

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra ekologie a životního prostředí



**Jan Ševčík**

**Genetická diverzita populací vrby bylinné  
(*Salix herbacea* L.) ve Vysokých Sudetech**

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 2012



## **Prohlášení**

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

V Olomouci 11. května 2012

.....

podpis

Ševčík, J.: Genetická diverzita vrby bylinné (*Salix herbacea* L) ve Vysokých Sudetech. Diplomová práce. Katedra ekologie a životního prostředí PřF UP v Olomouci, 44 stran, 7 příloh, česky.

### Abstrakt

Tato práce se zabývala ohroženým a chráněným druhem naší flóry, vrbou bylinnou (*Salix herbacea* L.). Její populace byly zkoumány z historického, současného i budoucího hlediska. Za účelem seznámení se s historickým rozšířením byly zrevidovány položky z vybraných herbářových sbírek. V herbářích byly nalézány hlavně položky z Hrubého Jeseníku se značnou převahou z populace na Petrových kamenech, která tímto musela na početnosti významně utrpět. Byly navštíveny všechny recentní a některé historické lokality s výskytem zájmového druhu. Na těchto lokalitách byl zhodnocen stav populací. Na Petrových a Tabulových kamenech bylo kromě hromadného kvetení pozorován i vývoj tobolek a semen. Tyto semena se nepodařilo přimět ke klíčení. Ze všech recentních populací v ČR byly odebrány vzorky listů pro extrakci genomické DNA a následné studium genetické variability populací pomocí SSR (simple sequence repeats) markerů. Byly tak optimalizovány podmínky pro 3 mikrosatelity. Celkem bylo na 80 rostlinách identifikováno 13 multilokusových genotypů s převahou 6 hojných genotypů. Ve dvou lokusech byla zjištěna vysoká míra heterozygotnosti. Bylo nalezeno několik alel s výskytem pouze na jedné ze zkoumaných lokalit. Žádný z genotypů nebyl přítomen na více lokalitách. Na lokalitách byla zjištěna nepříbuznost některých polykormonů se zbytkem populace. Vrba bylinná se v našich populacích množí nejspíše pouze vegetativně a tvorba semen je pravděpodobně způsobena opylením jiným druhem vrby.

Klíčová slova: Hrubý Jeseník, Krkonoše, ohrožený druh, SSR, konzervační genetika

Ševčík, J.: Genetic structure and clonal diversity of *Salix herbacea* L. in Hight Sudetes  
Diploma thesis, Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of  
Science, Palacky University of Olomouc, 44 pp., 7 Appendices, in Czech.

### **Abstract**

The object of this thesis is endangered, relic and protected willow species, the dwarf willow (*Salix herbacea* L.). I studied this species from the historical, current and future prospects. I studied the herbaria collections in order to better understand the population dynamics on studied localities in time. This part of my study confirmed already extinct populations. Furthermore, it revealed that the majority of collected plants originate from the Petrovy kameny Mt.—an extremely fragile site—and thus this population was ravaged by the excessive collecting by botanists. I visited all the documented localities (including the extinct ones). The most surprising observation made in the field was the documentation of the seed development at both Hrubý Jeseník sites. Unfortunately, neither direct sowing nor in vitro biotechnological manipulation ended in germination. I collected plant material for DNA extraction for further analyses from all the Czech populations. The population genetics analyses were done by using three microsatellite loci. Out of the total of 13 multilocus genotypes found in the sample of 80 plants, only 6 were common in studied populations. Markers showed high proportion of heterozygotes, that all genotypes occur at single locality only, and that some populations are formed by a single clone only. Genetic data also confirmed that (at least for the most of populations) the only reproductions strategy is by vegetative propagation.

**Keywords:** Giant Mountains, Hruby Jesenik Mts., SSR, threatened species, conservative genetics

# Obsah

Seznam tabulek .....	vii
Seznam obrázků .....	viii
Poděkování .....	ix
1. ÚVOD .....	1
1.1. rod Salix .....	1
1.2. historie horských vrů .....	2
1.3. populační změny horských vrů .....	4
2. CÍLE PRÁCE .....	6
3. MATERIÁL A METODY .....	7
3.1. popis zkoumaného taxonu .....	7
3.2. rozšíření vrby bylinné v ČR .....	9
3.2.1. krkonošské lokality .....	9
3.2.2. jesenické lokality .....	11
3.3. zpracování rostlinného materiálu .....	16
3.4. Mikrosatelity .....	17
3.5. analýza dat .....	19
4. VÝSLEDKY .....	20
4.1. herbářové sbírky .....	20
4.2. stav populací .....	21
4.2.1. Krkonoše .....	21
4.2.2. Hrubý Jeseník .....	21
4.3. genotypová variabilita populací .....	23
4.3.1. testování a charakterizování mikrosatelitů .....	23
4.4. Příbuznost populací .....	29
5. DISKUZE .....	31
5.1. rozšíření .....	31
5.2. stav populací .....	33
5.3. genetická variabilita populací .....	35
6. ZÁVĚR .....	39
7. Použitá literatura: .....	40
8. PŘÍLOHY .....	45
Seznam příloh .....	45

## Seznam tabulek

<b>Tab. 1: Přehled testovaných mikrosatelitů.</b> Primer rbs19 publikován v práci Stamati <i>et al.</i> (2003), ostatní v práci Barker <i>et al.</i> (2003). .....	17
<b>Tab. 2: Složení PCR mixu v množství pro jeden vzorek.</b> .....	18
<b>Tab. 3: Přehled herbářových dokladů <i>Salix herbacea</i> z území ČR.</b> BRNL - Ústav lesnické botaniky, dendrologie a typologie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně; BRNM - Moravské zemské muzeum; - LIT - Okresní vlastivědné muzeum, Litoměřice; ROZ - Středočeské muzeum, Roztoky u Prahy. ....	20
<b>Tab. 4: Poloha a stav všech dohledaných trsů na Jesenických lokalitách.</b> 0-16 – Lokalita Tabulové skály; 17-26 – Lokalita Petrovy kameny .....	22
<b>Tab. 5: Seznam použitých mikrosatelitů.</b> Primer rbs19 publikován v práci Stamati <i>et al.</i> 2003, ostatní v práci Barker <i>et al.</i> 2003. T <sub>a</sub> - annealingová teplota, C – počet cyklů.....	24
<b>Tab. 6: Počet detekovaných alel u použitých primerů a jejich velikost.</b> .....	25
<b>Tab. 7: Genotypy jednotlivých trsů.</b> .....	25
<b>Tab. 8: Vyřazené vzorky.</b> .....	27

## Seznam obrázků

<b>Obr. 1: Evropské rozšíření <i>Salix herbacea</i>. (Jalas &amp; Suominen 1998, upraveno) .....</b>	<b>7</b>
<b>Obr. 2: Mapa lokalit studovaných populací vrby bylinné v Krkonoších. Zdroj mapového podkladu www.mapy.cz .....</b>	<b>14</b>
<b>Obr. 3: Mapa odběru vzorků vrby bylinné na lokalitě Studniční stěna. ....</b>	<b>14</b>
<b>Obr. 4: Mapa lokalit studovaných populací vrby bylinné v Jeseníkách. Zdroj mapového podkladu www.mapy.cz .....</b>	<b>15</b>
<b>Obr. 5: Mapy odběru vzorků vrby bylinné v Hrubém Jeseníku. a) lokalita Petrovy kameny; b) lokalita Tabulové kameny .....</b>	<b>15</b>
<b>Obr. 6: Mapa rozložení genotypů <i>Salix herbacea</i> na Studniční stěně.....</b>	<b>28</b>
<b>Obr. 7: Mapa rozložení genotypů <i>Salix herbacea</i> na Tabulových kamenech. ....</b>	<b>28</b>
<b>Obr. 8: UPGMA dendrogram všech přirozených populací <i>Salix herbacea</i> v ČR.....</b>	<b>29</b>
<b>Obr. 9: NJ dendrogram všech přirozených populací <i>Salix herbacea</i> v ČR.....</b>	<b>30</b>



## Poděkování

Tímto bych rád poděkoval RNDr. Radimu J. Vašutovi za možnost podílet se na výzkumu vysokohorských vrb, za čas, který vložil do vedení této práce a za cenné rady a připomínky ke studiu vrby. Zvláštní díky patří Blance Brandové a Michalovi Sochorovi, kteří mi nesmírně pomohli ve zvládnutí laboratorní práce. A také RNDr. Miloslavu Kitnerovi, Ph.D. a RNDr. Luboši Majeskému za trpělivost při „pozorování“ mojí činnosti v laboratoři.

Dále bych tímto rád poděkoval Ing. Jitce Zahradníkové za možnost navštívit krkonošské populace vrby bylinné. Bez ní by jejich nalezení bylo velmi obtížné a nebezpečné.

V neposlední řadě své mamince a přítelkyni, které se mě snažili podporovat a věřily, že tuto práci dokončím.

# 1. ÚVOD

Vrba bylinná (*Salix herbacea* L.), na kterou je tato diplomová práce zaměřena, je významným druhem české flóry. Významnost a zároveň vzácnost tohoto taxonu potvrzuje jeho zařazení do červeného seznamu rostlin i jeho legislativní ochrana. V obou případech v kategorii kriticky ohroženého druhu. Proto je v zájmu ochrany přírody tento druh podrobněji studovat. V ČR se recentně vyskytuje pouze na 4 lokalitách a to v nejvyšších polohách státu. Tyto poslední populace jsou již jen fragmentem historického areálu z období posledního glaciálu. Jakožto glaciální relikty jsou populace u nás výrazně izolované od souvislého areálu druhu. Ten se nejbližší nachází v Alpách a Tatrách, centrum rozšíření tohoto druhu jsou až arktické oblasti severní Evropy a Severní Ameriky. Geografický a časový hiát není jen mezi populacemi z našeho území ve srovnání s populacemi v centru rozšíření druhu, ale i mezi našimi populacemi navzájem. Toto odloučení zapříčinilo změny ve vnitřní i mezi populacní genetické variabilitě, které nám umožní lépe poznat historii tohoto druhu, ale i jeho možnou budoucnost.

## 1.1. rod *Salix*

Čeleď *Salicaceae* v užším pojetí obsahuje 2-4 rody. Z nichž nejpočetnější je právě typový rod vrba (*Salix* L.), který celosvětově obsahuje okolo 450 druhů (Argus 1997). Názory na skutečný počet se ovšem velmi liší a pohybují se mezi 330-350 (Skvortsov 1968) až 526 druhů (Fang 1987). Důvodem takto odlišných názorů na počet druhů je obtížná determinovatelnost vrb, která je způsobena častou hybridizací, vysokou genetickou variabilitou, možnou apomixií, nezřetelnými určovacími znaky a přitom vysokou morfologickou variabilitou a plasticitou (Brunsfeld 1991).

Vrby jsou opadavé, dvoudomé entomogamní či fakultativně anemogamní keře i stromy. Listy nejčastěji střídavé, celistvé. Pupy kryté 1 šupinou. Květenství jsou vzpřímené, mnohokvěté, podlouhlé nebo téměř kulovité jehnědy. Občas se u některých kříženců či kultivarů objevují oboupohlavné květenství. Samičí květy s gynecem srostlým ze dvou plodolistů, se zřetelnou čnělkou a dvěma bliznami. Plodem je tobolka s anemochorními plody. Základní chromozómové číslo je  $x = 19$  (Elven & Karlsson (2000) u *Salix triandra* L. udávají až  $x=22$ ), většina druhů je diploidních  $2n = 38$ , ale polyploidie je vyvinuta až do dodekaploidní úrovně, tj.  $2n = 12x = 228$ .

V Evropě rostou přirozeně zástupci tří podrodů: (1) subgen. *Salix*, což jsou většinou stromové vrby kvetoucí po olistění; (2) subgen. *Vetrix* Dumort., který zahrnuje většinu druhů, jedná se o keře kvetoucí před nebo současně s olistěním. (3) Subgen. *Chamaetia* (Dumort.) Nasarow, zahrnující drobné vrby (sub)alpínských a (sub)arktických, často reliktních, stanovišť. Zástupci tohoto podrodu jsou nejlépe přizpůsobeni nepříznivým klimatickým podmínkám chladných oblastí. Rozšíření rodu je téměř celosvětové s těžištěm výskytu v mírném až subarktickém pásmu Severní Ameriky, Evropy a horách Číny. Schází v Austrálii, na Novém Zélandě, v Indonésii, nejzápadnější Africe, nejvýchodnější Brazílii (Chmelař & Koblížek 1990) a pouze tři druhy jsou původní v Střední a Jižní Americe (Argus 1997). V Evropě je původních 65 druhů (Myklestad & Birks 1993).

Evolučně původnější druhy se vyznačují stromovitým vzrůstem, diploidním počtem chromozomů. Odvozenější druhy jsou spíše rostliny keřového vzrůstu a polyploidní (Dorn 1976). Centra vzniku vrb jsou pravděpodobně dvě: (1) v tropické a subtropické oblasti Ameriky (2) v horách Jihovýchodní Asie, kde se kromě někdy vyčleňovaného rodu *Choosenia* Nakai vyskytují i původnější sekce vrb a topolů. V Evropě jsou vrby známy z oligocénu, kdy vznikají i první horské vrby podrodu *Vetrix*. Podrod *Chamaetia* pravděpodobně vznikl ze třetihorních horských druhů vrb z jihozápadní Číny (Hörandl *et al.* 2002).

Ve srovnání s ostatními dřevinami probíhá u vrb evoluce relativně rychle. Je to způsobeno jak obligátní alogamií, která napomáhá i k časté hybridizaci, tak i krátkým generačním časem způsobeným rychlým růstem. Tyto vlastnosti jim napomáhají být úspěšným R-stratégem osidlujícím nejrůznější narušené a volné biotopy s vhodným přístupem k podzemní vodě. Na rychlou evoluci rodu ukazuje i charakter rozšíření. Zatímco některé druhy mají disjunktivní areály (severní Evropa, hory střední Evropy, Severní Amerika), tak u vrb se projevuje spíše vikarizace (Elven & Karlsson 2000).

## 1.2. historie horských vrb

Vysokohorské druhy vrb často rostou na klimaticky extrémních stanovištích. Ty se projevují nejen nízkými ročními průměrnými teplotami, krátkou vegetační sezónou, dlouho vytrvávající sněhovou pokrývkou, či naopak velmi nízkými teplotami beze sněhové pokrývky, ale také velkými výkyvy teplot během dne, mechanickým narušováním a vyšším zastoupením UV záření. Díky těmto tlakům jsou horské druhy

vrby keříčkovitého vzrůstu, dále se u nich vyvinulo husté ochlupení patrné hlavně na mladých orgánech. U druhů horských a arktických rostlin je velmi důležitá symbióza s mykorhizními houbami (Newsham *et al.* 2009). S horskými vrby žije v symbióze desítky druhů hub, jak dokládá na vrbě bylinné Mühlmann & Peintner (2008) a na *S. polaris* Wahlenb. Väre *et al.* (1992).

Středoevropské populace horských druhů vrby mají podobnou evoluční historii. Jejich geografické rozšíření velmi ovlivnil terciér, resp. střídání glaciálů a interglaciálů. Když v Evropě došlo k prvnímu zalednění, byla ve vyšších polohách teplomilná vegetace třetihor nahrazena vegetací tundry s mechy a lišejníky a v nižších polohách vegetací studených stepí. V nejchladnějším období bylo souvislé zalednění u severních hranic naší země. V Krkonoších, Hrubém Jeseníku a na Šumava se vytvořily malé horské ledovce, které později daly vzniknout ledovcovým karům (Jeník 1961). Naše území tak leželo v tzv. periglaciální oblasti a poskytovalo refugium jak severským organismům ustupujícím před pevninským ledovcem, tak pozůstatkům původní flóry.

Při následném oteplování v periglaciálu docházelo k opětovnému návratu teplomilnějších druhů rostlin a lesa z temperátních oblastí. Chladnomilné druhy rostlin ustupovaly za odtávajícím ledovcem na sever či výše do hor, kde nacházely vhodné mikroklima. Vrby jsou díky anemochorním semenům, rychlé klíčivosti a dobře vyvinuté mykorhize jedny z prvních kolonizátorů volných biotopů vzniklých po ústupu ledovce (Newsholme 1992, Mühlmann & Peintner 2008). Tentokrát zafungovaly jako refugia hory a jiná místa připomínající severskou tundru, jako jsou např. rašeliniště (Birks 1993). Tyto chladnomilné druhy, vyskytující se u nás mimo svoje optimum, jsou nazývány glaciálními relikty. Z vrby to jsou např. *Salix herbacea* L., *S. lapponum* L., *S. hastata* L., *S. appendiculata* Vill. či *S. starkeana* Willd. (již vyhynulý druh, který u nás rostl na slatinných loukách v okolí Olomouce a patrně zanikl v důsledku lidské činnosti). Kromě vysokohorských vrby se u nás jako glaciální relikty vyskytují také jiné druhy rostlin např. *Rubus chamaemorus* L., *Betula nana* L., *Bartsia alpina* L. V takto geograficky izolovaných populacích dochází ke genetické divergenci a populace v různých částech svého areálu se mohou značně lišit, někdy jsou hodnoceny i jako různé taxony až na druhové úrovni (např. *Salix retusa* agg.).

### 1.3. populační změny horských vrb

Horské vrby si díky efektivnímu šíření semen a pylu na dlouhé vzdálenosti zajišťují vysoký genový tok mezi jednotlivými populacemi. Rychle klíčivá semena zajišťují rychlé osidlování nových lokalit velkým množstvím nových genet a tím udržování rychlé adaptability populací na selekční tlaky prostředí (Hörandl *et al.* 2002). Takováto strategie byla vhodná i pro udržení co možná největšího množství genetické variability v populacích vrby bylinné expandujících při interglaciálním oteplení za ledovcem zpět na sever v kontinuálním pásu, který umožňoval genetický tok. Alsos *et al.* (2009) pomocí studia genetické diverzity evropských populací vrby bylinné pomocí AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) a modelování ztrát vhodných biotopů do roku 2080 vlivem klimatických změn zjistil, že při 50% extinkci populací na těchto lokalitách, by druh celkově ztratil pouze 5 % ze své genetické variability. Takovýto nepoměr je v kontrastu s možným až 60% snížením genetické diverzity u *Ranunculus glacialis* E.D. Clarke (Schönswetter *et al.* 2003) či *Arabis alpina* L. (Ehrich *et al.* 2007).

Výše uvedené vlastnosti umožnily zachování druhu ve vhodných refugiích v našich horách. V refugiích se populace našich horských druhů vrb staly geograficky a reprodukčně značně izolované. Nalezená refugia ve vysokých horách umožňují pouze početně omezené populace, které se tak se zmenšujícím prostorem stále více fragmentovaly a zmenšovaly. Tyto horské lokality se vyznačují tvrdými životními podmínkami (krátká vegetační doba, omezený přísun živin, silný vítr apod.). Jejich vliv může bránit sexuální reprodukci, která se stává riskantní (Urbanska & Schütz 1986). Jedním ze způsobů vyrovnání se bariérám v sexuální reprodukci je klonální propagace (Bliss 1971). Se vzrůstající nadmořskou výškou její důležitost vzrůstá a nemalá část vysokohorských rostlin jí využívá (Beisman *et al.* 1997).

Vrby podrodu *Chamaetia* mají v horských podmínkách velkou míru klonality. Ta se dá zkoumat pomocí indexu *PD* (*proportion of distinguishable genotypes*). Pro vrbu bylinnou Stamati *et al.* (2007) zjistil ve Velké Británii  $PD = 0,40$  pro SSR (*Simple sequence repeats*). Pro podmínky Alp zjistil Reisch *et al.* (2007) ještě nižší hodnotu,  $PD = 0,18$  pro SSR a  $PD = 0,36$  pro RAPD (*Random amplification of polymorphic DNA*). Některé populační studie variability jsou prováděny na základě variability na úrovni izozymů. Chrtěk *et al.* (2007) touto metodou podrobil zkoumání v Krkonoších vrby bylinnou, kde na největší české lokalitě, z které bylo odebráno 50

vzorků, zjistil 5 izozymových fenotypů. Na dalších dvou lokalitách zjistil po 1 izozymovém fenotypu. Z globálního pohledu a budoucího vývoje populací studoval vrbu bylinnou Alsos *et al.* (2009). Ve 41 populacích zjistil 1 odlišnou genetickou skupinu v Severní Americe a 4 v Evropě. Největší genetická diverzita byla nalezena ve skandinávských a jihoalpských populacích.

Převaha klonálního rozmnožování s sebou nese i úskalí v podobně zesílení genetického driftu, jakožto důsledek snížení efektivní velikosti populace (Pluess *et Stöcklin* 2004). Ta je způsobena konkurencí ramet různých genet, populace se stává uniformní a může převládnout jen jeden nebo několik málo genotypů (Watkinson & Powell 1993). Pro udržení genetické diverzity stačí sporadická imigrace sexuálně vzniklých renet (Watkinson & Powell 1993). Bez této imigrace se může začít projevovat efekt zakladatele, jako např. v učebnicové studii na populaci *Solidago canadensis* L., kde dominovaly genety, které se uchytili jako první (Hartnett & Bazzaz 1985).

Takovéto populace jsou všeobecně náchylné ke změnám či ztrátě genetické diverzity. Ve fragmentovaných populacích vzrůstá význam genetického driftu, tedy náhodných změn frekvencí alel určitého genu. To je mnohem více účinné v malých než ve velkých populacích (Relichová 2009). Genetický drift spolu s efektem hrdla láhve (*bottle-neck effect*) má za následek větší míru inbreedingu, kdy je populace v důsledku častého příbuzenského křížení složena z jedinců se zvýšenou genetickou homozygotností a zároveň se sníženou fitness. Tím se snižuje adaptibilita populací na selekční tlaky prostředí a může vést až k vymizení jednotlivých populací. U dvoudomých druhů rostlin hrozí také ztráta jednoho pohlaví z populací. Příkladem mohou být mnohé naše populace horských vrb, jako např. výskyty pouze samčích keřů *Salix bicolor* Willd. v kotli Úpy, samičího polykormonu *S. lapponum* L. u Tabulových skal v Hrubém Jeseníku (Chmelař 1972), či na všech vysokosudetských lokalitách pouze pestíkovými květy kvetoucí vrba bylinná (Vašina & Zahradníková 1999). U takových populací se ještě více prohlubuje genetický drift.

Dnes je většina lokalit ohrožených druhů horských vrb chráněna. Tato místní ochrana omezila většinu možných ohrožení na minimum. I přesto v menší míře zůstává ohrožení emisemi a následnou změnou chemizmu půdy a tím narušení mykorhizních vztahů. Dále pak sešlap turisty a nepůvodní zvěří. U nás to je například kamzík. Bylo prokázáno, že sešlap polykormonů vrby bylinné zmenšuje pokryvnost jednotlivých keřů a snižuje tvorbu květenství (Rossi 2006), a tedy i generativní rozmnožování

a efektivní šíření na nové lokality, které je pro vytrvání druhů vrb v regionu obzvláště důležité. Z výše uvedených důvodů je důležité i nadále naše horské druhy vrb studovat, zjistit jejich skutečné ohrožení a zajistit jim tak vhodnou ochranu.

## 2. CÍLE PRÁCE

Vrba bylinná patří mezi zvláště chráněné druhy rostlin a mezi rostliny ohrožené. K šíření na další lokality zpravidla dochází pomocí semen a k jejich produkci je nutná přítomnost obou pohlaví. Nicméně v Hrubém Jeseníku a Krkonoších jsou známí pouze samičí jedinci. Tato skutečnost může snižovat schopnost reakce druhu na měnící se životní prostředí, a tak zapříčinit vymizení tohoto neobyčejného druhu z našeho území.

Za posledních 100 let došlo na našem území ke značnému snížení počtu lokalit i početnosti druhu na lokalitách. Na některých za to prokazatelně může lidská činnost, na jiných je to nejspíše dílo náhody a abiotických faktorů. Pro zjištění aktuálnosti tohoto ohrožení i zajištění správného managementu je nutné znát vnitro i mezipopulační genetickou diverzitu. Její znalost má zásadní význam pro zjištění historie populací, tak i pro úvahy o její budoucnosti. Geneticky variabilní populace mohou úspěšněji čelit extrémním vysokohorským klimatickým podmínkám i jejich změnám.

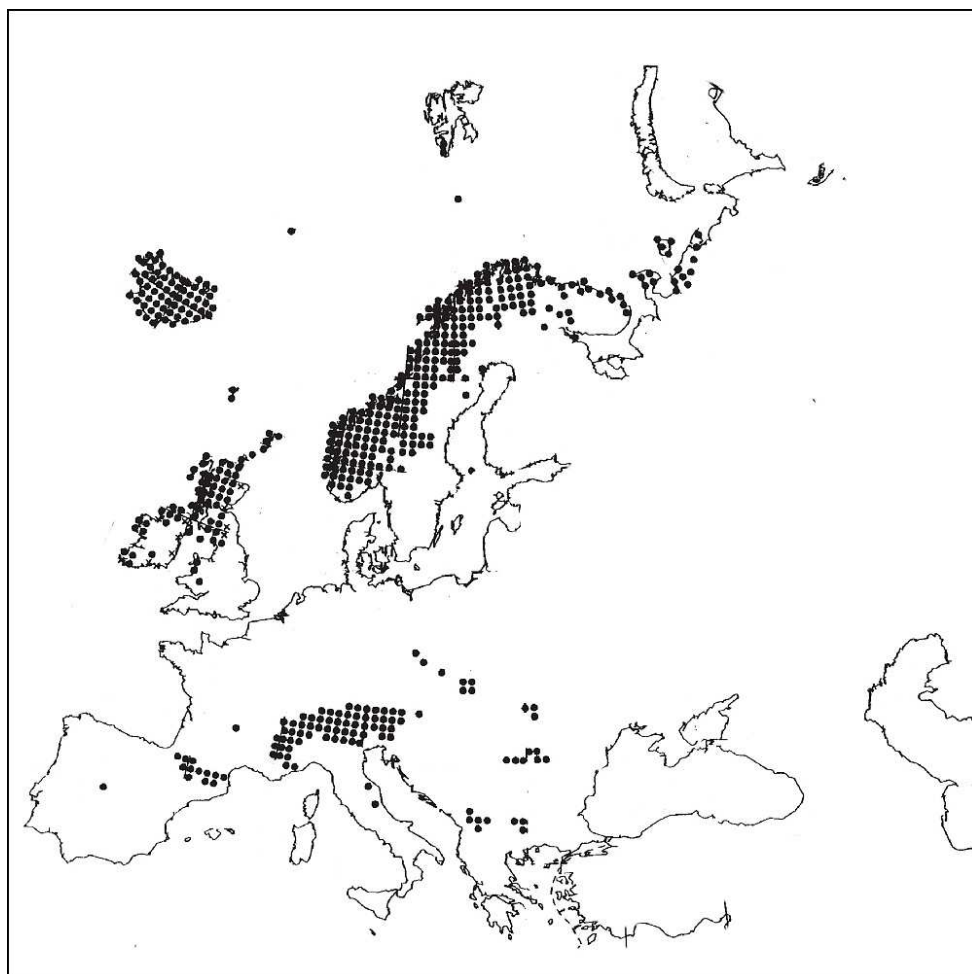
Práce by také měla mít přínos pro ochranu přírody. Konkrétně pro Správu Chráněné krajinné oblasti Jeseníky a Správu Národního parku Krkonoše.

Tato práce hledá odpovědi na následující otázky. (1) Jaká je vnitro a mezipopulační genetická diverzita vrby bylinné v České republice? (2) Jaký je stav, ohrožení a budoucnost našich populací?

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. popis zkoumaného taxonu

Vrba bylinná je rozšířena v arktickém a boreálním pásmu Severní Ameriky, Grónska a Evropy. V Evropě na jih zasahuje do subalpínských a alpínských poloh vysokých pohoří (celé Alpy, ostrůvkovitě v Karpatech, Pyreneje, Apeniny, Sudety a pohoří severního Balkánu) (obr. 1).



Obr. 1: Evropské rozšíření *Salix herbacea*. (Jalas & Suominen 1998, upraveno)

Je to nízký (2-10 cm) opadavý keřík s plazivými v nodech kořeňujícími větvemi. Kromě nadzemních větví vytváří i podzemní nedělené šlahouny. Listy krátce řapíkaté, 0,8-2,0 cm dlouhé, v mládí pýřitě chlupaté. Čepel žláznatě pilovitá až tupě zubatá, vzácně celokrajná, eliptická až okrouhlá. Jehnědy na koncích prýtů, zpola kryté vrchními listy, elipsoidní, 0,5-0,7 cm dlouhé a 0,4-0,5 cm široké, s pouze 5-8 květy.



Semeníky a tobolka bývají červeně zbarvené. (Beerling 1998, Elven & Karlsson 2000, Chmelař & Koblížek 1990, Koblížek 2006, Skvortsov 1968)

Vrba bylinná je ve velikosti a tvaru listů velmi variabilní. Jedinci z Tater mají listy značně větší než exempláře z Alp a Babí hory v Oravských Beskydech. Na základě velikosti listů mohou být rozlišovány dvě variety a to nominální *S. herbacea* var. *herbacea* a velkolitá *S. herbacea* var. *macrophylla* Ser. s listy až 3 cm dlouhými a 3 cm širokými. Jedinci z Jeseníků patří vesměs k morfortypu se středně velkými listy (Krkavec 1971). Na těchto, ale i krkonošských lokalitách, se ovšem nalézají rovněž jedinci jak s velkými, tak i malými listy.

Kvete zároveň s rašením nebo těsně po vyrašení listů od května do července. V nejvyšších nadmořských výškách nebo na jiných pozdě odtávajících lokalitách může kvést až v srpnu. Na lokalitách sice převažuje vegetativní rozmnožování, ale pro tento druh je nutností osidlovat lokality nové. Pro vykvetení a odplození potřebuje minimálně 3 měsíce trvající vegetační dobu (Beerling 1998). V silných populacích dosahuje produkce více než 4000 semen/m<sup>2</sup> (Nyléhn *et al.* 2000).

Dlouho vytrvávající sněhová pokrývka nebo silné působení účinků větrů dovoluje vytrvávat otevřeným společenstvům konkurenčně slabých rostlin, včetně vrby bylinné, které využívají narušení zápoje konkurenčně silnějších druhů, jako jsou borůvka, brusinka, smilka. Často je udávána jako typický druh pro sněhová výležiska, ale v různých částech svého areálu má rozdílné ekologické preference (Birks 1993). Ve střední Evropě se její biotopy dají rozdělit do dvou kategorií. První skupinu tvoří slehlé droliny jemnějšího štěrku na exponovaných místech, kde bývá nepatrné množství sněhu. Do druhé skupiny spadají sněhová výležiska s nahromaděným množstvím sněhu a velmi krátkou vegetační dobou. Pro sněhová výležiska je typická pouze v subalpínském až niválním stupni Alp, kde je diagnostickým druhem pro svaz *Salicion herbaceae*. Nejčastěji zde osidluje kyselé horniny (flyše či granity), velmi vzácně i horniny zásadité (dolomity) (Rechinger 1964). V oceánských oblastech jako Skandinávie nebo Britské ostrovy dále roste na stanovištích vystavených extrémním účinkům větru, jako jsou vlhké, ale vyfoukávané, skalní spáry a droliny s minimem sněhu v zimním období (Birks 1993, Beerling 1998). Stejně biotopy vyhledává i v Tatrách, kde dokonce ze všech vrb vystupuje do nejvyšších poloh. (Chmelař 1972, Koblížek 2006)

V ČR se vyskytuje jen na několika málo lokalitách v nejvyšších polohách státu. Převážně na vlhkých vyfoukávaných skalách. Ve sněhových výležiscích roste v ČR

pouze na Studniční stěně. Její absence v této vegetaci u nás je nejspíše způsobena nevhodnými vlhkostními poměry v půdě (Hejcman et. al. 2006, Tomaselli 1991).

Výskyty druhu v ČR mají výrazně reliktní charakter. Jakožto reliktní druh je na našem území v naprosté izolovanosti od větších populací z vysokých hor (Alpy, Západní Karpaty) a arktických oblastí severní Evropy. Výjimečnost vrby bylinné v naší květeně dokládá legislativní ochrana vyhláškou MŽP ČR č. 395/1992 Sb. v kategorii kriticky ohrožené druhy (§1) a zařazení do červené knihy rostlin do kategorie kriticky ohrožené druhy (C1) (Holub *et al.* 1979, Holub & Procházka 2000).

V této práci byly studovány rostliny na všech známých recentních lokalitách vrby bylinné v ČR. Všechny v literatuře známé historické lokality a lokality recentní byly shrnuty v Revizi rozšíření vrby bylinné Vašinou & Zahradníkovou (1999). Dvě lokality se vyskytují v CHKO Jeseníky a další tři v NP Krkonoše. Z nich 1 lokalita (Velký Kotel) je vysazená, a proto nebyla do studie zařazena (rostliny mají dokumentovaný původ ze Studniční stěny). Všechny recentní (i historické) lokality se nacházejí v územích s nejpřísnějším režimem ochrany, tj. jesenické lokality se nacházejí v Národní přírodní památce Praděd, všechny krkonošské lokality pak v I. zóně národního parku. Z důvodů legislativní ochrany studovaného taxonu i lokalit byly pro studium získána patřičná povolení (viz příloha 6-7).

## **3.2. rozšíření vrby bylinné v ČR**

### **3.2.1. krkonošské lokality**

Národní park Krkonoše se nachází v severní části ČR. Spolu s Jizerskými horami tvoří geologický komplex tzv. krkonoško-jizerského krystalinika. Podložím jsou zejména svory, fylity a ortoruly. Morfologie vrcholových partií byla utvářena převážně během střídání několika ledových a meziledových dob, kdy došlo k přemodelování výše položených partií Krkonoš místními ledovci do podoby ledovcových karů. Účinky mrazu, ledu, sněhu a větru daly vzniknout unikátní kolekci mrazem třídných forem reliéfu, jako jsou polygonální půdy, skalní skupiny, kamenná moře a suťové proudy.

Krkonoše mají oceánské klima. Podnebí je charakteristické vysokou relativní vlhkostí, převládající západní větrné proudění přináší značné množství srážek. Dle Quitta (1975) Krkonoše patří do chladné oblasti CH4, což je v ČR nejchladnější oblast.

Oblast je člověkem využívána již od středověku. Ve vrcholových partiích bylo nejdříve hospodařeno od první poloviny 17. století, kdy byly vystavěny první boudy v klečovém stupni. Enklávy okolo hřebenových bud markantně snížily horní hranici lesa, z 1250 m místy až na 1000 m n. m. Ve vrcholových partiích se v největším rozmachu páslo až desetitisíce hospodářských zvířat. Horská příroda byla zvláště v 18. století navštěvována sběrateli léčivých bylin, a poté i turisty.

V Krkonoších je vrba bylinná udávána z bývalé Přírodní památky Prameny Labe z Malé kotelní jámy. Dále několik lokalit z bývalé PP Prameny Úpy na Studniční hoře a Úpské jámě. Na polské straně Krkonoš pak jedna populace u turistické trasy u skal Końskie Łby, dále několik trsů v terénní depresi na hraně Malé Sněžné jámy (Loc: 50°46'46.23"S, 15°33'22.74"V) a na jejím dně.

Malá Kotelní jáma se nachází na jižním svahu hory Kotel (Loc.: 50°45'1.98"S, 15°31'46.82"V). Populace nacházející se jihozápadně od staré štoly byla popisována již v r. 1881, ale po rozsáhlém požáru kosodřeviny v roce 1924 (1925) (Šourek 1970) se o ní mělo, že zanikla. Vrba bylinná zde byla znovu nalezena v srpnu 1982 pracovníky KRNAPu na skalkách pod hranou karu ve výšce 1370 m. Je to plošně malý porost, který vyrůstá ze štěrbin žulových bloků a lemuje kameny. Je zde značně utlačována okolní vegetací, která je tvořena druhy jako *Festuca supina* Schur, *Nardus stricta* L., *Calluna vulgaris* (L.) Hull, *Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium vitis-idaea* L. a *Avenella flexuosa* (L.) Drejer. Populace zde čítá kolem 18-ti menších trsů, od sebe značně prostorově oddělených, které jsou ve velké míře narušovány abiotickými faktory jako je sucho, laviny a prudký déšť, ale také v důsledku pohybu zvěře, především vysoké, ale i člověka. (Vašina & Zahradníková 1999).

Dva měsíce před znovuobjevením lokality v Malé Kotelní jámě byla 5. července 1982 vrba bylinná správou KRNAPu introdukována na lokalitu ve Velké Kotelní jámě. Jako sadbový materiál byly použity zakořenělé řízky z populace na Studniční stěně (Vašina & Zahradníková 1999).

Největší česká populace se nachází na Studniční stěně (Loc: 50°43'55.98"S, 15°42'45.17"V). Osidluje zde 2 hlavní ekologicky rozdílné části: (1) zvětralé svorové droliny a (2) vlhkou úžlabinu s vyvěrajícím pramenem. Populace se nachází v přibližné nadmořské výšce 1450 m. Mělký půdní horizont, svažité terén, poloha těsně pod hranou karu s velkou akumulací sněhu, pády zemních lavin spolu s působením abiotických faktorů způsobují nesouvislý vegetační kryt, který umožňuje existenci plošně velké populace vrby bylinné, která zde ovšem netvoří příliš kompaktní polštáře. Je to dáno

i mozaikou skalek a nezpevněných částí svahu. Spolu s vrbou bylinnou se zde vyskytuje *Primula minima* L., *Calluna vulgaris* (L.) Hull, *Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium vitis-idaea* L., *Vaccinium uliginosum* L., *Avenella flexuosa* (L.) Drejer, *Deschampsia cespitosaa* (L.) P.Beauv. a *Huperzia selago* (L.) C. F. P. Mart.

Šourek (1970) v Květeně Krkonoš udává ještě další dvě lokality, na kterých ovšem už ani v té době nebyla vrba bylinná nalézána. První lokalitou je východní svah Studniční hory a lokalitou druhou Sněhový žleb v Úpské jámě.

### 3.2.2. jesenické lokality

Obě studované jesenické populace se nachází v NPR Praděd v CHKO Jeseníky nalézající se v severovýchodní části ČR. Jsou tvořeny převážně silikáty. Celá oblast prošla dlouhým geomorfologickým vývojem, o čemž svědčí zaoblené hřbety se širokými sedly. Nejvíce byla morfologie utvářena během střídání glaciálů a interglaciálů. V poslední době ledové se pevninský ledovec zastavil v severní části Jeseníků. Vlivem chladného klimatu se v závětrných polohách vytváří místní zalednění modelující pro Evropské středohory typické kotliny, dále dodnes přetrvávající periglaciální jevy, jako jsou polygonální půdy, skalní skupiny, kamenná moře a suťové proudy.

Jeseníky se nachází na rozhraní dvou klimatických oblastí. Západní hranice kontinentálního klimatu a doznívající vlivy oceánského klimatu. Podnebí je charakteristické vysokou relativní vlhkostí, převládající západní větrné proudění přináší značné množství srážek. Dle Quitta (1975) Jeseníky patří do chladné oblasti CH4, což je v ČR nejchladnější oblast.

Hřeben Jeseníků byly v minulosti silně ovlivňovány činností člověka. Od 17. století se zde rozmáhá pastva a v roce 1863 na místech vojenské zotavovny byla postaveny ovčárna. Ještě v polovině 19. století se na území Petrových kamenů až po Velkou kotlinu páslo 200-300 ovcí, které zde byly od června do října. Koncem 19. století se od pastvy začalo ustupovat a bylo zakázáno i travení, ale občas se zde dobytek pásal i po válce, jak je patrné např. z dobových pohlednic (Kavalec 1982). V období 1887-1907 probíhalo zalesňování všech horských revírů Hubertov a Malá Morávka, až na 2 ostrovy okolo Pradědu a Vysoké hole, každý o přibližné výměře 45 ha. V této době byla vysázena kleč a limba. Limba se zde neujala, ale kleč zde vytrvává do současnosti a z většiny míst je odstraňována.

Hranice lesa se nachází kolem 1350 m n. m. a na mnohých místech je snížena (např. pády lavin ve Velkém kotli). Celá oblast patří do oreofytika. Bezlesé hole na hřebenu Pradědu patří do vegetačních tříd *Juncetea trifidi*, *Mulgedioo-Aconitaea*.

V Jeseníkách je vrba bylinná udávána z Velké kotliny a Petrových a Tabulových kamenů. Petrovy kameny (1438 m n. m., 50° 4'6.80"S, 17°14'1.83"V) jsou tvořeny rulou a chloritickými břidlicemi. Ční až 7 m nad okolní terén. Vznikaly modelováním třetihorního reliéfu kryogenními pochody, které je vymodelovaly do třech mohutných skalisek s mnoha plošinami a spárami. Dále se jako přímý svědek působení mrazu v okolí nalézají polygonální půdy, které jsou zároveň důkazem kontinuálního bezlesí od doby ledové (Šafář 2003).

Roste jen na severovýchodní části skalního útvaru. Jednak ve vlhkých spárách porostlých mechy a játrovkami na skalní lavici, a pak také na strmé stěně pod touto plošinou. Populace čítá kolem 12-ti hustých trsů, které jsou od sebe často odděleny holou skálou.

Rostlinná společenstva na vrcholovém plató kolem Petrových kamenů jsou tvořena alpínskou keříčkovou vegetací svazu *Loiseleurion procumbentis-vaccinion*, vyfoukávaných alpínských trávníků *Juncion trifidi* a zapojených alpínských trávníků *Nardo strictae-caricion bigelowii*. Z rostlin dominuje *Festuca supina* Schur, *Nardus stricta* L., *Calluna vulgaris* (L.) Hull, *Vaccinium myrtilus* L., *Vaccinium vitis-idaea* L. a *Carex bigelowii* Torr. ex Schwein., *Deschampsia cespitosaa* (L.) P.Beauv., *Avenella flexuosa* (L.) Drejer. a *Salix silesiaca*. Willd. Samotné skály Petrových kamenů jsou charakteristické výskytem vzácných druhů rostlin jako *Cardamine resedifolia* L., *Anemone narcissiflora* L., *Campanula gelida* Kovanda, *Poa ripharea* (Asch. et Graebn.) Fritsch. Pro tyto rostliny jsou vlhké vyfoukávané skály Petrových kamenů refugiem před konkurenčně silnějšími rostlinami, které rostou na vrcholovém plató. Ve spárách spolu s vrbou bylinnou roste *Festuca supina* Schur, *Anemone narcissiflora* L. a mechorosty *Racomitrium fasciculare* (Hedw.) Brid., *Polytrichastrum alpinum* (Hedw.) G.L. Sm., *Anastrepta orcadensis* (Hook.) Schiffn.

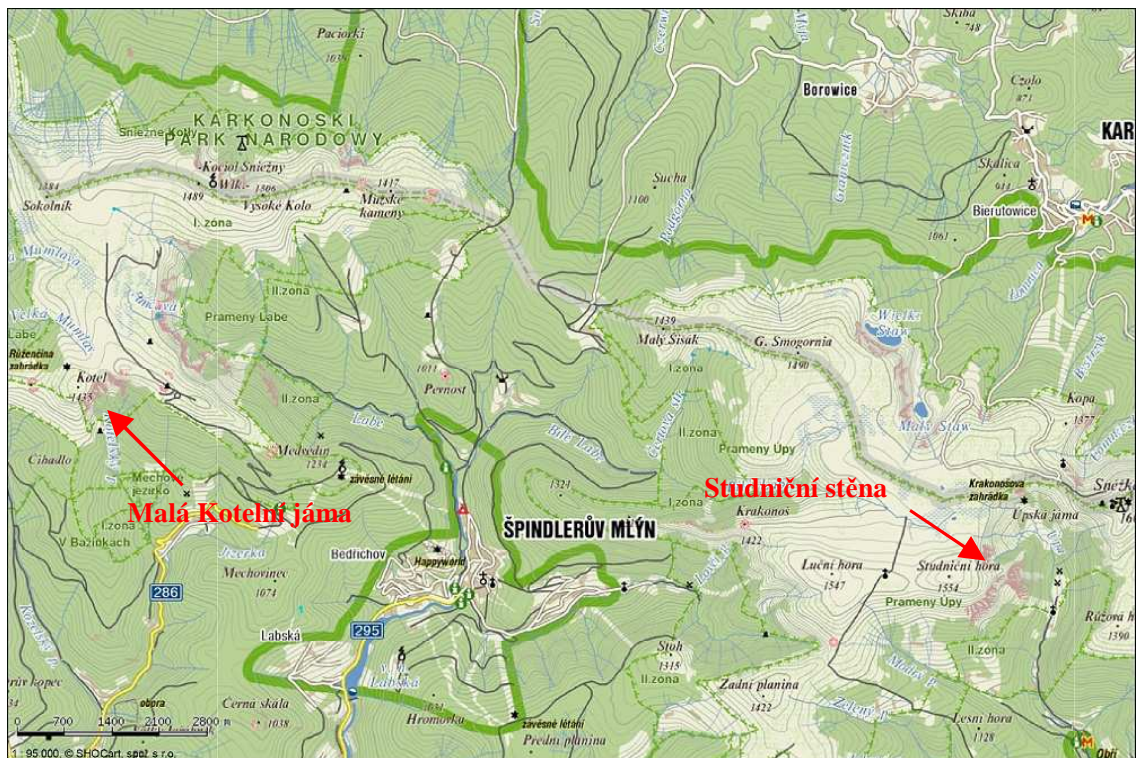
Dlouhou dobu zde místní rostliny trpěly sešlapem turistů navštěvujících Petrovy kameny za účelem odpočinku a výhledu z turistické stezky vedoucí těsně okolo skalisek. Ta byla v roce 1983 odkloněna a v současnosti je lokalita navštěvována jen zřídka. Ještě v roce 1972 byla vrba bylinná udávána J. Chmelařem z Velké kotliny (Loc: 50° 3'25.48"S, 17°14'17.73"V). Stanoviště bylo podobné lokalitě na Studniční hoře. Dnes je zde neznámá.

Velká populace se nachází severně pod vrcholem Praděd na Tabulových skalách. (1450 m n. m., 50° 5'10.83"S, 17°13'50.55"V). Skály jsou tvořeny fylonitizovanými a chloritizovanými rulami a břidlicemi. Stejně jako Petrovy kameny i Tabulové skály byly tvarovány v periglaciálním prostředí pleistocénu a z těchto dob se zde zachovaly četné kryoplanační terasy a thufury (Šafář 2003).

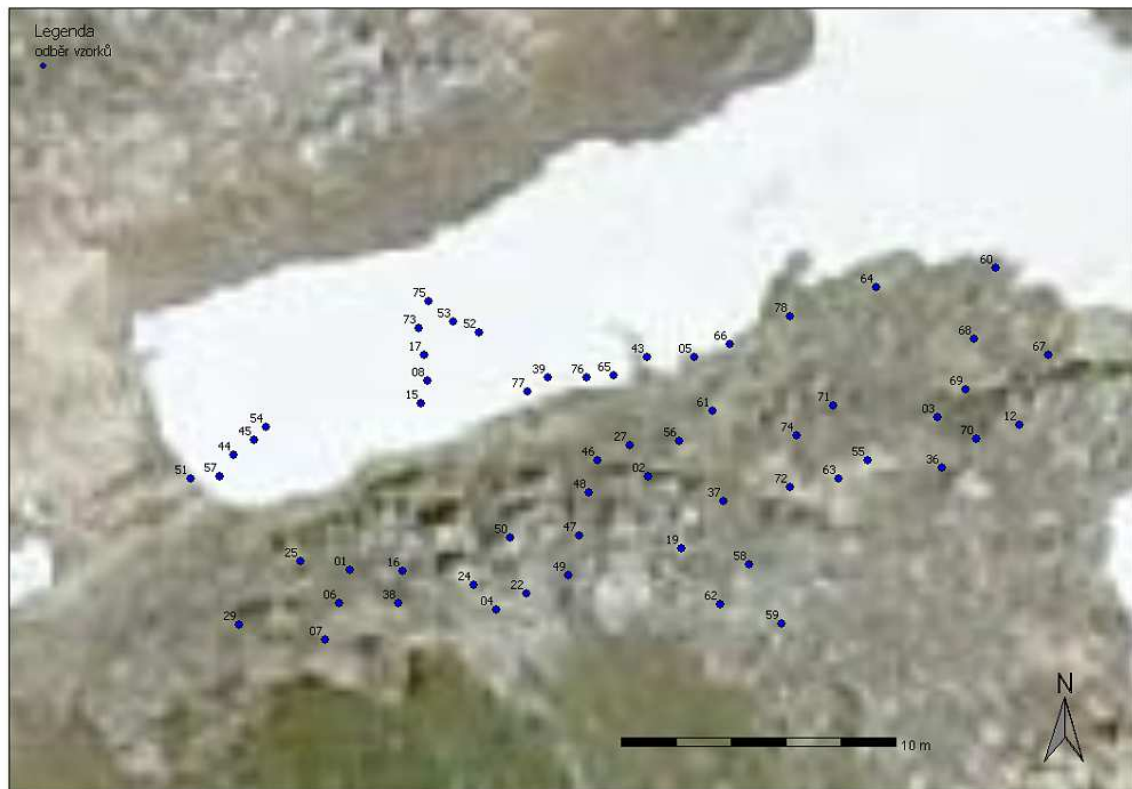
Vrba bylinná zde vytváří husté, často značně velké trsy na lemech skalních bloků, řídkěji i v hustší vegetaci plošiny skal. Její populace se dá rozdělit na dvě části: (1) spáry obnažených skal a okraje skalního útvaru v jižní části. Vrba zde roste podél vyfoukaných plochých skal a zasahuje daleko od okrajů skalisek a její trsy tvoří mozaiku s porosty mechů, trav a brusnic. (2) Na skalkách na okrajích bývalého lomu. Okraj lomu těsně lemuje a příliš nezasahuje do porostu travin a brusnic na vrcholu.

Vegetace je tvořena hlavně druhy jako *Festuca supina* Schur, *Empetrum hermaphroditum* Hagerup, *Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium vitis-idaea* L., *Huperzia selago* (L.) C. F. P. Mart. a dále mechorosty *Racomitrium fasciculare* (Hedw.) Brid., *Cynodontium polycarpon* (Hedw.) Schimp., *Dicranum flexicaule* Brid., *Ditrichum lineare* (Sw.) Lindb., *Oligotrichum hercynicum* (Hedw.) Lam. & DC., *Polytrichum piliferum* Hedw., *Polytrichastrum alpinum* (Hedw.) G.L. Sm., *Polytrichum strictum* [Menzies ex] Brid., *Nardia scalaris* Gray, *Grimmia funalis* (Schwägr.) Bruch & Schimp., *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb., *Ptilidium ciliare* (L.) Hampe. Na obnažených vlhkých místech se objevuje lišejník *Lichenomphalia hudsoniana* (H.S. Jenn.) Redhead, Lutzoni, Moncalvo & Vilgalys. Ve vlhkých spárách skal se vyskytuje *Cardamine resedifolia* L.

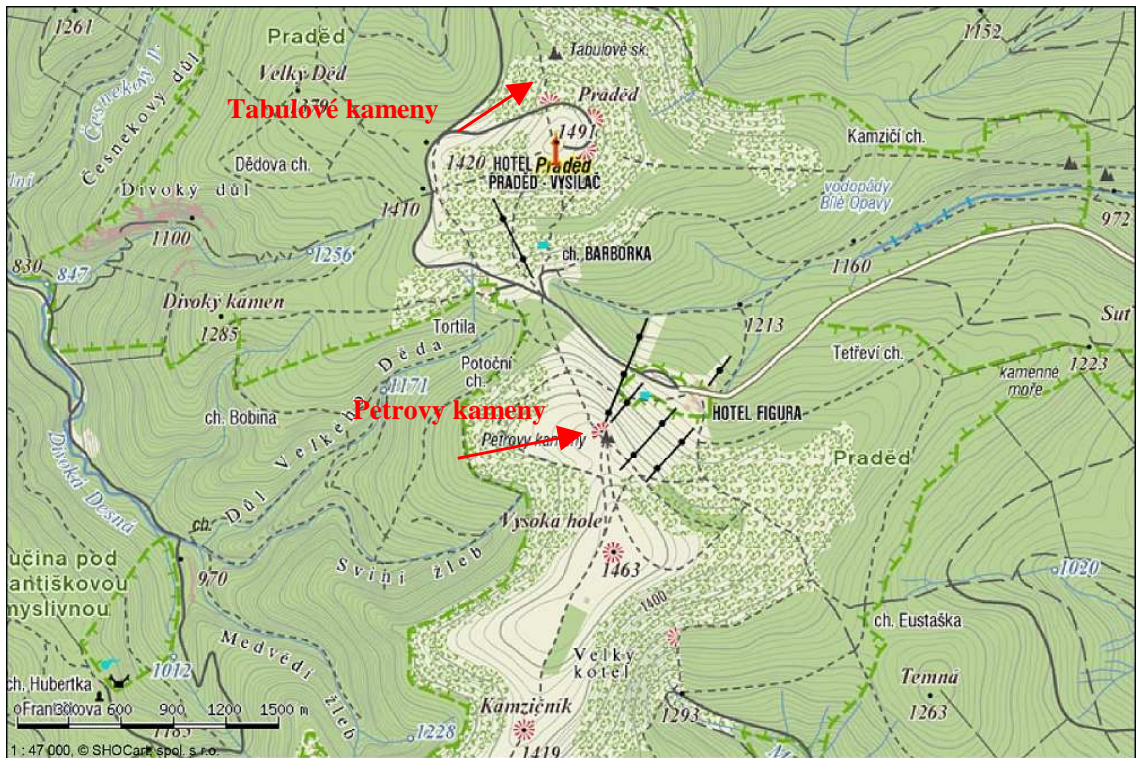
Tabulové skály nejsou veřejnosti přístupné, a tak je zde vrba bylinná narušována pouze abiotickými faktory prostředí. Ty působí na její vytlačování k okrajům, kde se části trsů odlamují a odpadávají na úpatí skal, kde nenajdou vhodné místo pro uchycení a další vývoj a zanikají. Jde nejspíše již o fragment původní populace. Z Tabulových skal byl získáván kámen na stavbu věže, která stávala na vrcholu Pradědu, a tak je pravděpodobné, že zde vrba bylinná bývala zastoupena daleko hojněji (Chmelař 1972).



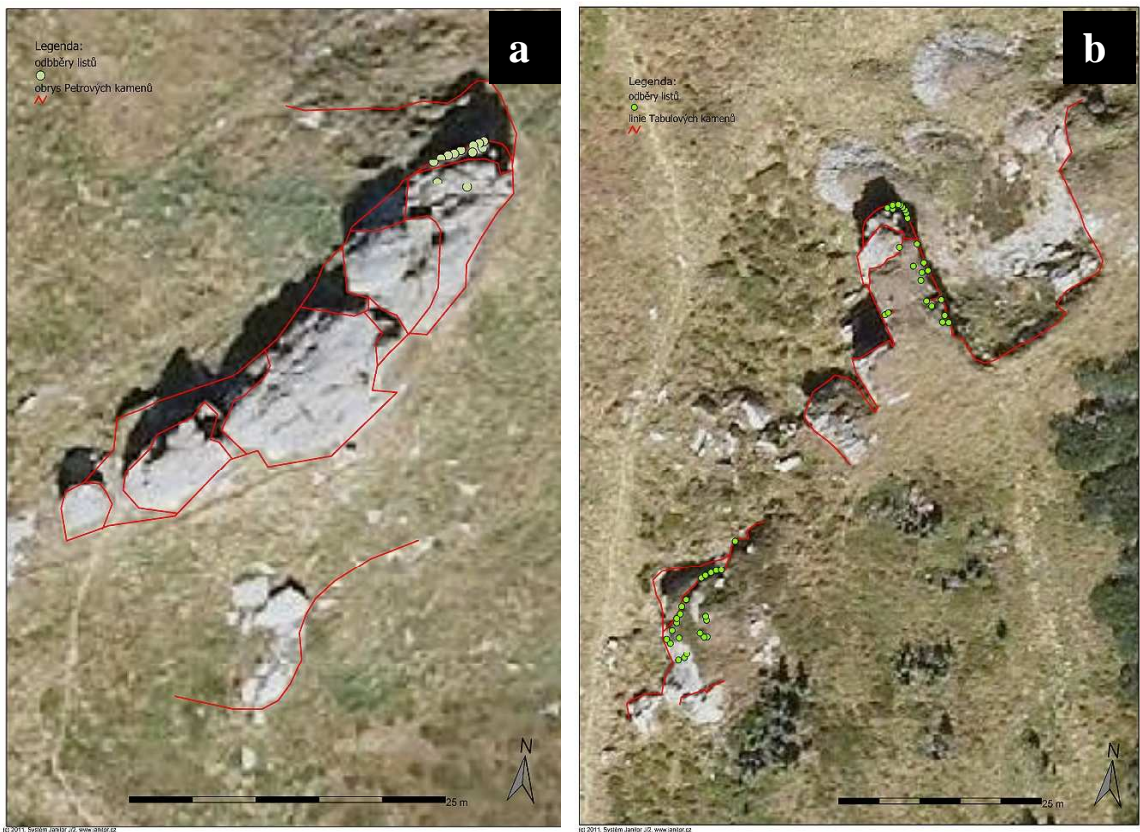
Obr. 2: Mapa lokalit studovaných populací vrby bylinné v Krkonoších. Zdroj mapového podkladu [www.mapy.cz](http://www.mapy.cz)



Obr. 3: Mapa odběru vzorků vrby bylinné na lokalitě Studniční stěna.



**Obr. 4:** Mapa lokalit studovaných populací vrby bylinné v Jeseníkách. Zdroj mapového podkladu [www.mapy.cz](http://www.mapy.cz)



**Obr. 5:** Mapy odběru vzorků vrby bylinné v Hrubém Jeseníku. a) lokalita Petrovy kameny; b) lokalita Tabulové kameny



### 3.3. zpracování rostlinného materiálu

Pro izolaci genomické DNA byly ze všech populací sebrány vzorky zdravých a zelených listů (5-10 listů na jedince). Každý sběr byl uložen do samostatného papírového sáčku, označen popiskem s kódem jedince a populace. Dále byla zakreslena poloha do náčrtku lokality popřípadě ortofotomapy. Takto sebrané vzorky byly uchovávány v boxu se silikagelem a tímto způsobem vysušeny.

V Krkonoších (obr. 2-3) byly populace prosbírány na konci srpna s pomocí Ing. J. Zahradníkové ze správy KRNAP. Z populace v Malé Kotelní jámě byly odebrány vzorky ze všech nalezených trsů. Ze Studniční stěny bylo z důvodu nepřehlednosti a rozsáhlosti lokality přistoupeno k odběru vzorků v transektech směřujících po svahu dolů. Dva probíhaly po části vyfoukávaných skalek, jeden po vlhké úžlabině. Vzdálenost mezi jednotlivými odběry nebyla větší než 2 metry. Dále byly odebrány vzorky z polských lokalit v kultivaci v genofondové zahradě Krkonošského národního parku.

V Jeseníkách byly populace prosbírány na začátku července (obr. 4-5). Na lokalitě Petrovy kameny byly odebrány vzorky ze všech zjištěných samostatných trsů. Stejně tak i na lokalitě Tabulové skály, kde bylo u větších trsů přistoupeno k odebrání více vzorků z jednoho trsu.

Z vysušených listů byla izolována genomická DNA za pomoci modifikovaného CTAB protokolu extrakce DNA podle Doyle & Doyle (1987), který byl již používán v molekulární laboratoři katedry botaniky UP pro izolaci jiných druhů vrb (Brandová 2010, Sochor 2011, Sochor *et al.* in prep.). Postup byl následující: přibližně 40 mg vysušených listů zbavených střední žilky bylo homogenizováno pomocí homogenizátoru (Retsch Mixer Mill MM 301) v 2ml Eppendorf zkumavkách (krkonošské populace) nebo pomocí tekutého dusíku (jesenické populace), následně extrahováno v 700 ml CTAB pufru (2% CTAB pH 8,0; 0,1 M Tris HCl pH=9,5; 0,02 M EDTA pH=8,0; 1,4 M NaCl; 1% PEG) s 2  $\mu$ l merkptoethanolu na třepačce při 65 °C po dobu alespoň 60 min. Dále bylo přidáno 700  $\mu$ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu (24:1), řádně protřepáno a centrifugováno (15 min., 13 000 rpm, 10 °C). Horní vodná fáze (500  $\mu$ l) byla šetrně odebrána a přidána do stejného objemu směsi chloroformu s isoamylalkoholem (24:1). Tato směs byla protřepána a centrifugována (15 min., 13 000 rpm, 10 °C). Horní fáze (400  $\mu$ l) byla následně přenesena do stejného objemu vychlazeného (-20 °C) isopropanolu a směs dále

ponechána při +4 °C alespoň 30 min. k precipitaci nukleových kyselin. Po centrifugaci (15 min, 13 000 rpm., 4 °C) byl získaný pelet osušen a rozpuštěn v 200 µl 10× TE (Tris-EDTA) pufru. Po přidání 2,0 µl RNasy (10 µg/ml) byl roztok inkubován 30 min. při 37 °C na termobloku. Pro další precipitaci bylo přidáno 20 µl acetátu sodného (3 M NaAc) a dvojnásobek objemu ethanolu (96 %, 440 µl, -20 °C) a ponecháno alespoň 30 min. při +4 °C. Po centrifugaci (13 000 rpm., 15 min., 4 °C) byl pelet promyt 80% EtOH a následně 70% EtOH. Po každém promytí byly vzorky centrifugovány (13 000 rpm., 10 min., 10 °C). Promytý pelet byl nakonec buď vakuově vysušen (Savant SpeedVac concentrator) (jesenické populace) nebo vysušen na termobloku (krkonošské populace) a rozpuštěn v 50-100 µl 1× TE pufru (10 mM Tris HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0).

Ke stanovení obsahu DNA ve vzorcích byl použit spektrofotometr Nanodrop 1000 od firmy ThermoScientific. Ke stanovení kvality vzorků byl použit 1,5% agarózový gel. Pro pozdější analýzy byl ze všech vzorků ze získaných hodnot naředěn pracovní roztok o koncentraci 5 µg/µl v 1× TE pufru. Pracovní i zásobní roztoky byly dále uchovávány při -20 °C či -80 °C.

### 3.4. Mikrosatelity

Byly použity mikrosatelity publikované dříve pro jiné druhy vrb (Stamati *et al.* 2003) i pro vrbu bylinnou (Barker *et al.* 2003) (tab. 1). Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla prováděna v přístroji Peltier Thermal Cycler PTC 200 od firmy MJ Research.

**Tab. 1: Přehled testovaných mikrosatelitů.** Primer rbs19 publikován v práci Stamati *et al.* (2003), ostatní v práci Barker *et al.* (2003).

pracovní název	originální název	primerová sekvence (5'-3') (F/R)	opakovaný motiv	velikost produktu (bp)
rbs19	gSIMCT024	TCATTTGCTCGATGAGGTTG GTGGTAGTTGCAAAAGGGGA	(CT) <sub>10</sub>	300
sx08	SB24	ACTTCAATCTCTCTGTATTCT CTATTTATGGGTTGGTCGATC	[TG] <sub>21</sub> AG[TG] <sub>3</sub> AG[TG] <sub>3</sub> AG[TG] <sub>3</sub> AGTGAG[TG] <sub>3</sub>	167
sx10	SB80	TAATGGAGTTCACAGTCCTCC ATACAGAGCCCATTTTCATCAC	[TC] <sub>21</sub>	140
sx14	SB100	ATGTCATTCAGGTTTGTTTTC ATGGTTTAACTTGTTACTGTA	[CCG] <sub>5</sub>	104
sx19	SB199	CTATTTGGTCTCAATCACCTT CTTTACCTCAGAAAATCCAGA	[TG] <sub>11</sub> CG[TG] <sub>6</sub>	122
sx20	SB201	CCTCTTTTTCTATTGTGGTCT GGCATGTATTTTTACTCCAAC	[CT] <sub>4</sub> CC[CT] <sub>3</sub> [CA] <sub>22</sub>	212
sx23	SB233	AAATTACCGTCCAATAAAGA CATTAGCCATGAACAAGTAAA	[TA] <sub>2</sub> [TGTGCG] <sub>4</sub> [TG] <sub>9</sub>	215

Pro správný průběh reakce bylo nejprve nutné zjistit nejvhodnější teplotu pro nasednutí primerů (tzv. „annealing temperature“). Tyto PCR podmínky byly optimalizovány pro každý mikrosatelit zvlášť. Pro amplifikaci cílových sekvencí byla použita GoTaq polymeráza. PCR mix byl míchán podle doporučení výrobce (tab. 2) Pro zjištění nasedací teploty primerů byl použit teplotní gradient 50-60 °C (s jednotlivými kroky teplot 50,0 °C; 50,3 °C; 50,9 °C; 51,9 °C; 51,7 °C; 52,8 °C; 54,3 °C; 56,0 °C; 57,4 °C; 58,5 °C; 59,3 °C; 59,8 °C a 60,0 °C), po zjištění této teploty byl upraven i počet cyklů PCR reakce.

**Tab. 2: Složení PCR mixu v množství pro jeden vzorek.**

	Množství pro jeden vzorek (μl)
destilovaná voda	5,75
10x GoTaq Buffer	2
dNTPs (10 mM)	0,2
Forward primer (20 μM)	0,5
Reverse primer (20 μM)	0,5
GoTaq DNA Polymerase	0,05
DNA (5 μg/μl)	1

PCR podmínky byly upraveny podle protokolu výrobce: 2 min. počáteční denaturace při 95 °C; následuje cyklická část: denaturace 95°C po dobu 30 sec, nasedání primerů („annealing“) s upravenou teplotou po dobu 30 sec a syntéza DNA („elongation“) při 72 °C po dobu 30 sec; konec celé PCR je uzavřen závěrečným prodlužováním při 72°C po dobu 5 min. a schlazení na 4 °C.

Úspěšnost průběhu PCR reakce byla zjišťována pomocí analýzy produktů na 1,5% agarózovém gelu (0,6 g agarózy v 40 ml 0,5x TBE) při 100 V po dobu 30 min. Následná vizualizace tohoto gelu probíhala pod UV světlem v soupravě Herlab UV1-OM s fotoaparátem Kodac Adas 290.

Konečná analýza PCR produktu byla provedena na vertikální elektroforéze na 0,4 mm silném 6% polyakrylamidovém gelu (70 ml 6% akrylamidový gel, 467 μl peroxidisíranu amonného, 46,7 μl N, N, N', N'-tetramethylethylendiamin) vizualizovaného stříbrem. Zajištění přilnutí gelu na sklo bylo zajištěné ošetřením skla pomocí silanu.

Před samotným nanesením PCR produktu na gel byl smíchán s denaturačním pufrem (formamid a loading dye 9:1) a denaturován 5 min. při 96 °C. Čas

elektroforetické separace (při 2000 V, 120 mA) závisel na délce amplifikované sekvence a pohyboval se v rozmezí 80-180 min. Gel byl po skončení separace promyt alespoň 20 min. v 10% kyseliny octové, 5 min. v 1% kyselině dusičné, obarven 30-40 min. v 0,1% roztoku dusičnanu stříbrného s 0,15% formaldehydem. Stříbro bylo redukováno v 3% roztoku uhličitanu sodného s 0,15% formaldehydem a 2 ppm thiosíranu sodného. Po vysušení byl gel v protisvětle vyhodnocen.

### 3.5. analýza dat

Pro zjištění GPS souřadnic z map v projekci WGS 84 bylo použito programu google earth (<http://www.google.com/intl/cs/earth/index.html>). Zjištěné souřadnice byly použity pro tvorbu map v softwaru JANITOR v aplikaci JanMap ([http://janitor.cenia.cz/www/j2\\_intro.php?lang=cze&idmn=31](http://janitor.cenia.cz/www/j2_intro.php?lang=cze&idmn=31)).

Tabulka genetického složení byla zpracována v programu Microsoft Excel. Při přítomnosti jednoho odlišitelného fragmentu, byla u rostliny považována homozygotní konstituce alel. Fragmenty byly oskórovány od nejtěžšího, který byl označen písmenem A, sestupně po nejlehčí. Délka alel byla zjištěna pomocí AFLP Leaderu. Po zjištění genetického složení byla dále spočítána proporce rozlišitelných genotypů (*PD – proportion of distinguishable genotypes*) jako podíl počtu zjištěných genet a počtu studovaných ramet v každé populaci (Reisch *et al.* 2007)

Konstrukce nezakořeněného dendrogramu byla provedena v programu FREETREE (Pavlíček *et al.* 1999) pomocí binární matice dat (přítomnost alely = 1, nepřítomnost alely = 0) a bootstrapem s 1000 replikacemi dle doporučení autorů programu. Vizualizace dendrogramu byla provedena v programu TREEVIEW (Page 1996).

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. herbářové sbírky

Byly zrevidovány herbářové položky ze sbírek 4 institucí (tab. 3). Naprostá většina herbářových položek bylo původem mimo Českou republiku (Slovensko, Alpy, Finsko aj.). Většina sběrů původem z ČR pocházela z lokalit v Hrubém Jeseníku: 16 položek z lokality Petrovy kameny, 5 položek z lokality Tabulové kameny, 3 položky z lokality označené jako Praděd a 1 položka z Velké kotliny. Herbářové položky z Petrových kamenů byly nejen často zastoupeny, ale také velmi často byly tyto položky zcela zaplněny jednotlivými rostlinkami, mnohdy celými trsy tohoto druhu. Krkonošské sběry byly nalezeny pouze 3: 1 položka nedostatečně lokalizovaná a 2 položky z okolí Studniční hory. Z území ČR nebyla nalezena žádná chybně určená položka.

**Tab. 3: Přehled herbářových dokladů *Salix herbacea* z území ČR.** BRNL - Ústav lesnické botaniky, dendrologie a typologie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně; BRNM - Moravské zemské muzeum; - LIT - Okresní vlastivědné muzeum, Litoměřice; ROZ - Středočeské muzeum, Roztoky u Prahy.

Herbárium	Lokalita	Sběratel	Rok
BRNL	Krkonoše	A. Bayer	1922
BRNM	Petrovy kameny	scholl?	1905
BRNM	Petrovy kameny	F. Šouka	1905
BRNM	Petrovy kameny	H. Laus	1907
BRNM	Petrovy kameny	scholl?	1909
BRNM	Petrovy kameny	H. Laus	1910
BRNM	Petrovy kameny	V. Skřivánek	1912
BRNM	Petrovy kameny	J. Šmarda	1920
BRNM	Petrovy kameny	scholl?	1925
BRNM	Petrovy kameny	V. Pospíšil	1946
BRNL	Petrovy kameny	A. Vězda	1946
ROZ	Petrovy kameny	Č. Novotný	1947
LIT	Petrovy kameny	Emil Šťastný	1947
BRNL	Petrovy kameny	R. Kurka	1947
BRNM	Petrovy kameny	V. Skřivánek	1955
BRNM	Petrovy kameny	V. Bednář	1957
BRNM	Petrovy kameny	J. Chmelař	1967
BRNL	Petrovy kameny	J. Chmelař	1967
BRNM	Praděd	R. Dvořák	1911

Herbárium	Lokalita	Sběratel	Rok
BRNL	Praděd, skály na vrcholu	D. Dryer	1906
BRNL	Praděd, skály, 1490 m	J. Chmelař	1960
BRNL	Studniční hora, nad Velkou Studniční jámou	R. Kurka	1950
BRNM	Tabulové kameny	J. Šmarda	1946
BRNM	Tabulové kameny	J. Dvořák	1946
BRNL	Tabulové kameny	J. Chmelař	1960
BRNM	Tabulové kameny	J. Chmelař	1970
BRNL	Tabulové kameny	J. Chmelař	1970
BRNL	Úpský hřeben, svah Studniční hory	J. Chmelař	1971
BRNM	Velký kotel	J. Chmelař	1971
BRNL	Velký kotel	J. Chmelař	1971

## 4.2. stav populací

### 4.2.1. Krkonoše

Na lokalitě Malá Kotelní jáma bylo nalezeno 12 menších trsů vrby bylinné. Tyto trsy jsou plošně velmi malé. Druh zde roste na velmi nepříznivém stanovišti, a to jak klimaticky, tak i z hlediska konkurence s ostatními druhy rostlin. Ze všech nalezených trsů byly odebrány vzorky listů. Při terénním studiu nebyly nalezeny všechny dříve známé trsy (Zahradníková, osobní komunikace).

Lokalita Studniční stěna je co do plochy výskytu vrby bylinné největší lokalitou ve Vysokých Sudetech (Vašina & Zahradníková 1999). Trsy zde jsou zdravé a nacházejí množství vhodných mikrostanovišť, které jim zajišťují vhodné vlhkostní podmínky i ve vrcholném létě.

### 4.2.2. Hrubý Jeseník

Na lokalitě Petrovy kameny nachází vrba bylinná vlhkostně vhodná a nezapojená místa ve spárách skal. Téměř vždy se jedná o spáry, které nedovolují rozrůstání keřů do plochy případně do jiné spáry. Bylo zde napočítáno 10-12 trsů a ze všech byl sebrán rostlinný materiál. Na této lokalitě jsem pozoroval tvorbu tobolek i semen. Tvorba tobolek byla pozorována jak v roce 2010, tak v roce 2011. Vždy se jednalo o stejný trs (ID 17).

Druhá naše největší populace se nachází na Tabulových kamenech. Vrba bylinná je zde konkurenčně schopnějšími druhy rostlin vytlačována na okraje skalních říms. Vrba zde vytváří velké trsy mající někdy plochu i více jak 1m<sup>2</sup>. Všechny nalezené trsy byly zakresleny do mapy a byl zhodnocen jejich stav (tab. 4). Rostliny zde jsou vitální.

V severní části lokality jsou často napadány houbovým patogenem. I na této lokalitě jsem v roce 2010 a 2011 pozoroval vytváření tobolek a semen a také na tomtéž trsu (ID 12).

**Tab. 4: Poloha a stav všech dohledaných trsů na Jesenických lokalitách. 0-16 – Lokalita Tabulové skály; 17-26 – Lokalita Petrovy kameny**

ID	zeměpisná šířka	zeměpisná délka	stav
0	50° 5'10.34"S	17° 13'49.39"V	Hustý trs na okraji římsy
1	50° 5'11.41"S	17° 13'51.05"V	Velký hustý trs na okraji římsy. Z části prorůstá do okolního travního porostu.
2	50° 5'11.45"S	17° 13'50.96"V	Řídký velký trs prorůstající travním drnem a borůvkám.
3	50° 5'11.59"S	17° 13'50.79"V	Velký řídký trs prorůstající travním drnem.
4	50° 5'11.61"S	17° 13'50.84"V	Menší hustý trs na okraji skal.
5	50° 5'11.64"S	17° 13'50.82"V	Menší hustý trs na okraji skal.
6	50° 5'11.79"S	17° 13'50.71"V	Menší hustý trs na okraji skal.
7	50° 5'11.73"S	17° 13'50.61"V	Malý trsík ve vyfoukané spáře
8	50° 5'11.84"S	17° 13'50.60"V	Několik malých trsů vyrůstající ze spár skály a skalní plošiny.
9	50° 5'11.88"S	17° 13'50.53"V	Velký trs na plošině. Suššími místy rozdělen na tři menší.
10	50° 5'11.49"S	17° 13'50.60"V	V dlouhé spáře skalní plošiny.
11	50° 5'10.05"S	17° 13'49.54"V	Dva oddělené menší trsy ve spáře skály.
12	50° 5'10.14"S	17° 13'49.50"V	Velký rozvolněný trs v mechu a hraně skal.
13	50° 5'10.26"S	17° 13'49.55"V	Rozvolněný trs v borůvkách, vřesu a mechu.
14	50° 5'10.19"S	17° 13'49.69"V	Trs prorůstající mechem.
15	50° 5'10.37"S	17° 13'49.65"V	Velký trs tvoření více malými trsíky prorůstajícími mechem a přes hranu skal.
16	50° 5'10.49"S	17° 13'49.79"V	Hustý trs na okraji římsy
17	50° 4'7.20"S	17° 14'2.13"V	Dva menší trsy vyrůstající ze spáry skalní plošiny.
18	50° 4'7.25"S	17° 14'2.11"V	Řídký velký trs prorůstající travním drnem nad skalní římsou.
19-23	50° 4'7.23"S	17° 14'2.01"V	Malé trsíky ve spárách skal na kolmé skále.
24-26	50° 4'7.27"S	17° 14'2.06"V	Malé trsíky ve spárách skal na kolmé skále.

### 4.3. genotypová variabilita populací

Celkem bylo izolováno 142 vzorků z populací z ČR, Polska, Slovenska a Bulharska. 44 vzorků z Tabulových kamenů, 12 vzorků z Petrových kamenů, 59 vzorků ze Studniční stěny, 9 vzorků z Malé kotelní jámy. Dále 10 vzorků z Polska, 5 vzorků ze Slovenska (Tatry) a 3 vzorky z Bulharska. Po izolaci genomické DNA byly 4 vzorky (z Tabulových skal) pro nevyhovující parametry pro další analýzy vyřazeny.

#### 4.3.1. testování a charakterizování mikrosatelitů

Pro studium genetické diverzity bylo testováno 7 mikrosatelitů (tab. 5), z nichž 3 (tj. rbs19, sx08 a sx 19) se podařilo charakterizovat tak, aby mohly být použity pro studium genotypové variability populací (tab. 6). Naopak, testování zbylých 4 mikrosatelitů (sx10, sx14, sx20, sx23) nenalezlo vhodné PCR podmínky (annealingová teplota a počet cyklů) při kterých by vycházely hodnotitelné výsledky. Zjištěnou genetickou diverzitu shrnuje tabulka 7. Některé vzorky byly z konečného shrnutí vyřazeny. Vyřazeny byly vzorky: 1) u kterých se nepodařilo získat DNA v požadované kvalitě; 2) nepodařilo se získat PCR produkt z jednoho nebo více mikrosatelitů. Celkem bylo vyřazeno 26 vzorků.

Pro mikrosatelit rbs19 bylo zjištěno 5 alel (A, B, C, D, E). V populaci na Tabulových kamenech byly nalezeny alely C a E, na Studniční stěně pak alely B, C, E. Na Petrových kamenech pouze alela C. U rostlin z Malé Kotelní jámy byly nalezeny pouze dvě alely, A a D. Bylo nalezeno 6 různých genotypů (AD, BC, BE, CC, CE, EE). Populace z Hrubého Jeseníku a Krkonoš mají pouze 1 společnou alelu (E). Na zahraničních lokalitách byly také nalezeny pouze alely B, C a E. Pro tento mikrosatelit byl v našich populacích zjištěn vysoký podíl heterozygotů (82,5 %).

Pro mikrosatelit sx08 bylo zjištěno celkem 11 různých alel (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K), ale z našich populací pouze alel 7 (A, B, D, E, G, I, J). V populaci z Tabulových skal se nachází alely A, B, E. Na Petrových kamenech byly nalezeny alely E a G, přitom alela G je zde privátní. V Malé Kotelní jámě byly nalezeny alely A a D. Na Studniční stěně D, E, I, J. Alely I a J pouze zde. Populace z Hrubého Jeseníku a Krkonoš mají pouze 2 společné alely, alela A a D. Bylo nalezeno 10 různých genotypů (AE, AD, BE, DE, DI, EI, EG, II, JD, JJ). I pro tento mikrosatelit zde byl zjištěn vysoký podíl heterozygotů (71 %). Na zahraničních lokalitách byly zjištěny ještě další alely. V polských populacích alely B a H, ve slovenských pak F a K.



Pro mikrosatelit sx19 bylo nalezeno 5 odlišných alel. Na Tabulových kamenech alela B a C, na Petrových kamenech pouze alela C, na Studniční stěně alely A, D a E a na lokalitě Malá Kotelní jáma pouze alela E. Tento mikrosatelit byl v populacích převážně v homozygotní konstituci (78,8 %). Bylo nalezeno 7 různých genotypů (AA, AC, AD, BB, CC, CC, EE).

Kombinace genotypů všech tří mikrosatelitů ukázala, že ve studovaných populacích je 13 různých genotypů. Žádný z genotypů nebyl přítomen na více lokalitách. Na severní části Tabulových kamenů se nacházejí 2 genotypy ( $PD = 0,1$ ). Jeden ze zjištěných genotypů byl zde nalezen pouze v 1 exempláři. V jižní části Tabulových kamenů byly nalezeny také 2, ale od severní části odlišné, genotypy ( $PD = 0,22$ ). Všechny keříky na Petrových kamenech patří ke stejnému genotypu ( $PD=0,2$ ). Malá Kotelní jáma hostí 1 unikátní genotyp ( $PD = 0,2$ ). Genotypově nejvariabilnější byla potvrzena Studniční stěna, která je i početně a ekologicky nejvýznamnější lokalitou v ČR. Celkem zde bylo nalezeno 7 jedinečných genotypů. 4 genotypy zde jsou široce rozšířené a další tři byly nalezeny v jediném exempláři. ( $PD = 0,17$ ).

Stejný multilokusový genotyp je často rozšířený po větší části lokality. Na Tabulových skalách je největší vzdálenost mezi genotypem 2 i mezi genotypem 3 přibližně 15 metrů; 18 m pak v Kotelní jámě. Na Studniční stěně je nejhojnější genotyp nacházen na 20 m svahu. Největší zjištěná vzdálenost (25 m) patří genotypu 1.

**Tab. 5: Seznam použitých mikrosatelitů.** Primer rbs19 publikován v práci Stamati *et al.* 2003, ostatní v práci Barker *et al.* 2003.  $T_a$  - annealingová teplota, C – počet cyklů

pracovní název	originální název	primerová sequence (5'-3') (F/R)	opakovaný motiv	$T_a$ [°C]	C
rbs19	gSIMCT024	TCATTTGCTCGATGAGGTTG	(CT)10	25	55,5
		GTGGTAGTTGCAAAAGGGGA			
sx08	SB24	ACTTCAATCTCTCTGTATTCT	[TG]21AG[TG]3AG[TG]3	55,5	31
		CTATTTATGGGTTGGTCGATC	AG[TG]3AGTGAG[TG]3		
sx10	SB80	TAATGGAGTTCACAGTCCTCC	[TC]21	-	-
		ATACAGAGCCCATTTTCATCAC			
sx14	SB100	ATGTCATTCAGGTTTGTTC	[CCG]5	-	-
		ATGGTTTAACTTGTTACTGTA			
sx19	SB199	CTATTTGTTCTCAATACCTT	[TG]11CG[TG]6	54	35
		CTTTACCTCAGAAAATCCAGA			
sx20	SB201	CCTCTTTTTCTATTGTGGTCT	[CT]4CC[CT]3[CA]22	-	-
		GGCATGTATTTTACTCCAAC			
sx23	SB233	AAATTACCGTCCAATAAAGA	[TA]2[TGTGCG]4[TG]9	-	-
		CATTAGCCATGAACAAGTAA			

**Tab. 6: Počet detekovaných alel u použitých primerů a jejich velikost.**

pracovní název	originální název	primerová sequence (5'-3') (F/R)	velikost fragmentů	počet alel
rbs19	gSIMCT024	TCATTTGCTCGATGAGGTTG GTGGTAGTTGCAAAAGGGGA	294, 296, 298, 300, 309	5
sx08	SB24	ACTTCAATCTCTCTGTATTCT CTATTTATGGGTTGGTCGATC	148, 160, 162, 164, 168, 176, 182, 184, 208, 214, 240	11
sx19	SB199	CTATTTGTTCTCAATACCTT CTTACCTCAGAAAATCCAGA	104, 112, 113, 115, 117	5

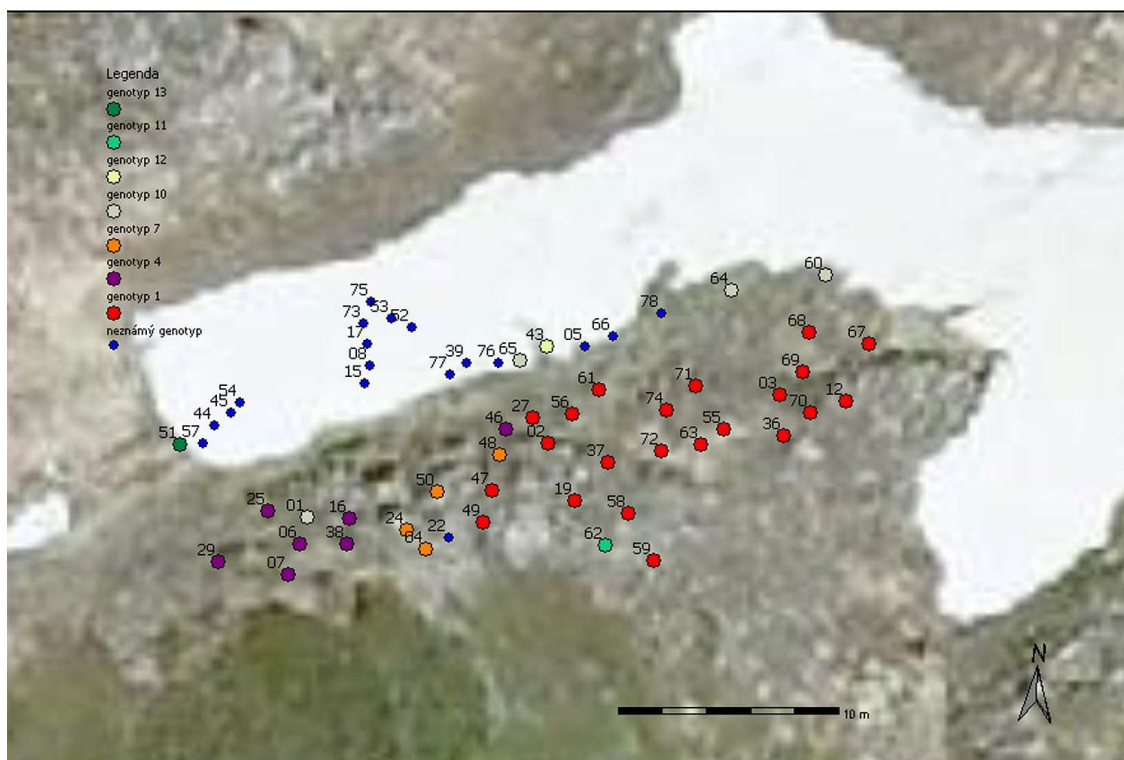
**Tab. 7: Genotypy jednotlivých trsů.**

ID	původ	primer			genotyp
		rbs19	sx8	sx19	
shk02	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk03	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk12	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk19	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk27	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk36	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk37	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk47	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk49	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk55	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk56	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk58	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk59	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk61	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk63	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk67	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk68	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk69	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk70	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk71	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk72	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shk74	Studniční stěna	BE	JJ	AA	1
shj01a	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj01b	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj01c	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj02b	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj03a	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj03b	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj04	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj05	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj06a	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj06b	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj08a	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj08b	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj08c	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj08d	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj08e	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj08f	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj09a	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2

ID	původ	rbs19	primer		genotyp
			sx8	sx19	
shj09c	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj10a	Tabulové kameny	CE	AE	CC	2
shj11c	Tabulové kameny	EE	BE	BB	3
shj12a	Tabulové kameny	EE	BE	BB	3
shj13a	Tabulové kameny	EE	BE	BB	3
shj13b	Tabulové kameny	EE	BE	BB	3
shj13c	Tabulové kameny	EE	BE	BB	3
shj15d	Tabulové kameny	EE	BE	BB	3
shj15e	Tabulové kameny	EE	BE	BB	3
shj16	Tabulové kameny	EE	BE	BB	3
shk06	Studniční stěna	BC	DE	CE	4
shk07	Studniční stěna	BC	DE	CE	4
shk16	Studniční stěna	BC	DE	CE	4
shk25	Studniční stěna	BC	DE	CE	4
shk29	Studniční stěna	BC	DE	CE	4
shk38	Studniční stěna	BC	DE	CE	4
shk46	Studniční stěna	BC	DE	CE	4
shj17a	Petrovy kameny	CC	EG	CC	5
shj18b	Petrovy kameny	CC	EG	CC	5
shj20	Petrovy kameny	CC	EG	CC	5
shj25	Petrovy kameny	CC	EG	CC	5
shj26	Petrovy kameny	CC	EG	CC	5
shk09	Malá Kotelní jáma	AD	AD	EE	6
shk26	Malá Kotelní jáma	AD	AD	EE	6
shk30	Malá Kotelní jáma	AD	AD	EE	6
shk35	Malá Kotelní jáma	AD	AD	EE	6
shk41	Malá Kotelní jáma	AD	AD	EE	6
shk04	Studniční stěna	BE	EI	AC	7
shk24	Studniční stěna	BE	EI	AC	7
shk48	Studniční stěna	BE	EI	AC	7
shk50	Studniční stěna	BE	EI	AC	7
shj02c	Tabulové kameny	CC	AE	CC	8
shj11b	Tabulové kameny	CE	BE	BB	9
shk01	Studniční stěna	BE	DE	CE	10
shk60	Studniční stěna	BE	DE	CE	10
shk64	Studniční stěna	BE	DE	CE	10
shk65	Studniční stěna	BE	DE	CE	10
shk66	Studniční stěna	BE	DE	CE	10
shk62	Studniční stěna	BE	II	AA	11
shk43	Studniční stěna	BC	EI	AD	12
shk51	Studniční stěna	BC	DI	AA	13
shk28	PL - hrana Sněžné jámy	CE	DH	CC	14
shk20	PL- Malá Sněžná jáma	EE	BD	CC	15
sht81	SK-Lomnické sedlo	0	CK	CE	16
shb85	Bulharsko	BE	FF	CC	17

**Tab. 8: Vyřazené vzorky.**

ID	původ	rbs19	primer		
			sx8	sx19	
shj02a	Tabulové kameny	0	AE	CC	vyřazeno
shj07	Tabulové kameny	0	AE	CC	vyřazeno
shj08g	Tabulové kameny	0	AE	CC	vyřazeno
shj09b	Tabulové kameny	0	AE	CC	vyřazeno
shj10b	Tabulové kameny	-	-	-	vyřazeno
shj11a	Tabulové kameny	0	0	0	vyřazeno
shj12b	Tabulové kameny	?	BE	BB	vyřazeno
shj12c	Tabulové kameny	0	0	0	vyřazeno
shj12d	Tabulové kameny	0	0	0	vyřazeno
shj13d	Tabulové kameny	0	0	0	vyřazeno
shj14	Tabulové kameny	-	-	-	vyřazeno
shj15a	Tabulové kameny	-	-	-	vyřazeno
shj15b	Tabulové kameny	?	BE	BB	vyřazeno
shj15c	Tabulové kameny	-	-	-	vyřazeno
shj17b	Petrovy kameny	CC	0	CC	vyřazeno
shj18a	Petrovy kameny	0	0	0	vyřazeno
shj19	Petrovy kameny	0	EG	0	vyřazeno
shj21	Petrovy kameny	0	EG	0	vyřazeno
shj22	Petrovy kameny	0	EG	CC	vyřazeno
shj23	Petrovy kameny	0	EG	CC	vyřazeno
shj24	Petrovy kameny	0	EG	CC	vyřazeno
shk05	Studniční stěna	0	DE	CE	vyřazeno
shk22	Studniční stěna	0	EI	AA	vyřazeno
shk40	Studniční stěna	BC	0	CE	vyřazeno
shk52	Studniční stěna	0	DI	AA	vyřazeno
shk54	Studniční stěna	0	DI	AD	vyřazeno



Obr. 6: Mapa rozložení genotypů *Salix herbacea* na Studniční stěně.



Obr. 7: Mapa rozložení genotypů *Salix herbacea* na Tabulových kamenech.



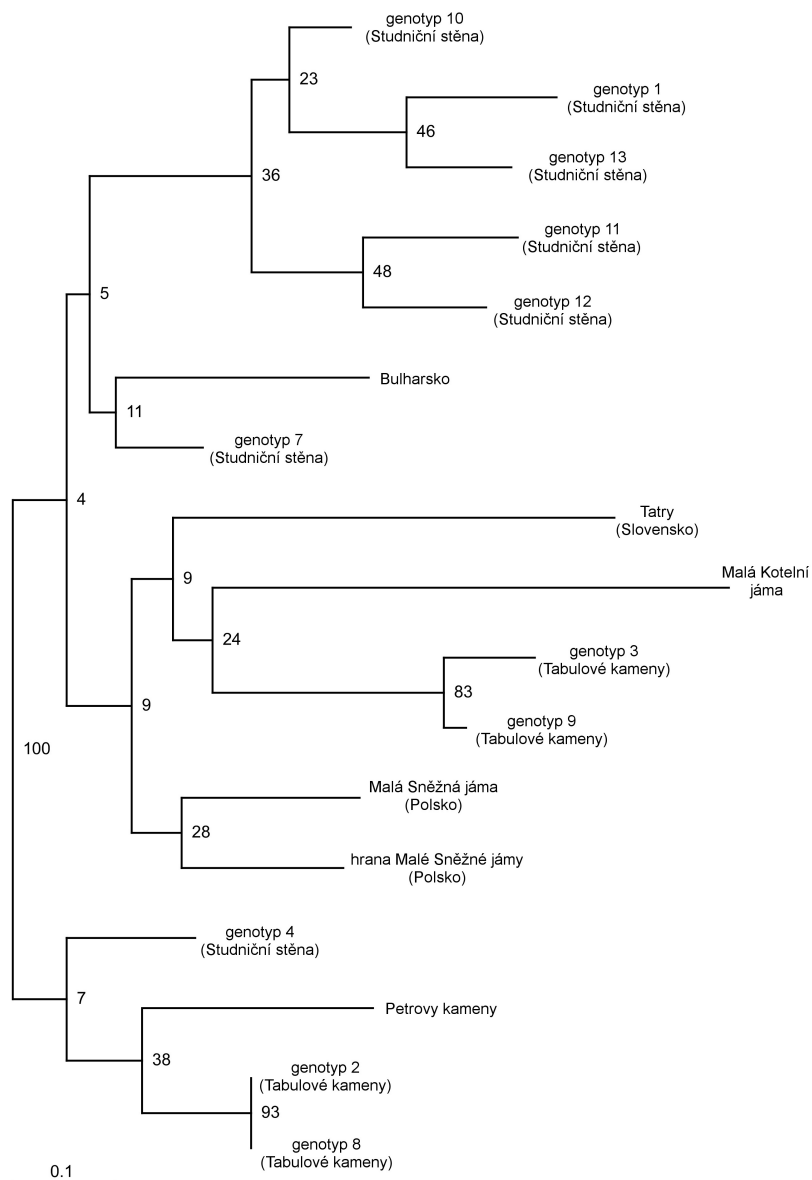
0.1

Obr. 8: UPGMA dendrogram všech přirozených populací *Salix herbacea* v ČR.

#### 4.4. Příbuznost populací

S využitím genotypových dat ze 3 markerů pro konstrukci UPGMA dendrogramu byly na Tabulových kamenech zjištěny dvě skupiny nepřibuzných genotypů, první z nich se nachází v jižní části, druhá skupina v části severní. Druhá skupina tvořena genotypy 2 a 8 je s velkou pravděpodobností geneticky příbuzná polykormonu na Petrových kamenech a nejspíše vzdáleně příbuzná i genotypům 4 a 7 ze Studniční stěny (Obr. 8). Podobná situace byla zjištěna i na Studniční stěně. Na této lokalitě se nacházejí velmi příbuzné genotypy 1, 10, 11, 12 a 13 a spolu s nimi nepřibuzná skupina genotypů 4 a 7. Byla zjištěná výrazná nepřibuznost polykormonu z Malé Kotelní jámy s ostatními našimi populace i populacemi z blízkého Polska. Populace z Malé Sněžné jámy a její hrany se zdají být příbuzné s genotypy 4 a 7 ze Studniční stěny. U bulharské populace byla zjištěna příbuznost s českými populacemi.

Dendrogram zkonstruovaný pomocí NJ metody se v některých částech od předešlého odlišuje (obr 9). Genotyp z Bulharska je řazen do příbuznosti skupiny genotypů ze studniční stěny (genotypy 1, 10, 11, 12 a 13). Do této skupiny je řazen i genotyp 7. Další příbuznou skupinu tvoří genotyp z Tater, Malé Kotelní jámy, polské populace a genotypy 3 a 9 z Tabulových kamenů. Poslední skupinou, která je od předešlých signifikantně odlišná jsou genotypy 2 a 8 z Tabulových kamenů, genotyp 4 ze Studniční stěny a polykormon Petrových kamenů.



**Obr. 9:** NJ dendrogram všech přirozených populací *Salix herbacea* v ČR.

## 5. DISKUZE

### 5.1. rozšíření

Byly zrevidovány herbářové položky ze sbírek 4 institucí (Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně, Moravského zemského muzea v Brně, Okresního vlastivědného muzea v Litoměřicích a Středočeského muzea v Roztokách u Prahy). V těchto herbáriích byla většina položek zahraničního původu (nejčastěji Alpy a Tatry). Většina sběrů z ČR pocházela z Petrových kamenů a to i přesto, že je tato populace ve srovnání s jinými našimi populacemi malá. V porovnání, blízká populace na Tabulových kamenech, vzdálená 2 km od Petrových kamenů, je v těchto herbáriích dokládána pouze pětkrát a to i přesto, že se jedná také o dobře dostupnou, dlouhou dobu známou a velkou populaci. Stejných výsledků bylo získáno i při studiu herbářových sbírek Muzea východních Čech, Vlastivědného muzea v Olomouci a botanického oddělení Přírodovědeckého muzea Národního muzea v Praze (Hroneš *et al.* in prep<sup>1</sup>). Tento nepoměr je patrně způsoben oblíbeností Petrových kamenů jako takových a jejich častou návštěvou jak turisty, tak i botaniky. Nacházejí se zde mimo vrby bylinné i jiné zajímavé druhy rostlin: např. *Anemone narcissiflora*, *Campanula gelida*, *Poa ripharea*. Nutno podotknout, že za současného stavu, kdy se na lokalitě nachází 12 odlišitelných menších trsů, může nejspíše právě dřívější sběr herbářových položek botaniky. Většina revidovaných položek z této lokality obsahovalo neúměrné množství rostlin, často celé trsy i s kořeny, kterými byl zaplněn celý papír položky. Takto muselo být v minulém století z této populace odstraněno více jak 1 m<sup>2</sup> kompaktních porostů vrby bylinné. Toto číslo se nezdá nikterak velké, ale stanoviště na Petrových kamenech je klimaticky velmi nepříznivé a tomu odpovídá i rychlost růstu tohoto druhu. V současnosti zdejší populace nemá ani 1/4 m<sup>2</sup> (při počítání se 100% pokryvností).

Z Hrubého Jeseníku je vrba bylinná kromě výše zmíněných recentních lokalit dokládána z Velké kotliny. Rostla zde na vrcholových skalkách. Blíže tuto lokalitu popisuje Chmelař (1972). V současnosti zde není známa. Lokalitu jsem osobně několikrát navštívil, ale nepodařilo se mi zde potvrdit výskyt druhu. I přesto nemohu její přítomnost na lokalitě vyloučit. Jedná se o dosti nepřehledný a obtížný terén a vrba bylinná zde může být snadno přehlédnuta. Výskyt na lokalitě nemusí být nepřetržitý.

---

<sup>1</sup> 65. Hroneš M., Nývtová V., Brandová B., Ševčík J., Dančák M. & Vašut R. J. (2013?): Vysokohorské vrby (*Salix*) sudetských pohoří České republiky – rozšíření a současný stav populací. – To be submitted to Zprávy české Botanické Společnosti.



Vrba bylinná má dobrou schopnost regenerace z kořenových výběžků a při pohřbení substrátem způsobený např. lavinou jím může za několik let prorůst. Vašina a Zahradníková (1999) popisují regeneraci vrby bylinné po odtržení drnu lavinou a jeho nahromadění ve spodních částech lokality na Studniční stěně. Z nahromaděného materiálu začala prorůstat až za dva roky.

Herbářové položky lokalizované jako „Praděd“ a „Praděd, skály na vrcholu“ patří nejspíše k lokalitě Tabulové kameny. Na přelomu 19. a 20. století byly v okolí Pradědu nejspíše vhodnější podmínky než dnes, a tak zde v minulosti růst mohla. Jenže Tabulové kameny se nacházejí v jeho blízkosti, při historické stezce a na herbářových schedách jsou často psány podobnou formulací. Proto se v těchto případech patrně jedná o nepřesně lokalizované Tabulové kameny.

Mezi mnou studovanými herbářovými položkami byly pouze dvě herbářové položky původem z Krkonoš. Jedna je lokalizovaná v místech recentní lokality na Studniční stěně. Dále pak nad Velkou Studniční jámou, kde dnes již nalézána není. Šourek (1970) v Květeně Krkonoš dále v okolí Studniční hory zmiňuje ještě dvě lokality, kde již v té době nebyla nalezena. Jedná se o východní svah Studniční hory a Sněhový žleb v Úpské jámě a požárem zničenou populaci u staré štoly v Malé Kotelní jámě. V roce 1982 bylo pracovníky KRNAPu na okrajích Malé Kotelní jámy nalezeno několik trsů vrby bylinné. Jedná se patrně o pozůstatky tehdejší populace nacházející se o něco níže. V Krkonoších se dále nachází jedna vysazená populace ve Velké Kotelní jámě, blíže dokumentovaná Vašinou a Zahradníkovou (1999).

Z těchto devíti českých historických lokalit jsou do současnosti dochovány pouze 2 lokality v Hrubém Jeseníku, 2 původní lokality na české straně Krkonoš a 1 vysazená tamtéž. Tento úbytek je nejspíše způsoben abiotickými činiteli jako letní sucho, pády zemných lavin, ale i konkurencí ostatních rostlin. Stále je pravděpodobné, že na lokalitách v okolí skalek Úpské a Studničních jam a ve Velké kotlině může být znovu nalezena. Jde sice o botanicky dobře prozkoumaná území, ale s velmi náročným terénem a jelikož se jedná o velmi nenápadnou rostlinu, může být snadno přehlížena. Její nenápadnost v porostu bylin dokládá i přehlížení vitální populace v terénní depresi nad Malou Sněžnou jámou na polské straně Krkonoš publikováno Vašinou a Zahradníkovou (1999). Nález této nové lokality je spíše výjimka. Nepředpokládám nález úplně nové lokality. V celých Vysokých Sudetech nejsou nalézány pestíkovými květy kvetoucí keře, a tak je možné pouze vegetativní šíření na krátké vzdálenosti pomocí lavin a rozrůstání se do prostoru podzemními výběžky

Na lokalitách v Hrubém Jeseníku jsem sice ve vajíčku pozoroval shluky buněk podobných embryím (Ševčík 2010) a několik let po sobě našel tobolečky se semeny, ale tyto semena se mi na živném médiu nepodařilo přimět k vyklíčení. Nemusí se jednat o semena vzniklá opylením druhým pohlavím téhož druhu, ale o důkaz možného křížení tohoto druhu s jiným druhem našich vrb. V literatuře je popisováno velké množství hybridů s vrbou bylinnou (Beerling 1998, Elven & Karlsson 2000), ale žádný její kříženec na našem území nebyl nalezen. V okolí Tabulových a Petrových kamenů se nacházejí samčí keře *Salix silesiaca*, *Salix aurita*, *Salix hastata* a *Salix rosmarinifolia* (Hroneš *et al.* in prep<sup>2</sup>). Beerling (1998) zmiňuje možnost křížení *S. herbacea* se *S. aurita* a *S. repens*, Elven & Karlsson (2000) ještě křížence se *Salix hastata*. Nejblíže Tabulovým a Petrovým kamenům, a zároveň nejhojněji jsou zastoupeny keře četných kříženců se *S. aurita* a tyto mohou být i donorem pylu. Nicméně tomuto křížení může bránit tzv. inkompatibilita, která se může na této úrovni projevovat až při tvorbě semen (Erdelská 1981). Inkompatibilita se vyskytuje u více jak poloviny druhů krytosemenných rostlin. U vrb je popisováno velké množství kříženců, pokud tedy u vrb existuje, je pravděpodobně snižena. Pokud by se projevila, tak by to mohlo být až při utváření embrya či při životaschopnosti semen. Proto tvorbu semen na Tabulových a Petrových kamenech nelze brát jako důkaz generativního šíření druhu.

## 5.2. stav populací

Na území ČR se v současnosti vrba bylinná vyskytuje na pouze 4 původních lokalitách. Tyto lokality se nacházejí v legislativou chráněných územích. Lokality v Hrubém Jeseníku se nacházejí v I. zóně CHKO v NPR Praděd. Krkonošské lokality v I. zóně národního parku. Z tohoto důvodu je již nepravděpodobné, že by došlo k ohrožení tohoto druhu vlivem přímé lidské činnosti, jak tomu bylo v minulosti. Nicméně zůstává ohrožení přírodními vlivy, které se na mnohých lokalitách značně projevují.

Naše nejmenší populace se nachází v Malé Kotelní jámě. Velká populace jihozápadně od staré štoly byla v roce 1925 zničena požárem kosodřeviny (Šourek 1970). Z této populace patrně zůstalo několik málo trsů rostoucí na skalkách ve vrcholových částech Malé Kotelní jámy. Při návštěvě této lokality jsem našel

---

<sup>2</sup> Hroneš M., Ševčík J. & Vašut R.J. (in prep.): *Salix rosmarinifolia* L. - zpráva připravená k publikování v sérii *Additamenta ad floram Reipublicae Bohemicae* vydávané v časopise *Zprávy Čes. Bot. Společ.*

12 menších trsů vrby bylinné, které byly ve špatném zdravotním stavu způsobeném konkurencí ostatních druhů rostlin. Trsy zde jsou velmi kompaktní, omezující se svým výskytem jen na několik málo centimetrů mezi vegetací brusnic, vřesu a metličky a holým skalním podložím. Od objevení v roce 1982 se porost zmenšil téměř o polovinu. Příčinou je nejspíše narušování substrátu a stability trsů sněhem, vodou a mrazem (Vašina a Zahradníková 1999). Takovéto narušování na mnohých lokalitách přispívá k vegetativnímu šíření druhu níže po svahu. Na této lokalitě pro takovéto šíření není z důvodu přílišné zapojenosti vegetace prostor.

Populace na Studniční stěně je svou velikostí a možnostmi růstu naší nejvýznamnější populací. Podloží je zde značně nestabilní a v důsledku strmého závětrného svahu a severovýchodní expozice se zde značně kumuluje sněh, který narušuje podloží i travní drn. Tyto jevy jistě značně narušují keře toho druhu, ale zároveň mu umožňují trvalou hojnou existenci. Vrba bylinná zde roste na dvou značně rozdílných stanovištích: (1) svorové skalky se sporou vegetací; (2) vlhká úžlabina s dlouho trvající sněhovou pokrývkou. Vrba bylinná zde sice tvoří většinou rozvolněné trsy, ale tento prostor jí dovoluje dynamiku růstu, která zajišťuje obsazování nových mikrostanovišť.

Nejznámější česká populace na Petrových kamenech je značně narušena dřívější lidskou činností (sběr botaniky, poškození turisty). Sešlap hustých porostů vrby bylinné značně snižuje její pokryvnost, ale i tvorbu jehněd (Rossi *et al.* 2006). Díky přísné a důsledné ochraně lokality toto ohrožení již není v podstatě aktuální. V současnosti se Petrovy kameny nacházejí v oblasti se zakázaným vstupem. Většina zbylých trsů je v dobrém stavu, některé ovšem vyrůstají ze skalní spáry bez možnosti šíření do okolí. Historicky nejspíše hojnější rozšíření dávalo předpoklad genetické různorodosti populace. Rostliny na herbářových dokladech byly často větší trsy. Proto zde vrba bylinná musela růst i na volném prostoru pod samotnými skalními výběžky, kam se rozšířila ze skal. Takto rozvolněné plochy mohly být udržovány pastvou dobytka, který se zde v té době hojně pásal (Kavalec 1982). Pastvu jako jednu z možností udržování rozvolněných společenstev s výskytem vrby bylinné zmiňuje i Beerling (1998). Dnes jinde v okolí Petrových kamenů nejsou vhodné mikrostanoviště pro šíření druhu, plochy v okolí jsou značně zapojené.

Naše druhá největší populace se nachází na Tabulových kamenech. Vrba bylinná je zde konkurenčně schopnějšími druhy rostlin vytlačována na okraje skalních říms. V historii zde byla nejspíše mnohem hojnější, ale populace byla odtěžena spolu

s kamenem na výstavbu rozhledny na Pradědu (Chmelař 1972). Z tohoto důvodu jsem očekával značnou genetickou diverzitu populace. Stejně jako u populace na Petrových kamenech i zde se tento předpoklad nepotvrdil. Byly zde nalezeny 2 hojné a 2 vzácné genotypy. Nejspíše se vrba bylinná na této lokalitě před těžbou vyskytovala v podobné struktuře jako v současnosti a vlivem těžby bylo zachováno několik málo trsů, které se nadále rozrostly na vhodné mikrostanoviště. Jelikož se jednotlivé trsy stejného genotypu nacházejí i více jak 10 m od sebe, muselo se jednat o genotypy, které byly konkurenčně zdatnější. To jim umožňovalo růst ve větším zápoji ostatních druhů rostlin, čili dále od těžných míst, a mohly se tak zachovat. Zda-li bylo těžební činností v kamenolomu způsobeno vymření neznámého genotypu dnes již nelze zjistit, ale je pravděpodobné, že se na lokalitě mohly vyskytovat i další genotypy.

Vrba bylinná je často udávána jako druh typický pro sněhová výležiška a to hlavně v Alpách, kde osidluje téměř výlučně tento biotop. Vyhledává partie sněhových výležišek s vyšší hladinou podzemní vody v letním období a stabilním půdním substrátem (Wijk 1986, Tomaselli 1991), v těch pak spolu s mechorosty vytváří společenstvo svazu *Salicion herbaceae*. Tyto části výležišek vyhledává i v oblastech s reliktním rozšířením, např. v severních Apeninách (Tomaselli 1991). Hejcman *et al.* (2006) při studiu krkonošského sněhového výležiška Mapy republiky pozoroval množství diagnostických druhů tohoto svazu, ale značné vegetační rozdíly oproti alpským výležiškům, mimo jiné i absenci vrby bylinné. To je nejspíše způsobeno rozdílným typem sněhových výležišek, kdy středové partie s mokřadní částí chybí. V místech s vysokou sněhovou pokrývkou u nás roste pouze část populace na Studniční stěně. Všechny ostatní lokality mají spíše charakter skalního rázu. To ovšem neznamená, že by populace vrby bylinné u nás rostly na netypických stanovištích pro tento druh. Srovnání růstu na vyfoukávaných skalních stanovištích, výskytu na sněhových výležiscích a mezi nimi přechodných stanovištích napříč areálem provedl Birks (1993). Vrba bylinná sice v celém svém areálu roste na sněhových výležiscích, ale mimo Alpy (kde vyhledává pouze tento biotop) roste téměř vždy právě na stanovištích, na kterých je nacházena i v ČR.

### 5.3. genetická variabilita populací

U vrby bylinné jsem v populacích v ČR našel 16 různých multilokusových genotypů. Nejvíce jich bylo nalezeno na Studniční stěně (celkem 7), nejméně pak na

Petrových kamenech a Malé Kotelní jámě (po jednom genotypu). Chrtek *et al.* (2006) při studiu populací vrby bylinné v Krkonoších za použití izozymů zjistil v populaci Malé Kotelní jámy 1 genotyp a na Studniční stěně genotypů pět. Isozymy často nejsou selekčně neutrální, a proto mohou poskytovat zkreslené výsledky. Obzvláště v extrémních podmínkách horských oblastí, kde životně důležité vlastnosti, a tedy i proteiny, podléhají silnému selekčnímu tlaku.

Vrba bylinná ve Vysokých Sudetech roste na větrem exponovaných místech ve vrcholových částech hřebenů. Tyto horské lokality se vyznačují extrémními životními podmínkami (krátká vegetační doba, nedostatek živin, silný vítr apod.). Jejich vliv může bránit sexuální reprodukci, která se stává méně výhodnou (Urbanska & Schütz 1986). Tomuto prostředí se vrba bylinná musela dokonale přizpůsobila. Takovýmto přizpůsobením může být vegetativní rozmnožování (Bliss 1971). Populace vegetativně se rozmnožujících druhů vykazuje menší stupeň genetické variability ve srovnání s neklonálními druhy (Ellstrand & Roose 1987, Hamrick & Godt 1996). Widén *et al.* (1994) udává průměrnou hodnotu u vegetativně se šířících druhů  $PD = 0,24$ . Podobnou hodnotu multilokusových genotypů vůči počtu analyzovaných vzorků ( $PD = 0,1-0,22$ ) jsem našel i v našich populacích vrby bylinné. Stejně nízkou hodnotu ( $PD = 0,18$ ) zjistil při použití SSR i Reisch *et al.* (2006) v podmínkách Alp. Stejný vzorek zkoumal i pomocí RAPD a touto metodou zjistil vyšší hodnoty ( $PD = 0,36$ ). Tato vyšší hodnota je nejspíše způsobena samotnou metodou, která může být ovlivněna přítomností cizí DNA (např. parazitických či mutualistických organismů) (Flegr 2005).

Genetická variabilita populací klonálních druhů závisí na genetické variabilitě zakládajících jedinců. Když se populace skládá pouze z genetického fondu rostlin, které ji založily, tak se genetická diverzita v průběhu vývoje vlivem konkurence, či dokonce samotné náhody, zmenšuje. Pokud v takových populacích nedochází k přispívání novými genetami, populace se stává uniformní a může převládnout jen jeden nebo několik málo genotypů (Watkinson & Powell 1993). Pro zachování genetické diverzity populace stačí i nepatrné osidlování novými genetami (Watkinson & Powell 1993). Ve Velké Británii byla pro vrba bylinnou při použití SSR zjištěna značně vysoká proporce odlišitelných genotypů ( $PD = 0,4$ ) (Stamati *et al.* 2007). Bylo zkoumáno stanoviště podobné jako na Studniční stěně. Na takovém stanovišti je snižená vnitro- i mezidruhovú konkurence a je tudíž umožněno ujímání nových genet. V tamním regionu je vrba bylinná obecněji rozšířena než v ČR. Proto je takto vysoká hodnota nejspíše způsobena kombinací častějšího regionálního rozšíření a typem stanoviště.

Na všech lokalitách byla zjištěna velká vzdálenost mezi rostlinami sdílejícími stejný genotyp. Stamati *et al.* (2007) ve Skotsku zjistil největší vzdálenost mezi keři jednoho genotypu 7 m, Reisch *et al.* (2006) v Alpách pak nalézal jednotlivé genotypy pospolu ve vzdálenosti okolo 1,3 m. Naše populace jsou značně odlišné. V Malé Kotelní jámě je vzdálenost s výskytem jednoho genotypu přibližně 18 m. Jelikož zde keříky vrby rostou přibližně na vrstevnici, muselo být této vzdálenosti docíleno postupným aktivním rozšiřováním do šířky pomocí podzemních výběžků a zakořeňování poléhavých větví. To ukazuje na značné stáří populace. O něco menší vzdálenost byla zjištěna i u 2 genotypů na Tabulových kamenech. I zde je výskyt trsů v jedné rovině, ale jelikož se jedná o v historii značně antropogenně ovlivněnou lokalitu, není možné odlišit samovolné rozšiřování trsů od rozšiřování způsobeného lidskou činností při těžbě kamene. Největší vzdálenosti, 20-25 m, byly zjištěny u genotypů na Studniční stěně. Zde se vrba rozšiřuje níže po svahu pomocí plazivého sněhu a pádu lavin (Vašina a Zahradníková (1999)).

Byť bylo na 80 analyzovaných rametách z populací v ČR zjištěno jen 13 genotypů, tak kromě lokusu *sx19* byla zjištěna velmi vysoká heterozygotnost (82,5 % pro lokus *rbs 19* a 71 % pro lokus *sx8*, u lokusu *sx19* však může být heterozygotnost podstatně vyšší. Bylo totiž značně obtížné odlišit od sebe heterozygoty s alelami CD a homozygoty s alelami CC). Tyto hodnoty svědčí o malé intenzitě inbreedingu. Jelikož jsou naše populace geograficky značně oddělené, nemůže mezi nimi probíhat genetický tok a z důvodů nízké početnosti druhu na lokalitách je inbreedingu nejspíše zabráněno absencí generativního a přítomnosti pouze vegetativního rozmnožování. V takových populacích časem převládne jeden nebo několik málo genotypů (Watkinson & Powell 1993). Toto je plně v souladu se zjištěnými početnostmi genotypů v našich populacích.

Na základě zjištěných genotypových dat byly zkonstruovány dendrogramy. Jejich informativnost je zatím omezená, neboť využití 3 markerů nemůže poskytnout dostatečně signifikantní výsledky. Jevy jako např. homoplazie (náhodná shoda alelického profilu) tak mohou zkreslovat skutečné vztahy mezi jednotlivými genotypy. Toho projevem je např. pozice jedince z Bulharska, který je situován jako „ingroup“ ačkoliv jeho příbuznost s našimi populacemi je vysoce nepravděpodobná. I přes veškeré limity zde předložených výsledků, některé závěry můžeme považovat za průkazné. I přes nízký počet markerů a odlišný algoritmus výpočtů dendrogramů mezi metodami UPGMA a NJ, některé části stromů jsou navzájem podobné. Nejdůležitější je zjištění

skupin nepříbuzných genotypů v jednotlivých lokalitách (obr. 8 a 9). Na Tabulových kamenech byly zjištěny dvě skupiny nepříbuzných genotypů, první z nich se nachází v jižní části, druhá skupina v části severní. Druhá skupina tvořena genotypy 2 a 8 je s velkou pravděpodobností geneticky příbuzná polykormonu na Petrových kamenech a nejspíše vzdáleně příbuzná i genotypům 4 a 7 ze Studniční stěny. Podobná situace byla zjištěna i na Studniční stěně. Na této lokalitě se nacházejí velmi příbuzné genotypy 1, 10, 11, 12 a 13 a spolu s nimi nepříbuzná skupina genotypů 4 a 7. Naznačená výrazná „nepříbuznost“ polykormonu z Malé Kotelní jámy s ostatními našimi populacemi je spíše orientační, přesto pravděpodobnost bližších genetických vazeb je velmi nízká.

Ačkoliv se zjištěná data prozatím nedají spolehlivě interpretovat jako celek, již teď je zřejmé, že poskytují nové a zásadní informace o vztazích v populacích a mezi nimi. Nejzajímavější je zjištění nepříbuznosti části polykormonů se zbytkem populace na lokalitě. Tyto jednotlivé skupiny jsou naštěstí v populaci rovnoměrně početně zastoupeny a nehrozí jim jako takovým v blízké budoucnosti zánik v konkurenci s jinými nepříbuznými genotypy. Opačná situace je s genotypy vzácnějšími, jako jsou genotypy 8 a 9 na Tabulových kamenech. Nacházejí se jako součást polykormonů hojnějších genotypů. Bylo by proto vhodné poskytnout jim větší prostor, který se nabízí na vrbových bylinných neobsazených skalkách vzniklých těžbou na téže lokalitě.

Jednotlivé lokusy jsou sice často heterozygotní, ale mnohdy s podobnými alelami. Nicméně tyto přeživší genotypy se musely plně adaptovat na místní životní podmínky, ale jsou náchylnější k jakékoliv změně na svých lokalitách. Rozdílná situace je u populací s velkou genetickou diverzitou, která vytváří bariéru pro patogeny a hmyz, ale pár dobře vyselektovaných klonů se může bránit špatným životním podmínkám lépe než při široké genetické základně (Libby 1982 cit. in Aravanopoulos 1999), proto se domnívám, že alespoň populacím na Studniční stěně a Tabulových kamenech v blízké budoucnosti nebezpečný vyhynutí nehrozí. Pokud by se přeci jen tak stalo, druhu jako takovému by to příliš neblížilo. Naprostá většina genetické variability je uchována v severských a alpských populacích (Alsos *et al.* 2009), nicméně jedná se o zcela unikátní rostlinný druh dokumentující vývoj naší krajiny. Svým způsobem růstu a výskytu se jedná i o druh známý, a proto si i do budoucna zasluhuje pozornost a ochranu.

## 6. ZÁVĚR

Při studiu herbářových položek bylo zjištěno, že většina sběrů z ČR pocházela z Petrových kamenů. Z toho lze v této populaci usuzovat na mnohem větší početnost druhu v minulost a její značný úbytek. Při návštěvách lokalit na Petrových a Tabulových kamenech byl kromě hromadného kvetení vrby bylinné pozorován i vývoj tobolek a semen a to dva následující roky po sobě. Tyto semena se nepodařilo přimět ke klíčení.

Populace v ČR jsou v dobrém zdravotním stavu, jen na některých trsech je patrné poškození letním suchem. Výjimkou je populace v Malé Kotelní jámě, která je velmi slabá a jednotlivé trsy značně trpí konkurencí silnějších druhů rostlin.

Při výzkumu genetické diverzity pomocí SSR markerů bylo vyzkoušeno 6 mikrosatelitů. Podmínky pro použití byly optimalizovány pro 3 z nich (sx8, sx19 a rbs19). Bylo nalezeno několik alel s výskytem pouze na jedné ze zkoumaných lokalit. Celkem bylo na 80 rostlinách identifikováno 13 multilokusových genotypů s převahou 6 hojných genotypů a 7 velmi vzácných. Na Studniční stěně a Petrových kamenech bylo nalezeno hned několik genotypů. Na jednotlivých lokalitách bylo zjištěno několik skupin nepříbuzných genotypů. Tato vnitropopulační variabilita může vrbě bylinné pomoci přežít i v případných budoucích změnách na těchto lokalitách. Žádný ze zjištěných genotypů není přítomen na více lokalitách. Jedinci stejného genotypu na lokalitě Malá Kotelní jáma byly nalezeny až v 18m vzdálenosti od sebe. To svědčí o značném stáří lokality. Další lokalita, Studniční stěna, má velmi dobré podmínky pro vegetativní šíření a vzdálenost mezi keři stejného genotypu byla až 25 m. Vrba bylinná se v našich populacích množí nejspíše pouze vegetativně a tvorba semen je pravděpodobně způsobena opylením jiným druhem vrby. V naší přírodě zatím žádný kříženec s vrbou bylinnou zjištěn nebyl.



## 7. Použitá literatura:

- 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.
- Aravanopoulos F. A., Kim K. H. & Zsuffa L. (1999): Genetic diversity of superior *Salix* clones selected for intensive forestry plantations. – *Biomass and bioenergy* 16: 249-255.
- Argus G. W. (1997): Infrageneric classification of *Salix* (*Salicaceae*) in the New World. – *Systematic Botany Monographs* 52: 1-121.
- Barker J. H. A., Pahlich A., Trybush S., Eewards J. & Karp A. (2003): Microsatellite markers for diverse *Salix* species. – *Molecular Ecology Notes*. 3: 4–6.
- Beerling D. J. (1998): Biological flora of the British isles: *Salix herbacea* L. – *Journal of Ecology* 86: 872-895.
- 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 a natural gradient. – *Molecular Ecology*. 6: 989-993.
- Birks H. J. B. (1993): Quaternary palaeoecology and vegetation science— current contributions and possible future developments. – *Review of Palaeobotany and Palymology* 79: 53-177.
- Bliss L. C. (1971): Arctic and alpine plant life cycles. – *Annual Review of Ecology and Systematics* 2: 405-438.
- Brandová B. (2010): Hybridizace horských druhů vrb na příkladu vrby hrotolisté ve Velké kotlině. - diplomová práce na Katedře ekologie Univerzity Palackého v Olomouci. 63p.
- Brunsfeld S. J., Soltis D. E. & Soltis P. S. (1991): Patterns of genetic variation in *Salix* section *Longifoliae* (*Salicaceae*). – *American Journal of Botany* 78(6): 855-869.
- Dorn R. E. (1976): A synopsis of American *Salix*. – *Canadian Journal of Botany*. 54: 2769-2789.
- Ehrich, D., Gaudeul, M., Assefa, A., Koch, M.A., Mummenhoff, K., Nemomissa, S., Intrabiodiv Consortium & Brochmann, C. (2007): Genetic consequences of Pleistocene range shifts: contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. *Molecular Ecology*, 16, 2542–2559.

- Ellstrand N. C. & Roose M.L. (1987): Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. – *American Journal of Botany* 74: 123-131.
- Elven R. & Karlsson T. (2000): *Salicaceae*. – In: Jonsell B. [ed.], *Flora Nordica* 1. *Lycopodiaceae – Polygonaceae*. – *Bergius Foundation*, Stockholm, p. 118–195.
- Erdelská O. (1981): Embryológia krytosemenných rastlín. – *Veda*, Bratislava, 200 s.
- Fang, Chen-fu. (1987): On the distribution and origin of *Salix* in the World. *Chinese Acta – Phytotax. Sin.* 25: 307-312. [In Chinese, English abstract]
- Flegr J. (2005): Evoluční biologie. – *Academia*, Praha.
- Doyle J. J. & Doyle J. L. (1987): A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. – *Phytochemical Bulletin*. 19: 11–15.
- Dorn R. E. (1976): A synopsis of American *Salix*. – *Canadian Journal of Botany* 54: 2769-2789.
- Hamrick J.L. & Godt M. J. W. (1996): Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: – Biological Sciences* 351: 1291-1298.
- Hartnett D. C. & Bazzaz F. A. (1985): The genet and ramet population dynamics of *Solidago canadensis* in an abandoned field. – *Journal of ecology*. 73: 407–413.
- Hejcman M., Dvorak I.J., Kocianova M., Pavlu V., Nezerkova P., Vitek O., Rauch & O Jenik J. (2006): Snow depth and vegetation pattern in a late-melting snowbed analyzed by GPS and GIS in the Giant Mountains, Czech Republic. - *Arctic, Atarctic, and Alpine research*. Vol. 38: 90-98
- Holub J., Procházka F. & Čeřovský J. (1979): Seznam vyhynulých, endemických a ohrožených taxonů vyšších rostlin Květeny ČSR (1. verze). – *Preslia* 51: 213-237.
- Holub J. & Procházka F. (2000): Red List of Vascular Plants of the Czech republic. – *Preslia* 72: 187–230.
- Hörandl E., Florineth F. & Hadacek F. (2002): Weiden in Österreich und angrenzenden Gebieten. – Wien.
- 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. & 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.
- Jalas J, & Suominen J eds. (1988) Atlas *Florae Europaeae*. Distribution of Vascular Plants in Europe. 2. Angiospermae (part): 3. *Salicaceae* to *Balanophoraceae*, *Polygonaceae*, *Chenopodiaceae* to *Basellaceae*. Cambridge University Press, Cambridge
- Kavalec K. (1982): Státní přírodní rezervace Petrovy kameny, Inventariační průzkum lesnický dle metodiky SÚPPOP 1973, *Krajské středisko státní památkové péče a ochrany přírody v Ostravě*, Ostrava.
- Koblížek J. (2006): *Salicales* – vřbotvaré. – In: Goliašová K. & Michalková N. [eds.], Flóra Slovenska V/3, pp. 208-303 – *Veda*, Bratislava.
- Krahulcová A., Krahulec F. & Harčárik J. (2007): Genetická variabilita vybraných horských druhů cévnatých rostlin v Krkonoších. – In: Štursa J. & Knapik R. (eds),
- Krkavec F. (1991): K rozšíření některých druhů rodu *Salix* (L.) v Hrubém Jeseníku. – *Campanula* 2: 41-45
- Libby W. J. (1982): What is a safe number of clones per plantations?– In: Aravanopoulos F. A., Kim K. H. & Zsuffa L. (1999): Genetic diversity of superior *Salix* clones selected for intensive forestry plantations – *Biomass and bionergy* 16: 249-255.
- Myklestad Å. & Birks H. J. B. (1993): A numerical analysis of the distribution patterns of *Salix* L. species in Europe. – *Journal of Biogeography* 20: 1-32.
- 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, *Sommerset*.
- Nylén J., Elven, R. & Nordal I. (2000): Plant reproduction in the succession after the retreat of the glacier Blaisen, southwest Norway. – *Det Norske Videnskaps-akademi. I. Matematisk Naturvitenskapelig Klasse, Skrifter* 39: 113-126
- Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. - *Comput Appl Biosci* 12: 357–358.

- Pavlíček B.A., Hrda S., Flégr J. (1999) FreeTree - Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness, Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. - *Folia Biologica - Prague* 45: 97–99.
- Pluess A. R. & Stöcklin J. (2004): Population genetic diversity of the clonal plant *Geum reptans* (*Rosaceae*) in the Swiss Alps. – *American Journal of Botany* 91(12): 2013–2021.
- Quitt E. (1975): Klimatické oblasti ČSR 1 : 500 000. – *Geografický Ústav*, Brno.
- Rechinger K. H. (1964): Genus *Salix* L. – In: Tutin T. G., Heywood V. H., Burges N. A., Valentine D. H., Walters S. M. & Webb D. A. [eds], *Flora Europaea*, Volume 1 *Lycopodiaceae to Platanaceae*, Cambridge University Press, Cambridge – New York – Port Chester – Melbourne – Sydney: 43-54.
- Reisch Ch., 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. (2001): Genetika populací. – Brno.
- 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.
- Schönswetter, P., Paun, O., Tribsch, A. & Niklfeld, H. (2003): Out of the Alps: colonization of Northern Europe by East Alpine populations of the Glacier buttercup *Ranunculus glacialis* L. (*Ranunculaceae*). *Molecular Ecology*, 12, 3373–3381.
- Skvortsov A. K. (1968): Willows of the USSR. Taxonomic and Geographic Revision. – *Nauka*, Moscow.
- 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.
- Sochor M. (2011): Genetická struktura populací ohrožených horských druhů vrb (*Salix* spp.). - diplomová práce na Katedře botaniky Univerzity Palackého v Olomouci 56p.
- Šafář J. [ed. ] (2003): Olomoucko. – In: Mackovčín P. & Sedláček M. [eds. ], *Chráněná území ČR*, sv. VI. – *Agentura ochrany přírody a krajiny ČR*, Praha.

- Šourek J. (1970): Květena Krkonoš. Český a polský Krkonošský národní park. – *Academia*, Praha: 452 s.
- Tomaselli M. (1991): The snow-bed vegetation in the Northern Apennines. – *Vegetation* 94: 177-189
- Urbanska K. M. & Schütz M. (1986): Reproduction by seed in alpine plants and revegetation research above timber line. – *Botanica Helvetica* 96: 43-60.
- Väre H., Vestberg M. & Eurola S. (1992): Mycorrhiza and root-associated fungi in Spitsbergen. – *Mycorrhiza* 3: 93-104.
- Vašina V. & Zahradníková J. (1999): Revize rozšíření vrby bylinné (*Salix herbacea* L.) v Krkonoších a Hrubém Jeseníku. [Revision of Occurrence of Dwar Willow (*Salix herbacea* L. in the Giant Mts. And Hrubý Jeseník Mts. ] – *Opera corcontica* 36: 153-162.
- Watkinson A.R. & Powell J. C. (1993): Seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity in plant populations – a computer simulation of *Ranunculus repens*. – *Journal of Ecology* 81: 707-717.
- Widén B., Cronberg C. & Widén M. (1994): Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. – *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* 29: 245-263.
- Wijk S. (1986): Influence of climate and age on annual shoot increment in *Salix herbacea*. *Journal of Ecology* 74, 685-692.

## 8. PŘÍLOHY

### Seznam příloh

**Příloha 1: *Salix herbacea* L.** — 1. vrba bylinná a. pupeny; 2. odkvetlé květenství; 3. brzy po vyrašení; 4. sesychající listy vlivem letního počasí; 5. listy napadené fytopatogenem

**Příloha 2: Různá stanoviště *Salix herbacea* L.** — 1. spáry Petrových kamenů, 2. strmá stěna Petrových kamenů, 3. okraje zapojené vegetace (Tabulové skály) 4. porosty mechorostů, Tabulové skály, 5. okraj skal (Tabulové skály); 5. turistický chodník (Černohorský hřeben, Ukrajina), 6. společenstva mechorostů v terénní depresi (Černohorský hřeben, Ukrajina)

**Příloha 3: Lokality *Salix herbacea* v Hrubém Jeseníku.** – 1. Petrovy kameny; 2. Petrovy kameny – skalní římsa; 3. Tabulové skály – lomová stěna; 4. Tabulové kameny

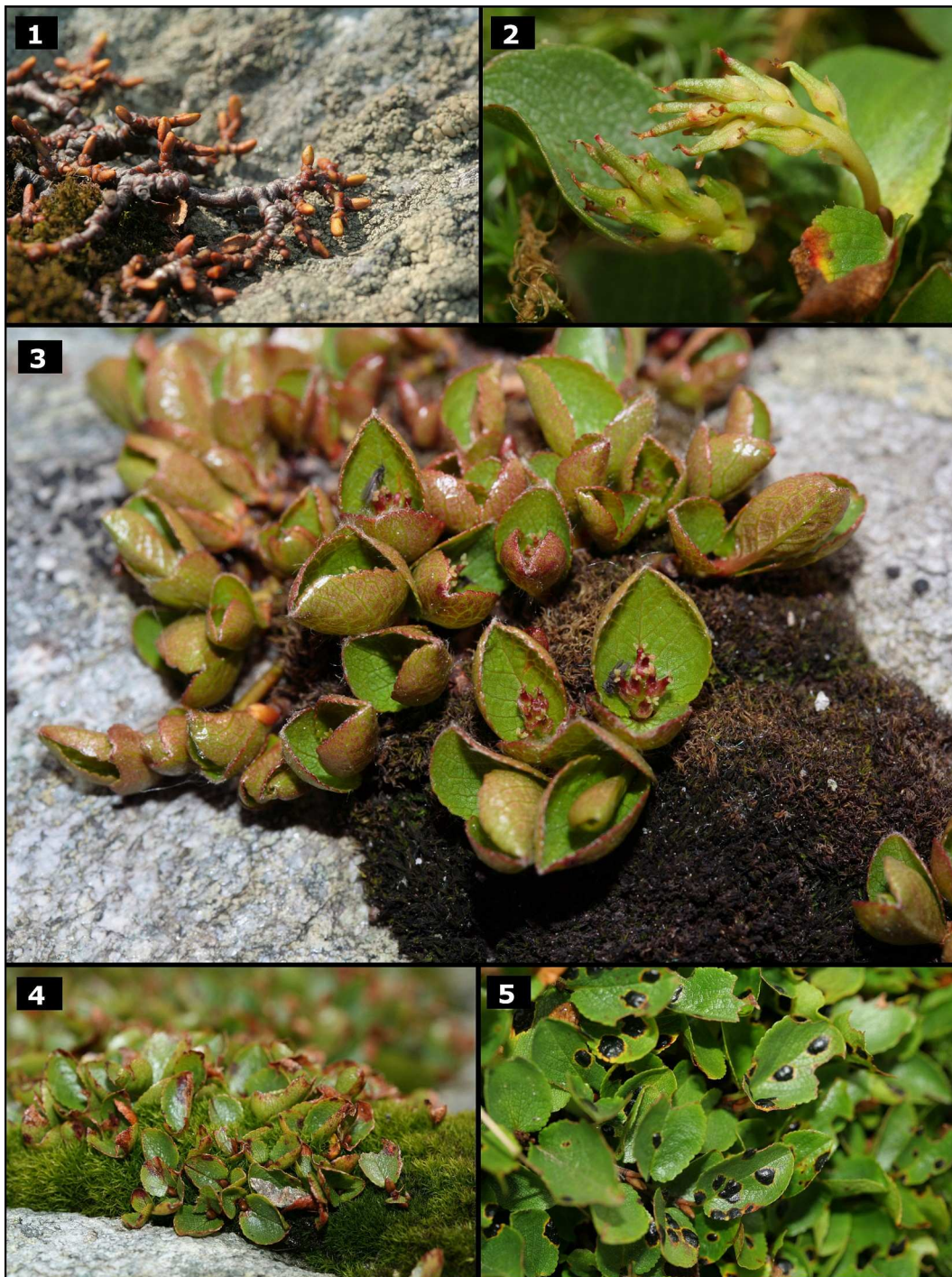
**Příloha 4: Různá stanoviště *Salix herbacea* L.** — 1. Malá Kotelní jáma, 2. a 3. okraje skalek v Malé Kotelní jámě, 4-6. Porosty vrby bylinné na Studniční stěně.

**Příloha 5: Kvalita a koncentrace extrahované genomické DNA vrby bylinné.**  
shj – rostliny původem z Hrubého Jeseníku; shk – rostliny původem z Krkonoš; sht – rostliny původem z Tater; shb – rostliny původem z Bulharska

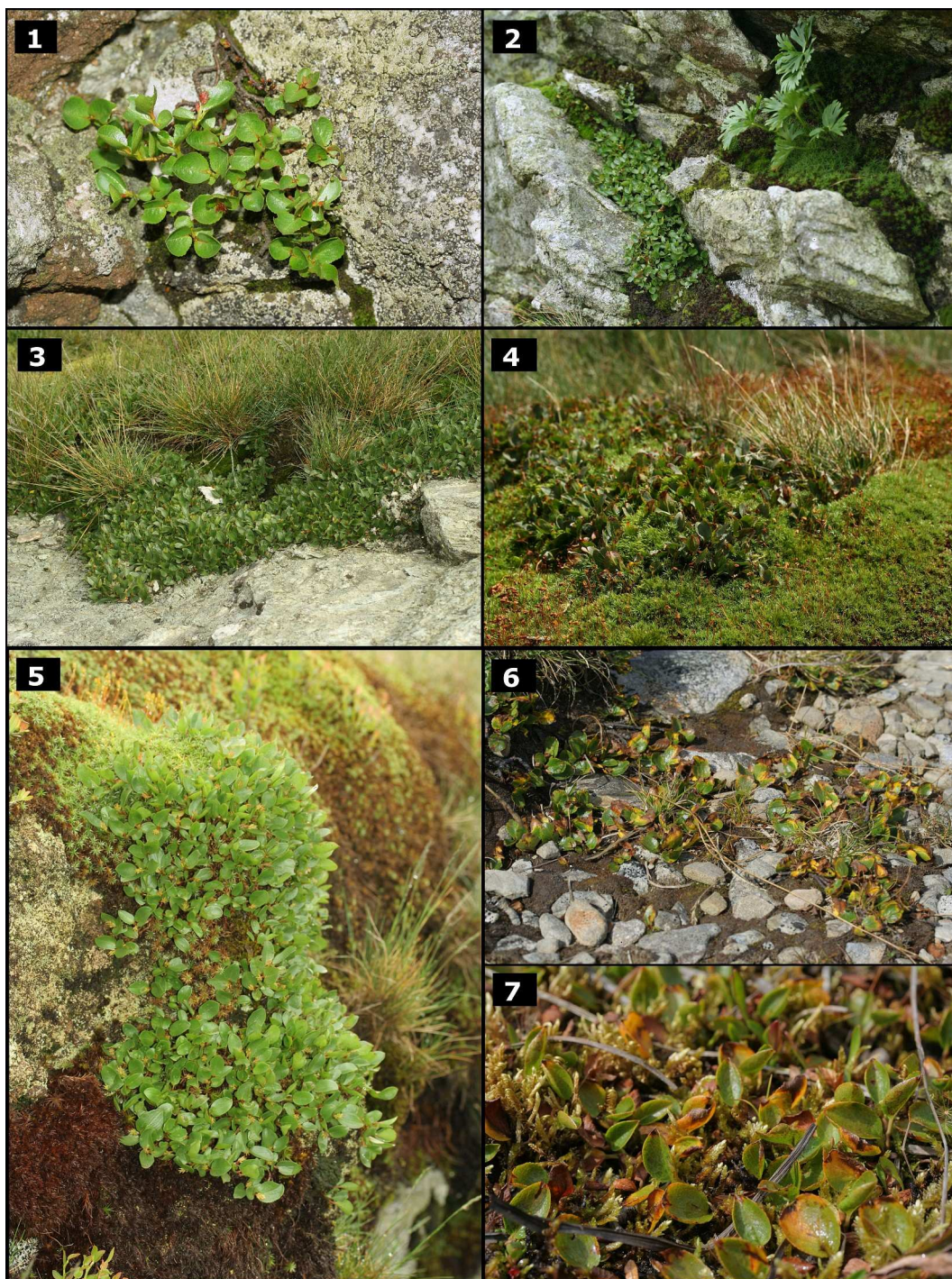
**Příloha 6: Povolení pro výzkum vrby bylinné v CHKO Jeseníky**

**Příloha 7: Povolení výzkumu vrby bylinné na území NP Krkonoše**

**Příloha 1:** *Salix herbacea* L. — 1.vrba bylinná a. pupeny; 2. odkvetlé květenství; 3. brzy po vyrašení; 4. sesychající listy vlivem letního počasí; 5. listy napadené fytopatogenem



**Příloha 2: Různá stanoviště *Salix herbacea* L. — 1. spáry Petrových kamenů, 2. strmá stěna Petrových kamenů, 3. okraje zapojené vegetace (Tabulové skály) 4. porosty mechorostů, Tabulové skály, 5. okraj skal (Tabulové skály); 6. turistický chodník (Černohorský hřeben, Ukrajina), 7. společenstva mechorostů v terénní depresi (Černohorský hřeben, Ukrajina)**

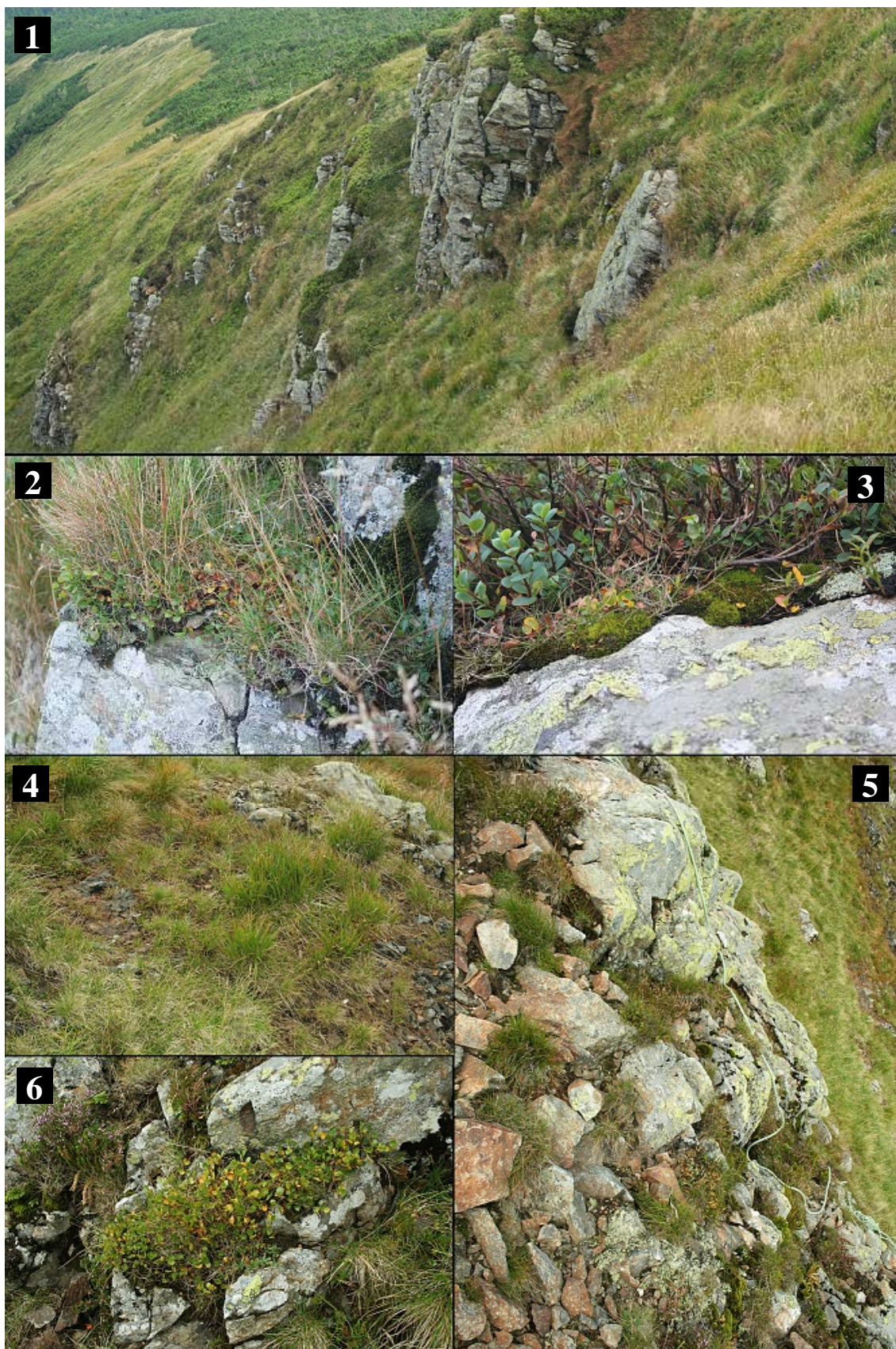




**Příloha 3: Lokality *Salix herbacea* v Hrubém Jeseníku. – 1. Petrovy kameny;  
2. Petrovy kameny – skalní římsa; 3. Tabulové skály – lomová stěna; 4. Tabulové  
kameny**



**Příloha 4: Různá stanoviště *Salix herbacea* L. — 1. Malá Kotelní jáma, 2. a 3. okraje skalek v Malé Kotelní jámě, 4-6. Porosty vrby bylinné na Studniční stěně.**



**Příloha 5: Kvalita a koncentrace extrahované genomické DNA vrby bylinné.**

shj – rostliny původem z Hrubého Jeseníku; shk – rostliny původem z Krkonoš; sht -  
rostliny původem z Tater; shb – rostliny původem z Bulharska

ID vzorku	ng/ul	260/280	ID vzorku	ng/ul	260/280
shj01A	139,17	1,85	shj17A	173,52	1,98
shj01B	408,34	1,94	shj17B	314,77	1,82
shj01C	884,47	1,91	shj18A	696,51	1,94
shj02A	848,35	1,91	shj18B	317,32	1,97
shj02B	171,96	1,69	shj19	542,33	1,91
shj02C	1125,87	1,82	shj20	304,90	1,84
shj03A	88,28	1,83	shj21	789,66	1,95
shj03B	177,76	1,98	shj22	882,50	2,00
shj03C	379,45	1,98	shj23	324,33	2,00
shj04	267,35	1,95	shj24	910,89	1,77
shj05	384,57	1,87	shj25	162,11	1,62
shj06A	540,92	1,90	shj26	326,74	1,96
shj06B	529,31	1,83	shk01	395,18	1,84
shj07	355,73	1,94	shk02	884,75	1,99
shj08A	35,87	1,89	shk03	616,44	2,01
shj08B	77,43	1,94	shk04	721,37	2,00
shj08C	521,35	1,96	shk05	907,00	1,98
shj08D	719,24	1,91	shk06	868,06	1,97
shj08E	118,25	1,98	shk07	522,22	2,11
shj08F	385,28	1,92	shk08	639,10	2,06
shj08G	658,01	1,93	shk09	319,33	1,91
shj09A	304,51	1,96	shk10	734,45	2,11
shj09B	856,68	2,00	shk11	997,96	2,09
shj09C	517,67	1,93	shk12	504,37	2,05
shj10A	575,72	1,99	shk13	388,05	2,13
shj10b	6,20	1,80	shk14	761,47	2,12
shj11A	724,19	1,93	shk15	461,04	2,00
shj11B	295,87	1,98	shk16	914,17	2,12
shj11C	343,97	1,95	shk17	511,,24	2,04
shj12A	586,12	1,96	shk18	508,08	1,99
shj12B	123,22	1,98	shk19	639,55	2,06
shj12C	964,11	2,02	shk20	555,40	1,91
shj12D	1021,86	1,92	shk21	397,59	2,03
shj13A	707,77	1,97	shk22	1855,76	1,98
shj13B	1066,05	1,94	shk23	320,68	1,67
shj13C	358,47	1,95	shk24	171,10	175,00
shj13D	681,11	2,01	shk25	299,07	1,91
shj14	61,55	1,06	shk26	627,16	2,05
shj15A	48,13	1,41	shk27	292,76	1,98
shj15B	217,74	1,99	shk28	879,46	2,02
shjr15C	2,23	5,91	shk29	631,73	2,04
shj15D	598,58	1,87	shk30	457,49	2,04
shj15E	555,78	1,93	shk31	518,38	2,07
shj16	164,99	1,91	shk32	338,56	2,04

ID vzorku	ng/ul	260/280	ID vzorku	ng/ul	260/280
shk33	220,52	2,00	shk60	571,71	1,74
shk34	427,22	1,99	shk61	432,53	2,01
shk35	215,84	1,87	shk62	136,23	2,02
shk36	631,48	2,04	shk63	211,10	1,75
shk37	432,51	1,99	shk64	566,88	2,12
shk38	998,41	1,99	shk65	522,99	2,02
shk39	427,22	1,99	shk66	552,64	2,03
shk40	817,00	2,13	shk67	266,24	1,96
shk41	148,75	1,82	shk68	439,19	1,98
shk42	182,52	1,81	shk69	340,49	1,97
shk43	243,01	1,75	shk70	156,11	1,97
shk44	209,03	1,79	shk71	250,96	2,03
shk45	189,23	1,69	shk72	575,95	2,09
shk46	687,45	1,94	shk73	421,16	2,03
shk47	77,64	1,83	shk74	319,19	1,92
shk48	321,73	1,92	shk75	271,34	1,99
shk49	280,79	1,93	shk76	498,81	2,03
shk50	190,17	1,90	shk77	192,16	1,96
shk51	196,31	1,80	shk78	504,29	2,04
shk52	260,46	1,90	sht79	227,11	1,87
shk53	151,08	1,74	sht80	794,33	2,12
shk54	279,31	1,90	sht81	303,04	1,98
shk55	492,02	1,98	sht82	388,66	2,06
shk56	139,65	1,70	sht83	492,46	1,93
shk57	340,10	1,90	shb84	412,49	1,94
shk58	198,06	1,89	shb85	317,75	1,95
shk59	228,86	1,93	shb86	220,76	1,86

## Příloha 6: Povolení k výzkumu vrby bylinné v CHKO Jeseníky



Agentura ochrany přírody a krajiny České republiky  
SPRÁVA CHRÁNĚNÉ KRAJINNÉ OBLASTI  
JESENÍKY

Šumperská 93  
790 01 Jeseník  
tel. : 584 458 659  
fax: 584 458 646  
jeseniky@nature.cz  
www.jeseniky.nature.cz

dle rozdělovníku

NAŠE Č.J.: 125/JS/11

VYŘIZUJE: Mgr. Radek Štencel

V JESENÍKU DNE: 10.2.2011

**Věc:** Rozhodnutí ve věci povolení výjimek

- výjimka ze základních ochranných podmínek NPR Praděd a NPR Šerák - Keprník dle § 43 odst. 3 zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny v platném znění  
- výjimka ze základních podmínek ochrany zvláště chráněných kriticky ohrožených druhů rostlin vrby bylinné (*Salix herbacea*) a vrby laponské (*Salix lapponum*) dle § 56 odst. 1 a 2 zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny v platném znění

*Týká se:* Vstup mimo cesty vyznačené se souhlasem orgánu ochrany přírody a odběr částí rostlin z populací vrby bylinné (*Salix herbacea*), vrby laponské (*Salix lapponum*), vrby hrotolisté (*Salix hastata*) a dalších běžnějších druhů vrb, případně kříženců uvedených druhů s běžnějšími druhy

**Žadatelé:** RNDr. Radim J. Vašut, nar. 30.10.1976, U Letiště 10, 778 00 Olomouc  
Mgr. Blanka Brandová, nar. 12.12.1985, Smetanova 518, 534 01 Holice  
Bc. Jan Ševčík, nar. 26.12.1986, Kollárova 494, 517 54 Vamberk  
Bc. Michal Hroneš, nar. 14.3.1987, Blahoslavova 1038, 500 03 Hradec Králové

### ROZHODNUTÍ

#### Výrok

Správa CHKO Jeseníky (dále jen „Správa“) jako orgán státní správy věcně a místně příslušný podle ustanovení § 78 odst. 1 a 2 zákona č.114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, v platném znění (dále jen „zákon“) a podle vyhlášky MŽP č. 46/2010 Sb., o příslušnosti správ NP a správ CHKO k výkonu státní správy ve správních obvodech tvořených NPR, NPP a jejich ochrannými pásmy, na základě žádosti RNDr. Radima J. Vašuta, Ph.D. a týmu studentů PřF UP Olomouc pod jeho vedením („žadatelé“) doručené Správě dne 18.1.2011, po provedeném správním řízení podle zákona č. 500/2004 Sb., správní řád, v platném znění (dále jen „správní řád“)

#### rozhodla

tak, že:

**I. výjimka z ustanovení § 29 písm. d) a i) zákona** pro vstup mimo cesty vyznačené se souhlasem orgánu ochrany přírody na území NPR Praděd a NPR Šerák-Keprník a pro odběr částí rostlin rodu *Salix* z lokalit v rámci NPR Šerák-Keprník a NPR Praděd **se podle § 43 odst. 3 zákona povoluje** za předpokladu splnění níže uvedených podmínek.

**II. výjimka z ustanovení § 49 odst. 1 zákona** pro zásah do biotopu a přirozeného vývoje zvláště chráněných kriticky ohrožených druhů rostlin vrby bylinné (*Salix herbacea*) a vrby laponské (*Salix lapponum*) **se podle § 56 odst. 1 a 2 zákona povoluje** za předpokladu splnění níže uvedených podmínek.

IČ: 62933591  
DS: 9ttidy9

Bankovní spojení ČNB Praha 1  
číslo účtu: 18228-011/0710

radek.stencel@nature.cz  
tel.: 584 458 645

G:\56\_ochrana\5618\_vyjimky\2011\125JS11\_R\_Salix.doc

1. Výjimka z ustanovení § 29 písm. d) zákona pro vstup mimo cesty vyznačené se souhlasem orgánu ochrany přírody na území NPR Praděd a NPR Šerák-Keprník se povoluje pouze žadatelům a to jen za účelem revize recentně existujících a historicky udávaných lokalit horských druhů vrby, které jsou předmětem výzkumu žadatelů (vrba bylinná (*Salix herbacea*), vrba laponská (*Salix lapponum*), vrba hrotolistá (*Salix hastata*) a její kříženci) a za účelem odběru částí rostlin rodu *Salix* dle podmínky 2. tohoto rozhodnutí.

2. Výjimka z ustanovení § 29 písm. i) a výjimka z ustanovení § 49 odst. 1 zákona pro odběr částí rostlin rodu *Salix* vyskytujících se na území obou jmenovaných NPR se vztahuje rovněž pouze na žadatele.

- v rámci výzkumu se povoluje odběr částí rostlin vrby hrotolisté (*Salix hastata*) a jejich kříženců s běžnějšími druhy vrby v rozsahu nutném pro molekulární studie genetické diverzity a sběr malého množství herbářových položek nutných pro dokumentaci druhů z jednotlivých lokalit. Odběrem částí rostlin nesmí dojít k jejich závažnému poškození nebo ke zničení jedince, z něž bude materiál odebírán.

- odběr částí rostlin vrby bylinné (*Salix herbacea*) a vrby laponské (*Salix lapponum*) se povoluje pouze v nezbytně nutném rozsahu pro účely výzkumu genetické diverzity (odběr malého množství listů, případně semeníků z vybraných rostlin). Herbářové položky vrby bylinné (*Salix herbacea*) z lokalit Petrovy kameny a Tabulové kameny nebudou pořizovány, z populace vrby laponské (*Salix lapponum*) u Tabulových kamenů je možné pořídit max. 3 herbářové doklady.

3. Všechny zjištěné populace zájmových druhů budou lokalizovány pomocí GPS, bude zaznamenána velikost populace a zastoupení pohlaví ve studovaných populacích. Údaje o zaznamenaném rozšíření studovaných druhů a zjištěných kříženců budou poskytnuty Správě CHKOJ. Všechny pořízené herbářové položky budou uloženy ve veřejně přístupném herbáři, Správa bude informována o místě jejich uložení.

4. Při pohybu mimo značené stezky na území NPR budou co nejvíce šetřeny veškeré přírodní složky prostředí, během pohybu v území nesmí dojít k narušení a ohrožení rostlinných a živočišných společenstev, s výjimkou odběru částí rostlin rodu *Salix* nebude nijak zasahováno do biotopů a přirozeného vývoje zvláště chráněných druhů rostlin a živočichů.

Při pohybu v terénu mimo značené stezky je žadatel povinen se na požádání prokázat povolenou výjimkou.

5. Termíny a místa předpokládaných vstupů do NPR budou alespoň 3 dny před vlastní návštěvou oznámeny Správě. Správa může v případě kolize se zájmy ochrany přírody v daném území (např. hnízdění ptáků) touto výjimkou povolenou činnost v konkrétním místě omezit.

6. Každoročně po dobu platnosti výjimky, nejpozději do 31.3. následujícího roku bude zaslána Správě CHKO Jeseníky dílčí zpráva o výsledcích výzkumu (nejlépe v elektronické podobě). Závěrečnou zprávu o výsledcích výzkumu žadatel předá nejpozději k 31.3. 2016 Správě CHKO Jeseníky a zašle ji do Ústředního seznamu ochrany přírody.

Veškeré další výstupy z výzkumu (obhájené diplomové a dizertační práce, publikované články atd.) budou rovněž poskytnuty Správě CHKO Jeseníky.

7. Výjimka se povoluje s platností do 31.12. 2015.

#### **Odůvodnění**

Dne 18.1. 2011 byla na Správu CHKO Jeseníky doručena žádost RNDr. Radima J. Vašuta, PhD. a týmu studentů PříF UP Olomouc zabývajících se výzkumem vysokohorských druhů vrby o povolení výjimek ze základních ochranných podmínek NPR Praděd a NPR Šerák-

Keprník a o povolení výjimky ze základních podmínek ochrany zvláště chráněných kriticky ohrožených druhů rostlin vrby bylinné (*Salix herbacea*) a vrby laponské (*Salix lapponum*).

Dnem doručení žádosti bylo zahájeno správní řízení ve věci povolení výjimek ze zákazu vstupu mimo cesty vyznačené se souhlasem orgánu ochrany přírody na území NPR Praděd a NPR Šerák-Keprník, výjimky ze zákazu sbírat rostliny na území uvedených NPR a výjimky ze základních ochranných podmínek zvláště chráněných kriticky ohrožených druhů rostlin vrby bylinné (*Salix herbacea*) a vrby laponské (*Salix lapponum*).

Zahájení správního řízení bylo dne 21.1. 2011 oznámeno všem známým účastníkům řízení. Na úřední desce Správy CHKO Jeseníky (elektronické i standardní) bylo oznámení o zahájení správního řízení vyvěšeno dne 21.1.2011 a sejmuto dne 31.1. 2011. Do správního řízení se nepřihlásilo žádné občanské sdružení. V rámci správního řízení o povolení výjimek se k záměru vyjádřily obce Jindřichov (vyjádření evidováno 26.1. 2011 pod č.j. 179/JS/11) a Lipová-lázně (evidováno pod č.j. 178/JS/11 ze dne 25.1. 2011). Obě obce vyjádřily jako účastníci řízení dle § 27 odst. 3 správního řádu ve spojení s § 71 odst. 3 zákona souhlas s povolením výjimek, obec Jindřichov bez připomínek či námitek, obec Lipová-lázně za předpokladu „citlivého a šetrného provádění všech činností, tak, aby nedošlo k poškozování přírodního prostředí a biotopů zvláště chráněných druhů rostlin a živočichů“. Podmínky stanoviska obcí jsou zohledněny ve výrokové části rozhodnutí.

Uvedené výjimky jsou požadovány za účelem zpracování studií věnovaných v ČR vzácným vysokohorským druhům vrb. Cílem studií je především doplnit chybějící informace o genetické diverzitě jeseníckých populací studovaných druhů a určit míru hybridizace a introgrese s běžnějšími druhy vrb na lokalitách. Rostliny budou sledovány rovněž ve vztahu k zastoupení pohlaví ve studovaných populacích. Výzkumem získaná data by měla přispět k hlubšímu poznání těchto druhů a vyústit v praktická doporučení pro jejich ochranu.

Plánovaná studie je založena na návštěvě lokalit, na kterých se studované druhy vyskytují nebo v minulosti vyskytovaly, identifikaci rostlin v terénu, rozlišení rodičovských a hybridních taxonů, odběru malého množství listů z vybraných rostlin pro molekulární studie genetické diverzity a sběru malého množství herbariových položek nutných pro dokumentaci druhů z lokalit.

Výjimka ze zákazů uvedených v § 29 písm. d) a i) byla podle § 43 odst. 3 povolena v zájmu ochrany přírody, protože realizace plánovaného výzkumu by měla přinést další poznatky o studovaných druzích využitelné pro jejich další ochranu, povolovaná činnost zároveň nebude mít za předpokladu dodržení podmínek rozhodnutí významný vliv na zachování stavu a předmětu ochrany NPR Praděd a NPR Šerák-Keprník.

Výjimka ze zákazu uvedeného v § 49 odst. 1 zákona byla podle § 56 odst. 2 písm. d) zákona povolena pro účely výzkumu a vzdělávání, odběr 3-5 listů (případně několika semeníků) z rostlin vrby bylinné (*Salix herbacea*) na lokalitách Petrovy kameny a Tabulové kameny nebude mít negativní vliv na místní populace tohoto druhu. Rovněž odběr listů k izolaci DNA pro molekulárně genetické studie a pořízení max. 3 herbariových dokladů z populace vrby laponské (*Salix lapponum*) z lokality u Tabulových kamenů nebude mít na místní populaci druhu negativní vliv. Výsledky výzkumu by pak měly přispět nejen k hlubšímu poznání studovaných druhů, ale také vyústit v praktická doporučení pro jejich ochranu.

Po zhodnocení výše uvedených důvodů dospěla Správa k závěru, že záměr žadatele není v rozporu se zákonnými podmínkami pro povolení výjimky, proto rozhodla tak, jak je uvedeno ve výroku.

Nedodržení stanovených podmínek může být důvodem ke zrušení rozhodnutí podle § 84 odst. 1 písm. c) zákona a zahájení sankčního řízení dle § 87 zákona.

Poučení o odvolání:

Proti tomuto rozhodnutí se lze podle § 81 odst. 1 správního řádu odvolat do 15 dnů od doručení k MŽP podáním u Správy CHKO Jeseníky, Šumperská 93, 790 01 Jeseník. K odvolání se přiloží takový počet stejnopisů, který odpovídá počtu účastníků řízení, jinak je vyhotoví správní orgán na náklady odvolatele. V odvolání se uvede v jakém rozsahu se rozhodnutí napadá a dále namítaný rozpor s právními předpisy nebo nesprávnost rozhodnutí nebo řízení, jež mu předcházelo. Včas podané a přípustné odvolání má odkladný účinek.



Ing. Jan Halfar

VEDOUcí SPRÁVY



**Rozdělovník:**

účastník řízení dle § 27 odst. 1 správního řádu:

RNDr. Radim J. Vašut, Katedra botaniky PřF UP Olomouc, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc  
a studenti PřF UP Olomouc pod jeho vedením uvedení jako žadatelé

účastník řízení dle § 27 odst. 3 správního řádu ve spojení s § 71 odst. 3 zákona:

- Obec Bělá pod Pradědem
- Obec Loučná nad Desnou
- Obec Malá Morávka
- Město Vrbno pod Pradědem
- Obec Lipová – lázně
- Obec Ostružná
- Obec Jindřichov
- LČR, s.p., LS Jeseník, Zámecké nám.2, 790 01 Jeseník
- LČR, s.p., LS Loučná, Kociánov 37, 788 11 Loučná nad Desnou
- LČR, s.p., LS Janovice, Zámecká 2, 793 42 Janovice
- LČR, s.p., LS Karlovice, 793 23 Karlovice 134
- LČR, s.p., LS Hanušovice, Osvobození 251, 788 33 Hanušovice
- LČR, s.p., LS Javorník, Lidická 96, 790 70 Javorník

**na vědomí po nabytí právní moci:**

- Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Nuselská 36, 140 00 Praha 5
- Česká inspekce životního prostředí, Ol Olomouc, OOP, Tovární 41, 772 00 Olomouc



## Příloha 7: Povolení k výzkumu vrby bylinné na území NP Krkonoše

Další záznamy Správy Krkonošského národního parku.

Povolení vystaveno na základě Rozhodnutí Správy KRNP č.j. 03948/2011 ze dne 24.5.2011. Povolení odběr minimálního množství rostlinného materiálu. Povolení je přenosné na Bc. Jana Ševčíka.



### SPRÁVA KRKONOŠSKÉHO NÁRODNÍHO PARKU

Dobrovského 3, Vrchlabí  
telefon: 499 456 211



## POVOLENÍ

výzkumné činnosti na území Krkonošského národního parku a ve zvláště chráněných územích jeho ochranného pásma

Číslo: 58/2011

Střediska TES:  
Pec pod Sněžkou tel. 499 896 213  
Spindlerův Mlýn tel. 499 433 228  
Harrachov tel. 481 529 188

Veškeré využití národních parků musí být podřízeno zachování a zlepšení přírodních poměrů a musí být v souladu s vědeckými a výchovnými cíli sledovanými jejich vyhlášením (§ 15, odst. 2 zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny).

Správa Krkonošského národního parku vydává ve smyslu ustanovení § 73, odst. 2 zákona č. 114/1992 Sb. povolení výzkumné činnosti pro:

Jméno, adresa:

RNDr. Radim Jan VAŠUT Ph.D.

UP Olomouc, PřF, Katedra botaniky  
Šlechtitelů 11, OLOMOUČ, 78371

Lokalita výzkumu:

Kotelní jámy a Studniční hora

Za účelem:

Poměr pohlaví a genetické diverzity populací vrby bylinné v Krkonoších

Platnost povolení od: 8.6.2011 do: 31.12.2013

Ing. Jan Hřebáčka  
ředitel Správy  
Krkonošského národního parku



### Povolení se vydává za těchto podmínek:

1. Budou důsledně dodržována příslušná ustanovení zák. č. 114/1992 Sb. a Návštěvního řádu Krkonošského národního parku s výjimkou těch, která by znemožňovala provádění výzkumné činnosti. Bude šetřena příroda NP, povolenou činností nebude způsobena žádná škoda, ani nebude prováděna činnost nad rozsah a vymezení uvedené v povolení.
2. Z bezpečnostních a kontrolních důvodů bude každý vstup (návštěva) na území NP hlášen písemně, případně telefonicky, na příslušném středisku TES Správy Krkonošského národního parku s udáním časového rozmezí provádění povolené činnosti.
3. Po ukončení prací v běžném kalendářním roce zašle držitel povolení krátkou zprávu o své činnosti na oddělení ochrany přírody Správy KRNP.
4. Další podmínky:

### Poučení:

Správa Krkonošského národního parku si vyhrazuje právo upravit nebo doplnit uvedené podmínky i během výkonu povolené činnosti.

Povolení k výzkumné činnosti je nepřenosné na jinou osobu a při kontrole orgány ochrany přírody Krkonošského národního parku, Policií ČR je povinností držitele se jím prokázat. V případě nedodržení uvedených podmínek bude toto povolení zrušeno bez náhrady a z přestupků vyzvozeno blokové nebo správní řízení.