney P. F. & Coulter J. R. (1969): Cell microfluorimetry: a method for rapid fluorescence measurement. – *Science* 163: 1213-1214.

Weber H. E. (1996): Former and modern taxonomic treatment of the apomictic *Rubus* complex. – Folia Geobot. Phytotax. 31: 373-380.

Wink M. (1997): Plant secondary metabolites: biochemistry, function and biotechnology. – In: Biochemistry of plant secondary metabolism. Annual Plant Reviews 2: 1-16.

#### Internetové odkazy

[www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf](http://www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf)

<http://www.kew.org/cvalues/>