

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BOTANIKY

**Variabilita populace kruhatky Matthioliho
(*Cortusa matthioli*) v propasti Macocha**

Bakalářská práce

Patricie Nejezchlebová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie – Geografie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.
Olomouc 2020

Prohlašuji, že jsem zadanou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Radima J. Vašuta, Ph.D. a uvedla veškerou literaturu, kterou jsem ve své práci použila.

V Olomouci dne 20. 5. 2020

.....
podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mojí práce, panu RNDr. Radimu J. Vašutovi, Ph.D., za pomoc, ochotu a cenné rady, a to jak při výzkumu, tak při následné tvorbě bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení:	Patricie Nejezchlebová
Název práce:	Variabilita populace kruhatky Matthioliho (<i>Cortusa matthioli</i>) v propasti Macocha
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra botaniky
Vedoucí práce:	RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.
Rok obhajoby:	2020
Abstrakt:	<p>Bakalářská práce se zabývá výzkumem variability ohrožené populace kruhatky Matthioliho (<i>Cortusa matthioli</i>) v propasti Macocha (CHKO Moravský kras) pomocí metody AFLP. Součástí práce je také sledování klíčivosti. Klíčivost semen byla shledána jako dostatečná, bohužel problémovým se stalo udržení populace. Výsledky provedené metody AFLP naznačují, že populace kruhatky Matthioliho je v Macoše relativně geneticky variabilní. Přibližné zhodnocení prvotních výsledků ukázalo použitelnost metody AFLP. Bohužel nebylo možné stanovit základní populačně-genetické parametry, díky nedostatečnému počtu analyzovaných jedinců a přesnější fragmentační analýze. Taktéž nebylo možné nalézt jistý pattern ve vztahu mezi studovanými rostlinami. Práce ovšem ukázala použitelnost metody AFLP pro studium populace kruhatky v Macoše. Pro přesnější vědecké zhodnocení by bylo ale vhodné ve studii pokračovat na rozsáhlejším populačním sběru.</p>
Klíčová slova:	Kruhatka Matthioliho, <i>Cortusa matthioli</i> , <i>Primulaceae</i> , propast Macocha, Moravský kras, AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism, ochrana přírody.
Počet stran:	64
Počet příloh:	2
Jazyk:	čeština

Bibliographic identification

Author's name:	Patricie Nejezchlebová
Title of thesis:	Variability in population of <i>Cortusa matthioli</i> (<i>Primulaceae</i>) in the Macocha abyss
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Botany
Supervisor:	RNDr. Radim J. Vašut, Ph.D.
The year of presentation:	2020
Abstract:	<p>The bachelor's thesis deals with the research of the variability of the endangered population of <i>Cortusa matthioli</i> in the Macocha abyss (Moravian Karst Protected Landscape Area) using the AFLP method. Part of the work is also monitoring germination. Seed germination was found to be sufficient, unfortunately the maintenance of the population became problematic. The results of the AFLP method suggest that the population of <i>Cortusa matthioli</i> is relatively genetically variable in the Macocha abyss. An approximate evaluation of the initial results showed the applicability of the AFLP method. Unfortunately, it was not possible to determine the basic population-genetic parameters, due to the insufficient number of analyzed individuals and more accurate fragmentation analysis. It was also not possible to find a certain pattern in the relationship between the studied plants. However, the work showed the applicability of the AFLP method for the study of the population of <i>Cortusa</i> in the abyss.</p>
Keywords:	<i>Cortusa matthioli</i> , <i>Primulaceae</i> , the Macocha Abyss, Moravian Karst, AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism, nature conservation.
Number of pages:	64
Number of appendices:	2
Language:	Czech

1	ÚVOD.....	8
2	CÍLE PRÁCE.....	9
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1	Charakteristika území.....	10
3.1.1	Geologie a geomorfologické tvary	11
3.1.2	Klima	13
3.1.3	Flóra.....	16
3.2	Charakteristika čeledi <i>Primulaceae</i>	18
3.2.1	Taxonomie a obecná charakteristika	18
3.2.2	Kruhatka Matthioliho – <i>Cortusa matthioli</i> L.....	19
3.2.3	Rozmnožování, klíčení a růst čeledi <i>Primulaceae</i>	22
3.3	Studium genotypové variability.....	28
3.3.1	Metoda AFLP	28
4	MATERIÁL A METODY.....	32
4.1	Klíčení a růst kruhatky v <i>in vitro</i> podmínkách	32
4.2	Studium genotypové variability populace kruhatky v Macošě	32
4.2.1	Rostlinný materiál	32
4.2.2	Extrakce DNA.....	34
4.2.3	AFLP	36
4.3	Kontrola úspěšnosti AFLP elektrolýzou	39
4.4	Fragmentační analýza	40
5	VÝSLEDKY.....	42
5.1	Klíčení.....	42
5.2	Extrakce DNA	43
5.3	Průběh AFLP reakcí	45

5.4	Fragmentační analýza	46
5.5	Výsledky AFLP a jejich interpretace	47
6	DISKUZE	51
7	ZÁVĚR	52
8	LITERATURA.....	53

1 ÚVOD

Kruhatka Matthioliho moravská (*Cortusa matthioli* subsp. *moravica*) patří v České republice k ohroženým druhům rostlin. Přirozeně se vyskytuje pouze na jediné lokalitě – v propasti Macocha, spadající pod Chráněnou krajinnou oblast Moravský kras. Propast Macocha se z důvodu svých rozměrů řadí mezi propasti typu „light hole“, tedy propasti zcela osvětlené Sluncem. Vlivem přístupného slunečního záření se na dně a skalních stěnách daří rozmanité vegetaci v čele s touto unikátní rostlinou, která je označována jako glaciální relikv. Specifické klima stinných, vlhkých vápencových skal propasti vytváří pro kruhatku příhodné podmínky pro život, a zajišťuje přežití tohoto druhu po tisíce let. Bohužel počet jedinců v macošské populaci dlouhodobě klesá. Jedinci na lokalitě sice kvetou, ale vytváří semena jen s obtížemi. Svoji roli na současné situaci může hrát jak probíhající změna klimatu, tak způsob využívání půdy člověkem aj. Tyto skutečnosti mohou narušit genetickou variabilitu populace kruhatky.

2 CÍLE PRÁCE

Předmětem studia bakalářské práce je kruhatka Matthioliho moravská, vysokohorský druh byliny běžně rozšířený ve vysokých Alpách a Karpatech, který v České republice roste pouze na jediné lokalitě, a to v propasti Macocha jako glaciální relikv. Cílem práce bylo přiblížit přírodní podmínky v místě výskytu tohoto významného druhu, a také charakterizovat druh samotný. Cílem praktické části bylo vyzkoušet metodu AFLP pro studium genotypové diverzity rostlin z Macochy a na základě toho odpovědět na otázku, zda-li je populace kruhatky v Macoše geneticky variabilní nebo homogenní (v důsledku klonálního rozmnožování).

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Charakteristika území

Chráněná krajinná oblast (dále CHKO) Moravský kras se nachází v Jihomoravském kraji, severovýchodně od krajského města Brna. Tato chráněná oblast je druhou nejstarší CHKO v ČR (Správa CHKO Moravský kras 2020). Byla vyhlášena 4. 7. 1956, a je zároveň se svojí rozlohou 92 km² třetím nejmenším velkoplošným chráněným územím (Správa CHKO Moravský kras 2020). Jedná se o chráněný protáhlý pás o délce přibližně 22 km, táhnoucí se severo – jižním směrem, konkrétně od obce Sloup po okrajové části města Brna. Součástí chráněné krajinné oblasti jsou i maloplošná zvláště chráněná území, a to konkrétně 4 národní přírodní rezervace, 2 národní přírodní památky a 11 přírodních rezervací. V rámci CHKO bylo objeveno více než 1 100 jeskyní, z nichž pouze 5 je v současnosti zpřístupněno veřejnosti – Punkevní jeskyně, jeskyně Balcarka, Sloupsko-šošůvské jeskyně, Kateřinská jeskyně a jeskyně Výpustek. Nepravidelně turisticky zpřístupněnou jeskyní je také jeskyně Býčí skála, která je ale během roku přístupná pouze ojedinele.

Část území Moravského krasu je od roku 2004 zařazena na List mokřadů mezinárodního významu v rámci Ramsarské úmluvy, a to pod názvem Podzemní Punkva (Správa CHKO Moravský kras 2020). Území se váže na podzemní tok řeky Punkvy, protékající systémem Amatérské jeskyně. Území zahrnuje jak samotnou Punkvu, tak i její zdrojnice – Sloupský potok, Bílou vodu a další menší toky.



Obrázek 1 Lokalizace CHKO Moravský kras na katastrálním území obcí. Zdroj: Nejezchlebová 2018.

3.1.1 Geologie a geomorfologické tvary

Celá oblast je vyvinuta v 25 km dlouhém a cca 3–6 km širokém pruhu devonských vápenců. Podkladem oblasti je intruzivní těleso vyvřelého brněnského masivu proterozoického stáří. Ve středním a svrchním devonu vzniklé mělké, teplé a čisté moře vytvořilo optimální podmínky pro růst a rozvoj kolonií přisedle žijících

živočichů (Chlupáč a kol. 2002). Jejich vápnitě schránky se staly základním stavebním prvkem vápenců celého území chráněné krajinné oblasti.

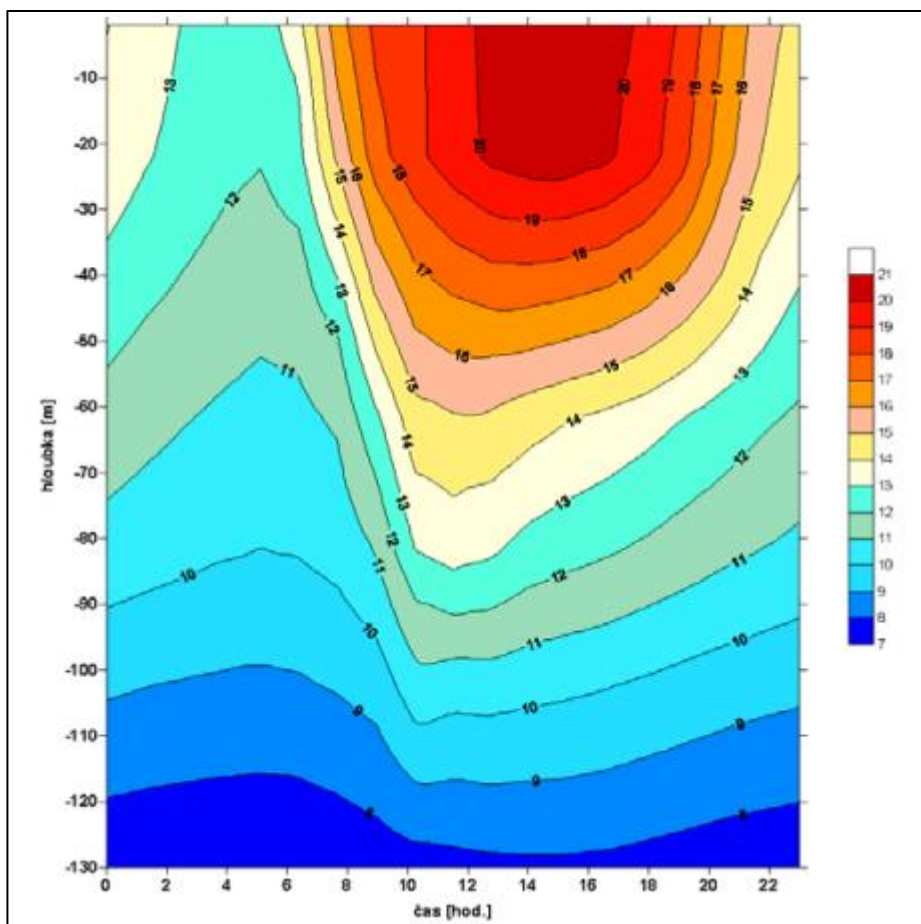
Z geomorfologického hlediska tvoří území podcelek Dražanské vrchoviny – Moravský kras, který je nejrozsáhlejším a nejvíce zkrasovělým územím České republiky. Střední výška území je 448 m n. m. Celé území je hojně poseto krasovými tvary reliéfu jak endogenními (podpovrchovými), tak exogenními (povrchovými) (Demek et al. 2006).

Mezi nejznámější povrchové tvary můžeme zařadit škrapy (konkávní a konvexní tvary nejrůznějších podob, rozčleňující skalní povrch nebo stěny jeskyní) a závrtý (místo soustředění prosakování povrchových vod do podzemí, a následné prohlubování a snižování krasového reliéfu, převážně kruhového tvaru). Významnými krasovými jevy jsou i izolované skály, skalní okna, mosty a žleby (protáhlé krasové údolí, kaňonovitého tvaru). Pravděpodobně nejznámějším exogenním tvarem reliéfu Moravského krasu je propast Macocha. Propastí lze rozumět svislou či šikmou prohlubeň se skalními stěnami. Její vertikální rozměr pak převyšuje rozměr horizontální (Smolová, Vítek 2007). Z důvodu svých mohutných rozměrů se Macocha řadí mezi propasti typu „light hole“, tedy propasti, které jsou během dne zcela osvětlené Sluncem. Vlivem této skutečnosti se na dně a skalních stěnách daří vegetaci. Macocha je významným nalezištěm kruhatky Matthioliho z čeledi prvosenkovitých. Kruhatka Matthioliho je glaciálním reliktem a v České republice se nachází pouze na stěnách dolní části propasti. Zdejší populace se liší od typických vysokohorských populací, a proto je zdejší populace považována za endemický poddruh, *C. matthioli* subsp. *moravica* (PODP.) SOJÁK. Právě tato unikátní rostlina a její macošská populace je předmětem výzkumu v této bakalářské práci. Podrobně se práce tématem zabývá v jedné z následujících kapitol. Propast může obecně končit jak slepě, tak i jako v případě Macochy vyústěním do často zavodněných jeskynních prostor. Suchá část propasti měří 138,5 m. V Macošě se poprvé objevují vody Punkvy na denním světle, kde poté znovu mizí do podzemních prostor.

3.1.2 Klima

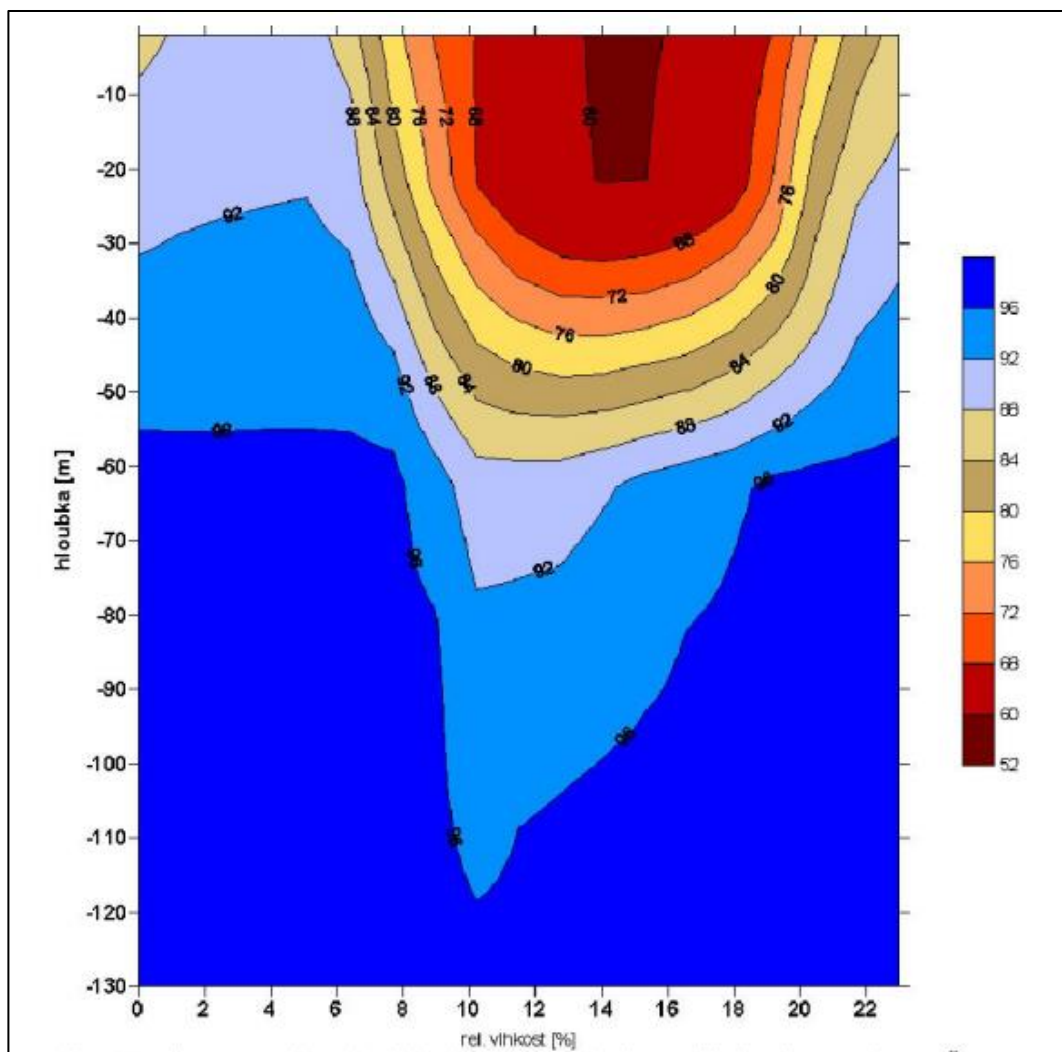
Propast Macocha se vyznačuje specifickým klimatem. Na dně propasti je zajímavý roční chod teploty vzduchu. Roční amplituda teploty je zde nižší než ve volné krajině. V zimě dochází na dně suché části propasti k hromadění chladného vzduchu. Z tohoto důvodu jsou průměrné teploty zimních měsíců v propasti často nižší. Teplota je stejně tak nižší i v letních měsících, vlivem zastínění dna propasti. Teplota vzduchu je nejnižší na dně Macochy a směrem vzhůru roste. Vlhkost vzduchu je na rozdíl od teploty nejvyšší na dně a směrem vzhůru se snižuje.

Vlivem orientace podélné osy propasti SZ – JV směrem, dosahují paprsky slunečního záření největší hloubky kolem 10 hodiny dopolední LEČ (letního evropského času), a tato situace je doprovázená také maximální denní teplotou oblasti dna Macochy (Litschmann et al. 2008). S postupným ozářením skalních stěn dochází vlivem anabatického proudění k rozrušení původně inverzního zvrstvení vzduchu. Následkem je pokles teploty ve vyšších vrstvách. Tato situace je ovšem pouze přechodná a po relativně krátkém čase (cca 1–2 hodiny) dochází k obnovení teplotní inverze. V tomto čase již sluneční paprsky nedopadají přímo na skalní stěnu a teplota vzduchu se začíná opět pozvolna snižovat. Pokles teploty je nejintenzivnější ve spodní části propasti s kolmými skalními stěnami. V nálevkovitě rozšířené vrchní části (do hloubky cca 20 m) maxima teplot přetrvávají delší dobu, a to v důsledku turbulentní výměny vzduchu s okolní atmosférou zemského povrchu (Litschmann et al. 2008). Turbulentní výměnou dochází také postupně k udržení zvýšené teploty i v hlubších částech propasti do večerních hodin. Po západu Slunce dochází ke snížení rychlosti proudění, a také snížení teploty. V nočních hodinách dochází k postupnému zaplňování propasti studeným vzduchem, a to z plošiny kolem ústí propasti a z mírně ukloněných svahů v horní části. Nejnižší teploty je dosaženo těsně před východem Slunce.



Obrázek 2 Průměrné rozložení teploty vzduchu v Macošé v průběhu dne. Zdroj: Litschmann et al. 2008.

Co se týče vlhkosti vzduchu, je možné pozorovat vrstvu nasyceného vzduchu s velmi malou denní amplitudou na dně propasti, a směrem k povrchu vlhkost pozvolna klesající. V denním chodu vlhkosti jsou největší změny pozorovány ve svrchních vrstvách, směrem do hloubky se vlhkostní amplituda snižuje. Poměrně značná část propasti, od hloubky přibližně 60 m, je po převážnou část dne vyplněna vzduchem s relativní vlhkostí vzduchu nad 96 %. Minimum vzdušné vlhkosti je v hlubších částech pozorováno kolem 10. hodiny LEČ. Směrem k okolnímu povrchu se vlhkostní minimum posouvá (Litschmann et al. 2008).



Obrázek 3 Průměrné rozložení relativní vlhkosti vzduchu v Macoše v průběhu dne. Zdroj: Litschmann et al. 2008.

Kromě klimatu Macochy je také zajímavým tématem klima samotných jeskyní a dalších podzemních prostor. Podzemní prostory mají v porovnání s okolní volnou krajinou nižší denní i roční amplitudy teploty a vlhkosti vzduchu. Vlhkost vzduchu v podzemních prostorech bývá velmi vysoká, proto jsou některé tamní prostory využívány k léčbě některých dýchacích onemocnění. V jeskyních, které nejsou bezprostředně spojeny se zemským povrchem, se po celý rok udržuje konstantní teplota.

3.1.3 Flóra

Rozmanitost flóry na území CHKO je velmi bohatá a lze ji rozdělit do dvou základních skupin – společenstva krasového povrchu a krasového podzemí. Moravský kras se vyznačuje hustotou zalesnění okolo 54 % celkové rozlohy. Půda na území krasu je však také zemědělsky obdělávána, a tak krasové plošiny pokrývají, kromě převažujícího společenstva lesů, i pole. Malá část území patří loukám a pastvinám. S rozvojem zemědělství a železářství souviselo kácení lesů a nahrazování původních dřevin rychle rostoucími monokulturami smrku a borovic.

Fytogeograficky náleží studovaná oblast do fytochorionu 70. Moravský kras, která náleží do fytogeografického obvodu Českomoravské mezofytikum, v rámci fytogeografické oblasti Mezofytika (Skalický 1988). Podle členění území ČR na bioregiony (Culek 1996), náleží oblast do Macošského bioregionu, který je v ČR územně nejmenší (100 km²), avšak velmi cenný regionu z pohledu biodiverzity. Tento bioregion řadíme do Hercynské podprovincie, části většího biogeografického celku Provincie středoevropských listnatých lesů.

Pro danou oblast je mimo jiné typická vegetace a květena obnažených skal a skalních stěn. Zde je vegetace kvůli v převážně chybějícímu půdnímu pokryvu omezena na lišejníky a mechy, na místech se sporým půdním pokryvem můžeme pozorovat i některé vyšší rostliny. V těchto podmínkách roste i kriticky ohrožená kapradina jelení jazyk celolistý (*Phyllitis scolopendrium*), která se vyskytuje pouze na několika místech v Pustém žlebu (Správa CHKO 2020). Společenstva údolního dna jsou ovlivněna klimatickou inverzí. Tato společenstva jsou vlhkomilná a chladnomilná a převážně i stínomilná. Z důvodu teplotní inverze rostou v nižších částech reliéfu horské a podhorské druhy, zatímco ve vyšších polohách reliéfu druhy teplomilné.

Jedním z důsledků zpřístupnění některých jeskyní veřejnosti je rozvoj vegetace, která je pod zemským povrchem zcela nepůvodní, a to kolem světelných reflektorů využívaných při prohlídkách. Z důvodu této skutečnosti je vegetace nazývána „Lampenflórou“ (Správa CHKO 2020). Do podzemních prostor se organismy dostávají s návštěvníky ve formě spor a semen. Organismy následně reagují na přívod umělého osvětlení a začínají růst. Z tohoto důvodu je

osvětlení v podzemních částech eliminováno a je používáno co nejvíce úsporně, ve formě čidel aj.

Zvláštní kapitolou je samotná propast Macocha, která patří mezi mimořádné lokality. Nejstarší prameny se zabývají rostlinami pouze obecně (badatelé se soustředili především na průzkum krasových jevů). První soustavný průzkum provedl František Straňák při sestupech s Karlem Absolonem (1903 a 1905). V propasti zaznamenal 105 druhů rostlin. Vlastní floristický průzkum propasti provedl Karel Sutorý z Botanického oddělení Moravského zemského muzea v letech 2001–2008. Své závěry poté publikoval v časopisu *Příroda* pod názvem „*Cévnaté rostliny propasti Macocha po 150 letech výzkumu*“ (Sutorý 2009). Neomezil se přitom pouze na dno a stěny, ale zahrnul do svého bádání i bezprostřední okolí (přibližně do míst, kde se terén zalamuje do Macochy). Celkem je obecně z propasti udáváno 247 taxonů cévnatých rostlin, závěry výzkumu ukazují ale pouze 199 taxonů. Možným vysvětlením této skutečnosti může být ovlivnění lokality člověkem, a to různými, více či méně obvyklými způsoby. Příkladem krátkodobého kuriózního způsobu může být i tento: „*Před mnoha lety učinila se k rozkazu p. starohraběte Salm-Reiferscheida zkouška, zdaž by se v Macošě nedaly přechovati ovce; spuštěno tedy několik kusů dolů. Ač hojnost potravy s vrchu se jim házelo, přec jim v té hrozně hloubce nešlo k duhu, ano za krátký čas zaplatila to ona zvířata životem!*“ (Sutorý 2009). Dlouhodobějším ovlivněním lze označit výzkum jeskynních prostor a umístění provizorních staveb na dně propasti v souvislosti se zpřístupněním Punkevních jeskyní (1914) nebo instalaci železného žebříku, který mezi léty 1913–1933 spojoval dno propasti s dolním můstkem (Sutorý 2009).

V současnosti se nové druhy vyskytují hlavně v okolí horního a dolního můstku a také kolem chodníku, spojujícího obě lokality. Do propasti se semena dostávají nejvíce s dešťovou vodou z okolí dolního můstku, přičemž se následně uchytí na skalách pod můstkem a na vrcholu suťového kužele. V těchto místech jsou také nejpříznivější světelné a teplotní podmínky pro růst. Spodní část Macochy mohou ovlivňovat i zvýšené stavy vody, především povodně, které zaplní dno, a pokryjí jej nánosy bahna. To vede ke zničení stávající vegetace, ale také k zavlečení nových diaspor.

V dolní a střední části propasti se tedy vyskytují stínomilné druhy, které se vyznačují protažením stonků ve směru přicházejícího světla. V okolí vývěrů vodních toků můžeme pozorovat jednodušší organismy, a to různé druhy řas a mechorostů. Propast je lokalitou celé řady unikátních rostlinných společenstev. Vlhké skalní stěny pokrývají husté polštáře mechorostů – např. sourubka kadeřavá (*Neckera crispa*), stromkovec ocáskovitý (*Thamnobryum alopecurum*), baňatka potoční (*Brachythecium rivulare*), měřík čeřitý (*Plagiomnium undulatum*) aj. (Správa CHKO 2020). V tlejících kmenech na suťovém povrchu dna propasti roste vzácný mech šikoušek zelený (*Buxbaumia viridis*), který se vyskytuje i v okolních žlebech. Jak již bylo zmíněno výše, propast je také lokalitou růstu jedné z nejzajímavějších a nejvzácnějších rostlin Moravského krasu – kruhatky Matthioliho (*Cortusa matthioli*), objevené v roce 1918 při výzkumné výpravě na dno propasti (Správa CHKO 2020).

3.2 Charakteristika čeledi *Primulaceae*

3.2.1 Taxonomie a obecná charakteristika

Rod kruhatka patří do čeledi prvosenkovité (*Primulaceae*) z řádu vřesovcotvarých (*Ericales*), který patří k evolučně odvozenější skupině rostlin – v rámci skupiny vyšších dvouděložných (*Rosopsida*) a náleží do asteridového kládu (APG 2016); přehledně je systematické zařazení shrnuto Tabulce 1.

Tabulka 1 Taxonomické zařazení *Primulaceae*.

Říše:	rostliny (<i>Plantae</i>)
Podříše:	cévnaté rostliny (<i>Tracheobionta</i>)
Oddělení:	krytosemenné (<i>Magnoliophyta</i>)
Třída:	vyšší dvouděložné (<i>Rosopsida</i>)
Řád:	vřesovcotvaré (<i>Ericales</i>)
Čeleď:	prvosenkovité (<i>Primulaceae</i>)

Zástupci čeledi jsou obecně polokeře, převážně ale vytrvalé byliny s celistvými a laločnatými listy, které jsou často v přízemní růžici. Kořeny bývají vláknité. Květy jsou oboupohlavné, sympetální, synsepální nebo choripetální, méně často také apetalní. Květy jsou nejčastěji pětičetné a aktinomorfní. Počet tyčinek je shodný s počtem obalů. Gyneceum lze pozorovat se čnělkou, která je zakončena hlavičkatou bliznou. Semeník je svrchní, méně často

také polospodní. Plodem je kulovitá nebo vejcovitá tobolka. Plod se otevírá pěti nebo deseti zuby. Semena jsou početná, nepravidelně mnohostěnná, na hřbetní straně zploštělá, a na břišní naopak vyklenutá, často bradavčitá s tupými hranami. Byliny spadající do této čeledi jsou rozšířeny po celé zeměkouli, především pak v mírném pásu severní zemské šířky, výjimečně v Americe (Kovanda 1992). U všech druhů *Primulaceae* byla zjištěna pouze fotosyntéza typu C3. V pletivech se často vyskytují sekreční buňky nebo nádržky obsahující sekret (Kovanda 1992). Obsah alkaloidů je těchto rostlin vzácný (např. je u *Primula denticulata*).

Většina zástupců čeledi jsou suchozemské rostliny s vysokou druhovou diverzitou. Zástupci rostou jak na suchých stanovištích (*Primula veris* aj.), tak i vlhkých (např. *Primula elatior*). Zvláštností je zástupce *Hottonia palustris*, která roste ponořená ve stojatých či zvolna tekoucích vodách. V tropech se jedná především o dřeviny keřového i stromového vzrůstu (např. rod *Rapanea*) (Grulich 2013).

Značná rozmanitost zástupců čeledi je klasifikována do 4 podčeledí, jejichž stručná charakteristika je shrnuta v Tabulce 2.

Tabulka 2 Zástupci dílčích podčeledí *Primulaceae*. Zdroj: Stevens 2017.

PODČELEĎ	ZÁSTUPCI A VÝSKYT
<i>Maesoideae</i>	pouze rod <i>Maesa</i> , cca 150 druhů v tropech Eurasie a Afriky
<i>Theophrastoideae</i>	15 druhů rodu <i>Samolus</i> v Eurasii, jižní Africe, Severní a Jižní Americe; cca 90 druhů <i>Theophrasteae</i> v tropické Americe
<i>Primuloideae</i>	9 rodů čítá 900 druhů, výskyt především v mírném a subtropickém pásu severní polokoule
<i>Myrsinoideae</i>	41 rodů a necelých 1500 druhů, výskyt kosmopolitní

3.2.2 Kruhatka Matthioliho – *Cortusa matthioli* L.

Nejstarší vědecký popis této rostliny sestavil významný italský renesanční lékař a botanik P. A. Matthioli ve 14. století. Rostlinu pojmenoval na počest jejího objevitele Giacomu A. Cortusiho, který ji objevil v horách poblíž obce Valstagna v Benátsku (Danihelka 2011). Dle doslovného překladu Jiřího Danihelky (Danihelka 2011) popisuje Matthiolus rostlinu ve svém díle následovně: „... [p. 985] Tolik o kuklících. Jejich velmi příjemná vůně mi připomněla jinou rostlinu, obdařenou snad neméně významnými účinky, kterou si dovolím

nazvat kortuskou [= kruhatkou], neboť o ní jako první podal zprávu šlechtitý Cortusus. *Cortusa* vyhání listy dosti podobné révě, avšak daleko menší, téměř okrouhlé a též slabě drsné, poněkud svíravé chuti a s dlouhými přímými řapíky. Stvoly tvoří útlé, přímé, bezlisté, na vrcholku však nesoucí od přírody nádherné květy, které jsou vně purpurově červené a uvnitř zlatě zářivé, neboť jsou vyplněny zlatavými tyčinkami. Spočívá na četných tenkých, do široka rozložených kořenech. Vyskytuje se jak s fialovými, tak se sněhobílými květy, avšak první jsou častější. Roste na stinných, sluncem nikdy neozářených místech, na půdě křídové nebo bělavé barvy. Cortusus, její objevitel, neviděl tuto rostlinu nikde jinde než v okolí města Vicenza, a to jenom v té části, která slove Valle stagna. Celá rostlina, je-li čerstvá, vydává velmi příjemnou vůni, která se skoro podobá vůni medových plástů, je však daleko příjemnější a též výraznější. U suché [rostliny] však vůně mizí “.

Druh kruhatka Matthioliho je morfologicky značně variabilní, variabilita se v přirozených horských populacích projevuje zejména v hustotě a odění řapíků, tvaru, barvě a konzistenci čepele listu, a velikosti a tvaru kalicha. Proto je v rámci druhu rozlišováno několik variet nejasné taxonomické váhy. Pro nás význačné jsou morfotypy s převážně s chlupatými řapíky a s poměrně tlustou, naspodu šedozelenou listovou čepelí, které se vyskytují v pohořích střední a jihovýchodní Evropy a zasahují až do asijského Ruska. V České republice je vyskytující se morfotyp klasifikován jako samostatná subspecie *moravica* se základním chromozómovým počtem $2n = 24$ (viz e.g. Kovanda 1992).

Značná variabilita a plasticita druhu vedla k popsání celé řady vnitrodruhových taxonů, které sumarizoval a nomenklatoricky typifikoval Sutorý (2010). Přehled jím typifikovaných vnitrodruhových taxonů se vztahem ke Střední Evropě je shrnut v Tabulce 3.

Tabulka 3 Výčet známých druhů *Cortusa*. Zdroj: Sutorý 2010; vlastní zpravování.

TAXON	ROK OBJEVU	TYP
<i>C. matthioli</i> f. <i>engadinensis</i>	1886	lektotyp
<i>C. matthioli</i> f. <i>alpina</i>	1872	holotyp
<i>C. matthioli</i> f. <i>cenisia</i>	1886	lektotyp
<i>C. matthioli</i> f. <i>tatrensis</i>	1870	lektotyp
<i>C. matthioli</i> f. <i>moravica</i>	1918	holotyp
<i>C. matthioli</i> f. <i>freynii</i>	1873	holotyp
<i>C. matthioli</i> (f. <i>matthioli</i>) subf. <i>longecalycina</i>	1882	lektotyp
<i>C. matthioli</i> (f. <i>matthioli</i>) subf. <i>latidens</i>	1909	lektotyp
<i>C. matthioli</i> (f. <i>brotheri</i>) subf. <i>glabrescens</i>	1892	lektotyp
<i>C. matthioli</i> (f. <i>brotheri</i>) subf. <i>subcanescens</i>	1895	lektotyp
<i>C. matthioli</i> (f. <i>brotheri</i>) subf. <i>villosula</i>	1892	lektotyp

3.2.2.1 Kruhatka Matthioliho moravská – *Cortusa matthioli* subsp. *moravica*

Rostliny se vyznačují řídké a žláznatě chlupatým, někdy až olysalým řapíkem a plazivým oddenkem. Listy jsou s tenkou, ledvinovitě okrouhlou až okrouhlou, dlanitolaločnou čepelí, s úkrojky nepravidelně, jednoduše nebo dvojitě pilovitě zubatými. Na bázi je čepel srdčitá a po obou stranách zelená. Stvol je dlouhý 15–35 cm. Okolík je 5–12květý. Listeny obalu jsou kopinaté a mnohem kratší než stopky. Kališní cípy květů jsou úzce trojúhelníkovité, špičaté až zašpičatělé a zářezy mezi nimi špičaté. Koruna těchto bylin je purpurově červená zvonkovitého tvaru. Prašníky jsou 2x delší než nitky, zároveň při bázi srdčité. Plodem je vejcovitá tobolka s mnohohrannými semeny, 1,2 – 1,8 mm dlouhými (Kovanda 1992).

Místem výskytu jsou stinné, vlhké vápencové skály, a jedinou lokalitou je CHKO Moravský kras (v dolní části propasti Macocha). Tyto byliny jsou tedy endemity Moravského

krasu. Na lokalitě svého výskytu kvetou, ale semena tvoří jen málo. Populace je důsledkem této skutečnosti velmi zranitelná a počet jedinců se snižuje. *C. Matthioli* poprvé objevil na Moravě Vilém Filkuka v roce 1918, druh byl označen jako glaciální relikv, tedy pozůstatek organismu doby ledové na našem území (Sutorý 2010).



Obrázek 4 *Cortusa matthioli* subsp. *moravica*. Zdroj: Štefka 2011.

3.2.3 Rozmnožování, klíčení a růst čeledi *Primulaceae*

Klíčivost semen je kritickým počátkem života všech rostlin a zároveň mírou úspěchu přetrvávání jejich populací. Míra a úspěšnost klíčení se může lišit v závislosti na lokalitě, životní historii a fylogenetických vztahů. Jedna z hypotéz, proč je populace kruhatky v Macošě zranitelná, je špatná klíčovost semen nebo malá schopnost vyklíčených rostlin přežít. Proto rešerše publikací věnovaných klíčení mohou pomoci při pozdější volbě strategie ochrany nebo záchrany populace.

Zástupci čeledi *Primulaceae* jsou oboupohlavní. Vajíčka v semeníku jsou připojena k centrální ose bez jakýchkoli přepážek mezi nimi. Toto uspořádání je zvané volná centrální placentace. Vajíčka mají dvojitou ochrannou vrstvu. Na rozdíl od většiny ostatních čeledí v rámci řádu *Ericales* tvoří obě vrstvy mikropyle. Hlavním opylovačem čeledi je hmyz. V květech těchto rostlin bývá mechanická překážka pro samoopylení. V tobolce, která je

nesena na rovném stonku je obvykle více semen. Tobolka se otevírá na vrcholu pomocí víčka nebo zubů (Anderberg et al. 2002).

Prací, které by se zabývaly klíčivostí semen u kruhatek nebo příbuzných rostlin je velmi málo. Výjimkou je studie věnovaná klíčivosti semen u druhu pochybek huňatý (*Androsace villosa*), která hledala podmínky pro úspěšné klíčení semen (Aarslan et al. 2011). Jedná se o druh s podobnými ekologickými nároky jako kruhatka Matthioliho, preferuje skalní biotopy v alpínském stupni na vápencovém nebo žulovém podloží. Autoři (Aarslan et al. 2011) studovali klíčivost semen u rostlin sbíraných na svazích horského masívu Uludağ (2543 m n. m.) v západním Turecku (poblíž města Bursa). Testovali rozdíly v klíčivosti čerstvých semen, semen vystavených krátkodobému vlhkému chlazení (15 d, + 4 °C), semen ošetřených GA3 (které se používá k překonání nízké klíčivosti semen u mnoha druhů rostlin; 100, 150 a 250 ppm) a semen vystavených chlazení + GA3. Vlhké chlazení bylo prováděno jednak v nepřetržité tmě (20 °C), a také za 12hodinové fotoperiody při 20/10 °C. Semena udržovaná ve tmě vykazala vyšší procenta klíčivosti než semena udržovaná pod fotoperiodou. Rychlost klíčení se zvýšila na 90–97 % při použití 100–250 ppm GA3 a krátkodobě vlhkým chlazením v nepřetržité tmě (20 °C). Práce ukázala, že kombinace obou procesů je efektivním způsobem, kterým lze zvýšit procento klíčivosti rostlin (Aarslan et al. 2011), výsledky shrnuje Tabulka 4.

Tabulka 4 Klíčivost semen *Androsace villosa* L. Zdroj: Aarslan et al. 2011.

Treatment Series		GA ₃ (ppm)	Germination (%)	MGT (days)
Darkness (20°C)		0	24 ± 2	14.7 ± 0.8
		100	64 ± 4	10.9 ± 0.8
		150	63 ± 3	9.5 ± 1.1
		250	75 ± 6	9.2 ± 0.4
	Moist chilling 15 Days (+ 4°C)	0	56 ± 4	8.6 ± 0.9
		100	91 ± 5	5.0 ± 0.2
		150	97 ± 1	4.8 ± 0.1
		250	97 ± 1	4.4 ± 0.7
Photoperiod (20/10°C; 12/12h)		0	0	0
		100	20 ± 2	16.9 ± 1.5
		150	24 ± 2	16.1 ± 0.6
		250	29 ± 1	16.5 ± 1.1
	Moist chilling 15 Days (+ 4°C)	0	9 ± 1	12.2 ± 0.5
		100	64 ± 6	7.3 ± 0.6
		150	65 ± 3	10.0 ± 0.1
		250	68 ± 6	9.5 ± 0.0
Photoperiod (20/10°C; 12/12h)	Scarification (10 min. %80 H ₂ SO ₄)	0	37 ± 6	17.6 ± 0.8

Vegetační období *Androsace villosa* L. je velmi krátké díky vysokohorským podmínkám, načasování přirozeného klíčení je tedy kritické. Studie přispívá k pochopení klíčících mechanismů alpských druhů celkově (předpokládá se fyziologická dormance), a také k jejich ochraně. Autoři jsou na základě výsledků toho názoru, že semena, která by byla zanesena do skalních trhlin, by měla větší šanci klíčení, a zároveň růstem na takových stanovištích by podléhali menší míře konkurence stejného či jiného druhu.

Co se týče kruhatky Matthioliho, rozmnožování a udržení populace se stává, také v souvislosti s měnícími se podmínkami prostředí, čím dál méně frekventovaným jevem. Tato problematika by mohla souviset, tak jako v mnoha případech ostatních ohrožených bylin, se změnou světového a místního klimatu, charakterem půdního pokryvu a geologického podkladu, dopadem lidské činnosti aj. Tuto hypotézu podporuje pozorování stavu populace v posledních letech, kdy extrémní suchá léta v letech 2015–2019 pravděpodobně významně negativně ovlivnila početnost populace kruhatky na stěnách propasti Macocha (Z. Musil, ústní sdělení).

Problematikou výskytu, rozmnožování a klíčení kruhatky Matthioliho se zabýval ukrajinský botanik Yuriy Kobiv, který sledoval populaci druhu v masívu Černé hory v Ukrajinských Karpatech (Kobiv 1999). Shrnutí jeho publikace a příspěví do porozumění problematiky rozmnožování a životního cyklu těchto vzácných bylin bude shrnuto v následujícím textu. Cílem publikace bylo na základě odhadu budoucího vývoje populací (autor předpokládal pokles počtu rostlin na jednotlivých stanovištích) přispět k zajištění odpovídající ochrany těchto exemplářů.

Autor (Kobiv 1999) nejprve vymezuje na základě literatury 2 hlavní oblasti výskytu kruhatky, a to SV část Evropského Ruska v čele s pohořím Ural a několik nalezišť ve středním Rusku, a centrální a JV Evropu, konkrétně pohoří Alpy a Karpaty, které přechází v pohoří Balkánského poloostrova. Všechny nalezené populace byly izolované a téměř všechna naleziště zaujímal nadmořskou výšku v rozmezí 500–2150 m n. m., kromě izolovaného naleziště v propasti Macocha. Stanoviště byla bez výjimky na vápenatém podloží, vlhká a poblíž zdroje vody. Klíčivost semen ze 4 vybraných lokalit byla sledována *in vitro* na vlhkém filtračním papíru (každá série obsahovala 100 semen) a po případném vyklíčení byly rostliny

přesazeny do nádob. Vzorke rostlin byly v rámci výzkumu na některých stanovištích také vykopávány a následně proběhlo vyšetření podzemních částí.

Semena v *in vitro* podmínkách začala klíčit 11. – 15. den po vysazení, vrchol klíčení nastal 16. – 22. den. Klíčivost semen byla ovšem velmi nízká, a pohybovala se mezi 4–14 % v závislosti na populaci. První listy kruhatek jsou bezzubé, mělce rozdělené, s několika nenápadnými laloky, později se vytváří růžice 3-5 listů. Jednoleté až dvouleté rostliny jsou nejprve sterilní, reprodukční období začíná obvykle mezi 3–4 vegetačním období. Produkce nových listů začíná brzy na jaře, k nástupu květů dochází zpravidla 20-30 den po tání sněhu (tj. na konci dubna/začátkem května). K nejintenzivnějšímu kvetení dochází od června. Každá rostlina kvete 6–8 dní a zrání semen končí ve 2 pol. srpna. Protože stonky zůstávají vztyčené, mohou semena zůstat v otevřených kapslích 1-2 měsíce, k šíření semen tedy dochází v období konce srpna až do konce měsíce října. Poslední listy rostlin vytvořené v srpnu mají menší laminy a kratší řapíky. Na podzim listy postupně vymizí. Tvořící se oddenky se rozšiřují monopodiálně. V září vznikne na vytvořeném oddenku apikální pupen o průměru od 3 do 8,5 mm, v závislosti na typu výhonku (vegetativní x kvetoucí) (Kobiv 1999).

Oddenek u dospělých jedinců je tmavě hnědý, (l-) 1,5–4 (–6) cm dlouhý a hustě pokrytý dlouhými smyčcovými kořeny. Mladé rostliny ve věku 1–3 (–4) let jsou představovány jednou listovou rozetou, tj. tzv. rhizomatózním růstem. Každá rozeta nemá více než jeden stvol. Ve věku od cca 4 let růstu dochází k vývoji oddenku, iniciovaným postranními pupeny na oddenku (většina těchto pupenů ale zůstává nečinnými natrvalo). Poté se na této oddenkové větvi objeví nová listová rozeta. V řádu několika let dochází k dalšímu větvení na dceřiné ose. 5 až 7letá kvetoucí rostlina je obvykle představována 2–4 integrovanými moduly. Kromě listové rozety může nést stvol každý modul (Kobiv 1999).

Protože rychlost rhizomatózního růstu je pomalá, pupeny stejného genetického původu obvykle zůstávají pevně agregované (rostliny bez agregace vykazovaly snížení rychlosti vegetativní proliferace). Dceřiný klonální fragment (odkazující na bývalou laterální osu) nevykazuje u kruhatek jakékoli rysy omlazení ve srovnání s rodičovskou částí. Poměrně pomalá vegetativní proliferace v kombinaci s možnou fragmentací může poněkud prodloužit životnost genet.

Plodné období obvykle přetrvává 3–5 (–7) let. Staří kvetoucí jedinci vykazují zřejmé příznaky stárnutí: pokles velikosti listů a stvolů, rychlosti vegetativního množení a počtu listů na rozetě, jakož i zvýšení akumulace mrtvých zbytků nadzemních a podzemních orgánů. Někteří jednotlivci procházejí krátkým 12letým senilním obdobím, které se vyznačuje zastavením kvetení, úplným poklesem vitality, zakrnění a postupným umíráním. Celková délka života se tedy obecně pohybuje mezi 5 a 10 lety. Ovšem dle výzkumu autora drtivá většina rostlin umírala dříve. Tento závěr vyvodil ze srovnání jedinců vybraných skupin, kdy reprodukčně schopní jednotlivci téměř nikdy v testovaných populacích nepřevládali (Kobiv 1999).

Struktura populací během výzkumu v případě karpatských kruhatek byla posuzována následovně: v každé populaci byly zaznamenány čtyři věkové skupiny: sazenice, rostliny ve vegetativním období, reprodukčně schopné rostliny a senilní rostliny. Počet sazenic kolísá každým rokem, takže ho nelze považovat za relevantní parametr. Pozornost proto byla věnována zbylým stabilnějším skupinám. Pozorované populace zahrnovaly jak reprodukční, tak i po postreprodukční jedince, které lze rozeznat pouze vykopáním a zkoumáním jejich podzemních orgánů. Senilní jedinci byli přítomni v každé populaci, ale jejich procento bylo nízké a nikdy nepřesáhlo 5 % z celkového počtu dospělých rostlin. Vegetativní dospělí jedinci převyšovali ostatní skupiny téměř ve všech populacích.

Autorův výzkum ukázal, že jednotlivé populace v ukrajinských Karpatech byly v roce 2006 poměrně vzácné, a pravděpodobnost přežití byla kritická (Kobiv 1999). V porovnání s předchozími měřeními a údaji o počtu nalezišť a jedinců byly výsledky v době autorova měření neuspokojivé. Některé populace již nebyly nalezeny vůbec. Jiné, dříve označené jako hojné, byly nalezeny z výrazně nižším počtem jedinců. Jako možnou příčinu úbytku či celkového vymizení Kobiv označil redukci vodních toků, těžbu dřeva a vápence v okolí toků a využití lokalit jako pastvin. Autor také konstatuje skutečnost, že se jedná o tzv. glaciální relikty, a je tedy předpokládán přirozený úpadek populace, který je nutné sledovat.

Poslední prací, která okrajově souvisí s klíčivostí semen u rostlin příbuzných kruhatce je studie věnovaná morfologii semen a endospermu v čeledi Primulaceae (Morozowska et al. 2010). Autoři popisují morfologii semen a strukturu endospermu u vybraných druhů. Snahou

autorů bylo studium morfologie semen, posuzovány byly velikost a tvar, povrchová struktura, tloušťka pláště semen a struktura endospermu u druhů napříč čeledí Primulaceae, tj. u *Androsace septentrionalis* (pochybek severní), ***Cortusa matthioli*** (kruhatka Matthioliho), *Hottonia palustris* (žebratka bahenní), *Primula elatior* (prvosenka vyšší), *Soldanella carpatica* (dřípatka karpatská), *Anagallis arvensis* (drchnička rolní), *Centunculus minima* (drobýšek nejmenší, v práci uveden jako *Anagallis minima*), *Cyclamen purpurascens* (brambořík nachový), *Glaux maritima* (sivěnka přímořská), *Lysimachia nemorum* (vrbina hajní), *L. vulgaris* (vrbina obecná), *Trientalis europaea* (sedmikvítek evropský) a *Samolus valerandi* (solěnka Valerandova). Morfologické a anatomické znaky semen byly studovány za použití semen získaných během let 2005–2007 ze živých rostlin v přírodních lokalitách výskytu. Měření semen a hilum byla prováděna světelnou mikroskopií (LM) 30, tloušťka semenného povlaku byla měřena pomocí obrázků ze skenovací elektronové mikroskopie (SEM) (Morozowska et al. 2010).

Na základě výzkumu byla podrobně popsána i morfologie semen *Cortusa matthioli*, jejichž charakteristika je shrnuta v Tabulce 5.

Tabulka 5 Charakteristika semen *Cortusa matthioli*. Zdroj: Morozowska et al. 2010, vlastní zpracování.

Druh	Tvar semene	Spongiová vnější vrstva	Tvar hilum	Hrany	Tloušťka testa [μm]			Endosperm	
					Testum	Vnější vrstva	Vnitřní vrstva	Typ	Vnitřní povrch
<i>Cortusa matthioli</i>	Sektoroidní	Chybí	Rovný	Neokřídlené ani kýlnaté	31,5	6,4	25,1	Rovnoměrně ztloustnuté buňky	Hladký

Tvar semen je sektoroidní, s přibližně stejnými úhly, spongiová vnější vrstva chybí. Lze pozorovat obrysy krystalů viditelné na ventrálním pohledu na povrchu semen pod vrstvou buněčné vrstvy kutikuly. Semena mají úzké a rovné hilum a na svém povrchu jsou opatřena sekundárními pruhy/sítěmi pruhů. Hrany semen nejsou ani okřídlené, ani kýlnaté. Tloušťka testa je 31,5 μm. Buňky endospermu jsou rovnoměrně ztloustnuté a vnitřní povrch je hladký.

3.3 Studium genotypové variability

Populační genetiky využívá moderních metod molekulární biologie, mezi nejrozšířenější patří studium variability mikrosatelitů (SSR, Simple Sequence Repeats) a metoda AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Obecně je vhodnější využití kodominantních markerů jako jsou právě mikrosatelity nebo SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Jejich použití je vázáno na znalost polymorfních úseků a primerů. Proto je často volena náhradní metoda, dominantní AFLP.

Pro kruhatky nejsou známy žádné dostupné mikrosatelity, proto se metoda AFLP jeví jako nejvhodnější a nejdostupnější metodou pro studium genetické diverzity reliktní populace kruhatky v Macoše. Tato metoda byla již dříve úspěšně použita na katedře botaniky ke studiu reliktních populací s malým počtem jedinců. S pomocí metody AFLP tak byla stanovena genotypová variabilita kriticky ohroženého pelyňku Pančičova (Kitner et al. 2012), pampelišek (Majeský et al. 2012; 2015) nebo reliktních populací tučnice české (Majeský et al., nepublikováno). Sochor a kol. (2013) testovali využití metody AFLP společně s mikrosatelity na početně omezených populacích vzácné vrby lýkovcové v Moravskoslezských Beskydách a prokázali, že obě metody poskytují podobné výsledky. Přestože je populace kruhatky Matthioliho v Macoše velmi omezená a dostupný rostlinný materiál nedostačující pro běžná statistická vyhodnocení, AFLP se teoreticky jeví jako vhodná metoda, která má potenciál podhalit genotypovou variabilitu této unikátní populace.

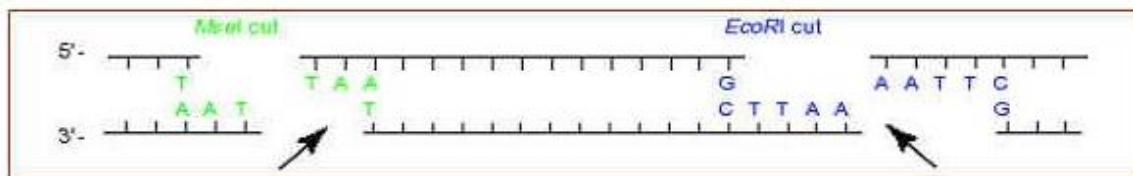
3.3.1 Metoda AFLP

Amplified Fragment Length Polymorphism, zkráceně AFLP, je restriční metoda, která umožňuje analýzu polymorfismu v celkové genomové DNA organismů, a tedy její charakterizaci. Metoda nevyžaduje znalosti o struktuře genomu. Využívá prvků metody RFLP (restriction fragment length polymorphism / polymorfismus délky restričních fragmentů) a PCR (polymerase chain reaction / polymerázová řetězová reakce). DNA zkoumaných vzorků je štěpena dvěma různými restričními enzymy. K restričním fragmentům jsou ligací připojeny oligonukleotidové adaptory, zkonstruované tak, aby nedošlo k obnově původního místa restrikce. Následně je pomocí dvou PCR s využitím specifických primerů selektována část vzniklých fragmentů. Produkty PCR jsou nakonec rozděleny

elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Principem metody je sledování přítomnosti nebo nepřítomnosti fragmentu vybrané délky.

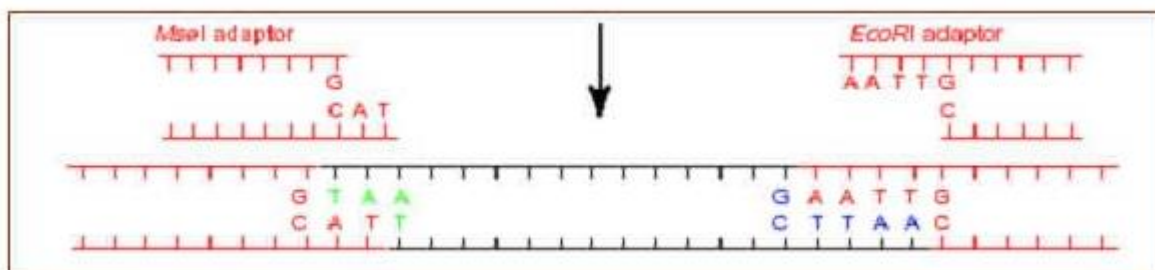
3.3.1.1 Princip metody

Prvním krokem metody AFLP je restrikce, což je specifické rozštěpení genomové DNA dvěma restrikčními endonukleázami, a to enzymem MseI, který rozpoznává 4bp dlouhou sekvenci (TTAA), a enzymem EcoRI, rozpoznávající 6bp dlouhou sekvenci (GAATTC). Zmíněné restriktázy MseI a EcoRI štěpí DNA tzv. s přesahem (na koncích fragmentů vznikají jenovláknové přesahy několika bazí). Výsledkem je velké množství fragmentů DNA, přičemž jeden konec označen MseI a druhý enzymem EcoRI (Laboratoř molekulární biologie rostlin PŘF JU 2013).



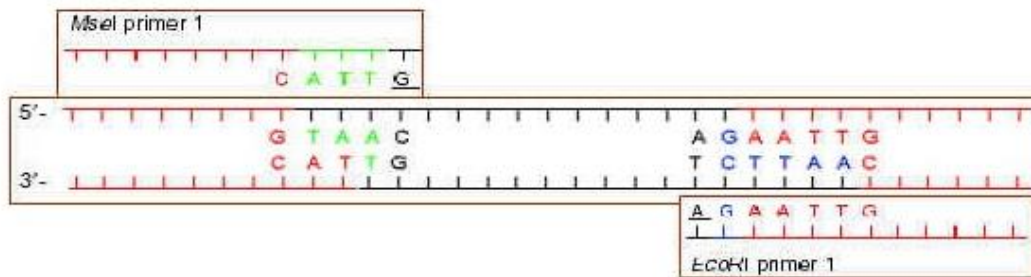
Obrázek 5 Restrikce. Zdroj: Katedra botaniky UK 2020.

Na volné konce vzniklé předchozí restrikcí se komplementárně vážou tzv. adaptory (krátké synteticky vytvořené úseky dvouřetězcové DNA, o známé sekvenci). Tuto fázi nazýváme ligace. Spojení ligačních adaptorů s konci fragmentů zajišťuje enzym T4 DNA ligáza. Výsledkem ligace je tedy přesné určení začátku a konce všech fragmentů DNA (Laboratoř molekulární biologie rostlin PŘF JU 2013).



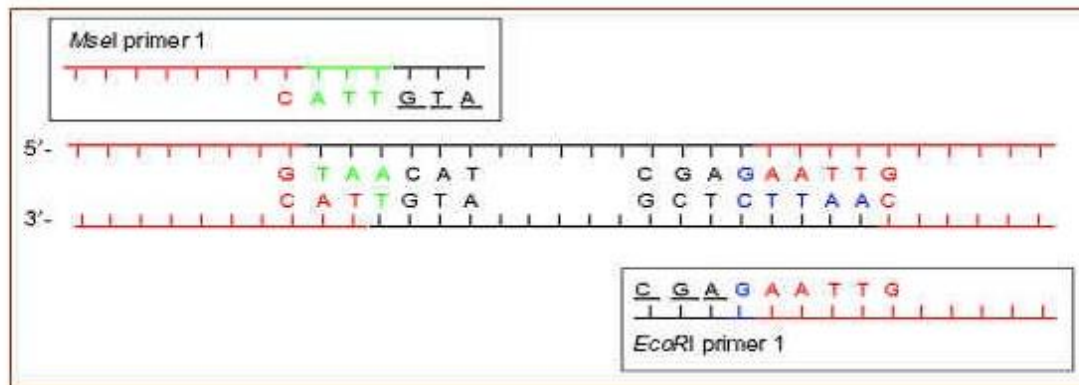
Obrázek 6 Ligace. Zdroj: Katedra botaniky UK 2020.

Po ligaci následuje tzv. preselektivní amplifikace (zkráceně preamplifikace), kdy probíhá reakce PCR s dvěma primery. Pomocí PCR můžeme je přidáním primerů namnožit počáteční sekvence získaných fragmentů. Velké množství fragmentů je však třeba redukovat na nižší počet. Primery mají sekvenci komplementární k sekvenci adaptorů, ale také obsahují jednu bázi navíc, a proto přesahují přímo do studovaného fragmentu. Výsledkem PCR reakce jsou fragmenty s MseI adaptorem na jednom konci a s EcoRI adaptorem na konci druhém. Prodloužením o jednu bázi je preamplifikována pouze 1/16 fragmentů (namnoží se pouze ¼ fragmentů mající na příslušném místě komplementární bázi, díky použití 2 primerů v preamplifikačním kroku tedy $1/4 \times 1/4$) (Laboratoř molekulární biologie rostlin PŘF JU 2013).



Obrázek 7 Preamplifikace. Zdroj: Katedra botaniky UK 2020.

Vzniklých fragmentů je po preamplifikaci stále příliš mnoho, a k vyhodnocení je třeba jejich počet dále zredukovat. Preselektované fragmenty tedy vstupují do druhé, tzv. selektivní amplifikace, ve které jsou použity primery komplementární k adaptorům prodloužené třemi selektivními nukleotidy, s přesahy opět do studovaných fragmentů. Tímto procesem je počet fragmentů znovu redukován (amplifikována je pouze 1/256 fragmentů - $1/16 \times 1/16$). EcoRI primery jsou značené fluorescenčně, což umožňuje separaci fragmentů v automatickém sekvenátoru (fragmentační analýza), kde jsou fragmenty po přidání fluorescenčně značeného standardu rozděleny dle délky (Laboratoř molekulární biologie rostlin PŘF JU 2013).



Obrázek 8 Amplifikace Zdroj: Katedra botaniky UK 2020.

3.3.1.2 Využití metody

AFLP lze použít díky možnosti detekovat variabilitu na nízkých úrovních pro studium následující problematiky (Katedra botaniky UK, 2020).

1. **Definice klonů**, při které je velmi vhodnou metodou, která jednoznačně určí genotyp zkoumaných organismů.
2. **Populačně-genetické studie**, a to zjišťování vnitropopulační a mezipopulační variability a diverzity, fylogeografické studie a určení podobností mezi populacemi (využití pro studium prostorového šíření rostlin).
3. **Analýza rodičovství**.
4. **Systematika** (fylogeneze aj.), při které může ovšem nastat problém homologie fragmentů. Čím podobnější jsou si taxony, tím je homologie pravděpodobnější.

Použití metody AFLP má několik výhod, a to vysoký stupeň polymorfismu, nepotřebnost předchozích znalostí o studovaném organismu a zachycení variability v celém genomu organismu. Nevýhodou metody je poměrně vysoká cena, požadavky na kvalitu DNA, časová náročnost metody, zajištění přesných reakčních podmínek při restrikci i PCR, nejistá homologie a různá intenzita získaných fragmentů aj.

4 MATERIÁL A METODY

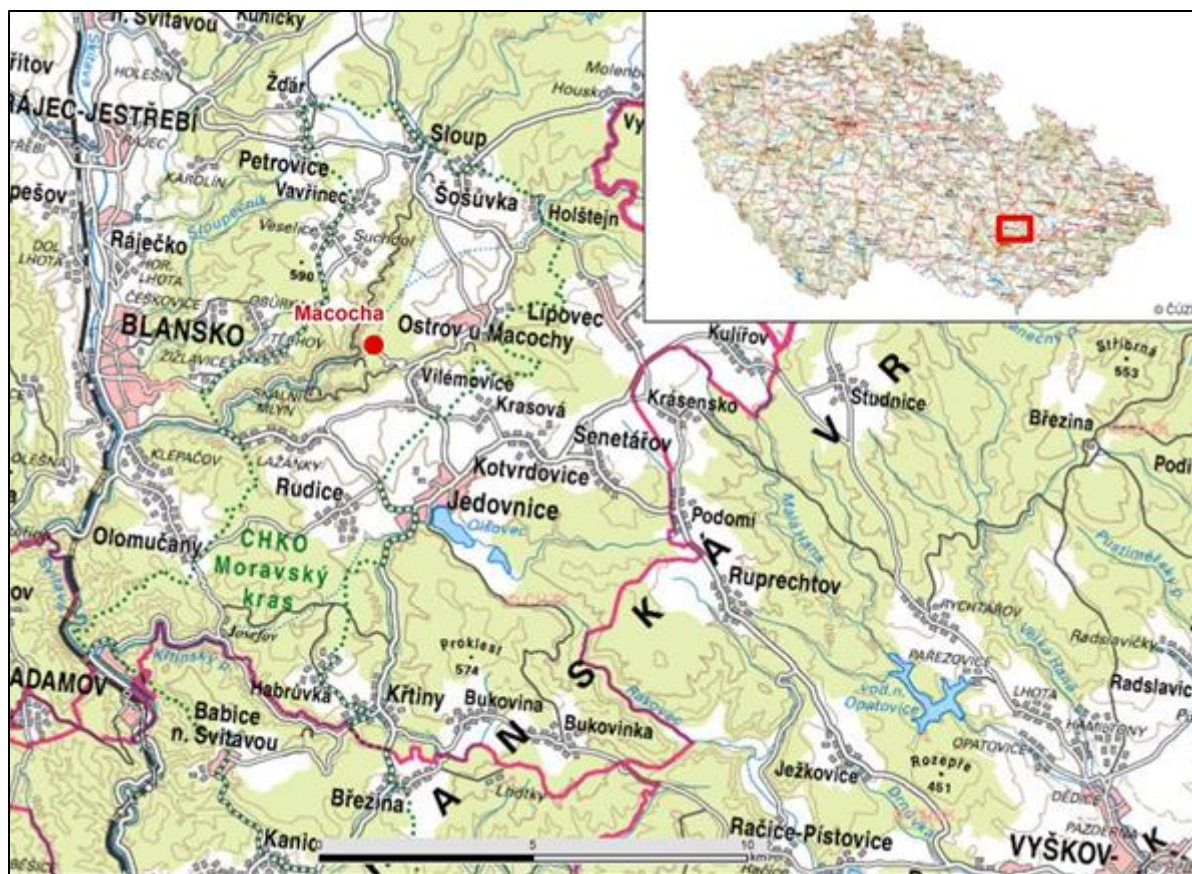
4.1 Klíčení a růst kruhatky v *in vitro* podmínkách

První částí provedeného výzkumu bylo sledování klíčivosti a následný růst rostlin *Cortusa matthioli*. Rostlinný materiál byl získán v rámci výměny Index Seminum ze 2 botanických zahrad, z estonského Tartu a chorvatského Záhřebu. Semena byla podrobena klíčivosti v různých teplotních podmínkách, a to jak v chladících boxech (klíčidlech) Katedry botaniky UP (v cyklech 14-7 °C a 25-15 °C), tak v prostředí s pokojovou teplotou. Následně byly mladé rostliny přesazeny a umístěny do různých prostředí ke sledování dalšího růstu.

4.2 Studium genotypové variability populace kruhatky v Macoše

4.2.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál k výzkumu byl pořízen skupinou dobrovolníků dne 27.8. 2013, a to při příležitosti zjišťování aktuálního počtu jedinců kruhatky Matthioliho moravské v lokalitě propasti Macocha. Materiál k výzkumu byl sbírán z různých částí skalních stěn propasti a následně odborně konzervován a uchován panem Mgr. Zdeňkem Špiškem, Ph.D. Seznam takto pořízených vzorků a jejich charakter je uveden v Tabulce 6. Vzorek s označením 52 byl, z důvodu dostatečného množství přebývajícího materiálu, pro kontrolu při výzkumu duplikován (v tabulce označen číslem 52*).



Obrázek 9 Lokalizace propasti Macocha. Zdroj mapových podkladů: ČÚZK, vlastní zpracování.

Tabulka 6 Rostlinný materiál pro AFLP. Množství udává hmotnost použitého rostlinného pletiva, charakter popisuje, ze kterých částí listů byla DNA získána.

VZOREK	MNOŽSTVÍ [mg]	CHARAKTER
CM 1	17	list + řapík
CM 2	8	řapík
CM 3	18	list
CM 4	9	řapík
CM 13	17	list
CM 14	20	list
CM 17	15	řapík + list
CM 18	20	řapík + list
CM 21	20	list
CM 31	19	list
CM 32	19	list
CM 43	21	list
CM 44	16	řapík + list
CM 46	20	list
CM 47	20	list
CM 48	20	list
CM 49	17	list
CM 51	18	řapík + list
CM 52	18	list
CM 52*	20	list

4.2.2 Extrakce DNA

Extrakce DNA byla provedena s využitím kitu DNeasy od Qiagen, dle doporučeného protokolu. Doporučené množství 20 mg nebylo možné vždy získat, přesný přehled použitého množství rostlinného pletiva shrnuje Tabulka 6. Kousky rostlinného pletiva byly vloženy do 2 ml mikrozkušavky, ke kterému byly vždy přidány 3 sterilní skleněné kuličky. Takto připravené vzorky byly homogenizovány pomocí homogenizátoru (Retsch Mixer Mill) o frekvenci 30 Hz po dobu 3,5 minuty. K výslednému homogenizátu bylo přidáno 400 μ l pufru AP1, který extrahuje DNA z nadrceného vzorku a rozbije RNA, a 4 μ l RNase A. Vzorky byly po důkladném zvortexování přeneseny na vyhřívaný termoblok s třepačkou a inkubovány (65 °C, 40 minut). Po inkubaci bylo k lyzátu přidáno 130 μ l pufru P3 a směs byla ponechána na ledu po dobu 5 minut. Takto připravená směs byla následně přefiltrována přes filtr, který byl umístěn ve 2ml zkumavce, a centrifugována při 14 000 RPM a 10 °C po dobu 5 minut. Po centrifugaci bylo

extrahováno 400 µl vzniklého roztoku do čistých Eppendorf zkumavek, a to bez odstředěných nečistot. Následovala další centrifugace (14 000 RPM, 2 min, 4 °C). Po centrifugaci se ve vzorcích opět vyskytovali v menší míře nečistoty, proto bylo 350 µl opět přepipetováno do čistých Eppendorf zkumavek a následně promíchán se zředěným pufrům AW1 (525 µl). Po promíchání bylo extrahováno 650 µl výsledné směsi a roztok byl centrifugován ve zkumavkách, a to 1 minutu při 4 °C a 8 000 RPM. Po centrifugaci bylo k roztoku přidáno zbylé množství směsi (225 µl) a následovala další centrifugace, trvající opět 1 minutu při 4 °C a 8 000 RPM. Vzniklý roztok byl po přidání pufru AW2 dvoufázově promýván. (přidáním 500 µl AW2, centrifugace 1 minutu při 4 °C a 8 000 RPM; po centrifugaci přidáno opět 500 µl AW2, centrifugace 2 minuty při 4 °C a 14 000 RPM). Následně byl do roztoku napipetován pufr AE, a to ve dvou, po sobě následujících identických krocích: 100 µl AE -> klidová fáze 5 minut při pokojové teplotě – slouží k rozpuštění DNA -> centrifugace (1 min, 4 °C, 8 000 RPM) -> opakování procesu.

Koncentrace DNA byla orientačně stanovena na přístroji (spektrofotometru) Nanodrop 2000 (ThermoScientific).

Koncentrace DNA byla po extrakci nízká, proto byla precipitací a následným rozpouštěním v menším množství roztoku získána koncentrace vyšší. To zahrnovalo následující postup. Do extrahovaných vzorků byl přidán vychlazený 96% Ethanol (400 µl) a následně byl koncentrát ponechán přes noc v lednici při +4 °C.

Druhého dne bylo zahájeno promývání vzorků EtOH. Nejprve byly vychlazené vzorky 15 minut centrifugovány při 4 °C a 13 000 RPM. Následně byl roztok ze zkumavek opatrně odlit a byla ponechána pouze DNA rostlin. Do každé Eppendorf zkumavky bylo přidáno 1 000 µl 80% EtOH a vzorky opět podstoupily centrifugace, v tomto případě na 10 min, při 10 °C a 13 000 RPM. Přebytečná tekutina byla opět odlita, vyjímaje rostlinné DNA. Stejným způsobem proběhla také poslední centrifugace izolace DNA, tentokrát ale s 70% EtOH. Promytý pelet byl ponechán k volnému proschnutí (60 minut do lehce mléčné barvy) a rozpuštěn v 40 až 100 µl TE pufru (10 mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM). Kvalita izolátů byla stanovena spektrofotometricky (NanoDrop 2 000).

4.2.3 AFLP

Protokol metody AFLP byl použit podle Kitner a kol. (2012), který byl v minulosti na katedře botaniky aplikován na různé druhy rostlin. Detailní popis metody je uveden v úvodu.

Pro AFLP analýzy byly nejdříve použity vzorky s předpokládanou koncentrací 5 ng μ l⁻¹. Druhé testování proběhlo s koncentrací DNA 10 ng μ l⁻¹ (hodnota stanoveno podle přibližných hodnot ze spektrofotometru).

4.2.3.1 Restrikce

Prvním krokem restrikce (a AFLP celkově) je příprava a napipetování restrikčního mixu k DNA a inkubace vzorků na termobloku (37 °C, 2,5 hodiny). Izolované vzorky DNA (koncentrace 40 ng $\cdot\mu$ l⁻¹) byly uchovávány v lednici po dobu potřebnou k promíchání s restrikčním mixem. Restrikce byla provedena v následujících krocích:

1. Příprava restrikčního mixu pro daný počet vzorků, – viz. tab. 7.
2. Promíchání restrikčního mixu a rozpipetování mixu (13,75 μ l/10,00 μ l) do předem připravených sterilních PCR stripů.
3. Přidání 6,25/10,00 μ l DNA -> výsledný objem směsi je tedy 20 μ l.
4. Promíchání a centrifugace stripů na stolní centrifuze.
5. Přemístění plných stripů do termocykleru a inkubace mixu 2,5 hodiny při 37 °C.

Tabulka 7 Protokol přípravy restrikčního mixu (uvedené objemy platí pro 1 vzorek).

LÁTKA	RESTRIKCE I.		RESTRIKCE II.			
	OBJEM [μ l]	OBJEM PCR MIXU PRO PIPETOVÁNÍ [μ l]	1. sada vzorků		2. sada vzorků	
			OBJEM [μ l]	OBJEM PCR MIXU PRO PIPETOVÁNÍ [μ l]	OBJEM [μ l]	OBJEM PCR MIXU PRO PIPETOVÁNÍ [μ l]
ddH ₂ O	11,562		11,562		7,812	
EcoRI BUFF	2,000		2,000		2,000	
EcoRI enzym	0,063		0,063		0,063	
MseI enzym	0,125	13,750	0,125	13,750	0,125	10,000
DNA	6,250	6,250	6,250	6,250	10,000	10,000
CELKEM	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000	20,000

4.2.3.2 Ligace

Před uplynutím doby inkubace (cca 25 minut) byla provedena příprava ligačního mixu, který se poté přidal ke vzorkům po restrikci. Proces ligace:

1. Příprava ligačního mixu dle protokolu – viz tab. 8.
2. Promíchání ligačního mixu.
3. Přidání mixu (5 μ l) do PCR stripů připravených v předchozím kroku.
4. Inkubace stripů na termocycleru po dobu 3 hodin při 37 °C.

Tabulka 8 Protokol přípravy ligačního mixu (uvedené objemy platí pro 1 vzorek).

LÁTKA	LIGACE I.		LIGACE II.	
	OBJEM [μ l]	OBJEM PCR MIXU PRO PIPETOVÁNÍ [μ l]	OBJEM [μ l]	OBJEM PCR MIXU PRO PIPETOVÁNÍ [μ l]
ddH ₂ O	3,000		3,000	
Ligase BUFF	0,500		0,500	
EcoRI adapter	0,500		0,500	
MseI adapter	0,500		0,500	
Ligase enzym	0,500	5,000	0,500	5,000

4.2.3.3 Preselektivní amplifikace

Matricí pro PCR je neředitelný produkt restrikce a ligace (Adaptor/Ligation Solution). Proces preamplifikace je následovný:

1. Příprava mixu dle protokolu – viz tab. 9.
2. Promíchání směsi a následné rozpipetování po 18 μ l do připravených PCR stripů.
3. Přidání 2 μ l produktu restrikce/ligace.
4. Promíchání mixu a krátká centrifugace na stolní centrifuze.
5. Přemístění PCR stripů do cykleru a spuštění nastaveného programu pro preselektivní amplifikaci (1:25 hod).

Tabulka 9 Protokol přípravy mixu pro preamplifikaci (uvedené objemy platí pro 1 vzorek).

LÁTKA	PREAMPLIFIKACE I.		PREAMPLIFIKACE II.	
	OBJEM [μl]	OBJEM PCR MIXU PRO PIPETOVÁNÍ [μl]	OBJEM [μl]	OBJEM PCR MIXU PRO PIPETOVÁNÍ [μl]
ddH ₂ O	11,850		11,300	
buffer dodaný s polymerázou (5x)	4,500		4,000	
dNTP (orig)	0,500		1,600	
EcoA*primer	0,500		0,500	
Msel*primer	0,500		0,500	
goTaq Polymerasa	0,150	18,000	0,100	18,000
Adaptor/Ligation Solution	2,000	2,000	2,000	2,000
CELKEM	20,000	20,000	20,000	20,000

Mix byl po preselektivní amplifikaci 7 x naředěn (5 μl směsi + 30 μl sterilní ddH₂O). Takto zředěný roztok byl použit jako matrice pro následné selektivní PCR amplifikace. Zbytek nenaředěného vzorku byl zmrazen a uchován jako záloha.

4.2.3.4 Selektivní amplifikace

Matricí pro selektivní amplifikaci byl již připravený 7x naředěný produkt preselektivní amplifikace. Proces provedení amplifikační reakce:

1. Příprava mixu dle protokolu – viz tab. 10, použití více primerových kombinací dle tab. 11.
2. Promíchání směsi a rozpipetování po 8 μl do PCR stripů.
3. Přidání 2 μl naředěného preamplifikátu.
4. Promíchání a krátká centrifugace na stolní centrifuze.
5. Přemístění PCR stripů do cykleru a spuštění nastaveného programu pro selektivní amplifikaci (0:49 hod).

Tabulka 10 Protokol přípravy mixu pro selektivní amplifikaci (uvedené objemy platí pro 1 vzorek).

LÁTKA	AMPLIFIKACE I.		AMPLIFIKACE II.	
	OBJEM [μl]	OBJEM PCR MIXU PRO PIPETOVÁNÍ [μl]	OBJEM [μl]	OBJEM PCR MIXU PRO PIPETOVÁNÍ [μl]
ddH ₂ O	3,740		4,150	
Buffer (5x)	2,000		2,000	
dNTP (orig)	0,200		0,800	
EcoA***primer	1,000		0,500	
Msel***primer	1,000		0,500	
goTaq	0,060	8,000	0,050	8,000
preamplifikát (7x zředěný)	2,000	2,000	2,000	2,000
CELKEM	10,000	10,000	10,000	10,000

Tabulka 11 Použité primerové kombinace pro selektivní amplifikaci.

AFLP I.		AFLP II.	
KOMBINACE	PRIMERY	KOMBINACE	PRIMERY
1.	E1+M8 CTT	1.	E2+M1
2.	E1+M931	2.	E2+M8 CTT
3.	E3+M8 CTT	3.	E4+M1
4.	E3+M931	4.	E4+M8 CTT

4.3 Kontrola úspěšnosti AFLP elektrolyzou

Kontrola úspěšnosti AFLP proběhla během výzkumu několikrát, zejména pak při jejím druhém provedení. Při AFLP I. proběhlo ověření po selektivní amplifikaci. Ověření proběhlo na 1,2 % agarózovém gelu v TBE pufru (0,5 TBE). Agarózový gel s plastovými hřebínky byl ponechán k volnému zatuhnutí při pokojové teplotě 1 hodinu. Následně bylo do vzniklých prohlubní po odstranění hřebíků napipetováno 4 μl směsi po selektivní amplifikaci spolu s 2 μl nanášecího pufru. Gel byl poté vystaven elektrolyze (100 V, 40 min). Za pozitivní výsledek o úspěšnosti AFLP se považuje detekce „šmouhy“ amplifikovaných bandů. Výsledky byly ale po prvním pokusu nedostačující. Na vině mohla být nízká koncentrace DNA vzorků, se kterou bylo pracováno v rámci AFLP I.

Kontrola zopakované AFLP metody byla provedena dvoufázově, a to ihned po ligaci a následně po selektivní amplifikaci. V případě kontroly po ligaci bylo do každé prohlubně napipetováno 3 μl ligační směsi spolu s 2 μl nanášecího pufru. Gel byl poté vystaven elektrolyze (150 V, 20 min). Po proběhlé selektivní amplifikaci bylo napipetováno v rámci 2 μl

směsi obsahující DNA spolu s 2 μ l nanášecího pufru, a to pouze do prohlubní po jednom hřebínku. Následná elektrolýza trvala 40 minut při 100 V.

4.4 Fragmentační analýza

Separace AFLP produktů byla provedena na přístroji Thermo OWL S3S. Pro detekci separovaných AFLP fragmentů byl použit mírně upravený protokol Bassam a kol. (1991). Celý postup byl proveden v těchto krocích:

Prvním krokem byla příprava denaturačního PAA gelu dle následujícího postupu:

1. Řádné očištění malého skla, nejprve vodovodní H₂O, poté ddH₂O -> ošetření ethanolem (otření skel do sucha) -> přetření skel přípravkem na odpuzování vody (Rain Repellent), rozetření po obvodu směrem do středu -> ponechání ošetřeného skla k volnému schnutí.
2. Řádné očištění velkého skla s přilepeným gelem (omytí obou stran kartáčem za použití saponátu, opláchnutí vodovodní H₂O a posléze ddH₂O) -> otření do sucha -> přenesení skla do digestoře na polystyrenové víko.
3. Ošetření velkého skla silanem (1 ml kys. Octové v 96% ethanolu + 3 μ l silanu) – nalití směsi na sklo, rozetření pap. utěrkou od krajů do středu, ponechání 5 min k proschnutí a výměna rukavic za čisté, aby nedošlo ke kontaminaci -> po 5 minutách 4x rychle přetřít EtOH.
4. Položení spacerů na hrany ošetřeného velkého skla a následné přiklopení malého skla na umístěné spacery. Fixace skel svorkami.
5. Příprava směsi ze 70 ml 6% zásobního roztoku akrylamidu, 467 μ l 10% roztoku peroxidisíranu amonného a 46,7 μ l TEMEDU.
6. Natáhnutí roztoku do stříkačky a následné plnění prostoru mezi skly -> vsunutí hřebínku po naplnění celé plochy směsí a další fixace -> 60 minut ponecháno volně stát.
7. Po hodině stání omýtí skla, hřebínku a okolí nalévacího prostoru kartáčem -> upnutí skla do přístroje a vytáhnutí hřebínku -> nalití pufru 0,5xTBE -> vypláchnutí třídačkou místa, kde bývají umístěny vzorky.
8. Nastavení 75 W, max. proud a napětí (2 000 V, 120 mA) na 50 minut.

9. Denaturace vzorků: 10 minut předem nahřátí temocykleru na 96 °C -> smíchání 1 dílu vzorku a ½ dílem denaturačního pufru s formamidem 5 minut před nanesením na gel -> přenesení vzorků na vytemperovaný blok na 3 minuty -> po 3 minutách umístění vzorků do ledu. Během denaturace vypnutí zdroje stejnosměrného elektrického proudu, odpojení katody, otevření katodového prostoru a znovu vyčistění mezery pro hřebínek pufrům z injekční stříkačky -> vsunutí hřebínku asi 1 mm hluboko do gelu.
10. Nanášení vzorků osmikanálovou pipetou do mezer mezi zoubky hřebínku.
11. Připojení ke zdroji napětí (60 W) a sledování separace pomocí barviv v nanášecím pufru (bromfenolová modř a xylenová modř).

Během separace byl připraven FIX/STOP roztok (132 ml CH₃COOH doplněno do 1 200 ml ddH₂O), 1% HNO₃ (18 ml koncentrované kys. pomalu nalito do 1 000 ml ddH₂O, a poté doplněno do 1 200 ml), 0,1% AgNO₃ (1,2 g dusičnanu rozpuštěno v 1 000 ml ddH₂O, následně doplněno do 1 200 ml) a VÝVOJKA = 3% Na₂CO₃. Po uplynutí doby elektroforetického dělení vzorků došlo k vypnutí zdroje stejnosměrného elektrického proudu, odpojení elektrod a odtečení pufru z katodové části do sběrného prostoru pomocí připevněné odvodní trubičky. Po tomto kroku byla skla s gelem vyjmuta a po odstranění hřebínku a spacerů oddělena nožem. Takto uvolněné velké sklo s gelem bylo položeno do předem připravené fotomisky na třepačce, gelem nahoru.

Druhým krokem fragmentační analýzy bylo barvení stříbrem, dle připraveného protokolu v laboratoři Katedry botaniky PŘF UPOL:

1. Sklo, uložené ve fotomisce, bylo zalito FIX/STOP roztokem -> 20minutová doba působení roztoku za stálého míchání (70-90 ot/min).
2. Slití FIX/STOP roztoku do baňky.
3. Promytí skla, uloženého v čisté nádobě, ddH₂O (3x á 1-2 min).
4. Promytí skla o délce 5 minut v 1% roztoku HNO₃.
5. Opětovné promytí skla, uloženého v čisté nádobě, ddH₂O (3x).
6. Umístění skla do fotomisky na třepačce.
7. Přidání 0,1% roztoku AgNO₃, doba působení 30 minut -> nalití roztoku do zásobní láhve.
8. Ponoření skla s gelem do ddH₂O po dobu 5 vteřin a uložení skla do fotomisky.

9. Zalití připraveného skla s gelem VÝBOJKOU = 3% Na₂CO₃, pokračování v míchání, dokud nebude gel zabarven.
10. Zastavení vývoje zabarvení FIX/STOP roztokem.
11. Odstranění skla s gelem z fotomisky, slití roztoku do zásobní láhve.
12. Ponoření skla na 2 minuty do misky s ddH₂O.
13. Přenesení skla do sušárny -> sušení 1 hodinu při 60°C.

Takto připravené sklo bylo popsáno fixem k identifikaci a bylo připraveno k dalšímu vyhodnocení. Posledním krokem bylo statistické vyhodnocení zjištěných informací pomocí programu R s využitím knihoven gg dendro a ggplot2 (Wickham 2016).

5 VÝSLEDKY

5.1 Klíčení

Do každého prostředí bylo 30. května 2019 do připravených nádob s perlitem umístěno stejné množství semen z obou výše zmíněných lokalit – Tartu a Záhřeb. Klíčivost zasazených semen vykazala stejnou aktivitu bez ohledu na teplotní režim prostředí, a zároveň bez ohledu na lokalitu původu. Nejzdatnější z mladých rostlin byly po 5 měsících (21. října) experimentálně přesazeny do větších nádob se zásaditým substrátem, a umístěny do 3 různých prostředí. Část takto přesazených rostlin (12 jedinců) byla ponechána ve skleníku náležící Katedře botaniky. Druhá část rostlin byla šetrným způsobem převezena do domácího prostředí. Sedm rostlin bylo umístěno do teplejší sporadicky větrané místnosti bytu na okenní parapet, dalších devět pak do chladnější, velmi často větrané místnosti, taktéž na okenní parapet.



Obrázek 10 Přesazování jedinců *Cortusy Matthioli*. 21. října 2019. Zdroj: vlastní fotografie.

Během zimních měsíců došlo k předpokládanému úhynu všech jedinců, a to nejprve v teplejší místnosti, dále pak ve skleníku katedry a jako poslední uhynuly i jedinci umístění v chladné místnosti.

Výsledkem provedeného experimentu bylo potvrzení skutečnosti, že umělé pěstování a udržení populace *Cortusy* je velmi obtížné, nemluvě o snaze samovolné reprodukce rostlin. Druh je pravděpodobně velmi silně vázaný na specifické klima, vodní režim a taktéž na složení půdy.

5.2 Extrakce DNA

Výsledkem primární izolace kitem DNeasy od Qiagen byla u většiny vzorků poměrně nízká koncentrace DNA, množství DNA bylo ovšem dostačující pro zvýšení koncentrace precipitací. Výsledky měření hodnoty koncentrací DNA jsou shrnuty v tabulce 12.

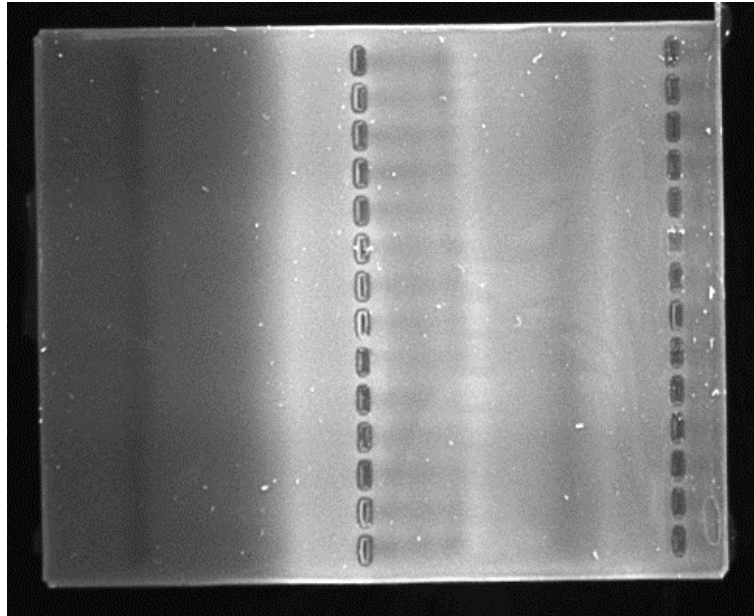
Tabulka 12 Koncentrace DNA po izolaci, po precipitaci a postup ředění koncentrace DNA.

ID VZORKU	PRIMÁRNÍ KONCENTRACE DNA [mg/μl]	VÝSLEDNÁ KONCENTRACE DNA PO PRECIPITACI [mg/μl]	ŘEDĚNÍ DNA		
			Ratio1	Objem 30 μl, konc 40 ng/μl	H ₂ O [μl]
CM 1	10,7	69,1	0,578871201	17,4	12,6
CM 2	8,6	38,9	1,028277635	30,8	-0,8
CM 3	14,9	55,4	0,722021661	21,7	8,3
CM 4	12,9	64,2	0,62305296	18,7	11,3
CM 13	8,5	44,9	0,890868597	26,7	3,3
CM 14	16	52,3	0,764818356	22,9	7,1
CM 17	10,3	72,9	0,548696845	16,5	13,5
CM 18	10,6	53,3	0,750469043	22,5	7,5
CM 21	20,9	54,0	0,740740741	22,2	7,8
CM 31	11,6	46,5	0,860215054	25,8	4,2
CM 32	6,5	39,3	1,017811705	30,5	-0,5
CM 43	23,2	75,2	0,531914894	16	14
CM 44	16,3	59,8	0,668896321	20,1	9,9
CM 46	41,1	68,2	0,586510264	17,6	12,4
CM 47	9	75,9	0,527009223	15,8	14,2
CM 48	22,4	55,7	0,718132855	21,5	8,5
CM 49	13,2	58,7	0,681431005	20,4	9,6
CM 51	13,7	77,5	0,516129032	15,5	14,5
CM 52	15,7	67,1	0,596125186	17,9	12,1
CM 52*	27,3	85,4	0,468384075	14,1	15,9

Dalším krokem bylo ředění vzorků destilovanou H₂O na předem určenou koncentraci 40 ng/μl, viz tabulka č. 11. Do celkového objemu jednotlivých zkumavek bylo napipetováno množství DNA a dH₂O, dle stanoveného poměru. Ve dvou případech musel být poměr dodatečně poupraven, a to konkrétně u vzorku cm_2 a cm_32, kdy do příslušné Eppendorf zkumavky obsahovali dále neředěnou DNA (podíl dH₂O stanoven na hodnotu 0).

5.3 Průběh AFLP reakcí

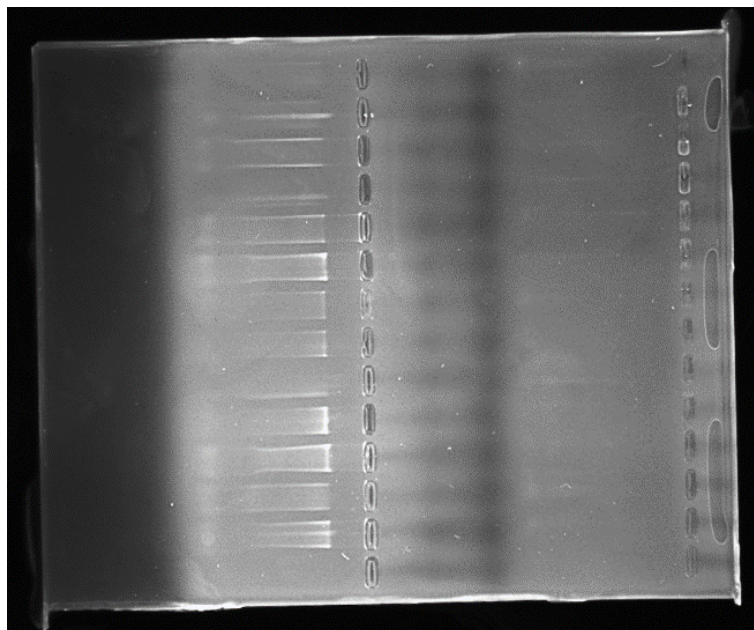
Kontrola na agarózovém gelu ukázala úspěšnost jednotlivých kroků AFLP reakcí. První AFLP reakce nebyla úspěšná a výsledek po první selektivní amplifikaci ukázal jen nízkou koncentraci DNA v reakci, viz obr. 11.



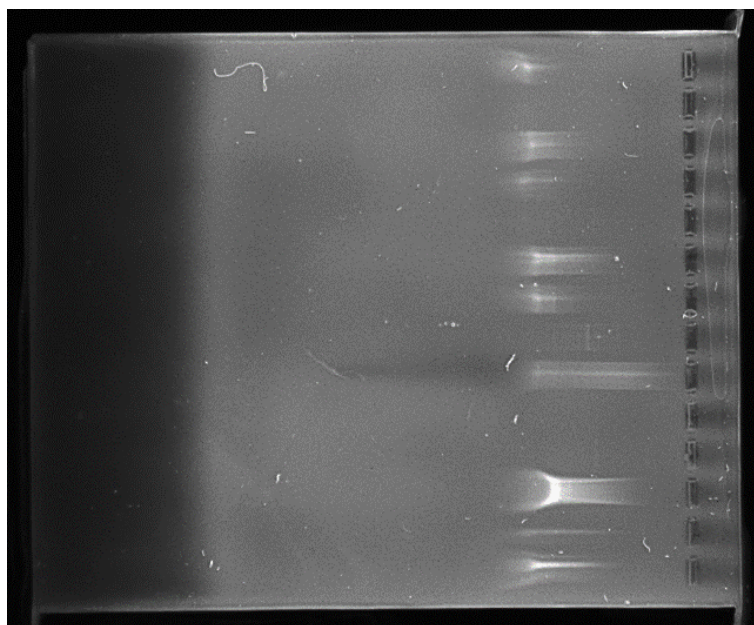
Obrázek 11 Kontrola AFLP I. po selektivní amplifikaci na agarosovém gelu.

Za pozitivní výsledek o úspěšnosti AFLP se považuje detekce „šmouhy“ amplifikovaných bandů. Výsledky byly ale po prvním pokusu nedostačující, výsledek nebyl zřetelně patrný. Na vině mohla být nízká koncentrace DNA vzorků, se kterou bylo pracováno v rámci AFLP I. Po elektrolýze na gelu byla i přes to provedena fragmentová analýza, která taktéž nepřinesla žádné výsledky.

Kontrola znovu proběhnuté AFLP metody byla provedena dvoufázově, a to ihned po ligaci a následně po selektivní amplifikaci. Obě kontroly proběhly částečně úspěšně, separace na agarosovém gelu potvrdila úspěšný průběh reakcí, viz obrázek 12 a 13.



Obrázek 12 Kontrola průběhu AFLP II. po ligaci na agarosovém gelu.



Obrázek 13 Kontrola průběhu AFLP II. po selektivní amplifikaci na agarosovém gelu.

5.4 Fragmentační analýza

Fragmentační analýza pro první testovanou primerovou kombinaci byla zcela neúspěšná a nebyly pozorovány žádné fragmenty AFLP. Pravděpodobnou příčinou je kombinace 2 faktorů: velmi nízká koncentrace DNA fragmentů po AFLP a zároveň nedostatečné nabarvení těchto fragmentů při fragmentační analýze na PAGE.

Fragmentační analýza druhého testování AFLP byla úspěšnější a podařilo se vizualizovat fragmenty AFLP pro 4 primerové kombinace (E1-M8, E2-M8, E4-M1 a E4-M8). Ani druhá proběhlá fragmentační analýza neposkytla kvalitní výsledek. Podařilo se získat pouze gel s velmi slabě vizualizovanými fragmenty AFLP. Jako hlavní příčinu lze pravděpodobně považovat malé množství napipetovaného množství roztoku s AFLP fragmenty (s původním cílem uchovat část pro případnou kontrolní fragmentační analýzu). I přesto, že byly separované fragmenty velmi slabé, bylo možné je (byť s obtížemi) odečíst a oskórovat kombinací odečítáním na čtečce a vizualizací po naskenování a zvýšení kontrastu.

Původním plánem bylo ve spolupráci se školitelem fragmentační analýzu zopakovat a získat zřetelnější výsledek, ale vzhledem k omezením plynoucím z SARS-2 pandemie nebylo možné tento plán uskutečnit.

5.5 Výsledky AFLP a jejich interpretace

Fragmentační analýza ukázala, že neproběhly reakce úspěšně pro všechny a vzorky a všechny primerové kombinace. Výsledky jsou k dispozici k nahlédnutí ve volné příloze. Pro některé vzorky neproběhla reakce opakovaně pro více primerových kombinací (vzorek 52), pro jiné vzorky reakce proběhla jen u některých primerových kombinací. Pouze v případě 7 vzorků proběhla AFLP reakce (nebo byly detekovány fragmenty na PAGE), tj. u vzorků 1, 13, 17, 18, 43, 51 a 52*. Vzhledem k absenci kontroly nelze jednoznačně říci, zda je příčinou absence fragmentů problém reakcí AFLP nebo špatná fragmentační analýza. Počty neúspěšných reakcí, a také počty zjištěných alel jsou shrnuty v tabulce 13.

Tabulka 13 Počet zjištěných alel a neúspěšných reakcí fragmentační analýzy

Kombinace primerů	Počet zjištěných alel	Počet neúspěšných reakcí
E2-M1	43	9
E2-M8	75	5
E4-M1	49	6
E4-M8	39	11
Celkem	206	31
E1-M8	0	20
E1-M931	0	20
E3-M8	0	20
E3-M931	0	20
Celkem	0	80

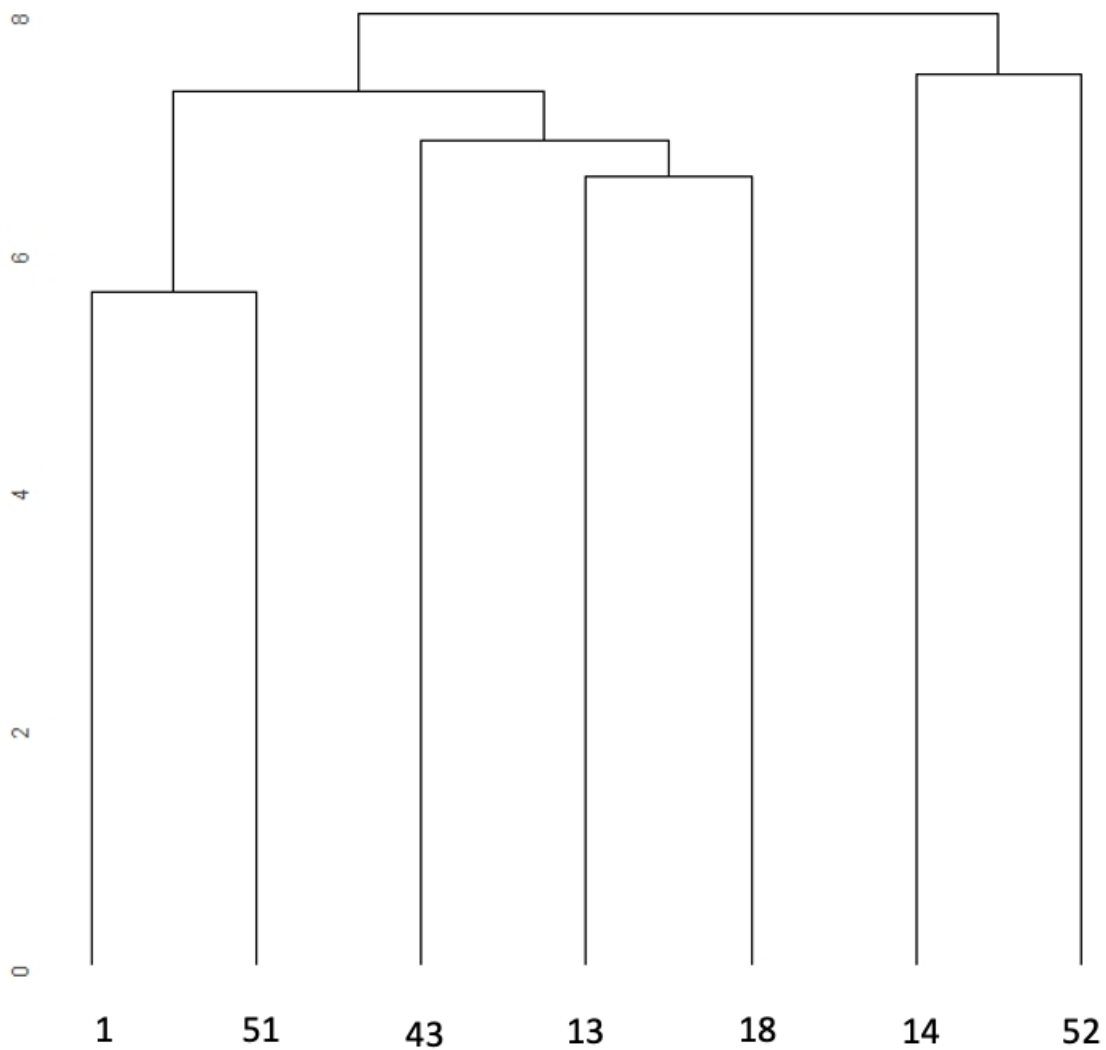
Počet detekovaných fragmentů (206) ukazuje na použitelnost zvolených kombinací primerů v dalších studiích. Při dostatečně velkém populačním vzorku by byla možné data signifikantně statisticky vyhodnotit.

Nedostatečný počet studovaných jedinců (pouze 19, přičemž po duplicitě 20 vzorků celkem) a malý počet kompletních profilů neumožňuje AFLP data statisticky vyhodnotit. Přesto lze z prvních pilotních dat, jejichž hlavním cílem bylo testování metodiky, vyčíst informaci o studované macošské populaci. Výsledná data ukazují, že jednotlivé rostliny nepředstavují klony, naopak jsou zřejmě geneticky dostatečně divergované. UPGMA analýzy (i přes nedostatečnosti dat pro takové analýzy) ukazují poměrnou genetickou variabilitu mezi studovanými jedinci.

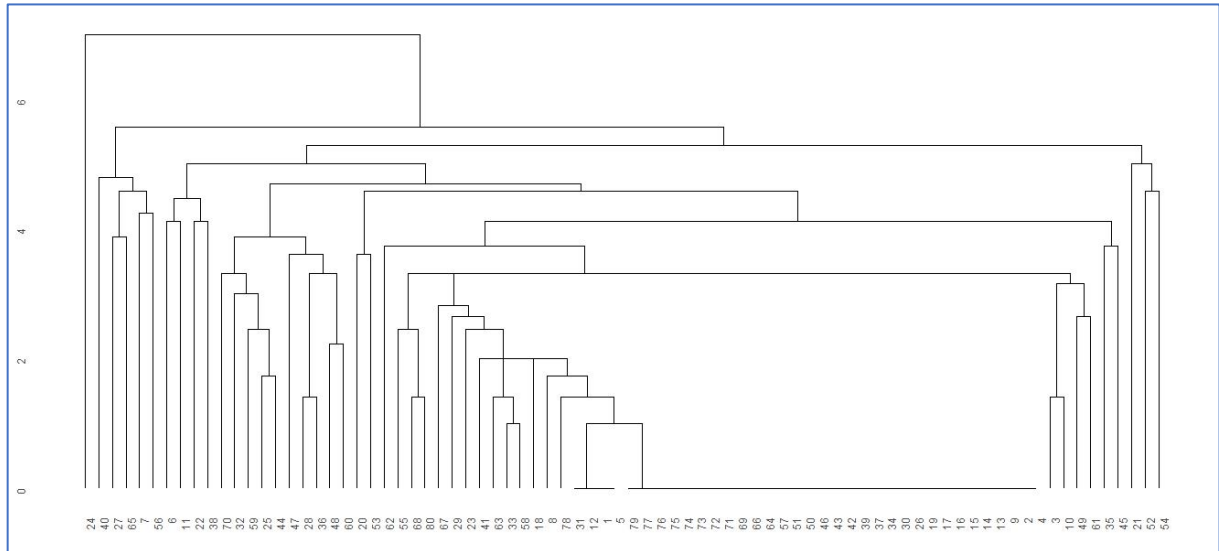
Shlukovací analýza pro 7 jedinců s kompletním profilem ve všech 4 primerových kombinacích ukazuje, že žádný jedinec není zcela shodný. Tato skutečnost je zobrazena v níže uvedeném obrázku 14. Vzhledem k tomu, že pouze u 7 jedinců šlo sloučit data ze všech 4 primerových kombinací, byla provedena také shlukovací analýza všech 20 vzorků (19 rostlin), rozdělená na 4 podskupiny podle primerů. Tato analýza ukazuje jen minimální podobnost mezi

vzorky. Jediný velký shluk vzorků v sobě zahrnuje profily bez úspěšné AFLP amplifikace (viz obrázek 15).

Obrázek 14 Dendrogram genetické podobnosti 7 rostlin s kompletním AFLP profilem ze všech 4 primerových kombinací.



Obrázek 15 Dendrogram genetické podobnosti 20 profilů (v pořadí jedinců 1, 2, 3, 4, 13, 14, 17, 18, 21, 31, 32, 43, 44, 46, 47, 48, 49, 51, 52 a 52*) pro primerovou kombinaci E2-M1 (čísla 1-20), E2-M8 (čísla 21-40), E4-M1 (čísla 41-60) a E4-M8 (čísla 61-80).



6 DISKUZE

Na základě výzkumů spojených s bakalářskou prací lze konstatovat, že pěstování a udržení populace *Cortusy* je velmi obtížné. Druh je pravděpodobně velmi silně vázaný na specifické klima, vodní režim a taktéž na složení substrátu. Tato vazba může nepříznivě ovlivňovat budoucí populace v propasti Macocha vzhledem k postupně měnícím se podmínkám prostředí.

V souvislosti s extrakcí DNA *Cortusy* bylo zjištěno, že extrakce pomocí běžných komerčních kitů se nejeví jako vhodná metoda extrakce DNA pro vzácné druhy rostlin z hlediska nedostatku materiálu. Qiagen DNA kity jsou známé vysokou kvalitou izolované DNA, ale současně její nízkou koncentrací. To může ovlivnit průběh metody AFLP. Tato metoda je obecně známá svou citlivostí na obsah DNA. To se potvrdilo i v případě prvního experimentu, kdy AFLP nebylo úspěšné, neboť DNA koncentrace stanovená pomocí spektrofotometru byla pravděpodobně výrazně menší, než značily naměřené hodnoty. Druhý experiment (s vyšším obsahem DNA) následně prokázal použitelnost stanovené metody. Kontrola jednotlivých kroků na agarózovém gelu potvrdila úspěšnost jednotlivých kroků AFLP, a to i přes to, že reakce neproběhla u všech vzorků. Následná fragmentační analýza potvrdila přítomnost fragmentů. I s nedostatečně kvalitním prvním PAGE gelem se podařilo identifikovat 206 různých fragmentů. Tento počet by již umožňoval, v případě vyššího počtu jedinců, základní statistické vyhodnocení. I přes to lze na základě provedeného výzkumu konstatovat, že první výsledky naznačují relativně geneticky variabilní populaci. Další potvrzení prvních výsledků se nepodařilo realizovat v důsledku opatření vlády proti šíření pandemie SARS-2 (nemoci Covid-19).

7 ZÁVĚR

Práce je zaměřena zejména na testování použitelnosti metody AFLP pro studium populace kruhatky v propasti Macocha. Populace je ve svém přirozeném prostředí v posledních letech postihována sníženou rozmnožovací schopností a následným úbytkem jedinců. Tato skutečnost vlivem silné vazby rostlin na specifické podmínky byla taktéž potvrzena provedeným výzkumem.

Zhodnocení získaných výsledků provedeného výzkumu ukázalo použitelnost výše zmíněné metody AFLP. I přes nedostatečně kvalitní PAGE gel se podařilo identifikovat celkem 206 různých fragmentů DNA. Výsledky naznačují, že populace kruhatky Matthioliho je v Macoše relativně geneticky variabilní. Pro přesnější vědecké zhodnocení by bylo ale vhodné ve studii pokračovat na rozsáhlejším populačním sběru, který by bylo možné statisticky vyhodnotit (například stanovit heterozygotnost/homozygotnost, tzn. míru inbreedingu, genetickou vzdálenost mezi jednotlivými druhy apod.). Bohužel po provedeném výzkumu nebylo možné stanovit základní populačně-genetické parametry z důvodu nedostatečného počtu analyzovaných jedinců a přesnější fragmentační analýzy. Nebylo možné nalézt ani jistý pattern ve vztahu mezi studovanými rostlinami. Výchozí předpokládána genetická variabilita ale přináší optimismus pro budoucí přežití druhu na studované lokalitě.

8 LITERATURA

- Anderberg A. A., Rydin C. & Kallersjo M. (2002): Phylogenetic relationships in the order *Ericales* s.l.: analyses of molecular data from five genes from the plastid and mitochondrial genomes. – *American Journal of Botany* 89: 677–687.
- APG (2016): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. – *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1–20.
- Arslan H., Kirmizi S., Guleryuz G. & Sakar F. S. (2011): Germination Requirements of *Androsace villosa* L. (*Primulaceae*). – *Acta Biologica Cracoviensia, series Botanica* 53: 32–36.
- Culek M. (1996): Biogeografické členění České republiky. – Enigma, Praha. ISBN 80-85368-80-3.
- Danihelka J. (2011): Kruhatka Matthiolova (*Cortusa matthioli*) v Sudetech aneb anti-Hendrych. – *Zprávy České Botanické Společnosti* 46: 251–263.
- Demek, J.; Mackovčín, P. et al. (2006). Hory a nížiny: Zeměpisný lexikon ČR. Vydání II. – AOPK ČR, Brno. 582 s., 1 CD. ISBN 80-86064-99-9.
- Chlupáč, I., et al. (2002): Geologická minulost České republiky. – Academia, Praha. ISBN 80-200-0914-0.
- Kitner M., Majeský Ľ., Gillová L., Vymyslický T. Nagler M. (2012): Genetic structure of *Artemisia pancicii* populations inferred from AFLP and cpDNA data. – *Preslia* 84: 97-120.
- Kobiv Y. (1999): *Cortusa matthioli* (*Primulaceae*) in the Chornohora Mts (Ukrainian Carpathians): Distribution, ecology, taxonomy and conservation. – *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 44: 355–374.
- Kovanda M. (1992): *Cortusa* L. – kruhatka. – In: Hejný S., Slavík B., Kirschner J. & Křísa B. (eds), *Květena České republiky* 3, p. 254–256, Academia, Praha.
- Litschmann T., Rožnovský J., Hebelka J. (2008): Hodnocení letního teplotního a vlhkostního profilu propasti Macocha. 16th International Poster Day „Transport of Water, chemicals and Energy in the System Soil – Plant – Atmosphere“, Bratislava. 315-324, ISBN 978-80-89139-16-3.

- Majeský, L., Vašut, R. & Kitner, M. (2015): Genotypic diversity of apomictic microspecies of the *Taraxacum scanicum* group (*Taraxacum* sect. *Erythrosperma*). - *Plant Systematics and Evolution* 301: 2105-2124.
- Majeský, L. , Vašut, R. , Kitner, M. & Trávníček, B. (2012): The pattern of genetic variability in apomictic clones of *Taraxacum officinale* indicates the alternation of asexual and sexual histories of apomicts. - *PLoS ONE* 7(8): e41868. doi: 10.1371/journal.pone.0041868.
- Morozowska M., Czarna A., Kujawa M., Jagodzinski A. (2010): Seed morphology and endosperm structure of selected species of Primulaceae, Myrsinaceae, and Theophrastaceae and their systematic importance. *Plant Syst Evol* 291:159–172.
- Sochor M., Vašut R. J., Stanovská E., Majeský L. & Mráček J. (2013): Can gene flow among populations counteract the habitat loss of extremely fragile biotope? An example from population genetic structure in *Salix daphnoides*. – *Tree Genetics & Genomes* 9: 1193-1205.
- Sutorý K. (2009): Cévnaté rostliny propasti Macocha po 150 letech výzkumu. – *Příroda* 8: 225–245.
- Sutorý K. (2010): Lectotypification of infraspecific taxa in *Cortusa matthioli* (Primulaceae) described by Josef Podpěra. – *Acta Musei Moraviae, Scientiae biologicae, Brno.* 95(2): 71–75.
- Smolová I., Vitek J. (2007): Základy geomorfologie. Vybrané tvary reliéfu. – Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Skalický V. (1988): Regionálně fyto geografické členění. – In: Hejný S. & Slavík B. [eds], *Květena České socialistické republiky* 1: 103–121, Academia, Praha.
- Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. – Springer-Verlag, New York.

Online zdroje:

Správa CHKO Moravský kras [online]. 2020 [cit. 2020-40-14]. Dostupné z:
<http://moravskykras.ochranaprirody.cz/>

Správa CHKO Moravský kras. Flóra. *Agentura ochrany přírody a krajiny ČR* [online]. 2020 [cit. 2020-02-01]. Dostupné z: <http://moravskykras.ochranaprirody.cz/charakteristika-oblasti/flora/>

Gulich V. Primulaceae Vent. – prvosenkovité / prvosenkovité. *Botany.cz* [online]. 2013 [cit. 2020-02-01]. Dostupné z: <https://botany.cz/cs/primulaceae/>

Laboratoř molekulární biologie rostlin PŘF JU. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) [online]. 2013 [cit. 2020-04-11]. Dostupné z:
<http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/aflp.html>

Katedra botaniky UK. AFLP I. - princip metody [online]. 2020 [cit. 2020-04-11]. Dostupné z:
<https://www.natur.cuni.cz/biologie/botanika/struktura/laborator-dna/metody/aflp/aflp-i-princip-metody>

Zdroje obrázků:

Nejezchlebová P. (2018). Vybrané geografické aspekty návštěvnosti podzemních prostor na území CHKO Moravský kras. [online]. [cit. 2020-04-26].

Litschmann T., Rožnovský J., Hebelka J. (2008). Hodnocení letního teplotního a vlhkostního profilu propasti Macocha. [online]. [cit. 2020-05-26]. Dostupné z: <http://amet.cz/Hodnocen%C3%83%C2%AD%20letn%C3%83%C2%ADho%20teplotn%C3%83%C2%ADho%20profilu%20propasti%20%20Macocha.pdf>

Štefka L. (2011). CHKO Moravský kras – unikátní kout naší republiky. [online]. [2020-05-26]. Dostupné z: <https://www.casopis.ochranaprirody.cz/z-nasi-prirody/chko-moravsky-kras-unikatni-kout-nasi-republiky/>

Katedra botaniky UK (2020). AFLP I. - princip metody [online]. [cit. 2020-04-11]. Dostupné z: <https://www.natur.cuni.cz/biologie/botanika/struktura/laborator-dna/metody/aflp/aflp-i-princip-metody>

Zdroje tabulek:

- Stevens P.F. (2017). Angiosperm Phylogeny Website. Missouri Botanical Garden. [online]. [2020-05-26]. Dostupné z: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/>
- Arslan H., Kirmizi S., Guleryuz G. & Sakar F. S. (2011): Germination Requirements of *Androsace villosa* L. (*Primulaceae*). – Acta Biologica Cracoviensia, series Botanica 53: 32–36.
- Morozowska M., Czarna A., Kujawa M., Jagodzinski A. (2010): Seed morphology and endosperm structure of selected species of Primulaceae, Myrsinaceae, and Theophrastaceae and their systematic importance. Plant Syst Evol 291:159–172.

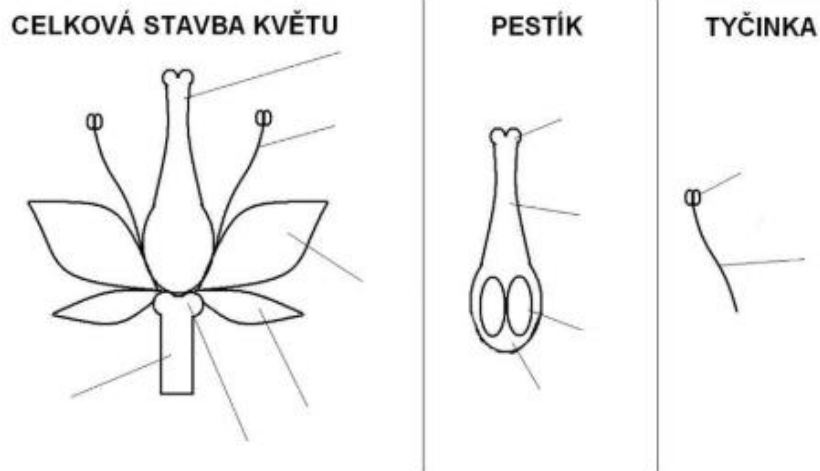
Přílohy



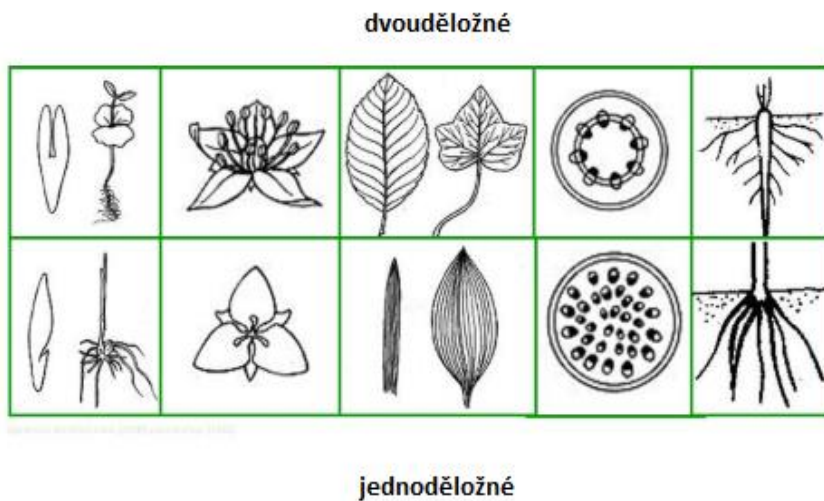
Pracovní list k tématu *Primulaceae*

Tento pracovní list je určený pro žáky středních škol. Spadá do učiva biologie dvouděložných rostlin. Žák by si tímto vytvořeným pracovním listem měl utříbit základní obecné informace týkající se dvouděložných rostlin a posléze konkrétně informace týkající se čeledi Primulaceae.

ÚKOL č. 1: Popiš stavbu květu krytosemenných rostlin.



ÚKOL č. 2: Popiš rozdíl mezi jednoděložnými a dvouděložnými rostlinami, uveď 3 zástupce ke každé kategorii.



Jednoděložné	
Dvouděložné	

ÚKOL č. 3: Zařad' čeled' prvosenkovité do systému a napiš jejich latinský název.

Říše: _____

Podříše: _____

Oddělení: _____

Třída: _____

Řád: _____

Čeľad': _____

ÚKOL č. 4: Dopln' křížovku dle nápovědy.

Víte, jaké je latinské rodové jméno nejznámějšího zástupce čeledi *Primulaceae* – prvosenky jarní?

1.																	
2.																	
3.																	
4.																	
5.																	
6.																	
7.																	

1. Latinský název rostlin.
2. Rostlinné pletivo tvořené buňkami s tenkými buněčnými stěnami, buňkami nejčastěji izodiametrického tvaru.
3. Listové přívěsky na bázi řapíku nebo na bázi přisedlého listu, vyskytující se u krytosemenných rostlin.
4. Rostlinné pletivo tvořené buňkami s dělivou funkcí.
5. Jizva na semeni po vaječném poutku.
6. Bezlistý a nevětvený stonek rostlin s přízemní růžicí nesoucí květ nebo květenství.
7. Způsob šíření semen nebo plodů pomocí větru.

ÚKOL č. 5: Krátce popiš čeleď *Primulaceae*. Uveď 3 zástupce.

ÚKOL č. 6: Dopln a správně přiřaď text z možností uvedených níže.

Kruhatka Matthioliho moravská (*Cortusa matthioli subsp. moravica*) patří do čeledi Prvosenkovité (_____). Jedná se o glaciální _____, který se na území ČR vyskytuje pouze na jediné lokalitě, a to v propasti _____, náležící do CHKO _____.

Rostliny lze nalézt na _____ skalních stěnách. Dlouhodobou existenci této byliny umožňují specifické _____ a _____ podmínky propasti. Kruhatku řadíme do kategorie _____, tedy



víceletých nedřevnatých rostlin. Květy kruhatky jsou _____ barvy, uspořádané do hroznovitého květenství zvané _____. Pilovité listy vyrůstají v přízemní _____. Plodem je _____.

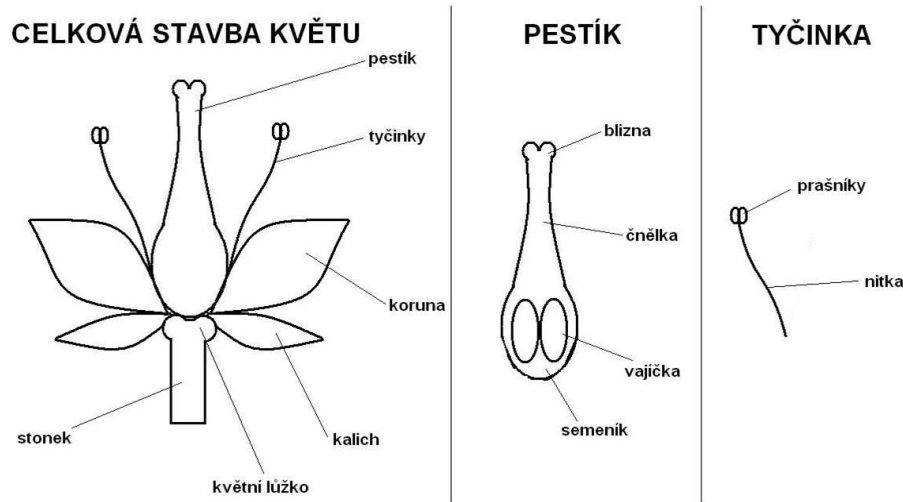
Možnosti:

relikt, *Primulaceae*, okolík, vápencových, růžici, Macocha, tobolka, Moravský kras, klimatické, trvalek, vlhkostní, růžové.

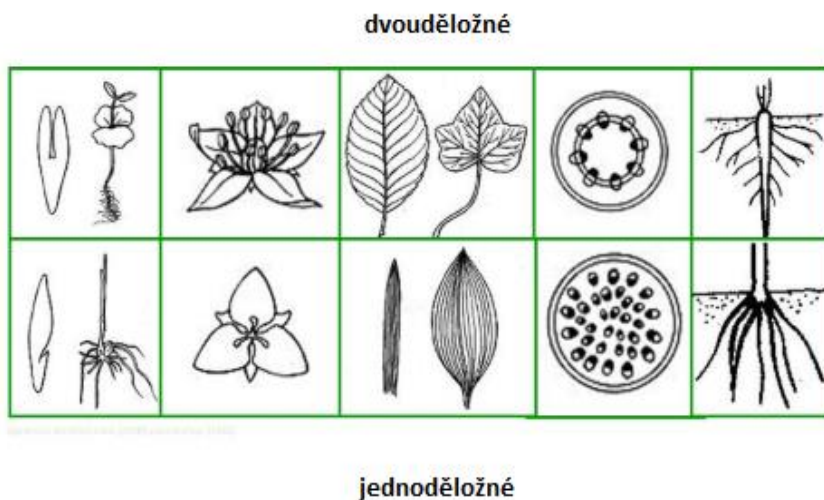
Pracovní list k tématu *Primulaceae*

Tento pracovní list je určený pro žáky středních škol. Spadá do učiva biologie dvouděložných rostlin. Žák by si tímto vytvořeným pracovním listem měl utříbit základní obecné informace týkající se dvouděložných rostlin a posléze konkrétně informace týkající se čeledi Primulaceae.

ÚKOL č. 1: Popiš stavbu květu krytosemenných rostlin.



ÚKOL č. 2: Popiš rozdíl mezi jednoděložnými a dvouděložnými rostlinami, uveď 3 zástupce ke každé kategorii.



Dvouděložné	Dvě dělohy, květ rozlišen na kalich a korunu, zpeřená žilnatina, uspořádané cévní svazky, hlavní kořen s postranními kořeny. Zástupci – prvosenka jarní, hrušeň obecná, růže šípková.
Jednoděložné	Jedna děloha, květní obaly nerozlišený = okvětí, souběžná žilnatina, svazčité kořeny, neuspořádané cévní svazky. Zástupci – lipnice obecná, hyacint východní, lilie zlatohlávek.

ÚKOL č. 3: Zařaď čeleď prvosenkovitě do systému a napiš jejich latinský název.

Říše: rostliny

Podříše: cévnaté rostliny

Oddělení: krytosemenné

Třída: vyšší dvouděložné

Řád: vřesovcotvaré

Čeleď: Primulaceae

ÚKOL č. 4: Dopln křížovku dle nápovědy.

Víte, jaké je latinské rodové jméno nejznámějšího zástupce čeledi *Primulaceae* – prvosenky jarní?

1.				P	L	A	N	T	A	E				
2.		P	A	R	E	N	C	H	Y	M				
3.	P	A	L	I	S	T	Y							
4.				M	E	R	I	S	T	É	M			
5.		H	I	L	U	M								
6.	S	T	V	O	L									
7.				A	N	E	M	O	C	H	O	R	I	E

1. Latinský název rostlin.
2. Rostlinné pletivo tvořené buňkami s tenkými buněčnými stěnami, buňkami nejčastěji izodiametrického tvaru.
3. Listové přívěsky na bázi řapíku nebo na bázi přisedlého listu, vyskytující se u krytosemenných rostlin.
4. Rostlinné pletivo tvořené buňkami s dělivou funkcí.
5. Jizva na semeni po vaječném poutku.
6. Bezlistý a nevětvený stonek rostlin s přízemní růžicí nesoucí květ nebo květenství.
7. Způsob šíření semen nebo plodů pomocí větru.

ÚKOL č.5.: Krátce popiš čeleď *Primulaceae*. Uveď 3 zástupce.

Jedná se jednoleté o vytrvalé byliny s hlízou nebo oddenkem. Listy tvoří přízemní růžici a jsou střídavé nebo vstřícné. Palisty u této čeledi chybí. Květy se vyskytují jednotlivě nebo v květenství a jsou oboupohlavné. Andreceum tvořené pěti tyčinkami, gyneceum z pěti plodolistů. Semeník svrchní. Květ rozlišen na kalich a korunu. Plodem je tobolka, která se otevírá pomocí zubů nebo víčka.

Zástupci: prvosenka jarní, brambořík nachový, vrbina tečkovaná.

ÚKOL č. 6: Dopln a správně přiřaď text z možností uvedených níže.

Kruhatka Matthioliho moravská (*Cortusa matthioli subsp. moravica*) patří do čeledi Prvosenkovité (*Primulaceae*). Jedná se o glaciální relikt, který se na území ČR vyskytuje pouze na jediné lokalitě, a to v propasti Macocha, náležící do CHKO Moravský kras.



Rostliny lze nalézt na vápencových skalních stěnách. Dlouhodobou existenci této byliny umožňují specifické klimatické a vlhkostní podmínky propasti. Kruhatku řadíme do kategorie trvalek, tedy víceletých nedřevnatých rostlin. Květy kruhatky jsou růžové barvy, uspořádané do hroznovitého květenství zvané okolík. Pilovité listy vyrůstají v přízemní růžici. Plodem je tobolka.

Možnosti:

relikt, *Primulaceae*, okolík, vápencových, růžici, Macocha, tobolka, Moravský kras, klimatické, trvalek, vlhkostní, růžové.