

**Struktura společenstev herbivorního hmyzu
externě žeroucího na vrbách**



Martin Volf

2010

Bakalářská diplomová práce
školitel: Mgr. Jan Hrček

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE

Volf, M. (2010) **Struktura společenstev herbivorního hmyzu externě žeroucího na vrbách.** (Community structure of leaf-chewing insect on willows, Bc. Thesis, in Czech) - 42 pp. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE

The communities of leaf-chewing insect on willows were studied. The effect of host-plant phylogeny, leaf morphology and secondary metabolites on community structure was examined.

Práce vznikla za podpory studentského grantu SGA PřF JU 2009

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 27.4.2010

.....
Martin Volf

Poděkování

Děkuji všem, bez jejichž pomoci a podpory by tato práce nemohla vzniknout.

Byli to především R. Čtvrtečka, V. Hypša, R. Julkunen-Tiitto, J. Koblížek, J. Lepš, J. Macek, K. Nováková, V. Novotný, L. Sekerka, M. Štech, J. Šumpich, K. Těšitel, M. Zapletal a v neposlední řadě má rodina, přátelé a Anička.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Vztah rostlina herbivorního hmyzu	1
1.2 Obranné mechanismy rostlin proti herbivornímu hmyzu	3
1.3 Vrby a jejich chemická obrana proti herbivornímu hmyzu	8
1.4 Trichomy vrb a jejich vliv na herbivory	11
1.5 Hybridizace vrb a její dopad na složení společenstev herbivorů	12
1.6 „Leaf-chewers“ na vrbách	13
1.7 Cíle práce	15
2. Metodika	16
2.1 Hybridizace vrb	16
2.2 Zkoumané druhy vrb	16
2.3 Výzkumné plochy	17
2.4 Sběr a určování hmyzu	17
2.5 Akumulační křivky druhů a podobnost herbivorních společenstev	18
2.6 Sezónní trendy	18
2.7 Chemické složení listů	19
2.8 Morfologie listů	19
2.9 Molekulární data a fylogenetické analýzy	20
2.10 Porovnání matic nepodobností	23
2.11 Mnohorozměrné analýzy	23
3. Výsledky	25
3.1 Sběr a determinace hmyzu	25
3.2 Akumulační křivky druhů	26
3.3 Sezónní trendy	27
3.4 Molekulární analýzy	27
3.5 Porovnání matic nepodobností	29
3.6 Mnohorozměrné analýzy	30
4. Diskuze	32
5. Použitá literatura	38

1. Úvod

1.1 Vztah rostlin a herbivorního hmyzu

Studium specializace herbivorního hmyzu a jeho ekologických vztahů s rostlinami patří mezi jeden z klasických modelů výzkumu v biologii. Je to dáno velkým významem obou skupin. Rostliny mají největší objem celkové biomasy a hmyz je nejpočetnější skupinou mnohobuněčných organismů na zemi (Schoonhoven, van Loon & Dicke, 2005). Důležitost herbivorie z ekologického hlediska a její dopad na rostliny dále demonstruje fakt, že asi 10% globální primární produkce rostlin je zkonzumováno herbivory (Coupe & Cahill, 2003), což zhruba odpovídá množství energie uložené v rostlinné biomase investované rostlinami do rozmnožování (Mooney, 1972). Herbivorií je pak poškozeno až 87% listů (Damman, 1993). Studium herbivorie a specializace herbivorního hmyzu má i praktické využití v zemědělství, protože herbivorní hmyz se svou činností podílí na 15% ztrát celosvětové úrody zemědělských plodin (Schoonhoven *et al.*, 2005).

Poznatky o vztazích rostlin a hmyzích herbivorů jsou aplikovatelné i v jiných oblastech biologie. Během posledních tří desetiletí jsme byli svědky snahy odhadnout celkový počet druhů organismů na naší planetě. Diverzita členovců byla Erwinem (1982) odhadnuta na 31 milionů druhů. Toto vysoké číslo vzbuzovalo od začátku velké emoce. Část ochránců přírody ho přijímala s nadšením, naopak nemalé procento vědecké obce a zvláště pak taxonomové se k tomuto číslu stavěli se značnou nedůvěrou. Jejich výsledky totiž podporovaly hypotézu, že celkový počet druhů hmyzu je nižší než deset milionů (Gaston, 1991). Do celého problému tak bylo vneseno další světlo až na základě rozsáhlého výzkumu specializace tropického herbivorního hmyzu, kdy byla celková diverzita členovců odhadnuta na 4 až 6 milionů druhů (Novotny *et al.*, 2002).

Studium specializace hmyzích herbivorů také přináší zajímavé poznatky z oblasti evoluční biologie. Na herbivorním hmyzu jsou dobře dokumentovatelné různé modely speciace. Kromě klasické allopatrické speciace způsobené izolací populací na větší vzdálenosti až stovek kilometrů, jejímž dobře prostudovaným příkladem mohou být mandelinky rodu *Oreina* (Dobler *et al.*, 1996), jsou zvláštním případem různé minující a hálkotvorné druhy, které žijí po mnoho generací pouze na jednom stromě. U takových druhů byla zjištěna genetická divergence i mezi populacemi z jednotlivých stromů v rámci jediné lokality. Navíc byla zaznamenána i jakási specializace na daného jedince stromu, kdy se jedincům přeneseným na jiný strom, byť stejného druhu a na stejné lokalitě, dařilo podstatně

hůře (Mopper, 1996). U herbivorního hmyzu byly odhaleny i příklady sympatrické speciace, jednoho z nejzajímavějších fenoménů evoluční biologie. Konkrétně se jedná například o vrtule rodu *Rhagoletis*, u kterých došlo k behaviorální izolaci populací, protože se každý druh páří na jiném druhu ovoce, ačkoliv v umělých podmínkách jsou stále schopny hybridizace (Frey & Bush, 1990). U stejného rodu byla též pozorována allochronie, kdy došlo k izolaci populací dvou sesterských druhů, které se v přírodě každý rozmnožují každý v jinou dobu, čímž je křížení populací značně omezeno (Bush, 1975).

Na příkladu výše zmíněných minerů a vrtulí, je vidět, že specializace na živnou rostlinu může ovlivnit speciaci herbivorního hmyzu. Ke speciaci tak dochází v podstatě ze dvou důvodů: buď propojením preference určitého zdroje s výběrem partnera, nebo ostrůvkovitým rozmístěním zdroje v prostoru, což následně zvyšuje pravděpodobnost izolace populací (Janz, Nylin & Wahlberg, 2006).

Většina herbivorního hmyzu je specializovaná a jen méně než 10% druhů se živí rostlinami z více jak tří čeledí (Bernays & Graham, 1988). Relativně vysoká míra specializace tak znamená, že alespoň v některých případech byla tato specializace spojena se speciací. Speciace herbivorů je ovlivňována vlastnostmi rostlin. Otázkou zůstává, zda a do jaké míry je naopak speciace rostlin ovlivňována herbivory. Problematikou koevoluce rostlin a herbivorního hmyzu se zabývá řada vědeckých prací. Ehrlich & Raven (1964) považovali dnešní stav hostitelské specializace za výsledek postupné koevoluce hostitelských rostlin a herbivorního hmyzu. V jejich podání se rostliny snaží diverzifikovat svou obranu proti herbivorům. Pokud se jim to podaří a dojde ke správné mutaci, změní se jejich obranné vlastnosti, nejčastěji si vytvoří komplexnější sekundární metabolity. Tím uniknou herbivorii a dostanou se do nové adaptivní zóny, kde pak může dojít k jejich radiaci. Hmyz je nicméně schopen se časem na nové sekundární metabolity přizpůsobit, a pokud se mu to podaří, obsadí novou niku a může i u něj následně dojít k radiaci. Tímto procesem autoři vysvětlovali například skutečnost, že příbuzní motýli žijí na příbuzných živých rostlinách.

Nicméně téma koevoluce herbivorů s rostlinami je poměrně kontroverzní a názory na její způsob a průběh se různí. Problematická situace je například i u hlavní radiace motýlů a krytosemenných rostlin. Není totiž jasné, zda hlavní radiace obou skupin proběhly zhruba ve stejné době a mohlo tak dojít k vzájemnému ovlivnění speciace, potažmo ke koevoluci. Panuje shoda, že k hlavní radiaci krytosemenných rostlin došlo před 130–90 miliony let (Crane, Friis & Pedersen, 1995). Je to tak částečně i díky dobrým fosilním podkladům. Oproti tomu je doba diverzifikace motýlů značně nejistá (Wheat *et al.*, 2007). Pro motýly totiž velkou měrou chybí fosilní nálezy, což značně ztěžuje dobu jejich radiace správně odhadnout

(Braby, Trueman & Eastwood, 2005; Labandeira & Sepkoski, 1993). Zatímco část autorů tak případnou koevoluci krytosemenných rostlin a motýlů připouští (Braby *et al.*, 2005), další autoři s ní zásadně nesouhlasí kvůli možnému pozdějšímu vzniku motýlů, který by znemožnil přímou interakci obou skupin během jejich radiace (Janz & Nylin, 1998; Labandeira *et al.*, 1993).

Další výtkou koevoluční teorii je námitka, že ačkoliv rostliny herbivorní hmyz silně ovlivňují a mohou tak být zodpovědné za jeho speciaci, není naopak hmyz příliš silným selekčním faktorem, který by dokázal ovlivňovat speciaci rostlin, protože nedokáže významně ovlivnit jejich fitness (Bernays, 1998; Jermy, 1984). Proti tomuto tvrzení se nicméně dá najít celá řada argumentů. Hmyz je chopen velmi silně selektovat rostliny na základě jejich chemického složení a jedince s nižším obsahem obranných látek efektivně likvidovat (Becerra, 2007), nebo v kombinaci s abiotickými podmínkami ovlivňovat areály rozšíření celých druhů (Fine, Mesones & Coley, 2004). Dozajista oprávněná je však námitka, že kromě herbivorního hmyzu je evoluce rostlin ovlivňována celou řadou dalších silných selekčních faktorů – zvláště patogenů a savčích herbivorů (Schoonhoven *et al.*, 2005). Navíc i herbivoři jsou ovlivňováni i jinými faktory než jsou sekundární metabolity rostlin, zejména predací (Bernays *et al.*, 1988). Tomu, že koevoluce nebude vždy fungovat ve smyslu práce Ehrlich & Raven (1964), odpovídá i fakt, že důkazy pro ni se u listožravého hmyzu našly jen v omezeném množství případů (Mitter, Farrell & Futuyma, 1991). Jedním z nich je rod mandelinek *Phyllobrotica* žijící na hluchavkovitých rostlinách, u kterých byla prokázána kongruence jejich fylogeneze s fylogenezí hostitelských rostlin (Farrell & Mitter, 1990). Nicméně sami autoři této studie připouští, že k tomuto výsledku mohlo dojít i sekvenční evolucí, kdy hmyz napadne linii živných rostlin po jejich radiaci a následně svou speciací sleduje průběh evoluce rostlin a jejich důležité vlastnosti, ale samotnou evoluci neovlivňuje.

Ať už ale evoluce proběhla podle jakéhokoliv modelu, jsou pro speciaci a specializaci herbivorního hmyzu důležité některé vlastnosti rostlin, zvláště jejich chemické složení nebo morfologie povrchu listů.

1.2 Obranné mechanismy rostlin proti herbivornímu hmyzu

Význam sekundárních metabolitů rostlin zdůrazňovali již Ehrlich a Raven (1964). Názor, že chemické složení je pro specializaci herbivorů zcela klíčové zastává i řada dalších autorů (Becerra, 1997; Janz *et al.*, 1998; Ricklefs, 2008; Roslin & Salminen, 2008; Wahlberg,

2001). Sekundární metabolity můžeme obecně rozdělit na dvě kategorie – kvalitativní a kvantitativní.

Kvalitativní obrana je představována relativně jednoduchými sloučeninami vznikajícími z malého množství prekurzorů, hlavně z acetyl-koenzymu A a aminokyselin (Schoonhoven *et al.*, 2005). Produkce těchto metabolitů je tak poměrně rychlá, ale zato energeticky náročná (Schoonhoven *et al.*, 2005). Jedněmi z nejvýznamnějších jsou alkaloidy, které jsou přítomné u 20% všech krytosemenných rostlin (Schoonhoven *et al.*, 2005). Dalšími významnými skupinami jsou terpenoidy, steroidy, fenolické sloučeniny, glukosinoláty a kyanogenní sloučeniny. Tyto látky jsou obecně účinné zejména proti generalistickým herbivorům, zatímco specialisté jsou schopní se na ně přizpůsobit a v některých případech z nich dokonce těžit a využívat je. Látky sloužící původně k ochraně před herbivorním hmyzem a patogeny tak mohou naopak specializované herbivory k žíru stimulovat a dále je zvýhodňovat, například sloužit k jejich obraně před predátory (Bowers, 1983; Poprawski, Greenberg & Ciomperlik, 2000; Rank, 1992; Rank *et al.*, 1998).

Kvantitativní obrana je nejčastěji představována látkami jako je celulóza nebo lignin, jejichž hlavní funkcí je vyztužovat rostlinná pletiva, ale které zároveň snižují stravitelnost potravy pro herbivory. Častou formou obrany jsou také taniny, které sráží ve střevě hmyzu bílkoviny, čímž dále snižují stravitelnost. Zajímavým případem je přítomnost hydrátu oxidu křemičitého v listových pletivech některých čeledí rostlin (typicky *Poaceae*, *Cyperaceae*, *Palmae*), který je zodpovědný za obrušování mandibulárních zoubků herbivorů. To následně vede ke snížené efektivitě požívání potravy, hladovění až smrti. Tradičně se věřilo, že vytvořit kvantitativní obranné metabolity v dostatečném množství k obraně určitého pletiva trvá rostlině sice dlouho, ale pak je tato obrana účinná jak proti generalistům, tak proti specialistům, protože se na ni herbivorní hmyz v podstatě nemůže přizpůsobit (Feeny, 1976). Objevují se však důkazy, že tomu tak není a herbivorní hmyz je schopen se na kvantitativní obranu, konkrétně na taniny (Roslin *et al.*, 2008) nebo hydrát oxidu křemičitého (Bernays, 1986), přizpůsobit také.

Kromě výše zmíněné kvalitativní a kvantitativní obrany představuje pro herbivory problém také samotné složení rostlinných pletiv. Oproti predátorům, kteří jsou schopni svoji potravu využít až z 80%, mohou herbivoři využít jen 40-50% potravy (Slansky & Scriber, 1985). Rostliny totiž mají ve svém těle zcela odlišné zastoupení jednotlivých látek důležitých pro hmyz. Zcela klíčový je například obsah dusíku, kterého je v rostlinné stravě relativní nedostatek (Schoonhoven *et al.*, 2005). Důležitost obsahu dusíku, vody a sekundárních metabolitů, která je platná obecně, je dobře pozorovatelná během sezónní změny složení listů.

Herbivoři výrazně reagují na vyšší množství dusíku a vody v mladých listech (Coley, Bateman & Kursar, 2006; Murakami *et al.*, 2005). Na jaře se tak často setkáváme s vyšší abundancí a diverzitou herbivorů (Murakami *et al.*, 2005). Nicméně tento trend nemusí být jednoznačný, protože se během sezóny mění i zastoupení sekundárních metabolitů a tak se herbivorům může paradoxně dařit lépe na starších listech, které nejsou nutričně již tak hodnotné, ale zároveň nejsou tak výrazně kvalitativně bráněné (Meyer & Montgomery, 1987). S postupem sezóny a se snižujícím se zastoupením kvalitativní obrany se zvyšuje tuhost listů a význam kvantitativní obrany (Coley *et al.*, 2006; Kause *et al.*, 2001; Meyer *et al.*, 1987). Herbivoři jsou pochopitelně těmito sezónními změnami silně zasaženi a dochází k výměně druhů a změně jejich životních strategií (Kause *et al.*, 2001). Podobný trend můžeme zaznamenat i mezi osluněnými a neosluněnými rostlinami. Ve stínu mají obvykle rostliny vyšší obsah dusíku a menší relativní zastoupení látek na bázi uhlíku (Schoonhoven *et al.*, 2005), což má dopad na složení herbivorních společenstev. Nicméně situace je poměrně komplikovaná. V laboratoři sice hmyz obvykle preferuje listí pocházející ze zastíněných rostlin, ale v přírodě bylo zjištěno, že na těchto stromech nemá nižší mortalitu (Sipura & Tahvanainen, 2000). Za to mohou být jiné zodpovědné abiotické podmínky, například teplota a nebo biotické interakce, zejména predace (Bernays *et al.*, 1988).

Jinou skupinou chemických sloučenin, které nepřímo ovlivňují herbivorní hmyz a zároveň i predátory a parazitoidy jsou rostlinné nízkomolekulární látky, které se šíří vzduchem. Ty jsou hmyzem často využívány k lokalizaci živné rostliny i na vzdálenost až stovek metrů (Schoonhoven *et al.*, 2005). Z těchto látek jsou ale významné zejména ty, které rostliny vylučují při poškození herbivory. Zajímavé je, že typ vylučovaných sloučenin je často specificky pro určitý druh herbivora a někdy dokonce i pro daný instar larvy (Schoonhoven *et al.*, 2005). Opakovaně bylo dokázáno, že samotné mechanické poškození rostliny nestačí k produkci těchto látek, rostlina je začala vylučovat až po nanesení extraktu ze specifických herbivorů (Turlings, Tumlinson & Lewis, 1990). Pokud se tyto sloučeniny dostanou do ovzduší, mohou u okolních rostlin stejného druhu indukovat obrannou reakci proti herbivorům, která spočívá ve zvýšení obsahu sekundárních metabolitů a vylučování stejných látek jako poškozená rostlina (Tschamntke *et al.*, 2001). Pomocí těchto látek ale hlavně dochází k lákání specializovaných predátorů a parazitoidů (Turlings *et al.*, 1995; Van Den Boom *et al.*, 2004). Tím se dostáváme od chemického složení rostlin k predaci, která velmi významně ovlivňuje specializaci herbivorů.

Chemické složení rostlin, predace a specializace jsou velmi provázaná témata. Herbivoři specializovaní na určitý druh potravy mají z hlediska rizika predace oproti

generalistům dvě hlavní výhody. První z nich je schopnost některých specialistů využívat sekundární metabolity rostlin ke své obraně před predátory (Bowers, 1983; Denno, Larsson & Olmstead, 1990; Martinsen, Driebe & Whitham, 1998; Pasteels *et al.*, 1983). Druhou výhodou představuje vyšší rychlost růstu a kratší doba žíru.

Rychlost růstu a doba strávená žírem je z hlediska pravděpodobnosti predace pro herbivorní hmyz zcela zásadní. Například housenka má při žraní až 100x vyšší riziko predace než při odpočinku (Bernays, 1997). Pro herbivory je tak velmi výhodné minimalizovat čas nutný k dokončení růstu a získání dostatečného množství energie. Dosažení těchto cílů umožňují specialistům dva faktory. Za prvé bylo zjištěno, že specialisté jsou schopní si rychleji vybrat svůj zdroj potravy a stráví tak méně času přesunováním se mezi jednotlivými rostlinami a jejich ochutnáváním (Bernays, 1998). Je to dáno zejména tím, že specialisté se mohou zaměřit jen na úzké spektrum zdrojů, což klade menší nároky na jejich nervovou soustavu. Generalisté se navíc často musí potýkat se suboptimální kvalitou stravy, která je způsobena především sekundárními metabolity, na které nejsou přizpůsobeni. To vede k prodloužené době žíru (Coley *et al.*, 2006) a vystavuje generalistu většímu riziku predace. Výsledné vzorce specializace pozorované v přírodě, tak mohou být spíše výsledkem predace než úplné nepoživatelnosti dané rostliny pro určitý druh herbivora. Ačkoliv se totiž herbivoři v přírodě specializují na určitou rostlinu, přijímají ochotně v laboratoři i rostliny, na kterých se v přírodě nevyskytují, protože jsou pro ně mírně suboptimálním zdrojem potravy (Denno *et al.*, 1990; Smiley, 1978).

Specializace je tedy často pro herbivorní hmyz výhodná. Na druhou stranu může ale přílišná specializace přinášet i značné nevýhody, pokud se herbivor dostane do prostředí, kde je jeho živná rostlina vzácná nebo špatně dostupná. To se týká například mšic, které mají složité životní cykly, během kterých se musí přesouvat mezi hostitelskými rostlinami. V tropických deštných lesech, kde má většina druhů rostlin velice nízké populační hustoty, je pro mšice přesun a hledání hostitelských rostlin velice problematické. K tomu se přidávají i jejich špatné letecké schopnosti. Oba tyto faktory mají za následek nižší diverzitu mšic v tropech oproti mírnému pásu (Dixon, 1987).

Další významnou formou přímé obrany rostlin před herbivory jsou epikutikulární vosky a trichomy. Vosky rostlině slouží hlavně proti vyschnutí a jako obrana proti patogenům a herbivorům. Jejich účinek na herbivorní hmyz je však nejednoznačný a liší se případ od případu. Herbivoři se na listech pokrytých vrstvou vosku hůře pohybují a častěji padají. To vede ke snížené efektivitě příjmu potravy (Brennan & Weinbaum, 2001). V ekologických studiích se často zkoumá vliv trichomů, které mohou být v některých případech velice

efektivním způsobem obrany, kdy jsou schopné zabránit herbivorii ze strany hmyzu až na pár výjimek velmi dobře přizpůsobených specialistů (Cardoso, 2008). Trichomy brání pohybu herbivora po listu a jeho proniknutí k povrchu. To má za následek horší příjem potravy a pomalejší růst, což vede k větším ztrátám energie a zvýšenému riziku predace (Zvereva, Kozlov & Niemela, 1998). Dlouhé a husté trichomy mohou bránit i ovipozici (Chiang & Norris, 1983). V některých případech jsou však naopak samice specializovaných herbivorů schopny se trichomů pevně zachytit. To jim může naopak kladení vajíček značně usnadnit (Robinson, Wolfenbarger & Dilday, 1980).

K nevýhodám epikutikulárních vosků a trichomů patří na druhou stranu i to, že kromě herbivorního hmyzu ztěžují pohyb i predátorům a parazitoidům (Chang *et al.*, 2004; Van Lenteren *et al.*, 1995). Nicméně predátoři a parazitoidi herbivorů mohou být vosky negativně ovlivněni také.

Kromě obranných vlastností rostlin má na složení společenstev herbivorního hmyzu značný vliv architektura a růstová forma daného druhu a jeho rozšíření (Lavandero *et al.*, 2009). Obecně lze říci, že větší rostliny se složitější architekturou podporují bohatší společenstva herbivorního hmyzu a stromy jsou tak na druhy herbivorů bohatší než byliny (Lawton, 1983). Podobný vztah můžeme najít i pro velikost areálu. Rostliny s menším areálem rozšíření hostí chudší společenstva herbivorního hmyzu (Leather, 1991).

Dalším zajímavým faktorem, který může ovlivňovat specializaci herbivorů je fylogeneze hostitelských rostlin. Bylo dokázáno, že fylogeneze hostitelských rostlin dokáže dobře predikovat hostitelská spektra herbivorního hmyzu (Weiblen *et al.*, 2006). Tento fakt se dá vysvětlit několika způsoby. Může být dán skutečně koevolucí a postupnou specializací herbivorů, jak je tomu třeba u silně specializovaných fíkových vosiček (Anstett, Hossaert-McKey & Kjellberg, 1997). Nicméně výsledky některých novějších prací nepodporují striktní koevoluci ani u této skupiny (Marussich & Machado, 2007) a u herbivorního hmyzu obecně jsou pak doložené případy koevoluce ještě vzácnější. Weiblen *et al.* (2006), uvádí jako další možné vysvětlení fylogenetický konzervatismus, kdy mají zástupci herbivorního hmyzu tendenci preferovat k žraní nebo ovipozici stejnou linii rostlin jako jejich rodiče. Často ale specializace herbivorního hmyzu pouze sleduje jiné vlastnosti rostlin s fylogenezí korelované, především jejich chemické složení (Bangert *et al.*, 2006; Hochwender & Fritz, 2004; Hochwender *et al.*, 2005).

Vliv fylogeneze a chemického složení je nejlepší sledovat v systému, kdy jsou tyto dvě vlastnosti alespoň částečně nezávislé. V takových případech vychází obvykle chemické složení a sekundární metabolity jako lepší prediktor hostitelských spekter herbivorů (Becerra,

1997; Wahlberg, 2001). Většina těchto studií však byla zaměřena na malé množství druhů (jak rostlin, tak herbivorů), nebo byla taxonomicky omezená. I v případě, že byla zkoumána celá herbivorní společenstva, byla tato společenstva relativně chudá a ve skutečnosti i taxonomicky omezená (e.g. Becerra 1997). Zajímavé by tak bylo porovnat vliv fylogeneze a sekundárních metabolitů na specializaci herbivorů v rámci nějaké širší ekologické skupiny. Otázkou je jakou skupinu herbivorů a jaké hostitelské rostliny vybrat. Z našich druhů stromů připadají v úvahu vzhledem ke své druhové bohatosti a četnému výskytu v podstatě jen vrby. Vrby mají navíc i unikátní chemické složení, které je představováno hlavně fenolickými glykosidy.

1.3 Vrby a jejich chemická obrana proti herbivornímu hmyzu

Na území České republiky se vyskytuje 22 původních druhů vrb (Chmelař & Koblížek, 1990). Kromě značné druhové diverzity mají vrby ještě další výhody z hlediska studia interakce s herbivorním hmyzem. Hlavní z nich je jejich unikátní chemické složení, které navíc pravděpodobně není u tohoto rodu korelováno s fylogenezí (Nyman & Julkunen-Tiitto, 2005). Toto tvrzení se ale bohužel nedá zatím dobře ověřit, protože komplexnější fylogeneze vrb není doposud k dispozici. Zastoupení sekundárních metabolitů je u vrb v rámci druhu do určité míry variabilní, ale vnitrodruhová variabilita chemického složení je výrazně menší než variabilita mezidruhová (Nyman *et al.*, 2005). Díky tomu je možné provádět porovnání vlivu chemického složení jednotlivých druhů vrb na složení společenstev herbivorního hmyzu.

Vrby obsahují dva typy sekundárních metabolitů. Jednak kondenzované taniny, které jsou typické pro aparentní rostliny, zvláště pak stromy. Vrby však navíc obsahují i specifické chemické látky – fenolické glykosidy. Z hlediska obsahu sekundárních metabolitů můžeme evropské druhy vrb rozdělit do dvou kategorií. Jedna skupina, kam patří například *Salix fragilis*, *S. pentandra*, *S. purpurea* a *S. triandra*, obsahuje velké množství fenolických glykosidů a v podstatě žádné kondenzované taniny. Druhá skupina, která obsahuje velmi malé množství fenolických glykosidů, ale zato velké koncentrace kondenzovaných taninů zahrnuje například druhy *Salix aurita*, *S. caprea*, *S. cinerea*, *S. viminalis* (Julkunen-Tiitto, 1989; Rowell-Rahier, 1984). Obsah fenolických glykosidů činí vrby jedinečnými mezi našimi druhy stromů, které jinak obsahují většinou pouze kondenzované taniny. Vrby jsou tak z tohoto hlediska podobné svou obranou spíše bylinám, pro které je kvalitativní obrana typická (Feeny, 1976). Tomu odpovídá i pravděpodobný průběh osidlování rodu *Salix* herbivory. Vrby byly

asi původně osídleny herbivory z bylin. Jako první došlo nejspíše k osídlení druhů s vysokým obsahem fenolických glykosidů a malým obsahem kondenzovaných taninů a to právě díky jejich podobnosti s bylinami (Rowell-Rahier, 1984).

Fenolické glykosidy mají i v současnosti veliký dopad na strukturu společenstev herbivorů na vrbách, kdy druhy s vyšším obsahem fenolických glykosidů hostí chudší společenstva herbivorů, než druhy vrb s menší koncentrací těchto sekundárních metabolitů (Rowell-Rahier, 1984). Zvláště generalisté jsou přítomností fenolických glykosidů negativně ovlivněni. Polyfágní herbivoři tak preferují spíše vrby s nízkým obsahem těchto sekundárních metabolitů (Matsuki & Maclean, 1994; Orians *et al.*, 1997; Rowell-Rahier, 1984). Oproti tomu specializovaný hmyz preferuje hlavně vrby s vysokým obsahem fenolických glykosidů (Orians *et al.*, 1997; Rank, 1992; Roininen & Tahvanainen, 1989; Rowell-Rahier, 1984; Topp *et al.*, 2002). Na takových stromech totiž uniká kompetici ze strany generalistů, kteří nejsou schopni se vyrovnat s vyšší koncentrací těchto látek. Tato výhoda plynoucí ze specializace platí obecně (Ehrlich & Raven, 1964), zcela speciálním případem specializace na vrby a jejich sekundární metabolity jsou ale některé mandelinky.

Mandelinek se na vrbách vyskytuje celá řada. Mezi méně specializované patří *Galerucella lineola* a *Lochmaea capreae*. Tyto mandelinky se vyskytují hlavně na vrbách s nízkým obsahem fenolických glykosidů (Ikonen, 2002). Dalším běžným druhem je *Plagioderma versicolora*, která se vyskytuje na vrbách s nižší až střední koncentrací fenolických glykosidů. Larvy těchto mandelinek se brání proti predátorům a parazitoidům pomocí iridoidních monoterpenů, které *de-novo* syntetizují (Pasteels *et al.*, 1984). Narozdíl od larev, jejichž abundance nebývá s obsahem fenolických glykosidů korelována (Soetens, Rowell-Rahier & Pasteels, 1991), mohou být dospělci na vrbách s vyšším obsahem fenolických glykosidů početnější, protože tyto sekundární metabolity u nich pravděpodobně fungují jako fagostimulanty (Kolehmainen *et al.*, 1995; Soetens *et al.*, 1991). To ale platí jen do určité koncentrace, protože ve větším množství jsou pro ně fenolické glykosidy škodlivé (Denno *et al.*, 1990).

Nejvíce specializovanými mandelinkami na vrbách jsou rody *Chrysomela* a *Phratora*. Ty preferují vrby s vyšším obsahem fenolických glykosidů (Ikonen, 2002; Orians *et al.*, 1997; Tahvanainen, Julkunen-Tiitto & Kettunen, 1985). Fenolické glykosidy u nich také stimulují příjem potravy (Kolehmainen *et al.*, 1995). Vyšším obsahem fenolických glykosidů v listech některých vrb jsou pozitivně ovlivněny i jejich larvy, které v přírodě na takových druhích vrb lépe přežívají. Larvy mandelinek rodů *Chrysomela* a *Phratora* mají na zadečku několik žláz, kterými vylučují obranný sekret. Ten je složen ze salicylaldehydu, který larvy získávají

přeměnou fenolických glykosidů obsažených v potravě (Pasteels *et al.*, 1983). Pokud se larva živí potravou chudou na fenolické glykosidy, například vrbami s převahou kondenzovaných taninů, k sekreci salicylaldehydu nedochází nebo je alespoň velmi utlumena (Pasteels *et al.*, 1983; Rank *et al.*, 1998).

Salicylaldehyd se ukázal jako účinná obrana proti slunéčkům (Denno *et al.*, 1990) a mravencům (Martinsen *et al.*, 1998; Pasteels *et al.*, 1983), kteří v našich podmínkách patří mezi nejvýznamnější predátory larválních stádií mandelinek na vrbách. Jiní autoři však při vystavení predaci nenašli rozdíl mezi přežíváním larev z vrb na fenolické glykosidy bohatých nebo chudých (Rank *et al.*, 1998). Larvy s vyšším sekrecí salicylaldehydu tak nebyly před predátory lépe chráněné, což jeho význam z hlediska obrany před predací snižuje. Důvod preference a lepšího přežívání larev mandelinek rodů *Chrysomela* a *Phratora* na na fenolické glykosidy bohatých druhích vrb tak Rank *et al.* (1998) spatřují v tom, že na takovýchto živných rostlinách rostou jejich larvy rychleji než na vrbách, které obsahují fenolických glykosidů jen malé množství. Rychlejší růst mandelinek na potravě bohaté na fenolické glykosidy by mohl být způsoben i jejich schopností získávat z těchto sekundárních metabolitů glukózu, kterou larvy dále využívaly jako zdroj energie (Rowellrahier & Pasteels, 1986). Nicméně jiná studie zase rychlejší růst těchto specializovaných mandelinek na vrbách s vyšší koncentrací fenolických glykosidů popírá a uvádí ho naopak pro některé specializované pilatky rodu *Nematus* (Matsuki *et al.*, 1994).

Je zřejmé, že tato problematika je komplikovaná a závěry jednotlivých prací nelze jednoduše generalizovat. Vždy totiž záleží na sledovaném druhu herbivora a hlavně na konkrétním druhu vrby a přesné koncentraci fenolických glykosidů v jejích listech. Problémem je i to, že nezanedbatelná část studií na toto téma rozděluje vrby na základě obsahu fenolických glykosidů pouze do hrubých skupin, někdy pouze do dvou, s přítomností či nepřítomností těchto látek. Přitom herbivorní hmyz může negativně ovlivňovat příliš nízká i příliš vysoká koncentrace fenolických glykosidů a také zastoupení jednotlivých druhů těchto sloučenin (Tahvanainen *et al.*, 1985). Výsledky prací, které tento fakt nezohledňují, jsou proto velmi špatně interpretovatelné.

U vrb, podobně jako u jiných stromů z temperátní oblasti, je důležitá sezónní variabilita chemického složení a kvality listů. Při stárnutí listů se mění jejich tuhost a dochází ke změnám obsahu dusíku, vody, fenolických glykosidů a kondenzovaných taninů. Během sezóny se obsah vody a dusíku snižuje, naopak tuhost listů a obsah kondenzovaných taninů stoupá (Ikonen, 2002; Matsuki *et al.*, 1994). Nejednoznačný je trend změny zastoupení fenolických glykosidů. Někteří autoři uvádějí jejich větší obsah u mladých listů na začátku

sezóny (Ikonen, 2002), jiní zjistili vyšší koncentrace u starých listů (Denno *et al.*, 1990). Celkově má však podporu spíše platnost prvního tvrzení, neboť několik dalších prací týkajících se vrbám blízkce příbuzných topolů, potvrzuje vyšší obsah fenolických glykosidů v mladých pletivech (Martinsen *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1987). Tomu, že by měly být mladé listy vrb dobře chráněné fenolickými glykosidy, odpovídá i skutečnost, že vrby a topoly patří do skupiny stromů s neukončeným růstem listů. Tím se liší například od dubů, jejichž růst listů je ukončen během pár týdnů po začátku vegetační sezóny. Duby se tak z hlediska obrany listů spoléhají spíše na jejich rychlý růst a investují sekundární metabolity až do plně vyvinutého listoví, zatímco topoly a vrby mají mladé listy po značnou část sezóny a vyplatí se jim proto do nich silně investovat (Meyer *et al.*, 1987).

Sezónní změny kvality potravy v podobě vrbových listů tak mohou mít na herbivory velký vliv. Na jaře je pravděpodobně hlavním faktorem ovlivňujícím preferenci herbivorů obsah dusíku (Matsuki *et al.*, 1994). Může se tak stát, že i generalisté preferují druhy vrb s poněkud vyšším obsahem fenolických glykosidů, které ale mají zároveň ve svých listech větší množství dusíku (Ikonen, 2002). Z našich vrb se to může týkat *Salix fragilis*, která má obsah dusíku v porovnání s některými jinými druhy vrb o něco vyšší (Denno *et al.*, 1990). Naopak během zbytku sezóny jsou hlavními látkami určujícími potravní preference herbivorního hmyzu na vrbách fenolické glykosidy (Matsuki *et al.*, 1994).

1.4 Trichomy vrb a jejich vliv na herbivory

Podobně jako vytvářejí dvě rozdílné skupiny na základě složení a obsahu sekundárních metabolitů, tvoří vrby i dvě skupiny z hlediska přítomnosti a hustoty trichomů na svých listech. Ačkoli je hustota trichomů často negativně korelovaná s obsahem fenolických glykosidů (Soetens *et al.*, 1991), nepřekrývají se tyto dvě skupiny úplně. To umožňuje zkoumat vliv těchto dvou proměnných na specializaci herbivorního hmyzu odděleně. K vyhodnocení a korekci výsledků je tak potřeba znát fylogenezi hostitelských rostlin, jinak hrozí riziko pseudoreplikací (Matsuki *et al.*, 1994).

Trichomy mají na specializaci hmyzu žeroucího vrbu značný vliv (Soetens *et al.*, 1991; Topp *et al.*, 2002). Hustota trichomů má především negativní vliv na rychlost a efektivitu žraní dospělců i larev herbivorů. Například Zvereva *et al.* (1998) uvádí, že dospělci zkoumaných mandelínek na hustě ochlupených listech častěji měnili pozice žraní a jejich larvy strávily více času popolézáním po listech na úkor odpočinku. Husté trichomy tak u larev zpomalují růst (Matsuki *et al.*, 1994; Zvereva *et al.*, 1998) a zvyšují riziko predace.

Herbivoři však reagují především na kvalitativní změny hustoty trichomů (Zvereva *et al.*, 1998). To umožňuje při analýzách vlivu trichomů na specializaci herbivorního hmyzu ignorovat vnitrodruhovou variabilitu, která se u vrb do určité míry vyskytuje. Potravní preference herbivorního hmyzu na vrbách může ovlivnit i délka trichomů. Například dlouhé trichomy mohou být larvy některých mandelínek schopny efektivně odstraňovat, jako tomu je u *Salix viminalis* a *Phratora vulgatissima* (Dalin, Bjorkman & Eklund, 2004). V takovém případě pak není herbivor přítomností trichomů příliš ovlivněn. Ačkoli trichomy mají na herbivory pravděpodobně menší vliv než chemické složení vrb (Matsuki *et al.*, 1994), určitě stojí za to se jimi zabývat a sledovat jejich dopad na specializaci herbivorního hmyzu.

1.5 Hybridizace vrb a její dopad na složení společenstev herbivorů

Vrby by se mohly zdát ideální skupinou stromů pro výzkum specializace herbivorního hmyzu v podmínkách České republiky. Situaci ale komplikuje velká frekvence, s jakou se vrby kříží a špatná rozlišitelnost hybridů v terénu. Vrby nevytváří hybridní zóny a běžně se tak na jedné lokalitě vyskytují jak oba mateřské druhy tak jejich hybridy (Fritz, Nicholsorians & Brunsfeld, 1994). Brát hybridizaci vrb a případně i topolů v úvahu je přitom zásadně důležité, protože složení herbivorních společenstev se velmi často mezi rodičovskými druhy a jejich kříženci významně liší (Hochwender *et al.*, 2004; Hochwender *et al.*, 2005). Mateřské alely pro různé vlastnosti ovlivňující specializaci herbivorů mají mezi sebou komplikované vztahy. Do hry tak u různých vlastností vstupuje genetická aditivita, dominance a epistáze (Fritz *et al.*, 2003; Hochwender *et al.*, 2004).

Z hlediska preference hybridů různými druhy herbivorů můžeme pozorovat několik možností. V některých případech jsou hybridy herbivory přijímáni stejně jako jeden z rodičovských druhů. To naznačuje dominanci jedné z alel určujících danou vlastnost významnou pro potravní preferenci herbivora. Nastat mohou ale i dva další scénáře. Buď jsou hybridy pro herbivory méně lákaví než mateřské druhy, což může být způsobeno změnou vlastností důležitých při rozpoznávání živné rostliny (Fritz *et al.*, 2003) nebo zděděním několika dominantních alel pro výhodné obranné vlastnosti (Fritz *et al.*, 1994). Jindy hybridy naopak herbivoři preferují. Preference kříženců může mít více důvodů a souvisí pravděpodobně se ztrátou obranyschopnosti. Může se například stát, že obranné vlastnosti se u mateřského druhu navzájem synergicky podporují a pokud dojde ke změně jedné z nich, přestává fungovat celý obranný systém. Dalším možným vysvětlením je, že daná obranná vlastnost je ovládána geny na řadě nepropojených lokusů, které se při hybridizaci mohou

rozejít (Fritz *et al.*, 2003). Horší obranyschopnost hybridů může být také způsobena aditivním vztahem alel klíčových pro obranu. Pokud se v takovém případě oba mateřské druhy vrb brání různým způsobem, tak hybrid nebude dobře bráněn ani jedním z nich (Fritz *et al.*, 1994).

Většina studií, která se tímto tématem zabývá, ukazuje u hybridů vrb a topolů na intermediální zastoupení důležitých sekundárních metabolitů mezi oběma rodičovskými druhy (Bangert *et al.*, 2006; Orians & Fritz, 1995; Soetens *et al.*, 1991). To naznačuje aditivní vztahy alel zodpovědných za produkci těchto obranných látek, což částečně umožňuje odhadnout možné chemické složení kříženců. U *Salix fragilis*, která má listy lysé, a *S. alba* s ochlupenou spodní stranou listové čepele, je tento odhad nadále zjednodušen i tím, že zde je obsah fenolických glykosidů negativně korelován s hustotou trichomů (Soetens *et al.*, 1991).

1.6 „Leaf-chewers“ na vrbách

Až na problematiku křížení jsou vrby ideální skupinou stromů ke studiu specializace herbivorního hmyzu. Většina předchozích prací se zabývala specializací nějaké taxonomicky omezené skupiny hmyzu. Z ekologického hlediska však dává větší smysl zabývat se touto tematikou u širší, ekologicky vymezené skupiny, nejlépe gildy. Zajímaví z hlediska studia potravní specializace je zejména gilda herbivorů externě žeroucí listy (anglicky leaf-chewers). Jedná se o herbivory žeroucí listy rostlin, kteří nevytváří miny ani háčky. Zahrnuje ale housenky a housenice vytvářející zámotky nebo přehýbající okraje listů. Tato gilda, jejíž existence je dokumentována již ze spodního permu (Labandeira, 1998), je výhodná pro studium specializace díky svému velkému významu, druhové bohatosti a silné interakci s obrannými vlastnostmi rostlin.

Hmyz externě žeroucí listy je celosvětově velice významnou skupinou herbivorů, která je spolu s hmyzem sajícím rostlinné šťávy zodpovědná za značnou část poškození rostlin (Coley & Barone, 1996). Zatímco hmyz sající rostlinné šťávy není, vzhledem ke svému způsobu příjmu potravy, sekundárními metabolity rostlin výrazně ovlivněn (Schoonhoven *et al.*, 2005), mají tyto látky zcela zásadní vliv na listy žeroucí herbivory. Není tedy divu, že se jedná u skupinu hmyzu, jejíž specializace je nejčastěji zkoumána. Pro studium v mírném pásu je důležitá i její taxonomická rozmanitost v temperátních oblastech. V našich podmínkách zahrnuje larvy motýlů a pilatek a imága i larvy brouků.

Herbivorní brouci jsou na vrbách relativně specializovaní, i když se mezi nimi najde jen málo monofágů. Většina z nich je však vázána pouze na Salicaceae (Topp *et al.*, 2002). Na vrbách se vyskytují především dvě čeledi – Chrysomelidae (mandelinkovití) a

Curculionidae (nosatcovití). Mandelinky jsou obecně sice většinou relativně specializované (Jurado-Rivera *et al.*, 2009), ale to se týká hlavně druhů žijících na bylinách, zatímco na stromech se vyskytující druhy jsou často polyfágní. Vysoká míra specializace některých druhů mandelinek na vrbách je tak poměrně výjimečná. Z pohledu specializace mandelinek jsou tak vrby odlišné od našich dalších druhů stromů a jsou podobné spíše bylinám. To souvisí pravděpodobně s jejich chemickou obrannou, která se kvůli fenolickým glykosidům podobá spíše kvalitativní obraně bylin.

Ačkoliv mezi nosatce patří jedni z nejvíce polyfágních herbivorů, například rod *Oribius* z Nové Guineje, jehož zástupci se živí širokou škálou rostlin (Wesis *et al.*, 2010), jsou brouci z této čeledi ve většině případů specializovaní a mají relativně úzká potravní spektra. Proto není překvapivé, že i velká většina nosatců vyskytujících se na vrbách a topolech je vázána pouze na čeleď Salicaceae (Rowell-Rahier, 1984).

U brouků dochází k výběru rostliny vhodné pro naklazení vajíček na základě potravní preference dospělce (Rank, 1992). Výběrem rostliny pro ovipozici se tak brouci liší od motýlů a pilatek, jejichž dospělci se listy rostlin neživí. Ovipozice pilatek se zdá být řízena obsahem fenolických glykosidů (Hjalten *et al.*, 2007). Jinak se ale pilatky z hlediska své specializace značně podobají broukům. I u nich platí, že většina druhů vyskytujících se na vrbách je vázána pouze na Salicaceae (Rowell-Rahier, 1984). Podobně jako u brouků můžeme také u pilatek pozorovat trend, kdy se na vrbách s vyšším obsahem fenolických glykosidů vyskytují více specializované druhy (Roininen *et al.*, 1989; Rowell-Rahier, 1984). Larvy těchto specialistů, například několika druhů rodu *Nematus*, mají na takových vrbách, podobně jako některé mandelinky, rychlejší růst (Roininen *et al.*, 1989).

Mezi nejspecializovanější pilatky patří listy ohýbající druhy rodu *Phyllocolpa*, které se často vyskytují pouze na jednom druhu vrby a jsou tak do značné míry výjimečné mezi herbivorním hmyzem na vrbách (Kopelke, 2007a, 2007b; Zinovjev, 1998). Nicméně i přes takovou specializaci některých skupin se kongruence fylogeneze pilatek a vrb nedá příliš očekávat, mimo jiné proto, že vrby byly pilatkami kolonizovány několikrát nezávisle (Nyman, Widmer & Roininen, 2000). U pilatek dochází navíc k častým přeskokům mezi hostitelskými rostlinami. Ve výsledku jsou tak vrby využívány pilatkami z nejrůznějších skupin (Nyman *et al.*, 2006).

Oproti oběma výše uvedeným řádům hmyzu, jejichž zástupci jsou na vrby relativně specializovaní a žerou většinou pouze rostliny z čeledi Salicaceae, jsou housenky motýlů, obzvláště můr (Noctuidae), vyskytujících se na vrbách podstatně polyfágnější. I pro tuto

skupinu však platí, že vrby s vysokým obsahem fenolických glykosidů hostí chudší společenstva housenek složená převážně ze specializovaných druhů (Rowell-Rahier, 1984).

Lze tedy shrnout, že specializace herbivorního hmyzu externě žeroucího listy je významně ovlivněna vlastnostmi vrb, hlavně fenolickými glykosidy. Ty mají dopad na složení i diverzitu herbivorních společenstev na vrbách.

1.7 Cíle práce

Cílem této studie je porovnat složení společenstev herbivorního hmyzu mezi jednotlivými druhy vrb a zjistit jak velký vliv mají na složení těchto společenstev fenolické glykosidy, morfologie listů a fylogeneze hostitelských rostlin.

2. Metodika

2.1 Hybridizace vrb

Vrby v přírodě velice často vytváří křížence, proto jsem se během své práce snažil sbírat hmyz pouze na jedincích, jejichž morfologie vykazovala jasnou příslušnost k některému ze zkoumaných druhů. Vrby jsem určoval podle práce Chmelař & Koblížek (1990). Determinaci ověřoval Milan Štech a problematické exempláře též profesor Koblížek. Přes původní úmysl nesbírat herbivorní hmyz z kříženců jednotlivých druhů vrb jsem se nakonec rozhodl přistoupit ke sběru dat na dvou vytipovaných hybridech (*Salix alba* x *fragilis* a *S. purpurea* x *viminalis*). Tito hybridi jsou kříženci druhů s vysokým a nízkým obsahem fenolických glykosidů a dalo se očekávat, že budou hostit zajímavá společenstva herbivorního hmyzu, jejichž složení může poskytnout cenné informace o vlivu fenolických glykosidů na herbivorní hmyz.

2.2 Zkoumané druhy vrb

Společenstva herbivorního hmyzu byla zkoumána na třech druzích širokolistých vrb – *Salix aurita*, *S. caprea*, *S. cinerea*, čtyřech úzkolistých – *S. fragilis*, *S. purpurea*, *S. rosmarinifolia*, *S. viminalis*, dvou křížencích vrb – *S. alba* x *fragilis* a *S. purpurea* x *viminalis* a osice *Populus tremula*, která sloužila jako outgroup pro analýzy. Tyto druhy vrb byly vybrány podle dvou kritérií. Prvním bylo pokrytí chemické diverzity a morfologické variability vrb rostoucích na území České republiky (Tab 1.). Druhým pak dostupnost v okolí Českých Budějovic, která by umožňovala efektivní sběr dat.

Tabulka 1. Obsah fenolických glykosidů a ochlupení listů zkoumaných druhů vrb. Červeně jsou zvýrazněny vlastnosti, které, dle dostupné literatury, rostlinu chrání před generalistickými herbivory. V tabulce jsou také uvedeny zkratky druhů, kterými jsou označeny v obrázcích a grafech.

druh	zkratka druhu	obsah fenolických glykosidů u dospělého stromu ¹	trichomy na líci listu	trichomy na rubu listu
<i>S. aurita</i>	AUR	nízký	ano	ano
<i>S. caprea</i>	CAP	nízký	ne	ano
<i>S. cinerea</i>	CIN	nízký	ano	ano
<i>S. fragilis</i>	FRA	vysoký	ne	ne
<i>S. purpurea</i>	PUR	vysoký	ne	ne
<i>S. rosmarinifolia</i>	ROS	vysoký	ano	ano
<i>S. viminalis</i>	VIM	nízký	ne	ano
<i>S. alba</i> x <i>fragilis</i>	ALBxFRA	vysoký	ne	ano
<i>S. purpurea</i> x <i>viminalis</i>	PURxVIM	vysoký	ne	ne
<i>P. tremula</i>	TRE	nízký	ne	ne

¹ Julkunen-Tiitto (1989), Soetens *et al.* (1991), Julkunen-Tiitto osobní komunikace

Všechny druhy byly sbírány po dvě sezóny (2008 a 2009), jen v okolí Českých Budějovic vzácná *S. purpurea*, kterou se podařilo nalézt až začátkem druhé sezóny, pouze v roce 2009. Od ostatních zkoumaných druhů, které dosahují keřového nebo stromového vzrůstu, se svou růstovou formou odlišuje bylinná *Salix rosmarinifolia*.

2.3 Výzkumné plochy

Výzkum probíhal celkem na třech lokalitách s bohatým výskytem vrb: I) Vrbenských rybnících u Českých Budějovic, II) v okolí NPP Ohrazení a na hrázi Kališůvského rybníka a III) v bezprostředním okolí a na hrázi rybníka v NPP Děkanec u vsi Krasejovka. Většina zkoumaných druhů stromů byla zastoupena na dvou až třech lokalitách (Tab. 2). Pouze na jediné lokalitě se vyskytovali oba kříženci a také *Salix viminalis* a *S. purpurea*.

Tabulka 2. Výskyt druhů stromů na jednotlivých lokalitách.

druh	Vrbenské rybníky	Ohrazení, Kališůvský rybník	Děkanec
<i>S. aurita</i>		x	x
<i>S. caprea</i>	X	x	x
<i>S. cinerea</i>	X	x	x
<i>S. fragilis</i>		x	x
<i>S. purpurea</i>	X		
<i>S. rosmarinifolia</i>		x	x
<i>S. viminalis</i>	X		
<i>S. alba x fragilis</i>	X		
<i>S. purpurea x viminalis</i>			x
<i>P. tremula</i>	X	x	x

2.4 Sběr a určování hmyzu

Sběr dat probíhal během dvou sezón v letech 2008 a 2009, od konce dubna do poloviny září. Hmyz jsem sbíral smykáním a ručním sběrem.

Ke standardizaci počtu sebraných jedinců hmyzu jsem používal čas strávený sběrem vyjádřený v minutách, přičemž poměr času strávený ručním sbíráním a smykem byl vyrovnaný. Z počátku jsem se pokoušel udržet vyrovnané i časy a úsilí strávené sběrem na jednotlivých druzích vrb. To se ale, vzhledem k různé četnosti výskytu daných druhů na lokalitách, nakonec ukázalo jako neproveditelné.

Imága brouků jsem v době mezi sebráním a určením uchovával v čistém etanolu. Brouky jsem determinoval podle klíčů Čížek (2008), Javorek (1947),(1966; 1972; 1974) a Warchalowski (2003). Determinace jsem konzultoval s Lukášem Sekerkou. Část problematických nosatců určil Richard Čtvrtečka. Housenky, housenice a larvy brouků jsem

dochoval do dospělosti za účelem získání imág pro determinaci druhu. Vzhledem k relativně vysokým ztrátám během dochovávání, jsem přistoupil k fotodokumentaci jednotlivých larev, které pak podle těchto fotografií určil Jan Macek. Podle fotografií byly určovány jen bezpečně rozpoznatelné druhy. Část materiálu tak zůstala neurčená. To se týká převážně obalečů, jejichž larvy nejsou na základě fotografií spolehlivě rozlišitelné. Úspěšně vylíhlé motýly určil Michal Zapletal a Jan Šumpich.

Kvůli vysoké úmrtnosti housenek a housenic při dochovávání během první sezóny, byly do analýz nakonec zařazeny pouze larvy z období srpen až září 2008 a z celé sezóny 2009.

2.5 Akumulační křivky druhů a podobnost herbivorních společenstev

Pro porovnání diverzity herbivorních společenstev na jednotlivých družích vrb jsem v programu EstimateS 8.2 zrekonstruoval akumulaci křivky druhů podle indexu Mao Tau.

Průběh akumulaci křivek pro sto sběrů jsem odhadl na základě mocninné funkce a metody nejmenších čtverců s použitím aplikace „řešitel“, která je součástí programu Microsoft Office Excel 2003.

Porovnání složení společenstev herbivorního hmyzu jsem provedl podle práce (Novotny *et al.*, 2006) pomocí Chao-Sorensenova indexu založeném na výskytu a abundanci jednotlivých druhů herbivorů. Pro standardizaci porovnání jsem použil vážení abundance nasbíraného hmyzu dobou sběru. Matici podobností hodnot Chao-Sorensen indexu jsem spočítal v programu EstimateS 8.2. Stejným způsobem jsem pak spočítal samostatné matice nepodobností složení společenstev brouků a motýlů.

2.6 Sezónní trendy

Má práce nebyla zaměřena na sledování sezónní variability složení herbivorních společenstev, nicméně jsem se rozhodl udělat alespoň základní srovnání, zda se liší abundance jednotlivých druhů na jaře, kdy je listů mladé a v létě, kdy je většina listů plně vyvinutá. Podle dospívání listů jsem tak sezónu rozdělil na dvě části. V roce 2008 jsem přelom stanovil na konec května. V roce 2009, kdy bylo jaro teplejší a většina listů dospěla rychleji, o dva týdny dříve. Pro toto srovnání jsem vybral pouze druhy „leaf-chewers“, které se vyskytují v obou obdobích. Jejich abundance jsem vážil délkou jednotlivých sběrů a celkovou délkou sběrů v daném období. S takto získanými hodnotami jsem provedl párový t-test.

2.7 Vyhodnocení chemického složení

Informace o obsahu fenolických glykosidů u jednotlivých druhů vrb byly přejaty z článku Julkunen-Tiitto (1989). Přes osobní komunikaci s autorkou tohoto článku se bohužel nepodařilo dohledat původní data a matici podobností chemického složení. Obsah fenolických glykosidů tak byl vyhodnocován pouze na základě délek větví ve fenogramu zastoupení těchto sekundárních metabolitů u jednotlivých druhů vrb publikovaném ve výše zmíněné práci. Tímto způsobem byly získány informace o chemickém složení jednotlivých druhů vrb nikoliv však jejich kříženců a topolu osiky.

Obsah fenolických glykosidů v listech křížence *Salix alba* x *fragilis*, byl odhadnut na základě hustoty trichomů. Zatímco *Salix alba* má na spodní straně listů husté trichomy a obsahuje jen malé množství fenolických glykosidů, má *S. fragilis* listy lysé s vysokým obsahem fenolických glykosidů. Hybridi mají obsah fenolických glykosidů v listech intermediální. Soetens *et al.* (1991) uvádí, že u komplexu *Salix alba*, *S. fragilis* a jejich kříženců je obsah fenolických glykosidů signifikantně negativně korelován s hustotou trichomů a konkrétní hodnotu obsahu fenolických glykosidů lze odhadnout na základě hustoty trichomů. Tuto metodu jsem využil i ve své práci.

Velká část prací zabývající se problematikou obsahu fenolických glykosidů u hybridů různých druhů vrb a topolů uvádí, že koncentrace těchto sekundárních metabolitů je u kříženců intermediální mezi oběma rodičovskými druhy (Bangert *et al.*, 2006; Orians *et al.*, 1995; Soetens *et al.*, 1991). Pomocí této informace jsem zhruba odhadl pozici křížence *Salix purpurea* x *viminalis* na fenogramu a umístil ho na poloviční vzdálenost mezi oběma rodičovskými druhy. Umístění topolu osiky na fenogramu zastoupení fenolických glykosidů u jednotlivých druhů vrb jsem odhadl na základě osobní komunikace s Rittou Julkunen-Tiitto a umístil ho jako sesterskou skupinu vrb s nízkým obsahem fenolických glykosidů.

Na základě délek větví použitého fenogramu jsem sestavil matici chemických nepodobností jednotlivých druhů stromů, kterou jsem využil k porovnání vlivu fenolických glykosidů s vlivem fylogeneze hostitelských rostlin na složení společenstev herbivorů.

2.8 Morfologie listů

Jako vlastnosti charakterizující morfologii listů, o kterých jsem předpokládal, že mají vliv na specializaci herbivorního hmyzu, jsem použil hustotu trichomů a „specific leaf area“.

Specializace herbivorního hmyzu na vrbách je z hlediska morfologie listů ovlivněna především kvalitativními rozdíly v hustotě trichomů (Zvereva *et al.*, 1998). Část předešlých

studií mezi sebou porovnávala druhy vrb z hlediska ochlupení pouze na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti trichomů. Vzhledem k tomu, že se od sebe jednotlivé druhy vrb hustotou trichomů velmi liší, rozhodl jsem se porovnávat jejich ochlupení na základě jejich pokryvnosti. Pokryvnost trichomů jsem odhadoval na plně vyvinutých listech ve střední části koncové větévky. Tato metoda mi umožnila poměrně přesně zachytit rozdíly v hustotě trichomů u různých druhů. Abych omezil vliv vnitrodruhové variability, která se u vrb vyskytuje, změřil jsem pokryvnost pro každý druh u tří až pěti jedinců z různých lokalit a hodnoty zprůměroval. Pokryvnost trichomů jsem odhadoval odděleně pro vrchní a spodní stranu listu, protože tyto dvě hodnoty nejsou u mnou sledovaných druhů vrb korelované a horní strana listu bývá až desetkrát méně ochlupena než strana spodní. Pokud bych tak pokryvnosti trichomů pro obě strany listu sečetl, došlo by k potlačení rozdílů na základě ochlupení povrchu horní strany listu, protože by taková hodnota pokryvnosti byla určena téměř výhradně trichomy na spodní straně listu. Ochlupení vrchní strany přitom ale může mít značný vliv na herbivorní hmyz, který listy požírá metodou skeletování a může si vybrat, z které strany bude list žrát. To se týká například dřepčičků rodu *Crepidodera*, kteří na vrbách patří k nejvýznamnějším druhům herbivorního hmyzu.

Také druhá měřená vlastnost, „specific leaf area“ (SLA), neboli poměr plochy a hmotnosti listu, může ovlivňovat specializaci herbivorů (Poorter *et al.*, 2004). Tato vlastnost je korelována s dalšími charakteristikami listů, například tuhostí a obsahem vody, které jsou z hlediska potravní specializace herbivorů velmi významné. Měření specific leaf area jsem prováděl pomocí vážení koleček z listů o známém průměru, která byla předtím vysušena v silikagelu. V rámci jednoho jedince jsem vážil kolečka z různých listů ve střední části větévky. Pro stanovení specific leaf area daného druhu vrby jsem použil průměr hodnot tří až sedmi jedinců z různých lokalit.

Pro každou z výše uvedených vlastností (trichomy na spodní a horní straně listu a specific leaf area), jsem spočítal matici nepodobností pro následné porovnání s fylogenezí hostitelských rostlin.

2.9 Molekulární data a fylogenetické analýzy

Molekulární fylogeneze vrb doposud není k dispozici, proto jsem se pokusit ji pro studované druhy zrekonstruovat. Předcházející práce na toto téma se potýkaly hlavně s malou variabilitou sekvencí, která bránila v rekonstrukci fylogeneze rodu *Salix* (Azuma *et al.*, 2000; Leskinen & Alstrom-Rapaport, 1999). Pro molekulární analýzy jsem vybral tři lokusy – úsek

ITS 1 a 2, trnT-trnL a matK. ITS (internal transcribed spacer), který se nachází na jaderné ribozomální DNA a trnT-trnL chloroplastový mezigenový spacer, jsou vysoce variabilní úseky, které se používají pro rekonstrukci fylogeneze taxonů s malou genetickou variabilitou. Třetí použitý lokus, matK region, je úsek chloroplastové DNA, mutující střední rychlostí, který se běžně využívá pro rekonstrukci fylogeneze rostlin na různých taxonomických úrovních.

Vzorků určených na molekulární analýzy jsem na lokalitách odebral od každého druhu vždy několik – z každého shluku morfologicky totožně vypadajících jedinců však alespoň jeden. Tím jsem se snažil odhalit přítomnost špatně určených stromů nebo hybridů. Celkem bylo na izolaci DNA vybraných 41 vzorků. Vzorky jsem po sebrání nechal vysušit v silikagelu.

Na začátku izolace DNA jsem vzorky ručně homogenizoval. Do směsi jsem přidal PVPP, abych zabránil vlivu případných inhibitorů během homogenizace. DNA jsem izoloval za použití Invitrek Plant Extraction Kit (Invotrogen) podle protokolu přiloženého výrobcem. Získanou DNA jsem následně amplifikoval v Boier XP thermal cycler podle příslušných protokolů (Tab 3 a Tab 4). Pro amplifikaci DNA jsem použil specifické primery ITS4, ITS1P, trnL, trnT2F, 3F_KIMf a 1R_KIMr (Tab.5). Přítomnost PCR produktu jsem ověřil na elektroforéze. Následně jsem PCR produkt přečistil pomocí GenElute PCR Clea-up Kit (Sigma). Oproti originálnímu protokolu jsem před posledním krokem vzorky inkuboval 10 minut místo 1 minuty, čímž jsem docílil větších výnosů DNA. Přečištěné PCR produkty jsem nechal osekvenovat u firmy Macrogene Korea.

Tabulka 3. Složení PCR reakce

Látka	objem (μl)
PPP Master mix (Top-Bio)	12,5
primer 1 (2.5 pmol)	3,0
primer 2 (2.5 pmol)	3,0
H ₂ O	5,5
DNA	1,0

Tabulka 4. Průběh PCR reakce

gen	Fáze	teplota	trvání	opakování
ITS	Denaturace	95°C	300s	1x
	Denaturace	95°C	60s	32x
	Annealing	52°C	90s	32x
	Extenze	72°C	90s	32x
	finální extenze	72°C	600s	1x
matK	Denaturace	94°C	300s	1x
	Denaturace	94°C	30s	35x
	Annealing	52°C	20s	35x
	Extenze	72°C	20	35x
	finální extenze	72°C	300s	1x
trnT-trnL	Denaturace	95°C	300s	1x
	Denaturace	95°C	60s	30x
	Annealing	52°C	90s	30x
	Extenze	72°C	90s	30x
	finální extenze	72°C	600s	1x

Tabulka 5. Sekvence použitých primerů

lokus	název primeru	sekvence
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
	ITS1P	CTTTATCATTTAGAGGAAGGAAG
trnT-trnL	trnL	GAGATTTTGAGTCTCGCGTGTC
	trnT2F	CAAATGCGATGCTCTAACCT
matK	3F_KIMf	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG
	1R_KIMr	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC

Získané sekvence jsem sestavil v programu ChromasPro 1.42 a následně alignoval pomocí programu ClustalX 1.83. Alignment jsem manuálně upravil v BioEdit 7.0.5.3. Použil jsem jednoduché kódování mezer, kdy jsem jako mezeru ponechal pouze první pozici indelu a zbytek označil jako chybějící data. Tímto jsem dosáhl toho, že informace obsažená v indelech nebyla nadhodnocena, ale ani úplně ztracena, jak tomu může být při označení mezer jako pátého stavu nebo označením celé mezery jako chybějících dat. Sekvence lokusu matK neobsahovala žádnou fylogenetickou informaci, proto jsem ve fylogenetických analýzách matK region nepoužil.

ILD test homogenity mezi lokusy trnT-trnL a ITS vyšel při 10 000 replikacích neprůkazně ($p = 0,155$). V dalších fylogenetických analýzách jsem tak používal matice těchto genů spojené do jedné. Na základě hLRT (hierarchical likelihood ratio test) jsem pomocí programu Modeltest 3.7 ovládaného přes program MrMTgui 1.0 vybral vhodný model pro metodu maximum likelihood. Vybraný model HKY+G měl následující parametry:

Base=(0.3111 0.2191 0.2589), Nst=2, TRatio=2.4865, Rates=gamma, Shape=0.0035, Pinvar=0. Phylogram příbuznosti zkoumaných druhů vrb jsem zrekonstruoval metodou maximum likelihood v programu PAUP 4.0b10. Bayesiánskou analýzu spojené matice lokusů ITS1, ITS2 a trnT-trnL jsem provedl v programu MrBayes 3.1.2. (ngen=10⁶, samplefreq=100, nrun=2, nchain=4, sump burnin = 1000) za použití modelu HKY+G. Hodnoty posteriorních pravděpodobností získané bayesiánskou analýzou jsem použil pro vyjádření podpory větví fylogramu.

Z fylogramu získaného metodou maximum likelihood jsem odečetl délky větví a použil je k vyjádření fylogenetických vzdáleností jednotlivých taxonů. Tuto metodu jsem zvolil kvůli zachování stejného postupu jako u porovnávání nepodobností jednotlivých druhů vrb na základě obsahu fenolických glykosidů.

2.10 Porovnání matic nepodobností

Pro porovnání vlivu fenolických glykosidů a fylogeneze hostitelských rostlin na složení společenstev herbivorního hmyzu jsem využil matice nepodobností těchto vlastností. Tyto matice jsem porovnal pomocí parciálního Mantelova testu v programu R 2.10.1 funkcemi "mantel" a "mantelp" z balíčku Vegan 1.17-2. Nejprve jsem provedl parciální Mantelův test s maticí nepodobností společenstev pro všechny „leaf chewers“, poté samostatně pro brouky a motýly.

Před využitím hustoty trichomů a specific leaf area v multivariátních analýzách, bylo nutné zjistit, zda jsou nezávislé na fylogenezi hostitelských rostlin a dají se tak využít jako samostatné proměnné bez rizika pseudoreplikací. Proto jsem spočítal Mantelův test s maticemi nepodobností těchto morfologických vlastností a maticí fylogenetických vzdáleností hostitelských rostlin.

2.11 Mnohorozměrné analýzy

Mnohorozměrné analýzy vlivu jednotlivých proměnných na složení společenstev herbivorního hmyzu byly prováděny v programu Canoco for Windows 4.52. Do mnohorozměrných analýz jsem zahrnul pouze druhy s více než dvěma odchycenými individui. Na základě délky gradientu zjištěné pomocí DCA jsem pro analýzy upřednostnil unimodální metodu CCA. CCA analýzu jsem provedl s projekčním škálováním se zaměřením na mezidruhové vzdálenosti. Počty individuí jsem vážil dobou sběru, vynásobil stem, přičetl

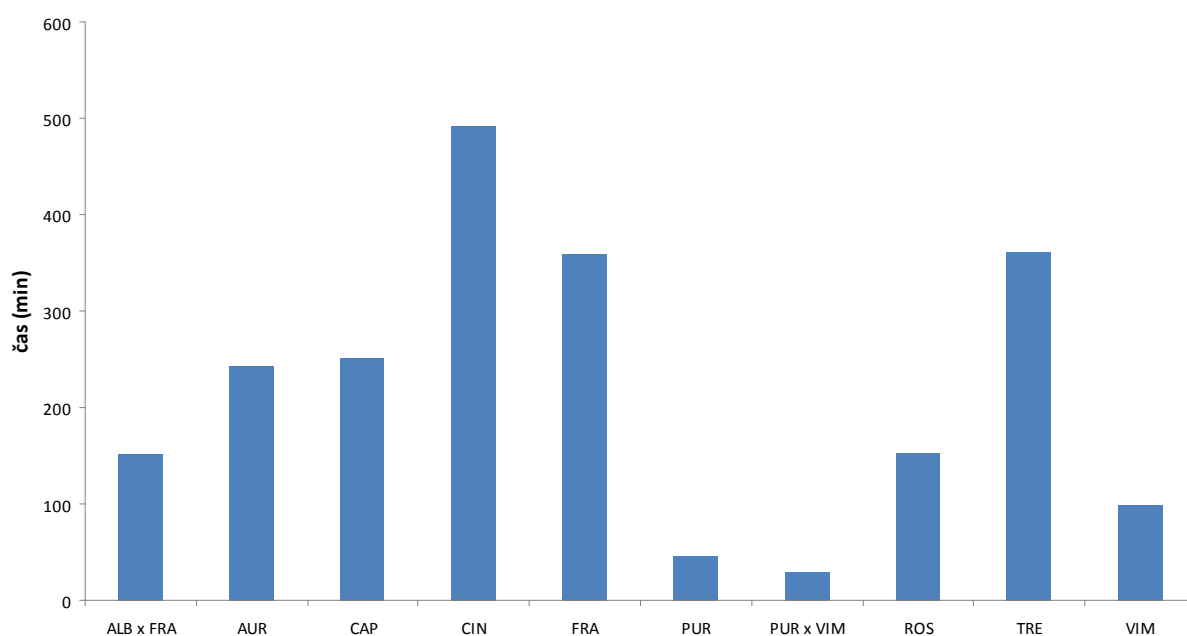
jedničku a logaritmicky transformoval. U všech analýz jsem prováděl Monte-Carlo test signifikance všech kanonických os s 999 permutacemi.

Nejprve jsem spočítal CCA s druhy hostitelských rostlin jako environmentálními prediktory. Lokality sběru jsem použil jako kovariáty. Další analýzy jsem prováděl pouze s vrbami, data získaná na topolu osice jsem do nich již nezahrnoval. Takto jsem provedl CCA vlivu druhu hostitelské rostliny, specific leaf area a hustoty trichomů na spodní a horní straně listu na složení společenstev herbivorního hmyzu. Lokality jsem opět použil jako kovariáty. Pro porovnání vlivu jednotlivých proměnných jsem provedl parciální analýzy. Výsledky mnohorozměrných analýz jsem vizualizoval pomocí programu CanoDraw for Windows 4.12.

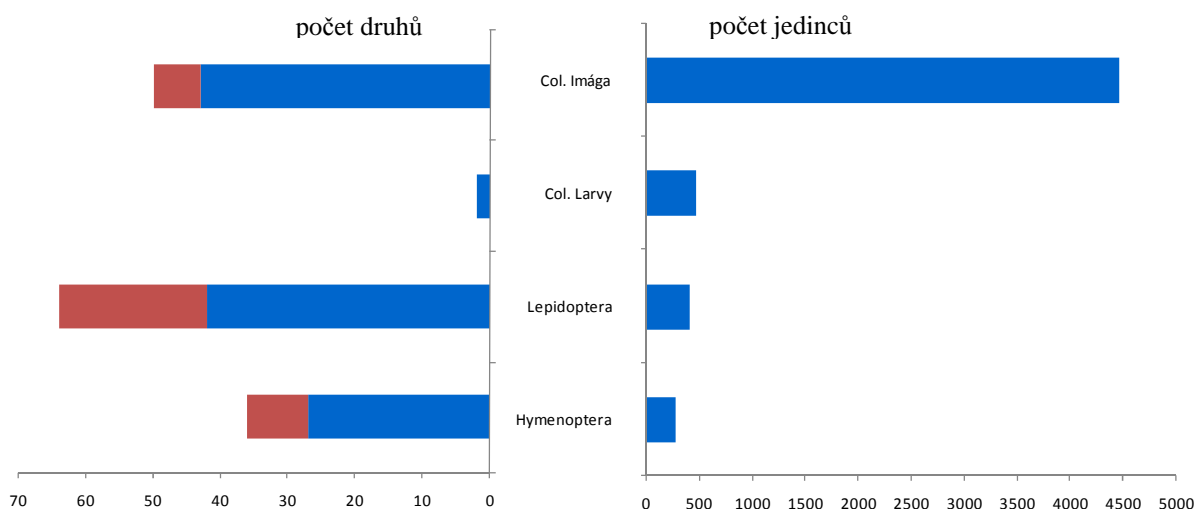
3. Výsledky

3.1 Sběr a determinace hmyzu

Celková doba sběru byla 2187 minut čistého času. Vzhledem k vzácnému výskytu některých druhů vrb, nebyla intenzita sběru mezi jednotlivými druhy vyrovnaná (Obr. 1). Celkem bylo nasbíráno 5597 jedinců „leaf-chewers“ ze 152 druhů. Nejpočetněji byla ve sběrech zastoupena imága brouků, největší druhovou diverzitu měli motýli (Obr. 2). Z 64 druhů motýlů bylo však jen 42 zaznamenáno ve více jak dvou jedincích. Oproti tomu měli brouci proporcí vzácných druhů podstatně nižší (7 z 50).



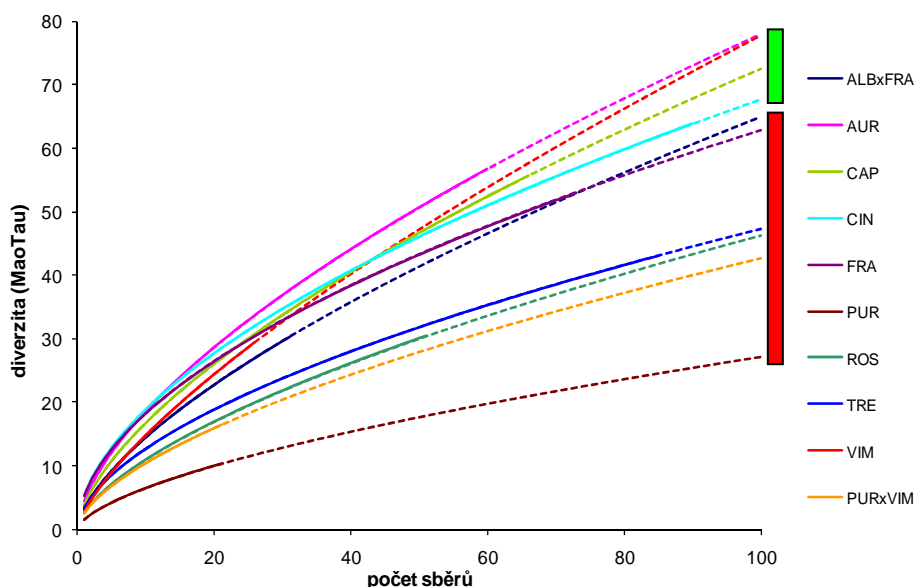
Obrázek 1. Čas strávený sběrem hmyzu na jednotlivých druzích stromů. Druhy stromů jsou označeny prvními třemi písmeny druhového názvu (Tab 1.).



Obrázek 2. Zastoupení jednotlivých skupin – housenic pilatek, housenek motýlů, imág brouků a jejich larev ve sběrech. Zobrazen je počet druhů a celkový počet jedinců těchto skupin. Červeně jsou vyznačeny druhy s méně než třemi jedinci.

3.2 Akumulační křivky druhů

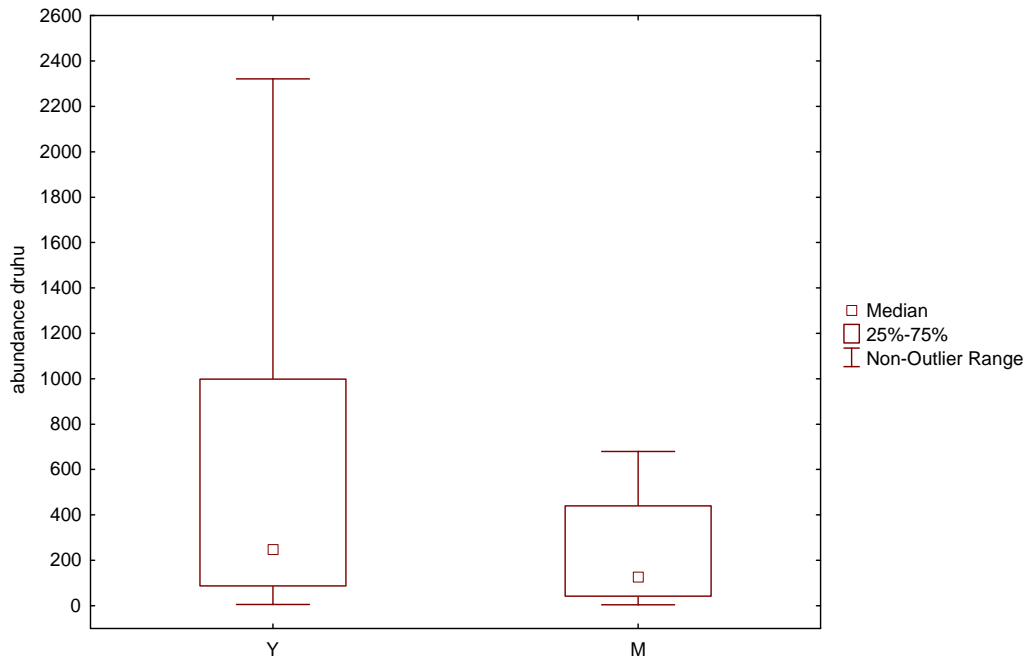
Výsledky porovnání diverzity odhadované podle akumulčních křivek potvrdily předpoklad, že společenstva herbivorního hmyzu jsou druhově bohatší na vrbách s nižším obsahem fenolických glykosidů než na vrbách s vysokým obsahem těchto sekundárních metabolitů (Obr. 3).



Obrázek 3. Akumulační křivky druhů. Plná čára představuje hodnoty pro reálná data, přerušovanou čárou je vyznačen odhad růstu diverzity. Červeným pruhem jsou označeny vrby s vysokým obsahem fenolických glykosidů, zeleným druhy s jejich nízkým obsahem.

3.3 Sezónní trendy

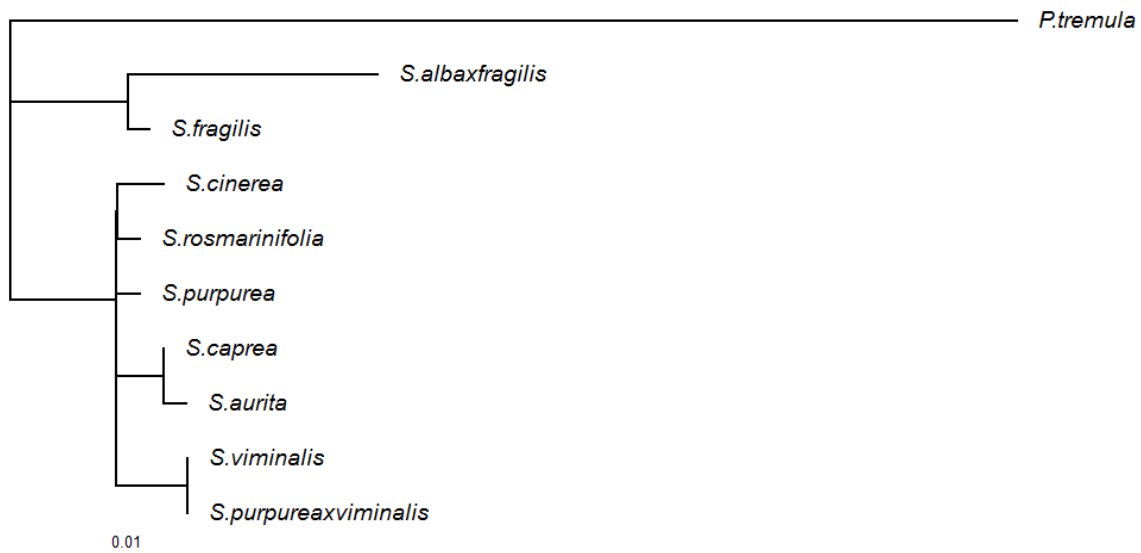
Překryv mezi jarním a letním obdobím sběrů byl 47 druhů, což představuje 31% z celkového počtu. Ačkoliv například na *Salix purpurea* byla celková abundance herbivorního hmyzu na jaře o 80% vyšší než v létě, byly rozdíly v abundanci jednotlivých druhů hmyzu mezi jarem a létem pro údaje ze všech druhů vrb neprůkazné (párový t-test, $t=0.723538$; $df=47$; $p=0.472935$, Obr. 4).



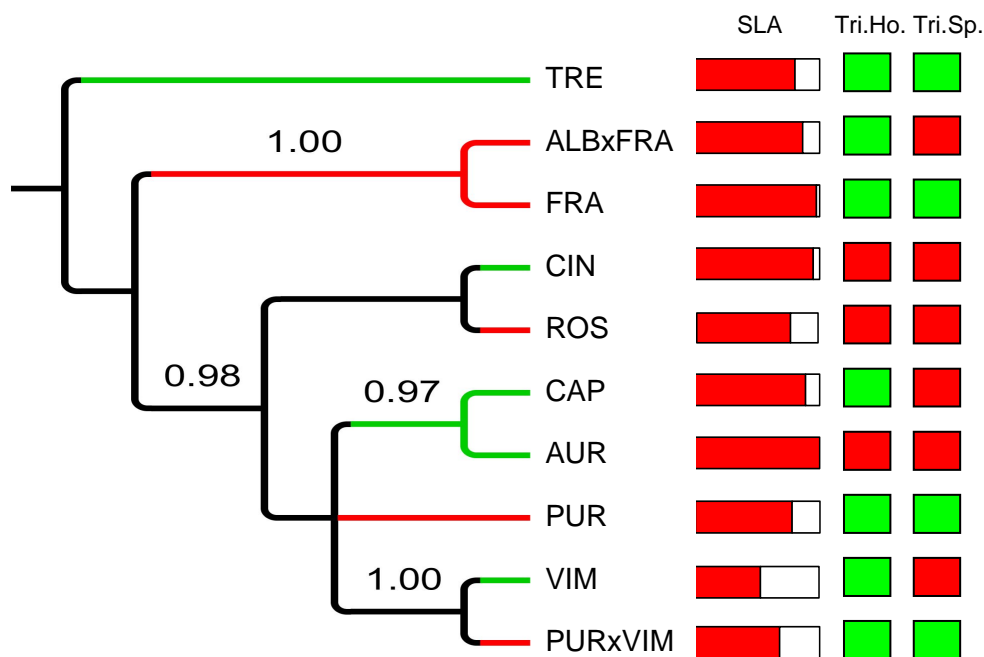
Obrázek 4. Porovnání abundance jednotlivých druhů herbivorů na jaře na mladých listech (Y) a v létě na plně vyvinutém listoví (M). Párový t-test: $t=0.723538$; $df=47$; $p=0.472935$.

3.4 Molekulární analýzy

Ukázalo se, že v rámci sekvencí ITS1, ITS2, matK a trnT-trnL, které jsou v jiných případech na mezidruhové úrovni poměrně variabilní, je rod *Salix* velice konzervativní. Fylogram příbuznosti druhů rodu *Salix* zrekonstruovaný metodou maximum likelihood na základě lokusů ITS1, ITS2 a trnL-trnT ukazuje obrázek 5. Vzhledem k nepatrné délce některých větví, způsobené malou variabilitou sekvencí, zde pro přehlednost uvádím i kladogram, kde délka větví neodpovídá fylogenetickým vzdálenostem (Obr. 6). Na tomto kladogramu jsou vymapovány vlastnosti jednotlivých druhů stromů a vyznačeny hodnoty posteriorních pravděpodobností pro Bayesiánskou analýzu.



Obrázek 5. Fylogram příbuznosti druhů rodu *Salix* zrekonstruovaný na základě lokusů ITS1, ITS2 a trnL-trnT metodou maximum likelihood. Kladogram je zakořeněn druhem *Populus tremula*.



Obrázek 6. Kladogram příbuznosti druhů rodu *Salix* s vyznačenými hodnotami posteriorních pravděpodobností. Zeleně označené větve reprezentují linie s nízkým obsahem fenolických glykosidů, červeně linie s jejich vysokým obsahem. V pravé části obrázku jsou vyznačeny morfologické vlastnosti pro daný druh – specific leaf area (SLA), trichomy na horní (Tri.Ho.) a spodní (Tri.sp.) straně listu. Přítomnost nebo nepřítomnost trichomů je vyznačena červenou, respektive zelenou barvou. Taxony jsou označeny prvními písmeny druhových názvů.

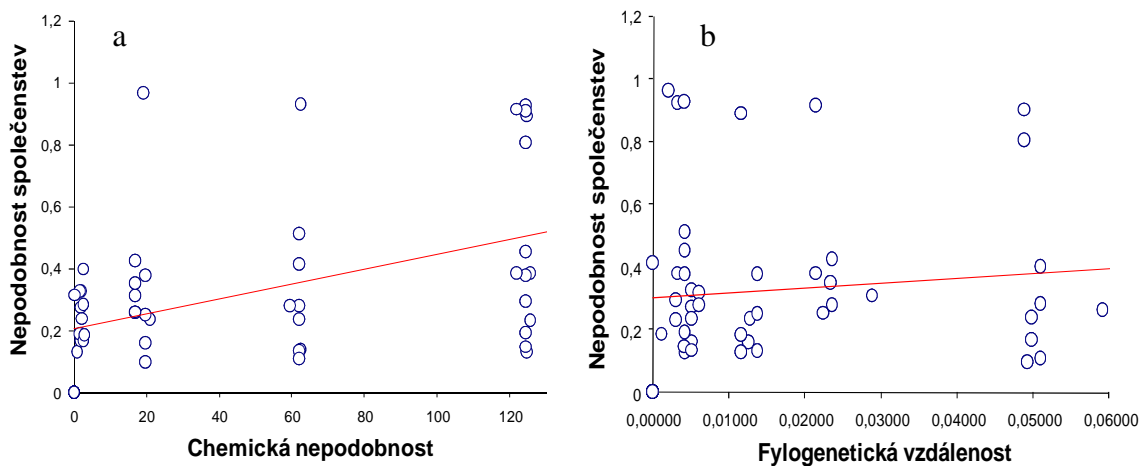
3.5 Porovnání matic nepodobností

Mantelův test prokázal, že morfologické vlastnosti ani obsah fenolických glykosidů nejsou korelované s fylogenezí rodu *Salix* (Tab.6). Všechny tyto vlastnosti jsem tak mohl během analýz používat jako samostatné proměnné bez rizika pseudoreplikací.

Tabulka 6. Výsledky Mantelova testu korelace matic podobností vlastností jednotlivých druhů rostlin s maticí jejich fylogenetických vzdáleností.

Charakteristika	r	p
obsah fenolických glykosidů	-0.2236	0.919
specific leaf area	-0.2154	0.830
trichomy na líci listu	-0.1873	0.668
trichomy na rubu listu	-0.1344	0.632

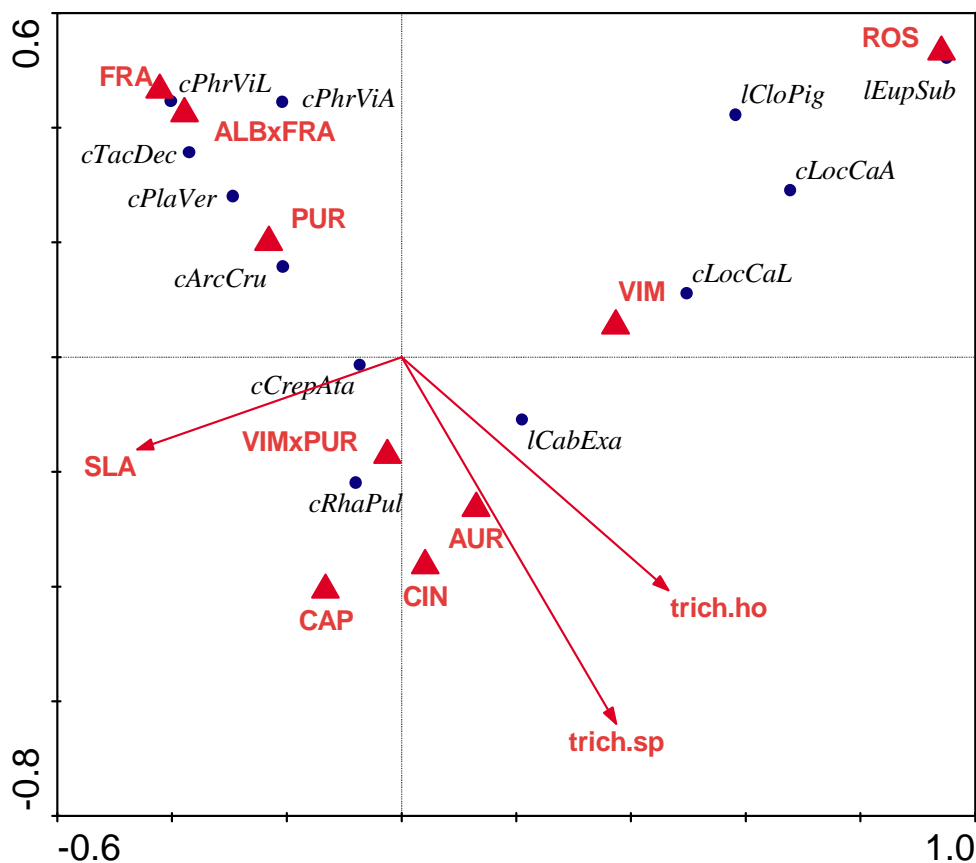
Vliv fylogeneze hostitelských rostlin na složení společenstev se ukázal jako neprůkazný ($r=0.06862$, $p=0.135$). Oproti tomu vliv fenolických glykosidů byl signifikantní. Podobnost společenstev herbivorního hmyzu klesá s podobností chemického složení hostitelských rostlin ($r=0.3796$, $p=0.031$, Obr. 7). Stejně testy jsem zopakoval samostatně pro motýly a brouky. Výsledky byly u brouků (fylogeneze: $r=0.1192$, $p=0.100$; fenolické glykosidy: $r=0.3517$, $p=0.029$) i motýlů (fylogeneze: $r=0.2107$, $p=0,117$; fenolické glykosidy: $r=0.3676$, $p=0.028$) podobné jako při analýze kompletních společenstev externě žeroucího herbivorního hmyzu.



Obrázek 7. Závislost nepodobnosti společenstev herbivorního hmyzu na nepodobnosti obsahu fenolických glykosidů v listech hostitelských rostlin (a) a jejich fylogenetické vzdálenosti (b). Jednotlivé body odpovídají dvojicím chemické, respektive fylogenetické nepodobnosti hostitelských rostlin a nepodobnosti složení na nich se vyskytujících společenstev herbivorního hmyzu. Podobnost společenstev signifikantně klesá s podobností chemického složení hostitelských rostlin ($r=0.3796$, $p=0.031$), ale není ovlivněna jejich fylogenetickou vzdáleností ($r=0.06862$, $p=0.135$).

3.6 Mnohorozměrné analýzy

Výsledky CCA s druhy hostitelských rostlin jako environmentálními prediktory potvrdily, že druhová příslušnost hostitelské rostliny má vliv na složení společenstev herbivorního hmyzu (Monte-Carlo test, $F=1.969$, $p<0.001$). První dvě osy vysvětlily 86% variability. Druhy stromů se rozdělily podle první osy na topol osiku na jedné straně a všechny vrby na straně druhé. Do CCA porovnání vlivu morfologie listů na složení herbivorních společenstev jsem topol osiku již nezařadil, aby vynikly rozdíly mezi jednotlivými druhy vrb. Druhová příslušnost vrb a morfologie listů měly dopad na složení herbivorní společenstva (Monte-Carlo test, $F=2.410$, $p<0.001$). První dvě kanonické osy vysvětlily 68% variability. Oproti ostatním vrbám je jednoznačně vymezena *Salix rosmarinifolia*. V ordinačním diagramu jsou vyznačeny druhy herbivorů, které vysvětlují více než 5% variability. Jedná se především o brouky a jejich larvy.



Obrázek 9. CCA ordinační diagram vlivu druhové příslušnosti hostitelských rostlin a morfologie jejich listů na složení společenstev externě žeroucího herbivorního hmyzu. První dvě kanonické osy vysvětlují 68% variability. Druhy vrby jsou označeny prvními třemi písmeny druhového názvu. V diagramu jsou vyznačeny tři morfologické vlastnosti listů – specific leaf area (SLA), trichomy na horní (trich.ho) a spodní (trich.sp) straně listů. Do diagramu jsou zahrnuty druhy imág brouků (c...A), jejich larev (c...L) a housenek motýlů (l...), které vysvětlují více jak 5% variability. Žádný druh pilatky nepřesáhl mírou vysvětlené variability 5%.

Z ordinačního diagramu pro tuto analýzu je patrné, že jednotlivé druhy vrb tvoří shluky především na základě hustoty trichomů a také obsahu fenolických glykosidů, který ale nebyl jako vysvětlující proměnná do této analýzy zahrnut (Obr. 9).

Parciální analýzy pro jednotlivé proměnné ukázaly, že všechny mají signifikantní vliv na složení herbivorních společenstev. Největší míru variability, 46.2%, vysvětlí druhová příslušnost hostitelských rostlin (Monte-Carlo test, $F=2.181$, $p<0.001$). Trichomy na horní straně listu vysvětlí 23% variability ($F= 2.842$, $p<0.001$), což je více než trichomy na spodní straně listu, které vysvětlují 19.9% variability ($F=2.468$, $p<0.001$). Specific leaf area vysvětluje 23.2% variability ($F=2.870$, $p<0.001$).

4. Diskuze

Druhově nejpočetněji byli zastoupeni motýli. Oproti broukům však byla velká část druhů motýlů zaznamenána pouze v jednom nebo dvou jedincích. Pokud tedy nebudeme brát singletony a doubletony v úvahu, je druhová diverzita motýlů a brouků na vrbách vyrovnaná. Z hlediska počtu jedinců byla imága brouků zcela dominantní a představovala 80% všech individuů. Výsledky mé práce tak ukazují, že z hlediska abundance jsou na vrbách nejvýznamnějšími herbivory z gildy leaf chewers dospělci brouků. Ačkoliv jsem sběrem hmyzu strávil téměř 2200 minut čistého času je ze sklonu akumulčních křivek patrné, že společenstva na některých druhích vrb nebyla zcela uspokojivě prosbírána a ideální by bylo na těchto vrbách ve sběru pokračovat.

Porovnání akumulčních křivek herbivorního hmyzu pro jednotlivé druhy stromů ukázalo, že nejvyšší diverzitu herbivorů hostí vrby s nízkým obsahem fenolických glykosidů. Toto zjištění podporuje hypotézu, že by se na vrbách s vysokým obsahem fenolických glykosidů mělo vyskytovat méně druhů herbivorního hmyzu, než na druhích s nízkým obsahem těchto sekundárních metabolitů (Rowell-Rahier, 1984). To by mohlo být způsobeno jedinečností fenolických glykosidů, na které se narozdíl od kondenzovaných taninů, běžně se vyskytujících u jiných druhů stromů, dokázalo přizpůsobit méně herbivorního hmyzu. Zvláště patrný je tento trend u *Salix purpurea*, která patří mezi našimi vrbami k druhům s nejvyšším obsahem fenolických glykosidů a mezi studovanými druhy vrb podporovala zdaleka nejchudší společenstva herbivorního hmyzu. Z terénního pozorování byl u této vrby navíc patrný i další trend. Zatímco na jaře se na této vrbě vyskytovali herbivoři v relativně vysokých populačních hustotách, došlo s postupem sezóny k rapidnímu snížení jejich abundancí. Vysvětlením tohoto rozdílu by mohla být sezónní variabilita v obsahu dusíku a fenolických glykosidů. Fenolické glykosidy herbivorní hmyz negativně ovlivňují dvěma způsoby: odpuzují dospělé brouky (Kolehmainen *et al.*, 1995) a zpomalují růst larev (Denno *et al.*, 1990). Tento negativní vliv by mohl být vyvážen vysokými koncentracemi dusíku, kterého mladé listy na jaře obsahují zvýšené množství (Denno *et al.*, 1990), čímž by se *S. purpurea* stala pro herbivorní hmyz atraktivní. S postupem sezóny však obsah dusíku v listech klesá (Meyer *et al.*, 1987), až plně převáží negativní vliv fenolických glykosidů. To patrně následně vyústí v pokles abundancí herbivorů. Obdobný scénář by měl platit i pro další druhy vrb, nicméně výsledek porovnání abundancí herbivorního hmyzu mezi jarem a pokročilejšími fázemi sezóny byl pro všechny zkoumané druhy stromů neprůkazný. Jedním z možných vysvětlení tohoto výsledku je, že u vrb s malým obsahem fenolických glykosidů není propad

v kvalitě listů tak výrazný a abundance herbivorů se tak mezi jednotlivými fázemi sezóny příliš neliší.

V mnohorozměrné analýze se rozdělily hostitelské stromy podle první osy na vrby a topol osiku. To ukazuje, že složení herbivorních společenstev je na topolu osice, vrbám blízcě příbuzném druhu, výrazně odlišné od všech zkoumaných vrb. Vrby tak z hlediska složení svých herbivorních společenstev tvoří homogenní skupinu. V rámci vrb došlo na rozdělění přibližně do dvou skupin – I) vrby s vysokým obsahem fenolických glykosidů a hladkými nebo jen velice řídce ochlupenými listy (*S. alba x fragilis*, *S. fragilis*, *S. purpurea*) a II) vrby s hustě ochlupenou spodní stranou listů a nízkým obsahem fenolických glykosidů (*S. aurita*, *S. caprea*, *S. cinerea*). K druhé skupině má blízko *S. purpurea x viminalis*, která má sice povrch listů zcela lysý ale má nízký obsah fenolických glykosidů. Samostatně stojí *S. viminalis*, která ačkoliv se skupině II podobá ochlupením listů i obsahem fenolických glykosidů má narozdíl od nich malou specific leaf area.

Od těchto dvou skupin se významně liší *Salix rosmarinifolia*. Tato vrba je výjimečná vysokým obsahem fenolických glykosidů, hustě ochlupenými listy, nízkou specific leaf area a bylinným vzrůstem. *S. rosmarinifolia* tak hostí výrazně odlišná společenstva herbivorního hmyzu, která jsou druhově poměrně chudá. Za nízkou diverzitu společenstev herbivorního hmyzu může být v tomto případě kromě vysokého obsahu fenolických glykosidů zodpovědná i růstová forma a omezené rozšíření tohoto druhu v ČR, protože je známo, že rostliny s jednodušší architekturou a malým areálem rozšíření hostí obecně chudší společenstva herbivorů (Lawton, 1983; Leather, 1991).

Zatímco hybrid *Salix alba x fragilis* je složením svých společenstev velice podobný *S. fragilis*, není *S. purpurea x viminalis* podobná ani jednomu ze svých rodičovských druhů. Pozice *S. alba x fragilis* je pravděpodobně způsobena tím, že tento hybrid není obsahem fenolických glykosidů ani morfologií listů od *S. fragilis* příliš odlišný. Oproti tomu se kříženec *S. purpurea x viminalis* odhadnutým obsahem fenolických glykosidů od svých rodičovských druhů značně liší a to od obou přibližně stejnou měrou. Morfologie listů *Salix purpurea x viminalis* je takřka shodná s *S. purpurea*, která má lysé listy s nízkou specific leaf area, ale je velmi rozdílná od *S. viminalis*, která má spodní stranu listů silně ochlupenou. Pokud by bylo složení společenstev herbivorního hmyzu určeno výhradně morfologií listů, měl by se tento hybrid svou pozicí na ordinačním diagramu podobat *S. purpurea*. Velká odlišnost společenstev herbivorů na *S. purpurea x viminalis* od obou rodičovských druhů ale spíše nasvědčuje většímu významu obsahu fenolických glykosidů. Jejich význam podporuje i to, že podobně jako je hybrid *S. purpurea x viminalis* svým chemickým složením

intermediální mezi oběma rodičovskými druhy, je i od obou z nich přibližně stejně vzdálen na ordinačním diagramu.

Všechny sledované morfologické vlastnosti listů měly na herbivorní hmyz signifikantní vliv a vysvětlily podobnou míru variability. Jako nejlepší prediktor složení herbivorních společenstev se ukázala specific leaf area. Tato vlastnost nepřímo vyjadřuje tuhost listu a také obsah vody, který je často korelován s obsahem dusíku (Coley *et al.*, 2006). Obsah vody a dusíku přitom patří k nejdůležitějším vlastnostem ovlivňujícím specializaci herbivorního hmyzu (Schoonhoven *et al.*, 2005). Zvláště na vrbách může být obsah dusíku důležitý také z toho důvodu, že herbivorům kompenzuje negativní vliv fenolických glykosidů.

Trichomy mají na herbivorní hmyz na vrbách značný dopad (Topp *et al.*, 2002; Zvereva *et al.*, 1998) a jejich význam podporují i výsledky méj práce, přičemž ochlupení vrchní strany listu mělo větší vliv než ochlupení strany spodní. Tento výsledek podporuje moji hypotézu, že především brouci a jejich larvy, kteří se živí skeletováním, preferují pro získávání potravy méně ochlupenou stranu listu a budou proto v tomto případě více ovlivněni hustotou trichomů na vrchní straně listu.

Pro detailnější studium vlivu trichomů na herbivorní hmyz by bylo zajímavé rozlišovat mezi sebou vrby nejen na základě hustoty trichomů, ale také podle jejich typu. Mnou zkoumané druhy vrb totiž můžeme rozdělit do dvou skupin. První z nich jsou druhy s rovnými přilehlými trichomy, druhou představují vrby s dlouhými, odstálými kadeřavými chlupy. Dá se očekávat, že oba dva typy budou ovlivňovat herbivory odlišným způsobem, protože mohou vyžadovat od konzumenta rozdílné adaptace. Odstálé chlupy mohou například méně vadit larvám žeroucím list na bázi trichomů (Dalin *et al.*, 2004), na druhou stranu mohou zase efektivněji bránit ovipozici a pohybu herbivora po listu.

Z ordinačního diagramu (Obr. 9) je patrné, že mezi druhy herbivorního hmyzu, které vysvětlily více jak 5% variability, jasně dominují brouci a jejich larvy. Tento výsledek může být způsoben dvěma faktory. Prvním z nich je početnost. Brouků se nachytalo největší množství jedinců a jako skupina jsou nejlépe prosbíráni, takže svým výskytem dobře odráží rozdíly mezi jednotlivými druhy vrb. Druhým možným důvodem je fakt, že brouci na vrbách patří obecně k více specializovaným skupinám hmyzu. Mezi specialisty patří například *Phratora vitellinae*, jejíž imága a larvy se vyskytovaly na vrbách s vyšším obsahem fenolických glykosidů a lysými listy. Dalším početně zastoupeným druhem mandelinky byla *Lochmaea capreae*, která se vyskytuje především na vrbách s nízkým obsahem fenolických glykosidů (Denno *et al.*, 1990). Běžně jsem ji tak zaznamenal na *Salix aurita*, *S. cinerea* a *S. viminalis*. Neočekávaný byl však její výskyt na *S. rosmarinifolia*, kde zvláště na lokalitě

Ohrazení byla společenstva herbivorního hmyzu touto mandelinkou zcela dominována. Tento druh mandelinky je tak částečně zodpovědný za nepodobnost společenstev herbivorního hmyzu mezi *S. rosmarinifolia* a ostatními druhy vrb bohatými na fenolické glykosidy, na kterých jsem ji nenalezl. Podobný jev, kdy se příbuzné mandelinky *Galerucella lineola* nebo *Plagioderma versicolora*, jinak žeroucí vrby s nízkým obsahem fenolických glykosidů, z neznámých příčin vyskytnou ve velkém množství na vrbě s vysokým obsahem těchto sekundárních metabolitů, byl zaznamenán již dříve (Ikonen, 2002). Druh *Lochmaea capreae* se tedy zřejmě chová podobně. Ačkoliv tento jev nebyl zatím přesně vysvětlen, mohl by za ním stát například vyšší obsah dusíku u některých, na fenolické glykosidy bohatých druhů vrb (Denno *et al.*, 1990).

O vrbách je známo, že mají velice konzervativní sekvence DNA (Azuma *et al.*, 2000; Leskinen *et al.*, 1999). S tímto problémem jsem se setkal i během své práce. Z použitých lokusů byl nejméně variabilní chloroplastový spacer *matK*, který neposkytoval takřka žádnou fylogenetickou informaci a byl proto zcela nepoužitelný pro rekonstrukci fylogeneze rodu *Salix*. Také ribozomální ITS1 a ITS2 a chloroplastový *trnT-trnL* neposkytovaly odděleně dostatečně silný fylogenetický signál. K zesílení fylogenetického signálu ale významně přispělo jejich spojení a kódování mezer. Přesto mají jednotlivé větve získaného fylogramu velmi malou podporu a jejich délka ukazuje na malou variabilitu použitých sekvencí. Nízké hodnoty posteriorních pravděpodobností pro velkou část větví zpochybňují zde prezentovanou podobu fylogeneze rodu *Salix* a nevylučují alternativní scénáře jejího průběhu. Nicméně některé oblasti fylogramu mají dostatečnou podporu posteriorních pravděpodobností aby z nich šlo vyvodit jisté závěry. Prvním z nich je, že hybridy jsou umístováni jako sesterský taxon jednoho z rodičovských druhů. Dá se očekávat, že vzhledem k použití chloroplastové DNA a jejímu způsobu vertikálního přenosu se jedná o druh mateřský a jedná se tedy o metodologický artefakt. Druhým výsledkem je, že *Salix fragilis* je zde s vysokou podporou umístována jako sesterský taxon všech ostatních druhů mnou zkoumaných vrb. Zajímavé je také umístění *S. aurita* a *S. caprea* jako sesterských druhů. U *S. aurita* by se dala spíše očekávat blízká příbuznost s *S. cinerea*, s níž se tento druh v přírodě velice často kříží. Kromě těchto závěrů umožnila rekonstrukce fylogeneze testovat nulovou hypotézu, že jsou s ní další zkoumané vlastnosti (obsah fenolických glykosidů, morfologie listů) korelované. Její zamítnutí následně dovolilo použití těchto vlastností jako nezávislých proměnných a v případě obsahu fenolických glykosidů porovnat jejich vliv na složení společenstev herbivorního hmyzu s vlivem fylogeneze hostitelských rostlin.

Porovnání chemického složení mezi jednotlivými druhy vrb jsem provedl na základě délek větví fenogramu obsahu fenolických glykosidů z práce Julkunen-Tiitto (1989). Tento přístup není ideální, ale byl jsem nucen ho použít, vzhledem k tomu, že původní data z této práce jsou bohužel ztracena a další studie, která by mezi sebou porovnávala obsah sekundárních metabolitů pro všechny mnou studované druhy vrb, nebyla od té doby publikována. Pro správné vyhodnocení dat a získání maximální informace by bylo optimální provést celou analýzu obsahu sekundárních metabolitů znovu a to přímo pro jedince ze zkoumaných lokalit. Tento přístup by byl navíc vhodnější i z důvodu, že obsah fenolických glykosidů bude mezi vrbami z Čech a Finska, kde byla studie Julkunen-Tiitto (1989) prováděna, mírně odlišný, ačkoliv vnitrodruhová variabilita by měla být značně menší než mezidruhová (Nyman *et al.*, 2005).

Přesto, že použité metody odhadu podobnosti chemického složení mezi jednotlivými druhy stromů nebyly ideální, podařilo se prokázat vliv sekundárních metabolitů na složení herbivorních společenstev. Naopak vliv fylogeneze byl neprůkazný. Tento výsledek se shoduje s předchozími pracemi na obdobné téma, například se studií Becerra (1997), která zkoumala vztah novosvětských mandelínek rodu *Blepharida* a stromů rodu *Bursera*. Obecně se dá totiž očekávat, že ve většině případů bude fylogeneze dobrým prediktorem složení společenstev herbivorního hmyzu pouze v případech, kdy jsou s ní korelované vlastnosti důležité pro specializaci herbivorů (Bangert *et al.*, 2006). V tomto případě s ní však ani obsah fenolických glykosidů a ani morfologické vlastnosti listů korelované nebyly. V samostatných analýzách pro brouky a motýly se výsledky nezměnily a obsah fenolických glykosidů vycházel stále průkazně a fylogeneze nikoliv.

Pro brouky, kteří jsou na vrbách představováni především relativně specializovanými mandelinkami a nosatci, není vliv sekundárních metabolitů příliš překvapivý a byl často prokázán pro jednotlivé druhy (Denno *et al.*, 1990; Ikonen, 2002; Kolehmainen *et al.*, 1995; Oriens *et al.*, 1997; Rank, 1992; Rank *et al.*, 1998; Soetens *et al.*, 1991; Tahvanainen *et al.*, 1985), ačkoliv Topp *et al.* (2002), kteří se zabývali herbivorními brouky na vrbách komplexně, vliv fenolických glykosidů na složení společenstev brouků nepotvrdili. Motýli byli na vrbách zkoumáni podstatně méně než brouci a pilatky. O mūrách bylo zjištěno, že jejich housenky jsou většinou polyfágní (Rowell-Rahier, 1984). Nebylo tak jisté zda budou fenolické glykosidy složení společenstev housenek motýlů ovlivňovat. Výsledek testu však byl průkazný stejně jako u brouků. To lze vysvětlit tím, že kromě mūr byly do analýz zahrnuty i daleko specializovanější skupiny, například obaleči. Druhým důvodem může být to, že ačkoli jsou polyfágní druhy pravděpodobně schopné se živit na širokém spektru vrb s

nízkým obsahem fenolických glykosidů, které se svou chemickou obranou příliš neliší od našich jiných stromů, bude pro ně limitující vysoký obsah těchto sekundárních metabolitů u ostatních druhů.

Výsledky této studie potvrdily velký význam sekundárních metabolitů a morfologie listů rostlin na složení společenstev herbivorního hmyzu. Vliv fylogeneze v tomto systému, kde s ní nejsou vlastnosti důležité pro specializaci herbivorního hmyzu korelované, prokázán nebyl. To potvrzuje hypotézu, že ve většině případů je herbivorní hmyz ovlivňován spíše produkty genů než samotnou v nich obsaženou molekulárně fylogenetickou informací.

Vzhledem k tomu, že obsah fenolických glykosidů a fylogeneze vrb jsou na sobě nezávislé, jsou vrby ideální k detailnějšímu zkoumání dopadu příbuznosti a obsahu sekundárních metabolitů rostlin na specializaci herbivorního hmyzu. Tento výzkum však bude vyžadovat rekonstruovat fylogenezi vrb na základě informativnějších sekvencí DNA a novou analýzu obsahu fenolických glykosidů.

5. Použitá literatura

- Anstett, M.C., Hossaert-McKey, M., & Kjellberg, F. (1997) Figs and fig pollinators: Evolutionary conflicts in a coevolved mutualism. *Trends In Ecology & Evolution*, **12**, 94-99.
- Azuma, T., Kajita, T., Yokoyama, J., & Ohashi, H. (2000) Phylogenetic relationships of *Salix* (Salicaceae) based on *rbcl* sequence data. *American Journal Of Botany*, **87**, 67-75.
- Bangert, R.K., Turek, R.J., Rehill, B., Wimp, G.M., Schweitzer, J.A., Allan, G.J., Bailey, J.K., Martinsen, G.D., Keim, P., Lindroth, R.L., & Whitham, T.G. (2006) A genetic similarity rule determines arthropod community structure. *Molecular Ecology*, **15**, 1379-1391.
- Becerra, J.X. (1997) Insects on plants: Macroevolutionary chemical trends in host use. *Science*, **276**, 253-256.
- Becerra, J.X. (2007) The impact of herbivore-plant coevolution on plant community structure. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **104**, 7483-7488.
- Bernays, E. & Graham, M. (1988) On The Evolution Of Host Specificity In Phytophagous Arthropods. *Ecology*, **69**, 886-892.
- Bernays, E.A. (1986) Diet-Induced Head Allometry Among Foliage-Chewing Insects And Its Importance For Graminivores. *Science*, **231**, 495-497.
- Bernays, E.A. (1997) Feeding by lepidopteran larvae is dangerous. *Ecological Entomology*, **22**, 121-123.
- Bernays, E.A. (1998) The value of being a resource specialist: Behavioral support for a neural hypothesis. *American Naturalist*, **151**, 451-464.
- Bowers, M.D. (1983) The Role Of Iridoid Glycosides In Host-Plant Specificity Of Checkerspot Butterflies. *Journal Of Chemical Ecology*, **9**, 475-493.
- Braby, M.F., Trueman, J.W.H., & Eastwood, R. (2005) When and where did troidine butterflies (Lepidoptera: Papilionidae) evolve? Phylogenetic and biogeographic evidence suggests an origin in remnant Gondwana in the Late Cretaceous. *Invertebrate Systematics*, **19**, 113-143.
- Brennan, E.B. & Weinbaum, S.A. (2001) Stylet penetration and survival of three psyllid species on adult leaves and 'waxy' and 'de-waxed' juvenile leaves of *Eucalyptus globulus*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **100**, 355-363.
- Bush, G.L. (1975). Sympatric speciation in phytophagous parasitic insects. In *Evolutionary strategies of parasitic insects and mites*. (eds P.W. Price), pp. 1-5. Plenum, New York.
- Cardoso, M.Z. (2008) Herbivore handling of a plant's trichome: The case of *Heliconius charithonia* (L.) (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Passiflora Lobata* (Killip) Hutch. (Passifloraceae). *Neotropical Entomology*, **37**, 247-252.
- Coley, P.D. & Barone, J.A. (1996) Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review Of Ecology And Systematics*, **27**, 305-335.
- Coley, P.D., Bateman, M.L., & Kursar, T.A. (2006) The effects of plant quality on caterpillar growth and defense against natural enemies. *Oikos*, **115**, 219-228.
- Coupe, M.D. & Cahill, J.F. (2003) Effects of insects on primary production in temperate herbaceous communities: a meta-analysis. *Ecological Entomology*, **28**, 511-521.
- Crane, P.R., Friis, E.M., & Pedersen, K.R. (1995) The Origin And Early Diversification Of Angiosperms. *Nature*, **374**, 27-33.
- Čížek, P. & Doguet, S. (2008) *Klíč k určování dřepčičků (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae) Česka a Slovenska* Městské muzeum Nové Město nad Metují, Nové Město nad Metují.
- Dalin, P., Bjorkman, C., & Eklund, K. (2004) Leaf beetle grazing does not induce willow trichome defence in the coppicing willow *Salix viminalis*. *Agricultural And Forest Entomology*, **6**, 105-109.
- Damman, H. (1993). Patterns of interaction among herbivore species. In *Caterpillars. Ecological and evolutionary constraints on foraging* (eds N.E. Stamp & T.M. Casey), pp. 131-169. Chapman & Hall, New York.

- Denno, R.F., Larsson, S., & Olmstead, K.L. (1990) Role Of Enemy-Free Space And Plant-Quality In Host-Plant Selection By Willow Beetles. *Ecology*, **71**, 124-137.
- Dixon, A.F.G., Kindlmann, P., Lepš, J., Holman, J. (1987) Why there are so few species of aphids, especially in the tropics. *The American Naturalist*, **129**, no. 4, 580-592.
- Dobler, S., Mardulyn, P., Pasteels, J.M., & RowellRahier, M. (1996) Host-plant switches and the evolution of chemical defense and life history in the leaf beetle genus *Oreina*. *Evolution*, **50**, 2373-2386.
- Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. (1964) Butterflies And Plants - A Study In Coevolution. *Evolution*, **18**, 586-608.
- Erwin, T.L. (1982) Tropical forests: their richness in Coleoptera and other arthropod species. *The Coleopterists Bulletin*, **36**, 74-75.
- Farrell, B. & Mitter, C. (1990) Phylogenesis Of Insect Plant Interactions - Have Phyllobrotica Leaf Beetles (Chrysomelidae) And The Lamiales Diversified In Parallel. *Evolution*, **44**, 1389-1403.
- Feeny, P. (1976). Plant apparency and chemical defense. In *Biochemical interaction between plants and insects: proceedings of the fifteenth annual meeting of the Phytochemical Society of North America* (eds J.W. Wallace & R.L. Mansell), pp. 1-40. Plenum Press, New York.
- Fine, P.V.A., Mesones, I., & Coley, P.D. (2004) Herbivores promote habitat specialization by trees in amazonian forests. *Science*, **305**, 663-665.
- Frey, J.E. & Bush, G.L. (1990) Rhagoletis Sibling Species And Host Races Differ In Host Odor Recognition. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **57**, 123-131.
- Fritz, R.S., Hochwender, C.G., Brunfeld, S.J., & Roche, B.M. (2003) Genetic architecture of susceptibility to herbivores in hybrid willows. *Journal Of Evolutionary Biology*, **16**, 1115-1126.
- Fritz, R.S., Nicholsons, C.M., & Brunfeld, S.J. (1994) Interspecific Hybridization Of Plants And Resistance To Herbivores - Hypotheses, Genetics, And Variable Responses In A Diverse Herbivore Community. *Oecologia*, **97**, 106-117.
- Gaston, K.J. (1991) The Magnitude Of Global Insect Species Richness. *Conservation Biology*, **5**, 283-296.
- Hjalten, J., Niemi, L., Wennstrom, A., Ericson, L., Roininen, H., & Julkunen-Tiitto, R. (2007) Variable responses of natural enemies to *Salix triandra* phenotypes with different secondary chemistry. *Oikos*, **116**, 751-758.
- Hochwender, C.G. & Fritz, R.S. (2004) Plant genetic differences influence herbivore community structure: evidence from a hybrid willow system. *Oecologia*, **138**, 547-557.
- Hochwender, C.G., Janson, E.M., Cha, D.H., & Fritz, R.S. (2005) Community structure of insect herbivores in a hybrid system: examining the effects of browsing damage and plant genetic variation. *Ecological Entomology*, **30**, 170-175.
- Chang, G.C., Rutledge, C.E., Biggam, R.C., & Eigenbrode, S.D. (2004) Arthropod diversity in peas with normal or reduced waxy bloom. *Journal Of Insect Science*, **4**.
- Chiang, H.S. & Norris, D.M. (1983) Morphological And Physiological-Parameters Of Soybean Resistance To Agromyzid Beanflies. *Environmental Entomology*, **12**, 260-265.
- Chmelař, J. & Koblížek, J. (1990). Salicaceae. In *Květena České republiky 2* (eds S. Hejný & B. Slavík), pp. 458-495. Academia, Praha.
- Ikonen, A. (2002) Preferences of six leaf beetle species among qualitatively different leaf age classes of three Salicaceous host species. *Chemoecology*, **12**, 23-28.
- Janz, N. & Nylin, S. (1998) Butterflies and plants: A phylogenetic study. *Evolution*, **52**, 486-502.
- Janz, N., Nylin, S., & Wahlberg, N. (2006) Diversity begets diversity: host expansions and the diversification of plant-feeding insects. *Bmc Evolutionary Biology*, **6**.
- Javorek, V. (1947) *Klíč k určování brouků ČSR* R. Promberger, Olomouc.
- Jermý, T. (1984) Evolution Of Insect Host Plant Relationships. *American Naturalist*, **124**, 609-630.
- Julkunen-Tiitto, R. (1989) Phenolic Constituents Of *Salix* - A Chemotaxonomic Survey Of Further Finnish Species. *Phytochemistry*, **28**, 2115-2125.
- Jurado-Rivera, J.A., Vogler, A.P., Reid, C.A.M., Petitpierre, E., & Gomez-Zurita, J. (2009) DNA barcoding insect-host plant associations. *Proceedings Of The Royal Society B-Biological Sciences*, **276**, 639-648.

- Kause, A., Saloniemi, I., Morin, J.P., Haukioja, E., Hanhimaki, S., & Ruohomaki, K. (2001) Seasonally varying diet quality and the quantitative genetics of development time and body size in birch feeding insects. *Evolution*, **55**, 1992-2001.
- Kolehmainen, J., Julkunen-Tiitto, R., Roininen, H., & Tahvanainen, J. (1995) Phenolic Glucosides As Feeding Cues For Willow-Feeding Leaf Beetles. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **74**, 235-243.
- Kopelke, J.P. (2007a) The European species of the genus *Phyllocolpa*, part I: the leucosticta -group (Insecta, Hymenoptera, Tenthredinidae, Nematinae). *Senckenbergiana biologica*, **87**, 75-109.
- Kopelke, J.P. (2007b) The European species of the genus *Phyllocolpa*, part II: the leucapsis-group (Insecta, Hymenoptera, Tenthredinidae, Nematinae). *Senckenbergiana biologica*, **87**, 149-161.
- Labandeira, C.C. (1998) Early history of arthropod and vascular plant associations. *Annual Review Of Earth And Planetary Sciences*, **26**, 329-377.
- Labandeira, C.C. & Sepkoski, J.J. (1993) Insect Diversity In The Fossil Record. *Science*, **261**, 310-315.
- Lavandero, B., Labra, A., Ramirez, C.C., Niemeyer, H.M., & Fuentes-Contreras, E. (2009) Species richness of herbivorous insects on *Nothofagus* trees in South America and New Zealand: The importance of chemical attributes of the host. *Basic And Applied Ecology*, **10**, 10-18.
- Lawton, J.H. (1983) Plant Architecture And The Diversity Of Phytophagous Insects. *Annual Review Of Entomology*, **28**, 23-39.
- Leather, S.R. (1991) Feeding Specialization And Host Distribution Of British And Finnish Prunus Feeding Macrolepidoptera. *Oikos*, **60**, 40-48.
- Leskinen, E. & Alstrom-Rapaport, C. (1999) Molecular phylogeny of Salicaceae and closely related Flacourtiaceae: evidence from 5.8 S, ITS 1 and ITS 2 of the rDNA. *Plant Systematics And Evolution*, **215**, 209-227.
- Martinsen, G.D., Driebe, E.M., & Whitham, T.G. (1998) Indirect interactions mediated by changing plant chemistry: Beaver browsing benefits beetles. *Ecology*, **79**, 192-200.
- Marussich, W.A. & Machado, C.A. (2007) Host-specificity and coevolution among pollinating and nonpollinating New World fig wasps. *Molecular Ecology*, **16**, 1925-1946.
- Matsuki, M. & Maclean, S.F. (1994) Effects Of Different Leaf Traits On Growth-Rates Of Insect Herbivores On Willows. *Oecologia*, **100**, 141-152.
- Meyer, G.A. & Montgomery, M.E. (1987) Relationships Between Leaf Age And The Food Quality Of Cottonwood Foliage For The Gypsy-Moth, *Lymantria-Dispar*. *Oecologia*, **72**, 527-532.
- Mitter, C., Farrell, B., & Futuyma, D.J. (1991) Phylogenetic Studies Of Insect Plant Interactions - Insights Into The Genesis Of Diversity. *Trends In Ecology & Evolution*, **6**, 290-293.
- Mooney, H.A. (1972) The carbon balance of plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **3**, 315-346.
- Mopper, S. (1996) Adaptive genetic: Structure in phytophagous insect populations. *Trends In Ecology & Evolution*, **11**, 235-238.
- Murakami, M., Yoshida, K., Hara, H., & Toda, M.J. (2005) Spatio-temporal variation in Lepidopteran larval assemblages associated with oak, *Quercus crispula*: the importance of leaf quality. *Ecological Entomology*, **30**, 521-531.
- Novotny, V., Basset, Y., Miller, S.E., Weiblen, G.D., Bremer, B., Cizek, L., & Drozd, P. (2002) Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. *Nature*, **416**, 841-844.
- Novotny, V., Drozd, P., Miller, S.E., Kulfan, M., Janda, M., Basset, Y., & Weiblen, G.D. (2006) Why are there so many species of herbivorous insects in tropical rainforests? *Science*, **313**, 1115-1118.
- Nyman, T., Farrell, B.D., Zinovjev, A.G., & Vikberg, V. (2006) Larval habits, host-plant associations, and speciation in nematine sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Evolution*, **60**, 1622-1637.
- Nyman, T. & Julkunen-Tiitto, R. (2005) Chemical variation within and among six northern willow species. *Phytochemistry*, **66**, 2836-2843.
- Nyman, T., Widmer, A., & Roininen, H. (2000) Evolution of gall morphology and host-plant relationships in willow-feeding sawflies (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Evolution*, **54**, 526-533.

- Orians, C.M. & Fritz, R.S. (1995) Secondary Chemistry Of Hybrid And Parental Willows - Phenolic Glycosides And Condensed Tannins In *Salix Sericea*, *S-Eriocephala*, And Their Hybrids. *Journal Of Chemical Ecology*, **21**, 1245-1253.
- Orians, C.M., Huang, C.H., Wild, A., Dorfman, K.A., Zee, P., Dao, M.T.T., & Fritz, R.S. (1997) Willow hybridization differentially affects preference and performance of herbivorous beetles. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **83**, 285-294.
- Pasteels, J.M., Rowell-Rahier, M., Braekman, J.C., & Daloze, D. (1984) Chemical Defenses In Leaf Beetles And Their Larvae - The Ecological, Evolutionary And Taxonomic Significance. *Biochemical Systematics And Ecology*, **12**, 395-406.
- Pasteels, J.M., Rowell-Rahier, M., Braekman, J.C., & Dupont, A. (1983) Salicin From Host Plant As Precursor Of Salicylaldehyde In Defensive Secretion Of Chrysomeline Larvae. *Physiological Entomology*, **8**, 307-314.
- Poorter, L., de Plassche, M.V., Willems, S., & Boot, R.G.A. (2004) Leaf traits and herbivory rates of tropical tree species differing in successional status. *Plant Biology*, **6**, 746-754.
- Poprawski, T.J., Greenberg, S.M., & Ciomperlik, M.A. (2000) Effect of host plant on *Beauveria bassiana*- and *Paecilomyces fumosoroseus*-induced mortality of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Environmental Entomology*, **29**, 1048-1053.
- Rank, N.E. (1992) Host Plant Preference Based On Salicylate Chemistry In A Willow Leaf Beetle (*Chrysomela-Aeneicollis*). *Oecologia*, **90**, 95-101.
- Rank, N.E., Kopf, A., Julkunen-Tiitto, R., & Tahvanainen, J. (1998) Host preference and larval performance of the salicylate-using leaf beetle *Phratora vitellinae*. *Ecology*, **79**, 618-631.
- Ricklefs, R.E. (2008) Foliage chemistry and the distribution of Lepidoptera larvae on broad-leaved trees in southern Ontario. *Oecologia*, **157**, 53-67.
- Robinson, S.H., Wolfenbarger, D.A., & Dilday, R.H. (1980) Anti-Xenosis Of Smooth Leaf Cotton To The Ovipositional Response Of Tobacco Budworm. *Crop Science*, **20**, 646-649.
- Roininen, H. & Tahvanainen, J. (1989) Host Selection And Larval Performance Of 2 Willow-Feeding Sawflies. *Ecology*, **70**, 129-136.
- Roslin, T. & Salminen, J.P. (2008) Specialization pays off: contrasting effects of two types of tannins on oak specialist and generalist moth species. *Oikos*, **117**, 1560-1568.
- Rowell-Rahier, M. (1984) The Presence Or Absence Of Phenolglycosides In *Salix* (Salicaceae) Leaves And The Level Of Dietary Specialization Of Some Of Their Herbivorous Insects. *Oecologia*, **62**, 26-30.
- Rowellrahier, M. & Pasteels, J.M. (1986) Economics Of Chemical Defense In Chrysomelinae. *Journal Of Chemical Ecology*, **12**, 1189-1203.
- Schoonhoven, L.M., van Loon, J.J.A., & Dicke, M. (2005) *Insect-plant biology* Oxford University Press, New York.
- Sipura, M. & Tahvanainen, J. (2000) Shading enhances the quality of willow leaves to leaf beetles - but does it matter? *Oikos*, **91**, 550-558.
- Slansky, F. & Scriber, J.M. (1985). Food consumption and utilization. In *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* (eds G.A. Kerkut & L.I. Gilbert), Vol. 4, pp. 87-163. Pergamon, New York.
- Smiley, J. (1978) Plant Chemistry And Evolution Of Host Specificity - New Evidence From *Heliconius* And *Passiflora*. *Science*, **201**, 745-747.
- Smreczyński, S. (1966) *Klucze do oznaczania owadów polski. XIX: Chrzęszcze - Coleoptera. Zeszyt 98 b, Ryjkowce - Curculionidae, podrodziny Otiorhynchinae, Brachyderinae* Państwowe wydawnictwo naukowe, Warszawa.
- Smreczyński, S. (1972) *Klucze do oznaczania owadów polski. XIX: Chrzęszcze - Coleoptera. Zeszyt 98 d, Ryjkowce - Curculionidae, podrodzina Curculioninae, plemiona Dryophthorini, Cossonini, Bagoini, Tanysphyrini, Notarii, Smicronychini, Ellescini, Acaliptini, Tychiini, Anthonomini, Curculiononi, Pissodini, Magdalini, Trachodini, Rhynchophorini, Cryptorhynchini* Państwowe wydawnictwo naukowe, Warszawa.
- Smreczyński, S. (1974) *Klucze do oznaczania owadów polski. XIX: Chrzęszcze - Coleoptera. Zeszyt 98 e, Ryjkowce - Curculionidae, podrodzina Curculioninae, plemiona Barini, Coryssomerini, Ceutorhynchini* Państwowe wydawnictwo naukowe, Warszawa.

- Soetens, P., Rowell-Rahier, M., & Pasteels, J.M. (1991) Influence Of Phenolglucosides And Trichome Density On The Distribution Of Insects Herbivores On Willows. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **59**, 175-187.
- Tahvanainen, J., Julkunen-Tiitto, R., & Kettunen, J. (1985) Phenolic Glycosides Govern The Food Selection Pattern Of Willow Feeding Leaf Beetles. *Oecologia*, **67**, 52-56.
- Topp, W., Kulfan, J., Zach, P., & Nicolini, F. (2002) Beetle assemblages on willow trees: do phenolic glycosides matter? *Diversity And Distributions*, **8**, 85-106.
- Tscharntke, T., Thiessen, S., Dolch, R., & Boland, W. (2001) Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochemical Systematics And Ecology*, **29**, 1025-1047.
- Turlings, T.C.J., Loughrin, J.H., McCall, P.J., Rose, U.S.R., Lewis, W.J., & Tumlinson, J.H. (1995) How Caterpillar-Damaged Plants Protect Themselves By Attracting Parasitic Wasps. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **92**, 4169-4174.
- Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H., & Lewis, W.J. (1990) Exploitation Of Herbivore-Induced Plant Odors By Host-Seeking Parasitic Wasps. *Science*, **250**, 1251-1253.
- Van Den Boom, C.E.M., Van Beek, T.A., Posthumus, M.A., De Groot, A., & Dicke, M. (2004) Qualitative and quantitative variation among volatile profiles induced by *Tetranychus urticae* feeding on plants from various families. *Journal Of Chemical Ecology*, **30**, 69-89.
- Van Lenteren, J.C., Hua, L.Z., Kamerman, J.W., & Xu, R.M. (1995) The Parasite-Host Relationship Between *Encarsia Formosa* (Hym, Aphelinidae) And *Trialeurodes Vaporariorum* (Hom, Aleyrodidae). 26. Leaf Hairs Reduce The Capacity Of *Encarsia* To Control Greenhouse-Whitefly On Cucumber. *Journal Of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*, **119**, 553-559.
- Wahlberg, N. (2001) The phylogenetics and biochemistry of host-plant specialization in Melitaeine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Evolution*, **55**, 522-537.
- Warchalowski, A. (2003) *Chrysomelidae: The leaf beetles of Europe and the Mediterranean area* Natura optima dux Foundation, Warszawa.
- Weiblen, G.D., Webb, C.O., Novotny, V., Basset, Y., & Miller, S.E. (2006) Phylogenetic dispersion of host use in a tropical insect herbivore community. *Ecology*, **87**, S62-S75.
- Wesis, P., Niangu, B., Ero, M., Masamdu, R., Autai, M., Elmouttie, D., & Clarke, A.R. (2010) Host use and crop impacts of *Oribius* Marshall species (Coleoptera: Curculionidae) in Eastern Highlands Province, Papua New Guinea. *Bulletin of Entomological Research*, **100**, 133-43.
- Wheat, C.W., Vogel, H., Wittstock, U., Braby, M.F., Underwood, D., & Mitchell-Olds, T. (2007) The genetic basis of a plant-insect coevolutionary key innovation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, **104**, 20427-20431.
- Zinoviev, A.G. (1998). Palearctic sawflies of the genus *Pontania* costa (Hymenoptera: Tenthredinidae) and their host-plant specificity. In *Biology Of Gall-Inducing Arthropods*, Vol. 199, pp. 204-225.
- Zvereva, E.L., Kozlov, M.V., & Niemela, P. (1998) Effects of leaf pubescence in *Salix borealis* on host-plant choice and feeding behaviour of the leaf beetle, *Melasoma lapponica*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **89**, 297-303.