

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Vliv obranných mechanismů vrb na strukturu
společenstev herbivorního hmyzu**

Diplomová práce

Martin Volf

Školitel: Mgr. Jan Hrček

České Budějovice 2012

MAGISTERSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE

Volf, M. (2012) **Vliv obranných mechanismů vrb na strukturu společenstev herbivorního hmyzu.** (The impact of defensive host-plant traits on community structure of herbivorous insects on willows, Mgr. Thesis, in Czech) - 66 pp. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE

This study examines the role of defensive host-plant traits in structuring the community of leaf-chewing insects living on willows. Host-plant phylogeny was reconstructed and leaf morphology and content of three different groups of secondary metabolites were measured. Relationships between defensive leaf traits were examined and their influence on insect community structure was analyzed.

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 jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 18.4.2012

.....
Martin Volf

Poděkování

Děkuji všem, bez jejichž pomoci a podpory by tato práce nemohla vzniknout. Byli to především: R. Julkunen-Tiito, J. Macek, M. Borovanská, V. Novotný, R. Čtvrtečka, L. Sekerka, J. Šumpich, M. Zapletal, M. Štech a v neposlední řadě má rodina a Anička.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1. Úvod | 1 |
| 1.1 Vztah rostlin a herbivorního hmyzu | 1 |
| 1.2 Vrby jako vhodný modelový systém..... | 3 |
| 1.3 Vliv fylogeneze hostitelských rostlin na herbivorní hmyz | 4 |
| 1.4 Sekundární metabolity vrb... .. | 5 |
| 1.4.1 Kondenzované taniny..... | 6 |
| 1.4.2 Flavonoidy..... | 7 |
| 1.4.3 Salicyláty..... | 8 |
| 1.5 Morfologická obrana vrb před herbivory | 9 |
| 1.5.1 Trichomy..... | 9 |
| 1.5.2 Specific leaf area..... | 10 |
| 1.6 Obranné strategie rostlin | 10 |
| 1.7 Hybridizace vrb..... | 11 |
| 1.8. "Leaf-chewers" na vrbách..... | 12 |
| 1.9. Cíle práce a hypotézy..... | 14 |
| 2. Metodika | 15 |
| 2.1 Zkoumané druhy vrb | 15 |
| 2.2 Výzkumné plochy | 16 |
| 2.3 Sběr a určování hmyzu | 16 |
| 2.4. Morfologie listů..... | 17 |
| 2.5 Analýza obsahu sekundárních metabolitů..... | 18 |
| 2.5.1 HPLC analýza obsahu salicylátů a flavonoidů..... | 18 |
| 2.5.2 Analýza obsahu kondenzovaných taninů..... | 19 |
| 2.5.3 Chemická podobnost jednotlivých druhů vrb..... | 19 |
| 2.6 Molekulární data..... | 19 |
| 2.7 Fylogenetické analýzy..... | 22 |
| 2.8 Akumulační křivky druhů a podobnost herbivorních společenstev..... | 22 |
| 2.9 Korelace vlastností rostlin a jejich vliv na složení společenstev hmyzu..... | 23 |
| 2.10 Mnohorozměrné analýzy složení společenstev hmyzu..... | 23 |
| 3. Výsledky..... | 24 |
| 3.1 Složení společenstev herbivorního hmyzu | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 Obsah sekundárních metabolitů | 26 |
| 3.3 Molekulární analýzy..... | 30 |
| 3.4 Vztahy obranných vlastností vrb..... | 33 |
| 3.5 Vliv vlastností hostitelských rostlin na složení společenstev hmyzu..... | 34 |
| 3.6 Vliv Salicylátů | 36 |
| 4. Diskuze | 37 |
| 4.1 Složení společenstev herbivorního hmyzu..... | 37 |
| 4.2 Obsah sekundárních metabolitů..... | 38 |
| 4.3 Fylogeneze hostitelských rostlin..... | 40 |
| 4.4. Obranné strategie vrb..... | 41 |
| 4.5. Vliv vlastností hostitelských rostlin na složení společenstev hmyzu..... | 42 |
| 4.6. Vliv salicylátů..... | 44 |
| 5. Závěr..... | 46 |
| 6. Použitá literatura | 47 |
| Příloha 1..... | 56 |
| Příloha 2..... | 63 |

1. Úvod

1.1. Vztah rostlin a herbivorního hmyzu

První cévnaté osídlily souš před zhruba 450 miliony let a od základu změnily podobu suchozemských ekosystémů (Lenton *et al.*, 2012; Steemans *et al.*, 2009). Hmyz je následoval nedlouho poté a první doklady o herbivorii z jeho strany pochází již z období před přibližně 400 miliony let (Labandeira, 1998; Schoonhoven, van Loon & Dicke, 2005). Ačkoliv první herbivoři se živili převážně rostlinnými sporama, postupně v rámci hmyzu vznikaly nové specializace a způsoby využívání rostlin jako zdroje potravy (Labandeira, 1998; Schoonhoven *et al.*, 2005). To umožnilo vznik obrovského počtu druhů herbivorního hmyzu s celou řadou specializací a vedlo k tomu, že herbivorní linie hmyzu jsou obecně mnohem diverzifikovanější než jejich příbuzní (Thompson, 1994). Dnes představuje hmyz spolu s rostlinami více než polovinu popsáných druhů a z hlediska biomasy ještě více (Futuyma & Agrawal, 2009; Schoonhoven *et al.*, 2005). Herbivorie tak představuje jeden z klíčových vztahů mezi organismy na naší planetě. Výzkum herbivorie se proto stal jedním ze základních pilířů ekologie. Zvláště zásadní je otázka co podobu a dynamiku vztahu rostlin a herbivorního hmyzu určuje.

Již Ehrlich & Raven (1964) formulovali myšlenku, že na evoluční úrovni stojí za speciací herbivorního hmyzu především vznik a diverzifikace nových sekundárních metabolitů hostitelských rostlin. Ačkoliv do dnešní doby doznala tato teorie vůči svému původnímu znění určitých změn, dá se říci, že obecně je v tomto ohledu platná a podporuje ji i řada novějších prací (Armbruster *et al.*, 1997; Futuyma *et al.*, 2009; Renwick, 2002). Poněkud kontroverzní je ale otázka, zda herbivorní hmyz ovlivňuje evoluci rostlin a dochází tak mezi těmito dvěma skupinami ke koevoluci jak ji popisovali Ehrlich & Raven (1964). Příklady koevoluce hmyzu s rostlinami ve smyslu práce Ehrlich & Raven (1964) jsou totiž poměrně vzácné (Mitter, Farrell & Futuyma, 1991) a jejich výsledky ne zcela jednoznačně interpretovatelné (Farrell & Mitter, 1990). Někteří autoři proto argumentují, 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 nicméně svědčí, že hmyz je chopen velmi silně selektovat rostliny na základě jejich chemického složení (Agrawal, 2005) 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). Naopak u skupin rostlin, které jsou proti herbivorům silně bráněny, došlo v některých případech k radiaci a nápadnému zvýšení počtu druhů (Farrell, Dussourd & Mitter, 1991). Zásadní z tohoto hlediska je navíc skutečnost, že herbivorní hmyz zkonzumuje asi 10% globální primární produkce rostlin (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). Tyto ztráty jistě nejsou zanedbatelné a dá se z nich usuzovat, že na rostliny je ze strany herbivorního hmyzu vytvářen vysoký tlak. Ačkoliv tak pro koevoluci nemáme v případě herbivorního hmyzu a rostlin příliš důkazů a evoluce obou skupin je významně ovlivněna i jinými faktory (Bernays & Graham, 1988; Schoonhoven *et al.*, 2005), je zřejmé, že tyto dvě skupiny jsou navzájem velmi silně provázány.

Rostliny a hmyz se navzájem neovlivňují pouze na evoluční úrovni, ale i na úrovni společenstev. Pro složení společenstev listy žeroucího herbivorního hmyzu je klíčová zejména příbuznost hostitelských rostlin (Agrawal, 2005; Bangert *et al.*, 2006; Janz & Nylin, 1998; Ricklefs, 2008; Weiblen *et al.*, 2006) a kvalita potravy představovaná především obsahem sekundárních metabolitů (Agrawal, 2005; Barber & Marquis, 2011; Becerra, 1997; Janz *et al.*, 1998; Lavandero *et al.*, 2009; Marquis & Lill, 2010; Murakami *et al.*, 2005; Rasmann, Johnson & Agrawal, 2009; Ricklefs, 2008; Wahlberg, 2001) a morfologií listů (Agrawal, 2005; Cardoso, 2008; Murakami *et al.*, 2005; Raupp, 1985). Proto je překvapivé, že jen velice málo dosud publikovaných studií obsahovalo data zahrnující jak fylogenezi hostitelských rostlin, tak informace o jejich chemickém složení a morfologii a tyto data kombinovalo s informacemi o složení společenstev herbivorního hmyzu. Přitom studie, které tyto data kombinují, umožňují dobrý vhled do celé problematiky a správnou interpretaci výsledků. Z dostupných prací splňují tyto požadavky částečně práce různých autorů na dubech (*Quercus*) ale především pak studie Agrawala na *Asclepiadaceae* a Bercerry na *Burseraeae*.

Duby hostí bohatá společenstva herbivorního hmyzu a navíc se jedná o široce rozšířený rod stromů. Proto byl výzkum herbivorie na dubech předmětem mnoha prací (Forkner, Marquis & Lill, 2004; Marquis *et al.*, 2010; Marquis, Lill & Piccinni, 2002; Murakami *et al.*, 2005; Roslin & Salminen, 2008; Rossiter, Schultz & Baldwin, 1988; Salminen *et al.*, 2004). Ačkoliv fylogenetické pozadí z nich má jen malá část (Pearse, 2011), nemělo by představovat problém tyto studie díky dostupné fylogenezi hostitelských rostlin (Pearse & Hipp, 2009) o tyto data doplnit. Duby jsou typické aparentní rostliny

(Feeny, 1976) a jejich listy jsou bráněny v postatě jen mezi rostlinami široce rozšířenými taniny. Výsledky studií na dubech tedy nejsou aplikovatelné na specializovanější systémy, v nichž hostitelské rostliny obsahují různé skupiny sekundárních metabolitů a nepřinášejí ani potenciálně velice zajímavé informace o případné interakci různých forem chemické obrany s morfologickými adaptacemi i mezi sebou navzájem.

Z tohoto hlediska jsou mnohem zajímavější práce Becerry (e.g. Becerra, 1997; Becerra, 2007) a Agrawala (e.g. Agrawal & Fishbein, 2006; Agrawal, Lajeunesse & Fishbein, 2008; Rasmann & Agrawal, 2011), které přinesly plno zásadních poznatků o vztahu herbivorního hmyzu s hostitelskými rostlinami. Jak Burseraceae tak Asclepiadaceae jsou chemicky velice dobře bráněny sekundárními metabolity. Burseraceae obsahují především monoterpeny, seskviterpeny a alkany, zatímco Asclepiadaceae jako obranu využívají kardenolidy a latex. Zvláště v případě Asclepiadaceae je obrana před herbivory velmi účinná, protože kardenolidy ovlivňují tok draselných a sodných iontů v buňkách a latex kromě své mechanické funkce obsahuje i další toxiny (Agrawal et al., 2006; Agrawal et al., 2008). Ve výsledku jsou proto společenstva herbivorního hmyzu na těchto rostlinách vysoce specializovaná a zahrnují jen malý počet druhů (Agrawal et al., 2006; Agrawal et al., 2008; Becerra, 2007). Becerra se navíc ve svých pracích zaměřuje převážně na specializované mandelineky skupiny *Blepharida*. Vysoká míra specializace, značně limitovaný počet druhů a v případě prací Becerry i úzké taxonomické zaměření bohužel neumožňují testovat hypotézy týkající se "běžných" společenstev herbivorního hmyzu, která zahrnují velký počet druhů s různou mírou specializace.

Výše uvedené příklady studií na dubech a vysoce specializovaných systémech Asclepiadaceae a Burseraceae jsou v podstatě dvěma póly téže problematiky. V ideálním případě by ale měl modelový systém zahrnovat celou škálu druhů herbivorů od silných specialistů až po úplné generalisty a navíc by měly hostitelské druhy rostlin disponovat různými druhy obrany a navzájem se od sebe v tomto ohledu lišit. Z tohoto hlediska se zdá být vhodným systémem herbivorní hmyz žijící na vrbách.

1.2. Vrby jako vhodný modelový systém

Nespornou výhodou vrb z hlediska studia interakcí s herbivorním hmyzem je jejich druhová diverzita. Na území České republiky jsou vrby totiž zastoupeny 22 původními druhy (Chmelař & Koblížek, 1990) a v rámci Evropy patří k nejbohatším rodům stromů. Jednotlivé druhy vrb se od sebe navíc na první pohled nápadně odlišují morfologií listů,

kteře jsou lysé nebo naopak opatřeny hustými trichomy. To co z vrb ale činí ideální model pro výzkum herbivorie je především jejich unikátní chemické složení, které navíc pravděpodobně není u tohoto rodu korelováno s fylogenezí (Nyman & Julkunen-Tiitto, 2005). Sekundární metabolity, které vrby obsahují, jsou zejména taniny, flavonoidy a především pro čeleď Salicaceae unikátní salicyláty (Julkunen-Tiitto, 1989; Nyman *et al.*, 2005). Díky rozmanitému zastoupení sekundárních metabolitů, které se navíc navzájem odlišují svojí funkcí a účinností, jsou společenstva herbivorního hmyzu na vrbách značně diverzifikovaná a zahrnují striktní specialisty, druhy vázané pouze na čeleď Salicaceae i generalisty, kteří se kromě vrb živí i jinými rostlinami (Agrawal, 2005; Kopelke, 2007a, 2007b; Rowell-Rahier, 1984; Topp *et al.*, 2002; Zinovjev, 1998). Vrby jsou proto ideální modelovou skupinou pro testování hypotéz týkajících se vlivu sekundárních metabolitů, morfologie listů a fylogeneze hostitelských rostlin na strukturu společenstev herbivorního hmyzu.

Obecně se dá shrnout, že každý systém hostitelských rostlin a na nich žijících herbivorů má svoje zvláštnosti, ale v těchto studiích nejde postupovat jinak než po jednotlivých systémech. Vrby tedy zaplňují mezeru mezi extrémně kvalitativně bráněnými *Asclepiaceae* a *Burseraceae* a kvantitativně bráněnými duby

1.3. Vliv fylogeneze hostitelských rostlin na herbivorní hmyz

Většina herbivorního hmyzu je relativně specializovaná a využívá jen omezené spektrum hostitelských rostlin (Bernays *et al.*, 1988; Novotny *et al.*, 2004). Ve výběru hostitele je přitom většina herbivorů značně konzervativní a dává přednost rostlinám ze stejné fylogenetické linie (Janz *et al.*, 1998; Mitter *et al.*, 1991). Ve většině případů je proto fylogeneze hostitelských rostlin dobrým prediktorem složení společenstev herbivorního hmyzu (Agrawal, 2005; Bangert *et al.*, 2006; Janz *et al.*, 1998; Novotny *et al.*, 2006; Ricklefs, 2008; Weiblen *et al.*, 2006). Tento jev může být, kromě případů skutečného fylogenetického konzervatismu, způsoben tím, že s fylogenezí jsou často korelovány další důležité vlastnosti hostitelských rostlin (Ricklefs, 2008). Pokud jsou vlastnosti hostitelských rostlin na jejich fylogenezí nezávislé, je struktura herbivorních společenstev často lépe vysvětlena podobností chemického složení hostitelských rostlin než jejich samotnou fylogenezí, zejména pokud sekundární metabolity, které tyto rostliny obsahují, jsou proti herbivorům velmi účinné (Becerra, 1997; Wahlberg, 2001).

Rekonstrukce molekulární fylogeneze vrb i celé čeledi Salicaceae se v minulosti ukázala být poměrně složitá, protože většina běžně používaných lokusů neobsahuje dostatečný počet informativních pozic pro rozlišení vztahů na vnitrorodové úrovni (Volf, 2010). Předešlé pokusy o rekonstrukci fylogeneze čeledi Salicaceae proto obsahovaly velké množství polytomí a nebyly dostatečně informativní (Azuma *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2010; Hamzeh & Dayanandan, 2004; Leskinen & Alstrom-Rapaport, 1999). V případě vrb tak zatím o vlivu fylogeneze hostitelských rostlin na složení společenstev herbivorního hmyzu není dostupných příliš informací. Fylogenetická vzdálenost založená na morfologických znacích v práci Topp *et al.* (2002) byla sice korelovaná s nepodobností společenstev herbivorů, nicméně v práci založené na molekulárních datech, i když špatně rozlišených, tento trend potvrzen nebyl (Volf, 2010). U vrb se dá nicméně očekávat, že zcela klíčový bude vztah fylogeneze a obsahu sekundárních metabolitů. Vzhledem k tomu, že vrby obsahují značné množství účinných sekundárních metabolitů, zvláště salicylátů, je pravděpodobné, že pokud nebude jejich obsah u příbuzných druhů korelován, nebude fylogeneze hostitelských rostlin příliš dobrým prediktorem složení společenstev herbivorního hmyzu.

1.4. Sekundární metabolity vrb

Sekundární metabolity můžeme podle jejich funkce rozdělit na dvě kategorie – kvalitativní a kvantitativní.

Kvalitativní obrana je představována relativně jednoduchými sloučeninami vznikajícími z malého počtu prekurzorů, hlavně z acetyl-koenzymu A a aminokyselin (Schoonhoven *et al.*, 2005). Produkce těchto metabolitů je proto poměrně rychlá, ale zato energeticky náročná (Schoonhoven *et al.*, 2005). Kvalitativně působící sekundární metabolity jsou obecně účinné zejména proti generalistickým herbivorům, zatímco specialisté jsou schopni se na ně přizpůsobit a v některých případech je dokonce využívat ve svůj prospěch. Látky sloužící původně k ochraně před herbivorním hmyzem a patogeny tak mohou naopak specializované herbivory k žíru stimulovat a dále je zvýhodňovat, například tím, že slouží jako obrana před predátory (Agrawal *et al.*, 2008; Bowers, 1983; Harborne & Williams, 2000; Poprawski, Greenberg & Ciomperlik, 2000; Rank, 1992; Rank *et al.*, 1998; Treutter, 2006). Příklady kvalitativně působících obranných sekundárních metabolitů obsažených v pletivech vrb jsou salicyláty a flavonoidy.

Kvantitativní obrana je nejčastěji představována látkami s vysokou molekulární hmotností jako je celulóza nebo lignin, jejichž hlavní funkcí je vyztužovat rostlinná pletiva, ale které zároveň snižují stravitelnost těchto pletiv pro herbivory (Schoonhoven *et al.*, 2005). Častou formou této obrany jsou také kondenzované taniny. Tradiční představa byla, že vytvořit kvantitativní obranné metabolity je pro rostlinu sice časově náročné, ale pak je tato obrana účinná jak proti generalistům, tak proti specialistům, protože se na ni herbivorní hmyz v podstatě nemůže přizpůsobit (Feeny, 1976). Výsledky některých prací ale svědčí o tom, že herbivorní hmyz je schopen se na kvantitativní obranu do určité míry přizpůsobit také (Bernays, 1986; Roslin *et al.*, 2008).

Ve studiích zaměřených na ekologii herbivorního hmyzu se vrby z hlediska obsahu sekundárních metabolitů často dělí do dvou skupin. Jedna skupina, kam z druhů rostoucích v ČR patří například *Salix fragilis*, *S. pentandra*, *S. purpurea*, *S. triandra* a *S. rosmarinifolia*, by měla být charakterizována vysokým obsahem salicylátů a nízkým obsahem kondenzovaných taninů. Druhá skupina, která salicyláty neobsahuje, ale zato jsou pro ni typické vysoké koncentrace kondenzovaných taninů, zahrnuje například druhy *Salix aurita*, *S. caprea*, *S. cinerea* a *S. viminalis* (Hochwender *et al.*, 2005; Rowell-Rahier, 1984; Topp *et al.*, 2002). Podle způsobu obrany by se tak vrby měly dělit do dvou skupin - jedné, která je chráněna kondenzovanými taniny, typickými pro aparentní rostliny (Feeny, 1976), a druhé, která se z rámce klasických dřevin zcela vymyká a je bráněna především kvalitativně pomocí salicylátů.

Ve své práci jsem se kromě salicylátů a kondenzovaných taninů zaměřil také na flavonoidy. Díky tomu můj dataset obsahuje informace o vlivu i) taninů, tedy široce rozšířené kvantitativní obrany, ii) flavonoidů, které působí kvalitativně, ale rovněž jsou běžné i u jiných rostlin, a iii) salicylátů, které představují kvalitativní sekundární metabolity unikátní pro čeleď Salicaceae.

1.4.1. Kondenzované taniny

S výzkumem taninů, jakožto látek chránících rostliny před herbivory začal ve své práci Feeny (1976), který hlavní antiherbivorní účinek taninů spatřoval v jejich schopnosti srážet bílkoviny. To mělo u herbivorního hmyzu vést ke zhoršení stravitelnosti potravy a menším energetickým ziskům. Taniny se nicméně dělí na několik skupin, které se významně liší svými vlastnostmi (Barbehenn & Constabel, 2011; Salminen & Karonen, 2011; Salminen, Karonen & Sinkkonen, 2011). Nejlepší schopnost srážet bílkoviny mají v laboratorních podmínkách ze všech těchto skupin kondenzované taniny (Barbehenn *et al.*, 2011;

Salminen *et al.*, 2011). Výsledky studií navazující na práci Feeny (1976) nicméně prokázaly, že schopnost taninů srážet bílkoviny je v alkalickém prostředí hmyzího střeva silně omezená a tento mechanismus proto nemůže vysvětlit antiherbivorní účinky taninů (Appel, 1993; Martin, Martin & Bernays, 1987). V takových podmínkách ale dochází k jejich oxidaci a vzniku volných radikálů, které herbivorovi způsobují oxidativní stres (Ahmad, 1992; Appel, 1993; Barbehenn *et al.*, 2009; Barbehenn & Martin, 1994; Summers & Felton, 1994). V tomto ohledu jsou neúčinnější ellagitanniny, naopak u kondenzovaných taninů je tato aktivita velice nízká (Barbehenn, Weir & Salminen, 2008; Barbehenn *et al.*, 2011; Barbehenn *et al.*, 2009; Salminen *et al.*, 2011; Salminen *et al.*, 2011).

Přestože kondenzované taniny nezpůsobují srážení proteinů ve střevech ani oxidativní stres, je o nich obecně známo, že na herbivorní hmyz vliv mají. Vliv kondenzovaných taninů spočívá zřejmě především v tom, že pro herbivory představují nestravitelnou hmotu (Barbehenn *et al.*, 2009). Ve většině případů byl proto zjištěn negativní dopad kondenzovaných taninů na rychlost růstu larev, jejich přežívání a konečnou velikost imág (Bernays, Chamberlain & Leather, 1981; Grayer *et al.*, 1992; Kause *et al.*, 2001; Kopper *et al.*, 2002; Pearse, 2011) i když někdy až při relativně vysokých koncentracích (Ayres *et al.*, 1997; Bernays *et al.*, 1981; Bryant *et al.*, 1993). Byl prokázán i vliv kondenzovaných taninů na strukturu společenstev herbivorního hmyzu (Forkner *et al.*, 2004). Dostupné výsledky studií provedených na Salicaceae tyto závěry potvrzují (Ayres *et al.*, 1997; Donaldson & Lindroth, 2004).

1.4.2. Flavonoidy

Podobně jako taniny i flavonoidy jsou mezi rostlinami široce rozšířenou skupinou sekundárních metabolitů. Na rozdíl od kondenzovaných taninů ale patří do skupiny kvalitativně působících sekundárních metabolitů. Kromě ochrany před herbivory mají flavonoidy v rostlinných pletivech i další funkce, hlavně ochranu před nepříznivými abiotickými vlivy, jako jsou UV záření, chlad, vysychání, a také obranu před patogeny (Harborne *et al.*, 2000; Treutter, 2006).

Role flavonoidů ve vztahu rostlin a herbivorního hmyzu je poměrně komplikovaná. Flavonoidy jsou různorodou skupinou látek a na herbivorní hmyz mohou působit jako deterenty i jako fagostimulanty (Cipollini *et al.*, 2008; Erhard, Pohnert & Gross, 2007; Harborne *et al.*, 2000; Simmonds, 2001, 2003; Treutter, 2006). Kromě toho u hmyzu snižují efektivitu trávení potravy a fungují i jako toxiny (Kobayashi *et al.*, 2008; Lahtinen *et al.*, 2006; Treutter, 2006). V některých případech u nich byla zjištěna i fototoxicita, kdy

jsou po vystavení světlu zodpovědné za vznik kyslíkových radikálů (Crockett & Boeve, 2011). Na druhou stranu specializovaný hmyz je schopný flavonoidy pomocí glykosylace detoxifikovat (Lahtinen *et al.*, 2006; Salminen *et al.*, 2004; Vihakas, Kapari & Salminen, 2010), nebo je dokonce využit ve svůj prospěch a například je inkorporovat do své kutikuly nebo hemolymfy jako obranu před predátory (Treutter, 2006; Vihakas *et al.*, 2010). Vysoký obsah flavonoidů v listech živné rostliny by proto měl do určité podpořovat vyšší poměr specializovaných druhů herbivorního hmyzu oproti generalistům.

1.4.3. Salicyláty

Nejvýznamnější skupinu sekundárních metabolitů vrb představují salicyláty, které jsou narozdíl od obou výše zmíněných rodin sekundárních metabolitů unikátní pro čeleď Salicaceae. Jejich obsahem a tím i investicí převážně do kvalitativní obrany se vrby a topoly dramaticky liší od našich ostatních dřevin a jsou z tohoto hlediska podobné spíše bylinám (Feeny, 1976). Od flavonoidů se salicyláty liší i tím, že jejich hlavní funkce je především obrana před herbivory, i když fungují i proti některým patogenům (Hjalten *et al.*, 2007). Na nespecializovaný herbivorní hmyz účinkují jako deterenty, zpomalují rychlost růstu jeho larev a zvyšují jejich mortalitu (Denno, Larsson & Olmstead, 1990; Kolehmainen *et al.*, 1995; Matsuki & Maclean, 1994; Orians *et al.*, 1997; Rank *et al.*, 1998; Roininen & Tahvanainen, 1989; Tahvanainen, Julkunen-Tiitto & Kettunen, 1985). Oproti tomu někteří specialisti se dokázali na salicyláty poměrně dobře přizpůsobit a využívají je ve svůj prospěch. U specialistů proto salicyláty někdy stimulují příjem potravy (Kolehmainen *et al.*, 1995) nebo jim při nejmenším nevadí (Ruuhola *et al.*, 2001). Vyšším obsahem salicylátů jsou v případě specialistů pozitivně ovlivněny především 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 salicylátů obsažených v potravě (Pasteels *et al.*, 1983). Salicylaldehyd se ukázal jako účinná obrana proti sluněčkům (Denno *et al.*, 1990) a mravencům (Martinsen, Driebe & Whitham, 1998; Pasteels *et al.*, 1983; Zvereva, Kruglova & Kozlov, 2010), kteří v našich podmínkách patří mezi nejvýznamnější predátory larválních stádií mandelinek na vrbách. Další výsledky týkající se rychlejšího růstu larev těchto specializovaných mandelinek na vrbách s vyšším obsahem salicylátů (Rank *et al.*, 1998) navíc podporují hypotézu, že tyto larvy jsou schopné ze salicylátů, které patří mezi fenolické glykosidy, získávat glukózu, kterou dále využívají jako zdroj energie (Rowell-Rahier & Pasteels, 1986).

Polyfágní herbivoři preferují spíše vrby s nízkým obsahem těchto sekundárních metabolitů (Matsuki *et al.*, 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 *et al.*, 1989; Rowell-Rahier, 1984; Topp *et al.*, 2002). Vzhledem k dopadu salicylátů na herbivory se jejich účinky projevují i na skladbě a struktuře společenstev hmyzu na Salicaceae (Bangert *et al.*, 2006; Hochwender *et al.*, 2005). U pilatek a nosatců bylo navíc zjištěno, že se jejich společenstva na vrbách s vysokým obsahem salicylátů skládají z menšího počtu druhů, než na vrbách, které tyto sekundární metabolity neobsahují (Rowell-Rahier, 1984). Novější studie zaměřená na strukturu společenstev herbivorních brouků trend ale závislosti diverzity na obsahu salicylátů nepotvrdila (Topp *et al.*, 2002).

1.5. Morfologická obrana vrb před herbivory

Rostliny nejsou bráněny pouze sekundárními metabolity, ale tato chemická ochrana je doplněna o různé morfologické adaptace tvořící další linii obrany před herbivory. V případě vrb se jedná zejména o trichomy a tuhost listů.

1.5.1. Trichomy

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 (Volf, 2010). Trichomy jsou efektivním způsobem obrany, který je schopný rostlinu dobře chránit před herbivory. Zcela se na ně dokázalo přizpůsobit jen nemnoho specialistů (Cardoso, 2008; Dalin, Bjorkman & Eklund, 2004). Malí herbivoři jimi bývají obvykle více postiženi než velcí (Agrawal, 2005), protože hlavní funkce trichomů spočívá v tom, že brání pohybu herbivora po listu a ztěžují mu proniknutí k jeho povrchu. To má za následek horší příjem potravy a pomalejší růst, což vede k větším ztrátám energie a zvýšenému riziku predace (Matsuki *et al.*, 1994; Zvereva, Kozlov & Niemela, 1998). U nesespecializovaných herbivorů mohou trichomy bránit i v ovipozici (Chiang & Norris, 1983), ačkoliv v případě některých specialistů naopak samicím umožňují se na listu lépe přichytit a tím ovipozici usnadňují (Robinson, Wolfenbarger & Dilday, 1980). Nevýhodou trichomů v rámci ochrany před herbivory je i fakt, že kromě herbivorního hmyzu ztěžují pohyb i jeho predátorům a parazitoidům (Chang *et al.*, 2004; Van Lenteren *et al.*, 1995).

Přestože trichomy mají na herbivorní hmyz na vrbách pravděpodobně menší vliv než sekundární metabolity (Matsuki *et al.*, 1994), jsou stále schopné značně ovlivňovat specializaci herbivorů a složení jejich společenstev (Soetens, Rowell-Rahier & Pasteels, 1991; Topp *et al.*, 2002).

1.5.2. Specific leaf area

Tuhost listů může představovat pro hmyz při jejich konzumaci značnou překážku (Agrawal *et al.*, 2006; Bernays, 1986; Murakami *et al.*, 2005; Pearse, 2011). Zpracovat tuhé listy trvá bezobratlým herbivorům déle a navíc přitom dochází k obrušování jejich mandibulárních zoubků. To může následně vést k hladovění a nakonec až k smrti (Bernays, 1986). Význam tuhosti listů při výběru potravy potvrzují i výsledky z výzkumu týkajícího se vrb (Raupp, 1985). Dá se proto očekávat, že tuhost listů bude mít, podobně jako ostatní výše uvedené vlastnosti, dopad na složení společenstev herbivorního hmyzu. Ve vědeckých pracích často využívanou a jednoduše měřitelnou vlastností, dobře vystihující tuhost listů, je specific leaf area (Groom & Lamont, 1999; Witkowski & Lamont, 1991). Specific leaf area se vyjadřuje jako poměr plochy a váhy listu a její vliv na specializaci a strukturu společenstev herbivorů podporují výsledky různých studií (Agrawal *et al.*, 2006; Poorter *et al.*, 2004).

1.6. Obranné strategie rostlin

Výše uvedené vlastnosti rostlin sloužící k jejich obraně mají mezi sebou rozmanité vztahy, vzájemně se doplňují a odlišné rostliny využívají různé z nich. Podle způsobu jakým se brání proti herbivorům, rozdělil Feeny (1976) rostliny do dvou hlavních skupin. Mezi aprentní rostliny, spoléhající především na kvantitativní obranné mechanismy, patří drtivá většina dřevin, zatímco byliny ale i vrby využívající kvalitativně působící látky patří do skupiny neaparentních rostlin.

Dříve oblíbenou teorií týkající se vztahu různých obranných mechanismů byl tzv. "Univariate trade-off". Tato teorie predikovala negativní korelaci různých druhů obrany před herbivory (Rehr, Feeny & Janzen, 1973). Základní myšlenka "Univariate trade-off" vychází z představy, že pokud je jeden z obranných mechanismů dostatečně účinný, dochází k zániku selekce na ostatní způsoby obrany. Této představě by v zásadě odpovídalo i členění vrb na dvě skupiny - jednu s lysými listy a vysokým obsahem salicylátů a druhou chráněnou trichomy a kondenzovanými taniny (Hochwender *et al.*,

2005; Rowell-Rahier, 1984; Topp *et al.*, 2002). Výsledky původních prací podporujících tuto teorii však byly zpochybněny kvůli z dnešního pohledu špatné metodice (Agrawal, 2007) a nepodporují je ani výsledky novějších studií (Agrawal *et al.*, 2006; Rudgers, Strauss & Wendel, 2004). Důvodem, proč nebyla existence tohoto trade-off potvrzena je patrně fakt, že různé sekundární metabolity zastávají kromě obrany před herbivory i jiné funkce a proto mezi nimi nemusí být jednoduchá a přímá závislost. Většinu rostlin navíc napadá široká škála herbivorů a obrana zajišťovaná pouze jediným znakem by proto pravděpodobně nebyla proti všem účinná (Agrawal, 2007).

Zdá se proto, že různé formy obrany se často komplementárně doplňují spíše během sezóny, než aby mezi nimi byla negativní závislost na mezidruhové úrovni. Pro rostliny je klíčové dobře chránit své mladé listy, které pro ně představují značnou investici a zároveň jsou díky vysokému obsahu dusíku lákavé pro herbivory (Coley, Bateman & Kursar, 2006). Úspěšná obrana mladých listů je důležitá zejména pro vrby a topoly, které mají narozdíl od většiny ostatních dřevin neukončený růst listů a mladé listy se u nich objevují po velkou část vegetační sezóny (Meyer & Montgomery, 1987). Získat dobrou kvantitativní obranu je nicméně časově náročné. Mladá pletiva jsou proto bráněna především kvalitativně a kvantitativní obrana nabývá na významu až s postupující sezónou. Obecně tak platí trend, že kvalitativně působící sekundární metabolity, v případě vrb salicyláty a flavonoidy, jsou v listech zastoupeny především na jaře a jejich obsah se s postupem sezóny snižuje, i když u vrb zůstává po celou sezónu poměrně vysoký (Ikonen, 2002; Lahtinen *et al.*, 2006; Martinsen *et al.*, 1998). Naopak dochází k nárůstu obsahu kondenzovaných taninů a tuhosti listů a tyto změny jsou doprovázeny i snížením obsahu dusíku (Coley *et al.*, 2006; Ikonen, 2002; Kauser *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2010; Matsuki *et al.*, 1994; Meyer *et al.*, 1987; Murakami *et al.*, 2005; Salminen *et al.*, 2004).

1.7. Hybridizace vrb

Vrby jsou známé častým mezidruhovým křížením. Celou situaci komplikuje fakt, že vrby nevytváří žádné hybridní zóny a na jediné lokalitě se tak zpravidla vyskytují oba rodičovské druhy i jejich kříženci (Fritz, Nicholsons & Brunsfeld, 1994). To značně ztěžuje správnou determinaci hostitelských rostlin, která je přitom zcela nezbytná, protože společenstva herbivorního hmyzu se mezi mateřskými druhy a jejich hybridy často velmi liší (Hochwender & Fritz, 2004; Hochwender *et al.*, 2005). Tato rozdílná skladba

společenstev herbivorů je způsobena odlišností hybridů v zastoupení sekundárních metabolitů, hustotě trichomů a dalších vlastnostech od mateřských druhů.

Z genetického hlediska je situace komplikovaná, protože každá ze souboru obranných vlastností je kódována řadou alel, mezi kterými panují různé vztahy - aditivita, dominance i epistáze (Fritz *et al.*, 2003; Hochwender *et al.*, 2004). V případě sekundárních metabolitů se nicméně ve většině případů u hybridů vyskytují stejné látky jako u mateřských druhů a liší se pouze jejich koncentrace. Méně často u hybridů některé sekundární metabolity chybí a z dosavadních výsledků vyplývá, že vznik nových sloučenin bývá u kříženců rostlin obecně poměrně vzácný (Cheng, Vrieling & Klinkhamer, 2011).

Z hlediska preference hybridů herbivory mohou nastat tři možnosti. Buď jsou pro herbivory podobně atraktivní jako jeden z mateřských druhů, nebo jsou jimi preferováni více nebo naopak méně než kterýkoliv z rodičů. Shodná atraktivita pro herbivory s jedním z mateřských druhů se dá vysvětlit dominancí jedné z alel určujících danou vlastnost významnou pro potravní preferenci herbivora (Fritz *et al.*, 1994). Za vyšší preferencí stojí ve většině případů patrně zhoršení obranyschopnosti, způsobené například rozchodem funkčně propojených lokusů ovládajících určitou vlastnost, případně zráta jednoho článku z komplexu různých obranných charakteristik, bez kterého přestane celý systém fungovat (Fritz *et al.*, 2003). Naopak pokud hybrid zdědí několik dominantních alel pro výhodné obranné vlastosti, případně se u něho výrazně změní podoby signálů, podle kterých herbivoři rozpoznávali jeho mateřské druhy, je pro ně méně atraktivní (Fritz *et al.*, 2003; Fritz *et al.*, 1994).

1.8. "Leaf-chewers" na vrbách

Velká část předchozích prací byla při studiu vlivu faktorů ovlivňujících herbivorii zaměřena na taxonomicky vymezené skupiny hmyzu. Zdá se však výhodnější zabývat se takovou problematikou u širší a ekologicky přirozeně vymezené skupiny, guildy. Tento přístup totiž umožňuje odlišit trendy charakteristické pro jednotlivé taxony od závislostí, které mají obecnější platnost.

Ideální gildou pro studium herbivorie jsou leaf-chewers, neboli listy okusující hmyz. Tato guilda patří mezi jedny z nejstarších a objevila se už ve spodním permu (Labandeira, 1998). Celosvětově se patrně jedná o nejdiferzifikovanější skupinu herbivorího hmyzu, která je spolu s hmyzem sajícím rostlinné šťávy zodpovědná za majoritní podíl na celkové herbivorii ze strany hmyzu (Coley & Barone, 1996). Narozdíl

od hmyzu sajícího rostlinné šťávy, který díky svému způsobu konzumace potravy nepříjde s obrannými mechanismy rostlin tolik do styku, jsou listy okusující herbivoři nuceni se vypořádat s obranou rostlin, zvláště se sekundárními metabolity (Schoonhoven *et al.*, 2005). Proto by se obsah sekundárních metabolitů a morfologie listů měly dobře odrážet ve struktuře jeho společenstev. V podmínkách České republiky jsou na vrbách listy okusující herbivoři představováni především imágy a larvami brouků, housenkami motýlů a housenicemi pilatek.

Nejpočetnější skupinu herbivorního hmyzu vyskytujícího se na vrbách představují brouci a jejich larvy, zejména pak mandelinky a nosatci (Volf, 2010). Zástupci obou těchto čeledí jsou na Salicaceae relativně specializovaní. Přesto se mezi nimi prakticky nevyskytují žádní striktní monofágové a většina druhů je specializovaná na celou čeleď Salicaceae (Rowell-Rahier, 1984; Topp *et al.*, 2002). Z ekologického hlediska jsou v tomto případě zajímavé především mandelinky. Ty se v přírodě obvykle vyskytují spíše na bylinách, zatímco na aparentních rostlinách, zejména stromech, jich v našich podmínkách můžeme nalézt pouze velmi malý počet druhů. Vrby se od ostatních dřevin nápadně odlišují svým unikátním chemickým složením, zejména pak přítomností salicylátů, které se některé specializované mandelinky naučily využívat ve svůj prospěch (Denno *et al.*, 1990; Martinsen *et al.*, 1998; Pasteels *et al.*, 1983; Rank *et al.*, 1998; Rowell-Rahier *et al.*, 1986; Zvereva *et al.*, 2010). Dá se proto předpokládat, že výskyt a druhová diverzita mandelinek na vrbách úzce souvisí právě s obsahem těchto sekundárních metabolitů.

Podobně specializované jako brouci jsou na vrbách i pilatky, z nichž převážná většina druhů vyskytujících se na vrbách je také vázána pouze na čeleď Salicaceae (Rowell-Rahier, 1984). Narozdíl od brouků se ale mezi pilatkami vyskytují i striktní monofágové (Kopelke, 2007a, 2007b; Zinovjev, 1998). Podobně jako u brouků můžeme také u pilatek pozorovat trend, kdy se na vrbách s vyšším obsahem salicylátů vyskytují více specializované druhy (Roininen *et al.*, 1989; Rowell-Rahier, 1984), kterým se v takových podmínkách lépe daří a jejich larvy rostou rychleji (Roininen *et al.*, 1989).

Ze zde uvedených řádů hmyzu jsou nejpolyfágnější motýli a na vrbách se běžně vyskytují i druhy, které se kromě Salicaceae živí i rostlinami z jiných čeledí. Přesto i pro motýly platí, že vrby s vysokým obsahem fenolických glykosidů hostí chudší společenstva housenek, která jsou složená převážně ze specializovaných druhů (Rowell-Rahier, 1984).

1.9. Cíle práce a hypotézy

Primárním cílem této studie je porovnat složení společenstev herbivorního hmyzu mezi jednotlivými druhy vrb a zjistit jaký vliv mají na jejich strukturu sekundární metabolity, morfologie listů a fylogeneze hostitelských rostlin. Vzhledem k tomu, že fylogeneze evropských druhů vrb v podstatě neexistuje, klade si práce za cíl její rekonstrukci. Podobně je nezbytná i analýza obsahu sekundárních metabolitů, protože ani tyto údaje nejsou dostupné a nebo jsou jen velmi špatně porovnatelné s mými daty. Finálním cílem je využití znalostí fylogeneze, obsahu sekundárních metabolitů a morfologie listů k testování následujících hypotéz:

- I) Vrby postrádající salicyláty, a tím pádem i účinnou kvalitativní obranu, budou lépe bráněny kvantitativně a morfologickými adaptacemi. Kvalita listů, vyjádřená jejich tuhostí a obsahem kondenzovaných taninů, se bude v průběhu sezóny proto rychleji zhoršovat u vrb s nízkým obsahem salicylátů.
- II) Podobnost společenstev herbivorního hmyzu bude korelována s podobností chemického složení hostitelských rostlin, ale na složení společenstev bude mít vliv i morfologie listů.
- III) Obsah sekundárních metabolitů bude mít na složení herbivorních společenstev větší dopad než fylogeneze hostitelských rostlin. Pokud se ukáže, že fylogeneze není korelována s obsahem sekundárních metabolitů, dá se předpokládat, že její vliv nemusí být signifikantní.
- IV) Salicyláty budou mít na složení listy okusujícího hmyzu větší vliv než flavonoidy a kondenzované taniny, protože se jedná o unikátní sekundární metabolity vrb.
- V) Na vrbách s velkým obsahem salicylátů by se měla vyskytovat druhově chudší společenstva. To je způsobeno tím, že na salicyláty se, vzhledem k jejich ojedinelosti v rámci rostlin, dokázalo přizpůsobit méně druhů herbivorů než na flavonoidy a kondenzované taniny.
- VI) Na vrbách s vyšším obsahem salicylátů se bude vyskytovat sice méně druhů hmyzu, ale ty budou mít díky nižší kompetici ze strany generalistů vyšší abundance. S obsahem salicylátů se proto nebude měnit celková abundance herbivorů.

2. Metodika

2.1. Zkoumané druhy 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. Kromě čistých mateřských druhů jsem se ale rozhodl přistoupit i ke sběru hmyzu i na dvou vybraných hybridních – *Salix alba* x *fragilis* a *S. purpurea* x *viminalis*. Tito hybridní jsou kříženci druhů s vysokým a nízkým obsahem salicylátů a dalo se očekávat, že budou hostit zajímavá společenstva herbivorního hmyzu, jejichž složení může poskytnout informace o vlivu těchto sekundárních metabolitů na herbivorní hmyz. Vrby jsem určoval podle práce Chmelař & Koblížek (1990). Determinaci ověřoval Milan Štech a problematiku exemplářů identifikoval také profesor Koblížek.

Společenstva herbivorního hmyzu byla zkoumána na osmi druzích vrb – *Salix aurita*, *S. caprea*, *S. cinerea*, *S. fragilis*, *S. purpurea*, *S. pentandra*, *S. rosmarinifolia*, *S. viminalis*, dvou jejich křížencích – *S. alba* x *fragilis* a *S. purpurea* x *viminalis* a osice *Populus tremula*, která sloužila jako outgroup pro analýzy. Tyto druhy vrb byly vybrány, tak aby byly zastoupeny obě skupiny vrb běžně rozlišované v ekologických studiích a byla tak pokryta chemická diverzita a morfologická variabilita vrb rostoucích na území České republiky (Tab 1.).

Tabulka 1. Obsah salicylátů a ochlupení listů zkoumaných druhů vrb. Červeně a zeleně jsou odlišeny dvě skupiny, na něž se vrby tradičně dělí podle obsahu sekundárních metabolitů.

| druh | salicyláty v listech dospělého stromu ¹ | trichomy na listech |
|---------------------------------------|---|------------------------|
| <i>S. aurita</i> | ne | ano |
| <i>S. caprea</i> | ne | ano |
| <i>S. cinerea</i> | ne | ano |
| <i>S. fragilis</i> | ano | ne |
| <i>S. pentandra</i> | ano | ne |
| <i>S. purpurea</i> | ano | ne |
| <i>S. rosmarinifolia</i> | ano | ano |
| <i>S. viminalis</i> | ne | ano |
| <i>S. alba</i> x <i>fragilis</i> | ano | ano |
| <i>S. purpurea</i> x <i>viminalis</i> | ano | ne |
| <i>P. tremula</i> | ano | ne |

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

Tabulka 2. Výskyt druhů stromů na jednotlivých lokalitách.

| druh | Vrbenské rybníky | Ohrazení, Kališťský rybník | Děkanec | Tůně u Špačků |
|------------------------------------|------------------|-------------------------------|---------|------------------|
| <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 | X | |
| <i>S. pentandra</i> | X | | | |
| <i>S. purpurea</i> | X | | | X |
| <i>S. rosmarinifolia</i> | | X | X | |
| <i>S. viminalis</i> | X | | | X |
| <i>S. alba x fragilis</i> | X | | | |
| <i>S. purpurea x viminalis</i> | | | X | |
| <i>P. tremula</i> | X | X | X | |

2.2 Výzkumné plochy

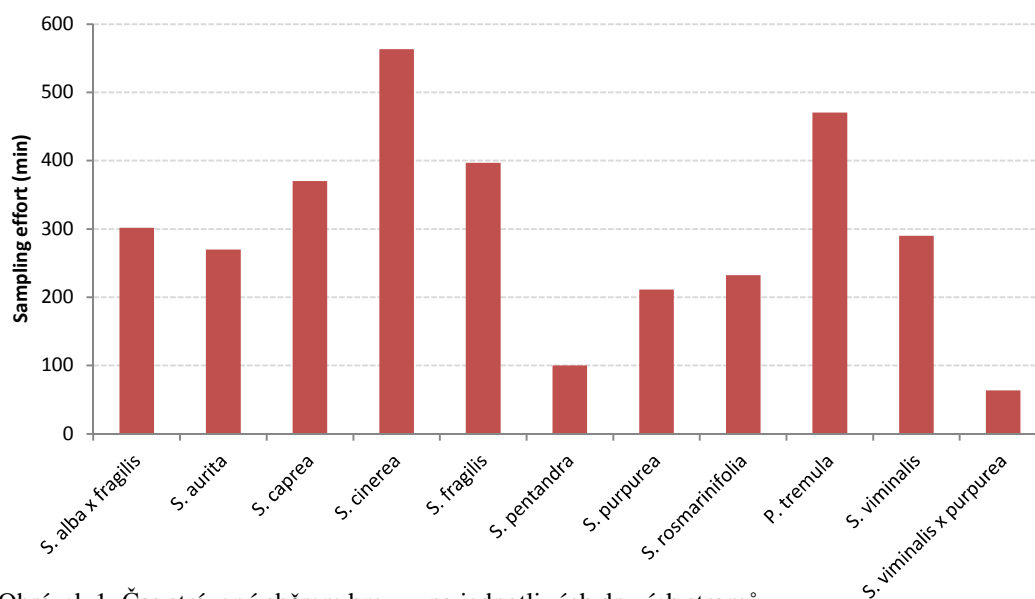
Výzkum probíhal v letech 2008 až 2010 na čtyřech lokalitách v okolí Českých Budějovic: I) Vrbenských rybníciích, II) v bezprostředním okolí rybníka v NPP Děkanec u vsi Krasejovka, III) v okolí NPP Ohrazení a na hrázi Kališťského rybníka a IV) v PP Tůně u Špačků u Nových Hodějovic. Většina zkoumaných druhů stromů byla zastoupena na dvou až třech lokalitách (Tab. 2). Pouze na jediné lokalitě se vyskytovali oba hybridy a také *Salix pentandra*.

2.3 Sběr a určování hmyzu

Sběr dat probíhal během sezón 2008 až 2010 od konce dubna do poloviny září. Hmyz jsem sbíral smýkáním a ručním sběrem, abych získal i housenky zarolované v listech. Ke standardizaci počtu sebraných jedinců hmyzu jsem používal čas strávený sběrem vyjádřený v minutách, přičemž poměr času strávený ručním sbíráním a smykem byl mezi všemi druhy stromů 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 (Obr. 1). Brouky jsem determinoval podle klíčů Čížek & Doguet (2008), Javorek (1947) Smreczyński (1966, 1972, 1974) a Warchalowski (2003). Část problematických nosatců a mandelínek určil Richard Čtvrtečka a Lukáš Sekerka. Housenky, housenice a larvy brouků jsem dochovával do dospělosti kvůli determinaci. 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 proto zůstala neurčená. To se týká převážně čeledí *Tortricidae*, *Depressariidae* a *Gelechiidae*, jejichž larvy nejsou na základě fotografií spolehlivě rozlišitelné. Vylíhlá imága motýlů určili Michal Zapletal a Jan Šumpich.

Pro test specializovanosti jednotlivých řádů hmyzu na čeleď Salicaceae jsem použil data z dostupné literatury (Čížek *et al.*, 2008; Javorek, 1947; Macek *et al.*, 2007, 2008; Smreczyński, 1966, 1972, 1974; Warchalowski, 2003) a informace z osobní komunikace s Janem Mackem a Lukášem Sekerkou.



Obrázek 1. Čas strávený sběrem hmyzu na jednotlivých druzích stromů

2.4. 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 (SLA). Hustotu trichomů jsem určil pomocí odhadu jejich pokryvnosti (Volf, 2010) a výsledky pro spodní a svrchní stranu listu sečetl. 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. Vzorky pro stanovení specific leaf area jsem nasbíral ve vegetační sezóně 2011 v pravidelných 14-ti denních intervalech. Měření specific leaf area jsem prováděl pomocí vážení koleček z listů o známém průměru, která byla předtím vysušena v silikagelu.

2.5. Analýza obsahu sekundárních metabolitů

Analýzu obsahu sekundárních metabolitů jsem provedl v laboratoři prof. Riitty Julkunen-Tiitto na University of Eastern Finland. Vzorky pro analýzu jsem nasbíral začátkem června a srpna 2010 pro srovnání hodnot z počátku a vrcholu vegetační sezóny. Vzorky listů jsem vysušil a až do analýzy uchovával v silikagelu.

2.5.1 HPLC analýza obsahu salicylátů a flavonoidů

Analýzu jsem prováděl podle protokolu Riitty Julkunen-Tiitto (ústní sdělení). Pro analýzu jsem použil 3-10mg pletiva z listů. Se vzorky jsem následně pracoval na ledu. K naváženému vzorku jsem do 2ml zkumavky přidal 0,6ml vychlazeného metanolu. Vzorek jsem zhomogenizoval pomocí tkáňového homogenizátoru. Poté jsem vzorek nechal 15 minut stát na ledu. Pak jsem homogenizaci opakoval. Po opětovné homogenizaci jsem vzorek zcentrifugoval při 13 000 otáčkách po dobu tří minut. Vzorek jsem přenesl do nové 6ml zkumavky a nechal metanol odpařit ve vakuové centrifúze. Extrakci jsem tímto způsobem opakoval ve stejné 6ml zkumavce třikrát s časem stání na ledu sníženým z 15 minut na 5 minut. Pevné reziduum zbylé po extrakci v 2ml zkumavce jsem použil pro stanovení obsahu kondenzovaných taninů nerozpustných v metanolu.

K vysušenému extraktu jsem přidal 600 μ l metanolu a 600 μ l destilované vody. Případnou sraženinu jsem opatrně zhomogenizoval pomocí ultrazvuku. 20 μ l takto připraveného vzorku jsem použil na HPLC analýzu obsahu salicylátů a flavonoidů. Samotnou analýzu jsem prováděl pomocí kolony ZORBAX SB-C18 3.5 μ m, 4.6 x 75mm při teplotě 30°C. Jako solventy jsem použil 1,5% tetrahydrofuran a 0,25% kyselinu o-fosforečnou rozpuštěné ve vodě (solvent A) a metanol (solvent B). Použitý gradient ukazuje tabulka 3. Jako vnitřní standard jsem použil arbutin. Na detektoru jsem měřil hodnoty při 220, 270 a 320 nm. Flavonoidy a salicyláty jsem identifikoval pomocí hodnot retenčních časů a spektrálních křivek a jejich obsah přepočtl na základě hodnot získaných pro arbutin a pomocí response factors na váhu a objem vzorku.

Tabulka 3. HPLC gradient

| čas (min) | podíl solventu B (%) |
|-----------|----------------------|
| 5 | 0 |
| 10 | 15 |
| 20 | 30 |
| 40 | 50 |
| 60 | 100 |

2.5.2 Analýza obsahu kondenzovaných taninů

Obsah kondenzovaných taninů jsem změřil pomocí butanolového testu (acid-butanol assay) (Swain & Hillis, 1959). Obsah kondenzovaných taninů rozpustných v metanolu jsem stanovil následovně: k 6 ml směsi kyseliny chlorovodíkové rozpuštěné v metanolu, vzniklé smícháním 50ml 35% HCl s 950 ml butanolu, jsem přidal 0,25ml 2% $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ rozpuštěného v HCl. Do této směsi jsem následovně pipetou přenesl 100-400 μl roztoku připraveného na HPLC analýzu (viz výše). Metanolem jsem doplnil celkový obsah reakce na 7,25 ml. Vzorek jsem důkladně zvortexoval a s povoleným víčkem nechal ve vodní lázni vařit 50 minut. Po ochlazení jsem změřil absorbanci vzorku při 550 nm. Obsah taninů nerozpustných v metanolu jsem měřil obdobným způsobem. K 1-2 mg pevného rezidua zbylého po přípravě vzorků na HPLC analýzu jsem přidal 1ml metanolu a postupoval podle postupu uvedeného výše.

Obsah kondenzovaných taninů ($\mu\text{g}/\text{mg}$ vzorku) jsem z hodnot absorbance spočítal pomocí rovnice $x = \frac{A_{550} - 0.0317}{0.0066}$ a přepočtl na objem a váhu vzorku.

2.5.3 Chemická podobnost jednotlivých druhů vrb

Na základě získaných informací o obsahu sekundárních metabolitů jsem provedl analýzu chemické podobnosti jednotlivých druhů stromů. Data jsem nejprve zlogaritmoval. K vyhodnocení výsledků jsem následně použil dvě metody: UPGMA a CCA spočítané v programech Statistica 9.1 a Canoco for Windows 4.56.

2.6. Molekulární data

Molekulární fylogeneze evropských druhů vrb doposud není k dispozici. Proto jsem se pokusil 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; Chen *et al.*, 2010; Leskinen *et al.*, 1999). Pro molekulární analýzy jsem vybral tři lokusy – ITS 1 a 2, trnT-trnL a ADH. ITS, který je součástí 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 byl gen pro alkohol dehydrogenázu (ADH), která je u rostlin zodpovědná především za udržování hladiny NAD^+ . ADH je úsek jaderné DNA s vysokou mutační rychlostí, který se u vrb vyskytuje ve více kopiích.

Vzorků určených na molekulární analýzy jsem na lokalitách odebral od každého druhu vždy několik, z každého shluku morfologicky totožně vypadajících jedinců však alespoň jeden. Vzorky jsem po sebrání nechal vysušit v silikagelu. Na začátku izolace DNA jsem vzorky zhomogenizoval. Do směsi jsem přidal PVPP, abych zabránil vlivu případných inhibitorů během homogenizace. DNA jsem izoloval za použití Invitex Plant Extraction Kit (Invotrogen) podle protokolu přiloženého výrobcem. Získanou DNA jsem následně amplifikoval podle příslušných protokolů (Tab. 4 a Tab. 5). Pro amplifikaci DNA jsem použil specifické primery (Tab. 6). Přítomnost PCR produktu jsem ověřil pomocí elektroforézy. PCR produkty pro ITS a trnT-trnL jsem nechal přečistit a osekvenovat u firmy Macrogene Korea.

Tabulka 4. Složení PCR reakce

a) složení PCR reakce pro amplifikaci ITS a trnT-trnL b) složení PCR reakce pro amplifikaci ADH

| Látka | objem (μl) | Látka | objem (μl) |
|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| PPP Master mix (Top-Bio) | 12,5 | PPP Master mix (Top-Bio) | 12,5 |
| primer 1 (2.5 pmol) | 3,0 | primer 1 (1.0 pmol) | 3,0 |
| primer 2 (2.5 pmol) | 3,0 | primer 2 (1.0 pmol) | 3,0 |
| H ₂ O | 5,5 | H ₂ O | 5,0 |
| DNA | 1,0 | DNA | 1,5 |

Tabulka 5. Průběh PCR reakce

| lokus | 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 |
| ADH* | Denaturace | 94°C | 240s | 1x |
| | Denaturace | 94°C | 60s | 39x |
| | Annealing | 54-50°C* | 60s | 39x |
| | Extenze | 72°C | 120s | 39x |
| | finální extenze | 72°C | 480s | 1x |

*touchdown

Tabulka 6. Sekvence použitých primerů

| lokus | název primeru | sekvence |
|---------------|---------------|-------------------------|
| ITS | ITS4 | TCCTCCGCTTATTGATATGC |
| | ITS1P | CTTTATCATTTAGAGGAAGGAAG |
| trnT- trnL | trnL | GAGATTTTGAGTCTCGCGTGTC |
| | trnT2F | CAAATGCGATGCTCTAACCT |
| ADH | ADH 10F | CTCAGGATCAATACTGATAGG |
| | ADH 530F | TGAGGGAGCAAGGTTATCAGG |
| | ADH 700R | AMACCAAACCTCYTYGYYGTY |
| | ADH 1460R | ACCACCAAGCACTGCAACACC |

(Cronn *et al.*, 2002; Savage, 2010; Selosse, Bauer & Moyersoen, 2002; Taberlet *et al.*, 1991; White *et al.*, 1990)

U všech vrub kromě *S. viminalis* jsem zjistil přítomnost více kopií genu pro ADH. Proto jsem u tohoto lokusu přistoupil ke klonování. Pomocí výše uvedeného protokolu jsem provedl amplifikaci dvakrát nezávisle pro každý vzorek. Objem každé reakce byl 50 μ l. Produkt jsem zanalyzoval pomocí elektroforézy na agarózovém gelu, z kterého jsem požadovaný fragment DNA vyzoloval za použití kitu NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel) podle přiloženého protokolu. Následně jsem změnil koncentraci DNA a vybral pro každý vzorek ten z duplikátů, který lépe odpovídal ideální koncentraci vypočítané podle rovnice: $koncentrace = \frac{a \times 50}{3} \times 8$, ve které je "a" rovné délce fragmentu v kb. Tímto způsobem jsem dosáhl lepších výsledků při ligaci. Ligaci jsem provedl pomocí pGEM®-T Easy Vector kitu (Promega). Složení ligační reakce ukazuje tabulka 7. Reakci jsem nechal inkubovat přes noc ve 4°C.

Tabulka 7. Složení ligační reakce

| Látka | objem (μ l) |
|--------------------|---------------------|
| pGEM vector | 1,0 |
| 2x ligation buffer | 5,0 |
| H ₂ O | 2,0 |
| DNA | 1,0 |
| T4 DNA ligáza | 1,0 |

Pro transformaci jsem použil JM109 kompetentní buňky (Promega). K 10 μ l ligační reakce jsem přidal 50 μ l kompetentních buněk a nechal stát na ledu 20 minut. Po uplynutí této doby jsem vzorky inkuboval při 42°C přesně 50 sekund a poté okamžitě přenesl na 2

minuty na led. Přidal jsem 450µl LB média a inkuboval 90 minut při 37°C a 160 otáčkách/min. Pak jsem 50-90µl směsi obsahující kompetentní buňky naočkoval na plotny s agarem obsahujícím ampicilin, IPTG a X-gal.

Vzhledem k vysoké výtěžnosti jsem neprováděl kontrolní PCR, ale bílé kolonie hned přenesl do Terrific broth media s ampicilinem a nechal inkubovat přes noc ve 37°C při 160 otáčkách/min. K izolaci plazmidu jsem použil Nucleospin Plasmid kit (Macherey-Nagel) a postupoval podle protokolu přiloženého výrobcem. DNA jsem poté nechal osekvenovat.

2.7. Fylogenetické analýzy

Lokus ADH byl variabilní i v rámci druhu a i u jediného jedince byly často nalezeny různé kopie. Do analýz jsem proto zahrnul všechny zjištěné odlišné sekvence pro tento gen. Získané sekvence jsem sestavil v programu Geneious 5.5.3. a následně alignoval pomocí programu ClustalX 1.83. Alignment jsem manuálně upravil v BioEdit 7.0.5.3. Na základě AIC (Akaike Information Criterion) jsem pomocí programu Modeltest 3.7 ovládaného přes program MrMTgui 1.0 vybral vhodný model pro metodu maximum likelihood. Vybraný model HKY+I+G měl následující parametry: Base= (0.2935 0.1967 0.2204), Nst=2, TRatio= 1.6889, Rates=gamma, Shape= 0.7768, Pinvar= 0.6410. Fylogram příbuznosti zkoumaných druhů vrb jsem zrekonstruoval metodou maximum likelihood v programu PAUP 4.0b10. Provedl jsem i Bayesiánskou analýzu spojené matice lokusů ITS1, ITS2, trnT-trnL a ADH v programu MrBayes 3.1.2. při počtu 2.5×10^6 generací s nastavením modelu GTR s gamma distribucí. Před vyhodnocením výsledků jsem prvních 25% generací z datasetu odstranil. Hodnoty posteriorních pravděpodobností získané bayesiánskou analýzou jsem použil pro vyjádření podpory větví fylogramu.

2.8. 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. Pro lepší přehlednost v grafu jsem průběh akumulaci křivek pro *S. pentandra* a *S. purpurea x viminalis* odhadl pro 70 sběrů na základě lomenné funkce: $x = \frac{1}{(ax^2+bx+c)^d} + e$, 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 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 matice nepodobností složení společenstev zvlášť pro brouky, motýly a pilatky.

2.9. Korelace vlastností rostlin a jejich vliv na složení společenstev hmyzu

Abych se vyhnul pseudoreplikacím prováděl jsem analýzu vztahu jednotlivých obranných vlastností vrb ve fylogenetickém kontextu pomocí independent contrasts v programu R 2.10.1 funkcemi z balíčku ape 3.0. Jako vstupní informaci o fylogenezi zkoumaných stromů jsem použil fylogram s průměrnými vzdálenostmi jednotlivých druhů vrb získanými metodou maximum likelihood. Obdobným způsobem jsem provedl i analýzu vlivu obsahu salicylátů na diverzitu a abundanci herbivorního hmyzu. Pro analýzu jsem použil logaritmovanou jarní hodnotu koncentrace salicylátů v listech a jako index diverzity hodnotu MaoTau získanou z akumulčních křivek pro 40 vzorků.

Pro porovnání vlivu sekundárních metabolitů 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 z balíčku Vegan 1.17-2. Nejprve jsem provedl parciální Mantelův test s maticí nepodobností společenstev pro všechny „leaf chewers“, poté samostatně pro brouky, motýly a pilatky.

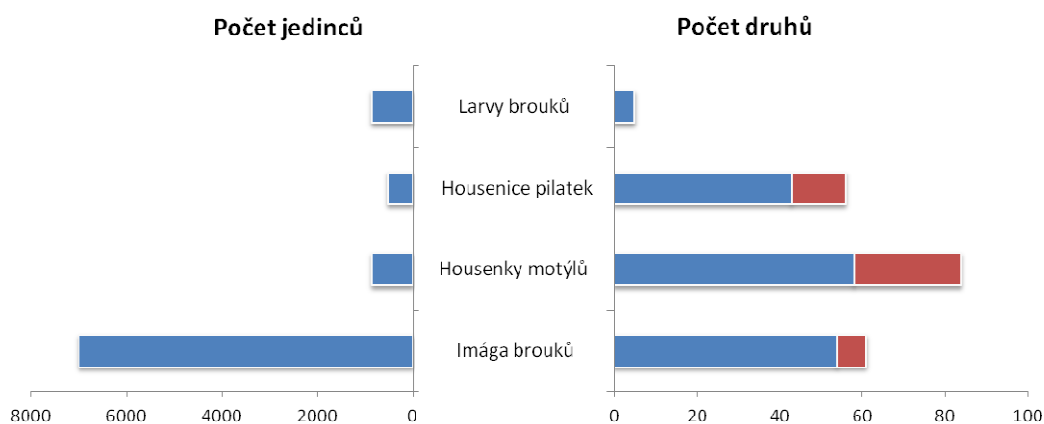
2.10. Mnohorozměrné analýzy složení společenstev hmyzu

Mnohorozměrné analýzy vlivu jednotlivých vlastností rostlin na složení společenstev herbivorního hmyzu jsem provedl v programu Canoco for Windows 4.56. Z analýz jsem vyřadil druhy s méně než třemi 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 mezidruhovú vzdálenosti. Počty individuí jsem vážil dobou sběru, vynásobil stem, přičetl jedničku a logaritmičtě transformoval. U všech analýz jsem prováděl Monte-Carlo test signifikance první kanonické osy s 999 permutacemi. Pro porovnání vlivu jednotlivých proměnných jsem provedl parciální analýzy. Výsledky mnohorozměrných analýz jsem vizualizoval pomocí programu CanoDraw for Windows 4.12.

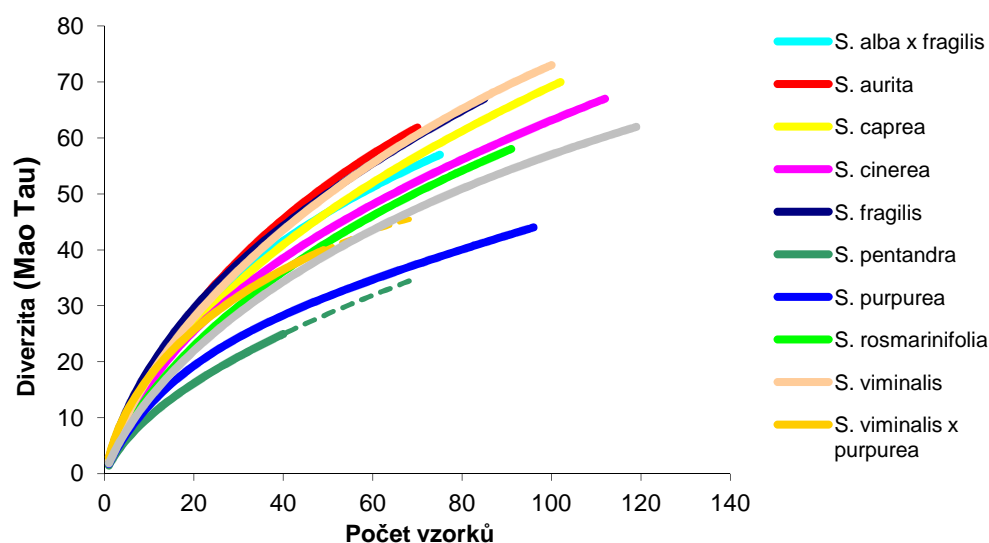
3. Výsledky

3.1. Složení společenstev herbivorního hmyzu

Celkem jsem nasbíral 9196 jedinců hmyzu z 201 druhů (Příloha 1). Nejpočetněji byla ve sběrech zastoupena imága brouků, především madelinky, největší druhovou diverzitu měli motýli (Obr. 2). Z 84 druhů motýlů byli však jen u 58 zaznamenáni více jak dva jedinci. Oproti tomu u brouků byla proporce vzácných druhů podstatně nižší (7 z 54). Celkový odhad diverzity pro společenstva na jednotlivých druhích stromů ukazuje obrázek 3.

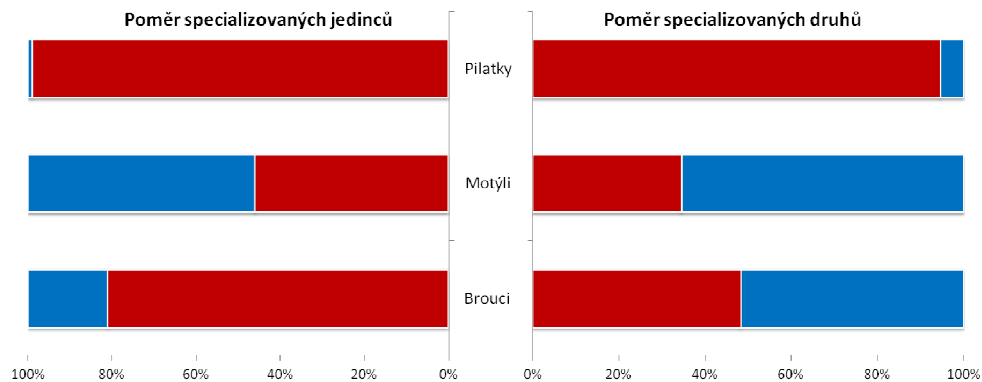


Obrázek 2. Celkový počet jedinců a počet druhů pro jednotlivé skupiny leaf chewers. Červeně jsou vyznačeny druhy s méně než třemi jedinci.



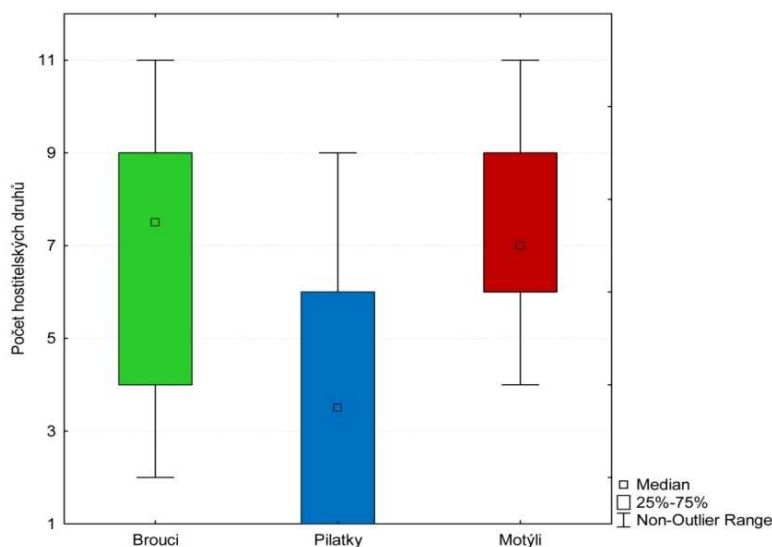
Obrázek 3. Akumulační křivky počtu druhů leaf chewers pro jednotlivé druhy hostitelských rostlin. Plná čára představuje hodnoty pro reálná data, přerušovaně je vyznačen růst diverzity aproximovaný lomenou funkcí.

Většina sebraného herbivorního hmyzu byla specializovaná pouze na čeleď Salicaceae (Obr. 4). Největší podíl specialistů jsem zjistil u pilatek. U brouků byl sice vysoký podíl druhů vyskytujících se i na živných rostlinách z jiných čeledí, nicméně z hlediska abundance jasně převažovali specialisté na Salicaceae. Naopak motýli vyskytující se na vrbách byli z převážné části generalisté.

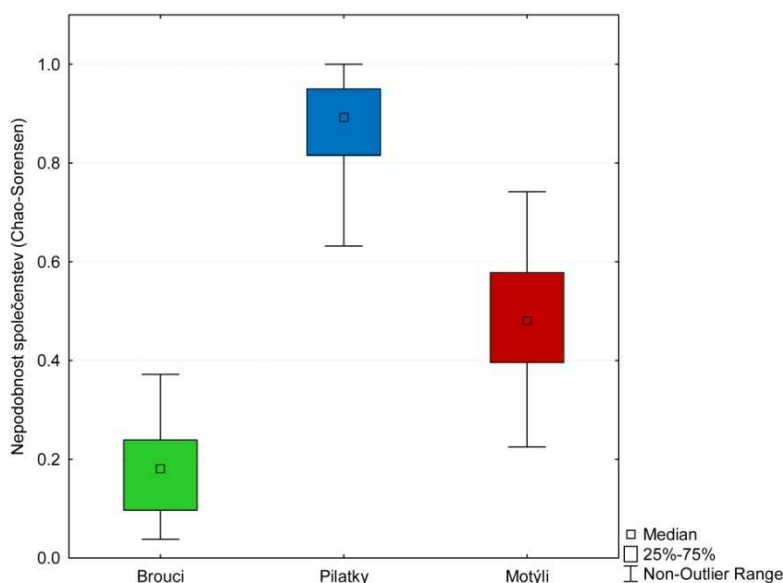


Obrázek 4. Poměr specialistů na Salicaceae (červeně) a generalistů živících se i na jiných rostlinách (modře) na základě informací z literatury.

Podobný trend byl patrný i u specializace herbivorního hmyzu na jednotlivé druhy stromů v rámci čeledi Salicaceae. I v tomto případě byly nejspecializovanější pilatky, mezi kterými se vyskytovali i striktní monofágové (Obr. 5, $p=0.002$) a jejich společenstva si byla mezi jednotlivými druhy stromů nápadně méně podobná než v případě motýlů a brouků (Obr. 6, $p<0.001$).



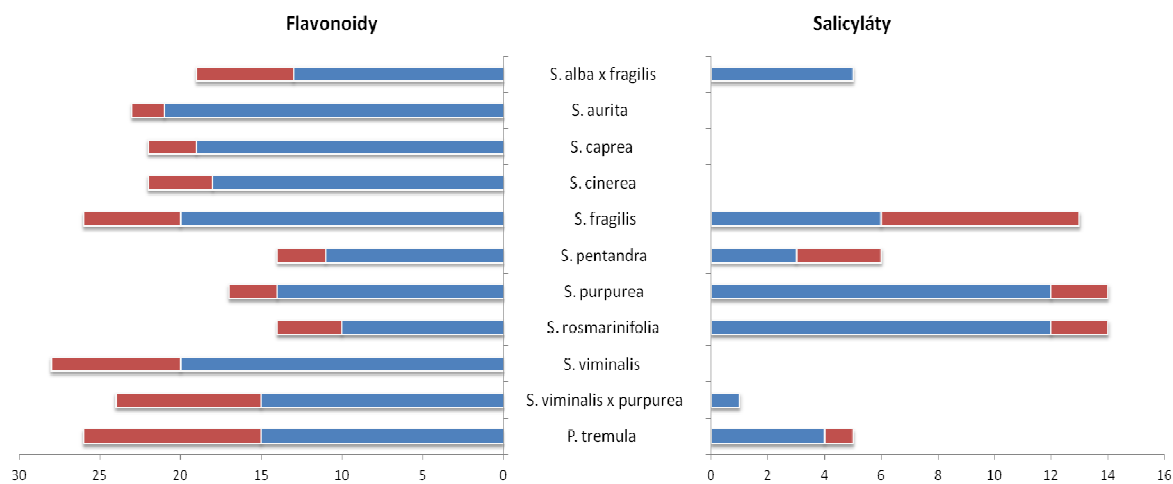
Obrázek 5. Počet hostitelských druhů rostlin pro jednotlivé druhy herbivorů ze tří řádů hmyzu ($p=0.002$, $F=7.04$).



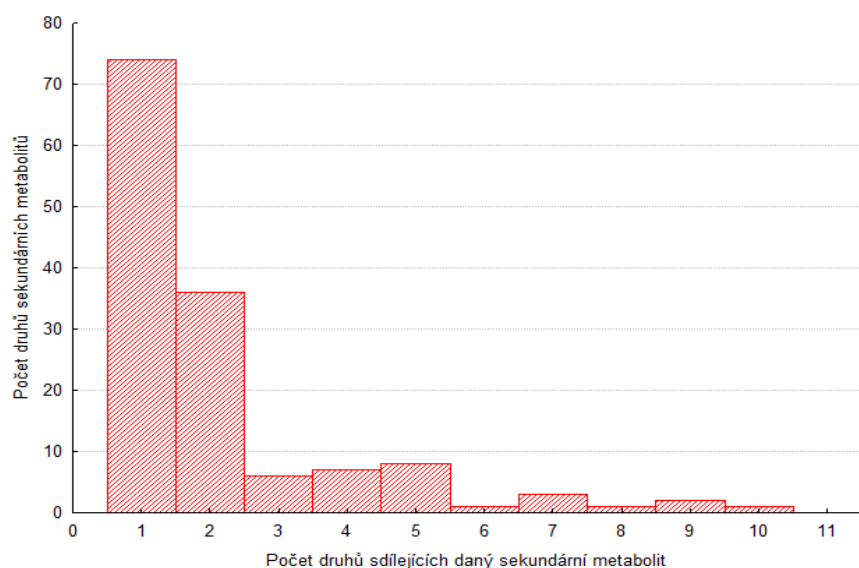
Obrázek 6. Podobnost společenstev jednotlivých řádů hmyzu mezi různými druhy hostitelských stromů ($p < 0.001$, $F = 386.05$).

3.2. Obsah sekundárních metabolitů

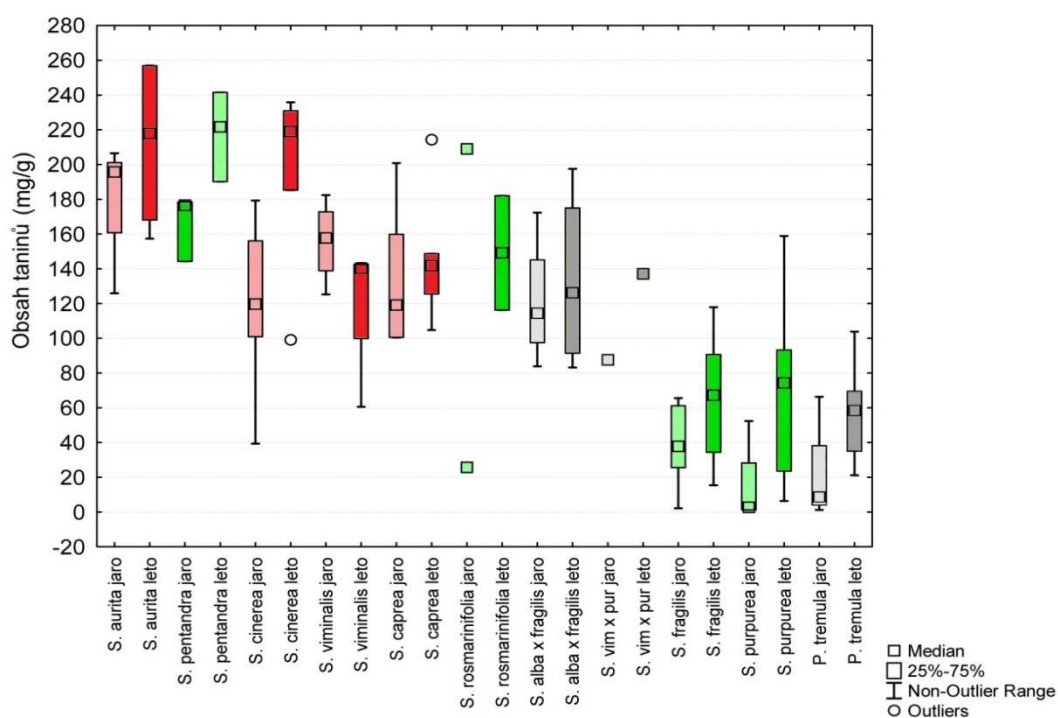
Celkem jsem ve svých vzorcích zjistil 137 druhů flavonoidů a salicylátů (Příloha 2). Diverzita zastoupení flavonoidů u všech zkoumaných druhů stromů byla přibližně vyrovnaná, zatímco v případě obsahu salicylátů byly mezi jednotlivými druhy značné rozdíly (Obr. 7). Velká část sloučenin byla unikátní pro jediný zkoumaný druh stromu a žádný sekundární metabolit z této skupiny nebyl sdílen všemi druhy vrby (Obr. 8). Nejhojněji se vyskytující salicylát byl salicin, který obsahovaly všechny vrby obsahující salicyláty.



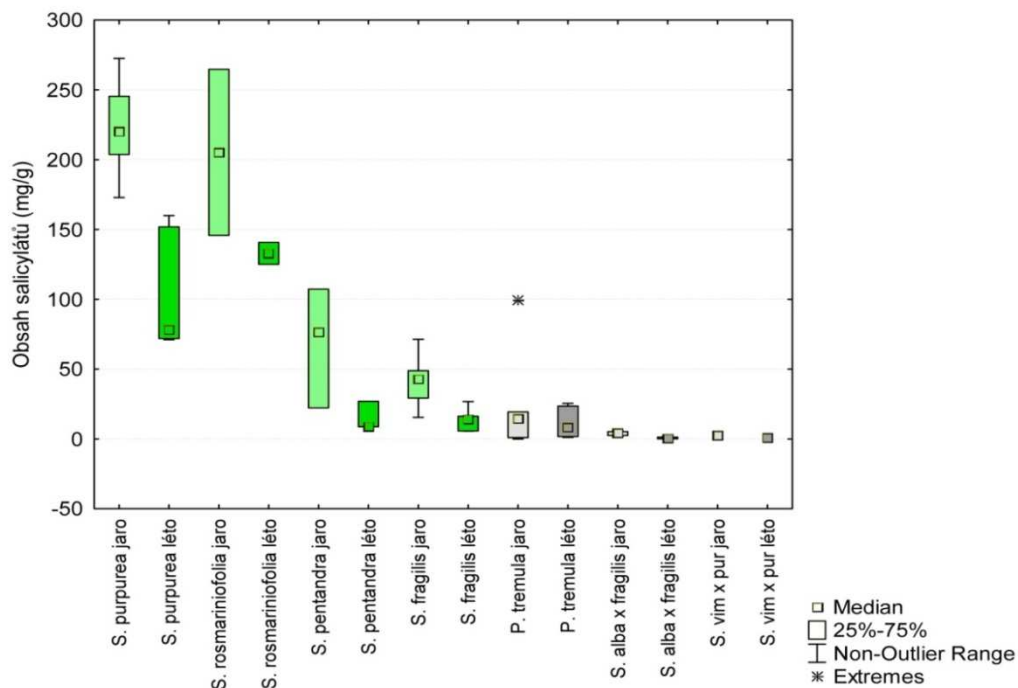
Obrázek 7. Diverzita obsahu (počet druhů) flavonoidů a salicylátů. Červeně jsou označeny sekundární metabolity unikátní pro daný druh stromu.



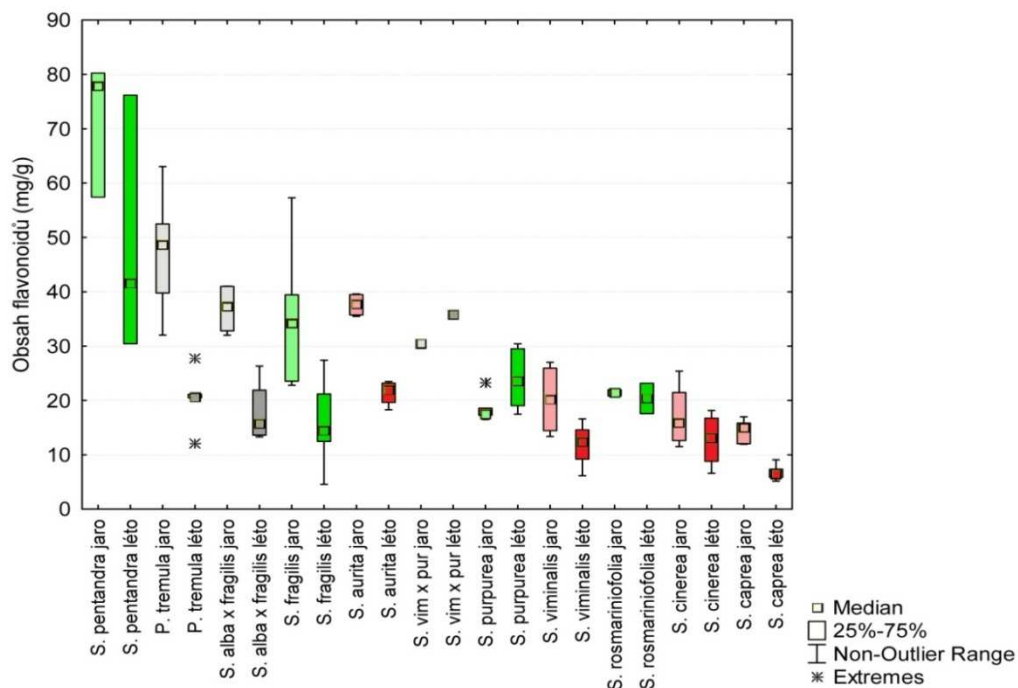
Obrázek 8. Sdílení jednotlivých druhů salicylátů a flavonoidů různými druhy stromů.



Obrázek 9. Obsah kondenzovaných taniinů. Zelenou a červenou barvou jsou odlišeny skupiny vrb tradičně užívané v ekologických studiích - zeleně skupina s "vysokým obsahem salicylátů a nízkým obsahem kondenzovaných taniinů", červeně skupina s "nízkým obsahem salicylátů a vysokým obsahem kondenzovaných taniinů". Světlejší odstín označuje hodnoty naměřené na jaře, tmavší v létě.



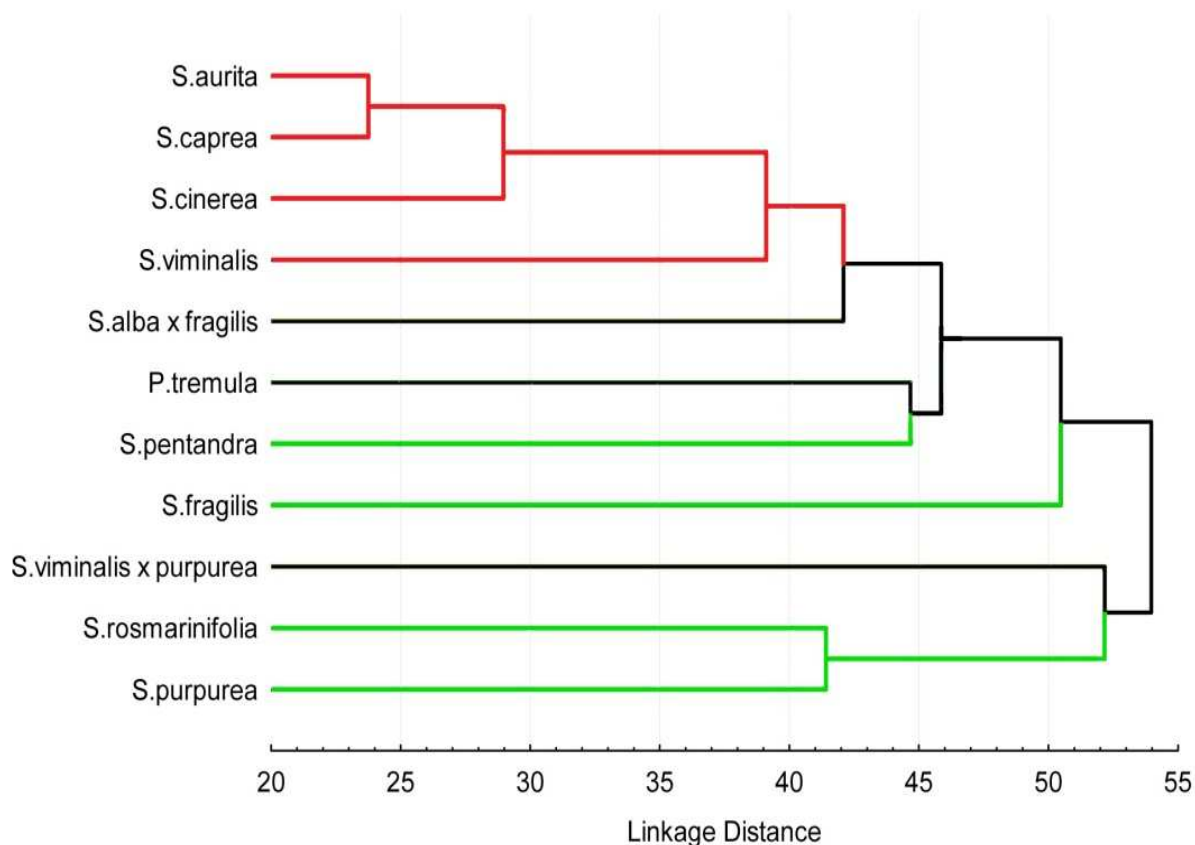
Obrázek 10. Obsah salicylátů. Zelenou barvou jsou odlišeny vrby tradičně řazené v ekologickckých studiích do skupiny druhů s "vysokým obsahem salicylátů". Světlejší odstín označuje hodnoty naměřené na jaře, tmavší v létě. *Salix aurita*, *S. caprea*, *S. cinerea* a *S. viminalis*, které salicyláty neobsahují, nejsou v grafu uvedeny.



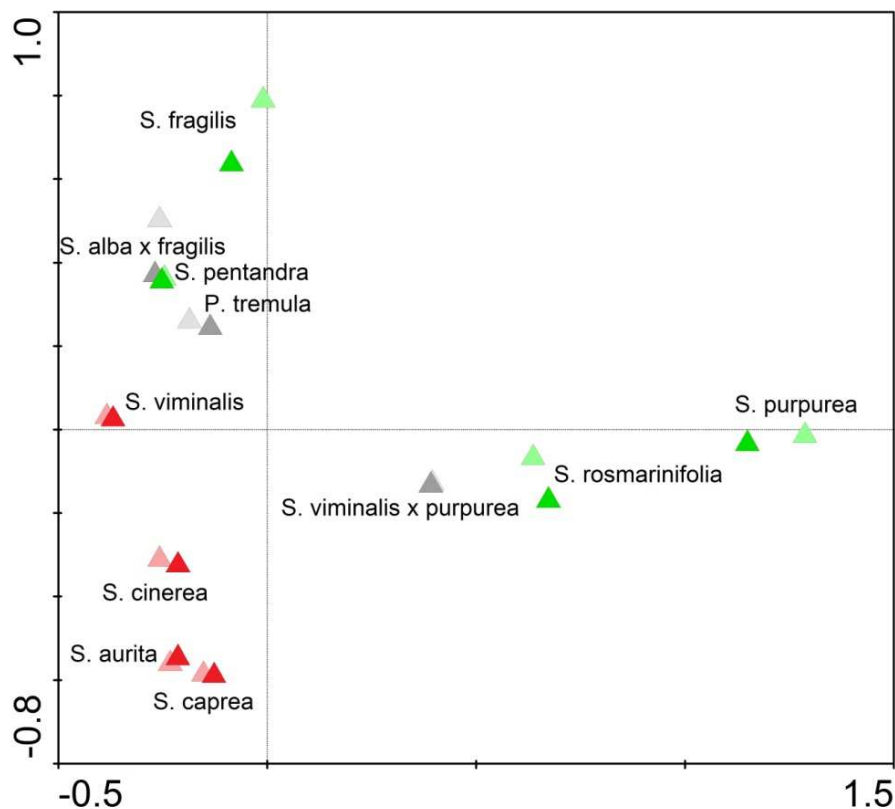
Obrázek 11. Obsah flavonoidů. Zelenou a červenou barvou jsou odlišeny skupiny vrby tradičně užívané v ekologickckých studiích - zeleně skupina s "vysokým obsahem salicylátů a nízkým obsahem kondenzovaných taninů", červeně skupina s "nízkým obsahem salicylátů a vysokým kondenzovaných taninů". Světlejší odstín označuje hodnoty naměřené na jaře, tmavší v létě.

Kondenzované taniny byly obsaženy v listech všech zkoumaných stromů. Jejich průměrná koncentrace se během sezóny zvyšovala (Obr. 9, $p=0.009$, $t=-3.23$), zatímco v případě salicylátů a flavonoidů došlo k jejímu poklesu (Obr. 10, $p=0.040$, $t=2.60$ a Obr. 11, $p=0.011$, $t=3.13$). Obsah kvantitativně působících látek se tak v průběhu sezóny zvyšoval a kvaliativně působících snižoval. Zkoumané vrby se dají rozdělit na dvě skupiny dle přítomnosti či nepřítomnosti salicylátů, nicméně v rámci vrb, které salicyláty obsahují, jsou patrné velké rozdíly v jejich koncentraci. V případě flavonoidů a kondenzovaných taninů není z výsledků zřejmý žádný trend na jehož základě by se daly jednotlivé druhy vrb rozdělit do kategorií.

Z výsledků analýz porovnávajících jednotlivé druhy stromů na základě obsahu sekundárních metabolitů je patrné, že tato podobnost koresponduje s přítomností či nepřítomností salicylátů (Obr. 12). Sezonní variabilita v obsahu sekundárních metabolitů byla vyšší u vrb s obsahem salicylátů (Obr. 13).



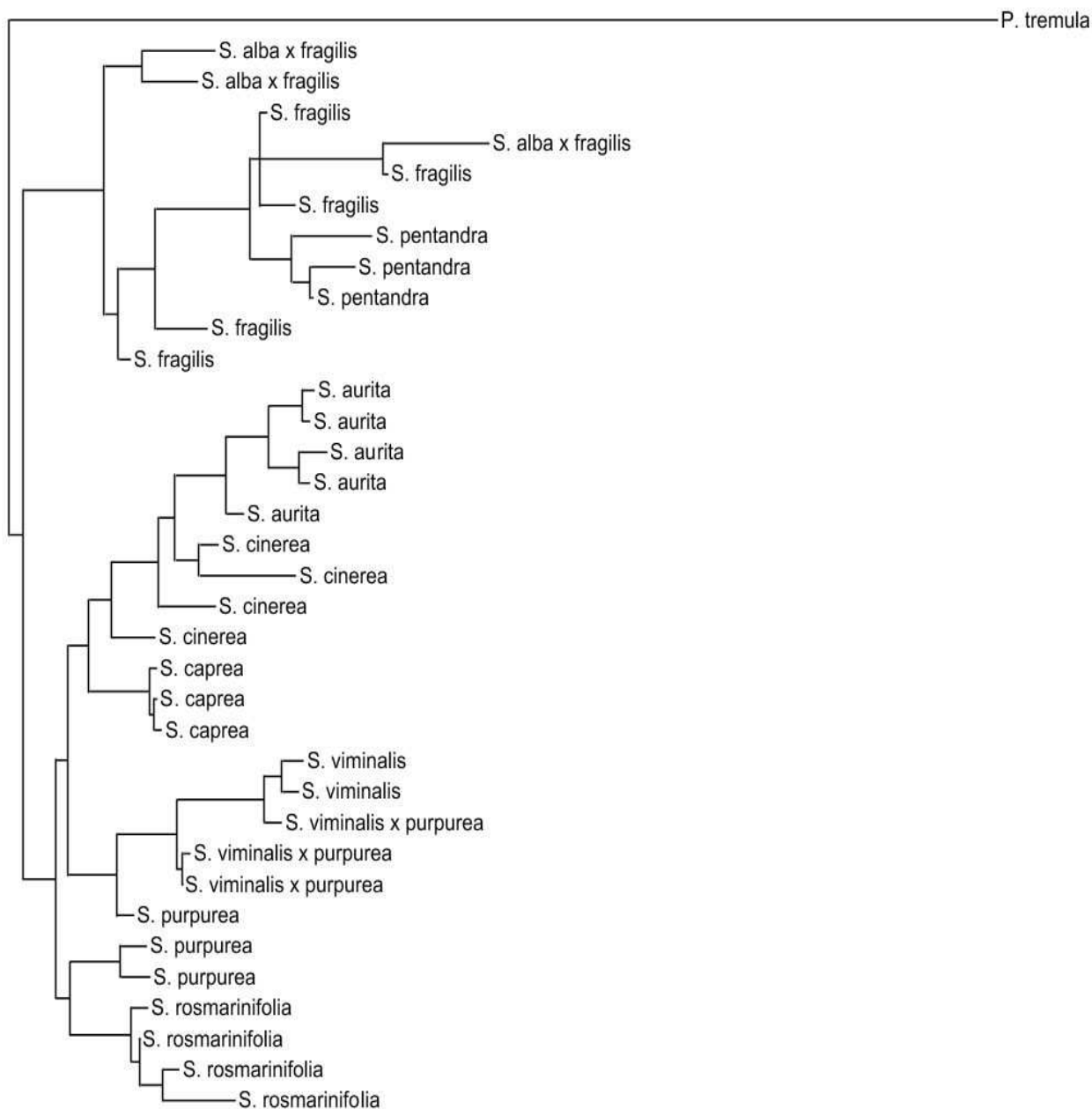
Obrázek 12. Podobnost zkoumaných druhů stromů na základě obsahu sekundárních metabolitů (UPGMA, euclidean distances). Zelenou a červenou barvou jsou odlišeny skupiny vrb tradičně užívané v ekologickckých studiích.



Obrázek 13. RDA ordinační diagram podobnosti a sezónní variability zkoumaných druhů stromů na základě obsahu sekundárních metabolitů. Zelenou a červenou barvou jsou odlišeny skupiny vrb tradičně užívané v ekologických studiích. Světlejší odstín označuje hodnoty naměřené na jaře, tmavší v létě.

3.3. Molekulární analýzy

Ukázalo se, že v rámci sekvencí ITS1, ITS2 a trnT-trnL, které jsou v jiných případech na mezidruhové úrovni variabilní, je rod *Salix* poměrně konzervativní. Z použitých lokusů byl proto nejvíce informativní gen pro ADH. Fylogram příbuznosti druhů rodu *Salix* zrekonstruovaný metodou maximum likelihood na základě lokusů ITS1, ITS2, trnL-trnT a ADH ukazuje obrázek 14. Topologie fylogramu rekonstruovaného na základě maximal likelihood byla shodná u obou modelů vybraných podle AIC a HLRT. Obdobné výsledky poskytla i Bayesiánská analýza, pro kterou kvůli přehlednosti uvádím ultrametrický strom s vyznačeným obsahem salicylátů a hodnotami posteriorních pravděpodobností pro (Obr. 15). I v rámci jednotlivých jedinců jsem v některých případech zjistil přítomnost více různých kopií genu pro ADH. Jedinou vrbou, jejíž genom obsahoval pouze jednu kopii, byla *S. viminalis*. Kromě již předem známých hybridů *S. alba x fragilis* a *S. viminalis x purpurea* jsem zjistil i křížení v rámci skupiny *S. aurita*, *S. caprea* a *S. cinerea*, protože tyto druhy navzájem nevytváří monofyletické sesterské skupiny a v případě některých jedinců "*S. cinerea*" se pravděpodobně jedná o hybridy s *S. aurita* nebo *S. caprea*.



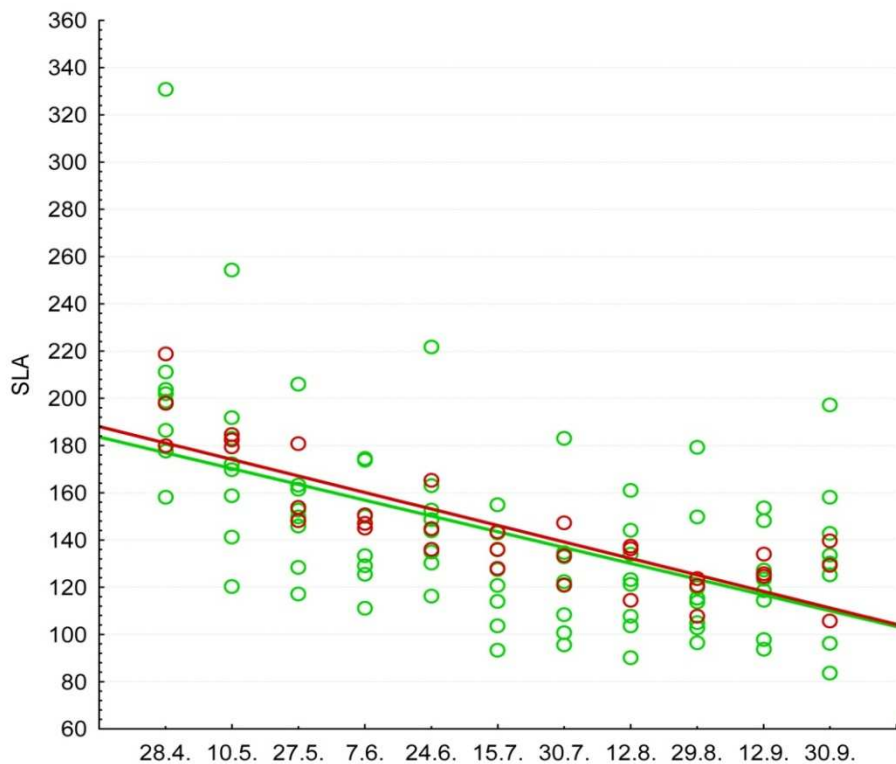
Obrázek 14. Fylogram příbuznosti druhů rodu *Salix* zrekonstruovaný na základě lokusů ITS1, ITS2, trnL-trnT a ADH metodou maximum likelihood podle modelu HKY s gama distribucí. Kladogram je zakořeněn topolem osikou (*Populus tremula*). Lokus ADH byl variabilní i v rámci druhu a i u jediného jedince byly často nalezeny různé kopie. Do fylogramu jsou proto zahrnuty všechny zjištěné odlišné sekvence v rámci druhu.

3.4. Vztahy obranných vlastností vrů

Žádné obranné vlastnosti zkoumaných rostlin spolu nebyly korelované, ačkoliv v případě flavonoidů jsem zjistil marginálně pozitivní závislost jejich obsahu a SLA, respektive hustoty trichomů (Tab. 8). U vrů postrádajících salicyláty se obsah kondenzovaných taninů během sezóny nezvyšoval prudčeji než u vrů, jejichž listy salicyláty obsahují ($p=0.444$, $t=-0.77$). Podobně se mezi oběma skupinami nelišil ani sezónní trend změny specific leaf area (Obr. 16, $p=0.845$).

Tabulka 8. Korelace chemických a morfologických vlastností zkoumaných rostlin za použití independent contrasts. Tučně jsou vyznačeny marginálně signifikantní hodnoty.

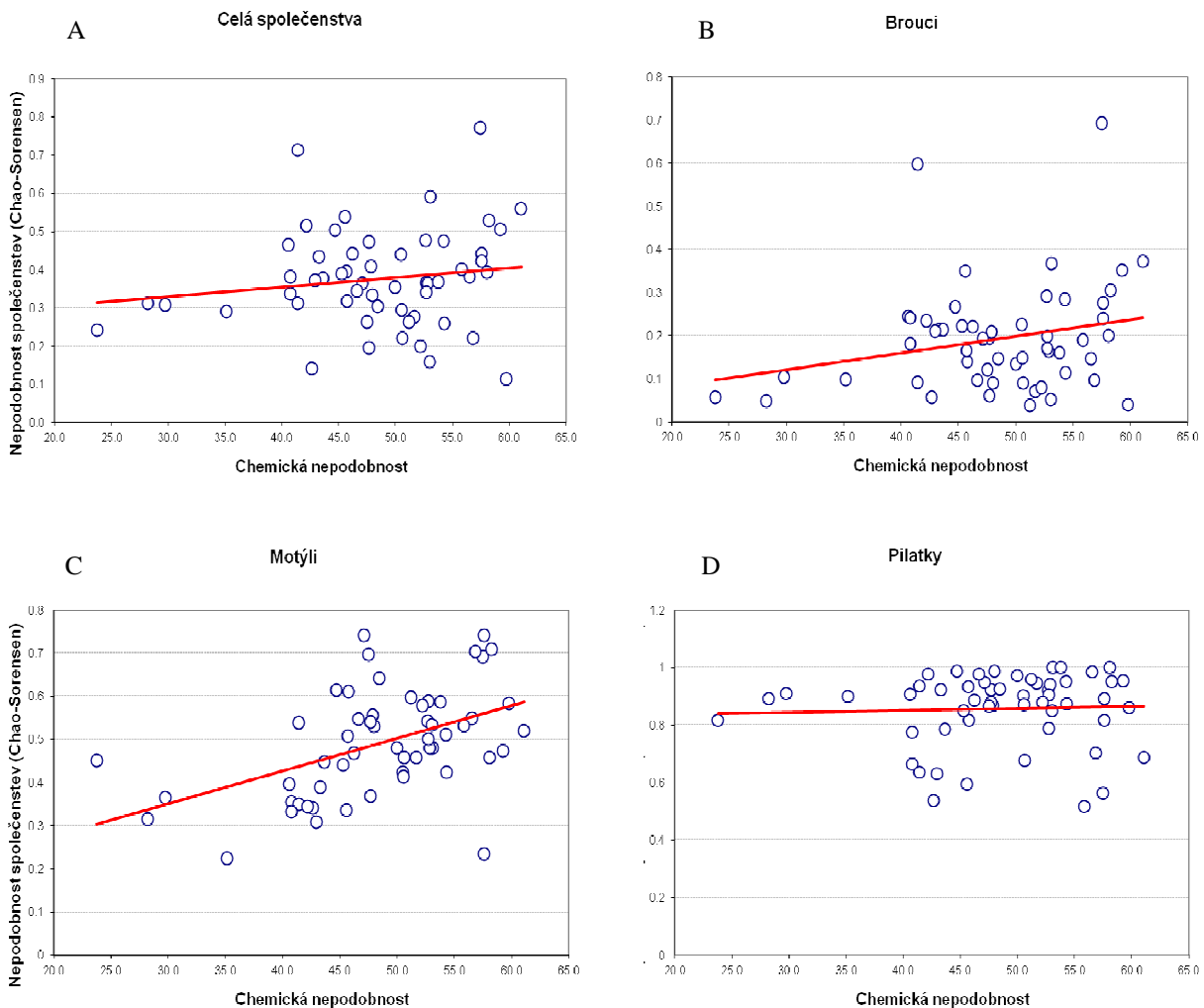
| | Salicyláty | | Flavonoidy | | Taniny | | SLA | | Trichomy | |
|-------------------|------------|-------|------------|--------------|--------|-------|------|--------------|----------|--------------|
| | F | p | F | p | F | p | F | p | F | p |
| Salicyláty | - | - | 0.16 | 0.703 | 0.76 | 0.409 | 0.01 | 0.922 | 0.20 | 0.67 |
| Flavonoidy | 0.16 | 0.703 | - | - | 1.62 | 0.239 | 4.87 | 0.058 | 4.40 | 0.069 |
| Taniny | 0.76 | 0.409 | 1.61 | 0.239 | - | - | 1.88 | 0.207 | 1.17 | 0.310 |
| SLA | 0.01 | 0.922 | 4.87 | 0.058 | 1.88 | 0.207 | - | - | 0.55 | 0.481 |
| Trichomy | 0.20 | 0.669 | 4.40 | 0.069 | 1.17 | 0.310 | 0.55 | 0.481 | - | - |



Obrázek 16. Trend sezónní změny specific leaf area u stromů obsahujících salicyláty (zeleně) a bez salicylátů (červeně). Trend se mezi oběma skupinami nelišil ($p=0.845$, $F=0.04$).

3.5. Vliv vlastností hostitelských rostlin na složení společenstev hmyzu

Fylogeneze hostitelských rostlin a jejich chemická nepodobnost, představovaná maticí nepodobností obsahu jejich sekundárních metabolitů, spolu nebyly korelované ($r=0.11$, $p=0.393$). Vliv fylogeneze neměl na podobnost herbivorních společenstev signifikantní vliv ($r=0.1505$, $p=0.128$). Vliv chemické nepodobnosti na složení celých společenstev herbivorního hmyzu byl jen marginálně signifikantní (Obr. 17, $p=0.078$). V samostatných analýzách pro jednotlivé řady hmyzu mělo chemické složení průkazný dopad na podobnost společenstev brouků (Obr. 17, $p=0.039$) a motýlů (Obr.17, $p=0.010$). V případě pilatek byl vliv obsahu sekundárních metabolitů zcela neprůkazný (Obr. 17, $p=0.216$).

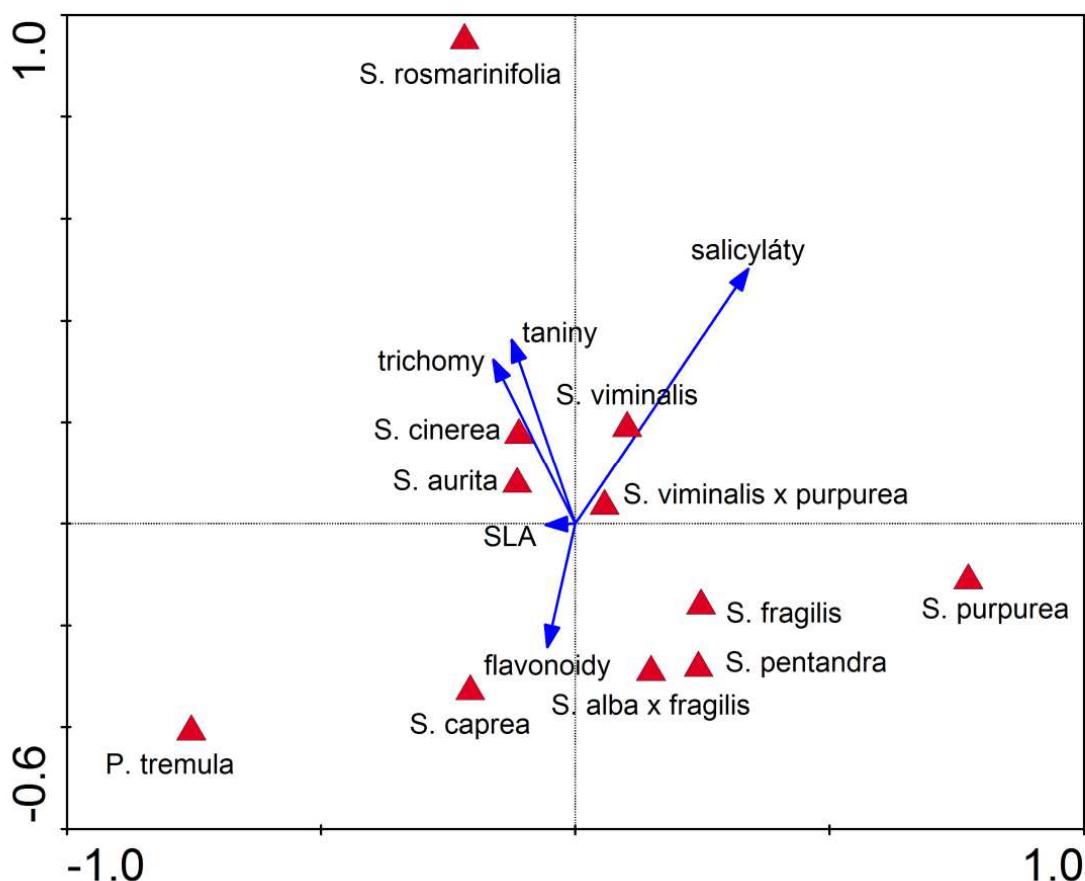


Obrázek 17. Vliv chemické nepodobnosti na složení společenstev herbivorního hmyzu. Podobnost společenstev pilatek (D) ($r=0.03$, $p=0.216$) ani celých společenstev herbivorů (A) ($r=0.23$, $p=0.078$) nebyla s chemickou nepodobností korelována. Naopak v případě společenstev brouků (B) ($r=0.25$, $p=0.039$) a motýlů (C) ($r=0.47$, $p=0.01$) byl vliv signifikantní.

Výsledky CCA potvrdily, že druhová příslušnost hostitelských rostlin a jejich zkoumané vlastnosti mají vliv na složení společenstev herbivorního hmyzu (Monte-Carlo test, $F=4.192$, $p<0.001$). První dvě kanonické osy vysvětlily 45% variability (Obr. 18). Výsledky parciálních analýz ukázaly, že ze zkoumaných vlastností rostlin mají na složení společenstev herbivorů největší dopad salicyláty (Tab. 9).

Tabulka 9. Vliv jednotlivých chemických a morfologických vlastností rostlin na složení společenstev herbivorů. Uvedeny jsou výsledky Monte-Carlo testu a podíl vysvětlené variability.

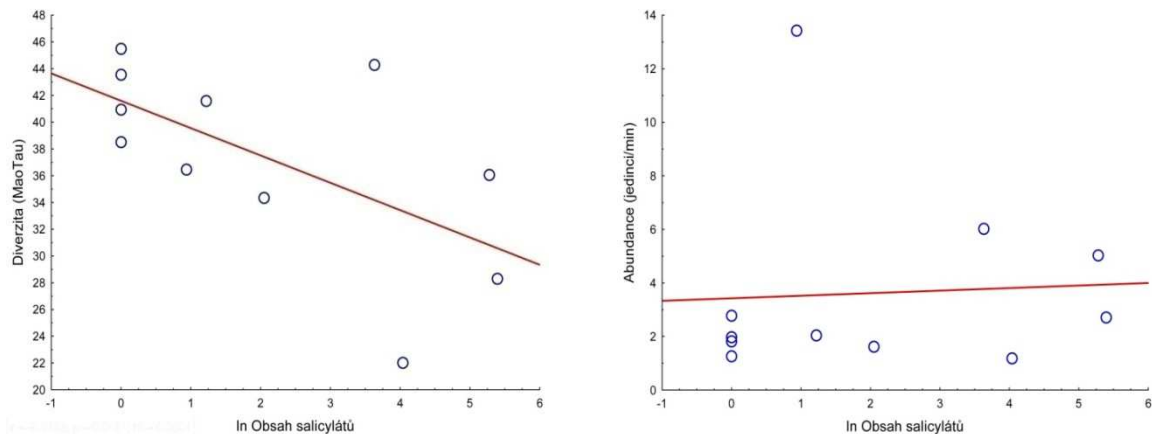
| | F | p | vysvětlená variabilita |
|-------------------|-------|---------|------------------------|
| Salicyláty | 3.627 | < 0.001 | 0.205 |
| Flavonoidy | 2.267 | < 0.001 | 0.128 |
| Taniny | 2.330 | < 0.001 | 0.132 |
| SLA | 2.665 | < 0.001 | 0.150 |
| Trichomy | 2.163 | < 0.001 | 0.122 |



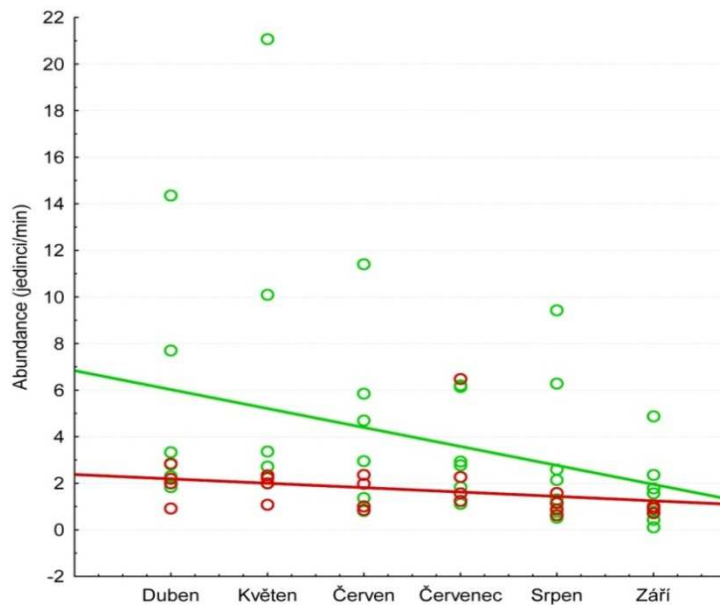
Obrázek 18. CCA ordinační diagram vlivu druhové příslušnosti hostitelských rostlin, obsahu sekundárních metabolitů a morfologie jejich listů na složení společenstev listy okusujícího herbivorního hmyzu. První dvě kanonické osy vysvětlují 45% variability.

3.6. Vliv salicylátů

Ze všech zkoumaných proměnných měly na strukturu společenstev hmyzu největší vliv salicyláty (Tab. 9). Salicyláty měly dopad i na diverzitu společenstev hmyzu (Obr. 19, $p=0.043$), ačkoliv při analýze za použití independent contrasts vyšel tento vliv pouze jako marginální ($R^2=0.34$, $p=0.077$). Naopak se neprokázal vliv salicylátů na abundanci herbivorů (Obr. 19, $p=0.867$). U vrb, které salicyláty obsahovaly, jsem zjistil nápadný pokles abundance herbivorního hmyzu s postupující sezónou (Obr. 20., $p=0.0355$).



Obrázek 19. Vliv salicylátů na diverzitu ($R^2=0.38$, $p=0.043$) a abundanci herbivorů ($R^2=0.003$, $p=0.867$). Obsah salicylátů je uveden pro koncentraci změřenou na jaře a v logaritmickém měřítku.



Obrázek 20. Trend sezónní změny abundance herbivorního hmyzu u vrb obsahujících salicyláty (zeleně) a bez salicylátů (červeně). U vrb, které salicyláty neobsahují, nebyla změna abundance hmyzu signifikantní ($p=0.192$, $R^2=0.076$), naopak u druhů které salicyláty obsahují byl její pokles během sezóny průkazný ($p=0.035$, $R^2=0.11$).

4. Diskuze

4.1. Složení společenstev herbivorního hmyzu

Vrby se od našich ostatních dřevin liší především výraznou investicí do kvalitativně působících sekundárních metabolitů, čímž se z hlediska své obranné strategie podobají spíše bylinám. Jejich unikátní chemické složení se proto odráží ve složení společenstev herbivorního hmyzu, která hostí. Například na vrbách dominantní mandelinky jsou obecně specializované především na neaparentní, kvalitativně bráněné byliny a na aparentních rostlinách se vyskytují poměrně vzácně (Warchalowski, 2003).

Většina herbivorního hmyzu byla specializovaná pouze na čeleď Salicaceae. To odpovídá i výsledkům dřívějších prací omezených na různé taxony hmyzu (Rowell-Rahier, 1984; Topp *et al.*, 2002). V mé práci ale byly mezi jednotlivými řády hmyzu v tomto ohledu zjištěny značné rozdíly. Nelze sice předpokládat, že míra specializace bude u tří nepříbuzných taxonů zcela schodná, nicméně mezi zástupci pilatek, motýlů a brouků byly v širší hostitelských spekter takové rozdíly, že lze uvažovat i o vlivu jiných faktorů než pouhé příslušnosti k dané taxonomické linii.

Nejspecializovanější byly housenice pilatek, u kterých byla drtivá většina druhů i jedinců specializovaná pouze na Salicaceae. Navíc se u pilatek jako u jediného ze zkoumaných hmyzích řádů vyskytovali i striktní monofágové. Jednotlivé druhy vrb proto hostily značně odlišná společenstva pilatek. Užší vazba na živné rostliny je u pilatek obecnějším jevem, zejména ve srovnání s motýly (Neuvonen & Niemela, 1983), mezi nimiž přes na první pohled podobnou životní strategii převažovali generalisté. Kromě vysoké míry specializace dosahují pilatky na vrbách i neobvyklé diverzity. Vrby zřejmě představují pro pilatky velmi vhodný zdroj potravy a proto v souvislosti s osídlením vrb došlo k jejich radiaci (Nyman *et al.*, 2006). Pilatky na vrbách jsou totiž zřejmě schopné využívat sekundární metabolity hostitelských rostlin ve svůj prospěch, což jim patrně umožňuje právě vyšší specializace na hostitelské rostliny. U specializovaných pilatek tak vyšší obsah salicylátů stimuluje ovipozici (Hjalten *et al.*, 2007; Kolehmainen *et al.*, 1994; Roininen *et al.*, 1999) a jejich larvy rostou na vrbách s vyšším obsahem salicylátů rychleji (Matsuki *et al.*, 1994; Roininen *et al.*, 1989). Dá se předpokládat, že druhy, které jsou dobře přizpůsobené na své hostitele, jsou schopné se sekundárními metabolity vypořádat lépe a více z nich i případně těžit, než druhy méně specializované. Zvláště silný tlak na specializaci na jednotlivé druhy hostitelských rostlin se dá očekávat zejména v případě vrb,

u kterých různé druhy stromů obsahují velice rozdílné sekundární metabolity a jejich efektivní odbourávání nebo využívání proto pravděpodobně vyžaduje odpovídající specializaci. O méně specializovaných motýlech naopak není známo, že by byli schopní sekundární metabolity vrb využívat ve svůj prospěch. Místo striktní specializace tak strategie motýlů patrně spočívá spíše ve schopnosti přijímat široké spektrum potravy.

U brouků byl počet druhů specializovaných na Salicaceae a generalistů vyrovnaný, avšak podobně jako u pilatek měli generalisté celkově mnohem nižší abundanci. V rámci Salicaceae ale byli brouci obecně méně specializovaní na jednotlivé druhy vrb než pilatky a to i přesto, že i u nich byla zjištěna schopnost využívat salicyláty ve svůj prospěch (Denno *et al.*, 1990; Martinsen *et al.*, 1998; Pasteels *et al.*, 1983; Rank *et al.*, 1998; Rowell-Rahier *et al.*, 1986; Zvereva *et al.*, 2010). Hlavní výhodou, kterou salicyláty larvám mandelínek přinášejí je obrana před predátory pomocí salicylaldehydu, který získávají konverzí některých salicylátů, zejména salicinu (Pasteels *et al.*, 1983). Ten je ale mezi vrbami obsahujícími salicyláty široce rozšířen a specializované mandelinky proto mohou z tohoto hlediska osidlovat takřka libovolné druhy vrb. Navíc, ačkoliv je tento příklad adaptace velmi zajímavý, nejedná se o široce rozšířený jev. Na mých pokusných plochách se vyskytovalo pouze šest druhů mandelínek u kterých bylo prokázáno využívání salicylaldehydu k vlastní obraně. Kromě toho se mezi brouky nevyskytovali žádní herbivoři žijící poloskrytě v zavinutých listech, mezi které v rámci pilatek osidlujících vrb patří nejvíce specializované druhy (Nyman *et al.*, 2006). Výsledky kvalitativních analýz výskytu druhů brouků na jednotlivých družích vrb může ovlivňovat i dobrá mobilita a schopnost letu jejich imág. Někteří jedinci se proto díky vysoké pohyblivosti mohou dočasně vyskytovat i na vrbě, která je pro ně suboptimálním zdrojem potravy nebo případně naopak rychle využít dočasného zlepšení kvality listů na jinak nevhodném druhu stromu.

4.2. Obsah sekundárních metabolitů

Obvyklé dělení vrb do dvou skupin na i) druhy s vysokým obsahem salicylátů a nízkým obsahem kondenzovaných taninů a ii) druhy s vysokým obsahem kondenzovaných taninů a nízkým obsahem salicylátů (Hochwender *et al.*, 2005; Rowell-Rahier, 1984; Topp *et al.*, 2002) se na základě mých výsledků zdá být poměrně nevhodné. Mezi salicyláty a kondenzovanými taniny jsem nezjistil žádnou negativní korelaci a například *Salix pentandra* obsahovala jak relativně vysoké koncentrace salicylátů, tak kondenzovaných taninů.

Kromě toho, že toto dělení postrádá jakoukoliv informaci o obsahu flavonoidů, není zcela vhodné ani z hlediska obsahu salicylátů. Koncentrace a jednotlivé druhy salicylátů se mezi různými druhy vrb nápadně liší a použitím kategorií vymezených na pouhé přítomnosti či nepřítomnosti salicylátů dochází ke ztrátě části informace a znemožnění testování některých hypotéz. Dělení vrb do skupin podle obsahu flavonoidů a kondenzovaných taninů je pak zcela nevhodné, protože z výsledků není zřejmý žádný trend na jehož základě by se daly jednotlivé druhy vrb rozdělit do kategorií.

Z výsledků analýz porovnávajících jednotlivé druhy stromů na základě obsahu všech zkoumaných sekundárních metabolitů je patrné, že tato podobnost částečně koresponduje s přítomností či nepřítomností salicylátů. Vrby tak sice lze rozdělit na dvě skupiny, ale mezi těmi nepanuje sesterský vztah. Navíc mezi vrbami, které salicyláty obsahují, jsou značné rozdíly a některé z nich jsou z hlediska obsahu sekundárních metabolitů podobnější spíše druhům bez salicylátů. Podobně jako v případě zastoupení jednotlivých skupin sekundárních metabolitů proto není dělení vrb do skupin vhodné ani na základě jejich celkového chemického složení. Vzhledem ke složitosti celého systému a velké variabilitě obsahu sekundárních metabolitů, se proto při studiu vrb zdá být nejlepším řešením provést důkladnou analýzu konkrétních vzorků, místo spoléhání se na data z literatury a následného členění vrb do nepřesných kategorií.

Ačkoliv jednotlivé druhy vrb obsahovaly velký podíl unikátních sekundárních metabolitů, jednalo se zčásti o deriváty se stejným chemickým základem, o kterých se dá předpokládat, že nemají na hmyz příliš odlišné účinky. Kromě těchto navzájem si velice podobných sloučenin ale byly jednotlivé linie stromů charakterizovány i značně odlišnými skupinami sekundárních metabolitů, u kterých lze dopad na podobnost společenstev hmyzu jednoznačně předpokládat. Příkladem jsou glykosylované a neglykosylované flavonoidy, u kterých mají neglykosylované molekuly přes stejný flavonový základ výrazně negativnější účinky na herbivorní hmyz, než jejich glykosylované formy (Lahtinen *et al.*, 2006; Salminen *et al.*, 2004).

Zajímavý je výskyt unikátních flavonoidů u *Salix viminalis* x *purpurea*, které neobsahoval ani jeden z mateřských druhů. U hybridů se přitom většinou vyskytují stejné látky jako u mateřských druhů a vznik nových sloučenin je u kříženců obecně poměrně vzácný (Cheng *et al.*, 2011). Na změnu chemického složení u kříženců velice často reaguje herbivorní hmyz. V tomto případě hostil hybrid *S. viminalis* x *purpurea* několikanásobně vyšší populační hustoty herbivorního hmyzu, než oba mateřské druhy. To naznačuje, že jeho celková obrana byla výrazně horší než u *S. viminalis* a *S. purpurea*.

Výskyt unikátních sekundárních metabolitů u hybridů vrb a jejich rozdílné chemické složení od obou mateřských druhů může být teoreticky vysvětleno tvorbou jednotlivých metabolitů v propojených biosyntetických drahách. Jediná mutace tak snadno může ovlivnit řadu drah vedoucích k mnoha různým látkám a proto i jedinci lišící se v jediné mutaci mohou mít zcela odlišné chemické složení (Nyman *et al.*, 2005).

Oproti zjištěné mezidruhovému variabilitě byla sezónní variabilita v obsahu sekundárních metabolitů poměrně malá a projevovala se zejména změnou koncentrací jednotlivých sloučenin. Vyšší obsah salicylátů a flavonoidů na jaře a vyšší obsah kondenzovaných taninů v létě jsou v souladu s široce rozšířeným trendem snižování koncentrace kvalitativně působících látek a zvyšování významu kvantitativní obrany s postupující sezónou a stářím listů (Cornelissen, Fernandes & Coelho, 2011; Ikonen, 2002; Kaase *et al.*, 2001; Lahtinen *et al.*, 2006; Martinsen *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1987; Murakami *et al.*, 2005; Salminen *et al.*, 2004).

4.3. Fylogeneze hostitelských rostlin

Vrby se ukázaly být ve svých molekulárních znacích velice konzervativní skupinou. Nízká variabilita sekvencí stála i za předchozími neúspěšnými pokusy o rekonstrukci fylogeneze čeledi Salicaceae (Azuma *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2010; Hamzeh *et al.*, 2004; Leskinen *et al.*, 1999). V mém případě se ukázalo jako zásadní spojení informace, kterou nesou lokusy ITS 1, ITS 2 a trnT-trnL, s informacemi získanými ze sekvence pro ADH, která byla ze všech lokusů nejvíce variabilní.

Celková podoba fylogeneze odpovídá na úrovni podrodů tradiční představě o příbuznosti jednotlivých druhů vrb založené na morfologii (Skvortsov, 1968) a na této úrovni je i velmi dobře podpořena hodnotami posteriorních pravděpodobností. Vzhledem k tomu, že tato práce nebyla primárně zaměřena na rekonstrukci kompletní fylogeneze rodu *Salix*, nedají se další případné rozdíly oproti klasickému členění posoudit. Minimálně v případě členění do jednotlivých sekcí však mé výsledky taxonomickým vztahům podle Skvortsova (1968) neodporují.

I v rámci jednotlivých jedinců jsem v některých případech zjistil přítomnost více různých kopií genu pro ADH a sekvence některých z nich ukazují na mezidruhové křížení. Obsah sekundárních metabolitů se mezi jednotlivými genotypy může značně lišit. Přítomnost hybridů u vrb tak značně omezuje využití literárních zdrojů o zastoupení sekundárních metabolitů. Z tohoto hlediska je proto důležité, že jsem analýzu sekundárních

metabolitů i fylogenezi rekonstruoval pro svoje konkrétní vzorky a chemické složení a fylogenetická pozice jednotlivých stromů si tak navzájem odpovídají.

Z topologie fylogramu je patrné, že v rámci vrb je přítomnost salicylátů ancestrální stav a u některých linií došlo k jejich sekundární ztrátě. Vzhledem k malému počtu druhů vrb zahrnutých do mojí analýzy a nepříliš spolehlivě rekonstruované pozici *S. viminalis*, bohužel nelze s jistotou říci, kolikrát k této události došlo. Nicméně vrby ztratily salicyláty nejméně dvakrát: jednou v rámci linie vedoucí k *S. aurita*, *S. cinerea* a *S. caprea* a podruhé u *S. alba*, která sice nebyla zahrnuta do mých analýz, ale je o ní známo, že je blízce příbuzná na salicyláty poměrně bohaté *S. fragilis* (Azuma *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2010; Leskinen *et al.*, 1999; Skvortsov, 1968) a sama zároveň salicyláty neobsahuje vůbec nebo pouze jen ve velice malých koncentracích (Julkunen-Tiitto, 1989).

4.4. Obranné strategie vrb

Mezi obsahem zkoumaných sekundárních metabolitů, specific leaf area a hustotou trichomů jsem nenašel žádný průkazný vztah. Jednotlivé druhy obranných mechanismů se navzájem nevyklučovaly a byly na sobě navzájem nezávislé. Moje práce tak podporuje výsledky současných studií, které popírají existenci "Univariate trade-off" (Agrawal, 2007; Agrawal *et al.*, 2006; Rudgers *et al.*, 2004). Základní myšlenka této teorie, predikující negativní korelaci různých druhů obrany před herbivory, vycházela z představy, že pokud je jeden z obranných mechanismů proti hmyzu dostatečně účinný, dochází k zániku selekce na ostatní způsoby obrany. Vrby nicméně napadá široká škála herbivorů. Vyskytují se na nich jak generalisté, proti kterým jsou účinné zejména salicyláty (Matsuki *et al.*, 1994; Orians *et al.*, 1997; Rowell-Rahier, 1984), tak specialisté, kteří se na tento druh sekundárních metabolitů dokázali dobře přizpůsobit (Ikonen, 2002; Kolehmainen *et al.*, 1995; Orians *et al.*, 1997; Pasteels *et al.*, 1984; Pasteels *et al.*, 1983; Rank, 1992; Roininen *et al.*, 1989; Rowell-Rahier, 1984; Soetens *et al.*, 1991; Topp *et al.*, 2002) a účinnější formou obrany před nimi patrně představují kondenzované taniny, trichomy a tuhost listů. Obrana zajišťovaná pouze jediným znakem by proto nebyla efektivní proti všem herbivorům, kteří vrby napadají. Morfologické a chemické adaptace vrb navíc zastávají i jiné funkce. Příkladem jsou flavonoidy, které kromě obrany před herbivory chrání rostlinu i před patogeny a nepříznivými abiotickými podmínkami, jako jsou extrémní teploty, sucho nebo UV záření (Harborne *et al.*, 2000; Treutter, 2006).

V rámci svých hypotéz (hypotéza I) jsem předpokládal, že vrby, které postrádají salicyláty, a tím i účinnou kvalitativní obranu, budou lépe bráněny kvantitativně a budou mít vyšší tuhost listů. Tento můj předpoklad se nepotvrdil. Mezi vrbami se salicyláty a vrbami bez salicylátů nebyl rozdíl v koncentraci kondenzovaným taninů ani hodnotách specific leaf area. U vrb bez salicylátů se nepotvrdilo ani očekávané rychlejší zhoršování kvality listů jako potravy pro herbivorní hmyz během sezóny. Vrby, které během evoluce salicyláty ztratily tak neinvestují více do jiných forem obrany. Salicyláty nepochybně fungují jako dobrá obrana před generalisty, ale někteří specializovaní herbivoři jsou i v jejich přítomnosti schopní dosáhnout velmi vysokých populačních hodnot, zřejmě díky omezené kompetici ze strany generalistů. Na celkovou abundanci herbivorního hmyzu tedy nemají salicyláty vliv a proto se patrně některým druhům vrb nevyplatí do relativně energeticky náročné kvalitativní obrany investovat.

4.5. Vliv vlastností hostitelských rostlin na složení společenstev hmyzu

Obsah sekundárních metabolitů nebyl korelovaný s fylogenezí hostitelských rostlin. V souladu s hypotézou III proto podobnost společenstev herbivorního hmyzu neodpovídala fylogenetické vzdálenosti hostitelských rostlin. Můj výsledek tak podporuje závěry prací předpokládajících, že fylogeneze hostitelských rostlin je dobrým prediktorem struktury společenstev herbivorů pouze v případě, že jsou s ní korelovány další důležité vlastnosti, například právě obsah sekundárních metabolitů (Bangert *et al.*, 2006; Becerra, 1997). Příbuznost hostitelských rostlin proto bude pravděpodobně hrát úlohu spíše na vyšších taxonomických úrovních, nejčastěji přibližně od čeledi výše, na kterých se od sebe rostliny ve svých vlastnostech navzájem značně liší a navíc na nich může hrát roli i fylogenetický konzervatismus herbivorního hmyzu.

Oproti mému původnímu předpokladu (hypotéza II) měla chemická podobnost rostlin jen marginálně signifikantní vliv na podobnost společenstev hmyzu. V samostatných analýzách se vliv zastoupení sekundárních metabolitů projevil u motýlů a brouků, naopak na podobnost společenstev pilatek chemické složení hostitelských rostlin žádný vliv nemělo. Důvodem, proč v případě pilatek, a proto i kompletních společenstev hmyzu, neměla chemická podobnost vliv, je pravděpodobně vysoká specializovanost pilatek. Zatímco jednotlivé druhy vrb sdílí část druhů brouků a motýlů, společenstva pilatek jsou na různých druzích vrb zcela odlišná a jen minimálně se překrývají. Pilatky se

proto zdají být specializované spíše na jednotlivé druhy stromů, než na skupiny druhů s podobným chemickým složením, jak je tomu v případě brouků a motýlů.

Kondenzované taniny, flavonoidy a salicyláty se výrazně liší svým výskytem u různých rostlin. Zatímco kondenzované taniny a flavonoidy jsou široce rozšířené sekundární metabolity, výskyt salicylátů je omezen na čeleď Salicaceae. Nеспециализovaný hmyz, který se vyskytuje i na jiných čeledích rostlin, je proto na salicyláty díky jejich omezenému rozšíření pravděpodobně přizpůsoben méně než na kondenzované taniny a flavonoidy a reaguje na ně citlivěji. Přestože tedy všechny zkoumané obranné vlastnosti hostitelských rostlin měly dopad na složení společenstev herbivorního hmyzu, největší podíl variability v jejich složení vysvětlil, v souladu hypotézou IV, obsah salicylátů. Salicyláty, sloučeniny unikátní pro vrby a topoly, tak byly z tohoto hlediska lepším prediktorem struktury společenstev hmyzu než mezi rostlinami široce rozšířené taniny a flavonoidy.

Vlastností hostitelských rostlin, která vysvětlila druhý největší podíl variability ve složení společenstev listy okusujícího herbivorního hmyzu, byla specific leaf area. Ta je velmi dobře korelována s tuhostí listů (Groom *et al.*, 1999; Witkowski *et al.*, 1991). Tuhost listů je pro herbivory limitujícím faktorem, na který se lze jen poměrně obtížně přizpůsobit, a většinou proto ovlivňuje jak specializovaný tak nспециализovaný hmyz (Agrawal *et al.*, 2006; Bernays, 1986; Murakami *et al.*, 2005; Pearse, 2011). Poměrně velký dopad specific leaf area na složení společenstev hmyzu se proto dá nejspíše vysvětlit tím, že vysoká tuhost listů působí narozdíl od ostatních mnou zkoumaných vlastností vrb negativně na všechny zkoumané druhy hmyzu.

Tradičně byly v rámci taninů za nejučinnější proti herbivorům považovány kondenzované taniny díky jejich hypotetické schopnosti srážet bílkoviny (Feeny, 1976). Ta ale nebyla v prostředí hmyzího střeva prokázána (Appel, 1993; Martin *et al.*, 1987). Řada prací proto předpokládá, že z hlediska obrany před herbivory mají kvůli své oxidativní aktivitě daleko větší význam jiné skupiny taninů (Ahmad, 1992; Appel, 1993; Barbehenn *et al.*, 2009; Barbehenn *et al.*, 1994; Summers *et al.*, 1994). Mé výsledky nicméně potvrzují, že kondenzované taniny na složení společenstev hmyzu mají vliv a přinejmenším lze předpokládat, že rostlinám slouží jako nestrávitelná hmota, která snižuje schopnost hmyzu efektivně využívat potravu a zpomaluje jeho růst (Barbehenn *et al.*, 2009; Grayer *et al.*, 1992; Kause *et al.*, 2001; Kopper *et al.*, 2002; Pearse, 2011).

Jak se dalo předpokládat, od všech vrb se nápadně odlišovala společenstva herbivorního hmyzu na topolu osice. Kromě společenstev na osice se od všech ostatních

druhů rodu *Salix* nápadně lišila i společenstva hmyzu na *S. purpurea* a *S. rosmarinifolia*, které jsou charakterizovány mimořádně vysokým obsahem salicylátů. *Salix rosmarinifolia* navíc jako jedinná ze zkoumaných vrb dosahuje pouze bylinného vzrůstu, přičemž růstová forma je důležitým faktorem ovlivňujícím podobu společenstev herbivorního hmyzu (da Costa *et al.*, 2011; Lavandero *et al.*, 2009; Lawton, 1983).

4.6. Vliv salicylátů

Salicyláty jsou skupinou sekundárních metabolitů unikátních pro čeleď Salicaceae. Lze proto předpokládat, že v průběhu své evoluce mělo příležitost se na ně přizpůsobit jen relativně malé množství druhů herbivorů. Podle této teorie by se proto na vrbách, které salicyláty obsahují, měla vyskytovat méně rozmanitá společenstva hmyzu. Výsledky studií na toto téma si ale navzájem odporují (Rowell-Rahier, 1984; Topp *et al.*, 2002). Důvodem rozporů je pravděpodobně použití nevhodné metodiky. Autoři obou studií totiž převzali informace o obsahu sekundárních metabolitů z literatury. Jednotlivé populace vrb se ale v rámci svého areálu rozšíření mohou svým chemickým složením značně lišit (Julkunen-Tiitto, ústní sdělení) a využití informací o obsahu salicylátů pocházejících z literárních údajů je proto značně problematické.

Výsledky mé práce podporují existenci závislosti diverzity společenstev herbivorního hmyzu na obsahu salicylátů (hypotéza V), ačkoliv v analýze za použití independent contrasts se tento trend ukázal být pouze marginálně signifikantní. Důvodem, proč nebyla tato závislost více průkazná, je patrně nízká diverzita společenstev, která hostila *S. pentandra* a naopak nápadně vysoká diverzita hmyzu na *S. fragilis*. Vysvětlení těchto odlišností v diverzitě hmyzu může spočívat v rozšíření obou druhů vrb. *Salix fragilis* patří v ČR k jedněm z nejhojněji se vyskytujících dřevin, naopak *Salix pentandra* se v okolí Českých Budějovic vyskytuje poměrně vzácně a roztroušeně. Vysoká abundance hostitelské rostliny přitom může mít pozitivní dopad na diverzitu hmyzu. (Brandle & Brandl, 2001; Kelly & Southwood, 1999; Leather, 1991). Na *S. pentandra* byl vzhledem k jejímu řídkému výskytu navíc hmyz sbírán pouze na jediné lokalitě. To zřejmě vedlo k podhodnocení celkové diverzity herbivorních společenstev a *S. pentandra* proto hostila nejchudší společenstva herbivorů, což neodpovídá jejímu středně vysokému obsahu salicylátů.

V souladu s hypotézou VI se celková abundance herbivorního hmyzu s obsahem salicylátů neměnila. Důvod spočívá patrně v tom, že ačkoliv se na vrbách s vyšším obsahem salicylátů vyskytuje méně druhů hmyzu, mohou tito specialisté díky absenci konkurence ze strany generalistů dosahovat vyšších populačních hustot. Celková abundance hmyzu se proto nezmění. Tento závěr může poskytnout vodítko k tomu, proč u některých druhů vrb došlo k druhotné ztrátě salicylátů. Kvalitativní obrana založená na produkci sekundárních metabolitů je pro rostliny energeticky poměrně náročná (Schoonhoven *et al.*, 2005). Vzhledem k tomu, že salicyláty nemají na celkovou abundanci hmyzu a tím pádem pravděpodobně i na poškození hostitelských rostlin vliv, lze předpokládat, že se některým vrbám vyplatí do jejich produkce přestat investovat a ušetřenou energii vynaložit například na kompenzaci ztrát způsobených herbivory.

Na vrbách, v jejichž pletivech jsou salicyláty obsaženy, docházelo během sezóny k nápadnému poklesu abundance herbivorního hmyzu. Oproti tomu na ostatních stromech zůstával počet jedinců v podstatě konstantní. Během sezóny narůstá obsah taninů a zvyšuje se tuhost listů. Obsah salicylátů sice v průběhu sezóny klesá, ale u většiny druhů, které tyto sekundární metabolity obsahují, zůstává stále relativně vysoký. Nápadné snížení abundance hmyzu během sezóny proto patrně souvisí se změnou kvality potravy a kombinací nepříznivých faktorů ovlivňujících hmyz na vrbách bráněných salicyláty. Výsledné populační hustoty herbivorního hmyzu jsou však v podstatě totožné s vrbami, které salicyláty postrádají.

5. Závěr

Případy koevoluce rostlin a herbivorního hmyzu byly dosud zaznamenány jen velmi vzácně. I mé výsledky potvrzují, že hmyz často využívá hostitelské rostliny s podobným chemickým složením, místo aby sledoval jejich fylogenetické linie. Ze zkoumaných vlastností rostlin tak měly na podobu společenstev hmyzu největší dopad sekundární metabolity, salicyláty. Ty jsou pro čeleď Salicaceae unikátní a vrbám poskytují dobrou ochranu před generalisty, kteří neměli během své evoluce příležitost se na ně přizpůsobit. Naopak některé druhy specializovaného hmyzu se na ně dokázaly velmi dobře adaptovat a dokonce je využívat ve svůj prospěch. Ačkoliv mají salicyláty velký dopad na diverzitu a složení společenstev herbivorního hmyzu na vrbách, celková abundance hmyzu se s jejich obsahem obsahem nemění. Salicyláty tak již nepředstavují pro vrby evoluční výhodu a vrbám se proto patrně nevyplatí do tvorby salicylátů investovat energii, což vedlo k sekundární ztrátě těchto metabolitů v rámci některých linií vrb.

Díky analýze obsahu sekundárních metabolitů a vybraných morfologických vlastností listů hostitelských rostlin jsem prokázal, že jednotlivé obranné vlastnosti vrb spolu nejsou korelované. To spolu s výsledky některých novějších prací zpochybňuje platnost teorie "Univariate trade-off", predikující negativní závislost mezi jednotlivými obrannými mechanismy rostlin před herbivorním hmyzem.

Vrby a jejich společenstva herbivorního hmyzu představují mezistupeň mezi silně specializovanými společenstvy na Burseraceae či Asclepiadaceae a společenstvy na dubech, zahrnujícími především generalisty. Oproti těmto systémům se na vrbách vyskytuje široké spektrum různě specializovaných herbivorů a zároveň obsahují několik skupin sekundárních metabolitů s odlišnou funkcí. Studium vrb proto umožňuje testovat řadu hypotéz o vztahu rostlin a herbivorního hmyzu. Tato práce díky úspěšné rekonstrukci fylogeneze hostitelských rostlin a analýze obsahu sekundárních metabolitů pokládá základ pro další studium herbivorů na Salicaceae, který umožní do analýz zahrnout další potenciálně velmi důležité proměnné, jako je obsah dusíku, nebo i jiné guildy herbivorního hmyzu.

6. Použitá literatura

- Agrawal, A.A. (2005) Natural selection on common milkweed (*Asclepias syriaca*) by a community of specialized insect herbivores. *Evolutionary Ecology Research*, **7**, 651-667.
- Agrawal, A.A. (2007) Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology & Evolution*, **22**, 103-109.
- Agrawal, A.A. & Fishbein, M. (2006) Plant defense syndromes. *Ecology*, **87**, S132-S149.
- Agrawal, A.A., Lajeunesse, M.J., & Fishbein, M. (2008) Evolution of latex and its constituent defensive chemistry in milkweeds (*Asclepias*): a phylogenetic test of plant defense escalation. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **128**, 126-138.
- Ahmad, S. (1992) Biochemical defense of prooxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochemical Systematics and Ecology*, **20**, 269-296.
- Appel, H.M. (1993) Phenolics in ecological interactions - the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology*, **19**, 1521-1552.
- Armbruster, W.S., Howard, J.J., Clausen, T.P., Debevec, E.M., Loquvam, J.C., Matsuki, M., Cerendolo, B., & Andel, F. (1997) Do biochemical exaptations link evolution of plant defense and pollination systems? Historical hypotheses and experimental tests with *Dalechampia* vines. *American Naturalist*, **149**, 461-484.
- Ayres, M.P., Clausen, T.P., MacLean, S.F., Redman, A.M., & Reichardt, P.B. (1997) Diversity of structure and antiherbivore activity in condensed tannins. *Ecology*, **78**, 1696-1712.
- 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.
- Barbehenn, R., Weir, Q., & Salminen, J.P. (2008) Oxidation of ingested phenolics in the tree-feeding caterpillar *Orgyia leucostigma* depends on foliar chemical composition. *Journal of Chemical Ecology*, **34**, 748-756.
- Barbehenn, R.V. & Constabel, C.P. (2011) Tannins in plant-herbivore interactions. *Phytochemistry*, **72**, 1551-1565.
- Barbehenn, R.V., Jaros, A., Lee, G., Mozola, C., Weir, Q., & Salminen, J.P. (2009) Tree resistance to *Lymantria dispar* caterpillars: importance and limitations of foliar tannin composition. *Oecologia*, **159**, 777-788.
- Barbehenn, R.V. & Martin, M.M. (1994) Tannin sensitivity in larvae of *Malacosoma disstria* (Lepidoptera) - roles of the peritrophic envelope and midgut oxidation. *Journal of Chemical Ecology*, **20**, 1985-2001.
- Barber, N.A. & Marquis, R.J. (2011) Leaf quality, predators, and stochastic processes in the assembly of a diverse herbivore community. *Ecology*, **92**, 699-708.
- 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. (1998) The value of being a resource specialist: Behavioral support for a neural hypothesis. *American Naturalist*, **151**, 451-464.
- Bernays, E.A., Chamberlain, D.J., & Leather, E.M. (1981) Tolerance of acridids to ingested condensed tannin. *Journal of Chemical Ecology*, **7**, 247-256.
- Bowers, M.D. (1983) The role of iridoid glycosides in host-plant specificity of checkerspot butterflies. *Journal of Chemical Ecology*, **9**, 475-493.
- Brandle, M. & Brandl, R. (2001) Species richness of insects and mites on trees: expanding Southwood. *Journal of Animal Ecology*, **70**, 491-504.
- Bryant, J.P., Reichardt, P.B., Clausen, T.P., & Werner, R.A. (1993) Effects of mineral-nutrition on delayed inducible resistance in Alaska paper birch. *Ecology*, **74**, 2072-2084.
- 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.
- 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**.
- Chen, J.H., Sun, H., Wen, J., & Yang, Y.P. (2010) Molecular phylogeny of *Salix* L. (Salicaceae) inferred from three chloroplast datasets and its systematic implications. *Taxon*, **59**, 29-37.
- Cheng, D.D., Vrieling, K., & Klinkhamer, P.G.L. (2011) The effect of hybridization on secondary metabolites and herbivore resistance: implications for the evolution of chemical diversity in plants. *Phytochemistry Reviews*, **10**, 107-117.
- 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.
- Cipollini, D., Stevenson, R., Enright, S., Eyles, A., & Bonello, P. (2008) Phenolic metabolites in leaves of the invasive shrub, *Lonicera maackii*, and their potential phytotoxic and anti-herbivore effects. *Journal of Chemical Ecology*, **34**, 144-152.
- Čížek, P. & Doguet, S. (2008) *Klíč k určování dřepčků (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae) Česka a Slovenska* Městské muzeum Nové Město nad Metují, Nové Město nad Metují.
- 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.
- Cornelissen, T., Fernandes, G.W., & Coelho, M.S. (2011) Induced responses in the neotropical shrub *Bauhinia brevipes* Vogel: does early season herbivory function as cue to plant resistance? *Arthropod-Plant Interactions*, **5**, 245-253.
- 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.
- Crockett, S.L. & Boeve, J.L. (2011) Flavonoid glycosides and naphthodianthrones in the sawfly *Tenthredo zonula* and its host-plants, *Hypericum perforatum* and *H. hirsutum*. *Journal of Chemical Ecology*, **37**, 943-952.

- Cronn, R.C., Small, R.L., Haselkorn, T., & Wendel, J.F. (2002) Rapid diversification of the cotton genus (*Gossypium*: Malvaceae) revealed by analysis of sixteen nuclear and chloroplast genes. *American Journal of Botany*, **89**, 707-725.
- da Costa, F.V., Neves, F.D., Silva, J.D., & Fagundes, M. (2011) Relationship between plant development, tannin concentration and insects associated with *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *Arthropod-Plant Interactions*, **5**, 9-18.
- 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.
- Donaldson, J.R. & Lindroth, R.L. (2004) Cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) performance in relation to variable phytochemistry in juvenile aspen (*Populus tremuloides* Michx.). *Environmental Entomology*, **33**, 1505-1511.
- Ehrlich, P.R. & Raven, P.H. (1964) Butterflies And Plants - A Study In Coevolution. *Evolution*, **18**, 586-608.
- Erhard, D., Pohnert, G., & Gross, E.M. (2007) Chemical defense in *Elodea nuttallii* reduces feeding and growth of aquatic herbivorous Lepidoptera. *Journal of Chemical Ecology*, **33**, 1646-1661.
- Farrell, B.D., Dussourd, D.E., & Mitter, C. (1991) Escalation of plant defense - do latex and resin canals spur plant diversification. *American Naturalist*, **138**, 881-900.
- Farrell, B.D. & 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.
- Forkner, R.E., Marquis, R.J., & Lill, J.T. (2004) Feeny revisited: condensed tannins as anti-herbivore defences in leaf-chewing herbivore communities of *Quercus*. *Ecological Entomology*, **29**, 174-187.
- Fritz, R.S., Hochwender, C.G., Brunsfeld, 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., & Brunsfeld, 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.
- Futuyma, D.J. & Agrawal, A.A. (2009) Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 18054-18061.
- Grayer, R.J., Kimmins, F.M., Padgham, D.E., Harborne, J.B., & Rao, D.V.R. (1992) Condensed tannin levels and resistance of groundnuts (*Arachis hypogaea*) against *Aphis craccivora*. *Phytochemistry*, **31**, 3795-3800.

- Groom, P.K. & Lamont, B.B. (1999) Which common indices of sclerophylly best reflect differences in leaf structure? *Ecoscience*, **6**, 471-474.
- Hamzeh, M. & Dayanandan, S. (2004) Phylogeny of *Populus* (Salicaceae) based on nucleotide sequences of chloroplast TRNT-TRNF region and nuclear rDNA. *American Journal of Botany*, **91**, 1398-1408.
- Harborne, J.B. & Williams, C.A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**, 481-504.
- 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.
- 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.
- Javorek, V. (1947) *Klíč k určování brouků ČSR* R. Promberger, Olomouc.
- Jermey, 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.
- 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.
- Kelly, C.K. & Southwood, T.R.E. (1999) Species richness and resource availability: A phylogenetic analysis of insects associated with trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 8013-8016.
- Kobayashi, S., Asai, T., Fujimoto, Y., & Kohshima, S. (2008) Anti-herbivore structures of *Paulownia tomentosa*: Morphology, distribution, chemical constituents and changes during shoot and leaf development. *Annals of Botany*, **101**, 1035-1047.
- 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.
- Kolehmainen, J., Roininen, H., Julkunen-Tiitto, R., & Tahvanainen, J. (1994) Importance of phenolic glucosides in host selection of shoot galling sawfly, *Euura amerinae*, on *Salix pentandra*. *Journal of Chemical Ecology*, **20**, 2455-2466.
- 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.
- Kopper, B.J., Jakobi, V.N., Osier, T.L., & Lindroth, R.L. (2002) Effects of paper birch condensed tannin on whitemarked tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae) performance. *Environmental Entomology*, **31**, 10-14.
- Labandeira, C.C. (1998) Early history of arthropod and vascular plant associations. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **26**, 329-377.

- Lahtinen, M., Kapari, L., Haukioja, E., & Pihlaja, K. (2006) Effects of increased content of leaf surface flavonoids on the performance of mountain birch feeding sawflies vary for early and late season species. *Chemoecology*, **16**, 159-167.
- 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.
- Lenton, T.M., Crouch, M., Johnson, M., Pires, N., & Dolan, L. (2012) First plants cooled the Ordovician. *Nature Geoscience*, **5**, 86-89.
- 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.
- Liu, Z.G., Cai, Y.L., Fang, Y., Jing, J., & Li, K. (2010) Induced response in *Schima superba*: Effects of early-season herbivory on leaf traits and subsequent insect attack. *African Journal Of Biotechnology*, **9**, 8731-8738.
- Macek, J., Dvořák, J., LTraxler, L., & Červenka, V. (2007) *Noční motýli I*. Academia, Praha.
- Macek, J., Dvořák, J., LTraxler, L., & Červenka, V. (2008) *Noční motýli II*. Academia, Praha.
- Marquis, R.J. & Lill, J.T. (2010) Impact of plant architecture versus leaf quality on attack by leaf-tying caterpillars on five oak species. *Oecologia*, **163**, 203-213.
- Marquis, R.J., Lill, J.T., & Piccinni, A. (2002) Effect of plant architecture on colonization and damage by leaf-tying caterpillars of *Quercus alba*. *Oikos*, **99**, 531-537.
- Martin, J.S., Martin, M.M., & Bernays, E.A. (1987) Failure of tannic acid to inhibit digestion or reduce digestibility of plant protein in gut fluids of insect herbivores - Implications for theories of plant defense. *Journal of Chemical Ecology*, **13**, 605-621.
- 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.
- 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.
- 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.
- Neuvonen, S. & Niemela, P. (1983) Species richness and faunal similarity of arboreal insect herbivores. *Oikos*, **40**, 452-459.
- 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.

- Novotny, V., Miller, S.E., Leps, J., Basset, Y., Bito, D., Janda, M., Hulcr, J., Damas, K., & Weiblen, G.D. (2004) No tree an island: the plant-caterpillar food web of a secondary rain forest in New Guinea. *Ecology Letters*, **7**, 1090-1100.
- 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.
- 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., & Daloz, 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.
- Pearse, I.S. (2011) The role of leaf defensive traits in oaks on the preference and performance of a polyphagous herbivore, *Orgyia vetusta*. *Ecological Entomology*, **36**, 635-642.
- Pearse, I.S. & Hipp, A.L. (2009) Phylogenetic and trait similarity to a native species predict herbivory on non-native oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 18097-18102.
- 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.
- Rasmann, S. & Agrawal, A.A. (2011) Latitudinal patterns in plant defense: evolution of cardenolides, their toxicity and induction following herbivory. *Ecology Letters*, **14**, 476-483.
- Rasmann, S., Johnson, M.D., & Agrawal, A.A. (2009) Induced responses to herbivory and jasmonate in three milkweed species. *Journal of Chemical Ecology*, **35**, 1326-1334.
- Raupp, M.J. (1985) Effects of leaf toughness on mandibular wear of the leaf beetle, *Plagioderma versicolora*. *Ecological Entomology*, **10**, 73-79.
- Rehr, S.S., Feeny, P.P., & Janzen, D.H. (1973) Chemical Defence In Central-American Non-Ant-Acacias. *Journal of Animal Ecology*, **42**, 405-416.
- Renwick, J.A.A. (2002) The chemical world of crucivores: lures, treats and traps. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **104**, 35-42.
- 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) Antixenosis of smooth leaf cotton to the ovipositional response of tobacco budworm. *Crop Science*, **20**, 646-649.

- Roininen, H., Price, P.W., Julkunen-Tiitto, R., Tahvanainen, J., & Ikonen, A. (1999) Oviposition stimulant for a gall-inducing sawfly, *Euura lasiolepis*, on willow is a phenolic glucoside. *Journal of Chemical Ecology*, **25**, 943-953.
- Roininen, H. & Tahvanainen, J. (1989) Host selection and larval performance of two 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.
- Rossiter, M., Schultz, J.C., & Baldwin, I.T. (1988) Relationships among defoliation, red oak phenolics, and gypsy moth growth and reproduction. *Ecology*, **69**, 267-277.
- 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.
- Rowell-Rahier, M. & Pasteels, J.M. (1986) Economics of chemical defense in Chrysomelinae. *Journal of Chemical Ecology*, **12**, 1189-1203.
- Rudgers, J.A., Strauss, S.Y., & Wendel, J.E. (2004) Trade-offs among anti-herbivore resistance traits: Insights from Gossypieae (malvaceae). *American Journal of Botany*, **91**, 871-880.
- Ruuhola, T.M., Sipura, M., Nousiainen, O., & Tahvanainen, J. (2001) Systemic induction of salicylates in *Salix myrsinifolia* (Salisb.). *Annals of Botany*, **88**, 483-497.
- Salminen, J.P. & Karonen, M. (2011) Chemical ecology of tannins and other phenolics: we need a change in approach. *Functional Ecology*, **25**, 325-338.
- Salminen, J.P., Karonen, M., & Sinkkonen, J. (2011) Chemical ecology of tannins: Recent developments in tannin chemistry reveal new structures and structure-activity patterns. *Chemistry-A European Journal*, **17**, 2806-2816.
- Salminen, J.P., Lahtinen, M., Lempa, K., Kapari, L., Haukioja, E., & Pihlaja, K. (2004) Metabolic modifications of birch leaf phenolics by an herbivorous insect: Detoxification of flavonoid aglycones via glycosylation. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences*, **59**, 437-444.
- Salminen, J.P., Roslin, T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Pihlaja, K., & Pulkkinen, P. (2004) Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *Journal of Chemical Ecology*, **30**, 1693-1711.
- Savage, J.A. (2010) *An ecological and evolutionary perspective on functional diversity in the genus Salix*. Phd thesis., University of Minnesota, Minneapolis.
- Schoonhoven, L.M., van Loon, J.J.A., & Dicke, M. (2005) *Insect-plant biology* Oxford University Press, New York.
- Selosse, M.A., Bauer, R., & Moyersoen, B. (2002) Basal hymenomycetes belonging to the Sebacinaceae are ectomycorrhizal on temperate deciduous trees. *New Phytologist*, **155**, 183-195.
- Simmonds, M.S.J. (2001) Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry*, **56**, 245-252.
- Simmonds, M.S.J. (2003) Flavonoid-insect interactions: recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*, **64**, 21-30.
- Skvortsov, A.K. (1968) *Willows of the USSR: a taxonomic and geographic revision* Nauka, Moscow.
- Smreczyński, S. (1966) *Klucze do oznaczania owadów polski. XIX: Chrząszcze - Coleoptera. Zeszyt 98 b, Ryjkowce - Curculionidae, podrodziny Otiorhynchinae, Brachyderinae* Państwowe wydawnictwo naukowe, Warszawa.

- Smreczyński, S. (1972) *Klucze do oznaczania owadów polski. XIX: Chrząszcze - 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: Chrząszcze - 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.
- Stemans, P., Le Herisse, A., Melvin, J., Miller, M.A., Paris, F., Verniers, J., & Wellman, C.H. (2009) Origin and radiation of the earliest vascular land plants. *Science*, **324**, 353-353.
- Summers, C.B. & Felton, G.W. (1994) Prooxidant effects of phenolic acids on the generalist herbivore *Helicoverpa zea* (Lepidoptera, Noctuidae) - Potential mode of action for phenolic compounds in plant anti-herbivore chemistry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **24**, 943-953.
- Swain, T. & Hillis, W.E. (1959) The phenolic constituents of *Prunus domestica*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **10**, 63-68.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., & Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105-1109.
- Tahvanainen, J., Julkunen-Tiitto, R., & Kettunen, J. (1985) Phenolic glycosides govern the food selection pattern of willow feeding leaf beetles. *Oecologia*, **67**, 52-56.
- Thompson, J.N. (1994) *The Coevolutionary Process* The University of Chicago Press.
- Topp, W., Kulfan, J., Zach, P., & Nicolini, F. (2002) Beetle assemblages on willow trees: do phenolic glycosides matter? *Diversity and Distributions*, **8**, 85-106.
- Treutter, D. (2006) Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, **4**, 147-157.
- Van Lenteren, J.C., Hua, L.Z., Kamerman, J.W., & Xu, R.M. (1995) The parasite-host relationship between *Encarsia formosa* (Hymenoptera, Aphelinidae) and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera, Aleyrodidae). *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift fur Angewandte Entomologie*, **119**, 553-559.
- Vihakas, M.A., Kapari, L., & Salminen, J.P. (2010) New types of flavonol oligoglycosides accumulate in the hemolymph of birch-feeding sawfly larvae. *Journal of Chemical Ecology*, **36**, 864-872.
- Volf, M. (2010) *Struktura společenstev herbivorního hmyzu externě žeroucího na vrbách. Bakalářská práce.*, University of South Bohemia, České Budějovice.
- 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.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., & Taylor, J.W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual* (eds N. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky & T. White), pp. 315-322. Academic Press, New York.

- Witkowski, E.T.F. & Lamont, B.B. (1991) Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia*, **88**, 486-493.
- Zinovjev, 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.
- Zvereva, E.L., Kruglova, O.Y., & Kozlov, M.V. (2010) Drivers of host plant shifts in the leaf beetle *Chrysomela lapponica*: natural enemies or competition? *Ecological Entomology*, **35**, 611-622.

Příloha 1. Soupis zjištěných druhů hmyzu

| | <i>S. alba x fragilis</i> | <i>S. aurita</i> | <i>S. caprea</i> | <i>S. cinerea</i> | <i>S. fragilis</i> | <i>S. pentandra</i> | <i>S. purpurea</i> | <i>S. rosmarinifolia</i> | <i>S. viminalis</i> | <i>S. viminalis x purpurea</i> | <i>P. tremula</i> |
|--|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| Larvy brouků | | | | | | | | | | | |
| <i>Chrysomela vigintipunctata</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Lochmaea capreae</i> | 3 | 29 | 47 | 65 | 1 | 0 | 0 | 642 | 188 | 22 | 10 |
| <i>Phratora tibialis</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 146 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Phratora vitellinae</i> | 84 | 2 | 6 | 0 | 523 | 0 | 48 | 97 | 68 | 107 | 12 |
| <i>Plagiodera versicolora</i> | 61 | 4 | 2 | 1 | 142 | 10 | 3 | 1 | 34 | 205 | 0 |
| Imága brouků | | | | | | | | | | | |
| <i>Agelastica alni</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 5 | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| <i>Anaesthetis testacea</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| <i>Archarius crux</i> | 1 | 13 | 5 | 1 | 20 | 0 | 6 | 3 | 2 | 0 | 3 |
| <i>Archarius salicivorus</i> | 0 | 2 | 6 | 6 | 1 | 0 | 1 | 3 | 3 | 0 | 1 |
| <i>Byctiscus betulae</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Byctiscus populi</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| <i>Chrysomela populi</i> | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 16 |
| <i>Chrysomela tremula</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Chrysomela vigintipunctata</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Clytra laeviscula</i> | 9 | 3 | 10 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| <i>Crepidodera aurata</i> | 207 | 133 | 357 | 109 | 1433 | 21 | 190 | 162 | 220 | 249 | 111 |
| <i>Crepidodera aurea</i> | 31 | 47 | 36 | 12 | 8 | 2 | 1 | 19 | 6 | 99 | 344 |
| <i>Crepidodera fulvicornis</i> | 2 | 68 | 8 | 148 | 61 | 29 | 9 | 1 | 8 | 5 | 13 |
| <i>Cryptocephalus bipunctatus</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Cryptocephalus decemmaculatus</i> | 1 | 0 | 1 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 |
| <i>Cryptocephalus labiatus</i> | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Cryptocephalus ocellatus</i> | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Cryptocephalus pusillus</i> | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Cryptocephalus quinquepunctatus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Cryptorhynchus lapathi</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| <i>Dorytomus affinis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| <i>Dorytomus ictor</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Dorytomus melanoptalmus</i> | 5 | 3 | 5 | 1 | 11 | 0 | 16 | 1 | 2 | 9 | 1 |
| <i>Dorytomus rufatus</i> | 3 | 1 | 34 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 11 | 0 | 4 |
| <i>Dorytomus taeniatus</i> | 0 | 5 | 13 | 2 | 2 | 0 | 0 | 3 | 3 | 2 | 13 |
| <i>Dorytomus tortrix</i> | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Ellescus bipunctatus</i> | 0 | 5 | 2 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

| | <i>S. alba x fragilis</i> | <i>S. aurita</i> | <i>S. caprea</i> | <i>S. cinerea</i> | <i>S. fragilis</i> | <i>S. pentandra</i> | <i>S. purpurea</i> | <i>S. rosmarinifolia</i> | <i>S. viminalis</i> | <i>S. viminalis x purpurea</i> | <i>P. tremula</i> |
|--------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| <i>Elleucus scanius</i> | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 9 |
| <i>Galerucella lineola</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 | 1 | 53 | 0 |
| <i>Isochnus populicola</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Lochmaea capreae</i> | 3 | 13 | 47 | 9 | 1 | 0 | 0 | 408 | 43 | 17 | 10 |
| <i>Luperus flavipes</i> | 0 | 0 | 5 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| <i>Luperus longicornis</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Magdalis linearis</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Magdalis ruficornis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Oberea oculata</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Phratora laticollis</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Phratora vitelinae</i> | 2 | 2 | 6 | 0 | 437 | 0 | 47 | 97 | 3 | 107 | 9 |
| <i>Phratota tibialis</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 127 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Phyllobius arborator</i> | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Phyllobius argentatus</i> | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 16 |
| <i>Phyllobius oblongus</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Phyllobius pomaceus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Phyllobius pyri</i> | 8 | 5 | 4 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 | 56 |
| <i>Phyllobius scutellaris</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Phyllobius vespertinus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Phyllobius viridicollis</i> | 9 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 |
| <i>Phyllopertha horticola</i> | 0 | 2 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 8 | 2 | 2 | 2 |
| <i>Plagiodera versicolora</i> | 42 | 4 | 2 | 1 | 123 | 9 | 3 | 1 | 14 | 133 | 0 |
| <i>Polydrusus cervinus</i> | 11 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Polydrusus formosus</i> | 0 | 8 | 34 | 12 | 6 | 0 | 0 | 20 | 1 | 3 | 26 |
| <i>Polydrusus picus</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Polydrusus ruficornis</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Rhampus pulicarius</i> | 15 | 3 | 43 | 42 | 11 | 9 | 18 | 2 | 48 | 32 | 3 |
| <i>Smaragdina salicina</i> | 0 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Tachyerges decoratus</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 16 | 0 | 12 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Tachyerges salicis</i> | 0 | 3 | 1 | 3 | 7 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Tachyerges stigma</i> | 0 | 6 | 3 | 4 | 5 | 0 | 9 | 3 | 6 | 5 | 1 |
| <i>Temnocerus tomentosus</i> | 0 | 1 | 2 | 14 | 2 | 0 | 0 | 7 | 4 | 5 | 4 |
| <i>Tetrops praeustus</i> | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

| | <i>S. alba x fragilis</i> | <i>S. aurita</i> | <i>S. caprea</i> | <i>S. cinerea</i> | <i>S. fragilis</i> | <i>S. pentandra</i> | <i>S. purpurea</i> | <i>S. rosmarinifolia</i> | <i>S. viminalis</i> | <i>S. viminalis x purpurea</i> | <i>P. tremula</i> |
|----------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| Motýli | | | | | | | | | | | |
| <i>Acleris hastiana</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Acronicta aceris</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Acronicta alni</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Acronicta auricoma</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Acronicta megacephala</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| <i>Acronicta psi</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Agonopterix conterminella</i> | 0 | 3 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Agonopterix ocellana</i> | 0 | 1 | 0 | 6 | 7 | 0 | 2 | 3 | 2 | 2 | 0 |
| <i>Agriopis aurantiaria</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Agriopis marginaria</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Agrochola lota</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 0 |
| <i>Alsophila aescularia</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amphipyra berbera</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Amphipyra perflua</i> | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Amphipyra pyramidea</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Anacamptis populella</i> | 0 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 20 |
| <i>Apatura iris</i> | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Apotomis capreana</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Archiearis notha</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Arctia caja</i> | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Bena prasina</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Biston betularius</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Biston stratarius</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Cabera exanthemata</i> | 6 | 21 | 5 | 27 | 1 | 1 | 3 | 11 | 8 | 5 | 9 |
| <i>Callimorpha dominula</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Celypha lacunana</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Clostera anachoreta</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Clostera curtula</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Clostera pigra</i> | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 0 | 18 | 1 | 0 | 5 |
| <i>Colobochyla salicalis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Colotois pennaria</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Conistra vaccinii</i> | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Cosmia trapezina</i> | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 3 |

| | <i>S. alba x fragilis</i> | <i>S. aurita</i> | <i>S. caprea</i> | <i>S. cinerea</i> | <i>S. fragilis</i> | <i>S. pentandra</i> | <i>S. purpurea</i> | <i>S. rosmarinifolia</i> | <i>S. viminalis</i> | <i>S. viminalis x purpurea</i> | <i>P. tremula</i> |
|-------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| <i>Cyclophora pendularia</i> | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Dasychira pudibunda</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Earias clorana</i> | 1 | 3 | 1 | 7 | 3 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Ectropis crepuscularia</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 |
| <i>Ematurga atomaria</i> | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Erannis defoliaria</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Eudia pavonia</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Eupithecia subfuscata</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Euproctis similis</i> | 0 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Eupsilia transversa</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Gelechia sororculella</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Gypsonoma dealbana</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Hemithea aestivaria</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Hydria undulata</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Hydriomena autumnalis</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Hydriomena furcata</i> | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Hypomecis punctinalis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Ipimorpha retusa</i> | 4 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| <i>Ipimorpha subtusa</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Laothoe populi</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| <i>Lithophane socia</i> | 4 | 0 | 5 | 1 | 5 | 5 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Lobophora halterata</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| <i>Lomaspilis marginata</i> | 13 | 8 | 6 | 15 | 9 | 1 | 7 | 1 | 18 | 1 | 8 |
| <i>Lymantria dispar</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Notodonta ziczac</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Operophtera brumata</i> | 59 | 9 | 18 | 46 | 10 | 10 | 10 | 2 | 60 | 5 | 2 |
| <i>Orgyia antiqua</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 |
| <i>Orthosia cerasi</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Orthosia cruda</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Orthosia gothica</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Orthosia incerta</i> | 5 | 1 | 0 | 1 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| <i>Orthosia munda</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Orthosia opima</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| <i>Orthosia populi</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |

| | <i>S. alba x fragilis</i> | <i>S. aurita</i> | <i>S. caprea</i> | <i>S. cinerea</i> | <i>S. fragilis</i> | <i>S. pentandra</i> | <i>S. purpurea</i> | <i>S. rosmarinifolia</i> | <i>S. viminalis</i> | <i>S. viminalis x purpurea</i> | <i>P. tremula</i> |
|------------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| <i>Pandemis heparana</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Parastichtis suspecta</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Phalera bucephala</i> | 0 | 0 | 1 | 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 |
| <i>Pheosia tremulae</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 |
| <i>Pseudosciaphila branderiana</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Pterapherapteryx sexalata</i> | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Pterostoma palpinum</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| <i>Ptilodon capucina</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Ptycholoma lecheanum</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Rhyparia purpurata</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Sciota hostilis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Scoliopteryx libatrix</i> | 4 | 5 | 1 | 4 | 1 | 0 | 7 | 4 | 5 | 3 | 0 |
| <i>Selenia tetralunaria</i> | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Semiothisa alternaria</i> | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Semiothisa notata</i> | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 5 | 0 | 9 | 0 | 0 |
| <i>Tethea or</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| <i>Trichopteryx carpinata</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pilatky | | | | | | | | | | | |
| <i>Allantus togatus</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus alpicola</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus fasciatus</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus humeralis</i> | 0 | 3 | 4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus humilis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus hystrio</i> | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus leucolaenus</i> | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus longisera</i> | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus longiserra</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus mimus</i> | 0 | 8 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus palipes</i> | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus puniceus</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus sp1</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus sp2</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus sp3</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | <i>S. alba x fragilis</i> | <i>S. aurita</i> | <i>S. caprea</i> | <i>S. cinerea</i> | <i>S. fragilis</i> | <i>S. pentandra</i> | <i>S. purpurea</i> | <i>S. rosmarinifolia</i> | <i>S. viminalis</i> | <i>S. viminalis x purpurea</i> | <i>P. tremula</i> |
|----------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| <i>Amauronematus</i> sp4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus</i> sp5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus</i> sp6 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus</i> sp7 | 0 | 1 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus viduatoides</i> | 0 | 8 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Amauronematus viduatus</i> | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 6 | 27 | 55 | 2 | 2 | 0 |
| <i>Amauronematus vittatus</i> | 4 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 6 | 0 | 0 |
| <i>Ametastegia perla</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Apocheima pilosaria</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Arge enodis</i> | 3 | 0 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| <i>Arge ustulata</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Empria immersa</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Nematus bergmanni</i> | 5 | 1 | 1 | 9 | 8 | 0 | 1 | 0 | 7 | 9 | 2 |
| <i>Nematus bipartitus</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Nematus hypoxanthus</i> | 0 | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 27 | 3 | 2 | 0 |
| <i>Nematus melanaspis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| <i>Nematus melanocephalus</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Nematus nigricornis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| <i>Nematus oligospilus</i> | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Nematus pavidus</i> | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Nematus respondens</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Nematus salicis</i> | 4 | 0 | 0 | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Nematus</i> sp1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Nematus</i> sp2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Nematus</i> sp3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Nematus</i> sp4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>Phyllocolpa alienata</i> | 0 | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Phyllocolpa leucapsis</i> | 0 | 0 | 0 | 70 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Phyllocolpa leucosticta</i> | 0 | 0 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Phyllocolpa oblita</i> | 8 | 1 | 0 | 0 | 18 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Phyllocolpa polita</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Phyllocolpa scotaspis</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| <i>Pristiphora confusa</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 |
| <i>Pristiphora lanifica</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | S. alba x fragilis | S. aurita | S. caprea | S. cinerea | S. fragilis | S. pentandra | S. purpurea | S. rosmarinifolia | S. viminalis | S. viminalis x purpurea | P. tremula |
|------------------------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| Pristiphora sp1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Pristiphora sp2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 0 |
| Pristiphora subopaca | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Rhogogaster chlorosoma | 0 | 0 | 1 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Tenthredo livida | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Tentredo fagi | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Trichiocampus grandis | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Příloha 2. Obsah zjištěných sekundárních metabolitů (µg/mg)

| | <i>S. alba x fragilis</i> | <i>S. aurita</i> | <i>S. caprea</i> | <i>S. cinerea</i> | <i>S. fragilis</i> | <i>S. pentandra</i> | <i>S. purpurea</i> | <i>S. rosmarinifolia</i> | <i>S. viminalis</i> | <i>S. viminalis x purpurea</i> | <i>P. tremula</i> |
|-------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| (+) catechin | 0 | 7.785047 | 0.584356 | 4.183575 | 0 | 0 | 1.370943 | 1.861199 | 2.838052 | 1.213702 | 1.34358 |
| 2`-O-acetylsalicin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5.603455 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| acetyl-salicortin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21.14434 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.227055 |
| ampelopsin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.369872 | 0 | 0 |
| ampelopsin derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.389998 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ampelopsin derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.140089 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| apigenin 5-glucoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.467149 | 0 | 0 | 0 |
| apigenin 7-glucoside | 0 | 0 | 0 | 0.313303 | 0 | 0 | 0.482671 | 0.342079 | 0.049796 | 0.349452 | 0 |
| apigenin derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.026114 | 0 | 0 | 0 |
| apigenin derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.077934 |
| apigenin derivative 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.152847 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| apigenin derivative 4 | 0 | 0 | 0 | 0.016468 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| apigenin derivative 5 | 0 | 0 | 0 | 0.00492 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| chlorogenic acid | 8.131711 | 2.604598 | 0 | 1.266261 | 8.861451 | 23.3613 | 0 | 0 | 0.736063 | 0 | 2.458962 |
| chlorogenic acid derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.180985 | 0 | 0 | 0 | 0.197032 | 0 | 0 |
| chlorogenic acid derivative 2 | 0.150052 | 0 | 0 | 0 | 0.132484 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| chlorogenic acid derivative 3 | 0 | 0 | 0 | 0.215486 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| chrysoeriol derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0.057059 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| chrysoeriol derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.047626 |
| chrysoeriol glycoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.454914 | 0 | 0 | 3.884002 | 0 |
| cinnamic acid derivative 1 | 0.134326 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| cinnamic acid derivative 2 | 0.018728 | 0 | 0 | 0 | 0.103756 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| cinnamic acid derivative 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.093565 |
| cinnamoyl acetyl salicortin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.340771 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| cinnamoyl salicylate 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.137492 | 0 | 0 | 0 |
| cinnamoyl salicylate 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.898184 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| cinnamoyl salicylate 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.456886 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| cinnamoyl salicylate 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.081381 | 0 | 0 | 0 |
| cinnamoyl salicortin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.61684 |
| cinnamoyl tremulacin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.079671 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| cinnamoyl tremuloidin | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.212323 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| dicoumaroyl flavonol | 0 | 0.009794 | 0.015599 | 0.103664 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| disalicortin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.349023 | 3.327267 | 0 | 0 | 0 |
| ditremulacin derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.039064 | 1.059405 | 0 | 0 | 0 |

| | <i>S. alba x fragilis</i> | <i>S. aurita</i> | <i>S. caprea</i> | <i>S. cinerea</i> | <i>S. fragilis</i> | <i>S. pentandra</i> | <i>S. purpurea</i> | <i>S. rosmarinifolia</i> | <i>S. viminalis</i> | <i>S. viminalis x purpurea</i> | <i>P. tremula</i> |
|-----------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| ditremulacin derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.137713 | 0.998686 | 0 | 0 | 0 |
| ditremulacin derivative 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.417017 | 0.223632 | 0 | 0 | 0 |
| ditremulacin derivative 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.240188 | 0 | 1.328597 | 2.08112 | 0 | 0 | 0 |
| eriodictyol 7-glucoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.443798 | 0 | 0 | 5.790387 | 0 |
| eriodictyol aglycon derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.218625 | 0 |
| eriodictyol aglycon derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.640166 | 0 |
| eriodictyol derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.751685 | 0 |
| eriodictyol derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.249038 | 0 |
| eriodictyol diglycoside 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.086058 | 0 | 0 | 1.503584 | 0 |
| eriodictyol diglycoside 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.601336 | 0 | 0 | 1.524363 | 0 |
| eriodictyol diglycoside 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.360992 | 0 |
| eriodictyol glycoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.483292 | 0 |
| flavonoid diglucoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.405409 |
| HCH acetyl salicortin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10.65788 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HCH salicortin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.60843 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HCH tremulacin derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.702448 | 0.50662 | 0 | 0 | 0 |
| HCH tremulacin derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.800521 | 0.537342 | 0 | 0 | 0 |
| hyperin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.028508 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.391061 |
| isorhamnetin aglycon derivative 1 | 0.103922 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| isorhamnetin aglycon derivative 2 | 0.702742 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| isorhamnetin derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.21242 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| isorhamnetin derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.784229 | 0.805775 | 0 |
| isorhamnetin derivative 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.909428 | 0 | 0.161521 |
| isorhamnetin derivative 4 | 0.473063 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| isorhamnetin glycoside 1 | 0.866179 | 0 | 0 | 0 | 1.548419 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| isorhamnetin glycoside 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.000741 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| isorhamnetin rhamnoside | 2.151659 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.633109 | 0 | 0 |
| kempferol 3-arabinoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.126387 | 0 | 0 | 0 | 0.063541 | 0 | 0 |
| kempferol 3-glucoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.064064 | 0.394886 | 0 | 0 | 0.108923 | 0 | 2.762715 |
| kempferol 3-rhamnoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.400879 | 0 |
| kempferol glycoside derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.508292 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| kempferol glycoside derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.231029 |
| kempferol glycoside derivative 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.111227 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| luteolin 5-glucoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.904592 | 0 | 0 | 7.116254 | 0 | 0 | 0 |
| luteolin 7-glucoside | 0 | 1.274918 | 0.307463 | 0.313303 | 0.116533 | 0 | 5.559204 | 5.562687 | 0 | 1.018135 | 0 |

| | <i>S. alba x fragilis</i> | <i>S. aurita</i> | <i>S. caprea</i> | <i>S. cinerea</i> | <i>S. fragilis</i> | <i>S. pentandra</i> | <i>S. purpurea</i> | <i>S. rosmarinifolia</i> | <i>S. viminalis</i> | <i>S. viminalis x purpurea</i> | <i>P. tremula</i> |
|------------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| luteolin aglycon derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.352631 | 0 |
| luteolin aglycon derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.35475 | 0 | 0 | 1.072227 | 0 |
| luteolin aglycon derivative 3 | 0 | 0.02228 | 0.00693 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| luteolin glycoside 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.034396 | 0 | 1.743107 | 0 | 0 | 0.718073 | 0 |
| luteolin glycoside 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.080147 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| luteolin glycoside 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.048441 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| luteolin glycoside 4 | 0 | 0.205065 | 0.114908 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| luteolin glycoside 5 | 0 | 0.355936 | 0.236972 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| luteolin glycoside 6 | 0 | 3.95077 | 1.950388 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| luteolin glycoside 7 | 0 | 6.963539 | 3.863875 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| luteolin glycoside 8 | 0 | 0.353909 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| luteoline glycoside 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.149867 | 0 | 0 | 0 |
| methyl-apienin derivative 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.106816 |
| methyl-apigenin derivative 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.43404 |
| methyl-apigenin derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.023753 |
| methyl-apigenin derivative 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.053543 |
| methyl-luteolin 5-glucoside | 0 | 1.37221 | 0.489122 | 2.379632 | 0 | 0 | 0 | 0.325207 | 0 | 0 | 0 |
| methyl-luteolin aglycon | 0 | 0.06393 | 0.322601 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| methyl-luteolin glycoside 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.082984 | 0 | 0.601474 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| methyl-luteolin glycoside 2 | 0 | 0.13008 | 0 | 0.07259 | 0.080147 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.229353 | 0 |
| methyl-luteolin glycoside 3 | 0 | 0 | 0.070581 | 0.005524 | 0 | 0 | 0.740275 | 1.272066 | 0 | 0.158278 | 0 |
| methyl-luteolin glycoside 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.446901 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| monocoumaroyl astragalin | 0 | 0.944335 | 1.160059 | 4.091571 | 0 | 0 | 0 | 0.158648 | 1.898546 | 0 | 0 |
| monocoumaroyl flavonol | 0 | 0 | 0.016003 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| myricetin 3-arabinoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.051491 | 0 | 0 |
| myricetin 3-galactoside | 0 | 0 | 0 | 0.196877 | 0 | 0.620637 | 0 | 0 | 0.644761 | 0 | 0 |
| myricetin 3-glucoside | 0 | 0 | 0.011175 | 0.00737 | 0 | 2.347844 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.340092 |
| myricetin glycoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.075057 | 0 | 0 |
| myricitrin | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.45708 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| naringenin 7-glucoside | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.501276 | 0 | 0 | 2.057926 | 0 |
| neochlorogenic acid | 9.405594 | 0.118674 | 0.373261 | 0.51494 | 3.066569 | 14.218 | 0 | 0.748495 | 0.266456 | 0 | 5.348575 |
| para-OH-cinnamic acid derivative 1 | 0.450833 | 0.220805 | 0.186878 | 0.304468 | 0.430965 | 1.540384 | 0 | 0.262864 | 0.357774 | 0 | 0.768818 |
| para-OH-cinnamic acid derivative 2 | 0.425248 | 0 | 0.266207 | 0 | 0.346753 | 0 | 0 | 0.298809 | 0.056055 | 0 | 0.387129 |
| para-OH-cinnamic acid derivative 3 | 0 | 0.003578 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.01516 |
| para-OH-cinnamic acid derivative 4 | 0 | 0 | 0.005693 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | <i>S. alba x fragilis</i> | <i>S. aurita</i> | <i>S. caprea</i> | <i>S. cinerea</i> | <i>S. fragilis</i> | <i>S. pentandra</i> | <i>S. purpurea</i> | <i>S. rosmarinifolia</i> | <i>S. viminalis</i> | <i>S. viminalis x purpurea</i> | <i>P. tremula</i> |
|--------------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| para-OH-cinnamic acid derivative 5 | 0 | 0 | 0.105035 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| para-OH-cinnamic acid derivative 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.034564 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| para-OH-cinnamic acid derivative 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.016738 |
| para-OH-cinnamic acid derivative 9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.12235 | 0 | 0 | 0 |
| para-OH-cinnamic acid glucoside | 0.266568 | 0.323295 | 0 | 0.044729 | 0.328085 | 0.680536 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| protocatechuic acid | 0 | 0.035744 | 0.037312 | 0.134342 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.077892 | 0 | 0 |
| quercetin 3-glucoside | 0.819526 | 2.310858 | 0.405889 | 1.066902 | 2.557529 | 7.096379 | 0.615478 | 0 | 2.27215 | 1.543409 | 11.8838 |
| quercetin 3-pyranoside/arabinoside 1 | 1.320522 | 0 | 0 | 0.013381 | 0 | 2.636563 | 0 | 0 | 0.425367 | 0 | 0.593553 |
| quercetin 3-pyranoside/arabinoside 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.029947 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| quercetin aglycon | 0.584101 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| quercetin derivative 1 | 0.160207 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| quercetin diglycoside 1 | 0 | 0.392937 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.193637 |
| quercetin diglycoside 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.904592 | 0 | 0 | 0 | 0.098597 | 0 | 0.998067 |
| quercetin diglycoside 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.136037 | 0 | 0 |
| quercetin diglycoside 4 | 0.39375 | 0.066405 | 0 | 0 | 0.492846 | 0 | 0 | 0 | 0.067454 | 0 | 0 |
| quercetin glycoside 1 | 0 | 0 | 0.051212 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| quercetin glycoside 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.055274 | 0 | 0 |
| quercetin glycoside 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.098885 | 0 | 0 |
| quercetin triglycoside 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.107775 | 0 | 0 |
| quercetin triglycoside 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.050297 | 0 | 0.351556 |
| quercetin triglycoside 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.311724 |
| quercitrin | 0.765112 | 0 | 0 | 0 | 0.221845 | 0.706901 | 0 | 0 | 1.60915 | 2.29635 | 0 |
| rhamnetin aglycon derivative | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.501174 | 0 |
| salicin | 0.679631 | 0 | 0 | 0 | 1.160746 | 3.231018 | 13.99938 | 15.04732 | 0 | 1.636478 | 2.84721 |
| salicortin | 0.001 | 0 | 0 | 0 | 3.468194 | 0 | 70.26478 | 88.09934 | 0 | 0 | 3.979732 |
| salicyl alcohol | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.089463 | 0 | 2.164967 | 3.762932 | 0 | 0 | 0 |
| salicyl alcohol diglycoside | 1.453179 | 0 | 0 | 0 | 2.386291 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| salipurposide | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.353714 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| tremulacin | 0.138069 | 0 | 0 | 0 | 10.33048 | 0 | 60.36083 | 47.42061 | 0 | 0 | 9.773002 |
| tremulacin derivative 1 | 0.001 | 0 | 0 | 0 | 0.960352 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| tremulacin derivative 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.034662 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| tremulacin derivative 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.595423 | 0.769449 | 1.298847 | 1.758285 | 0 | 0 | 0 |
| tremuloidin | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.599393 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| condensed tannins | 127.2598 | 196.7261 | 139.7653 | 160.4677 | 51.9109 | 192.1847 | 42.61745 | 134.299 | 138.5257 | 112.2698 | 37.89527 |

