

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



Hybridizace horských druhů vrb na příkladu vrby hrotolisté ve Velké kotlině

Blanka BRANDOVÁ

Diplomová práce
předložená
na Katedře ekologie a životního prostředí
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků
na získání titulu Mgr. v oboru
Ochrana přírody

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

Olomouc 2010

Brandová, B.: Hybridizace horských druhů vrby na příkladu vrby hrotolisté ve Velké kotlině. Diplomová práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, 54 pp., v češtině.

Abstrakt

Vrby jsou dvoudomé, entomogamní, anemochorní keře až stromy, které se mezi sebou snadno kříží. Díky tomu se v terénu obtížně určují. Tato práce se zabývá hybridizací vrby obecně. Za modelový příklad si vzala druhy vrba hrotolístá a vrba slezská, které ve Velké kotlině (Hrubý Jeseník, CZ) tvoří hybrida *Salix ×chlorophana*. Vrba hrotolístá je v ČR druhem silně ohroženým. Cílem této práce bylo popsat současné rozšíření vrby hrotolísté a jejího křížence s vrbou slezskou, odhadnout počet sterilních a nesterilních rostlin na lokalitě Velká kotlina a poměr pohlaví, optimalizovat využití mikrosatelitů (SSR) pro studované taxony a nastínit možnosti využití této metody pro ochranu přírody. Byly zrevidovány položky pěti vybraných herbárií a pro vrbu hrotolistou a jejího křížence s vrbou slezskou byla vytvořena síťová mapa rozšíření. Současně mají v ČR pouze čtyři lokality výskytu. Ve Velké kotlině byly vytyčeny dva transekty a na nich sečteny sterilní, samčí a samičí rostliny vrby hrotolísté a křížence (celkem 249 rostlin). Počty sterilních rostlin byly malé (3 pro vrbu hrotolistou, 12 pro křížence). Poměr pohlaví byl u vrby hrotolísté poměrně vyrovnaný ($\sigma:\text{♀} = 1,1:1$), u křížence byl vychýlen v prospěch samic ($\sigma:\text{♀} = 1:2,1$). V terénu byly nasbírány listy rostlin, z nichž byla vyzolována genomická DNA a měli jsme k dispozici 48 vzorků pro optimalizaci mikrosatelitů. Bylo vyzkoušeno sedm mikrosatelitů známých pro jiné druhy rodu *Salix*, podmínky byly optimalizovány pro dva z nich. Ze získaných výsledků předběžně vyplývá, že k hybridizaci vrby hrotolísté s vrbou slezskou dochází ve Velké kotlině opakovaně, že kříženec je alelicky podobnější vrbě slezské a že vrba hrotolístá je na lokalitě genotypicky poměrně variabilní. Ze získaných dat vyplývá, že silně ohrožený druh vrba hrotolístá se na lokalitě rozmnožuje i generativně, je geneticky variabilní a její výskyt zde není do budoucna pravděpodobně ohrožen. Přesně taková data jsou pro ochranu přírody potřebná a mohou být získány právě využitím mikrosatelitů.

Klíčová slova: hybridizace, vrba, *Salix hastata* ohrožený druh, poměr pohlaví, mikrosatelity, Hrubý Jeseník

Brandová, B.: Mountainous willow's hybridization: study of the halberd willow in Velká kotlina fold. Diploma thesis, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University in Olomouc, 54 pp., in Czech.

Abstract

The genus willow (*Salix* L.) includes trees and shrubs that easily hybridize with each other and are dioecious, anemochorous and often difficult to determine. I focused on plant hybridization. *Salix hastata* (Halberd willow), *S. silesiaca* (Silesian willow) and their hybrid *S. ×chlorophana* were chosen for being model organisms. They often occur in Velká kotlina fold (Hrubý Jeseník Mts., CZ). Velká kotlina fold is one from only four current localities of *S. hastata* in the Czech republic, which is considered to be a threatened species here. I therefore set these targets: (1) to describe current distribution of *S. hastata* and its hybrid with *S. silesiaca*; (2) to estimate the amount of sterile willow plants and sex-ratio in the studied locality; (3) to optimise use of microsatellites (SSR) for studied species and (4) to outline the use of microsatellites for nature protection purposes. Herbal items from five different Czech institutions were revised and (based on that) current distribution maps for *S. hastata* and its hybrid were created. Using two studied plots sterile, male and female plants of *S. hastata* and its hybrid were counted in Velká kotlina fold. Numbers of sterile willows were low (3 for *S. hastata*, 12 for hybrid). Sex-ratio of *S. hastata* plants was relatively balanced ($\text{♂}:\text{♀} = 1,1:1$), for hybrid female plants predominated ($\text{♂}:\text{♀} = 1:2,1$). In Velká kotlina fold we picked willow leaves, then we isolated genomic DNA and got 48 samples. We utilized these samples to optimise the use of microsatellites. Seven different combinations of microsatellite primers, which are known for other *Salix* species, were tested. For two of them we revealed optimal conditions. Based on the results from these two microsatellites we may say hybridization is quite frequent in Velká kotlina fold, hybrid is more similar to *S. silesiaca* and *S. hastata* has several different genotypes here. We infer from received facts that threatened species *S. hastata* probably reproduces sexually in Velká kotlina fold, is genetically variable and probably its distribution here will persist well. These data are necessary for nature protectionists and can be obtained by using microsatellites.

Key words: hybridization, willows, *Salix hastata*, threatened species, sex-ratio, microsatellites, Hrubý Jeseník Mts.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Radima J. Vašuta, Ph. D. a jen s použitím citovaných literárních pramenů.

V Olomouci 7. května 2010

podpis

Obsah

Seznam tabulek	vii
Seznam obrázků	viii
Poděkování	ix
Úvod	1
Čeleď Salicaceae a rod <i>Salix</i>	1
Středoevropské populace vysokohorských vrb	4
Hybridizace a hybridní zóny	8
Hybridizace v rodu <i>Salix</i>	10
Cíle práce	12
Materiál a metody	14
Charakteristika lokality	14
Charakteristika studovaných taxonů	16
Charakteristika studované populace	20
Početnost pohlaví	21
Herbáře	21
Laboratorní práce	21
Izolace genomické DNA	22
Použití mikrosatelitů	22
Analýza dat	25
Výsledky	26
Početnost pohlaví	26
Herbáře	27
Laboratorní práce	28
Izolace genomické DNA	29
Použití mikrosatelitů	31
Diskuse	35
Početnost pohlaví	35
Herbáře	36
Laboratorní práce	37
Izolace genomické DNA	38
Použití mikrosatelitů	39
Hybridizace a hybridní zóny	40
Hybridizace, mikrosatelity a ochrana přírody	46
Budoucnost výzkumu	47
Závěr	48
Literatura	50

Seznam tabulek

Tabulka 1. Klíč pro determinaci vrb ve Velké kotlině.....	18
Tabulka 2. Použité mikrosatelity.....	23
Tabulka 3. Používané složení PCR mixu.....	23
Tabulka 4. Počty sterilních, samčích a samičích rostlin na dvou vytyčených transektech a vypočtené poměry sterilních a nesterilních rostlin a poměry samčích a samičích rostlin.	27
Tabulka 5. Zrevidované herbářové položky.....	27
Tabulka 6. Vzorky genomické DNA studovaných taxonů.	30
Tabulka 7. Výsledky skórování použitých mikrosatelitů.....	32

Seznam obrázků

Obrázek 1. Lokalita Velká kotlina (Hrubý Jeseník, CZ) s výskytem studovaných taxonů vrb.	15
Obrázek 2. Rozšíření druhů <i>Salix hastata</i> a <i>S. silesiaca</i> v Evropě. Zdroj: Atlas Florae Europaeae).	17
Obrázek 3. vrba hrotolistá (<i>Salix hastata</i>).	18
Obrázek 4. vrba slezská (<i>Salix silesiaca</i>).	18
Obrázek 5. kříženec <i>Salix</i> × <i>chlorophana</i>	18
Obrázek 6. Zastoupení sterilních, samčích a samičích rostlin na dvou vytyčených transektech pro vrbu hrotolistou (<i>Salix hastata</i>) a křížence s vrbou slezskou (<i>S.</i> × <i>chlorophana</i>).	26
Obrázek 7. Současné rozšíření vrby hrotolisté (<i>Salix hastata</i>) a jejího křížence s vrbou slezskou (<i>S.</i> × <i>chlorophana</i>) založené na údajích z herbářových položek.	27
Obrázek 8. Sken polyakrylamidového gelu pro mikrosatelit MS-SX 11.	33
Obrázek 9. Sken polyakrylamidového gelu pro mikrosatelit MS-SX 12.	34

Poděkování

Děkuji především Radimovi, který mi umožnil začít pracovat na vrbách a věnovat se jim jako práci i jako zálibě, strávil se mnou spoustu hodin v labu a pomáhá se vším, co je potřeba.

Dále děkuji „laboratorním patriotům“ Luboši Majeskému a Michalu Sochorovi, kteří neváhají a podají pomocnou ruku, když je třeba. Děkuji i dr. Milanovi Kittnerovi za vždy ochotné zodpovězení dotazů.

Děkuji Univerzitě Palackého, Katedře botaniky a jejímu internímu grantu PRF-2010-001, díky kterému se mi dostalo malých finančních prostředků na realizaci práce.

Děkuji také Vencovi Dvořákovi za pomoc s DMAPem a podnětné debaty k tématice vzácných rostlin.

Velký dík patří i mým bývalým spolubydlícím Vendy, Radce a Cibuli, bez kterých bych nikdy nebyla schopná dojít až ke státnicím a obhajobám. O to se zasloužila i rodina a přítel, jim také děkuji.

Děkuji Správě Chráněné krajinné oblasti Jeseníky (hlavně Jindřichu Chlapkovi) za poskytnutí užitečných informací, udělení povolení a doufám, že i třeba jako budoucí národní park mi toto povolení prodlouží...

A jako poslední musím poděkovat Mezinárodní asociaci přátel dugongů, kteří dodávali podporu ve chvílích nejtěžších...

V Olomouci 7. května 2010.

Úvod

Tato diplomová práce je zaměřena na horské druhy vrby České republiky, jmenovitě na vrbu hrotolistou svěží, vrbu slezskou a jejich křížence. Všechny 3 taxony se vyskytují a kříží na lokalitě Velká kotlina v Hrubém Jeseníku. Tato karová lokalita je jedinečná i ve středoevropském měřítku. Vrby se v terénu poměrně těžko determinují, protože mají určovací znaky redukované v důsledku anemochorie a entomogamie. Často a snadno mezi sebou hybridizují, a tak dochází ke vzniku hybridních rojů. V nich je potom obtížné odlišit druhy rodičovské od kříženců. Výzkum hybridizace je v dnešní době běžný, používány jsou především metody založené na studiu DNA. Lokalita Velká kotlina je ideálním místem ke studiu hybridní zóny, která zde mezi studovanými taxony vzniká. Z pohledu ochrany přírody je studovaný taxon vrba hrotolistá svěží významným druhem (druh silně ohrožený). Proto je v jejím zájmu bližší studium vlastností jejích populací v ČR.

Čeleď Salicaceae a rod *Salix*

Čeleď vrbovité (*Salicaceae* MIRBEL) vyskytující se téměř po celém světě jsou dvoudomé anemochorní opadavé keře i stromy. Těžiště rozšíření má v mírném až subarktickém pásmu obou polokoulí. V užším pojetí zahrnuje 2-3 rody: východoasijský monotypní rod *Chosenia* NAKAI a holarkticky rozšířené rody topol (*Populus* L.) a vrba (*Salix* L.). Poslední jmenovaný, rod *Salix* je nejpočetnější a je uváděno 300-600 druhů (Skvortsov 1968, Fang 1987, Argus 1997 aj.). Přestože zástupce rodu nalezneme téměř po celém světě (s výjimkou Austrálie a Nového Zélandu), těžištěm rozšíření jsou oblasti v mírném až subarktickém pásmu severní polokoule. Rod *Populus* se s 40-110 druhy vyskytuje hlavně v boreálním až subtropickém pásmu severní polokoule (Chmelař & Koblížek 1990).

Rostliny rodu *Salix* patří ke kvetoucím rostlinám doloženým ještě z před dob ledových. K druhům tehdy rostoucím patří např. *Salix reticulata* L. či *S. herbacea* L. Vrby se pravděpodobně z teplého temperátního pásu a subtropů rozšířily nepatrně do tropů, hojně se rozrostly právě v temperátu a posléze i v arktických oblastech. Místo původu tohoto rodu bylo nejspíše v horách východní Asie, kde se vyskytuje blízce příbuzný rod *Chosenia* a některé primitivní a evolučně staré druhy topolů. Evolučně původnější vrby se vyznačovaly stromovým vzrůstem, subtropickou distribucí a diploidním počtem

chromozómů. Naopak, evolučně odvozenější druhy vrb se vyskytují v temperátní zóně, jsou spíš keřovitého vzrůstu a jsou polyploidní (Dorn 1976).

Historicky nejdůležitějším obdobím pro rod *Salix* byly doby ledové, kdy docházelo k ústupu druhů ze severu, přežívání populací v refugíích, jejich izolaci a diferenciaci. Velký význam měly rovněž doby meziledové, kdy probíhala expanze populací a hybridizace mezi předtím izolovanými druhy (populacemi). Poté, co ledovce ustoupily, byly vrby jedním z prvních kolonizátorů nově vzniklých biotopů (uvolněných ledovcových sedimentů) díky lehkým anemochorním semenům (Newsholme 1992).

Zástupci rodu *Salix* mají mohutný kořenový systém, pupeny kryté zpravidla 1 šupinou, listy střídavé, celistvé, často krátce řapíkaté, palisty dobře vyvinuté. Květenstvím jsou vzpřímené jehnědy, květy jsou jednopohlavné, samčí mají 2(-12) tyčinek, pylová zrna jsou kulovitá až elipsoidní, samičí květy s gyneceem srostlým ze dvou plodolistů, většinou zřetelnou čnělkou a dvěma bliznami (Chmelař & Koblížek 1990). Plodem je tobolka, semena jsou kyjovitá, lysá. Jsou entomogamní a anemochorní, důležité je vegetativní rozmnožování.

Rod *Salix* můžeme rozdělit na 3 základní podrody: (1) *Salix* L., což jsou většinou stromové vrby kvetoucí až po olistění větví; (2) *Vetrix* DUMORT., zahrnující hlavně keře nebo malé stromky kvetoucí před nebo současně s olistěním větví a (3) *Chamaetia* (DUMORT.) NASAROV, kam patří drobné keříčky vrb převážně reliktních stanovišť. Hybridizace je častá ve všech podrodech (Elven & Karlsson 2000), ale je znám pouze jediný přirozený hybrid mezi podrody (*Salix triandra* L. × *S. viminalis* L. = *S. ×mollissima* EHRH.), ostatní údaje (zvláště údajní kříženci druhů subgen. *Chamaetia* × subgen. *Vetrix*) jsou sporné.

Evoluce rodu je oproti jiným dřevinám poměrně rychlá. Vrby mají krátký generační čas a také areály rozšíření tomu napovídají. Zatímco některé jiné druhy mají areály oddělené (severní Evropa, hory střední Evropy a severní Amerika), u vrb se projevuje spíše vikariance (Elven & Karlsson 2000). Tato vikariance se dá dobře ilustrovat na komplexu druhů *Salix serpyllifolia* SCOP. (Alpy), *S. retusa* L. (Alpy, Karpaty a hory na Balkáně) a *S. kitaibeliana* WILLD. (Karpaty), což jsou blízké příbuzné druhy lišící se pouze kvalitativními znaky (Chmelař 1972).

Základním chromozomovým číslem rodu *Salix* je $x = 19$. Polyploidie je vyvinuta až do $2n = 12x = 228$, blízké příbuzné druhy ale mají počty chromozómů stejné (jsou homoploidní). Mnoho našich vrb jsou diploidní (*S. daphnoides* VILL., *S. eleagnos* SCOP., *S. hastata* L., *S. herbacea* L., *S. lapponum* L., *S. purpurea* L., *S. silesiaca*

WILLD., *S. repens* L.), většina stromových druhů vrb (*S. alba* L., *S. babylonica* L., *S. cinerea* L., *S. fragilis* L.) jsou tetraploidní. Vzácněji jsou některé druhy hexaploidní (*S. phylicifolia* L.), oktoploidní (*S. serpyllifolia*) a nebo dekaploidní. Chromozomy vrb jsou velmi drobné (Chmelař 1979).

Většina zástupců rodu *Salix* je vysoce polymorfní a plastická. Např. *S. nigricans* SM. je známá jako keříček i jako strom, listový okraj *S. hastata* může přecházet z celistvého, neděleného k žláznatě pilovitému. Habitat, velikost a tvar listů jsou často silně ovlivněny vlastnostmi prostředí (Elven & Karlsson 2000), což podstatně ztěžuje identifikaci druhů v terénu.

Vrby můžeme určovat buď podle olistěných větévček, nebo podle samčích a samičích květů (Chmelař & Koblížek 1990). Dále nám mohou pomoci některé další morfologické znaky typické pro tento rod: (1) lišty na dřevě (po sloupnutí kůry se vyskytují např. u *Salix aurita* L., *S. cinerea*); (2) primární listy neboli katafyly (nejnižší list na prýtu) či (3) nektariové žlázy (u většiny vrb je vyvinuta jen jedna). Větve vyrůstající z poničených nebo ořezaných keřů mají často abnormálně velké listy a palisty (i u druhů, které běžně palisty nemají). Tyto větve by neměly být sbírány, stejně jako větve extrémně mladé a malé (Elven & Karlsson 2000).

Vrby se rozmnožují jak pohlavně (spojením samčí a samičí gamety a následnou kombinací rodičovských genomů), tak nepohlavně tvorbou ramet, které jsou geneticky identické s mateřskou rostlinou. Tyto dva způsoby se dnes považují za komplementární – vzájemně se doplňují, aby udržely genetickou variabilitu a podporovaly rostlinné populace a jejich šíření (Salick & Pfeffer 1999). U vrb se to týká hlavně nepohlavního – klonálního rozmnožování a hybridizace – tedy křížení mezi různými druhy, což je extrémní forma rozmnožování pohlavního.

Vrby jsou rostliny dvoudomé, což znamená, že každá rostlina tvoří buď samičí nebo samčí květy. Většina rostlin je ale jednodomých, dvoudomost se vyvinula pouze u 4 %, pravděpodobně v důsledku vzniku polyploidů. Pokud vznikne polyploid, druh se zmnoženou sadou chromozomů, tak je odkázán převážně na samosprašení. Trpí pak vlivem silného příbuzenského křížení neboli inbreedingu. V důsledku toho se může vyvinout právě oddělené pohlaví – tedy dvoudomost, jako je tomu např. v rodu kustovnice (Miller & Venable 2000).

Poměr obou pohlaví nebývá vyrovnaný, u vrb je běžné, když je tento poměr vychýlen ve prospěch samic (Alliende & Harper 1989). U *Salix cinerea* je tento poměr 2:1 v prospěch ♀, u *S. caprea* L. 2:1 v prospěch ♀, u *S. aurita* 4:1 v prospěch ♀, u *S.*

rosmarinifolia L. 3:1 ve prospěch ♀, u *S. herbacea* a *S. polaris* WAHLENB. 3:1 ve prospěch ♀, u *S. arctica* PALLAS také 2:1 ve prospěch ♀ (Falinski 1980, Crawford & Balfour 1983, Alliende & Harper 1989, Dawson & Bliss 1989). Vychýlený poměr pohlaví může být někdy pro populace nebezpečný, časem může dojít k vymizení jednoho pohlaví – a tím k nemožnosti pohlavního rozmnožování.

Pokud jsou rostliny dvoudomé a jejich prostředí heterogenní, vzniká určitý pattern výskytu samic a samců. U vrb jsou pohlaví oddělená a dokonce existují studie, které prokazují různé ekologické preference jednotlivých pohlaví. Např. u *Salix arctica* samice preferují vlhčí, chladnější stanoviště s více živinami, naproti tomu samci se vyskytují spíše na sušších, teplejších stanovištích s méně živinami (Dawson & Bliss 1989).

Středoevropské populace vysokohorských vrb

Středoevropské populace vysokohorských vrb mají podobnou evoluční historii, procházejí stejnými procesy a jsou ovlivňovány podobnými faktory. Obecně patří vysokohorské vrby do podrodu *Chamaetia* a jsou to drobné keříčky se zpravidla reliktním výskytem. To znamená, že jsou přizpůsobeny životu v klimaticky nepříznivých podmínkách (ať už v tundře nebo v horách) a v chladnějších obdobích měly tyto druhy širší rozšíření. V současnosti mají zpravidla těžiště rozšíření v boreálním a arktickém pásmu Eurasie a Ameriky, kde se vyskytují souvisle, popř. ve vysokých horách mírného pásma, kde je výskyt většinou ostrůvkovitý až izolovaný. Zároveň je ale tento ostrůvkovitý výskyt vázán na hory, které fungují jako refugia a genová centra, a často mívají vysoký stupeň endemismu.

V České republice se z těchto pravých vysokohorských vrb z podrodu *Chamaetia* vyskytuje pouze *Salix herbacea* (Krkonoše, Hrubý Jeseník) a *S. myrtilloides* L. (Slavkovský les, Železné hory). Dále u nás jsou druhy jako *S. lapponum* (Krkonoše, Hrubý Jeseník), *S. bicolor* WILLD. (Krkonoše), *S. appendiculata* VILL. (Šumava, Novohradské hory), *S. hastata* (Hrubý Jeseník) a *S. silesiaca* (Sudety a Beskydy), které patří do podrodu *Vetrix* a vyskytují se v horách. Do hor mohou dosahovat i druhy, které mají těžiště rozšíření v nižších polohách, ale přežijí i extrémnější podmínky: např. *S. caprea*, *S. aurita* nebo *S. cinerea*.

Vysokohorské rostliny obecně musí být dobře adaptovány na určité faktory prostředí, které jsou pro hory typické. Musí vydržet extrémní výkyvy teplot mezi létem a zimou,

výkyvy i v létě často v rozmezí desítek stupňů Celsia, dlouhotrvající sněhovou pokrývkou, pády lavin, krátkou vegetační sezónou, vyšší intenzitu UV záření a časté vysychání (Jeník 1961). U vrb se díky tomu vyvinul drobný keříčkovitý vzrůst, časté vegetativní rozmnožování, ochlupení listů či symbióza s mykorrhizními houbami (Newsham et al. 2009).

Pro vysokohorské vrby je typická mykorrhiza, tedy symbióza rostliny (jejích kořenů) s houbovým organismem. U vrb se jedná o tzv. ektotrofní mykorrhizu (houba tvoří kolem kořene hyfový plášť a neproniká téměř vůbec do kořene) a erikoidní (houbová vlákna pronikají dovnitř do kořene). Toto soužití bývá prospěšné pro oba druhy, rostlina poskytuje houbě uhlík, energii a houba rostlině vodu a některé minerální látky. Výskyt je potvrzen hlavně u arktických druhů vrb, např. u *Salix arctica*. U *S. polaris* bylo potvrzeno kolem 50 ektomykorrhizních druhů hub (Newsham et al. 2009). Právě ektotrofní mykorrhiza je důležitá i pro *S. herbacea* v Rakousku, která je částečně díky ní schopná rychle kolonizovat prostor uvolněný ledovcem (Mühlmann & Peintner 2008). Bylo u ní prokázáno 19 druhů houbových organismů. Z toho můžeme usuzovat, že pro všechny vrby žijící v extrémních podmínkách znamená mykorrhiza nutnou součást jejich přežití.

Již v pozdních třetihorách docházelo k postupnému ochlazování klimatu v Evropě a ve čtvrtohorách přišly doby ledové – glaciály, střídané klimaticky teplejšími obdobími – dobami meziledovými (interglaciály). V Evropě došlo k zalednění a zároveň poklesu mořské hladiny. To samozřejmě změnilo i teplomilnou vegetaci, která se zde v třetihorách vyvinula. V nejchladnějších obdobích se v České republice vyskytovala vegetace tundry s mechy a lišejníky na horách a vegetace studených stepí v nížinách, les zde téměř vymizel. Souvislé zalednění dosáhlo severních hranic naší země a v Krkonoších, Hrubém Jeseníku a na Šumavě se tvořily malé ledovce místní (Jeník 1961). Díky nim vznikly na našem území ledovcové kary (tzv. kotle), které jsou dodnes patrné a mnohé z nich jsou významnými botanickými lokalitami (např. tzv. krkonošské botanické zahrádky). S postupným oteplováním se opět šířil smíšený opadavý les temperátního pásma a do našich hor ustupovaly z nížin rostliny, které zde nacházely chladnější mikroklima. Dnes tyto chladnomilné druhy rostlin nazýváme glaciální relikty. Patří sem i některé naše druhy vrb, jako např. *Salix herbacea*, *S. lapponum* a *S. hastata*.

Tyto izolované populace následně prochází svým unikátním vývojem, který je závislý na podmínkách konkrétního refugia (specifické klima, typ podloží) a díky tomu se

v nich do současnosti vyvinul vysoký stupeň endemismu. Vyskytuje se zde mnoho rostlin a společenstev, které se celosvětově vyskytují právě jen v tomto refugiu (např. *S. bicolor* v Úpské jámě v Krkonoších).

Vysokohorské vrby jsou v dnešní době téměř všechny nějakým způsobem chráněny, protože v zemích střední Evropy mají jen malé izolované populace. Nejvíce je ohrožují imise a následující změna chemismu půd, nepůvodní druhy živočichů (kamzíci), turistický ruch, nekontrolovaný sběr botaniky a potenciálně klimatické změny. Sešlap turisty je někdy zvlášť nebezpečný pro další vývoj těchto malých izolovaných populací. Rossi et al. (2006) prokázali, že sešlap polykormonů *Salix herbacea* způsobuje značný úbytek pokryvnosti těchto polykormonů a také snižuje podíl pohlavního rozmnožování (tvorbu jehněd).

Klimatické změny mohou tyto druhy ohrozit hlavně změnou mikroklimatických podmínek a následným vymizením výše zmiňovaných refugií a celkově ztrátou genetické diverzity. Alsos et al. (2009) studoval *Salix herbacea*, její genetickou diverzitu pomocí AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), makrofosilních záznamů a modelů rozšíření druhu v minulosti a současnosti. Tento multidisciplinární přístup se ukázal jako vhodný a autoři zjistili, že pokud vlivem globální změny klimatu dojde k vymizení některých biotopů *S. herbacea* (46-57 %) do roku 2080, nedojde ke ztrátě odpovídajícího procenta genetické diverzity. Podle použitého klimatického scénáře se ztratí přibližně jen 5 %, protože tato vrba se ze svých refugií v jižní a střední Evropě vracela do Skandinávie v širokém pásu, což umožňovalo udržet genetickou diverzitu vysokou. Existují ale i druhy, které velkou část genetické diverzity ztratí, neboť jí mají koncentrovanou právě v jižních alpínských refugiích. Rekonstrukce migrace rostlinných druhů v minulosti nám může leccos napovědět o současné genetické diverzitě druhu a zároveň naznačit, jak se může druh v budoucnu vyrovnávat se změnou klimatu.

Právě u vysokohorských druhů vrb a jejich střeoevropských populací je nutné si uvědomit jejich migraci do refugií během dob ledových, případnou diferenciaci a následnou postglaciální expanzi zpět do oblastí, kde odtál ledovec. Střeoevropské populace potom zůstaly geograficky a reprodukčně izolovány, postupem času se víc a víc fragmentovaly a jejich početnost zpravidla klesala nebo stagnovala.

Rostlinné populace mají vždy určitou početnost a jejich velikost není konstantní. Zároveň v nich probíhají náhodné změny alelových četností. Ovlivňují je také další evoluční procesy jako migrace, mutace či přírodní výběr, ale změna alelové četnosti je

základním procesem evoluce. Existují zde různé další procesy, které alelovou četnost mění. V méně početných populacích bývají tyto změny mnohem víc účinné nebo dokonce fatální. Je to (1) náhodný drift genů, při kterém se náhodně mění frekvence alel určitého genu (v malé populaci může zcela změnit genofond populace, ve velké populaci se toto kolísání většinou vyrovná) a (2) vliv zakladatele, kdy novou populaci zakládá přeživší jedinec či několik jedinců, a proto může nově vzniklá populace obsahovat jen malou část původní genetické variability (Relichová 2009).

Pokud dojde k náhlé restrikci početnosti, populace prochází hrdlem láhve (bottle-neck effect), dělí se na jednotlivé samostatné fragmenty, které od sebe mohou být izolovány, genový tok se přerušuje a nastává prostor pro náhodný drift genů a inbrední depresi, kdy je populace v důsledku častého příbuzenského křížení složena z jedinců se zvýšenou genetickou homozygotností a zároveň se sníženou fitness. To vše způsobí, že druh přestává být schopen reagovat na změny jeho prostředí, je geneticky ochuzen a populace může úplně vymizet (Briggs & Walters 2001). Rychlost tohoto vymizení pochopitelně závisí na mnoha faktorech, např. na přítomnosti semenné banky nebo krátko či dlouhověkosti rostlin (krátkověké vymizí rychleji). V malých populacích dvoudomých druhů také nastává nebezpečí, že zmizí jedno z pohlaví, a tak druh přestane mít možnost pohlavního rozmnožování.

Genetická proměnlivost populace je pro její úspěšné přežití nezbytně nutná. V malých populacích tato proměnlivost často klesá a rostliny jsou často vystaveny genetické erozi. Stává se, že vzácný domácí druh se začne křížit s druhem introdukovaným člověkem. Populace silně ohroženého druhu *Viola lutea* subsp. *sudetica* (WILLD.) NYMAN je v dnešní době silně poškozena introdukcí *V. tricolor* L. (Krahulcová et al. 1996).

Studie populační variability jsou prováděny např. na základě variability na úrovni izozymů, v malých populacích bývá tato variabilita malá. Chrtek et al. (2007) zjišťovali genetickou variabilitu u vybraných horských druhů rostlin, mj. u *Salix herbacea*, právě pomocí analýzy izozymů. Tato analýza umožní odhalit počet jednotlivých genotypů vyskytujících se v populaci a pro *S. herbacea* bylo zjištěno 7 jednotlivých genotypů ze 3 lokalit. Problémem u této metody je, že ne vždy se veškerá variabilita na úrovni genomu projeví i ve variabilitě proteinů.

Zjištění vnitropopulační variability je důležité nejen pro poznání historie populace, ale může nám napovědět, jakým směrem se bude populace vyvíjet. Velké a geneticky stabilní populace se lépe vypořádají s vlivy, které byly jmenovány výše a se kterými se právě malé či geneticky chudé populace vypořádat mnohdy nemohou.

Hybridizace a hybridní zóny

Křížení neboli hybridizace je v biologii pojem označující rozmnožování dvou odlišných druhů. Vzniklý organismus se potom nazývá kříženec neboli hybrid. Bývá to jednotlivá rostlina nebo zvíře vzniklé křížením rodičů, kteří mají odlišné genotypy. Jsou sterilní nebo fertillní, záleží na kvalitativních a kvantitativních rozdílech v genomech obou rodičů. Pokud jsou sterilní, mohou se ale rozmnožovat vegetativně (Allaby 2006).

Hybridizace byla v minulosti považována za slepou uličku. Označovala proces, který sice existuje, ale druhy příliš neovlivňuje. V 19. století prošly tyto názory určitým cyklickým vývojem. Od 40. do 60. let se původ morfologické a cytologické variability rostlin přisuzoval introgresivní hybridizaci. Od 60. do 80. let byly tyto názory podrobeny kritice a autoři byli k vlivu hybridizace spíše skeptičtí. A od 90. let se hybridizaci opět začíná mnoho autorů věnovat, některé minulé předpoklady jsou potvrzeny a některé vyvráceny (Rieseberg 1995).

V současnosti se hybridizace považuje za jeden z procesů, které mohou silně ovlivnit adaptaci druhů pomocí introgrese, evoluci druhů, jejich zánik či vývoj mnoha populací ohrožených druhů (Barton 2001). Molekulární fylogenetická data a studie geografické distribuce molekulárních markerů potvrzují, že hybridizace je jak geograficky, tak fylogeneticky rozšířená (Rieseberg 1995).

Tato práce se zabývá hybridy interspecifickými – tedy mezidruhovými. Existuje samozřejmě i hybridizace mezirodová, ale v případě vrb k ní nedochází. Ahmadi et al. (2010) zkoušeli, zda je to možné a povedlo se jim zkřížit *Salix aegyptica* L. a *Populus caspica* BORNM za účelem vzniku mezirodového hybrida se zvýšeným výnosem, např. pro energetické účely.

S problematikou interspecifické hybridizace úzce souvisí problém definice druhu. Různé koncepty druhů se liší svými měřítky a hranicemi. Základní koncept – biologický – se řídí reprodukčními bariérami, naopak jiné koncepty kladou důraz na děje, které druhy spojují. Ekologický koncept považuje druh za jeho ekologickou niku čili část životního prostředí a zdrojů, které organismus využívá. Nově existuje i genealogický koncept, který vymezuje druh jako soubor organismů s jedinečnou genetickou historií. To zkoumají podle sekvencí NK a bílkovin (Campbell & Reece 2006).

Podle klasického biologického konceptu (Mayr 1963) je druh skupina populací, které se mezi sebou navzájem kříží a jsou reprodukčně izolovány od populací jiných druhů. Tento koncept je pro studium hybridizace nepoužitelný, pokud by platil doslova,

k mezidruhové hybridizaci by nemohlo docházet. Lépe je proto používat populace, které jsou izolovány geneticky než reprodukčně (Rieseberg & Carney 1998).

Pokud máme v přírodě dvě populace různých druhů, které byly v minulosti odděleny, vyvíjely se samostatně a v současnosti jsou opět propojeny, může dojít ke dvěma extrémním situacím. Buď se spolu křížit nemohou, hybridizace je téměř nulová a vzniklí hybridi jsou málo životaschopní, anebo se populace sice liší, ale izolační bariéry mohou být jen malé nebo žádné. V tom případě k hybridizaci dochází a záleží jen na tom, jestli se v prostředí vyskytují biotopy pro křížence vhodné – přechod mezi biotopy obou rodičů. Pokud tento přechodový biotop neexistuje, hybrid bude znevýhodněn, prostředí bude zvyhodňovat buď jednoho nebo druhého rodiče. Pokud ale přechodový biotop existuje, hybrid se v něm může stát početnějším a zdatnějším než druhy rodičovské. V takových situacích vznikají velké hybridní roje (Allaby 2006). To jsou kontinuální skupiny hybridů, kteří jsou od sebe morfologicky odlišní, vznikají hybridizací 2 druhů a následným zpětným křížením s rodiči a mezi hybridy navzájem. Pokud jsou na stanovišti vhodné podmínky nebo je stanoviště hybridní populace od rodičovských izolováno, může také vzniknout nový hybridní druh (Rieseberg & Carney 1998).

Pokud existuje určitá oblast, kde se stýkají areály dvou různých druhů či poddruhů, které se spolu mohou křížit a dávat tak vznik plodnému potomstvu, vzniká tzv. hybridní zóna (Barton & Hewitt 1985). V této zóně se potom vyskytují jak čisté rodičovské druhy, tak široká škála hybridů první generace, pozdějších generací a kříženci zpětní. Představují většinou velký problém pro taxonomii a pro definici druhů celkově. Jsou většinou výsledkem určité rovnováhy mezi šířením hybridů a selekcí působící proti hybridům.

Hybridní zóny mohou být odhaleny zaznamenáváním frekvence určitých diagnostických alel nebo fenotypových charakteristik pro obě populace podél transektu mezi nimi. Obvykle mají potom tvar esovité křivky, která může být široká (postupná) nebo úzká (strmá) podle poměru přežití hybrida a rekombinace genů (Barton 1983). Určitý pattern frekvencí genotypů v hybridní zóně nám může hodně říct o takových parametrech jako je tok genů nebo tlak přírodního výběru (Barton & Hewitt 1985).

Dříve se ke studiu hybridizace a hybridních zón používaly hlavně morfologické znaky rostlin. Později se ukázalo, že ne všichni kříženci mohou být pomocí běžných určovacích znaků odhaleni a s rozvojem techniky se začaly studovat nejprve chromozomy rostlin a posléze už samotné sekvence DNA. Dnes je většina studií

hybridizace a hybridních zón založena na metodách molekulárních markerů. Markery nám poskytují informace o organismu získané s pomocí analýzy jeho molekul (proteinů: analýza izozymů nebo nejčastěji DNA: tzv. DNA markery).

Hybridizace v rodu *Salix*

Hybridizace mezi vrbami je běžná, mnohem častější než u ostatních rostlinných rodů. Hybridy se objevují mezi různými druhy, mezi podrody výjimečně, častí jsou hybridy vícenásobní a někdy nejsou ani intermediární. Většinou jsou vrboví kříženci plodní a mohou se křížit s ostatními kříženci nebo se svými rodiči, což následně ztěžuje určování v terénu. V přírodě je hybridizace ztěžována dvoudomostí (tedy dostupností obou pohlaví) a rozdílnou dobou kvetení. Často vrby tvoří rozsáhlé hybridní roje (především podrod *Vetrix*, kam patří i zájmové druhy této diplomové práce), kde se pak nacházejí různá kontinua od rodičovských druhů po křížence a křížence zpětné, několikanásobné. Hybridizace probíhá hlavně v zónách, které jsou určitým způsobem disturbovány. Často jsou to zóny ovlivněné člověkem, což pravděpodobně vysvětluje velice častý výskyt hybridizace v Evropě (Newsholme 1992).

V 19. a první polovině 20. století se díky preferenci úzkého druhového konceptu každá nalezená varianta popisovala jako výsledek hybridizace a vyústila v popis mnoha nových druhů. V každém takto popsaném druhu byla tedy variabilita dost malá, nebyl brán ohled na v té době ještě nedostatečně prozkoumané procesy jako ekotypová variabilita či plasticita. Důraz byl kladen na jednotlivé morfologické znaky. Až později se přišlo na to, že právě tyto znaky jsou nejen u rodu *Salix* variabilní i v rámci druhu (Elven & Karlsson 2000).

Dříve byl tedy vliv hybridizace přeceňován, dnes však víme, že i přesto hraje v tomto rodě důležitou roli. Frekvence hybridizace v přirozeném prostředí a životaschopnost hybridů je různá. Stále zde existují určité bariéry zabraňující hybridizaci: rozdílné typy habitatů, odlišná doba kvetení, geografické bariéry, rozdílné stupně ploidie nebo neplodnost hybridů.

Vrbové hybridy můžeme podle životaschopnosti a biologického významu rozdělit do 4 kategorií (Elven & Karlsson 2000).

- (1) Sterilní nebo téměř sterilní hybridy vyskytující se hlavně na narušovaných stanovištích ve velice malém počtu. Patří sem zřejmě všichni kříženci diploidních a víceploidních rostlin. Někteří z nich jsou dnes častí pouze

v důsledku kultivace, ale mohou v člověkem ovlivněné krajině tvořit významnou část vegetace. Např. *Salix* ×*arctogena* FLOD.

- (2) Hybridi mezi diploidy a vyššími ploidy s průkazným zpětným křížením s víceploidním rodičem. Při tomto typu hybridizace probíhá stálý genový tok od diploidního rodiče ke kříženci a druhému rodiči. Tito kříženci se často nacházejí v zónách styku areálů rodičů a v intermediárních biotopech. Např. *Salix* ×*nothula* ANDERSSON.
- (3) Vysoce plodní hybridy mezi stejně ploidními rodiči, hlavně mezi diploidy. Probíhá u nich časté zpětné křížení s rodiči a tvoří tak velké hybridní roje, které mohou obsahovat 3 a někdy i více druhů. Vyskytují se hlavně na styku areálů druhů a jejich ekologického styku. Můžeme je najít např. na přechodu mezi křovinami a močálem, občas se zde vyskytnou disturbance. Např. komplex druhů *Salix hastata/herbacea/lanata*.
- (4) Hybridi vznikající na přechodu od jednoho k druhému blízkému příbuznému druhu. Vznikli v důsledku nekompletní speciace v oddělených areálech během posledního zalednění s následným propojením. Vyskytují se ve stejných biotopech jako rodiče a v některých oblastech mohou být jedinými zástupci, což potom způsobuje problémy v určování. Např. kříženec *Salix rosmarinifolia/repens* (*S. repens* subsp. *repens*/*S. repens* subsp. *rosmarinifolia*).

Co se týče křížení vrb v České republice, dosud je z území ČR uváděno 36 kříženců vrb (Chmelař & Koblížek 1990, Vašut & Pečinka 2000, Koblížek 2002).

Křížence u nás si můžeme rozdělit do 2 skupin:

- (1) Hojní kříženci, druhy se schopností vytvářet zpětné křížence a hybridní roje; jedná se vždy o křížení příbuzných druhů (v rámci stejného podrodu), hojně lze v ČR pozorovat křížence druhů *Salix alba*, *S. fragilis* (např. nejčastěji *S.* ×*rubens* SCHRANK = *S. alba* × *fragilis*), nebo *S. caprea*, *S. silesiaca*, *S. aurita*, *S. viminalis* etc. (nejčastěji např. *S.* ×*subcaprea* N. J. ANDERSSON, *S.* ×*subaurita* N. J. ANDERSSON, *S.* ×*rubra* HUDS. aj.) (Chmelař 1971-1973, Chmelař & Koblížek 1990).
- (2) Vzácni kříženci, jejichž výskyt je ojedinělý a vzácný, obvykle lze nalézt jednu rostlinu mezi rodiči. Nacházíme je zpravidla pouze tam, kde spolu hojněji rostou rodičovské druhy. Znaky těchto kříženců jsou obvykle nápadně intermediární. Do této kategorie patří např. kříženci vrby popelavé (*S. cinerea*) nebo také kříženci snadno křížitelných druhů, ale vzácně se vyskytující na společné

lokalitě (Chmelař 1971-1973, Chmelař & Koblížek 1990), jako např. *S. ×angustifolia* (Vašut & Pečinka 2000).

Cíle práce

V květeně ČR je zastoupeno kolem 300 druhů původních dřevin, z nichž nemalá část je do nějaké míry ohrožena (Holub & Procházka 2000). Příčiny tohoto ohrožení bývají různé. Každý taxon má jinou biologii, jiné ekologické nároky, reprodukční mechanismy, historii a každý je v systému jinak vymezen.

Pro pochopení problematiky ohrožených druhů dřevin je nutné nejprve znát přesné vymezení taxonů, jejich vztah k příbuzným druhům, vztahy k jiným populacím téhož druhu, genetickou strukturu populací a následně lze pak podchytit příčiny jejich ohrožení.

Tato práce má za cíl vytvoření základu pro pochopení populačních vztahů mezi vrbou hrotolistou, vrbou slezskou a jejich křížencem – tj. zmapovat jejich současné rozšíření, zjistit na lokalitě poměr sterilních a nesterilních rostlin a poměr rostlin samčích a samičích a hlavně zoptimalizovat podmínky pro použití mikrosatelitů v podmínkách Katedry botaniky UP v Olomouci. Tato metoda ještě pro studované taxony nikde optimalizována nebyla a i v rámci ČR se mikrosatelitům u rodu *Salix* věnuje pouze jedno pracoviště (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně).

Práce by měla pokračovat v rámci doktorského studia, kdy se budou hlouběji analyzovat genetické vnitro-populační vztahy mezi taxony vrb ve Velké kotlině právě za pomoci mikrosatelitů, studiem geneticko-evolučních vztahů s rostlinami z Evropy a hybridizačními zónami a hybridizací vrb celkově. Tato diplomová práce je potřebným odrazovým bodem pro úspěšný začátek této práce navazující.

Práce by zároveň měla mít přínos pro praktickou ochranu přírody a pro Správu CHKO Jeseníky tím, že nastíní stav populací vrb, hlavně vrby hrotolisté, ve Velké kotlině.

Cílem této diplomové práce je:

- (1) zmapování současného rozšíření vrby hrotolisté a jejího křížence s vrbou slezskou v České republice, revize herbářových položek a tvorba mapy současného rozšíření;
- (2) zjištění počtu sterilních rostlin a poměru pohlaví vrby hrotolisté a jejího křížence s vrbou slezskou na lokalitě Velká kotlina;

- (3) optimalizace použití mikrosatelitů pro studium vrby hrotolisté, vrby slezské a jejich křížence;
- (4) nástin budoucího využití mikrosatelitů pro účely ochrany přírody.

Materiál a metody

Abychom mohli splnit cíle práce, je nutné si nejprve charakterizovat lokalitu, kde se studované taxony vyskytují, dále se musíme dozvědět základní charakteristiky právě studovaných druhů a probrat různá specifika studované populace ve Velké kotlině. Poté probereme metody, které nám pomohou k dosažení našich cílů. V případě početnosti pohlaví terénní sčítání, dále revizi herbářových položek, tvorbu map a následně všechny potřebné přípravné a hlavní práce v laboratoři. Ty jsou nutné hlavně k optimalizaci použití mikrosatelitů pro studium hybridizace a genetické variability populace v podmínkách Katedry botaniky UP v Olomouci.

Charakteristika lokality

Pro studium hybridizace vybraných vysokohorských druhů rodu *Salix* byla vybrána lokalita Velká kotlina (cca 1290-1400 m n. m., Loc: 50°3'19.739"N, 17°14'12.015"E), (Obr. 1), která se nachází v Národní přírodní rezervaci Praděd v Chráněné krajinné oblasti Jeseníky. Kotliny jako takové jsou jedním z typických znaků tzv. evropských středohor, dále je charakterizují např. převážně silikátové složení, velké geologické stáří, nepoužitelnost klasické altitudinální zonace a vysoká druhová diverzita. Kromě Jeseníků patří v České republice k evropským středohorám ještě Krkonoše a Králický Sněžník (Jeník 1961).

Národní přírodní rezervace Praděd je chráněna především pro zachovalou přírodu vrcholových partií s charakterem severské tundry. V bezlesí, které zde začíná v nadmořské výšce 1310 m n. m. (Treml & Banaš 2000), se vyskytují alpské hole, unikátní mrazové sruby (Petrovy kameny, Tabulové skály) a lavinové dráhy v karech, které vznikly činností ledovce (Velká a Malá kotlina). Toto bezlesí může právě v oblastech kotlin zasahovat podél lavinových drah pod běžnou hodnotu (např. ve Velké kotlině je to cca 1290 m n. m.). Okolo tohoto bezlesí jsou chráněny především zachovalé klimaxové smrčiny s příměsí jeřábu (Šafář et al. 2003).

Velká kotlina je jednou z botanicky nejbohatších a nejcennějších lokalit v rámci střední Evropy. Vyskytuje se zde kolem 480 druhů a poddruhů cévnatých rostlin, z toho 117 v určitém stupni ohrožení. Mezi nejvzácnější druhy zde patří stenoendemit ČR s jedinou světovou lokalitou jitrocel tmavý sudetský (*Plantago atrata* subsp. *sudetica* (PILGER) HOLUB, C1, §1, ČK, WORLD-E), další endemity jako hvozdík kartouzek sudetský

(*Dianthus carthusianorum* subsp. *sudeticus* L., C1, §1, ČK, WORLD-I) a mateřídouška sudetská (*Thymus pulcherrimus* subsp. *sudeticus* (LYKA) P.SCHMIDT,), zvonek vousatý (*Campanula barbata* L., C2, §2), hořeček jarní (*Gentiana verna* L., C1, §1) a mnohé další (Procházka 2001).



Obrázek 1. Lokalita Velká kotlina (Hrubý Jeseník, CZ) s výskytem studovaných taxonů vrb.

Vegetaci a celkový charakter Velké kotliny ovlivňují faktory fyzikální, geografické i klimatické. Údolím Divoké Desné foukají severozápadní větry k Vysoké holi, na vrcholu zrychlují, tvoří vyfoukávaná společenstva alpínských holí a vzápětí padají přes hranu na jihovýchodní svah Velké kotliny, kde se zmírní a turbulují. Tento jev se nazývá anemo-orografický systém (Jeník 1961) a funguje ve většině ledovcových karů evropských středohor. Díky větrnému proudění se na lokalitu dostává velké množství eolických sedimentů (minerální prach a organický detritus, jako např. listy, stélky rostlin či diaspor). Rostliny zde mají na výběr z mnoha mikrostanovišť. Typické je prolínání teplomilných a studenomilných prvků. Lavinové dráhy zároveň zabraňují vývoji lesa, proto se zde vyskytují přirozená bezlesá stanoviště. Díky tomu jsou tyto lokality tak neobvyklé a druhově bohaté.

Nejvýše položené jsou zde přirozené metličkové a smilkové porosty svazu *Nardo strictae-Caricion bigelowii* (*Nardo-Caricion rigidae*), na chráněnějších svazích jsou to trávníky svazu *Calamagrostion villosae*. Ve štěrbinách skalek a na vyfoukávaných místech se vyskytují porosty svazu *Juncion trifidi* a na některých skalkách ve Velké kotlině se také vyskytuje vegetace svazu *Agrostion alpinae*. Na osluněných svazích rostou druhově bohaté vysokostébelné trávníky svazu *Calamagrostion arundinaceae*, v nižších částech lavinových drah potom můžeme najít mozaiku křovin svazu *Salicion silesiaca*, které jsou občas nahrazovány vysokobylinnými porosty svazu *Adenostylion* a kapradinovými nivami svazu *Dryopterido-Athyrium*. Typickým stanovištěm pro celou NPR Praděd jsou prameniště svazu *Swertio-Anisothecion squarrosi*, ve kterém se hlavně vyskytuje objekt této práce, vrba hrotolistá. Lesní vegetaci při horní hranici lesa zde tvoří především rozvolněné papratkové smrčiny *Athyrium alpestre-Piceetum* nebo třtinové smrčiny *Calamagrostion villosae-Piceetum*.

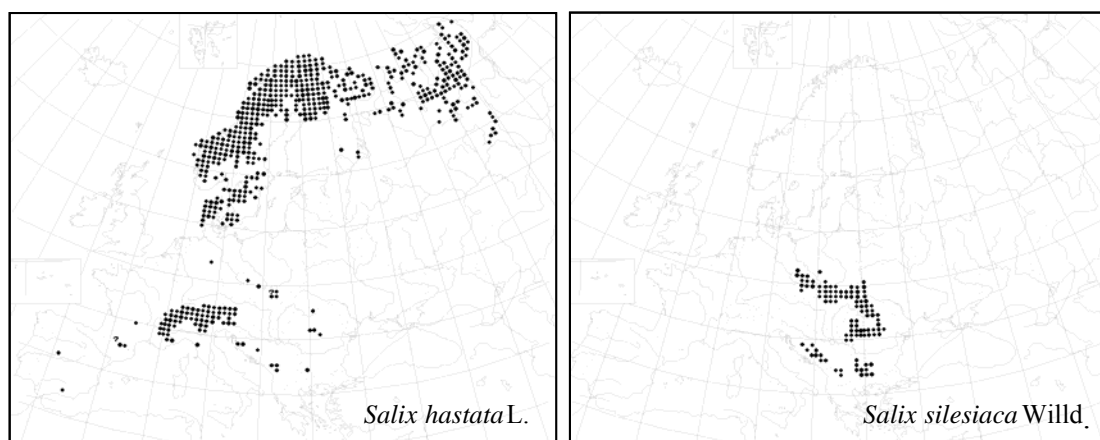
Současně se Velká kotlina potýká pouze s několika problémy. Jedním z nich jsou kamzíci, jejichž populace se podílí na okusu některých vzácných druhů rostlin (Chlapek in verb.) a na změně fyzikálně-chemických podmínek na místech jejich nocovišť. Zároveň se zde ještě pořád občas pohybují turisté či lidé sbírající borůvky pomocí hřebenu. Sporným bodem je také kosodřevina, která je v Jeseníkách nepůvodní. Ve Velké kotlině už byla naštěstí odstraněna.

Charakteristika studovaných taxonů

Tato diplomová práce se věnuje především druhu vrba hrotolistá, dále jejímu křížení s vrbou slezskou a následně jejich kříženci. Všechny tyto vrby spadají do podrodu *Vetrix*. Vrba hrotolistá je u nás druhem silně ohroženým (Procházka 2001), zatímco vrba slezská žádný statut ohrožení nemá.

Vrba hrotolistá svěží (*Salix hastata* subsp. *vegeta* RECH. fil.) má svůj hlavní areál v jižní Fennoskandii a v horách střední Evropy (Obr. 2). U nás se vyskytuje pouze v Hrubém Jeseníku na 4 lokalitách (Velká kotlina, Malá kotlina, svah pod Petrovými kameny a Šerák-Keprník). Ve Velké kotlině je její populace vitální a poměrně početná, na svahu pod Petrovými kameny se vyskytuje už pouze pár jedinců. Je to keř 0,5-1,5(-2,0) m vysoký (Obr. 3 a, b). Ve Velké kotlině jsme ji určovali především podle svěže zeleného líce listů a sivě zeleného rubu s vyniklou síťnatou žilnatinou. Tuto žilnatinu vrba hrotolistá také v určité míře předává většině kříženců.

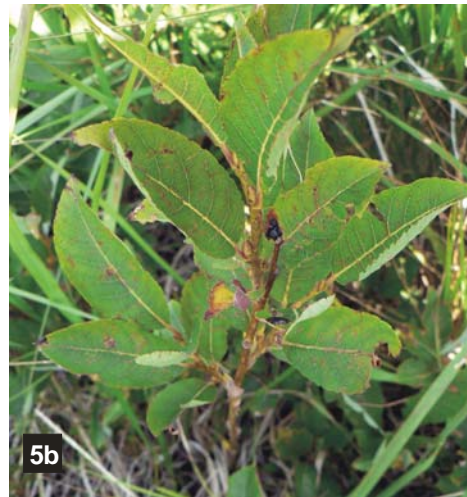
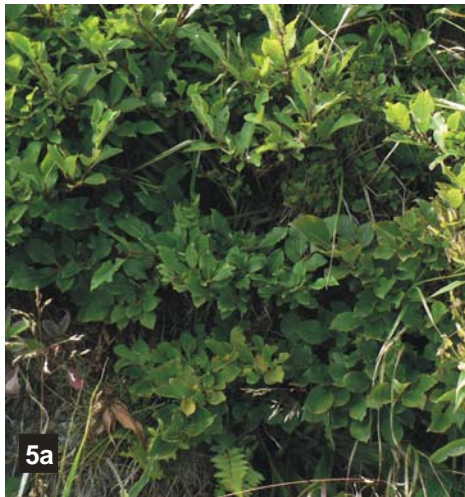
Palisty měla pravidelně zubaté, prýty potom žlutavé, lesklé a lysé. V červnu jsme pozorovali i drobné chlupaté semeníky (Šimíček 1978). Rašící listy mají vždy čistě zelenou barvu a borku má nerozpraskanou.



Obrázek 2. Rozšíření druhů *Salix hastata* a *S. silesiaca* v Evropě. Zdroj: Atlas Florae Europaeae (© Botanical Museum, Finnish Museum of Natural History, 1999).

Vrba slezská, rozšířená hlavně v pohořích střední a jihovýchodní Evropy (Obr. 2), je obvykle keř 2-4 m vysoký, v subalpínských polohách zakrslý (Obr. 4 a, b). V ČR roste hlavně v oreofytiku – v Sudetech a Moravsko-slezských Beskydech. Pro jeho praktické určení na lokalitě byla používána především jeho hladká, šedivá borka, na starších prýtech podélně popraskaná, dobrým znakem byly také načervenalé rašící listy. Obě tyto charakteristiky v určité míře vykazovala i většina kříženců. Vrbu slezskou jsme dále poznali i podle špinavě zelených listů s nevyniklou žilnatinou, hrubých nepravidelných palistů a žluto-šedohnědých prýtů (Chmelař & Koblížek 1990). Při návštěvě lokality v červnu jsme pozorovali i zcela lysé semeníky a široké a dlouhé jehnědy.

Kříženec vrby slezské a vrby hrotolisté (*Salix* × *chlorophana* N.J.ANDERSSON), (Obr. 5 a, b) vyskytující se pouze v Hrubém Jeseníku (Velká kotlina, svah pod Šerákem), (Chmelař 1972), a Vysokých a Belanských Tatrách (Krkavec 1971) byl v některých znacích intermediární (barva prýtů, tvar palistů, tvar a ochlupacení jehněd), některé znaky ale vykazoval téměř vždy (rašící načervenalé listy či „lískovitá“ kůra). Žilnatinu měl převážně intermediární, ale nepravidelně uspořádanou oproti rodičovským druhům. Znaky, které odlišovaly křížence od rodičů můžeme najít v Tab. 1.



Obrázek 3. vrba hrotolistá (*Salix hastata*) — a. habitus porostu; b. detail listu a prýtu.

Obrázek 4. vrba slezská (*Salix silesiaca*) — a. habitus porostu; b. detail listu a prýtu.

Obrázek 5. kříženec *Salix* × *chlorophana* — a. habitus porostu; b. detail listu a prýtu.

Tabulka 1. Klíč pro determinaci vrb ve Velké kotlině. Klíč je zaměřen především na rozlišení vrby hrotolisté, slezské a jejich křížence. Jako doplněk je uvedena vrba ušatá a její kříženec s vrbou slezskou, které se vzácně vtroušeně vyskytují v místech výskytu křížence *S. ×chlorophana* (Brandová 2008).

<i>Salix</i>	<i>hastata</i>	<i>×chlorophana</i>	<i>silesiaca</i>	<i>aurita, subaurita</i>
Líc listů	svěže zelený, lesklý; vždy zelený	špinavě zelený, matný, rašící koncové prýty načervenalé	špinavě zelený, ± lesklý, koncové rašící prýty vždy načervenalé	matně tmavě zelený, svraskalý
Rub listů	zcela lysý, sivý, s vyniklou síťnatou žilnatinou	jen podél žilek roztr. pýřitý, nasivělý (variabilní)	světle zelený, alespoň v mládí podél žilek pýřitý	nápadně chlupatý, případně olysalý, světle zelený
Žilnatina	síťnatá	nevyniklé síťnatá, mírně vyniklá, občas nepravidelná	na rubu vystouplá, nesíťnatá, pravidelná	na líci svraskalá, nepravidelná
Palisty	pravidelně zubaté	přechod H–S	hrubě a nepravidelně zubaté	jemně, ale docela nepravidelně zubaté
Prýty	žluté, lesklé, zcela lysé	obvykle lesklé, ale brázdité, bez lišt	žlutošedohnědé, zejména starší větévky nápadně popraskané (lískovité), obvykle lysé	červenohnědé, jednoleté prýty alespoň mírně chlupaté; pod kůrou nápadné lišty
Semeníky	chlupaté, drobné	olysalé, jehnědy intermediární velikosti a intermediárního tvaru semeníku	zcela lysé, jehnědy široké a dlouhé	jehnědy krátké, chlupaté
Rašící listy	zelené	světle načervenalé	načervenalé	zelené

Po delším pobytu na lokalitě bylo při určování přihlíženo i k ekologickým preferencím vrb. Na vlhčích místech (květnaté horské až vysokobylinné subalpínské nivy, prameniště a vlhké svahy podél potoků (Laus 1927), vlhké sutě) se spíše dala očekávat čistě vrba hrotolistá, na sušších skalkách a mezi borůvčím (lavinové dráhy, subalpínské křoviny) spíše kříženec nebo vrba slezská. Kříženec se vyskytoval nejvíce v přechodech různých mikrobiotopů (mezi subalpínskými prameništi a subalpínskými vysokostébelnými trávníky, na vyfoukávaných alpínských trávnících a mezi subalpínskou brusnicovou vegetací). Jeho preference jsou bližší vrbě slezské než vrbě hrotolisté (Brandová 2008). Taxony byly determinovány na základě morfologických znaků, biotop určeného taxonu byla jen doplňková informace.

Charakteristika studované populace

Vybraná populace se nachází ve Velké kotlině v Hrubém Jeseníku v České republice. Populace druhu vrba hrotolistá *Salix hastata* je největší populací tohoto druhu v ČR (Krkavec 1971, Chmelař 1972, Šimíček 1978, Chmelař & Koblížek 1990). Kromě ní se ve Velké kotlině vyskytuje vrba slezská, jejich kříženec *S. ×chlorophana*, dále vrba ušatá (*S. aurita*) a v dolních partiích vrba jíva (*S. caprea*). Z této lokality je také doložena hybridizace mezi vrbou slezskou a vrbou hrotolistou (Krkavec 1971, Chmelař & Koblížek 1990).

Populace byla navštívena opakovaně během let 2007, 2008 a 2009. V červnu ještě nebyly větve ani olistěné, některé části Velké kotliny (hlavně prameniště) byly ještě pod sněhem. V červenci se rostliny začínají olistňovat a současně kvést. V srpnu již začíná žloutnutí listů a příprava rostlin na dlouhotrvající sněhovou pokrývku, která přichází třeba již na konci září.

Vrba hrotolistá (nazývaná též vrba šípovitá nebo šípová) se dle české taxonomie dělí na dva poddruhy (Chmelař & Koblížek 1990). Nominátní subspecie se vyskytuje téměř v celém areálu tohoto druhu a nejbližší k ČR ve slovenských Karpatech. Od druhé subspecie ji můžeme odlišit pomocí eliptických listů, báze listů eliptické až klínovité a řapíku delšího než 3 mm. *Salix hastata* subsp. *vegeta* se vyskytuje pouze v jižní Skandinávii a izolované populace má v horách střední Evropy (právě v Hrubém Jeseníku).

Podle taxonomie švédské jsou tyto poddruhy 3 (Elven & Karlsson 2000), kdy se ke 2 jmenovaným přidává ještě *Salix hastata* subsp. *subintegrifolia*. Nominátní subspecie se vyskytuje v severozápadní Skandinávii, v severním Rusku a na Sibiři, subsp. *hastata* hlavně v jižní Skandinávii a ve střední Evropě (v ČR) a subsp. *subintegrifolia* ve Skandinávii severní, severním Rusku a severozápadní Severní Americe. Autoři pro americké a středoevropské lokality přiznávají příliš málo známých detailů.

Naše populace *S. hastata* subsp. *vegeta* jsou pravděpodobně pozůstatkem migrace, která proběhla na konci posledních dob ledových, proto zůstala reprodukčně i geneticky izolována od populací alpských a karpatských. Naopak právě populace alpské a karpatské (subsp. *hastata*) byly zřejmě během střídání dob ledových a meziledových propojeny, proto jsou si podobnější. Celkově jsou ale lokality ve střední Evropě izolované a výskyt obou poddruhů zde není běžný. Přežily převážně na místech, kde mají pro život vhodné podmínky. Ve Velké kotlině k těmto podmínkám jistě patří dlouhotrvající vysoká sněhová pokrývka a lavinová aktivita.

Z toho vyplývá, že vybraný druh je pro studium více než vhodný a že naše vybraná populace ve Velké kotlině je výjimečná. Je u nás největší a nejstabilnější, pro naše laboratorní analýzy je zde možné nasbírat dostatek materiálu bez poškození populace. Dochází zde ke křížení tří až čtyř druhů vrb a vzniku zajímavých hybridních rojů a zón ve velice malém měřítku. Studium právě těchto zón je důležité z hlediska evoluce druhů hybridizací.

Početnost pohlaví

V terénu byla zjišťována především početnost sterilních rostlin a samčího a samičího pohlaví. Pomocí provázku byly ve Velké kotlině vytyčeny dvě linie (30 m), podél kterých probíhalo sčítání samčích a samičích rostlin a sterilních jedinců. První linie byla umístěna vertikálně podél proudu potoka a druhá horizontálně. Rostliny byly sčítány do vzdálenosti 1 m od provázku (tedy v pruhu širokém 2 m). Pokud byly na rostlině přítomny jehnědy, bylo určeno a zapsáno pohlaví ($\sigma \times \text{♀}$), pokud ne, byla rostlina zaznamenána jako sterilní.

Herbáře

Druh vrba hrotolistá a její kříženec s vrbou slezskou byl prohlédnut a zrevidován v herbářových položkách vybraných institucí. U každé položky byl zaznamenán druh, autor, místo a rok sběru.

Laboratorní práce

Laboratorní práce zahrnovaly především izolace genomické DNA, PCR s jednotlivými mikrosatelitovými primery a vizualizace vzorků na agarózovém a polyakrylamidovém gelu. Pro provedení těchto prací byl nejprve nasbírán rostlinný materiál. Listy vrb pro laboratorní analýzy byly sbírány po celé Velké kotlině, vždy z keřů od sebe minimálně několik metrů vzdálených. Z jednoho keře bylo sebráno cca 4-5 listů, od každého studovaného taxonu byl sebrán rovnoměrný počet vzorků. Listy sebrané na lokalitě byly zamrazeny a skladovány při teplotě -80 °C . Jiný rostlinný materiál pocházel z herbáře Katedry botaniky UP v Olomouci a osobních herbářových dokladů.

Izolace genomické DNA

Pro izolaci genomické DNA byl nejprve použit protokol podle Reisch et al. (2005). Na základě nepříliš dobrých výsledků a komunikace s R. J. Vašutem a M. Sochořem byl nahrazen protokolem, který je v laboratoři používán L. Majeským pro izolaci DNA jiných rostlin (zejména rodu *Taraxacum*).

- (1) Listy (200 mg, bez řapíku a střední žilky) homogenizovat v dusíku a přenést do 700 μ l 2 % CTAB pufru s 1 % PVP a 2 μ l β ME (65 °C) a inkubovat při 65 °C alespoň 60 minut.
- (2) Přidat stejný objem směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1), pořádně protřepat a centrifugovat (13 000 RPM, 15 minut, 10 °C).
- (3) Horní fázi přenést do CHF : IAA (500 μ l), protřepat, centrifugovat.
- (4) Horní fázi (400 μ l) přenést do stejného objemu isopropanolu, promíchat, nechat precipitovat při +4 °C alespoň 30 minut nebo přes noc.
- (5) Centrifugovat (13 000 RPM, 15 minut, 4 °C), pelet nechat proschnout a rozpustit v 200 μ l TE pufru (10 \times).
- (6) Přidat 0,5 μ l RNasy (10 μ g/ml) a inkubovat 30 minut při 37 °C na třepačce.
- (7) Přidat 20 μ l (0,1 objemu) NaAc a dvojnásobek objemu EtOH (440 μ l, -20 °C), nechat precipitovat při +4 °C alespoň 30 minut.
- (8) Centrifugovat (13 000 RPM, 15 minut, 4 °C), pelet promýt 80 % EtOH, zcentrifugovat (13 000 RPM, 10 minut, 10 °C), promýt 70 % EtOH, zcentrifugovat (13 000 RPM, 10 minut, 10 °C).
- (9) Pelet vysušit a rozpustit v 50-100 μ l TE pufru.

Ke stanovení obsahu DNA ve vzorcích byl použit spektrofotometr Nanodrop 1000 od firmy ThermoScientific. Každé rostlině bylo přiděleno číslo, byl zaznamenán druh (vrba hrotolistá, v. slezská, kříženec), lokalita, obsah genomické DNA ve vzorku a zda byla DNA izolována ze zmrazeného vzorku nebo z herbářové položky. Pro pozdější analýzy byly všechny vzorky zředěny na pracovní koncentraci 5 μ g/ μ l.

Použití mikrosatelitů

Pro některé druhy rodu *Salix* již byly mikrosatelitové primery vyvinuty (Barker et al. 2003, Stamati et al. 2003, Reisch et al. 2007). Bohužel pro studované taxony *S. hastata*, *S. silesiaca* a *S. \times chlorophana* ještě mikrosatelity nejsou známy. Proto byly v této diplomové práci použity a vyzkoušeny vybrané primery z práce Barker et al. (2003),

kteře byly vyvinuty pro druh *S. burjatica* a následně testovány na desítkách dalších druhů, mj. rostoucích i v České republice, a vybrané primery ze studie Stamati et al. (2003), kteře byly vyvinuty pro druh *S. lanata* a odzkoušeny i pro *S. lapponum* a *S. herbacea*. Jednotlivé vybrané použité mikrosatelitové primery naleznete v Tab. 2.

Tabulka 2. Použitě mikrosatelity. Primery s označením MS-SX jsou z práce Barker et al. (2003), s označením RBS z práce Stamati et al. (2003). Uvedené mikrosatelity byly odzkoušeny a podmínky byly optimalizovány pro MS-SX 11 a MS-SX 12.

Pracovní název	Sekvence primeru (5'-3')	Opakované motivy	Velikost produktu (bp)	Počet alel
MS-SX 11	CTCAGCAACTCAATCCAAC TA GTTTGTTAGGGGAGGTAAGAA	[CCG] ₅	87	4
MS-SX 12	TATTGCTTTGATGGCGACTGC CAGCAACGGAAATAGCAACAG	[ACCGCC] ₅ ACCG C	110	5
MS-SX 22	TATAAAGACAAATACCTGGGG CATCAAAGACTGCTAGAAAGG	[CA] ₂ [GA] ₂ GGAA [TA] ₂ [CA] ₁₅ GA	144	18
MS-SX 24	ATTCCTTCTTCATCAGTAGC GACAACGCCATTACATGACC	[GCC] ₃ ATCATTC CCC[GCC] ₄	102	5
RBS 18	TCATCTCCATCACCGACAAG CTGCCGTTTGTGCTAGTT	(CT) ₁₆	280	8
RBS 19	TCATTTGCTCGATGAGGTTG GTGGTAGTTGCAAAGGGGA	(CT) ₁₀	300	7
RBS 20	TAGCATAACCACCGACCACA CTGGTTAACGTCGGAGCTGT	(CT) ₁₁	235	4

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla prováděna v přístroji Peltier Thermal Cycler PTC 200 od firmy MJ Research. Složení PCR mixu je uvedeno v Tab. 3 a je založeno především na článku Stamati et al. (2003) a na osobní komunikaci s R. J. Vašutem a M. Sochořem.

Tabulka 3. Používané složení PCR mixu.

	Množství pro 1 vzorek
Destilovaná voda	6,75 µl
10x NovaTaq Buffer with MgCl ₂	1
dNTPs (10 mM)	0,2
Forward primer (20 µM)	0,5
Reverse primer (20 µM)	0,5
NovaTaq DNA Polymerase	0,05
DNA (5 µg/µl)	1
	Σ=10 µl

K úspěšnému použití primerů bylo nejprve nutné zjistit nejvhodnější annealingové teploty. Pro jeden vzorek byl použit teplotní gradient s 12 teplotami v rozmezí 55 – 65 °C. Po zjištění této teploty (na agarózovém gelu) byl vyzkoušen počet cyklů nejvhodnější pro nejlepší obraz bandů na gelech.

PCR reakce probíhala potom následovně: 2 minuty počáteční denaturace při 94 °C; 29 cyklů 0,5 minuty denaturace při 94 °C, 0,5 minuty annealing při teplotě zjištěné pomocí teplotních gradientů, 0,5 minuty prodlužování při 72 °C; 6 minut konečného prodlužování při 72 °C a nakonec zchlazení na 4 °C. Pro PCR reakci byla použita polymeráza NovaTaq DNA Polymerase (Novagen, Merck).

Výsledky PCR reakce byly zjišťovány pomocí separace produktů na 1 % agarózovém gelu a vizualizace etidium bromidem (rozlišení do cca 5 párů bází), dále přesněji pomocí vertikální elektroforézy s polyakrylamidovým gelem a vizualizací pomocí stříbra (přesnost cca 1-2 páry bází).

Agarózový a polyakrylamidový gel slouží hlavně k vizualizaci fragmentů DNA zmnožených při PCR reakci. Agarózový gel se připravuje z 1 % agarózy (na jeden gel používáme 0,35 g agarózy a 35 ml 0,5 % roztok TBE) a používá se do horizontální elektroforézy, která běží při napětí 100 V 0,5 hod. Pro pozdější vizualizaci UV světlem se do něj přidává 1 µl etidium bromidu. Polyakrylamidový je na dobu průběhu a přípravu náročnější. Pro jeho přípravu se používá 6 % roztok akrylamidu, který má neurotoxické účinky a je to karcinogen a mutagen. Polyakrylamidový gel je nanesen mezi dvě skla a ta jsou uchycena ve vertikální elektroforéze, která běží při napětí 2000 V. Doba průběhu závisí na molekulárních hmotnostech rozdělovaných PCR produktů, pro naše vzorky se tato doba pohybovala kolem 2 hodin, spíše méně (pro MS-SX 11 a 12 cca 105 minut). Fragmenty jsou vizualizovány pomocí 0,1 % roztoku dusičnanu stříbrného. Pomocí vývojky se objevují hnědočerné stříbrem obarvené proužky PCR produktů. Polyakrylamidové gely jsou potom naskenovány a oskórovány.

Analýza dat

Data o počtu pohlaví byla zpracována v programu Microsoft Excell. Údaje z herbářových položek byly zpracovány do přehledné tabulky v programu Microsoft Excell. U lokalit byly zjištěny jejich GPS souřadnice a v programu D-MAP byla vytvořena síťová mapa.

Fragmenty vizualizované na PAGE byly oskórovány následujícím způsobem: hmotnostně nejtěžší fragment byl označen písmenem A, další fragmenty byly abecedně označeny podle hmotnosti sestupně. Každá rostlina dostala označení podle počtů pozorovaných fragmentů, vždy nejvýše však 2 (diploidní organismy).

Data byla zpracována do tabulky v programu Microsoft Excell. Dále byla data analyzována pomocí programu PopGen (Yeh et al. 1997; <http://cc.oulu.fi/~jaspi/popgen/popgen.htm>). Analyzovány byly jen rostliny, pro které byl znám genotyp, a proto přítomnost jednoho fragmentu byly považována za homozygotní konstituci (AA).

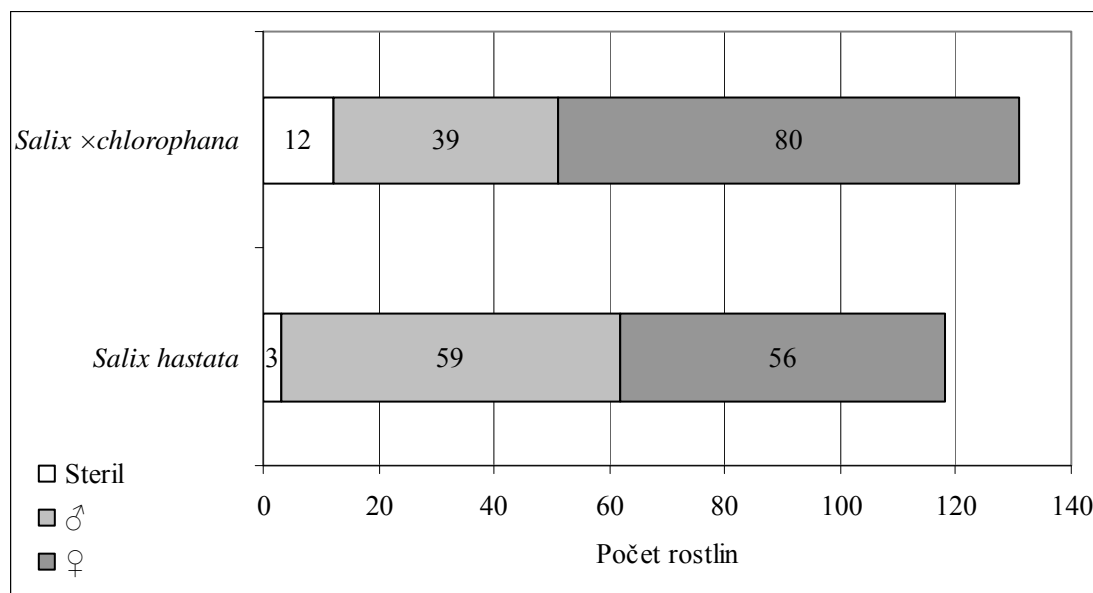
Výsledky

Na lokalitě převažovaly nesterilní rostliny nad sterilními a poměr pohlaví byl u křížence i u vrby hrotolisté mírně vychýlen ve prospěch samic. Rozšíření na základě revize herbářových položek potvrdilo výskyt na všech 4 lokalitách uváděných v Květeně ČR (Chmelař & Koblížek 1990). Izolace DNA byla provedena z 66 rostlin, použitelných z nich nakonec bylo 48. Ze 7 použitých mikrosatelitů byly zoptimalizovány podmínky pro použití 2 z nich. U mikrosatelitu MS-SX 11 bylo nalezeno 7 různých alel, u mikrosatelitu MS-SX 12 pouze 3 alely.

Početnost pohlaví

Na lokalitě bylo sečteno celkem 249 rostlin, z toho 118 vrb hrotolístých a 131 kříženců s vrbou slezskou. Transekt 1 byl umístěn vertikálně (tzn. podél proudu potoka), bylo v něm sečteno 142 rostlin a transekt 2 horizontálně (tzn. napříč Velkou kotlinou), v něm bylo sečteno 107 rostlin.

U vrby hrotolisté byly zjištěny celkem 3 sterilní rostliny, 59 rostlin samčích a 56 rostlin samičích. U křížence s vrbou slezskou bylo zjištěno 12 sterilních rostlin, 39 rostlin samčích a 80 rostlin samičích (Obr. 6).



Obrázek 6. Zastoupení sterilních, samčích a samičích rostlin na dvou vytyčených transektech pro vrbu hrotolistou (*Salix hastata*) a křížence s vrbou slezskou (*S. ×chlorophana*).

U vrby hrotolisté byl poměr sterilních rostlin k samicím a samcům přibližně 1:38,4 a poměr samčích rostlin ku samičím 1,1:1. U křížence byl poměr sterilních rostlin k samicím a samcům 1:9,9 a poměr samčích rostlin ku samičím 1:2,1 (Tab. 4).

Tabulka 4. Počty sterilních, samčích a samičích rostlin na dvou vytyčených transektech pro vrbu hrotolistou (*Salix hastata*) a křížence s vrbou slezskou (*S. ×chlorophana*) a vypočtené poměry sterilních a nesterilních rostlin a poměry samčích a samičích rostlin.

<i>Salix hastata</i>	Steril	♂	♀	Steril / ♂ + ♀	♂ / ♀
Transekt 1 (vertikální)	1	52	38	1:90	1:1,4
Transekt 2 (horizontální)	2	7	18	1:12,5	1:2,6
Celkem	3	59	56	1:38,4	1,1:1

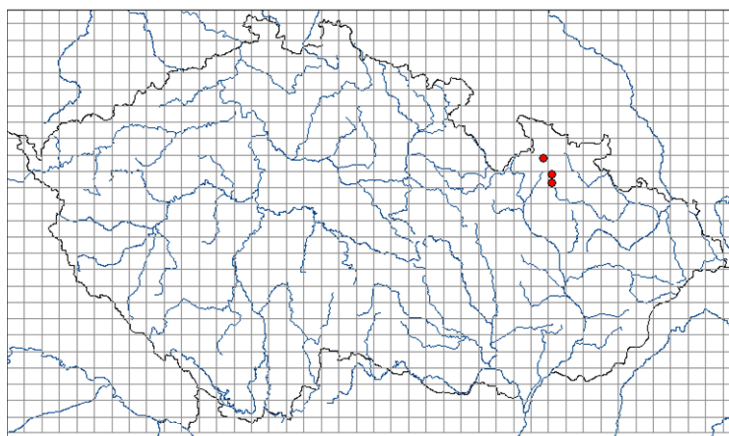
<i>Salix ×chlorophana</i>	Steril	♂	♀	Steril / ♂ + ♀	♂ / ♀
Transekt 1 (vertikální)	9	18	24	1:4,7	1:1,3
Transekt 2 (horizontální)	3	21	56	1:25,7	1:2,7
Celkem	12	39	80	1:9,9	1:2,1

Herbáře

Byly zrevidovány položky z 5 vybraných institucí (Tab. 5). Většina položek pocházela z Velké kotliny z Jeseníků a potom ze Slovenska (Tatry, Velká Fatra). Některé položky byly zrevidovány (mylná identifikace křížence a vrby slezské). Na základě těchto dokladů bylo sestaveno rozšíření vrby hrotolisté *Salix hastata* a křížence *S. ×chlorophana*, které se shoduje s rozšířením uvedeném v Květeně ČR (Chmelař & Koblížek 1990).

O: 97. Hr. Jes. (Velká a Malá kotlina, svah pod Petrovými kameny, sv. svah Šeráku).

Podle lokalit z herbářů byly dohledány GPS souřadnice lokalit a na jejich základě byla v programu D-MAP sestavena mapa síťového rozšíření *Salix hastata* v České republice (Obr. 4). Zároveň se tato mapa shoduje s rozšířením křížence *S. ×chlorophana*.



Obrázek 7. Současné rozšíření vrby hrotolisté (*Salix hastata*) a jejího křížence s vrbou slezskou (*S. ×chlorophana*) založené na údajích z herbářových položek.

Tabulka 5. Zrevidované herbářové položky. V Pardubicích se jedná o položky z Východočeského muzea, v Českých Budějovicích z Jihočeského muzea, v Roztokách u Prahy ze Středočeského muzea, ve Zlíně z Muzea jihovýchodní Moravy a v Plzni ze Západočeského muzea.

Herbárium a druh	Rok	Autor sběru	Lokalita	Země	Pozn.
PARDUBICE					
hastata	1908	Kappel	Harz	Německo	
hastata	1908	Laus	Gesenke, Gr. Kessel	Česká republika	
hastata	1931	?	Keprník	Česká republika	rev. S. silesiaca
hastata	1931	Kavka	Velká kotlina v Jeseníkách	republika	
hastata	1935	Horák	Bielské Tatry	Slovensko	det. Koblížek 2007
				Česká	
hastata	1947	Horák	Velká kotlina v Jeseníkách	republika	
				Česká	
hastata	1947	Krčan	Velká kotlina v Jeseníkách	republika	
				Česká	
hastata	1953	Krčan	Velká kotlina v Jeseníkách	republika	
			Vých. svah pod Petrovými kameny, asi 1300 m n.m.	Česká	
hastata	1972	Horák		republika	
ČESKÉ BUDĚJOVICE					
		Domin et			
hastata	1929	Krajina	Bielské Tatry	Slovensko	
			Morava, Jeseníky, nad	Česká	
chlorophana	1947	Kurka	Ovčárnou	republika	det. Chmelař 1960
				Česká	
hastata	1947	Kurka	Horská louka nad Ovčárnou	republika	det. Chmelař 1960
hastata	1955	Kurka	Belanské Tatry	Slovensko	det. Chmelař 1960
				Česká	
hastata	1960	Chmelař	Velká kotlina v Jeseníkách	republika	
ROZTOKY					
hastata	1980	Zmažek	Velká Fatra	Slovensko	
ZLÍN					
hastata	1960	Šmarta	Liptovské Tatry	Slovensko	
hastata	1960	Lisková	Liptovské Tatry	Slovensko	
PLZEŇ					
hastata	1935	Mencel	Vysoké Tatry	Slovensko	

Laboratorní práce

Laboratorní práce zahrnují především výsledky izolací genomické DNA a výsledky optimalizace podmínek pro použití mikrosatelitů. Dále zde uvádím výsledky 2 mikrosatelitů, pro které se podmínky podařilo optimalizovat (MS-SX 11, MS-SX 12).

Izolace genomické DNA

Genomická DNA byla izolována celkem z 66 rostlin, z toho 36 *Salix hastata*, 11 *S. ×chlorophana* a 10 *S. silesiaca*. Většina těchto rostlin pocházela z Velké kotliny v Jeseníkách. Podle obsahu genomické DNA byly vybrány pouze vzorky, které měly koncentraci vyšší než 20 µg/µl. Po této úpravě zůstalo 48 použitelných vzorků (Tab. 6), vyřazeno bylo 9 vzorků *S. hastata*. Pouze 7 vzorků bylo izolováno z herbářových položek, pro ostatní byly použity listy z mrazáku. Původ rostlinného materiálu pro izolaci DNA nemá na výtěžek vliv (Sochor 2009), to bylo potvrzeno i v této diplomové práci.

Nejmenší použité množství genomické DNA ve vzorku tedy bylo 20,74 µg/µl (vzorek č. 8), nejvyšší potom 310,53 µg/µl (vzorek č. 5). Průměrné množství DNA ve vzorku bylo 87,98 µg/µl.

Tabulka 6. Vzorčky genomické DNA studovaných taxonů.

Číslo	Druh	Lokalita	Koncentrace DNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Zdroj (ZL=zmražený list; HP:herbářová položka)
1	hastata	Velká kotlina	32,01	ZL
2	hastata	Velká kotlina	32,50	ZL
3	hastata	Velká kotlina	102,67	ZL
4	hastata	Velká kotlina	103,33	ZL
5	hastata	Velká kotlina	310,53	ZL
6	hastata	Velká kotlina	283,16	ZL
7	hastata	Velká kotlina	57,81	ZL
8	hastata	Velká kotlina	20,74	ZL
9	hastata	Velká kotlina	62,73	ZL
10	hastata	Velká kotlina	35,67	ZL
11	hastata	Velká kotlina	68,56	ZL
12	hastata	Velká kotlina	67,08	ZL
13	hastata	Velká kotlina	47,74	ZL
14	hastata	Velká kotlina	173,98	ZL
15	hastata	Velká kotlina	116,49	ZL
16	hastata	Velká kotlina	58,50	ZL
17	hastata	Louka nad Ovčárnou	82,65	ZL
18	hastata	Louka nad Ovčárnou	39,45	ZL
19	hastata	Louka nad Ovčárnou	160,78	ZL
20	hastata	Velká kotlina	151,24	ZL
21	hastata	Velká kotlina	56,31	ZL
22	hastata	Velká kotlina	26,37	ZL
23	hastata	Velká kotlina	20,86	ZL
24	hastata	Velká kotlina	78,51	ZL
25	hastata	Velká kotlina	22,48	ZL
26	hastata	Velká kotlina	28,34	ZL
27	hastata	Velká kotlina	52,25	ZL
28	chlorophana	Velká kotlina	200,10	ZL
29	chlorophana	Velká kotlina	98,83	ZL
30	chlorophana	Velká kotlina	193,93	ZL
31	chlorophana	Velká kotlina	68,96	ZL
32	chlorophana	Velká kotlina	54,67	ZL
33	chlorophana	Velká kotlina	153,17	ZL
34	chlorophana	Velká kotlina	159,30	ZL
35	chlorophana	Louka nad Ovčárnou	252,66	ZL
36	chlorophana	Velká kotlina	30,55	ZL
37	chlorophana	Velká kotlina	40,47	ZL
38	chlorophana	Velká kotlina	42,48	ZL
39	silesiaca	Velká kotlina	24,42	ZL
40	silesiaca	Velká kotlina	41,55	ZL
41	silesiaca	Velká kotlina	24,10	ZL
42	silesiaca	Velká kotlina	166,35	HP
43	silesiaca	Velká kotlina	26,42	HP
44	silesiaca	Velká kotlina	98,86	HP
45	silesiaca	Velká kotlina	103,40	HP
46	silesiaca	Bílá Opava Moravsko-Slezské	76,98	HP
47	silesiaca	Beskydy	21,23	HP
48	silesiaca	Rychlebské hory	51,95	HP

Použití mikrosatelitů

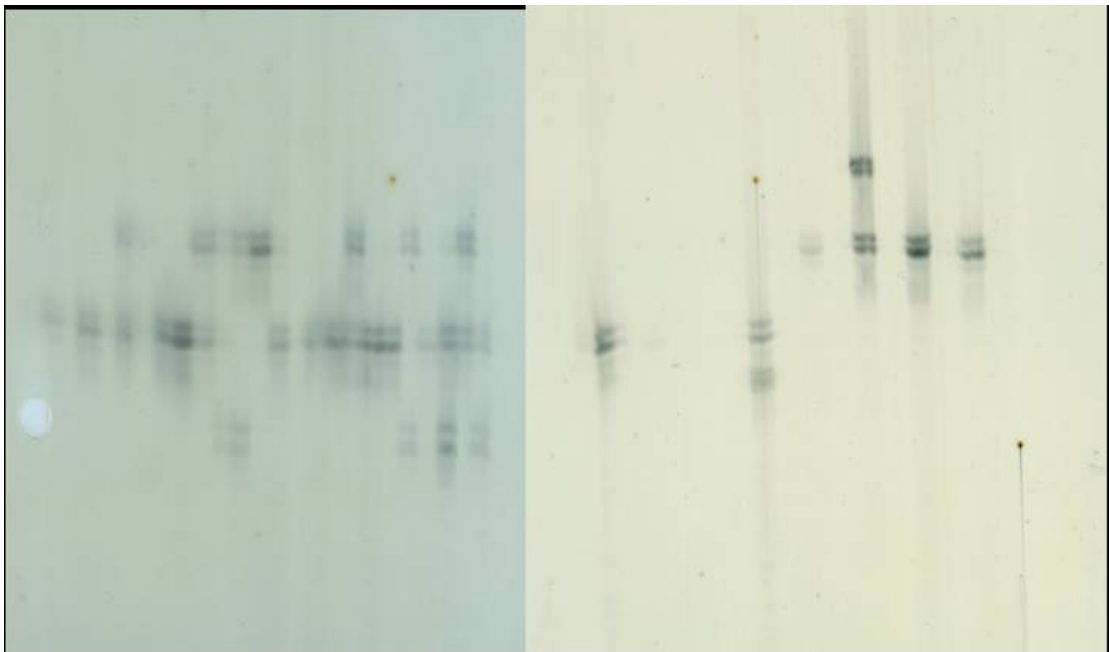
Pro studium genetické diverzity a populační variability vrby hrotolisté bylo vyzkoušeno 7 mikrosatelitových primerů. Pro 5 z nich nejsou zatím podmínky optimalizované (RBS 18, RBS 19, RBS 20, MS-SX 22, MS-SX 24) a podmínky uvedené v literatuře nejsou v našich podmínkách funkční. Pro těchto prvních 5 kombinací mikrosatelitových primerů se nám nepovedlo za pomoci střídání teplotních gradientů a různých počtů cyklů dostat hodnotitelné výsledky.

Pro 2 z nich (MS-SX 11, MS-SX 12) byly tyto podmínky optimalizovány pomocí použití teplotního gradientu a příslušného PCR programu a výsledky ze skórování jednotlivých PAGE gelů jsou zde uvedeny (Tab. 7).

Tabulka 7. Výsledky skórování použitých mikrosatelitů.

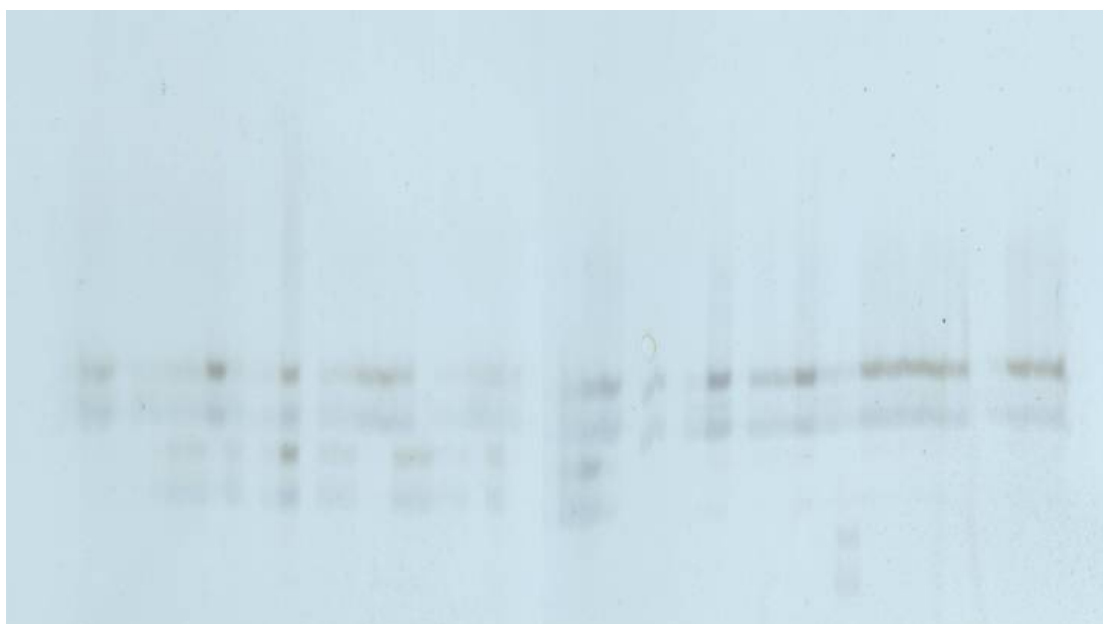
Rostlina č.	Taxon	Pohlaví	MS-SX 12	MS-SX 11
1	hastata	neurčeno	AA	EE
2	hastata	neurčeno	AA	0
3	hastata	neurčeno	0	EF
4	hastata	neurčeno	AA	0
5	hastata	neurčeno	AB	CE
6	hastata	neurčeno	AB	0
7	hastata	neurčeno	AB	EF
8	hastata	neurčeno	AA	EF
9	hastata	neurčeno	AB	CE
10	hastata	neurčeno	0	CG
11	hastata	neurčeno	AB	CG
12	hastata	♂	AB	CD
13	hastata	neurčeno	0	EF
14	hastata	♀	AB	0
15	hastata	♀	AB	EF
16	hastata	neurčeno	AA	EF
17	hastata	neurčeno	AA	CE
18	hastata	neurčeno	AB	EF
19	hastata	neurčeno	BB	EF
20	hastata	♂	AB	CG
21	hastata	neurčeno	AB	EE
22	hastata	♀	AA	EG
23	hastata	neurčeno	AB	CE
24	hastata	neurčeno	AA	EG
25	hastata	neurčeno	AB	0
26	hastata	♀	AB	EE
27	hastata	neurčeno	AB	EF
28	chlorophana	neurčeno	0	EE
29	chlorophana	neurčeno	AA	0
30	chlorophana	neurčeno	0	EE
31	chlorophana	neurčeno	AA	0
32	chlorophana	neurčeno	AA	0
33	chlorophana	neurčeno	0	0
34	chlorophana	neurčeno	AA	0
35	chlorophana	neurčeno	AA	EE
36	chlorophana	neurčeno	AA	EG
37	chlorophana	neurčeno	AA	0
38	silesiaca	neurčeno	AC	0
39	silesiaca	neurčeno	AA	FF
40	silesiaca	neurčeno	AA	0
41	silesiaca	neurčeno	AA	0
42	silesiaca	neurčeno	AA	AB
43	silesiaca	neurčeno	AA	0
44	silesiaca	neurčeno	0	0
45	silesiaca	neurčeno	AA	BB
46	silesiaca	neurčeno	AA	0
47	silesiaca	neurčeno	AA	BB
48	silesiaca	neurčeno	AA	0

Pro mikrosatelit MS-SX 11 bylo na základě polyakrylamidového gelu vizualizovaného stříbrem zjištěno 7 různých alel (A, B, C, D, E, F, G). Z 48 rostlin byly alely skórovatelné u 30 vzorků. Alely A a B jsou přítomny pouze u vrby slezské, alela C a D pouze u vrby hrotolisté. Alely E a G se vyskytují pouze u vrby hrotolisté a u křížence a alela F jen u obou rodičů (Obr. 5). U vrby hrotolisté se vyskytuje 6 různých genotypů (EE, EF, EG, CD, CE, CG). U vrby slezské potom 3 různé genotypy (AB, BB, FF) a u křížence 2 různé genotypy (EE, EG). Výskyt homozygotů je 0,30, výskyt heterozygotů 0,70. Pro vrbu hrotolistou je hodnota χ^2 pro Hardy-Weinbergovo ekvilibrium 19,05 (df = 10, P = 0,04). Pro křížence je hodnota χ^2 pro Hardy-Weinbergovo ekvilibrium 0,00 (df = 1, P = 1), pro vrbu slezskou je hodnota χ^2 pro Hardy-Weinbergovo ekvilibrium 7,20 (df = 3, P = 0,07).



Obrázek 8. Sken polyakrylamidového gelu pro mikrosatelit MS-SX 11. Zleva je patrných 27 vzorků vrby hrotolisté, poté následuje 11 vzorků jejího křížence s vrbou slezskou a 10 vzorků vrby slezské.

Pro mikrosatelit MS-SX 12 byly na základě polyakrylamidového gelu vizualizovaného stříbrem zjištěny 3 různé alely (A, B, C). Z 48 rostlin byly alely skórovatelné u 41 vzorků. Alela A je přítomná u všech 3 studovaných taxonů, alela B se vyskytovala pouze u vrby hrotolisté, alela C pouze u jedné vrby slezské (Obr. 6). U vrby hrotolisté byly zjištěny 3 různé genotypy (AA, AB, BB), u křížence pouze jeden genotyp (AA) a u vrby slezské dva různé genotypy (AA, AC). Výskyt homozygotů je 0,6341, výskyt heterozygotů 0,3659. Pro vrbu hrotolistou je hodnota χ^2 pro Hardy-Weinbergovo ekvilibrium 2,88 (df = 1, P = 0,09). Pro křížence a pro vrbu slezskou nemohly být hodnoty vypočteny.



Obrázek 9. Sken polyakrylamidového gelu pro mikrosatelit MS-SX 12. Zleva je patrných 27 vzorků vrby hrotolisté, poté následuje 11 vzorků jejího křížence s vrbou slezskou a 10 vzorků vrby slezské.

Diskuse

Diskutovat v této diplomové práci budu hlavně výsledky poměrů sterilních a nesterilních rostlin a poměrů pohlaví, současné rozšíření vrby hrotolisté a jejího křížence, výsledky optimalizace metody mikrosatelitů, předběžné výsledky získané použitím 2 mikrosatelitů, celkově hybridizaci vrb a využití dat získaných touto cestou pro ochranu přírody.

Početnost pohlaví

Celkem bylo zjištěno velmi málo sterilních rostlin (u vrby hrotolisté 3, u křížence 12). Poměr pohlaví byl u obou taxonů mírně vychýlen ve prospěch samic. Poměr pohlaví vychýlený ve prospěch samic je u vrb poměrně běžný (Alliende & Harper 1989, Crawford & Balfour 1983, Dawson & Bliss 1989). Proto jsou výsledky získané z transektů ve Velké kotlině pro vrbu hrotolistou odpovídající. Pro jejího křížence s vrbou slezskou vyšel tento poměr vyrovnaně.

Ze získaných výsledků vyplývá, že vrby se na lokalitě ve Velké kotlině rozmnožují pravděpodobně jak sexuálně, tak vegetativně. To potvrzují mj. i výsledky získané z mikrosatelitů, kdy se u vrby hrotolisté objevuje několik různých genotypů (u MS-SX 11 6 různých genotypů, u MS-SX 12 3 různé genotypy), což potvrzuje, že ve Velké kotlině dochází k sexuální reprodukci a rekombinaci genotypů.

Výsledky, které prokázaly velký podíl vegetativního rozmnožování, jsou uvedeny v bakalářské práci Hrachová (2009). U vrby laponské v Krkonoších byl prokázán velký podíl vegetativního rozmnožování a většina našich populací tohoto ohroženého druhu se skládá právě ze sterilních rostlin. Může to být dáno reliktností lokalit na našem území. Jedinci vrb pravděpodobně rovněž nekvetou každý rok. Může se tedy stát, že rok, ve kterém bylo šetření provedeno, ovlivní výsledek. V případě vrby hrotolisté a křížence s vrbou slezskou ovšem toto ovlivnění asi nebylo velké, sterilních rostlin bylo ve Velké kotlině nalezeno jen málo.

Proč je poměr pohlaví u vrb často vychýlen v prospěch samic? Tento mechanismus nebyl zatím v literatuře uspokojivě vysvětlen. Pro vliv poměru tvorby semen zatím nejsou žádné důkazy, možná je to způsobeno selháním genetického mechanismu, který řídí směr pohlaví. Také je možné, že různá pohlaví mají různou mortalitu a pokud se samci vyskytují v extrémnějších prostředích, může snižovat jejich početnost právě toto

(Dawson & Bliss 1989). Pokud se rostliny samčí a samičí vyskytují v odlišných biotopech, může tím být snižována konkurence v rámci druhu. Právě velmi heterogenní prostředí Velké kotliny mohlo způsobit, že poměr pohlaví u křížence vrby hrotolisté a vrby slezské vyšel vyrovnaně. Samice i samci zde mají dostatek volných mikrobiotopů, které mohou využít.

Herbáře

Z údajů 5 vybraných institucí byl potvrzen výskyt vrby hrotolisté na 4 lokalitách v ČR (Velká a Malá kotlina, svah pod Petrovými kameny, sv. svah Šeráku). Na lokalitě Šerák se bohužel nepodařilo druh potvrdit terénním pozorováním. Ve vybraných herbářových sbírkách byla nalezena jediná položka vrby hrotolisté z této lokality (herbář Východočeského muzea Pardubice), která byla revidována a určena jako vrba slezská. Je proto možné, že se zde vrba hrotolístá již nevyskytuje a možná jsou zde jen kříženci nebo pouze vrby slezské.

Na lokalitě Velká kotlina je výskyt vrby hrotolisté celkem hojný, vyhledává především přechodové biotopy (přechodová stanoviště mezi subalpínskými prameništi a vyfoukávanými alpínskými trávníky nebo mezi subalpínskými prameništi a subalpínskými vysokostébelnými trávníky a subalpínská prameniště). Hojněji se zde vyskytuje i její kříženec s vrbou slezskou, který se vyskytuje spíše ve vyfoukávaných alpínských trávnících, ale také v subalpínské brusnicové vegetaci a na přechodu mezi subalpínskými prameništi a subalpínskými vysokostébelnými trávníky (Brandová 2008). Hlavně ve spodní části Velké kotliny se potom vyskytuje i vrba slezská. Občas můžeme najít i vrbu ušatou, vrbu jívu a různé křížence vykazující některé jejich znaky (list se zahnutou špičkou, chlupatý list, lišty na dřevě).

Lokalita Malá kotlina byla navštívena v srpnu roku 2009 a výskyt vrby hrotolisté potvrzen nebyl. Nalezeno bylo pouze několik rostlin křížence s vrbou slezskou. Bude tedy pravděpodobně nutné výskyt vrby hrotolisté na této lokalitě přehodnotit, popř. potvrdit přítomnost čisté vrby hrotolisté či křížence zde molekulárními metodami. V Malé kotlině nebyly zjištěny ani vhodné mikrobiotopy, které vrba hrotolístá třeba ve Velké kotlině preferuje. Díky tomu, že v zimě tady nepadají laviny, je vegetace zapojená a neposkytuje tedy prostor pro uchycení a růst vrb. Dále je zde poměrně velká plocha pokácené kleče, jejíž biomasa nebyla odstraněna. To také ubírá místo, kde by se mohla vrba hrotolístá uchytit nebo šířit.

Na svahu pod Petrovými kameny a těsně nad chatou Ovčárna bylo nalezeno pár jedinců vrby hrotolisté a po celém svahu se roztroušeně (s větším výskytem podél vlhkých míst) vyskytují kříženci s vrbou slezskou a rovněž vrba slezská. Výskyt vrby hrotolisté u turistické chaty Ovčárna má evidentně ruderální charakter a je důkazem, že druh preferuje nezapojená místa. Přirozeně se jim nejlépe daří na místech, která jsou viditelně v zimě mimo plochu sjezdové dráhy (více jsou v těsném okolí Petrových kamenů a dole u silnice na Praděd). Na této lokalitě jsou častější kříženci vykazující i znaky ostatních vrb, které se zde vyskytují (vrba ušatá, vrba jíva). Zároveň se zde vyskytují člověkem narušené biotopy (příkopy, okraje silnice, okraje parkovišť, půda rozježděná auty), které jsou pro uchycení pionýrských dřevin a hybridů vhodné (Allendorf et al. 2001).

V důsledku je tedy možné, že po důkladnějším prověření lokalit Malá kotlina a Šerák budou z našich 4 lokalit výskytu vrby hrotolisté už jen 2 lokality. Pouze přítomnost křížence bude dokazovat, že zde vrba hrotolístá v minulosti patrně rostla a úspěšně se křížila s vrbou slezskou.

V porovnání s dalšími druhy českých vzácných horských vrb je u vrby hrotolisté zajímavé, že se vyskytuje pouze v Hrubém Jeseníku. Jak vrba bylinná, tak vrba laponská se vyskytují jak v Hrubém Jeseníku, tak v Krkonoších. Vysvětlení by mohlo být v odlišných migračních cestách druhů po skončení dob ledových. Vrba bylinná se z refugií v jižní Evropě vracela v širokém pásu (Alsos et al. 2009), proto se pravděpodobně dostala na všechna vhodná česká stanoviště. U vrby hrotolisté není znám způsob rekolonizace biotopů, ale pravděpodobně probíhala její postglaciální migrace jinak a způsobila, že se u nás vrba hrotolístá vyskytuje pouze v Hrubém Jeseníku.

Laboratorní práce

V rámci laboratorních prací budu diskutovat hlavně vhodnost použitých protokolů, laboratorní podmínky pro použití metody mikrosatelitů a podmínky, které jsou pro jejich úspěšnost nutné. Diskutovány budou také výsledky získané pro 2 mikrosatelity (MS-SX 11, MS-SX 12).

Izolace genomické DNA

Izolace DNA proběhla ze 66 sebraných rostlin. Vzorky byly použitelné pro 48 rostlin a pocházely jak ze zmražených listů, tak z herbářových položek. Průměrný obsah DNA ve vzorku byl 87,98 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Protokol použitý při izolaci se ukázal jako vhodný. Vyřazení 9 vzorků vrby hrotolisté z důvodu malého obsahu genomické DNA mohlo být způsobeno drobnou chybou při izolaci, neboť všechny pocházely z jednoho dne, kdy izolace probíhaly. Vrba hrotolistá, vrba slezská a jejich kříženec při izolaci nevykazují problémy jako vznik bílé nerozpustné sraženiny, která je častá např. pro vrbu lýkovcovou (M. Sochor, R.J. Vašut in verb.). Jako důležitý faktor se při izolaci ukázalo prvotní množství homogenizovaného listu vkládaného do CTAB pufru. Pokud bylo homogenizovaného rostlinného materiálu nadbytek, byl následně výtěžek izolace DNA nízký, případně bylo potřeba tyto vzorky protřepávat velmi dlouho. Je to dáno faktem, že roztok CTAB upufruje jen určité množství rostlinného materiálu, které odpovídá 200 mg pletiva čerstvých listových čepelí. Dle našich experimentů toto množství odpovídá přibližně 50 mg sušených listů vrby hrotolisté (R. J. Vašut in verb.). Nyní může být tento protokol používán pro všechny druhy rodu *Salix* a je velmi pravděpodobné, že bude dosahováno dobrých výsledků.

Stanovená hranice výběru vzorků (obsah genomické DNA 20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) byla pro práci s mikrosatelity vhodná, vzorky dávaly dobré výsledky bez ohledu na obsah DNA. Pravděpodobně bychom podobných výsledků dosáhli i s DNA rostlin, které mají nižší koncentraci DNA (alespoň 15 a více $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Nejpřesnější stanovení koncentrace v naší laboratoři je pomocí přístroje Nanodrop 1000. I přes přesnost a snadnost měření pomocí tohoto přístroje se domnívám, že je vhodné měření provádět na přístroji opakovaně, alespoň dvakrát. Někdy se výsledky dvou měření mohou výrazně lišit, řádově i o desítky procent. To může být způsobeno tím, že roztok DNA není v TE pufru dokonale rozpuštěný (obzvlášť pokud měříme ihned po skončené izolaci a konečném přidání TE pufru), a tak můžeme nabrat jak 1 μl vzorku jen s DNA (vysoký obsah DNA), tak 1 μl úplně bez DNA.

Počet použitých rostlin (48) je pro rozsah této práce dostatečný. Pro následující studium bude ale jistě rozšířen, zejména počty vzorků u křížence a vrby slezské.

Použití mikrosatelitů

V této diplomové práci bylo vyzkoušeno 7 různých mikrosatelitů ze 2 literárních zdrojů (Barker et al. 2003, Stamatii et al. 2003). Pro 2 z těchto mikrosatelitů byly optimalizovány podmínky.

Mikrosatelity jsou molekulární markery, které se v genomu váží pouze na jedno místo, takže dokáží rozlišit jednotlivé genotypy. Používají se právě pro studium hybridizace, paternity a populační genetiky. Jsou druhově specifické. V této práci byly použity mikrosatelity, které byly vyvinuty pro jiné druhy vrb, nefungují pro ně tudíž podmínky, které jsou uvedeny v člancích. Jejich optimalizace je tedy pracná a často trvá velmi dlouho, než jsou optimální podmínky nalezeny. Týká se to hlavně počtu cyklů při PCR reakci, annealingové teploty, ale i obsahu genomické DNA ve vzorku, vlastností polymerázy – rozdíl mezi používanou NovaTaq (Novagen) polymerázou a polymerázou GoTaq (Promega) – nebo obsahu $MgCl_2$. PCR reakce je celkově citlivá na jakoukoli změnu podmínek. Často jde také o dobu, kterou jsou vzorky přítomny ve stripech, než se dostanou do cycleru, a zda jsou chlazené.

Vzorky vizualizované na agarózovém gelu etidium bromidem dávají většinou pouze slabé bandy. Na podrobnějším a citlivějším PAGE gelu jsou ale potom bandy viditelné většinou poměrně dobře. Agarózový gel byl proto používán hlavně pro orientaci, zda má cenu vzorky vizualizovat i na mnohem pracnějším PAGE.

U vrby hrotolisté bylo pro mikrosatelit MS-SX 11 nalezeno 6 různých genotypů, u křížence 2 různé genotypy a u vrby slezské 3 různé genotypy. U vrby hrotolisté byly pro mikrosatelit MS-SX 12 nalezeny 3 různé genotypy, pro křížence pouze jeden genotyp a pro vrbu slezskou dva různé genotypy. Tyto výsledky lze chápat zatím jako předběžně, neboť nelze provést analýzu populace jako celku, přesto nám určitou signifikantní informaci poskytují. K hybridizaci dochází ve Velké kotlině pravděpodobně opakovaně, neboť u křížence bylo prokázáno několik různých genotypů. Kříženec je alelicky podobnější vrbě slezské, vzácné alely se většinou vyskytují pouze u těchto 2 taxonů. A vrba hrotolistá má na lokalitě až 6 různých genotypů, z čehož můžeme odvodit, že u ní dochází k rekombinaci a generativnímu rozmnožování. Vzhledem k tomu, že sběr rostlin byl proveden na prostorově poměrně omezené ploše (tj. vlhká místa v horní až střední části Velké kotliny), lze z této genetické variability usuzovat, že zde druh prosperuje a patrně lze předpokládat, že genetická variabilita druhu v celé Velké kotlině

bude ještě výrazně vyšší. Lze proto předpokládat, že zde výskyt vrby hrotolisté není výrazně ohrožen.

U mikrosatelitu MS-SX 11 bylo u křížence a vrby slezské na naskenovaném polyakrylamidovém gelu hodně „mezer“. Ty se dají vysvětlit přítomností nulové alely. Pro jednoduchost jsme v této práci předpokládali, že rostlina s alelou A je homozygot (AA). Je možné (ale nepravděpodobné), že je to rostlina s genotypem A0. To mohlo způsobit vzniklé mezery. Po analýzách v programu PopGen se ale ukázalo, že tomu tak pravděpodobně nebude. Dalším možným vysvětlením je chyba při laboratorních pracích při nanášení vzorků na polyakrylamidový gel a vynechání polymerázy. To ale hodnotíme také jako nepravděpodobné, protože všechny práce v laboratoři byly vykonávány pečlivě a podle protokolů. Jistě to bude předmětem dalšího studia.

Stamati et al. (2007) se věnovali studiu významu klonálního růstu pomocí metody mikrosatelitů (SSR neboli Simple Sequence Repeat) u 3 druhů subarktických vrb ve Velké Británii. Dvě z nich (*Salix lanata* L. – pouze 2 rostliny z 82 celkově měly shodný genotyp a *S. lapponum* – pouze 13 rostlin z 224 mělo stejný genotyp), které jsou zde ohrožené a vyskytují se na strmých svazích, se vegetativně téměř nemnožily a převažovalo pohlavní rozmnožování. Většina rostlin měla vlastní multi-lokusové genotypy. Naopak třetí vrba *S. herbacea* (36 rostlin z 89 mělo shodný genotyp), vyskytující se na exponovaných vršcích skal, se rozmnožovala spíše vegetativně a rostliny sdílely stejný genotyp až 7 m od sebe. Vysoký podíl klonálního rozmnožování u *S. herbacea* potvrdil i Reisch et al. (2007) v Německu, kdy pro 132 analyzovaných rostlin prokázali 24 genotypů a stejné genotypy byly nejpravděpodobnější do vzdálenosti 130 cm. Závěr z této studie byl, že *S. herbacea* využívá jak pohlavního rozmnožování za účelem dalšího vývoje a adaptace, tak rozmnožování klonálního pro udržení dobře přizpůsobených genotypů. I přestože jsou naše molekulární analýzy předběžné, lze usuzovat, že podobná situace bude pravděpodobně i u vrby hrotolisté, vrby slezské a jejího křížence ve Velké kotlině.

Hybridizace a hybridní zóny

Rostlinný hybrid může být brán buď v užším slova smyslu jako jedinec vzniklý křížením dvou různých druhů (Rieseberg & Carney 1998) nebo v širším jako potomstvo vznikající mezi individuálními rostlinami dvou populací, které se od sebe liší jedním nebo více dědičnými znaky. Ve Velké kotlině se vyskytují hybridi právě na rozhraní

dvou různých populací, které se od sebe poměrně výrazně liší. Kříženec má následně znaky, které mohou být typické pro rodiče (např. načervenalé rašící listy od vrby slezské přecházejí do hybrida téměř vždy, síťnatá žilnatina přechází do hybrida zase od vrby hrotolisté). Vzhled hybridních rostlin může být intermediární, což byl v minulosti převládající názor. Dnes už ale víme, že jejich vzhled je spíše mozaikou od vzhledu jednoho rodiče přes intermediární rostliny k rodiči druhému (Rieseberg 1995).

Vzniku hybridů brání prezygotické (habitátní, behaviorální, temporální, mechanická nebo gametická izolace) a postzygotické bariéry. Prezygotické brání křížení mezi druhy či brání oplození vajíček, postzygotické brání hybridní zygote vyvinout se v dospělého jedince nebo snižují životaschopnost hybrida. Pokud jsou překonány bariéry prezygotické, vzniká hybrid a ten je vystaven bariérám postzygotickým. K těm patří redukovaná životaschopnost, redukovaná plodnost nebo naprostá sterilita, někdy také dochází ke zpětnému křížení hybrida s rodiči nebo s jiným hybridem a následující generace může být slabá či sterilní. Tomuto jevu se pak říká hybridní selhání (Campbell & Reece 2006). Hybridizační experimenty se většinou týkají bariér postzygotických, protože ty se dají lépe zkoumat v podmínkách skleníkového experimentu (Rieseberg & Carney 1998).

Hybridizace má několik evolučních důsledků (Rieseberg 1997): (1) zvýšení druhové genetické diverzity, (2) původ adaptací, (3) vznik nových ekotypů nebo dokonce druhů a (4) posílení nebo selhání reprodukčních bariér.

Pokud jsou reprodukční bariéry mezi druhy pouze jednoduché, bude většina genomu přístupná introgresi – tedy jevu, při kterém se hybrid kříží zpětně se svým rodičem a vnáší tak své hybridní geny do genomu rodičovského. Jen ty znaky, které jsou vázány na sterilní nebo nepřítušné životaschopné geny, jsou introgresi nepřístupné (Rieseberg & Carney 1998). Hybrid nebo zpětný hybrid musí být plodný a životaschopný, aby k introgresi mohlo docházet. Když probíhá introgrese, mohou rostliny jednoho nebo obou rodičů podléhat genetické erozi a být tak ohroženy. Ale některé izolační bariéry (jako např. chromozomové strukturální rozdíly) mohou odolávat introgresi selektivně (Rieseberg 1995), což následně umožňuje udržení mezidruhových rozdílů.

Mezidruhová kříženci jsou značně variabilní ve stupni životaschopnosti a plodnosti. Někdy jsou hybridy první generace značně životaschopnější a větší než rodiče, tomu se potom říká heterózní efekt a využívá se při maximalizaci výnosů zemědělských plodin (Rieseberg & Carney 1998). Někdy může tento jev pomoci ke vzniku nových hybridních druhů, ale rostliny často nemají tu velkou životaschopnost a velikost i

v dalších generacích. Obecně jsou mezidruhová kříženci méně životaschopní a spíše sterilní (Barton 2001), ale některé vzniklé hybridní genotypy mohou své rodiče v těchto parametrech překonávat, dokonce i v biotopu rodiče. Pokud jsou kříženci první generace málo životaschopní a částečně sterilní, v dalších generacích se tyto rostliny mohou stát plně plodnými (Rieseberg 1995).

Hybridní zóny jsou lokality, kde se stýkají areály dvou různých druhů či poddruhů. Hybridní potomek dvou odlišných populací (subspezií, ras) zde převažuje a formuje klinu, která je definována jako postupná změna fenotypu – znaku, rysu, vlastnosti – druhu přes určitý geografický areál (Barton & Hewitt 1985). Přesná definice hybridní zóny neexistuje, v jedné je rozhodující zvýšená fitness hybrida v dané zóně, jindy musí být hybrid morfologicky odlišitelný od rodičů. Objevují se v místě, kde se stýkají dvě blízké příbuzné, ale geneticky odlišné populace. Review, která se hybridními zónami zabývá, uvádí různou šířku těchto zón – od stovek metrů až stovek kilometrů a od plynulých po stupňovité přechody. Hybridní zóny bývají buď stabilní s určitou rovnováhou nebo se mohou pohybovat, obvykle tak 0,1-10 m za rok. Jsou ale důležité pro studium vývoje nových druhů (speciace hybridizací) a pro studium postupné reprodukční izolace.

Hybridní zóny představují paradox současné definice druhu (jak již bylo řečeno výše): „Druh je základní taxonomická kategorie, v níž jsou jedinci, kteří mají shodnou genetickou výbavu, jímž je společná ekologická nika a při rozmnožování dávají vznik plodnému potomstvu“. Oba rodičovské druhy by tudíž měly vlastně být pouze jeden druh. Přesto jsou ale rodiče odlišní, což podporuje spíše alternativní definici druhu: „Druh je taxon, který si udržuje svou identitu i přes genetický tok“ (Barton & Hewitt 1979).

Hybridní zóny a genový tok nemusí nutně vést k rekombinaci populací. Tyto zóny mohou stabilně existovat po tisíce let. Převládajícím vysvětlením pro tento jev je, že hybridní zóny jsou zónami pnutí, napínání mezi protichůdnými efekty rozšíření rodičovských druhů a selekce proti hybridům (tension zone). Rozšiřování rodičovského druhu napomáhá vzniku nových hybridů, což se pak projevuje genovým tokem mezi populacemi a introgresí. Přesto mají ale v mnoha situacích hybridi menší fitness než rodičovské druhy. Chybí jim totiž kompletní genetické sady, které umožňují druhům rodičovským být lépe přizpůsobený k podmínkám stanoviště. Častější úmrtnost a sterilita hybridů vytváří bariéru genovému toku tím, že tvoří „hybridní propad“. Geny sice „tečou“ z rodičovských druhů do hybridů, ale zároveň se už téměř nepředávají do

dalších generací. Statistické modely ukazují, že neutrální alely tečou přes tuto bariéru poměrně pomalu v poměru k alelám výhodným, které tečou rychleji. Zajímavým výstupem tohoto modelu je, že hybridní zóny jsou téměř nezávislé na životním prostředí a mohou se tudíž pohybovat (Barton 1979).

Podle Moora (1977) je pro hybridní zónu a její stabilitu jiné vysvětlení, které bere v úvahu podmínky prostředí (dispersal-independent cline model). Různé frekvence alel si hledají různá ekvilibria závislá na přesných podmínkách prostředí v přesném místě. V každém takovém místě umožňuje selekce stabilní ekvilibrium pouze jednoho typu alel, což se projevuje vznikem uhlazené klíny. Hybridi potom tedy mají v určité části klíny vyšší fitness než druhy rodičovské.

V rámci areálu druhu jsou nejnáchylnější k hybridizaci malé periferní populace, které častěji přicházejí do kontaktu s jinými, příbuznými druhy. Pro tyto populace pak může mít interspecifický genový tok v zásadě 2 důsledky: genetická asimilace nebo outbrední deprese. První případ nastává, pokud je fitness hybridů vyšší než u rodičovských druhů a neprobíhá proti nim selekce. Některé studie popisují dokonce nahrazení vzácných taxonů hybridy. Outbrední deprese je způsobena naopak nižší fitness hybridů v daných ekologických podmínkách každého z rodičovských populací. Důsledkem outbrední deprese bývá typicky např. nižší produkce semen a i drasticky snížená klíčivost, což má pro viabilitu populace velmi negativní důsledky.

Dříve vědci zkoumali genetickou proměnlivost a křížení rostlin hlavně podle jejich vzhledu, podle různých morfologických charakteristik – tedy nejprve studovali fenotypy. Fenotyp je v podstatě genotyp rostliny ovlivněný jejím prostředím. S vynálezem mikroskopu mohli začít studovat rostlinné chromozomy a poté přišel výzkum proměnlivosti na základě studia sekundárních metabolitů nalezených ve vzorcích rostlin. Dnes máme možnost zkoumat proměnlivost přímo na základě zkoumání DNA. Každá změna v genetickém kódu nemusí zároveň vyvolat změnu v produkci sekundárních metabolitů nebo změnu fenotypu, proto jsou dnes metody založené přímo na studiu DNA považovány za spolehlivější a relevantnější.

V dnešní době lze přímo analyzovat sekvence DNA pomocí automatických sekvenátorů, což je ale poměrně nákladné a ne pro každého dostupné. Ke studiu variability v našich podmínkách se tedy používá hlavně otisk DNA využívajícího polymerasovou řetězovou reakci (Polymerase Chain Reaction, PCR). Tato metoda je založena na zmnožení (amplifikaci) určitých úseků DNA in vitro. Různé taxony se svým otiskem DNA mohou značně lišit. Střídáním opakovaného zahřívání a

ochlazování vzorku můžeme z několika úseků, které máme, získat velké množství těchto úseků. Pomocí primerů, které jsou pro mnohé druhy již známé, si definujeme úsek DNA, který se bude při PCR množit. Primery jsou krátké oligonukleotidy, které jsou komplementární k úsekům ohraničujícím místo našeho zájmu. PCR reakce bývá často citlivá na podmínky, např. na teplotu annealingu, obsah Mg^{+} iontů či koncentraci DNA. Detekce fragmentů zmnožených při PCR se většinou provádí na sekvenátoru nebo pomocí agarózového a polyakrylamidového gelu (PAGE).

Ke studiu rostlinného genomu a variability můžeme použít velké množství různých molekulárních markerů. Markery nám poskytují informace o organismu získané s pomocí analýzy jeho molekul (proteinů: analýza izozymů nebo nejčastěji DNA: tzv. DNA markery). První skupinou jsou markery dominantní, které bývají levnější, ale jsou poměrně anonymní (např. RAPD, RFLP, AFLP). Váží se v genomu na více míst. Markery kodominantní jsou oproti dominantním dražší, pracnější, ale přinášejí přesnější a informativní výsledky (např. mikrosatelity SSR). Váží se v genomu pouze na jedno místo, takže dokáží rozlišit jednotlivé genotypy. Používají se právě pro studium hybridizace, paternity a populační genetiky.

Variabilita DNA může být na různých úrovních různá. Některé sekvence jsou stále uvnitř i mezi druhy, některé jsou naopak variabilní tak moc, že každá rostlina je odlišná. Proto se pro studium určité problematiky užívají odlišné části genomu. Pro studium hybridizace a fylogenetických vztahů se používají relativně konzervativní úseky chloroplastové DNA, která se dědí po mateřské linii a díky tomu se během meiosis nerekombinuje.

Některé sekvence DNA jsou v rostlině přítomny jen v jedné kopii, některé se opakují a některé se opakují velmi často. Opakující se sekvence mohou být kratší úseky dvou až šesti párů bází, těm se říká mikrosatelity (SSR neboli Simple Sequence Repeat). Vyskytují se ve všech prokaryotických i eukaryotických organismech a v kódujících i nekódujících oblastech. Jsou velmi početné a rozmístěné po celém genomu. Lze je poměrně snadno studovat s použitím PCR reakce, ale musíme znát sekvence primerů a PCR reakci je někdy třeba dlouho optimalizovat. Pro vrby jsou některé tyto sekvence známé (Barker et al. 2003, Stamati et al. 2003, Reisch et al. 2007). Obecně se používají hlavně k analýze rodičovství, identifikaci klonů a populačně-genetickým studiím (genový tok, migrace, historie populací). Jaderné mikrosatelity jsou nejlepším současným markerem pro zhodnocení populační variability. Pro studium hybridizace se

dále dají použít metody PCR-RFLP s chloroplastovou DNA, analýza isozymů, AFLP či DNA MicroArrays, což je ale extrémně drahá metoda.

Nové molekulární metody mají ale také své nevýhody. Někdy může být problémem izolace DNA studované rostliny, někdy odběr vzorků, kdy se soustředíme pouze na několik rostlin a nevíme, jak moc reprezentují danou populaci či druh. Výsledky některých metod nejsou opakovatelné pro různá pracoviště (např. RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA). A v neposlední řadě bývá problémem i kontaminace vzorků, obzvláště při PCR metodách.

Díky molekulárním fylogenetickým studiím máme velké množství molekulárních markerů (Rieseberg 1995), pomocí kterých můžeme studovat a kvantifikovat hybridizaci a procesy s ní spojené či přesně identifikovat různé stupně hybridů (hybrid první generace, zpětný kříženec apod.). Můžeme také sestavovat genetické mapy hybridních druhů.

V současné době je hybridizace v rodu *Salix* studována téměř po celém světě. Experimenty můžeme rozdělit podle jejich povahy na čistě laboratorní s materiálem nasbíraným v přírodních populacích a na experimenty v populacích pokusných (na poli, ve skleníku).

Hodně experimentů je prováděno ve skleníku či na pokusné ploše. Autoři nasbírají rostliny, pěstují je ve skleníku nebo na poli a experimentálně tvoří křížence F1, zpětné křížence apod. Ve skleníku se dají ovlivňovat různé faktory prostředí (teplota, vlhkost, napadení patogenem), rostliny se dají náhodně či nenáhodně rozmístit podle potřeby a dá se sledovat a měřit životaschopnost a reakce rostlin (velikost rostlin, listů, počet jehněd, biomasa listů, jehněd, počet semen atd.).

Salick & Pfeffer (1999) tak prokazovali současný význam hybridizace a klonálního rozmnožování pro vrby, Fritz et al. (2006) zkoumali význam životního prostředí (konkrétně půdní vlhkosti) pro rodiče a fitness hybridů, Hochwender & Fritz (1999) studovali vliv hybridizace a environmentálního stresu na vývojovou nestabilitu morfologických znaků (tzv. fluctuating asymmetry) projevující se v různých rozměrech listů vrb a Hardig et al. (2000) hledali morfologickou a molekulární evidenci hybridizace a introgrese v hybridní zóně *Salix eriocephala* – *S. sericea*.

V Německu se Beismann et al. (1997) věnovali studiu hybridizace *Salix alba* a *S. fragilis*. Pomocí AFLP analýz se jim podařilo identifikovat jak druhy rodičovské, tak hybridy. Díky výsledkům z AFLP bylo také zjištěno, že 4 jednotlivé stromy z 26 zkoumaných od sebe nemohou být odlišeny ani pomocí všech 3 primerových

kombinací, tzn. je to pravděpodobně jeden klon. Na základě AFLP a mikrosatelitů také pracoval Hanley et al. (2002) se *S. viminalis*, kdy vytvořili genetickou mapu druhu a snažili se identifikovat markery, které jsou spojeny se znaky významnými pro zemědělskou produkci (alternativní paliva – biomasa).

Pomocí mikrosatelitů jsou zkoumány i vysokohorské vrby. Ve Skotsku je použili Stamati et al. (2007) pro studium diverzity podílu klonálního rozmnožování 3 druhů horských vrb (*Salix lanata*, *S. lapponum* a *S. herbacea*) a v Německu Reisch et al. (2007) pro studium prostorové genetické struktury a podílu klonálního a sexuálního rozmnožování *S. herbacea*.

Hybridizace, mikrosatelity a ochrana přírody

Hybridizace je pro ochranáře velkým oříškem. Základními otázkami je, zda hybridy také chránit a zda lze domácí druhy chránit před křížením s druhy introdukovanými (Allendorf et al. 2001). Škodlivé efekty hybridizace (ať už s nebo bez efektu introgrese) již vedly k vymizení mnoha populací a vyhynutí mnoha rostlinných a živočišných druhů. Zvláště problematické je mezidruhovému křížení u druhů málo početných a vzácných, které přijdou do styku s druhy běžnými. Zvyšující se vliv člověka na ekosystémy způsobuje, že je hybridizace mnohem častější. Nejvíce působí introdukce nepůvodních druhů rostlin a živočichů, fragmentace populací a změna biotopů. Dřívější politika ochrany přírody byla striktně proti ochraně druhů vznikajících hybridizací. Dnes je ale hybridizace považována za jeden z důležitých procesů evoluce, proto jsou také měněny zásady ochranářské politiky.

Allendorf et al. (2001) se pokusili hybridizaci roztřídit a podle jednotlivých druhů nastavit, zda má cenu hybridy chránit nebo ne. Základním kritériem bylo, zda je hybridizace přírodním procesem nebo procesem ovlivněným či způsobeným člověkem. Pokud je hybridizace přírodní, může vznikat (1) přírodní hybridní druh, (2) přírodní introgrese a (3) přírodní hybridní zóna. V těchto případech (hlavně u č. 1) by měly hybridně vznikající rostliny být určitým způsobem chráněny i přes jejich hybridní původ. Pokud je ale hybridizace antropogenní, mohou vznikat pouze kříženci první generace (F1) a pokud jsou sterilní, probíhá (4) hybridizace bez introgrese. V tomto případě hybridizace přímo populace genetickým promíšením neohrožuje, ale promarněné investice do rozmnožování mohou představovat demografické riziko. Pokud se F1 hybridy kříží zpětně s rodiči, vzniká tak hybridní roj. V něm může docházet

k (5) velmi rozšířené introgresi nebo (6) kompletnímu promíšení. Tyto hybridní roje způsobují ochraně přírody největší problémy. Pokud máme populaci ve stavu 5 a není provedeno ochranné opatření, může se populace dostat do stavu 6, ve kterém čistí rodiče neexistují.

Pokud už hybridizace jednou započne, je obtížné s ní něco udělat, hlavně pokud jsou kříženci plodní a kříží se mezi sebou i zpětně s rodiči. Pokud se populace dostane do stavu 6, měla by jí být i nadále věnována pozornost, protože hybrid může v ekosystému zaujmout stejnou ekologickou funkci jako měli rodiče. Člověkem způsobená hybridizace a její škodlivé vlivy na populace (hlavně nahrazení druhů hybridem či genetické promíchání) v poslední době narůstají, takže ochranařská politika by se měla zaměřit hlavně na omezení těchto lidských vlivů.

Využití mikrosatelitů může mít pro ochranu přírody poměrně velký význam. Váží se v genomu pouze na jedno místo, tzn. jsou schopné identifikovat jednotlivé genotypy. Díky svému kodominantnímu charakteru lze tak nejen identifikovat jedince/klony, ale rovněž míru hybridizace daných jedinců/klonů. Z celkového počtu různých genotypů můžeme potom usuzovat na podíl klonálního (vegetativního) rozmnožování, podíl sexuálního rozmnožování, frekvenci hybridizace a vnitrodruhovou variabilitu. To všechno přináší velice cennou informaci, která může být následně využita při tvorbě vhodných plánů péče a zásad managementu druhů, především pro malé, prostorově nebo početně omezené a reliktní populace.

Budoucnost výzkumu

Tato diplomová práce je mj. pilotní studií pro následující doktorské studium na Katedře botaniky Univerzity Palackého. Výzkum vrby hrotolisté začal již bakalářskou prací (Brandová 2008), kde byly zjištěny základní morfologické charakteristiky vhodné k odlišení studovaných taxonů (vrby hrotolisté, vrby slezské a jejich křížence), byla stanovena frekvence výskytu studovaných taxonů a tím i hybridizace na lokalitě Velká kotlina a byly objasněny ekologické preference studovaných taxonů. Tato diplomová práce dala podnět k revizi rozšíření vrby hrotolisté (ze 4 lokalit uváděných v literatuře už pravděpodobně existují jen 2). Bylo zjištěno, že na lokalitě Velká kotlina se vyskytuje malé množství sterilních rostlin a poměr pohlaví je vychýlen v prospěch samic. Dále byla optimalizována metoda využití publikovaných mikrosatelitů pro použití v podmínkách molekulární laboratoře Katedry botaniky UP v Olomouci.

Zároveň byly optimalizovány podmínky pro 2 mikrosatelity. Z výsledků se dá odhadovat, že k hybridizaci dochází na lokalitě opakovaně, genotypy křížence jsou alelicky podobnější vrbě slezské a vrba hrotolistá se ve Velké kotlině pravděpodobně rozmnožuje sexuálně (bylo u ní objeveno více různých genotypů).

V rámci budoucího doktorského studia bude zrevidováno současné rozšíření druhu a křížence s vrbou slezskou. Bude pokračovat molekulární výzkum s použitím mikrosatelitů. Bude především zvýšeno množství vzorků jednotlivých druhů a bude použito větší množství dostupných mikrosatelitových primerů. Pro získání výsledků, kterými budeme moci lépe popsat děje v populacích, předpokládáme využití 5-7(-10) mikrosatelitů. V této práci prezentované výsledky naznačují, že díky tomu budeme schopni lépe charakterizovat směr genetického toku, strukturu populací a frekvenci hybridizace, případně zda-li dochází ke genetické erozi jednoho z rodičů.

Zároveň vyvstává otázka podobnosti našeho typu vrby hrotolisté se skandinávskými rostlinami a jejich odlišnosti od rostlin alpských (popř. karpatských). I tato problematika by měla být řešena v rámci budoucího doktorandského studia, kdy by měly být získány vzorky vrby hrotolisté z dalších evropských populací. Měla by být stanovena genetická příbuznost jeseníckých populací k vybraným evropským populacím a zodpovězena otázka, zda-li jsou naše populace bližší skandinávským (jak se zdá z morfoloické podobnosti) nebo středoevropským (Alpy, Karpaty).

Závěr

Tato práce se zabývala hybridizací vrb obecně, hybridními zónami a terénními studijními objekty pro tuto práci byla vrba hrotolistá, vrba slezská a jejich kříženec *Salix ×chlorophana* z lokality Velká kotlina v Hrubém Jeseníku. Cílem této práce bylo zmapování současného výskytu vrby hrotolisté a jejího křížence s vrbou slezskou v ČR, revize herbářových položek a tvorba mapy současného rozšíření, zjištění počtu sterilních a nesterilních rostlin a poměru pohlaví na lokalitě Velká kotlina, optimalizace použití mikrosatelitů pro studium vrby hrotolisté, vrby slezské a jejich křížence a nakonec nástin budoucího použití mikrosatelitů pro účely ochrany přírody.

Byly zrevidovány herbářové položky 5 různých institucí. Na základě soupisu lokalit získaných z této revize a nalezení jejich GPS souřadnic byla sestavena mapa síťového rozšíření. Vrba hrotolistá a její kříženec u nás mají 4 různé lokality v Hrubém Jeseníku (Velká a Malá kotlina, svah pod Petrovými kameny, Šerák). Terénním pozorováním v

lokalitě Malá kotlina ale výskyt vrby hrotolisté nebyl potvrzen, přítomen byl pouze kříženec. V případě svahu pod Petrovými kameny bylo nalezeno jen několik jedinců vrby hrotolisté. To vše vede k závěru, že by současné rozšíření vrby hrotolisté mělo být v budoucnu ověřeno a následně zrevidováno. Je pravděpodobné, že ze 4 lokalit se stanou pouze 2.

Ve Velké kotlině bylo nalezeno pouze několik sterilních rostlin studovaných taxonů (u vrby hrotolisté 3, u křížence 12). To zřejmě potvrzuje, že druh na lokalitě dobře prosperuje a může se rozmnožovat sexuálně. Poměr pohlaví byl u vrby hrotolisté poměrně vyrovnaný ($\text{♂}:\text{♀} = 1,1:1$), u křížence byl vychýlen ve prospěch samic ($\text{♂}:\text{♀} = 1:2,1$).

V terénu byly nasbírány listy rostlin, z nichž byla vyizolována genomická DNA a měli jsme k dispozici 48 vzorků pro optimalizaci mikrosatelitů. Bylo vyzkoušeno sedm mikrosatelitů známých pro jiné druhy rodu *Salix*, podmínky byly optimalizovány pro 2 z nich (MS-SX 11, MS-SX 12). Ze získaných výsledků předběžně vyplývá, že k hybridizaci vrby hrotolisté s vrbou slezskou dochází ve Velké kotlině opakovaně, že kříženec je alelicky podobnější vrbě slezské a že vrba hrotolístá je na lokalitě genotypicky poměrně variabilní. Ze získaných dat vyplývá, že silně ohrožený druh vrba hrotolístá se na lokalitě rozmnožuje i generativně, je geneticky variabilní a její výskyt zde není do budoucna pravděpodobně ohrožen. Přesně taková data jsou pro ochranu přírody potřebná a mohou být získána právě metodou mikrosatelitů.

Literatura

- Ahmadi A., Azadfar D. & Jafari Mofidabadi A. (2010): Study of inter-generic hybridization possibility between *Salix aegyptica* and *Populus caspica* to achieve new hybrids. – International Journal of Plant Production 4 (2): 143-147.
- Allaby M. (2006): A Dictionary of Plant Science. – Oxford University Press.
- Allendorf F. W., Leary R. F., Spruell P. & Wenburg J. K. (2001): The problems with hybrids: setting conservation guidelines. – Trends in Ecology & Evolution 16:613-622.
- Alliende M. C. & Harper J. L. (1989): Demographic studies of a dioecious tree. I. Colonization, sex and age structure of a population of *Salix cinerea*. – Journal of Ecology 77: 1029-1047.
- Alsos I. G., Alm T., Normand S. & Brochmann Ch. (2009): Past and future range shifts and loss of diversity in dwarf willow (*Salix herbacea* L.) inferred from genetics, fossils and modelling. – Global Ecology and Biogeography 18: 223-239.
- Argus G. W. (1997): Infrageneric classification of *Salix* (*Salicaceae*) in the New World. – Monographs in Systematic Botany 52: 1–121.
- Barker J. H. A., Pahlich A., Trybush S., Edwards K. J. & Karp A. (2003): Microsatellite markers for diverse *Salix* species. – Molecular Ecology Notes 3: 4-6.
- Barton N. H. (1979): The dynamics of hybrid zones. – Heredity 43: 341-359.
- Barton N. H. (1983): Multilocus clines. – Evolution 37: 454-71.
- Barton N. H. (2001): The role of hybridization in evolution. – Molecular Ecology, 10: 551-568.
- Barton N. H. & Hewitt G. M. (1985): Analysis of hybrid zones. – Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 16: 113-148.
- Beismann H., Barker J. H. A., Karp A. & Speck T. (1997): AFLP analysis sheds light on distribution of two *Salix* species and their hybrid along natural gradient. – Molecular Ecology 6: 989-993.
- Brandová B. (2008): Ekologie, biologie a rozšíření vrby šípovité (*Salix hastata*) ve Velké kotlině (Hrubý Jeseník). Bakalářská práce, Katedra ekologie a životního

prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, 35 pp., v češtině.

- Briggs D. & Walters S. M. (2001): Proměnlivost a evoluce rostlin. – Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Campbell N. A. & Reece J. B. (2006): Biologie. Computer Press, Brno.
- Crawford R. M. M. & Balfour J. (1983): Female predominant sex ratios and physiological differentiation in arctic willows. – *Journal of Ecology* 71: 149-160.
- Dawson E. T. & Bliss C. L. (1989): Patterns of water use and the tissue water relations in the dioecious shrub, *Salix arctica*: the physiological basis for habitat partitioning between the sexes. – *Oecologia* 79: 332-343.
- Dorn R. E. (1976): A synopsis of American *Salix*. – *Canadian Journal of Botany* 54: 2769-2789.
- Elven R. & Karlsson T. (2000): Salicaceae. – In: Jonsell B. [ed.], *Flora Nordica* 1. Lycopodiaceae – Polygonaceae. – Bergius Foundation, Stockholm, p. 118–195.
- Falinski J. B. (1980): Vegetation dynamics and sex structure of the populations of pioneer dioecious woody plants. – *Vegetatio* 43: 23-28.
- Fang, Ch. (1987): On the distribution and origin of *Salix* in the World. Chinese. – *Acta Phytotaxonomica Sinica* 25: 307-312.
- Fritz R. S., Hochwender C. G., Albrechtsen B. R. & Czesak M. E. (2006): Fitness and genetic architecture of parent and hybrid willows in common gardens. – *Evolution* 60: 1215-1227.
- Hanley S., Barker J. H., Van Ooijen J. W., Aldam C., Harris S. L., Åhman I., Larsson S. & Karp A. (2002): A genetic linkage map of willow (*Salix viminalis*) based on AFLP and microsatellite markers. – *Theoretical and Applied Genetics* 105: 1087-1096.
- Hardig T. M., Brunsfeld S. J., Fritz R. S., Morgan M. & Orians C. M. (2000): Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone. – *Molecular Ecology* 9: 9-24.

- Hochwender C. G. & Fritz R. S. (1999): Fluctuating asymmetry in a *Salix* hybrid system: the importance of genetic versus environmental causes. – *Evolution* 53(2): 408-416.
- Hrachová S. (2009): Biologie a ekologie *Salix lapponum* L. se zaměřením na problematiku ekologie pohlaví. Bakalářská práce, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, 58 pp., v češtině.
- Chmelař J. (1971): Poznámky k československým druhům rodu *Salix*. Část I. Druhy vrb nižších poloh. – *Časopis Slezského Muzea, Opava, Ser. C*, 10: 1-17.
- Chmelař J. (1972): Poznámky k československým druhům rodu *Salix*. Část II. Druhy vrb vyšších poloh. – *Časopis Slezského Muzea, Opava, Ser. C*, 11: 1-16.
- Chmelař J. (1973): Poznámky k československým druhům rodu *Salix*. Část III. Zavlečené taxony vrb. – *Časopis Slezského Muzea, Opava, Ser. C*, 12: 1-16.
- Chmelař J. (1979): Taxonomický význam počtu chromozomů rodu *Salix* L. – *Lesnictví* 25 (LII), 5: 411-415.
- Chmelař J. & Koblížek J. (1990): 65. *Salicaceae* Mirbel – vrbovité. – In: Hejný S. & Slavík B. [eds.], *Květena České republiky* 2, pp. 458-495, Academia, Praha.
- Chrtek J., Plačková I., Zahradníková J., Kirschner J., Kirschnerová L., Štěpánek J., Krahulcová A., Krahulec F. & Harčarik J. (2007): Genetická variabilita vybraných horských druhů cévnatých rostlin v Krkonoších. – In Štursa J. & Knapik R. [eds.]: *Geoekologické problémy Krkonoš. Sborník Mezinárodní Vědecké Konference, říjen 2006, Svoboda n. Úpou. Opera Corcontica*, 44/1: 251-264.
- Jeník J. (1961): *Alpínská vegetace Krkonoš, Králického Sněžníku a Hrubého Jeseníku.* – Praha.
- Krahulcová A., Krahulec F. & Kirschner J. (1996): Introgressive hybridization between a native and an introduced species: *Viola lutea* subsp. *sudetica* × *V. tricolor*. – *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica* 31: 219-244.
- Krkavec F. (1971): K rozšíření některých druhů rodu *Salix* v Hrubém Jeseníku. – *Campanula* 2: 41-45.

- Laus H. (1927): Květena Petrštiny ve Vysokých Jesenicích se zvláštním zřetelem na rozšíření našich arkticko-alpinských druhů vrb. – Časopis Vlasteneckého Spolku Musea Olomouc, 39: 27-52.
- Mayr, E. (1963): Animal species and evolution. Cambridge, MA, USA: Harvard University Press.
- Miller J. S. & Venable D. L. (2000): Polyploidy and the Evolution of Gender Dimorphism in Plants. - Science 289: 2335-2338.
- Moore W. S. (1977): An evaluation of narrow hybrid zones in vertebrates. – The Quarterly Review of Biology 52: 263-78.
- Mühlmann O. & Peintner U. (2008): Mycobionts of *Salix herbacea* on a glacier forefront in the Austrian Alps. – Mycorrhiza 18: 171-180.
- Newsham K. K., Upson R. & Read D. J. (2009): Mycorrhizas and dark septate root endophytes in polar regions. – Fungal Ecology, vol. 2, 1: 10-20.
- Newsholme Ch. (1992): Willows – the genus *Salix*. Butler & Tanner Ltd, Frome, Somerset.
- Procházka F. (2001): Black and Red List of Vascular Plants of the Czech Republic. – Příroda 8: 1-166.
- Reisch C., Anke A. & Röhl M. (2005): Molecular variation within and between ten population of *Primula farinosa* (*Primulaceae*) along an altitudinal gradient in the northern Alps. – Basic and applied ecology 6: 35–45.
- Reisch C., Schurm S. & Poschlod P. (2007): Spatial genetic structure and clonal diversity in an alpine population of *Salix herbacea* (*Salicaceae*). – Annals of Botany 99: 647–651.
- Relichová J. (2009): Genetika populací. Masarykova univerzita Brno.
- Rieseberg L. H. (1995): The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. – American Journal of Botany 82(7): 944-953.
- Rieseberg L. H. (1997): Hybrid origins of plant species. – Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics, 28: 359-89.
- Rieseberg L. H. & Carney S. E. (1998): Plant hybridization. – New Phytologist, 140: 599-624.

- Rossi G., Parolo G., Zonta L. A., Crawford J. A. & Leonardi A. (2006): *Salix herbacea* L. fragmented small population in the N-Apennines (Italy): response to human trampling disturbance. – *Biodiversity and Conservation* 15: 3881–3893.
- Salick J. & Pfeiffer E. (1999): The interplay of hybridization and clonal reproduction in the evolution of willows. – *Plant Ecology* 141: 163-178.
- Skvortsov A. K. (1968): Willows of the USSR. Taxonomic and Geographic Revision. – Nauka, Moscow.
- Sochor M. (2009): Molekulární markery pro studium vysokohorských druhů vrb (*Salix*). Bakalářská práce, Katedra botaniky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého Olomouc, 44 pp., v češtině.
- Stamati K., Blackie S., Brown W. S. & Russell J. (2003): A set of polymorphic SSR loci for subarctic willow (*Salix lanata*, *S. lapponum* and *S. herbacea*). – *Molecular Ecology Notes* 3: 208-282.
- Stamati K., Hollingsworth P. M., Russell J. (2007): Patterns of clonal diversity in three species of sub-arctic willow (*Salix lanata*, *Salix lapponum* and *Salix herbacea*). – *Plant Systematics and Evolution*, 269: 75-88.
- Šafář J. [ed.] (2003): Olomoucko. – In: Mackovčín P. & Sedláček M. [eds.], Chráněná území ČR, sv. VI. – Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha.
- Šimíček V. (1978): *Salix hastata* L. – vrba šípovitá. – *Lesnická práce*, Kostelec nad Černými lesy, 57: 144.
- Treml V. & Banaš M. (2000): Alpine timberline in the High Sudeties. – *Acta Universitatis Carolinae, Geographica*, Praha, 35: 83-99.
- Vašut R. & Pečinka A. (2000): Nález *Salix ×angustifolia* v ČR. – *Zprávy České Botanické Společnosti* 35: 41-42.
- Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T., Ye Z. H. & Mao J. X. (1997): Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. – Edmonton, AB: University of Alberta.