Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Populační genetika dvou ohrožených perleťovců moravských Karpat

Bakalářská práce

Dan Leština

Školitel: doc. Mgr. Martin Konvička, Ph.D.

České Budějovice 2012

Leština, D., 2012: Populační genetika dvou ohrožených perleťovců moravských Karpat [Population genetics of two endangered fritillary butterflies in the Moravian Carpathians – Bc. Thesis, in Czech.] 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation
Populations of two sympatric large fritillary species, the High Brown Fritillary (*Argynnis adippe*) and the Niobe Fritillary (*A. niobe*), were studied using microsatellite markers to assess and compare potential population subdivision in a relatively preserved landscape of the Czech part of the Carpathians. The results are confronted with data obtained from a smaller-scale mark-release-recapture study, with species' known life histories and namely with their conservation status, all of which is also considered in explaining the obtained patterns of genetic diversity.

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.

Místo, datum

Podpis studenta

Poděkování

Rád bych poděkoval především svému školiteli Martinu Konvičkovi za trpělivost, vedení a skvělé nápady, což platí i pro Jana Zimu Jr., se kterým jsem práci konzultoval. Pak už ale nezbývá než uvést dlouhý výčet jmen lidí, bez kterých by práce nevznikla a kterým vděčím za mnohé: Alena Bartoňová, Aneta Tremerová, Anežka Pavlíková, Dita Horázná, Irena Slámová, Jakub Procházka, Kamil Zimmermann, Michaela Borovanská, Pavel Kepka, Pavel Vrba, Petr Vlašánek, Radka Jungová, Vojtěch Duchoslav, Zdeněk Fric, Zuzana Kotrbová.

OBSAH

ÚVOD..... 1
CÍLE PRÁCE..... 5
METODIKA..... 6
VÝSLEDKY.....17
DISKUSE..... 22
ZÁVĚR.....27
LITERATURA.....28

ÚVOD

Přežití populací závisí především na jejich velikosti, hustotě a prostorové dynamice. Pro každý druh by bylo optimální mít co největší soudržnou populaci, kde by si ale jedinci zároveň příliš vzájemně nekonkurovali. U různých taxonomických skupin nalezneme různá řešení tohoto problému. Existují organismy maximalizující svou populační hustotu na malé prostorové škále a vytvářející tak velmi početné lokální populace, které mohou přežívat třeba i bez genového toku, jak tomu je např. u některých půdních bezobratlých (např. Cicconardi 2010). Jiné organismy jsou naopak hodně mobilní a tím udržují populace na velké geografické rozloze, čímž zajišťují dostatečný počet jedinců v populaci - příkladem mohou být někteří ptáci (viz např. Stenzler 2009) nebo houby šířící se sporami (např. Vincenot 2012). Další možnou strategií je přežívání v metapopulaci vzájemně propojených, samostatně však nestabilních subpopulací (Hanski 1989 ad.). Denní motýli jsou z tohoto pohledu chápáni jako modelová skupina s různými strategiemi u jednotlivých druhů.

Každý organismus má unikátní nastavení demografických parametrů a hranice mezi jednotlivými typy struktury populací nejsou ostré. Záleží také na časovém a prostorovém měřítku, ve kterém se na populaci díváme. Uzavřená populace může mít u různých druhů rozlohu v řádu m^2 i v milionů km^2. A stejně tak jednu a tu samou populaci můžeme vnímat různě v závislosti na šíři úhlu pohledu, jak bylo ilustrováno např. na populaci pernatušky jablečníkové (*Wheeleria spilodactylus* Curtis, 1827) ve Walesu (Menendez a Thomas 2000). Interpretace její populační struktury podle výše zmíněných kategorií je zásadně odlišná, díváme-li se na mikrohabitatovou, lokální, regionální a „celostátní“ škálu, liší se též při použití různé časové škály.

Strukturovanost populací jako „veličina“ má ale obrovský význam pro praktické chování jednotlivých druhů v různých krajinách a zejména pro dopad krajinných změn. Stejnou změnu vnímají různé druhy odlišně (Louy *et al.* 2007).

Nejčastějším modelem krajinných změn je fragmentace biotopu. Klíčové pro její dopad tedy je, jestli se odehrává v měřítku, které se toho kterého druhu týká. Denní motýli se zde ukázali jako vhodná modelová skupina, protože mezi nimi nalezneme druhy s velmi kontrastním uspořádáním populací v krajině a tedy s kontrastními odpověďmi na takovéto změny. Např. okáč horský (*Erebia epiphron* Knoch, 1783) dosahuje velikých populačních hustot, a nevadí mu, když je populace dlouhodobě izolována na poměrně malém prostoru (Kuras *et al.* 2003, Schmitt *et al.* 2005), naproti tomu otakárek fenyklový (*Papilio machaon*

Linnaeus, 1758) vytváří otevřené populace o nízkých hustotách, závislé na dostatečné ploše vhodného habitatu v krajině (Hoole *et al*. 1999).

Pokud dojde jen ke změně rozložení těchto obyvatelných míst, na takto extrémně mobilní druhy to nebude mít vliv, protože populace se budou promíchávat i přes plochy neobyvatelného území stejně, jako do té doby. Druhy s velkou lokální hustotou populace mohou naopak přežívat v oddělených populacích v jednotlivých fragmentech. Při významných krajinných změnách ale nastává situace, kdy jsou jednotlivé fragmenty pro mnoho druhů příliš malé (neudrží dostatečně velké populace) a vzdálenosti mezi nimi pro mnoho druhů příliš velké (přestane fungovat metapopulační dynamika) – tyto druhy pak z daného území vymizí. Změnou struktury krajiny by tedy měly být nejvíce ohroženy organismy s kombinací středních hodnot těchto znaků (která hodnota je „střední" pak závisí na konkrétní situaci; jinak řečeno je předpokládána unimodální závislost odpovědi na fragmentaci biotopu). Na základě faunistických dat z 21 západoevropských regionů vyšlo najevo, přesně v souladu s tímto očekáváním, že z kategorií sedentární/přechodní/mobilní motýli vymírají signifikantně nejvíce ti přechodní; i porovnání úbytku obývaných faunistických čtverců v jednom z regionů vedlo ke stejnému závěru (Thomas 2000). Podobně v případové studii na čtyřech druzích říčních ryb byly fragmentací postiženy ty středně mobilní (Blanchet *et al.* 2010).

Změny volné krajiny střední Evropy posledních století se vyznačují všeobecnou intenzifikací obhospodařovaných ploch, naprostým opuštěním ploch pro tuto intenzifikaci nevhodných, a konečně zalesněním některých z nich. Druhy vázané na ranně sukcesní biotopy, vznikající jako vedlejší produkt extenzivního hospodaření, jsou tedy postiženy nejvíce (Thomas *et* Morris 1995). Tyto biotopy pravděpodobně ubyly jak z hlediska celkového počtu, tak z hlediska vzájemné návaznosti (cf. Konvička *et al.* 2005), čili by měly být nejvážněji ohroženy právě ty zde žijící druhy, kterým pro udržení dostatečné populační velikosti jedna lokalita nestačí.

A právě tyto druhy jsou typicky nevhodné pro výzkum populační genetiky. Tito motýli mívají větší velikost těla (Stevens *et al.* 2012), s čímž se pojí lepší letové schopnosti, zejména pohotové zrychlení a manévrování. Započteme-li navíc očekávatelnou nízkou populační hustotou (Thomas 2000), může být problém na jedné lokalitě získat dostatečně velký vzorek jedinců. Stejně tak pro studie pomocí zpětných odchytů (mark-release-recapture, MRR) je velký problém v odchytu dostatečného počtu jedinců, umocněný větší potřebou důkladného „proznačení" populace kvůli větší individuální mobilitě a potřebou pokrýt proporcionálně větší území, než u druhů s malým doletem, tvořících lokální,

soběstačné populace. Tato logistická obtížnost je zřejmě důvodem pro nesrovnatelně menší počet studií detailní populační struktury u těchto druhů (viz např. druhy zpracované v Stevens (2010)), kterou je ale důležité znát především vzhledem k potenciálnímu ohrožení právě těchto druhů.

Co se týče molekulárně genetických přístupů, z mobilnějších druhů jsou místy zkoumány druhy všeobecně rozšířené, které se běžně vyskytují i v moderní značně degradované krajině (*Aglais urticae* - Vandewoestijne *et al.* 1999; *Colias* spp. - Cleary *et al*. 2002; *Maniola jurtina* a *Pieris napi* - Wood a Pullin 2002; *Maniola jurtina* - Schmidt *et al.* 2005), které vesměs nemají žádnou vnitřní populační strukturu a jejichž populace jsou víceméně kontinuální v měřítku kontinentu. I okáč bojínkový (*Melanargia galathea* Linnaeus, 1758) je relativně hojný díky tomu, že mu vyhovují různé typy luk, včetně těch které se stále v Evropě hojně nacházejí. Informace o spojitosti jeho populací (Habel *et al.* 2010 ad.) proto také nevypovídají o vlivu krajinných změn.

Studie na druzích s větším potenciálním ohrožením a zároveň propojenými populacemi jsou již mnohem vzácnější. Např. okáč rosičkový (*Erebia medusa* Denis & Schiffermüller, 1775) je druh mesofilních až vlhčích luk s vysokým podílem křovin, které navíc musí být v blízkosti lesa, popř. žije přímo na lesních světlinách. Z těchto důvodů čelí značnému úbytku v západní Evropě. Z molekulárně ekologických prací (Schmitt *et* Muller 2007, Schmitt *et al.* 2007) lze vyčíst, že tam, kde ještě přežívá, jsou jeho kolonie vzájemně v kontaktu, ale obecně se jejich autoři zaměřují spíše na historii rozšíření, než na populační strukturu. Jako bariéry genového toku určují např. horské hřebeny nebo zemědělsky využívané nížiny.

Typickým zástupcem druhů se střední až vyšší schopností disperze, který obývá ranně sukcesní částečně antropogenní biotopy a zároveň ve střední Evropě čelí značnému ohrožení, je okáč skalní (*Chazara briseis* Linnaeus, 1764). Detailní studii populační biologie poslední větší české populace provedli Kadlec *et al.* (2010), kde přišly ke slovu i genetické nástroje. Konkrétně byly použity allozymové markery, které u tohoto mobilního motýla, obývajícího ale velmi izolované kolonie, prokázaly jejich mírnou diferenciaci.

Perleťovci podrodu *Fabriciana* Reuss, 1920 z rodu *Argynnis* Fabricius, 1807 byli dosud jen málo zkoumaní. Oba evropské druhy, perleťovec prostřední (*Argynnis adippe* Denis & Schiffermüller, 1775) i perleťovec maceškový (*Argynnis niobe* Linnaeus, 1785) vykazují vazbu na jistou formu nakládání s krajinou. Dnes se vyskytují jen v některých územích, ačkoli dříve byli hojnější (podrobněji viz Metodika: Studované druhy), zároveň to jsou dle Binka (1992) druhy s malou populační hustotou (kategorie 5, tzn. cca 4 ex./ha) a

velkými nároky na rozlohu vhodného biotopu (kategorie 4, tzn. min. 64 ha). Překvapivě jsou ale uváděni jako středně sedentární (kategorie 4 a 3; viz Diskuse). Získání konkrétních údajů o populační dynamice těchto motýlů v rámci studovaného území je tedy jedním z hlavních cílů této práce.

Oba druhy patří mezi ohrožené, ale přesto je v jejich abundanci velký rozdíl – p. prostřední, *A. adippe*, je mnohem hojnější, a to jak v rámci Evropy (Kudrna *et al.* 2011, Reinhardt *et al.* 2007), České republiky (Beneš *et* al. 2002, aktuální data viz Příloha 1), i studovaného území (viz Obr. 1, 2 a Metodika: Paralelní MRR studie). Z toho důvodu bychom mohli očekávat větší propojenost populací *A. adippe* a především větší genetickou diverzitu. Na druhou stranu má každý druh svou vlastní, různorodou historii vývoje početnosti (viz Metodika: Studované druhy), která by mohla mít také výrazný vliv na tyto veličiny, např. prostřednictvím efektu hrdla lahve při dočasném zmenšení populace, nebo zvýšením divergence subpopulací při menším počtu jedinců v metapopulaci (Freeland *et al.* 2012). Zjištění úrovně genetické diverzity a její porovnání mezi těmito druhy je dalším cílem této studie.

V současné době je dobře odůvodněným zvykem kombinovat více přístupů k výzkumu populací, přičemž analýza genetické struktury a studie pomocí zpětných odchytů jsou těmi základními (Leitner a Haddad 2011, cf. Stevens *et al.* 2010, Stevens *et al.* 2012, aj.). Současné užití těchto metod jednak poskytuje možnost vzájemné kalibrace metod náchylných na různé druhy zkreslení, jednak významně rozšiřuje časovou a prostorovou škálu, kterou jsme schopni postihnout. MRR studií nelze zjistit žádnou událost starší, než je délka života jedince, na druhou stranu genetické metody mají velmi malé rozlišení, pokud je diferenciace populací nedostatečná – pokud jsou oddělené příliš krátkou dobu, nebo v příliš malé míře. To je ale naopak oblast, kterou MRR studie dobře pokrývají, na menším prostoru a při častých pohybech jedinců v rámci tohoto prostoru je možné dosáhnout mnohem více zpětných odchytů, tzn. lepší kvality dat. Nicméně zpětné odchyty v této práci představují pouze doplňující zdroj informací k populačně genetickým datům, které by hlavně měly odpovědět na moje otázky.

Nejvhodnějším genetickým markerem pro inspekci genetické variability na úrovni jedinců a populací na geografické škále v řádu desítek kilometrů jsou mikrosatelity (též Simple Sequence Repeats, SSRs, nebo Short Tandem Repeats, STRs), jelikož jsou kodominantní (tzn. umožňující stanovit úroveň hetrozygotnosti), většinou selekčně neutrální, vysoce variabilní a mají vysokou mutační rychlost (Selkoe a Toonen 2006).

CÍLE PRÁCE

- Popsat genetickou strukturu populací perleťovců *Argynnis adippe* a *A. niobe*.

- Vzájemně porovnat údaje o obou druzích v kontextu jejich ekologie, zejména abundance a historie rozšíření. *A. adippe* je sice ohrožený, ale mnohem hojnější a v současnosti šířící se druh, zatímco *A. niobe* je vymírající, kriticky ohrožený druh, který je i na studované ploše mnohem vzácnější.

- Genetickou strukturu populací porovnat s daty o mobilitě jedinců v těchto populacích získanými pomocí zpětných odchytů v paralelně probíhající studii.

- Údaje o populační dynamice studovaných druhů srovnat s ostatními denními motýly.

- Stanovit charakteristiky genetické diverzity a porovnat je mezi druhy, příp. se srovnatelnými údaji o ostatních motýlech.

METODIKA

Studované druhy

Podle nedávno publikovaných studií fylogeneze tribu Argynnini Swainson 1833 (Simonsen 2006, Simonsen *et al.* 2006) náleží oba zkoumané druhy do stejné vývojové větve, odpovídající už dříve popsanému podrodu *Fabriciana* Reuss, 1920. Sousedním podrodem je *Speyeria* Scudder, 1872, kam patří mj. dále zmiňovaný americký perleťovec *Argynnis* (*Speyeria) idalia* Drury, 1773 nebo náš perleťovec velký, *Argynnis aglaja* Linnaeus, 1785.

Perleťovec prostřední (*A. adippe*) je druh s palearktickým areálem, sahajícím od Pyrenejského poloostrova a Velké Británie přes Sibiř a Střední východ po Čínu a Japonsko; v Evropě zasahuje na severu do střední Skandinávie, na jihu až na středomořské poloostrovy, žije i v Maroku a severním Alžírsku (Tuzov 2003, Tolman 2008, Kudrna *et al.* 2011). Živnými rostlinami jsou různé druhy violek, uvádí se violka Rivinova (*Viola riviniana* Reichenbach, 1823), v. srstnatá (*V. hirta* L.), v. psí (*V. canina* L.) a v. vonná (*V. odorata* L.) (Warren 1995, Beneš *et al.* 2002). Larvy, a zřejmě i vajíčka, ke svému vývoji musí mít k dispozici místa s teplým mikroklimatem, např. větší kusy osluněných kapradinových listů nebo obrostlé kameny (Warren 1995). Dospělci létají v jedné generaci od konce června do srpna a kromě bohaté nabídky nektaru vyžadují blízkost vhodných nocovišť a úkrytů, tzn. lesa nebo křovin.

Perleťovec maceškový (*A. niobe*) má o něco menší areál, sahající od Pyrenejského poloostrova po střední Sibiř a Altaj, v západní části potom oproti předchozímu druhu dosahuje jen do jižní Skandinávie, chybí ve V. Británii a Africe (Tuzov 2003, Tolman 2008, Kudrna *et al.* 2011). Housenky se také živí různými druhy violek, např. v. vonnou (*Viola odorata*), v. psí (*V. canina*) nebo v. bahenní (*V. palustris* L.) (Spitzer *et al.* 2009a, Salz a Fartmann 2009, Beneš *et al.* 2002). Larvální vývoj je ještě závislejší na teplém mikroklimatu než u p. prostředního, vyhledává proto místa s kusy obnaženého substrátu. Na atlantickém pobřeží Evropy jsou to především oblasti písečných dun (Salz a Fartmann 2009), ale v ostatních regionech jde zpravidla o tradičně obhospodařovaná místa, kde se kromě dostatečné nabídky nektaru, úkrytů, živných rostlin atp. nachází i půda mechanicky narušovaná kopyty dobytka nebo jinými faktory (Salz a Fartmann 2009, Spitzer *et al.* 2009a; srov. Studované území a sběr vzorků). Přes tyto rozdíly v habitatových preferencích (viz též Paralelní MRR studie), najdeme oba druhy často na společných lokalitách (např. na většině odchytových lokalit pro tuto studii, Tab. 2)

V rámci celé Evropské unie je p. maceškový „téměř ohrožený“ (kategorie NT, Van Swaay 2010), v zemích západní a střední Evropy je to ale jeden z nejvážněji ustupujících druhů. V mnoha regionech dle dostupných údajů úplně vymizel, např. ve Vlámsku (Maes *et* Van Dyck 1999), v Sasku a v Durynsku (Reinhardt *et al.* 2007) a podobný trend je zřetelný i na dalších místech (Kudrna *et al.* 2011, Beneš *et al.* 2002, Maes *et* Van Dyck 1999). Perleťovec prostřední naproti tomu celoevropsky ohrožen není (kategorie LC, Van Swaay 2010), ale ani on se nevyskytuje v intenzivně obdělávané krajině. Ve Velké Británii v 2. pol. 20. stol. vymizel z 94% svého původního areálu během 30 let (Warren 1995) a stal se tak jedním ze dvou „kriticky ohrožených“ denních motýlů Británie (Fox *et al.* 2011).

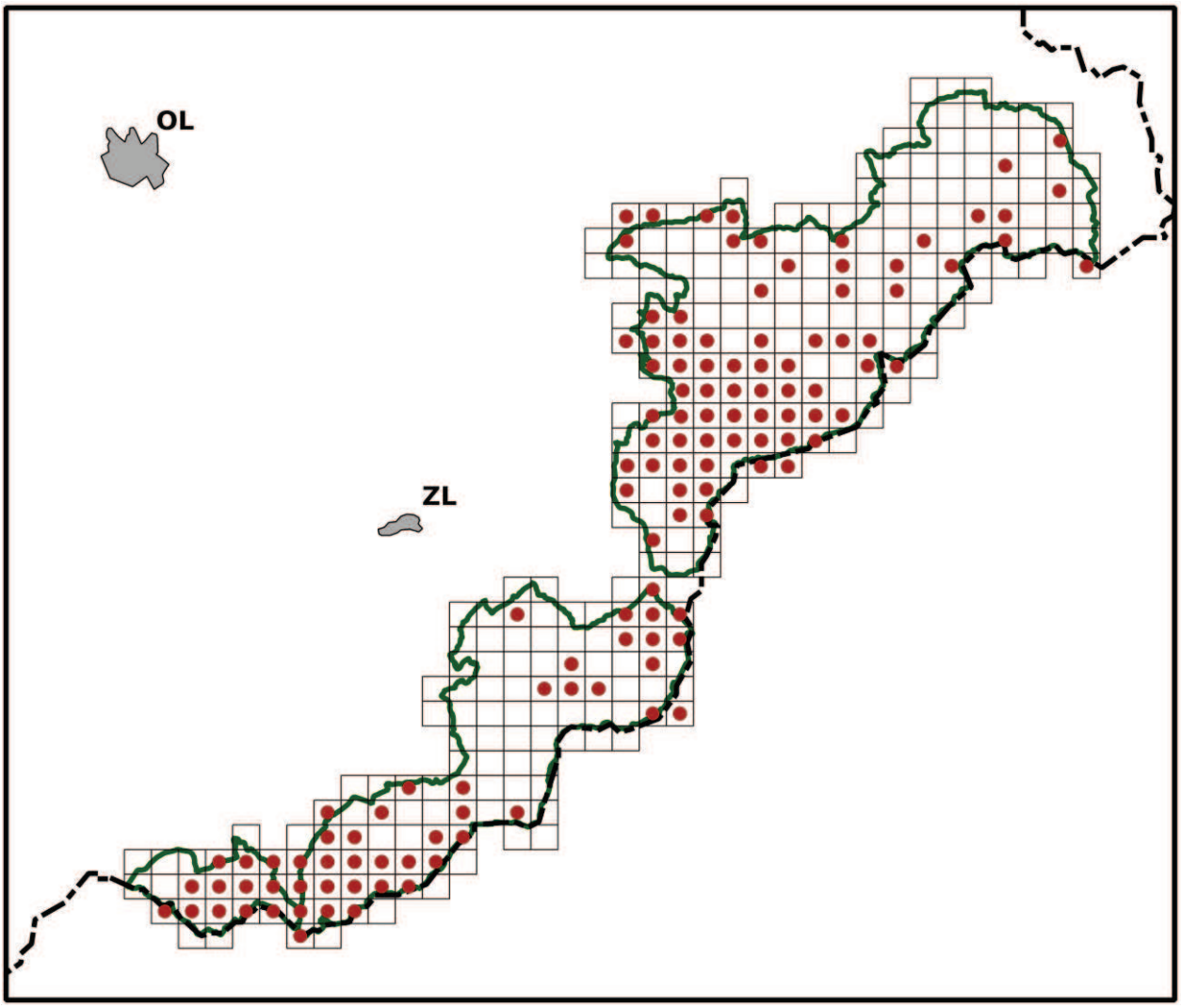
Ačkoli oba druhy byly v ČR dříve rozšířeny plošně (Beneš *et al.* 2002), o p. maceškovém (*A. niobe*) není z posledních let žádný věrohodný záznam z Čech, výjimkou jsou pouze vzácná hlášení z Podorlicka (Databáze Mapování motýlů České republiky, EntÚ BC AV ČR), jinde pravděpodobně vyhynul (viz Příloha 1). Na Moravě přežívá v karpatských pohořích, hojný ale zůstává prakticky jen v údolí horní Vsetínské Bečvy (viz Studované území). Je řazen mezi ohrožené druhy (Beneš *et al.* 2005). Druhý z perleťovců, *A. adippe*, má jiný osud, sice také oproti původnímu stavu významně ustoupil (Beneš *et al.* 2002), zejména v 80. letech (J. Beneš, ústní sdělení), ale v posledních letech se do mnoha území vrací (viz Příloha 1, Databáze Mapování motýlů České republiky, EntÚ BC AV ČR); je řazen mezi druhy zranitelné (Beneš *et al.* 2005).

Studované území

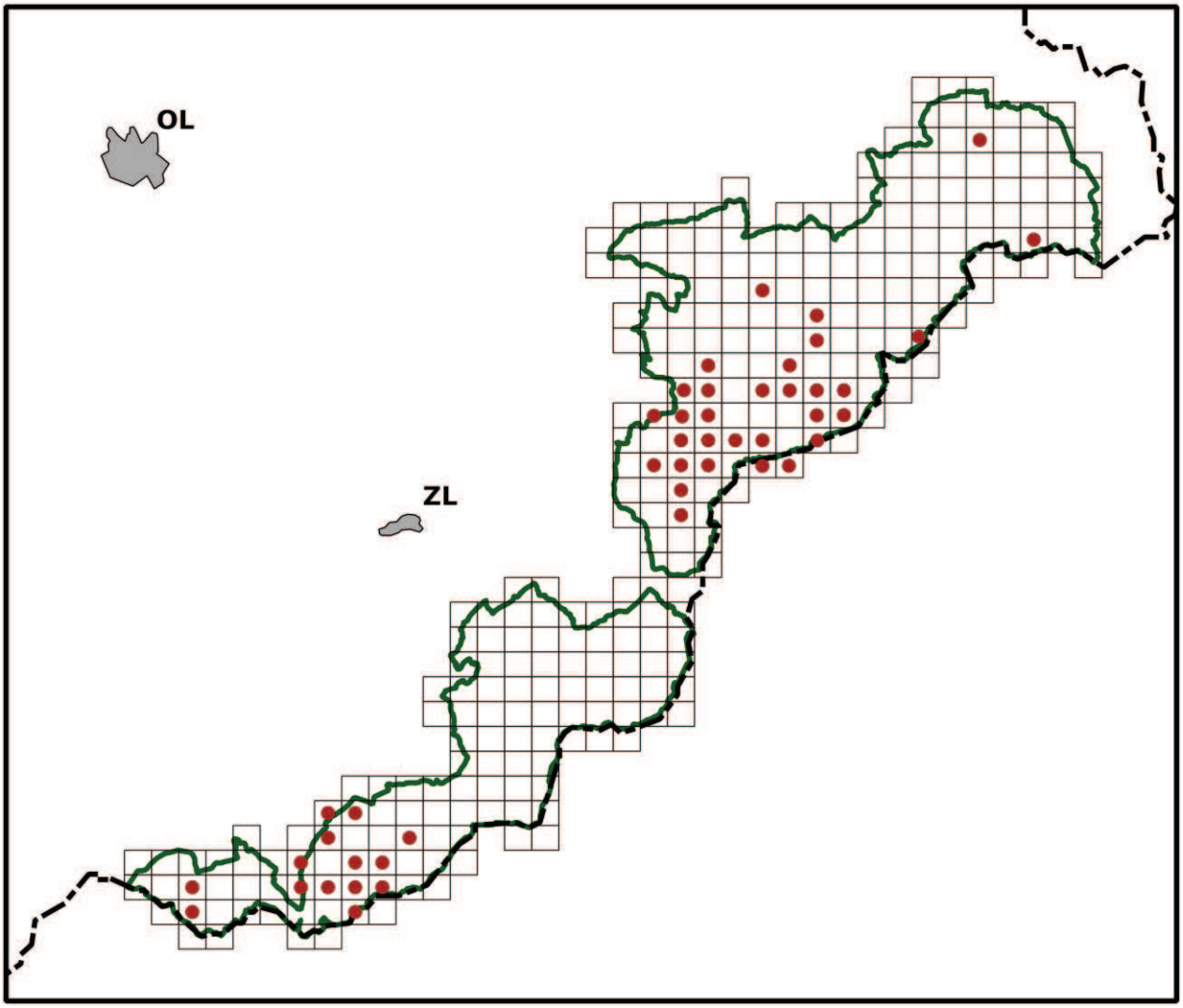
Západní Karpaty tvoří v České republice několik dílčích pohoří. Vzorky jsem sbíral na jejich části, od jihu Moravskoslezských Beskyd po sever Bílých Karpat (nejvzdálenější lokality 46 km od sebe). Krajina této oblasti, zejména pak její centrální části, údolí horního toku Vsetínské Bečvy, je charakteristická relativně zachovalou jemnou krajinnou mozaikou, na některých místech též doprovázenou tradičním způsobem extenzivního využití. Stále je rozšířen soukromý chov dobytka a ruční sečení luk. Díky geologicky nestabilnímu flyšovému podloží zde poměrně často dochází k malým sesuvům, které mohou obnažit půdu (důležité pro mikroklima; Spitzer *et al.* 2009a).

Na horním toku Vsetínské Bečvy nacházíme systém dlouhých, hluboce zařízntých bočních údolí, pravoúhle se odvětvujících z údolí hlavního, je zde tedy neobvykle velký počet „odlehlých" míst. Větší centralizace osídlení, natož potom scelování pozemků do větších polí či luk díky tomu v bočních údolích ani nebyla možná. Jiné než tradiční využití také nemůže přijít ke slovu, alespoň na typických strmých svazích, ovšem s jednou podstatnou výjimkou, a tou je vysazování lesních kultur. To je nyní největší hrozbou pro druhy závislé na původním stylu nakládání s pozemky (Spitzer *et al.* 2009b), snad společně s všeobecným opouštěním pozemků.

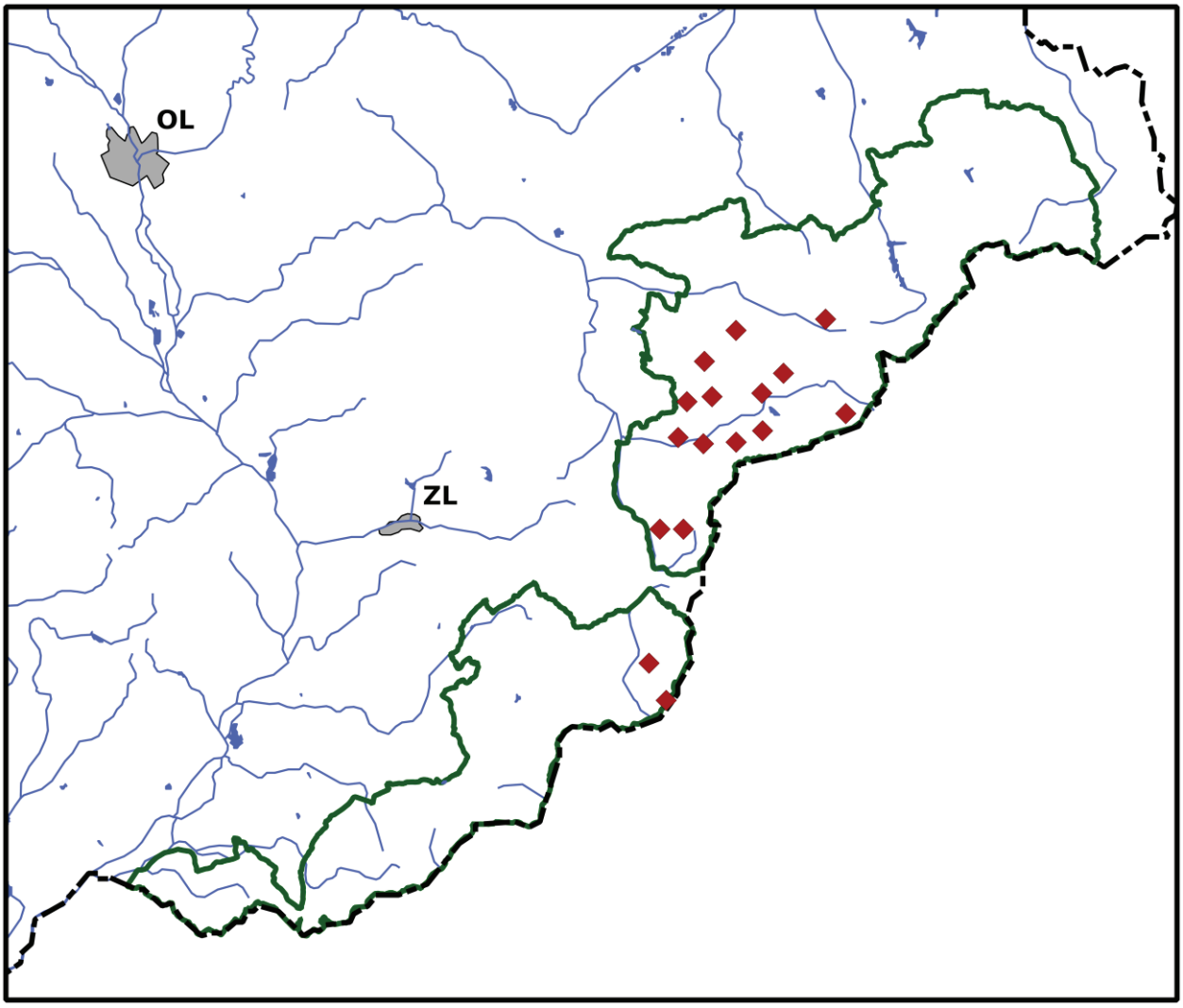
Většina sebraného materiálu pro genetickou studii pochází z tohoto „centrálního údolí", které hostí největší populace obou druhů v regionu, též zde probíhala paralelní studie pomocí zpětných odchytů.



Obr. 1: Výskyt perleťovce prostředního (*A. adippe*) v CHKO Beskydy a v CHKO Bílé Karpaty. OL, ZL – města Olomouc a Zlín. Plnou čarou hranice CHKO, přerušovanou čarou státní hranice. Údaje Správy CHKO Beskydy a CHKO Bílé Karpaty.



Obr. 2: Výskyt perleťovce prostředního (A. niobe) v CHKO Beskydy a v CHKO Bílé Karpaty. OL, ZL – města Olomouc a Zlín. Plnou čarou hranice CHKO, přerušovanou čarou státní hranice. Údaje Správy CHKO Beskydy a CHKO Bílé Karpaty.



Obr. 3: Studované území s vyznačenou polohou odchytových lokalit. OL, ZL – města Olomouc a Zlín. Plnou čarou hranice CHKO, přerušovanou čarou státní hranice, světlou barvou vodní toky a vodní plochy.

Paralelní MRR studie

V roce 2009 v jádru studované oblasti proběhla masivní studie za použití zpětných odchytů (L. Spitzer, M. Konvička, Z. Fric, P. Kepka, R. Tropek, M. Zapletal, nepubl.). V bočních údolích Lušová a Dinotice (poloha viz Tab. 2) byly sledovány oba druhy po celou dobu letu (23.6.-12.8.). Celkem odchyty probíhaly 32 jednotlivých dní, bylo označeno 3903 jedinců (2418 ♂♂ a 629 ♀♀ *A. adippe*, 542 ♂♂ / 314 ♀♀ *A. niobe*), zpětných odchytů bylo zaznamenáno 815 (490 ♂♂ a 138 ♀♀ *A. adippe*, 134 ♂♂ / 53 ♀♀ *A. niobe*). Při každém odchytu byla zaznamenána přesná poloha, jako ulétnutá vzdálenost byla tedy použita přímo geometrická vzdálenost mezi přesnými body odchytu.

Pro doplnění obecných informací o populacích, které zkoumá tato práce, mi byly poskytnuty vypočtené údaje o velikosti populací a době dožití, které uvádím v Tab. 1. Z výsledků je především patrné, že i v místě, kde *A. niobe* dosahuje největších populačních hustot v republice, je jeho populační hustota stále řádově nižší, než u druhého druhu. Imaga žijí rovněž kratší dobu, což může mít vliv na vzdálenost, jakou dokáže jedinec během života urazit.

Tab. 1: Demografické charakteristiky populací cílových druhů v údolích Lušová a Dinotice, převzato z nepublikovaných závěrů L. Spitzera *et al*.

	A. adippe		*A. niobe*	
	♂	♀	♂	♀
N (±SE)	11300 (485)	5520 (452)	1510 (197)	3130 (748)
Průměrná doba dožití (dny)	18	18	12	9
Max. doba dožití (dny)	49	42	33	33

Pro porovnání genetické struktury populace s mobilitou zjistitelnou touto tradiční metodou mi byla poskytnuta data o počtech přeletů mezi oběma lokalitami a také o přesné vzdálenosti mezi místy odchytu všech 603 opakovaně odchycených jedinců. Vypočítal jsem průměrnou ulétnutou vzdálenost jedinců a poměr přeletů mezi lokalitami k celkovému počtu zpětných odchytů. Počet mezilokalitních přeletů jsem vztáhl i k odhadnuté velikosti populace, protože ta méně zanedbává jedince, kteří se přesunuli z některé ze zkoumaných lokalit mimo studované území.

Jako disperzní parametr porovnatelný mezi druhy jsem vypočetl sklon linearizované inverse power function (inverzní mocninná funkce, IPF; viz např. Fric *et* Konvička 2010, Konvička *et al.* 2012), který odráží vztah vzdálenosti a počtu jedinců, kteří tuto vzdálenost urazili. Rozdíl mezi sklony jsem otestoval Tukeyho HAD testem (Zar 1996).

Molekulárně ekologické postupy

V centrálním údolí jsem pro studii vybral devět lokalit po celé jeho délce (všechny lokality viz Tab. 2 a Obr. 3)., ostatních částech moravských Karpat jsem navštívil většinu aktuálně udávaných lokalit (Databáze Mapování motýlů České republiky, EntÚ BC AV ČR, též L. Spitzer a M. Konvička, ústní sdělení), a sebral maximální možné množství vzorků. Sběr vzorků probíhal v sezónách 2010 a 2011, někde jsem zčásti využil i vzorky sebrané kolegy při MRR studii v roce 2009. Z nasbíraného materiálu jsem pro analýzu populační struktury použil 126 jedinců *A. adippe* a 131 jedinců *A. niobe*. Jejich výsledky dostatečně spolehlivě zodpověděly moje základní otázky, zbytek materiálu bude tedy případně použit až pro případné další studie.

Tab. 2: Lokality, jejich poloha a počty analyzovaných jedinců (N) obou druhů.

Místní název	Zkratka	°sev. šířky	°vých. délky	*N A. adippe*	*N A. niobe*
Březitá	Br	49,3104228	18,1882753		9
Bzové	Bz	49,3795086	18,2609039	17	11
Černé	Ce	49,3088481	18,1380311	3	6
Dinotice	Di	49,3510278	18,1127311	26	15
Kobylská	Ko	49,3595683	18,2276817	7	9
Kopanice	KP	49,0882092	18,0545533	12	
Kudlačena	Ku	49,4336672	18,3254456	10	3
Losový	Lo	49,3151131	18,0992903	3	24
Lušová	Lu	49,3560656	18,1512292	21	24
Podťaté	Po	49,3391097	18,3563908	6	14
Pulčín	Pu	49,2230819	18,0713272	4	0
Sidonie	Si	49,0506983	18,0809711	5	0
Valašská Bystřice	VB	49,3913989	18,1395975	8	8
Vranča	Vr	49,3218756	18,2287661		7
Valašská Senice	VS	49,2230428	18,10741	4	
Zákopčí	Za	49,4224353	18,1880172		1

Z čistým etanolem fixovaných tkáňových vzorků jsem genomovou DNA izoloval pomocí komerčně dostupného laboratorního kitu (QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit), podle dodaného protokolu, eluční objem jsem postupně optimalizoval na dvakrát 100µl ve dvou postupných elucích.

Byla otestována možnost použít mikrosatelitové markery vyvinuté pro relativně příbuzný druh *A. idalia* (ty ale neposkytovaly žádné konzistentní PCR produkty. Proto bylo zadáno komerční vyvinutí nových primerů u firmy Genoscreen (Francie), vzorky DNA *A.*

niobe byly zaslány na službu GenoSat, která zahrnuje vytvoření genomové knihovny, její screening pomocí STRs sond a následné 454 sekvenování vybraných úseků (Malausa *et al.* 2011).

Z párů primerů (dále „pp“) navržených firmou Genoscreen jsem pomocí online dostupné aplikace NetPrimer (http://www.premierbiosoft.com/netprimer/) vybral 30 nejvhodnějších k PCR, a to s ohledem na sekundární strukturu molekul primerů, pravděpodobnost tvorby primerových dimerů a další biochemické vlastnosti závislé na jejich sekvenci. Těchto 30 pp jsem nechal komerčně vyrobit (Generi-Biotech) a vyzkoušel jsem jejich skutečné chování při PCR, výsledky jsem kontroloval agarózovou gelovou elektroforézou. Pro konzistentně se amplifikující lokusy jsem nechal vyrobit „forward“ primery značené fluorescenční značkou (6-FAM, NED, PET nebo VIC; Applied Biosystems), abych zjistil jejich skutečnou použitelnost pro studii, především jsou-li polymorfní. Z výsledných otestovaných pp jsem vytvořil dvě skupiny vzájemně kompatibilních pp pro současné použití (multiplex PCR). Pomocí těchto dvou setů jsem amplifikoval příslušné STR lokusy ze všech dostupných vzorků (12 µl reakce, 4 µl Combi PPP-MasterMix (Top-Bio), 1µl set primerů (c_{tot}=1nmol/µl), 5 µl sterilní bidestilované vody, 2 µl izolátu DNA; PCR parametry: 4 minuty počáteční denaturace při 94°C, poté 35 cyklů střídání 94°C (30s), 54°C (60s), 72°C (60s), ukončeno 5 min. finální elongace při 72°C). PCR produkty byly odesílány na fragmentační analýzu (většina vzorků prostřednictvím firmy Macrogen (Korea), počáteční testy sekvenátor ABI 3130 Biologického centra AV ČR) a konečně samotné délky alel jsem analyzoval pomocí softwaru Genemapper (Applied Biosystems).

Pro odhad výskytu nulových alel a jsem použil program FreeNA (Chapuis *et* Estoup 2007), ve kterém jsem následně upravil datasety jak pro charakteristiku alelických frekvencí celkových populací, tak jejich částí. Případnou genetickou vazbu jsem otestoval softwarem GENEPOP (Rousset 2008).

Jako základní parametry genetické variability jsem pro oba druhy vypočetl průměrný počet alel na lokus (N_a) a očekávanou proporci heterozygotů (H_e). Porovnáním H_e se skutečnou heterozygotností (H_o) jsem získal inbreeding coefficient (F), jakožto nejdůležitější měřítko celkové strukturovanosti populace (nenáhodného páření). Při porovnání jednotlivých „subpopulací“ jsem nejprve použil párové (pairwise, pw) F_{st}, základní koeficient ukazující na mezipopulační rozdíly. Ten uvádím zejména kvůli dobré porovnatelnosti údajů s literaturou, korektnější mírou diferenciace populací je však Φ_{pt}, které je založené na sumarizaci rozdílů mezi samotnými jedinci porovnávaných populací (Excoffier *et al.* 1992).

Pomocí něj a metody AMOVA (Analysis of Molecular Variance, Excoffier *et al.* 1992) jsem mezipopulační rozdíly otestoval. Nakonec jsem vynesením linearizovaných hodnot párového Φ_{pt} (použil jsem jen lokality s $N>7$) a logaritmicky transformovaných geografických vzdáleností zobrazil „izolaci vzdáleností“ (isolation by distance, IBD) a její vliv otestoval Mantelovým testem (5000 permutací). Všechny výše uvedené výpočty jsem prováděl pomocí programu GenAlEx podle doporučení jeho autorů (Peakall a Smouse 2006), není-li uvedeno jinak.

VÝSLEDKY

Analýza mobility na základě dat z paralelní MRR studie

Počty přeletů mezi oběma údolími, standardizované jednak počtem všech zpětných odchytů u každého z druhů, jednak odhadem populační velikosti uvádím v Tab. 3, stejně jako průměrnou ulétnutou vzdálenost a hodnotu sklonu regresní přímky linearizované IPF. Rozdíl ve sklonu přímky mezi druhy (nebrán ohled na pohlaví) byl těsně nesignifikantní (Tukey HAD; DF=74; t=-1,954; p= 0,054).

Tab. 3: Údaje o mobilitě cílových druhů v údolích Lušová a Dinotice vypočtené z dat ze zpětných odchytů. Počet přeletů – počet jedinců, kteří byli postupně odchyceni v obou údolích; % mezilokalitní – počet přeletů dělený celkovým počtem zpětných odchytů pro dané pohlaví a druh, násobený 100%; P.p./*N* - počet přeletů dělený odhadnutou celkovou velikostí populace; MD – průměrná ulétnutá vzdálenost v metrech; *m* – sklon linearizované IPF.

	A. adippe		*A. niobe*	
	♂	♀	♂	♀
Počet přeletů	41	13	5	3
% mezilokalitní	8,3	9,4	3,7	5,7
P.p./*N*	0,0036	23	0,0033	0,0010
MD (±SE)	686 (35)	754 (67)	479 (70)	534 (99)
m	-1,50	-1,15	-1,22	-1,07

Vlastní populačně genetická práce

Z genomu *A. niobe* bylo celkem získáno 8144 STRs lokusů, pp pro 388 z nich byly bioinformatickou analýzou firmy Genoscreen označeny jako vhodné pro PCR. Ze 30 vybraných pp poskytovalo skutečné konzistentní PCR produkty 18 pp. Fragmentační analýza 24 vzorků od každého druhu ukázala, že dva z těchto 18 lokusů byly u obou druhů monomorfní a dalších deset vykazovalo buď nespecifické PCR produkty, těžko odlišitelné od skutečných alel, nebo se neamplifikovaly konzistentně.. Ze zbylých se mi podařilo vytvořit dva sety primerů použitelné pro multiplex PCR, každý po třech pp (Tab. 4), pomocí kterých jsem následně provedl PCR všech vzorků obou druhů.

Tab. 4: Použité SSRs lokusy, sekvence příslušných primerů a genetické charakteristiky lokusů (bez korekce vlivu nulových alel). Hodnoty pro celkové populace *A. adippe*/*A.niobe*. Set – set primerů pro multiplex PCR, N_a – průměrný počet alel na lokus, H_e – průměrná očekávaná proporce heterozygotů, H_o – průměrná pozorovaná proporce heterozygotů, F – průměrný fixační index.

Kód	Sekvence primerů	Motiv	Set	N_a	H_e	H_o	F
An_25	F: TTAAAAGAGCTTGCTGCGGT R: TGCATCAAATGTGTTACGTGC	tg	1	4/4	0,38/0,59	0,37/0,56	0,03/0,05
An_26	F: TGTCGAATCAAGAAATTAGAATGC R: CAAGAATTGCTCGTTTAAAAGTATT	atct	1	1/6	-/0,41	-/0,29	-/0,28
An_30	F: GCCATTATTGTATCCTCCTTGG R: CGTCAAAAGAGCAATCAGTGG	ttg	1	4/5	0,13/0,40	0,12/0,42	0,08/-0,02
An_20	F: TAGATCCAGTGGTCGCCTTT R: ATATGACAGTCGGGAGACGG	tgta	2	6/33	0,57/0,93	0,48/0,51	0,16/0,45
An_24	R: ATGAATGGAGTTTCGCCAAG F: GTGCAGGGAAGGAAGAGAAG	ag	2	5/10	0,48/0,66	0,30/0,50	0,37/0,25
An_27	F: ACCAAGTTCCACCCATCTGA R: CACAGAAGCCACTGCCACTA	ctt	2	6/6	0,34/0,24	0,40/0,27	-0,20/-0,12

Test genetické vazby odhalil pouze jedinou průkaznou vazbu, a to u *A. niobe* mezi lokusy An_26 a An_27. Celkem bylo zjištěno 26 alel u druhu *A. adippe* a 64 u *A. niobe*, mezi jednou a šesti alelami na jeden lokus u *A. adippe* a pěti a 33 alelami u *A. niobe* (monomorfní lokus An_26 byl při analýzách v rámci *A. adippe* dále vyřazen). Ze srovnání průměrného N_a i H_e mezi druhy je zřejmé, že *A. adippe* má výrazně nižší genetickou diverzitu, viz Tab. 5. Celkové populace obou druhů vykazují F blízký nule (též viz Tab. 5). Na všech jednotlivých lokalitách bylo po korekci výskytu nulových alel heterozygotů více, než by bylo očekáváno při Hardy-Weinbergově rovnováze (tab. 6 a 7). Párová F_{st} i Φ_{pt} shodně ukazují na zanedbatelnou diferenciaci lokalit (Tab. 8-11).

Tab. 5: Základní genetické charakteristiky pro celkové populace, hodnoty pro originální data (U) a pro data po korekci vlivu nulových alel (C). Vysvětlivky viz Tab. 4.

	N	N_a (±SE)	H_e (±SE)	H_o (±SE)	F (±SE)
A. adippe U	126	4,5 (0,6)	0,32 (0,09)	0,28 (0,07)	0,07 (0,08)
A. niobe U	131	10,7 (4,5)	0,54 (0,10)	0,42 (0,05)	0,15 (0,09)
A. adippe C	126	5,2 (0,7)	0,36 (0,10)	0,37 (0,09)	-0,04 (0,03)
A. niobe C	131	11,3 (4,6)	0,56 (0,10)	0,57 (0,10)	-0,03 (0,02)

Tab. 6: Základní genetické charakteristiky vzorků *A. adippe* z jednotlivých lokalit po korekci vlivu nulových alel (vynechány lokality s N<7). Vysvětlivky viz Tab. 5, zkratky názvů lokalit viz Tab. 2.

	N	*N*a (±SE)	*H*e (±SE)	*H*o (±SE)	*F* (±SE)
Bz	17	3,6 (0,51)	0,34 (0,06)	0,35 (0,06)	-0,045 (0,027)
Di	26	3,8 (0,58)	0,39 (0,09)	0,38 (0,09)	-0,012 (0,057)
Ko	7	2,2 (0,37)	0,37 (0,1)	0,43 (0,11)	-0,183 (0,092)
KP	12	3,6 (0,4)	0,46 (0,1)	0,5 (0,1)	-0,092 (0,025)
Ku	10	3,2 (0,73)	0,36 (0,07)	0,42 (0,08)	-0,176 (0,072)
Lu	21	4,8 (0,49)	0,41 (0,09)	0,42 (0,08)	-0,037 (0,029)
VB	8	2,8 (0,37)	0,39 (0,09)	0,43 (0,08)	-0,110 (0,057)

Tab. 7: Základní genetické charakteristiky vzorků *A. niobe* z jednotlivých lokalit po korekci vlivu nulových alel (vynechány lokality s N<7). Vysvětlivky viz Tab. 5, zkratky názvů lokalit viz Tab. 2.

	N	N_a (±SE)	H_e (±SE)	H_o (±SE)	*F* (±SE)
Br	9	4 (1,27)	0,48 (0,12)	0,54 (0,13)	-0,128 (0,029)
Bz	11	4,33 (1,02)	0,52 (0,09)	0,58 (0,10)	-0,119 (0,045)
Di	15	6,83 (1,83)	0,57 (0,11)	0,58 (0,12)	-0,015 (0,033)
Ko	9	4,67 (1,38)	0,50 (0,10)	0,56 (0,11)	-0,116 (0,061)
Lo	24	7,00 (2,00)	0,58 (0,10)	0,60 (0,10)	-0,064 (0,022)
Lu	25	7,17 (2,15)	0,54 (0,09)	0,56 (0,08)	-0,064 (0,039)
Po	16	6,17 (2,02)	0,56 (0,11)	0,56 (0,12)	-0,008 (0,036)
VB	8	3,67 (1,12)	0,46 (0,10)	0,52 (0,12)	-0,122 (0,030)
Vr	7	3,83 (1,08)	0,48 (0,09)	0,50 (0,12)	-0,035 (0,075)

Tab. 8: Párové F_{st} po korekci vlivu nulových alel pro dvojice lokalit *A. adippe*. Pod diagonálou průměry z hodnot ze všech lokusů, nad diagonálou konfidenční intervaly.

	Bz	Di	Ko	KP	Ku	Lu	VB
Bz		-0,004; 0,086	-0,01; 0,087	0,001; 0,078	-0,02; -0,001	-0,013; 0,037	-0,021; 0,045
Di	0,031		-0,037; -0,009	-0,023; 0,03	-0,015; 0,026	-0,01; 0,003	-0,034; 0,087
Ko	0,039	-0,021		-0,037; -0,006	-0,037; 0,018	-0,028; -0,005	-0,037; 0,049
KP	0,033	-0,002	-0,02		-0,029; 0,026	-0,021; 0	-0,031; -0,008
Ku	-0,011	0,003	-0,008	0,002		-0,021; 0,009	-0,045; 0,106
Lu	0,014	-0,005	-0,018	-0,012	-0,006		-0,026; 0,034
VB	0,011	0,013	0,004	-0,017	0,019	0,002	

Tab. 9: Pod diagonálou párové F_{st} po korekci vlivu nulových alel pro dvojice lokalit *A. niobe*, nad diagonálou konfidenční interval.

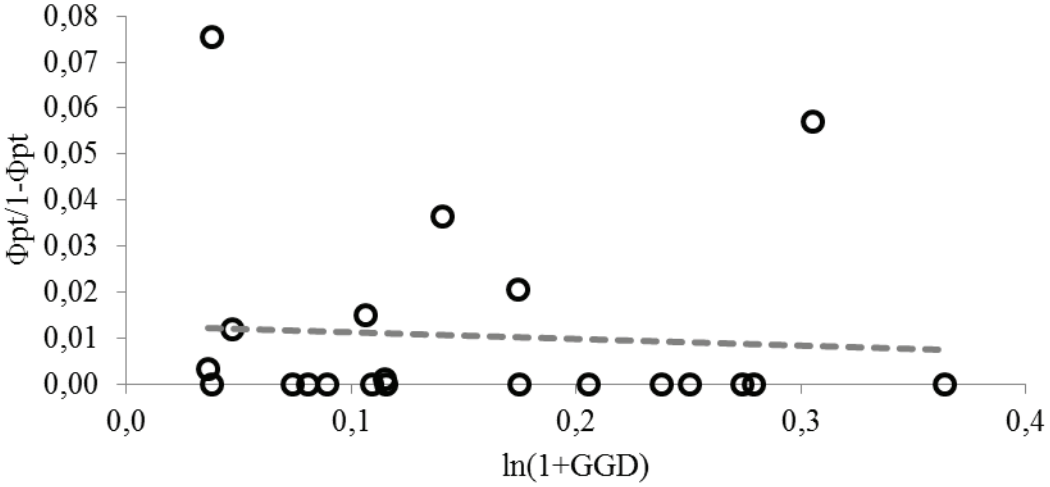
	Br	Bz	Di	Ko	Lo	Lu	Po	VB	Vr
Br		-0,002; 0,052	-0,016; 0,032	0,017; 0,08	-0,007; 0,04	0,000; 0,044	-0,016; 0,044	0,021; 0,07	-0,023; 0,094
Bz	0,028		-0,024; 0,003	-0,017; 0,025	-0,007; 0,023	-0,012; 0,034	-0,01; 0,024	-0,014; 0,023	-0,049; 0,01
Di	0,008	-0,012		0,002; 0,015	-0,018; -0,004	-0,008; 0,016	-0,023; 0,003	0,003; 0,029	-0,027; 0,022
Ko	0,043	0,004	0,01		-0,001; 0,016	-0,020; 0,003	-0,017; 0,05	-0,013; 0,075	-0,018; 0,06
Lo	0,013	0,01	-0,011	0,009		-0,010; 0,005	-0,014; 0,013	0,002; 0,06	-0,012; 0,043
Lu	0,018	0,011	0,005	-0,009	-0,002		-0,005; 0,029	-0,013; 0,06	-0,013; 0,031
Po	0,015	0,006	-0,01	0,016	0	0,013		0,003; 0,047	-0,003; 0,057
VB	0,043	0,007	0,016	0,026	0,029	0,018	0,025		-0,029; 0,019
Vr	0,029	-0,02	-0,005	0,017	0,013	0,005	0,027	-0,006	

Tab. 10: Pod diagonálou hodnoty parametru diferenciace Φ_{pt} pro dvojice lokalit *A. adippe*, nad diagonálou hodnoty pravděpodobnosti p na základě 999 permutací (H_0 – populace se neliší). Záporné hodnoty zobrazeny jako 0.

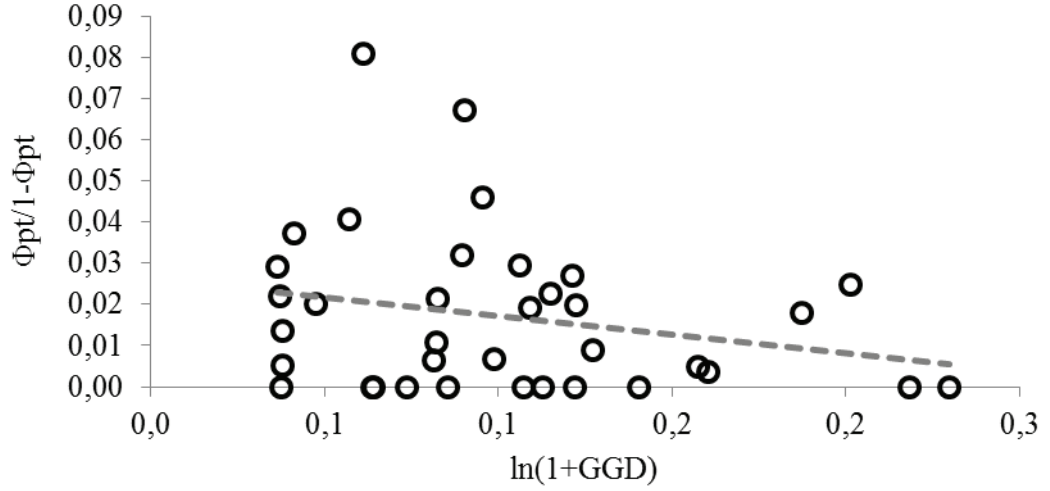
	Bz	Di	Ko	KP	Ku	Lu	VB
Bz		0,101	0,096	0,083	0,431	0,229	0,418
Di	0,035		0,392	0,432	0,411	0,416	0,319
Ko	0,070	0		0,414	0,393	0,399	0,425
KP	0,054	0	0		0,460	0,445	0,438
Ku	0	0	0	0		0,436	0,301
Lu	0,015	0	0	0	0		0,407
VB	0,001	0,012	0	0	0,020	0,003	

Tab. 11: Pod diagonálou hodnoty parametru diferenciace Φ_{pt} pro dvojice lokalit *A. niobe*, nad diagonálou hodnoty pravděpodobnosti p na základě 999 permutací (H_0 – populace se neliší). Záporné hodnoty zobrazeny jako 0.

	Br	Bz	Di	Ko	Lo	Lu	Po	VB	Vr
Br		0,114	0,323	0,019	0,454	0,066	0,348	0,065	0,182
Bz	0,044		0,488	0,287	0,359	0,078	0,355	0,255	0,401
Di	0,011	0		0,204	0,475	0,311	0,449	0,218	0,459
Ko	0,075	0,014	0,019		0,317	0,454	0,196	0,172	0,215
Lo	0	0,004	0	0,009		0,447	0,417	0,185	0,451
Lu	0,039	0,029	0,005	0	0,000		0,145	0,119	0,374
Po	0,005	0,007	0	0,020	0	0,018		0,213	0,191
VB	0,063	0,022	0,020	0,031	0,021	0,028	0,024		0,460
Vr	0,036	0,000	0	0,021	0	0,006	0,026	0	



Obr. 4: Závislost diferenciace populací *A. adippe* na jejich vzájemné vzdálenosti (isolation by distance). Mantelův test R^2=0,005, P=0,496 při 5000 permutacích. $\Phi_{pt}/1-\Phi_{pt}$ – linearizovaná míra diferenciace Φ_{pt} (Excoffier *et al.* 1992); ln(1+GGD) – logaritmované geografické vzdálenosti mezi lokalitami.



Obr. 5: Závislost diferenciace populací *A. niobe* na jejich vzájemné vzálenosti (isolation by distance). Mantelův test R^2=0,059, P=0,126 při 5000 permutacích. $\Phi_{pt}/1-\Phi_{pt}$ – linearizovaná míra diferenciace Φ_{pt} (Excoffier *et al.* 1992); ln(1+GGD) – logaritmované geografické vzdálenosti mezi lokalitami.

Mantelův test izolace vzdáleností žádnou závislost neprokázal ani u jednoho druhu, jak ilustruje Obr. 4 a 5.

DISKUSE

Z výsledků vyplývá, že populace ani jednoho ze studovaných druhů v centrální části moravských Karpat není geneticky strukturovaná. Vedlejším, ale o to překvapivějším závěrem je, že výrazně početnější *A. adippe* je geneticky chudší, než *A. niobe*.

Populace ani jednoho z motýlů nevykazuje nedostatek heterozygotů oproti hodnotám předpokládaným při Hardy-Weinbergově rovnováze, což ukazuje na silné propojení lokalit. Naopak, po korekci vlivu nulových alel se heterozygotů zdá být dokonce více. Důvodem může být např. recentní imigrace z geneticky oddělených populací (tzv. *isolate breaking*, např. Hamilton 2009), ale toto vysvětlení je stěží představitelné v kontextu studovaných populací, protože je velmi nepravděpodobné, že by se tomu tak stalo u obou druhů zároveň v nedávné době. Dalším možným vysvětlením by mohla být amplifikace více než jednoho lokusu některými pp při PCR, tomu ale neodpovídá celkový obraz genotypových dat, například fakt, že alely mají kontinuální variabilitu v délce. Vzhledem k tomu, že průměrný nadbytek heterozygotů je vzhledem k variabilitě (SE průměru mezi lokusy) poměrně malý, jde zřejmě o pouhý artefakt bez biologického významu, vnesený možná korekcí vlivu nulových alel.

Ani v jedné z populací nejsou tedy známky vnitřní struktury, což bylo potvrzeno i malými hodnotami párového F_{st} (Tab. 8 a 9) a neprůkaznými rozdíly mezi lokalitami v AMOVA (Tab. 10 a 11). U příbuzného *A. idalia* byly mezi populacemi na škále srovnatelné s touto studií zjištěny malé, ale přesto znatelné rozdíly (průměrné pw F_{st} (ppwF_{st})=0,057, Keyghobadi *et al.* 2006), motýla ale zkoumali na značně izolovaném místě, kde mají jedinci pravděpodobně pozměněné disperzní chování. Pro zjištění podobných rozdílů museli jít jiní autoři na škálu řádově větší (Williams 2003), což ukazuje, že *A. idalia* je v normálních populacích značně pohyblivým druhem, zřejmě podobně jako perleťovci podrodu *Fabriciana*.

Na rozsáhlém území byly zjištěny podobné hodnoty také pro dva zcela jiné, nepříbuzné motýly v západních Spojených státech, pro soumračníka *Erynnis propertius* Scudder *et* Burgess, 1870 (ppwF_{st}=0,06) a pro otakárka *Papilio zelicaon* Lucas, 1858 (ppwF_{st}=0,05; oba bez IBD, oba viz Zakharov *et* Hellmann 2008). I některé evropské druhy vykazují podobně malé hodnoty pw*F*st jako v mojí práci, ale mezi mnohem vzdálenějšími místy; např. extrémně mobilní babočka bílé C (*Polygonia c-album* Linnaeus, 1758; ppwF_{st}=0,061, až 10 000km, bez IBD; Kodandaramaiah *et* al. 2011) a velmi hojný okáč

pýrový (*Pararge aegeria* Linnaeus, 1758; ppwF_{st}=0,011, ca 100-700km). Srovnatelné jsou i výsledky z výzkumu populací okáče *Erebia triaria* de Prunner, 1798 na Pyrenejském poloostrově (ppwF_{st}=0,07, Vila *et al.* 2006).

Naopak průkazné rozdíly byly (kromě izolované populace *A. idalia*) na škále srovnatelné s mojí prací zjištěny u ohroženého amerického okáče *Neonympha mitchellii francisi* Parshall & Kral, 1989 (do 10km; ppwF_{st}=0,075; Milko *et al.* 2011). Také modrásek černoskvrnný (*Phengaris arion* Linnaeus, 1758) v Polsku vytváří značně rozrůzněné populace (u dvojic lokalit bližších 20km ppwF_{st}=0,088, Sielezniew a Rutkowski 2011). U vzdálenějších dvojic lokalit (stovky km) ale pwF_{st} větší nebyly, což je zvláštní výsledek, zejména v porovnání se sousední oblastí rozšíření modráska černoskvrnného, Dánskem a Švédkem (Ugelvig *et al.* 2011). Tam jsou kromě toho studované populace vzájemně divergované obecně ještě více (ppwF_{st}=0,314), patrně díky horší prostupnosti okolního prostředí (moře, lesnatá krajina s velkými jezery) a velké geografické izolovanosti všech lokalit. Údaje o tomto druhu jsou z pohledu této práce zásadní především proto, že *P. arion* na většině míst vykazuje prakticky totožné biotopové nároky jako *A. niobe*, a zároveň je to deštníkový druh ochrany přírody (Spitzer *et al.* 2009b). Ještě větší divergence byly v jiné studii zaznamenány u kongenerického modráska Rebelova (*Phengaris „rebeli“* Hirschke 1904; ppwF_{st}=0,498, cca 100km; Rutkowski *et al.* 2009, taktéž v Polsku).

Neočekávaná je absence jakéhokoli vlivu geografické vzdálenosti na genetickou podobnost populací – na studovaném území se s vzrůstající vzdáleností genetická diferenciace dokonce mírně snižuje (Obr. 4 a 5). Závislost je ale velmi neprůkazná, výsledek tak plně souhlasí s hypotézou velmi časté výměny jedinců mezi lokalitami.

To samé lze vyvodit ze zpětných odchytů, motýli se běžně pohybovali na stovkách metrů a byly zaznamenány i přelety mezi zkoumanými sousedními údolími. Zajímavé je porovnání proložené IPF s jinými motýly, např. s MRR daty o několika druzích perleťovců a hnědásků ze západních Čech (Fric *et al.* 2010, Konvička *et al.* 2012), kteří vykazují podobné hodnoty sklonu regresní přímky, přestože jde o druhy mnohem menší (kromě perleťovce velkého, *Argynnis aglaja* Linnaeus 1758, který je stejně velký jako moje cílové druhy).

V tomto kontextu je totiž nutné připomenout výše zmíněné expertní hodnocení (Bink 1992), kde jsou jak *A. niobe* a *A. adippe*, tak druhy ze západočeských studií shodně označováni jako motýli spíše sedentární, což by odpovídalo podobnému sklonu disperzní přímky. Jedním z možných důvodů je, že jak expertní hodnocení, tak MRR studie mohou dávat příliš velkou váhu mobilitě v rámci rutinních pohybů, která ale představuje jen jednu složku pohybu jedinců („dispersalu“); mezi dalšími, důležitějšími složkami, jsou především

četnost a efektivnost cíleného dispersního chování, čili přeletů na jiné „lokality“ (Van Dyck *et* Baguette 2005). Zejména se to týká MRR výzkumů prováděných na malé ploše, jak bylo ukázáno např. právě při studiích v západních Čechách (Zimmermann *et al.* 2011). Každopádně výsledky mojí práce ukazují, že na škále desítek kilometrů je populace obou zkoumaných druhů prakticky panmiktická.

Vzájemné porovnání MRR charakteristik mobility mezi studovanými druhy ukazuje jistý rozpor. Mezi dvěma lokalitami častěji přelétá *A. adippe*, který ale vykazuje lehce strmější sklon regresní přímky IPF (tzn. frakce jedinců, která uletí danou vzdálenost, se s touto vzdáleností snižuje rychleji, viz Tab. 3), což by vypovídalo o celkově nižší mobilitě, rozdíl ve sklonu však není signifikantní (p=0,054).

Asi největší zvláštností, kterou jsem u studovaných populací objevil, je velmi výrazné relativní genetické ochuzení perleťovce prostředního (*A. adippe*) (viz Tab. 5) dobře patrné u většiny zkoumaných lokusů (Tab. 4). Projevuje se nižším počtem alel na lokus (N_a) a nižším zastoupením heterozygotů, a to jak skutečným (H_o), tak očekávaným za platnosti Hardy-Weinbergovy rovnováhy (H_e). Toto ochuzení by mohla způsobit redukce efektivní velikosti populace na několik desítek jedinců po dobu několika generací (znásobí se tak genetický drift; Freeland *et al.* 2011), ale takto razantní snížení početnosti u tohoto velkého a nápadného motýla v posledních desetiletích zaznamenáno nebylo. Tento druh sice v 80. a 90. letech z mnoha lokalit v ČR přechodně vymizel, ale pravděpodobně se ani v této době nestal vzácnějším, než *A. niobe* (J. Beneš, ústní sdělení), který má ale ve studovaném území dvojnásobný počet alel (N_a, Tab. 5) než *A. adippe*.

Jako pravděpodobnější vysvětlení se tak jeví rychlá expanze druhu do oblasti střední Evropy ještě před tím, než by ji přírodovědci byli schopni zaznamenat, podobně jako u jasoně červenookého (*Parnassius apollo* Linnaeus, 1758; Todisco *et al.* 2010), kde zřejmě díky ní došlo ke snížení genetické variability oproti jiným druhům motýlů. Autoři této studie expanzi kladou 100-70 tis. let do minulosti, použili ale jako marker sekvenci genu pro cytochromoxidázu I, který má obecně nižší mutační rychlost než mnou použité mikrosatelitové markery. Případná expanze *A. adippe* by tedy musela být novějšího data.

Hodnoty heterozygotnosti mikrosatelitových lokusů (H_e i H_o) *A. adippe* jsou nízké nejen v porovnání s *A. niobe*, ale i s ostatními druhy motýlů, např. dalším příbuzným, *A. idalia* (Williams *et al.* 2003, Keyghobadi *et al.* 2006). Korektní srovnání s literárními údaji je ale obtížné, zejména protože v různých pracích jsou použity různé lokusy, které jsou zpravidla pro každou studii vybírány tak, aby měly maximální informativnost, tzn. variabilitu. Srovnání diverzity by tak mohlo být významně zkresleno způsobem výběru

lokusů, který se mezi studiemi značně liší. Také fakt, že moje práce i drtivá většina ostatních studií využívá z praktických důvodů jako charakteristiku diversity jen průměr z hodnot pro několik málo lokusů srovnání znesnadňuje.

Srovnání mikrosatelitové diverzity mezi dvěma cílovými druhy této studie z tohoto pohledu ale je možné, což je v rámci známých prací poměrně vzácné. V literatuře se sice dá nalézt velké množství dokladů o úspěšné amplifikaci jedněch mikrosatelitových lokusů pro více druhů (např. Gemmell *et al.* 1997), srovnání diverzity ale mohou být i přesto zkreslená. Ve velké většině případů totiž jde o markery vyvinuté původně pro jeden z druhů, které jsou poté vyzkoušeny u druhů dalších. Problém je v tom, že jsou vybírány markery variabilní u původního druhu. Pokud je mezi druhy náhodná variabilita v míře polymorfismu jednotlivých lokusů, budou takto vybrané markery u nových druhů méně variabilní, než u druhu původního (cf. Primmer *et al.* 2005). Tento problém moje práce řeší současným screeningem obou druhů. U motýlů obdobný postup zvolili Zeisset *et al.* (2005).

Pro přímé studium vývoje genetické variability by bylo třeba analyzovat vzorky z různě starých časových řezů, což je možné díky existujícímu rozsáhlému muzejnímu materiálu a představuje to jeden z dalších plánovaných kroků mé práce. K odhalení vývoje populací přispějí jistě i vzorky z jiných částí areálů obou druhů, pomocí kterých bude možné zasadit valašské populace do širšího kontextu a odhalit tak případný fylogeografický signál.

Materiál z ostatních částí areálu, jehož malou část jsem v době odevzdání bakalářské práce již začal shromažďovat, především upřesní odpověď na jednu ze základních otázek celého výzkumu těchto dvou perleťovců, a to, na jaké škále jsou populace studovaných druhů geneticky strukturované, když na škále prezentované v této práci struktura chybí. Další otevřenou možností je srovnání s jinými systémy populací, které by byly v podobném geografickém měřítku, ale s větší potenciální izolací mezi lokalitami, jako jsou ostrovy v Severním a Baltském moři.

Z hlavního dosavadního výsledku mojí práce, propojení populace v rámci dosud studované oblasti, můžeme odvodit, že pro přežití těchto druhů není důležitá ani tak samotná kvalita luční plochy (vhodné mikroklimatické podmínky pro ovipozici, larvální vývoj atd.), ale především celková nabídka těchto ploch v rámci regionu. To odpovídá pozorovanému fenoménu náhlého vymizení z celých oblastí (viz Metodika: Studované druhy). Při postupně se zhoršující „kvalitě“ krajiny se zřejmě populace těchto motýlů zmenšují až do stavu, kdy už nedokáží mezilokalitními pohyby držet v jednom celku, po čemž následuje jejich zánik.

Je tedy třeba důsledně dbát na ochranu především velkoplošných chráněných území a volné krajiny, není možné spoléhat na přežití těchto, a jistě ani mnohých jiných živočichů na

malých plochách biotopu. Jistou naději v kontrastu s velmi negativním vlivem současných krajinných změn zejména na *A. niobe* jsou údaje o populaci tohoto druhu, která dlouhodobě přežívá na postindustrálním biotopu, a to na překvapivě malé ploše (údajně 5-10ha, Salz *et* Fartmann 2009). Příčinou je zřejmě náhodou vzniklá vysoká hustota míst vhodných k ovipozici – violek v blízkosti obnažené půdy. Takovýto stav sice těžko mohl někdy v přirozené krajině nastat, pozorování ale potvrzuje potenciál takovýchto ploch pro ochranu přírody (cf. Tropek *et* Řehounek 2012).

V kontextu zde uvedených výsledků je důležité zdůraznit, že by o cílových druzích bylo nesprávné říci, že se vyskytují např. pouze *na* extenzivních pastvinách. Spíše je pro ně důležité, aby se všechny zdroje pro všechny vývojové fáze vyskytovaly v krajině v určité frekvenci (cf. Denis *et al.* 2003 a Metodika: Studované druhy). Vyskytují se *v těch územích*, kde mají vhodné podmínky (jsou typickými představiteli početné kategorie motýlů, kterou němečtí autoři označují jako „Habitatkomplexbewohner“ (Reinhardt 2007))

ZÁVĚR

Analýzou alelických frekvencí mikrosatelitních markerů jsem ukázal, že v rámci centrální části moravských Karpat nemá populace perleťovce prostředního (*Argynnis adippe*) ani perleťovce maceškového (*A. niobe*) žádnou průkaznou genetickou strukturu, jedinci obou druhů se tedy mezi lokalitami v oblasti hojně pohybují. Vyplývá z toho, že populační trendy budou reagovat na změny biotopů v měřítku regionálním a větším, spíše než na osud jednotlivých lokalit. Oproti některým druhům motýlů jsou tedy mnohem pohyblivější, na druhou stranu o mobilitě na škále větší než desítky kilometrů informace nemáme, bude to ale jedním z témat dalších výzkumů. Překvapivé je značné genetické ochuzení výrazné hojnějšího *A. adippe*.

LITERATURA

BENEŠ, J. & KONVIČKA, M. 2002. Motýli České republiky: Rozšíření a ochrana. Praha: SOM.

BENEŠ, J., KONVIČKA, M., DVOŘÁK, J., FRIC, Z., HAVELDA, Z., PAVLÍČKO, A., VRABEC, V. & WEIDENHOFFER, Z. 2005. Hesperioidea & Papilionoidea (denní motýli). *In: Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí. Red list ofthreatened species in the Czech Republic. Invertebrates.* Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR.

BINK, F. A. 1992. *Ecologische atlas van de dagvlinders of Noordwest-Europa*. Haarlem: Schuyt and CO.

BLANCHET, S., REY, O., ETIENNE, R., LEK, S. & LOOT, G. 2010. Species-specific responses to landscape fragmentation: implications for management strategies. *Evolutionary Applications,* 3, 291-304.

CHAPUIS, M. P., LOISEAU, A., MICHALAKIS, Y., LECOQ, M., FRANC, A. & ESTOUP, A. 2009. Outbreaks, gene flow and effective population size in the migratory locust, Locusta migratoria: a regional-scale comparative survey. *Molecular Ecology,* 18, 792-800.

CICCONARDI, F., EMERSON, B. C., FRATI, F. & FANCIULLI, P. P. 2010. Deep phylogeographic divisions and long-term persistence of forest invertebrates (Hexapoda: Collembola) in the North-Western Mediterranean basin. *Molecular Ecology,* 19, 386-400.

CLEARY, D. F. R., DESCIMON, H. & MENKEN, S. B. J. 2002. Genetic and ecological differentiation between the butterfly sisterspecies Colias alfacariensis and Colias hyale. *Contributions to Zoology,* 71, 131-139.

EXCOFFIER, L., SMOUSE, P. E. & QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among dna haplotypes - application to human mitochondrial-dna restriction data. *Genetics,* 131, 479-491.

FOX, R., WARREN, M. S., BRERETON, T. M., ROY, D. B. & ROBINSON, A. 2011. A new Red List of British butterflies. *Insect Conservation and Diversity,* 4, 159-172.

FREELAND, J. R., KIRK, H. & PETERSEN, S. 2011. Molecular Ecology. 2 ed. Hoboken: Wiley-Blackwell.

FRIC, Z., HULA, V., KLIMOVA, M., ZIMMERMANN, K. & KONVICKA, M. 2010. Dispersal of four fritillary butterflies within identical landscape. *Ecological Research,* 25, 543-552.

GEMMELL, N., ALLEN, P., GOODMAN, S. & REED, J. 1997. Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations. *Molecular Ecology,* 6, 661-666.

HABEL, J. C., JUNKER, M. & SCHMITT, T. 2010. High dispersal ability and low genetic differentiation in the widespread butterfly species Melanargia galathea. *Journal of Insect Conservation,* 14, 467-478.

HAMILTON, M. 2009. Population Genetics. Wiley.

HANSKI, I. 1989. METAPOPULATION DYNAMICS - DOES IT HELP TO HAVE MORE OF THE SAME. *Trends in Ecology & Evolution,* 4, 113-114.

HOOLE, J., JOYCE, D. & PULLIN, A. 1999. Estimates of gene flow between populations of the swallowtail butterfly, Papilio machaon in Broadland, UK and implications for conservation. *Biological Conservation,* 89, 293-299.

KADLEC, T., VRBA, P., KEPKA, P., SCHMITT, T. & KONVICKA, M. 2010. Tracking the decline of the once-common butterfly: delayed oviposition, demography and population genetics in the hermit Chazara briseis. *Animal Conservation,* 13, 172-183.

KEYGHOBADI, N., UNGER, K., WEINTRAUB, J. & FONSECA, D. 2006. Remnant populations of the Regal Fritillary (Speyeria idalia) in Pennsylvania: Local genetic structure in a high gene flow species. *Conservation Genetics,* 7, 309-313.

KODANDARAMAIAH, U., WEINGARTNER, E., JANZ, N., DALEN, L. & NYLIN, S. 2011a. Population structure in relation to host-plant ecology and Wolbachia infestation in the comma butterfly. *Journal of Evolutionary Biology,* 24, 2173-2185.

KODANDARAMAIAH, U., WEINGARTNER, E., JANZ, N., DALEN, L. & NYLIN, S. 2011b. Population structure in relation to host-plant ecology and Wolbachia infestation in the comma butterfly. *Journal of Evolutionary Biology,* 24, 2173-2185.

KONVIČKA, M., ZIMMERMANN, K., KLÍMOVA, M., HŮLA, V. & FRIC, Z. 2012. Inverse link between density and dispersal distance in butterflies: field evidence from six co-occurring species. *Population Ecology,* 54, 91-101.

KONVIČKA, M., BENEŠ, J. & ČÍŽEK, L. 2005. Ohrožený hmyz nelesních stanovišť: ochrana a management. Olomouc: Sagittaria.

KUDRNA, O., HARPKE, A., LUX, K., PENNERSTORFER, J., SCHWEIGER, O., SETTELE, J. & WIEMERS, M. 2011. Distribution Atlas of Butterflies in Europe. Halle: Gesellschaft für Schmetterlingschutz.

KURAS, T., BENES, J., FRIC, Z. & KONVICKA, M. 2003. Dispersal patterns of endemic alpine butterflies with contrasting population structures: Erebia epiphron and E-sudetica. *Population Ecology,* 45, 115-123.

LEIDNER, A. K. & HADDAD, N. M. 2011. Combining Measures of Dispersal to Identify Conservation Strategies in Fragmented Landscapes. *Conservation Biology,* 25, 1022-1031.

LOUY, D., HABEL, J., SCHMITT, T., ASSMANN, T., MEYER, M. & MULLER, P. 2007. Strongly diverging population genetic patterns of three skipper species: the role of habitat fragmentation and dispersal ability. *Conservation Genetics,* 8, 671-681.

MAES, D. & VAN DYCK, H. 1999. Dagvlinders in Vlaanderen. Ecologie, verspreiding en behoud. Antwerpen: Instituut voot Natuurbehoud en Vlaamse Vlinderwerkgroep.

MALAUSA, T., GILLES, A., MEGLECZ, E., BLANQUART, H., DUTHOY, S., COSTEDOAT, C., DUBUT, V., PECH, N., CASTAGNONE-SERENO, P., DELYE, C., FEAU, N., FREY, P., GAUTHIER, P., GUILLEMAUD, T., HAZARD, L., LE CORRE, V., LUNG-ESCARMANT, B., MALE, P., FERREIRA, S. & MARTIN, J. 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources,* 11, 638-644.

MILKO, L. V., HADDAD, N. M. & LANCE, S. L. 2012. Dispersal via stream corridors structures populations of the endangered St. Francis' satyr butterfly (Neonympha mitchellii francisci). *Journal of Insect Conservation,* 16, 263-273.

PEAKALL, R. & SMOUSE, P. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes,* 6, 288-295.

PRIMMER, C. R., PAINTER, J. N., KOSKINEN, M. T., PALO, J. U. & MERILA, J. 2005. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology,* 36, 348-360.

REINHARDT, R., SBIESCHNE, H., SETTELE, J., FISCHER, U. & FIEDLER, G. 2007. *Tagfalter von Sachsen,* Dresden, Entomologische Nachrichten und Berichte, Beheift 11.

SALZ, A. & FARTMANN, T. 2009. Coastal dunes as important strongholds for the survival of the rare Niobe fritillary (Argynnis niobe). *Journal of Insect Conservation,* 13, 643-654.

SCHMITT, T., CIZEK, O. & KONVICKA, M. 2005a. Genetics of a butterfly relocation: large, small and introduced populations of the mountain endemic Erebia epiphron silesiana. *Biological Conservation,* 123, 11-18.

SCHMITT, T. & MULLER, P. 2007. Limited hybridization along a large contact zone between two genetic lineages of the butterfly Erebia medusa (Satyrinae, Lepidoptera) in Central Europe (vol 45, pg 39, 2007). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research,* 45, 175-175.

SCHMITT, T., RAKOSY, L., ABADJIEV, S. & MULLER, P. 2007a. Multiple differentiation centres of a non-Mediterranean butterfly species in south-eastern Europe. *Journal of Biogeography,* 34, 939-950.

SCHMITT, T., RAKOSY, L., ABADJIEV, S. & MULLER, P. 2007b. Multiple differentiation centres of a non-Mediterranean butterfly species in south-eastern Europe. *Journal of Biogeography,* 34, 939-950.

SCHMITT, T., ROBER, S. & SEITZ, A. 2005b. Is the last glaciation the only relevant event for the present genetic population structure of the meadow brown butterfly Maniola jurtina (Lepidoptera : Nymphalidae)? *Biological Journal of the Linnean Society,* 85, 419-431.

SELKOE, K. & TOONEN, R. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters,* 9, 615-629.

SIELEZNIEW, M. & RUTKOWSKI, R. 2012. Population isolation rather than ecological variation explains the genetic structure of endangered myrmecophilous butterfly Phengaris (=Maculinea) arion. *Journal of Insect Conservation,* 16, 39-50.

SIMONSEN, T. 2006. Fritillary phylogeny, classification, and larval host plants: reconstructed mainly on the basis of male and female genitalic morphology (Lepidoptera : Nymphalidae : Argynnini). *Biological Journal of the Linnean Society,* 89, 627-673.

SIMONSEN, T. 2007. Comparative morphology and evolutionary aspects of the reflective under wing scale-pattern in Fritillary butterflies (Nymphalidae : Argynnini). *Zoologischer Anzeiger,* 246, 1-10.

SPITZER, L., BENES, J., DANDOVA, J., JASKOVA, V. & KONVICKA, M. 2009a. The Large Blue butterfly, Phengaris [Maculinea] arion, as a conservation umbrella on a landscape scale: The case of the Czech Carpathians. *Ecological Indicators,* 9, 1056-1063.

SPITZER, L., BENES, J. & KONVIČKA, M. 2009b. Oviposition of the Niobe fritillary (*Argynnis niobe*(Linnaeus, 1758)) at submountain conditions in the Czech Carpathians (Lepidoptera, Nymphalidae). . *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo,* 30, 165-168.

STENZLER, L. M., MAKAREWICH, C. A., COULON, A., ARDIA, D. R., LOVETTE, I. J. & WINKLER, D. W. 2009. SUBTLE EDGE-OF-RANGE GENETIC STRUCTURING IN TRANSCONTINENTALLY DISTRIBUTED NORTH AMERICAN TREE SWALLOWS. *Condor,* 111, 470-478.

STEVENS, V. M., TROCHET, A., VAN DYCK, H., CLOBERT, J. & BAGUETTE, M. 2012. How is dispersal integrated in life histories: a quantitative analysis using butterflies. *Ecology Letters,* 15, 74-86.

STEVENS, V. M., TURLURE, C. & BAGUETTE, M. 2010. A meta-analysis of dispersal in butterflies. *Biological Reviews,* 85, 625-642.

THOMAS, C. D. 2000. Dispersal and extinction in fragmented landscapes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences,* 267, 139-145.

THOMAS, J. A., MORRIS, M. G. & HAMBLER, C. 1994. PATTERNS, MECHANISMS AND RATES OF EXTINCTION AMONG INVERTEBRATES IN THE UNITED-KINGDOM. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences,* 344, 47-54.

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.

TOLMAN, T. 2008. Collins Butterfly Guide. London.

TROPEK, R. & ŘEHOUNEK, J. 2012. Bezobratlí postindustriálních stanovišť: význam, ochrana a management. České Budějovice: ENTÚ BC AV ČR & Calla.

TUZOV, V. K. 2003. Nymphalidae part I. *In:* BOZANO, G. C. (ed.) *Guide to the Butterflies of the Palearctic region.* Milano.

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.

VAN SWAAY, C., CUTTELOD, A., COLLINS, S., MAES, D., MUNGUIRA, M. L., ŠAŠIĆ, M., SETTELE, J., VEROVNIK, R., VERSTRAEL, T., WARREN, M., WIEMERS, M. & WYNHOF, I. 2010. European Red List of Butterflies Luxembourg: Publications Office of the European Union.

VANDEWOESTIJNE, S., NEVE, G. & BAGUETTE, M. 1999. Spatial and temporal

population genetic structure of the butterfly Aglais urticae L-(Lepidoptera, Nymphalidae). *Molecular Ecology,* 8, 1539-1543.

VINCENOT, L., NARA, K., STHULTZ, C., LABBE, J., DUBOIS, M., TEDERSOO, L., MARTIN, F. & SELOSSE, M. 2012. Extensive gene flow over Europe and possible speciation over Eurasia in the ectomycorrhizal basidiomycete Laccaria amethystina complex. *Molecular Ecology,* 21, 281-299.

WARREN, M. S. 1995. MANAGING LOCAL MICROCLIMATES FOR THE HIGH BROWN FRITILLARY, ARGYNNIS-ADIPPE. *Ecology and Conservation of Butterflies*, 198-210.

WILLIAMS, B., BRAWN, J. & PAIGE, K. 2003. Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: Speyeria idalia (Nymphalidae). *Molecular Ecology,* 12, 11-20.

WOOD, B. C. & PULLIN, A. S. 2002. Persistence of species in a fragmented urban landscape: the importance of dispersal ability and habitat availability for grassland butterflies. *Biodiversity and Conservation,* 11, 1451-1468.

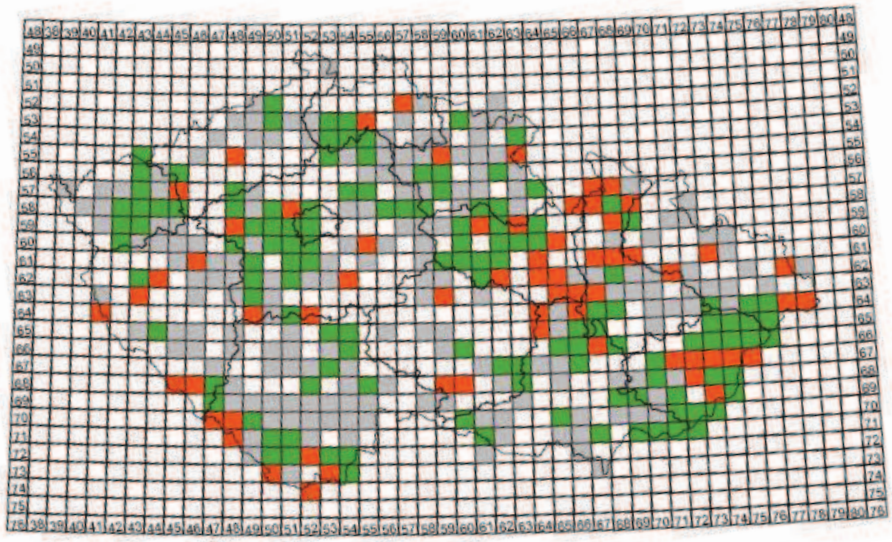
ZAKHAROV, E. V. & HELLMANN, J. J. 2008. Genetic differentiation across a latitudinal gradient in two co-occurring butterfly species: revealing population differences in a context of climate change. *Molecular Ecology,* 17, 189-208.

ZAR, J. H. 1996. Biostatistical analysis. 3 ed. London.

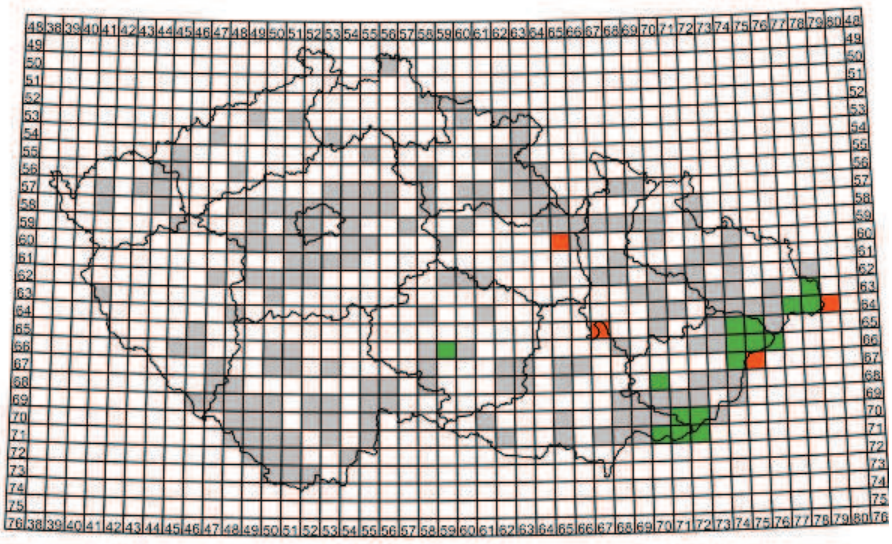
ZEISSET, I., ALS, T. D., SETTELE, J. & BOOMSMA, J. J. 2005. Microsatellite markers for the large blue butterflies Maculinea nausithous and Maculinea alcon (Lepidoptera : Lycaenidae) and their amplification in other Maculinea species. *Molecular Ecology Notes,* 5, 165-168.

ZIMMERMANN, K., FRIC, Z., JISKRA, P., KOPECKOVA, M., VLASANEK, P., ZAPLETAL, M. & KONVICKA, M. 2011. Mark-recapture on large spatial scale reveals long distance dispersal in the Marsh Fritillary, Euphydryas aurinia. *Ecological Entomology,* 36, 499-510.

Příloha 1: Mapky rozšíření studovaných druhů v ČR.



Příloha 1a: Rozšíření *A. adippe* v České republice. Šedě původní rozšíření, zeleně stálý výskyt druhu, oranžově nové záznamy. Databáze Mapování motýlů České republiky (Entomologický ústav BC AV ČR).



Příloha 1b: Rozšíření *A. niobe* v České republice. Šedě původní rozšíření, zeleně stálý výskyt druhu, oranžově nové záznamy. Databáze Mapování motýlů České republiky (Entomologický ústav BC AV ČR).