

„Malování“ rostlinných chromozomů

Čeleď brukvovitých (*Brassicaceae*) patří k velkým rostlinným čeledím; zahrnuje 49 tribů, 321 rodů a 3 660 druhů. Zájem vědců o tuto skupinu vzrostl především díky ustanovení huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) modelovým druhem a sekvenování jeho genomu (viz např. Živa 2007, 1: 5–7). To v r. 2000 odstartovalo mimo jiné bouřlivý rozvoj srovnávací fylogenomiky a cytogenomiky, včetně úspěšného zavedení metody malování chromozomů (chromosome painting, CP) huseníčku a její aplikace na další zástupce brukvovitých (srovnávací malování chromozomů – comparative chromosome painting, CCP). Metoda CCP umožňuje studium chromozomové kolinearity (tj. míry shody v posloupnosti chromozomových segmentů), rozpoznání chromozomových přestaveb, porovnání struktury chromozomů nebo jejich částí mezi jednotlivými druhy a rekonstrukci struktury celých karyotypů. Brukvovité jsou jedinou rostlinnou čeledí, u níž je v tomto rozsahu metoda CCP použitelná (viz v dalším textu). Srovnávací cytogenetické mapy brukvovitých tak představují zcela unikátní typ dat o evoluci rostlinných karyotypů a genomů.

Soubor všech chromozomů v eukaryotickém jádře, charakterizovaný druhově specifickým počtem chromozomů o určité velikosti a tvaru, se nazývá karyotyp. Existuje řada technik, které umožňují rekonstruovat strukturu karyotypu a porovnávat karyotypy různých druhů. Evoluci karyotypů a genomů lze studovat pomocí srovnávacího genetického mapování a srovnávací analýzy celogenomových sekvencí. Alternativní přístup studia chromozomové kolinearity a identifikace chromozomových přestaveb nabízejí molekulárně-cytogenetické metody na principu fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH), především v úvodu zmíněné malování chromozomů (dále jen CP).

FISH spočívá v mikroskopické detekci specifické sekvence na chromozomech

s použitím fluorescenčně značeného fragmentu nukleové kyseliny komplementárního k cílové sekvenci, tzv. sondy. Pojem hybridizace znamená, že se podle pravidel komplementarity pro párování bází spojí vlákno studované DNA s druhým vláknem, kterým je fluorescenčně značená sonda (o hybridizačních metodách viz Živa 2009, 1: 44–45). K hybridizaci dochází přímo na chromozomovém preparátu, tedy na místě (*in situ*). Metoda FISH využívá procesu denaturace a reasociace DNA. Studovaná molekula DNA na preparátu musí být nejprve denaturována, čímž dojde k rozrušení vodíkových můstků mezi bázemi a oddělení řetězců. Tímto způsobem získáme z původní dvoušroubovice DNA dva jednoduché polynukleotidové řetězce. Po na-

vození reasociačních podmínek je na jednovláknovou DNA navázána sonda. Její navázání se projeví jako hybridizační signál, který můžeme pozorovat pomocí fluorescenčního mikroskopu.

Malování chromozomů u živočichů a člověka

Termín chromosome painting zavedl v r. 1988 Daniel Pinkel k popisu fluorescenční vizualizace velkých chromozomových segmentů nebo celých chromozomů *in situ* s použitím sekvenčně specifických

1 a 2 *Goldbachia laevigata* (obr. 1) a *Ochthodium aegyptiacum* (obr. 2) z čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*), jediné rostlinné čeledi, u níž je zatím aplikovatelná metoda srovnávacího malování chromozomů (comparative chromosome painting, CCP).

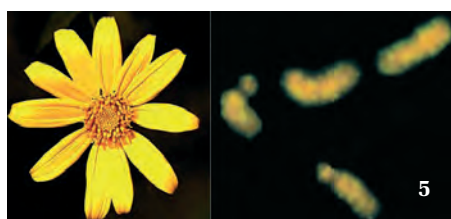
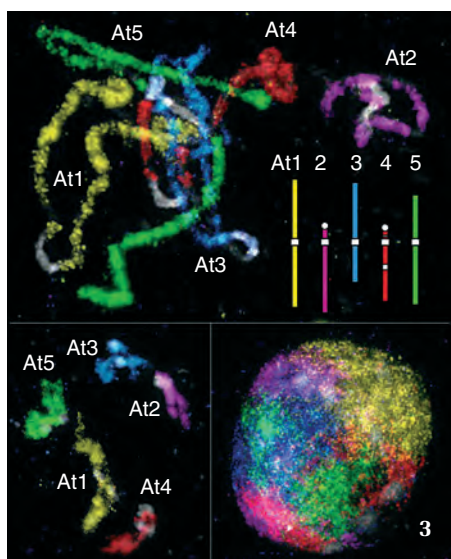
3 Malování chromozomů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*; na obr. chromozomy ve fázi pachytene, diakineze a v interfázi) s použitím sondy z chromozomově specifických BAC klonů (Bacterial Artificial Chromosome – umělý bakteriální chromozom, blíže v textu) odpovídajících jednotlivým chromozomům tohoto druhu. Každý z pěti chromozomových párů je označen jiným fluorochromem. Podle: A. Pečinka a kol. (2004), upraveno

4 Princip malování chromozomů (chromosome painting, CP) u huseníčku rolního s použitím fluorescenčně značených BAC klonů odpovídajících dvěma jeho chromozomálním ramenům, které jsou simultánně hybridizovány na pachytenní chromozomy. Mitotické chromozomy huseníčku rolního nejsou kvůli své malé velikosti pro CP vhodné. Orig. T. Mandáková

5 Neúspěšné malování chromozomů u druhu *Machaeranthera gracilis* (dříve *Haplopappus gracilis*) z čeledi hvězdnicovitých (*Asteraceae*, $2n = 4$). Oba chromozomové páry byly získány laserovou mikrodisekcí a jejich DNA amplifikovaná pomocí polymerázové řetězové reakce s použitím degenerovaných oligonukleotidových primerů (DOP-PCR). PCR produkt většího chromozomového páru bez patrné sekundární konstrikce byl fluorescenčně označen a použit jako hybridizační sonda. Vysoká koncentrace neoznačené DNA menšího chromozomového páru sloužila k blokování hybridizačního signálu repetitivních sekvencí. Výsledkem barvení je nespecifický signál na obou chromozomových párech. Podle: I. Schubert a kol. (2001), upraveno

6 Příklad srovnávacího malování chromozomů řeřišnice srstnaté (*Cardamine hirsuta*, $n = 8$) s použitím BAC klonů huseníčku rolního sestavených podle struktury jednotlivých chromozomů v ancestrálním karyotypu čeledi brukvovitých (Ancestral Crucifer Karyotype, ACK, $n = 8$). CCP analýza odhalila, že řeřišnice srstnatá sdílí 6 ancestrálních chromozomů s ACK (AK1–AK5 a AK7), zatímco dva chromozomy (AK6 a AK8) prošly reciprokou translokací (AK6/8 a AK8/6). Centromery jednotlivých chromozomů jsou označeny šipkami. Orig. T. Mandáková

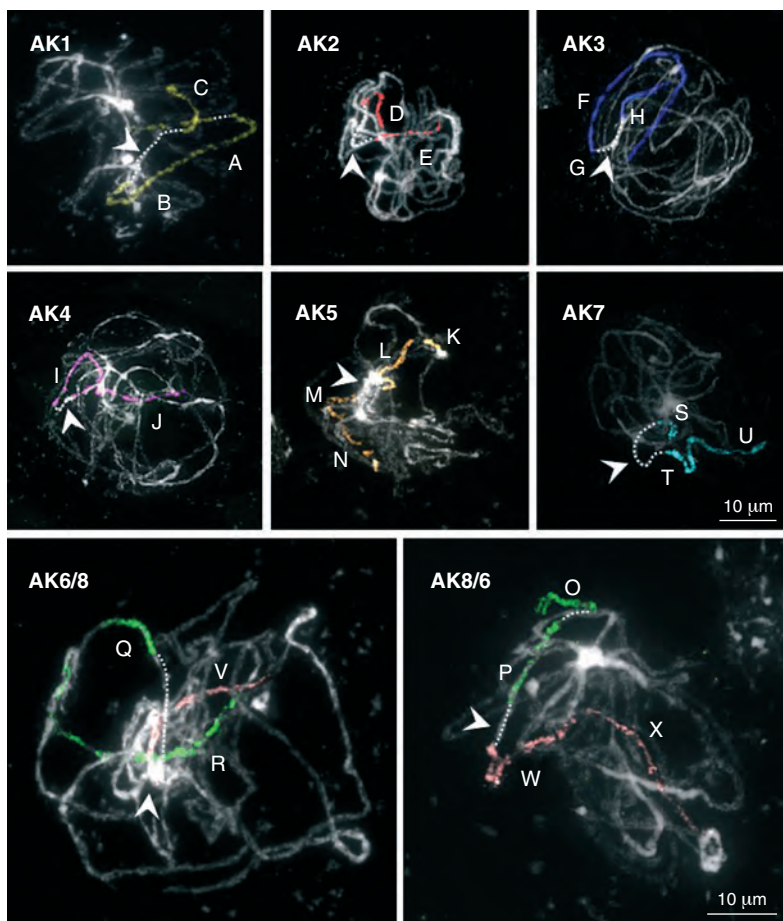
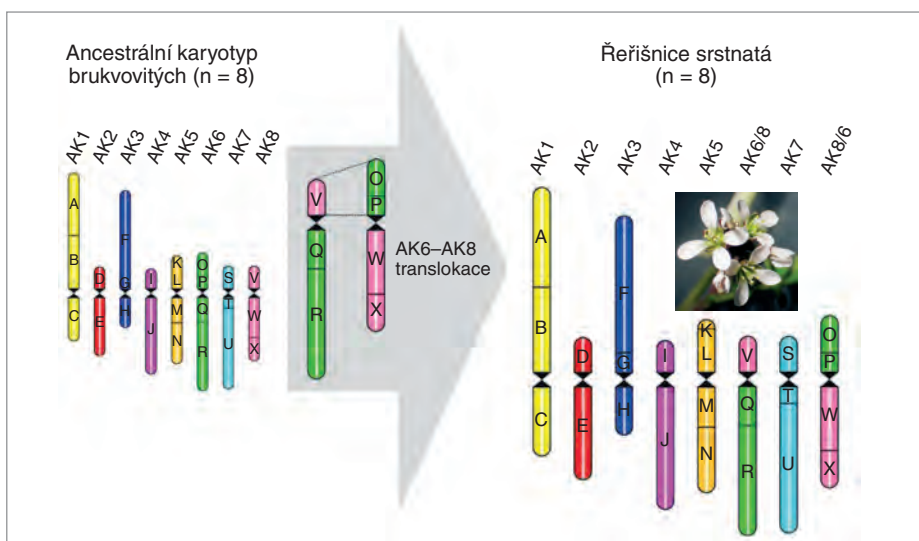
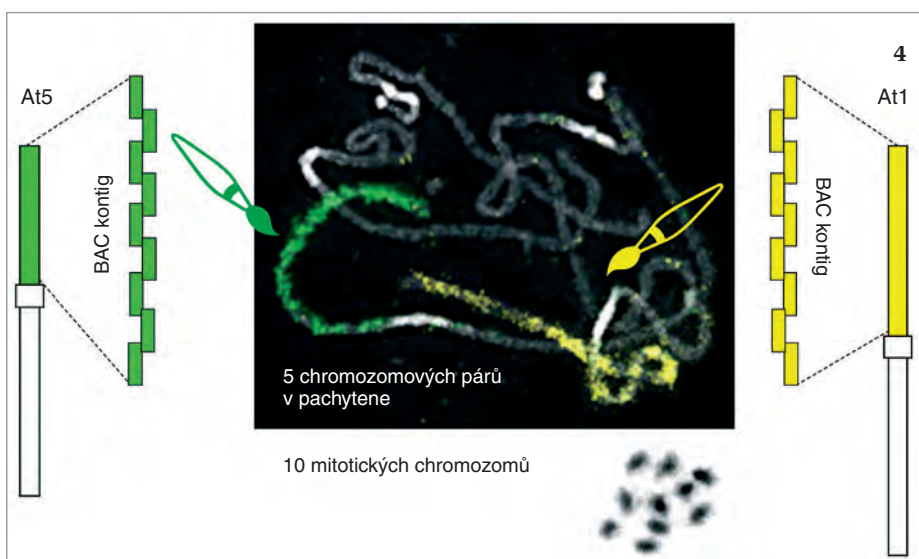




sond. Hybridizační sondy pro CP se v cytogenetice člověka a ostatních živočichů získávají z chromozomů nebo jejich segmentů izolovaných tříděním chromozomů pomocí průtokového cytometru (sorter; tzv. flow sorting) v suspenzi na základě rozdílů v relativní fluorescenci, nebo laserovou mikrodisekcí. Podmínkou laserové mikrodisekce je, aby byly separované objekty v mikroskopu identifikovatelné. V porovnání s průtokovou cytometrií jde o metodu pracnou, časově náročnou a co do množství separovaných chromozomů výrazně méně výnosnou. Nespornou výhodou mikrodisekce je téměř 100% čistota získané DNA. Takto izolovaná DNA se následně amplifikuje polymerázovou řetězovou reakcí s užitím degenerovaných oligonukleotidových primerů (DOP-PCR), fluorescenčně se označí a hybridizuje se na chromozomy na preparátu.

Aby bylo dosaženo specifické hybridizace pouze k cílovým chromozomům nebo chromozomovým segmentům, musí sonda obsahovat chromozomově specifické sekvence nukleotidů. K dosažení chromozomové specifity hybridizačních signálů je nutné potlačit hybridizaci sekvencí, které se nacházejí i na jiných chromozomech (především roztroušených repetitivních sekvencí). To se provádí přidáním velkého množství neznačené celkové genomické DNA nebo DNA obohacené o repetitivní frakci do směsi s hybridizační sondou. Nadbytek neznačené DNA pak doslova blokuje hybridizaci repetice.

V cytogenetice člověka a živočichů se uplatňuje celé spektrum metod založených na CP. Pomocí CP lze identifikovat jednotlivé chromozomy a diagnostikovat strukturní i numerické chromozomové aberace. K rozšíření a rutinnímu provádění CP přispělo především zavedení mnohobarevné FISH (multicolor FISH, mFISH), umožňující např. simultánní detekci a analýzu všech 24 lidských chromozomů s použitím



několika různých fluorescenčních barviv (fluorochromů).

Srovnávací malování chromozomů (dále jen CCP) je založeno na mezidruhovém hybridizaci sond. CCP nám dovoluje identifikaci evolučně sdílených chromozomů nebo velkých chromozomových oblastí mezi různými druhy a konstrukci srovnávacích cytogenetických map. Umožňuje také rekonstrukci ancestrálních (vývojově původních) karyotypů a přispívá k pochopení evoluce chromozomů.

Malování chromozomů u rostlin

V cytogenetice rostlin získal termín CP širší význam, stal se synonymem pro genomickou hybridizaci *in situ* (GISH), což je hybridizace celkové genomické DNA určitého druhu na chromozomy nebo buněčná jádra druhu jiného. Barvení specifických chromozomů (např. pohlavního chromozomu Y) u rostlin ve skutečnosti představuje hybridizaci chromozomově specifických repetitivních sekvencí spíše než sekvencí přítomných v genomu v jedné nebo nízkém počtu kopií, jak je tomu v případě CP u živočichů.

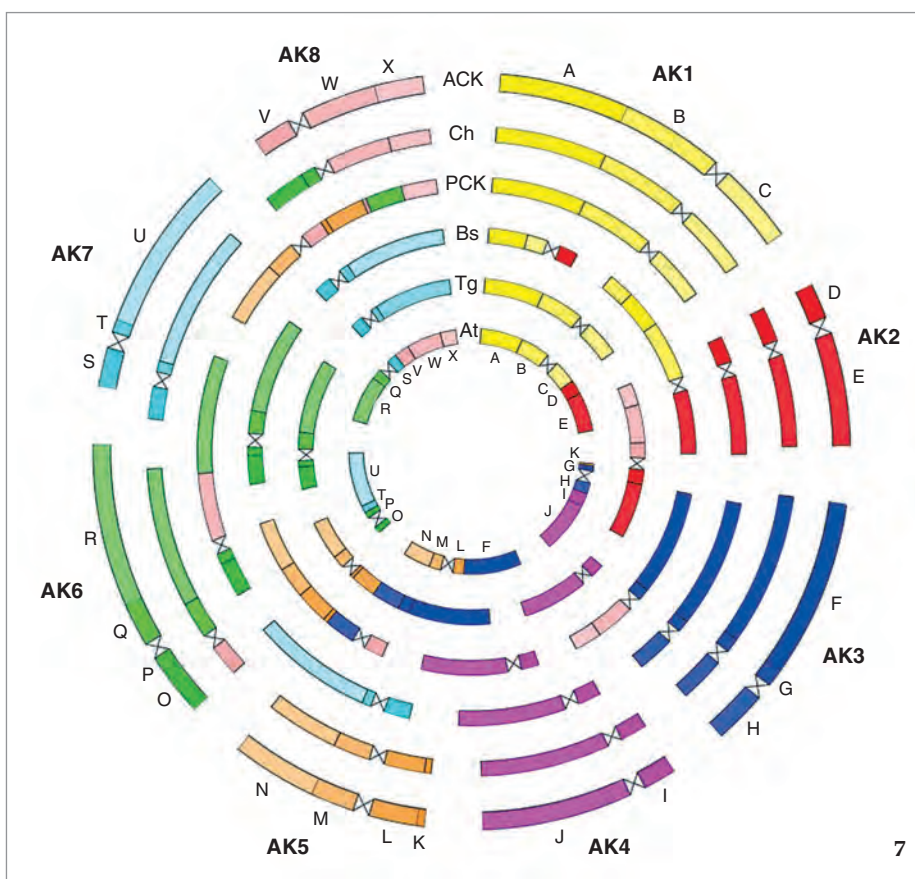
Ačkoli je CP se sondami z velkých chromozomových segmentů nebo celých chromozomů získaných flow sortingem nebo mikrodisekcí běžně využívanou metodou v cytogenetice člověka a živočichů, pokusy o jeho zavedení u rostlin skončily neúspěšně. CP s použitím takových sond není u rostlin možný. Rostliny totiž mají v genomu velký podíl nejrůznějších typů repetitivních sekvencí, které při CP způsobují nespecifickou hybridizaci (obr. 5). Proto rostliny vyžadují odlišnou strategii metody CP od protokolů zavedených u živočichů a člověka.

Alternativní strategií CP je FISH s použitím fragmentů genomické DNA klonovaných do bakterií ve formě umělých bakteriálních chromozomů (Bacterial Artificial Chromosome, BAC). Pomocí BAC-FISH lze identifikovat specifické chromozomové segmenty u rostlinných skupin s malými genomy a relativně nízkým obsahem repetitivních sekvencí, jako jsou např. lilek brambor (*Solanum tuberosum*) a lilek rajče (*S. lycopersicum*), čirok (*Sorghum*), rýže (*Oryza*), válečka (*Brachypodium*) a různé druhy brukvovitých.

Huseníček rolní

Tato drobná krátkověká rostlina je jedním z nejlépe charakterizovaných modelových druhů. Huseníček byl osekvenován a téměř celý jeho genom dnes máme k dispozici ve formě BAC knihoven obsahujících tisíce chromozomově specifických BAC klonů nesoucích známou sekvenci DNA a pokrývajících celá chromozomová ramena. Dostupnost těchto knihoven se známým pořadím jednotlivých BAC klonů na chromozomech se stala základem pro použití metody CP. U huseníčku tato metoda funguje díky jeho malému genomu (ca 157 milionů bází) s nízkým podílem repetitivní DNA (asi 15 %) lokalizované především v heterochromatinové oblasti kolem centromer (tzv. pericentromery) a také díky malému počtu chromozomů ($n = 5$).

Postup CP zahrnuje selekci BAC klonů neobsahujících repetitivní sekvence, fluorescenční značení jednotlivých BAC klo-



nů a následnou mFISH na chromozomech huseníčku. Při CP se používá velké množství různě značených BAC klonů, které jsou simultánně hybridizovány na chromozomové preparáty. Vzhledem k tomu, že je známo pořadí jednotlivých BAC klonů a jejich přesná pozice na chromozomech, mohou být tyto klony různě kombinovány a značeny podle potřeby konkrétního experimentu (viz obr. 4). Tímto způsobem lze analyzovat chromozomy v interfázi a ve všech fázích mitózy i meiózy. Protože jsou mitotické chromozomy huseníčku rolního velmi malé (ca 2 μ m), pro účely CP se lépe osvědčily delší a méně kondenzované meiotické chromozomy ve fázi pachytene (ca 80 μ m; meióza I, v průběhu pachytene se homologické chromozomy párují a tvoří bivalenty), které poskytují větší rozlišení hybridizačních signálů.

Zavedení metody CP u rostlin je dílem českého vědce Martina A. Lysáka spolupracujícího s badateli v laboratoři Inga Schuberta v německém Gatersleбену. Prvním úspěšně značeným rostlinným chromozomem se stal v r. 2001 chromozom 4 huseníčku a o tři roky později se pomocí metody CP podařilo současně vizualizovat všech pět párů chromozomů tohoto druhu pomocí pěti různých fluorochromů a chromozomově specifických skupin překrývajících se BAC klonů (BAC kontigů) jako hybridizačních sond (obr. 3). Huseníček rolní se tak stal první rostlinou, jejíž karyotyp byl metodou CP zrekonstruován.

Aplikace CP u huseníčku umožňuje analyzovat strukturu jeho chromozomů, stejně jako jejich organizaci uvnitř nedělících se interfázních buněčných jader. Metoda poskytuje nástroj pro studium vnitro- a mezi-chromozomových přestaveb, jakými jsou inverze a translokace. V interfázní cytogenetice slouží CP při analýze prostorové

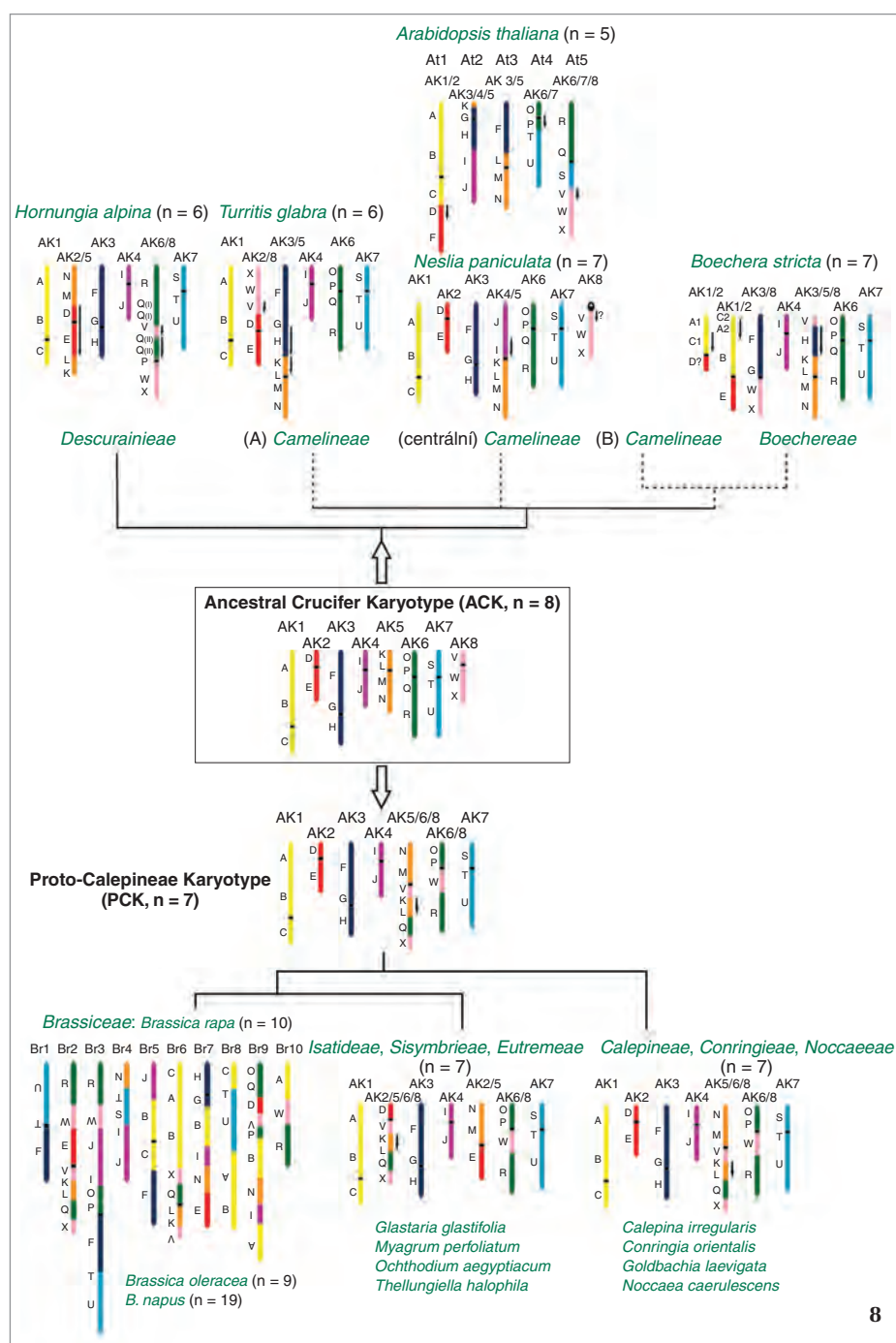
7 Diagram znázorňující kolinearitu mezi chromozomy ancestrálního karyotypu čeledi brukvovitých (ACK, $n = 8$), společného předka druhů z vývojové linie II (Proto-Calepineae Karyotype, PCK, $n = 7$) a evolučně odvozenými karyotypy řeřišnice srstnaté (Ch, $n = 8$, tribus *Cardamineae*), *Boechea stricta* (Bs, $n = 7$, *Boecheaeae*), huseníku lysého (*Turritis glabra*, syn. *strmobýl* lysý, *Arabis glabra*, Tg, $n = 6$, *Turritideae*) a huseníčku rolního (At, $n = 5$, *Camelineae*). Genomické bloky jsou označeny A–X a barevně odpovídají pozici na daném ancestrálním chromozomu AK1–AK8. Blíže v textu. Orig. T. Mandáková

8 Rekonstrukce evoluce karyotypu v čeledi brukvovitých. ACK ($n = 8$) je považován za ancestrální karyotyp vývojové linie I a II. Karyotypy linie II vznikly redukcí chromozomové počtu z ACK prostřednictvím jejich společného předka nazvaného Proto-Calepineae Karyotype (PCK, $n = 7$). Podle: M. A. Lysák a M. A. Koch (2011), upraveno

struktury jednotlivých chromozomových teritorií (viz také Živa 2011, 2: 54–55) nebo asociací určitých chromozomových oblastí.

Srovnávací malování chromozomů v čeledi brukvovitých

Brukvovité představují první a dosud jedinou rostlinnou skupinu, u níž se podařila optimalizace CCP. Úspěšnost metody v této čeledi je dána zavedením CP u huseníčku rolního, dostupností kvalitních fylogenetických studií a srovnávacích genetických map několika brukvovitých druhů z tribu *Camelineae* (huseníček rolní, $n = 5$; huseníček *A. lyrata*, $n = 8$; kokoška červená – *Capsella rubella*, $n = 8$).



8

Při CCP se chromozomově specifické BAC klony z huseníčku rolního hybridizují na chromozomy jiných brukvovitých druhů. Ačkoli jsou k dispozici BAC klony i dalších druhů, BAC klony z huseníčku rolního mají oproti nim mnoho výhod: je známa jejich pozice na chromozomech, máme celé BAC knihovny a co je nejdůležitější, evolučně mladý genom huseníčku rolního obsahuje pouze malé množství repetitivních sekvencí. Omezené zastoupení repetitivních sekvencí dovoluje provádět CCP s použitím velkého počtu BAC klonů.

Pomocí metody CCP v čeledi brukvovitých můžeme identifikovat velké chromozomové oblasti a celé chromozomy společně pro různé druhy, dále rozpoznat chromozomové přestavby, kterými se karyotypy jednotlivých druhů odlišují, a odhalit mechanismy odpovědné za současnou podobu karyotypů. Komplexní chromozomové přestavby se považují za unikátní evoluční události a není pravděpodobné, že by vznikaly nezávisle u různých

vývojových skupin. Informace o struktuře karyotypů získané pomocí CCP tak představují velmi cenný fylogenetický marker, který má silný potenciál pro vyřešení fylogeneticky sporných vztahů v této čeledi.

Ancestrální karyotyp brukvovitých

Zcela klíčovou otázkou při rekonstrukci karyotypu je odlišení původních a odvozených chromozomových struktur. Srovnávací genetické mapy tribu *Camelinae* odhalily vysoce konzervovanou chromozomovou kolinearitu mezi huseníčkem rolním ($n = 5$) a oběma druhy s počtem chromozomů $n = 8$ (huseníček *A. lyrata* a kokoška červenavá). Srovnávací genetické a cytogenetické práce také ukázaly, že kompaktní genom huseníčku rolního je charakterizován vysoce přestavěným a odvozeným karyotypem, což znemožňuje jeho použití jakožto referenčního bodu pro srovnávací studie v čeledi brukvovitých.

Všeobecná podobnost karyotypů huseníčku *A. lyrata* a kokošky červenavé a skutečnost, že $n = 8$ je nejběžnějším chromozomovým počtem v tribu *Camelinae*, stejně jako v celé čeledi, vyústily v definici ancestrálního karyotypu brukvovitých (Ancestral Crucifer Karyotype, ACK) s $n = 8$ chromozomy AK1–AK8 podobajícími se chromozomům huseníčku *A. lyrata* a kokošky červenavé. Na základě dalších srovnání bylo definováno 24 konzervovaných genomických bloků A–X představujících základní stavební kameny ACK a všech karyotypů brukvovitých. ACK s 8 chromozomy a 24 genomickými bloky se tak stal referenčním genomem pro srovnávací cytogenetické studie napříč brukvovitými (obr. 6–8).

Evoluce karyotypu brukvovitých

V čeledi rozeznáváme 49 monofyletických tribů a tři hlavní vývojové linie (I, II a III). Koncept ACK byl poprvé aplikován při CCP analýze druhů z vývojové linie I s předpokládanou redukcí chromozomového počtu z ancestrálních $n = 8$ na $n = 7$, 6 a 5. Tato studie odhalila, že karyotyp huseníčku rolního prošel redukcí chromozomového počtu z $n = 8$ na $n = 5$ prostřednictvím tří recipročních translokací a nejméně tří inverzí (obr. 7). Ačkoli je huseníček *A. lyrata* příslušníkem stejného rodu jako extrémně přestavěný huseníček rolní, jeho karyotyp snižení chromozomového počtu ani žádné velké chromozomové přestavby neprodělal. Rod huseníček tak představuje kontrast mezi stabilitou a značnou dynamikou karyotypů v čeledi brukvovitých.

Metoda CCP je cenná především u těch druhů, pro něž nemáme k dispozici žádná sekvenční ani genetická data. Struktura karyotypů zrekonstruovaná u druhů řepinka latnatá (*Neslia paniculata*, $n = 7$, *Camelinae*), huseník lysý (*Turritis glabra*, syn. strmobýl lysý, *Arabis glabra*, $n = 6$, *Turritidae*) a *Hornungia alpina* ($n = 6$, *Descurainieae*) odhalila vysoký stupeň chromozomové kolinearit mezi těmito druhy, huseníčkem rolním a ACK (obr. 7). Navzdory několika inverzím si 6 homeologických chromozomů řepinky latnaté a čtyři chromozomy huseníku lysého a *H. alpina* zachovalo ancestrální uspořádání. Ačkoli se některé ancestrální chromozomy účastní fúzí častěji než jiné, chromozomové fúze jsou druhově specifické. Tato data ukazují, že redukce chromozomového počtu z ACK na evolučně odvozené karyotypy s počtem chromozomů $n = 7$, 6 a 5 proběhla několikrát nezávisle, a potvrzují, že ACK představuje ancestrální karyotyp vývojové linie I brukvovitých.

Dalším příkladem aplikace metody CCP je studie evoluce karyotypu ve vývojové linii II a blízké příbuzných tribech. Všechny studované triby v této části fylogenetického stromu brukvovitých se vyznačují chromozomovým číslem $n = 7$. Cílem našeho výzkumu zde byla rekonstrukce struktury karyotypů u 8 druhů z 6 různých tribů: *Calepina irregularis* a *Goldbachia laevigata* (*Calepineae*, obr. 1), hořinka východní (*Conringia orientalis*, *Conringieae*), *Glastaria glastifolia* (*Isatideae*), povázka prorostlá (*Myagrum perfoliatum*, *Isatideae*), penízek modravý (*Noccaea caerulescens*, syn. *Thlaspi caerulescens*, *Coluteocarpeae*,

obr. 9), *Ochthodium aegyptiacum* (*Sisymbriaceae*, obr. 2) a *Eutrema salsugineum* (*Eutremaceae*). Předmětem studie těchto druhů se stejným chromozomovým počtem byla otázka, došlo-li u nich k redukci počtu chromozomů z $n = 8$ na $n = 7$ nezávisle, a jaké přestavby jsou za současnou strukturu těchto karyotypů odpovědné. CCP analýza ukázala, že všechny studované druhy sdílejí komplexní strukturu dvou chromozomů vzniklých translokacemi z původních tří ancestrálních chromozomů (obr. 8). A protože je velmi nepravděpodobné, že by se identická komplexní chromozomová přestavba vytvořila několikrát nezávisle, představují tyto dva chromozomy přesvědčivý cytogenetický marker dokazující existenci společného ancestrálního karyotypu 6 tribů s chromozomovým číslem $n = 7$ nazvaného Proto-Calepineae Karyotype (PCK, obr. 7 a 8), který obsahoval dva výše zmíněné přestavěné chromozomy. Struktura PCK zůstala zcela zachovaná u tribů *Calepineae* a *Conringieae*. U tribu *Coluteocarpeae* došlo v evoluci z PCK k několika sekundárním inverzím. U tribů *Isatideae*, *Sisymbriaceae* a *Eutremaceae* byla identifikována sekundární translokace mezi jedním z PCK specifických chromozomů a ancestrálním chromozomem AK2, která u těchto tří tribů dala vzniknout evolučně mladšímu karyotypu (tzv. translokační PCK, tPCK). Skutečnost, že PCK má pět chromozomů a dvě chromozomová ramena strukturálně identická s ACK, naznačuje, že PCK a ACK se vyvinuly ze společného



9 Penízeček modravý (*Nocca caerulea*, syn. *Thlaspi caeruleum*), u kterého došlo k redukci chromozomového počtu z $n = 8$ na $n = 7$ následované několika inverzemi. Snímky T. Mandákové

předka, anebo spíše, že 7 chromozomů PCK vzniklo redukcí chromozomového počtu z 8 chromozomů ACK.

Aplikace CCP v éře sekvenování celých genomů

Genomy *Schrenkiella parvula* a *Eutrema salsugineum* byly nedávno osekvenovány a srovnávací cytogenetická mapa *E. salsugineum* konstruovaná metodou CCP byla u těchto genomů použita pro sestavení sekvencí 7 párů chromozomů. Sekveno-

vání genomu těchto druhů potvrdilo tPCK strukturu jejich karyotypů. Podobně jako v případě *E. salsugineum* srovnávací cytogenetické mapy huseníku alpského (*Arabis alpina*), řeřišnice srstnaté (*Cardamine hirsuta*) a *Leavenworthia alabamica* vytvořené pomocí CCP sloužily jako předloha k poskládání celogenomových sekvencí těchto druhů. Tyto příklady ukazují, jak přesná jsou srovnávací cytogenetická data získaná metodou CCP, a především dokládají, jak potřebná tato data jsou v dnešní době odehrávající se ve znamení sekvenování celých genomů.

Protože čeled' brukvovitých je dosud jedinou skupinou rostlin, u níž lze CCP aplikovat, výsledky, které tato metoda přináší, představují zcela unikátní vhled do vnitro- i mezidruhové variability karyotypů a umožňují odhalit mechanismy odpovědné za chromozomové změny u rostlin. Porovnání výsledků CCP s fylogenetickými vztahy přispívá k pochopení role chromozomových změn v genetické diverzifikaci a speciaci rostlin. A v neposlední řadě, srovnávací cytogenetické mapy jsou velmi cenným pomocníkem při mapování sekvencí jednotlivých chromozomů v genomu.

Seznam použité literatury uvádíme na webové stránce Živy.

Článek vznikl díky podpoře z projektu Evropského sociálního fondu č. CZ.1.07/2.3.00/30.0037.



www.casopis.ochranaprirody.cz

Ochrana přírody

Vydavatelem časopisu je Agentura ochrany přírody a krajiny ČR.

Časopis Ochrana přírody má dlouholetou tradici, vychází již od roku 1946. Věnuje se problematice ochrany přírody a krajiny v nejširších souvislostech.

V časopise najdete články a aktuální informace týkající se problematiky péče o krajinu, ochrany zvláště chráněných území, druhové ochrany živočichů a rostlin i právních aspektů ochrany přírody. Časopis přináší výsledky výzkumu a monitoringu,

poskytuje rovněž informace o plnění mezinárodních úmluv a také o soustavě Natura 2000. Uvádí rovněž četné odborné informace ze zahraničí i texty související s ekologickou výchovou a prací s veřejností. Součástí časopisu jsou pravidelné rubriky **Z naší přírody**, **Péče o přírodu a krajinu**, **Právo v ochraně přírody**, **Výzkum a dokumentace**, **Zaměřeno na veřejnost** a **Zahraničí**. Samozřejmostí jsou rozhovory na aktuální témata, recenze, pozvánky na výlet i krátké aktuální zprávy.

Časopis nyní vychází šestkrát v roce, vždy ve druhé polovině sudého měsíce. Zhruba jedenkrát ročně navíc vychází zvláštní monotematické číslo. Od letošního roku má Ochrana přírody nový formát i zcela novou grafickou podobu. Cena za jedno číslo je pouze 39 Kč. Vážným zájemcům o náš časopis zašleme zdarma starší číslo na ukázkou. Těšíme se na společné chvíle s časopisem Ochrana přírody!

redakce