

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Biogeografie a fylogeografie cirkumpolárních lučních motýlů

Bakalářská práce

Lenka Honzová

Školitel: RNDr. Zdeněk Faltýnek Fric, Ph.D., Entomologický ústav, BC CAS.

České Budějovice 2024

Honzová, L. Biogeografie a fylogeografie cirkumpolárních lučních motýlů. [Biogeography and phylogeography of circumpolar grassland butterflies. Bc. Thesis, in Czech.] 46 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

I have studied a biogeography and phylogeography of a circumpolar grassland butterfly *Boloria freija* and its closely related *Boloria natazhati*. Using Species Distribution Models, I reconstructed its potential distribution under present, past, and future climatic scenarios. Using mitochondrial COI marker, it is evident the Eurasian origin of the species and a single colonization to North America, happening around 1.3 million years ago. *B. natazhati* is according to the used marker conspecific with *B. freija*.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 11.4.2024

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala Zdeňkovi Faltýnkovi Fricovi za jeho trpělivost, podporu, velkou pomoc při práci na analýzách, za veškeré jeho rady a čas který mi věnoval. Z konzultace, věnovaný čas a podporu při laboratorních pracích bych ráda poděkovala Haně Konvičkové. Dále bych ráda poděkovala veškerým sběratelům mých vzorků (M. Česánek, D. Goshko, Y. Shevnin atd.). Můj dík patří také Museum of the North, Fairbanks, Alaska (Fulbright stipend to Z. F. Fric). V neposlední řadě bych ráda poděkovala Stanislavu Grillovi za podporu při práci s programem ArcGIS PRO. Velmi děkuji své rodině za podporu v průběhu studia.

Obsah

1 ÚVOD	1
1.1 Perleťovec <i>Boloria freija</i> (Thunberg, 1791)	1
1.2 Holarktická tundra	3
1.3 Důvody k využití COI (cytochrom oxidáza 1).....	3
2 CÍLE PRÁCE	4
3 METODIKA	5
3.1 Klimatické modely	5
3.2 Laboratorní práce.....	6
3.2.1 Sběr materiálu	6
3.2.2 Extrakce DNA.....	7
3.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR):.....	7
3.2.4 Gelová elektroforéza:.....	8
3.2.5 Příprava gelu:.....	9
3.2.6 Přečištění PCR produktů	9
3.3 Sangerovo sekvenování (Kapilární elektroforéza).....	10
3.4 Zpracování dat	11
3.5 BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure).....	13
3.6 Fylogenetická analýza.....	13
3.6.1 Haplotypové sítě	13
3.6.2 Fylogenetické stromy	13
4 VÝSLEDKY	15
4.1 BAPS	15
4.2 Klimatické modely	17
4.3 Haplotypové sítě.....	22
4.4 Fylogenetické stromy a kalibrace času.....	24
5 DISKUZE	25
5.1 Fylogeografická historie perleťovce <i>Boloria freija</i>	25
6 ZÁVĚR	27
7 LITERATURA	28
8 PŘÍLOHY	34

1 ÚVOD

1.1 Perleťovec *Boloria freija* (Thunberg, 1791)

Perleťovec *Boloria freija* patří do rodu *Boloria*, který zahrnuje 46 druhů ve třech podrodech (*Boloria*, *Procllossiana* a *Clossiana*) (Tuzov a Bozano 2006). Perleťovec *Boloria freija* (Obrázek 1.) je typickýmobyvatelem holarktické křovinaté tundry a lesotundry, ale i nejrůznějších trávníků podél cest a na podmáčených loukách. V jižněji položených oblastech je tento druh zastoupen reliktními populacemi, u kterých se předpokládá, že zde byly zachovány od poslední doby ledové v nadmořských výškách až 3000 m a na rašeliništích v lesní zóně (Scott, 1986; Koršunov, 2002; Lvovskij a Morgun, 2007). Ve vlhkých oblastech evropské střední tajgy létají dospělci 3-4 týdny, od poloviny května do konce června. Larvy se nalézají na ostružiníku morušce (*Rubus chamaemorus*) a na brusnici vlochyni (*Vaccinium uliginosum*) od poslední třetiny června. Do poloviny srpna nebo září dosáhnou čtvrtého instaru, přestanou se krmit a zahrabou se do vrstvy mechu, ve kterém přezimují. Po roztání sněhu larvy dokončí svůj vývoj a zakuklí se, obvykle na začátku května. Stádium kukly trvá až dva týdny (Marttila a kol., 1991; Tatarinov a Dolgin, 1999; Eliasson a kol., 2005).

Boloria freija je schopná přežít nízké teploty i díky genetickým výhodám. Jednou z nich je ta, že její hemolymfa nezamrzá, obsahuje totiž specifický protein, který je inhibován boronovými kyselinami (Feeney, 1991). Tento protein by mohl mít také antioxidační vlastnosti, jak naznačuje antioxidační aktivita *Borassus flabellifer*, tradiční léčivé rostliny (Talluri, 2017).

Ochrana druhu *Boloria freija* jakožto cirkumpolárního motýla je důležitá vzhledem ke globálnímu oteplování a očekávanému nárůstu teplot, jelikož povrchové teploty stoupají v oblastech o vysoké zeměpisné šířce rychleji, než kdekoliv jinde (Holland & Bitz, 2003). Podle současných predikcí se očekává, že povrchová teplota na Antarktidě se do roku 2100 zvýší průměrně o 10 °C (You a kol., 2021). Tyto změny teplot by mohly mít velké dopady na chladu přizpůsobené motýli, jelikož by díky ztrátě sněhové pokrývky mohli ztratit své zimoviště (Bintanja & Andry, 2017, McCrystall a kol., 2021, Danks, 2004, Thompson a kol., 2021, Zhu a kol., 2019). Problém pro chladu přizpůsobené motýli by mohl také nastat se ztrátou tzv. "chill days" které potřebují k svému vývoji a mohlo by docházet ke zpožděnému výskytu těchto druhů (Stålhandske a kol., 2017).

K překonání těchto podmínek budou ohrožené druhy nuceny k migraci do prostředí s příznivějšími podmínkami, nebo setrvání na původním stanovišti a přijetí rizika vysokých

populačních ztrát (Corlett & Westcott, 2013; Kellermann & van Heerwaarden, 2019). Na základě výzkumu z roku 2024 bylo zjištěno, že perleťovec *Boloria freija* v Americe prokázal průměrný pokles obsazenosti o 7,5 % na lokalitách středních zeměpisných šířek (Shirey a kol. 2024).

Perleťovec *Boloria freija* má značné množství poddruhů, které dokazují dlouhodobou izolaci jednotlivých horských skupin motýlů.

Mezi jednotlivé poddruhy řadíme *Boloria b. pallida* (Elwes, 1899) s populacemi rozšířenými na Altaji, Mongolském Altaji, Západních Sajanech (částečně), v JZ Tuvě, Jižním Changaje. Populace z Jižního Altaje a zřejmě i ze západního makrosvalu Mongolského Altaje se vyznačují sytějším načervenalým odstínem barvy pozadí.

Boloria f. calais Fruhstorfer 1922 s populacemi ve východních Sajanech, východní Tuvě; v západních Sajanech je nutné dodatečné potvrzení výskytu.

Boloria f. freija (Thunberg, 1791) s populacemi od severní Evropy po Ochotské moře, Magadan a Zabajkalí, ve východní části oblasti žije forma *jakutensis* s bazálně ztmavenými křídly u samic.

Boloria f. batchimeg Churkin & Yakovlev, 2024 s populacemi ve středním Mongolsku a v okolí Ulánbátaru.

Boloria f. antipody Churkin & Yakovlev, 2024 s populacemi ve východním Kazachstánu a na Saurském hřbetu (Churkin a kol. 2024).

Do zpracovávaných dat jsem zahrнула také perleťovce *Boloria natazhati* (Gibson, 1920), který se vyskytuje v Severní Americe. U tohoto konkrétního perleťovce dosud není známo, zda se jedná o druh sesterský, nebo není jen barevnou formou od *B. freija*.



Obrázek 1. *Boloria freija* (Nacré de l'orcette 2023)

1.2 Holarktická tundra

Holarktická tundra je biom, který se rozkládá v nejsevernějších částech Severní Ameriky, Evropy a Asie a vyznačuje se chladným a drsným podnebím. Tato rozsáhlá a odlehlá oblast je známá svými krátkými léty, dlouhými zimami a permafrostem – vrstvou trvale zmrzlé půdy, která se nachází pod povrchem (Vomáčka a kol. 2017).

Utváření tohoto regionu do dnešní podoby začalo již v období eocénu. Toto období bylo charakterizováno významnými geologickými a klimatickými změnami, které postupně vedly mimo jiné i k samotné kolizi tří tektonických desek (Eurasijská, Indická a Africká tektonická deska). Takové kolize jsou poměrně vzácné a může dojít ke vzniku různých geologických útvarů včetně hor, sopek nebo příkopů. V tomto případě došlo ke vzniku Himalájí. Utváření tohoto pohoří mělo nemalý vliv na území vznikající Eurasie. Velký dopad měl vznik srážkového stínu na velké části území Eurasie a tím umocnění její kontinentality (Ramstein a kol. 1997; Ruddiman & Kurzbach 1989). Současně se samotnými pohyby kontinentů docházelo ke změně velikosti moří. Původní prehistorické moře Tethys se důsledkem pohybů desek začalo zmenšovat a postupně se přeformovávat na dnešní Středozevní moře.

K ochlazování Země dochází již od období eocénu, nicméně vrcholem je až období pleistocénu, které umožnilo v dobách ledových ještě větší pokles teploty, rozšíření ledovce a s ním i permafrostu. To vše začalo začalo pohybem dnešního Australského kontinentu, který se oddělil od Antarktidy, což vedlo k izolování daného území a jeho dalšímu ochlazování. Tyto klimatické změny měly dopad na změnu habitatů a tím i na rozšíření živočišných druhů (Zhang a kol. 2000, Hewitt 2000, Malicky 2000, Zachos a kol. 2001, Williams a kol. 1998).

Holarktická tundra, která je klíčovým komponentem Arktického biomu prošla během času značnými změnami. Aktuálním problémem je úbytek arktických prvků v krajině spojený s globálním oteplováním a vlivem člověka. V zájmu zachování krajinných struktur a ochrany biotopů je kladen důraz na pochopení a řešení faktorů, které zapříčiňují změny v krajině (Vuorinen a kol. 2017, Huang a kol. 2004, Vomáčka a kol. 2017).

1.3 Důvody k využití COI (cytochrom oxidáza 1)

Část mitochondriálního genu COI (cytochrom oxidáza podjednotka I, občas označovaná jako COX1) je již dvě desetiletí používána jako univerzální nástroj pro identifikaci organismů, tzv. barcoding. Použití COI pro DNA barcoding pro identifikaci jednotlivých druhů je výhodné z mnoha ohledů. Velkou výhodou je univerzální aplikovatelnost a spolehlivost, velká míra variability mezi druhy a zároveň nízké náklady pro zpracování vzorků (Hebert et. Al. 2003

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je vypracovat biogeografický model výskytu lučních cirkumpolárních motýlů na základě klimatických požadavků, na příkladu perleťovce *Boloria freija*. Posunout model do různých časových období (holocén, vrcholný glaciál, poslední interglaciál, různé scénáře změny klimatu v budoucnosti) a následně modely verifikovat pomocí genetických patternů (mitochondriální DNA). Zároveň zjistit vazby s *Boloria natazhati*.

3 METODIKA

3.1 Klimatické modely

Pro tvorbu modelů klimaticky vhodných areálů jsem získala lokality výskytu sledovaného druhu ze studované literatury (Tshikolovets a kol. 2009, Tshikolovets a kol., 2009, Tshikolovets a kol. 2016, Tshikolovets a kol. 2002, Tshikolovets a kol. 2019) a rozšířila jsem je o souřadnice zaznamenané při sběru motýlů pro mé laboratorní zpracování. Další data jsem použila z databáze GBIF (GBIF.org 2024 -DOI10.15468/dl.wr8cmh + 10.15468/dl.qahttm). Data jsem využívala od roku 1980 a mladší, jelikož u starších nálezů bývá větší problém s přesnými lokalizacemi. K lokalitám jsem dohledávala a zaznamenávala GPS souřadnice. Data byla dále zpracována v programu R.0.2 (R Core 2020) v rozhraní RStudio v. 1.3.1073 s pomocí balíků dismo, maptools, rJava, raster, rgdal a rgeos. Pro výrobu Modelů rozšíření druhu (Species Distribution Modeling – SDM) jsem využila metodu Maximum Entropy (MaxEnt, verze 3.4.4, citace Philips a kol. 2024) s výběrem proměnných pomocí jackknife (Paar a kol.1980). Jako klimatické podklady pro tvorbu SDM modelu jsem využívala data z CHELSA v. 1.2 (Karger a kol. 2017) v rozlišení 2,5 zeměpisných minut.

Vytvořený model jsem posléze projektovala do map se současným klimatem i do různých výšečí dob minulých, obzvláště různá období holocénu, poslední doby ledové a meziledové, protože mě zajímalo, jak se areály výskytu měnily od poslední doby meziledové až do současnosti.

Pro výpočet potenciálního rozšíření během kvartéru jsem využívala data z jedenácti možných scénářů(<http://www.paleoclim.org/>). Jedná se konkrétně o osm scénářů od pozdního holocénu (od před přibližně 0,3–4,2 tisíci lety) až po poslední interglaciál (před zhruba 130 tisíci lety) (Obrázek 2). Klimatická data jsme použili z databáze PaleoClim (Brown a kol. 2018 (<http://www.paleoclim.org/>)).

Pro predikci rozšíření druhu v závislosti na různém vývoji globálního oteplování pro roky 2050 a 2070 jsem si zvolila jsem si dva různé scénáře s různou úrovní oteplování – model cc4.5 s mírnějším a cc8.5 s výraznějším odhadem oteplování.

Mapy jsem následně upravovala za využití aplikace ArcGIS Pro 3.2 (Redlands, C. E. S. R. I. (2011). ArcGIS Desktop: Release 10.). Pro cirkumpolární pohled jsem využívala North Pole Lambert Azimuthal Equal Area souřadnicový systém.

Období	Zdroj klimatických dat
Svrchní holocén, subboreál až subatlantik (4.2-0.3 ka), v1.0	Fordham et al. (2017)
Střední holocén, boreál až atlantik (8.326-4.2 ka), v1.0	Fordham et al. (2017)
Pleistocén/spodní holocén, dryas/preboreál (11.7-8.326 ka), v1.0	Fordham et al. (2017)
Pleistocén, stadiál Mladší Dryas (12.9-11.7 ka), v1.0	Fordham et al. (2017)
Pleistocén, Bølling-Allerød (14.7-12.9 ka), v1.0	Fordham et al. (2017)
Pleistocén, Heinrich Stadial 1 (17.0-14.7 ka), v1.0	Fordham et al. (2017)
Pleistocén, poslední glaciální maximum (ca. 21 ka), v1.2b	CHELSA (Karger et al. 2017)
Pleistocén, poslední interglaciál (ca. 130 ka), v1.0	Otto-Bliesner et al. (2006)
Pleistocén, MIS19 (ca. 787 ka), v1.0	Brown et al. (2018)
Pliocén: středně pliocénní oteplení (3.205 Ma), v1.0	Hill (2015)
Pliocén, M2 (ca. 3.3 Ma), v1.0	Dolan et al. (2015)

Obrázek 2: Modelové scénáře výskytu motýlů v minulosti s uvedenými zdroji klimatických dat (Vrba a kol. 2023)

3.2 Laboratorní práce

3.2.1 Sběr materiálu

Svou práci začínám výběrem vzorků. Celkem jsem zpracovávala 103 vzorků ze sbírky školitele na Entomologickém ústavu. Mnou využívané vzorky byly sbírány a uchovávány od roku 1984 do roku 2019. Od části motýlů byly odebrané nožky uchovávány v 96 % ethanolu a uskladněny v mrazáku v -20 °C. Další část vzorků byla uskladněna na sucho v 1,5 ml mikrozskumavkách. Ze všech těchto vzorků jsem izolovala DNA.

3.2.2 Extrakce DNA

Pro extrakci DNA jsem využívala Genomický DNA Mini Kit od firmy Geneaid.

Při práci s nožkami uskladněnými v ethanolu jsem je nejprve musela nechat vyschnout na savém papíru. Tato část odpadá u nožiček skladovaných na sucho.

Do 1,5 ml mikrozkušavky jsem odpipetovala 200 µl GT pufru. Poté jsem za pomoci pestličky drtila nožky na menší části a přidala 25 µl proteinázy K. Směs jsem nechala inkubovat při 60°C po dobu 30 minut. V následujícím kroku jsem přidávala 200 µl GTB pufru, vzorky jsem vortexovala a opět jsem je nechala inkubovat při 60°C 20 minut. Poté jsem přidala 4 µl RNázy A a nechala odstát v pokojové teplotě 5 minut.

Po přidání 200 µl 100 % ethanolu a protřepání na vortexu jsem směs přepipetovala do kolonek, které jsem umístila do sběrných zkumavek a za pomoci centrifugy odstředovala odpadní tekutinu. Sběrné zkumavky jsem vyhodila a kolonky umístila do čistých sběrných zkumavek. Vzorek jsem poté promývala 400 µl W1 pufru a opět centrifugovala. Odpadní tekutinu jsem vylila. Následně jsem přidala 600 µl vymývacího pufru a opět centrifugovala, odpadní tekutinu vylila a centrifugovala znovu, aby byla kolonka suchá. Vysušenou kolonku jsem nasadila do 1,5 ml mikrozkušavky a na střed sítko kolonky jsem pipetovala 100 µl předeštěného Elučního Pufru. Následně jsem nechala 5 minut odstát, a poté centrifugovala. Tekutinu v mikrozkušavce jsem uchovávala v mrazáku při teplotě -20 °C.

3.2.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR):

Metoda polymerázové řetězové reakce je využívána k rychlému množení konkrétního úseku DNA. Je založená na principu replikování nukleových kyselin. Pro označení začátků a konců požadované části jsou využívány různé primery (Tabulka 1).

Tabulka 1: Mnou využívané primery

Název primeru	sekvence
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
LepF1	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG
MLepF1	GCTTTCCCACGAATAAATAATA
LepR1	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA
MLepR2	GTTCAWCCWGTWCCWGCYCCATTTTC

Nejprve jsem zkusila sekvenovat celý sledovaný úsek COI (cytochrom oxidáza 1) v jednom kuse, k čemuž jsem užila běžně užívané primery (Tabulka 2a). V případě neúspěchu u vzorků s nižší kvalitou jsem byla nucena amplifikaci cílového genu rozdělit. Použila jsem k tomu dvojice primerů LepF1/MLepR2 a MLepF1/LepR1 (F značí forward a R reverse primer), které gen amplifikují ve dvou menších fragmentech (Tabulka 2b).

Příprava PCR – amplifikace celého úseku COI (cytochrom oxidáza 1)

Tabulka 2a: Chemikálie pro amplifikaci celého úseku COI

Název chemikálie	Množství (na 1 vzorek)
H ₂ O v PCR kvalitě	4 µl
MyTaq Red Mix, 2x, výrobce Bioline	6,25 µl
LCO1490_Fw	0,625 µl
HCO2198_Rev	0,625 µl

Příprava PCR – rozdělená amplifikace

Tabulka 2b: Chemikálie pro rozdělenou amplifikaci

Název chemikálie	Množství (na 1 vzorek)
H ₂ O v PCR kvalitě	4,5 µl
MyTaq Red Mix, 2x, výrobce Bioline	6,5 µl
LepF1	0,5 µl
LepR2	0,5 µl

3.2.4 Gelová elektroforéza:

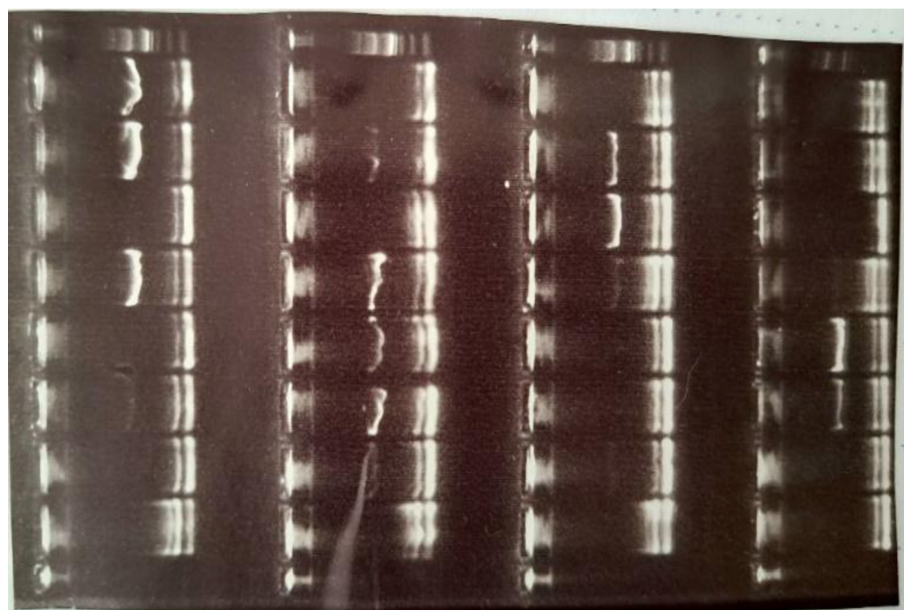
Úspěšnost PCR zjišťuji pomocí gelové elektroforézy, která se zakládá na tom, že molekuly DNA, které mají negativní náboj (ten je způsoben převážně fosfátovými skupinami v nukleových kyselinách) jsou přitahovány k anodě v elektrickém poli. Díky gelové elektroforéze můžu rozlišit molekuly DNA na základě různých rychlostí, s jakými se pohybují gelem, což je v nepřímé závislosti na velikosti molekul DNA (menší části doputují dále).

Elektroforéza se provádí na gelu, nejčastěji vyrobeném z agarózy. Vzorky se vkládají do předem připravených jamek, které jsme připravili za pomoci nástroje zvaného hřeben. Pro snazší manipulaci se vzorkem je již PCR mix obohacený o nanášecí pufr. Pro vizualizaci DNA je do gelu přidáno barvivo GelRed(Biotium). K odhadu velikosti pozorovaných fragmentů

DNA se používá speciální velikostní marker (žebřík), který se aplikuje do jedné z bočních jamek v každé řadě, a obsahuje fragmenty s přesně definovanými velikostmi.

3.2.5 Příprava gelu:

Připravovala jsem 1,5 % agarózový gel z 1,5 gramu agarózy na 100ml TAE (Tris-acetate-EDTA) puftru. Gel jsem zahřívala v mikrovlnné troubě, dokud nebyl zcela čirý a rosolovitý. Následně jsem po mírném zchladnutí přidala 1 μ l barviva GEL-RED a směs jsem promíchala. Směs jsem nalila do připravené formy a ujistila se, že neobsahuje žádné vzduchové bubliny, které by zkreslovaly výsledky. Následně jsem umístila hřebeny. Po ztuhnutí gelu (přibližně 20 minut) jsem hřebeny vyndala. Do jamek připravených hřebenem jsme napipetovala 2 μ l vzorků a elektroforézu jsem pustila po dobu 30 min na 100 voltů. Gel jsem zobrazila pomocí transiluminátoru pod UV světlem, abych byla schopná vyhodnotit úspěšnost PCR (Obrázek 3).



Obrázek 3: Gel pod UV světlem

3.2.6 Přečištění PCR produktů

Před odesláním vzorků na sekvenování je potřeba odstranit drobné fragmenty DNA. Využívám k tomu enzymy FastAP a Exo I od výrobce Biogen. Pipetuji 135 μ l FastAP a 85 μ l Exo I do 1,5 ml mikrozkuhavky, kterou vortexuji a následně centrifuguji. Do každého vzorku přidám 2 μ l směsi a opět centrifuguji. Následně se vzorky zahřívají v cykleru při 37 °C po dobu 40 minut.

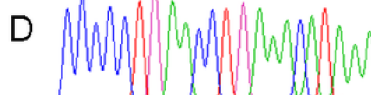
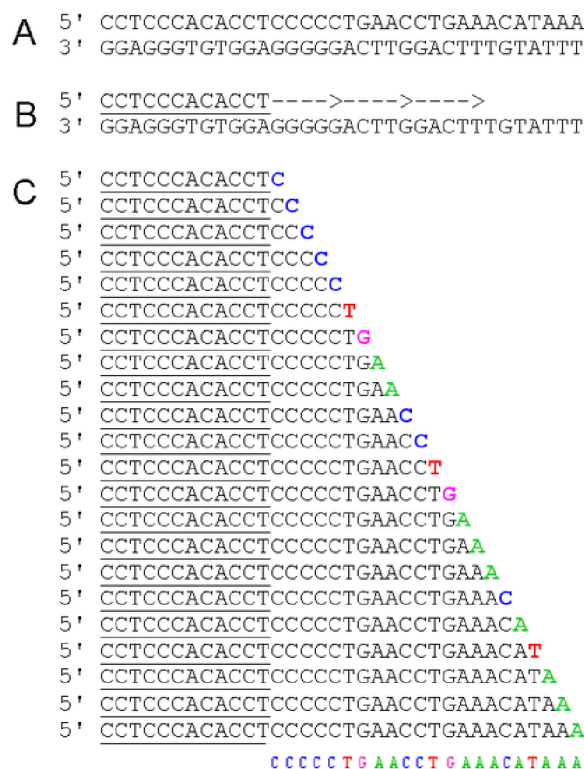
Přečištění (purifikaci) PCR produktu za účelem odstranění zbývajících primerů a nezačleněných nukleotidů (dNTP) jsem provedla s využitím komerčně dostupného čistícího kitu. Tento krok je zásadní, jelikož pro další sekvenaci bude využit jen jeden primer, a proto je nutné přesně vyvážit koncentraci dNTP ve vztahu k ostatním komponentám.

Vzorky, které byly po provedení PCR vyhodnoceny jako dostatečně kvalitní, byly následně odeslány do firmy Macrogen do Nizozemí, kde firma provádí Sangerovo sekvenování. Data byla následně zaslána zpět v elektronické podobě pro další zpracování.

3.3 Sangerovo sekvenování (Kapilární elektroforéza)

Sangerovo sekvenování je metoda využívána k odečítání sekvencí vzorků. Principem je příprava reakční směsi, která obsahuje templátovou DNA, DNA-polymerázu, dNTPs (deoxyribonukleotidtrifosfáty) - dATP, dGTP, dCTP, dTTP, sekvenační primery a fluorescenčně označené ddNTPs (dideoxyribonukleotidfosfáty). Spolu s dalšími přísadami je tato směs nazývána Mastermix.

Templátová DNA je replikována a nukleotidy dNTPs a ddNTPs jsou začleňovány do řetězce nově vznikající DNA. Vlastností ddNTPs je ukončování reakce, čímž vznikají různě dlouhé segmenty replikované DNA. Tyto segmenty jsou následně seřazeny podle délky tak, aby koncové nukleotidy vytvořily řadu, která je následně strojově odečítána (Obrázek 4) (Kapustová a kol. 2021).



Obrázek 4: Seřazení fragmentů replikované DNA: A: Sekvenovaný fragment DNA, B: Připojení primeru a směr syntézy nového vlákna, C: Produkty reakce, barevně zvýrazněné dideoxynukleotidy, D: Chromatogram reakčních produktů (Enzo 2005)

3.4 Zpracování dat

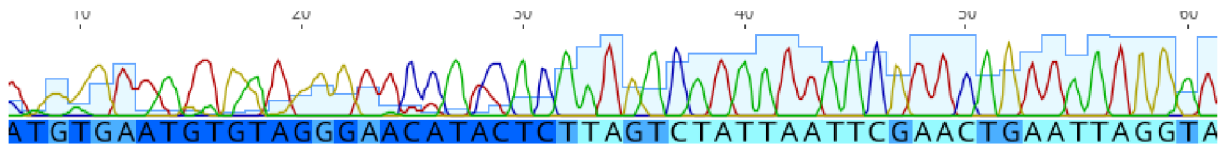
Sekvence získané v Macro genu jsem následně zkontrolovala v programu Geneious Prime 2023.1.2., kde jsem nekvalitní začátky a konce sekvencí ořezala (Obr.4) a zároveň jsem spojovala sekvence, které byly za účelem osekvenování rozděleny na poloviny. V případě nejasnosti, o který nukleotid se jedná, jsem pro danou část použila degenerované kódy na základě tabulky IUPAC (Tabulka 3).

Tabulka 3: Tabulka kódu IUPAC

Symbol	Nukleotidová báze
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
N	A nebo C nebo G nebo T
M	A nebo C
R	A nebo G
W	A nebo T
S	C nebo G
Y	C nebo T
K	G nebo T
V	Není T
H	Není G
D	Není C
B	Není A

Jednotlivé sekvence jsem zalignovala v programu Geneious Prime 2023.1.2, (Obrázek 5) následné drobnější úpravy jsem vytvářela pomocí programu BioEdit (Hall, T.A.,1999) s pomocí algoritmu ClustalW (Thompson a kol.1994).

Mnou získané sekvence jsem doplnila o sekvence získané z databáze Genbank (Clark a kol. 2015) a BOLD a tento kompletní alignment jsem použila na další analýzy, tedy pro výpočet klastrů podle BAPS, haplotypové sítě a fylogenetického stromu.



Obrázek 5: Odstraňované části sekvence zobrazené v programu Geneious Prime 2023.1.2 (nukleotidy k odstranění jsou podbarveny tmavě modrou)

3.5 BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure)

Analýza BAPS označuje metodu shlukování genotypových dat založenou na statistickém modelu struktury populace, která je srovnávána s modely vytvořenými jinými metodami (Corander a kol. 2008).

Clustery se vytvářejí na základě statistického modelu populační struktury, přičemž jedinci pocházejí z jedné populace anebo nesou alely z více populací. Pravděpodobnost údajů při různých hypotézách se vypočítá pomocí multinomického-Dirichletova rozdělení (Tonkin a kol. 2019).

Vzorky jsem pomocí BAPS analýzy rozdělila do clustrů, přičemž jsem postupovala dle manuálu (<https://web.abo.fi/fak/mnf/mate/jc/software/BAPS5manual.pdf>).

3.6 Fylogenetická analýza

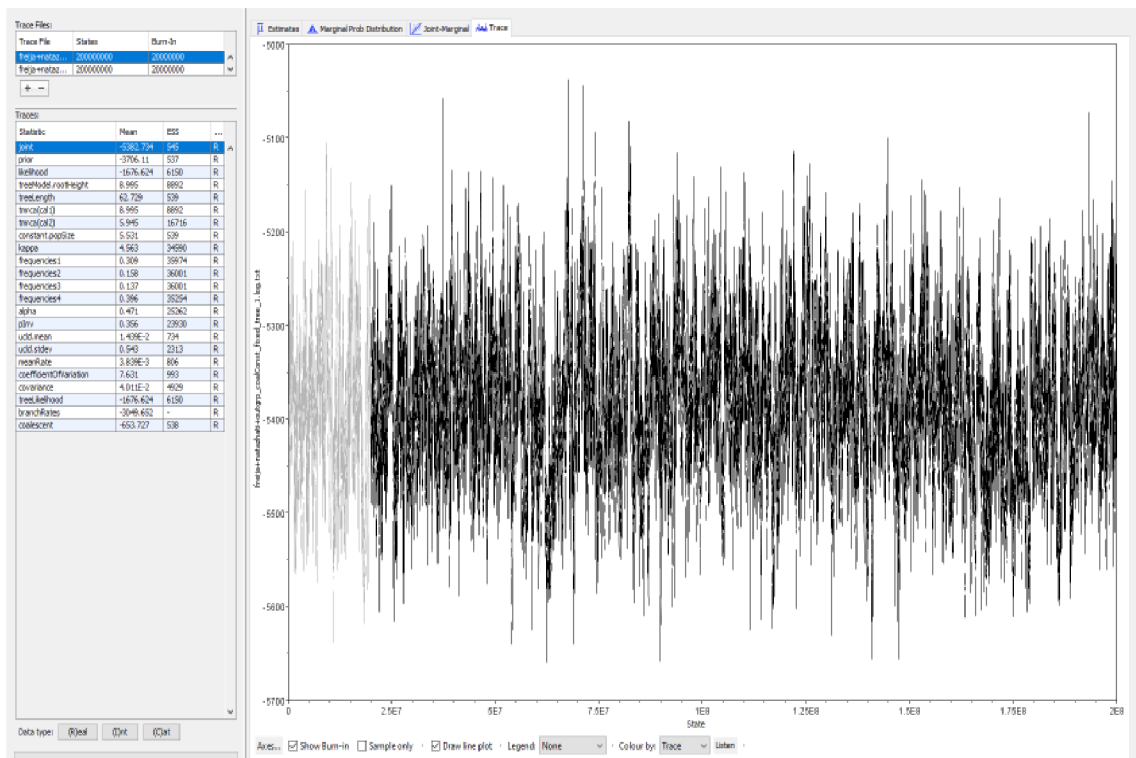
3.6.1 Haplotypové sítě

Alignované sekvence z našich vzorků i z Genbanku jsem použila pro konstrukci haplotypových sítí. Ty byly vytvořeny použitím programu PopArt (Leigh a kol. 2015), spojovací limit byl nastaven standardně na hodnotu 95 %. Dále byly sítě upraveny v programu Adobe Illustrator a Adobe Photoshop CS2.

3.6.2 Fylogenetické stromy

Pro výpočet fylogenetického stromu jsem použila několik sekvencí příbuzných druhů *Boloria dia* a *Boloria euphrosyne* jako tzv. outgroups. Fylogenetický strom jsem vypočítala metodou Maximum Likelihood v programu IQtree (Nguyen a kol., 2015) za použití ultrafast bootstrap (Minh a kol., 2013) s 1000 kroky. Pro kalibraci času divergence jsem použila dvě sekundární kalibrace z Chazot a kol. (2019). Pro kalibraci fylogenetického stromu jsem jako outgroup použila dva uzly. Prvním z nich bylo oddělení *Boloria dia* (9,14 mil. let) a jako druhý uzel

jsem použila oddělení *B. euphrosyne* (5,95 mil. let). Ostatní hodnoty jsem ponechala ve výchozím nastavení. Použila jsem substituční model HKY+ Γ +I. Molekulární hodiny byly nastaveny jako log-normal relaxed clock a jako speciální model jsem použila koalescentní konstantní. Pro výpočet jsem použila Bayesovskou analýzu v programu BEAST v.1.10.4. (Drummond a kol., 2012). Analýzy proběhly v pěti bězích po 200 000 000 generací a samplingu 5 000 generací. Hodnoty jsem kontrolovala v programu Tracer v. 1.6, všechny hodnoty ESS byly větší než 500 (Obrázek 6). Prvních 10 % výpočtu jsem použila jako tzv. burnin a pomocí TreeAnnotator v1.10.4 jsem zkonstruovala Maximum Clade Credibility Tree.



Obrázek 6: Odhad parametrů při bayesovské analýze při časové kalibraci perleťovce *Boloria freija* v programu BEAST a jejich hodnoty (zobrazeno v programu Tracer)

4 VÝSLEDKY

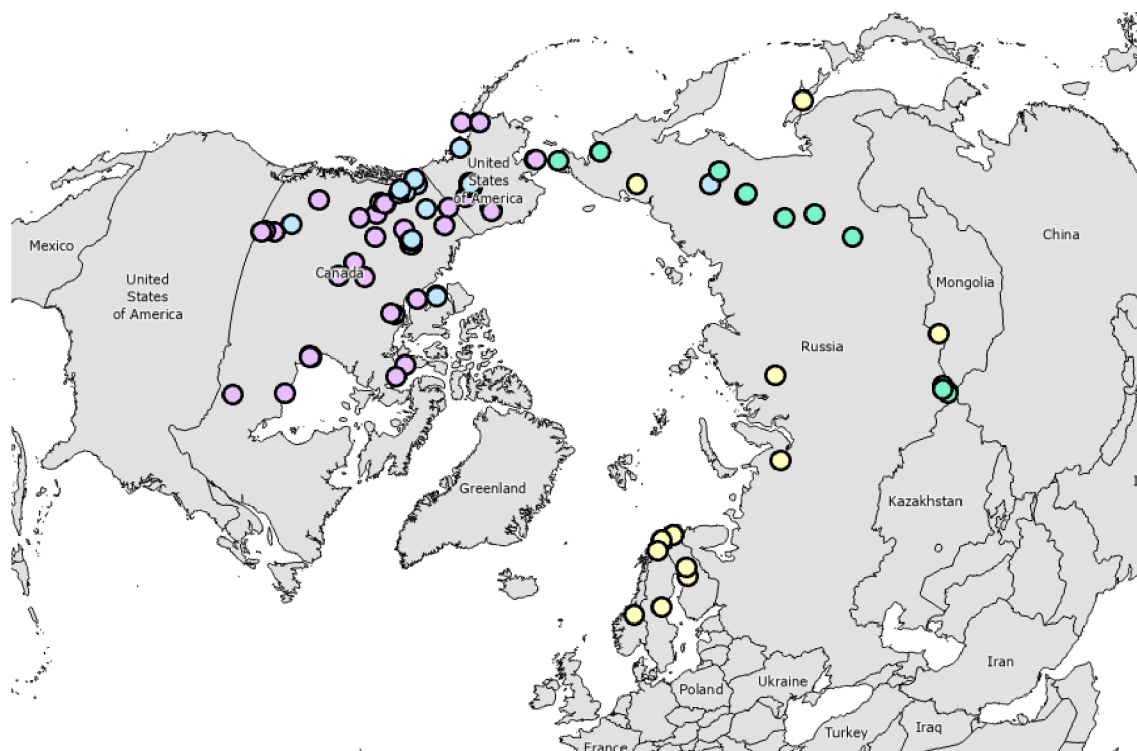
Po vyřazení příliš krátkých, nebo chybových sekvencí jsem měla celkem k dispozici 245 vzorků, z nich 174 pro americkou část areálu a 71 pro euroasijskou část areálu. Z tohoto počtu 85 vzorků pocházelo ze sbírky školitele. Ostatní vzorky pocházely z databáze NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a z databáze GBIF (GBIF.org 2024 - DOI10.15468/dl.wr8cmh + 10.15468/dl.qahttm). Prostorové rozložení jednotlivých vzorků je vidět na přiložené mapě (Obrázek 7).

4.1 BAPS

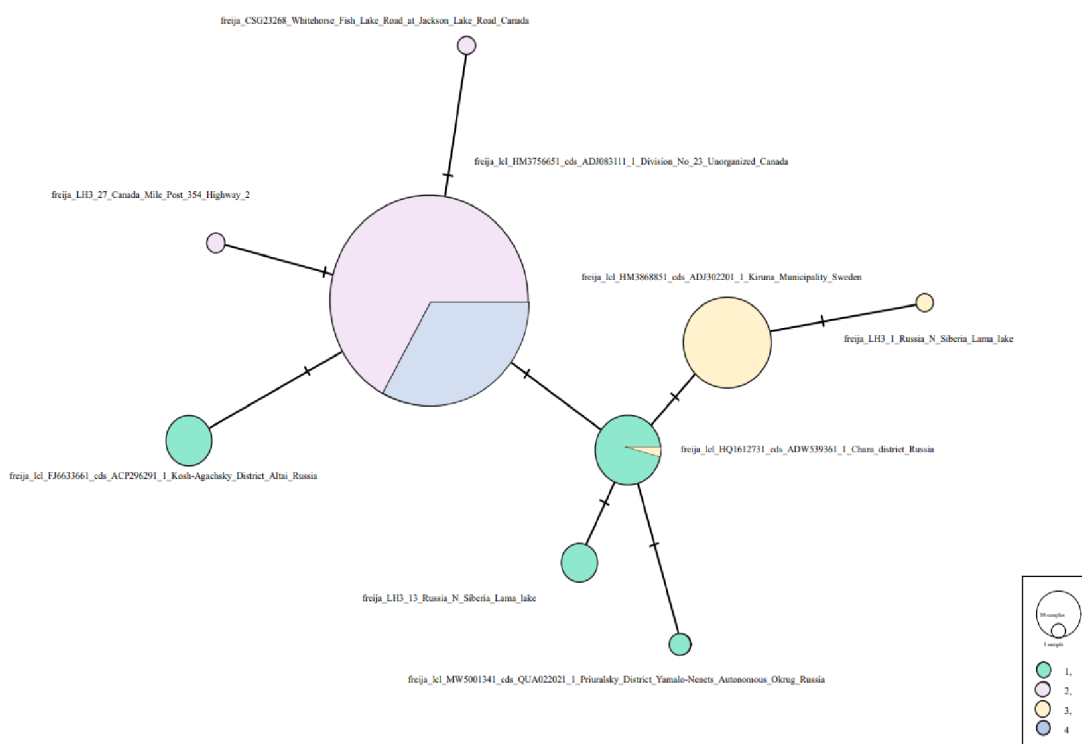
Vzorky byly v programu rozděleny do čtyř clusterů na základě genetické podobnosti. V Eurasii se nachází dva z nich a v Severní Americe další dva, z nich jeden zahrnuje i vzorky určené jako *Boloria nathazati*. Prostorové rozložení jednotlivých skupin je vidět v přiložené mapě (Obrázek 8). Haplotypovou síť vytvořenou na základě analýzy BAPS můžeme vidět na Obrázku 9.



Obrázek 7: Rozložení vzorků *Boloria freija* (kolečko) a *Boloria nathazati* (trojúhelník) v mapě (vytvořeno pomocí aplikace ArcGIS Pro 3.2)



Obrázek 8: Barevně rozlišené vzorky rozdělené do čtyř clusterů na základě BAPS analýzy

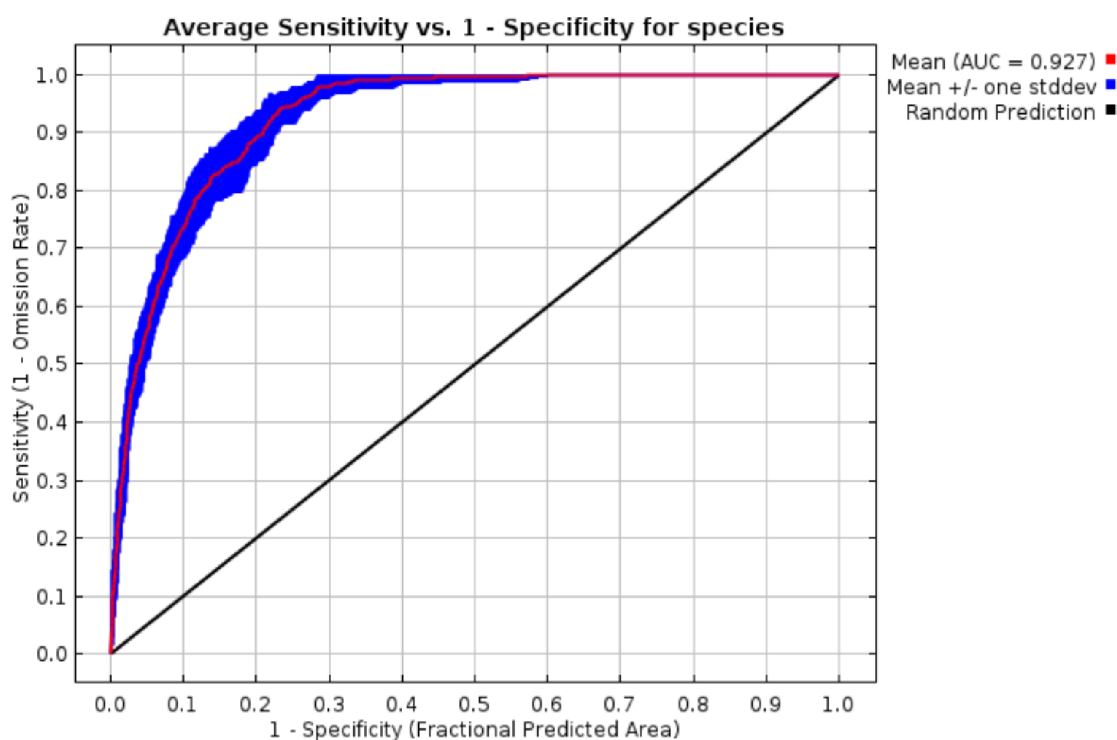


Obrázek 9: Haplotypová síť na základě BAPS analýzy

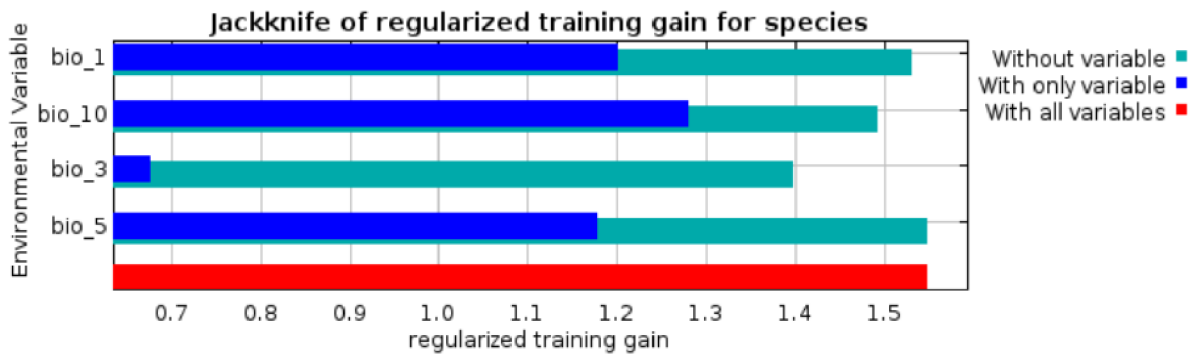
4.2 Klimatické modely

Ze zpracovávaných dat jsem vytvořila mapu aktuálního rozmístění perleťovce *Boloria freija*, ve které jsou kroužky znázorněné jednotlivé zaznamenané lokality výskytu (Obrázek 7). Celkem jsem měla k dispozici 7835 distribučních dat, po odstranění duplikátů a míst příliš blízko sebe jsem jich využila 373 dat rovnoměrně rozmístěných po areálu. Pro výrobu modelu se jako nejvhodnější jevila škálovací konstanta $RM = 3$ (Příloha 2) a funkce $FC = H$ (Příloha 3). Vlastní model měl $AUC = 0,927$ ($SD = 0,010$) (Obrázek 10) a byly využity čtyři proměnné Bio1 – průměrná roční teplota, Bio3 – izotermalita, Bio5 – nejvyšší teplota nejvlhčího měsíce a Bio10 – průměrná teplota nejteplejšího čtvrtletí (Obrázek 11 a Obrázek 12). Práh (Maximum test sensitivity plus specificity threshold) = 0.245.

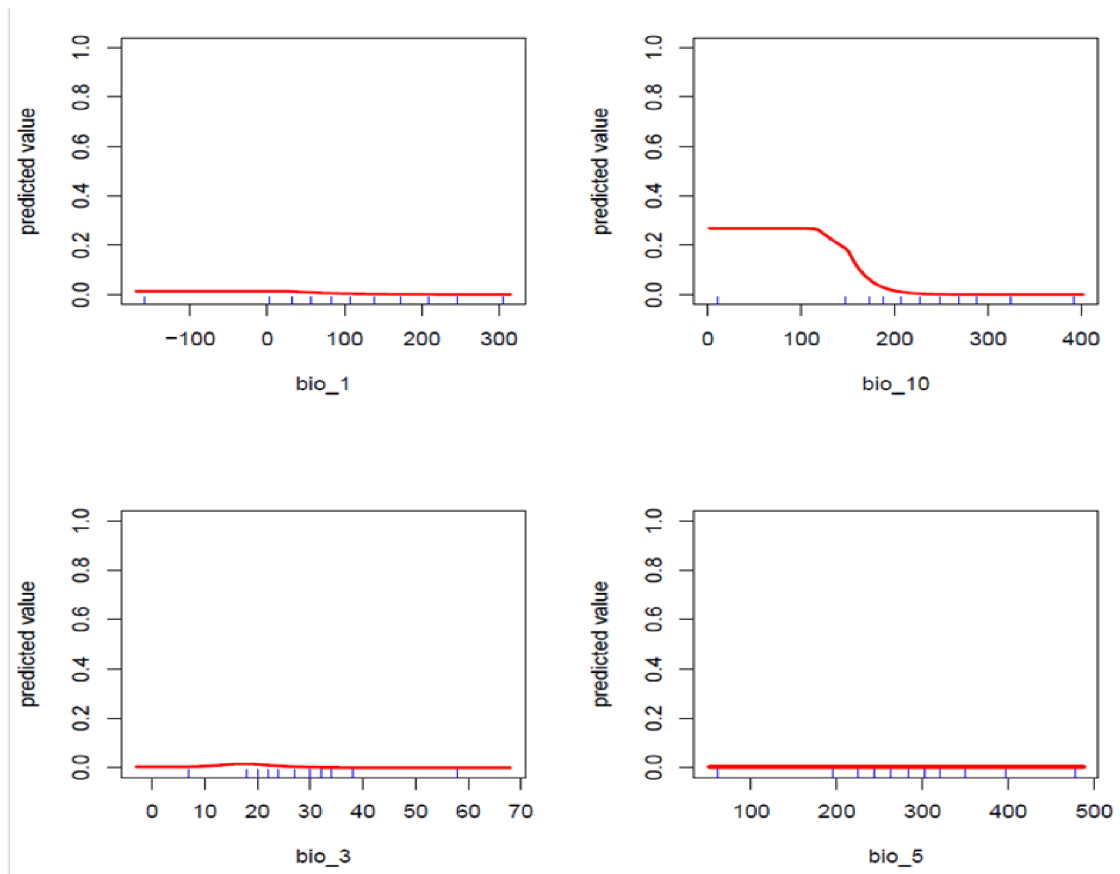
Na základě aktuálního výskytu byl následně klimatický model vhodných podmínek výskytu motýla promítnut do minulosti, a to s přihlédnutím na klimatické podmínky v jednotlivých obdobích (Obrázek 13 Až Obrázek 15).



Obrázek 10: Křivka pro zvolený model znázorňující AUC (area under the curve)

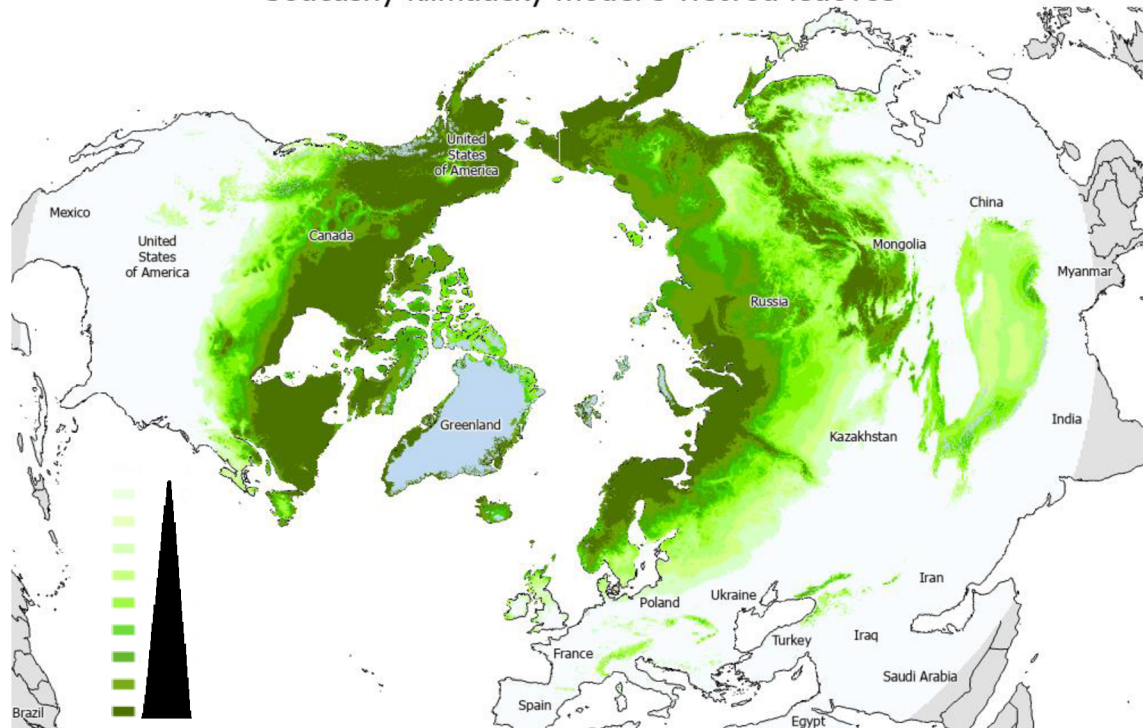


Obrázek 11: Graf příspěvku mnou zvolených proměnných. Modře příspěvek samotné proměnné, tyrkysově příspěvek ostatních proměnných v modelu.



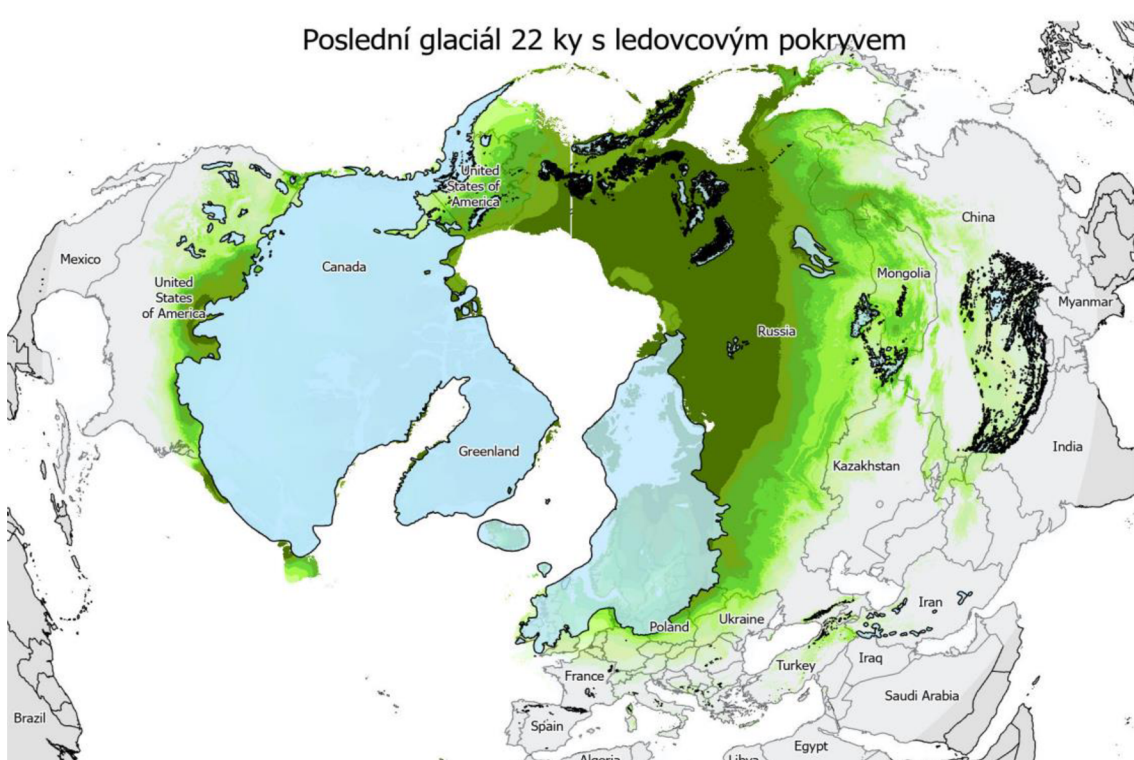
Obrázek 12: Hodnoty bioklimových proměnných použitých pro výpočet SDM

Současný klimatický model s vrstvou ledovce



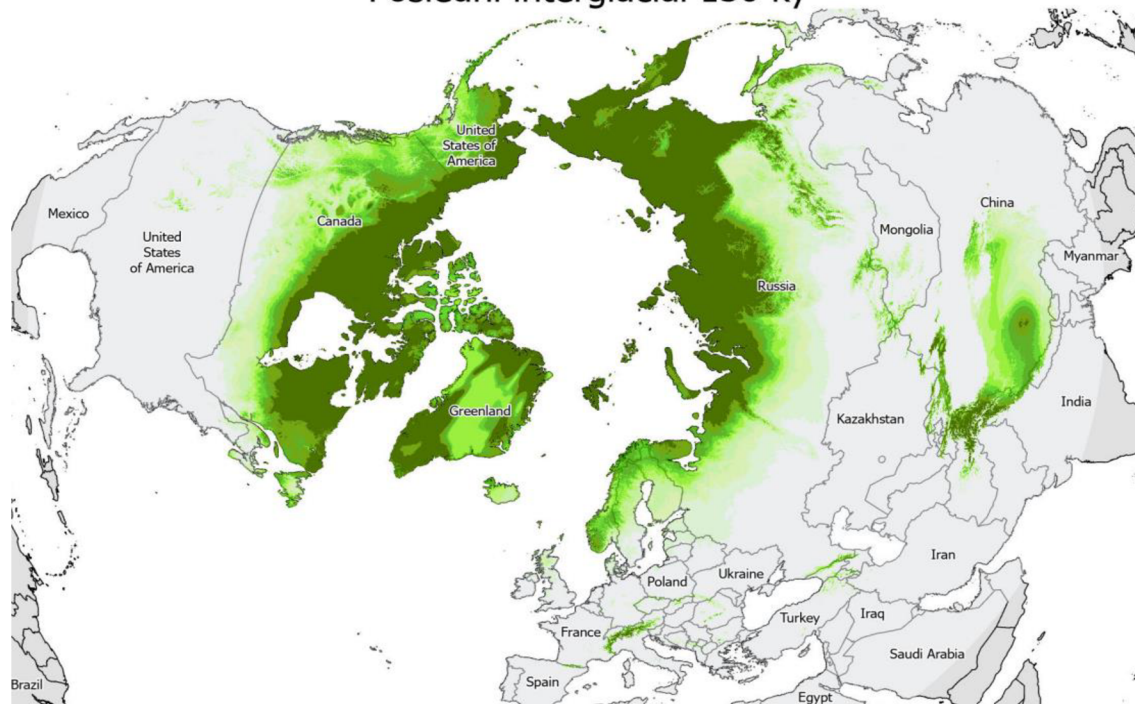
Obrázek 13: Mapa aktuálních vhodných klimatických podmínek pro výskyt druhu *Boloria freija*

Poslední glaciál 22 ky s ledovcovým pokryvem



Obrázek 14: Potenciální rozšíření *B. freija* v období posledního glaciálu s vrstvou ledovcového pokryvu

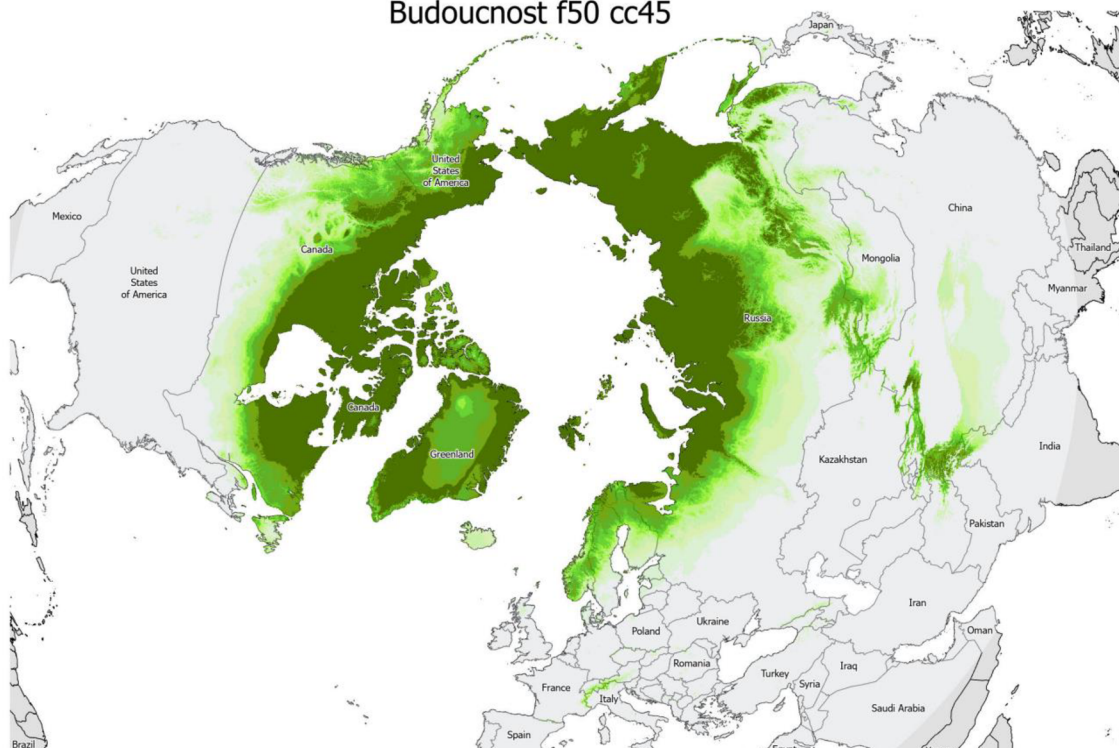
Poslední interglaciál 130 ky



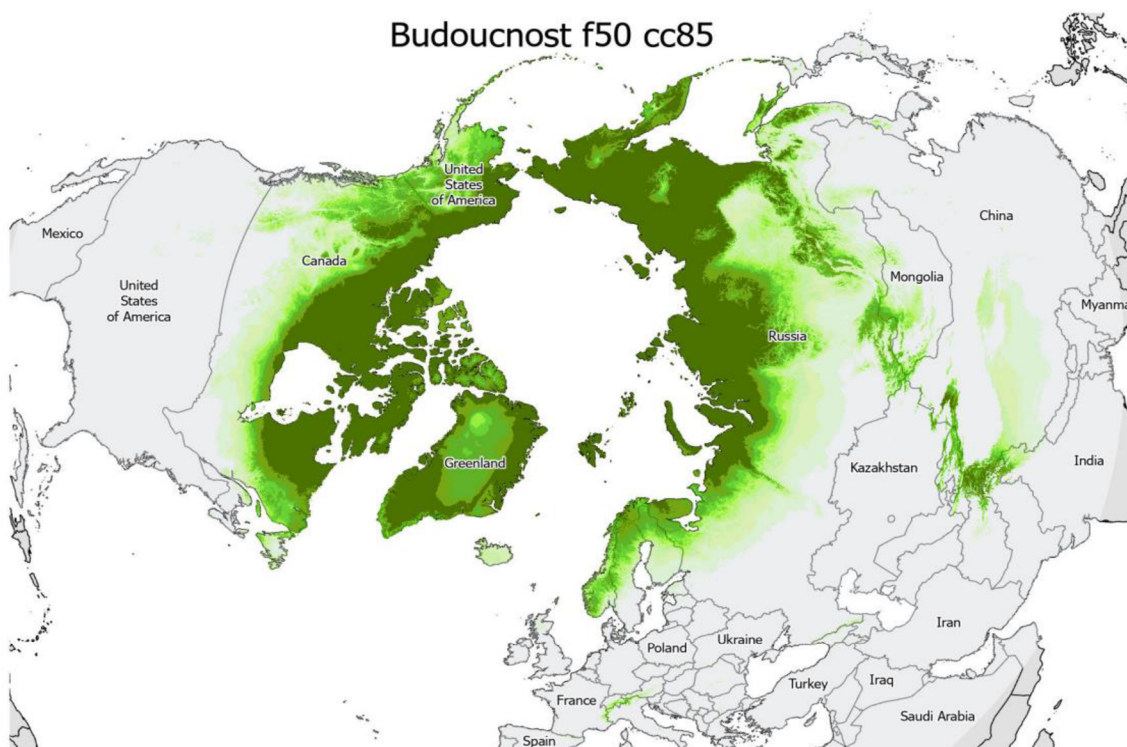
Obrázek 15: Potenciální rozšíření *B. freija* v období posledního interglaciálu (130 ky)

Následně jsem vytvořila mapové výstupy pro dva možné scénáře globálního oteplování a jejich vlivy na změnu plochy budoucího habitatu (Obrázek 16) až (Obrázek 19).

Budoucnost f50 cc45



Obrázek 16: Potenciální rozšíření *B. freija* pro rok 2050 při mírnějším průběhu globálního oteplování

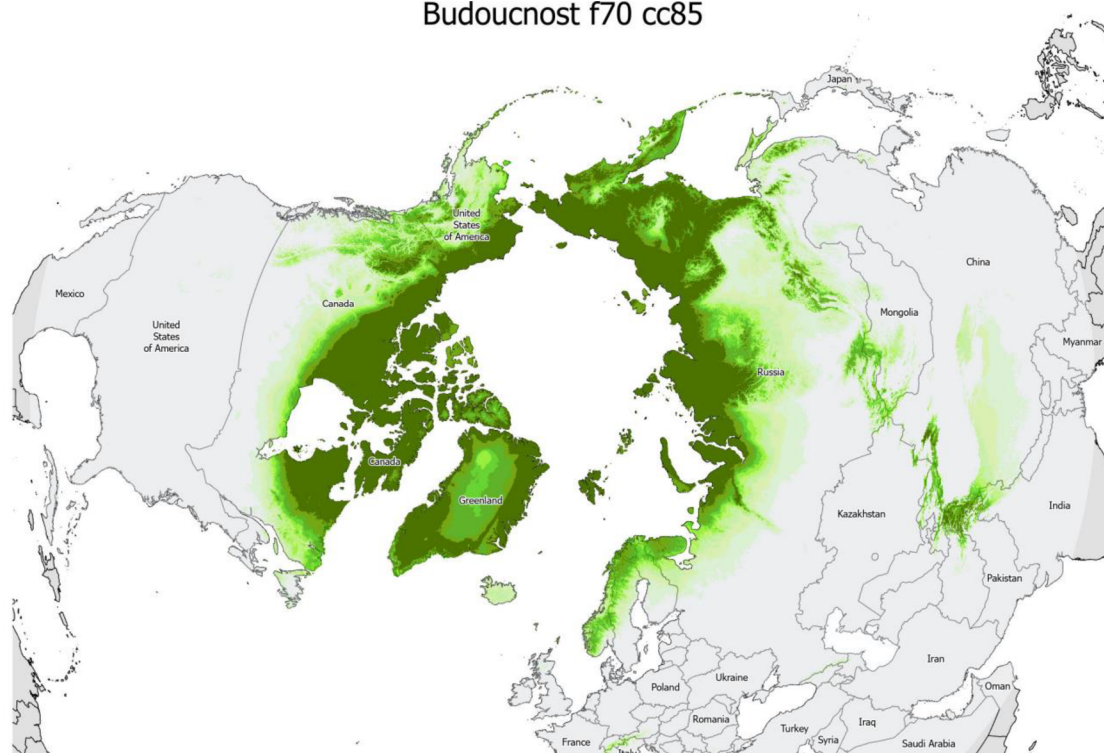


Obrázek 17: Potenciální rozšíření *B. freija* pro rok 2050 při závažnějším průběhu globálního oteplování



Obrázek 18: Potenciální rozšíření *B. freija* pro rok 2070 při mírnějším průběhu globálního oteplování

Budoucnost f70 cc85



Obrázek 19: Potenciální rozšíření *B. freija* pro rok 2070 při závažnějším průběhu globálního oteplování

Podrobnější časové rozlišení map viz Příloha 1.

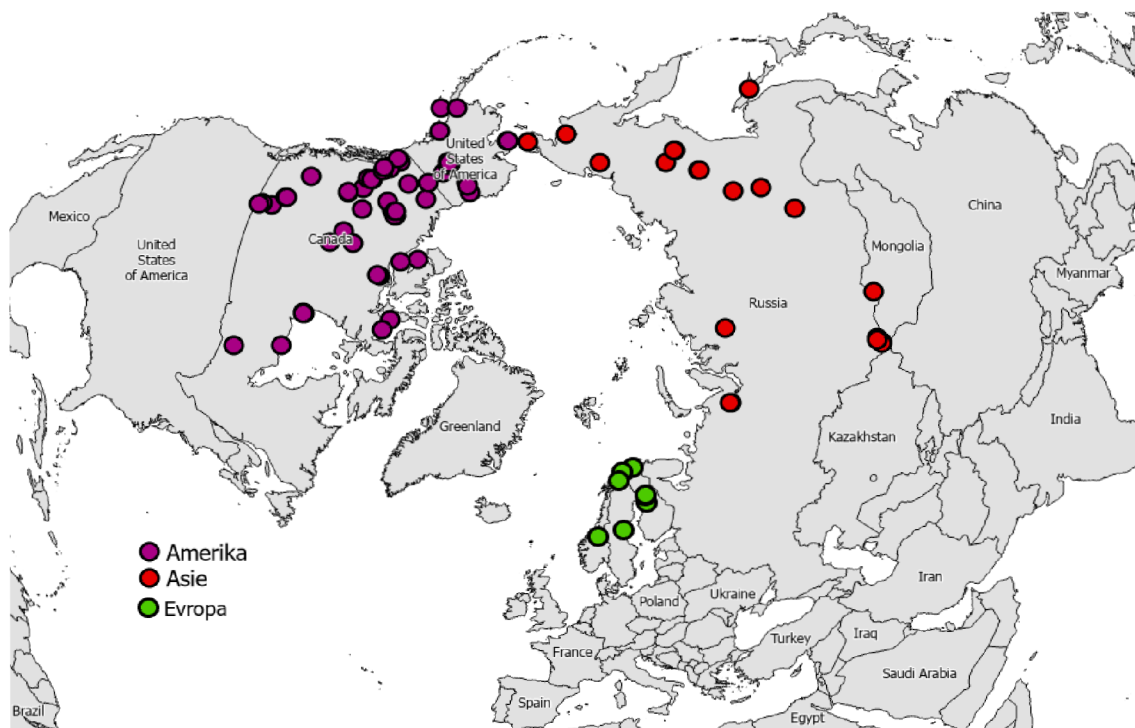
Z predikčních klimatických modelů vidíme, že *B. freija* jako druh nebude globálním oteplováním výrazně ohrožena, jelikož se pro ni klimaticky vhodné podmínky pouze přesunou více k severu. Nicméně populace izolovaná na Altaji by v budoucnu mohla ztratit svoje biotopy.

4.3 Haplotypové sítě

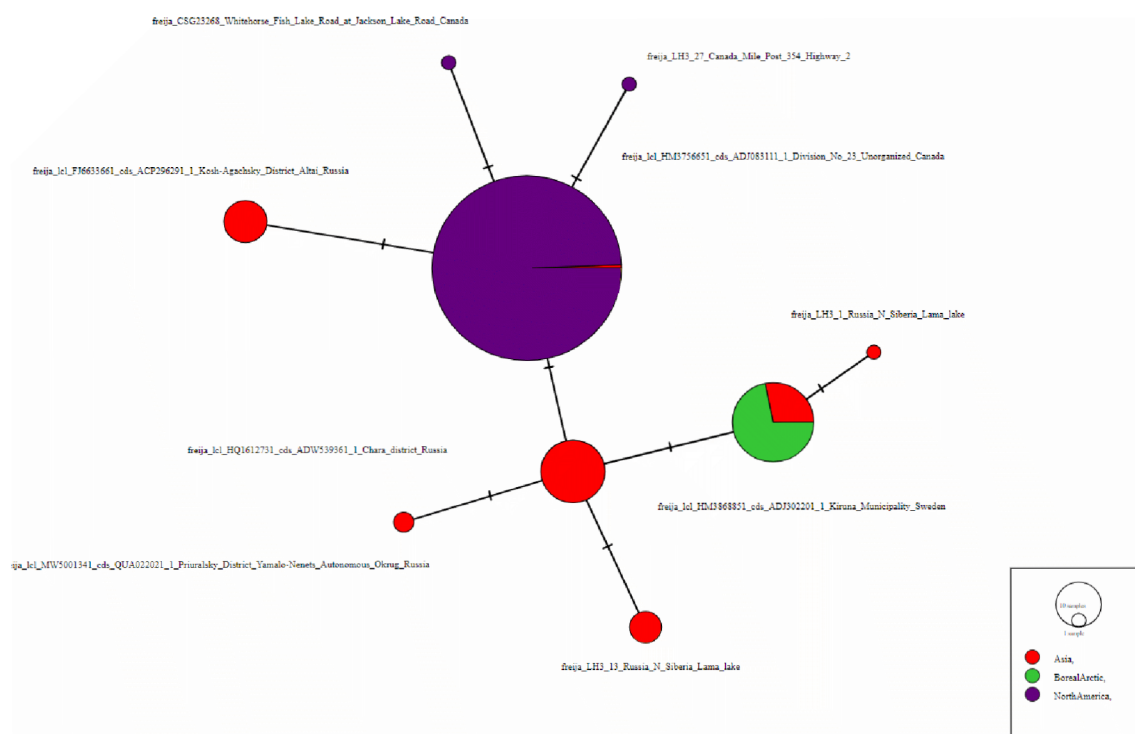
Haplotypová síť, doplněná o cirkumpolární mapu dokumentuje fylogeografické vztahy populací druhu *B. freija* (Obrázek 20) a (Obrázek 21). Síť byla zkonstruována na základě 245 sekvencí genu pro COI.

Pro perleťovce *Boloria freija* bylo nalezeno 9 haplotypů. Velikost jednotlivých kruhů v síti znázorňuje počet jedinců daného haplotypu. Síť je rozdělena do 4 skupin, které jsou barevně odlišené a shodují se s barevným rozlišením v mapě a ve fylogenetickém stromu.

V oblasti Severní Ameriky můžeme najít tři haplotypy, které jsou blízce příbuzné. V oblastech Norska Švédska a Finska se nachází totožný haplotyp. Na území Ruska se nachází čtyři haplotypy. Z haplotypové sítě dokážeme vyčíst, že populace v oblasti Altaje a Sajanů jsou odlišné od ostatních Euroasijských populací.



Obrázek 20: Barevné rozlišení vzorků na základě geografické polohy



Obrázek 21: Haplotypová síť barevně rozlišená na základě geografické polohy vzorků

4.4 Fylogenetické stromy a kalibrace času

Získaný fylogenetický strom jsem vypočítala metodou Maximum Likelihood v programu IQtree (Nguyen a kol., 2015) a využila jsem ultrafast bootstrap (Minh a kol., 2013) s 1000 kroky. Následně jsem strom kalibrovala Bayesovskou analýzou v programu BEAST v.1.8.4. (Drummond a kol., 2012).

Na kladogramu jsou znázorněny vztahy mezi jednotlivými vzorky perleťovce *B. freija* - celkem 225 vzorků a zároveň vztahy s *B. natazhati* - 28 vzorků (Příloha 4). Z fylogenetického stromu vidíme přítomnost stejných skupin, jaké jsme mohli pozorovat při rozdělení v haplotypové síti. Pro lepší přehlednost jsou jednotlivé geografické oblasti vyznačené stejnými barvami, jaké byly použity pro haplotypovou síť (Příloha 5). *B. natazhati* je ve fylogenetickém stromě barevně odlišena.

B. freija je monofyletickým druhem. Hlavní štěpení druhu na jednotlivé populace probíhalo mezi před 1 až 4 miliony let. Z mnou vybraných outgroups je *B. freija* nejbližší *B. euphrosyne*. V kladogramu vidíme, že *B. freija* je druhem pocházejícím z Asie (Sibiř). Následně došlo k jedné vlně invaze do Ameriky, a to asi před 1,3 miliony let. Evropské vzorky tvoří jednu větev, která byla oddělena asi před 0,8 miliony let. Asijské vzorky tvoří tři větve. Na fylogenetickém stromu vidíme oddělenost vzorků z Altaje.

Vzorky *B. natazhati* můžeme nalézt rovnoměrně vmíchané mezi vzorky *B. freija* nacházející se v Severní Americe. Tím můžeme vyloučit, že by se jednalo o odlišný druh, jelikož netvoří samostatnou větev.

5 DISKUZE

Cílem této práce bylo vypracování biogeografického modelu výskytu lučních cirkumpolárních motýlů na základě klimatických požadavků na příkladu perleťovce *Boloria freija* a následně tento model promítnout do různých časových období. Následně jsem modely verifikovala pomocí genetických patternů (mitochondriální DNA). Cílii jsem také na zjištění vazeb mezi perleťovcem *Boloria freija* a *B. natazhati*. Jako v řadě dalších studií, které se zabývají podobnými tématy jsem ve svých analýzách využila fylogenetické, fylogeografické a populačně genetické přístupy (Besold a kol. 2008, 2015; Kodandaramaiah a kol. 2011, 2012; Theissingner a kol. 2011, 2013; Wahlberg & Saccheri 2007).

5.1 Fylogeografická historie perleťovce *Boloria freija*

Pro perleťovce *Boloria freija* byly nalezeny čtyři geograficky oddělené haplotypové skupiny. Největší genetická diverzita pro tento druh byla zjištěna v palearktické oblasti, což odpovídá zjištěním Jany Marešové (2019) pro druhy *Boloria eunomia* a *Boloria selene*.

Z klimatických map jsem zjistila, že jižněji položené populace (například populace nacházející se na Altaji) perleťovce *B. freija* byly izolované od severněji položených, a to v období glaciálů a interglaciálů. Podobný případ izolace v této oblasti můžeme vidět i u klimatických map zpracovaných pro druhy *B. eunomia*, *B. selene* i *B. chariclea* (Marešová a kol. 2019, 2021). Klimaticky vhodný areál pro výskyt perleťovce *B. freija* byl v období posledního glaciálního maxima (přibližně před 22 000 let). Obdobné výsledky můžeme pozorovat ve studiích pro *Oeneis jutta* anebo již zmiňovaná *B. eunomia* a *Agriades optilete*. Naopak pro *B. selene* vidíme propad v ploše klimaticky vhodného areálu a snížení jeho kvality (Marešová 2019, Marešová 2021).

V Bayesovské analýze se na bázi nachází vzorky ze Sibiře, což značí, že centrem vzniku *B. freija* je Asie. Toto tvrzení také potvrzují studie Simonsena a kol. (2010), které uvádí střední Asii jako centrum vzniku pro celý druh *Boloria*. I pro toto zjištění existuje výjimka, kterou je *Boloria chariclea*, která do Eurasie expandovala ze svého centra vzniku ze Severní Ameriky (Marešová a kol. 2020).

Stejně tak jako některé další druhy (např. *Parnassius apollo* a další), *B. freija* expandovala z Asie dále do Severní Ameriky a Evropy (Kodandaramaiah a kol. 2010; Todisco a kol. 2010; Ugelvig a kol. 2011 b; Wahlberg & Rubinoff 2011, Marešová a kol. 2019, Simonsen a kol. 2010). *Boloria freija* kolonizovala Ameriku přibližně před 1,3 miliony let,

což je o poznání později než jiné druhy bolorií. *Boloria selene* kolonizovala Severní ameriku již před 2,5 miliony let, a to skrz druhý Beringův pevninský most (Marešová a kol. 2019).

Z mnou vytvořeného fylogenetického stromu vyplynulo, že perleťovec *B. natazhati* je ve vztahu k *B. freija* parafyletický. Různé populace sedají do různých větví s dalšími americkými vzorky. Tudíž jsou totožným druhem lišícím se pouze fenotypem. To vyvrací starší spekulace. Simonsen (2010) uvádí, že se nejspíše jedná o sesterské skupiny, nicméně ani toto tvrzení není zcela jisté. V průběhu let se o postavení těchto dvou druhů vedly debaty. *Boloria natazhati* byla původně považována za poddruh *Boloria freija* (Passos 1964), následně byla ovšem vyhodnocena plnohodnotným druhem (Troubridge & Wood, 1990; Shepard a kol. 1998). V té době to však vzhledem k téměř zanedbatelným molekulárním rozdílům mezi těmito druhy a malému množství exemplářů nebylo možné tento problém bez dalších studií s naprostou jistotou vyřešit (Simonsen a kol. 2010).

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vytvoření klimatického modelu pro perleťovce *Boloria freija*. Z výsledků vytvořených klimatických map a jejich predikcí bylo zjištěno, že ačkoliv je perleťovec *Boloria freija* zařazen do skupiny motýlů ohrožených globálním oteplováním, tento konkrétní druh jako celek nebude klimatickými podmínkami ohrožen, nicméně jižněji položené populace ohroženy budou. Klimaticky vhodný habitat se stáhne na sever, ovšem nevymizí. Ohroženou skupinou by samozřejmě také mohla být reliktní populace *Boloria freija* nacházející se na Altaji.

Ze získaných sekvencí byly vytvořeny fylogenetické stromy metodou maximální věrohodnosti a Bayesovské inference. Na základě mitochondriální DNA (tzv. barcoding) z 245 vzorků jsme také potvrdili že *Boloria freija* je motýlem s původem v Asii s následným rozšířením do Evropy a Severní Ameriky.

Z fylogenetického stromu a haplotypových sítí jsme dále byli schopni zjistit, že perleťovec *Boloria freija* a *Boloria natazhati* nejsou dva odlišné druhy, nýbrž se jedná pouze o fenotypovou odlišnost jednoho a téhož druhu.

7 LITERATURA

Besold, J., & Schmitt, T. (2015). More northern than ever thought: refugia of the Woodland Ringlet butterfly *Erebia medusa* (Nymphalidae: Satyrinae) in Northern Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 53, 67–75.

Bintanja, R., & Andry, O. (2017). Towards a rain-dominated Arctic. *Nature Climate Change*, 7, 263–267.

Churkin, S., & Yakovlev, R. (2024). Short review of *Clossiana freija* (Thunberg, 1791) (Lepidoptera, Nymphalidae) from Russia, Kazakhstan and Mongolia with the description of two new subspecies. *Ecologica Montenegrina*, 71, 101-111. DOI: 10.37828/em.2024.71.9.

Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2016). GenBank. *Nucleic Acids Res.*, 44(D1), D67-72. DOI: 10.1093/nar/gkv1276.

Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. (1999). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.*, 9.

Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., Tang, J., (2008). Corander J, Marttinen P, Siren J, Tang J. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, 9, 539. DOI: 10.1186/1471-2105-9-539.

Dos Passos, C. F. (1964). A synonymic list of the Nearctic Rhopalocera. *Memoirs, Lepidopterist*.

Drummond, A., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.*, 22, 1185-1192.

Eliasson, C. U., Ryrholm, N., Holmer, M., Jilg, K., & Gardenfors, U. (2005). Fjärilar: Dagfjärilar / Hesperiiidae–Nymphalidae. *Nationalnyckeln till Sveriges flora och fauna*, Uppsala: ArtDatabanken, Sveriges Lantbruksuniversitet.

Enzo, (2005, August 15) Sanger-DNA-Seq.png.. Wikimedia Commons. [Online image]. Retrieved from <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sanger-DNA-seq.png>

Feeney, R. E., Osuga, D. T., Yeh, Y. (1991). Effect of boronic acids on antifreeze proteins. *Journal of Protein Chemistry*, 10, 167-170.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907–913. DOI: 10.1038/35016000.

Huang, C. C., MacDonald, G. M., & Cwynar, L. C. (2004). Holocene landscape development and climatic change in the low arctic, Northwest Territories, Canada. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 205, 221-234.

Kapustová, B., Pavlovič, D., Štěch, J., Volfová, A., Kopecká, L., Pecháčková, K., Habásko, J., Hanáková, A., Hermanová, K., Pádárová, I., Kozinski, J., Šimáčková, B., Friedová, N., Balejová, M., Novotný, D., Rejlek, V., Vlčková, K., Pítová, V., Dušek, P., Gurka, J., Šípek, A., Štuka, Č., Vejražka, M. Sekvenování DNA. (2021). In: WikiSkripta. Retrieved from https://www.wikiskripta.eu/w/Sekvenov%C3%A1n%C3%AD_DNA

Karger, D. N., Conrad, O., Böhner, J., Kawohl, T., Kreft, H., Soria-Auza, R. W., Zimmermann, N., Linder, P., Kessler, M. (2017). Climatologies at high resolution for the earth's land surface areas. *Scientific Data*, 4, 170122.

Leigh, J., & Bryant, D. (2015). PopART: Full-Feature Software for Haplotype Network Construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6. DOI: 10.1111/2041-210X.12410.

Malicky, H. (2000). Areal dynamik und Biomgrundtypen am Beispiel der Köcherfliegen (Trichoptera). *Entomologica Basiliensia*, 22, 235-259.

Maresova, J, Habel, J.C., Neve, G., Sielezniew, M., Bartonova, A., Kostro-Ambroziak, A., Fric, Z.F., (2019). Cross-continental phylogeography of two Holarctic Nymphalid butterflies, *Boloria eunomia* and *Boloria selene*. *PloS One*, 14(3), e0214483. Doi: 10.1371/journal.pone.0214483.

Maresova, J., Suchackova Bartonova, A., Konvicka, M., Høye, T., Gilg, O., Kresse, J., Shapoval, N., Yakovlev, V., Fric, Z.F. (2021). The story of endurance: Biogeography and the evolutionary history of four Holarctic butterflies with different habitat requirements. *Journal of Biogeography*, 48, 590-602. Doi: 10.1111/jbi.14022.

Marttila, O., Aarnio, H., Haahetela, T., & Ojalainen, P. (1991). Suomen päiväperhoset. Toinen, täydennetty painos. Helsinki: Kirjayhtymä.

Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & Haesler von A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188–1195.

Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Haesler von A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274.

Phillips, S. J., Dudík, M., Schapire, R. E. (2024). Maxent software for modeling species niches and distributions (Version 3.4.1). Retrieved from http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/

Ramstein, G., Fluteau, F., Besse, J., & Jossame, S. (1997). Effect of orogeny, plate motion and land-se.

Ruddiman, W. F., & Kutzbach, J. E. (1989). Forcing of late Cenozoic northern hemisphere climate by plateau uplift in southern Asia and The American west. *Journal of Geophysical Research*, 94, 18409-18427.

Scott, J. A. (1986). *The Butterflies of North America: A Natural History and Field Guide*. Stanford: Stanford University Press.

Shepard, J. H. (1998). The correct name for the *Boloria chariclea/titania* complex in North America (Lepidoptera: Nymphalidae). In Emmel, T. C. (Ed.), *Systematics of Western North American Butterflies* (pp. 727–730). Gainesville: Mariposa Press.

Shirey, V., Neupane, N., Guralnick, R., & Ries, L. (2024). Rising minimum temperatures contribute to 50 years of occupancy decline among cold-adapted Arctic and boreal butterflies in North America. *Global Change Biology*. DOI: 10.1111/gcb.17205.

Simonsen, T. J., Wahlberg, N., Warren, A. D., & Sperling, F. A. H. (2010). The evolutionary history of *Boloria* (Lepidoptera: Nymphalidae): phylogeny, zoogeography and larval foodplant relationships. *Systematics and Biodiversity*, 8, 513 - 529.

Talluri, M. R., Gummadi, V., Ganga, R. B. (2017). Antioxidant activity of *Borassus flabellifer*. *International Research Journal of Pharmacy*, 8, 18-22.

Tatarinov, A. G., Dolgin, M. M. (1999). *Bulavousye cheshuekrylye. Fauna evropeiskogo Severo-Vostoka (Lepidoptera Rhopalocera. Fauna of the Northeastern Europe, Vol. 7, Part 1)*. St. Petersburg: Nauka.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22(22), 4673-4680. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673.

Todisco, V., Gratton, P., Cesaroni, D., & Sbordoni, V. (2010). Phylogeography of *Parnassius apollo*: Hints on taxonomy and conservation of a vulnerable glacial butterfly invader. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101, 169–183.

Tonkin-Hill, G., Lees, J. A., Bentley, S. D., Frost, S. D. W., & Corander, J. (2019). Fast hierarchical Bayesian analysis of population structure. *Nucleic Acids Res.*, 47(11), 5539-5549. DOI: 10.1093/nar/gkz361.

Troubridge, J. T., & Wood, D. M. (1990). Biology and taxonomic status of *Boloria natazhati* (Gibson) (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterists' Society*, 44, 180–187.

Tshikolovets, V., & Strelzov, A. (2019). *The butterflies of Russian Far East /Khabarovskiy and Primorskiy Kray, Jewish Autonomous and Amur regions), Sakhalin and Kuril Islands*. Tshikolovets Publications, Pardubice.

Tshikolovets, V. V., Yakovlev R. V., & Bálnit Z. (2009). Butterflies of Mongolia, V. Tshikolovets, Kyiv.

Tshikolovets, V. V. (2009). Butterflies of Altai, Sayans and Tuva (South Siberia). Tshikolovets Publications, Pardubice.

Tshikolovets, V. V., Bidzilya, O. V., & Golovoskin, M. I. (2002). The butterflies of Transbaikal Siberia. Tshikolovets Publications, Brno.

Tshikolovets, V. V., Kosterin, O., Gorbunov, P., & Yakovlev, R. (2016). The butterflies of Kazakhstan. Tshikolovets Publications, Pardubice.

Ugelvig, L. V., Nielsen, P. S., Boomsma, J. J., & Nash, D. R. (2011). Reconstructing eight decades of genetic variation in an isolated Danish population of the large blue butterfly *Maculinea arion*. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 201.

Ugelvig, L. V., Vila, R., Pierce, N. E., & Nash, D. R. (2011). A phylogenetic revision of the *Glaucopsyche* section (Lepidoptera: Lycaenidae), with special focus on the Phengaris–*Maculinea* clade. *Phylogenetics and Evolution*, 61, 237-243.

Vomáčka, Knotek, Konečná, Hanák, Dientsbier, Průchová, (2017). Zákon o ochraně přírody a krajiny. Komentář. C. H. Beck, Praha.

Vuorinen, K.E.M., Oksanen, L., Oksanen, T., Pyykönen, A., Olofsson, J., Virtanen, R. (2017). Open tundra persist, but arctic features decline—Vegetation changes in the warming Fennoscandian tundra. *Global Change Biology*, 23, 3794 - 3807.

Vrba, P., Fric, Z., Rindos, M., Hájková, K., & Konvicka, M. (2023). Evropsky významní motýli mezofilních a vlhkých trávníků v čase globální změny (*Lycaena dispar*, *Lycaena helle*, *Phengaris nausithous*, *Phengaris teleius*, *Euphydryas aurinia*) NmetS-certifikovaná metodika. Biologické centrum AVČR, v.v.i., České Budějovice. DOI: 10.13140/RG.2.2.35699.71204.

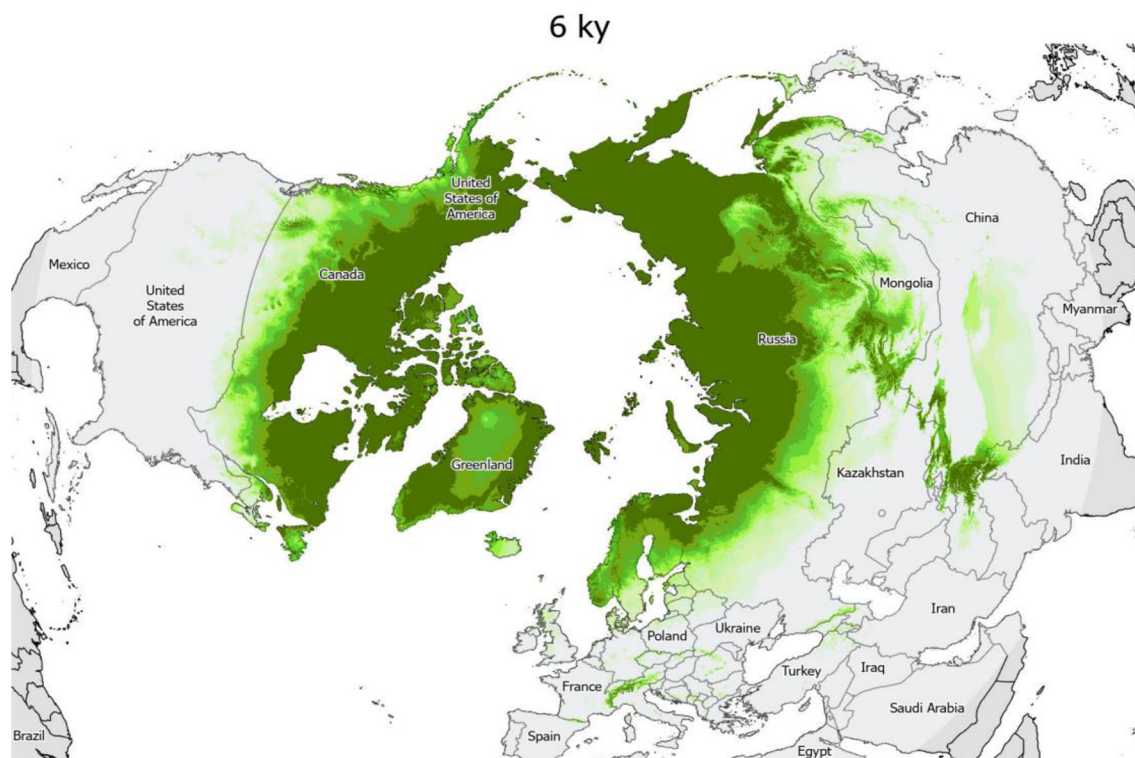
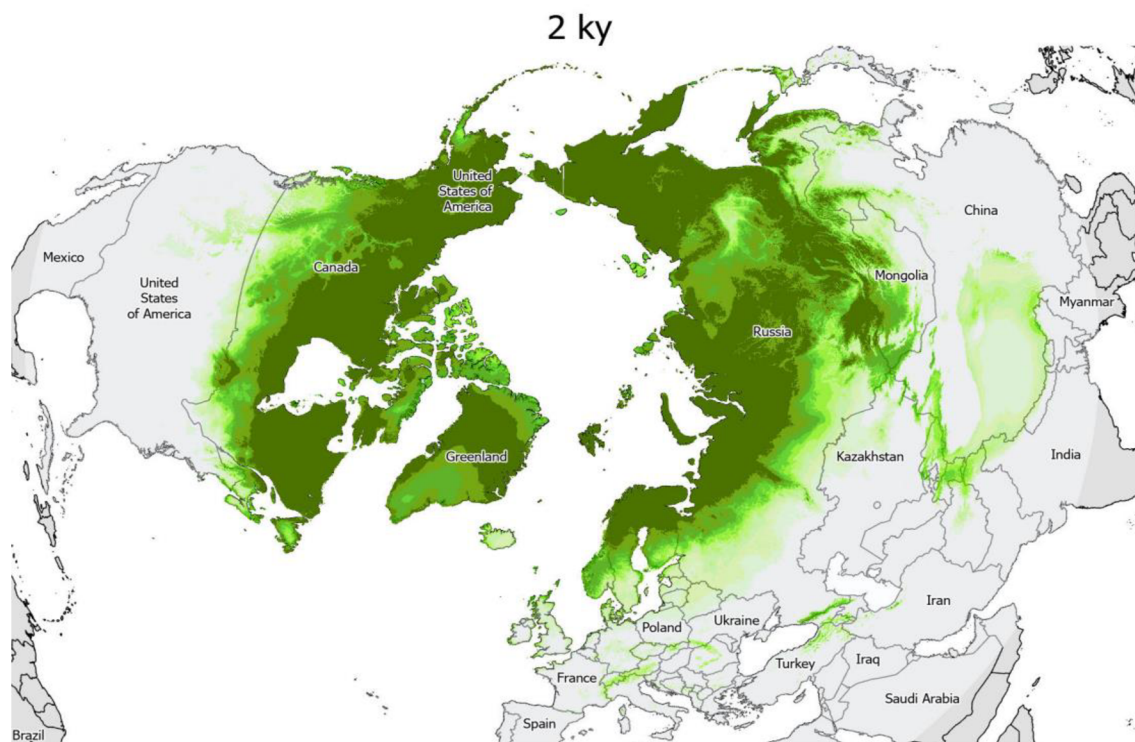
Williams, D., Dunkerley, D., Dedecker, P., Kershaw, P., & Chappell, M. (1998). *Quaternary Environments*. Arnold, London.

Zachos, J. C., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., & Billups, K. (2001). Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to Present. *Science*, 292, 686-693.

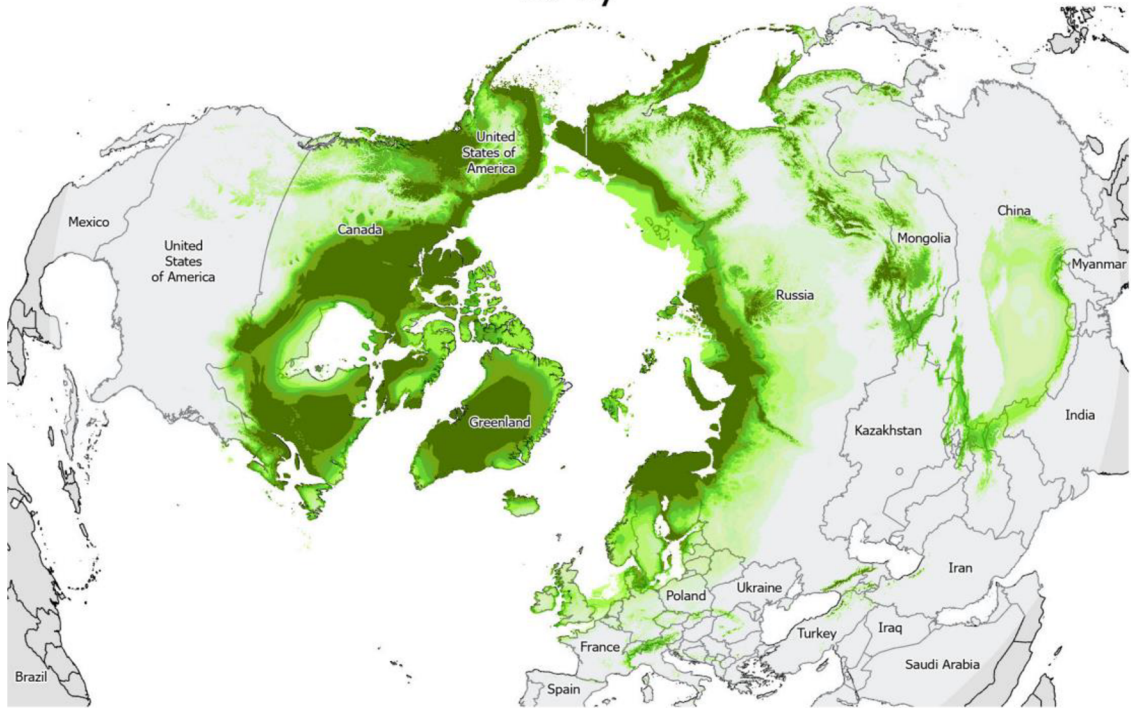
Zang, T., Heginbottom, J. A., Barry, R. G., & Brown, J. (2000). Further statistics on the distribution of permafrost and ground ice in the Northern Hemisphere 1. *Polar Geography*, 24(2), 126-131. DOI: 10.1080/10889370009377692.

8 PŘÍLOHY

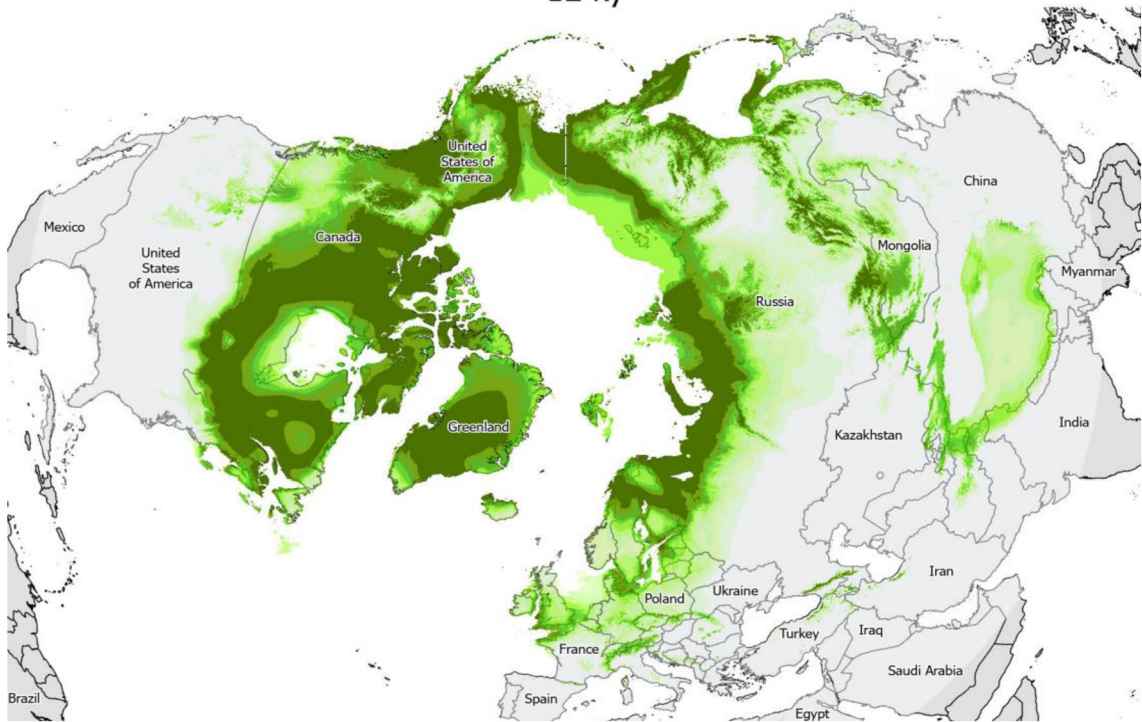
Příloha 1 Modely klimatického vývoje v různých časových obdobích (označeno v každé mapě samostatně)



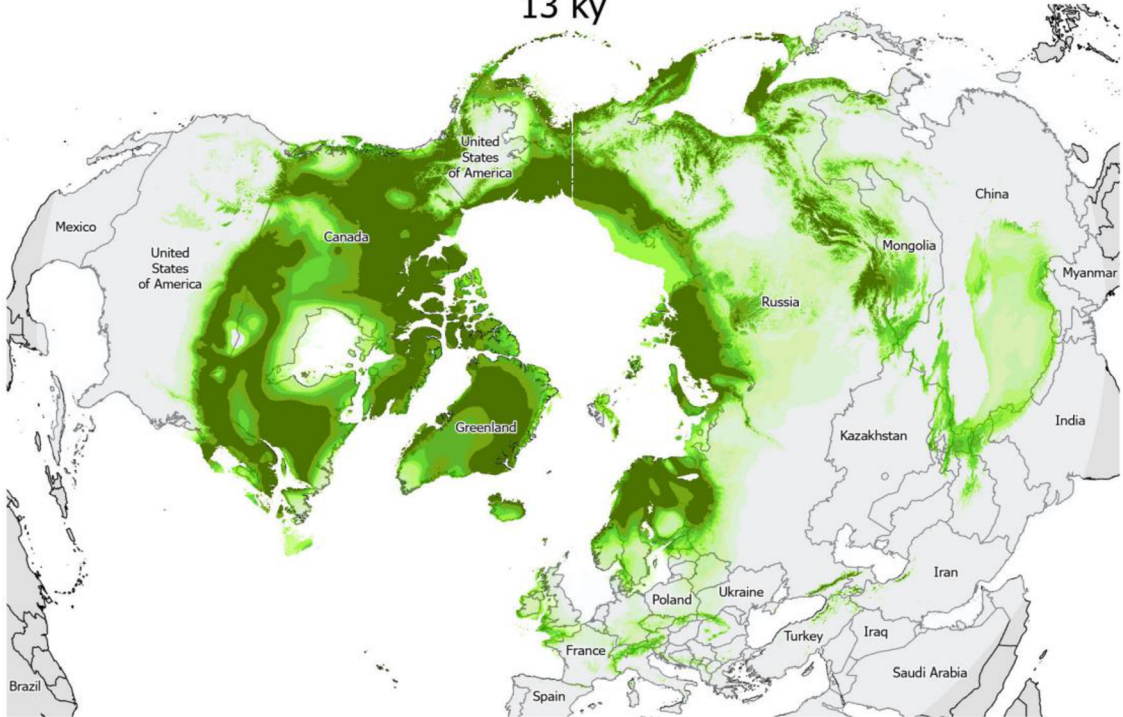
10 ky



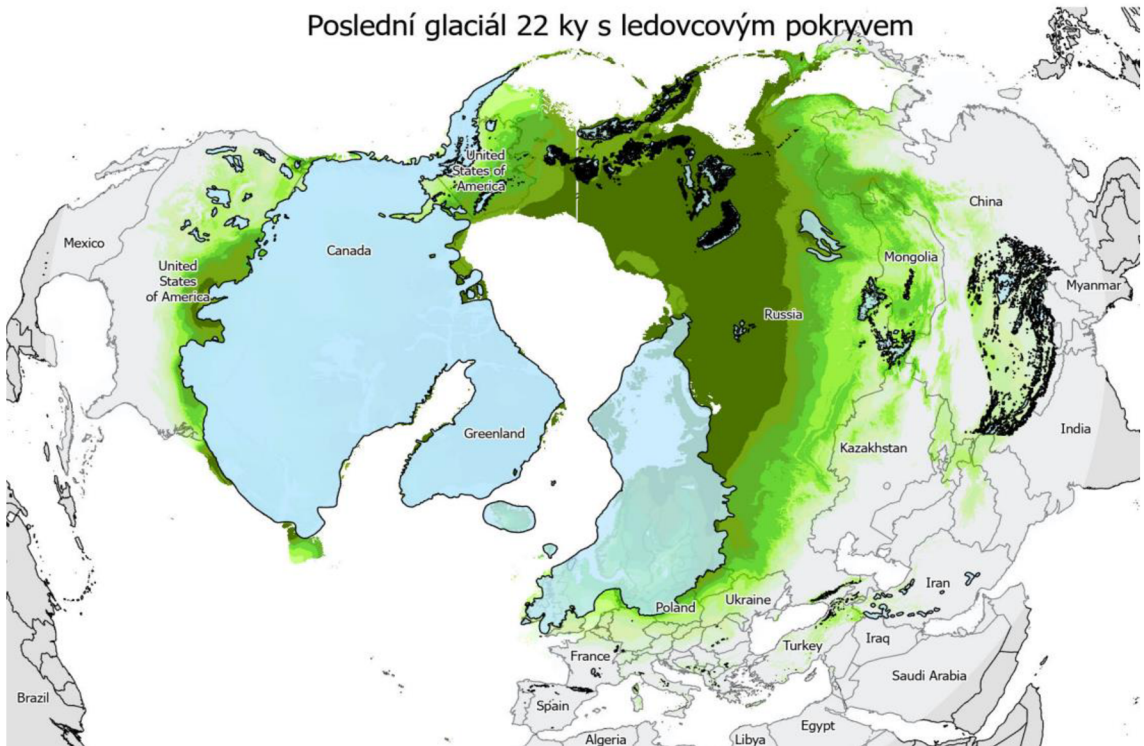
12 ky



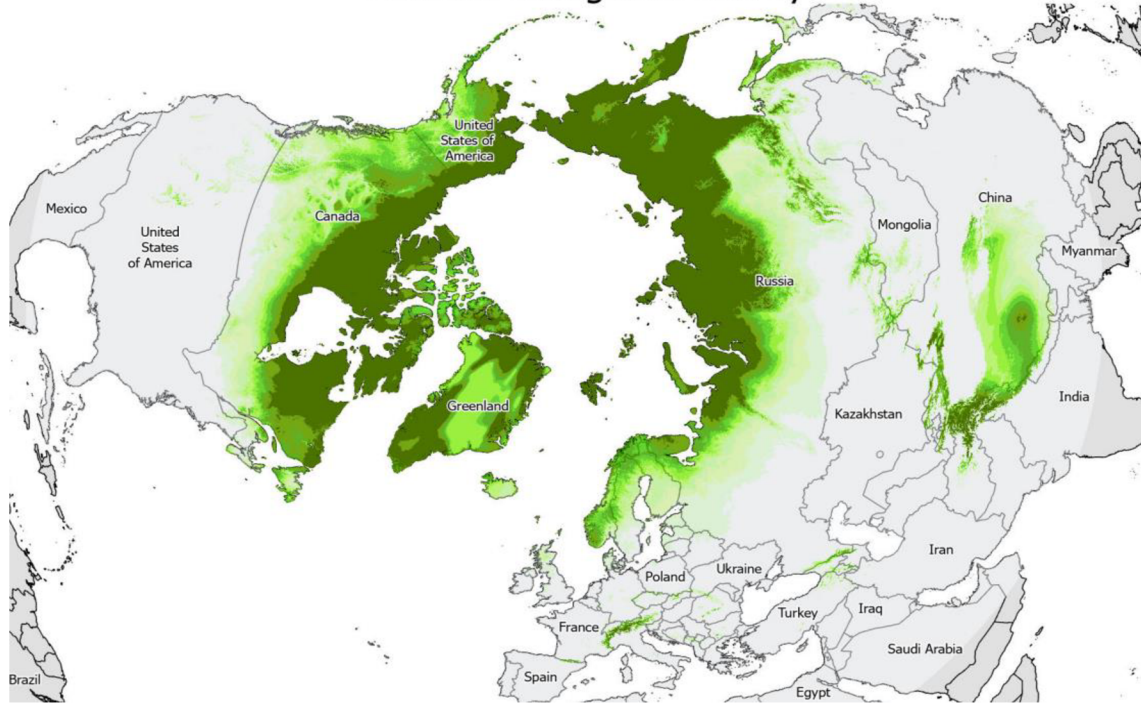
13 ky



Poslední glaciál 22 ky s ledovcovým pokryvem



Poslední interglaciál 130 ky



Příloha 2 Tabulka výpočtů vhodné škálovací konstanty k tvorbě klimatických map

rm	fc	auc.train	AICc	delta.AICc	w.AIC	ncoef
0.5	LQHPT	0.971493469433364	12577.856122773	1065.34841250796	4.43871876810554e-232	219
1	LQHPT	0.957793171994583	11780.1348404928	267.627130227755	7.41708276258991e-59	106
01.V	LQHPT	0.952176750816679	11597.9085353891	85.4008251240411	2.75532293435303e-19	74
2	LQHPT	0.948659503766001	11531.4716381086	18.9639278435916	7.35802821733663e-05	67
02.V	LQHPT	0.94512285912789	11521.9554345445	9.44772427947464	0.0085739075683985	54
3	LQHPT	0.942185354056514	11512.507710265	0	0.965441710212433	40
03.V	LQHPT	0.940940903200848	11519.7439618282	7.2362515631994	0.0259056203165328	34
4	LQHPT	0.939646045938405	11536.7805212324	24.2728109673499	5.17549777385141e-06	31
04.V	LQHPT	0.938628902022786	11550.2599043932	37.7521941281575	6.12267578833718e-09	26
5	LQHPT	0.937910644876892	11577.4821605452	64.9744502801586	7.51109832374693e-15	31
05.V	LQHPT	0.937086520616494	11578.3706994718	65.8629892067911	4.81681171816725e-15	25
6	LQHPT	0.936354603197761	11587.514144657	75.0064343920003	4.98064715461091e-17	23
06.V	LQHPT	0.935459582121326	11615.4838260515	102.97611578648	4.20481246378286e-23	24
7	LQHPT	0.934464158039521	11622.0890227057	109.58131244069	1.54684358817134e-24	21
07.V	LQHPT	0.933291150410805	11652.4136008829	139.90589061792	4.02298040525389e-31	19
8	LQHPT	0.933093896071005	11653.9908042695	141.483094004529	1.82836354480244e-31	18
08.V	LQHPT	0.932502679462517	11673.679700073	161.171989808021	9.69779841473607e-36	17
9	LQHPT	0.932138769794077	11680.5166870386	168.008976773628	3.17716885281866e-37	16
09.V	LQHPT	0.931746173552674	11686.451488573	173.943778307972	1.63423503801485e-38	15
10	LQHPT	0.931389367226109	11695.0703066245	182.562596359472	2.19665552651878e-40	14
10.V	LQHPT	0.931075180950804	11702.4486894136	189.940979148583	5.48992601921855e-42	13
11	LQHPT	0.930748700429943	11707.9514231237	195.443712858641	3.50479845903035e-43	12
11.V	LQHPT	0.93043178210007	11715.6447809512	203.137070686207	7.48292897881296e-45	13
12	LQHPT	0.930062135117037	11720.3912211667	207.883510901684	6.97260761986852e-46	12
12.V	LQHPT	0.929684018764844	11725.7255668935	213.217856628457	4.84235660898164e-47	12
13	LQHPT	0.929375296598674	11734.1333946292	221.625684364182	7.23302846314156e-49	13
13.V	LQHPT	0.929042805557764	11737.3229532709	224.815243005927	1.4679670760248e-49	12
14	LQHPT	0.928525354422609	11738.972521389	226.464811124022	6.43453473455282e-50	11
14.V	LQHPT	0.928116365853798	11745.7094616076	233.20175134258	2.21620111321184e-51	10
15	LQHPT	0.927744533227111	11748.1510313196	235.643321054627	6.53776103062628e-52	9
15.V	LQHPT	0.927348931725683	11753.3297583409	240.822048075857	4.9077536850832e-53	10
16	LQHPT	0.926998409124625	11757.4130818326	244.905371567576	6.3708932431693e-54	9
16.V	LQHPT	0.926637231510752	11765.7921786805	253.284468415484	9.65389487919218e-56	11
17	LQHPT	0.926245181680263	11762.5693094321	250.061599167051	4.83659509100654e-55	10
17.V	LQHPT	0.925797397936588	11772.362208153	259.854497888016	3.61442146360339e-57	11
18	LQHPT	0.92533977879647	11776.6417169401	264.134006675084	4.25358647920959e-58	11
18.V	LQHPT	0.924891721847339	11780.0333877121	267.525677447065	7.80303071580159e-59	11
19	LQHPT	0.924387930985023	11783.201256263	270.693545997976	1.60091915484946e-59	11

Příloha 3 Tabulka výpočtů vhodné funkce k tvorbě klimatických map

rm	fc	AICc	delta.AICc	w.AIC	ncoef
	3 L	12594,38	1130,13	3.93610573817844e-246	6
	3 LQ	11561,23	96,98	8.73087297371105e-22	10
	3 H	11464,25	0,00	0.999999999698994	29
	3 LQH	11508,33	44,08	2.67838219774453e-10	27
	3 LQHP	11533,71	69,46	8.27375853467761e-16	36
	3 LQHPT	11512,51	48,26	3.31672159149166e-11	40

Příloha 4: Přehled studovaného materiálu s označením vzorku, uvedením druhu, lokality a souřadnic

Kód vzorku	Druh	Latituda	Longituda	Konkrétní lokalita	Země
lcl_FJ6633661_cds_ACP296291_1	freija	50,300000	87,800000	Altai	Russia
lcl_FJ6633671_cds_ACP296301_1	freija	50,300000	87,800000	Altai	Russia
lcl_FJ6633681_cds_ACP296311_1	freija	50,300000	87,800000	Altai	Russia
lcl_HM3756651_cds_ADJ083111_1	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
lcl_HM3756661_cds_ADJ083121_1	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
lcl_HM3756671_cds_ADJ083131_1	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
lcl_HM3756681_cds_ADJ083141_1	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
lcl_HM3756701_cds_ADJ083161_1	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
lcl_HM3756711_cds_ADJ083171_1	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
lcl_HM3756721_cds_ADJ083181_1	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
lcl_HM3757731_cds_ADJ084191_1	freija	58,632000	-93,786000	Manitoba	Canada
lcl_HM3757781_cds_ADJ084241_1	freija	58,632000	-93,786000	Manitoba	Canada
lcl_HM3757801_cds_ADJ084261_1	freija	58,632000	-93,786000	Manitoba	Canada
lcl_HM3758101_cds_ADJ084561_1	freija	58,620000	-93,830000	Manitoba	Canada
lcl_HM3868851_cds_ADJ302201_1	freija	68,997000	20,744000	Kiruna_Municipality	Sweden
lcl_HM3868861_cds_ADJ302211_1	freija	68,997000	20,744000	Kiruna_Municipality	Sweden
lcl_HM4302401_cds_ADM206421_1	freija	58,620000	-93,830000	Manitoba	Canada
lcl_HM4302411_cds_ADM206431_1	freija	58,620000	-93,830000	Manitoba	Canada
lcl_HM4302421_cds_ADM206441_1	freija	58,620000	-93,830000	Manitoba	Canada
lcl_HM4302441_cds_ADM206461_1	freija	58,620000	-93,830000	Manitoba	Canada
lcl_HM4302481_cds_ADM206501_1	freija	58,620000	-93,830000	Manitoba	Canada
lcl_HM4302511_cds_ADM206531_1	freija	58,620000	-93,830000	Manitoba	Canada
lcl_HM4302761_cds_ADM206781_1	freija	58,632000	-93,786000	Manitoba	Canada
lcl_HM8711211_cds_ADR131431_1	freija	65,882000	26,342000	Ranua	Finland
lcl_HM8732151_cds_ADP570531_1	freija	69,891000	27,078000	Utsjoki	Finland
lcl_HQ1612241_cds_ADW538871_1	freija	50,941910	-114,806884	Moose_Mountain	USA
lcl_HQ1612321_cds_ADW538951_1	freija	58,644981	-124,718593	Stone_Mountain	Canada
lcl_HQ1612391_cds_ADW539021_1	freija	58,644981	-124,718593	Stone_Mountain	Canada
lcl_HQ1612401_cds_ADW539031_1	freija	58,644981	-124,718593	Stone_Mountain	Canada
lcl_HQ1612731_cds_ADW539361_1	freija	56,800789	118,231962	Chara_district	Russia
lcl_HQ1612741_cds_ADW539371_1	freija	50,294989	88,330647	Altai	Russia
lcl_KT1334911_cds_AOA827211_1	freija	58,632000	-93,788000	Manitoba	Canada
lcl_KT1346471_cds_AOA838771_1	freija	58,769000	-93,929000	Manitoba	Canada
lcl_KU8744081_cds_AQZ228061_1	freija	68,489000	-149,203000	Alaska	USA
lcl_KU8744091_cds_AQZ228071_1	freija	64,704000	148,300000	Alaska	USA
lcl_MW5000771_cds_QUA021451_1	freija	69,045611	20,855389	Enontekiö	Finland
lcl_MW5001341_cds_QUA022021_1	freija	66,900000	65,666694	Enontekiö	Finland
lcl_MW5012111_cds_QUA032791_1	freija	66,900000	65,666694	Enontekiö	Finland
lcl_MW5013601_cds_QUA034281_1	freija	66,900000	65,666694	Enontekiö	Finland
lcl_MW5014071_cds_QUA034751_1	freija	69,941611	23,035389	Alta	Norway
lcl_MW5017521_cds_QUA038201_1	freija	65,927111	26,451000	Ranua	Finland
lcl_MW5022681_cds_QUA043361_1	freija	69,045611	20,855389	Enonteki	Finland
lcl_MW5032811_cds_QUA053491_1	freija	69,872806	27,130111	Lapland	Finland

Kód vzorku	Druh	Latituda	Longituda	Konkrétní lokalita	Země
LH1_10	freija	64,869652	-147,736836	Fairbanks	USA
LH1_11	freija	64,869652	-147,736836	Fairbanks	USA
LH1_12	freija	65,490675	-145,402703	Fairbanks	USA
LH1_13	freija	64,869652	-147,736836	Fairbanks	USA
LH1_14	freija	64,869652	-147,736836	Fairbanks	USA
LH1_15	freija	64,953783	-148,363217	Fairbanks	USA
LH1_16	freija	64,461560	-148,119830	Fairbanks	USA
LH1_17	freija	64,869652	-147,736836	Fairbanks	USA
LH1_18	freija	64,869652	-147,736836	Fairbanks	USA
LH1_19	freija	64,869652	-147,736836	Fairbanks	USA
LH1_1	freija	64,703966	-148,301193	Fairbanks	USA
LH1_20	freija	64,869652	-147,736836	Fairbanks	USA
LH1_21	freija	64,869652	-147,736836	Fairbanks	USA
LH1_22	freija	64,869652	-147,736836	Fairbanks	USA
LH1_23	freija	64,889038	-147,923875	Fairbanks	USA
LH1_25	freija	58,697833	-156,653833	Chandalar resting site	USA
LH1_26	freija	58,716167	-156,626333	King Salmon	USA
LH1_27	freija	57,906583	-153,471825	Ugamik Island	USA
LH1_28	freija	58,697833	-156,653833	Chandalar resting site	USA
LH1_29	freija	58,736333	-156,654333	King Salmon	USA
LH1_2	freija	64,457450	-148,114540	Wood River Buttes	USA
LH1_30	freija	69,372937	-148,700792	Sagwon Bluffs	USA
LH1_31	freija	58,701000	-156,656833	King Salmon	USA
LH1_32	freija	58,697833	-156,653833	Galbraith Lake env.	USA
LH1_33	freija	68,031550	-149,667317	Chandalar shelf env.	USA
LH1_34	freija	58,707167	-156,646667	King Salmon	USA
LH1_36	freija	64,852560	-165,933870	Seward peninsula	USA
LH1_37	freija	64,935480	-166,211260	Seward peninsula	USA
LH1_38	freija	69,372937	-148,700792	Sagwon Bluffs	USA
LH1_39	freija	58,697833	-156,653833	Galbraith lake	USA
LH1_3	freija	64,461190	-148,118430	Wood River Buttes	USA
LH1_40	freija	58,697833	-156,653833	Chandalar shelf env.	USA
LH1_42	freija	57,906583	-153,471825	Ugamik Island	USA
LH1_43	freija	58,697833	-156,653833	Chandalar resting site	USA
LH1_45	freija	68,031550	-149,667317	Chandalar shelf env.	USA
LH1_46	freija	68,031550	-149,667317	Chandalar shelf env.	USA
LH1_48	freija	49,836547	-114,421705	Racehorse Creek	Canada
LH1_4	freija	64,869652	-147,736836	Fairbanks	USA
LH1_5	freija	60,529870	-150,514040	Kenai peninsula	USA
LH1_6	freija	64,460960	-148,118270	Wood River Buttes	USA
LH1_7	freija	68,451635	-149,490124	Galbraith Lake	USA
LH1_8	freija	64,874968	-147,844582	Fairbanks	USA
LH1_9	freija	64,866428	-147,739986	Fairbanks	USA
LH3_10	freija	58,684881	-124,803442	Northern Rockies	Canada
LH3_11	freija	52,234678	-117,220047	Northern Rockies	Canada
LH3_13	freija	69,475193	90,279617	Lama Lake	Russia

Kód vzorku	Druh	Latituda	Longituda	Konkrétní lokalita	Země
LH3_14	freija	63,062573	139,800142	Yakutia	Russia
LH3_15	freija	62,585569	10,298332	Kvikne	Norway
LH3_16	freija	58,684881	-124,803442	Northern Rockies	Canada
LH3_17	freija	66,665947	-136,320150	Yukon teritory	Canada
LH3_1	freija	69,475193	90,279617	Taymyrsky Dolgano-Nenetsky Distric	Russia
LH3_21	freija	60,067656	-134,724344	Yukon teritory	Canada
LH3_24	freija	49,836798	-114,421472	Racehorse Creek	Canada
LH3_25	freija	62,791453	148,090300	Siberia	Russia
LH3_26	freija	56,800789	118,231962	Siberia	Russia
LH3_27	freija	60,726266	-115,886290	Mile Post	Canada
LH3_28	freija	66,813817	65,793579	Sob river	Russia
LH3_29	freija	49,388569	-113,949793	Whitney Creek	Canada
LH3_2	freija	60,726266	-115,886290	Hay River	Russia
LH3_30	freija	58,629181	-124,655661	Northern Rockies	Canada
LH3_31	freija	63,062573	139,800142	Yakutia	Russia
LH3_33	freija	52,220333	-117,192000	Wilcox Pass Trail	Canada
LH3_36	freija	49,705582	87,422669	Altai	Russia
LH3_37	freija	58,684881	-124,803442	Northern Rockies	Canada
LH3_38	freija	66,813817	65,793579	Sob river	Russia
LH3_39	freija	52,234678	-117,220047	Improvement District No. 12	Canada
LH3_3	freija	50,547323	142,785424	Sakhalin	Russia
LH3_40	freija	58,629181	-124,655661	Northern Rockies	Canada
LH3_42	freija	63,183984	139,832892	Yakutia	Russia
LH3_43	freija	63,062573	139,800142	Yakutia	Russia
LH3_44	freija	62,585569	10,298332	Kvikne	Norway
LH3_47	freija	63,822431	-135,826542	Yukon teritory	Canada
LH3_48	freija	58,963552	126,273395	Yakutia	Russia
LH3_49	freija	50,547323	142,785424	Tumovsk	Russia
LH3_51	freija	50,547323	142,785424	Tumovsk	Russia
LH3_52	freija	49,738250	87,153450	Altai	Russia
LH3_53	freija	59,934454	-127,464100	Northern Rockies	Canada
LH3_5	freija	62,791453	148,090300	Susuman	Russia
LH3_8	freija	62,020864	129,602057	Yakutia	Russia
LH3_9	freija	63,062573	139,800142	Yakutia	Russia
09PROBE-09411	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
09PROBE-09412	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
09PROBE-09413	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
09PROBE-09415	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
09PROBE-0941	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
09PROBE-09521	freija	58,632000	-93,786000	Manitoba	Canada
09PROBE-09529	freija	58,632000	-93,786000	Manitoba	Canada
09PROBE-09595	freija	58,619000	-93,829000	Manitoba	Canada
09PROBE-09596	freija	58,619000	-93,829000	Manitoba	Canada
09PROBE-09598	freija	58,620000	-93,830000	Manitoba	Canada
09PROBE-09606	freija	58,620000	-93,830000	Manitoba	Canada
CCDB-24272-G11	freija	55,817000	-86,633000	Kenora	Canada

Kód vzorku	Druh	Latituda	Longituda	Konkrétní lokalita	Země
CCDB-24272-G12	freija	49,724900	-86,949600	Geraldton	Canada
CCDB-24272-H03	freija	70,730000	-117,770000	Ulukhaktok	Canada
MM23877	freija	69,045600	20,855400	Enontekiö	Finland
MM23878	freija	69,045600	20,855400	Enontekiö	Finland
RVcoll16H102	freija	62,734200	17,062400	Timrå Municipality	Sweden
KN00848	freija	66,900000	65,666700	Krasnyi kamen	Russia
VED19B266	freija	65,015800	25,657400	Kattilavaara	Finland
EZ0239CNC	freija	59,544456	-129,941692	Nickel Creek	Canada
EZ0254CNC	freija	61,038400	-138,388000	Silver City	Canada
EZ0255CNC	freija	61,038400	-138,388000	Silver City	Canada
EZ0256CNC	freija	58,580000	-124,760000	Northern Rockies	Canada
EZ0264CNC	freija	70,740000	-117,770000	Ulukhaktok	Canada
EZ0271CNC	freija	70,740000	-117,770000	Ulukhaktok	Canada
CSG16846	freija	50,560000	97,060000	Tulva	Russia
BIOUG45162-A02	freija	62,534700	-113,976000	North Slave Region	Canada
BIOUG45162-A03	freija	62,534700	-113,976000	North Slave Region	Canada
2015nk17	freija	65,563300	-171,563000	Chukotsky District	Russia
2015nk18	freija	65,563300	-171,563000	Chukotsky District	Russia
2015nk19	freija	65,563300	-171,563000	Chukotsky District	Russia
2017nk22	freija	56,790400	118,248000	Novaya Chara	Russia
2017nk24	freija	56,790400	118,248000	Novaya Chara	Russia
2017nk27	freija	62,784200	148,182000	Susuman	Russia
2017nk28	freija	62,784200	148,182000	Susuman	Russia
BIOUG73656-C04	freija	68,535000	-89,825000	Kugaaruk	Canada
07PROBE-03889	freija	58,632000	-93,788000	Manitoba	Canada
07WNP-10761	freija	58,763117	-93,926533	Manitoba	Canada
MM04095	freija	68,997000	20,744000	Kiruna Municipality	Sweden
MM00671	freija	65,882000	26,342000	Kiruna Municipality	Sweden
MM06344	freija	69,891000	27,078000	Utsojki	Finland
RR-BOFR-NU002	freija	67,167200	-107,654000	Kitikmeot Region	Canada
NHMO-DAR-11918	freija	69,807000	23,487400	Alta	Norway
CNCLEP_81868	freija	64,593000	-127,365000	Sahtu Region	Canada
BIOUG89940-F05	freija	69,523000	-93,504000	Nunavut	Canada
KWPEnto37191	freija	64,704000	-148,300000	Fairbanks	USA
UAMEnto109539	freija	68,489000	-149,203000	Fairbanks	USA
CSG23267	freija	60,688200	-135,232000	Whitehorse	Canada
CSG23268	freija	60,688200	-135,232000	Whitehorse	Canada
CSG23469	freija	60,064500	-130,504000	Rancheria	Canada
CSG23470	freija	60,064500	-130,504000	Rancheria	Canada
CSG23755	freija	65,357300	-140,219000	Yukon territory	Canada
CSG23836	freija	60,095100	-134,697000	Montana	Canada
CSG24303	freija	60,560800	-136,221000	Yukon territory	Canada
09PROBE-09410	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
09PROBE-09417	freija	58,660000	-94,170000	Manitoba	Canada
09PROBE-09527	freija	58,632000	-93,786000	Manitoba	Canada
09PROBE-09559	freija	58,619000	-93,829000	Manitoba	Canada

Kód vzorku	Druh	Latituda	Longituda	Konkrétní lokalita	Země
09PROBE-09594	freija	58,619000	-93,829000	Manitoba	Canada
09PROBE-09603	freija	58,620000	-93,830000	Manitoba	Canada
09PROBE-09632	freija	58,632000	-93,786000	Manitoba	Finland
MM23876	freija	69,872800	27,130100	Northern Lapland	Finland
MM23879	freija	65,927100	26,451000	Northern Lapland,	Finland
KN00846	freija	66,900000	65,666700	Krasnyi kamen	Russia
KN00847	freija	66,900000	65,666700	Krasnyi kamen	Russia
RVcoll16H170	freija	69,941600	23,035400	Kafjord	Norway
EZ1200CNC	freija	65,317000	-126,683000	Sahtu Region	Canada
EZ0253CNC	freija	61,038400	-138,388000	Silver city	Canada
EZ0265CNC	freija	70,740000	-117,770000	Ulukhaktok	Canada
EZ0270CNC	freija	70,740000	-117,770000	Ulukhaktok	Canada
CSG16809	freija	64,700000	177,500000	Chukotka	Russia
CSG16810	freija	64,700000	177,500000	Chukotka	Russia
BIOUG45162-A01	freija	62,534700	-113,976000	North Slave Region	Canada
2017nk23	freija	56,790400	118,248000	Novaya Chara	Russia
2017nk25	freija	62,784200	148,182000	Susuman	Russia
2017nk26	freija	62,784200	148,182000	Susuman	Russia
BIOUG73656-C03	freija	68,535000	-89,825000	Kugaaruk	Canada
MM04096	freija	68,997000	20,744000	Kiruna Municipality	Sweden
RR-BOFR-NU001	freija	66,792200	-107,661000	Kitikmeot Region	Canada
2005-LOWA-87	freija	50,300000	87,800000	Altaj	Russia
2005-LOWA-88	freija	50,300000	87,800000	Altaj	Russia
2005-LOWA-773	freija	50,300000	87,800000	Altaj	Russia
CSG22842_C_BC	freija	53,573000	-123,413000	Bulkley-Nechako	Canada
CNCLEP_81864	freija	64,593000	-127,362000	Sahtu Region	Canada
CNCLEP_81865	freija	65,190000	-126,410000	Sahtu Region	Canada
CNCLEP_81866	freija	64,593000	-127,362000	Sahtu Region	Canada
CNCLEP_81867	freija	61,376000	-123,123000	Dehcho Region	Canada
CNCLEP_81869	freija	64,593000	-127,362000	Sahtu Region	Canada
CNCLEP_81895	freija	65,182000	-126,476000	Norman_Wells	Canada
CNCLEP_81896	freija	63,470000	-128,460000	Sahtu Region	Canada
BIOUG58253-B07	freija	59,797000	-112,011000	Wood Buffalo	Canada
CSG23269	freija	60,688200	-135,232000	Whitehorse	Canada
CSG23468	freija	60,064500	-130,504000	Rancheria	Canada
CSG23822	freija	59,922500	-130,350000	Rancheria	Canada
HQ1612911	natazhati	58,586665	-124,766052	Northern Rockies	USA
CCDB-24272-H01	natazhati	58,580000	-124,740000	Northern Rockies	USA
CCDB-24272-H02	natazhati	60,390000	-138,520000	Yukon teritory	Canada
CCDB-24272-H04	natazhati	68,917630	-114,314294	Nunavut	Canada
EZ1201CNC	natazhati	64,933000	-127,616000	Sahtu Region	Canada
EZ1202CNC	natazhati	64,932000	-127,341000	Sahtu Region	Canada
EZ1203CNC	natazhati	64,933000	-127,616000	Sahtu Region	Canada
EZ0258CNC	natazhati	68,917630	-114,314294	Nunavut	Canada
EZ0259CNC	natazhati	68,917630	-114,314294	Nunavut	Canada
Kód vzorku	Druh	Latituda	Longituda	Konkrétní lokalita	Země
EZ0260CNC	natazhati	60,333515	-133,878444	Yukon teritory	USA
EZ0261CNC	natazhati	60,333515	-133,878444	Yukon teritory	USA
EZ0262CNC	natazhati	60,333515	-133,878444	Yukon teritory	USA
EZ0263CNC	natazhati	60,333515	-133,878444	Yukon teritory	USA
EZ0266CNC	natazhati	70,740000	-117,770000	Ulukhaktok	Canada
EZ0267CNC	natazhati	70,740000	-117,770000	Ulukhaktok	Canada
EZ0268CNC	natazhati	70,740000	-117,770000	Ulukhaktok	Canada
EZ0269CNC	natazhati	70,740000	-117,770000	Ulukhaktok	Canada
EZBNA692-07	natazhati	70,740000	-117,770000	Ulukhaktok	Canada
EZ0272CNC	natazhati	70,740000	-117,770000	Ulukhaktok	Canada
EZ0274CNC	natazhati	68,917630	-114,314294	Nunavut	Canada
ENT002-002470	natazhati	58,616000	-124,684000	Northern Rockies	Canada
ENT002-002471	natazhati	58,616000	-124,684000	Northern Rockies	Canada
ENT002-002472	natazhati	58,616000	-124,684000	Northern Rockies	Canada
ENT002-002473	natazhati	58,616000	-124,684000	Northern Rockies	Canada
ENT002-002474	natazhati	58,616000	-124,684000	Northern Rockies	Canada
ENT002-002475	natazhati	58,616000	-124,684000	Northern Rockies	Canada
CSG24274	natazhati	60,075000	-134,723000	Yukon teritory	USA
CSG24275	natazhati	60,074500	-134,724000	Yukon teritory	USA

Příloha 5 Fylogenetický strom vytvořený pomocí metody maximum likelihood ze sekvencí COI perleťovce *Boloria freija*.





natashah_EZ0263CNC_White_Mts
 freija_09PROBE-09596_Canada
 natashah_EZ0274CNC_Bernard_Harbour
 natashah_EZ0259CNC_Bernard_Harbour
 freija_CNCLP_81864_Jawbone_Lake_Grassy_meadow_lake_shore_Canada
 freija_CSG23755_Mt_Klotz_4_-_7_km_W_herbacious_meadow_Canada
 freija_09PROBE-09596_Canada
 freija_09PROBE-09410_Canada
 natashah_ENT002-002470_Summit_Lake_south_ridge_of_Mt_St_Paul
 natashah_CCDB-24272-H01_Stone_Mountain_Park_Saint_Paul
 freija_CNCLP_81895_Ski_Club_Memorial_Trail_Norman_Wells_Canada
 freija_CSG23267_Whitehorse_Fish_Lake_Road_at_Jackson_Lake_Road_Canada
 freija_EZ0256CNC_Mt_St_Paul_Stone_Mt_Park_Canada
 natashah_EZ0258CNC_Bernard_Harbour
 freija_09PROBE-09415_Canada
 freija_09PROBE-09417_Canada
 freija_09PROBE-09632_Finland
 freija_CNCLP_81867_Rabbit_Kettle_Lake_Canada
 freija_CCDB-24272-G11_5_km_East_of_mouth_of_Little_Shagamu_River_Kenora_Canada
 freija_CNCLP_81868_Jawbone_Lake_Canada
 freija_CNCLP_81865_Fossil_Canyon_Franklin_Ridge_Canada
 natashah_ENT002-002471_Summit_Lake_south_ridge_of_Mt_St_Paul
 freija_CSG23470_Rancheria_near_Rancheria_River_slide_road_at_br_Canada
 freija_09PROBE-09413_Canada
 natashah_EZ0262CNC_White_Mts
 freija_09PROBE-09594_Canada
 freija_EZ0239CNC_Nickel_Creek_Canada
 freija_CNCLP_81869_Jawbone_Lake_Alpine_hummocky_meadow_Canada
 freija_RR-BOFR-NU001_Tinney_Cove_Baturst_Inlet_NU_Canada
 freija_CNCLP_81866_Jawbone_Lake_Alpine_hummocky_meadow_Canada
 freija_09PROBE-09412_Canada
 freija_CSG23268_Whitehorse_Fish_Lake_Road_at_Jackson_Lake_Road_Canada
 freija_BIOUG89940-F05_Canada
 freija_EZ0264CNC_Holman_Diamond_Jenness_Peninsula_Victoria_Island_Canada
 natashah_EZBNA692-07_Holman_Diamond_Jenness_Peninsula_Victoria_Island
 natashah_EZ0266CNC_Holman_Diamond_Jenness_Peninsula_Victoria_Island
 natashah_EZ0272CNC_Holman_Diamond_Jenness_Peninsula_Victoria_Island
 natashah_EZ0268CNC_Holman_Diamond_Jenness_Peninsula_Victoria_Island
 natashah_CCDB-24272-H02_Kaskawulsh_nunatak_sites
 freija_EZ0265CNC_Holman_Diamond_Jenness_Peninsula_Victoria_Island_Canada
 natashah_EZ0267CNC_Holman_Diamond_Jenness_Peninsula_Victoria_Island
 natashah_EZ0269CNC_Holman_Diamond_Jenness_Peninsula_Victoria_Island
 freija_EZ0271CNC_Holman_Diamond_Jenness_Peninsula_Victoria_Island_Canada
 freija_EZ0270CNC_Holman_Diamond_Jenness_Peninsula_Victoria_Island_Canada
 freija_CCDB-24272-H03_Uluhaktok_Victoria_Island_Canada
 freija_lcl_KU8744091_cds_AQ2228071_1_Fairbanks_North_Star_Borough_School_District
 freija_LH1_10_USA_Alaska_Fairbanks_Creamers_Fields
 freija_LH1_17_USA_Alaska_Fairbanks_Creamer_Fields
 freija_LH1_16_USA_Alaska_Wood_River_Buttes
 freija_LH1_1_USA_Alaska_Bonanza_Creek_Experimenta_forest
 freija_LH1_2_USA_Alaska_Wood_River_Buttes
 freija_LH1_6_USA_Alaska_Wood_Riv_Buttes
 freija_LH3_10_Canada
 freija_LH3_39_Canada
 freija_LH3_33_Canada_Alberta_Wilcox_pass
 freija_LH1_23_USA_Alaska_Fairbanks_Sheep_Creek
 freija_LH1_22_USA_Alaska_Fairbanks_Creamers_Fields
 freija_LH3_11_Canada
 freija_LH1_9_USA_Alaska_Fairbanks_Creamers_Fields
 freija_LH1_3_USA_Alaska_Wood_River_Buttes
 freija_LH1_18_USA_Alaska_Fairbanks_Creamer_Fields
 freija_LH3_47_Canada_Halfway_Lakes_Mt_Haldane_trail
 freija_LH1_19_USA_Alaska_Fairbanks_Creamer_Fields
 freija_LH1_20_USA_Alaska_Fairbanks_Creamer_Fields
 freija_LH1_21_USA_Alaska_Fairbanks_Creamers_Fields
 freija_LH1_8_USA_Alaska_Fairbanks_near_Yankovich_road
 freija_LH1_11_USA_Alaska_Fairbanks_Creamers_Fields
 freija_LH1_15_USA_Alaska_Murphy_Dome
 freija_LH1_14_USA_Alaska_Fairbanks_Creamers_Fields
 freija_LH1_13_USA_Alaska_Fairbanks_Creamers_Fields
 freija_LH1_4_USA_Alaska_Fairbanks_Creamers_Fields
 natashah_EZ1201CNC_Katherine_Creek_Mackenzie_Mts
 freija_LH3_21_Canada
 freija_EZ0254CNC_Silver_City_St_Elias_Range__Canada
 natashah_CSG24274_Montana_Mountain_ridge_to_west_of_saddle
 natashah_EZ1203CNC_Katherine_Creek_Mackenzie_Mts
 freija_CSG23836_Montana_Mountain_Sugarloaf_Hill_west_access_road_Canada
 natashah_EZ0261CNC_White_Mts
 freija_CSG23269_Whitehorse_Fish_Lake_Road_at_Jackson_Lake_Road_Canada
 natashah_CSG24275_Montana_Mountain_ridge_to_west_of_saddle
 natashah_EZ1202CNC_Dodo_Canyon_Mackenzie_Mtns
 freija_EZ0253CNC_Silver_City_St_Elias_Range_Canada
 freija_KWPEnto37191_Bonanza_Creek_Exp_Forest_off_mj_33865_Parks_Hwy_USA
 freija_EZ0255CNC_Silver_City_St_Elias_Range__Canada
 freija_LH1_5_USA_Alaska_Kenai_peninsul_Sterling_Hwy
 freija_LH1_26_USA_Alaska_Alaska_peninsula_King_Salmon
 freija_LH1_29_USA_Alaska_Alaska_peninsula_King_Salmon
 freija_LH1_45_USA_ALASKA_Brooks_Range_Dietrich_riv
 freija_LH1_31_USA_Alaska_Alaska_peninsula_King_Salmon
 freija_LH1_34_USA_Alaska_Alaska_peninsula_King_Salmon
 freija_LH3_28_Russia_Polar_Ural_Mountains_Sob_river
 Finland
 freija_lcl_MW5014071_cds_QUA034751_1_Alta_Norway
 freija_LH3_15_Norsko_Kvikne
 freija_LH3_49_Russia_C_Sakhalin_Tumovsk_distr_Palevo_vill
 freija_LH3_38_Russia_Polar_Ural_Mountains_Sob_River
 freija_LH3_44_Norsko_Kvikne
 freija_CSG16846_South_Siberia_SE_Tuva_Ulin-Khan_River_headwaters_Eussia
 freija_lcl_HM3868861_cds_ADJ302211_1_Kiruna_Municipality_Sweden
 freija_MM23877_Saana_Finland
 freija_MM04096_Finland
 freija_VED19B265_N_of_Kattilavaara_bog_Finland
 freija_MM04095_Finland
 freija_RVcoll16H102_Paddus_to_Lappporten_path_Sweden
 freija_MM06344_Utsjoki_Finland
 freija_MM23876_Alligas_Finland
 freija_MM23879_Finland
 freija_NHMO-DAR-11918_Alta_Norway
 freija_RVcoll16H170_Kafjord_Norway
 freija_MM23878_Pikku-Malla_Finland
 freija_lcl_MW5012111_cds_QUA032791_1_Priuralsky_District_Yamaio-Netets_Autonomoust
 freija_lcl_MW5013601_cds_QUA034281_1_Priuralsky_District_Yamaio-Netets_Autonomoust
 freija_LH3_1_Russia_N_Siberia_Lama_lake
 freija_LH3_51_Russia_C_Sakhalin_Tumovsk_distr_Palevo_vill
 freija_LH3_3_Russia_C_Sakhalin_Palevo_vill
 freija_KNO0848_Krasnyi_Kamen_Russia
 freija_KNO0847_Krasnyi_Kamen_Russia

