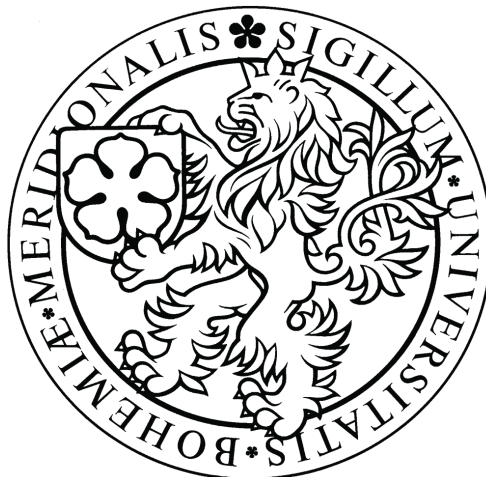


**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

Přírodovědecká fakulta



*Magisterská diplomová práce*

**Možnosti určení geografického původu živočišných a rostlinných  
produktů s pomocí stabilních izotopů kyslíku, vodíku a uhlíku  
Izotopový signál keratinu krunýře želv**

Vypracovala: Bc. Martina Drtinová

Vedoucí práce: doc. Ing. Jiří Šantrůček, CSc., PřF JU

Školitel – specialista: Mgr. Michal Berec, PhD., ZF JU

České Budějovice 2011

Drtinová, M. 2010. Možnosti určení geografického původu živočišných a rostlinných produktů pomocí stabilních izotopů kyslíku, vodíku a uhlíku. Izotopový signál keratinu krunýře želv. [The possibilities of determining the geographic origin of plant and animal products by means of stable isotopes of oxygen, hydrogen and carbon. Isotope signature in keratin of tortoise's shell. Mgr. Thesis, in Czech.] – p. 77, Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:** This biological study is focused on the possibility of using stable isotope analyses to determine the geographic origin of plants and mainly animals especially tortoises. In the experiment nineteen tortoises were divided into two groups which were fed by isotopically different food and water for one year. The samples of keratin from their shells were collected before and after the experiment. Then the samples were analysed for the ratio of particular isotopes using isotope ratio mass spectrometry.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích, dne .....

## **PODĚKOVÁNÍ**

*Na tomto místě bych ráda poděkovala mnoha lidem, bez nichž by tato práce zajisté nevznikla. Svým dvěma školitelům – Jirkovi Šantrůčkovi a Michalu Bercovi, za vedení práce, zajímavé diskuze a cenné rady. Velký dík patří také Petře Fialové za pěstování krmného materiálu, Marii Šimkové za trpělivost a pomoc při kryodestilaci, Jitce Kufnerové za obstarání většiny želv pro experimentální část, pomoc při odběru vzorků krunýře a užitečné informace o problematice CITES, panu doktoru Moravcovi za poskytnutí vzorků několika exemplářů želv, Láďovi Markovi za technické informace a také milé povídání při navažování vzorků, Simče Polákové za pomoc při statistickém zpracování výsledků a prostě všem z katedry fyziologie rostlin JU. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala za podporu a pochopení všem blízkým a rodině.*

# OBSAH

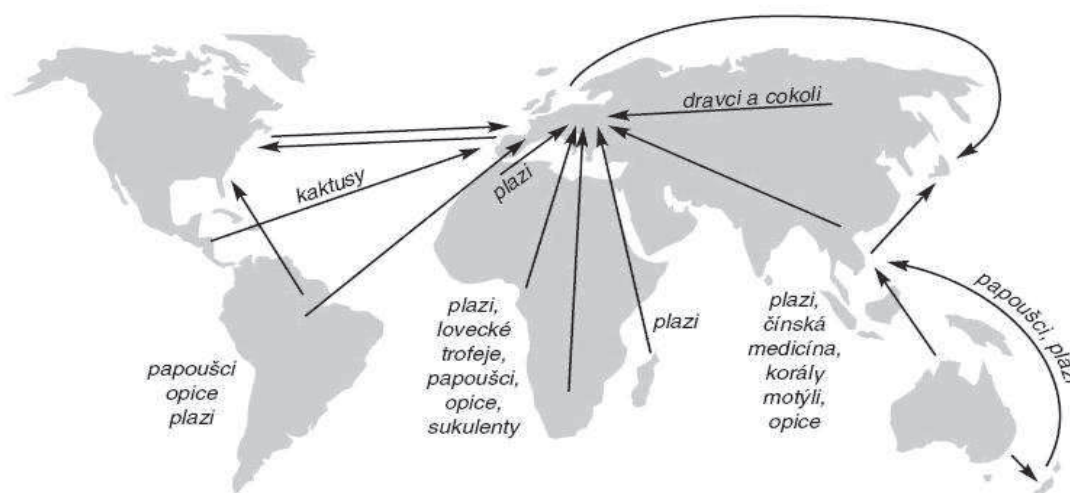
1. Úvod	1
1. 1. Ochrana volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin	1
1. 2. Izotop (definice, vlastnosti) a izotopová frakcionace	4
1. 3. Izotopy kyslíku, vodíku a uhlíku – jejich distribuce v přírodě a procesy ovlivňující jejich poměry	7
1. 4. Voda – rostlina – živočich aneb od vodní nádrže až k lesňáčkovi	11
1. 4. 1. Voda: Izotopová frakcionace během výparu a kondenzace	11
1. 4. 2. Voda – rostlina: Příjem a využití srážkové vody rostlinami	12
1. 4. 3. Rostlina – živočich: Izotopový otisk potravy v těle živočichů	13
1. 5. Výběr vhodné tkáně pro určení geografického původu želv	14
1. 6. Keratin – strukturní typy a syntéza	15
1. 7. Želvy – tvorba krunýře a přirůstání štítků	18
1. 8. Hypotézy a cíle práce	21
2. Materiál a metody	22
2. 1. Materiál	22
2. 1. 1. Zvířata, uspořádání experimentu	22
2. 1. 2. Zdrojová voda	25
2. 1. 3. Pěstování rostlin, krmení	27
2. 2. Metody	28
2. 2. 1. Odběr a příprava vzorků	28
2. 2. 2. Izotopové analytické metody	30
2. 2. 3. Statistické vyhodnocení dat	31
3. Výsledky	32
3.1. Vodík	32
3. 1. 1. $\delta D$ v keratinu želv, srovnání s $\delta D$ pitné vody a vody v krmivu	32
3. 1. 2. $\delta D$ zálivkové vody během experimentu	34
3. 1. 3. $\delta D$ vody v listech krmných rostlin	35
3. 1. 4. $\delta D$ mrtvých exemplářů s doloženým místem původu	37

3. 2. Kyslík	39
3. 2. 1. $\delta^{18}\text{O}$ v keratinu želv, srovnání s $\delta^{18}\text{O}$ pitné vody a vody v krmivu	39
3. 2. 2. $\delta^{18}\text{O}$ zálivkové vody během experimentu	41
3. 2. 3. $\delta^{18}\text{O}$ vody v listech krmných rostlin	42
3. 2. 4. $\delta^{18}\text{O}$ mrtvých exemplářů s doloženým místem původu	44
3. 3. Uhlík	46
3. 3. 1. $\delta^{13}\text{C}$ v keratinu želv, srovnání s $\delta^{13}\text{C}$ krmiva	46
3. 3. 2. $^{13}\text{C}$ mrtvých exemplářů s doloženým místem původu	48
4. Diskuze	50
4. 1. Vodík	50
4. 2. Kyslík	53
4. 3. Vodík a kyslík	57
4. 4. Uhlík	58
4. 5. Využití stabilních izotopů při určování geografického původu a další směřování výzkumů	61
5. Souhrn	63
5. Literatura	64
6. Příloha	75

# 1. ÚVOD

## 1. 1. Ochrana volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin

Roční obrat mezinárodního obchodu s volně žijícími živočichy a planě rostoucími rostlinami (dále živočichy a rostlinami) se podle odborných odhadů celosvětově pohybuje kolem 50 miliard dolarů (Stejskal 2006). Podle statistických údajů je však využívání živočichů a rostlin pro účely obchodu druhou nejvýznamnější příčinou ubývání druhů na naší planetě, a to hned za ničením přirozených stanovišť (Reeve 2002). Toto si již počátkem 60. let 20. století začalo mezinárodní společenství v čele s IUCN a OSN uvědomovat. Snaha brzdit často bezohledné využívání přírody a zabránit tak vyhubení některých druhů fauny a flóry v přírodě v důsledku nekontrolovaného mezinárodního obchodu vyústila 3. března 1973 v přijetí Úmluvy o mezinárodním obchodu s ohroženými druhy volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, zkráceně CITES neboli Washingtonská úmluva). Problematika mezinárodního obchodu s ohroženými druhy představuje svým obsahem a významem jeden z nejvýznamnějších problémů v oblasti ochrany životního prostředí a péče o biodiverzitu. Hlavními vývozními oblastmi jsou Střední a Jižní Amerika, Afrika a Asie a hlavními dovozními oblastmi jsou Severní Amerika, Evropa, Dálný Východ (Japonsko, Korea, Čína), Střední Východ a Austrálie (Obr. 1).



**Obrázek 1.** Hlavní směry a komodity obchodu s ohroženými druhy (převzato a upraveno z Bouchal 2002a).

V obchodu s exempláři druhů, na něž se vztahuje CITES, převažuje živá fauna a flóra, roste však též dovoz výrobků a neživých exemplářů. Nejčastějším „živým zbožím“ jsou zejména papoušci a plazi (z nichž pak hlavně želvy, hadi a ještěři). Obchodníci a překupníci se v poslední době zaměřují i na jihoamerické drápkaté opice. Z rostlin jsou to především kaktusy, orchideje a vzácné tropické dřevo. Z výrobků a neživých exemplářů sem patří například komerční dovozy módního a luxusního zboží, které obsahuje části těl exemplářů zahrnutých do CITES, lovecké trofeje apod.

Vedle legálního obchodu s živou přírodou existuje však i rozsáhlý obchod nelegální. Odhady uvádějí roční obrat 5 – 8 miliard dolarů (Stejskal 2006). Nejzávažnějším současným problémem je pašování částí vymírajících druhů, jako jsou tygři (kosti, pohlavní orgány), nosorožci (rohy), medvědi (drápy, žlučníky) aj. do Číny, Koreje, Vietnamu a Hongkongu pro výrobu tradičních léčiv. Co se objemu zisku týče, je ilegální obchod s faunou a florou třetím nejvýnosnějším obchodem na světě hned za obchodem s drogami a zbraněmi. Z hlediska boje proti nelegálnímu obchodu s ohroženými druhy je významná velmi dobrá spolupráce CITES s Interpolem či Světovou organizací celních orgánů (WCO). Účelem úmluvy CITES je tedy regulovat obchod s ohroženými druhy živočichů a rostlin postavením pod společnou kontrolu všech zemí světa, aby se zabránilo úplnému vyhubení některých organismů. Předmětem úmluvy je v současné době asi 5000 druhů zvířat a 25 300 druhů rostlin.

V České republice je dodržování Úmluvy CITES stanoveno zákonem č. 100/2004 Sb. Vývozní a dovozní povolení vydává Ministerstvo životního prostředí jako výkonný orgán na základě vyjádření odborného – vědeckého - orgánu, kterým je Agentura ochrany přírody a krajiny ČR. Ta posuzuje, zda jde o ohrožený druh, v jaké míře, a zda jeho vývoz či dovoz ohrozí stávající populaci. Česká inspekce životního prostředí provádí kontrolu dodržování zákona o CITES. To v praxi znamená, že provádí kontroly na hranicích, burzách, v prodejnách a u chovatelů. Za porušení zákona ukládá pokuty a nelegálně získané exempláře může i odebrat. Především díky zpřísněným kontrolám na hranicích, povinné registraci a pravidelným kontrolám na burzách a prodejnách výstavách se podařilo dosáhnout poklesu počtu nelegálně držených zvířat. Zlepšila se také mezinárodní spolupráce, přesto stále není situace uspokojivá.

Vzhledem k tomu, že legislativa ochrany přírody operuje nejen na mezinárodní ale také na státní a regionální úrovni a jednotlivé státy jsou oprávněny reagovat úpravou zákona s ohledem na momentální stav daného druhu, dochází často k situacím, kdy je třeba zjistit

nějakým způsobem geografický původ jedince či exempláře. Proto se v posledních letech těší oblibě alternativní, nepřímé metody, jako je využití molekulárně – genetických metod (Ogden *et al.* 2009), analýza stabilních izotopů (Hobson & Wassenaar 2005) nebo stopových prvků (Szép *et al.* 2003).

Stabilní izotopy našly své uplatnění nejprve v geochemii a meteorologii, později se začaly s úspěchem využívat ve fyziologii rostlin, paleontologii a archeologii. V ekologii se první práce používající postupy založené na analýze stabilních izotopů začaly objevovat až na přelomu 70. a 80. let. Poté, co došlo díky technologickým vylepšením k zautomatizování analýz (Brand 1996), se využití stabilních izotopů velmi rozšířilo – stačí si zběžně prolistovat několik posledních čísel některého ekologického časopisu (např. *Oecologia*). Jedním z mnoha praktických využití studia stabilních izotopů je uplatnění v ochraně přírody. Jedná se o neuvěřitelně se rozvíjející obor poslední dekády (Rubenstein & Hobson 2004).

Pro přiblížení uvedu hned v úvodu několik příkladů. Stabilní izotopy uhlíku a dusíku byly už dříve použity k rozlišení geograficky odlišných populací zvířat (Alisauskas & Hobson 1993). Základem této metody je regionální rozdíl v poměrech přirozeně se vyskytujících stabilních izotopů v potravních sítích. Proto mohou izotopové poměry v tělech organismů poskytnout informaci o jejich původu (Hobson 1999, Hobson & Wassenaar 1999a). Hobson & Wassenaar (1997) ve své studii demonstrují, že měřením poměru stabilních izotopů vodíku v keratinu peří je možno zhodnotit původ některých neotropických druhů pěvců zimujících ve střední Americe. Delta deuteria ( $\delta D$ , delta vypovídá o přirozeném výskytu těžkého izotopu, vysvětleno dále v kapitole 1. 2.) ve srážkách se odráží v rostlinách (Yapp & Epstein 1982) a následně se přenáší do konzumentů vyššího řádu (Cormie *et al.* 1994a, 1994b). Poměr stabilních izotopů vodíku (D/H vyjádřený jako  $\delta D$ ) v keratinu peří migrujících pěvců tedy poskytuje „geografickou značku“, která odkazuje na vodní zdroj místa, kde peří vyrostlo (Hobson & Wassenaar 1997). Přestože vztah a celková účast izotopů kyslíku v řetězci voda – potrava – živočišná tkáň zatím nebyla detailně prozkoumána, na základě velmi dobře známého vztahu mezi výskytem těžkých izotopů kyslíku a vodíku ve srážkové vodě (tzv. globální meteorická přímka; Craig 1961) lze usuzovat, že poměr stabilního izotopu kyslíku ve tkáních zvířat by také mohl poskytovat informaci o původu vzniku této tkáně. Výhodou použití izotopů kyslíku je stabilita po inkorporaci do organických sloučenin (Hobson & Bowen 2004). Na rozdíl od vodíku, jehož část je vyměnitelná s okolní vzdušnou vlhkostí.



## 1. 2. Izotop (definice, vlastnosti) a izotopová frakcionace

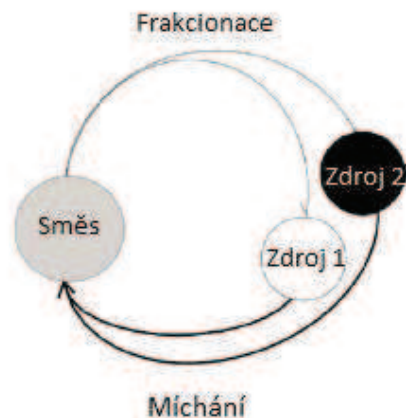
Izotopy jsou formy téhož chemického prvku, které mají v atomovém jádře stejný počet protonů (protonové číslo), ale různý počet neutronů (odlišné nukleonové číslo). K označení izotopů se používá nukleonové číslo, které se zapisuje vlevo nahoře před značku prvku př.  $^{18}\text{O}$  znamená, že tento izotop kyslíku má sumární počet protonů a neutronů (nukleonů) 18, z toho 8 protonů (podobně jako stabilní izotopy  $^{16}\text{O}$  a  $^{17}\text{O}$ ) a 10 neutronů. Pouze v případě vodíku se používají zvláštní symboly: D (deuterium,  $^2\text{H}$ ) a T (tritium,  $^3\text{H}$ , což je radioaktivní rozpadavý izotop vodíku, radionuklid). Od jednoho prvku může existovat několik stabilních izotopů, nejčastěji 1 – 4. Např. prvek kyslík je tvořen třemi stabilními izotopy:  $^{16}\text{O}$  (99,759 %),  $^{17}\text{O}$  (0,037 %) a  $^{18}\text{O}$  (0,204 %), kdy údaje v závorkách vyjadřují relativní procentuální zastoupení příslušného izotopu v prostředí. Izotopy daného prvku mohou být buď stabilní, nebo nestabilní (radioaktivní<sup>1</sup>). Ve své práci se budu dále zabývat pouze stabilními izotopy.

Neutron má nezanedbatelnou hmotnost ( $1,0073\text{u}$ )<sup>2</sup>, z čehož vyplývá, že izotopy daného prvku a potažmo i molekuly o různém izotopovém složení se od sebe liší hmotností. Proto reagují v kinetických i rovnovážných chemických a fyzikálních procesech různou rychlostí. Rychlost je klíčovým slovem pro jejich odlišné chování v biogeochemických procesech v přírodě. Základními pochody, kterými se zabýváme při studiu stabilních izotopů, je frakcionace (tj. dělení celku na části lišící se v zastoupení izotopů od původní směsi) a zpětné míchání. Oba procesy jsou zjednodušeně znázorněny na obrázku 2.

---

<sup>1</sup> Radioizotopy jsou chemické formy prvku, jejichž jádro je nestálé a radioaktivní přeměnou se mění na jádro jiné. Nestabilní izotopy se používají v nejrůznějších oblastech vědy a techniky (radiometrické datování, detekční metoda autoradiografie aj.)

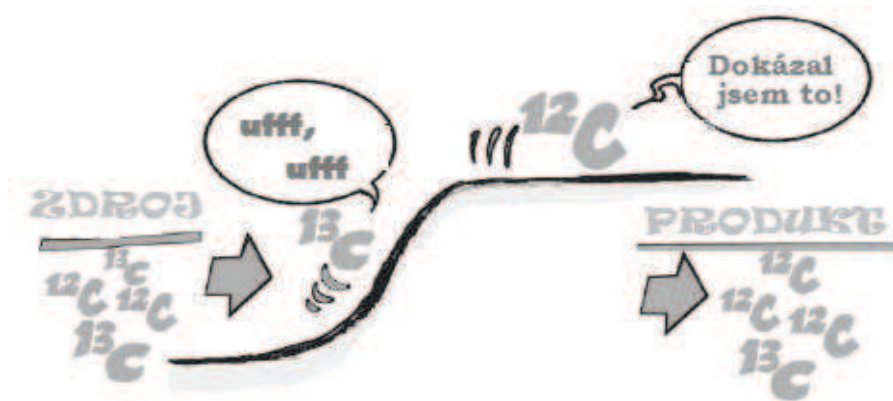
<sup>2</sup> hmotnost uvedená v atomových hmotnostních jednotkách,  $1\text{u} = 1,6605402 \times 10^{-27}\text{kg}$



**Obrázek 2.** Základní procesy určující distribuci stabilních izotopů (převzato a upraveno z Fry 2006).

Izotopová frakcionace je dvojího typu. Prvním typem je *kinetická frakcionace* probíhající u ireverzibilních jednosměrných chemických a fyzikálních procesů. Příkladem je změna skupenství, např. odpařování vody a kondenzace páry; absorpce a difúze plynů; ireverzibilní reakce jako je bakteriální rozklad rostlin nebo tvorba sraženin. Fáze nebo sloučeniny vzniklé při kinetické frakcionaci jsou ochuzené o těžké izotopy v porovnání s původními fázemi nebo sloučeninami. Např. odpařená voda je ochuzená o těžké izotopy. Když dochází k překonání energetické bariéry, např. zrušení interakce mezi molekulami, vždy bude rychleji reagovat izotop lehčí. (Obr. 3). Druhým typem je *rovnovážná frakcionace*, která je v podstatě izotopovým efektem spojeným s rovnovážnou reakcí. Příkladem je chemická rovnováha mezi  $\text{CO}_2$  a  $\text{HCO}_3^-$  a fyzikální rovnováha v systému voda - vodní pára. Pokud při rovnovážných procesech dochází na straně produktu ke vzniku vazby, hromadí se těžký izotop na této straně (Kelly *et al.* 2005).

Při geobiochemických procesech dochází neustále k milionům a milionům chemickým reakcí. Sloučeniny vznikají, mezi prvky se utvářejí méně či více silné vazby, a také se rozpadají. Frakcionace je skrytou hybnou silou izotopové distribuce na Zemi a jejím základem jsou fyzikálně-chemické vlastnosti prvků a jejich sloučenin.



**Obrázek 3.** Jeden neutron navíc má vliv na rychlost, s kterou se těžší izotop nebo izotopolog účastní dané reakce. Prvek, který je těžší, se bude většinou pohybovat nebo reagovat pomaleji (převzato a upraveno z Fry 2006).

Zastoupení izotopů v hmotě (izotopové složení) se obvykle vyjadřuje pomocí izotopového poměru. Poměr stabilních izotopů ( $R$ , od ang. slova *ratio*) se obvykle vyjadřuje jako podíl těžšího (vzácnějšího) izotopu k lehčímu (běžnějšímu), např.  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ . Aby bylo možno s informací o izotopové kompozici vzorku (hmoty) efektivně a pohodlně pracovat a také srovnávat její hodnotu s hodnotami naměřenými v jiných laboratořích, byl vypracován konvenční způsob zápisu izotopového složení. Základní veličinou je  $\delta$  (malá delta) definovaná jako:

$$\delta [\text{‰}] = (R_{\text{vzorek}} / R_{\text{standard}} - 1) * 1000$$

Izotopový poměr měřeného vzorku ( $R_{\text{vzorek}}$ ) tedy vztahujeme k izotopovému poměru mezinárodně určeného standardu ( $R_{\text{standard}}$ ). Standardem pro uhlík je mořský fosilní vápenc z Jižní Karolíny (PDB<sup>3</sup>, dnes jsou ovšem jeho zásoby vyčerpány a nahradil jej vápenc vídeňské Mezinárodní atomové agentury, tzv. VPDB), pro vodík vídeňský standard průměrné oceánské vody (SMOW<sup>4</sup>). Pro kyslík je možno použít oba standardy, přičemž většinou se používá SMOW. Hodnoty  $R$  pro jednotlivé standardy jsou uvedeny v tabulce 1.

<sup>3</sup> PDP - fosilie *Belemnita americana* z geologické formace *Pee Dee* v Jižní Karolíně, USA

<sup>4</sup> SMOW – **S**tandard **M**ean **O**cean **W**ater

**Tabulka 1.** Izotopové složení mezinárodních standardů. *T* je označení pro těžší izotop a *L* pro izotop lehčí (převzato a upraveno z Fry 2006).

	Poměr, T/L	Hodnota, T/L	% T	% L
SMOW	$^2\text{H}/^1\text{H}$	0,00015576	0,015574	99,984426
	$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	0,0003799	0,03790	99,76206
	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	0,0020052	0,20004	99,76206
PeeDee Belemnite (PDB)	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	0,011180	1,1056	98,8944
Vienna-PDB (VPDB)	$^{17}\text{O}/^{16}\text{O}$	0,0003859	0,0385	99,7553
	$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	0,0020672	0,2062	99,7553

Při vzájemném porovnávání dvou vzorků se vzorek, který obsahuje více těžšího izotopu, označuje jako obohacený a vzorek s menším obsahem těžšího izotopu jako ochuzený (Lajtha & Michener 1994).

### 1. 3. Izotopy kyslíku, vodíku a uhlíku – jejich distribuce v přírodě a procesy ovlivňující jejich poměry

V přírodě se přirozeně vyskytuje 329 izotopů, z toho 273 je stabilních (Kovačiková & Brůžek 2008). Díky odlišnému chování stabilních izotopů téhož prvku v různých biogeochemických procesech dochází k obohacení nebo ochuzení pletiv rostlin a tkání živočichů o těžší izotop příslušného prvku, čehož se s větším či menším úspěchem využívá k posouzení zeměpisného původu nejrůznějších organismů. V případě nutnosti určit geografický původ (např. forenzní vědy, studium migrace) jsou nejvíce využívány izotopy uhlíku a izotopy vody<sup>5</sup>.

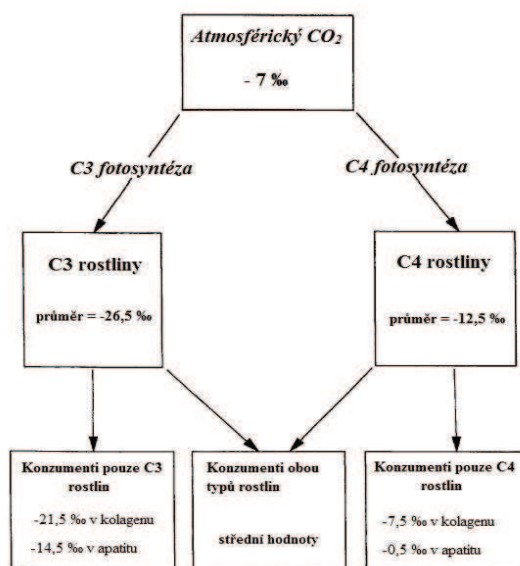
*Uhlík.* Nerovnoměrné rozdělení stabilních izotopů uhlíku v přírodě se odvíjí hlavně od různých biochemických typů fotosyntézy. Následkem vysoké diskriminace těžšího izotopu

<sup>5</sup> Slovní spojení „izotopy vody“ je věcně nesprávné a správně by se mělo v případě sloučenin obsahujících různé izotopy prvků používat termínu „izotopology“; tedy izotopology vody. Ale pro stručnost a také proto, že je tato nepřesnost často používána i v anglické literatuře, budu používat výraz „izotopy vody“ (Muller 1994).

uhlíku primárním karboxylačním enzymem rostlin s C<sub>3</sub> typem fotosyntézy (Rubisko) jsou pletiva C<sub>3</sub> rostlin více ochuzena o těžký izotop uhlíku <sup>13</sup>C než C<sub>4</sub> a CAM rostliny (O'Leary 1981). Migrací a konzumací místní produkce se organismy začnou izotopově „přebarvovat“ podle převažujícího typu fotosyntézy. Chlupy, drápy nebo jiné přirůstající části těla tak mohou představovat archiv dietetických návyků a jejich změn nebo „cestovní deník“ migračních aktivit (Šantrůček 2010). Toho využívají mnohé studie zkoumající závislost na potravě založené na různých typech fotosyntézy primárních producentů (Obr. 4). Samotné C<sub>3</sub> rostliny, přestože jasně izotopově oddělitelné od C<sub>4</sub>, vykazují značnou variabilitu v hodnotách δ<sup>13</sup>C v závislosti na mechanismech zajišťujících jejich hospodaření s vodou (Lajtha & Marshall 1994). Jedinci rostoucí na sušších stanovištích jsou více obohaceni o izotop uhlíku <sup>13</sup>C než jedinci ve vlhčích či chladnějších podmínkách (Farquhar *et al.* 1989).

Průlomová studie Marry *et al.* (1998) ukázala, že severoameričtí lesňáčci lejskovití (*Setophaga ruticilla*) zimující na Jamajce a v Hondurasu ve vlhkých, kvalitnějších biotopech měli tkáň ochuzenou o <sup>13</sup>C ve srovnání s těmi, kteří zimu trávili v sušším prostředí. To jim umožnilo testovat hypotézu, že ptáci, kteří přilétají na hnízdiště jako první, zimovali, co se potravy týče, v kvalitnějších biotopech. Výzkumníci tohoto týmu tak pomocí stabilních izotopů prokázali, že výběr prostředí na zimovišti může ovlivňovat fenologii přiletu tažného druhu (Marra *et al.* 1998) a ovlivňuje i následnou reprodukční úspěšnost (Norris *et al.* 2004).

Variace hodnot <sup>13</sup>C závisí nejen na pozici organismu v potravním řetězci, ale i na ekologických faktorech. Autotrofní organismy získávají uhlík z atmosféry ve formě CO<sub>2</sub>, heterotrofní organismy z živé nebo mrtvé biomasy autotrofů i heterotrofů. Organicky vázaný uhlík je přítomen v půdách (např. v humusu), v pevninských i mořských sedimentech je uložen v karbonátech, v hydrosféře tvoří uhličitanové a hydrogenuhličitanové ionty. Hodnoty δ<sup>13</sup>C jsou vyšší, jestliže se zvyšuje teplota prostředí, naopak nárůst srážek a vlhkosti stanoviště způsobují snížení hodnoty δ<sup>13</sup>C (van Klinken *et al.* 1994). V hustých lesích byliny pod klenbou z větví stromů méně fotosyntetizují a recyklují CO<sub>2</sub>, respiračního původu (už jednou fotosyntézou ochuzené proti volné atmosféře), proto hodnoty δ<sup>13</sup>C klesají směrem od bylin po stromové patro (Heaton 1999).



**Obrázek 4.** Množství izotopu  $^{13}\text{C}$  (vyjádřené jako  $\delta^{13}\text{C}$ ) v potravním řetězci v závislosti na způsobu fixace atmosférického  $\text{CO}_2$  při fotosyntéze. Upraveno podle Tykota (2004) a Kovačikové & Brůžka (2008).

*Kyslík.* Hlavní zásobárnou kyslíku v přírodě je voda ( $\text{H}_2\text{O}$ ), vzduch ( $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ) a organická hmota. Kyslík se vyskytuje ve třech stabilně-izotopových podobách:  $^{16}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$  a  $^{18}\text{O}$ . Při monitorování fyziologických změn živých organismů má uplatnění poslední z nich. Množství  $^{18}\text{O}$  ve srážkové vodě klesá v závislosti na teplotě, zvyšující se nadmořské výšce a vzdálenosti od moře. Studium paleoklimatických jevů přineslo poznatek, že rozdíl  $\delta^{18}\text{O}$  o 1 promile odpovídá změně teploty prostředí zhruba o  $2,6\text{ °C}$  (Yurtsever & Gat 1981). Obsah  $^{18}\text{O}$  v rostlinném těle závisí na typu fotosyntetické reakce rostlin, a to ve smyslu vyšších hodnot v celulóze rostlin typu C4 oproti C3. V aridních oblastech dosahují rozdíly mezi C<sub>3</sub> a C<sub>4</sub> rostlinami až 10 promile (Sternberg *et al.* 1984). Obecně, voda v otevřených vodních zdrojích je méně bohatá na  $^{18}\text{O}$  než voda v listech rostlin. Izotop kyslíku přítomný ve vodě, v atmosféře ( $\text{O}_2$ ) a v potravě je zabudován prostřednictvím vody v těle do kostního (zubního) minerálu na bázi uhličitanových ( $\text{CO}_3^{-2}$ ) a fosforečnanových ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) iontů během jejich utváření. Izotopové složení přijímaných tekutin i stravy je podmíněno obsahem  $^{18}\text{O}$  ve vodě v prostředí, kde organismy žijí, a ten (obsah  $^{18}\text{O}$ ) zase koloběhem vody, hlavně „velkým“ koloběhem mezi oceány a atmosférou. Jiný signál najdeme ve studních, jezerech, tekoucích řekách nebo vodě z tajících ledovců. Izotop kyslíku  $^{18}\text{O}$  vstupuje a vystupuje z těla a je komplexní funkcí potravy, fyziologie a také klimatu, v němž se organismus vyskytuje.

*Vodík.* Vodík existuje ve dvou stabilních izotopech –  $^1\text{H}$  a  $^2\text{H}$  (D). Společně s kyslíkem jsou často souhrnně označovány jako izotopy vody. V důsledku existence několika forem vodíku a kyslíku voda není všude stejná a dochází k vytváření několika izotopových kombinací – tzv. izotopologů (Obr. 5). Převážná většina vodíku, co se zdrojů týče, se nachází v koloběhu vody. Oceán je hlavní zásobárnou vodíku na Zemi a také svým složením slouží jako standard pro izotopové analýzy vodíku.

$^1\text{H}^1\text{H}^{16}\text{O}$	>99%
$^1\text{H}^1\text{H}^{18}\text{O}$	0,2%
$^2\text{H}^1\text{H}^{16}\text{O}$	<0,01%
$^2\text{H}^2\text{H}^{16}\text{O}$	těžká voda ( $\text{D}_2\text{O}$ )
$^2\text{H}^2\text{H}^{18}\text{O}$	nejtěžší voda

**Obrázek 5.** Vybrané možné izotopology vody. Těžká voda ( $\text{D}_2\text{O}$ ), v přírodě velice vzácná, je syntetizována v laboratorních podmínkách a využívána mimo jiné při nukleární magnetické rezonanci nebo v tzv. těžkovodních jaderných reaktorech.  $^2\text{H}^1\text{H}^{18}\text{O}$  – ve Fry 2006 tato kombinace uvedena nebyla, nevím procentuální zastoupení. (přejato a upraveno z Fry 2006).

Množství  $\delta\text{D}$  ve vzdušné vlhkosti klesá se stoupající nadmořskou výškou, zeměpisnou šířkou a klesající teplotou. V extrémní kombinaci těchto dvou faktorů může  $\delta\text{D}$  klesnout až na hodnoty -200 až -400 promile (vysoce položené ledovce nebo polární oblasti). Deuterium je také s velkým úspěchem využíváno při studiu procesů v metabolismu. Okolo 10 až 20% vodíku v organickém materiálu je vyměnitelných s běžnou vzdušnou vlhkostí, ale tento efekt je dobře znám a při analýzách brán v potaz. Studium fotosyntézy rostlin pomocí stabilních izotopů vodíku ukázalo vysoké ochuzení rostlin o  $\delta\text{D}$  oproti zdrojové vodě (Fry 2006). Fotosyntéza není ovšem jedinou činností rostlin a v důsledku syntézy základního stavebního kamene, celulózy, a transpirace dochází k obohacení rostlinného těla a tím ke kompenzaci předchozí deuteriové ztráty. Lze tedy říci, že hodnoty  $\delta\text{D}$  rostlinného těla korelují s hodnotami zdrojové vody. Zdroje vodíku zabudovaného v tkáních živočichů je možné rozdělit do tří kategorií – potrava, pitná voda a vzdušná vlhkost. Podle všeobecného zjištění je převážná většina vodíku získávána z potravy, jejíž hodnota  $\delta\text{D}$  je velice blízká složení zdrojové vody (Fry 2006). Procesy ovlivňující poměry a distribuci vybraných stabilních izotopů v přírodě jsou shrnuty v tabulce 2 (viz Příloha).



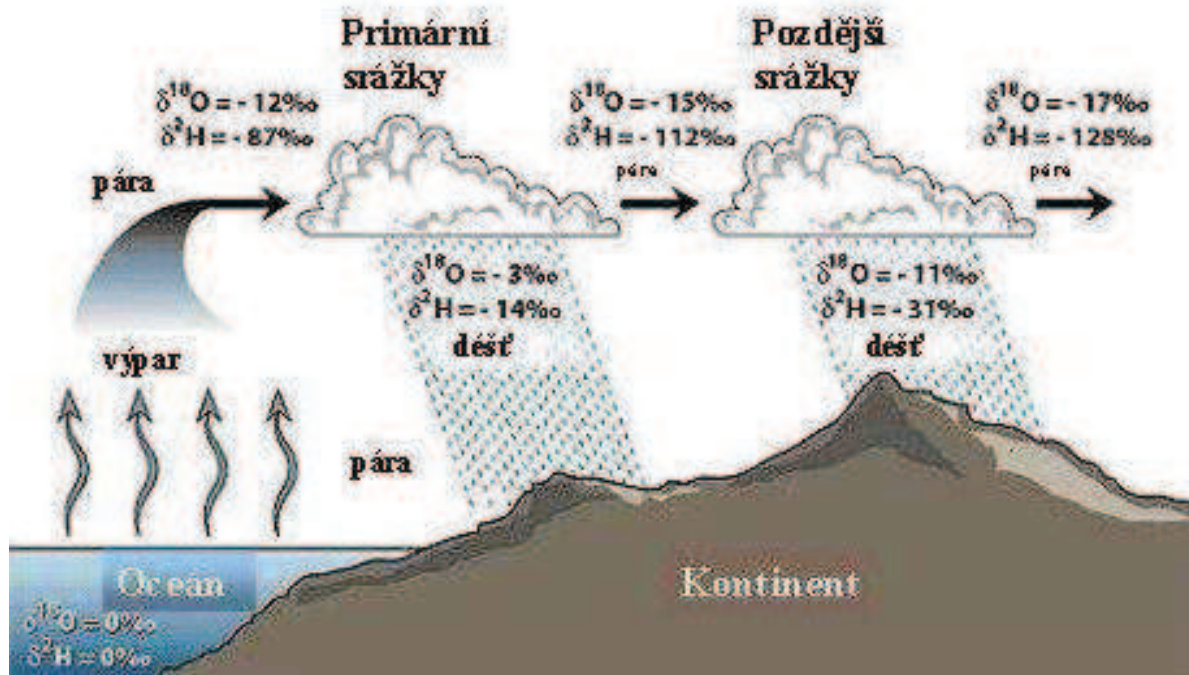
## **1. 4. Voda – rostlina – živočich aneb od vodní nádrže až k lesňáčkovi**

Zatímco analýzy izotopů uhlíku a dusíku přinesly nové vhledy do studia potravní ekologie (Kelly 2002) či bioarcheologie (Richards 2002), skutečným přínosem při zjišťování geografického původu rostlin a živočichů byly izotopy vody (Hobson *et al.* 1999, Bowen & Wassenaar 2005, Ehleringer *et al.* 2008, Hobson & Bowen 2004). Pro ověření možnosti využít izotopy vody k určení původu je důležité projít jednotlivé kroky na ose voda – rostlina – živočich.

### ***1. 4. 1. Voda: Izotopová frakcionace během výparu a kondenzace***

První krok vychází z koloběhu vody na zeměkouli. Vodní pára odpařená z hladiny oceánů a moří je obohacena o molekuly tvořené lehčími nuklidy vodíku a kyslíku ve srovnání s původní kapalnou vodou. Příčinou tohoto jevu je kinetický frakcionační efekt. Při odpařování jsou tedy mraky obohaceny lehkou vodou a mořská voda těžkou vodou. Ve výšce se pak z vodních par formují mraky a ve formě srážek kondenzuje přednostně těžká voda (Obr. 6). Velice zjednodušeně řečeno, molekuly s lehčími izotopy se snáze vypařují a naopak molekuly tvořené těžšími izotopy snáze kondenzují. Při srážkách vypadává opět díky kinetickému frakcionačnímu efektu dříve voda složená z těžších nuklidů, tudíž mraky postupující dále do vnitrozemí, jsou o molekuly vody složené z těžších atomů stále více ochuzovány. Proto např. tropické ekosystémy obsahují větší množství těžších izotopů kyslíku a vodíku než polární ekosystémy. Na velkých měřítkách potom v případě deuteria podle distribuce srážek vznikají gradienty, které lze využít při určování geografického původu (Gat 1996).





**Obrázek 6.** Izotopová frakcionace během výparu a kondenzace (přejato a upraveno z Hoefs 1997 a Coplen *et al.* 2000).

#### 1. 4. 2. Voda – rostlina: Příjem a využití srážkové vody rostlinami

Jak již bylo řečeno, izotopové složení vody na Zemi není všude stejné, tudíž existuje pádný předpoklad, že ani voda v rostlinách není všude stejná. Podíváme se tedy blíže na cestu vody rostlinným tělem. Srážková voda, čerpaná kořeny z půdy, je dále vedena s relativně malou izotopovou změnou rostlinou transpiračním proudem nejčastěji do listů. Malé množství vody je vtaženo do buněčných vakuol nebo zůstává v cytoplazmě a buněčných organelách včetně chloroplastů. Méně než jedno procento přijaté vody je v chloroplastu rozštěpeno na protony, elektrony a molekulární kyslík, který uniká do okolní atmosféry. Zbývajících 99 % vody se vypaří v mezofylu listu a odchází z listu jako vodní pára do atmosféry. V důsledku tohoto výparu (transpirace) a s ní spojené kinetické a rovnovážné izotopové frakcionace je voda v listu silně obohacena vzhledem k vodě přijímané kořeny (viz dále). Z hlediska izotopového složení kyslíku v rostlinném těle (biomase) je ovšem důležitá disociace vody na hydroxylové anionty a protony ( $\text{OH}^-$  a  $\text{H}^+$ ) a následná hydratace molekul  $\text{CO}_2$ , které jsou v cytoplazmě a v chloroplastech rozpuštěné. Rovnovážným vznikem a zánikem bikarbonátového iontu tak neustále (a s velkou rychlostí) dochází k výměně  $\text{OH}^-$  iontů mezi

vodou v listu a CO<sub>2</sub>. Ve výsledku je pak izotopové složení kyslíku v CO<sub>2</sub> prakticky totožné s izotopovým složením vody v listu.

Voda v kořenech rostlin (hlavně bylin, které mají kořeny v povrchové vrstvě půdy) je izotopově blízká srážkové vodě, voda v listech je již výrazně izotopově obohacená oproti srážkové vodě (Šantrůček *et al.* 2007). Během fyzikálního procesu výparu (evaporace) a tedy i během transpirace v listech se rychleji vypařují molekuly vody obsahující lehčí izotopy, <sup>1</sup>H a <sup>16</sup>O, než molekuly vody skládající se z izotopů těžších, D a <sup>18</sup>O. Proto je voda v listech obohacenější o těžší izotop kyslíku i vodíku oproti vodě srážkové. Velikost obohacení závisí na rychlosti výparu spoluurčované vlhkostí vzduchu a teplotou listu (Craig *et al.* 1963).

δD v celulóze rostlin odráží poměr D/H vody využitá rostlinou k její syntéze (Epstein *et al.* 1977). δ<sup>18</sup>O celulózy a ostatních asimilátů je výsledkem různých zdrojů kyslíku. Rostlina ho získává převážně ze srážkové vody (viz izotopová výměna popsána výše) méně z atmosférického CO<sub>2</sub>, nebo O<sub>2</sub>. Poměry obou izotopů ve vodě v listech jsou ovlivněny již zmíněnou transpirací a dále také už zmíněnými faktory vnějšího prostředí (Příloha, Tab. 2).

#### **1. 4. 3. Rostlina – živočich: Izotopový otisk potravy v těle živočichů**

Posledním článkem v řetězci, o kterém budu pojednávat, je živočich. Izotopově jsme to, co jíme a pijeme mínus nějaké drobné odchylky (Tykot 2004, Šantrůček 2010). Toto tvrzení potvrzují mimo jiné studie Hobsona *et al.* (1999c), Longinelliho (1984) nebo Ehleringera *et al.* (2008), v nichž byly zjištěny rozdíly hodnot δD a δ<sup>18</sup>O ve tkáních živočichů pocházejících z různých geografických oblastí spojené se zdrojem vody. Málo je však známo o podílu jednotlivých prvků z různých složek potravy a o izotopové frakcionaci kyslíku a vodíku v metabolismu živočichů. Na konečné hodnoty může mít vliv: voda z potravy, pitná voda, okolní vzdušná vlhkost a organická složka potravy. Hobson *et al.* (1999b) poskytli důkaz, že obojí, pitná voda i voda z potravy, je zabudována do metabolicky aktivních i neaktivních tkání u křepelek. Mechanismus inkorporace stabilních izotopů kyslíku a vodíku do biomolekul je však komplexní proces a v jeho rozšifrování jsme zatím pouze na začátku (Martínez del Rio *et al.* 2009).

Hodnoty δD ptačích per a motýlích křídel (oboje z velké části tvořeno keratinem) a vody v místě, kde tkáň vznikla, vykazovaly silnou korelaci (Hobson & Wassenaar 1997, Wassenaar & Hobson 1998). Hodnoty δD a δ<sup>18</sup>O organických sloučenin v tělech živočichů mohou být ovlivněny mnoha faktory, zahrnujícími všechny potravní a atmosférické zdroje

vodíku a kyslíku, i jejich syntézou. Dokonce i po syntéze dané tkáně dochází k izotopovému ovlivnění určité části obsaženého vodíku. DeNiro & Epstein (1981) poprvé ukázali, že vystavení potravy a později i tkání (mozek, játra) u myši okolní vzdušné vlhkosti změnilo celkovou hodnotu  $\delta D$ . Atomy vodíku jsou slabě poutány k atomům kyslíku a dusíku, tím pádem vodík (obsažený v  $\text{OH}^-$  aniontech) z okolní vzdušné vlhkosti se snadno vyměňuje s dostupným vodíkem ve vzorku organického materiálu (Schimmelmann *et al.* 1993).

Dalším důležitým faktorem, který má vliv na izotopové složení těla, je i hospodaření s vodou, které je druhově specifické, schopnosti ji uchovávat a na rychlosti metabolismu, neboť některá zvířata přijímají většinu vody jako součást pevné potravy, některá bez vody vydrží delší dobu, jiná nikoli. Zvířata lépe uzpůsobená suchému prostředí, která čerpají více vody z rostlin, odrážejí ve svých kostních tkáních míru vlhkosti prostředí (Ayliffe & Chivas 1990), protože složení rostlinného těla je závislé na vzdušné vlhkosti (např. Šantrůček *et al.* 2007). Naopak, zvíře, které pije denně a které má rychlý metabolismus vody (např. zebra) bude mít složení stabilních izotopů kyslíku ve svých tkáních bližší ke složení místní srážkové vody (Kohn *et al.* 1996). Šelmy mohou mít hodnoty  $^{18}\text{O}$  obsažené v kostech blízké své dominantní kořisti, neboť část vody v jejich organismu z této kořisti pochází (Kovačiková & Brůžek 2008).

Na základě všech tří předchozích částí lze předpokládat, že konkrétní izotopové složení srážkové vody a izotopové složení atmosférické vlhkosti v daném místě se promítne do složení vody a organických látek obsažených v těle rostlin, které v daném místě vyrostly a v rámci potravního řetězce posléze i v těle živočichů (Estep & Dabrowski 1980). Pokud jsou zdrojem potravy listy, je třeba brát v úvahu izotopové obohacení listů oproti srážkové vodě, které je úměrné rychlosti transpirace, a tedy i ariditě klimatu.

## 1. 5. Výběr vhodné tkáně pro určení geografického původu želv

Z předchozí kapitoly je zřejmé, že izotopové složení tkání živočichů je velice podobné izotopovému složení potravy, kterou přijímají. Pokud chceme využít metodu analýzy stabilních izotopů pro zjištění zeměpisného původu, je třeba správně zvolit tkáň, která by nám mohla dát odpověď. Při volbě studované tkáně je třeba zohlednit (1) změnu izotopového složení tkáně v prostoru a čase, (2) izotopovou frakcionaci v rámci tkáně, kterou musíme

umět kvantifikovat a vzít ji v úvahu pokud máme zjistit izotopové složení zdroje, a samozřejmě (3) jednoduchost a nedestruktivnost odběru tkáně. Pro zjednodušení lze říci, že existují dva typy tkání – metabolicky aktivní a metabolicky inertní. Oba typy tkání mají své výhody i nevýhody. Výběrem několika různých tkání s odlišným obdobím integrace geografické informace můžeme získat údaje, z kterých je možné zrekonstruovat historii pohybu po celý roční cyklus (Hobson 1993).

Metabolicky aktivní tkáně nesou flexibilní informaci o svém původu a jejich dosah do minulosti závisí na rychlosti přeměny dané tkáně. U tkání s rychlým metabolismem (krevní plasma, játra) je tato informace krátkodobější (zhruba týden), protože poločas výměny prvků v těchto tkáních je asi tři dny (Hobson & Clark 1992b). Svaly a krev (rozuměj: celá krev, tj. krevní buňky i plasma) se vyznačují pomalejší přeměnou – u velkých druhů ptáků poskytují informaci o původu až 6 týdnů nazpět (Hobson & Clark 1993), u malých druhů zhruba týden (Hobson & Bairlein 2003). Kolagen z kostí má velmi pomalou rychlost přeměny a nese informaci řádově roky.

Metabolicky inertní tkáně (keratin z peří, drápů, krunýře, vlasů, nehtů nebo chlupů) nám poskytují informaci o jejich původu v době růstu. Přestože tyto tkáně mohou dále růst, izotopový signál je pevně ukotven ve struktuře keratinu během jeho utváření. Výjimkou jsou izotopy vodíku (viz výše).

## **1. 6. Keratin – strukturní typy, syntéza a složení keratinu krunýře želv**

Keratin neboli rohovina je stavební bílkovinou patřící mezi cytoskeletární proteiny, konkrétně střední filamenta. Keratiny jsou nejvíce různorodou rodinou středních filament. Rozdílné soubory keratinů se nachází v různých epitelech, např. ve střední výstelce, jiné zase v epidermální vrstvě kůže. Speciální keratiny jsou přítomny ve vlasech, peří nebo drápech. Shlukují se do polymerů o velkých rozměrech (Coulombe & Bernot 2004). Při syntéze keratinu jsou nejprve aminokyseliny uspořádány do polypeptidického řetězce a následně je struktura molekuly stabilizována pomocí několika druhů můstků. Mezi ně patří především disulfidické můstky a vodíkové můstky.

Keratinová vlákna tvořena jednotlivými monomery, mající délkou 400–644 aminokyselin, se shlukují do polymerů a směsí různých keratinových podjednotek.

Keratinová vlákna jsou v epiteliálních buňkách obvykle natažena napříč celou cytoplazmou a filamenta sousedních buněk jsou nepřímo spojena pomocí mezibuněčných kontaktů (desmozomů). Konce keratinových vláken jsou zakotveny v desmozomech a kromě toho jednotlivá vlákna prostřednictvím globulárních hlaviček a konců, která vyčnívají z vlákna do stran, vytvářejí boční kontakty s dalšími buněčnými strukturami. Tato síť, zformovaná z vláken vysoce odolných proti přetržení a rozprostírající se napříč celým epitelem, rozkládá mechanický tlak, k němuž dochází při natažení kůže.

Vznik kompaktní vrstvy tvořené keratinem (štítku krunýře želv či perí ptáků) začíná v nejvýše položené vrstvě kůže – epidermis. Epidermis se dále člení do několika úrovní. Celý vysoce organizovaný a přesně načasovaný proces začíná ve spodní části epidermis (bazální lamina) diferenciací zatím nespecifikovaných buněk – keratinocytů. Hlavním strukturálním proteinem těchto buněk je keratin, který během procesu tvoří dlouhá keratinová střední filamenta. Keratinocyty prochází všemi vrstvami epidermis, ztrácí svou mitotickou schopnost a začínají syntetizovat nové proteiny keratinového typu, které jsou v dalších fázích inkorporovány do středních filament. Organely buněk postupně mizí a plazmatická membrána je nahrazena keratinovým obalem. Na konci celého procesu podstupují buňky programovanou smrt a plně keratinizují (Lippens *et al.* 2005).

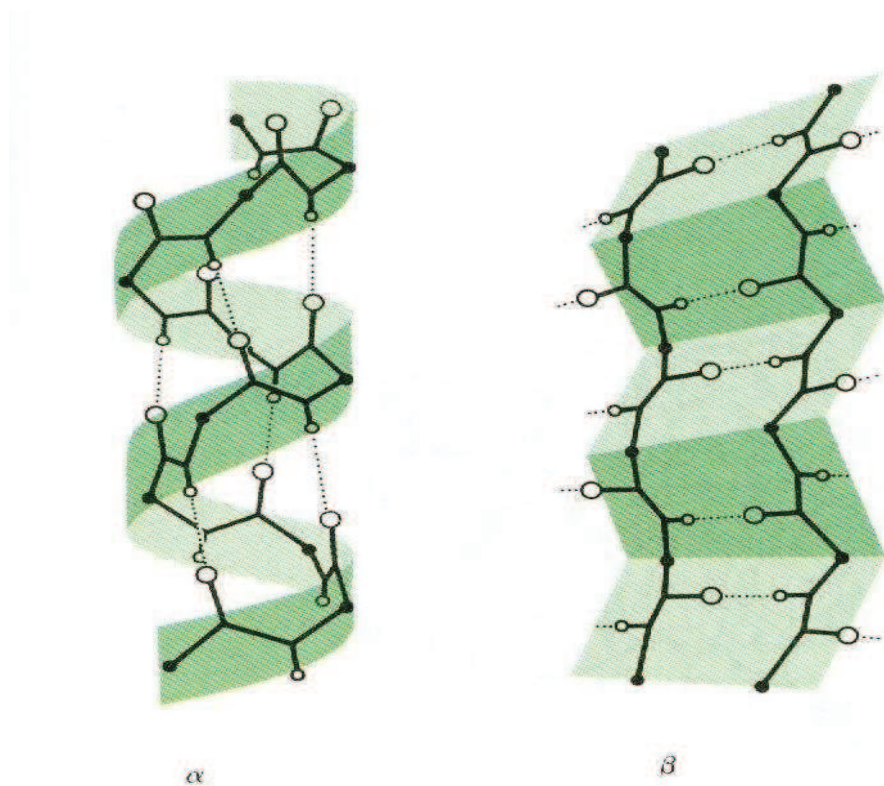
Keratinizace je specifickým procesem buněčné diferenciaci, při kterém systematicky postupující buňky formují keratin. Keratinizace neprobíhá pouze v buňkách epidermis, ale také v mukózních membránách, vlasech, nehtech, kožních derivátech atd. (Fukuyama *et al.* 1976).

Keratin může být sekundárně uspořádán do dvou různých struktur, alfa šroubovice (dále jako  $\alpha$  keratin) a beta struktura neboli struktura skládaného listu (dále jako  $\beta$  keratin). Znázornění obou typů struktur je možno vidět na obrázku 7. Epidermis plazů (Reptilia) je svým způsobem výjimečná, protože v ní najdeme oba strukturální typy keratinu (Wyld & Brush 1979). Co se jednotlivých skupin týče,  $\alpha$  keratin je možné najít u skupiny šupinatých (Squamata), na končetinách a krku želv (Chelonia), v epidermis krokodýlů (Crocodylia) ale také v ptačí a savčí epidermis. Vlna a vlasy jsou také tvořeny  $\alpha$  keratinem. Tento neskutečně elastický protein může být natažen až do několika násobku své původní délky. Druhým typem,  $\beta$  keratinem, jsou tvořeny krunýře želv, šupiny zástupců skupiny Squamata, část epidermis krokodýlů a je také hlavní složkou ptačích per. Na rozdíl od  $\alpha$  keratinu je pevný a daleko méně elastický (Mercer 1961). Z distribuce obou typů keratinu u plazů je patrné, že



flexibilní  $\alpha$  keratin nalezneme v pohyblivých a pružných oblastech těla a  $\beta$  keratin v pevných strukturách majících ochrannou funkci.

Ve struktuře krunýře želv můžeme najít nejen  $\beta$  keratin, ale v malém množství i  $\alpha$  keratin (Alexander 1970, Alibardi & Toni 2006), přičemž ve štítcích jednoznačně dominuje  $\beta$  keratin (Alibardi & Toni 2006). Alibardi & Toni (2006) ve své práci uvádějí, že keratin krunýře želv by měl být z velké části tvořen sekvencí aminokyselin ve složení prolin-glycin-tyrosin. Po sumarizaci chemických prvků tvořících tyto aminokyseliny lze tedy předpokládat, že keratin krunýře želv je tvořen z 52 % uhlíkem, z 30 % kyslíkem, z 11 % dusíkem a ze 7 % vodíkem.



**Obrázek 7.** Schematické znázornění obou typů uspořádání keratinu: šroubovice  $\alpha$  keratinu a skládaného listu  $\beta$  keratinu. Přerušovanou čarou jsou znázorněny stabilizující můstky (převzato a upraveno z Zubay *et al.* 1995).

Vodík a uhlík jsou do keratinu vestavěny během růstu (Hobson & Clark 1992). Na rozdíl od ostatních zde uváděných prvků a jejich stabilních izotopů, vodík tvoří slabé vazby s dusíkem a kyslíkem a je schopen výměny s okolní vzdušnou vlhkostí (Schimmelmann *et al.* 1993). Uvádí se, že 60 % z celkového množství vodíku je nevyměnitelných a zbylých 40 % vyměnitelných s okolním prostředím (Chamberlain *et al.* 1997). Míra výměny však může být

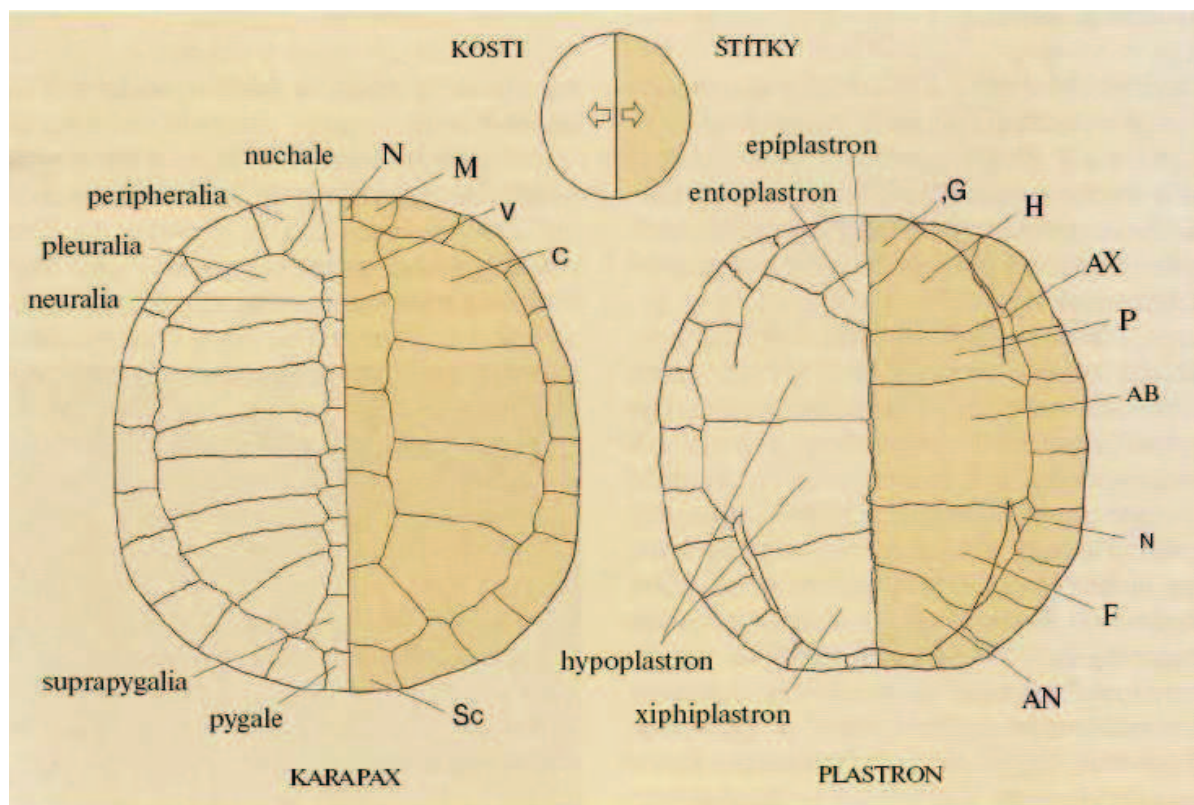
variabilní podle typů keratinu. Chamberlain *et al.* (1997) ve své práci testovali míru výměny vodíku v keratinu peří ptáků s okolním vzdušnou vlhkostí. Sérií experimentů dospěli k tomu, že 13 % z celkového množství vodíku je vyměnitelných. Je tedy zřejmé, že pokud je vodík zabudován do tkáně (peří), už je jen velmi málo vyměnitelný s okolní vzdušnou vlhkostí.

Taxonomická distribuce obou typů keratinu u obratlovců naznačuje, že tyto proteiny divergovaly už velice dávno. Typ alfa můžeme najít u všech skupin obratlovců a mohl by být předkem méně se vyskytujícího typu beta (Fraser *et al.* 1972). Plazi a ptáci jsou jediné organismy mající  $\beta$  keratin v epidermálních tkáních a od nich odvozených derivátů (Baden & Maderson 1970, Sawyer *et al.* 2000). Imunocytochemické analýzy svědčí o fylogenetické příbuznosti  $\beta$  keratinu v tělním pokryvu plazů a v epidermálních derivátech ptáků (Alibardi 2002). Na základě těchto faktů lze tedy usuzovat, že v keratinu krunýře želv by procento vyměnitelného vodíku mohlo být podobné tomu, které je typické pro peří ptáků.

## 1. 7. Želvy – tvorba krunýře a přirůstání štítků

Růst a tvorba krunýře u želv je proces daleko více komplikovaný než u bezobratlých živočichů, kterým se krunýř prodlužuje jednoduchým ukládáním nového kalcifikovaného materiálu po celém vnitřním povrchu a nekrytých okrajích. Kostěný krunýř želv je o mnoho lépe zásoben krevními cévami a nová kost je přidána okolo každé jednotlivé kosti celého krunýře. V mnoha případech nejsou kosti u čerstvě vylíhnutých jedinců spojené jedna s druhou, ale pokračují v růstu proti sobě, nakonec se setkají a utvoří spoj (suturu). Růst dále pokračuje v místě spoje, ale značně pomaleji až do dosažení dospělosti a u velice starých jedinců dochází k osifikaci spojů, čímž je proces růstu ukončen.

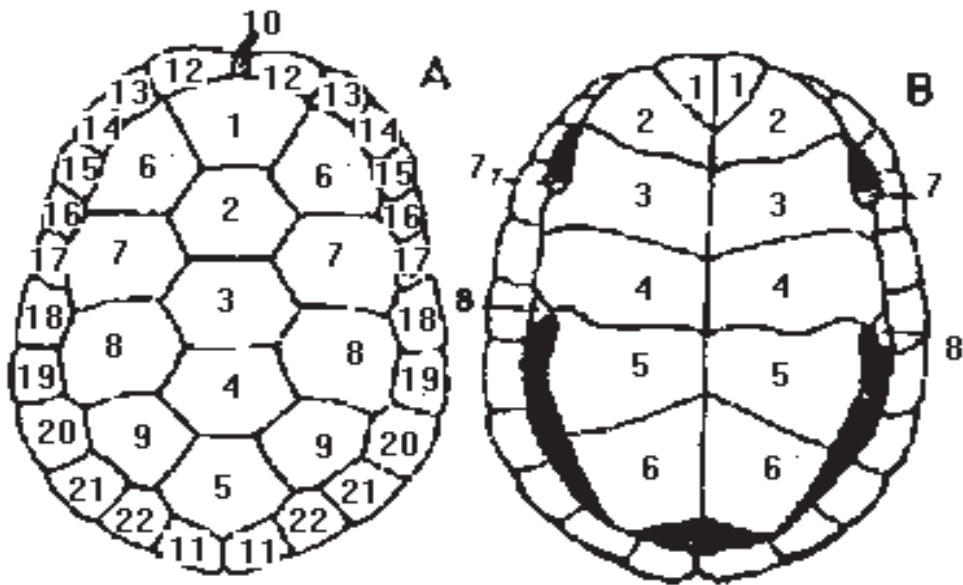
Krunýř je součástí kostry a skládá se ze dvou vrstev. Spodní vrstvu tvoří vlastní kost, tedy páteř, a dále vzájemně spojené ploché kosti. Ploché kosti v sobě zahrnují původní žebra, na něž navazují periferní kosti vytvářející okraj krunýře. Všechny tyto kostěné části jsou spojeny švy, podmiňující následnou pevnost krunýře. Na kostěném základu se nachází tenká vrstva rohovinových štítků, která, zjednodušeně řečeno, odpovídá vývojově například kůži a chlupům savců či peří ptáků. Podobně je to i s břišní částí krunýře. Uspořádání kostěné a rohovinové části krunýře není stejné – tedy jednotlivé rohovinové štítky neodpovídají rozložení pod nimi ležících kostí. Celou problematiku nejlépe objasňuje obrázek 8.



**Obrázek 8.** Vztah mezi kostrou krunýře želvy a rohovinovými štítky. Jednotlivá písmena udávají názvy štítků obou částí krunýře. Pro karapax: *N* krční štítek, *M* okrajové štítky, *V* hřbetní štítky, *C* žeberní štítky, *Sc* nadocasní štítky. Pro plastron: *G* hrdelní štítky, *H* ramenní štítky, *AX* pažní štítky, *P* hrudní štítky, *AB* břišní štítky, *N* slabinové štítky, *F* stehenní štítky, *AN* anální štítky. (Zych 2006).

Přestože některé druhy želv z čeledí Dermochelyidae, Trionychidae, Carettochelyidae ztratily během vývoje keratinové krytí svého krunýře, naprosté většině rodů skupiny Chelonia štítky zůstaly. Štítky mohou být překvapivě silné (*Eretmochelys*, *Astrochelys yniphora*) nebo také tenké jako papír (*Dermatechelys*, *Callagur*). Většinou jsou poskládány na krunýři jeden vedle druhého (Obr. 9), výjimkou je většina druhů rodu *Eretmochelys*, u nichž se štítky na krunýři překrývají podobně jako šupiny ryb.

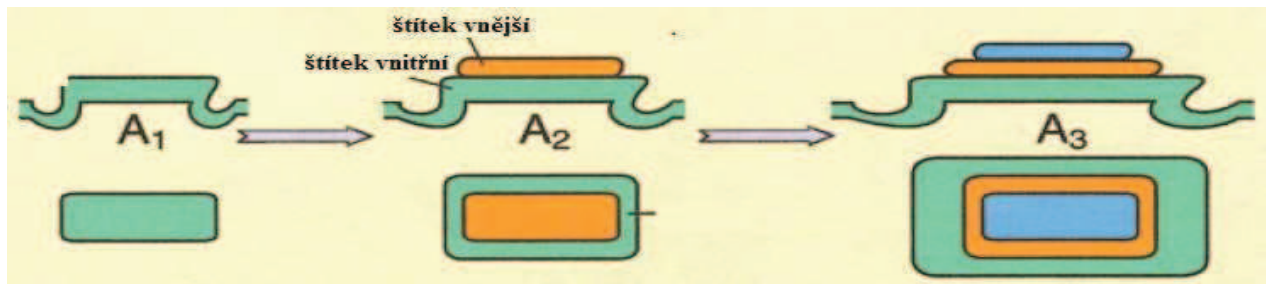




**Obrázek 9.** Uspořádání štítků na spodní i svrchní části krunýře

**A:** Hřbetní část krunýře (karapax): 1 až 5 - hřbetní štítky (scuta vertebralia), 6 až 9 - žeberní štítky (scuta costalia), 10 - krční štítek (scutum nuchale), 11 - nadocasní štítky (scuta supracaudalia), 12 až 22 - okrajové štítky (scuta marginalia). **B:** Břišní část krunýře (plastron): 1 - hrdelní štítky (scuta gularia), 2 - ramenní štítky (scuta humeralia), 3 - hrudní štítky (scuta pectoralia), 4 - břišní štítky (scuta abdominalia), 5 - stehenní štítky (scuta femoralia), 6 - anální štítky (scuta analia), 7 - pažní štítky (scuta axillaria), 8 - slabinové štítky (scuta inguinalia) (Szalay & Szalayová 1990).

Růst štítků u želv vychází z oblasti sutury a pokračuje postupným ukládáním rohovinového materiálu odspoda po celém obvodu štítku předchozího (Obr. 10). Na sebe se vrstvicí štítky poté tvoří na krunýři viditelné prstence. Někteří členové skupiny *Chelonia* žijící v temperátních oblastech produkují jeden prstenec ročně. Druh *Testudo hermanni*, který žije ve vlhčím prostředí jižní Evropy, produkuje jeden prstenec ročně do dosažení pohlavní dospělosti – 12 až 13 let, a to jak ve volné přírodě (Stubbs & Swingland 1985) tak v lidské péči (Castanet 1985).



**Obrázek 10.** Schématické znázornění přirůstání štítku u želvy *T. hermanni*. A1 – A3 jsou postupné fáze přirůstání štítků v čase tak, že A1 je nejmladší a A3 nejstarší. Zeleně označená hmota je vždy recentně přirůstající (převzato a upraveno z Alibardi 2005).

## 1. 8. Hypotézy a cíle práce

Za předpokladu, že fyzikální a chemické parametry prostředí ovlivňují frakcionaci izotopů biogenních prvků, rostliny i živočichové by v době růstu měli zaznamenávat tyto parametry do svých tkání v podobě izotopových poměrů. Pro určení geografického původu jsou asi nejlépe využitelné izotopy vody, protože globální distribuce vody s sebou nese výraznou geograficky specifickou frakcionaci. Izotopové složení srážkové vody na Zemi proto není všude stejné a je relativně dobře předpověditelné (Craig 1961). Vzhledem k tomu, že je voda klíčovým médiem i substrátem mnoha biosyntetických procesů, izotopové složení srážkové vody v daném místě výrazně ovlivní složení vody obsažené v rostlinném těle a v rámci potravního řetězce posléze i v těle živočišném (Estep & Dabrowski 1980, Hobson *et al.* 1999b). Cílem mé práce bylo ověřit, zda je možné usuzovat na geografický původ jedinců (živočichů), konkrétně vybraných druhů želv, na základě analýzy přirozeného zastoupení stabilních izotopů vodíku, kyslíku a uhlíku. Zvolila jsem manipulativní experiment využívající izotopového značení skupiny želv prostřednictvím stravy (rostlin a pitné vody) obohacené o těžké stabilní izotopy kyslíku a vodíku v kombinaci s analýzou keratinu pocházejícího z krunýře několika mrtvých exemplářů želv s doloženým místem původu (soukromá a muzejní sbírka). Obohacení mělo simulovat srážkovou vodu středomoří, konkrétně Kypru. Z ovlivněné i kontrolní skupiny jsem potom odebírala keratin a zkoumala jeho izotopové složení s cílem zjistit, zda se izotopová značka projeví v keratinu.

## 2. MATERIÁL A METODY

### 2. 1. Materiál

#### 2. 1. 1. Zvířata, uspořádání experimentu

Pro účel experimentu byla použita 19-ti členná skupina želv: 17 jedinců želvy zelenavé (*Testudo hermanni*) a jeden pár želv želvy vroubené (*Testudo marginata*). Oba druhy patří k běžně chovaným a dováženým suchozemským želvám. Geografické a ochranné charakteristiky obou druhů jsou uvedeny v tabulce 3.

**Tabulka 3.** Vybrané charakteristiky studovaných druhů želv (van Dijk *et al.* 2004a, b; Zych 2006).

druh	<i>Testudo hermanni</i>	<i>Testudo marginata</i>
geografické rozšíření	Albánie, Bulharsko, Bosna a Hercegovina, Chorvatsko, Řecko, Francie, Itálie, Turecko, Kypr	Albanie, Řecko, Itálie
status CITES	II	II
status EU	A	A
původ exemplářů	ČR <sup>6</sup>	ČR <sup>7</sup>

Pro zajímavost je také uveden původ experimentálních želv.<sup>6,7</sup>

<sup>6</sup> Jedinci želvy zelenavé pocházejí ze stejného chovu z důvodů právní ochrany nejmenovaného chovatele. Chovatel měl chovnou skupinu sedmi dospělých želv *Testudo hermanni*. Čtyři byly odchovány ve druhé a vyšší generaci v zajetí (kód původu C), jedna byla odchována v první generaci v zajetí (původ F), u dvou dalších želv (samce a samice) byl uveden původ neznámý (kód původu U). Majitel od tohoto stáda odchovával každoročně cca 10 - 20 mláďat. Od vstupu do EU platí v ČR zákaz obchodovat s druhy z přílohy A Nařízení Rady č. 338/97/ES. Želva zelenavá je v příloze A Nařízení Rady č. 338/97/ES. Pokud chtěl chovatel s mladými želvičkami obchodovat, potřeboval pro tento obchod "výjimku ze zákazu komerčních činností", kterou je možno získat za stanovených podmínek pro exempláře odchované v zajetí. Podmínky znamenají to, že rodičovské exempláře pocházejí z legálních zdrojů (odchov, povolený odchyt, legální dovoz) a chovné stádo se prokazatelně rozmnožuje již v druhé generaci. V roce 2005 požádal chovatel o vystavení těchto výjimek ze zákazu komerčních činností. AOPK ČR jako vědecký orgán CITES jeho žádost v rámci správního řízení vedeného místním registračním úřadem prověřila a konstatovala, že chovné stádo, obsahující exempláře s kódem "U", tedy neznámého původu, nelze uznat jako legální chovné stádo a tudíž vydala zamítavé stanovisko k této žádosti.

Po převozu želv z Prahy na pracoviště Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích byla zvířata po dobu 2 měsíců chována společně. Poté, těsně před začátkem experimentu, byl proveden odběr vzorků a želvy náhodným výběrem rozděleny do dvou skupin. Skupinu č. 1 tvořilo devět jedinců (8 jedinců *T. hermanni*, 1 jedinec *T. marginata*). Skupina č. 2 čítala 10 jedinců (9 jedinců *T. hermanni*, 1 jedinec *T. marginata*). Vzhledem k možnému výskytu druhů byla zvolena jedna konkrétní oblast (stát) pro simulaci prostředí přirozeného výskytu. Skupina č. 1 se stala skupinou kontrolní, reprezentující oblast České republiky (konkrétně České Budějovice) a skupina č. 2 se stala skupinou experimentální, představující možné místo výskytu druhu (konkrétně Kypr). Skupině 1 a 2 byla po celou dobu trvání experimentu podávána izotopově upravená strava i pitná voda (viz kapitola 2. 2. a 2. 3.), příležitostně doplňována ovocem, zeleninou, vajíčkem a sépiovou kostí. Pro správný vývoj krunýře a kostí je zapotřebí řada vitamínů, minerálních látek a stopových prvků, proto bylo zvířatům v průběhu experimentu do potravy přidáván minerální přípravek (Reptivite, výrobce Zoo Med, ČR). Každá skupina byla chována v otevřeném teráriu o rozměrech (60 x 80 x 50 cm), při teplotě v rozmezí 20 – 25 °C. Teplo bylo v ubikacích zajišťováno topným kamenem (20 W) a žárovkou (60W), světlo potom speciálními zářivkami značky Exo Terra - Repti Glo 5.0 (26W) a Repti Glo 2.0 (25W). Topné kameny byly v provozu 24 hodin denně, zářivky a žárovky 14 hodin denně.

---

Registrující orgán proto výjimky ze zákazu komerčních činností panu chovateli nevydal. Jemu se už ovšem doma hromadily další odchovanci. Zjistil, že jednou z legálních možností, jak se želviček zbavit, je, že je může darovat. Začal je tedy "rozdávat", ale od nových držitelů si za ně bral příspěvek na krmení. Toto už je komerční aktivita, která je nelegální. Chovateli byla prokázána v rámci policejního šetření a byl za ni potrestán podmíněným trestem odnětí svobody v roce 2007. V témže roce provedla na žádost policie ČR u chovatele místní šetření Česká inspekce životního prostředí (ČIŽP). Při šetření byl chovatel velmi emotivní a zklamaně deklaroval, že všechny želvy zabije. ČIŽP mu doporučila náhradní řešení - umístit dosud neumístěná mláďata (17 ks) a dva rodičovské exempláře s původem neznámým do některé veřejně prospěšné instituce nebo ZOO. Chovné stádo, takto zbavené problematických exemplářů, by mohlo nyní získat potřebné výjimky ze zákazu komerčních činností a chovatel by pak mohl mláďata legálně, se správnými dokumenty, prodávat. Chovatel se marně pokoušel několik měsíců zvířata umístit, nakonec na podzim 2007 požádal ČIŽP o spolupráci. ČIŽP našla pro všechny exempláře příjemce - 2 dospělé želvy putovaly do domu dětí a mládeže, juvenilní exempláře byla ochotná přijmout Jihočeská univerzita. V prosinci 2007 pak byly želvy chovatelem bezúplatně darovány zmíněným institucím.

<sup>7</sup> Želvy vroubené byly zařazeny do experimentu se souhlasem majitelky (pracovnice ČIŽP).

## Průběh experimentu v čase

březen 2009 - 1. odběr vzorku krunýře (před převozem zvířat z Prahy do Českých Budějovic)

duben 2009 (1. 4.) - převoz z Prahy

duben – červen 2009 – společné krmení

červen 2009 (30. 6.) – 2. odběr vzorku krunýře

1. 7. 2009 – začátek experimentu, diferenciací mezi skupinami zvířat v izotopovém složení krmení

červenec 2009 – září 2009 – značení zvířat izotopově upravenou smetankou lékařskou

říjen 2009 – listopad 2009 – značení zvířat provizorně izotopově upraveným pekingským zelím (viz kapitola 2. 1. 2.)

prosinec 2009 – červen 2010 – značení zvířat izotopově upraveným pekingským zelím

6. 6. 2010 – 3. odběr vzorku krunýře u skupin č. 1 a č. 2, ukončení experimentu

Mimo samotný experiment byly v práci dále použity vzorky okrajových a žeberních štítků (karapax) a hrudních, břišních a stehenních štítků (plastron) z mrtvých exemplářů s doloženým místem původu (Tab. 4). Vzorky 4, 5, 7 pocházejí z Národního muzea v Praze, vzorky 1-3 a 6, 8 potom ze soukromých sbírek.

**Tabulka 4.** Původ exemplářů u analyzovaných vzorků štítků.

vzorek	druh	původ exempláře
1.	<i>Testudo horsfieldi</i>	ČR2
2.	<i>Testudo marginata</i>	Řecko
3.	<i>Testudo graeca</i>	Maroko
4.	<i>Testudo graeca</i>	Rumunsko
5.	<i>Testudo graeca</i>	Bulharsko
6.	<i>Testudo graeca</i>	ČR1
7.	<i>Testudo graeca</i>	Původ neznámý
8.	? <i>Testudo graeca</i> ?	Kypr

## 2. 1. 2. Zdrojová voda

V závislosti na izotopovém složení srážkové vody obou lokalit byla voda použitá v experimentu dvojího typu. Voda pro skupinu č. 1 pocházela z nádrže Římov (v textu dále použit název „českobudějovická“, ČB-voda). Vodu pro skupinu č. 2 bylo třeba namíchat. Jako základ byla použita opět voda pocházející z Říмова, která byla izotopově obohacena vypočteným množstvím těžké vody ( $D_2^{16}O$ ) a vody s izotopem  $^{18}O$  ( $H_2^{18}O$ ) (v textu dále použit název „kyperská“). Tyto dva typy vody se používaly jako zdroj pro zalivku rostlin i pití zvířat. Pro zvířata i pěstované rostliny bylo třeba zajistit stálý, izotopově konstantní zdroj vody. Proto byla voda obou skupin po celou dobu trvání experimentu uchovávána a podle potřeby doplňována do dvou plastových 200 L nádrží umístěných v chlazené temné místnosti při teplotě 4-7 °C.

Informace potřebné pro výpočet množství těžké vody, které bylo přidáno do vody českobudějovické, jsou zobrazeny v tabulce 5. Ke zjištění geografických dat (zeměpisné souřadnice a nadmořská výška) obou lokalit posloužila aplikace „Google Earth“, posléze byl použit izotopový kalkulátor (volně přístupný na [www](http://wateriso.eas.purdue.edu/waterisotopes/) adrese: <http://wateriso.eas.purdue.edu/waterisotopes/>), který na základě geografických dat vypočítá izotopové složení srážkové vody daného místa.

**Tabulka 5.** Geografické charakteristiky obou lokalit a izotopové složení příslušné srážkové vody (celoroční průměr). Údaje byly získány z internetových vyhledávačů Google Earth a WaterIsotopes.org.

		zeměpisná			$\delta^{18}O$ [‰]	$\delta D$ [‰]
	místo	šířka [deg]	délka [deg]	nadm. výška [m]		
Česká republika	České Budějovice	48° 58'	14° 28'	474	-9	-62
Kypr	pobřeží	35° 12'	33° 29'	0	-5.4	-27

Jak je vidět z tabulky 5, srážková voda na Kypru je obohacenější o těžké izotopy vody. „Vyrobít“ takovou vodu v našich podmínkách bylo nejsnazší přidáním „těžké“ vody ( $D_2^{16}O$ , 99 % deuteria, Sigma – Aldrich, ČR) a vody s izotopem  $^{18}O$  ( $H_2^{18}O$ , 60 – 80 %  $^{18}O$ , Ústav jaderného výzkumu Řež a.s., ČR) do ČB-vody. Výpočet objemů  $D_2^{16}O$  a  $H_2^{18}O$ , které bylo nutné přidat do ČB-vody byl vztažen na již zmíněné 200 litrové nádrže a vstupní parametry izotopového složení průměrné srážkové vody:

pro vodík:

$$V_{\check{C}B} = 200 \text{ L}$$

$$V_K = 200 \text{ L}$$

$$\delta_{\check{C}B} = - 62 \text{ ‰}$$

$$\delta_K = - 27 \text{ ‰}$$

pro kyslík:

$$V_{\check{C}B} = 200 \text{ L}$$

$$V_K = 200 \text{ L}$$

$$\delta_{\check{C}B} = - 9 \text{ ‰}$$

$$\delta_K = - 5,4 \text{ ‰}$$

kde  $V$  značí objem,  $\delta$  izotopové složení relativně ke standardu (V-SMOW) a indexy ČB a K českobudějovickou, respektive kyperskou vodu. Pro zjištění množství těžšího izotopu přirozeně se vyskytujícího ve 200 litrech ČB- a kyperské vody bylo použito vztahů:

$$D_{\check{C}B} = (V_{\check{C}B}/M) * N * R_{\check{C}B}$$

$$D_K = (V_K/M) * N * R_K$$

kde  $V_K$  a  $V_{\check{C}B}$  značí požadovaný objem ( $200 \text{ L} \cong 200 \text{ kg}$ ),  $R_{\check{C}B}$  a  $R_K$  je poměr atomů těžkého a lehkého izotopu vodíku nebo kyslíku ve vodě pro danou lokalitu ( $R=D/H$  pro vodík a  $R=^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  pro kyslík),  $M$  je molární hmotnost vody ( $\text{kg mol}^{-1}$ ) a  $N$  Avogadrovo číslo. Oba vztahy udávají počet molekul vody s jedním atomem těžšího izotopu (počet DHO ale obdobně pro  $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) v objemu 200 litrů příslušné vody. Pokud od sebe odečteme počty atomů D ve vodě kyperské a českobudějovické ( $D_K - D_{\check{C}B}$ ) a vynásobíme  $M/N$ , získáme hmotnost těžké vody (resp. její objemy  $V_D$  a  $V_{18\text{O}}$ ), kterou je potřeba přidat do ČB-vody, aby vznikla voda izotopově blízká srážkové vodě Kypru. Využijeme přitom už uvedeného vztahu mezi  $\delta$  a  $R$  (viz Úvod, kapitola 1. 2.) a hodnot pro izotopový poměr standardu  $R_S$ , kterým je střední oceánská voda (viz kapitola 1. 2.:  $R_{S\text{D}} \cong 0,00015$ ,  $R_{S\text{18O}} \cong 0,002$ ):

pro vodík:

$$V_D = V_K * R_K - V_{\check{C}B} * R_{\check{C}B}$$

$$= V_K * [(\delta_K + 1) * R_S] - V_{\check{C}B} * [(\delta_{\check{C}B} + 1) * R_S]$$

$$= 200 * [(-27/1000 + 1) * 0,00015] - 200 * [(-62/1000 + 1) * 0,00015]$$

$$= 200 * 0,00014695 - 200 * 0,0001407$$

$$= 1,05 * 10^{-3} \text{ [kg]} \cong \underline{1,05 \text{ [ml]}}$$



pro kyslík:

$$\begin{aligned}V_{18O} &= V_K * R_K - V_{\check{C}B} * R_{\check{C}B} \\&= V_K * [(\delta_K + 1) * R_S] - V_{\check{C}B} * [(\delta_{\check{C}B} + 1) * R_S] \\&= 200 * [(-5,4/1000 + 1) * 0,002] - 200 * [(-9/1000 + 1) * 0,002] \\&= 200 * 0,0019892 - 200 * 0,001982 \\&= 1,44 * 10^{-3} \text{ [kg]} \cong \underline{1,44 \text{ [ml]}}\end{aligned}$$

Pro přípravu 200 litrů kyperské srážkové vody jsme tedy smíchali 1,05 ml D<sub>2</sub>O a 1,44 ml H<sub>2</sub><sup>18</sup>O s cca 200 litry vodovodní českobudějovické vody.

Pro ověření přesnosti izotopového kalkulátoru byly také zanalyzovány vzorky vodovodní vody pocházející z vesnice Skarinou (Kypr). Vzorky byly odebrány do dvou plastových lahví (0,5 L), skladovány v lednici a analyzovány rok po jejich odebrání.

### **2. 1. 3. Pěstování rostlin, krmení**

Každou se dvou skupin zvířat jsme se snažili krmit stravou izotopově blízkou složení stravy v místě jejich simulovaného výskytu tj. v Českých Budějovicích a na Kypru. Proto jsme rostliny, které jsme pěstovali pro želvy, zalévali upravenou vodou izotopově blízkou srážkové vodě v oblasti Českých Budějovic nebo na Kypru. Pro každou skupinu byla založena krmná sada v počtu 8 plastových přepravek (56 x 37 x 27 cm, objem 50 L), které byly do více než půlky naplněny zeminou (Zemina pro trávníky, Rašelina Soběslav s.r.o., ČR). Všechny přepravky (16 ks) s krmnými rostlinami byly umístěny po celou dobu experimentu ve společné skleníkové kóji (listopad 2009 – červen 2010) nebo na terase pod foliovým krytem (květen 2009 – září 2009). Do připravených přepravek byly přesazeny kúlovité zásobní kořeny pampelišky (smetánky) lékařské (*Taraxacum officinale*) s mladými vzrostlými vrcholy, které byly za účelem pokusu odebrány a přeneseny z lokality Borkovická Blata. Rostliny v obou sadách byly zalévány pouze příslušnou izotopově upravenou vodou (její příprava a skladování viz kapitola 2. 1. 2.). Po opětovném zakořenění rostlin byly pampelišky ořezány a nechány znovu obrůst. Teprve tyto nově vytvořené listy rostlin byly pravidelně stříhány a podávány želvám od července do září v roce 2009.



Ke konci září roku 2009 byly pampelišky v obou sadách napadeny škůdci a bylo třeba rychle najít provizorní zdroj izotopového značení. Proto byly želvy od října do listopadu roku 2009 značeny pekingským zelím kupovaným v supermarketu a louhovaným po 24 hodin v příslušné izotopově specifické vodě.

Provizorní zdroj značení byl v prosinci 2009 nahrazen opět pekingským zelím (*Brassica oleracea* var. *pekinensis*) tentokrát pěstovaným přímo ze semene ve skleníku Katedry fyziologie rostlin JU (Zelí pekingské celoroční Manoko F1, producent semen Nohel Garden, ČR).

## **2. 2. METODY**

Při odběrech, zpracování a analyzování vzorků na obsah stabilních izotopů byly použity tyto metody.

### ***2. 2. 1. Odběr a příprava vzorků***

*Odběry vzorků rostlin.* Odběry rostlinného materiálu používaného pro krmení zvířat byly prováděny s cílem zjistit izotopové složení vody a sušiny v listech jako hlavního zdroje vodíku a kyslíku pro stavbu těla živočichů. Odebírala jsem náhodně terčíky z listů za pomoci korkovrtu o průměru 1 cm. Každý vzorek byl tvořen vždy 3 listovými terčíky (celková plocha 9,42 cm<sup>2</sup>). Terčíky byly vysekány tak, aby neprotínaly žádné větší cévy, které obsahují relativně velké množství izotopově neobohacené (zálivkové) vody. Při potřebě minimálně 5-10 µl listové vody pro třikrát opakovanou izotopovou analýzu na D a <sup>18</sup>O, byly 3 odebrané terčíky dostatečným množstvím. Odebrané listové terčíky byly ihned vloženy do hermeticky uzavíratelných skleněných vakuových zkumavek (Exetainer, LabCo, UK), kde byly uchovány pro další zpracování. Exetainery byly skladovány v mrazicím boxu do doby destilace.

*Odběry vzorků krunýře.* Tyto odběry jsem prováděla odlamovacím nožem. Nožem byly želvám odříznuty přesahující oblasti marginálních štítků. Vzorky byly odebírány do mikrozkušavek značky Eppendorf (objem 2 ml – Tento typ byl používán během celého experimentu). Množství odebíraného keratinu se pohybovalo od 20 do 40 mg.

*Příprava vzorků vody z listů rostlin.* Voda byla ze vzorků rostlin extrahována kryodestilací. Před samotnou extrakcí byly exetainery s odebranými vzorky temperovány na pokojovou teplotu. Poté byly jednotlivě otevírány a zasouvány do O-kroužkem těsněných otvorů v

kovovém bloku. Z druhé strany bloku proti každému otvoru s exetainerem byl ještě jeden otvor. Do tohoto otvoru byla ihned po zasunutí exetaineru se vzorkem nasazena prázdná plastová nádobka (chromatografická vialka o objemu 2 ml s konickým dnem) také utěsněná O-kroužky. Jeden blok dovozoval instalaci 12- ti exetainerů se vzorky. Kovové bloky byly poté ze strany exetainerů umístěny do topného hnízda a zahřívány na 80 °C, zatímco dna vialek byla chlazená tekutým dusíkem na teplotu přibližně -20 °C (viz Příloha, Obr. 12). Po 5- ti hodinách kryodestilace přešla veškerá voda z terčíků listů do vialek termomodifuzí. Vialky s vodou byly uzavřeny víčky a umístěny do mrazicího boxu, kde byly skladovány až do provedení měření izotopového složení (detaily konstrukce zařízení jsou popsány v Šantrůček *et al.* 2007).

*Příprava vzorků rostlin a krunýřů pro analýzu uhlíku, kyslíku a vodíku (pevné vzorky).* Vzorky pevných látek, které byly analyzovány na hmotnostním spektrometru, bylo potřeba vysušit a rozemlít (zhomogenizovat). Veškeré mletí, které bylo použito při zpracování vzorků, bylo prováděno na oscilačním kulovém mlýnu MM 200 (Retsch, Německo). Rostlinné vzorky (terčíky po kryodestilaci) byly homogenizovány v mikrozkuřavkách se 2 mlecími wolframovými kuličkami při frekvenci 29 Hz po dobu 1 minuty. Vzorky krunýře od obou experimentálních skupin byly mlety také v mikrozkuřavkách, při frekvenci 29 Hz, ale po dobu 30 minut a se 3 mlecími wolframovými kuličkami. Štítky z mrtvých exemplářů byly díky většímu množství materiálu zhomogenizovány v mlecích nádobách s korundovou výplní za pomoci korundové koule (frekvence 29 Hz, čas 3 minuty). Takto rozemleté vzorky rostlin i krunýřů byly poté naváženy (viz dále) pro analýzu uhlíku. Izotopové analýzy kyslíku a vodíku v keratinu krunýře želv a rostlinném materiálu nebyly prováděny na pracovišti JU. Vzorky byly odeslány do laboratoře Iso-Analytical (UK). Z finančních důvodů se analyzovaly pouze vybrané vzorky z druhého a třetího odběru. Před samotným odesláním bylo třeba vzorky připravit a navážit. Vážení vzorků keratinu předcházela sedimentace po stěnách mikrozkuřavek rozptýleného keratinového materiálu pomocí etheru. Do každé mikrozkuřavky bylo napipetováno 0,9 ml diethyletheru. Po jeho odpaření zůstal vzorek keratinu usazený na dně. Díky dostatečnému množství materiálu nebylo třeba vzorky krunýře z mrtvých exemplářů podrobit sedimentaci v etheru. Dále byly vzorky určené k analýzám vodíku a kyslíku sušeny v horkovzdušném sterilizátoru SANYO po 3 dny při teplotě 60 °C a poté naváženy (Tab. 6). Před samotnou analýzou vodíku v keratinu je třeba ustavit rovnováhu mezi vzorkem a keratinovým standardem o známé vlhkosti a izotopovém složení vodíku (viz

Úvod, kapitola 1. 3., 1. 6.), tudíž byly stříbrné kapsle s navážkami zavřené pouze provizorně tak, aby mohly být v laboratoři Iso-Analytical otevřeny.

*Navážování vzorků a rozpětí hmotnosti navážek.* Navážování všech vzorků pro izotopová měření bylo prováděno na mikrováhách MT5 (Metler Toledo, Švýcarsko). Pro analýzy uhlíku byly vzorky navážovány do cínových kapslí o rozměru 5 x 9 mm, navážky keratinu určené k analýze vodíku a kyslíku potom do kapslí stříbrných (5 x 9 mm). Navážky pro jednotlivé materiály a izotopy se pohybovaly od 0,2 – 1,1 mg (Tab. 6).

**Tabulka 6.** Rozpětí navážek pevných vzorků pro měření jednotlivých izotopů.

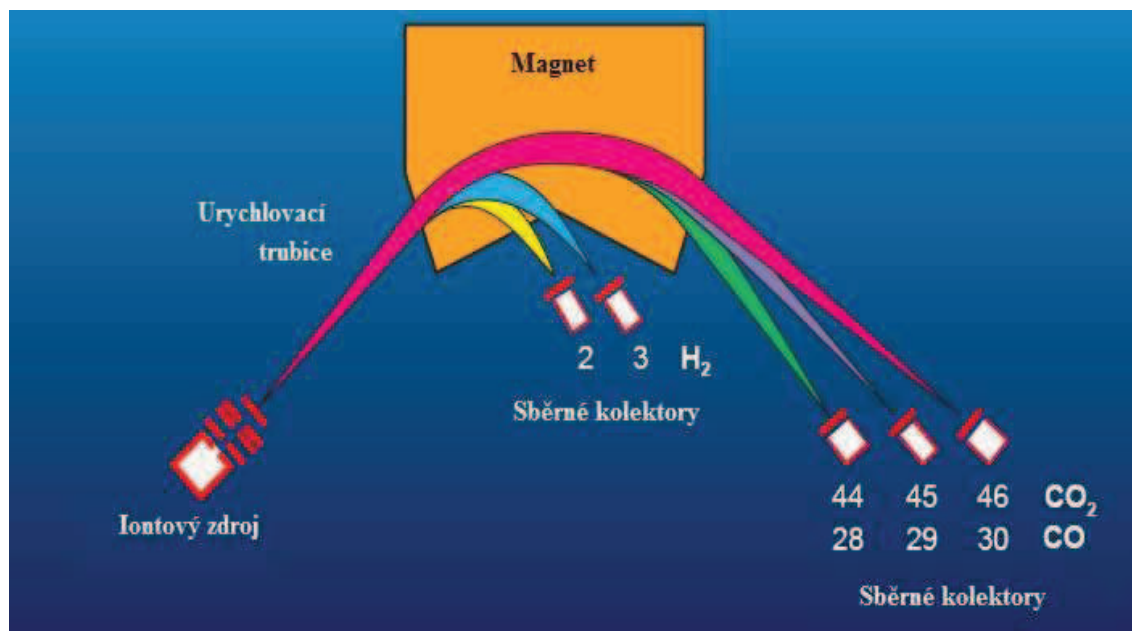
	hmotnost navážek [mg]	
	rostliny	krunýř
$\delta^{13}\text{C}$	0,35 - 0,45	0,2 - 0,33
$\delta^{18}\text{O}$	0,4 - 0,6	0,9 - 1,1
$\delta\text{D}$	0,9 - 1,1	0,9 - 1,1

### 2. 2. 2. *Izotopové analytické metody*

Izotopová poměrová hmotnostní spektrometrie (*Isotope Ratio Mass Spectrometry, IRMS*) je analytickou metodou umožňující zjišťovat izotopové složení vzorku. IRMS spektrometry porovnávají izotopový poměr vzorku se známým izotopovým složením standardu (viz Úvod, kapitola 1. 2.). Naprostá většina vzorků byla analyzována pomocí izotopového hmotnostního spektrometru DeltaPlus XL (ThermoFinnigan, Německo), který byl pro analýzu pevných vzorků připojen k prvkovému analyzátoru CHNOS Elemental analyzer vario MICRO cube (Elementar, Německo) a pro analýzu kapalných vzorků k pyrolyzační peci - prvkovému analyzátoru TC/EA Interface (ThermoFinnigan, Německo). Pro přiblížení nastíním základní principy metody.

Vzorek určený pro analýzu hmotnostním spektrometrem musí být plynný. V případě jiného skupenství musí být na plynný převeden v přídatném zařízení. Vzniklé jednoduché plyny ( $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ) jsou v iontovém zdroji ionizovány, následně jsou v dlouhé evakuované trubici urychleny vysokým napětím a poté vstupují do magnetického pole, kde se trajektorie daného iontu zakřivuje podle jeho hmotnosti a náboje (Obr. 13). Detekce se provádí pomocí sběrných kolektorů nastavených na hodnoty 2, 3 (pro vodík), 28, 29, 30 (pro kyslík v  $\text{CO}$ ) a

44, 45, 46 (pro uhlík v CO<sub>2</sub>). Poměry četností jednotlivých izotopů ve vzorcích se pak porovnávají s poměry u laboratorních standardů (se známými, podle IAEA standardů kalibrovanými izotopovými poměry).



**Obrázek 13.** Princip funkce izotopového poměrového hmotnostního spektrometru (IRMS). Přejato a upraveno z Šantrůček 2010.

### 2. 2. 3. *Statistické vyhodnocení dat*

Pro porovnání hodnot  $\delta$  v keratinu mezi oběma skupinami po závěrečném odběru u všech tří izotopů jsem použila neparametrický Mann – Whitney U test (dále M-W test), při srovnání různých typů potravy potom neparametrický Kruskal-Wallisův test (dále K-W test) a pro zjištění možného vztahu mezi keratinem mrtvých exemplářů se známou lokalitou původu a zeměpisnou šířkou jsem použila Spearmanovu korelaci. Ke statistickému zpracování dat byl použit program Statistica 9 (StatSoft, Inc., 1984 - 2010), SigmaPlot a tabulkový editor Microsoft Office Excel 2007.

## **3. VÝSLEDKY**

### **3. 1. VODÍK**

#### **3. 1. 1. $\delta$ D v keratinu želv, srovnání s $\delta$ D pitné vody a vody v krmivu**

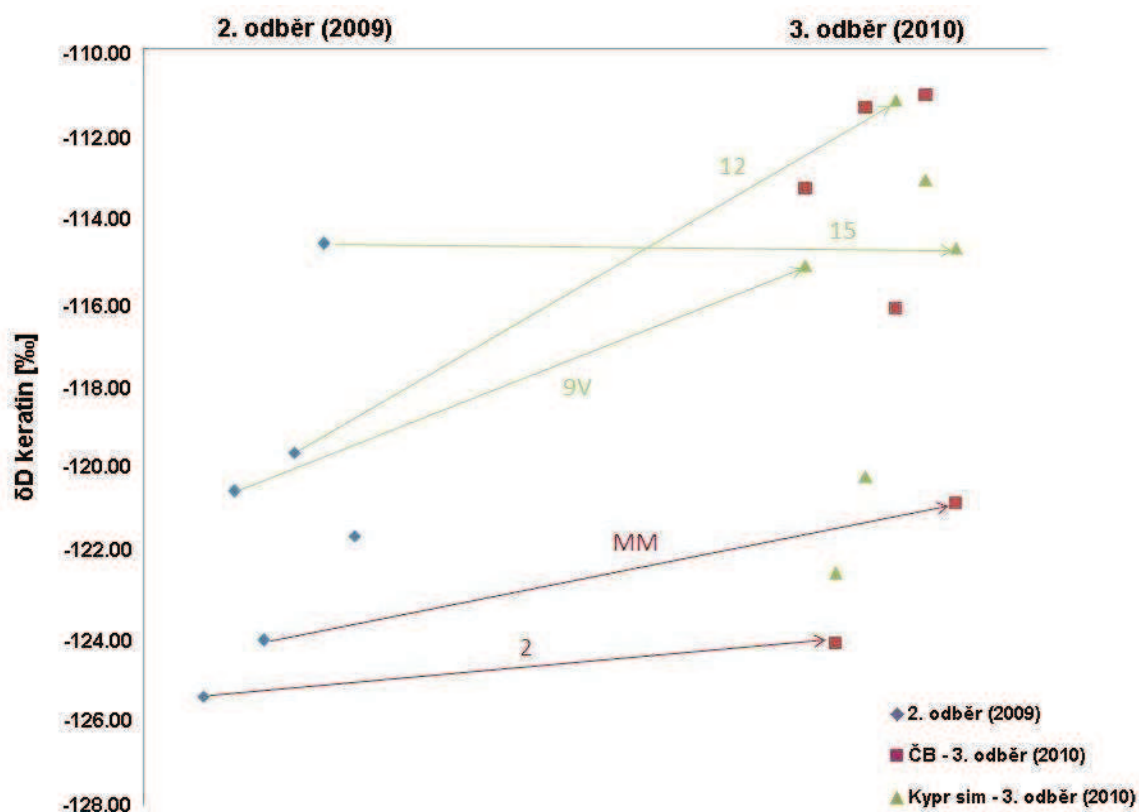
V obsahu D v keratinu se želvy obou skupin po ukončení experimentu nelišily (Tab. 12). Ale s přihlédnutím k malému počtu dat a vysoké variabilitě mezi jedinci je třeba nahlížet na výsledky ne jako na skupinu (opakování), ale je nutné porovnávat izotopové změny vyvolané zásahem u stejného jedince. V případě jedinců, u kterých je k dispozici hodnota  $\delta$ D keratinu u druhého i třetího odběru, je ve většině případů vidět větší obohacení o těžší izotop vodíku u skupiny Kypr (Tab. 11, Obr. 14). Ve srovnání s pitnou vodou i vodou v potravě (listovou) je keratin v obou skupinách silně ochuzen o D, více ale u sk. Kypr (Tab. 12).  $\delta$ D všech druhů krmiva (pampelišky, pekingské zelí) se lišila mezi sebou i mezi oběma skupinami, přičemž rostliny zalévané simulovanou „kyperskou“ vodou byly vždy obohacenější o těžší izotop vodíku (Obr. 16).  $\delta$ D vody odebrané na Kypru (vodovodní voda) byla  $-25,1 \pm 1,44$  ‰. Hodnota dešťové vody, kterou jsem spočítala pomocí izotopového kalkulátoru, byla  $-27$  ‰.

**Tabulka 11.**  $\delta D$  keratinu jednotlivých želv obou skupin v druhém (předexperimentálním) a třetím (konečném) odběru. Do tabulky je také přidána hodnota rozdílu  $\delta D$  u vybraných jedinců mezi druhým a třetím odběrem.

želva	skupina	$\delta D$ [‰]		Rozdíly (izotop. posun) 2010 - 2009 [‰]
		2. odběr (2009)	3. odběr (2010)	
1	ČB		-113,32	
2	ČB	-125,40	-124,14	1,26
4	ČB		-111,41	
6	ČB		-116,18	
8	ČB		-111,11	
MM	ČB	-124,07	-120,81	3,26
9V	K	-120,53	-115,17	8,4
10	K		-122,48	
11	K		-120,18	
12	K	-119,61	-111,21	5,36
13	K		-113,12	
15	K	-114,63	-114,74	-0,11

**Tabulka 12.** Porovnání  $\delta D$  zálivkové a pitné vody, vody v potravě (souhrnná hodnota všech typů krmiva za celý rok experimentu,  $N_{Kypř} = 26$  a  $N_{ČB} = 27$ ) a keratinu krunýře želv (souhrnné hodnoty za celou skupinu pro 3. odběr:  $N_{Kypř} = 6$  a  $N_{ČB} = 6$ ).

	ČB			Kypř		
	vážený průměr	sm. odchylka		vážený průměr	sm. odchylka	
voda						
$\delta D$ [‰]	-67	6		-20	25	
	medián	d. kvartil	h. kvartil	medián	d. kvartil	h. kvartil
voda v potravě						
$\delta D$ [‰]	-14,2	-59	4,7	-5,5	-8	13,4
keratin						
$\delta D$ [‰]	-114,8	-120,8	-111,4	-114,9	-120,2	-113,1

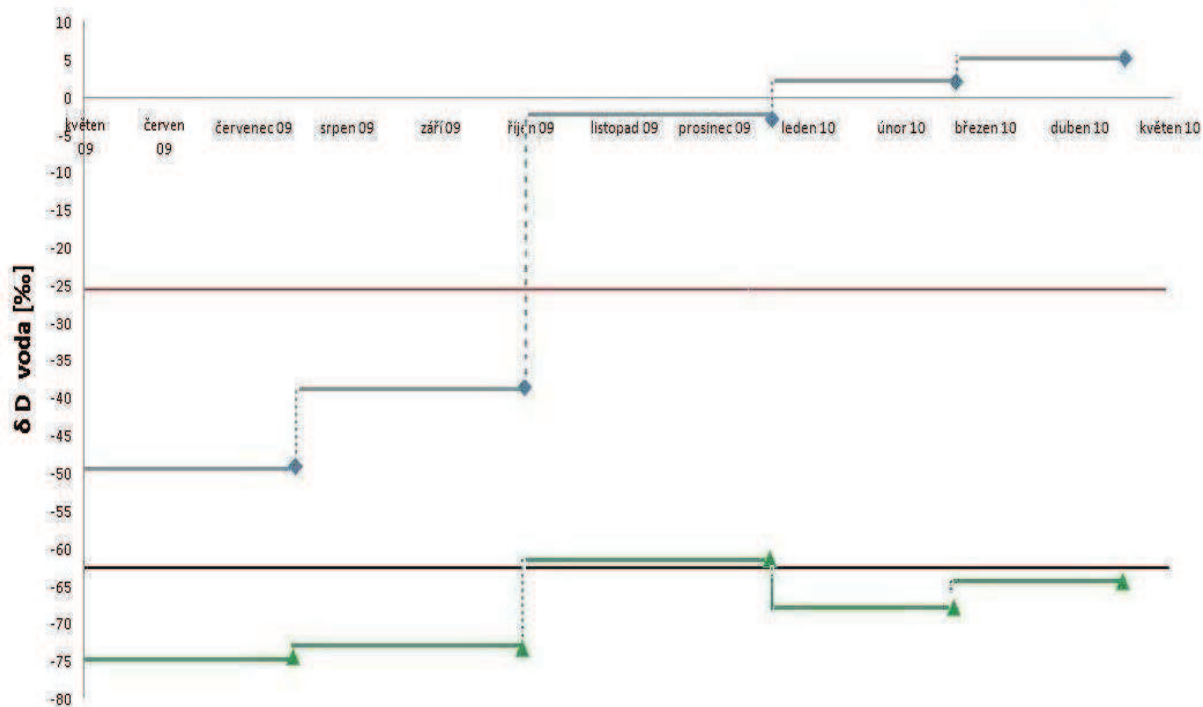


**Obrázek 14.**  $\delta D$  vybraných želv v druhém a třetím odběru keratinu. Šipkami je znázorněná změna  $\delta D$  keratinu vyvolaná změnou izotopového složení potravy a pitné vody u vybraných jedinců. Značení nad šipkami odkazuje ke konkrétnímu jedinci. Barevné rozlišení doplněno v legendě obrázku.

### 3. 1. 2. $\delta D$ zálivkové vody během experimentu

V experimentu byla používána pro zálivku krmných rostlin i pro pití želv voda izotopově odlišná pro obě skupiny zvířat. Nami namíchaná voda byla zpočátku značně ochuzenější o D než izotopovým kalkulátorem udávaný roční průměr ČB i Kyperské vody (Obr. 15, Tab. 5). To bylo s velkou pravděpodobností způsobeno sezónní variabilitou  $\delta D$ , protože v době založení experimentu (načerpání vody do sudů - květen 2009) byla voda v Římově ještě z velké části tvořena vodou ze sněhu, která bývá výrazně ochuzená o těžší izotop vodíku. Simulovaná „kyperská“ voda byla výrazně obohacena v druhé polovině experimentu, pravděpodobně v důsledku zvýšení dávky  $D_2O$ .



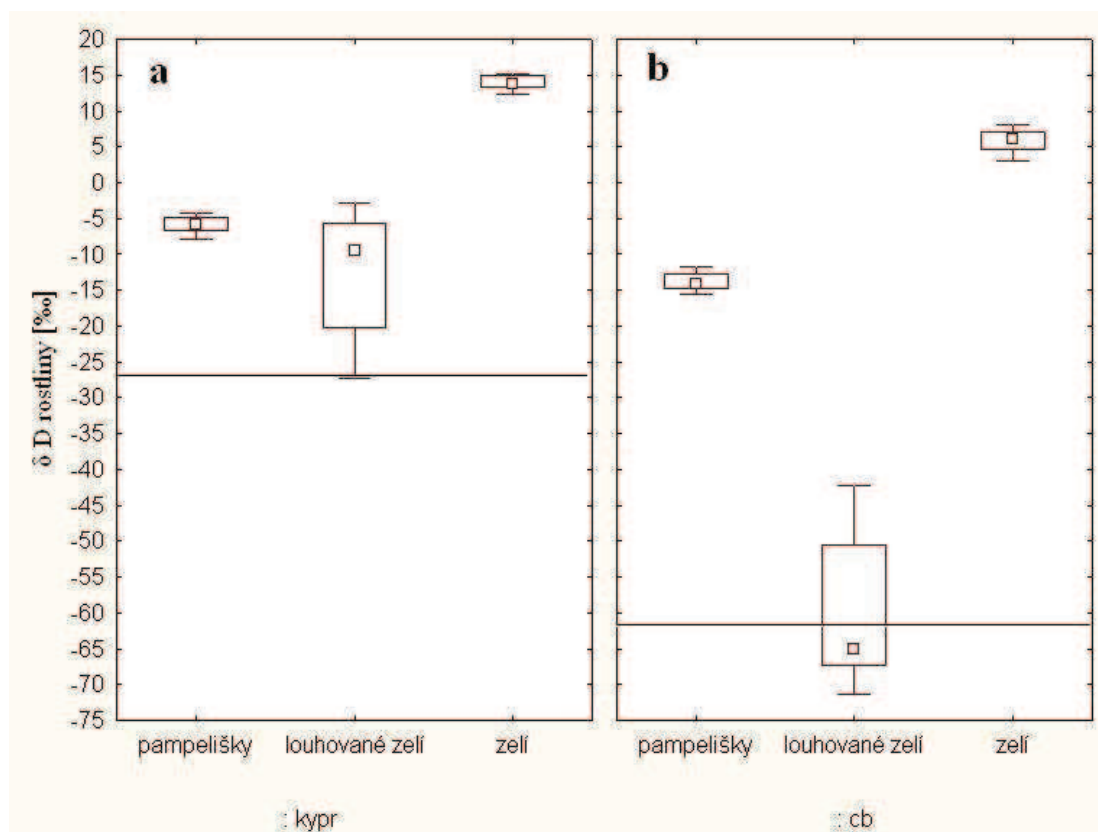


**Obrázek 15.** Izotopové složení ( $\delta D$ ) námi míchané simulované srážkové vody používané k zalévání rostlin a jako zdroj pitné vody pro želvy. Vodorovná červená linie udává průměrnou roční hodnotu  $\delta D$  srážkové vody na Kypru vypočítanou izotopovým kalkulátorem, černá potom průměrnou roční hodnotu  $\delta D$  srážek pro České Budějovice. Modré kosočtverce schodovitě pospojované vodorovnými liniemi a přerušovanou čarou znázorňují  $\delta D$  200 L zásob (dávek) simulované kyperské vody, zelené trojúhelníky potom  $\delta D$  průběžných zásob pro skupinu České Budějovice.

### 3. 1. 3. $\delta D$ vody v listech krmných rostlin

Želvy jsem v průběhu experimentu krmila třemi typy izotopově upravených rostlin (pampelišky, kupované pekingské zelí a pěstované pekingské zelí). Porovnání všech tří typů krmení uvnitř skupin ukázalo odlišnost (pro ČB K-W test:  $N=27$ ,  $H=23$ ,  $p=0,00$ ; pro Kypr K-W test:  $N=26$ ,  $H=17$ ,  $p=0,00$ ), stejně tak porovnání všech typů mezi skupinami (pro pampelišky M-W test:  $N=14$ ,  $Z=3,07$ ,  $p=0,00$ ; pro louhované zelí M-W test:  $N=22$ ,  $Z=3,94$ ,  $p=0,00$ ; pro zelí M-W test:  $N=17$ ,  $Z=3,42$ ,  $p=0,00$ ), přičemž rostliny zalévané simulovanou “kyperskou” vodou (Obr. 16a) byly vždy obohacenější o těžší izotop vodíku oproti rostlinám zalévaným vodou českobudějovickou (Obr. 16a).

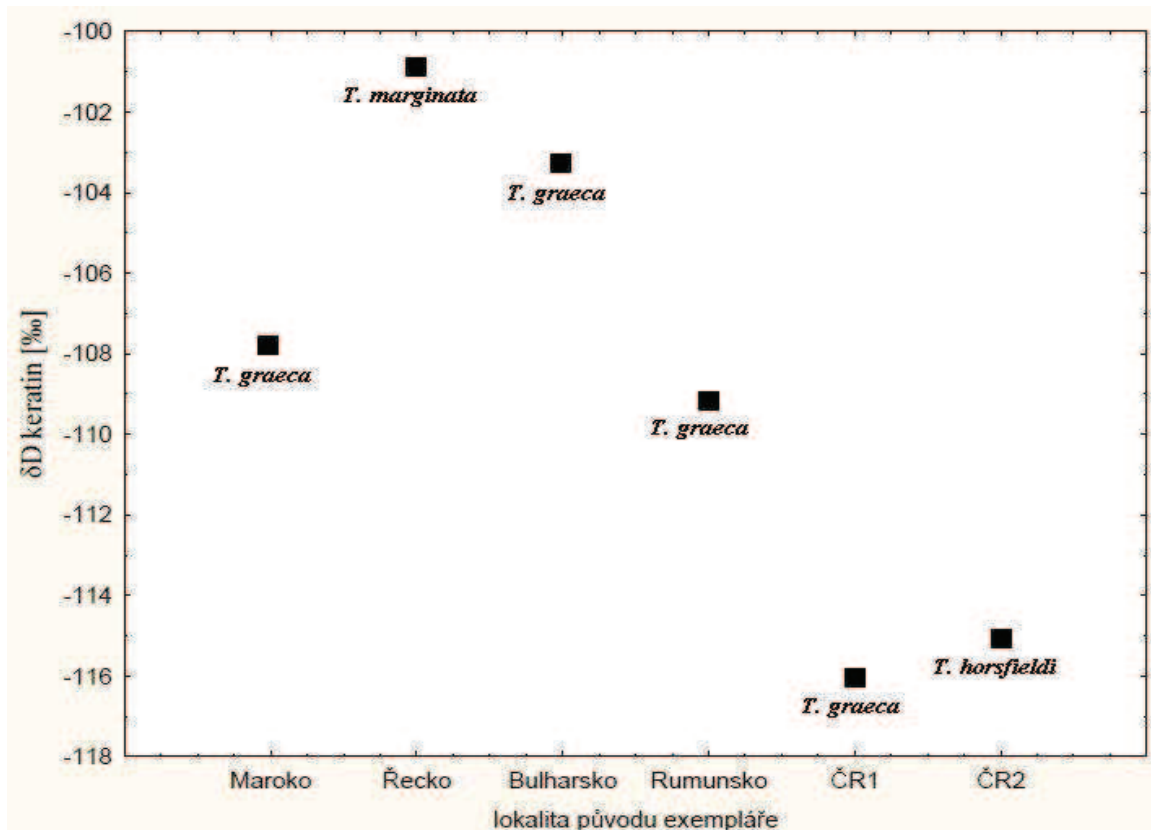




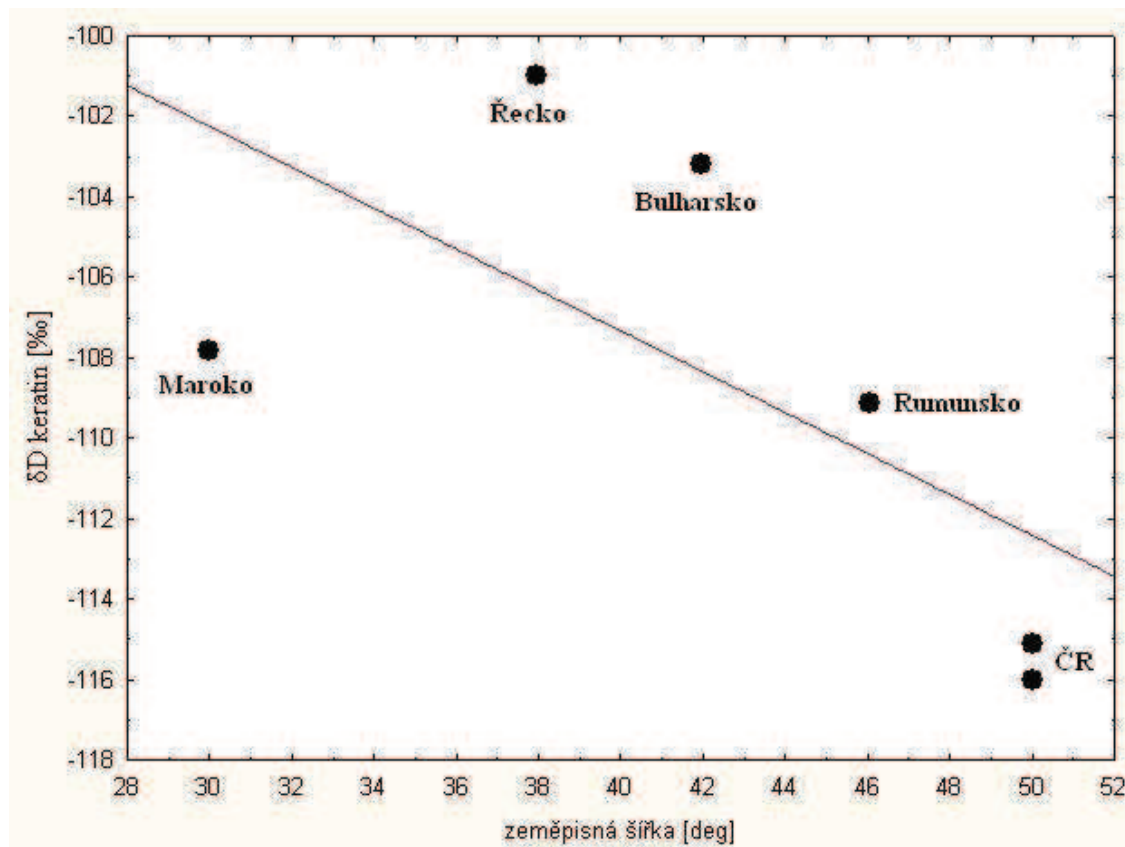
**Obrázek 16.** Hodnoty  $\delta D$  ve vodě v listech u jednotlivých typů krmiva podávaného želvám v průběhu experimentu u obou skupin: Kypr (a), České Budějovice (b). Vodorovné linie udávají průměrné roční hodnoty  $\delta D$  vypočítané izotopovým kalkulátorem pro Kypr, resp. České Budějovice. Malé čtverečky ukazují medián, obdélníkové boxy 25%-75% kvartil a úsečky rozsah neodlehlejších hodnot.

### 3. 1. 4. $\delta D$ mrtvých exemplářů s doloženým místem původu

Nejvíce obohacené o D se ukázalo zvíře původem z Řecka (-100,9 ‰), nejochuzenější naopak jedinec (ČR1) pocházející z České republiky (-116,05 ‰) (Obr. 17). Dalším důležitým výsledkem je také statisticky průkazná korelace  $\delta D$  keratinu mrtvých exemplářů a zeměpisné šířky (Spearmanova korelace:  $N=6$ ,  $R=-0,811$ ,  $t(N-2)=-2,779$ ,  $p=0,05$ ; obr. 18).



**Obrázek 17.**  $\delta D$  keratinu mrtvých exemplářů suchozemských želv různých druhů a zeměpisného původu.



**Obrázek 18.** Korelace  $\delta D$  keratinu mrtvých exemplářů a zeměpisné šířky. Hodnoty zeměpisné šířky byly získány z internetového vyhledávače Google Earth (přibližný střed státu).

## 3. 2. KYSLÍK

### 3. 2. 1. $\delta^{18}\text{O}$ v keratinu želv, srovnání s $\delta^{18}\text{O}$ pitné vody a vody v krmivu

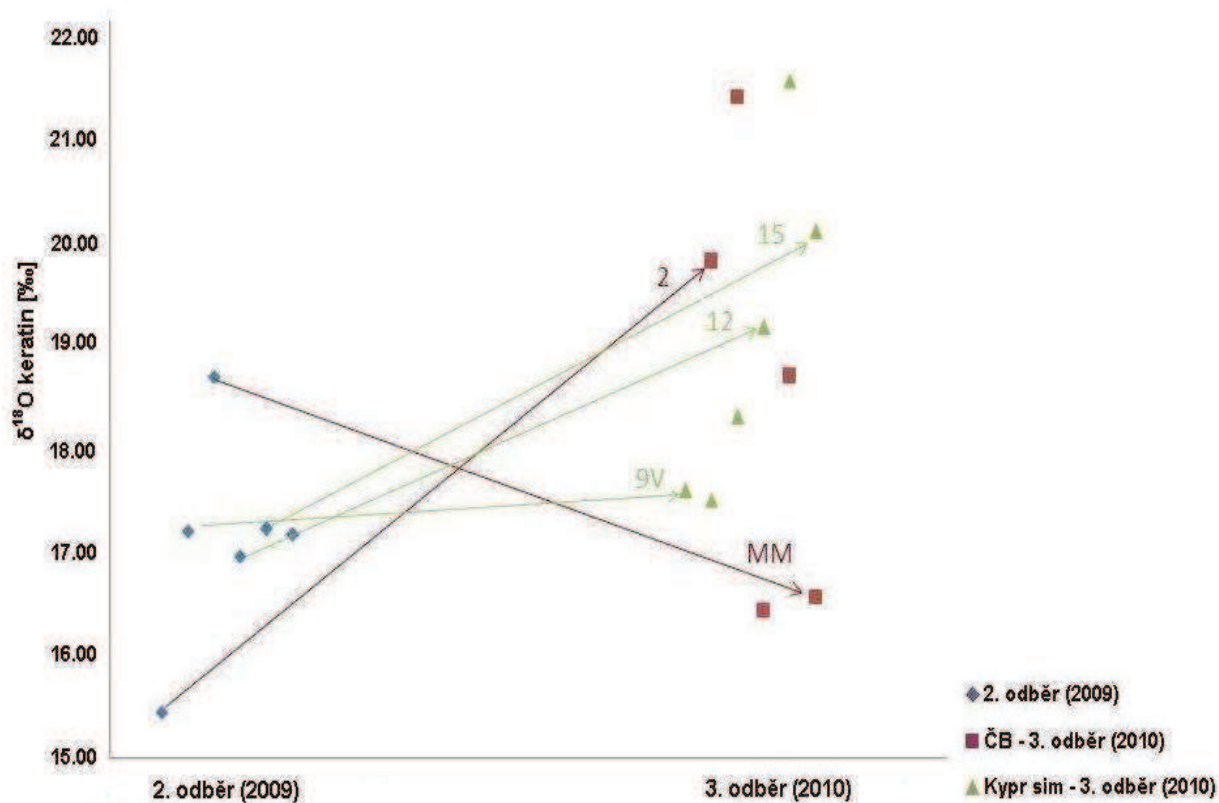
Stejně jako v případě vodíku se skupiny želv mezi sebou na konci experimentu nelišily ani v  $^{18}\text{O}$  (Tab. 14), ale byla výrazná variabilita mezi jedinci. Proto je třeba se zaměřit na izotopový posun vyvolaný u konkrétního jedince. U jedinců, u kterých je k dispozici hodnota  $\delta^{18}\text{O}$  keratinu u druhého i třetího odběru, je ve většině případů vidět obohacení o těžší izotop kyslíku, ve větší míře opět u skupiny Kypr (Tab. 13, Obr. 19). Keratin byl v porovnání se zálivkovou vodou obohacen v průměru o 26,2 % a v porovnání s vodou v listech v průměru o 16,55 ‰ (Tab. 14). Průměrný obsah kyslíku v keratinu krunýře želv byl 20,7 %. Porovnání vody ze všech tří typů krmení uvnitř skupin ukázalo odlišnost v  $^{18}\text{O}$ , ovšem při meziskupinovém porovnávání se od sebe průkazně lišilo pouze louhované zelí. Rostliny zalévané simulovanou „kyperskou“ vodou byly vždy obohacnější o těžší izotop kyslíku (Obr. 21).  $\delta^{18}\text{O}$  vodovodní kyperské vody byla  $-5 \pm 0,12$  ‰. Pro srovnání opět uvedu průměrnou roční hodnotu srážek spočítanou pomocí izotopového kalkulátoru, která byla -5,4 ‰.

**Tabulka 13.**  $\delta^{18}\text{O}$  keratinu jednotlivých želv obou skupin v druhém (předexperimentálním) a třetím (konečném) odběru. Do tabulky je také přidána hodnota rozdílu  $\delta^{18}\text{O}$  u vybraných jedinců mezi druhým a třetím odběrem.

želva	skupina	$\delta^{18}\text{O}$ [‰]		Rozdíly (izotop. posun) 2010-2009 [‰]
		2. odběr 2009	3. odběr 2010	
1	ČB			
2	ČB	15,44	19,83	4,39
4	ČB		21,42	
6	ČB		16,43	
8	ČB		18,71	
MM	ČB	16,56	16,56	-2,15
9V	K	17,21	17,60	0,39
10	K		17,50	
11	K		18,31	
12	K	16,96	19,18	2,23
13	K		21,58	
15	K	17,22	20,11	2,89

**Tabulka 14.** Porovnání  $\delta^{18}\text{O}$  zálivkové a pitné vody, vody v potravě (souhrnná hodnota všech typů krmiva za celý rok experimentu,  $N_{\text{Kypř}} = 30$  a  $N_{\text{ČB}} = 26$ ) a keratinu krunyře želv (souhrnné hodnoty za celou skupinu pro 3. odběr:  $N_{\text{Kypř}} = 6$  a  $N_{\text{ČB}} = 5$ ).

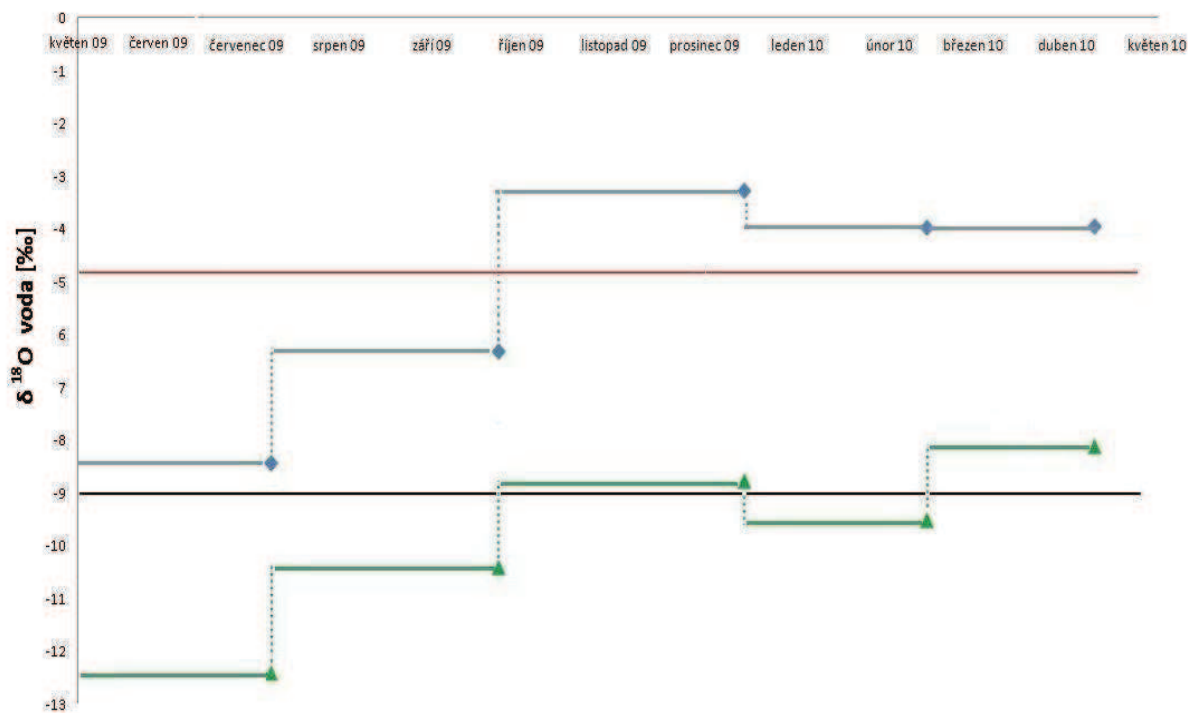
	ČB			Kypř		
	vážený průměr	sm. odchylka		vážený průměr	sm. odchylka	
voda						
$\delta^{18}\text{O}$ [‰]	-10	1,7		-5	4,8	
	medián	d. kvartil	h. kvartil	medián	d. kvartil	h. kvartil
voda v potravě						
$\delta^{18}\text{O}$ [‰]	2	-9	3,8	2,3	-4,3	3,7
keratin						
$\delta^{18}\text{O}$ [‰]	18,7	16,6	19,8	18,7	17,6	20,1



**Obrázek 19.**  $\delta^{18}\text{O}$  vybraných želv v druhém a třetím odběru keratinu. Šipkami je znázorněný izotopový posun kyslíku vyvolaný změnou izotopového složení vody v potravě a pitné vody u vybraných jedinců. Značení nad šipkami odkazuje ke konkrétnímu jedinci. Barevné rozlišení doplněno v legendě obrázku.

### 3. 2. 2. $\delta^{18}\text{O}$ zálivkové vody během experimentu

Izotopové složení namíchané simulované srážkové vody používané k zalévání rostlin a jako zdroj pitné vody pro želvy jsou zobrazeny v obrázku 20. Voda, odlišná pro obě skupiny, byla jako u vodíku zpočátku ochuzenější o těžší izotop oproti izotopovým kalkulátorem udávanému ročnímu průměru  $\delta^{18}\text{O}$  (Obr. 20, Tab. 5). Vysvětlení je nejspíš stejné jako v případě vodíku.



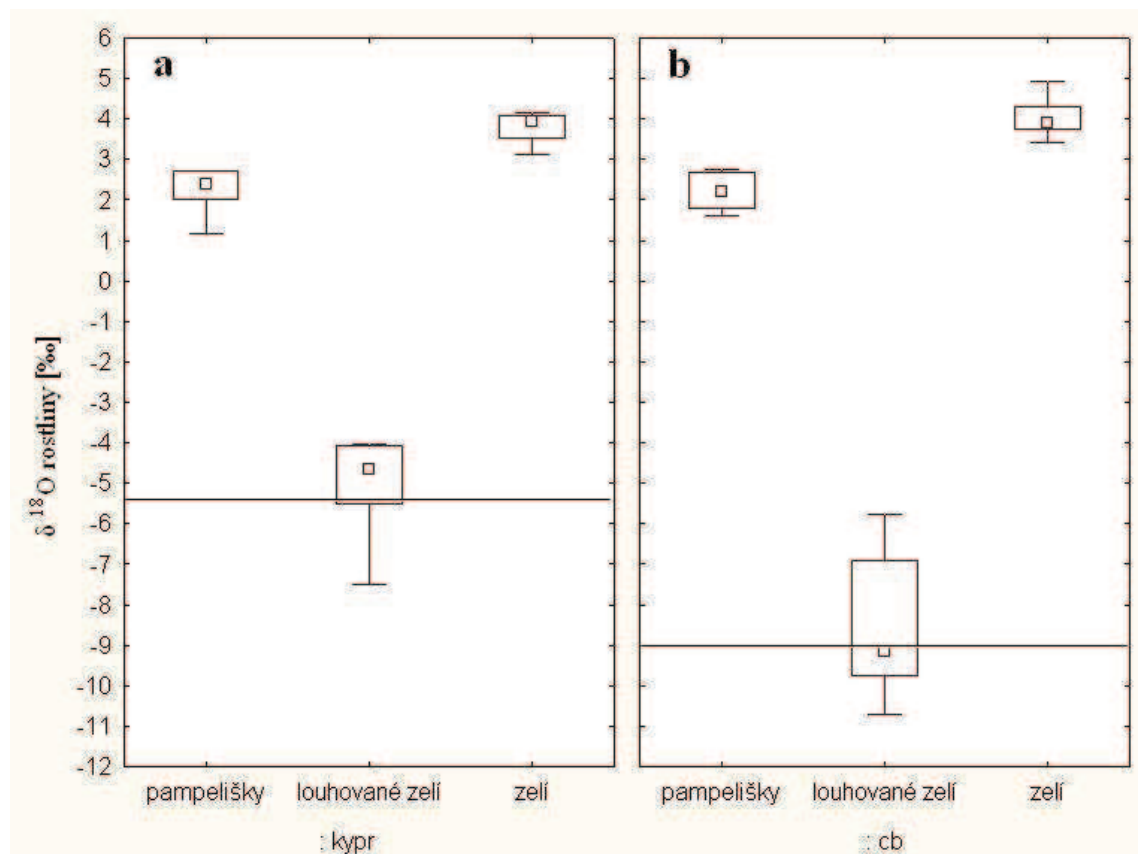
**Obrázek 20.** Izotopové složení ( $\delta^{18}\text{O}$ ) námi míchané simulované srážkové vody používané k zalévání rostlin a jako zdroj pitné vody pro želvy. Vodorovná červená linie udává průměrnou roční hodnotu  $\delta^{18}\text{O}$  srážkové vody na Kypru vypočítanou izotopovým kalkulátorem, černá potom průměrnou roční hodnotu  $\delta^{18}\text{O}$  srážek pro České Budějovice. Modré kosočtverce schodovitě pospojované vodorovnými liniemi a přerušovanou čarou znázorňují  $\delta^{18}\text{O}$  200 L zásob (dávek) simulované kyperské vody, zelené trojúhelníky potom  $\delta^{18}\text{O}$  průběžných zásob pro skupinu České Budějovice.

### 3. 2. 3. $\delta^{18}\text{O}$ vody v listech krmných rostlin

Porovnání  $\delta^{18}\text{O}$  všech tří typů krmení (pampelišky, louhované p. zelí i pěstované p. zelí) uvnitř skupin ukázalo průkaznou odlišnost (pro ČB K-W test:  $N=26$ ,  $H=22$ ,  $p=0,00$ ; pro Kypr K-W test:  $N=30$ ,  $H=23$ ,  $p=0,00$ ). Při porovnání  $\delta^{18}\text{O}$  všech typů potravy mezi skupinami se od sebe statisticky významně lišilo pouze louhované zelí (pro pampelišky M-W test:  $N=18$ ,  $Z=0,54$ ,  $p=0,59$ ; pro louhované zelí M-W test:  $N=22$ ,  $Z=3,55$ ,  $p=0,00$ ; pro zelí M-W test:  $N=16$ ,  $Z=-0,37$ ,  $p=0,71$ ). Průkazná odlišnost pouze v případě louhovaného zelí byla pravděpodobně dána tím, že zelí bylo po 24 hodin v rovnováze s příslušnou izotopově



odlišnou vodou. Rostliny zalévané simulovanou “kyperskou” vodou (Obr. 21a) byly vždy obohacenější o  $^{18}\text{O}$  než rostliny zalévané vodou českobudějovickou (Obr. 21a). Hodnoty váženého průměru pro používanou vodu a mediánu pro krmné rostliny jsou uvedeny v tabulce 14.

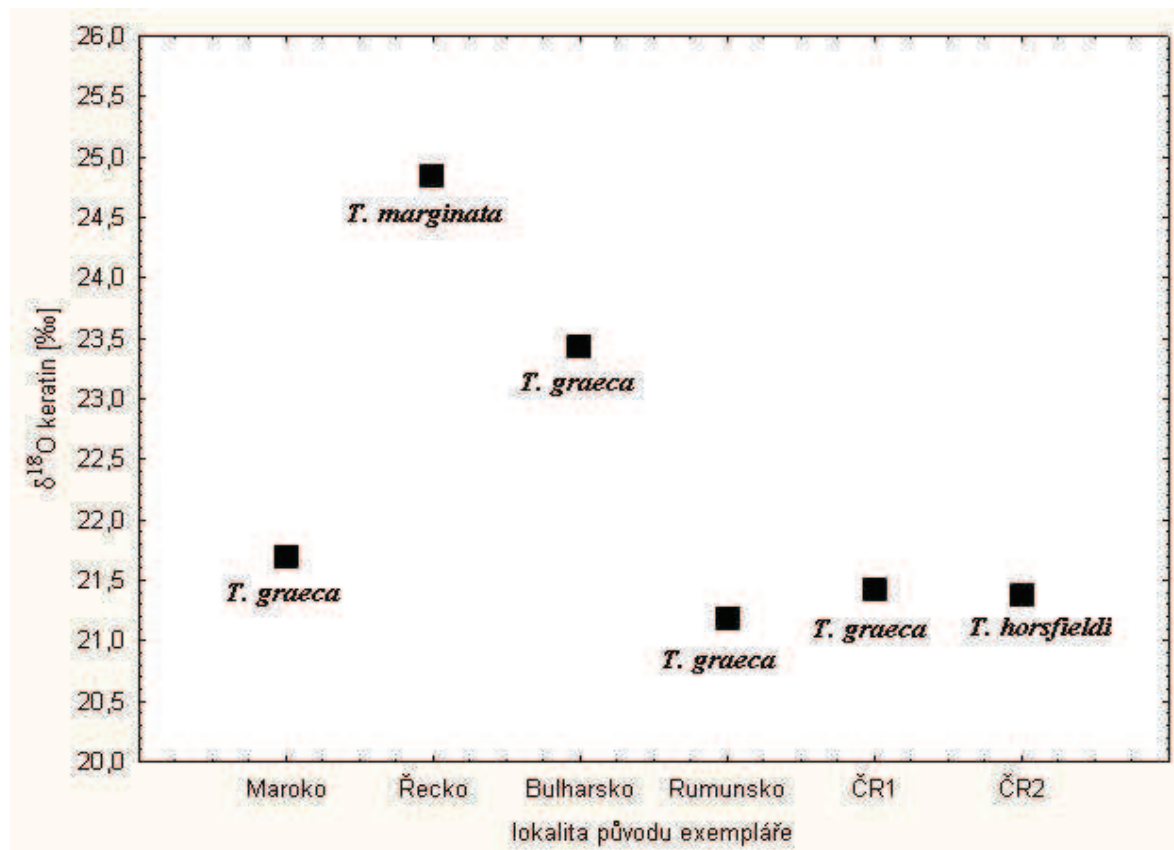


**Obrázek 21.** Hodnoty  $\delta^{18}\text{O}$  vody obsažené v jednotlivých typech krmiva podávaného želvám v průběhu experimentu skupiny: Kypr (a) a České Budějovice (b). Vodorovné linie udávají průměrné roční hodnoty  $\delta^{18}\text{O}$  srážkové vody vypočítané izotopovým kalkulátorem pro Kypr, resp. České Budějovice. Malé čtverečky ukazují medián, obdélníkové boxy 25%-75% kvartil a úsečky rozsah neodlehých hodnot.

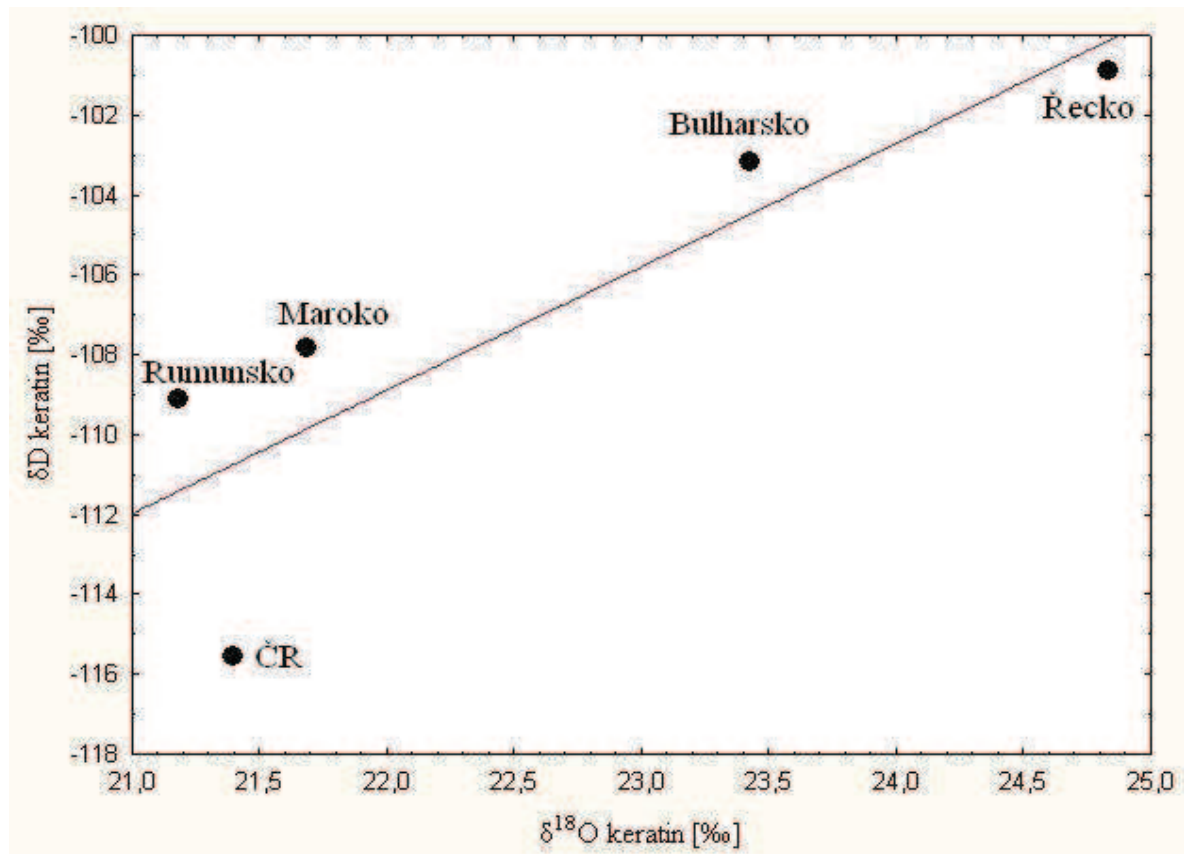
### 3. 2. 4. $\delta^{18}\text{O}$ mrtvých exemplářů s doloženým místem původu

Nejvíce obohacené o těžší izotop kyslíku se opět ukázalo zvíře původem z Řecka (24,83 ‰), nejochuzenější naopak jedinec (ČR2) pocházející z České republiky (21,37 ‰). Hodnoty  $\delta^{18}\text{O}$  keratinu všech mrtvých exemplářů jsou znázorněny na obrázku 22. Na rozdíl od  $\delta\text{D}$ , nebyl vliv lokality reprezentovaný zeměpisnou šířkou na  $\delta^{18}\text{O}$  keratinu krunýře analyzovaných želv průkazný (Spearmanova korelace:  $N=6$ ,  $R=0,638$ ,  $t(N-2)=-1,656$ ,  $p=0,173$ ).

Dalším zajímavým zjištěním je také korelace mezi  $\delta\text{D}$  a  $\delta^{18}\text{O}$  v keratinu: obohacení o D je provázeno obohacením v obsahu  $^{18}\text{O}$ . Ochuzené v obou izotopech bývají lokality původu s vyšší hodnotou zeměpisné šířky (Spearmanova korelace:  $N=5$ ,  $R=0,9$ ,  $t(N-2)=3,58$ ,  $p=0,04$ ; Obr. 23).



**Obrázek 22.**  $\delta^{18}\text{O}$  u mrtvých exemplářů suchozemských želv různých druhů želv a původu. Každý bod představuje jednoho jedince analyzovaného z jednoho odběru keratinu krunýře.



**Obrázek 23.**  $\delta^{18}\text{O}$  a  $\delta\text{D}$  keratinu krunýře mrtvých exemplářů želv různých druhů a místa původu. Řecko je představováno druhem *T. marginata*, Bulharsko, Maroko a Rumunsko druhem *T. graeca*. Bod reprezentující Českou republiku (ČR) vznikl průměrem hodnot  $\delta$  jedinců ČR1 (*T. graeca*) a ČR2 (*T. horsfieldi*).

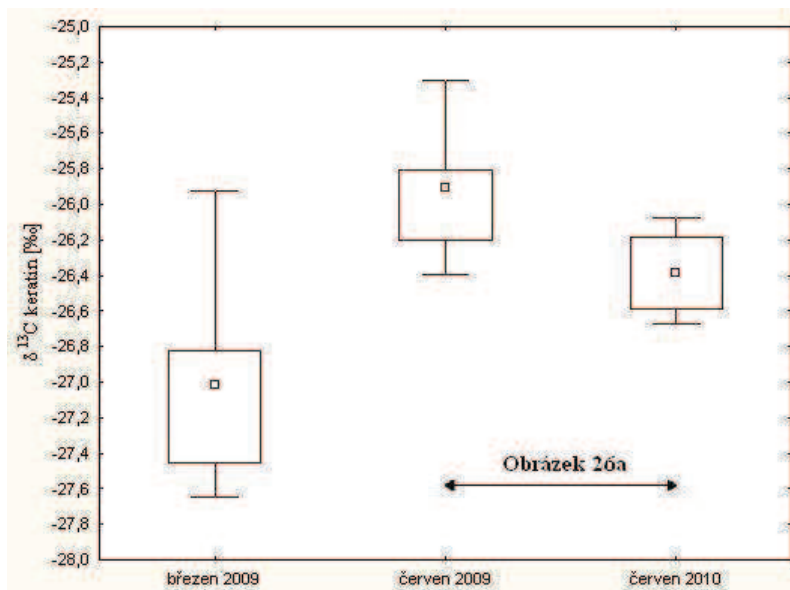
### 3. 3. UHLÍK

#### 3. 3. 1. $\delta^{13}\text{C}$ v keratinu želv, srovnání s $\delta^{13}\text{C}$ krmiva

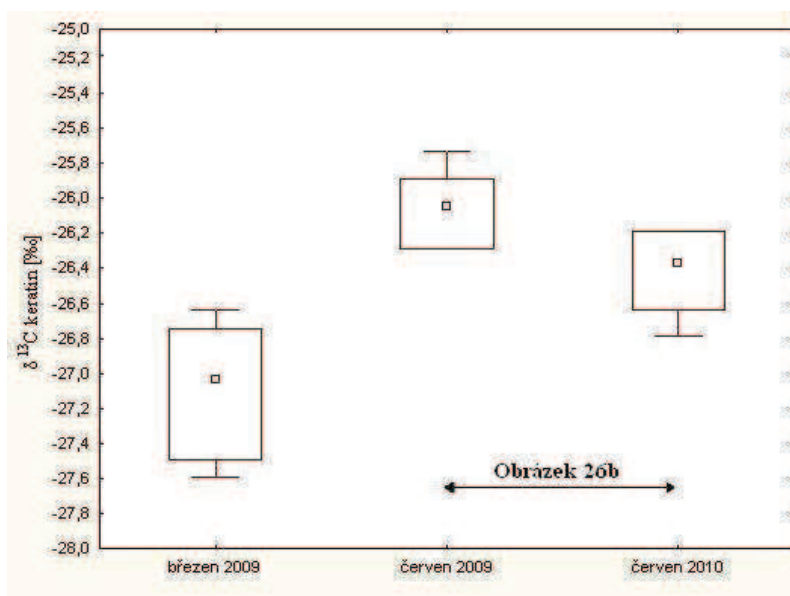
Rozmezí  $\delta^{13}\text{C}$  v keratinu krunýře želv u obou skupin se pohybovalo od -25,2 do -27,8 ‰, hodnota mediánu byla u odběru na konci pokusu stejná (-26,4 ‰) u obou skupin (Obr. 24, 25, Tab. 15). Rostliny použité ke krmení měly  $\delta^{13}\text{C}$  v rozmezí od -23,7 do -36,2 ‰ (Obr. 26). V porovnání s poměrem stabilních izotopů uhlíku u krmných rostlin, byl keratin krunýře želv u obou skupin vždy obohacenější o  $^{13}\text{C}$  (Tab. 15). Rozdíl  $\delta^{13}\text{C}$  mezi tkání zvířat (keratinem) a potravou (rostlinami) u obou skupin byl přibližně stejný: keratin byl o cca 4 – 5 ‰ obohacenější o  $^{13}\text{C}$  (Tab. 15).  $\delta^{13}\text{C}$  v keratinu krunýře želv se mezi jednotlivými odběry průkazně liší (pro ČB K-W test:  $N=24$ ,  $H=7,55$ ,  $p=0,02$ ; pro Kypr K-W test:  $N=26$ ,  $H=7,88$ ,  $p=0,02$ ). Po závěrečném testování rozdílu mezi hodnotami  $\delta^{13}\text{C}$  keratinu ve třetích (konečných) odběrech lze konstatovat, že se obě skupiny želv mezi sebou nelišily (M-W test:  $N = 12$ ,  $Z = 0,08$ ,  $p = 0,9$ ).

**Tabulka 15.** Porovnání  $\delta^{13}\text{C}$  krmiva (souhrnná hodnota všech typů krmiva za celý experiment:  $N_{\text{Kypr}} = 33$  a  $N_{\text{ČB}} = 33$ ) a keratinu krunýře želv (souhrnné hodnoty za celou skupinu pro 3. odběr:  $N_{\text{Kypr}} = 6$  a  $N_{\text{ČB}} = 6$ ) u obou skupin zvířat zahrnující také hodnotu rozdílu keratin - potrava.

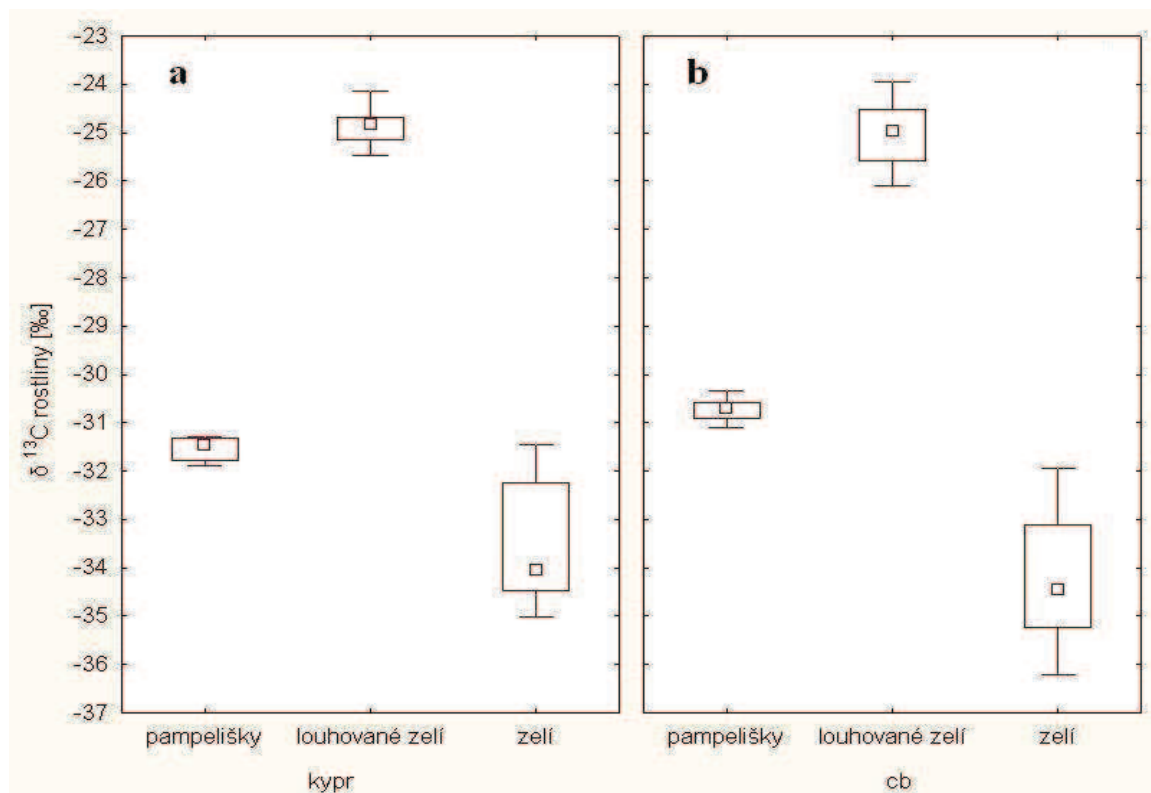
	ČB			Kypr		
	medián	d. kvartil	h. kvartil	medián	d. kvartil	h. kvartil
potrava						
$\delta^{13}\text{C}$ [‰]	-30.7	-33.2	-25.6	-31.4	-32.2	-25.2
keratin						
$\delta^{13}\text{C}$ [‰]	-26.4	-26.6	-26.2	-26.4	-26.6	-26.2
rozdíl keratin - potrava [‰]	4.3			5		



**Obrázek 24.** Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  v keratinu želv skupiny Kypr pro jednotlivé odběry v průběhu pokusu.  $\delta^{13}\text{C}$  krmiva, které se používalo mezi červnem 2009 a červnem 2010 je uvedeno v obrázku 25a. Malé čtverečky ukazují medián, obdélníkové boxy 25%-75% kvartil a úsečky rozsah neodlehých hodnot.



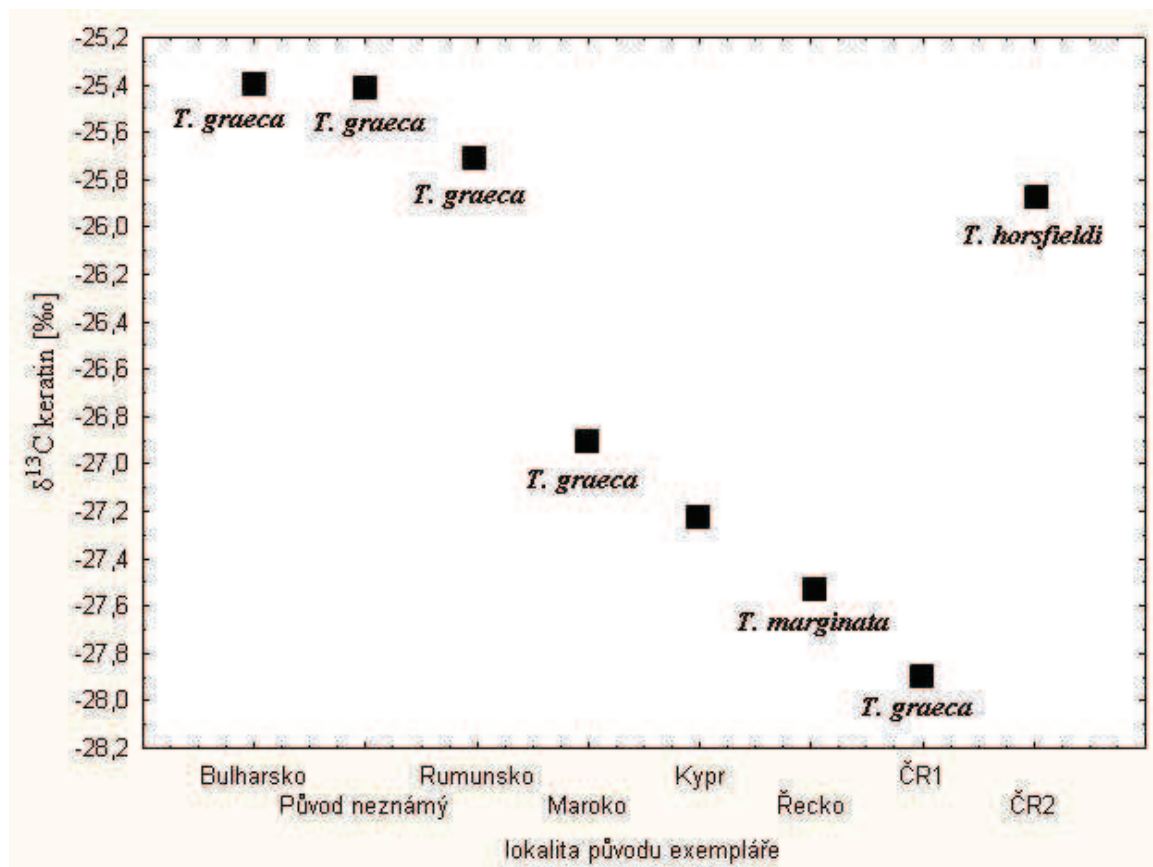
**Obrázek 25.** Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  v keratinu želv skupiny České Budějovice pro jednotlivé odběry v průběhu pokusu.  $\delta^{13}\text{C}$  krmiva, které se používalo mezi červnem 2009 a červnem 2010 je uvedeno v obrázku 25b. Malé čtverečky ukazují medián, obdélníkové boxy 25%-75% kvartil a úsečky rozsah neodlehých hodnot.



**Obrázek 26.** Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  jednotlivých typů krmiva podávaného želvám v průběhu experimentu u obou skupin: Kypr (a), České Budějovice (b). Malé čtverečky ukazují medián, obdélníkové boxy 25%-75% kvartil a úsečky rozsah neodlehých hodnot.

### 3. 3. 2. $\delta^{13}\text{C}$ mrtvých exemplářů s doloženým místem původu

Nejvíce obohacené o těžší izotop uhlíku se ukázalo zvíře původem z Bulharska (-25,4 ‰), nejochuzenější naopak jedinec (ČR1) pocházející z České republiky (-27,9 ‰). Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  keratinu všech mrtvých exemplářů jsou znázorněny v obrázku 27. Přestože z obrázku 27 jsou viditelné rozdíly mezi exempláři želv pocházejících z různých geografických lokalit, nebyla nalezená průkazná korelace mezi  $\delta^{13}\text{C}$  keratinu krunýře a zeměpisnou šířkou (Spearmanova korelace:  $N=7$ ,  $R=0,252$ ,  $t(N-2)=0,583$ ,  $p=0,585$ ). Velký izotopový rozdíl mezi oběma jedinci z České republiky je diskutován dále (Diskuze, kapitola 4. 4.).



**Obrázek 27.**  $\delta^{13}\text{C}$  mrtvých exemplářů suchozemských želv (včetně jedince s původem neznámým) ve vztahu k lokalitě původu.



## **4. DISKUZE**

### **4. 1. Vodík**

Izotopové analýzy vodíku v pitné a zálivkové vodě, vodě v krmných rostlinách a v keratinu krunýřů želv přinesly čtyři zajímavá zjištění. Dále je budu rozebírat a diskutovat v následujících odstavcích.

1. V simulačním experimentu s obohacenou „kyperskou“ vodou se nelišil obsah deuteria v keratinu želv mezi kyperskou a českobudějovickou skupinou. Ovšem při zaměření na izotopový posun u konkrétního jedince, byli jedinci skupiny Kypr ve většině případů obohaceni o těžší izotop vodíku než jedinci ze skupiny českobudějovické.
2. Ve srovnání s vodou (zálivkovou i v listech) je keratin obou skupin želv silně ochuzen o deuterium.
3. Obsah D ve vodě v potravě se významně lišil mezi pampeliškami, pekingským i lohovaným p. zelím v rámci jedné skupiny (zalévané stejnou vodou). Podobně při porovnání stejných typů potravy mezi skupinami; „Kyperské“ rostliny byly obohaceny o těžší izotop vodíku proti „českobudějovickým“ rostlinám.
4. Keratin krunýřů mrtvých exemplářů pocházejících z různých geografických lokalit se lišil. Se stoupající zeměpisnou šířkou se stával ochuzenější o těžší izotop vodíku.

Fox *et al.* (2007) ve své práci porovnával dvě různé skupiny vzorků peří patřící jednomu jedinci čírky sibiřské. Jednu skupinu tvořilo peří vzniklé na rodné lokalitě (pravděpodobně Sibiř), druhou pak peří vyrostlé na zimovišti (pravděpodobně Dánsko). Rozdíl v deutériu mezi ptačím peřím rostlým na rodné lokalitě a opeřením zimním byl 54,2 %. Uvedený rozdíl opravdu naznačuje pohyb čírky mezi dvěma zeměpisnou šířkou se lišícími oblastmi. Kelly *et al.* (2008) se pokusil pomocí  $\delta D$  potvrdit nebo vyvrátit udávaný geografický původ dvou poddruhů stehlíků. Rozdíl mezi  $\delta D$  mezi oběma poddruhy byl 25 %. Po následném porovnání hodnot  $\delta D$  s izotopovými mapami (Hobson *et al.* 2004) se udávaný původ potvrdil. Analogicky v mém experimentu jsem se pokusila izotopově upravenou stravou rozlišit dvě skupiny suchozemských želv. Na konci experimentu se však skupiny mezi sebou nelišily. Vysvětlením absence rozdílu mezi experimentálními skupinami u želv a také

výrazného ochuzení o D v keratinu proti vodě v potravě by mohly být alternativní zdroje vodíku anebo inkorporace vodíku do cílové tkáně (keratin). Zdrojem vodíku je voda v potravě ( $\delta D =$  cca -15 až +15 ‰), voda atmosférická vyměňovaná dýcháním a povrchem těla (může být silně ochuzená, u nás  $\delta D =$  kolem -100 ‰) a vodík v organických látkách z potravy, který se asi příliš nemění ve srovnání s vodou v listu. Zastoupení jednotlivých zdrojů vodíku a jejich promítnutí do celkové hodnoty  $\delta D$  tkáně je zatím předmětem studia. Doucett *et al.* 2007 připouští, že inkorporace stabilních izotopů vodíku do živočišných tkání je komplexní proces a my jsme zatím na začátku jeho porozumění. Víme málo, jestli existuje nějaká frakcionace během syntézy biomolekul z prekurzorů a tělní vody, a velice málo víme o reletivním příspěvku vodíku ve vodě v těle a z potravy do celkového množství vodíku vázaného v biomolekulách. Hobson & Wassenaar (1997) udávají téměř nulový rozdíl mezi potravou a keratinem peří ptáků a tím pádem za nejvýznamější zdroj izotopového signálu ( $\delta$ ) a samotného vodíku považují srážkovou vodu dané lokality. Podobného názoru je také Miller (1988), Estep & Dabrowski (1980) a Cormie *et al.* (1994a). Tomuto tvrzení oponují práce DeNira & Epsteina (1981) a Hobsona *et al.* (1999b). Hobson *et al.* (1999b) ve své práci na křepelkách dokazuje, že jen 26–32 % vodíku v keratinu pochází z pitné vody. Na základě výsledků analýz stabilních izotopů vodíku u experimentálních želv jsou při syntéze keratinu krunýře podle mého názoru zdroji izotopového signálu vodík v organické hmotě, kterou zvířata konzumují, a částečně asi i vzdušná vlhkost (Obr. 28B). V analogii s keratinem želv, roli v utváření izotopového signálu keratinu vlasů lidí hraje parametr, který Ehleringer *et al.* (2008) ve své práci nazývá jako „kontinentální supermarket“ a který ukazuje izotopové složení vodíku v potravě obyvatel USA. Díky existenci a obchodní politice řetězců organizací prodávajících potraviny je pak hodnota  $\delta D$  nezávislá na lokalitě nákupu a konzumace ( $\delta D =$  -115 ‰). Více zdrojů vodíku než pouze pitná voda a voda v rostlinách je pravděpodobně důvodem, proč se mezi sebou skupiny na konci experimentu nelišily. Druhým možným řešením by mohla být druhová a metabolická odlišnost. Míra, jakou zvířata inkorporují izotopový signál potravy a vody do svých tkání se liší napříč různými organismy a je také různá u různých tkání u jednotlivce (Hobson & Clark 1992a, b, Martínez del Rio *et al.* 2009). Je vysoce pravděpodobné, že při vyšším počtu jedinců bychom dosáhli statisticky významného rozdílu mezi oběma skupinami, přesto si myslím, že je důležité nahlížet na jedince v obou skupinách ne jako na „opakování“, ale jako na jednotlivá individua. Třetím a posledním vysvětlením absence rozdílu, které mě napadá při listování literaturou, zaměřenou převážně na teplokrevné vyšší obratlovce (Fox *et al.* 2007, Kelly *et al.* 2008, Cormie *et al.* 1994a, Estep

& Dabrowski 1980), je, že by mohl existovat rozdíl mezi izotopovou inkorporací u endotermních a exotermních živočichů.

Zajímavým výsledkem je také odlišnost  $\delta D$  obou typů pěstovaných krmných rostlin. Odpověď je třeba hledat ve způsobu pěstování rostlin a s ním spojenými faktory, ovlivňujícími  $\delta D$  vody v listech rostlin (Šantrůček *et al.* 2007, Bulíčková 2006, Wang & Yakir 2000). Voda v kořenech rostlin (hlavně bylin, které mají kořeny v povrchové vrstvě půdy) je izotopově blízká srážkové vodě, voda v listech je již výrazně izotopově obohacená oproti srážkové vodě (Šantrůček *et al.* 2007). Během fyzikálního procesu výparu (evaporace) a tedy i během transpirace v listech se rychleji vypařují molekuly vody obsahující lehčí izotopy,  $^1H$  a  $^{16}O$ , než molekuly vody skládající se z izotopů těžších,  $D$  a  $^{18}O$ . Proto je voda v listech obohacenější o těžší izotop kyslíku i vodíku oproti vodě srážkové. Velikost obohacení závisí na rychlosti výparu spoluurčované vlhkostí vzduchu a teplotou listu (Craig *et al.* 1963). Pampelišky byly pěstovány zhruba od května do září 2009 na venkovní terase. Z obrázku 15 je patrné, že zdrojová voda byla ochuzenější o těžší izotop vodíku v porovnání s dalším průběhem  $\delta D$  analyzované vody, což bylo pravděpodobně způsobeno sezónní variabilitou izotopového složení vodíku v nádrži Římov. Pekingské zelí bylo pěstováno ve skleníku za vyšší teploty a také bylo zaléváno vodou obohacenější o těžší izotop vodíku. V kombinaci s venkovním pěstováním a s ním spojenou nižší okolní teplotou lze tedy vysvětlit rozdíl mezi ochuzenějším  $\delta D$  pampelišek v porovnání s obohacenějším  $\delta D$  pekingského zelí, které bylo pěstováno ve skleníku. Vyšší míra obohacení o těžší izotop vodíku „kyperských“ rostlin oproti rostlinám „českobudějovickým“ je s velkou pravděpodobností způsobená obohacenější „kyperskou“ zálivkovou vodou.

Ve většině prací zabývajících se studiem stabilních izotopů vodíku ve vztahu ke geografickému původu rostlinných i živočišných produktů (Ehleringer *et al.* 2008, Chamberlain *et al.* 1997, Hobson *et al.* 1999b, Hobson & Wassenaar 1997, Gröcke *et al.* 2006, Hobson *et al.* 2004) autoři referují o méně či více silné korelaci mezi  $\delta D$  srážkové vody dané lokality a  $\delta D$  tkáně (živočišné nebo rostlinné) pocházející z této lokality. Ve své práci nemohu tuto hypotézu ověřit, protože nevím kde přesně zvíře žilo. Přesto mi přijdou výsledky analýz stabilních izotopů vodíku v keratinu krunýře mrtvých želv s doloženým původem velice zajímavé. Při pohledu na obrázek 18 je zřejmé, že obsah deutéria klesá společně se stoupající zeměpisnou šířkou. Výjimkou je jedinec pocházející z Maroka, jehož  $\delta D$  keratinu byla ochuzenější o těžší izotop vodíku než keratin jedinců z Řecka a Bulharska, které leží severněji.

## 4. 2. Kyslík

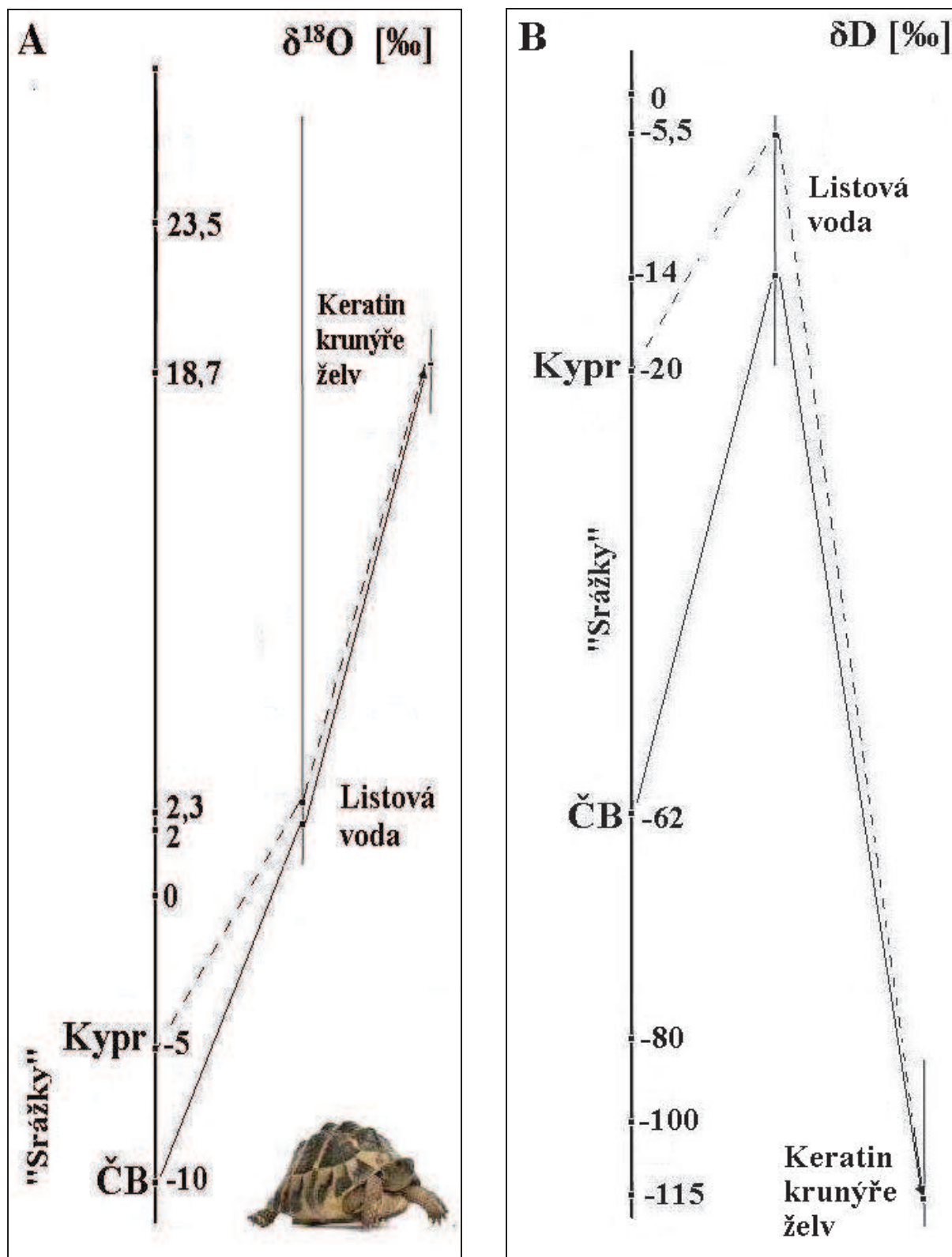
Stejně jako tomu bylo v případě vodíku, také izotopové analýzy kyslíku z vody, vodě v rostlinách a keratinu krunýřů želv přinesly několik zajímavých zjištění. Dále je budu rozebírat a diskutovat.

1. V simulačním experimentu se značenou vodou se nelišil obsah  $^{18}\text{O}$  mezi kyperskou a českobudějovickou skupinou. Pokud se ovšem zaměříme na izotopový posun u konkrétního jedince, byli jedinci skupiny Kypr v průměru obohacenější o těžší izotop vodíku než jedinci skupiny českobudějovické.
2. Ve srovnání s pitnou vodou i vodou z rostlin (krmiva) je keratin obohacen o  $^{18}\text{O}$  u obou skupin.
3. Obsah kyslíku v keratinu krunýře želv je 20,7%.
4. Keratin krunýřů mrtvých exemplářů pocházejících z různých geografických lokalit nekoreloval se zeměpisnou šířkou, vykazoval ale (statisticky nevýznamnou) tendenci podobnou jako u D.
5. Obsah  $^{18}\text{O}$  se významně lišil u obou typů pěstovaných krmných rostlin v rámci jedné skupiny. Při porovnání jednotlivých typů potravy mezi skupinami se mezi sebou lišilo pouze louhované zelí. „Kyperské“ rostliny byly obohacenější o těžší izotop kyslíku.

Na rozdíl od výsledků analýz stabilních izotopů vodíku, keratin vykazoval značné obohacení o těžší izotop kyslíku (v průměru o 25,5 ‰ v porovnání s vodou a o 16,6 ‰ v porovnání s vodou z krmných rostlin). Podobné hodnoty udávají také Longinelli (1984), který studoval izotopové složení krve a kosti u lidí a prasat. Obohacení u kosti (kyslík v  $\text{PO}_4^{3-}$ ) lidí oproti srážkové vodě udává 25,2 ‰ a u prasat 23,9 ‰. Hobson *et al.* (2004) studoval střeoevropské ptáky. Keratin v peří ptáků byl oproti místní srážkové vodě obohacen o 20,2 ‰. Dalším, kdo studoval stabilní izotopy kyslíku v živočišné tkáni, byl Wooller *et al.* (2004), který udává obohacení chitinu oproti zdrojové vodě o 24,7 ‰ u larev pakomárů. Vysvětlením obohacení o těžší izotop kyslíku by mohla být práce Bryanta & Froelicha (1995), podle kterých je poměr stabilních izotopů kyslíku závislý principiálně na velikosti těla. Ve své studii ale pravděpodobně zapomněli vzít v úvahu velice důležitý parametr, a to poměr denního obrátu vody vztažený k výdeji energie (*water economy index*, Nagy & Peterson 1988).

Přestože větší zvířata by mohla být méně schopná zadržovat vodu v porovnání s živočichy menšími (jak navrhuji ve své studii Bryant & Frohlich 1995), rozptyl u různých živočichů je extrémní (Nagy & Peterson 1988). Nejjednodušeji řečeno, někteří živočichové nemusí pít (přímorožec, 200 kg), jiní pijí jednou za několik dní (husa, 30 kg) a ostatní musí pít každý den (člověk, 70 kg). Co se týče suchozemských želv, potřeba pití je předmětem častých diskuzí. I když příklady obrovských a sloních želv převážených námořníky v podpalubí lodí, kde i několik měsíců přežívaly bez jakékoli potravy i vody, ukazují, že tato potřeba není velká, nelze souhlasit s tvrzením, že tyto želvy pít nepotřebují (Zych 2006). V ideálních podmínkách pijí terestrické želvy minimálně. Zvýšený příjem vody indikuje vždy buď nevyhovující podmínky, nebo nemoc zvířete. Jedním z nejdolnějších druhů vůbec z tohoto pohledu je želva stepní (*Testudo horsfieldi*) která přečkává až devět měsíců v hibernaci a v podmínkách polopouště se i v sezóně dostane k vodě jen ojediněle. Suchozemské želvy proto s vodou velmi dobře hospodaří. Pokud mají píci, či salát - a pampeliškové listí jim často velmi chutná - nepijí, neboť jsou vodou z krmení zcela saturovány. Za suchého a teplého počasí se zahrabávají do substrátu alespoň tak, aby měkké části těla byly co nejvíce ve vlhku pod povrchem půdy. Přebytkovou vodu zadržují v análním vaku, z nějž ji čerpají v období opravdového nedostatku. Anální vak pak vyprazdňují nejčastěji za silnějšího deště, při páření nebo na svoji obranu. V případě žízně želvy ve volné přírodě buď v dešti chytají jednotlivé kapky do otevřené tlamy, nebo vyhledávají louže, ze kterých pijí. Samostatnou kapitolou jsou mláďata, která jsou velmi citlivá na dehydrataci. Mladé želvy přijímají vodu celým povrchem těla, takže k dostatečnému přísunu tekutin jim stačí noční nebo téměř celodenní pobyt ve vlhkém substrátu. (Tichý, emailová komunikace, dostupné také online na <http://www.sci.muni.cz/botany/salicornia/piti.htm>).

Na základě fyziologických vlastností rostlin a živočichů lze tedy podle Kohna *et al.* (1996) čekat, že živočichové s menším obratem vody v těle budou mít poměr stabilních izotopů kyslíku vychýlen ve prospěch  $^{18}\text{O}$ , protože získávají více vody z izotopově obohacené potravy a méně pitím vody z izotopově ochuzeného zdroje. Dle mého názoru hlavními zdroji izotopového signálu kyslíku v keratinu krunýře želv by mohly být kyslík z listové vody, kyslík z konzumované organické hmoty a atmosférický kyslík ( $\delta^{18}\text{O} = 23,5 \text{ ‰}$ , Dole *et al.* 1954) (Obr. 28A). Významným faktorem, který přispívá ke zjištěnému obohacení keratinu o  $^{18}\text{O}$  je asi obohacení o  $^{18}\text{O}$  při výměně karbonylového kyslíku během syntézy keratinu (DeNiro & Epstein 1979).



**Obrázek 28.** Schématické znázornění předpokládaných zdrojů kyslíku (A) a vodíku (B) při syntéze keratinu společně s jejich hodnotami  $\delta^{18}\text{O}$  a  $\delta\text{D}$  pro obě skupiny experimentálních želv. Pro A:  $\delta^{18}\text{O} = 23,5$  ‰ je hodnota pro atmosférický kyslík. Pro B:  $\delta\text{D}$  pro vzdušnou vlhkost se pohybuje od -80 až do -100 ‰.



Obsah kyslíku v keratinu krunýře želv byl 20,7%. Alibardi & Toni (2006) ve své práci uvádějí, že keratin krunýře želv by měl být z velké části tvořen sekvencí aminokyselin ve složení prolin-glycin-tyrosin. Po sumarizaci chemických prvků tvořících tyto aminokyseliny lze tedy předpokládat, že keratin krunýře želv je tvořen z 52 % uhlíkem, z 30 % kyslíkem, z 11 % dusíkem a ze 7 % vodíkem. Vysvětlením by podle mého názoru mohlo být složení keratinu v krunýři želv, které je s vysokou pravděpodobností daleko složitější než pouze udávané trio aminokyselin, dále také nižší přesnost měření obsahu kyslíku v organické hmotě. V literatuře jsem nenašla žádnou další práci zabývající obsahem kyslíku v keratinu krunýře želv, nemohu tedy svůj výsledek s ničím dalším porovnat.

Z hlediska stabilně izotopových prací je důležité se zabývat nejen celkovým obsahem prvků (O, H), ale i jejich frakcemi, které se postsynteticky vyměňují s okolím. Karboxylové skupiny aminokyselin mohou vyměňovat O i H s vodou (kapalnou i plynnou) zatímco vazba C-H výměnu kyslíku neumožňuje (Preston 1992). Podobně, karboxylová skupina (C=O) dovoluje výměnu kyslíku s vodou a sulfhydrylové skupiny a amidoskupiny umožňují výměnu H (Ehleringer *et al.* 2008).

Na rozdíl od analýz stabilního izotopu vodíku se v obsahu  $^{18}\text{O}$  mezi sebou mrtvé exempláře s doloženým místem původu průkazně nelišily. Nabízí se několik vysvětlení proč má  $\delta\text{D}$  silnější rozlišovací schopnost než  $\delta^{18}\text{O}$ . Zdroj a specifické inkorporování kyslíku do živočišných tkání může být komplexnější než v případě vodíku. Je zde také poměrně více zdrojů kyslíku (kromě vody a potravy také vzduch) a na druhé straně také možností, kde živočišný organismus může kyslík vyloučit (kromě moči a potu, kde odchází i vodík ve vodě, také vydechané  $\text{CO}_2$ ). Dalším vysvětlením může být nízké rozpětí hodnot  $\delta^{18}\text{O}$  v porovnání s  $\delta\text{D}$ . Například pro Evropu je udávané rozpětí průměrných ročních hodnot  $\delta^{18}\text{O}$  ve srážkové vodě, -2 až -21,9 ‰, zatímco v případě vodíku -8 až -167 ‰ (Příloha, Obr. 29). Jinými slovy řečeno, potenciál určit geografický původ je několikrát vyšší pro  $\delta\text{D}$  než  $\delta^{18}\text{O}$  (Hobson *et al.* 2004).

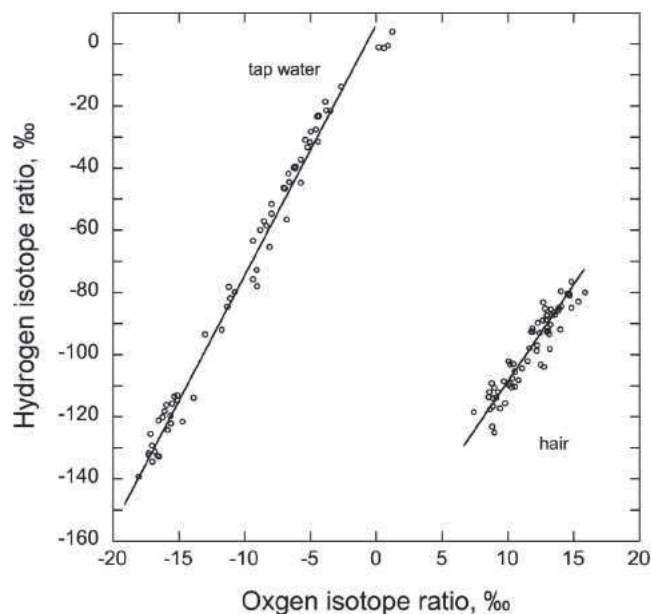
Stejně jako v případě stabilních izotopů vodíku, vysvětlením rozdílu mezi oběma typy pěstovaných krmných rostlin je způsob pěstování a faktory ovlivňující izotopové složení vody v listu (viz Diskuze, kapitola 4. 1.). V případě průkazného meziskupinového rozdílu u louhovaného zelí se podle mého názoru jedná o výsledek očekávaný, velice zvláštní však je absence průkazného rozdílu při meziskupinovém porovnání obou typů pěstovaných rostlin. Vysvětlením, které mě napadá, by mohl být opět nižší rozlišovací potenciál kyslíku v porovnání s vodíkem (viz výše).



### 4. 3. Vodík a kyslík

Podle mého názoru velice zajímavého a důležitého výsledku bylo dosaženo kombinací  $\delta D$  a  $\delta^{18}O$  keratinu mrtvých exemplářů želv s doloženým původem. Úzkou korelaci mezi oběma veličinami zjistili Ehleringer *et al.* (2008) v keratinu vlasů obyvatel různých měst napříč Spojenými státy (Obr. 30). Korelaci  $\delta D$  a  $\delta^{18}O$  využili také Fox *et al.* (2007) ve své práci, ve které se pokusil určit původ jedince čírky sibiřské (viz kap. 4. 1.). Obdobně by se dalo postupovat v případě mrtvých exemplářů želv. Z obrázku 17 i 22 je jasně patrný rozdíl mezi zvířaty pocházejícími z České republiky a želvou původem z Řecka.

Na tomto místě se nabízí možnost srovnání výsledků analýz stabilních izotopů kyslíku a vodíku pro experimentální (živá) a mrtvá zvířata s doloženou lokalitou původu. Dvě experimentální skupiny živých zvířat se mezi sebou na konci experimentu nelišily, ale, jak je vidět z obrázku 23, mrtvé exempláře už ano. Utváření izotopového signálu v keratinu krunýře želv je tedy s velkou pravděpodobností ovlivněno nejenom pitnou vodou a vodou v rostlinách, ale také dalšími faktory spojenými s konkrétní lokalitou (charakteristické atmosférické vlastnosti, vzdušná vlhkost), které nejsme schopni nasimulovat a které také rozhodují o izotopovém složení vody v listech rostlin.



**Obrázek 30.** Korelace izotopového poměru vodíku (*hydrogen isotope ratio*) a izotopového poměru kyslíku (*oxygen isotope ratio*) ve vodě z řádu (*tap water*) a keratinu z vlasů (*hair*) odebraných v 18-ti městech napříč Spojenými státy (Ehleringer *et al.* 2008).

#### 4. 4. Uhlík

Stejně jako v případě izotopů vodíku a kyslíku také izotopové analýzy uhlíku přinesly určitá pozoruhodná zjištění, která budu podrobněji diskutovat v následujících odstavcích.

1. V simulačním experimentu se značenou vodou se nelišil obsah  $^{13}\text{C}$  mezi skupinou ČB a Kypr ani v potravě (listech rostlin), ani v keratinu krunýře želv.
2. Keratin krunýřů byl obohacený o  $^{13}\text{C}$  ve srovnání s rostlinnou potravou (váženým průměrem  $^{13}\text{C}$  v listech).
3. Obsah  $^{13}\text{C}$  se významně lišil u jednotlivých druhů použité potravy (druhů rostlin).
4. Keratin krunýřů mrtvých exemplářů s různou lokalitou původu se výrazně lišil v  $\delta^{13}\text{C}$ .

V průběhu experimentu jsme používali pro obě skupiny stejné druhy rostlin ( $\text{C}_3$  rostliny), které byly pěstované ve stejných atmosférických, teplotních i vlhkostních podmínkách. Není tedy překvapením, že se skupiny mezi sebou neliší v obsahu  $^{13}\text{C}$  ani ve vypěstovaných rostlinách ani v obsahu  $^{13}\text{C}$  v keratinu krunýřů při odběru po ročním krmení želv.

Nejpravděpodobnějším vysvětlením rozdílu v  $\delta^{13}\text{C}$  mezi podávanou potravou a keratinem je izotopová frakcionace probíhající v potravním řetězci resp. při syntéze keratinu (DeNiro & Epstein 1981). Založeno převážně na studiích stabilních izotopů uhlíku u savců a ptáků, odhadované rozmezí rozdílu  $\delta^{13}\text{C}$  mezi živočichem a potravou pro kosti a deriváty kůže (vlasy, nehty, peří, šupiny) se pohybuje od 3 do 5,3 ‰ (van der Merwe & Vogel 1978, DeNiro & Epstein 1978, Mizutani *et al.* 1991, Hobson & Clark 1992a, Tieszen *et al.* 1983, Kelly 2000). Jinými slovy živočich je o 3 – 5,3 ‰ obohacnější o  $^{13}\text{C}$  proti jeho potravě. Pokud vezmu v úvahu fylogenetickou příbuznost plazů a ptáků, mnou naměřené hodnoty spadají do rozmezí udávaného v literatuře.

Izotopové složení  $\text{CO}_2$  v atmosféře je -8 ‰ (O'Leary 1988). Atmosféra je tudíž obohacená o  $^{13}\text{C}$  ve srovnání s hodnotami rostlin, které jsou vůči ní ochuzené o  $^{13}\text{C}$ . Tento jev je způsobený určitou „vybíravostí rostlin“, konkrétně karboxylačního enzymu Rubisko, který preferuje při fotosyntéze lehčí izotop uhlíku ( $^{12}\text{C}$ ). V případě respirace není diskriminace už tak velká jako u fotosyntézy, proto je hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  živočichy vyrespirovaného  $\text{CO}_2$  podobná té u rostlin (od -27 do -29 ‰). Rozdílné hodnoty u všech tří typů krmiva mohou být v malé míře způsobeny druhovou odlišností, ale nejpravděpodobnějším vysvětlením v případě zelí a pampelišek je rozdílný způsob pěstování. Pampelišky byly pěstovány venku na terase, jejich

izotopový zdroj uhlíku (volná atmosféra) je tedy obohacenější o  $^{13}\text{C}$  než respirační  $\text{CO}_2$ . Zelí bylo od semene pěstováno ve skleníku. Skleník je spojen s budovou, tudíž zde existuje vysoká pravděpodobnost ochuzení izotopového zdroje rostlin díky respiraci lidí. Proto bylo zelí ochuzené o  $^{13}\text{C}$  proti pampeliškám. V případě louhovaného zelí, zakoupeného v místním obchodním řetězci, se s vysokou pravděpodobností jednalo o dovoz z nějaké teplejší a aridnější oblasti, proto je tolik obohacené o  $^{13}\text{C}$  oproti zbývajícím typům potravy.

Mrtvé exempláře želv reprezentované čtyřmi druhy suchozemských želv jsou v přírodě spíše všežravci, jednoznačně však převažuje vegetariánská strava (Zych 2006). Hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  tkání zvířat z mořských, sladkovodních a terestrických habitatů spadají do rozmezí  $\delta^{13}\text{C}$  rostlin z míst, odkud jedinec pochází (Smith & Epstein 1970, Craig 1953). Rozsah poměrů stabilního izotopu uhlíku závisí na typu fotosyntézy, který používají místní rostliny. Protože  $\text{C}_3$  a  $\text{C}_4$  rostliny se velmi výrazně liší izotopovým složením svého uhlíku a my žijeme převážně v areálu rozšíření  $\text{C}_3$  nebo  $\text{C}_4$  rostlin, každý z nás je „pohyblivý  $\text{C}_3$  nebo  $\text{C}_4$  tvor“, izotopově téměř identický se svým fotosyntetizujícím „živitelem“. A to buď přímo (býložravci), nebo zprostředkovaně v potravním řetězci přes živočichy (masožravci). Rostliny  $\text{C}_4$ , přijímající oba stabilní izotopy uhlíku ( $^{12}\text{C}$  a  $^{13}\text{C}$ ) téměř stejnou měrou (nediskriminující těžký izotop uhlíku), rostou a někdy i dominují v subtropických oblastech. Naopak. Od 40-50° jižní a severní šířky k pólům rostou téměř výhradně  $\text{C}_3$  rostliny silně diskriminující izotop  $^{13}\text{C}$  (Šantrůček 2010).  $\text{C}_4$  rostliny proto vykazují pozitivnější hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  – průměr je -13 ‰ (jsou tedy obohacenější o  $^{13}\text{C}$ ) než rostliny  $\text{C}_3$ , u kterých je průměrná hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  -27 ‰ (Smith & Epstein 1971). Ale ani uvnitř jednotlivých skupin  $\text{C}_3$  nebo  $\text{C}_4$  rostlin není hodnota  $\delta^{13}\text{C}$  uniformní, má určitou variabilitu s normálním rozdělením četností: hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  jsou u  $\text{C}_3$  rostlin vyšší (blíže nule, a tedy biomasa je obohacená o  $^{13}\text{C}$ ), jestliže se zvyšuje teplota a „suchost“ prostředí, naopak nárůst srážek a vlhkosti stanoviště způsobují snížení hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  (van Klinken *et al.* 1994). Na základě těchto skutečností je tedy možné vysvětlit rozdílné hodnoty  $\delta^{13}\text{C}$  u mrtvých exemplářů s doloženým místem původu (Obr. 27).  $\delta^{13}\text{C}$  jedinců pocházející z oblasti Balkánu (Bulharsko, Rumunsko) byla velice podobná, přičemž jedinec pocházející z Bulharska byl stejně jako v případě vodíku a kyslíku obohacenější o těžší izotop, což je nejspíše dáno geografickou polohou Bulharska a Rumunska. Zvláštním, ne však nevysvětlitelným výsledkem, je ochuzenější  $\delta^{13}\text{C}$  jedince pocházejícího z Řecka (*T. marginata*), pokud se blíže podíváme na druh a lokalitu původu. Druh *T. marginata* je v přírodě typickým obyvatelem středomořských křovinatých trnitých polosuchých macchií, ve kterých se ukrývá. Vyskytuje se i ve vyšších nadmořských výškách do 2000m (Zych 2006). Jednou z několika lokalit výskytu tohoto druhu je i Řecko. Řecko je země s velice svérázným

reliéfem, kde 80% plochy pokrývají hory. Tato dvě fakta spojená s gradientem  $\delta^{13}\text{C}$  s nadmořskou výškou zjištěných u rostlin (např. Körner *et al.* 1991) vysvětlují nižší hodnotu  $\delta^{13}\text{C}$  u jedince pocházejícího z Řecka. Nejochuzenější o těžší izotop uhlíku byla zvířata narozená a odchovaná v České republice. Česká republika leží v oblasti mírného pásu, tudíž vegetace zde rostoucí bude mít pravděpodobně  $\delta^{13}\text{C}$  posunutý více do negativních hodnot. V případě zvířete s původem neznámým bych se na základě analýz stabilních izotopů uhlíku přiklonila k možnému původu jedince z oblasti Balkánu.  $\delta^{13}\text{C}$  exempláře pocházejícího z Maroka byla v porovnání s ostatními druhy relativně ochuzená o těžší izotop uhlíku. Tento výsledek je velice zvláštní, protože Maroko je značně aridní oblast na severozápadě Afriky, kde rostliny budou mít  $\delta^{13}\text{C}$  vychýlen ve prospěch  $^{13}\text{C}$  (Still *et al.* 2003). Samozřejmě se nabízí možnost, že zvíře údajně „původem z Maroka“ bylo odchováno v lidské péči, ale pokud bych měla usuzovat na geografický původ jedince na základě analýzy stabilních izotopů vodíku, kyslíku a uhlíku, řekla bych, že pochází z oblasti Balkánského poloostrova.

Při pohledu na obrázek 27 vyvstává otázka, jak je možné, že jedinec ČR2 pocházející z České republiky byl velmi obohacený o izotop  $^{13}\text{C}$  a naopak druhý, ČR1, vykazoval takovou míru ochuzení ve srovnání s ČR2. Vysvětlením je nahlédnutí do „historie“ druhého „obohacenějšího“ jedince z České republiky (ČR2). Tento jedinec opravdu pocházel z České republiky, ale jak uvedl chovatel, zvíře bylo v zajetí v průběhu života často přikrmováno kukuřicí ( $\text{C}_4$  rostlina).

Na těchto příkladech je vidět jak je důležité znát ekologii studovaného druhu, charakter lokalit výskytu a popřípadě také historii jedince jako takového. Pro přesnější pochopení distribuce izotopů uhlíku a tím také možnosti jeho využití při určování geografického původu je však potřeba detailnějšího výzkumu jejich rozmístění v různých biomech, abychom mohli s jistotou a přesností interpretovat výsledky analýz stabilních izotopů a říci, v jakém prostředí a kde přibližně zvířata žila. Mnoho studií se zatím bohužel jen omezuje na konstatování, že našlo průkazné rozdíly mezi různými skupinami, jejich jasná interpretace je ale mnohdy nesnadná (Pain *et al.* 2004)

#### 4. 5. Využití stabilních izotopů při určování geografického původu a další směřování výzkumů

Hobson *et al.* (2004) neváhá označit poměr stabilních izotopů vodíku jako nejužitečnější indikátor geografického původu živočichů napříč kontinenty. Kyslík doporučuje k pozdějšímu zpřesnění nebo v případě stejného poměru stabilních izotopů vodíku (např. pokud zvířata pocházejí z oblastí stejné zeměpisné šířky severní Ameriky nebo Evropy). Fox *et al.* (2007) je opatrnější. Podle jeho studie není použití analýzy stabilních izotopů dostatečně citlivé k přesnému určení místa původu jedince. Přesto však, pokud je zřejmý kontrast v izotopovém signálu peří rostlého v zimě a peří pocházejícího z rodné lokality, jedná se o dostatečný důkaz, že téměř jistě nebyl dotýčný jedinec chován v lidské péči v západní Evropě. Kelly *et al.* (2008) ve své práci uvádí, že pokud jsou oblasti původu jedince nelegálně odchyceného a jedince odchovaného v lidské péči dostatečně vzdálené zeměpisnou šířkou, je možné rozlišit, zda je jedinec nelegálně odchycen z přírody nebo legálně odchován v lidské péči. Zároveň dodává, že samotné  $\delta D$  k oddělení jedince chovaného v lidské péči a žijícího ve volné přírodě nestačí.

Podle mého názoru, analýza stabilních izotopů vody (hlavně vodíku) v kombinaci s poměrem stabilních izotopů uhlíku by mohla být využita jako část komplexu metod při rozhodování, jestli byl jedinec legálně odchován nebo nelegálně dovezen. Při rozhodování navrhuji udělat prvotní odhad lokality původu (zeměpisnou šířku) pomocí poměru stabilních izotopů vodíku, v případě stejných cílových hodnot  $\delta D$  díky zeměpisné šířce rozlišit pomocí  $\delta^{18}O$  a nakonec zpřesnit použitím poměru stabilních izotopů uhlíku. Pokud by tato metoda měla být uvedena do praxe, je třeba provést další rozsáhlejší studie a vzít v úvahu další kritéria, mimo jiné zkoumat i izotopové složení dusíku a síry v keratinu. Např. bude třeba zjistit, jak velká variabilita existuje v rámci jednoho jedince, tzn. odebrat vzorky ze všech druhů štítků krunýře. Dále bude nutné vytvořit rozsáhlejší databázi zahrnující druhy a jedince želv pocházející jak z volné přírody, tak z chovů v lidské péči spolu s lokalitami původu.

Využití stabilních izotopů více prvků vede ke zvýšení vypovídacích schopností tohoto přístupu (Chamberlain *et al.* 1997). Podobně přínosným může být doplnění analýzy stabilních izotopů stanovením výskytu stopových prvků (Parrish *et al.* 1983). Pro budoucí studie se stále ještě nabízí využití méně často studovaných izotopů (bór, stroncium, olovo), nových izotopových technik a sofistikovanějších statistických přístupů. Velmi slibná je kombinace stabilních izotopů se stopovými prvky, molekulárně genetickými přístupy a morfologií.

Poměrně opomíjeným je využití muzejních sbírek, zvláště u kriticky ohrožených nebo vyhynulých druhů (Smith *et al.* 2003). Podobně nedostatečným se jeví detailní poznání fyziologických mechanismů ovlivňující hodnoty stabilních izotopů v jednotlivých tkáních, rovněž málo toho víme o frakcionaci stabilních izotopů v rámci potravních řetězců. Důležitým úkolem bude také zpřesnit stávající izotopové mapy v oblastech, které jsou nedostatečně pokryty. Publikované studie ukazují velký potenciál stabilních izotopů pro určování geografického původu živočišných i rostlinných produktů, je třeba mít ale vždy na paměti omezení, která jsou s jejich použitím spojena.

## **5. SOUHRN**

Cílem mé práce bylo ověřit, zda je možné usuzovat na geografický původ jedinců (živočichů), konkrétně vybraných druhů želv, na základě analýzy přirozeného zastoupení stabilních izotopů vodíku, kyslíku a uhlíku. Zvolila jsem manipulativní experiment využívající izotopového značení skupiny želv prostřednictvím stravy (rostlin a pitné vody) obohacené o těžké stabilní izotopy kyslíku a vodíku v kombinaci s analýzou keratinu pocházejícího z krunýře několika mrtvých exemplářů želv s doloženým místem původu (soukromá a muzejní sbírka).

Podle mého názoru, analýza stabilních izotopů vody (hlavně vodíku) v kombinaci s poměrem stabilních izotopů uhlíku by mohla být využita jako část komplexu metod při rozhodování, jestli byl jedinec legálně odchován nebo nelegálně dovezen. Pokud by tato metoda měla být uvedena do praxe, je třeba provést další rozsáhlejší studie a vzít v úvahu další kritéria, mimo jiné zkoumat i izotopové složení dusíku a síry v keratinu. Např. bude třeba zjistit, jak velká variabilita existuje v rámci jednoho jedince, tzn. odebrat vzorky ze všech druhů štítků krunýře. Dále bude nutné vytvořit rozsáhlejší databázi zahrnující druhy a jedince želv pocházející jak z volné přírody, tak z chovů v lidské péči spolu s lokalitami původu.

Mezi důležité poznatky vyplývající z mé práce bych zařadila:

1. Při syntéze keratinu dochází ke značnému ochuzení o těžší izotop vodíku ve srovnání s přijímanou vodou. Na izotopovém signálu vodíku v krunýři želv se velkou měrou pravděpodobně podílí vodík obsažený v pevné organické potravě spolu s vodíkem ve vodě ve vzduchu (vzdušnou vlhkostí) (-80 až -100 ‰).
2. Při syntéze keratinu dochází ke značnému obohacení o těžší izotop kyslíku. Na izotopovém signálu kyslíku v keratinu krunýře želv se pravděpodobně podílí: kyslík z vody listové, kyslík z konzumované organické hmoty a vzdušný kyslík (23,5 ‰).
3. Keratin krunýřů mrtvých exemplářů s různou lokalitou původu se výrazně lišil v  $\delta^{13}\text{C}$ .
4.  $\delta\text{D}$  a  $\delta^{18}\text{O}$  keratinu krunýřů mrtvých exemplářů spolu průkazně korelovaly.



## **6. LITERATURA**

**Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** 2005. Základy buněčné biologie (Úvod do molekulární biologie buňky). *Espero Publishing*, 2. vydání, Ústí nad Labem.

**Alexander, N. J.** 1970. Comparison of  $\alpha$  and  $\beta$  keratin in reptiles. *Z. Zellforsch*, 110: 153 – 165.

**Alibardi, L.** 2005. Proliferation in the epidermis of chelonians and growth of the horny scutes. *Journal Of Morphology*, 265: 52 – 69.

**Alibardi, L., Sawyer, R. H.** 2002. Immunocytochemical analysis of beta ( $\beta$ ) keratins in the epidermis of chelonians, lepidosaurians, and archosaurians. *Journal Of Experimental Zoology*, 293: 27 – 38.

**Alibardi, L., Toni, M.** 2006. Cytochemical, biochemical and molecular aspects of the process of keratinization in the epidermis of reptilian scales. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 40: 73 – 134.

**Alisauskas, R. T., Hobson, K. A.** 1993. Determination of Lesser Snow Goose diets and winter distribution using stable isotope analysis. *Journal of Wildlife Management*, 57: 49 – 54.

**Ayliffe, L. K., Chivas, A. R.** 1990. Oxygen isotope composition of the bone phosphate of Australian kangaroos: Potential as a palaeoenvironmental recorder. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 574(9): 2603 - 2609.

**Baden, H. P., Maderson, P. F. A.** 1970. Morphological and biophysical identification of fibrous proteins in the amniote epidermis. *Journal of Experimental Zoology*, 174(2): 225 – 232.

**Benson, S., Lennard, CH., Maynard, P., Roux, C.** 2006. Forensic applications of isotope ratio mass spektrometry – A review. *Forensic Science International*, 157: 1 – 22.

**Bouchal, J.** 2002a. CITES chrání ohrožené druhy před ilegálním obchodem. *Pašovaná radost* [online]. Vydáno u příležitosti Výstavy Pašovaná radost pod záštitou Petra Pitharta.

**Bouchal, J.** 2002b. Česká republika – pašerácká velmoc? *Pašovaná radost* [online]. Vydáno u příležitosti Výstavy Pašovaná radost pod záštitou Petra Pitharta.

- Bouchal, J.** 2002c. CITES v České republice. *Pašovaná radost* [online]. Vydáno u příležitosti Výstavy Pašovaná radost pod záštitou Petra Pitharta.
- Bowen G. J., Wassenaar L. I., Hobson, K. A.** 2005: Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. *Oecologia*, 143: 337 – 348.
- Brand, W. A.** 1996. High precision isotope ratio monitoring techniques in mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 31: 315 – 318.
- Bryant, J. D., Froelich, P. N.** 1995. A model of oxygen isotope fractionation in body water of large mammals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59: 4523 - 4537.
- Bulíčková, L.** 2006. Heterogenita izotopového složení vody v listech rostlin. Bakalářská diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Candi, E., Schmidt, R., Melino, G.** 2005. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6: 328 - 340.
- Castanet, J.** 1985. Skeletochronology in reptiles. I. Experimental data about the signification of skeletal growth marks among lizards and turtles. *Annales des Sciences Naturelles, Zoologie (Paris)*, 7(1): 23 – 40.
- Cormie, A. B., Schwarcz, H. P., Gray, J.** 1994a. Relation between hydrogen isotopic ratios of bone collagen and rain. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58 (1): 377 – 391.
- Cormie, A. B., Schwarcz, H. P., Gray, J.** 1994b. Determination of the hydrogen isotopic composition of bone collagen and correction for hydrogen exchange. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58 (1): 365 – 375.
- Coulombe, P. A., Bernot K. M.** 2004. Keratins and the skin. In: Lennarz, W. J., Lane, D. M. Encyclopedia of biological chemistry, four-volume set. *Elsevier*, Amsterdam, 497 – 504.
- Coulombe, P. A., Omary, M. B.** 2002. ‘Hard’ and ‘soft’ principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current Opinion in Cell Biology*, 14: 110 – 122.
- Craig, H.** 1953. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 3: 53 – 92.
- Craig, H.** 1961. Isotopic variations in meteoric waters. *Science*, 133: 1702 – 1703.

- Craig, H. Gordon, L. I., Horibe, Y.** 1963. Isotopic exchange effects in the evaporation of water I. – Low temperature experimental results. *Journal Of Geophysical Research*, 68: 5079.
- D'Angela, D., Longinelli, A.** 1991. Oxygen isotopes in living mammal's bone phosphate: further results. *Chemical Geology*, 86: 75 - 82.
- DeNiro, M. J., Epstein, S.** 1978. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42: 495 – 506.
- DeNiro, M. J., Epstein, S.** 1979. Relationship between oxygen isotope ratios of terrestrial plant cellulose, carbon dioxide and water. *Science*, 204 (4388): 51 – 53.
- DeNiro, M. J., Epstein, S.** 1981. Hydrogen isotope ratios of mouse tissues are influenced by a variety of factors other than diet. *Science*, 214: 1374 - 1376.
- Dole, M., Lange, G. A., Rudd, D. P., Zaukelies, D. A.** 1954. Isotopic composition of atmospheric oxygen and nitrogen. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 6: 65 - 78.
- Doucett, R. R., Marks, J. C., Blinn, D. W., Caron, M., Hungate, B. A.** 2007. Measuring terrestrial subsidies to aquatic food webs using stable isotopes of hydrogen. *Ecology*, 88(6): 1587-92.
- Ehleringer, J. R., Bowen, G. J., Chesson, L. A., West, A. G., Podlesak, D., Cerling, T. E.** 2008. Hydrogen and oxygen isotopes in human hair are related to geography. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 2788 - 2793.
- Estep, M., Dabrowski, H.** 1980. Tracing food webs with stable hydrogen isotopes. *Science*, 209: 1537 - 1538.
- Epstein, S., Thompson, P., Yapp, C. J.** 1977. Oxygen and hydrogen isotopic ratios in plant cellulose. *Science*, 198: 1209 - 1215.
- Farquhar G. D., Hubick K. T., Condon A. G., Richards R. A.** 1989. Carbon isotope fractionation and plant water-use efficiency. In: Rundel P. W., Ehleringer J. R., Nagy K. A. (editors): Stable isotopes in ecological research. *Springer-Verlag*, New York, 21– 40.
- Fox, T. A. D., Christensen, T. K., Bearhop, S., Newton, J.** 2007. Using stable isotope analysis of multiple feather tracts to identify moulting provenance of vagrant birds: a case study of Baikal Teal *Anas formosa* in Denmark. *Ibis*, 149(3): 622 – 625.
- Fraser, R. D. B., MacRae T. P., Rogers, G. E.** 1972. Keratins: Their composition, structure and biosynthesis. *Charles C. Thomas*, Springfield.

- Fry, B.** 2006. Stable isotope ecology. *Springer Science*, New York.
- Fukuyama, K., Inoue, N., Suzuki, H., Epstein, W. L.** 1976. Keratinization. *International Journal Of Dermatology*, 15 (7): 473 – 489.
- Gannes, L. Z., O'Brian, D. M., Martínez del Rio, C.** 1997. Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology*, 78: 1271 – 1276.
- Gat, J. R.** 1996. Oxygen and hydrogen isotopes in the hydrologic cycle. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 24: 225–262.
- Griffiths, H.** 1998. Stable isotopes: integration of biological, ecological and geochemical processes. *Bios Scientific*, Herndon.
- Gröcke, D. R., Schimmelmann, A., Elias, S., Miller, R. F.** 2006. Stable hydrogen-isotope ratios in beetle chitin: preliminary European data and re-interpretation of North American data. *Quaternary Science Reviews*, 25: 1850 – 1864.
- Heaton, T. H. E.** 1999. Spatial, species, and temporal variations in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  of  $\text{C}_3$  plants: implications for paleodiet studies. *Journal of Archaeological Science*, 26(6): 637 - 650.
- Hobson, K. A.** 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: a review. *Oecologia*, 120: 314 – 326.
- Hobson, K. A., Wassenaar, L. I.** 1997. Linking breeding and wintering grounds of Neotropical migrant songbirds using stable hydrogen isotopic analysis of feathers. *Oecologia*, 109: 142 – 148.
- Hobson, K. A., Wassenaar, L. I.** 1999a. Stable isotopes ecology: an introduction. *Oecologia*, 120: 312 – 313.
- Hobson, K. A., Atwell, L., Wassenaar, L. I.** 1999b. Influence of drinking water and diet on the stable-hydrogen isotope ratios of animal tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96(14): 8003 - 8006.
- Hobson, K. A., Wassenaar, L. I., Taylor, O. R.** 1999c. Stable isotopes ( $\delta\text{D}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ ) are geographic indicators of natal origins of monarch butterflies in eastern North America. *Oecologia*, 120: 397 – 404.

- Hobson, K. A., Bowen, G., Wassenaar, L. I., Ferrand, Y., Lormee, H.** 2004: Using stable hydrogen and oxygen isotope measurements of feathers to infer geographical origins of migrating European birds. *Oecologia*, 141: 477 – 488.
- Hobson, K. A., Clark, R. G.** 1992a. Assessing avian diets using stable isotopes I: Turnover of  $^{13}\text{C}$  in tissues. *Condor*, 94(1): 181 – 188.
- Hobson, K. A., Clark, R. G.** 1992b. Assessing avian diets using stable isotopes II: Factors influencing diet – tissue fractionation. *Condor*, 94(1): 189 – 197.
- Hobson, K. A., Clark, R. G.** 1993. Turnover of  $^{13}\text{C}$  in cellular and plasma fractions of blood: implications for nondestructive sampling in avian dietary studies. *The Auk*, 110(3): 638 – 641.
- Hobson, K. A.** 2007. In isotopic exploration of the potential of avian tissues to track ganges in terrestrial and marine ecosystems. In: Dawson, T. E., Siegwolf, R. (editors). Stable isotopes as indicators of ecological change. *Elsevier Academic Press*, San Diego, USA, 129 – 144.
- Hobson, G. J., Wassenaar, L. I.** 2005. Global application of stable hydrogen and oxygen isotopes to wildlife forensics. *Oecologia*, 143: 337 – 348.
- Hoefs, J.** 1997. Stable Isotope Geochemistry, 4. vydání. *Springer-Verlag*, Berlin, 1997.
- Chamberlain, C. P., Blum, J. D., Holmes, R. T., Fenf, X., Sherry, T. W., Graves, G. R.** 1997. The use of isotope tracers for identifying populations of migratory birds. *Oecologia*, 109: 132 – 141.
- IAEA**, 2001. GNIP Maps and animations. *International Atomic Energy Agency*, Vienna, <http://isohis.iaea.org>.
- Kalač, P.** 1996. Organická chemie (Základní část). Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
- Kelly, J. F.** 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian Journal of Zoology*, 78: 1 – 27.
- Kelly, S., Heaton, K., Hoogewerff, J.** 2005. Tracing the geographical origin of food: The application of multi-element and multi-isotope analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 16(12): 555 – 567.
- Killingley, J. S.** 1980. Migrations of California gray whales tracked by oxygen-18 variations in their epizoic barnacles. *Science*, 207: 759 – 760.

- Kohn, M. J.** 1996. Predicting animal  $\delta^{18}\text{O}$ : Accounting for diet and physiological adaptation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(23): 4811 – 4829.
- Kohn, M. J., Schoeninger, M. J., Valley, J. W.** 1996. Herbivore tooth oxygen isotope compositions: Effects of diet and physiology. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 60(20): 3889-3896.
- Körner, Ch., Farquhar, G. D., Wong, S. C.** 1991. Carbon isotope discrimination by plants follows latitudinal and altitudinal trends. *Oecologia*, 88(1): 30 - 40.
- Kovačiková, L., Brůžek, J.** 2008. Stabilní izotopy a bioarcheologie – výživa a sledování migrací v populacích minulosti. *Živa*, 56(1): 42 – 45.
- Kreuzer - Martin, H. W., Lott, M. J., Dorigan, J., Ehleringer, J. R.** 2003. Microbe forensics: Oxygen and hydrogen stable isotope ratios in *Bacillus subtilis* cells and spores. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(3), 815 – 819.
- Kreuzer - Martin, H. W., Chesson, L. A., Lott, M. J., Dorigan, J., Ehleringer, J. R.** 2004. Stable isotope ratios as a tool in microbial forensics Part 1. Microbial isotopic composition as a function of growth medium. *Journal of Forensic Sciences*, 49(5): 954 - 960.
- Kubásek, J.** 2002. Diskriminace uhlíku  $^{13}\text{C}$  při fotosyntéze vyšších rostlin. Bakalářská diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Kubásek, J.** 2004.  $\text{C}_4$  rostliny a stabilní izotopy uhlíku. Magisterská diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Lajtha, K., Michener, R. H.** (editors) 1994. Stable isotopes in ecology and environmental science. *Blackwell Scientific*, London.
- Lajtha, K., Marshall, J. D.** 1994. Sources of variation in the stable isotopic composition of plants. In: Lajtha, K., Michener, R. H. (editors) 1994. Stable isotopes in ecology and environmental science. *Blackwell Scientific*, London.
- Lippens, S., Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., Declercq, W.** 2005. Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death and Differentiation*, 12: 1497 – 1508.
- Longinelli, A.** 1984. Oxygen isotopes in mammal bone phosphate: a new tool for paleohydrological and paleoclimatological research? *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48: 389 – 390.

- Lye, K.** 2002. Svět do kapsy. *Ottovo nakladatelství*, Praha.
- Marra P. P., Hobson K. A. & Holmes R. T.** 1998: Linking winter and summer events in a migratory bird by using stable-carbon isotopes. *Science*, 282: 1884 – 1886.
- Martínez del Rio, C., Wolf, N., Carleton, S. A., Gannes, L. Z.** 2009. Isotopic ecology ten years after a call for more laboratory experiments. *Biological Reviews*, 84: 91 – 111.
- McKechnie, A. E.** 2004. Stable isotopes: powerful new tools for animal ecologists. *South African Journal of Science*, 100: 131 – 134.
- Mercer, E. H.** 1961. Keratin and keratinization. An essay in molecular biology. *Pergamon Press*, Oxford.
- Miller, R. F., Fritz, P., Morgan, A. V.** 1988. Climatic applications of D/H ratios in beetle chitin. *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology*, 66: 277 – 288.
- Mizutani, H., Fukuda, M., Wada, E.** 1990. Carbon isotope ratio of feathers revers feeding behavior of Cormorants. *The Auk*, 107: 400 – 437.
- Morganová, N.** 1997. Velká encyklopedie chemie. *Svojtka a Vašut*, Praha.
- Muller, P.** 1994. Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry*, 66(5): 1077 – 1184.
- Nagy, K. A., Peterson, C. C.** 1988. Scaling of water flux rate in animals. *University of California Publications in Zoology*, 120: 1 – 172.
- Norris, D. R., Marra, P. P., Kyser, T. K., Sherry, T. W., Ratcliff, L. M.** 2004. Tropical winterhabitat limits reproductive success on the temperate breeding grounds in a migratory bird. *Proceedings of the Royal Society. Series B* (271): 59 - 64.
- Ogden, R., Dawney, N., McEwing, R.** 2004. Wildlife DNA forensics – bringing the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endangered Species Research*, 9: 179 – 195.
- O’Leary, M.** 1988. Carbon isotopes in photosynthesis. *Bioscience*, 38: 328 – 336.
- Pritchard, Dr. P. C. H.** 1979. Encyclopedia of turtles. Neptune, New Jersey: *T. F. H. Publications Inc, Ltd.*



- Pain, D. J., Green, R. E., Giessing, B., Kozulin, A., Poluda, A., Ottoson, U., Flade, M., Hilton, G. M.** 2004. Using stable isotopes to investigate migratory connectivity of the globally threatened Aquatic Warbler *Acrocephalus paludicola*. *Oecologia*, 138: 168 – 174.
- Parrish, J. R., Rogers, D. T., Ward, F. P.** 1983. Identification of natal locales of Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*) by trace-element analysis of feathers. *The Auk*, 100: 560 – 567.
- Preston, T.** 1992. The measurement of the stable isotope natural abundance variations. *Plant, Cell & Environment*, 15: 1091 – 1097.
- Procházka, P.** 2006. Analýza stabilních izotopů – alternativní metoda studia migrace ptáků. *Sylvia*, 42: 3 – 21.
- Reeve, R.** (2002). Policing International Trade in Endangered Species. The CITES Treaty and Compliance. *The Royal Institute of International Affairs and Earthscan Publications Ltd.* London, UK, 10 – 12.
- Richards, M. P., Pettitt, P. B., Trinkaus, E., Smith, F. H., Paunovic, M., Karavanic, I.** 2000. Neanderthal diet at Vindija and Neanderthal predation: The evidence from stable isotopes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 7663 – 7666.
- Rubenstein, D. R., Hobson, K. A.** 2004. From birds to butterflies: animal movement patterns and stable isotopes. *Trends in Ecology and Evolution*, 19 (5), 256 – 263.
- Řehoř, J. a kol.** 1973. Organická chemie, 2. upravené a doplněné vydání. *Státní zemědělské nakladatelství*, Praha.
- Sawyer, R. H., Glenn, T., French, J. O., Mays, B., Shames, R. B., Barnes, G. L., Rhodes, W., Ishikawa, Y.** 2000. The expression of beta ( $\beta$ ) keratins in the epidermal appendages of reptiles and birds. *American Zoologist*, 40: 530 – 539.
- Sharp, Z. D., Atudorei, V., Panarello, H. O., Fernández, J., Douthitt, Ch.** 2003. Hydrogen isotope systematics of hair: archeological and forensic applications. *Journal of Archeological Science*, 30(12): 1709 – 1716.
- Schimmelmann, A., Miller, R. F., Leavitt, S. W.** 1993. Hydrogen isotopic Exchange and stable isotope ratios in cellulose, wood, chitin and amino compounds. In: Swart, P. K., Lohmann, K. C., McKenzie, J. A., Savin, S. (editors). Climate change in continental isotopic records. Geophysical Monograph 78, *American Geophysical Union*, Washington, DC, 367–374.

- Smith, B. N., Epstein, S.** 1970. Biogeochemistry of the stable isotopes of hydrogen and carbon in salt marsh biota. *Plant Physiology*, 46: 738 - 742.
- Smith, B. N., Epstein, S.** 1971. Two categories of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios for higher plants. *Plant Physiology*, 47: 380 – 384.
- Smith, T. B., Marra, P. P., Webster, M. S., Lovette, I., Gibbs, H. L., Holmes, R. T., Hobson, K. A., Rohwer, S.** 2003. A call for feather sampling. *The Auk*, 120: 218 – 221.
- Spearman, R. I. C.** 1966. The keratinization of epidermal scales, feathers and hairs. *Biological Reviews*, 41(1): 59 – 95.
- StatSoft, Inc.** (1984 – 2009). STATISTICA (data analysis software sytem), version 9. www.statsoft.com.
- Stejskal, V.** 2006. Úvod do právní úpravy ochrany přírody a péče biologickou rozmanitost. *Linde*, Praha.
- Sternberg, L., DeNiro, M. J., Johnson, H. B.** 1984. Isotope ratios of cellulose from plants having different photosynthetic pathways. *Plant Physiology*, 74: 557 - 561.
- Still, C. J., Berry, J. A., Collatz, G. J., DeFries, R. S.** 2003. Global distribution of C3 and C4 vegetation: carbon cycle implications. *Global Biochemical Cycle*, 17: 1006 – 1029.
- Stubbs, D., Swingland, I. R.** 1985. The ecology of a Mediterranean tortoise (*Testudo hermanni*): a declining population. *Canadian Journal of Zoology*, 63: 169 – 180.
- Szalay, F., Szalayová, H.** 1990. Želvy (edice chov). *Státní zemědělské nakladatelství*, Praha.
- Szép, T., Möller, A. P., Vallner, J., Kovács, B., Norman, D.** 2003. Use of trace elements in feathers of Sand Martin *Riparia riparia* for identifying moulting areas. *Journal of Avian Biology*, 34: 307 – 320.
- Šantrůček J., Květoň J., Šetlík J., Bulíčková L.** (2007): Spatial Variation of Deuterium Enrichment in Bulk Water of Snowgum Leaves. *Plant Physiology*, 143: 88 - 97.
- Šantrůček, J.** 2010. Atmosféra – list – fotosyntéza – člověk. Jak měníme fotosyntézu listu a jak ona mění nás II. *Živa*, 2: 52 – 54.
- Tieszen, L. L., Boutton, T. W., Tesdahl, K. G., Slade, N. A.** 1983. Fractionation and turnover of stable carbon isotopes in animal tissues: implications for  $\delta^{13}\text{C}$  analysis of diet. *Oecologia*, 57: 32 – 37.

- Tykot, R. H.** 2004. Stable isotopes and diet: You are what you eat. In: Martini, M., Milazzo, M, Piacentini, M. (editors). Physics methods in archaeometry. Proceedings of the International School of Physics, “Enrico Fermi” Course CLIV. *IOS Press*, Amsterdam, 433 - 444.
- van Dijk, P. P., Corti, C., Mellado, V. P., Cheylan, M.** 2004a. *Testudo hermanni*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species.
- van Dijk, P. P., Lymberakis, P., Böhme, W.** 2004b. *Testudo marginata*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species.
- van Klinken, G. J., van der Plicht, H., Hedges, R. E. M.** 1994. Bond  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios reflect paleo – climatic variations. *Geophysical Research Letters*. 21(6): 445 – 448.
- van der Merwe, N. J., Vogel, J. C.** 1978.  $^{13}\text{C}$  content of human collagen of prehistoric diet in Woodland North America. *Nature*, 276: 815 – 816.
- van der Merwe, N. J., LeeThrop, J. A., Thackeray, J. F., Hall-Martin, A., Kruger, F. J., Coetzee, H., Bell, R. H. V., Lindeque, M.** 1990. Source-area determination of elephant ivory by isotopic analysis. *Nature*, 346: 744 – 746.
- Wang, X. F., Yakir, D.** 2000. Using stable isotopes of water in evapotranspiration studies. *Hydrological Processes*, 14: 1407 – 1421.
- Warchol, G. L.** 2004. The transnational illegal wildlife trade. *Criminal Justice Studies*, 17 (1): 57 – 73.
- Wassenaar, L. I., Hobson, K. A.** 1998. Natal origins of migratory Monarch butterflies at wintering colonies in Mexico: New isotopic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 15436 - 15439.
- Wooler, M. J., Francis, D., Fogel, M. L., Miller, G. H., Walker, I. R., Wolfe, A. P.** 2004. Quantitative paleotemperature estimates from  $\delta^{18}\text{O}$  of chironomid head capsules preserved in arctic lake sediments. *Journal of Paleolimnology*, 31: 267 – 274.
- Wunder, M. B., Kester, C. L., Knopf, F. L., Rye, R. O.** 2005. A test of geographic assignment using isotope tracers in feathers of known origin. *Oecologia*, 144: 607 – 617.
- Wyld, J. A., Brush, A. H.** 1979. The molecular heterogeneity and diversity of reptilian keratins. *Journal Of Molecular Evolution*, 12: 331 – 347.
- Wyneken, J., Godfrey, M., Bels, V.** (editors) 2008. The biology of turtles. *CRC Press*, USA.

**Yapp, C. J., Epstein, S.** 1982. A re-examination of cellulose carbon-bound hydrogen delta D measurements and some factors affecting plant-water D/H relationships. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 46: 955 - 965.

**Yurtsever, Y., Gat, J. A.** 1981: Atmospheric waters. In: Gat, J. R. et Gonfiantini, R. (editors.). Stable Isotope Hydrology - Deuterium and oxygen-18 in the water cycle. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, *Technical Report Series*, 103 – 142.

**Zubay, G. L., Parson, W. W., Vance, D. E.** 1995. Principles of biochemistry. *Wm. C. Brown Communications, Inc.*, USA.

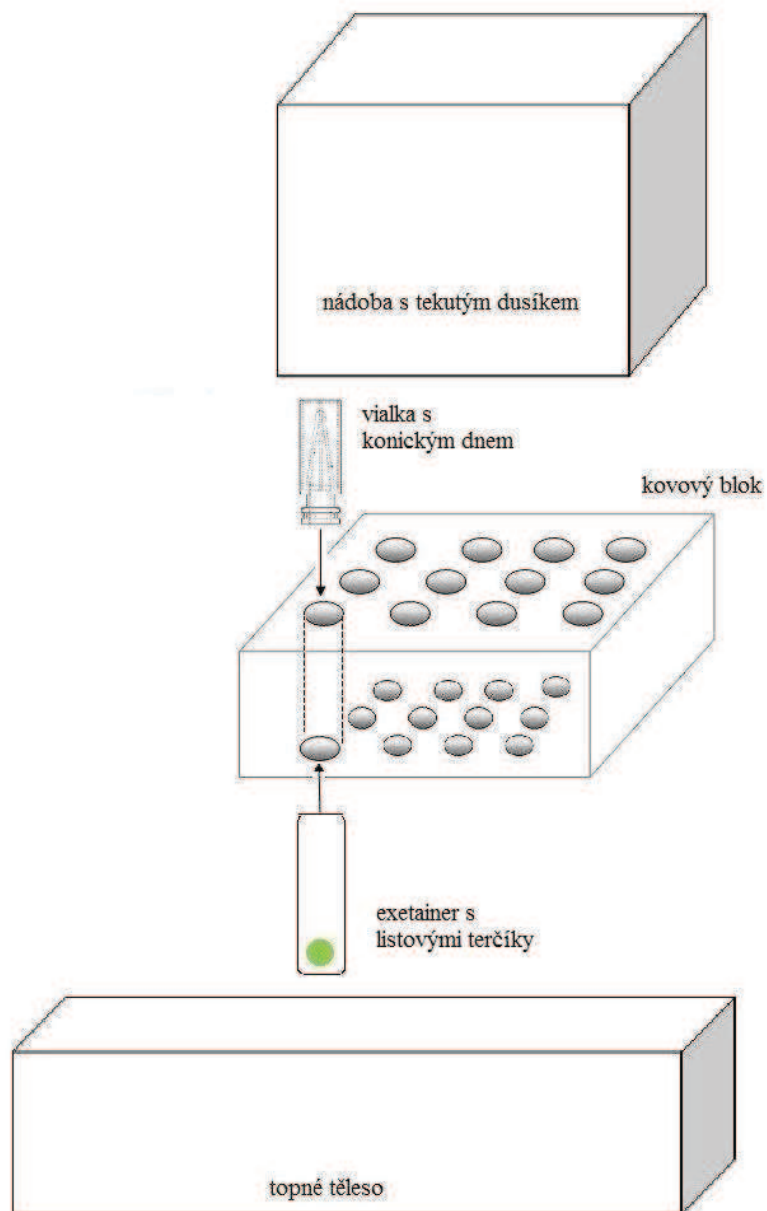
**Zwettler, Otto** 2002. Lexikon zemí 2003. *Fortuna Print*, Praha.

**Zych, J.** 2006. Želvy v přírodě a v péči člověka. *Nakladatelství Brázda, s. r. o.*, Praha.

## 7. PŘÍLOHA

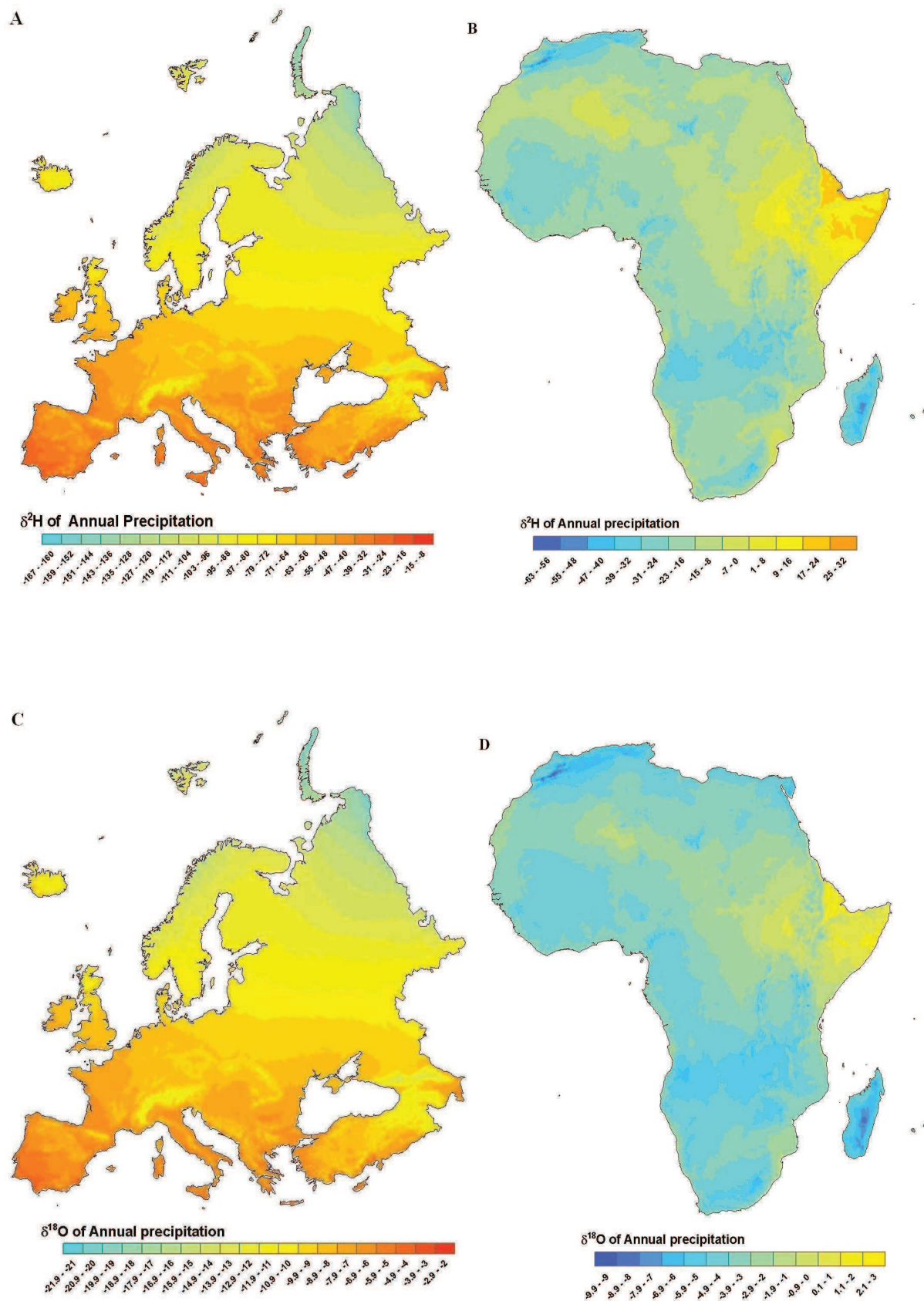
**Tabulka 2.** Procesy ovlivňující poměry vybraných stabilních izotopů a jejich distribuce v přírodě. Upraveno podle Procházky (2006) a Rubenstein & Hobson (2004).

stabilní izotop	procesy ovlivňující poměry stabilních izotopů		distribuce stabilních izotopů v přírodě		
	biologické a/nebo biogeochemické	antropogenní	suchozemské	mořské	
$\delta^{13}\text{C}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>liši se v pletivech rostlin podle:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- izotopové frakcionace při fotosyntéze C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> a CAM rostlin</li> <li>- okolních podmínek limitujících enzymatické reakce při fotosyntéze nebo ovlivňujících otevření průduchů</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zemědělské plodiny (např. C<sub>4</sub>) v přírodních ekosystémech (např. C<sub>3</sub>)</li> <li>- bodové znečištění atmosféry nebo vody</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- klesá se vzrůstající zeměpisnou šířkou</li> <li>- vzrůstá se zvyšující se nadmořskou výškou</li> <li>- vlhké biotopy více <b>ochuzeny</b> ve srovnání se suchými (v systémech založených na C<sub>3</sub> rostlinách)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- klesá se vzrůstající zeměpisnou šířkou</li> <li>- severní oceány více obohaceny ve srovnání s jižními oceány</li> <li>- bentické biotopy více obohaceny ve srovnání s pelagickými</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>mořské prostředí více obohaceno ve srovnání se suchozemskými</li> </ul>
$\delta\text{D}$ a $\delta^{18}\text{O}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>odlišné poměry ve srážkové vodě v závislosti na:               <ul style="list-style-type: none"> <li>- rozložení srážek</li> <li>- teplotě</li> <li>- nadmořské výšce</li> <li>- relativní vlhkosti</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zavlažování spodní vodou</li> <li>- budování přehradních nádrží ovlivňujících místní klima</li> <li>- antropogenní změna klimatu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- klesá se vzrůstající nadmořskou výškou</li> <li>- klesá se rostoucí zeměpisnou šířkou</li> <li>- nejvyšší v létě a nejnižší v zimě nad 30° s.š.</li> <li>- směrem od pobřeží se snižuje</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- žádné gradienty</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>mořské prostředí více obohaceno ve srovnání se suchozemskými</li> </ul>



**Obrázek 12.** Schéma kryodestilační aparatury. Detaily konstrukce zařízení jsou popsány v Šantrůček *et al.* 2007.





**Obrázek 29.** Průměrné roční hodnoty  $\delta\text{D}$  a  $\delta^{18}\text{O}$  srážek pro Evropu (A, C) a Afriku (B, D).  
Převzato a upraveno z WaterIsotopes.org.