

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Program: Ekologie a ochrana prostředí

Obor: Ochrana životního prostředí



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2007

GENETICKÁ VARIABILITA KRITICKY OHROŽENÉHO
ŽABNÍČKU VZPLÝVAVÉHO (*LURONIUM NATANS* L.,
ALISMATACEAE) NA OKRAJI AREÁLU A JEJÍ VÝZNAM
PRO CÍLENOU DRUHOVOU OCHRANU

Zpracoval: Martin Bartuška

Vedoucí práce: RNDr. Jan Suda, Ph.D.

OBSAH

OBSAH	1
ÚVOD	2
KAPITOLA PRVNÍ	3
ČELEĎ ŽABNÍKOVITÉ (<i>ALISMATACEAE</i>)	3
ŽABNÍČEK VZPLÝVAVÝ (<i>LURONIUM NATANS</i>)	4
<i>Popis</i>	4
<i>Stanoviště</i>	6
<i>Evropské rozšíření</i>	7
<i>Rozšíření v ČR</i>	7
KAPITOLA DRUHÁ	9
BIODIVERSITA	9
OCHRANĀRSKÁ GENETIKA (<i>CONSERVATION GENETICS</i>)	10
<i>Ztráta genetické rozmanitosti</i>	10
<i>Genetický posun (genetic drift)</i>	11
<i>Outbreeding (vzdálené křížení)</i>	12
<i>Inbreeding (příbuzenské křížení)</i>	13
KAPITOLA TŘETÍ	14
ENZYMY	14
<i>Isoenzymy</i>	14
ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ	16
<i>Základní předpoklady využití elektroforézy</i>	16
<i>Princip elektroforézy</i>	17
<i>Detekce isoenzymů</i>	18
<i>Přehled základních elektroforetických metod</i>	18
KAPITOLA ČTVRTÁ	20
METODIKA PRÁCE	20
<i>Sběr materiálu</i>	20
<i>Příprava vzorku</i>	21
<i>Extrakce vzorků</i>	21
<i>Vlastní elektroforéza</i>	22
DISKUZE	23
ZÁVĚR	25
LITERATURA	26

ÚVOD

Tato práce se zabývá evropským endemitem a jednou z nejvzácnějších rostlin České republiky žabníčkem vzplývavým (*Luronium natans* L.) z čeledi žabníkovitých (*Alismataceae*). Je to rostlina se subatlantskou tendencí výskytu a s hlavní koncentrací populací v Anglii. U nás dlouho považovaná za vyhynulou (kategorie A1) a znovu nalezena byla v roce 1999 na dvou lokalitách v oblasti CHKO Labské pískovce (Suda et al., 2000). Dnes je klasifikována jako C1 (kriticky ohrožený druh).

Cílem práce je provedení literární rešerše o studovaném druhu a testování metody izozymové analýzy pro stanovení genetické diversity populací na nalezených lokalitách. Získaná data budou sloužit jako podklad pro navazující projekty zaměřené na cílenou ochranu druhu, včetně možnosti reintrodukce na jiná stanoviště.

Tato práce bude rozdělena do několika tématických oddělení, které se budou snažit vysvětlit různé dílčí části přinášející základní data o samotné rostlině, přiblížení izozymové analýzy a zpracování vzorků.

KAPITOLA PRVNÍ

ČELEĎ ŽABNÍKOVITÉ (*ALISMATACEAE*)

Říše: rostliny (*Plantae*)
Podříše: cévnaté rostliny (*Tracheobionta*)
Oddělení: krytosemenné (*Magnoliophyta*)
Třída: jednoděložné (*Liliopsida*)
Řád: Žabníkotvaré (*Alismatales*)
Čeleď: Žabníkovité (*Alismataceae*)

Jedná se o vytrvalé, vzácně jednoleté, většinou vodní nebo bahenní byliny, kořenicí ve dně, většinou s oddenky. Listy bývají nahloučeny na bázi, častá je heterofylie, kdy jinak vypadají listy ponořené a jinak listy nad hladinou. Jsou to jednodomé rostliny s jednopohlavnými nebo oboupohlavnými květy, vzácně jsou dvoudomé. Listy jsou jednoduché, přisedlé nebo řapíkaté, s listovými pochvami. Čepele listů jsou celistvé, čárkovité, kopinaté, vejčité, podlouhlé nebo střelovité, žilnatina je souběžná, zpeřená nebo dlanitá. Květy jsou v květenstvích, vzácně jednotlivé, většinou v hroznech, latách nebo vrcholících, vzácně okolících. Květy jsou pravidelné, květenství i květy jsou často podepřeny listeny. Květní obaly jsou rozlišeny na kalich a korunu, zpravidla se jedná o 3 kališní lístky v 1 kruhu a 3 korunní lístky v 1 kruhu, korunní lístky mají zpravidla bílou, růžovou nebo červenou barvu. Tyčinek je 6 (výjimečně 3) v jednom kruhu, nebo 18-100 a více, někdy se tyčinky větví. Gyneceum je složeno ze 3 nebo ze 6-100 či více plodolistů, je apokarpní, semeník je svrchní. Plod je suchý, pukavý nebo nikoliv, v souplodí, jedná se zpravidla o měchýřky nebo nažky

Je známo 11-12 rodů a asi 80-90 druhů, které jsou rozšířeny skoro po celém světě, mimo chladné oblasti.

Alisma (žabník), *Baldellia*, *Burnatia*, *Caldesia* (vzplývka), *Damasonium*, *Echinodorus*, *Limnophyton*, *Luronium* (žabníček), *Ranalisma*, *Sagittaria* (šípatka), *Wiesneria*.

V ČR roste a je původní pouze 5 druhů z čeledi žabníkovitých (*Alismataceae*). Šípatka střelolistá (*Sagittaria sagittifolia*) je nápadná bahenní rostlina rozšířená hlavně v teplejších oblastech. Z rodu žabník (*Alisma*) rostou v ČR 3 druhy, všechno jsou to bahenní (obojživelné) rostliny. Nejběžnější je žabník jitrocelový (*Alisma plantago-aquatica*), vzácnější

jsou žabník kopinatý (*Alisma lanceolatum*) a žabník trávolistý (*Alisma gramineum*) (C2). Kriticky ohroženým druhem (C1) je žabníček vzplývavý (*Luronium natans*) (Kubát et al., 2002).

ŽABNÍČEK VZPLÝVAVÝ (*LURONIUM NATANS*)

Popis

Luronium natans (Obr. 1, Obr. 2) je evropská endemická rostlina (Obr. 3) a přes její atlantské rozšíření je nález nové lokality velmi vzácný. Úbytek populací této rostliny je zaznamenán na celém území jejího výskytu. Figuruje na seznamu z 21. května 1992 podle evropské směrnice 92/43/EEC O zachování přírodních stanovišť volně žijících živočichů a rostlin, která předpokládá založení speciálních území pro ochranu této rostliny na každém místě jejího výskytu (SACs). Navíc byla přidána na seznam Bernské konvence o ochraně druhů a přírodních stanovišť. Dále se vyskytuje ve všech červených knihách států, na jejímž území se vyskytuje a to jako silně nebo kriticky ohrožený druh (Rich, 1995).

Samotná rostlina je jediným zástupcem svého rodu. Je vytrvalá, stálezelená, schopná celý život vegetovat ponořená pod vodní hladinou. U rostliny se vyskytuje heterofylie. Listy jsou rozlišeny na listy vzplývavé (natantní) a listy pod vodní hladinou (submerzní).

Submerzní listy, vyrůstající z oddenku uchyceným v substrátu dna, tvoří růžici. Listy jsou 100-200 mm dlouhé, šídlovité až triangulární. Na bázi široké 5-6 mm, světle zelené, průsvitné s širší zelenou hlavní žilou listu. Výhonky vyrůstající z báze růžice mají v průměru kolem 1 mm a dorůstají délky 200 mm. Mohou mít bílé i zelené zbarvení. Růžice listů jsou do substrátu ukotveny pomocí válcovitého oddenku s četnými tenkými kořeny (Rich, 1995).

Natantní listy (vyskytují se v hloubkách vody do 60-70 cm) mají dlouhé křehké řapíky vyrůstající buď přímo z oddenku, nebo odstupují od vřetena květenství v místě jeho větvení. Listy dosahují velikosti až 40 mm, jsou oválného až vejčitého tvaru s tupým až zkráceným vrcholem. Středem listu probíhá výrazná centrální žilnatina a dvojice okrajových žilek. Z horní strany listů je barva tmavě zelená, lesklá, na spodní straně většinou světlá až vybledlá.

Květenství jsou dlouhá a rozvolněná. Květy se objevují nejčastěji v období července a srpna (mnou pozorované při sběru vzorků v pozdním září). Na větenu květenství vyrůstají v určitých intervalech trojice blanitých a alespoň částečně vzájemně srostlých listů. V úžlabí se zakládají 1 až 2 dlouhé květní stopky a několik listů. Zároveň zde může docházet k tvorbě vegetativních i generativních orgánů, což je v rostlinné říši jev dosti ojedinělý a můžeme se s ním setkat již jen u několika druhů např. u americké šípatky (*Sagittaria subulata*) (Suda et al, 2000).

Jednotlivé květy jsou vynášeny přímo na, nebo i nad hladinu. Květ je tvořen trojicí bílých korunních listů se žlutou skvrnou na bázi (Obr. 1, Obr. 2). Květ je miskovitý, oboupohlavný, bez znatelné vůně, s průměrem 12-15 mm, produkuje nektar lákající drobný hmyz, který zajišťuje opylování. Jeho životnost je pouze jeden den. Allogamie (opylování křížem) se uplatňuje do výšky vodního sloupce 60-70 cm a při jasném počasí. Při zatažených a větrných dnech se květ (podle literatury) neotevírá a dochází tak k samoopylení (Kay, 1999).

Při výšce vodního sloupce přesahující hodnotu 70 cm se začíná vyskytovat kvetení podvodní, tzn. stopky nesoucí květ nedosahují nad hladinu, celé květy zůstávají ponořené ve vodě a jsou trvale uzavřeny. Dochází k opylení bez otevření květu (kleistogamie) (Rich, 1995).

Plodem je podélně rýhovaná nažka dosahující velikosti 1-2 mm. V mělkých vodách a silně podmáčených stanovištích je největší produkce semen z důvodů lehčího způsobu přenosu pylu mezi různými rostlinami. Pylová zrna jsou charakteristická oktagonálním tvarem průřezu (Kay, 1999). Avšak díky vegetativnímu rozmnožování, kdy odnožené růžice tvoří podvodní shluky spojené pomocí tenkých výběžků, jde často o geitonogamii (opylení v rámci téhož klonu) než o allogamické opylování (Suda et al., 2000).

Nažky se po dozrání uvolňují z květního lůžka, klesají ke dnu, kde pro další vývoj potřebují chladovou stratifikaci. Klíčící semenáčky jsou schopné plavat na hladině, avšak uchycení bývá dosti problematické. Dospělosti se tedy dožívá pouhý zlomek rostlin z původního množství semen. Proto významným šířením druhu na dané lokalitě je klonální šíření pomocí četných výběžků.

Na větší vzdálenosti mezi lokalitami se uvažuje o rozšiřování diaspor (nažek a fragmentů dospělých rostlin) pomocí vodních ptáků. Za důkaz této teorie můžeme považovat výskyt geneticky stejných, či velmi podobných populací *L. natans* ve Švédsku, které jsou od sebe nezdělaně vzdálené desítky až stovky kilometrů, přičemž vodní toky nebo nádrže, ve kterých se populace vyskytují, náleží k různým povodím (Kay, 1999).

Stanoviště

Jak již bylo uvedeno v úvodu, za centrum rozšíření populací *L. natans* i oblast největší genetické diversity se nachází na území Velké Británie. Zde se vyskytuje na třech hlavních druzích stanovišť.

Hlavními spojovacími znaky stanovišť výskytu jsou životní podmínky *L. natans*. Voda by měla být oligotrofní až mezotrofní, lehce kyselá, se stálou nebo pouze lehce rozkolísanou výškou vodní hladiny v průběhu sezóny. Rostliny negativně reagují na výskyt i malého množství vápníku.

Prvním typem stanoviště jsou jezera a rybníky v nadmořských výškách do 400 m nad mořem, kde se rostliny vyskytují převážně v podobě podvodních růžic v hloubkách 1-2 m výjimečně 4 m. Tato extrémní hodnota byla pozorována jen ve velmi čistých jezerech na náhorních plošinách Welsu. Kvetoucí či natantní formy se vyskytují opravdu jen zřídka v mělkých příbřežních vodách. Patří sem také nížinná oligotrofní jezera, která jsou velmi ohroženým biotopem výskytu *L. natans* z důvodů lidského hospodaření od poloviny 19. století (možnost vysledovat začátky eutrofizace jezer).

Druhým typickým stanovištěm jsou přímořské nízkopoložené rybníky a jezírka v západní části Anglie. Literatura ze začátku 19. století popisuje široký a častý výskyt. V dnešní době jsou však registrovány pouze dvě taková stanoviště s výskytem *L. natans* - Ramsey Island a Dowrog Common - v západním Welsu. Úbytek stanovišť je opět připisován eutrofizaci, odvodňování krajiny a změnám v systému hospodaření (Kay, 1999).

Posledním stanovištěm jsou pomalu tekoucí oligotrofní až středně mezotrofní řeky. Dříve bylo známo sedm takovýchto řek podporující vitální populace, avšak v dnešní době jsou známy pouze dvě. Tento, dnes již vzácný typ stanoviště, však od poloviny 19. století začínají nahrazovat málo používané vodní kanály. Předpokládá se, že kanály by mohly efektivně nahradit dřívější široké rozšíření druhu. Toto rozšíření na druhou stranu nejspíš zapříčinilo snížení pozornosti na ochranu druhu (Perring & Farrell 1983), když se obnovily nanejvýš dřívější ztráty druhu v nížinách a řekách. Podle pozorování (Briggs 1988, Willby & Eaton 1993, Trueman at al. 1995) se považuje populace kanálů pouze za nestabilní a přechodné iniciační stádia osidlování této nově nalezené volné niky. V poslední době se také kanálů začíná týkat problém eutrofizace, napřimování toků, a zvýšení dopravního ruchu (převážně rekreační motorové lodě). Díky ekologické podobnosti a svázanosti stanovišť s pomalu tekoucími řekami se předpokládá, že rostlinné populace zde žijící pocházejí z bývalých

říčních stanovišť. I když je dost možné, že samotné říční populace také byly dříve pouze ostrovními populacemi základních populací z náhorního Welsu. Zdá se že dnešní i minulé populace *L. natans* byly do řek splaveny z jezer s již založenými rozsáhlými populacemi (Kay, 1999). Jako přechodná krátkodobá stanoviště se udávají příkopy, zaplavované břehy rybníků, mělké kaluže, v kterých je *L. natans* schopný dokonce i vykvést, avšak v důsledku nízkých zimních teplot oddenky vymrzají a rostliny nepřežijí trvale. (Suda et al., 2000)

Evropské rozšíření

Luronium natans je endemitem evropského kontinentu se subatlantskou tendencí výskytu. Nejrozšířenější je ve Velké Británii, hlavně v severním Welsu. V samotné Evropě jsou za nejjihnější výskyt považovány dvě lokality na severu Španělska. Další výskyty jsou hlášeny z Francie, Německa (dřívější výskyt i poblíž Berlína), v dnešní době větší populace drží se převážně na Lužici. Přesahuje do Dánska a Polska (zde v posledních sto letech vymizela více než polovina známých stanovišť). Za severní hranici výskytu se považuje Skandinávie.

V nedávné době se začaly přezkoumávat záznamy ze starších pozorování. Tímto byl potvrzen výskyt i v Irsku, dříve považovaný za chybné určení druhu. Informace z literárních pramenů o výskytu v Moldávii a Rumunsku se pokládají za nepravděpodobné a je třeba provést jejich přezkoumání. Jednalo by se tak o nejvýchodnější výskyt tohoto druhu, který má jinak hranici na území Litvy ve formě izolovaných stanovišť (Suda et al., 2000).

Rozšíření v ČR

První zmínky o výskytu *L. natans* na našem území pocházejí z počátku 19. stol. z vrchu Smrk v Jizerských horách. Není přesně známo místo nálezu, ale předpokládá se, že sběr byl proveden buď na úpatí zmíněné hory, nebo na blízkém území Frýdlantska.

První herbářová položka dokazující výskyt *L. natans* pochází z roku 1935 (sbírka K. Prokeše) z neznámého rybníka u Stráže nad Nežárkou na Třeboňsku v jižních Čechách. Tento nález nebyl nikde zmíněn, jelikož byl považován za běžnou, hojně rozšířenou, rostlinu žabníčku vodního (*Alisma plantago-aquatica*). Třetím a posledním místem nálezu do roku 1999 je

sever Frýdlantského výběžku, kde byl sbírán na jedné lokalitě v letech 1958 a 1960 V. Jehlíkem (Suda et al., 2000).

Až do roku 1999 byla tato rostlina v naší květeně klasifikována jako A1 (rostlina vyhynulá déle než 30 let). Jak už byl zmíněno v úvodu, v tomto roce byla v oblasti CHKO Labské pískovce opět objevena při botanickém inventarizačním průzkumu NP České Švýcarsko a CHKO Labské pískovce, a to hned na dvou lokalitách - Mlýnský rybník u Maxiček a malá hasičská nádrž poblíž cesty z Maxiček do Dolního Žlebu.

Obě lokality dostatečně zajišťují ekologické nároky rostliny. Je zde čistá, chladná, průzračná voda. Bez větších obtíží je možné dohlédnout na dno v hloubce 2 m. Voda obsahuje velmi malé množství rozpuštěných látek s malým množstvím dusíku a fosforu. V Mlýnském rybníce se hodnota dusíku pohybuje kolem 3,0 mg/l, což je třetina povoleného množství u kojenecké vody. (Suda et al., 2000)

Z historie Mlýnského rybníka se dozvídáme, že byl pravděpodobně založen již v 16. století pod názvem Königsmüllerteich. Postavení katru je zmiňováno v roce 1577. Na mapách se poprvé objevuje v roce 1825 jako Krummstellungs Teich. (Suda et al., 2000)

Další informace se objevují až v 50. letech 20. stol. V této době došlo k rozsáhlým polomům a silnému odlesnění velkých ploch. Přívalové deště poté zanesly Mlýnský rybník surovým humusem. Rybník byl proto vyhrnut až na jílovité podloží. V následujících letech rybník zůstal vypuštěný, pravděpodobně až do roku 1964. Objevuje se snaha o opětovné využití. Začíná se s jeho opravami s tím, že dno bylo opět vyčištěno a vyhrnuto. Zkušební napuštění a vypuštění se několikrát opakovalo. Kvůli nízkému pH (kolem 3,5 pH) byla přitékající voda upravena pomocí drceného vápence. Od této doby již byl rybník napuštěn, kromě jedné příhody, kdy ho vypustily děti (Suda et al., 2000).

Novodobá historie nám ukazuje poměrně krátkou dobu uchycení žabníčku (jsou dohady o možném rozšíření z nedaleké německé lokality nedávno objevené P. Bauerem a H. Härtelem). Historie požární nádrže je poněkud kratší. Byla vyhloubena asi před třiceti lety, což nám opět poukazuje na nedávné osídlení vitální populací žabníčku.

KAPITOLA DRUHÁ

BIODIVERSITA

Biodiversita (rozmanitost) naší planety rychle upadává a to přímým i nepřímým lidským zaviněním. Neznámé, ale přesto obrovské, množství druhů již vymřelo a populace spousty dalších druhů se ztelně ztenčily, což je také začalo bezprostředně ohrožovat (Frankham, 2002).

Mnohé druhy dnes vyžadují zásah na zlepšení jejich podmínek a správy jejich území pro zajištění jejich přežití. Za nejdůležitější faktor přispívající k vymírání druhů se dají považovat ztráty přirozeného prostředí, zavlečení nových druhů a znečištění. Všechny tyto faktory jsou způsobené lidmi, a nebo jsou přímo spojeny s růstem lidské populace. Týkají se životního prostředí, demografie a v neposlední řadě genetiky. Je nutno poukázat, že i když bude původní důvod poklesu populace odstraněn, problémy spojené s malými nebo roztroušenými populacemi budou stále přetrvávat.

Existuje velké množství různých definic biodiversity, neboť se jedná o složitý několika úrovnový jev. Světový fond ochrany přírody definoval v roce 1989 biodiversitu jako „Bohatství života na Zemi, miliony rostlin, živočichů a mikroorganismů, včetně genů, které obsahují, a složité ekosystémy vytvářející životní prostředí.“

Rozlišujeme tři základní úrovně biodiversity:

- 1) genetickou (genová variabilita v rámci populace nebo celého druhu)
- 2) druhovou (rozmanitost na úrovni druhů)
- 3) ekosystémovou (rozmanitost na úrovni společenstev a ekosystémů)

V mé práci se zabývám genetickou diversitou populací. Obor zabývající se touto tematikou se nazývá ochránářská genetik (*conservation genetics*).

OCHRANÁŘSKÁ GENETIKA (*CONSERVATION GENETICS*)

Tento obor se zabývá genetickými faktory ovlivňujícími riziko vyhynutí a navrhováním vhodného genetického managementu potřebného k jejich minimalizaci. Hlavní otázky jsou:

- Negativní efekt příbuzenského křížení na reprodukci a přežití (*inbreeding depression*)
- Ztráta genetické diversity a schopnosti vyrovnat se se změnami prostředí
- Fragmentace populací a snížení genetického toku
- Genetický drift potlačující přirozenou selekci a hlavní evoluční procesy
- Hromadění a ztráta zhoubných mutací
- Řešení taxonomických nejasností
- Určení vhodného způsobu managementu studovaného druhu
- Využití analýz molekulární genetiky k porozumění genetických pochodů v populacích určitého druhu potřebných pro jeho záchranu
- Účinky vzdáleného křížení na vitalitu jedince (*outbreeding depression*)

Ohrožené druhy mají převážně malé nebo upadající populace, takže *inbreeding* a ztráta genetické diversity jsou nevyhnutelné. Tento problém se netýká apomikticky se rozmnožujících druhů a druhů s autogamickým rozmnožováním. Zatímco *inbreeding* snižuje schopnost reprodukce a pravděpodobnost přežití, ztráta genetické diversity snižuje schopnost populací vypořádat se se změnami prostředí. (Frankel and Soulé, 1981) a další se domnívají, že genetické faktory přispívají ke zvýšení pravděpodobnosti extinkce u ohrožených druhů.

Ztráta genetické rozmanitosti

V průběhu vývoje se musely druhy vypořádat s nově vznikajícími podmínkami a čelit tak vyhynutí. Velké populace s vysokou genetickou variabilitou jsou schopny lépe vyrovnávat rozdíly mezi jedinci v jejich reakcích na změny prostředí (Frankham, 2002).

Proto jedním z faktorů ohrožujících populace je ztráta genetické diversity. Předpokládá se, že k této ztrátě přispívá fragmentace stanovišť a následné zmenšení velikosti populací. Ty jsou

následně postiženy ztrátou genetické diversity (Jain, 1994; Young et al., 1996; Smith et al., 2003; Shaal, 2005).

Populace alogamických druhů s nízkou genetickou diversitou často mají větší pravděpodobnost vyhynutí. Například při studiu *Clarkia pulchella* (Oenotheraceae) se ukázalo, že populace s nízkou genetickou diversitou vykazovaly 75% úmrtností ve třech generacích oproti 21% u populace s vyšší genetickou diversitou (Newman & Pilsen, 1997; Shaal, 2003). Další studie (Reed et al., 2003) předpokládá, že ztráta genetické rozmanitosti v dlouhodobém měřítku negativně ovlivňuje většinu druhů (pouze allogamické druhy). Je však potřeba poukázat, že tento trend se nepotvrdil u všech provedených studií. Je možné, že těchto opačných výsledků bylo dosaženo z důvodů rozdílných faktorů působících při výzkumu, např. velikost studovaných populací, nebo intenzita *inbreeding-u*.

Dále se předpokládá, že populace s nízkou genetickou diversitou jsou též náchylnější k napadení nemocemi, hmyzími škůdci a parazity oproti populacím s vysokou genetickou variabilitou (Frankham, 2002). Malé populace mají obecně nižší genetickou variabilitu než populace velké. To znamená, že ztráta genetické variability u malých populací vážně snižuje schopnost odolávat kompetičním tlakům a přizpůsobit se novým podmínkám.

Většina (ne všechny) genetické výzkumy populací se však provádějí na experimentálních populacích, často přenesených z běžných podmínek, kde nejsou populace vystaveny přírodním vlivům jako například kompetice, herbivorie, škůdci a nemoci (Shaal, 2003).

Genetický posun (*genetic drift*)

Dalším tématem kterým se ochránářská genetika zabývá je genetický posun. Tento jev se objevuje zejména u populací s fragmentovanými stanovišti. Jakmile jsou stanoviště rozdělena, populace se stávají izolované nejen prostorově, ale i geneticky (Ellstrand, 1992; Gliddon & Goudet, 1994). Vznikají tak populace, které již nejsou spojeny genetickým tokem (*genetic flow*).

V malých izolovaných populacích jsou změny v alelických frekvencích náhodné v důsledku malého množství jedinců. Předpokládá se že genetický drift vede ke snížení genetické diversity ve vlastní populaci, naopak se tím zvyšuje genetická variabilita mezi populacemi (Evand, 1979). Pokud je populace izolována a její velikost je zredukována, v populaci začne probíhat zmíněný genetický drift. V populaci proběhnou náhodné změny v alelických frekvencích a stává se tak rozdílnou od ostatních populací.

V okamžiku, kdy je efektivní velikost populace malá a dochází v ní k *inbreeding*-u, genetický drift může také ovlivnit frekvenci výskytu zhoubných alel, které by jinak byly eliminovány běžnou selekcí. Nejen že tímto jsou takové alely udržovány v populaci, ale jejich četnost výskytu se dokonce zvyšuje (Shaal, 2003). Z toho vyplývá, že malá velikost populace zvyšuje možnost vyhynutí druhu nahromaděním těchto mutací.

Oba zmíněné procesy, ztráta genetické diversity a genetický drift, jsou spolu těsně spjaty a mohou vést k oběma případům - ztrátě jednotlivých alel i snížení celkového počtu alel v populaci. Jako optimální způsob managementu se považuje předcházet tomu, aby tato situace vznikla. Pokud však již nastane, nejvhodnějším řešením často bývá obohacení genetické variability pomocí samovolné migrace, nebo cíleným posílením alel z jiných populací. Tento zásah sice naruší genetickou čistotu populace, ale je těžké si představit, že kvůli tomuto by se nechal vymřít ohrožený druh (Shaal, 2003). Tento přístup je vhodný pouze u allogamických druhů. Nově vzniklou otázkou po tomto zásahu je rozsah vlivu *outbreedingu* (vnesezení nového genotypu) na zdraví populace.

***Outbreeding* (vzdálené křížení)**

Vzdálené křížení je dalším důležitým tématem ochranné genetiky. Zabývá se zdrojem semen nebo rostlin pro záchranné programy (např. geografický původ rostlin použitých k reintrodukcii). Otázka zní: ovlivňuje míchání genotypů z různých míst výskytu snížení vitality (*fitness*) jedinců? Takováto ztráta *fitness* může být zapříčiněna kombinací genomů přizpůsobených rozdílným podmínkám (Primac, 1996).

Téma *outbreedingu* je tudíž velmi důležité pro ochranu rostlin *in situ* (na lokalitě výskytu) a pro záchranné programy.

Využitím studií genetické variability a struktury populace můžeme získat přehled o možných škodlivých následcích v záchranných programech, které by mohly vyvstat použitím genotypu z jiné populace.

***Inbreeding* (příbuzenské křížení)**

Dalším negativním efektem, který se může vyskytnout v malých populacích je *inbreeding*. Pokud se velikost populace sníží, zvýší se početnost křížení mezi geneticky blízkými jedinci (*inbreeding*). *Inbreeding* zvyšuje míru homozygotnosti v populaci, která má následně negativní efekt na *fitness* (Frankham, 1995). Toto opět platí pouze u allogamicky se rozmnožujících rostlin.

Jak *inbreeding* tak *outbreeding* jsou procesy, které generují genotypy s nízkým fitness uvnitř populace, ale nemusí snižovat početnost alel (Shaa, 2003). Ovlivňují také distribuci genotypu, ne však alel. Přesto tyto změny v genotypu mohou vést k dalším, méně známým procesům jako je například mutace v genu v závislosti na prostředí a interakce mezi alelami (Fenster & Galloway, 2000).

KAPITOLA TŘETÍ

V předchozích dvou kapitolách jsme se zabývali několika tématy: rostlinou *Luronium natans*, jejími ekologickými nároky na stanoviště, rozšířením a genetickou diversitou snažící se poukázat na faktory ohrožující malé populace. K získání základních představ o genetických poměrech probíhajících v populacích *Luronium natans* jsme se rozhodli použít isozymovou analýzu, využívající pohyb bílkovin v elektrickém poli. Tato metoda byla vybrána pro svou dostatečnou citlivost, potřebu malého množství zkoumaného vzorku, jednoduchou interpretaci výsledků a relativně nízkou cenu.

Při analýze se elektroforeticky rozlišují vybrané enzymy průchodem nosným médiem v elektrickém poli. Po následném obarvení jsme schopni určit různé fenotypy enzymu vyskytujících se v populaci. Tento výsledek je schopný podat představu o genetické variabilitě populace.

ENZYMY

Enzymy jsou jednoduché či složené bílkoviny, které katalyzují chemické přeměny v živých organismech. Enzymy určují povahu i rychlost chemických reakcí a vytvářejí tak v živých organismech harmonickou souhru chemických funkcí. Aktivita enzymů, spočívající v ovlivnění rychlosti chemických reakcí snižováním jejich aktivační energie, je závislá zejména na koncentraci substrátu, teplotě, pH, aktivátorech a inhibítorech.

Isoenzymy

Jako *isozymy* (isoenzymy) se označují všechny funkčně podobné formy daného enzymu, včetně všech polymerů složených z podjednotek, kódovaných buď různými lokusy, nebo různými alelami téhož lokusu (Munclinger, 2004). Proto se odlišují buď velikostí molekuly, nebo záměnou aminokyselin v molekule. Tyto změny se proto mohou projevit jako:

- změna náboje a konformace molekuly
- změna katalytické aktivity enzymu
- změna tepelné stability enzymu

- změna pH optima
- změna specifcity reakce
- změna chování k aktivátorům a inhibitorům

Isozymy mohou mít navíc v organismu různou funkci v závislosti na pH optimu, ale především vzhledem k rozdílné regulovatelnosti inhibitory a aktivátory.

Alozymy tvoří podmnožinu isozymů, které jsou variantami polypeptidů představujících různé alelické varianty jednoho lokusu (Munclinger, 2004).

ELEKTROFORÉZA PROTEINŮ

Isozymová analýza je jedním z mnoha typů elektroforetického zpracování proteinů. Název „elektroforéza“ pochází z řečtiny a obecně znamená transport pomocí elektřiny. Elektroforéza proteinů tedy znamená soubor způsobů rozlišení různých enzymatických makromolekul a neenzymatických bílkovin s rozdílným elektrickým nábojem v elektrickém poli.

Základ elektroforézy byl založen již na konci 19. století. Za prvního průkopníka této metody je považován švédský elektrochemik Arne Thiseliusem, který roku 1937 vynalezl tzv. metodu pohyblivého rozhraní. K dalšímu vylepšení metody došlo koncem 40. let 20. století využitím zónové elektroforézy a papírového nosiče, který znamenal stokrát menší množství vzorků, než prvotně využívaný způsob. Další rozvoj umožnilo nalezení nového nosného média. Byl použit škrobový gel a započato histologické barvení enzymů, využívající jejich katalytických vlastností. Následoval velký rozmach této metody s využitím nových poznatků a přístupů. Byly nalezeny nová nosná média a typy přístrojů (Munclinger, 2004).

Základní předpoklady využití elektroforézy

Základním předpokladem použití elektroforetických dat je, že změna v mobilitě proteinu je podmíněna změnami aminokyselin v sekvenci DNA. Protein tím může být ovlivněn několika způsoby (*Kirshner, 2000*):

- změna náboje proteinu
- změna velikosti proteinu
- změna tvaru proteinu
- změna aktivity či substrátové specifiky

Dalším předpokladem je kodominantní charakter exprese proteinu, tzn. že u heterozygota jsou fenotypově vyjádřeny obě alely. Musíme brát v potaz, že u rostlin jsou některé enzymy omezeny na cytosol, jiné jsou soustředěny pouze v chloroplastech. Také je potřeba rozlišovat tkáně, z kterých byly vzorky odebrány. Enzymy se v různých tkáních mohou lišit množstvím, zastoupením nebo aktivitou podjednotek (Munclinger, 2004).

Princip elektroforézy

Proteiny (bílkoviny) jsou molekuly skládající se z aminokyselin spojených kovalentními, tzv. peptidickými, vazbami. Za proteiny považujeme molekuly složené z více než sta aminokyselin (molekulová hmotnost větší než 10000), kratší řetězce nazýváme peptidy.

Možnost elektroforetického rozlišení proteinů nám dává pořadí a povaha aminokyselin určující strukturu vzniklých polypeptidů. Toto pořadí zcela závisí na informaci, obsažené v DNA genu, který tento peptid kóduje. Každá z 20 základních aminokyselin se od ostatních liší charakteristickým postranním řetězcem o různé velikosti, tvaru a popřípadě i svým elektrickým nábojem (Munclinger, 2004). Elektricky nabitě postranní řetězce jsou zodpovědné za pohyb proteinové makromolekuly nosným médiem při elektroforéze. Celkový náboj proteinu se ovšem mění s pH. Hodnota pH, ve kterém se kladné a záporné náboje vyrovnají, se nazývá izoelektrický bod. V tomto bodě se proteiny v elektrickém poli nepohybují.

Jakmile vznikne polypeptidový řetězec, slabé nekovalentní interakce dávají vzniknout sekundární (α -helix, β -struktura „skládaného listu“, $\alpha\beta$ -barel) a terciární struktury. Tyto struktury jsou udržovány pomocí vodíkových či disulfidických můstků mezi postranními řetězci aminokyselin. Hydrofobní skupiny mají tendenci orientovat se dovnitř, zatímco hydrofilní skupiny vně makromolekuly, proto některé skupiny nepřispívají k náboji vzniklého proteinu. A to buď již kuli zmíněnému uschování uvnitř molekuly, nebo proto, že se zapojují do tvorby jeho terciární struktury. Molekuly se stejnou primární strukturou se proto mohou touto strukturou lišit. To znamená, že jakákoli modifikace terciární struktury proteinu může způsobit změnu náboje díky změněnému podílu ionizovatelných postranních řetězců. Terciární struktura navíc určuje celkovou velikost a tvar makromolekuly, které u některých typů nosného média mohou rovněž ovlivňovat pohyb proteinů při elektroforéze.

V některých případech je funkční protein složen z několika polypeptidových řetězců. Tento jev je častý právě u enzymů. Tyto řetězce mohou být identické a být produktem jednoho genu, nebo mohou být rozdílné s původem kódování na různých genech. Toto uspořádání proteinu z podjednotek se nazývá kvartérní struktura. Proto se proteiny rozdělují podle počtu podjednotek, které ho tvoří na: monomery, dimery, trimetry, tetrametry, atd. (Kirshner, 2000). Elektroforetická mobilita bude pochopitelně u molekul s odlišným počtem podjednotek rozdílná. Proto budou-li póry nosného média dostatečně malé, tak že ovlivňují pohyb makromolekul, je rychlost migrace proteinů v určována jejich celkovým nábojem (Z), silou



elektrického pole (E) a koeficientu tření (f), který závisí na tvaru, velikosti a viskozitě nosného média:

$$v = EZ/f$$

Pokud se tedy k analýze vloží do elektrického pole směs proteinů, po elektroforéze získáme tyto proteiny na nosném médiu rozdělené podle své elektroforetické pohyblivosti (Munclinger, 2004).

Detekce isoenzymů

Po skončené elektroforéze získáme gel s rozdělenými proteiny. Převážná většina proteinů je bezbarvá. Proto po ukončení elektroforetické separace musí být jejich poloha detekována barvením. Existují specifické a nespecifické detekce. Nespecifickou detekcí bude například stanovení všech proteinů na gelu, čímž bychom získali velké množství zón, jejichž analýza by byla pro naše účely zbytečně složitá a problematická. Histochemická stanovení enzymů jsou specifitější a počet obarvených zón je podstatně nižší. V dnešní době existuje něco přes sto takovýchto stanovení. Obecně je možno říct, že detekce určitého enzymu je založena na reakci, kterou daný enzym katalyzuje. Existuje několik typů detekce (*Kirshner, 2000*):

- produkt reakce je sám o sobě barevný – v místě kde je enzym lokalizovaný vzniká barevný pruh, pokud možno nerozpustná sraženina
- substrát je barevný. Celý gel je zbarvený, místa s enzymatickou aktivitou jsou odbarvena
- spřažená reakce. Produkt reakce není barevný, ale je možno ho spřaženou reakcí zviditelnit. Tato reakce může být jak spontánní, tak i enzymatická.

Přehled základních elektroforetických metod

Metody elektroforézy proteinů lze rozdělit podle několika kritérií, například podle charakteru použitého nosného média, nebo podle orientace a tvaru tohoto média. Rozlišujeme elektroforézu horizontální, vertikální a kapilárovou.

Podle charakteru nosného média rozlišujeme čtyři základní typy elektroforézy:

1. elektroforézu na škrobovém gelu (SGE)
2. polyakrylamidovém gelu (PAGE) (použita v našem případě)

3. acetylcelulózovém gelu (CAGE)
4. agarózovém gelu (AGE).

KAPITOLA ČTVRTÁ

METODIKA PRÁCE

Metodika práce získání dat o populacích žabníčku vzplývavého (*L. natans*) je možné shrnout do několika bodů:

1. odebrání a uchování tkáně
2. příprava vzorků
3. vlastní elektroforéza
4. vizualizace proteinů (barvení) na gelu
5. genetická interpretace gelů, statistické zpracování dat

Z řady separačních metod proteinů byla pro tuto práci v laboratoři Botanického ústavu AV ČR užita vertikální separace na polyakrylamidových gelech (PAGE). Je charakterizována účinnou separací, dobrou reprodukovatelností gelů a jasnými *pattern* (obrazce na gelech). PAGE využívá k separaci jednotlivých molekul jak jejich náboj, tak velikost. Polyakrylamidové gely vznikají katalytickou polymerizací dvou monomerů, akrylamidu a N, N-metylen bisakrylamidu (bis). Gel je tvořen dlouhými vlákny polymerizovaného akrylamidu, navzájem spojenými vlákny bisakrylamidu. Koncentrace obou složek určuje velikost pórů ve výsledném gelu – čím je akrylamid koncentrovanější, tím jsou póry menší. Závislost velikosti pórů na koncentraci bisakrylamidu je složitější: póry jsou nejmenší při koncentraci bis 5%, směrem k nižším i vyšším koncentracím se jejich velikost zvyšuje (Munclinger, 2004).

Jako elektroforetické zařízení byla využita aparatura HOEFER SE 600.

Sběr materiálu

Získání materiálu ke zpracování proběhlo 26. 9. 2006 za spolupráce pracovníků správy CHKO a NP Labské pískovce (P. Bauer, H. Härtel). Jako optimální lokalita byla zvolena malá hasičská nádrž vedle cesty do Maxiček. Jedná se o ovál velikosti kolem 20 m². K hladině

strmě spadávají holé břehy. Nádrž je napájena vodou z pramene vytékajícího o pár metrů výš. Sběr vzorků byl prováděn ručně cca 0,5 až 1,5 m od kraje v rozmezí cca 1 m. Rostliny zde byly ve velmi dobré formě, zrovna v období kvetení. Sbírány byly listy natantní o velikost kolem 0,5-1 cm². Získané vzorky byly převáženy v skleněných nádobách s chladnou vodou. Nádoby samy byly ponořeny do vody. Po převozu byly do příštího rána, kdy došlo ke zpracování na vzorky, uloženy v chladničce.

Na lokalitě Mlýnského rybníka bylo odebráno několik submerzních listů pro otestování jejich využitelnosti, jako genetického materiálu, pro izozymovou analýzu.

Příprava vzorku

Příprava vzorků probíhá za stálého chlazení při maximální teplotě 5°C, kvůli zachování enzymatické aktivity.

Vychlazené mikroskopavky jsme očíslovali a ve stojanu zanořili do ledové lázně. Nasbíraný rostlinný materiál jsme očistili od možných nečistot destilovanou vodou. U natantních listů jsme odstranili řapík se střední žilkou listu. Zbytek listu jsme nastříhali na drobné části. Submerzní listy byly opláchnuty a nadrobno nastříhány.

Extrakce vzorků

Nastříhané kousky listů jsme homogenizovali v chlazených třecích miskách. Spotřeby rostlinného vzorku a extrakčního pufru je v tomto případě vyšší než při homogenizaci v elektrickém mixéru. Rostlinného materiálu je potřeba kolem 60-80 mg a extrakčního pufru 0,6-0,8 ml.

Kvůli získání kvalitních dat bylo množství pufru optimalizováno v závislosti na množství rostlinného materiálu. (*Obr. 4*)

Po homogenizaci následuje centrifugace. Provádíme ji po dobu 10 min. při 15000 ot./min. Získáme tak čistý supernatant (horní vrstva). Takto připravené vzorky rozpipetujeme a dáme zmrazit pro jejich uchování.

Vlastní elektroforéza

Jak již bylo řečeno, jako nosné médium jsme použili akrylamidový gel. Ten se skládá se dvou složek - tzv. koncentračního gelu (hustota 4%) kde dochází k soustředění molekul a ze separačního gelu (hustota 8%), kde již probíhá samotná separace proteinů.

Aplikaci vzorku na gel jsme provedli mikropipetou do komůrek vniklých v koncentračním gelu po vytažení hřebínku. Uzavřeli jsme aparaturu a vložili do elektrodové vany s pufrem (zde bylo použito Tris- glycinového pufru). V důsledku toho se v průběhu elektroforézy při konstantním proudu zvyšuje napětí. Celý průběh naměřených hodnot je zaznamenán na protokolech elektroforézy.

Po ukončení elektroforézy jsme gely vyjmuli z aparatury a připravili k barvení. K barvení proteinů bylo využito několika různých detekčních roztoků.

- 6-PGDH– 6-fosfoglukonát dehydrogenáza
- AAT- alkohol dehydrogenáza
- DIA- diaforáza
- EST- esteráza
- GHD- glutamát dehydrogenáza (Obr. 5)
- LAP- leucin animo peptidáza (Obr. 6)
- ME- malát enzym(Obr. 7)
- PGM+ PGI- fosfogluko mutáza +glukózofosfát isomeráza
- SHDH- šikikmát dehydrogenáza (Obr. 8)

Po obarvení se jsme gely napnuli a vysušili mezi dvěma kusy celofánové folie.

DISKUZE

Tato bakalářská práce patří mezi první studie, které se systematicky zabývají genetickou variabilitou kriticky ohroženého rostlinného druhu na území České republiky, s cílem využít získaná data pro efektivní druhovou ochranu. Zájmovým objektem je žabníček vzplývavý (*Luronium natans*) vyskytující se v ČR na okraji svého areálu (dosud ověřen výskyt na 2 původních lokalitách).

Jako ukazatel genetické variability byl zvolen enzymový polymorfismus. Pilotní výsledky získané po optimalizaci metodiky prokázaly uniformitu ve sledovaných molekulárních markerech (shodné typy izozymů ve všech studovaných systémech). Získané údaje jsou ve shodě s obecně nižší variabilitou vodních rostlin ve srovnání s rostlinami terestrickými (Kay, 1999). To může být zapříčiněno větší izolovaností jednotlivých populací vodních rostlin, mezi nimiž nemůže docházet k intenzivnímu genetickému toku. Studie provedené v centru výskytu žabníčku vzplývavého (*Luronium natans*) však překvapivě ukázaly poměrně vysokou genetickou diversitu (v kontextu dalších vodních rostlin). Ta může nejspíše poukazovat na probíhající sexuální rozmnožování a genovou výměnu (Kay, 1999).

Nulová genetická diversita zjištěná na okraji areálu (Labské pískovce) může být zapříčiněna několika faktory:

1) Založení populace a následné osídlení stanoviště jedinou rostlinou (tzv. efekt zakladatele, *founder effect*) díky vegetativnímu rozmnožování. Vegetativní rozmnožování je často převažujícím způsobem reprodukce na okraji areálu. Umožňuje přežití populací v oblastech, kde řada faktorů omezuje nebo znemožňuje pohlavní rozmnožování. Vytváří se tak množství dobře adaptovaných rostlin, jejichž genotyp je shodný s genotypem mateřské rostliny.

2) Výhradní samoopylování (autogamie) nebo opylování v rámci téhož klonu (geitonogamie). Produkce semen touto cestou poskytuje mateřské rostlině výhody generativního rozmnožování, mj. rozšiřování na velké vzdálenosti a možnost přežití za nevhodných podmínek. Autogamie se dále často uplatňuje v extrémních či okrajových biotopech, kde je opylování mezi geneticky rozdílnými rostlinami nemožné. V tomto případě je samoopylení zaručenou metodou ke zplození potomstva. Při opakovaném samoopylování však dochází ke snižování genetické diversity, zejména u diploidních rostlin.

3) Izolovanost populace a s ní spojený omezený (až nulový) genetický tok (*gene flow*). To mohlo vést ke genetickému posunu (*genetic drift*) nebo příbuzenskému křížení (*inbreeding*) a následnému snížení alelických kombinací.

Z ochrannářského pohledu výsledky nulové diversity poukazují na nutnost ochrany stanovišť a dospělých rostlin. Lze předpokládat, že genotyp osidlující studovanou lokalitu je dobře přizpůsoben zdejšími podmínkami a změna abiotických faktorů by mohla zapříčinit vymizení populace. V průběhu dalšího studia bude zapotřebí zjistit poměr vegetativního a generativního rozmnožování tak, aby bylo možné navrhnout optimální způsob managementu.

Dosavadní výsledky ukazují, že díky nízké genetické diversitě je pro případnou re-introdukcii nebo posilování již existujících populací možné použít jakékoliv jedince. Odpadá tedy nebezpečí ohrožení genetické diversity stávající populace nebo vzniku populace s jinou frekvencí alel než u populace mateřské.

ZÁVĚR

Předložená bakalářská práce obsahuje jak rešeršní část shrnující dosavadní literární poznatky o kriticky ohroženém druhu české květeny *Luronium natans*, tak část praktickou, jejímž cílem bylo optimalizovat metodiku izozymových analýz a získat první náhled do populační struktury tohoto ochránářsky významného druhu.

Důležitým podkladem pro další cílené ochránářské kroky bylo zjištění nulové genetické informace ve studované populaci v CHKO Labské pískovce.

V navazující diplomové práci bude genetická variabilita analyzována na rozsáhlejším populačním vzorku, se zahrnutím všech populací rostoucích na území ČR. Cílem bude podrobně zmapovat genetickou diversitu druhu na okraji jeho areálu. Současně budou do studia zahrnuty i populace rostoucí v sousedním Německu (kvůli poznání evoluční historie a vzájemných vztahů mezi populacemi).

Výsledky najdou praktické využití při navrhování optimálního způsobu managementu na stávajících lokalitách, posilování přirozených populací i při případné re-introdukcii žabníčku vzplývavého na další vhodná stanoviště.

LITERATURA

- Briggs J. D. ed.; (1988) Canals – Wildlife value and resoration issues. *British wildlife* 7: 365 – 377.
- Ellstrand N.; (1992) Gene flow by pollen: Implication for plant conservation genetics. *Oikos* 63:77-86.
- Ewens W.; (1979) *Mathematical Population Genetics*. Springer-Verlag, Berlin.
- Fenster & L. Galloway; (2000) Inbreeding and outbreeding depression in natural population of *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *Conservation Biol.* 14: 1406-1412.
- Frankel O. H. and M.E. Soulé; (1981) *Conservation and Evolution*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frankham R., J.D. Ballou and Briscoe, D.A.; (2002) *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frankham, R.; (1995) Inbreeding and extinction: A threshold effect. *Conservation Biology* 9, 792-799.
- Giddon C. & J. Goudet; (1994) The genetic structure of metapopulation and conservation genetics Pp 107-114 in V Loeschoke, J. Tomiuk & S. Jain, eds. *Conservation genetics*, Birkhauser, Basel.
- Jain S.; (1994) Genetics and demography of rare plants and patchily distributed colonizing species, Pp 291-308 in V. Loescheke, J. Tomiuk & S. Jain (editors), *Conservation genetics*, Birkhauser, Basel.
- Kay Q. O. N. & John R. F., Jones R. A.; (1999) Biology, genetics variation and conservation of *Luronium natans* (L.) Raf. In *Britain and Ireland*, Botanical society of British Isles 22:301 – 315.
- Kirschner J., Kirschnerová L., Kottová K., Plačková I., Štěpánek J., Tichý M.; (2000) *Analýza isoenzymů v populační biologii rostlin, Průhonice*.
- Kubát K., Chrtek J., Kaplan Z., Kirschner J.; (2002) *Klíč ke květeně České republiky*, Academia, Praha.
- Munclinger, Zima, Macholán, Piálek; (2004) *Skripta: Genetické metody v zoologii*, Karolinum, Praha.
- Newman D. & D. Pilson; (1997) Increased probability of extinction due to decreased genetic effects population size: Experimental population of *Clarkia pulchella*, *Evolution* 51: 354-362.
- Perring F. H. & Farrell L.; (1983) *British Red Data books: 1. vascular plants*, 2nd ed. Royal Society for Nature conservation, Lincoln.

Primac R.; (1996) Lessons from ecological theory : Dispersal, establishment and population structure. Pp 209-233; in D. Falc. C. Miller & P. Olwell, Restoring Diversity: Strategies for reintroduction of endangered plants. Island press, Washington, DC.

Reed D. & R. Frangham; (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis. *Evolution* 55: 1095-1103.

Rich T. C. G., Kay G. M., Kirshner J.; (1995) Floating water-plantain *Luronium natans* (L.) Raf. (Alismataceae) present in Ireland, *Ireland nature*, vol. 25, no. 4:140-145.

Shaal A. B., Leverich W. J.; (2005) Conservation genetics: Theory and practice, *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol 92, nr.1.

Smith S., J. Hubes & G. Wardell- Johnston; (2003) High population differentiation and extensive clonality in a rare malle eukalypt: *Eucalyptus curtysii*, *Conservation genetics*, 4: 298-300.

Suda J, Bauer P., Brabec J., Hadinec J.; (2000) Znovunalezené druhy naší květeny- žabníček vzplývavý, *Živa*, 205- 5/2000.

Truema I., Morton A. & Wainwright M.; (1995) The flora of Montgomeyrshire. Montgomeryshire Field Society and Montgomeryshire Wildlife Trust, Welshpool.

Willby N. J., Eaton J. W.; (1993) The distribution ecology and concervation of *Luronium natans* (L.) Raf. In Britain. *Journal of aqatic plant management* 31:70 – 78.

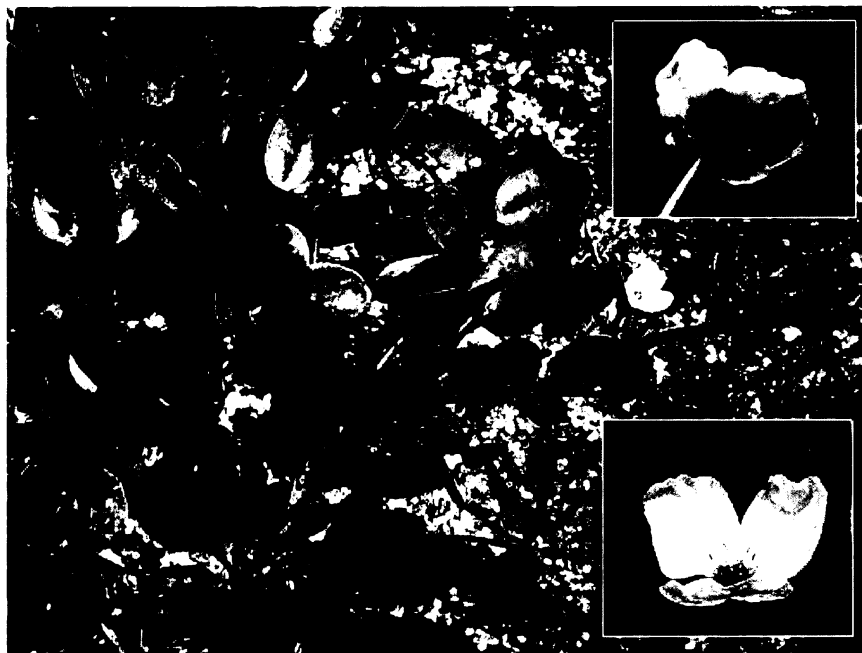
Zouny A., T. Boyl & T. Brown; (1996) The population genetics consequences of habitat fragmentation for plants, *Trends Ecol. Evol.* 1: 413-418.

Obr. 1



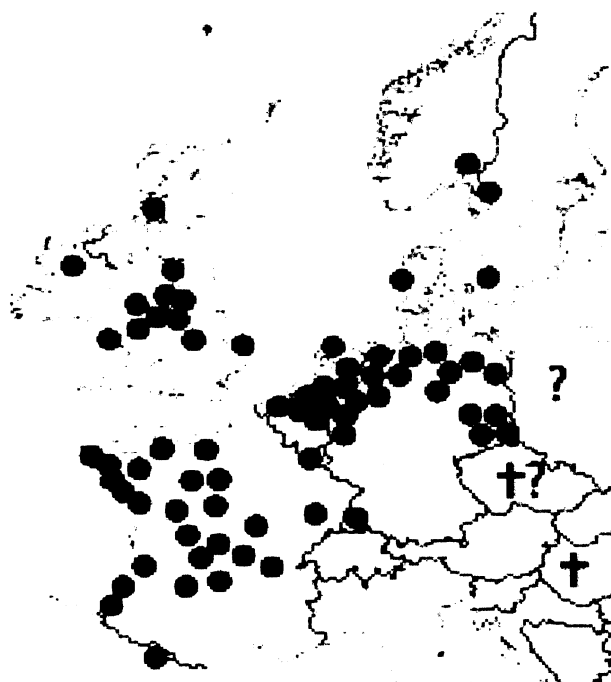
Habitus žabníčku vzplývavého (Luronium natans)

Obr. 2



Žabníček vzplývavý (Luronium natans)

Obr. 3



Výskyt žabníčku vzplývavého

Obr. 4

24.9.2006

EXTRAKCE - LURONIUM

pufr: VIOLA (vzorů adebrakay & dnyx raketei)

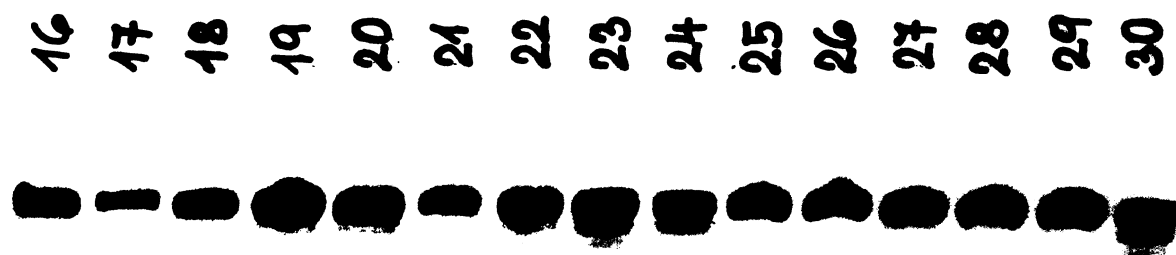
kolal. i. - PONORENÉ KOVAL. SRIINKE MACIŠTIN

1	1. Kolal.	1 vzor.	+D	vzorku 9,016g	pufru.	300 µl
2	1	2	+D	11	250 µl	
3	-	3	+D	60	400 µl	
4	-	4	+D	30	400 µl	
5	-	5	+D	14	250 µl	
6	-	6	+D	9	250 µl	
7	-	7	+D	10	250 µl	
8	-	8	+D	50	600 µl	
9	-	9	+D	24	350 µl	
10	-	10	+D	53	300 µl	
11	-	11	+D	33	400 µl	
12	-	12	+D	10	250 µl	
13	-	13	+D	11	250 µl	
14	-	14	+D	14	250 µl	
15	-	15	+D	21	250 µl	
16	2	1	SPLIVAVÉ-D	cca 60-80	450 µl	
17	-	2	+D	-	-	
18	-	3	+D	-	-	
19	-	4	+D	-	-	
20	-	5	+D	-	-	
21	-	6	+D	-	-	
22	-	7	+D	-	-	
23	-	8	+D	-	-	
24	-	9	+D	-	-	
25	-	10	+D	-	-	
26	-	11	+D	-	-	
27	-	12	+D	-	-	
28	-	13	+D	-	-	
29	-	14	+D	-	-	
30	-	15	+D	-	-	

DATA NĚJ = SPLIVAVÉ

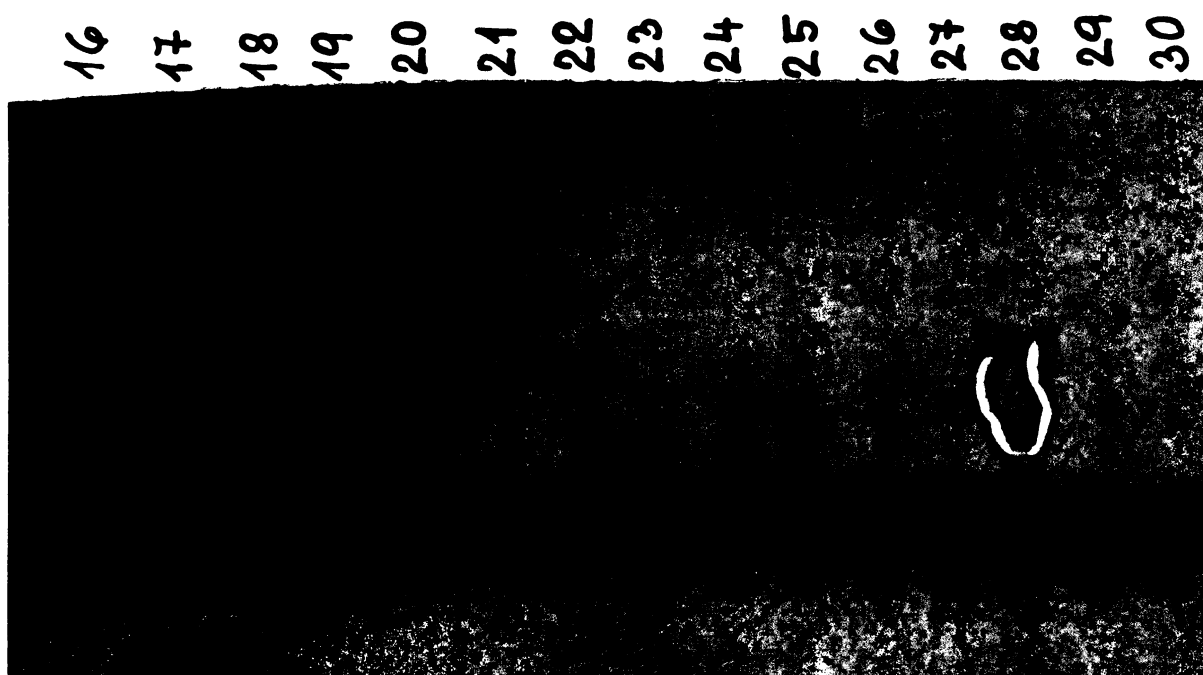
Protokol o extrakci vzorků

Obr.5



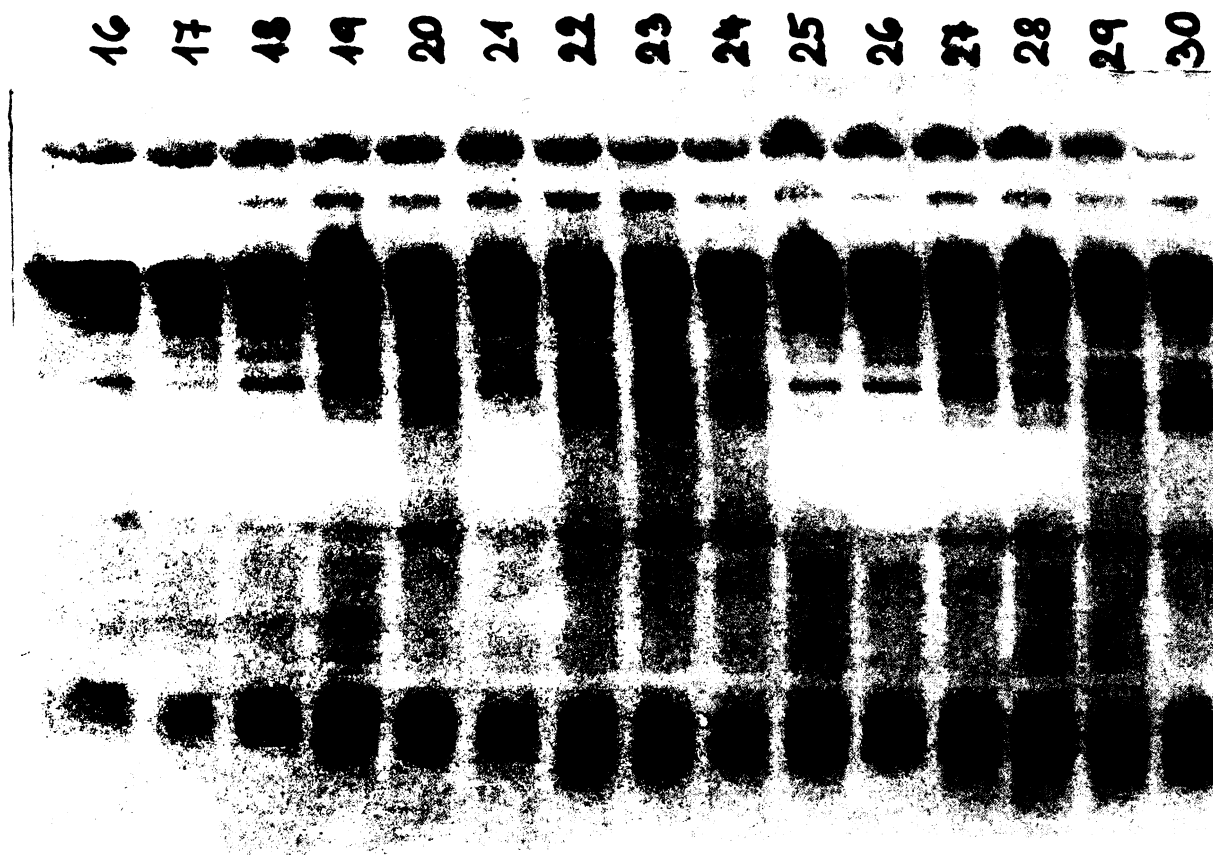
Gel: výsledky GHD barvení

Obr.6



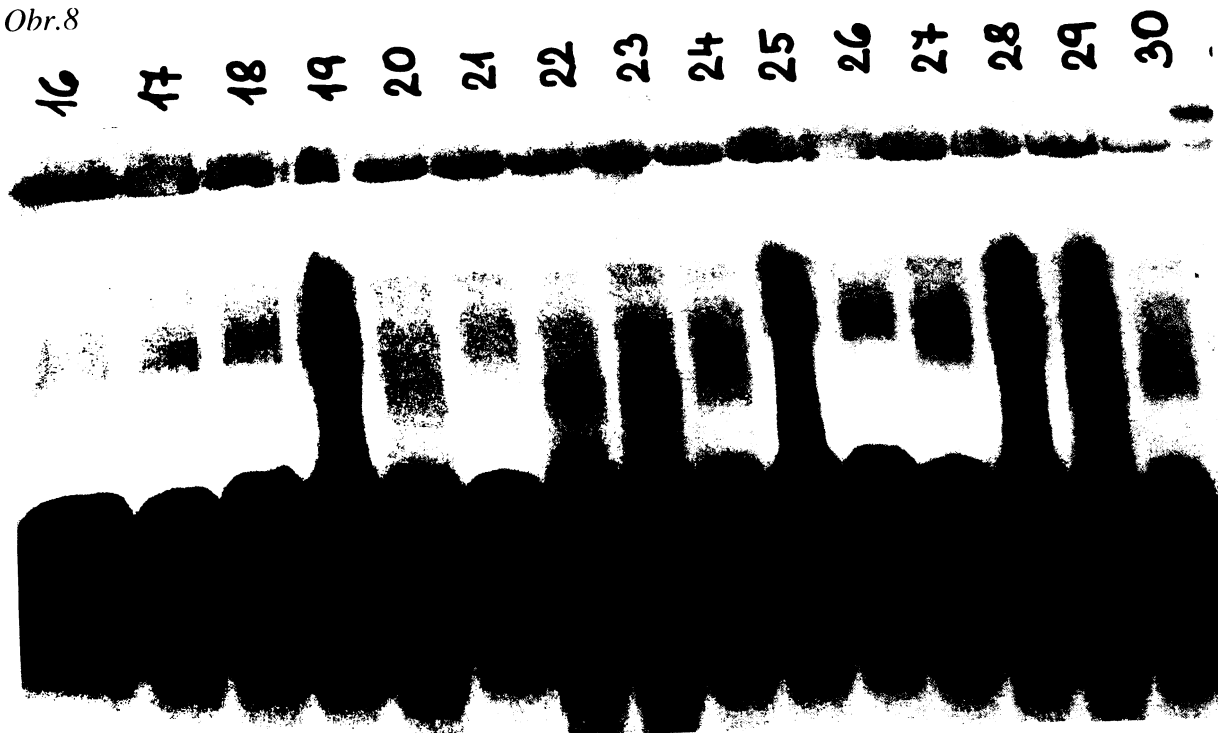
Gel: výsledky LAP barvení

Obr.7



Gel: výsledky ME barvení

Obr.8



Gel: výsledky SHDH barvení

