

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Využití termální kamery pro studium termoregulace  
horských motýlů rodu *Erebia***

Bakalářská práce

**Tomáš Svozil**

Školitelka: Mgr. Irena Slámová

České Budějovice 2012

Svozil T. (2012) Využití termální kamery pro studium termoregulace horských motýlů rodu *Erebia*. [The use of thermal camera for the study of thermoregulation of alpine butterflies of the genus *Erebia*. Bc. Thesis, in Czech.] – 37 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Comparative thermoregulation of seven species of the butterfly genus *Erebia* Dalman, 1816 were examined in constant conditions by using thermal camera. This thesis evaluated use of thermal camera in studies of physiological characteristics of butterflies differing in habitat preferences and morphology.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a 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 bakalářské 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.

České Budějovice, 27. 4. 2012

.....  
Tomáš Svozil

**Poděkování:**

Chtěl bych poděkovat své školitelce Ireně Slámové za odborné vedení této práce, GAJU (106/2010/P), GAČR (P505/10/2248), Petru Vlášánkovi, Aleně Bartoňové a Michalu Zapletalovi za nemalou pomoc a podporu. A hlavně Janovi Okrouhlíkovi za odpovědi na všemožné fyziologicky či technicky orientované otázky. Janu Klečkovi a Zdeňkovi Faltýnkovi Fricovi za rady se statistickým zpracováním dat. Za všeobecnou podporu a trpělivost bych rád poděkoval své rodině a všem přátelům.

## Obsah

Úvod .....	1
Termoregulační přizpůsobení motýlů.....	1
Fyziologická přizpůsobení .....	1
Behaviorální přizpůsobení .....	2
Morfologická přizpůsobení .....	4
Výber mikroklimatu .....	5
Geneticky fixované reakce na změnu klimatu .....	6
Cíle práce.....	8
Metodika.....	9
Studované druhy .....	9
Lokality .....	10
Průběh pokusu.....	10
Pokusné podmínky, aparatura .....	10
Měření povrchové teploty hrudi.....	11
Zpracování dat .....	12
Zpracování snímků z termální kamery.....	12
Rychlost ohřevu, asymptotická teplota .....	13
Regresní analýzy závislosti rychlosti ohřívání na hmotnosti, ploše křídel a W-L.....	13
Klasifikace druhů podle hmotnosti těla a plochy křídel.....	14
Klasifikace druhů podle rychlosti ohřevu a asymptotické teploty těla .....	14
Výsledky.....	15
Observační pozorování .....	15
Parametry asymptotické exponenciely .....	16
Regresní analýzy závislosti rychlosti ohřívání na hmotnosti, ploše křídel a W-L.....	17
Zhodnocení vlivu změny okolní teploty .....	18
Klasifikace druhů podle hmotnosti těla a plochy křídel .....	19
Klasifikace druhů podle rychlosti ohřevu a asymptotické teploty těla .....	20
Diskuze .....	25
Podmínky pokusu.....	25
Zpracování snímků z termální kamery .....	26
Závěr.....	27
Literatura .....	28

# Úvod

## Termoregulační přizpůsobení motýlů

Motýli jsou vysoce závislí na počasí a klimatických podmínkách. Tyto podmínky ovlivňují jejich tělesnou teplotu, ta zase ovlivňuje metabolismus, letovou aktivitu, množství nakladených vajec a načasování snůšky, což jsou základní složky fitness (Magnuson et al. 1979, Tracy & Christian 1986). Hodnota tělesné teploty nezbytná k aktivaci bývá udržována buď endotermně (pomocí metabolismu, často noční motýli) nebo ektotermně (z prostředí, denní motýli). U ektotermních denních motýlů je prostředí hlavním zdrojem tepla (Heinrich 1995, Wickmann 2009). Teplota těla je závislá na slunečním záření, teplotě vzduchu a rychlosti větru (Kingsolver 1985a) a je regulována pomocí absorbování slunečního záření, konvekcí od podkladu a výběrem vhodného mikrohabitatu (Heinrich 1995). Některé druhy denních motýlů se za určitých podmínek, s cílem dosažení tělesné teploty umožňující let, mohou zahřívat třesením křídelních svalů (endotermě) (Wickmann 2009).

Motýli musí udržovat tělesnou teplotu v rozmezí kritických hodnot (28–42°C) nutných k aktivaci pohybového aparátu (Kingsolver 1985a). K dosažení této teploty využívají mimo jiné sluneční záření (Shreeve 1992). Pro maximalizaci času stráveného v aktivním stavu, mnoho druhů optimalizovalo termoregulaci svou fyziologií, chování i morfologií (Van Dyck 2003).

## Fyziologická přizpůsobení

Termoregulační přizpůsobení hmyzu nacházíme již na molekulární úrovni. Byla prokázána významná souvislost mezi přítomností různých forem alel glykolytického enzymu fosfoglukozové izomerázy (PGI) a rozdílností v metabolismu letu, letové vykonosti a aktivitě (Watt 1992, 2003, Haag et al. 2005, Saastamoinen 2007). PGI je enzym, který katalyzuje přeměnu glukózy-6-fosfátu na fruktosa-6-fosfát v druhém kroku glykolýzy a minimalizuje zpoždění reakce na změnu metabolických požadavků (Watt 1992). Zvýšená variabilita alel PGI koreluje se zvýšenou chladovou odolností a vede ke zvýšené letové vykonosti, aktivitě či plodnosti (Haag et al. 2005, Saastamoinen 2007). U motýlů rodu *Cotias* Fabricius, 1807 se jedinci s různými genotypy PGI liší v jejich metabolické kapacitě, což vede k rozdílům v letových výkonech (Watt et al. 1983). Plodnost samic a úspěch samců na spáření jsou přímo ovlivněny letovou vykoností a tím pádem i genotypem PGI (Watt

1992). Samice rodu *Colias* s určitým genotypem PGI jsou schopné létat při nižších teplotách, což zvyšuje dobu, po kterou mohou létat (Kingsolver 1983b) a poskytuje jim více času na kladení vajíček (Watt 1992), což zvyšuje jejich reprodukční schopnosti. Ze stejných důvodů mají samci rodu *Colias* nesoucí pohybově výkonnější genotyp značnou výhodu v úspěšnosti páření ve srovnání s jinými samci (Watt et al. 1985). Jiná studie (Saastamoinen & Hanski 2008) se zaměřila na vliv nízké teploty na načasování kladení vajíček a velikost snůšky hnědáka kostkovaného (*Melitaea cinxia*, Linnaeus 1758). Jedinci s různými formami PGI byli pozorováni při kladení a jejich teplota hrudi byla změřena termální kamerou. Zvýšený bodový polymorfismus (single nucleotide polymorphism) na úrovni DNA enzymu PGI měl pozitivní vliv na teplotu hrudi při nízké teplotě prostředí. Samice schopné létat při nižší okolní teplotě začali v odpoledních hodinách klást dříve, kdy byly podmínky příznivější, a jejich snůšky byly obecně větší. To ukazuje, že fyziologické a molekulární rozdíly mají vliv na celkovou fitness jedince.

## Behaviorální přizpůsobení

K dosažení optimálních teplot těla v teplotně rozmanitém prostředí slouží různé strategie chování – motýli aktivně vyhledávají teplotně vhodné mikroklima, sluní se a přejímají teplo od okolních předmětů. Například některé druhy slunící se dorzálně sedají na pevný podklad (země, kmen, velký list) a využívají tak sálavého tepla (Wasserthal 1975). Množství dopadajícího záření motýli ovlivňují změnou orientace těla ke slunci a změnou úhlu svíraného křídly. Slunění probíhá v typických postojích, které vedou ke zvýšení tepelného účinku z přímého slunečního záření. Nejvíce tepla ze slunečního záření je přijímáno bází křídel a poté je teplo vedeno do hrudi (Wasserthal 1975). U denních motýlů rozlišujeme čtyři hlavní postoje při slunění: odrazové, laterální, dorzální a tělní (Kingsolver 1985a).

Při odrazovém slunění slouží horní křídla jako kolektory soustřeďující teplo na tělíčko a melanizovanou bazální část křídel. Hřbetní strana těla je orientovaná ke slunci a křídla svírají úhel v rozmezí 10° - 60°. Tento způsob slunění využívají některé druhy rodů *Pieris* Schrank, 1801 a *Pontia* Fabricius, 1807, které mají velká bílá a vysoce reflexní místa na křídlech (Kingsolver 1985b, 1985c, 1987, 1988). U druhu *Lycaena virgaureae* (Linnaeus, 1758) byl v některých případech pozorován úhel křídel i nad 90° (Douwes 1976a).

Laterálně (bočně) slunící se druhy uzavírají křídla nad hřbetem tak, že bazální části křídla tlačí na tělo (Watt 1968). Boční strana těla a spodní strana křídel jsou orientovány kolmo ke slunečním paprskům. Teplo je absorbováno boční částí těla a bazální částí spodní strany křídel vystavených slunci a je odváděno do hrudi (Watt 1968, Kingsolver 1985a). Zástupci rodu *Colias* otáčejí podélnou osu těla ke slunci v závislosti na teplotě těla a redukují příjem tepla tím, jakou plochu křídel vystavují slunečním paprskům (Kingsolver & Moffat 1983). *Hipparchia semele* (Linnaeus, 1758) naproti tomu křídla naklání a při chladném počasí je dokonce složená pokládá na povrch. Naopak při vysokých teplotách zjevně zabraňuje kontaktu těla a křídel s horkým povrchem (Findlay et al. 1983, Shreeve 1990, Dreisig 1995).

Druhy slunící se dorzálně rozevírají křídla v úhlu 180° a vystavují slunci horní stranu křídel a těla. Pokud nechá motýl křídla otevřená po delší dobu, dojde nejen k zahřátí křídel a těla, ale i vzduchu okolo a minimalizuje konvektivní tepelnou ztrátu (Vielmetter 1958, Tracy et al. 1979, Rawlins 1980). Druhy usedající na pevný podklad navíc zachycují i teplo sálající z podkladu, sekundárně se zahřívají a redukují tak konvektivní ztrátu tepla (Waaserthal 1975). Existují i případy motýlů, např. *Hypolimnas bolina* (Linnaeus, 1758), kteří křídla aktivně přitisknou k substrátu (Kemp & Krockenberger 2002). Některé dorzálně slunící se druhy motýlů (včetně rodu *Erebia*), které obvykle sedají na trávu a jiný nízký porost, svírají křídla do písmene “V“ a směřují je kolmo ke slunečním paprskům pro zvýšení tepelného zisku. Částečně zvednutá křídla snižují proudění vzduchu nad celým tělem, čímž se snižuje konvektivní tepelná ztráta z povrchu těla a zvyšuje se rychlost tepelného zisku ze slunce (Heinrich 1990).

Slunění tělíčka někdy bývá zařazeno mezi dorzální zahřívání. Kingsolver (1985a) toto chování pozoroval u *Lycaenidae* Leach, 1815, *Satyrinae* Boisduval, 1833 a *Hesperiidae* Latreille 1809. Pozice těla ke slunci je podobná, avšak křídla svírají úhel pod 10° a nezachycují téměř žádné sluneční záření, které je tak zachycováno pouze tělíčkem (Kingsolver 1985a).

Většina druhů používá jediný postoj, avšak existují i výjimky, např. *Agriades glandon* (de Prunner, 1798), u kterých sledujeme kombinace postojů. Nejčastějším případem je kombinace laterálního slunění v ranních a večerních hodinách spolu se sluněním dorzálním využívaným uprostřed dne (Heinrich 1986). Nezávisle na ohřívacích mechanismech se při vysokých teplotách vzduchu motýli chovají stejně. Aby zabránili přehřátí, svírají křídla k sobě a natočí je spolu s tělem rovnoběžně ke slunečním paprskům

(Wickmann 2009) nebo se přesunují do stínu (např. Clench 1966, Douwes 1976, Kingsolver & Watt 1984, Van Dyck & Matthysen 1998).

Na postoj při slunění má v některých případech vliv i směr větru. U dorzálně slunícího se druhu *Vanessa cardui* (Linnaeus, 1758) s otevřenými křídly je tepelná ztráta menší, když je konec zadečku orientován s větrem (Polcyn & Chappell 1986). Nicméně u laterálně slunícího se rodu *Colias* není pozorován tepelný vliv orientace těla vzhledem ke směru větru (Kingsolver & Moffat 1983).

## Morfologická přizpůsobení

Morfologie hraje významnou roli určující teplotu těla. Termoregulace motýlů je z morfologického hlediska ovlivněna zejména velikostí těla a zbarvením křídel a těla. Endotermický hmyz se při slunění ohřívá relativně pomalu, ale při letu se rychle ohřívá vlastním metabolismem (Heinrich 1972). To ale neplatí u většiny denních motýlů (ektotermní), u kterých je teplo generované svaly během letu zanedbatelné a tak se ochlazují díky konvekci tepla mezi povrchem a okolním vzduchem (Digby 1955). Motýli o velké tělesné hmotnosti se ohřívají i ochlazují pomaleji a mají vyšší rovnovážnou teplotu těla (Church 1960, Willmer & Unwin 1981, Willmer 1982, Stevenson 1985). Motýli o malé tělesné hmotnosti se při slunění zahřívají rychleji (Kemp & Krockenberger 2004) a malé druhy jsou schopné létat při nižší tělesné teplotě (Heinrich 1986). Tyto druhy mají ale současně i nižší wing-loading, který je též spojován s nižší letovou teplotou těla, a proto si tato oblast zaslouží detailnější výzkum.

Po hmotnosti těla jsou dalším důležitým termoregulačním prvkem křídla motýlů. Let je energeticky velmi nákladný (Suarez 2000) a vyžaduje udržení vysoké teploty svalů (Watt 1973, Dennis 1993). Při letu může u velkých zástupců hmyzu, jako jsou například velké druhy nočních motýlů, docházet k přebytečné produkci tepla (Heinrich 1995). Tento přebytek může být fyziologicky rozptýlen do těla (Heinrich 1974), v opačném případě musí být let pravidelně přerušován, aby došlo k ochlazení. Naopak denní motýli se endotermicky nezahřívají, protože mají zvýšený poměr povrchu k objemu těla, a let vede k pasivnímu ochlazení těla vlivem proudění vzduchu. Menší křídla umožňují mávat křídly s menší frekvencí a tedy při nižší teplotě hrudi, zároveň jsou ale citlivější na ztrátu tepla (Gilchrist 1990, Pivnick & McNeil 1986). Při snížení teploty těla na kritickou hodnotu musí pravidelně přerušit let a zahřát se sluněním (Casey 1981).



Tělesná teplota motýlů je dále ovlivněna i barvou a kresbou křídel. Vysoce melanizovaní jedinci mohou mít o 15-80 % vyšší tepelný příjem než světlejší jedinci (Watt 1968) a tmavší jedinci vykazují vyšší letovou aktivitu (Roland 1982). Vysokohorské druhy motýlů mají výrazně tmavší křídla než druhy žijící v nižších nadmořských výškách (např. Karl & Fischer 2009, Espeland et al. 2007, Ellers & Boggs 2002). Zvýšení melanizace v různých částech křídel má různý vliv na efektivnější udržování tělesné teploty v závislosti na postoji při slunění (Schmitz 1994). U bočně slunících se motýlů (např. *Colias*) má stupeň melanizace bazální části spodní strany zadního křídla vliv na teplotu hrudi, což má za následek vyšší letovou aktivitu a lepší zrání vajíček (Ellers & Boggs 2004). Zvýšení melanizace bazální části křídel u motýlů slunících se dorzálně, např. *Parnassius phoebus* (Fabricius, 1793), může zajistit vyšší teplotu hrudi a tím i delší dobu letu (Guppy 1986, Kingsolver 1987). U odrazově slunících se motýlů existuje vztah mezi mírou bílé barvy na střední části horního křídla a úhlu, který křídla svírají při vyhřívání (Kingsolver 1985b).

Změny v melanizaci křídel mohou vést i ke změnám polohy při slunění. Změna polohy těla při slunění a barvy pozadí vedly k reorganizaci a částečnému zrušení termoregulačních účinků melanizace. Z toho je možné usuzovat, že melanizace křídel má při adaptaci vliv na změnu termoregulačního mechanismu a zároveň může být reakcí na měnící se prostředí (Kingsolver 1987).

## Výběr mikroklimatu

Mikroklima a lokální klima (*sensu* Yoshimo 1975) mají vliv na výběr habitatu a ten má vliv na teplotu těla. Tělesná teplota, rychlost větru a sluneční záření jsou závislé na úhlu dopadajících paprsků, substrátu, orientaci k vyšším objektům, směru větru a výšce nad zemí (Wickmann 2009).

Preference substrátu byla pozorována u *Hipparchia semele*. Motýli tohoto druhu běžně odpočívají na lišejnicích. Pro zvýšení tělesné teploty přelétají na písek, který je nejteplejším substrátem (Shreeve 1990). Naopak při vysokých teplotách se tomuto substrátu vyhýbají, aby předešli přehřátí (Dreisig 1995). Skalní populace druhu *Lasiommata megera* (Linnaeus, 1767) se vyhřívají na skalách, ale při vysokých teplotách zalézají do stínu trhlin (Wickman 1988). Podobně se druh *Oeneis chryxus* (Doubleday, 1849) za chladných dní častěji objevuje na kamenech a v teplém období bývá častěji pozorován na rostlinách (Daily et al. 1991).

Obecně platí, že se stoupající vzdáleností od země okolní teplota klesá a rychlost větru stoupá, čímž byla vysvětlena letová aktivita druhu *Euphydryas phaeton* (Drury, 1773), který se se stoupající okolní teplotou pohybuje výše nad povrchem (Gilchrist 1990). Toto však neplatí v místech husté vegetace, kde je teplota u země nižší díky stínu vytvářenému vegetací. V horkých dnech toho využívá např. *Hipparchia semele*, hledající úkryt mezi stébly trávy (Findlay et al. 1983). Samci dorzálně sluníčního se druhu *Asterocampa leila* (W. H. Edwards, 1874) se stoupající teplotou vzduchu přelétají ze země do korun stromů, kde je nižší teplota a více stínu (Rutowski et al. 1994, Rutowski 2000).

Velký vliv na slunění motýlů má keřové a stromové patro. Některé druhy, např. *Ochlodes venata* (Bremer & Grey, 1853), *Thymelicus lineola* (Ochsenheimer, 1808) se aktivně vyhýbají stínu stromů a keřů (Dennis & Williams 1987, Pivnick & McNeil 1987), zatímco jiné, např. *Pararge aegeria* (Linnaeus, 1758), se stoupající teplotou vyhledávají jejich stín (Davies 1978, Wickman & Wiklund 1983, Shreeve 1984, Van Dyck & Matthysen 1998). Některé druhy, např. *Lasiommata megera*, se vyskytují na slunných pasekách na okraji lesa a využívají závětří stromů (Dennis & Bramley 1985).

V otevřené krajině má na lokální klima vliv topografie. Rychlost větru s nadmořskou výškou stoupá, teplota naopak klesá. Mnoho druhů, např. *Lasiommata megera*, preferuje slunné závětří kopců. Dále platí, že čím vyšší je teplota vzduchu a nižší rychlost větru, tím výše se samci vydávají (Wickman 1988).

## Geneticky fixovatelné reakce na změnu klimatu

Teplota je důležitým selekčním faktorem (Clarke 2003, Hoffmann et al. 2003), který představuje značný tlak na přežití i reprodukci ektotermů, tedy na klíčové prvky fitness (Dahlhoff & Rank, 2007). Pro přežití a teplotní adaptaci druhů má větší význam schopnost vyrovnat se s teplotními extrémami než s kolísajícími průměrnými teplotami (Anderson et al. 2003, Bijlsma & Loeschcke 2005, Chown et al. 2010). Naopak schopnost pružně reagovat na teplotní výkyvy umožňuje maximalizovat dobu, kdy může jedinec aktivovat (Kingsolver 1983a, Heindrich 1986) – a tedy i maximalizaci doby na vyhledávání potravy či partnera. Nutnost optimalizace termoregulace v určitých teplotních podmínkách vede u ektotermů ke vzniku behaviorálních, morfologických a fyziologických přizpůsobení, která mohou být geneticky fixována.

Překlenutí krátkodobých změn teploty prostředí je umožněno pomocí fenotypové plasticity organismu, např. adaptivní strategie v reakci na krátkodobou změnu životního prostředí nebo neadaptivní biochemické a fyziologické interakce organismu s prostředím (Bradshaw 1965, Pigliucci 2001). Mezi plastické reakce řadíme “rapid hardening“, aklimatizaci dospělého a vývojovou plasticitu.

Rapid hardening je popisován jako schopnost organismu vyrovnat se s extrémními teplotami díky předchozí expozici méně extrémním teplotám (např. Kelty & Lee 1999, 2001, Sejerkilde et al. 2003, Sinclair et al. 2003, Marais et al. 2009). K vyvolání hardeningu je nutná předchozí expozice méně extrémním podmínkám v řádu hodin (např. 1 až 2 h; Lee et al. 1987, Bahrndorff et al. 2009).

Aklimatizace dospělého je reverzibilní fakultativní reakce dospělce na konkrétní změnu v prostředí (Willmer et al. 2000, Wilson & Franklin 2002). Aklimatická reakce na teplotu, např. odolnost na teplotní stres, může být očekávána během několika hodin až dnů (Zeilstra & Fischer 2005, Geister & Fischer 2007).

Vývojová plasticita dospělce může být spuštěna podmínkami zažitými v průběhu larválního vývoje nebo až ve vývojovém stadiu dospělého. Prostředí, kde se motýli vyvíjejí, spouští kaskádu nevratných fenotypových změn (Willmer et al. 2000, Wilson & Franklin 2002). Příkladem mohou být různé formy motýlů rodu *Bicyclus* Kirby, 1871 v africkém Malawi. Zatímco formy dospělce líhnoucí se v období dešťů rozmnožují co nejdříve po vylíhnutí, naopak formy dospělce líhnoucí se v období sucha chovají velmi klidně a oddalují rozmnožování o několik měsíců (Brakefield & Reitsma 1991). Na konci chladného suchého období stoupá teplota, která zapříčiní přepnutí do režimu metabolismu využívajícího tukové rezervy spojeného s aktivitou námluv a reprodukčního chování (Brakefield et al. 2007).

## Cíle práce

Pro získání a udržení teploty těla se u motýlů vyvinuly fyziologické, mechanické a behaviorální uzpůsobení. Blízce příbuzné druhy motýlů rodu *Erebia* Dalman, 1816 udržují v přírodě odlišné optimální teploty těla a využívají odlišné teplotní niky (Slámová et al. 2012). Odlišné teploty těla si motýli pravděpodobně udržují výběrem mikrobiotopu, nicméně zde může být efekt daný odlišnými fyziologickými vlastnostmi druhů. Bylo testováno, zda se liší rychlost zahřívání a asymptotická teplota blízce příbuzných druhů rodu *Erebia* při stejných teplotních podmínkách v závislosti na hmotnosti, ploše křídel a wing-loadingu (W-L), což je podíl hmotnosti těla a plochy křídel. Laboratorní podmínky umožňují řízení těchto vlivů a umožňují tak sledovat reakci motýlů na stanovanou kombinaci podmínek. Díky možnosti úplné eliminace některých vlivů, například větru, je možné se zaměřit na úzkou množinu podmínek a snáze tak identifikovat sílu vlivu těchto podmínek. Bezkontaktní měření termální kamerou se jeví jako vhodný a dostupný nástroj k zajištění teplotních údajů a má bakalářská práce hodnotí vhodnost využití termální kamery a navrhuje metodiku pro další experimenty. Konkrétními cíle mé bakalářské práce jsou:

- I) Zoptimalizovat metodu používání termální kamery pro sledování ohřívání motýlů
- II) Naučit se pracovat se softwarem pro vyhodnocování snímků a optimalizovat vyhodnocování snímků
- III) Pokusně srovnat termoregulaci sedmi druhů okáčů lišících se obývaným biotopem a velikostí
- IV) Navrhnout postup dalších experimentů

## Metodika

### Studované druhy

Okáči rodu *Erebia* Dalman, 1816 jsou početným (více než 100 druhů), holoarktickým rodem chladnomilných motýlů. Obývají horské a arktické oblasti, několik málo druhů sestupuje i do teplých nížin. Společným znakem tohoto rodu jsou široká zaoblená křídla tmavě hnědé až černavé barvy, obvykle se světle hnědými nebo oranžovými očky na obou párech křídel. U většiny druhů jsou samice světlejší než samci. Housenky mají velkou hlavu, tělíčko se směrem dozadu zužuje a končí dvěma krátkými výběžky. Kuklí se volně na zemi nebo pod kameny a mají jednu generaci za rok. Dospělci létají nízko nad zemí, nejčastěji usedají v trávě nebo na květech.

Předmětem této studie je 7 druhů rodu, konkrétně druhy *E. alberganus* (Prunner, 1798), *E. melampus* (Fuessly, 1775), *E. pandrose* (Borhausen, 1788), *E. aethiops* (Esper, 1777), *E. ligea* (Linnaeus, 1758), *E. euryale* (Esper, 1805) a *E. tyndarus* (Esper, 1781). Studované druhy se liší areály, stupněm rozšíření, biotopem a velikostí (Tab. I). *E. pandrose*, *E. melampus* a *E. tyndarus* (rozpětí křídel do 38 mm) jsou menší než zbylé studované druhy. Jedná se o horské motýly, ale druhy *E. aethiops* a *E. ligea* sestupují i do nížin, resp. pahorkatin.

Tab. I: Studované druhy rodu *Erebia* a jejich velikost, nadmořská výška výskytu, doba letu a preferovaný biotop.

druh	rozpětí křídel (mm)	Nadm. výška (m n. m.)	doba letu	biotop
<i>alberganus</i>	40 – 50	900 - 2200	2. pol. VI – VIII	luční
<i>melampus</i>	30 – 35	800 - 2400	2. pol. VI – IX	luční
<i>pandrose</i>	30 – 38	1600 - 3100	VI – 1. pol. VIII	skalnatý
<i>aethiops</i>	40 – 45	0 - 2000	VII – 1. pol. IX	lesní
<i>ligea</i>	40 – 45	0 - 1800	VII – VIII	lesní
<i>euryale</i>	38 – 42	800 - 2500	VII – VIII	lesní
<i>tyndarus</i>	30 – 35	1200 - 2700	VII – IX	skalnatý

## Lokality

První odchyt alpských druhů *E. alberganus* a *E. melampus* se uskutečnil 27. – 29. června 2011 v Rakousku u obce Sölden v údolí říčky Windache (Windachtal, 1950 m n. m., 46°57'45.148" s. š., 11°2'39.494" v. d.), druh *E. pandrose* byl odchycen v blízkosti předchozí lokality (vzdálenost mezi lokalitami 7 km vzdušnou čarou) u obce Hochgurgl (2150 m n.m., 46°54'6.271"s. š., 11°3'13.968" v. d.). Druhý odchyt alpských druhů *E. ligea*, *E. tyndarus* a *E. euryale* se konal ve dnech 2. – 4. srpna 2011 opět v údolí říčky Windache. *E. aethiops* byl odchycen 6. srpna 2011 na Liščí hoře u Českého Krumlova (550 m n. m., 48°49'38.193" s. š., 14°19'12.418" v. d.). Motýli byly uloženi v papírových obálcích poskládaných v plastové krabičce s vlhkým filtračním papírem uvnitř, který motýlům poskytoval optimální vlhkost a byli přepraveni v chladícím boxu do klimaboxů, ve kterých probíhaly pokusy.

## Průběh pokusu

### Pokusné podmínky, aparatura

Pokusy probíhaly v chladícím boxu v 1. patře budovy B areálu Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity. Tento box byl nastaven na 18°C. Motýli byli aklimatizováni po dobu nejméně dvanácti hodin v klecích, jejichž stěny byly z jemné síťované nylonové tkaniny. Tkanina byla vlhčena cukerným roztokem, který sloužil jako potravní zdroj motýlů. V chladícím boxu byla udržována denní fotoperioda 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

Teplota povrchu hrudi motýlů byla měřena termální kamerou. Termální neboli infračervená kamera je zařízení, které snímá infračervené záření, což je elektromagnetické záření o vlnové délce delší než viditelné světlo. Tato kamera snímá tepelné záření těles v daleké infračervené oblasti (LWIR) dlouhých vlnových délek 8 – 15  $\mu\text{m}$ . Před snímáním je nutná kalibrace teploty, vlhkosti a emisivity. Emisivita je poměr energie vyzařované objektem při jeho dané teplotě k energii vyzařované černým tělesem (při nízkých teplotách nevyzařuje téměř žádnou energii) při stejné teplotě. I při pořizování fotografií tato kamera neustále snímá studovaný objekt a je tak možné v reálném čase pozorovat změnu teploty objektu.

Aparatura byla složena z termální kamery (Flir P660) na stativu, dvou světelných zdrojů a dřevěné destičky, na kterou byl umístěn snímáný motýl. Dřevěná destička byla zvolena z důvodu velké tepelné kapacity, která vytváří stabilní tepelný obraz. Dřevěná destička byla umístěna na stonajku ve výšce 15 cm nad zemí z důvodu minimalizace

teplotního vlivu podlahy. Termální kamera byla připevněna na stativu a její objektiv směřoval kolmo na destičku. Nastavení termální kamery bylo následující: teplota okolí 18°C, vlhkost 66%, emisivita 0,85. Vzdálenost destičky a čipu kamery činila 60 cm. Dvojice světelných zdrojů zářících na destičku byla umístěna 25 cm nad destičkou pod úhlem 60°. Každý světelný zdroj byl osazen halogenovou žárovkou o výkonu 18W a světelném toku 160 lm opatřenou UV filtrem. Halogenová žárovka vyzařuje tepelné záření a světlo v podobné frekvenci jako je denní světlo.

Teplota chladicího boxu byla udržována klimatizací, kterou ale bylo nutno při samotném snímání vypnout z důvodu nežádoucího proudění chladného vzduchu, což by pokus negativně ovlivnilo. Mezi jednotlivými pokusy byla klimatizace zapnuta pro udržení požadované teploty. Při pokusech s exempláři z prvního odchytu (dále nazývané jako „jarní“) byla teplota v chladícím boxu zvolena na 20 °C z důvodu snadného udržení požadované teploty. V případě snímání exemplářů z druhé ho odchytu (dále jen „letních“) byla po předešlé zkušenosti snížena teplota vzduchu na 18°C.

## Měření povrchové teploty hrudi

Před samotnou fází ohřívání a zaznamenávání teploty byli motýli 10 minut podchlazováni na 4°C do nehybného stavu v sousedícím chladícím boxu. Motýli byli ochlazováni v plastové krabičce opatřené víčkem. Víčko bylo opatřeno malými otvory, aby do krabičky lépe pronikal chladný vzduch. Na dno byl umístěn vlhký papír pro zachování vlhkosti uvnitř krabičky. Sledovaný jedinec byl vyjmut z klece, vložen do krabičky a uložen v chladícím boxu. Poté byl vyjmut a položen na dřevěnou destičku. Tato manipulace byla prováděna pinzetou kvůli zamezení ohřátí motýla lidskou rukou. Ihned po uložení motýla na dřevěnou destičku byly spuštěny oba světelné zdroje a snímání termální kamerou. Na začátku každého měření byla zaznamenána aktuální teplota a vlhkost v klimaboxu. Termální kamera pořizovala každých 20 sekund dva snímky, jeden snímek zachycoval termální obraz, druhý byl klasickou fotografií pro detailnější určení polohy sledovaného jedince. Toto měření bylo ukončeno po uplynutí 15-ti minut nebo dokud motýl neodletěl z destičky. Po skončení měření byl motýl usmrcen a bylo určeno pohlaví a olétanost motýla (A – jedinec nejeví známky poškození, B – jedinec jeví drobné známky poškození, C – jedinec jeví silné známky poškození). Motýl byl poté označen a uložen do mrazicího boxu. Měření „jarních“ druhů prováděl autor práce, měření „letních“ druhů Alena Bartoňová a Mgr. Irena Slámová.

Po provedení všech teplotních měření byli všichni sledovaní jedinci zvázeni na analytických vahách.

U každého druhu byl všem pokusným jedincům pinzetou odtržen pár křídel a položen na přichystaný milimetrový papír, který sloužil jako měřítko. Poté byla křídla vyfotografována digitálním fotoaparátem Panasonic FZ5 ze vzdálenosti 100 cm s ohniskovou vzdáleností 432 mm pro minimalizaci nežádoucích optických efektů způsobených objektivem. Při malém ohnisku by navíc hrozilo větší přiblížení objektu (tedy motýla) než měřítko (milimetrový papír) díky nepatrně menší vzdálenosti od objektivu a takové zkreslení je nežádoucí. Tento postup byl proveden se všemi druhy. Získané fotografie byly analyzovány ve volně dostupném programu Analyzing Digital Images Software 2008 (<http://mvh.sr.unh.edu/software/software.htm>), který podle zadaného měřítko (50 mm na milimetrovém papíře) a manuálně vytyčené plochy pomocí nástroje polygon dokázal vypočítat plochu křídla. U každého jedince poté došlo k součtu plochy předního a zadního křídla a poté, zdvojnásobením této hodnoty, byla spočtena celková plocha křídel. S pomocí získaných hodnot plochy křídel a hmotnosti byl vypočítán parametr wing-loading (W-L, podíl hmotnosti těla a plochy křídel)

## Zpracování dat

### Zpracování snímků z termální kamery

Ke zpracování dat z termální kamery byl použit program FLIR QuickReport© 1.2 volně přístupný na oficiálních stránkách výrobce termální kamery (<http://www.flir.com/cs/emea/en/view/?id=42406>). Tento program umožňuje v případě změn podmínek dodatečnou softwarovou kalibraci teploty, vlhkosti i emisivity. Program obsahuje nástroj, který uživateli ukazuje teplotu každého konkrétního bodu snímku z termální kamery. Teplota motýla byla odečtena změřením jednoho bodu lokalizovaného ve středu hrudi. Teplota motýlů bývá měřena na hrudi, protože jde o místo nejméně náchylné na teplotní vliv okolního prostředí. Primární data z termální kamery byla zanesena do grafu popisujícím závislost teploty těla na době ohřívání. Ten odhalil významné odchylky některých bodů od celkového trendu dat. Takové body byly identifikovány a podle snímku bylo dohledáno opodstatnění odchylky. Pokud se jednalo o překryv sledované části křídlem či nevhodný úhel pro snímání, byl bod vyřazen. V případě odletu jedince před uplynutím 2 minut, tedy 5 záznamů a méně, byla data též vyřazena.



## Rychlost ohřevu, asymptotická teplota

Závislost teploty hrudi ( $t_{th}$ ) na době expozice ( $t$ ) byla proložena upravenou asymptotickou exponenciálou ve tvaru  $t_{th} = t_s \cdot (1 - \exp(-s \cdot (t + c)))$  v programu Statistica 9.1 (StatSoft, Inc. 2010) pomocí Gauss–Newton metody odhadu s nastavením počátečních hodnot parametrů blízkých těm předpokládaným:  $t_s = 16$ ,  $s = 0,2$ ,  $c = 0,2$ ). Parametr  $t_s$  vyjadřuje hodnotu asymptotické teploty těla, při které nedocházelo k dalšímu ohřívání, parametr  $s$  rychlost ohřívání (strmost křivky, čím vyšší hodnota parametru  $s$ , tím rychleji se blíží k asymptotě) a parametr  $c$  vyjadřuje horizontální posun křivky vůči ose. Tento posun je způsobený různou počáteční teplotou těla, kterou měl každý jedinec na začátku snímání. Hodnota  $c$  tedy popisuje míru ochlazení motýlů před zahříváním, tedy s rostoucí hodnotou  $c$  se motýl méně ochladil a měl vyšší počáteční teplotu těla. Tento výpočet byl nejdříve proveden pro všechny druhy, poté i pro jednotlivé jedince. S parametry jednotlivých jedinců se dále pracovalo v programu Statistica 9.1 (StatSoft, Inc. 2010) a CANOCO v 4.5 (Ter Braak a Šmilauer 2002).

## Regresní analýzy závislosti rychlosti ohřívání na hmotnosti, ploše křídel a W-L

V programu Statistica 9.1 (StatSoft, Inc. 2010) byl testován vliv hmotnosti, plochy křídel a wing-loadingu na rychlost ohřevu (parametr  $s$ ). Jako jedno pozorování byly brány jedinci od všech druhů. Nezávislý vliv jednotlivých vlastností (hmotnost, plocha křídel ani wing-loading se navzájem neovlivňují) byl nejprve testován jednoduchou regresí. V případě průkaznosti byly tyto proměnné testovány pomocí mnohonásobné regrese, která testuje parciální vlivy jednotlivých proměnných (tato regrese zohledňuje vliv proměnných mezi sebou). Bylo tím tedy určeno, která proměnná více vysvětluje strmost křivky. Vysvětlovanou proměnnou byl parametr  $s$ , vysvětlující proměnnou byly logaritmičticky transformované hodnoty hmotnosti, plochy a wing-loadingu křídel. Do mnohonásobné regrese nemohl být zahrnut wing-loading jakožto poměr 2 sledovaných veličin v regresi již zahrnutých. Nejdříve byly regresní analýzy prováděny se všemi druhy současně. Protože rozdílné teploty prostředí u „jarních“ a „letních“ měření mohou mít vliv i na rychlost ohřívání a asymptotickou teplotu těla, byly provedeny regresní analýzy zvlášť u „jarních“ a „letních“ druhů pro zhodnocení případného vlivu experimentálních podmínek.

## Klasifikace druhů podle hmotnosti těla a plochy křídel

Pro hrubou představu toho, jak se jednotlivé druhy motýlů morfologicky liší, byla provedena klasifikace druhů podle hmotnosti těla a plochy křídel. Ta byla spočtena pomocí lineární diskriminační analýzy (LDA) v programu CANOCO v 4.5 (Ter Braak a Šmilauer 2002). Cílem bylo zjistit, jak kvantitativní prediktory (hmotnost, plocha křídel) popisují určení do druhu. Jedinci různých druhů byli vybráni jako jednotlivé vzorky. Jako *species data* byl zadán faktor kódující příslušnost k jednotlivým druhům (tj. příslušnost k danému druhu byla kódována 1, pro ostatní druhy 0). Jako kvantitativní prediktory (*environmental variables*) sloužící ke klasifikaci vzorků byly zadány velikost těla a plocha křídel. Byla vybrána kanonická korespondenční analýza CCA, se škálováním *Hill's scaling (inter-species distances)*. Ordinační diagramy byly vytvořeny v programu CanoDraw for Windows (Ter Braak a Šmilauer 2002). Jednotlivé body označující druhová data reprezentují průměry (centroidy) v ordinačním prostoru popsáném zobrazenými environmentálními proměnnými (Lepš a Šmilauer 2003). Je třeba poznamenat, že délka šipek environmentálních proměnných neodpovídá jejich popisné síle (Lepš a Šmilauer 2003).

## Klasifikace druhů podle rychlosti ohřevu a asymptotické teploty těla

Klasifikace druhů podle rychlosti ohřevu ( $s$ ) a asymptotické teploty ( $t_s$ ) těla byla provedena LDA (CCA, Hill's scaling, inter-species distances). Příslušnost ke druhu byla kódována jako faktor. Jako environmentální proměnné byly testovány rychlost ohřevu a asymptotická teplota těla. Byla provedena analýza bez použití kovariát a) na všech druzích - pro získání přehledu o odlišnostech mezi druhy zahříványými za odlišných experimentálních podmínek, b) na motýlech z „jarního“ a „letního“ experimentu zvlášť. V dalších dvou analýzách byl odfiltrován c) vliv experimentálních podmínek a d) vliv experimentálních podmínek a morfologie. Jako kovariáty popisující experimentální podmínky byly použity teplota a vlhkost vzduchu, při kterých docházelo k ohřívání. Morfologické kovariáty byly hmotnost, plocha křídel a olétanost jedince. Z těchto potenciálních kovariát byly pomocí postupné selekce vybrány kovariáty zahrnuté do modelu.

## Výsledky

Pokusu měření teploty termální kamerou bylo podrobena 88 jedinců motýlů. S výjimkou *E. pandrose* byly všechny druhy zastoupeny téměř výhradně samci. Samice se většinou vyznačují větší plochou křídel a téměř dvojnásobnou hmotností, čímž by bylo nutné provádět analýzy pro každé pohlaví zvlášť. Velmi malý počet samic (povětšinou 1 samice pro každý druh) znemožňoval jakýkoliv statistický výpočet a proto byla tato data odselektována. Po odselektování samic a nevhodných dat (důvody popsány v metodice) byla data 63 jedinců podrobena analýze. Z toho 29 jedinců z “jarního“ odchyty a 34 jedinců z “letního“ odchyty (Tab II.).

Tab. II: Počet, poměr pohlaví a průměrné naměřené hodnoty (hmotnost, plocha křídel, wing-loading) zkoumaných druhů.

Druh	N	Hmotnost $\pm$ SD (mg)	Plocha křídel $\pm$ SD (mm <sup>2</sup> )	Wing-loading $\pm$ SD (mg/cm <sup>2</sup> )
<i>alberganus</i>	9	53,97 $\pm$ 10,89	644,89 $\pm$ 65,92	0,83 $\pm$ 0,12
<i>melampus</i>	9	24,54 $\pm$ 4,00	383,11 $\pm$ 27,38	0,64 $\pm$ 0,07
<i>pandrose</i>	11	69,71 $\pm$ 14,50	690,22 $\pm$ 60,00	1,02 $\pm$ 0,25
<i>aethiops</i>	10	50,80 $\pm$ 3,71	925,55 $\pm$ 61,44	0,55 $\pm$ 0,04
<i>ligea</i>	7	41,58 $\pm$ 3,37	836,89 $\pm$ 71,95	0,50 $\pm$ 0,04
<i>euryle</i>	9	38,74 $\pm$ 4,48	773,11 $\pm$ 59,55	0,50 $\pm$ 0,06
<i>tyndarus</i>	8	35,59 $\pm$ 6,25	587,56 $\pm$ 118,06	0,62 $\pm$ 0,14

## Observační pozorování

Teplota hrudi se při započatí pokusu pohybovala v rozmezí 9 – 13 °C. Převážná většina motýlů byla po ochlazení neaktivní ve strnulém stavu. Zpočátku měl sledovaný jedinec nerovnoměrně chladné tělo a nebyl schopný pohybu. Nejchladnější částí bylo tělo, především hrud', nejteplejší částí byla křídla. Při slunění v laboratorních podmínkách se teplota křídel zvyšovala a to mnohem rychleji než teplota tělíčka. V tomto momentu se motýl často postavil na nohy a natočil křídla ke světelnému zdroji. Motýli používali dva odlišné způsoby postoje. Někteří jedinci rozevřeli křídla do písmene “V“, jiní je nechali zavřené. Z termálních fotografií je zjevné, že po dostatečném ohřátí křídel začal motýl zahřátou hemolymfu pumpovat do tělíčka, které se tak začalo rychleji ohřívat a brzy se jeho teplota vyrovnala s teplotou křídel. Motýl se ohříval tak dlouho, dokud teplota hrudi nedosáhla určité hladiny, která již zůstala stálá. Zejména malé druhy, *E. melampus*, *E.*

*tyndarus* a velký vysokohorský *E. pandrose* vykazovaly vysokou míru aktivity dlouhou dobu před ukončením patnáctiminutového snímání. Někteří jedinci dokonce odletěli ihned po vyjmutí z chladicího boxu, jejich let byl však nekoordinovaný.

## Parametry asymptotické exponenciely

Upravená asymptotická exponenciela popisovala rychlost ohřívání u všech jedinců velmi přesně ( $p < 0,001$ ). Z výsledků (Tab. III) je patrné, že tato hodnota byla o cca 2°C vyšší než teplota prostředí a že se stoupající teplotou rostla. U jarních druhů byl lehce nižší průměr  $t_s$  u *E. pandrose*, u letních byl průměr  $t_s$  nižší u *E. aethiops* a vyšší u *E. tyndarus*. Teplotní výkyvy  $t_s$  jedinců jednotlivých druhů byly malé a mezi druhy se výrazně nelišily.

Tab. III: Hodnoty asymptotické teploty  $t_s$  pro jednotlivé druhy.

Druh	Odchyt	Průměr ( $\pm$ SE)	t-value	df	Lo. Conf Limit	Up. Conf Limit
<i>alberganus</i>	jarní	21,794 $\pm$ 0,069	316,253	266	21,658	21,930
<i>melampus</i>	jarní	21,763 $\pm$ 0,051	424,887	224	21,662	21,864
<i>pandrose</i>	jarní	21,402 $\pm$ 0,051	423,607	268	21,303	21,502
<i>aethiops</i>	letní	19,905 $\pm$ 0,042	478,850	283	19,823	19,987
<i>ligea</i>	letní	20,183 $\pm$ 0,048	421,701	227	20,088	20,277
<i>euryale</i>	letní	20,125 $\pm$ 0,051	393,691	203	20,025	20,226
<i>tyndarus</i>	letní	20,423 $\pm$ 0,041	492,695	191	20,341	20,505

Strmost křivky  $s$  popisuje rychlost ohřívání jednotlivých druhů. Čím vyšší je hodnota  $s$ , tím dříve teplota těla dosáhne asymptotické teploty  $t_s$ . Rychlost ohřívání nevykazovala žádnou spojitost s rozdílnou teplotou prostředí v pokusech s „jarními“ a „letními“ druhy. Zatímco vnitrodruhově jsou hodnoty  $s$  velmi uniformní, mezi druhy vykazují v některých případech značnou rozdílnost. Nejpomaleji se ohřívá *E. alberganus*, trochu rychleji *E. pandrose*, naopak nejrychleji druhy *E. melampus* a *E. euryale* (Tab. IV). V tomto mezidruhovém srovnání se též rychle ohřívají i druhy *E. aethiops* a *E. tyndarus*, střední hodnoty pak vykazuje *E. ligea*.

Tab. IV: Hodnoty pro strmost křivky  $s$  jednotlivých druhů.

Druh	Odchyt	Průměr ( $\pm$ SE)	t-value	df	Lo. Conf Limit	Up. Conf Limit
<i>alberganus</i>	jarní	0,430 $\pm$ 0,013)	32,131	266	0,404	0,457
<i>melampus</i>	jarní	0,847 $\pm$ 0,022	38,845	224	0,804	0,890
<i>pandrose</i>	jarní	0,560 $\pm$ 0,012	45,305	268	0,535	0,584
<i>aethiops</i>	letní	0,758 $\pm$ 0,020	37,657	283	0,718	0,797
<i>ligea</i>	letní	0,670 $\pm$ 0,018	38,110	227	0,635	0,705
<i>euryale</i>	letní	0,843 $\pm$ 0,024	34,531	203	0,795	0,891
<i>tyndarus</i>	letní	0,736 $\pm$ 0,017	44,403	191	0,703	0,768

## Regresní analýzy závislosti rychlosti ohřívání na hmotnosti, ploše křídel a W-L

Jednoduchá regrese závislosti rychlosti ohřívání na hmotnosti, ploše křídel a wing-loadingu na strmost křivky  $s$  bez odlišení „jarních“ a „letních“ druhů odhalila, že hmotnost, plocha i wing-loading měly vliv na rychlost ohřívání), pokud by tyto proměnné na sobě nebyly závislé. S rostoucí hmotností, plochou i wing-loadingem klesá rychlost ohřívání (Tab. V). Z hodnot wing-loadingu lze usuzovat, že s rostoucí hmotností, při zachování plochy křídel, klesá rychlost ohřevu. Jinými slovy čím větší plochou křídel motýl disponuje při zachování stejné hmotnosti, tím rychleji se ohřeje. Mnohonásobná regrese závislosti rychlosti ohřívání na hmotnosti těla a ploše křídel (na sobě vzájemně závislých) potvrdila, že s rostoucí hmotností klesá rychlost ohřevu a má tedy na rychlost ohřívání větší vliv než plocha křídel (Tab. VI).

Tab. V: Závislost rychlosti ohřívání na třech na sobě nezávislých proměnných u všech druhů,  $N = 63$ , Beta určuje sklon závislosti.

	Beta ( $\pm$ SE)	$s$ ( $\pm$ SE)	t (61)	p	R2
Log (hmotnost)	-0,6212 $\pm$ 0,1003	-0,7329 $\pm$ 0,1184	-6,1912	0,0000	0,3859
Log (plocha)	-0,2537 $\pm$ 0,1238	-0,3666 $\pm$ 0,1789	-2,0485	0,0448	0,0644
Log (W-L)	-0,4909 $\pm$ 0,1116	-0,6865 $\pm$ 0,1560	-4,4003	0,0000	0,2409

Tab. VI: Závislost rychlosti ohřívání na dvou na sobě závislých proměnných u všech druhů, N = 63, Beta určuje sklon závislosti.

	Beta ( $\pm$ SE)	s ( $\pm$ SE)	t (60)	p	R2
Log (hmotnost)	-0,7186 $\pm$ 0,1229	-0,8478 $\pm$ 0,1449	-5,8494	0,0000	0,4042
Log (plocha)	0,1666 $\pm$ 0,1229	0,2407 $\pm$ 0,1775	1,3561	0,1801	0,4042

### Zhodnocení vlivu změny okolní teploty

Po separátním zhodnocení „jarních“ a „letních“ pokusů vyšlo, že hmotnost, plocha i wing-loading měly vliv na rychlost ohřívání (Tab. VII). Výsledek mnohonásobné regrese naznačuje, že na rozdíl od výsledků pro všechny druhy, v případě omezení na „jarní“ druhy plocha vysvětlí většinu variability a má tedy na rychlost ohřívání větší vliv než hmotnost (Tab. VIII). Jednoduchá regrese „letních“ druhů naopak odhalila, že hmotnost, plocha ani wing-loading (v případě, že na sobě nejsou závislé) neměly prokazatelný vliv na rychlost ohřívání (Tab. IX).

Tab. VII: Závislost rychlosti ohřívání na třech na sobě nezávislých proměnných „jarních“ druhů, N = 29, Beta určuje sklon závislosti.

	Beta ( $\pm$ SE)	s ( $\pm$ SE)	t (27)	p	R2
Log (hmotnost)	-0,7534 $\pm$ 0,1265	-0,7783 $\pm$ 0,1307	-5,9540	0,0000	0,5677
Log (plocha)	-0,7873 $\pm$ 0,1187	-1,4252 $\pm$ 0,2148	-6,6356	0,0000	0,6199
Log (W-L)	-0,5545 $\pm$ 0,1601	-1,0445 $\pm$ 0,3016	-3,4627	0,0018	0,3075

Tab. VIII: Závislost rychlosti ohřívání na dvou na sobě závislých proměnných „jarních“ druhů, N = 29, Beta určuje sklon závislosti.

	Beta ( $\pm$ SE)	s ( $\pm$ SE)	t (26)	p	R2
Log (hmotnost)	-0,2398 $\pm$ 0,2707	-0,2477 $\pm$ 0,2796	-0,8858	0,3839	0,6310
Log (plocha)	-0,5720 $\pm$ 0,2707	-1,0355 $\pm$ 0,4900	-2,1131	0,0444	0,6310

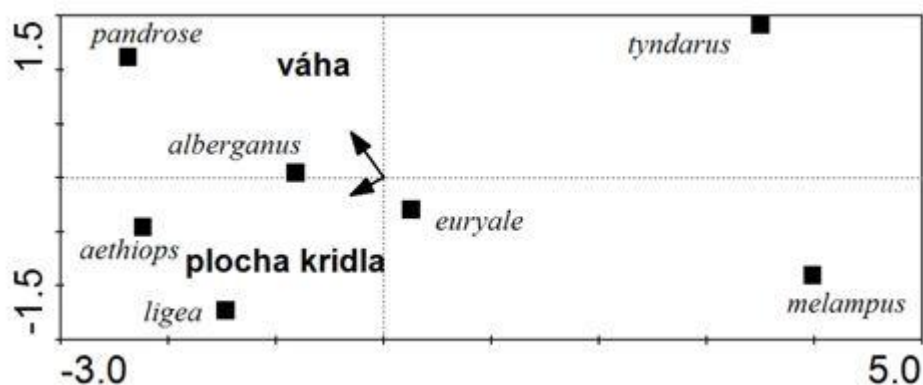
Tab. IX: Závislost rychlosti ohřívání na třech na sobě nezávislých proměnných “letních“ druhů, N = 34. Beta určuje sklon závislosti.

	Beta ( $\pm$ SE)	s ( $\pm$ SE)	t (32)	p	R2
Log (hmotnost)	-0,1870 $\pm$ 0,1737	-0,3054 $\pm$ 0,2837	-1,0765	0,2897	0,0350
Log (plocha)	-0,0034 $\pm$ 0,1768	-0,0049 $\pm$ 0,2587	-0,0190	0,9849	0,0000
Log (W-L)	-0,2099 $\pm$ 0,1728	-0,3927 $\pm$ 0,3234	-1,2141	0,2336	0,0440

Z regrese závislosti rychlosti ohřívání na hmotnosti, ploše křídel a wing-loadingu všech druhů vyplývá, že na rychlost ohřívání má zásadní vliv hmotnost, tj. s rostoucí hmotností klesá rychlost ohřívání. Avšak při rozdělení druhů podle teploty prostředí jsme dospěli k odlišnému výsledku. Z výše uvedených výsledků je patrný vliv změny okolní teploty na rychlost ohřívání.

## Klasifikace druhů podle hmotnosti těla a plochy křídel

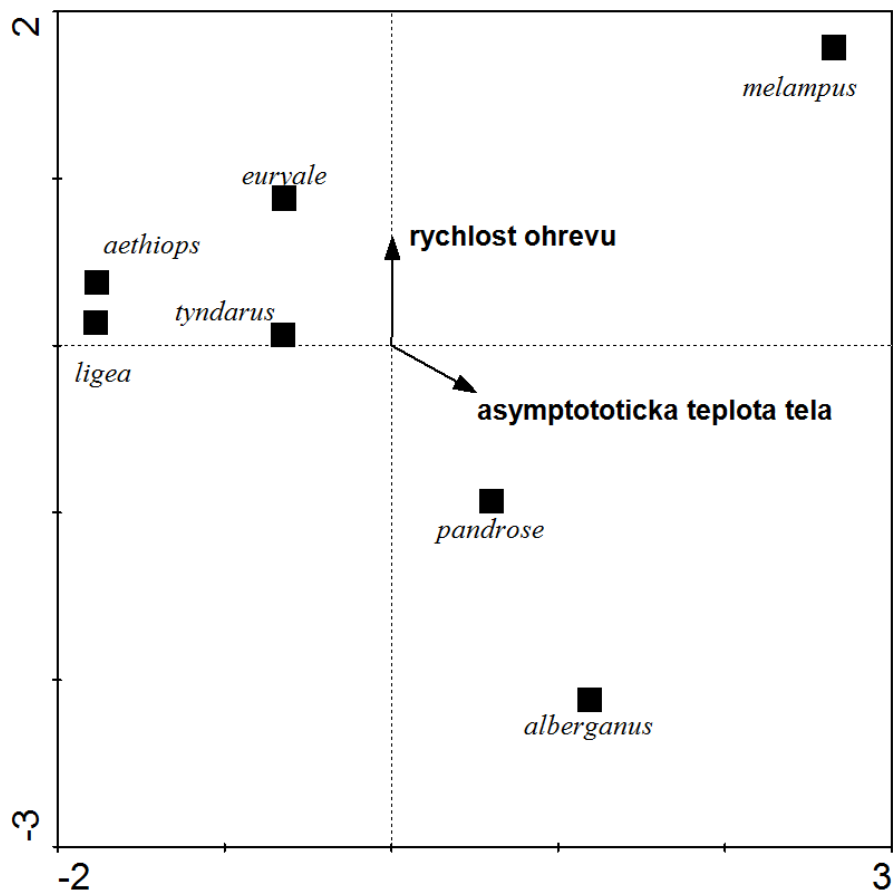
Druhy se navzájem lišily hmotností a plochou křídel (LDA, first canonical axis: eigenvalue = 0,908, F = 10,701, P = 0,0010, all canonical axes: trace = 1,611, F = 11,011, P = 0,0010). Druhy *E. pandrose*, *E. alberganus* a *E. tyndarus* se vyznačují vyšší hmotností než ostatní druhy (Obr. 1). Zatímco u *E. pandrose* a *E. alberganus* se vyšší hmotnot pojí zároveň s vyšší plochou křídel, *E. tyndarus* má k velké hmotnosti malá křídla. Druhy *E. aethiops* a *E. ligea* mají velkou plochu křídel. *E. melampus* má malou hmotnost a malou plochu křídel.



Obr. 1: Klasifikace sledovaných druhů podle váhy a plochy křídla (LDA).

## Klasifikace druhů podle rychlosti ohřevu a asymptotické teploty těla

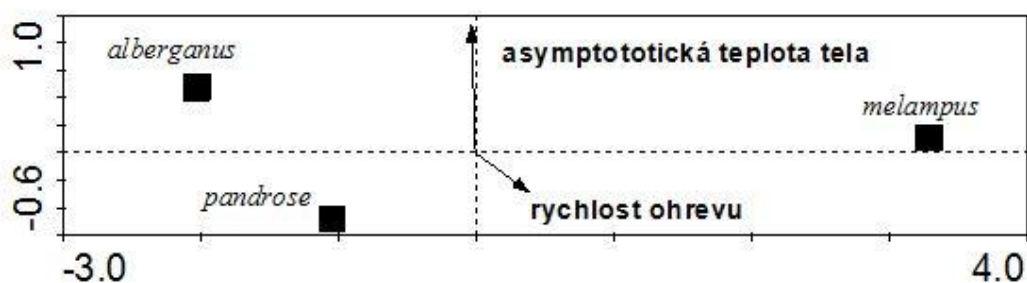
Sledované druhy se odlišovaly rychlostí ohřevu a dosaženou asymptotickou teplotou těla (LDA, first canonical axis: eigenvalue = 0,690, F = 7,796, P = 0,0010, all canonical axes: Trace = 1,271, F = 8,060, P = 0,0010). Vyčlenila se skupina druhů *E. aethiops*, *E. tyndarus*, *E. ligea* a *E. eurvale* testovaných v „letní“ skupině a skupina *E. melampus*, *E. alberganus* a *E. pandrose* z „jarních“ experimentálních podmínek (Obr. 2). Druhy z „jarní“ skupiny dosáhly za vyšších pokusných teplot okolí vyšší asymptotické teploty těla než letní. Letní druhy se za nižších pokusných teplot okolí ohřívaly rychleji.



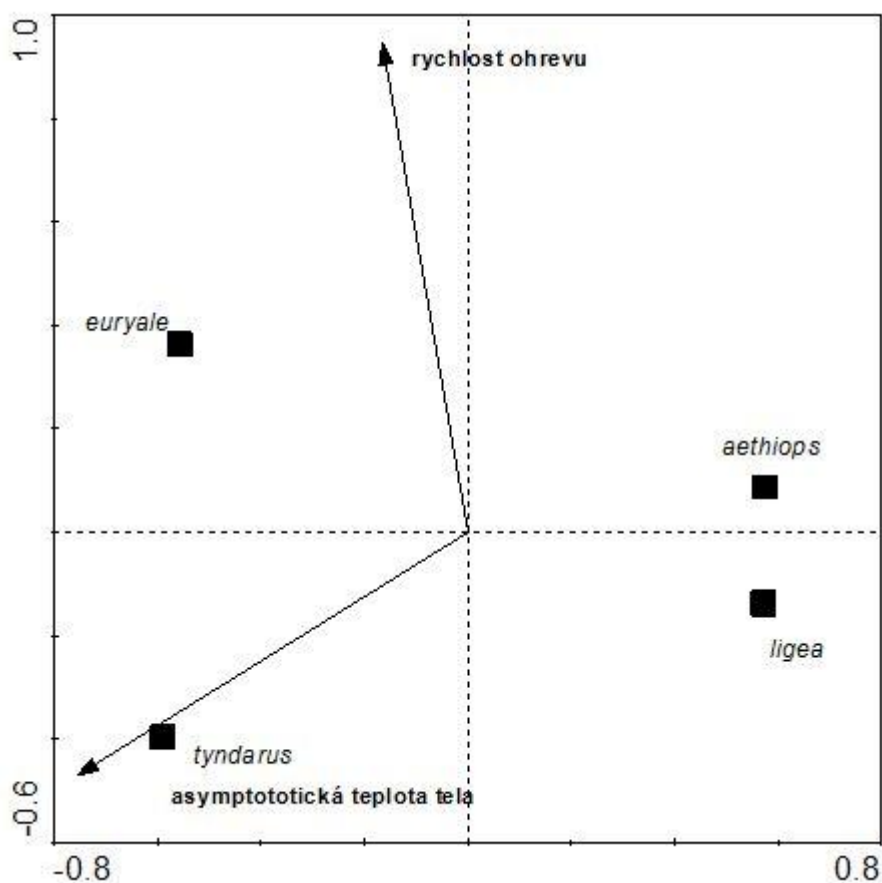
Obr. 2: Přehled klasifikace druhů podle rychlosti ohřevu a dosažené asymptotické teploty těla (LDA, bez zohlednění odlišných experimentálních podmínek pro „jarní“ a „letní“ experimenty)



Druhy se odlišovaly podle rychlosti ohřevu a dosažené asymptotické teploty v rámci „jarních“ (LDA, first canonical axis: eigenvalue = 0,835, F = 18,634, P = 0,0010, all canonical axes: Trace = 0,975, F = 12,358, P = 0,0010) i „letních“ (LDA, first canonical axis: eigenvalue = 0,248, F = 2,797, P = 0,1300, all canonical axes: Trace = 0,321, F = 1,856, P = 0,0010) experimentálních podmínek. Ze třech „jarních“ druhů se rychle ohřívaly *E. pandrose* a *E. melampus*, nejvyšší asymptotickou teplotu měl ale *E. alberganus* (Obr. 3). Ze čtyř „letních“ druhů se nejrychleji ohříval *E. euryale*, nejpomaleji *E. ligea* a *E. tyndarus*. *E. tyndarus* však dosáhl nejvyšší asymptotické teploty, naproti tomu *E. ligea* a *E. aethiops* měly tuto hodnotu nízkou (Obr. 4).

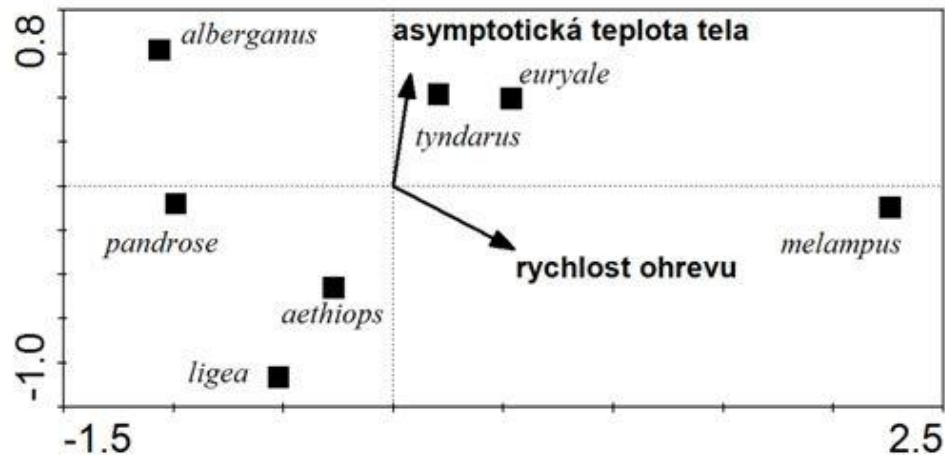


Obr. 3: Klasifikace „jarních“ druhů podle rychlosti ohřevu a dosažené asymptotické teploty těla (LDA, bez zohlednění vlivu experimentálních podmínek).



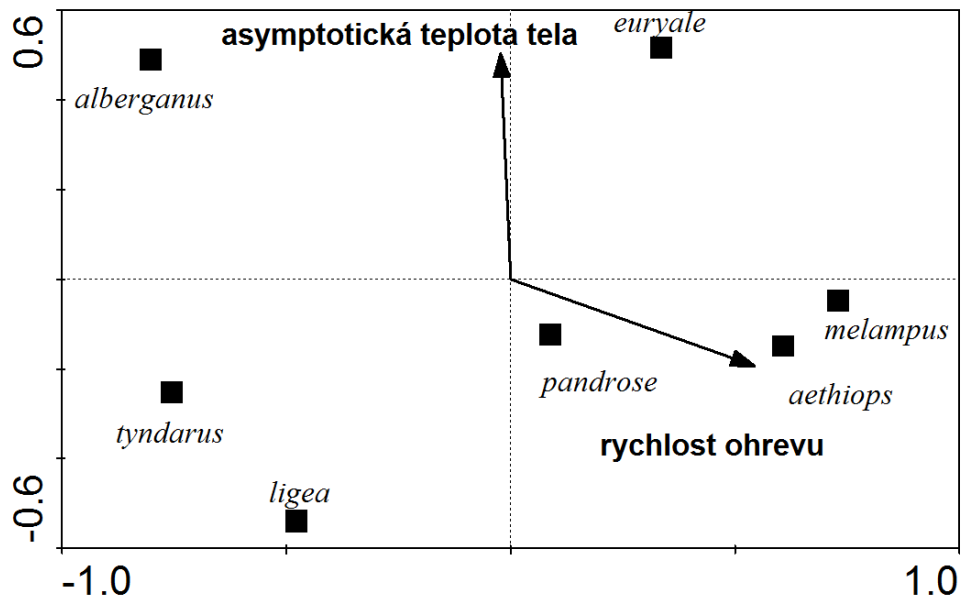
Obr. 4: Klasifikace „letních“ druhů podle rychlosti ohřevu a dosažené asymptotické teploty těla (LDA, bez zohlednění vlivu experimentálních podmínek).

Po odfiltrování vlivu experimentálních podmínek (teplota okolí a vlhkost vzduchu) se jednotlivé druhy navzájem odlišovaly rychlostí ohřevu a dosaženou asymptotickou teplotou. (LDA, first canonical axis: eigenvalue = 0,535, F = 7,180, P = 0,0010, all canonical axes: Trace = 0,714, F = 5,000, P = 0,0010). Nejrychleji se ohříval *E. melampus*, nejpomaleji se ohříval *E. alberganus* a *E. pandrose*. Nejvyšších teplot těla dosahovali *E. alberganus*, *E. tyndarus* a *E. euryale*. Nejnižší tělesné asymptotické teploty těla měli *E. aethiops* a *E. ligea* (Obr. 5).



Obr. 5: I po odfiltrování vlivu experimentálních podmínek se mezi sebou druhy odlišovaly v rychlosti ohřevu a v dosažené asymptotické teplotě těla (LDA).

Dokonce i po odstranění vlivu experimentálních podmínek i morfologie (postupnou selekcí byly vybrány kovariáty hmotnost těla, plocha křídla, teplota těla na začátku pokusu a teplota a vlhkost okolního vzduchu) byly rozdíly v rychlosti ohřevu a dosažené asymptotické teplotě průkazné (LDA, first canonical axis: trace = 0.255, F = 4.424, P = 0.0020, all canonical axes: trace = 0.361, F = 3.243, P = 0.0010). Druhy *E. alberganus* a *E. euryale* dosahovali při ohřívání nejvyšších teplot těla. Zatímco *E. euryale* se ohříval rychle, *E. alberagnus* se ohříval spíše pomalu. Druhy, které nedosahovaly ani vysokých asymptotických teplot těla a které se ani rychle neohřívaly, jsou *E. tyndarus* a *E. ligea*. Nejrychleji se ohřívaly druhy *E. melampus* a *E. aethiops* (Obr. 6).



Obr. 6: Klasifikace druhů podle rychlosti ohřevu a dosažené asymptotické teploty těla (LDA, kovariáty: hmotnost těla, plocha křídla, teplota těla na začátku pokusu a teplota a vlhkost okolního vzduchu).

## Diskuze

### Podmínky pokusu

Po vyjmutí z mrazícího boxu (4°C) a započetí pokusu (18°C nebo 20°C) se tělo i křídla motýla rychle zahřívaly a nevykazovaly téměř žádné teplotní rozdíly. Po cca 1 minutě se křídla začala ohřívat rychleji než zbytek těla a motýli v souladu s Heinrichem (1990) povětšinou zaujmuli pro ně typický postoj, kdy křídla byla otevřena do písmene “V“, avšak orientace ke zdroji nebyla zpozorována. Zahřívání na počátku pokusu se jeví spíše čistě jako fyzikální výměna tepla mezi tělem motýla a prostředím včetně destičky. Až po zaujmutí postoje začal motýl využívat svého behaviorálního (postoj pro slunění) a morfologického (melanizovaná křídla) uzpůsobení pro účinnější příjem tepla ze slunečního záření. Ze série snímků bylo patrné, že po zahřátí křídel začala stoupat i teplota hrudi a to od středu. To potvrzuje tvrzení, že je teplo z křídel aktivně odváděno do hrudi (Watt 1968, Kingsolver 1985a, Wasserthal 1975).

Po zkušenostech s měřením teploty těla motýlů se nabízí několik změn. Častým problémem měření byl únik sledovaného jedince během prvních 2 minut zahřívání, což je v souladu s tvrzením, že vysoce melanizovaní jedinci vykazují vysokou aktivitu (Roland 1982). V souvislosti s tímto poznatkem je vhodné provádět pokusy při nižší teplotě prostředí (cca 10 °C) a před samotným měřením ochlazovat motýly na 15 minut ve 4 °C. Teplota těla sledovaných jedinců se ustálila po asi šesti minutách a zbylý časový úsek se měnila jen minimálně. Tento poznatek vede k závěru, že by bylo vhodné zkrátit dobu snímání na 10 minut, což navíc způsobí i zrychlení a zefektivnění celé práce.

Výsledek regresních analýz pro všechny druhy, že sledované proměnné mají vliv na strmost křivky, vyvrátily následné regresní analýzy provedené po rozdělení na „jarní“ a „letní“ druhy. Byla prokázána odlišnost mezi těmito skupinami. Výsledky klasifikace druhů podle rychlosti ohřevu a asymptotické teploty těla potvrdily, že změna okolní teploty měla vliv na rychlost ohřívání. Podobně se potvrdil i vliv teploty okolí na asymptotickou teplotu těla, která dosahuje hodnoty přibližně 2°C nad teplotu okolí. Konstantní teplota okolí se tak jeví jako kritická podmínka pro budoucí výzkum.

Dokázaný negativní vliv proměnlivých hodnot teploty a vlhkosti by mohla alespoň částečně eliminovat klasifikace všech druhů po odfiltrování teploty prostředí a vlhkosti. Tato klasifikace přinejmenším naznačuje vztah mezi hmotností těla a rychlostí ohřevu. Zatímco dva nejtěžší druhy *E. alberganus* a *E. pandrose* se ohřívaly nejpomaleji, nejlehčí druh *E.*

*melampus* se ohřival nejrychleji. Odstranění vlivu všech známých experimentálních podmínek a morfologických znaků se se teoreticky objevila závislost rychlosti ohřívání a asymptotické teploty a ostatních neměřených aspektech. Z morfologických znaků např. melanizace křídel, z behaviorálního hlediska procentuální zastoupení slunících se jedinců daného druhu nebo efektivita postoje a z fyziologického hlediska např. PGI.

Při vícerozměrné analýze bylo zjištěno, že vlhkost měla signifikantní vliv na sledované parametry a musela být při analýzách odfiltrována. Značná kolísavost vlhkosti uvnitř klimaboxu byla způsobena klimatizací, po jejíž aktivaci došlo k výraznému poklesu vlhkosti. Práce v klimaboxu vylučuje možnost stálé aktivity klimatizace a proto je velmi důležité aktivně sledovat vlhkost i teplotu uvnitř klimaboxu a reagovat včasnou aktivací klimatizace, nebo naopak vyčkat na ustálení co možná nejvíce konstantních podmínek. Tento požadavek je časově náročný a již zmíněná regulace měření na 10 minut je vítaná.

Meření ukázala, že při daném osvětlení byla asymptotická teplota těla motýlů v průměru o 2 °C vyšší než teplota prostředí. Je však známo, že motýli se sluněním dokáží zahřát v rozmezí 28–42°C (Kingsolver 1985a). Tento výsledek může být důsledkem nekvalitního osvětlení, které patrně mělo nedostatečný výkon. Nabízí se řešení ve formě změření tepelného výkonu slunce v místě odchytu a uzpůsobit tomu výkon zdroje. Skutečnost, že slunce je bodovým zdrojem tepelného záření a že motýli často zaujímalí postoje k ohřívání, které však nebyly směrované, je podle mého názoru dostatečným důvodem k redukci osvětlení pouze na jediný zdroj.

Je důležité si uvědomit, že při měření infračervenou kamerou zachycujeme teplotu povrchu hrudi, která se liší od skutečné tělesné teploty z následujících důvodů: a) Povrchová teplota je nižší, než teplota létacích svalů kvůli povrchové tepelné ztrátě; b) tyto motýli mají izolační ochlupení, které snižuje tepelné ztráty, termální kamera tak snímá povrchovou teplotu této izolační vrstvy. Měření povrchové teploty je nutnou daní za bezkontaktní měření termální kamerou, čímž je eliminováno jakékoliv zkreslení teploty při kontaktním měření. Izolační ochlupení se však nejeví jako nepřekonatelná překážka a nabízí se možnost oholení na hrudi.

## Zpracování snímků z termální kamery

Jedním z důležitých aspektů využívání termální kamery je provést optimální metodu zpracování snímků. M. Saastamoinen a Ilkka Hanski (2008) při použití termokamery za účelem měření teploty hrudi motýlů vytyčili 5 bodů na hrudi, jejichž hodnoty zprůměrovali.

Tato metoda se ale zdá nevhodná, jelikož některé body mohou být umístěny na okraji hrudi, jejíž teplota je výrazně ovlivněna okolním prostředím a navíc při každém nepatrném posunu tohoto bodu se značně mění jeho hodnota. Po prostudování získaných snímků bylo rozhodnuto získávat teplotní data změřením jednoho bodu ze středu hrudi. Toto místo je nejméně náchylné na teplotní vliv okolního prostředí a zároveň je teplota okolních bodů stejná nebo se liší jen minimálně. Právě v tomto místě je teplota na začátku měření nejnižší, na konci nejvyšší.

Získávání teplotních dat mělo svá úskalí, která vedla až ke zkeslení výsledků a tudíž jejich vyřazení. Zkeslení dat například způsobila nevhodná poloha motýla vůči objektivu kamery, která nebyla schopná zachytit teplotu hrudi. Tato neschopnost byla způsobena buď křídlem zakrývajícím sledovanou část hrudi nebo v případě aktivity motýla nevhodným úhlem pro snímání. Všechny snímky, které neobsahovaly sledovaný objekt z důvodu jeho úniku ze zorného pole termální kamery, byly zaznamenány jako prázdná hodnota.

Graf vytvořený z primárních dat získaných termální kamerou odhalil další úskalí. Počáteční teplota těla jednotlivých jedinců při spuštění snímání má různou hodnotu, což se v grafu vizuálně projevilo tak, že se křivky nepřekrývají, byť mají podobný průběh. Bylo nutno do těchto dat manuálně zasáhnout a křivky k sobě co nejvíce přiblížit. V praxi to znamenalo posun celé datové řady o jeden časový krok dopředu (+ 20 s) nebo zpět (- 20 s). V případě posunu zpět došlo ke ztrátě původní počáteční hodnoty v čase 0, která byla nahrazena hodnotou získanou 20 s po začátku snímání. Pro další analýzy bylo nutno zajistit data v určitém rozpětí a touto úpravou byla data mimo sledovanou škálu eliminována.

## **Závěr**

Rod *Erebia* se díky mezidruhové morfologické odlišnosti a rozdílným stanovištím jeví jako ideální pro studium komparativní termoregulace. Používání termální kamery pro studium termoregulace v laboratorních podmínkách je zatím jen výjimečné. Dosažené výsledky této práce, byť v ranné fázi, vykazují potenciál pro budoucí pokračování výzkumu s pozměněnými podmínkami. Zejména po eliminaci nedokonalých podmínek byl prokázán vliv morfologie na rychlost ohřívání, který by si zasloužil další laboratorní výzkum. Ten by mohl díky eliminaci části faktorů specifičtěji určit vliv jednotlivých aspektů na ohřívání motýlů. Při odchytu dostatečného počtu jedinců se by se naskytla možnost i pro srovnání mezi pohlavími.

## Literatura

Anderson AR, Collinge JE, Hoffmann AA, Kellett M, McKechnie SW (2003) Thermal tolerance trade-offs associated with the right arm of chromosome 3 and marked by the *hsp-omega* gene in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 90: 195–202.

Bahrndorff S, Maien J, Loeschcke V, Ellers J (2009) Dynamics of heat-induced thermal stress resistance and Hsp70 expression in the springtail, *Orchesella cincta*. *Funct Ecol* 23: 233–239.

Bijlsma R, Loeschcke V (2005) Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *J Evol Biol* 18: 744–749.

Bradshaw AD (1965) Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Adv Genet* 13: 115–155.

Brakefield PM, Reitsma N (1991) Phenotypic plasticity, seasonal climate and the population biology of *Bicyclus* butterflies (Satyridae) in Malawi. *Ecol. Entomol.* 16: 291–303.

Brakefield PM, Pijpe J, Zwaan BJ (2007) Developmental plasticity and acclimation both contribute to adaptive responses to alternating seasons of plenty and of stress in *Bicyclus* butterflies. *J. Biosci.* 32: 465–475.

Casey TM (1981) Behavioral mechanisms of thermoregulation. *In*: Heinrich B (ed), *Insect Thermoregulation*. John Wiley and Sons, New York, pp 79-114.

Chown SL, Hoffmann AA, Kristensen TN, Angilletta MJ Jr, Stenseth NC, Pertoldi C (2010) Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. *Clim Res* 43: 3–15.

Church NS (1960) Heat loss and the body temperature of flying insects. II. Heat conduction within the body and its loss by radiation and convection. *Journal of Experimental Biology* 37: 186-212.



Clarke A (2003) Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. *Trends Ecol Evol* 18: 573–581.

Clench HK (1966) Behavioral thermoregulation in butterflies. *Ecology* 47: 1021–1034.

Dahlhoff EP, Rank NE (2007) The role of stress proteins in responses of a montane willow leaf beetle to environmental temperature variation. *J Biosci* 32: 477–488.

Daily GC, Ehrlich PR, Wheye D (1991) Determinants of spatial distribution in a population of the subalpine butterfly *Oeneis chryxus*. *Oecologia* 88: 587-596.

Davies NB (1978) Territorial defence in the speckled wood butterfly (*Pararge aegeria*): the resident always wins. *Animal Behaviour* 26: 138-147.

Dennis RLH (1993) *Butterflies and climate change*. Manchester University Press, Manchester.

Dennis RLH, Bramley MJ (1985) The influence of man and climate on dispersion patterns within a population of adult *Lasiommata megera* (L.) (Satyridae) at Brereton Heath, Cheshire (U.K.). *Nota Lepidopterologica* 8: 309-324.

Dennis RLH, Williams WR (1987) Mate location behaviour of the large skipper butterfly *Ochlodes venata*: flexible strategies and spatial components. *Journal of the Lepidopterists' Society* 41: 45-64.

Digby PSB (1955) Factors affecting the temperature excess of insects in sunshine. *J Exp Biol* 32: 279-298.

Douwes P (1976) Activity in *Heodes virgaureae* in relation to air temperature, solar radiation and time of day. *Oecologia* 22: 287–298.

- Dreisig H (1995) Thermoregulation and flight activity on territorial male graylings, *Hipparchia semele* (Satyridae), and large skippers, *Ochlodes venata* (Hesperiidae). *Oecologia* 101: 169-176.
- Ellers J, Boggs CL (2002) The evolution of wing color in *Colias* butterflies: heritability, sex linkage, and population divergence. *Evolution* 56: 836–840.
- Ellers J, Boggs CL (2004) Functional ecological implications of intraspecific differences in wing melanization in *Colias* butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 79-87.
- Espeland M, Aagaard K, Balstad T, Hindar K (2007) Ecomorphological and genetic divergence between lowland and montane forms of the *Pieris napi* species complex (Pieridae, Lepidoptera). *Biol J Linn Soc* 92: 727–745.
- Findlay R, Young MR, Findlay JA (1983) Orientation behaviour in the grayling butterfly: thermoregulation or crypsis? *Ecological Entomology* 8: 145-153.
- Geister TL, Fischer K (2007) Testing the beneficial acclimation hypothesis: temperature effects on mating success in a butterfly. *Behav Ecol* 18: 658–664.
- Gilchrist GW (1990) The consequences of sexual dimorphism in body size for butterfly flight and thermoregulation. *Functional Ecology* 4: 475–487.
- Guppy CS (1986) The adaptive significance of alpine melanism in the butterfly *Parnassius phoebus* F. (Lepidoptera: Papilionidae). *Oecologia* 70: 205–213.
- Haag CR, Saastamoinen M, Marden JH, Hanski I (2005) A candidate locus for variation in dispersal rate in a butterfly metapopulation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272: 2449–2456.
- Heinrich B (1972) Thoracic temperatures of butterflies in the field near the equator. *Comp Biochem Physiol* 43A: 459-467.

- Heinrich B (1974) Thermoregulation in endothermic insects. *Science* 185: 747-756.
- Heinrich B (1986) Comparative thermoregulation of four montane butterflies of different mass. *Physiological Zoology* 59: 616-626.
- Heinrich B (1990) Is "Reflectance" basking real? *J Exp Biol* 154: 31-43.
- Heinrich B (1995) Insect thermoregulation. *Endeavour* 19: 28-33.
- Hoffmann AA, Sørensen JG, Loeschcke V (2003) Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J Therm Biol* 28: 175-216.
- Karl I, Fischer K (2009) Altitudinal and environmental variation in lifespan in the copper butterfly *Lycaena tityrus*. *Funct Ecol* 23: 1132–1138.
- Kelty JD, Lee RE (1999) Induction of rapid cold hardening by ecologically relevant cooling rates in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 45: 719–726.
- Kelty JD, Lee RE (2001) Rapid cold-hardening of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) during ecologically based thermoperiodic cycles. *J Exp Biol* 204: 1659–1666.
- Kemp DJ, Krockenberger AK (2002) A novel method of behavioural thermoregulation in butterflies. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 922-929.
- Kemp DJ, Krockenberger AK (2004) Behavioral thermoregulation in butterflies: the interacting effects of body size and basking posture in *Hypolimnas bolina* (L.) (Lepidoptera: Nymphalidae). *Australian Journal of Zoology* 52: 229-236.
- Kingsolver JG (1983a) Thermoregulation and flight in *Colias* butterflies: elevational patterns and mechanistic limitations. *Ecology* 64: 534-545.

Kingsolver JG (1983b) Ecological significance of flight activity in *Colias* butterflies: implications for reproductive strategy. *Ecology* 64:546–551.

Kingsolver JG (1985a) Butterfly thermoregulation: organismic mechanisms and population consequences. *Journal of Research on the Lepidoptera* 24: 1-20.

Kingsolver JG (1985b) Thermal ecology of *Pieris* butterflies (Lepidoptera: Pieridae): a new mechanism of behavioral thermoregulation. *Oecologia* 66: 540-545.

Kingsolver JG (1985c) Thermoregulatory significance of wing melanization in *Pieris* butterflies (Lepidoptera: Pieridae): physics, posture, and pattern. *Oecologia* 66: 546-553.

Kingsolver JG (1987) Evolution and Coadaptation of Thermoregulatory Behavior and Wing Pigmentation Pattern in Pierid Butterflies. *Evolution* 41: 472-490.

Kingsolver JG (1988) Thermoregulation, flight, and the evolution of wing pattern in pierid butterflies: the topography of adaptive landscapes. *American Zoologist* 28: 899-912.

Kingsolver JG, Moffat RJ (1983) Thermoregulation and the determinants of heat transfer in *Colias* butterflies. *Oecologia* 53: 27-33.

Kingsolver JG, Watt WB (1984) Mechanistic constraints and optimality models: thermoregulatory strategies in *Colias* butterflies. *Ecology* 65: 1835–1839.

Lee RE, Chen CP, Denlinger DL (1987) A rapid coldhardening process in insects. *Science* 238: 1415–1417.

Lepš J, Šmilauer P (2003) Multivariate analysis of ecological data using CANOCO. Cambridge University Press, Cambridge, 282 p.

Magnuson JJ, Crowder LB, Medvick PA (1979) Temperature as an ecological resource. *American Zoologist* 19: 331-343.

- Marais E, Terblanche JS, Chown SL (2009) Life stage-related differences in hardening and acclimation of thermal tolerance traits in the kelp fly, *Paratora dreuxi* (Diptera, Helcomyzidae). *J Insect Physiol* 55: 336–343.
- Pigliucci M (2001) Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. John Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Pivnick KA, McNeil J (1986) Sexual differences in the thermoregulation of *Thymelicus lineola* adults (Lepidoptera: Hesperidae). *Ecology* 67: 1024-1035.
- Pivnick KA, McNeil J (1987) Diel patterns of activity of *Thymelicus lineola* adults (Lepidoptera: Hesperidae) in relation to weather. *Ecological Entomology* 12: 197-207.
- Polcyn DM, Chappell MA (1986) Analysis of heat transfer in *Vanessa* butterflies: effects of wing position and orientation to wind and light. *Physiological Zoology* 59: 706-716.
- Rawlins JE (1980) Thermoregulation by the black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes* (Lepidoptera: Papilionidae). *Ecology* 61: 345-357.
- Roland J (1982) Melanism and diel activity of alpine *Colias*. *Oecologia* 53: 214-221.
- Rutowski RL, Demlong MJ, Leffingwell T (1994) Behavioural thermoregulation at mate encounter site by male butterflies (*Asterocampa leila*, Nymphalidae). *Animal Behaviour* 48: 833-841.
- Rutowski RL (2000) Postural changes accompany perch location changes in male butterflies (*Asterocampa leilia*) engaged in visual mate searching. *Ethology* 106: 453-456.
- Saastamoinen M (2007) Life-history, genotypic, and environmental correlates of clutch size in the Glanville fritillary butterfly. *Ecological Entomology* 32: 235–242.
- Saastamoinen M, Hanski I (2008) Genotypic and environmental effects on flight activity and oviposition in the glanville fritillary butterfly. *Am Nat* 171: 701–712.

Schmitz H (1994) Thermal characterization of butterfly wings. I. Absorption in relation to different color, surface structure and basking type. *Journal of Thermal Biology* 19: 403-412.

Sejerkilde M, Sørensen JG, Loeschcke V (2003) Effects of cold- and heat hardening on thermal resistance and Hsp70 expression in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol* 49: 719–726.

Shreeve TG (1984) Habitat selection, mate location, and microclimatic constraints on the activity of the speckled wood butterfly *Pararge aegeria*. *Oikos* 42: 371-377.

Shreeve TG (1990) The movements of butterflies. In: Kudrna O (ed.) *Butterflies of Europe*, Vol. 2, Introduction to Lepidopterology, Wiesbaden, Germany: Aula, pp. 512-532.

Shreeve TG (1992) Adult behaviour. In: Dennis RLH (ed), *The ecology of butterflies in Britain*. Oxford University Press, Oxford, pp 22–45.

Sinclair BJ, Vernon P, Klok CJ, Chown SL (2003) Insects at low temperatures: an ecological perspective. *Trends Ecol Evol* 18: 257–262.

Slámová I, Klečka J, Konvička M (2012) Thermoregulation and microhabitat use in coldwellling butterflies: comparative analysis of the genus *Erebia*. *International Symposium: Future of Butterflies in Europe III Dutch Butterfly Conservation (De Vlinderstichting)*, 29th - 31st March 2012, Wageningen, Netherlands.

StatSoft Inc. (2010) *Statistica* (data analysis software system), version 9.1, [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

Stevenson RD (1985) Body size and limits to the daily range of body temperature in terrestrial ectotherms. *American Naturalist* 125: 102-117.

Suarez RK (2000) Energy metabolism during insect flight: biochemical design and physiological performance. *Physiological and Biochemical Zoology* 73: 765–771.

Ter Braak, C.J.F. & Šmilauer, P. (2002) CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Ithaca, NY, USA ([www.canoco.com](http://www.canoco.com)): Microcomputer Power, 500pp.

Tracy CR, Tracy BJ, Dobkin DS (1979) The role of posturing in behavioral thermoregulation by black dragons (*Hagenius brevistylus* Selys; Odonata). *Physiol. Zool.* 52: 565–571.

Tracy CR, Christian KA (1986) Ecological relationships among space, time, and thermal niche axes. *Ecology* 67: 609-615.

Van Dyck H (2003) Mate location: a matter of design? Adaptive morphological variation in the speckled wood butterfly. *In*: Boggs CL, Watt WB, Ehrlich P (eds), *Butterflies: ecology and evolution taking flight*. University of Chicago Press, Chicago, pp 353–366.

Van Dyck H, Matthysen E (1998) Thermoregulatory differences between phenotypes in the speckled wood butterfly: hot perchers and cold patrollers. *Oecologia* 114: 326–334.

Vielmetter W (1958) Physiologie des Verhaltens zur Sonnenstrahlung bei dem Tagfalter *Argynnis paphia* L. I. Untersuchungen im Freiland. *Journal of Insect Physiology* 2: 13-37.

Wasserthal LT (1975) The role of butterfly wings in regulation of body temperature. *J Insect Physiol* 21: 1921-1930.

Watt WB (1968) Adaptive significance of pigment polymorphism in *Colias* butterflies. I: Variation of melanin in relation to thermoregulation. *Evolution* 22: 437-458.

Watt WB (1973) Adaptive significance of pigment polymorphism in *Colias* butterflies. III. Progress in the study of the “alba” variant. *Evolution* 27: 537–548.

Watt WB (1992) Eggs, enzymes, and evolution: natural genetic variants change insect fecundity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 89: 10608–10612.

Watt WB (2003) Mechanistic studies of butterfly adaptations. *In: Boggs CL, Watt WB, Ehrlich PR (eds), Butterflies: ecology and evolution taking flight.* University of Chicago Press, Chicago, pp 319–352.

Watt WB, Cassin RC, Swan MS (1983) Adaptation at specific loci. III. Field behaviour and survivorship differences among *Colias* PGI genotypes are predictable from in vitro biochemistry. *Genetics* 103: 725–739.

Watt WB, Carter PA, Blower SM (1985) Adaptation at specific loci. IV. Differential mating success among glycolytic allozyme genotypes of *Colias* butterflies. *Genetics* 109: 157–175.

Wickman P-O (1988) Dynamics of mate-searching behaviour in a hilltopping butterfly, *Lasiommata megera* (L.): the effects of weather and male density. *Zoological Journal of the Linnean Society* 93: 357-377.

Wickman P-O (2009) Thermoregulation and habitat use in butterflies. *In: Settele J, Shreeve T, Konvička M, Van Dyck H (eds), Ecology of butterflies in Europe.* Cambridge University Press, Cambridge, pp 55-61.

Wickman P-O, Wiklund C (1983) Territorial defence and its seasonal decline in the speckled wood butterfly (*Pararge aegeria*). *Animal Behaviour* 31: 1206-1216.

Willmer PG (1982) Microclimate and the environmental physiology of insects. *Advances in insect Physiology* 16: 1-57.

Willmer PG, Unwin DM (1981) Field analyses of insect heat budgets: reflectance, size and heating rates. *Oecologia* 50: 250-255.

Willmer P, Stone G, Johnston IA (2000) *Environmental physiology of animals.* Blackwell, Oxford.



Wilson RS, Franklin CE (2002) Testing the beneficial acclimation hypothesis. *Trends Ecol Evol* 17: 66–70.

Yoshimo MM (1975) *Climate in a Small Area*. Tokyo: University of Tokyo Press.

Zeilstra I, Fischer K (2005) Cold tolerance in relation to developmental and adult temperature in a butterfly. *Physiol Entomol* 30: 92–95.