

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Doplňky barcodingu motýlů České republiky**

**Diplomová práce**

**Bc. Patrik Škopek**

**Zájmové chovy zvířat**

**Vedoucí práce: doc. Mgr. Vladimír Vrabc, Ph.D.**

**Konzultant: RNDr. Alena Sucháčková, Ph.D.**

**V Praze © 2023**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Doplňky barcodingu motýlů České republiky" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.4.2023

---

## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval RNDr. Aleně Sucháčkové, Ph.D., za cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování diplomové práce věnovala a doc. Mgr. Vladimíru Vrabcovi, Ph.D., za pomoc a cenné připomínky. Dále děkuji RNDr. Janě Marešové, Mgr. Janu Walterovi, Mgr. Haně Konvičkové, Ph.D., a MSc. Claudio Sbaraglia za pomoc s izolací vzorků a všem co se podíleli na sběru vzorků pro tuto práci.

# Doplňky barcodingu motýlů České republiky

## Souhrn

Cílem této práce bylo doplnění barcodů vybrané části druhů denních motýlů ČR (osekvenováním části mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu), vyhodnocení vnitrodruhových vzorců mitochondriální genetické diverzity a zjištění prevalence (podíl počtu infikovaných jedinců ve sledované populaci) vzorků nitrobuněčnými parazity, bakteriemi rodu *Wolbachia*. Testovány byly hypotézy: 1. Biotopové nároky a funkční vlastnosti motýlů mají vliv na to, která genetická linie se bude v České republice vyskytovat. Zároveň je předurčen osud motýlů: míra ohroženosti také vysvětlí výskyt genetických linií.; 2. Promořenost bakterií *Wolbachia* je v ČR vysoká, bakterie se vyskytuje u velké části druhů a testovaných vzorků. Osekvenoval jsem geny COI a WSP (ověření přítomnosti bakterie *Wolbachia*). Za pomoci spolupracovníků jsem získal 1119 sekvencí od 140 druhů žijící na našem území (z 142 druhů, tj. 98,6 % české fauny). Po přidání sekvencí z databáze BOLD obsahoval dataset 22 489 sekvencí s průměrně 160,6 vzorky na druh. Ve své studii jsem zjistil, že bakterií *Wolbachia* bylo nakaženo 108 druhů z 133 testovaných druhů (81,2 %), tedy většina českých druhů denních motýlů a pozitivní nález infekce byl u 401 vzorků (40,2 % studovaných vzorků). Tím potvrzují hypotézu 2. Odhalil jsem také 40 různých kmenů bakterie *Wolbachia*. Pomocí analýzy BAPS, která rozřazuje sekvence do klastrů dle příbuznosti, a na základě haplotypových sítí bylo všech 140 druhů rozděleno do kategorií linií přítomných v České republice (zvlášť pro obě metody). Dále byly testovány užitím přímých ordinačních analýz CCA závislosti mezi těmito liniemi a vzorci biotopových nároků, funkčních vlastností a ohroženosti motýlů. Na základě těchto analýz potvrzují hypotézu 1. Závislost mezi vysvětlovanými kategoriemi BAPS a vysvětlujícími proměnnými znaky – biotopy byla při analýze všech proměnných průkazná. Interaktivním výběrem byly zvoleny za proměnné vysvětlující nejvíce variability ubikvista (všudypřítomný) a xerotermofil-1 (stepní druhy). Závislosti mezi kategoriemi BAPS a proměnného znaku ohrožení, a kategoriemi BAPS a funkčních vlastností byly taktéž průkazné. Interaktivním výběrem byly vybrány délka doby letu, aparence (forma živné rostliny) a rozpětí předních křídel za znaky s nejvyšší vysvětlující variabilitou. Závislost haplotypových sítí pomocí vysvětlujících proměnných znaků (biotopů) vyšla neprůkazně, ale interaktivní výběr ukázal, že nejvíce variability vysvětlují ubikvista, mezofil-3 (lesní druhy) a tyrfofil (rašeliništní druhy) a prokázal závislost mezi zmíněnými biotopy a kategorií haplotypových sítí. Závislost haplotypových sítí pomocí proměnného znaku ohrožení vyšla průkazná. Vysvětlované kategorie haplotypových sítí pomocí funkčních vlastností ukázaly, že nejvíce variability prokazují aparence a délka doby letu. Tato práce přispěla k vytvoření datasetu barcodů motýlí fauny České republiky a poznání závislostí mezi genetickými liniemi a ekologií druhů.

**Klíčová slova:** DNA, barcoding, Lepidoptera, Rhopalocera, Česká republika, *Wolbachia*



# Additions to butterfly barcoding of the Czech Republic

## Summary

The aim of this work was to add barcodes of a selected part of butterfly species of the Czech Republic (by sequencing a part of the mitochondrial gene for cytochrome c oxidase), to evaluate intraspecific patterns of mitochondrial genetic diversity, and to determine the prevalence (proportion of infected individuals in the population) of samples infected with intracellular parasites, bacteria of the genus *Wolbachia*. The following hypotheses were tested: 1. The butterfly habitat requirements and functional traits influence which genetic lineages will be present in the Czech Republic. At the same time, the fate of butterflies is predestined: the degree of threat will also explain the occurrence of genetic lineages; 2. The prevalence of *Wolbachia* is high in the Czech Republic; the bacterium is present in a large proportion of species and individuals. I sequenced the COI and WSP genes to verify the presence of *Wolbachia*. With the help of collaborators, I obtained 1119 sequences from 140 species living in our territory (from 142 species, i.e., 98.6% of the Czech fauna). After adding sequences from the BOLD database, the dataset contained 22,489 sequences with an average of 160.6 samples per species. In my thesis, I found that 108 out of 133 tested species (81.2%), i.e., majority of Czech butterfly species, were infected with *Wolbachia*, and 401 samples (40.2% of the studied samples) were positive for infection. This confirms hypothesis 2. I also detected 40 different strains of *Wolbachia*. Using BAPS analysis, which sorts sequences into clusters according to relatedness, and haplotype networks, all 140 species were categorized into lineages present in the Czech Republic (separately for both methods). Furthermore, relationships between these lineages and patterns of habitat requirements, functional traits, and threat levels were tested using CCA ordination analyses. Based on these analyses, I confirm hypothesis 1. The relationship between the response BAPS categories and the explanatory trait-habitat variables was significant when all variables were analyzed. Interactive forward selection selected ubiquist (generalist) and xerothermophile-1 (steppe species) as the variables explaining the most of the variability. Relationships between BAPS categories and the threat level and between BAPS categories and functional traits were also significant. Interactive forward selection selected length of flight period, aparence (host plant form), and forewing length as traits explaining the most of the variability. The response haplotype networks using habitats as explanatory variables were not significant, but interactive selection showed that ubiquist, mesophilous-3 (forest species), and tyrphophilous (bog species) explained the most of the variability. The relationships of haplotype networks and threat level was significant. The relationship of the response variable haplotype networks using explanatory functional traits showed that the most of the variability was explained by aparence and length of flight period. This work extended the barcoding dataset of the butterfly fauna of the Czech Republic and contributed to the understanding of the relationships between genetic lineages and species ecology.

**Keywords:** DNA, barcoding, Lepidoptera, Rhopalocera, Czech Republic, *Wolbachia*

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Vědecké hypotézy a cíle práce</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b>	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Motýli</b>	<b>10</b>
3.1.1	Fauna denních motýlů v Evropě	10
3.1.2	Fauna denních motýlů v České republice	11
<b>3.2</b>	<b>DNA Barcoding</b>	<b>12</b>
3.2.1	Databanky	13
3.2.2	Příklady studií barcodingu ve světě	13
<b>3.3</b>	<b>Bakterie Wolbachia</b>	<b>14</b>
3.3.1	Metody detekce infekce	15
3.3.2	Wolbachia u motýlů	16
<b>3.4</b>	<b>Čtvrtohorní dynamika motýlích areálů</b>	<b>16</b>
3.4.1	Teorie refugií	17
3.4.2	Typy refugií	17
3.4.3	Vliv čtvrtohorního klimatu	18
3.4.4	Příklady studií u motýlů	19
3.4.5	Původ českých populací motýlů	21
<b>3.5</b>	<b>Metody studia biogeografie kvarterní Evropy</b>	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>Metodika</b>	<b>23</b>
4.1	Sběr vzorků	23
4.2	Izolace DNA	23
4.3	PCR	24
4.4	Elektroforéza	24
4.5	Úprava sekvencí, fylogenetické a biogeografické analýzy	25
4.6	Statistické vyhodnocení	25
<b>5</b>	<b>Výsledky</b>	<b>28</b>
5.1	Prevalence bakterie Wolbachia	28
5.2	Rozšíření linií po Evropě (BAPS kategorie)	29
5.3	Kategorie vzniklé na základě haplotypových sítí	34
5.4	Analýzy pomocí programu Canoco5	35
<b>6</b>	<b>Diskuze</b>	<b>42</b>
6.1	Vzorky a sekvence	42
6.2	Prevalence bakterie Wolbachia	42
6.3	Kategorie vzniklé na základě BAPS a haplotypových sítí	44

<b>6.4</b>	<b>Analýza Canoco.....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>50</b>
<b>9</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Vlivem rozšiřujícího zemědělství, fragmentace prostředí a ubýváním přírodních stanovišť klesají v České republice populace motýlů. Úbytek motýlů indikuje špatný stav přírody, jejich aktivní ochrana zajišťuje ochranu většiny druhového bohatství bezobratlých. Avšak účinná ochrana závisí také na řádné znalosti genetického kontextu uvnitř druhů. Barcoding je genetická identifikační technika schopná rozlišení většiny živočišných druhů pomocí krátké sekvence DNA (tzv. barcode = čárového kódu) (Hebert et al. 2003). Vytvoření datasetu barcodů pro denní druhy motýlů ČR je důležité nejen pro ochrannářské aktivity, ale i pro možnost získávání informací o genetických vztazích napříč Evropou a vyhodnocování například vnitrodruhových vzorců mitochondriální genetické diverzity. Zkoumání původu českých vzorků a vztahení těchto vzorců k biotopovým nárokům by mohlo vysvětlit současné rozmístění a nároky jednotlivých druhů motýlů, vysvětlit příčiny jejich ohroženosti a pomohlo by to lépe cílit ochrannářské programy. Vyhodnocení vzorků za účelem nalezení nitrobuněčného parazita – bakterie rodu *Wolbachia* Hertig a Wolbach 1924 (wolbachie) by pomohlo zjistit úroveň promořenosti této bakterie u českých druhů motýlů, porovnat to s jinými státy, popřípadě vysvětlit rozdíly mezi druhy s nízkou nebo vysokou promořeností a určit, které kmeny *Wolbachia* napadají, který druh. To je důležité, protože *Wolbachia* je nejrozšířenějším rodem endosymbiotických bakterií vyskytující se u milionu druhů bezobratlých, včetně 40 % všech druhů členovců, což z ní dělá jednu z největších pandemií (Taylor et al. 2018). U motýlů způsobuje reprodukční manipulaci, feminizaci a cytoplazmatické inkompatibilitu (Ahmed et al. 2015). Dále může mít vliv na nalezené vzorce mitochondriální diverzity a tím pádem také na výsledky barcodingu (Bartoňová Sucháčková et al. 2021).

## 2 Vědecké hypotézy a cíle práce

Cílem studie je doplnění vzorků vybrané části druhů denních motýlů ČR do datasetu jejich barcodů (sekvenování části mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu), vyhodnocení vnitrodruhových vzorců mitochondriální genetické diverzity skrz Evropu s ohledem na původ českých vzorků a vztahení těchto vzorců k biotopovým nárokům, funkčním vlastnostem a ohroženosti motýlů. Další cíl byl kvantifikovat a vyhodnotit, zda byly vzorky napadeny nitrobuněčnými parazity, bakteriemi rodu *Wolbachia*. Testovány byly hypotézy: 1. Biotopové nároky a funkční vlastnosti motýlů mají vliv na to, která genetická linie se bude v České republice vyskytovat. Zároveň je předurčen osud motýlů: míra ohroženosti také vysvětlí výskyt genetických linií.; 2. Promořenost bakterií *Wolbachia* je v ČR vysoká, bakterie se vyskytuje u velké části druhů a testovaných vzorků.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Motýli

Řád Lepidoptera (motýli) je jedním z nejrozmanitějších skupin hmyzu s okolo 180 000 popsánymi druhy (Kristensen et al. 2007; van Nieukerken et al. 2011), ale většinu diverzity tvoří noční motýli, denní motýli tvoří asi jen 20 000 druhů. Diverzita motýlů je nejvyšší v tropech, zejména v Neotropické oblasti (oblast Jižní Ameriky) s přibližně 8 000 druhy denních motýlů (Lamas 2004; Lavinia et al. 2017). Motýli jsou díky specifickým nárokům a způsobu života důležitým článkem při vyhodnocování stavu životního prostředí a jsou zdrojem cenných informací pro výzkumy vývojové biologie, ekologie, genetiky, biogeografie, etologie, změny klimatu a vzájemných vztahů hmyzu a rostlin (Wiemers et al. 2018).

#### 3.1.1 Fauna denních motýlů v Evropě

Dle seznamu Wiemers et al. (2018) je v Evropě známo 496 druhů denních motýlů, patřící do šesti čeledí: 246 druhů do čeledi Nymphalidae (babočkovití), 130 druhů do čeledi Lycaenidae (modráskovití), 57 druhů do čeledi Pieridae (běláskovití), 47 druhů do čeledi Hesperidae (soumračníkovití), 15 druhů do čeledi Papilionidae (otakárkovití) a 1 druh do čeledi Rionidae (pestrobarvcovití). Avšak populace motýlů v Evropě neustále klesají (IUCN 2022). Pokles diverzity a početnosti hmyzu je patrný ve všech studiích, které zahrnují hodnocení fauny, biomasy a hodnocení stavu klíčových skupin indikátorů, jako jsou motýli (Wagner 2018; Forister et al. 2019). A to nejen v Evropě, ale všude ve světě, viz následující příklady: monitorovací program motýlů v oblasti Flander v Belgii ukázal, že 19 z původních 64 druhů bylo vyhubeno (Maes & Van Dyck 2001). NatureServe hodnotil 636 druhů motýlů ve Spojených státech a Kanadě, a zjistil, že 19 % je ohroženo vyhynutím (NatureServe 2019). V rozsáhlém monitorování v Ohio ve Spojených státech bylo pozorováno během 21 let 33% snížení množství motýlů (Wepprich et al. 2019). V posledních několika desetiletích bylo zdokumentováno výrazné snížení přezimujících populací monarchů v Mexiku a Kalifornii, které bylo primárně přičítáno změnám ve využívání půdy (Thogmartin et al. 2017; Agrawal 2019; Forister et al. 2019). Například populace monarchů, která přezimuje podél pobřeží Tichého oceánu, klesla o více než 99 % ve srovnání s 80. léty (Pelton et al. 2019). Ve Spojeném království desetileté trendy ukazují, že početnost motýlů na monitorovaných lokalitách klesla o 52 % a došlo ke snížení geografických oblastí ve stejném regionu o 47 % (Fox et al. 2015). Hlavní příčinou úbytku motýlů je intenzifikace zemědělství a lesnictví, kvůli kterým dochází k zániku mokřadních stanovišť, luk, mezí a okrajů polních cest. Citlivější druhy motýlů vyhánějí ze zemědělské krajiny používání insekticidů a chemických hnojiv (Beneš et al. 2002). Pozorované úbytky populací vedly k zahájení desítek programů na ochranu motýlů (Warren & Bourn 2011; Bubová et al. 2016). Pro zachování biologické rozmanitosti jsou nezbytná chráněná území. Úbytek motýlů indikuje špatný stav přírody, jejich aktivní ochrana zajistí ochranu většiny druhového bohatství bezobratlých (Konvička et al. 2010). Účinná ochrana závisí na řádné identifikaci druhů ohrožených vyhynutím a za tímto účelem se sestavují tzv. červené seznamy. Hodnocení stavu druhů na těchto seznamech by mělo být založeno na důkladných znalostech jejich biologie a ekologie (Margules & Pressey 2000; Mattila

et al. 2006; Bubová et al. 2016). Nicméně takové znalosti jsou dostupné jen pro omezený počet druhů, a to i přesto, že motýli tvoří jednu z nejvíce studovaných skupin bezobratlých (van Swaay et al. 2002; Wenzel et al. 2006; Müller et al. 2010, Bubová et al. 2016).

Podle odlišnosti v druhové skladbě motýlů se Evropa dělí na dva regiony – středomořské země a země severně a východně od Alp a Pyrenejí. Ve středomořských zemích žije více druhů než severněji a překrývají se na úrovni pouze 160 druhů (Ulrich & Buszko 2003). Dle Maes et al. (2019) země s nejbohatší druhovou diverzitou v Evropě jsou Itálie (272 druhů), Rusko (258 druhů) a Francie (255 druhů). Následují země Řecko, Španělsko, Rakousko, Švýcarsko, Ukrajina a země na balkánském poloostrově s více než 200 druhy motýlů. Ostrovní státy mají nejnižší druhovou bohatost: Malta (23 druhů), Irsko (35 druhů) a Kypr (48 druhů). Na Islandu se vyskytují pouze dva migrující druhy – *Vanessa atalanta* Linnaeus 1758 (babočka admirál) a *Vanessa cardui* Linnaeus 1758 (babočka bodláková). Nejvyšší endemismus se nachází na ostrovech ve Středozemním moři: Španělsko 13 endemitů, Itálie 9 endemitů (4 na pevnině, 2 na Sardinii, 1 na Sicílii, 1 na Liparských ostrovech a 1 na Pontských ostrovech), Řecko 8 endemitů (2 na pevnině, 4 na Krétě, 1 na ostrově Chios a 1 na ostrově Karpathos). Kromě středomořských států se nachází endemit taky na Ukrajině (*Pseudochazara euxina* Kusnetsov 1909) a v Severní Makedonii (*Pseudochazara cingovskii* Gross 1973).

### 3.1.2 Fauna denních motýlů v České republice

Na území České republiky se nachází 142 druhů denních motýlů (reálný počet se může lišit, protože některé druhy jsou neznámé, ale ještě se neví, zda vymřely) (Wiemers et al. 2018). Výčet druhů získaných pro tuto práci, české i latinské názvy včetně popisů obsahuje Příloha I. Lidská činnost v krajině (tradiční hospodaření) udržovala bezlesí, které umožnilo přežití mnoha druhů nelesních stanovišť. Boreální druhy se často vyskytují ve vyšších horských polohách nebo rašeliništích. Některé teplomilné jihoevropské druhy a druhy kontinentálních stepí se nachází na jižní Moravě napojené na Panonskou nížinu a v České kotlině, kam pronikly přes kaňon Labe. I přes absenci rozsáhlých horských masivů byl v České republice zaznamenán izolovaný výskyt několika horských druhů, častějších v Alpách nebo Karpatech, např.: *Erebia epiphron* a *Erebia sudetica* (Laštůvka & Liška 2011). Nejvyšší diverzita motýlů je v pohořích Šumava a Jeseníky. Druhy obývající Českou republiku tvoří značně heterogenní soubor různého geografického původu a obývají stanoviště rozdílného charakteru (Laštůvka & Liška 2011). Příklady stanovišť a obývajících druhů: rašeliniště (*Boloria eunomia*, *Vacciniina optilete*), běžné louky (*Polyommatus icarus*, *Maniola jurtina*, *Coenonympha pamphilus*), vlhké louky (*Boloria selene*, *Lycaena hippothoe*), křoviny (*Iphiclides podalirius*, *Satyrium pruni*), stepi (*Polyommatus damon*, *Chazara briseis*, *Spialia sertorius*) a řídké lesy (*Euphydryas maturna*, *Parnassius mnemosyne*). Avšak kvůli intenzifikaci zemědělství i v České republice ubývá těchto přírodních stanovišť a dochází k vymírání druhů. Celkem u nás vyhnulo kolem 20 druhů motýlů (druh je klasifikován jako vyhynulý až po několika letech bez záznamu výskytu), v průběhu minulého i tohoto století, jako např.: *Colias chrysotheme* Esper 1781 (žluťásek úzkolemý), *Coenonympha hero* Linnaeus 1760 (okáč hnědý), *Neptis sappho* Pallas 1771 (bělopásek hrachorový), *Colias myrmidone* Esper 1781 (žluťásek barvoměnný), *Parnassius apollo* Linnaeus 1758 (jasoň červenooký), *Hyponephele lupina* Costa 1836 (okáč

středomořský), *Hipparchia statilinus* Hufnagel 1766 (okáč písečný). Další populace na pokraji vyhynutí přežívají ve zbytkových populacích. Jsou nimi například specialisté stepních oblastí: *Chazara briseis*, *Polyommatus damon* a *Polyommatus dorylas* (Bartoňová Sucháčková et al. 2021). Na druhou stranu se v poslední době objevily některé druhy, které byly u nás považované za vyhynulé. V roce 2018 byl po čtyřiceti letech znovu objeven *Pieris mannii* v jižních Čechách a po téměř čtyřiceti letech *Nymphalis xanthomelas* na Moravě a ve Slezsku (Konvička et al. 2010).

### 3.2 DNA Barcoding

Barcoding je genetická identifikační technika, která kromě identifikace druhů slouží také pro správné přiřazení rozličných životních stádií k dospělcům známých druhů (Hebert et al. 2003), posuzování biologické rozmanitosti současných i minulých společenstev zvířat a rostlin a k identifikaci a popisu nově objevených druhů. Barcoding je také rychlejší a levnější technika než morfologická identifikace druhu, která může být často obtížná nebo vyžaduje práci mnoha expertů (Valentini et al. 2009). Kromě genetických analýz pomáhá barcoding s poskytováním systematiky širší veřejnosti – zemědělství, biomedicína atd. (Savolainen et al. 2005). Barcoding identifikuje druh pomocí krátké sekvence DNA (tzv. barcode = čárového kódu). Dostatečně účinná genová sekvence pro rozlišení většiny živočišných druhů je gen pro cytochrom c oxidázovou podjednotku I (COI) z mitochondriálního genomu (Hebert et al. 2003). Jedná se o 648 bp (bp = base pairs čili páry bází) dlouhý fragment DNA sekvenovaný z 5' konce (Ward et al. 2005). Takto dlouhý fragment umožňuje dostatečné rozlišení pro identifikaci kryptických druhů, což nám pomáhá rozšířit obzory o biologické rozmanitosti (Hebert et al. 2004 b; Jung et al. 2011). Mitochondriální geny mají v buňce vyšší počet kopií než jaderná DNA, což umožňuje získat větší výtěžek mtDNA ze stopových vzorků (Dawnay et al. 2007). Druhy byly vymezeny konkrétní sekvencí nebo skupinou velmi podobných sekvencí (Ward et al. 2005).

Řád Lepidoptera se dlouhodobě používá jako modelový pro evoluční biologii, jako vlajkový taxon pro ochranu hmyzu a pro hodnocení dopadu klimatických změn (Dincă et al. 2021). Dincă et al. (2021) sestavili první referenční knihovnu s vysokým rozlišením pro evropské motýly, která poskytuje 97% pokrytí taxonů (459 druhů) s 22 306 COI sekvencemi. Nicméně taxonomický systém v kontinentálním měřítku nemůže být složen pouze z barcodeů (nebo jiném jediném genetickém markeru), protože neodráží výskyt introgrese, parafylie a reprodukční kompatibilitu mezi hluboce divergovanými liniemi (Dincă et al. 2021). Je potřeba komplexnější analýzy. Mnoho studií prokázalo, že mtDNA vykazuje silnou diferenciaci mezi populacemi, zejména u slabě disperzních druhů (Dapporto 2019; Avise 2009; Burney & Brumfield 2009; Dincă et al. 2021). Zvýšená dostupnost souborů obsahující barcodes umožnila srovnávací fylogeografické analýzy odhalující procesy diferenciaci a populační dynamiky během kvartérních klimatických cyklů – kvartérní klimatické oscilace způsobují genetickou diferenciaci a současné rozložení linií (Hewitt 2000; Schmitt 2007; Dincă et al. 2021).



### 3.2.1 Databanky

Databanky obsahují databáze nukleotidových sekvencí formálně popsaných druhů. Jednou z těchto databanek je Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), který je komplexní databází obsahující veřejně dostupné nukleotidové sekvence pro více než 300 000 formálně popsaných druhů. Národní centrum pro biotechnologické informace (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zpřístupňuje pro databázi GenBank data, např.: popis sekvence, taxonomii zdrojového organismu, místa mutací nebo modifikací atd. Sekvence obsažené v genových bankách jsou získávány z projektů a laboratoří zaměřené na sekvenování. Sekvence mohou být nahrány do databanek například pomocí portálu BankIt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/>) nebo přes NCBI a jsou přístupné pomocí systému Entrez (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Search/entrezfs.html>), který pokrývá kromě GenBank dalších 35 biologických databází. Databáze Entrez obsahuje navíc i genomové mapy, populace a fylogenetické sekvence. GenBank je součástí mezinárodní databáze nukleotidových sekvencí (INSDC; <http://www.insdc.org/>) a podílí se na evropském nukleotidovém archivu (ENA; <https://www.ebi.ac.uk/ena>) a na databázi DNA japonské databanky (DDBJ, <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>). Denní výměna dat s Evropským archivem nukleotidů a Japonskou datovou bankou zajišťuje celosvětové pokrytí. K vyhledávání podobností mezi sekvencemi a identifikací druhu slouží program BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Benson et al. 2007, 2015, 2018). K identifikaci sekvencí neznámého původu lze také využít webové stránky CBOL (The Consortium for the Barcode of Life; <http://www.ibol.org/phase1/cbol/>). To je mezinárodní iniciativa pro výzkum a vývoj barcodingu. Vygeneruje název druhu (pokud existuje referenční sekvence) za pár sekund nebo název nejbližšího příbuzného taxonu (pokud neexistuje referenční sekvence) (Buhay 2009). Další mezinárodní databáze pomáhající identifikovat a analyzovat záznamy DNA barcodu je BOLD (Barcode of Life Data System; <http://www.boldsystems.org/>), (Ratnasingham & Hebert 2007). BOLD poskytuje také fylogenetický strom a souhrn taxonomické identifikace (Strugnell & Lindgren 2007). Část databáze BOLD je veřejně k dispozici a spojuje molekulární, morfologická a distribuční data – úložiště se skládá z dvoufázového záznamu – stránkou se sekvencí a stránkou obsahující data vzorku (datum a místo chycení vzorku, souřadnice a geografický pohled včetně měřítka, obrázek) (Ratnasingham & Hebert 2007). Všechny databáze jsou propojeny s vědeckou literaturou prostřednictvím PubMed a PubMed Central (Benson et al. 2007, 2015, 2018). K datu 3/2023 databáze BOLD obsahuje 2 139 495 záznamů od 122 409 druhů motýlů.

### 3.2.2 Příklady studií barcodingu ve světě

V rámci Evropy uvedu jako příklad studii Dincă et al. (2011) zaměřenou na 180 druhů motýlů v Rumunsku. Pro jejich studii bylo získáno 1387 sekvencí COI od 99 % druhů. Průměrně bylo sekvenováno 7,7 vzorku na jeden druh. Pomocí DNA barcodingu ověřili správnou identifikaci u 90 % druhů. Zbývajících 10 % (devět párů úzce příbuzných druhů) zahrnovalo případy parafylie, polyfylie nebo sdílely barcode s blízce příbuznými druhy. Výskyt kryptických taxonů (shodných; skrytých; morfologicky nerozlišitelných) byl nepravděpodobný kvůli podobnosti sekvencí blízce příbuzných taxonů. To naznačovalo introgresi (výměnu genů

mezidruhovým křížením) nebo neúplné třídění linií v sekvenovaném genu. Další studie DNA barcodů od Dincă et al. (2015) zaměřená na Pyrenejský poloostrov zahrnovala 3502 sekvencí z 228 druhů. Dataset obsahoval vzorky z pevninského Španělska, Portugalska, Andorry a Baleárských ostrovů. Průměrně bylo sekvenováno 15,4 vzorku na druh. Sekvence DNA byly pro 93,9 % druhů monofyletické (mají společného předka), 2,6 % polyfyletické (více předků) a 3,5 % sdílely DNA barcode (druhy čeledi Lycaenidae). Následně byl tento pyrenejský dataset sloučen s ostatními veřejnými záznamy pro evropské motýly v databázi BOLD. Nový dataset obsahoval 5782 sekvencí DNA od 299 druhů, což odpovídalo cca 60 % evropské motýlí fauny. Po rozšíření datasetu o další taxony a geografické lokace úroveň monofylie klesla na 84,6 %, polyfylie na 8,0 % a sdílení DNA barcodu na 7,4 %. Po analýze GMYC (Generalized Mixed Yule-Coalescent) hledající potenciální kryptickou rozmanitost a odlišné linie bylo 27,7 % druhů rozděleno do dvou nebo více entit, které představují potenciální kryptické druhy. Česká předběžná studie Škopek (2020) obsahovala 500 sekvencí z 87 druhů (61,7 % fauny) - 398 sekvencí z 82 druhů (58,2 % fauny) s průměrem 5 sekvencí na 1 druh získaných v terénu a 102 sekvencí z databází (GenBank, BOLD). Analýzou GMYC bylo potvrzeno správné určení 71 druhů (81,6 %), 4 druhy (4,6 %) byly sloučené do dvou entit, 10 druhů (11,5 %) bylo rozděleno na více entit (potencionální kryptická diverzita) a 2 druhy (2,3 %) byly rozdělené a sloučené s jiným druhem. Studie Lukhtanov et al. (2009) obsahovala 353 z 500 druhů středoasijských motýlů (cca 70 % fauny). Bylo použito 2 až 10 sekvencí DNA pro většinu studovaných druhů. Zjistili, že 318 z 353 druhů (90,1 %) bylo dobře odlišitelných od ostatních druhů - 86,9 % monofyletických druhů a 3,2 % parafyletických druhů, 34 druhů (9,6 %) nebylo možné rozlišit. Dále tato analýza odhalila 110 sympatrických druhů (55 párů druhů jejichž areál výskytu se překrývá) a 86 alopatrických druhů (alopatrie je rozdělení a izolace populace geografickými bariérami). Studie DNA barcodingu pro faunu Kanady a USA od D'Ercole et al. (2021) získala 14 626 vzorků od 814 druhů (96 % fauny). Vzorků z Kanady bylo 6 935, z USA 7 037, dále byl dataset rozšířen o 602 vzorků ze Střední Ameriky, 27 z Jižní Ameriky, 7 z Evropy, 4 z Asie a 11 z GenBanku. Průměrně bylo použito 18 sekvencí na druh. Většina druhů (80 %) byla monofyletická, ostatní byly parafyletické nebo polyfyletické. Barcode sdílelo 15 % druhů a téměř 10 % druhů vykazovalo vysokou vnitrodruhovou variabilitu (>2,5 %). Tato studie zachytila 67 % odhadované diverzity haplotypů. Další studie zaměřená na sestavení referenční knihovny DNA barcodů motýlů z Argentiny Lavinia et al. (2017) se zaměřením na Atlantický les (primární les rozšířen od Brazílie, přes Argentinu do Paraguaye) shromáždila 2 020 sekvencí z 248 rodů a 417 druhů (35 % fauny). V průměru bylo analyzováno 4,8 sekvencí na druh. Úspěšnost identifikace přesáhla 95 %. Zjistili vzor sympatrické divergence v Atlantském lese v provincii Misiones u 18 druhů, které měly dvě nebo více odlišných linií v rámci stejné vzorkovací lokality. Sloučeno bylo 23 druhů.

### 3.3 Bakterie *Wolbachia*

*Wolbachia* je nejrozšířenějším rodem endosymbiotických bakterií infikující širokou škálu členovců a hlístic (Taylor et al. 2018). Vyskytují se u ní mezidruhové interakce od parazitismu po mutualismus. Aby si zajistila přežití, ovlivňuje reprodukci a plodnost hostitele. Je pleomorfní (mnohotvará), má velikost od 0,2 do 4  $\mu\text{m}$  a sídlí v cytoplazmě a gametách hostitele (Taylor et al. 2018). Míra infekce závisí na tom, který druh infikuje, kterého hostitele.

Dále také závisí na pohlaví hostitele. Pokud je hostitelem samec, infekce může být patologická, pokud samice, *Wolbachia* hostiteli zajistí delší život a zvýší produkci vajíček – tím si *Wolbachia* zajišťuje přenos z matky na potomstvo (Werren et al. 2008). Jak už jsem zmínil výše, *Wolbachia* se vyskytuje i v cytoplazmě gamet hostitele – spermie mají málo cytoplazmy, takže *Wolbachia* vyhledává samice a v jejich cytoplazmě infikuje vajíčka matky, aby si zajistila přenos do další generace (Werren et al. 2008). Protože je *Wolbachia* primárně přenášena skrz mateřskou zárodečnou linii hostitele, má schopnost měnit jádro hostitelských buněk a vývojové procesy infikovaných samic (změna kondenzace hostitelských chromozomů, určování pohlaví, biologie kmenových buněk a určování os během rané embryogeneze) (Taylor et al. 2018). Dále může mít vliv na nalezené vzorce mitochondriální diverzity a tím pádem také na výsledky barcodingu (Bartoňová Sucháčková et al. 2021). Mezi další reprodukční parazitické strategie patří vyvolání „cytoplazmatické inkompatibility“ mezi spermií a vajíčkem, což zabraňuje neinfikovaným samicím produkovat životaschopné potomstvo po spáření s infikovaným samcem (Werren et al. 2008). *Wolbachia* může také způsobit, že se infikované samice začnou množit nepohlavně, aby vznikla nová generace infikovaných klonů (Werren et al. 2008). *Wolbachia* má také schopnost chránit hostitele před patogeny (zejména RNA viry). Taylor et al. (2018) odhadují, že se infekce vyskytuje u milionu druhů bezobratlých, včetně 40 % všech druhů členovců, což z ní dělá jednu z největších pandemií.

### 3.3.1 Metody detekce infekce

Infekce *Wolbachia* se detekuje pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím specifických primerů WSP (*Wolbachia* surface protein). Tyto primery jsou krátké jednovláknové řetězce DNA, které jsou navrženy tak, aby se vázaly specificky na oblasti genomu *Wolbachia*. WSP kóduje povrchový protein na membráně vykazující sekvenční podobnost s proteiny na vnější membráně příbuzných bakterií (Braig et al. 1998; Baldo & Werren 2005). Mezi ostatními sekvenovanými geny je gen WSP nejvariabilnější a vykazuje vysokou genetickou divergenci mezi kmeny *Wolbachia* (Baldo & Werren 2005). Dále se přítomnost bakterie *Wolbachia* může zjišťovat pomocí MLST (Multilocus Sequence Typing). Jedná se techniku molekulární typizace na základě sekvencí DNA několika základních genů, které jsou přítomny u všech příslušníků rodu nebo druhu. Pět konzervovaných genů pro zjišťování variability bakterie *Wolbachia* jsou *ftsZ*, *gatB*, *coxA*, *hcpA* a *fbpA* (Baldo et al. 2006). Pomocí těchto genů je možné rozlišovat mezi různými kmeny téhož druhu. Obě techniky zahrnují sekvenování DNA – MLST je technika molekulární typizace používaná k identifikaci a klasifikaci různých mikroorganismů, zatímco WSP primery jsou používány specificky k detekci a identifikaci bakterie *Wolbachia*.

Veřejná databáze pro molekulární typizaci a diverzitu mikrobiálního genomu (PubMLST; <https://pubmlst.org/>) obsahuje data o sekvencích bakterie *Wolbachia* s informacemi o původu a fenotypu (a pro dalších cca 130 různých mikrobiálních druhů a rodů) (Jolley et al. 2018). Každá uložená sekvence je popsána a upravena tak, aby identifikovala přítomné geny a systematicky zobrazovala jejich variace. K datu 3/2023 obsahuje globálně 3 684 alelových sekvencí bakterie *Wolbachia* (4 z České republiky). V databázi GenBank

se nachází tři desítky plně nebo částečně osekvenovaných genomů *Wolbachia*, a další nukleotidové sekvence z jiných genomů (Taylor et al. 2018).

### 3.3.2 *Wolbachia* u motýlů

Bakterie *Wolbachia* způsobuje u Lepidoptera (motýli a noční můry) reprodukční manipulaci, feminizaci a cytoplazmatické inkompatibility (Ahmed et al. 2015). Studie Ahmed et al. (2015) ukazuje, že výskyt infekcí je velmi vysoký, a prokazuje, že klima a geografie jsou silnými prediktory frekvence infekce. Jejich dataset obsahoval z 83 % denní motýly (Papilionoide) a 17 % noční motýly (Heterocera). Jejich výzkum zahrnoval více než 300 druhů Lepidoptera. Z jejich vzorků bylo 43 % infikováno bakterií *Wolbachia* (Ahmed et al. 2015). Pro porovnání studie z Panamy (Werren et al. 1995) měla infikováno 16,2 % vzorků, studie z Velké Británie 35,2 % (West et al. 1998), studie z USA 14,3 % (Werren & Windsor 2000), studie z Ugandy 17 % (Jiggins et al. 2001), studie z Japonska 45 % (Tagami & Miura 2004), studie ze západní Evropy 43 % (Duron et al. 2008) a studie z Indie 52 % (Salunke et al. 2012). Studie Ahmed et al. (2015) nezjistila vztah mezi četností infekce *Wolbachia* a fylogenetickou příbuzností mezi skupinami Lepidoptera, ale zjistila významnou korelaci mezi četností infekce a zeměpisnou polohou hostitele – je známo, že napadení bakterií *Wolbachia* se liší u druhů Lepidoptera z různých geografických oblastí (Werren & Windsor 2000; Ahmed et al. 2015). Ahmed et al. (2015) uvádí, že je infekce *Wolbachia* u Lepidoptera vyšší v nižších zeměpisných šířkách (v teplejším klimatu). Stejného zjištění dosáhli i ve své studii Toju a Fukatsu (2011). Avšak například ve studiích Liu et al. (2006) a Morag et al. (2012) dosáhli opačných výsledků, a ve studii Sumi et al. (2013) nezjistili žádný sezónní účinek. Na základě výsledků Ahmed et al. (2015) odhadují, že přibližně 80 % druhů a čtvrtina až třetina jedinců je infikována bakterií *Wolbachia*. Ve studii Ilinsky a Kosterin (2017) prozkoumávali komplexní rozšíření infekce a genetickou diverzitu u 120 druhů z 13 čeledí Lepidoptera. Většina motýlů pocházela ze západosibiřských lokalit. Identifikovali nakažení u 58,3 % druhů Lepidoptera (375 infikovaných vzorků u 70 druhů). Mezi denními motýly bylo infikováno 59,3 % druhů. Ilinsky a Kosterin (2017) uvádí, že takto vysoký výskyt pravděpodobně platí i pro jiné oblasti mírného pásu, protože studované druhy mají široké palearktické nebo i dokonce holarktické rozšíření. Studie Lucek et al. (2021) zaměřená na studium prevalence (podíl počtu infikovaných jedinců k počtu všech jedinců ve sledované populaci) bakterie *Wolbachia* u 13 příbuzných hostitelských populací druhů z rodu *Erebia* odhalila, že více kmenů *Wolbachia* infikuje všechny zkoumané taxony, ale s různou prevalencí. Až na dvě výjimky zjistili, že prevalence *Wolbachia* je relativně vysoká (75 % a výš) mezi studovanými taxony a liniemi rodu *Erebia*. Lucek et al. (2021) usuzují, že přežití v odlišných glaciálních refugiích a zánik určitých kmenů *Wolbachia* během postglaciální expanze společně formovaly komplexní interakce mezi evolucí *Wolbachia* a diverzifikací jejího hostitele – rod *Erebia*.

## 3.4 Čtvrtohorní dynamika motýlích areálů

Glaciální období (doby ledové) jsou období dlouhodobého snižování teploty zemského povrchu a atmosféry. Během glaciálních období dochází k rozšiřování kontinentálních, polárních a alpských ledovců. Vyznačují se nízkými teplotami, sníženým množstvím srážek a zaledněním. Během dob ledových může globální teplota klesnout až o 10 °C (Dawson 2013).

Obvykle jsou spojeny se změnami oběžné dráhy Země, které ovlivňují množství slunečního záření dopadajícího na planetu (Hays et al. 1976; Maslin 2016). Glaciální cykly se vyskytují v intervalech trvajících 40 000 až 100 000 let. Mezi glaciálními obdobímí se objevují krátká teplá období známá jako postglaciální období (doby meziledové). Poslední velká doba ledová skončila přibližně před 12 000 lety. Od té doby se Země nachází v době meziledové (Dawson 2013).

Během posledního glaciálního období byla velká část Evropy pokryta silnou vrstvou ledovce. Ledovce se pohybovaly na jih a východ a zasahovaly až do dnešního Německa nebo Maďarska (Kelly & Gráda 2013). Klima v Evropě bylo mnohem chladnější a sušší než dnes. Toto období chladného a suchého klimatu způsobilo vyhynutí mnoha druhů zvířat a zapříčinilo migraci z některých oblastí Evropy (Kelly & Gráda 2013). S ústupem ledovců se klima začalo oteplovat a flora a fauna se dramaticky změnily. Přítomnost ledovců na území dnešní České republiky změnila krajinu – vyhloubila údolí, vytvořila ledovcová jezera a jeskyně a zanechala zde obrovské množství sedimentů (Macoun & Králík 2020). Glaciální procesy se také zasloužily o vznik některých z nejpozoruhodnějších krajin České republiky, včetně pískovcových útvarů Českého Švýcarska a vysokých vrcholů Krkonoš (Macoun & Králík, 2020).

### **3.4.1 Teorie refugií**

Geografické areály druhů se rozšiřovaly a zmenšovaly v závislosti na klimatických změnách čtvrtohor (Darwin 1859; Hewitt 1996; Bennett & Provan 2008; Stewart et al. 2010). Klimatické změny a to, jak jednotlivé druhy reagují na změnu klimatu v minulosti vedly k významným změnám v rozšíření druhů. Oblasti, které druhy obývaly během období glaciálního nebo interglaciálního (meziledového) cyklu jsou známá jako refugia. Refugia jsou útočiště umístěná v jiných zeměpisných šířkách nebo délkách, než by se normálně očekávalo, a často připomínají klimatické ostrovy, na nichž se podmínky příznivě liší od okolních oblastí. Snaha pochopit, jak druhy reagovaly na změny klimatu a kde přečkaly tyto změny má význam pro modely předpovídající, jak současné změny klimatu ovlivní druhy (Stewart et al. 2010). Ve čtvrtohorách taxony adaptované na mírný pás (teplomilné druhy) byly omezeny na refugia během glaciálů, zatímco taxony adaptované na chlad byly omezeny na refugia během interglaciálů (Stewart et al. 2010). Stewart et al. (2010) uvádí, že kromě tradičních jižních refugií pro druhy žijící v mírném pásu existovaly na severu během glaciálů kryptická útočiště a na jihu v horských oblastech ekvivalentní kryptická jižní refugia během interglaciálů. Studiím biogeografie doby ledové dominuje hypotéza glaciálního refugia. Tato hypotéza označuje chladné, glaciální fáze historie Země jako primární činitele populační divergence, v některých případech i speciace (Hewitt 1996; Stewart et al. 2010) a aplikuje se na druhy adaptované na teplo.

### **3.4.2 Typy refugií**

Podle doby výskytu a polohy dělíme refugia na glaciální, interglaciální a oceánsko-kontinentální gradient. Glaciální refugia dále dělíme na jižní refugia a kryptická severní refugia. V glaciálních obdobích jsou jižní refugia útočištěm pro teplomilné druhy. V dobách

interglaciálních se zde vyskytuje část populací a část migruje severněji. Na severu se střetávají druhy pocházející z různých jižních refugií, což naznačuje, že druhy reagovaly separátně na zvýšení dostupnosti stanovišť způsobené klimatickými změnami na konci posledního zalednění (Taberlet et al. 1998; Stewart et al. 2010). V Evropě se jižní refugia nacházejí na Pyrenejském, Italském a Balkánském poloostrově. Kryptická severní refugia jsou glaciální refugia pro teplomilné taxony umístěná ve vyšších zeměpisných šířkách (Stewart et al. 2010).

Interglaciální refugia dělíme na severní refugia a kryptická jižní refugia. Severní (polární) refugia jsou lokalizovaná ve vyšších zeměpisných šířkách, kde druhy přizpůsobené chladu přetrvávají v dobách interglaciálních. Na severní polokouli se severní refugia nacházejí v nejsevernějších částech Eurasie a Severní Ameriky, a také na několika ostrovech v Severním ledovém oceánu, například v Grónsku (Stewart et al. 2010). Během posledního zalednění mělo mnoho druhů adaptovaných na chlad větší rozšíření než dnes (Stewart et al. 2010). Několik arktických druhů je v současnosti omezeno výhradně na polární refugia, například *Vulpes lagopus* Linnaeus 1758 (liška polární). Současné areály některých z těchto druhů jsou velké, ale stále jsou výrazně zmenšeny ve srovnání s jejich velikostí během posledního zalednění. Kryptická jižní refugia jsou refugia dob interglaciálních pro druhy adaptované na chlad, nacházející se v nižších zeměpisných šířkách. V dnešní době, a pravděpodobně i během předchozích dob interglaciálních, se v těchto refugiích nacházely reliktní populace dříve rozšířených pleistocénních taxonů adaptovaných na chlad (Stewart et al. 2010). Populace druhů adaptovaných na chlad v kryptických jižních refugiích byly během dob interglaciálních často obklopeny populacemi teplomilných druhů, které expandovaly ze svých severních refugií (Stewart et al. 2010). Kryptická jižní refugia mají obecně horskou topografii (Alpy nebo Pyreneje), avšak ve vyšších zeměpisných šířkách může být nadmořská výška nižší. Oceánsko-kontinentální gradient vysvětluje expanzi stepních druhů do Evropy a jejich začlenění do biomu stepotundra pozdního pleistocénu. „Oceánická“ adaptace znamená adaptaci na vlhčí a méně proměnlivé klima interglaciální doby a „kontinentální“ adaptaci na sušší klima se sezónní variabilitou dob glaciálních. Euroasijské druhy savců mají dnes v Paleartidě omezenější kontinentální rozšíření, než během posledního zalednění (Musil 1985; Stewart et al. 2010).

### 3.4.3 Vliv čtvrtohorního klimatu

Genetická rozmanitost napříč Evropou byla uznána jako částečný důsledek izolace glaciálních dob v jižních refugiích a postglaciální kolonizace směrem na sever (Schmitt & Hewitt 2004). Genetická diverzita klesá od jihu na sever a vyšší genetickou diverzitu nalezneme ve východních liniích, než v těch západních (Schmitt & Hewitt 2004). To ukazuje na sníženou adaptabilitu v důsledku genetického ochuzení v důsledku glaciálních a postglaciálních změn. Proměnlivost klimatu v minulosti omezovala mnoho živočišných a rostlinných druhů na jihoevropská refugia během nejchladnějších fází (de Lattin 1967; Schmitt & Hewitt 2004). Během těchto glaciálních izolací se mnoho druhů vyvinulo do několika fylogeografických linií (Comes & Kadereit 1998; Taberlet et al. 1998; Hewitt 1999; Schmitt & Hewitt 2004). Během zalednění byly jižní druhy izolovanější a vyvíjely se nezávisle. Severní druhy byly mobilnější a migrovaly na velké vzdálenosti (Dennis et al. 1991).

Hewitt (1996) uvádí, že čtvrtohorní cykly s dlouhodobým zaledněním trvající až 100 000 let s kratšími interglaciálními dobami (10 – 15 000 let) byly hlavní hnací silou divergence populací teplomilných druhů. V těchto dlouhodobých cyklech tráví v refugiiích druhy mírného pásma delší období než druhy adaptované na chlad. Kratší výkyvy klimatu je obtížné identifikovat, ale Stewart et al. (2010) si myslí, že také způsobovaly ekologické „poruchy“, krátkodobé izolace refugií a expanze druhů teplomilných i studenomilných během stadiálů (studenější období během doby meziledové) a interstadiálů (teplejší období během doby ledové). Refugia, které druh obývá nepřetržitě po dobu jednoho celého glaciálního nebo interglaciálního cyklu lze považovat za dlouhodobá refugia (Stewart & Dalén 2008; Stewart et al. 2010). Tyto dlouhodobá refugia by měla mít nejvyšší úroveň genetické diverzity v rámci rozsahu druhu (Stewart et al. 2010). Velikost a doba trvání refugia má vliv na perzistenci druhů (Stewart et al. 2010). Schopnost populací přetrvat během období nepříznivého klimatu, aniž by vyhynula kvůli demografické situaci nebo inbreedingu závisí na nosnosti prostředí a na délce klimatické fáze (Lande 1988; Stewart et al. 2010). Například kryptická refugia bývají malá a budou tedy méně běžná pro druhy s velkým tělem, protože nosnost takového prostředí je menší (Stewart et al. 2010). Glaciální období jsou delší než interglaciální, takže teplomilné a studenomilné druhy byly omezeny na různou dobu. Také severní refugia mají geograficky blíže k sobě než jižní refugia, což naznačuje menší příležitost populační divergence mezi populacemi severních refugií než jižních refugiích (Stewart et al. 2010). Speciace mezi populacemi jižních refugií může být pomalejší než v kryptických severních refugiích, protože velikost populace bude větší kvůli širší geografické oblasti, což může vést ke zpomalení adaptivní divergence (Mayr 1954; Stewart et al. 2010). Potenciál speciace populací kryptických severních refugií by mohl být vyšší během delších glaciálních dob, než pro kryptická jižní refugia během kratších dob interglaciálních (Stewart et al. 2010). Proto Stewart et al. (2010) navrhuje, že izolace druhů mírného pásma v kryptických severních refugiích mohla hrát důležitou roli při původu arktických druhů. Jako příklad uvedu *Ursus maritimus* Phipps 1774 (medvěd lední) z *Ursus arctos* Linnaeus 1758 (medvěd hnědý). Fylogenetické důkazy prokazují, že se medvěd lední vyvinul z medvěda hnědého, a že k tomu pravděpodobně došlo před 200–300 000 lety (Talbot & Shields 1996; Ho et al. 2008; Stewart et al. 2010). Aby k tomu mohlo dojít, musela být populace medvěda hnědého vystavena severnímu klimatu a oceánským biotopům. Stewart et al. (2010) se domnívají, že taková populace musela žít v kryptickém severním refugiu, aby došlo k alopatrické speciaci v izolaci od ostatních medvědů hnědých.

#### 3.4.4 Příklady studií u motýlů

Ve studii Schmitt et al. (2005) zaměřené na mapování genetických linií u *Maniola jurtina* potvrdili evoluci dvou hlavních genetických linií. Potvrdily to data z alozymů (dědičný protein kódovaný v jednom lokusu), vzor křídel a morfologie genitálií. Dle Schmitt et al. (2005) tyto dvě linie vytvořily hybridní zónu v západní a střední Evropě. V rámci těchto linií nebyla nalezena žádná další genetická diference. Poslední zalednění by tedy mohlo být jediným hlavním faktorem, který ovlivnil genetickou strukturu populace tohoto druhu (Schmitt et al. 2005). Druh *M. jurtina* má ve svých populacích také vysokou genetickou diverzitu. Jedná se o typický jev pozorovaný u běžných a vysoce životaschopných druhů (Schmitt et al. 2005).

Analýza fylogeografických struktur ve studii Schmitt et al. (2007) zaměřená na význam středomořských a mimo-středomořských glaciálních refugií pro teplomilné druhy uvádí, že genetická struktura alozymů je velká, což je pravděpodobně výsledkem glaciálních diferenačních procesů v jihovýchodní Evropě. Studovaný druh *Erebia medusa* má několik endemických genetických linií v Rumunsku a Bulharsku. Silná diferenciace mezi těmito zeměmi ukazuje na dlouhodobé oddělení dvou hlavních skupin v údolí Dunaje. Silná diferenciace v Rumunsku je s největší pravděpodobností způsobena existencí několika center glaciální diferenciace, dvou nebo více jižně od jižních Karpat a jednoho ve východní části Karpatské kotliny (Schmitt et al. 2007). Slabší diferenciace mezi bulharskými vzorky a jejich vyšší genetická diverzita naznačují, že k toku genů došlo mezi různými oblastmi Bulharska během poslední doby ledové.

Fylogeografická analýza alpského druhu *Erebia ephron* jako vzorového modelu pro alpské disjunktní druhy (druhy, které se vyvinuly ze stejného předka) ve studii Schmitt et al. (2006) objevila silnou diferenciaci do pěti různých linií podporující pět center diferenciace. Jsou jimi východní Pyreneje, pohoří mezi centrálními Pyrenejemi a jihozápadními Alpami, dvě oblasti podél jižních Alp a okraj severních Alp. Schmitt et al. (2006) předpokládají, že počátek této diferenciace byl před současným interglaciálem. Výrazné genetické rozdělení do dvou hlavních skupin s pěti podskupinami silně naznačuje scénář s pěti nebo více alopatrickými centry diferenciace v západní části Evropy. Schmitt et al. (2006) uvádí, že je pravděpodobné, že se nacházely v nezaledněných částech východních a jihovýchodních Pyrenejí, táhnoucí se na západ od centrálních Pyrenejí, přes pohoří jižní Francie a zasahující na východ do nezaledněné nižší části jihozápadních Alp, na úpatí severozápadních Alp a podél jižních a severních úpatí. Na severu Alp táhnoucí se až k východu Černého lesa v jihozápadním Německu a k povodí Moravy. Podobné vzorce výskytu ukazující na úzkou genetickou příbuznost mezi horskými druhy mají i studie Kropf et al. (2002) zaměřená na studium rostliny *Anthyllis montana* Bailey & Bailey 1941 (úročník horský) a Martin et al. (2002) studující *Erebia cassioides* Reiner & Hochenwarth 1792 (okáč lesknový) mezi Pyrenejemi a jihozápadními Alpami (Schmitt et al. 2006).

Ve studii Schmitt et al. (2010) vykazuje druh *Coenonympha arcania* tři odlišné biogeografické vzorce. Druh *C. arcania* je jediným středomořským taxonem v tomto druhovém komplexu, který expandoval z nejméně dvou různých ledových refugií na jihu během postglaciálního období (Schmitt et al. 2010). Dle Schmitt et al. (2010) je zvláště zajímavý případ představující dva endemické taxony střední nadmořské výšky *Coenonympha darwiniana* Staudinger 1871 a *Coenonympha macromma* Turati a Verity 1910. S jejich omezeným rozšířením vykazují analyzované populace genetickou rozmanitost stejně vysokou, nebo dokonce vyšší, než u běžných a rozšířených druhů motýlů (Porter & Geiger 1995; Schmitt & Seitz 2001; Schmitt et al. 2003; Schmitt et al. 2010). Tento paradox neočekávaně vysoké genetické diverzity u těchto endemitů by mohl být vysvětlen relativně nedávným hybridním původem *C. darwiniana* (Schmitt et al. 2010). Pro *C. macromma* to lze vysvětlit pouze nedostatkem větších posunů mezi glaciálními a postglaciálními obdobími (Schmitt et al. 2010). Tyto dva taxony se mohly nacházet v geografické blízkosti na úpatí jižních Alp během ústupu



poslední doby ledové. Lokální přežívání zalednění na úpatí hor, zejména Alp, může u místních endemitů středních nadmořských výšek představovat obecnější rys (Schmitt et al. 2010).

### 3.4.5 Původ českých populací motýlů

Dle studie Stašová (2018) původ některých českých populací lučních motýlů (*Melitaea didyma*, *Erebia medusa*, *Polyommatus coridon*) pochází z východních větví těchto druhů. Podle fylogeografických analýz (topologie stromů a sítí získaných ze sekvencí COI a pseudogenu) je to následkem postglaciálního šíření z refugií v jihovýchodní Evropě. Cesty ze západu byly blokovány pohořími Šumavy, Českého lesa a Krušných hor (druhy mírného pásu byly omezeny výskytem do nižších geografických šířek v dobách ledových Pleistocénu) (Stašová 2018). To vedlo k izolaci a ke změnám v distribuci. V těchto refugiích se odlišné rodové linie chovaly jako odlišná centra a vyvíjely se nezávisle. Po skončení doby ledové se tyto odlišné rodové linie znovu setkaly a došlo k hybridizaci (Schmitt & Müller 2007; Stašová 2018).

Beneš (2018) ve své práci popisoval genetickou strukturu populací modrásků *Polyommatus damon* a *Polyommatus dorylas* založenou na mitochondriální DNA. Výsledky fylogenetických analýz potvrdily, že populace obou druhů ze střední Evropy nejsou geneticky příbuzné s populacemi z potenciálních jižních refugií (Balkánský poloostrov). Populace *Polyommatus damon* je odlišná i od populace z Pobaltí. Současné rozšíření dle Beneš (2018) tedy není následkem disperze na sever po skončení doby ledové. Další fylogenetické analýzy potvrdily příbuznost populací *Polyommatus golgus* Hübner 1813 k pyrenejským populacím *Polyommatus dorylas* (Beneš 2018).

Studium haplotypů (kombinace alel) ve studii Sucháčková Bartoňová et al. (2021) dokazuje zařazení populací *Chazara briseis* ve střední Evropě do mitochondriální skupiny rozšířené od Španělska po Altaj (střední Asie) oddělené od populací severní Afriky a jihovýchodních oblastí. V rámci této skupiny se pak místní populace ve střední Evropě liší určitým haplotypem. Populace z Německa jsou příbuzné s populacemi ze západní Evropy, populace České republiky mají jeden haplotyp jedinečný pro český region a další sdílí s populacemi Maďarska a Rakouska (Sucháčková Bartoňová et al. 2021).

Určování příbuznosti na základně fylogenetického stromu v předběžné studii Škopek (2020) mezi českými, německými a rumunskými populacemi čeledi Lycaenidae ukázala příbuznost českých populací teplomilných *Thecla betulae* s rumunskými populacemi. České a rumunské populace mohly být propojené teplou panonskou nížinou a německé populace mohly být od českých oddělené horami na hranicích. Vlhkomilný druh *Aricia eumedon* mohl být na druhou stranu izolován od těch rumunských teplými oblastmi na území ČR, protože byl více příbuzný německým vzorkům. Druhy *Plebejus argyrognomon* a *Polyommatus thersites* tvořily samostatnou českou větev.

### 3.5 Metody studia biogeografie kvarterní Evropy

Biogeografie se studuje především fylogenetickou analýzou zájmového taxonu (obecně druhu). Materiál se získává z lokalit výskytu, ze sbírek či veřejných databází. Studie mohou být založené na jednom či více genech. V praxi se využívá několik molekulárních markerů – barcode, alozymy, mikrosatelity a metody sekvenování nové generace (next generation, NGS). Alozymy jsou běžné variantní formy enzymu lišící se svou strukturou. Jsou kódovány různými alelami na stejném místě. Ve fylogenetice se používají k měření evoluční historie a vztahů mezi různými druhy (Parker et al. 1998). Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice. Skládají se z opakujících se jednotek o velikosti 2–5 nukleotidů. Detekují se pomocí amplifikace cílených úseků pomocí PCR a následné elektroforézy. Využívají se ke genetickému mapování, testování diverzity populace a k testům otcovství. Sekvenování nové generace je metoda umožňující rychlé a masivní sekvenování velkého množství vzorků najednou. Používá se k určení pořadí nukleotidů v celých genomech nebo cílových oblastech DNA či RNA (Behjati & Tarpey 2013).

## 4 Metodika

Základní laboratorní prací byla izolace DNA z noh motýlů. Izolovaná DNA byla poté vystavena polymerázové řetězové reakci (PCR), která umožňuje cyklickou klonaci vybraných úseků DNA (genů COI a WSP). Kvalita PCR produktů a přítomnost bakterie *Wolbachia* byla ověřena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Ověřené produkty se následně poslaly na sekvenování nukleových kyselin (sekvenování určuje pořadí nukleotidů v úseku DNA). Nasekvenované DNA produkty se musely upravit a srovnat (tzv. aligning). Upravené sekvence jsem tak mohl porovnávat, třídit a řadit pomocí specializovaných programů. Pomocí konkrétních programů jsem mohl studovat původ českých populací a linií.

### 4.1 Sběr vzorků

Nejprve bylo třeba sehnat vzorky všech druhů motýlů žijící na našem území. Některé vzorky motýlů byly již připravené k izolaci, další byly dodány ze soukromých sbírek. Některé sekvence zhotovené pro jiné výzkumy (Bartoňová et al. 2019; Maresova et al. 2019) byly taktéž použity pro tuto práci. Všechny ostatní druhy motýlů byly za účelem této práce spolupracovníky odchyceny z volné přírody. Bylo nutné sebrat a použít k dalším krokům více vzorků od každého druhu, kvůli možné vnitrodruhové variabilitě. Z celých těl motýlů byly odděleny nohy a přemístěny do mikrozkušavek (tzv. eppendorfek). Každá eppendorfka byla řádně označena.

### 4.2 Izolace DNA

V rámci jedné izolace jsem zpracoval 30 vzorků. Izolaci jsem prováděl pomocí sady Genomic DNA Mini kit dle přiloženého návodu. Nejprve jsem pomocí pipety do každé eppendorfky přidal 200  $\mu$ l lyzačního pufru (GT Buffer). Za pomoci pestlí jsem musel rozdrtit nohy motýlů na co nejmenší části tak, aby došlo k homogenizaci vzorku. Následně jsem přidal 20  $\mu$ l Proteinázy K a eppendorfky přemístil do vortexu k promíchání vzorků. Proteináza K slouží k degradaci bílkovin v buněčných lyzátech. Eppendorfky jsem poté umístil do inkubačního zařízení, kde zůstaly přibližně 3 hodiny a inkubovaly se při teplotě 60 °C. Po dokončení inkubace jsem přidal 200  $\mu$ l GBT pufru (GBT Buffer), vzorky jsem pomocí vortexu opět promíchal a dal inkubovat na dalších 20 minut. Po inkubaci jsem přidal 200  $\mu$ l analytického lihu (ethanol) a vzorky jsem znovu promíchal. Poté jsem prepipetoval obsah všech eppendorfek do předem připravených kolonek. Kolonky jsou mikrozkušavky (GD column) ve sběrných 2 mililitrových zkumávkách (Collection Tube). Následně jsem kolonky přemístil do centrifugy. V centrifuze se odstředily 2 minuty při 15 000 otáčkách za minutu. Po těchto dvou minutách jsem kolonky přemístil do nových sběrných nádob a ty staré vyhodil. Do kolonek jsem přidal 400  $\mu$ l promývacího W1 pufru (W1 Buffer) a dal je znovu do centrifugy na 30 sekund. Po odstředění jsem vylil obsah sběrných nádob a přidal 600  $\mu$ l dalšího promývacího pufru (WASH Buffer) a přemístil opět do centrifugy na dalších 30 sekund. Obsah sběrných nádob jsem poté znovu vylil a kolonky dal znovu do centrifugy, tentokrát na 3 minuty, aby došlo k vysušení. Po dokončení vysušení jsem přemístil kolonky do nových eppendorfek. Do každé z eppendorfek jsem přidal 70  $\mu$ l předehřátého (60 °C) elučního roztoku (Elution Buffer). Elution Buffer v kolonce uvolňuje vázanou DNA. Roztok bylo třeba nechat působit

minimálně 10 minut. Nakonec jsem uvolnil templáty DNA do eppendorfek – toho jsem docílil 30 sekundami v centrifuze. Všechny templáty jsem poté uskladnil v mrazáku (-20 °C).

### 4.3 PCR

Amplifikoval se mitochondriální gen cytochrom c oxidáza podjednotka 1 (COI) a *Wolbachia* surface protein (WSP). V první řadě jsem musel vytvořit Master Mixy, ve kterých probíhaly PCR reakce. Master Mix pro COI se skládal z 4 µl PCR H<sub>2</sub>O, 6,25 µl Bioline RedMix a dvou univerzálních primerů – 0,625 µl Forward primer LCO a 0,625 µl Reverse primer NANCY (Monteiro & Pierce 2001; Wahlberg & Wheat 2008). Sekvence primeru LCO je: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GTC AAC AAA TCA TAA AGA TAT TGG 3' a sekvence primeru Nancy: 5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG G CCT GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC 3'. Pro usnadnění sekvenování oba primery obsahovaly promotory (T7promoter a T3). Master Mix pro WSP obsahoval místo primerů LCO a NANCY primery 81F a 691R (Braig et al. 1998). Sekvence primeru 81F je: 5' TGG TCC AAT AAG TGA TGA AGA AAC 3' a sekvence primeru 691R je 5' AAA AAT TAA ACG CTA CTC CA 3'. Uvedené objemy platí pro 1 vzorek. Objemy složek Master Mixů úměrně odpovídaly počtu vzorků. Všechny chemikálie se musely skladovat podchlazené. Hotové Master Mixy jsem přepipetoval na speciální destičku obsahující mikrozkušavky. Do jednotlivých mikrozkušavek jsem přepipetoval 11,5 µl Master Mixu a 2 µl templátu DNA. Destičku s mikrozkušavkami jsem protřepal a vložil do termocykleru k amplifikaci DNA. PCR pro COI probíhala následujícím způsobem: zahřátí na 95 °C a ponechání 3 minuty (tzv. počáteční denaturace) – tím došlo k rozpojení vodíkových můstků. Následovalo 40 cyklů, kde se střídaly teploty následovně: 94 °C na 30 sekund, 50 °C na 30 sekund a 72 °C na dalších 30 sekund. Proces skončil tzv. finální elongací, která trvala 10 minut při 72 °C. Výsledkem byly desítky miliard amplifikovaných fragmentů DNA. PCR pro WSP probíhala podobně, pouze místo snížení teploty na 50 °C se snižovalo na 55 °C.

### 4.4 Elektroforéza

Kvalitu produktů PCR a přítomnost bakterie *Wolbachia* jsem ověřil pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Zviditelnily se a oddělily různé dlouhé skupiny řetězců DNA. Nejprve jsem musel vyrobit 1,5% agarózový gel. Rozmíchal jsem 1,5 g práškové agarózy ve 100 ml TAE pufru (TAE Buffer). Směs jsem vložil do mikrovlnné trouby na 1,5 min. Gel měl mít po uplynutí času rosolovitou konzistenci, pokud neměl, bylo třeba pokračovat v zahřívání. Bylo nutné gel v mikrovlnné troubě hlídat, aby nedošlo k převaření a s tím spojenou erupcí. Následně jsem přidal 1 µl barviva GEL-RED a zamíchal. Dále jsem gel přelil do předem připravené vaničky s hřebínky (ty slouží k vytvoření jamek pro vnesení vzorků) a počkal 20 minut, než gel ztuhne. Po ztuhnutí gelu jsem vyjmul hřebínky a vaničku vložil do elektroforetické vany vyplněnou elektroforetickým pufrem TAE. Dále jsem přepipetoval vzorky do jamek v gelu. Do první z jamek v každém sloupci jsem přidal samostatně velikostní ladder k odhadu velikosti DNA fragmentů. Po přepipetování jsem uzavřel vaničku a napojil anodu a katodu. Vaničkou procházelo konstantní napětí 150 V po dobu 25 minut. Během této doby se záporně nabitě řetězce nukleových kyselin prodíraly ke kladné elektrodě. Po dokončení elektroforézy jsem gel

vyjmul z vaničky a přemístil pod UV transiluminátor s kamerou s černým filtrem k fotodokumentaci. Na fotografiích bylo vidět, u kterých vzorků proběhla PCR úspěšně a vznikl PCR produkt, a které vzorky obsahovaly bakterii *Wolbachia*. Všechny PCR produkty byly následně odeslány do firmy Macrogen (Amsterdam, Nizozemsko), kde byly na komerční bázi osekvenovány na sekvenátoru typu ABI3730XL.

#### 4.5 Úprava sekvencí, fylogenetické a biogeografické analýzy

Získané sekvence byly porovnány s databází pomocí algoritmu BLAST a nalezené kontaminace byly vymazány. Následně byly sekvence zkontrolovány v programu Geneious (<https://www.geneious.com/>; Kearsse et al. 2012). Geneious je program poskytující nástroje pro analýzu sekvencí DNA a RNA, molekulární klonování, fylogenetiku a genomický výzkum. Umožňuje uživatelům importovat a manipulovat se sekvencemi z různých zdrojů a podporuje řadu typů sekvenčních dat, včetně sekvencí nukleotidů a aminokyselin, zarovnání a anotací. Předem bylo nutno zkrátit začátky a konce sekvencí na stejnou délku a vyřadit příliš krátké sekvence. Poté byly sekvence zarovnány metodou CLUSTAL-W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). CLUSTAL-W je program pro vícenásobné zarovnávání sekvencí DNA a proteinů. Vytváří také matici vzdáleností a konstruuje vícenásobné zarovnání (Thompson et al. 2003). K sekvencím získaným v rámci tohoto projektu byly přidány sekvence českých vzorků z databáze BOLD. Za účelem zjištění kmenů bakterie *Wolbachia* byly sekvence porovnány s databází PubMLST.

#### 4.6 Statistické vyhodnocení

Spojené sekvence získané z databáze a nově osekvenované v tomto projektu prošly analýzou BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure; Cheng et al. 2013). BAPS je metoda rozřazující sekvence do klastrů dle příbuznosti bez znalosti geografického původu vzorků. Analýza proběhla pro každý druh zvlášť. Přiřazení do klastrů se vypočítalo pomocí skriptu rhierBAPS (<https://github.com/gtonkinhill/rhierbaps>; Tonkin-Hill et al. 2018) v programu R verze 3.6.0 (R Core Team 2019). Každý z klastrů byl zobrazen pomocí různých barev na mapě Evropy. Vytvořilo se 140 map odpovídajících 140 druhům. Na základě těchto map se ke každému druhu přiřadila kategorie linie přítomné v České republice (nebo dvě kategorie, pokud byly přítomny konkrétní line). Tyto kategorie byly: (1) nízká diverzita: pouze jeden klast BAPS v celém druhu; (2) evropská linie: linie široce rozšířená po celé Evropě byla přítomna v ČR, zároveň se někde v Evropě vyskytovala/y i další linie; (3) mix evropských linií přítomných v ČR; (4) západní linie: vzorky z ČR jsou příbuzné se vzorky ze západní Evropy; (5) příbuznost s Apeninským/Balkánským poloostrovem; (6) příbuznost Balkán/východ: vzorky z ČR jsou příbuzné vzorkům z Balkánu nebo Balkánu plus východní Evropa/Asie; (7) středoevropská linie: středoevropské hory nebo Panonská nížina vytvořily samostatnou linii, do které patří vzorky z ČR; (8) temperátně-kontinentální linie: vzorky z ČR jsou příbuzné vzorkům obývajícím podobný zeměpisný pás a linie není přítomna ve Středomoří; (9) směs východních linií.

Dále byly vytvořeny haplotypové sítě. Pro tvorbu haplotypových sítí byl použit program POPArt verze 1.7 (<https://popart.maths.otago.ac.nz/>; Leigh & Bryant 2015). Ten popisuje populační struktury organismů a zkoumá fylogeografické historie týkající se jejich diverzity. Dalo by se říct, že jde o fylogenetické stromy mezi populacemi. Sítě byly hodnoceny na základě polohy haplotypů nalezených v ČR a haplotypů od nich vzdálených s maximálně dvěma mutacemi. Sítě byly rozděleny do následujících kategorií: (1) nízká diverzita nebo expanze v celém areálu; (2) nízká diverzita v rámci rozšířené linie (v síti existuje ještě i jiná, divergentní linie); (3) součást expandující rozšířené linie (existuje jiná, divergentní linie); (4) součást stabilní rozšířené linie (vykazuje buď stabilní síť s několika spojeními a rovnoměrnými sekvencemi v haplotypech, nebo kombinaci stabilní sítě a expanze); (5) středoevropská linie; (6) příbuznost Balkán/východ; (7) kontinentálně-temperátní linie; (8) příbuznost se západem; (9) příbuznost s Apeninským/Balkánským poloostrovem a (10) mix haplotypů (přítomno více českých haplotypů vzdálenějších než 2 mutace).

Poté byla sestavena databáze znaků pro každý druh: (1) vztah k biotopu, kde byly druhy zařazeny do devíti kategorií: ubikvistní (všudypřítomný), mezofilní-1 (luční druh), mezofilní-2 (keřový), mezofilní-3 (lesní), xerothermofilní-1 (stepní), xerothermofilní-2 (suchý keřový), hydrofilní (mokřadní), tyrfofilní (slatinný/rašelinový) a vysokohorský (na základě Macek et al. 2015); (2) funkční vlastnosti: délka předních křídel, forma živné rostliny = appearance (vzhled hostitelské/živné rostliny; řazeno 1–4; od malých rostlin až po stromy), plodnost (počet vajíček na samici při vylíhnutí; řazeno na stupnici 1–9), pohyblivost (řazeno na stupnici 1–9; od extrémně sedavého po extrémně pohyblivý), hustota (počet jedinců na jednotku plochy; řazeno na stupnici 1–9; od řídké až po hustou), délka doby letu (počet měsíců letu dospělců bez měsíců hibernace), voltinismus (počet mláďat nebo generací za rok), stádium přezimování (ukazatel rychlosti vývoje; řazeno na stupnici 1–5; od vajíčka po migrujícího dospělého jedince) a potravní index (váží počet rostlinných čeledí a rodů živných rostlin) (Bartoňová et al. 2016); a (3) stupeň ohrožení, který byl vytvořen na základě Červeného seznamu ČR (1 - neohrožený (Non), 2 - téměř ohrožený (NT), 3 - zranitelný (VU), 4 - ohrožený (EN) a 5 - kriticky ohrožený (CR)) (Hejda et al. 2017).

Následovaly analýzy v programu Canoco5 (<http://www.canoco5.com/>). Canoco5 je statistický program, který pracuje převážně s ordináčními analýzami. Používá různé typy dat, například data o přítomnosti/absenci nebo početnosti, a také různé typy environmentálních proměnných, například spojité, kategoriální nebo smíšené proměnné (Šmilauer & Lepš 2014). Mezi hlavní funkce programu patří analýzy hlavních komponent (PCA), korespondenční analýzy (CA), analýzy nadbytečnosti (RDA), regresní analýza, včetně lineární regrese, parciální korelace a kanonické korelační analýzy (CCA), a grafické a vizualizační nástroje, včetně biplotů, ordináčních diagramů a dalších typů grafů. V programu Canoco5 se provedly dvě sady kanonických korelačních analýz (CCA), přičemž se jako vysvětlovaná proměnná použily buď kategorie BAPS, nebo kategorie haplotypových sítí, a jako vysvětlující proměnné se použily znaky. Byly provedeny dva testy: (a) globální test, využívající všechny proměnné a (b) postupný interaktivní výběr proměnných s nejvyšší vysvětlenou variabilitou.

Prevalenci bakterie *Wolbachia* jsem vyhodnotil na základě sekvencí WSP v Excelu, kde jsem roztřídil napadené druhy do skupin dle typu nalezeného kmene bakterie a přiřadil ke každému druhu počet testovaných a pozitivních vzorků.

## 5 Výsledky

Dohromady jsem za pomoci spolupracovníků získal 1119 sekvencí od 140 druhů motýlů z celkových 142 druhů žijících na našem území (tj. 98,6 % české fauny; Příloha I.). Průměrně bylo osekvenováno 8 vzorků na druh. Z čeledi Papilionidae jsem získal 29 sekvencí od 4 druhů, z Hesperidae 85 sekvencí od 15 druhů, z Pieridae 147 sekvencí od 16 druhů, z Riodinidae 2 sekvence od 1 druhu, z Lycaenidae 322 sekvencí od 45 druhů a z Nymphalidae 534 sekvencí od 59 druhů. Pro druhy *Zerynthia polyxena*, *Lycaena helle*, *Leptotes pirithous*, *Neptis rivularis*, *Boloria aquilonaris* a *Hipparchia hermione* jsem získal pouze 1 sekvenci. Nejvíce sekvencí bylo získáno od druhů *Colias palaeno* (43), *Melitaea britomartis* (41) a *Maniola jurtina* (83). Chybějící druhy jsou *Melitaea phoebe* Denis a Schiffermüller 1775 (hnědásek diviznový) a *Hyponephele lycaon* Kühn 1774 (okáč šedohnědý; tento druh je však už několik let neznámý).

Získané sekvence byly doplněny o sekvence z databáze BOLD. Z databázi bylo použito 21 370 sekvencí (152,6 vzorku na druh). Nejvíce sekvencí měli *Polyommatus icarus* (621) a *Pieris rapae* (870). Celkový dataset tedy obsahoval 22 489 sekvencí s průměrně 160,6 vzorky na druh. Po rozšíření datasetu o sekvence z databázi obsahovala čeleď Papilionidae průměrně 149,5 sekvencí na druh, Hesperidae 183,8 sekvencí na druh, Pieridae 234,8 sekvencí na druh, Lycaenidae 142,3 sekvencí na druh, Nymphalidae 151,2 sekvencí na druh a 49 sekvencí pro 1 druh čeledi Riodinidae.

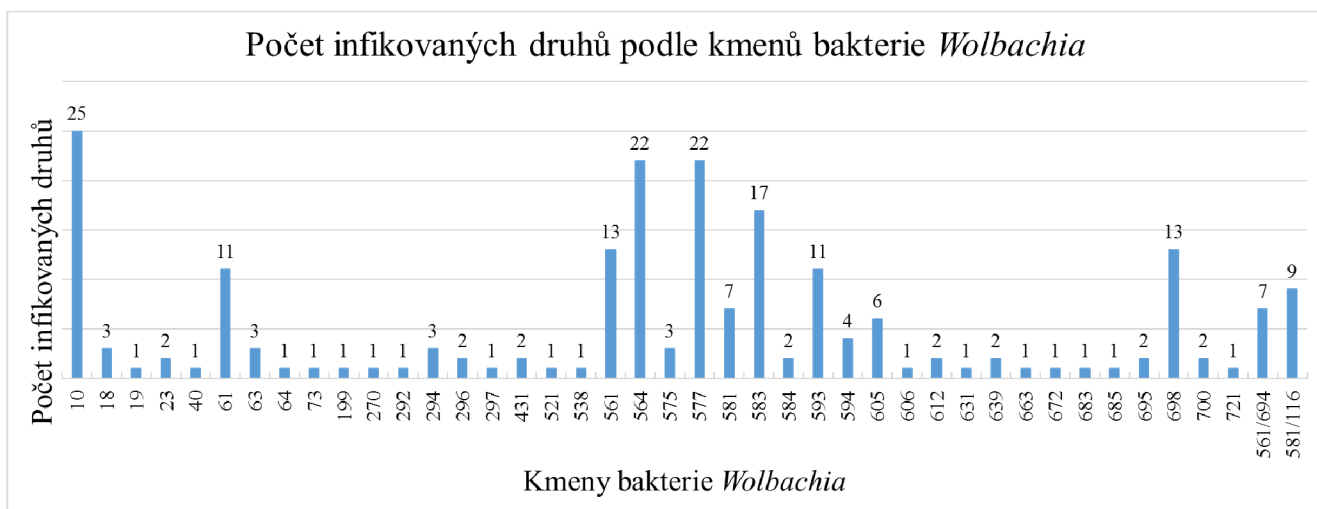
### 5.1 Prevalence bakterie *Wolbachia*

Na přítomnost bakterie *Wolbachia* bylo testováno 997 vzorků od 133 druhů s průměrně 7,5 vzorku na druh (výčet testovaných druhů s počtem testovaných a pozitivních vzorků, včetně specifických kmenů bakterií obsahuje Příloha II). Netestované druhy byly *Agriades optilete*, *Colias palaeno*, *Euphydryas aurinia*, *Hipparchia semele*, *Hyponephele Lycaon*, *Lycaena helle*, *Melitaea phoebe*, *Pieris bryoniae*, *Satyrrium spini* a *Brenthis hecate*. Tento dataset obsahoval navíc vymřelý druh *Colias myrmidone*. Pozitivní nález infekce byl u 401 vzorků (40,2 % studovaných vzorků). U 25 druhů nebyl nalezen žádný pozitivní vzorek (např.: *Chazara briseis* s 16 testovanými vzorky nebo *Coenonympha glycerion* s 10 vzorky). Mezi 108 pozitivními druhy byla pozorována nízká prevalence u *Arethusana arethusana* (1 pozitivní vzorek z 18), *Lycaena dispar* (1 z 10), *Maniola jurtina* (1 z 19), *Melitaea aurelia* (3 z 27), *Parnassius mnemosyne* (4 z 27) a u *Polyommatus icarus* (2 z 21). Vyšší počet infikovaných vzorků byl u *Aricia artaxerxes* (12 pozitivních z 13 testovaných), *Coenonympha tullia* (14 z 25) a *Plebejus argyrognomon* (10 z 23). Stoprocentní prevalence pozorována u 22 druhů, například: *Colias alfacariensis* (8 pozitivních vzorků z 8), *Colias hyale* (8 z 8), *Lycaena tityrus* (7 z 7), *Minois dryas* (9 z 9), *Pararge aegeria* (9 z 9), *Phengaris arion* (7 z 7) a *Satyrrium acaciae* (9 z 9).

Počet infikovaných druhů podle kmenu bakterie *Wolbachia* zobrazuje Graf 1. Celkem bylo nalezeno 42 různých kmenů bakterie *Wolbachia* (ve skutečnosti 40 protože kmény 561 a 561/694 a 581 a 581/116 jsou ty samé. V databázi byly pravděpodobně pojmenované dvakrát). Většina kmenů (27) nalezena pouze u 1-3 druhů (67,5 % kmenů) - 17 kmenů (42,5 %)



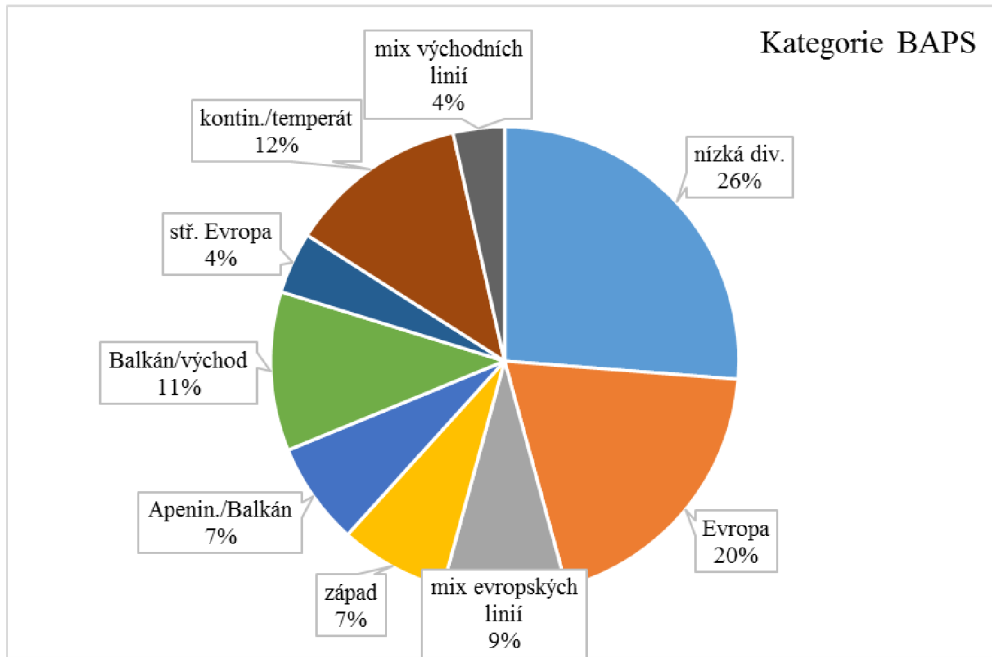
infikovalo pouze jeden druh. Osm kmenů infikovalo 2 druhy, čtyři kmeny 3 druhy, jeden 4 a jeden 6. Kmen 10 byl nalezen u 25 druhů. Kmen 61 u 11 druhů. Kmen 561 (+561/694) u 20 druhů. Kmen 564 u 22 druhů. Kmen 577 u 22 druhů. Kmen 581 (+581/116) u 16 druhů. Kmen 583 u 17 druhů. Kmen 593 u 11 druhů. Kmen 698 u 13 druhů. Přehled konkrétních druhů motýlů ke každému kmenu bakterie *Wolbachia* obsahuje Příloha III.



Graf 1. Celkový přehled počtu infikovaných druhů ke každému z nalezených kmenů bakterie *Wolbachia*.

## 5.2 Rozšíření linií po Evropě (BAPS kategorie)

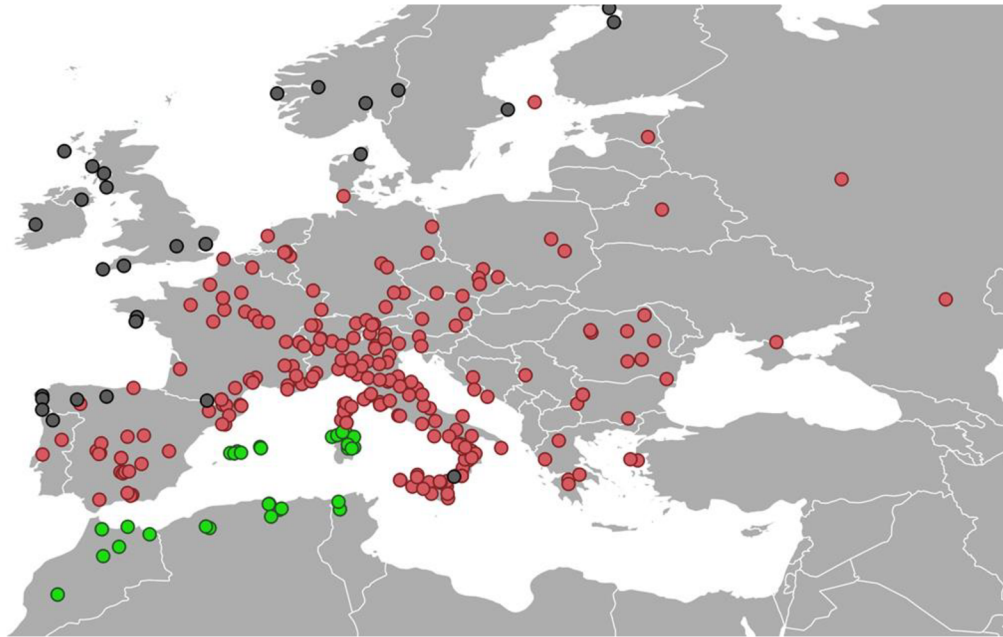
Na základě vytvořených klastrů (a následně map) analýzou BAPS se všechny druhy rozdělily do 9 kategorií linií přítomné v České republice (nebo dvou kategorií, pokud byly přítomny konkrétní line; Graf 2). Do kategorie (1) nízká diverzita (pouze jeden klaster v celém druhu) bylo zařazeno 37 druhů, např.: *Erynnis tages* (Obr. 1). Do kategorie (2) evropské linie (linie široce rozšířené po Evropě včetně ČR) bylo zařazeno 30 druhů (z toho 7 u kterých byla nalezená i další linie), např.: *Coenonympha pamphilus* (Obr. 2). Kategorie (3) mix evropských linií přítomných v ČR zahrnuje 12 druhů, např.: *Pieris napi* (Obr. 3). Do kategorie (4) západní linie (vzorky z ČR jsou příbuzné se vzorky ze západní Evropy) zahrnuto 11 druhů (z toho 1 u kterého byla nalezena další linie), např.: *Coenonympha arcania* (Obr. 4). Dalších 14 druhů mělo linie příbuzné s Apeninami/Balkánem – kategorie (5), např.: *Hesperia comma* (Obr. 5). Do kategorie (6) příbuznost Balkán/východ (vzorky z ČR jsou příbuzné vzorkům z Balkánu nebo Balkánu + východní Evropa/Asie) zařazeno 17 druhů (z toho 3 s další linií), např.: *Polyommatus daphnis* (Obr. 6). Do kategorie (7) středoevropská linie bylo zařazeno 8 druhů (z toho 4 s další linií), např.: *Argynnis aglaja* (Obr. 7). Do kategorie (8) temperátně-kontinentální linie (vzorky z ČR jsou příbuzné vzorkům obývajícím podobný zeměpisný pás a linie není přítomna ve Středomoří) bylo zahrnuto 21 druhů (z toho 7 s další linií), např.: *Glaucopsyche alexis* (Obr. 8). Do poslední kategorie (9) směs východních linií bylo zahrnuto 5 druhů (1 s další linií), např.: *Maniola jurtina* (Obr. 9). Výčet všech druhů v jednotlivých kategoriích obsahuje Příloha IV.



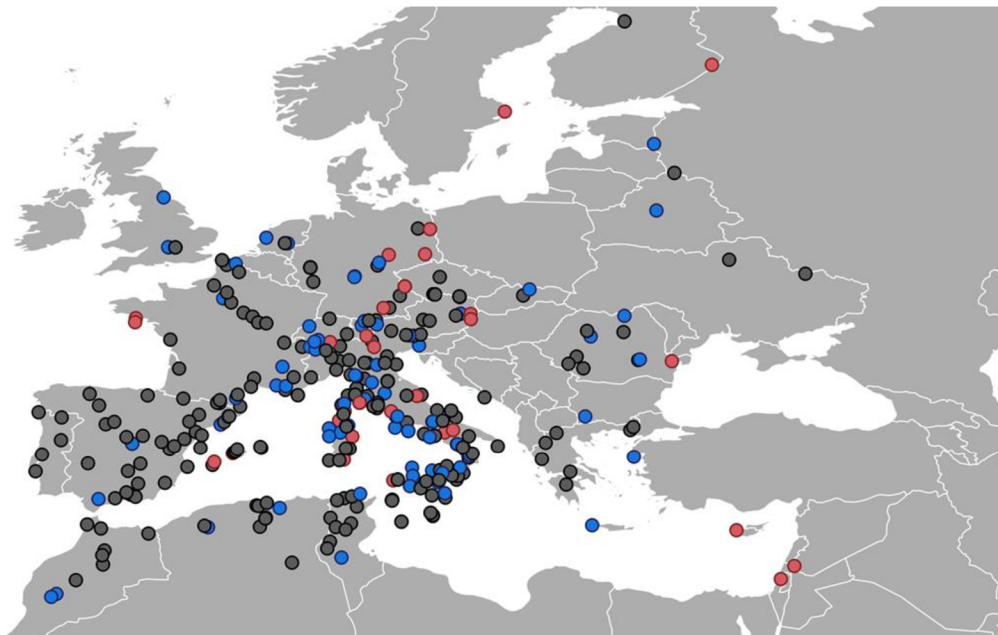
Graf 2. Poměr druhů rozdělených do devíti kategorií linií přítomných v České republice.



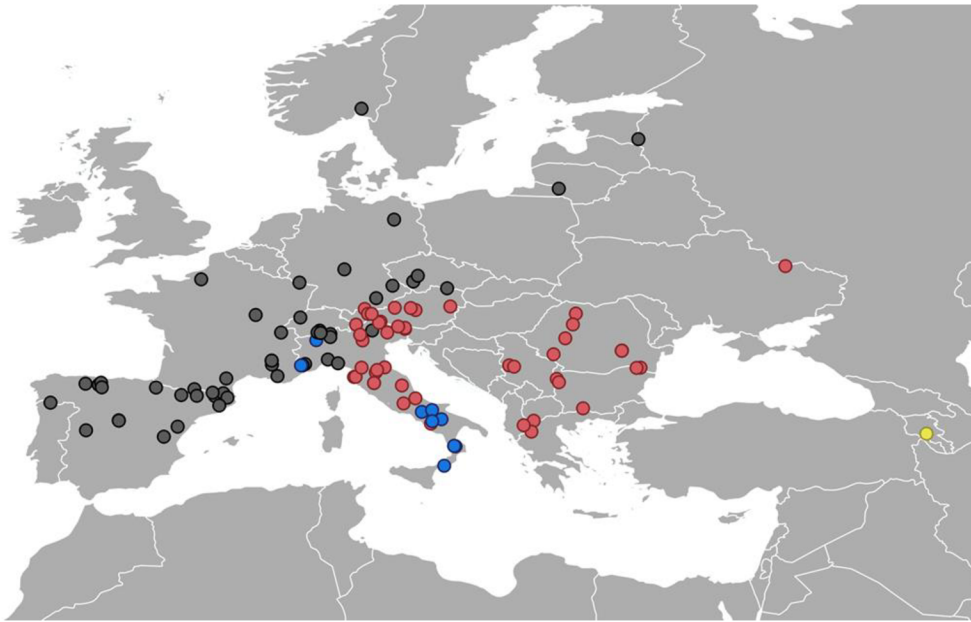
Obr. 1. Mapa klastru druhu *Erynnis tages* na mapě Evropy. Kategorie (1) nízká diverzita.



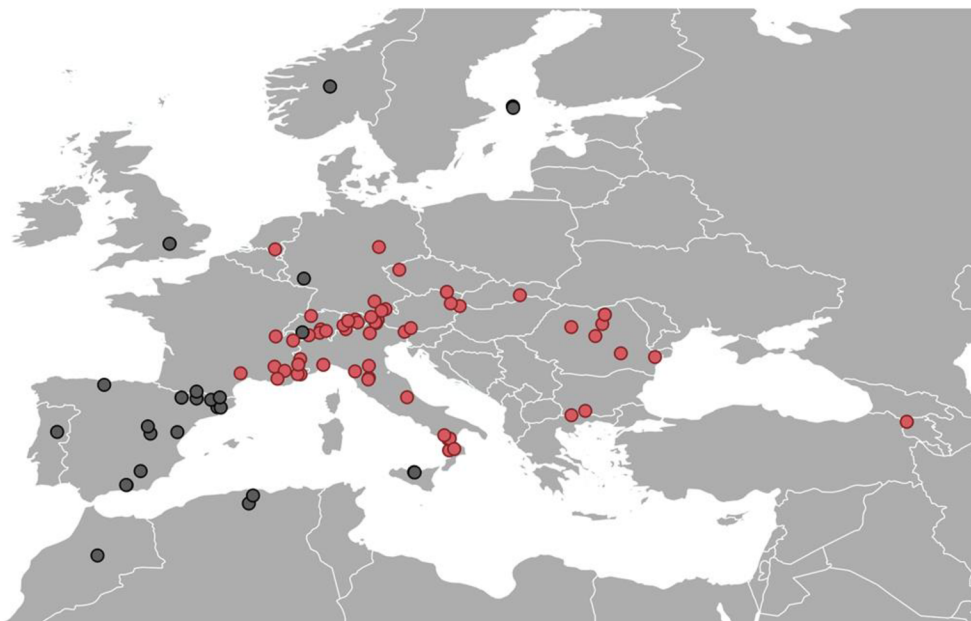
Obr. 2. Mapa klastrů pro *Coenonympha pamphilus*. Kategorie (2) evropské linie široce rozšířené po Evropě včetně ČR.



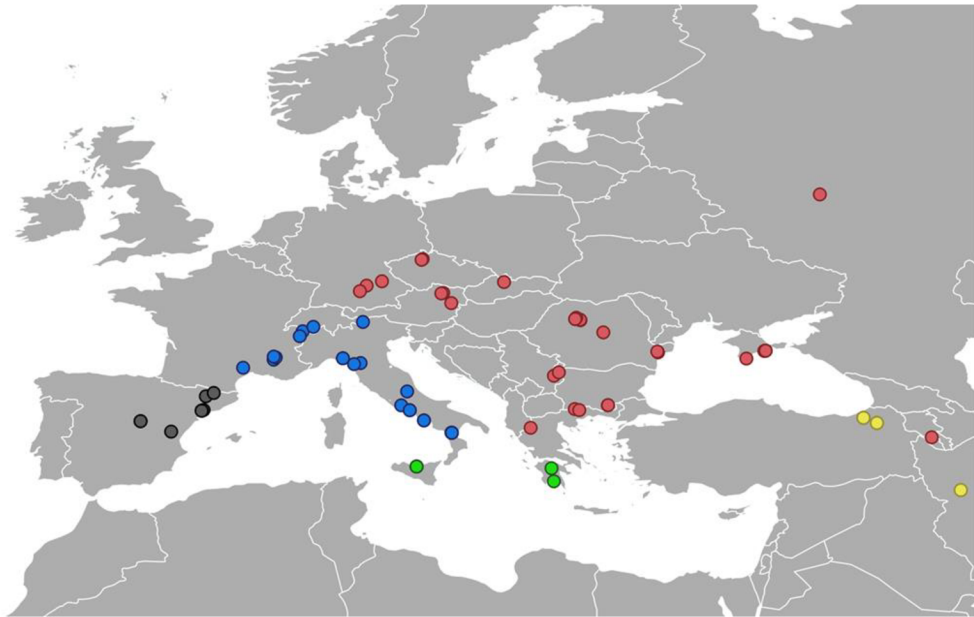
Obr. 3. Mapa klastrů pro *Pieris napi*. Kategorie (3) mix evropských linií přítomných v ČR.



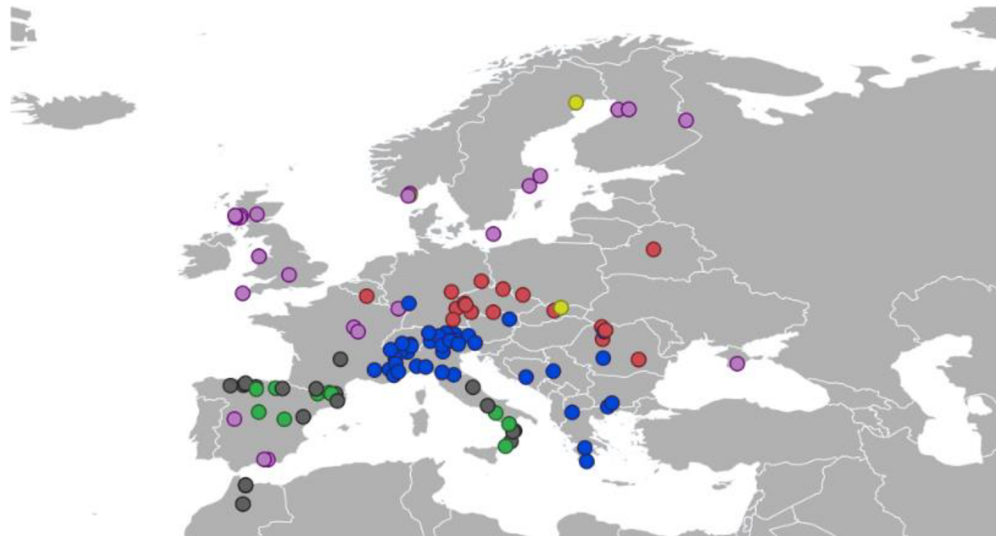
Obr. 4. Mapa klastrů pro *Coenonympha arcania*. Kategorie (4) západní linie (vzorky z ČR jsou příbuzné se vzorky ze západní Evropy).



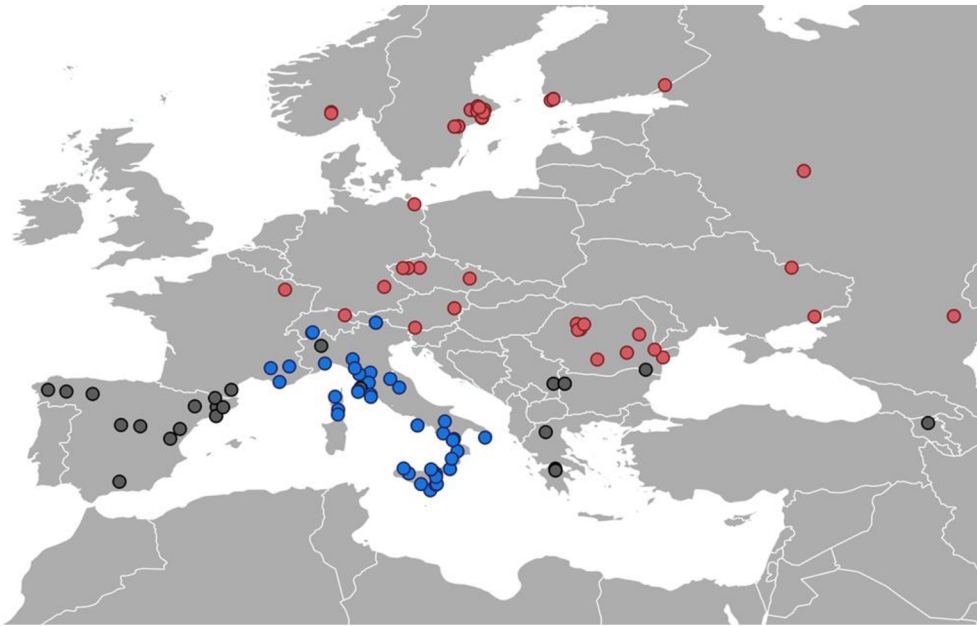
Obr. 5. Mapa klastrů pro *Hesperia comma*. Kategorie (5) linie příbuzné s Apeninami/Balkánem.



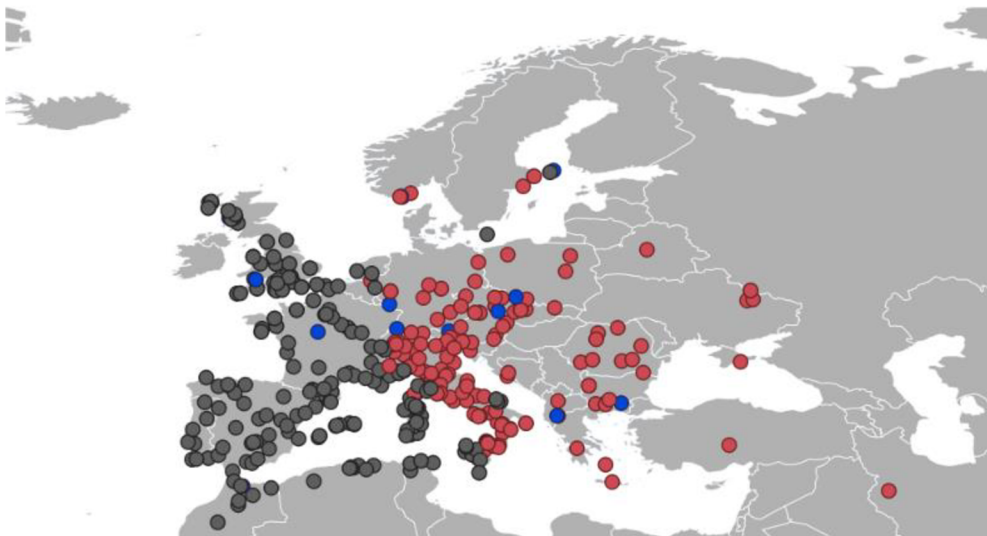
Obr. 6. Mapa klastrů pro *Polyommatus daphnis*. Kategorie (6) příbuznost Balkán/východ (vzorky z ČR jsou příbuzné vzorkům z Balkánu nebo Balkánu + východní Evropa/Asie).



Obr. 7. Mapa klastrů pro *Argynnis aglaja*. Kategorie (7) středoevropská linie.



Obr. 8. Mapa klastrů pro *Glaucopsyche alexis*. Kategorie (8) temperátně-kontinentální linie (vzorky z ČR jsou příbuzné vzorkům obývajícím podobný zeměpisný pás a linie není přítomna ve Středomoří).



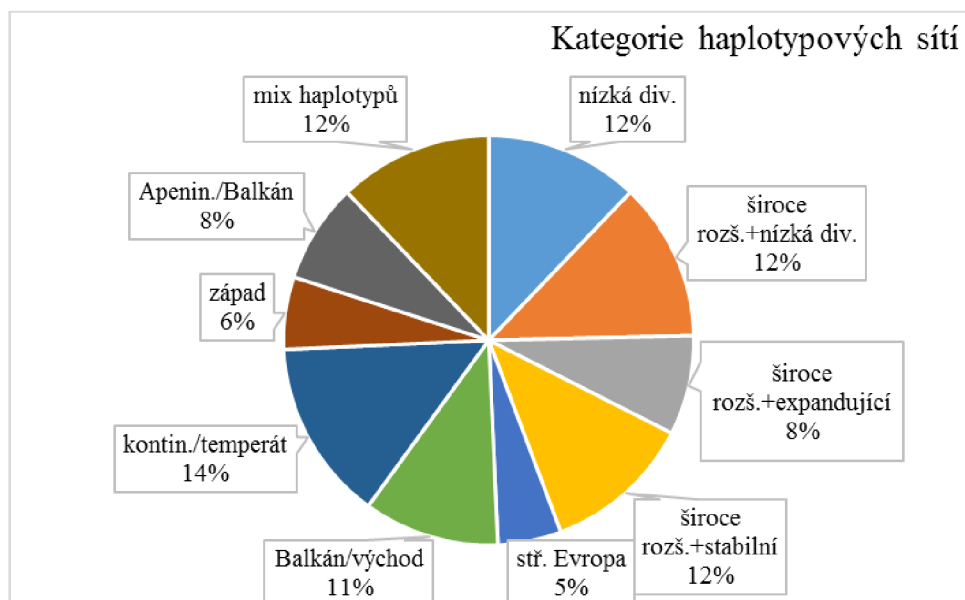
Obr. 9. Mapa klastrů pro *Maniola jurtina*. Kategorie (9) směs východních.

### 5.3 Kategorie vzniklé na základě haplotypových sítí

Všech 140 druhů bylo rozděleno do 10 kategorií (některé druhy byly zařazeny do dvou kategorií, Graf 3) na základě polohy haplotypů nalezených v ČR a haplotypů od nich vzdálených s maximálně dvěma mutacemi. Do kategorie (1) nízká diverzita nebo expanze bylo zařazeno 17 druhů. Do kategorie (2) nízká diverzita v rámci rozšířené linie 19 druhů (3 s další kategorií). Do kategorie (3) součást expandující rozšířené linie 11 druhů. Do kategorie



(4) součást stabilní rozšířené linie 17 druhů (1 s další kategorií). Do kategorie (5) střeoevropská linie 8 druhů (2 s další kategorií). Do kategorie (6) příbuznost Balkán/východ 15 druhů (2 s další kategorií). Do kategorie (7) mírně kontinentální linie 22 druhů (4 s další kategorií). Do kategorie (8) příbuznost se západem 9 druhů (2 s další kategorií). Do kategorie (9) příbuznost Apeniny/Balkán 13 druhů (4 s další kategorií). A do kategorie (10) mix haplotypů 17 druhů. Výčet všech druhů v jednotlivých kategoriích obsahuje Příloha V.

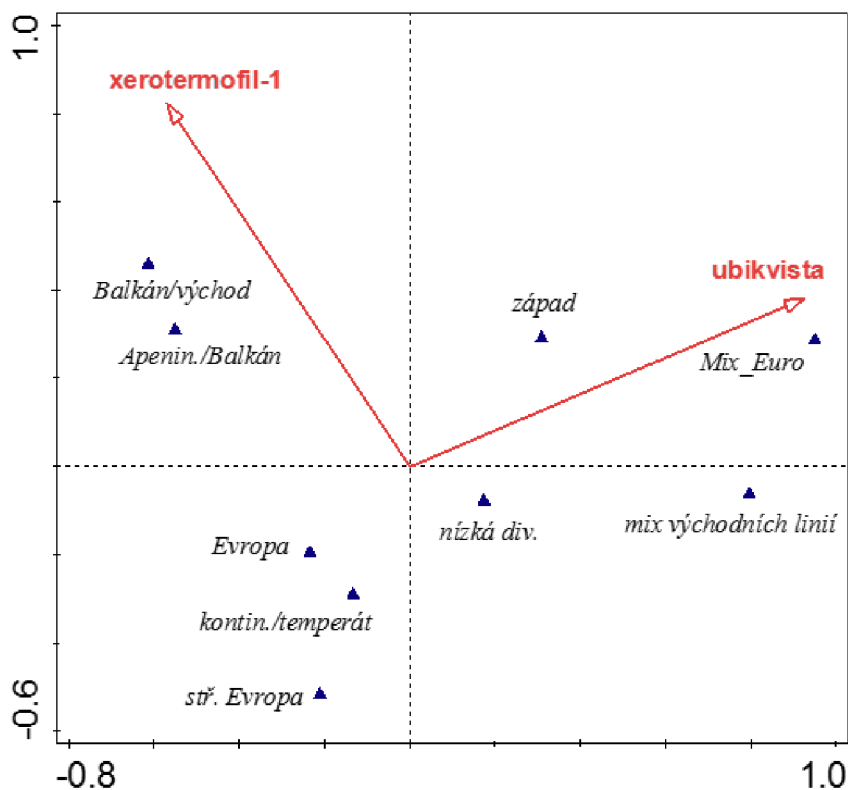


Graf 3. Poměr druhů rozdělených do 10 kategorií na základě haplotypových sítí.

## 5.4 Analýzy pomocí programu Canoco5

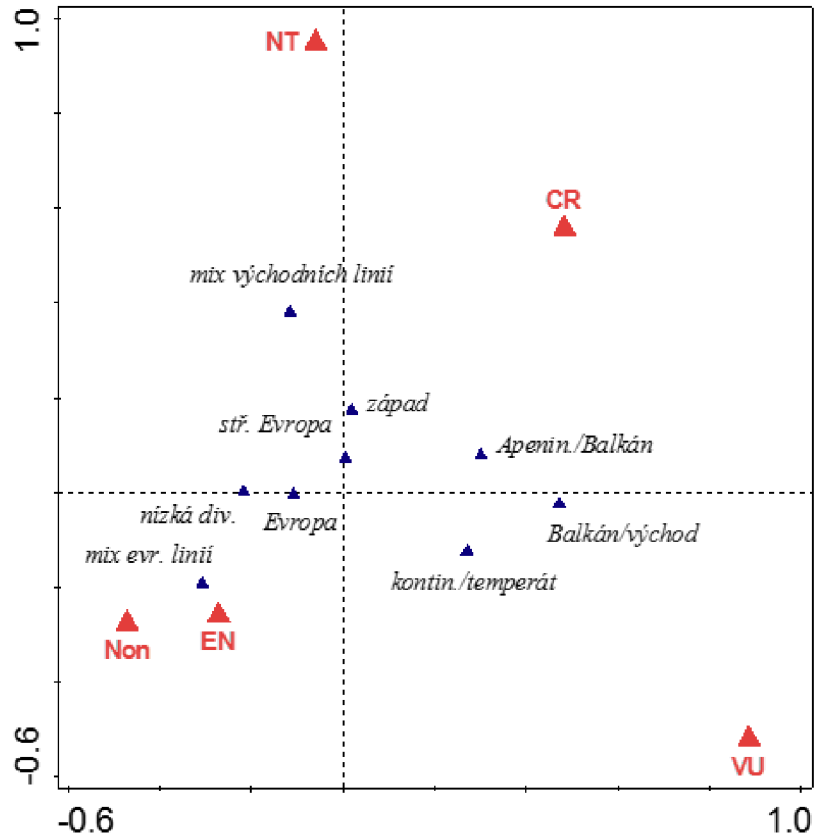
Užitím přímých ordinačních analýz CCA jsem zjišťoval závislost mezi kategoriemi BAPS / haplotypových sítí a znaky (biotopy, funkční vlastnosti a stupeň ohrožení). Závislost mezi vysvětlovanými **kategoriemi BAPS** a vysvětlujícími proměnnými znaky – **biotopy** (ubikvistní, mezofilní-1, mezofilní-2, mezofilní-3, xerothermofilní-1, xerothermofilní-2, hydrofilní, tyrfofilní a vysokohorský) byla při analýze všech proměnných průkazná (pseudo-F = 1,5; P = 0,012). Vysvětlená variabilita 9,5 %. Interaktivním výběrem (analýza vybrala pouze ty proměnné, které vysvětlí nejvíce variability) byly zvoleny za proměnné vysvětlující nejvíce variability ubikvistita (pseudo-F = 3,7; P = 0,001) a xerothermofil-1 (pseudo-F = 1,9; P = 0,056 - marginálně signifikantní), Obr. 10. Vysvětlená variabilita 4,0 %. Závislost mezi **kategoriemi BAPS** a proměnného znaku **ohrožení** byla signifikantní (pseudo-F = 1,7; P = 0,013), Obr. 11. Vysvětlená variabilita 4,7 %. Následovalo vysvětlování **kategorií BAPS** za pomoci funkčních vlastností (**traitů**). Vysvětlená variabilita 8,8 %; pseudo-F = 1,4; P = 0,02. Všechny znaky dohromady byly signifikantní. Interaktivním výběrem byly vybrány délka doby letu, aparence a rozpětí předních křídel za znaky s nejvyšší vysvětlující variabilitou (Obr. 12). Vysvětlená variabilita 4,5 % a nalezená závislost mezi vybranými znaky a kategorií BAPS (délka doby letu pseudo-F = 2,4; P = 0,021; rozpětí předních křídel pseudo-F = 2,1; P = 0,031 a aparence pseudo-F = 1,9; P = 0,052 - marginálně signifikantní).

Další vysvětlovanou kategorií jsou **haplotypové sítě** pomocí vysvětlujících proměnných znaků (**biotopů**). Testováním všech proměnných znaků biotopů se vysvětlilo 7,7 % variability, avšak test vyšel nesignifikantní – bez závislosti (pseudo-F = 1,2; P = 0,105). Interaktivní postupná selekce CCA ukázala, že nejvíce variability vysvětlily ubikvista, mezofil-3 a tyrfofil (Obr. 13). Tato analýza vysvětlila 4,5 % variability a prokázala závislost mezi zmíněnými biotopem a kategorií haplotypových sítí – ubikvista pseudo-F = 2,6; P = 0,009, mezofil-3 pseudo-F = 2; P = 0,03 a tyrfofil pseudo-F = 1,8; P = 0,066 (marginálně signifikantní). Dále se vysvětlovaly kategorie **haplotypových sítí** pomocí **ohrožení** (kategorie Červeného seznamu ČR), Obr. 14. Vysvětlená variabilita 4,5 % a byla zde nalezená závislost mezi stupněm ohrožení a kategorií haplotypové sítě (pseudo-F = 1,6; P=0,014). Vysvětlovaná kategorie **haplotypových sítí** pomocí funkčních vlastností (**traitů**). Při testování všech znaků vyšla sice průkazně (pseudo-F = 1,5; P = 0,005, vysvětlená variabilita 9,3 %.), ale protože mají funkční vlastnosti různé rozměry (nedoplňují se navzájem), tak byl také proveden postupný výběr. Interaktivní postupný výběr ukázal, že nejvíce variability prokazují aparence (forma živné rostliny) a délka doby letu (Obr. 15). Vysvětlená variabilita byla 3,4 % a byla prokázána závislost (aparence pseudo-F = 2,7; P = 0,004 a délka doby letu pseudo-F = 2,1; P = 0,021).

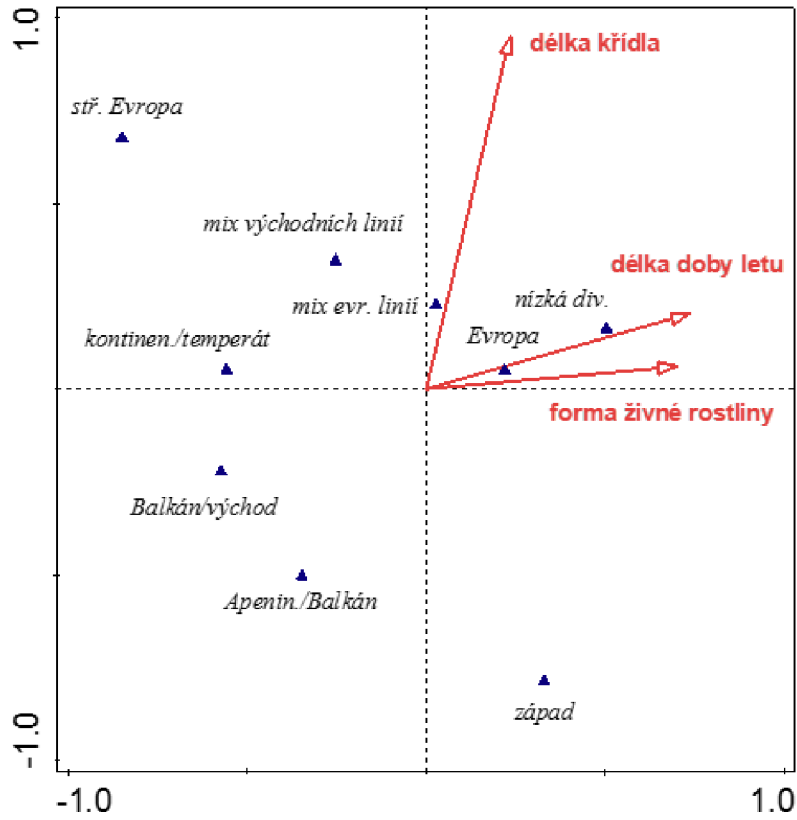


Obr. 10. Výsledky interaktivního výběru přímé korespondenční analýzy (CCA) mezi kategoriemi BAPS a biotopy (ubikvista a xerotermofil-1). První osa od sebe oddělila linie, které obsahovaly druhy přítomné na všech biotopech (ubikvista) (v kladných hodnotách) od linií se stepními druhy (xerotermofil-1) (v záporných hodnotách). Druhá osa pak oddělila všudy přítomné a stepní linie od těch opačných vlastností.

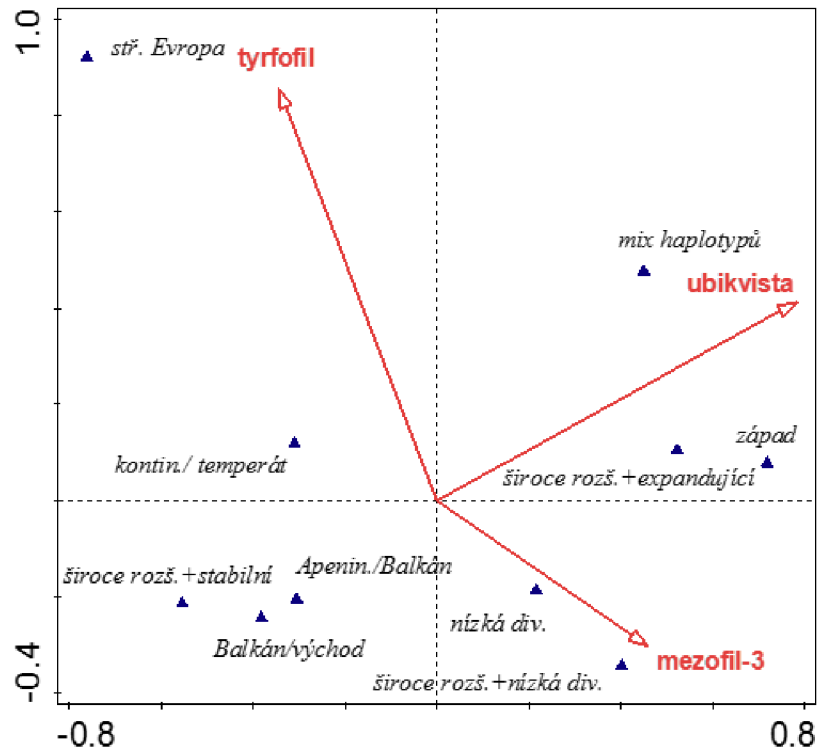




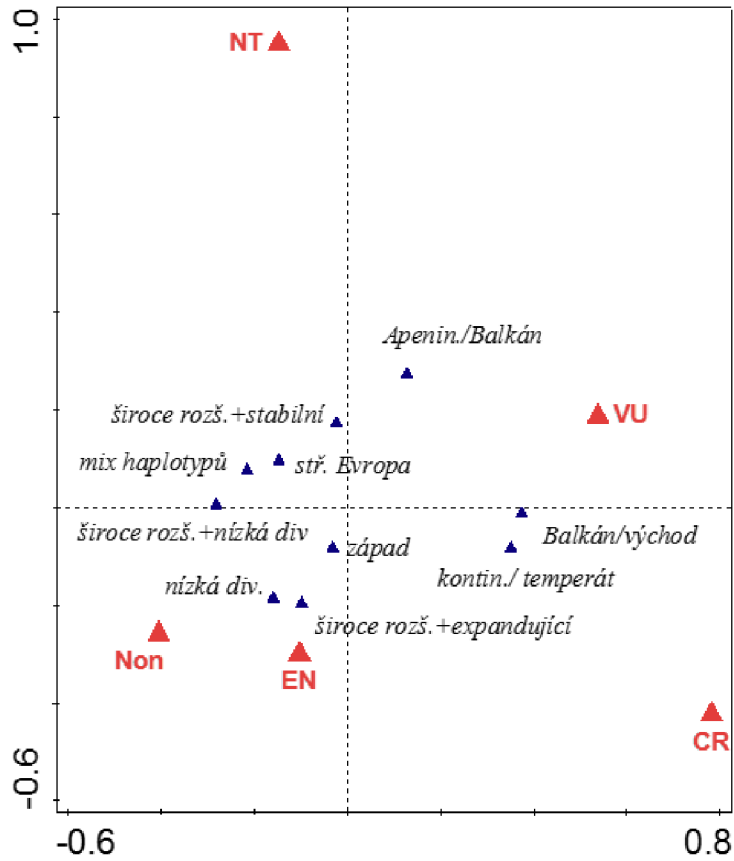
Obr. 11. Výsledky přímé korespondenční analýzy (CCA) mezi kategoriemi BAPS a proměnného znaku ohrožení (kategorie redlistu). První osa od sebe oddělila linie druhů se statusem ohrožení buď neohrožený (Non), ohrožený (EN) nebo téměř ohrožený (NT) a linie druhů se statusem zranitelný (VU) nebo kriticky ohrožený (CR).



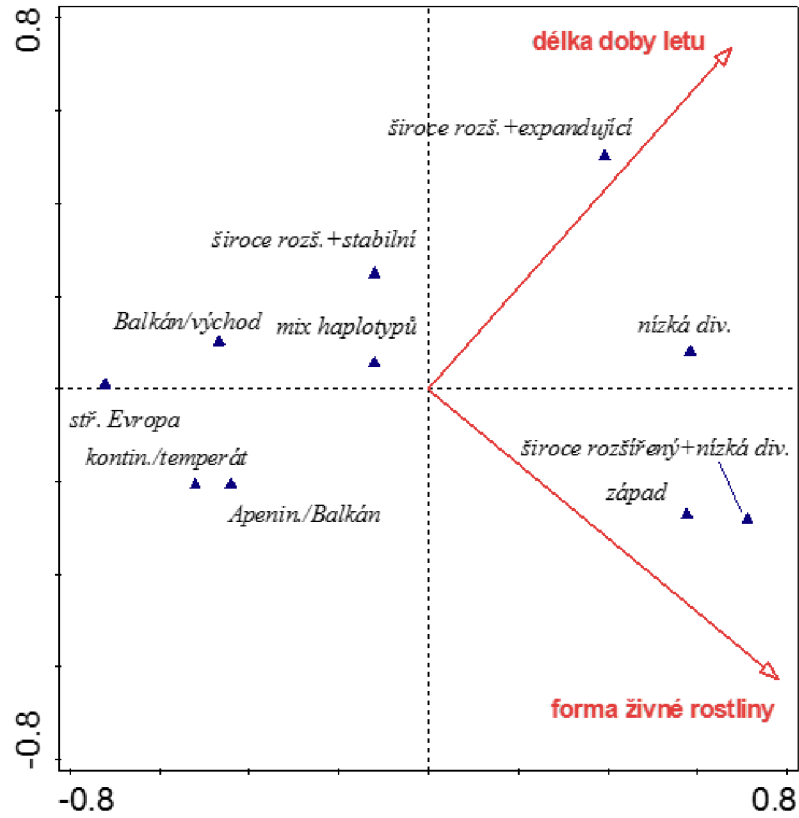
Obr. 12. Výsledky interaktivního výběru přímé korespondenční analýzy (CCA) mezi kategoriemi BAPS a funkčními vlastnostmi (délka křídla, délka doby letu a forma živné rostliny). První osa oddělila linie, které obsahují druhy s delší dobou letu, vyšší formou živné rostliny a větší (s delšími křídly) od linií obsahující druhy opačných vlastností. Druhá osa pak oddělila především linie s většími druhy od těch s menšími.



Obr. 13. Výsledky interaktivního výběru přímé korespondenční analýzy (CCA) mezi kategoriemi haplotypových sítí a biotopy (ubikvista, tyrfofil a mezofil-3). První osa od sebe oddělila linie, které obsahovaly druhy přítomné na všech biotopech (ubikvista) nebo lesní druhy (mezofil-3) v kladných hodnotách, a linie opačných vlastností v záporných hodnotách. Druhá osa oddělila především rašeliništní linie (tyrfofil) od všech ostatních.



Obr. 14. Výsledky přímé korespondenční analýzy (CCA) mezi kategoriemi haplotypových sítí a proměnného znaku ohrožení (kategorie redlistu). První osa od sebe oddělila linie druhů se statusem ohrožení buď neohrožený (Non), ohrožený (EN) a téměř ohrožený (NT) (v záporných hodnotách) a linie druhů se statusem kriticky ohrožený (CR) a zranitelný (VU) (v kladných hodnotách).



Obr. 15. Výsledky interaktivního výběru přímé korespondenční analýzy (CCA) mezi haplotypovými sítěmi a funkčními vlastnostmi (délka doby letu a forma živné rostliny). První osa od sebe oddělila linie, které obsahovaly druhy s delší dobou letu nebo druhy s vyšší formou živné rostliny (keře, stromy) v kladných hodnotách, a linie opačných vlastností v záporných hodnotách.

## 6 Diskuze

Tato práce byla zaměřena na doplnění datasetu barcodů motýlů České republiky (osekvenováním části jejich mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu) a vyhodnocení vnitrodruhových vzorců mitochondriální genetické diverzity v Evropě. Dále byla testována závislost mezi původy českých vzorků a vzorci biotopových nároků, funkčních vlastností a ohroženosti motýlů. Dále se vyhodnocovala prevalence bakteriemi *Wolbachia*.

### 6.1 Vzorky a sekvence

Až na dva druhy motýlů byly získány vzorky od všech druhů žijící na našem území (140 z 142 druhů). Takto vysoká hodnota je dostačující pro přehlednější studie, avšak pro dosažení kompletního datasetu by bylo třeba ještě doplnit o chybějící druhy. Mezi chybějící druhy patří *Melitaea phoebe* a *Hyponephele lycaon*. Bohužel *Melitaea phoebe* je velmi vzácně se vyskytující druh a *Hyponephele lycaon* je považován za vyhynulý druh na našem území (zatím ale nebyl oficiálně zařazen mezi vyhynulé druhy), takže sehnat vzorky bylo obtížné.

### 6.2 Prevalence bakterie *Wolbachia*

Potvrzují hypotézu 2. Promořenost bakterií *Wolbachia* je v ČR vysoká, bakterie se vyskytuje u velké části druhů a testovaných vzorků. Bakterií *Wolbachia* bylo nakaženo 108 druhů z 133 testovaných druhů (81,2 %). Nebylo testováno 10 druhů (dataset obsahoval navíc vymřelý druh *Colias myrmidone*). Pozitivní nález infekce byl u 401 vzorků (40,2 % studovaných vzorků). Dle dalších studií zaměřených na prevalenci bakterií *Wolbachia* to považují za obvyklé až velké procento prevalence. Studie Ahmed et al. (2015) prokázala infekci u 43 % vzorků. Studie z Panamy (Werren et al. 1995) měla infikováno 16,2 % vzorků, studie z Velké Británie 35,2 % (West et al. 1998), studie z USA 14,3 % (Werren & Windsor 2000), studie z Ugandy 17 % (Jiggins et al. 2001), studie z Japonska 45 % (Tagami & Miura 2004), studie ze západní Evropy 43 % (Duron et al. 2008) a studie z Indie 52 % (Salunke et al. 2012). Tyto výsledky také potvrzují odhady Ahmed et al. (2015) že přibližně 80 % druhů a čtvrtina až třetina jedinců je infikována bakterií *Wolbachia*.

U těchto 25 druhů nebyl nalezený žádný pozitivní vzorek: *Apatura ilia*, *Aporia crataegi*, *Argynnis adippe*, *Argynnis niobe*, *Aricia eumedon*, *Boloria eunomia*, *Boloria euphrosyne*, *Boloria selene*, *Brenthis daphne*, *Brintesia circe*, *Coenonympha glycerion*, *Erebia sudetica*, *Glaucopsyche alexis*, *Chazara briseis*, *Lasiommata megera*, *Leptotes pirithous*, *Limenitis camilla*, *Lycaena alciphron*, *Lycaena hippothoe*, *Pseudophilotes vicrama*, *Pyrgus armonicanus*, *Pyrgus carthami*, *Thecla betulae*, *Vanessa atalanta* a *Zerynthia Polyxena*. Vztah mezi BAPS kategorií a prevalencí *Wolbachia* nebyl testován, ale okometricky se zde jedná o druhy jak z centrální Evropy, tak ze západu a východu. Taktéž obsaženy jsou ve všech kategoriích haplotypových sítí, takže to vypadá, že původ linií nemá vliv na to, že nebyly infikovány (tyto testy budou předmětem další studie). U další části druhů byla objevena velmi nízká prevalence a u jiné zase vysoká. To může být ovlivněno různými faktory. Jak jsem zmiňoval v rešerši, infekce *Wolbachia* u Lepidoptera se může lišit mezi různými geografickými oblastmi (Werren & Windsor 2000; Ahmed et al. 2015). Také může být vyšší v nižších

zeměpisných šířkách (v teplejším klimatu) - teplota může ovlivnit rychlost replikace a účinnost přenosu (Wiwatanaratanabutr & Kittayapong 2009). V některých případech by mohla být míra infekce vyšší, kvůli zvýšené frekvenci horizontálního přenosu u určitých druhů (Ahmed et al. 2016). Dalším možným faktorem je evoluční historie hostitele a kmene *Wolbachia*. U některých druhů motýlů se mohly vyvinout mechanismy umožňující tolerovat nebo snižovat infekci. Míru infekce by taky mohla ovlivňovat genetická variabilita hostitele nebo konkurence s jiným endosymbiontem (Ahmed et al. 2015). Druhy s velmi vysokou až stoprocentní prevalencí jsou *Aricia artaxerxes*, *Colias alfacariensis*, *Colias hyale*, *Lycaena tityrus*, *Minois dryas*, *Pararge aegeria*, *Phengaris arion* a *Satyrium acaciae* (pouze druhy se 7 a více testovanými vzorky). Se studií Ilinsky a Kosterin (2017) nemohu optimálně porovnat všechny druhy, protože *Colias alfacariensis*, *Lycaena tityrus*, *Pararge aegeria* a *Satyrium acaciae* nebyly obsaženy v jejich datasetu, pro druhy *Aricia artaxerxes* a *Phengaris arion* byly testovány pouze 2 vzorky (všechny infikované) a pro *Colias hyale* nebyly získány kompletní profily MLST kvůli mnohočetné infekci. Jediný druh, který mohu porovnat je *Minois dryas*, který v jejich studii měl také stoprocentní prevalenci (13 vzorků). Jejich dataset obsahoval velmi vysokou (90 % a výš) až stoprocentní prevalenci pro druhy *Carterocephalus silvicola* Meigen 1829 (soumračník severní), *Coenonympha oedippus* Fabricius 1787 (okáč žlutooký), *Ochlodes sylvanus*, *Celastrina argiolus*, *Everes alcetas*, *Cupido argiades*, *Heodes virgaureae*, *Lycaena phlaeas*, *Araschnia levana* a *Argynnis paphia* (druhy s 6 a více testovanými vzorky). Druh *Carterocephalus silvicola* je u nás vyhuben a *Coenonympha oedippus* se u nás nevyskytuje. Ostatní druhy v této studii mají také vysokou prevalenci (70–100 %), ale nízký počet vzorků (3-6).

Většina kmenů (27) byla nalezena pouze u 1-3 druhů, z toho 17 kmenů infikovalo pouze jeden druh. To může být zapříčiněno procesy speciace za přítomnosti genetických bariér mezi populacemi, kdy se určitý kmen bakterie *Wolbachia* vyvíjel společně se svým hostitelem (Bartoňová Sucháčková et al. 2021). Na druhou stranu některé kmene bakterie byly nalezeny u mnoho druhů, např.: kmen 10 byl nalezen u 25 druhů, kmen 561 (+561/694) u 20 druhů, kmen 564 u 22 druhů nebo kmen 577 u 22 druhů. To by mohlo být následkem horizontálního přenosu (sdílení parazitoida, sdílení živné rostliny) (Bartoňová Sucháčková et al. 2021). Nejrozšířenější alela ve studii Ilinsky a Kosterin (2017) byla *wsp-10*, která se vyskytovala u 16 druhů. V této studii byla nejrozšířenější stejná alela, která se vyskytovala u 25 druhů (tzv. kmen 10).

Dále jsem porovnal ostatní výsledky se studií Ilinsky a Kosterin (2017) zaměřenou na studii prevalence bakterií *Wolbachia* u sibiřských druhů motýlů. Celková kolekce zahrnovala 792 exemplářů reprezentujících 120 druhů, ale denních motýlů bylo pouze 104 ze 151 druhů (68,9 % motýlí fauny Novosibirské provincie). Jejich dataset tedy obsahoval méně druhů a nižší diverzitu druhů. Pro detekci *Wolbachia* použili metodu MLST, v mé studii je použit PCR primeru WSP. V jejich studii bylo nalezeno 375 infikovaných vzorků u 70 druhů (58,3 % druhů Lepidoptera), což zahrnuje jak denní motýly, tak můry. Z denních motýlů bylo infikováno 59,3 %, což představuje také vyšší procenta. V jejich studii, stejně tak, jak v této, mnoho neinfikovaných druhů zastoupeno pouze několika vzorky a existuje možnost, že by příslušné populace mohly být ve skutečnosti infikovány. Například *Phengaris teleius*, *Phengaris nausithous* a *Aporia crataegi*. V mé studii byli *Phengaris teleius* a *Phengaris nausithous*

infikování. Ilinsky a Kosterin (2017) předpokládají, že prevalence *Wolbachia* pravděpodobně dramaticky poklesla v populaci *A. crataegi*, kvůli efektu úzkého hrdla, protože tento druh byl v Novosibiřské provincii extrémně hojný po celá desetiletí, dokud v roce 2007 nedošlo k prudkému poklesu v důsledku mrazů, po kterém se početnost druhu neobnovila a zůstala nízká. Ilinsky a Kosterin (2017) navíc také studovali poměr pohlaví v populacích, kvůli schopnosti *Wolbachia* ovlivňovat poměr líhnutých pohlaví, avšak byl zjištěn pouze jeden případ převahy samic, a to u populace *Maniola jurtina*. Důvod převahy samic v analyzované populaci však nesouvisel s infekcí *Wolbachia*, protože 5 ze zkoumaných samic bylo neinfikovaných. Ilinsky a Kosterin (2017) předpokládají, že vysoký výskyt ve studované oblasti odpovídá ostatním oblastem mírného pásu, protože fauna motýlů západní Sibíře je většinou zastoupena druhy hojně rozšířenými na severní polokouli – motýlí fauna Novosibiřské provincie (celkem 151 druhů) obsahuje 45,7 % transpalearktických druhů, 26,7 % západních palearktických druhů, 15,2 % východních palearktických druhů a 10,6 % holarktických druhů. Pouze zbývajících 2,8 % jsou amfipalaarktické a endemické sibiřské druhy. Existence takto vysoké míry infekce *Wolbachia* v mírných zeměpisných šířkách mohla být testována stanovením přítomnosti infekce u druhů ze vzdálených populací. Proto to Ilinsky a Kosterin (2017) otestovali a zjistili, že jsou takto infikovány populace i v jiných oblastech mírného pásu; například *Cupido argiades*, *Lycaena phlaeas*, *Nymphalis xanthomelas* a *Pieris rapae* v Japonsku (Tagami & Miura 2004); *Plebejus idas* a *Celastrina argiolus* v Severní Americe (Russell et al. 2009); *Argynnis paphia*, *Carterocephalus palaemon*, *Carcharodus alceae* a *Leptidea sinapis* v různých regionech (Russell 2012) a *Phengaris arion* v Evropě (Berezcki et al. 2015). Všechny zmíněné druhy byly pozitivní na infekci *Wolbachia* i v této studii, což potvrzuje tvrzení vysoké prevalence u druhů mírného pásu.

### 6.3 Kategorie vzniklé na základě BAPS a haplotypových sítí

I přesto, že pro 37 druhů nebyla zjištěná dostatečná diverzita k určení linií přítomných v ČR, mohli jsme všechny ostatní druhy rozdělit do osmi kategorií. Dle rozdělení BAPS u nás máme nejvíce evropské a mírně kontinentální linie druhů motýlů, následované liniemi z Apenin/Balkánu a Balkánu/východu. Máme zde taky několik druhů se smíšenými evropskými liniemi a západními liniemi a pár druhů se středoevropskými liniemi a smíšenými východními liniemi. Česká republika se vyznačuje různorodou motýlí faunou a setkávají se zde linie z několika různých směrů. A občas se míchá víc linií i uvnitř druhu. Tato analýza odhalila 23 takovýchto druhů s dvěma odlišnými liniemi. Například druhy *Limenitis camilla* a *Boloria dia*, u kterých byla nalezená evropská linie a temperátně-kontinentální linie. Druhy *Polyommatus amandus*, *Plebejus argus* a *Cupido minimus* s evropskou linií a linií Apeniny/Balkán. Druhy *Carcharodus alceae* a *Cupido alcetas* s evropskou linií a linií Balkán/východ. Druhy *Argynnis adippe*, *Melitaea cinxia* a *Polyommatus bellargus* s mírně kontinentální linií a linií Apeniny/Balkán. Druhy *Pieris bryoniae* a *Phengaris nausithous* se středoevropskou a mírně kontinentální linií. Dále *Pyrgus serratulae* se západní linií a linií Apeniny/Balkán, *Polyommatus thersites* se středoevropskou linií a linií Apeniny/Balkán, *Hipparchia fagi* se středoevropskou linií a linií Balkán/východ a *Erebia ligea* s linií Apeniny/Balkán a linií směr východních linií. Jedná se všechno o motýli s palearktickým (nebo západopalearktickým) a eurosibiřským areálem rozšíření.



Kategorie vzniklé na základě haplotypových sítí rozdělily druhy rovnoměrně do kategorií nízká diverzita, nízká diverzita v rámci rozšířené linie, stabilní rozšířené linie, příbuznost Balkán/východ, mírně kontinentální linie a mix haplotypů. Do každé kategorie se přiřadilo cca 12 % druhů. Do kategorií součást expandující rozšířené linie a příbuznost Apeniny/Balkán se přiřadilo 8 % druhů, do kategorie střeoevropská linie 5 % a příbuznost se západem 6 %.

Kategorie vzniklé na základě haplotypových sítí a kategorie BAPS se shodly při rozdělení většiny druhů do kategorií určitých linií. Kategorie střeoevropské linie se pro obě analýzy shodly pro druhy *Zerynthia polyxena*, *Argynnis aglaja*, *Melanargia galathea*, *Polyommatus thersites* a *Pieris bryoniae*. Do kategorie příbuznost Balkán/východ obě analýzy zařadily stejně druhy *Thymelicus lineola*, *Colias alfacariensis*, *Parnassius mnemosyne*, *Melitaea diamina*, *Melitaea didyma*, *Lasiommata maera*, *Lycaena alciphron*, *Polyommatus coridon*, *Scolitantides orion*, *Pseudophilotes vicrama*, *Carcharodus alceae* a *Cupido alcetas*. Do kategorie mírně kontinentální linie zařadily obě analýzy shodně druhy *Colias hyale*, *Boloria euphrosyne*, *Brenthis ino*, *Limenitis populi*, *Glaucopsyche alexis*, *Polyommatus damon*, *Plebejus idas*, *Phengaris nausithous*, *Agriades optilete*, *Pieris bryoniae*, *Argynnis adippe*, *Melitaea cinxia* a *Boloria dia*. Do kategorie příbuznost se západem zařadily obě analýzy shodně druhy *Coenonympha arcania*, *Hipparchia hermione*, *Lasiommata megera*, *Erebia sudetica*, *Lycaena phlaeas*, *Leptotes pirithous* a *Favonius quercus*. Do kategorie příbuznost Apeniny/Balkán zařadily obě analýzy shodně druhy *Hesperia comma*, *Erebia epiphron*, *Polyommatus bellargus*, *Aricia eumedon*, *Satyrium spini*, *Argynnis adippe*, *Melitaea cinxia*, *Polyommatus amandus* a *Polyommatus thersites*. Stejně druhy s dvěma liniemi v obou metodách jsou *Pieris bryoniae*, *Polyommatus thersites*, *Carcharodus alceae*, *Cupido alcetas*, *Phengaris nausithous*, *Argynnis adippe*, *Melitaea cinxia*, *Boloria dia*, *Apatura iris* a *Polyommatus amandus*. Rozdílný jsou *Apatura iris* (haplotypová síť) a *Hipparchia fagi*, *Limenitis camilla*, *Polyommatus bellargus*, *Pyrgus serratulae*, *Plebejus argus*, *Cupido minimus*, *Erebia ligea* (BAPS). Shodnutí mezi těmito dvěma metodami znamená, že mezi populacemi existuje silná genetická diferenciacce a dochází k malému toku genů. Všechny ostatní druhy, které vyšly rozdílně, mohly mít mezi populacemi slabou genetickou diferenciacce nebo mezi nimi probíhal tok genů. V rozdílných případech haplotypové sítě identifikují jemnější populační strukturu. K pochopení genetické struktury a historie populací je důležité brát v potaz obě metody dohromady.

## 6.4 Analýza Canoco

Hypotézu 1. Biotopové nároky a funkční vlastnosti motýlů mají vliv na to, která genetická linie se bude v České republice vyskytovat. Zároveň je předurčen osud motýlů: míra ohroženosti také vysvětlí výskyt genetických linií, potvrzují.

Vysvětlované kategorie haplotypových sítí pomocí vysvětlujících proměnných znaků (biotopů) - ubikvista, mezofil-3 a tyrfofil: druhy příbuzné s těmi západními nebo mající malou diverzitu jsou často lesní druhy (mezofil-3) nebo ty všudypřítomné (ubikvista). Druhy opačných vlastností (druhy spíše otevřených stanovišť) pochází z východu, jihu nebo jsou kontinentálně-temperátní. To je zajímavé pro složení fauny z hlediska kvarterní biogeografie –

lesní druhy mají nízkou diverzitu, takže se pravděpodobně rozšířily nedávno (v holocénu), nebo se k nám dostaly spíše ze západu (Stewart et al. 2010). Naopak ty východní druhy jsou spíše stepní a luční – mohly u nás žít i v glaciálu (oceánicko-kontinentální gradient) (Stewart et al. 2010). Druhy ze střední Evropy jsou převážně rašeliništní druhy (tyrfofil). Tyto druhy mohly být v glaciálu rozšířené v nížinách mezi horami, a pak v interglaciálu ustoupit na horská rašeliniště (Sudetské hory, Karpaty, Alpy).

Dále se vysvětlovaly kategorie haplotypových sítí pomocí proměnného znaku ohrožení (kategorie Červeného seznamu ČR). Kriticky ohrožené druhy jsou kontinentálně-temperátní nebo pocházejí z východu. Druhy z jihu a východu jsou spíše zranitelné, ze západu nebo s nízkou diverzitou buď ohrožené nebo neohrožené (lesní nebo všudypřítomné druhy). Druhy ze střední Evropy, popřípadě jihu, bývají klasifikovány spíše jako téměř ohrožené (spíše rašeliništní druhy).

Vysvětlované kategorie haplotypových sítí pomocí funkčních vlastností (traitů) - aparence (forma živné rostliny) a délka doby letu: druhy s vyšší formou živné rostliny (keře, stromy) jsou ze západu, druhy s nižší formou živné rostliny (byliny, trávy) jsou z východní nebo střední Evropy. To odpovídá obývanému biotopu druhů – západní druhy (lesní nebo všudypřítomný) požívají keře a stromy. Východní druhy (stepní, luční) požívají byliny a trávy. Druhy s delší dobou migračního letu mají nízkou diverzitu. Druhy s kratší dobou letu jsou spíše z jihu, střední Evropy nebo kontinentálně-temperátní.

Vysvětlované kategorie BAPS pomocí vysvětlujících proměnných znaků (biotopů) - ubikvita a xerotermofil-1: druhy příbuzné se západními druhy nebo mající nízkou diverzitu jsou podle této metody taky všudypřítomné (ubikvita). Druhy opačných vlastností (otevřených stanovišť) pochází spíše z Evropy nebo jsou kontinentálně-temperátní. U haplotypových sítí to byl jih nebo východ, ale zase stepní druhy tu mají vlastní proměnou. Rašeliništní jsou podle haplotypových sítí taktéž ze střední Evropy. Druhy z jihu a východu jsou převážně stepní druhy (xerotermofil-1).

Vysvětlování kategorií BAPS pomocí vysvětlujícího proměnného znaku ohrožení: kriticky ohrožené druhy jsou podle této metody příbuzné druhům ze západu a jihu. Kontinentálně-temperátní druhy a druhy příbuzné východu jsou spíše klasifikovány jako zranitelné. Neohrožené, téměř ohrožené a ohrožené druhy jsou spíše z Evropy, mají nízkou diverzitu nebo jsou mixem východních linií. Status ohrožení vyšel mezi oběma metodami znatelně rozličně. Jak už jsem zmiňoval, rozdíly mezi těmito dvěma metodami jsou běžné kvůli rozdílné strategii. Status ochrany není závislý pouze na původu druhu, ale hraje zde roli více proměnných. Motýli příbuzné východu mohou být zranitelnější vůči ztrátě a fragmentaci stanovišť. Motýli příbuzní západním druhům mohou být citlivější na stresové faktory prostředí, jako jsou změna klimatu, znečištění nebo přítomnost invazních druhů. Některé druhy mohou být schopny lépe přetrvávat v degradovaných nebo fragmentovaných biotopech a některé si zas mohly vyvinout větší toleranci vůči zmíněným stresorům.

Následovalo vysvětlování kategorií BAPS za pomoci funkčních vlastností (traitů) - délka doby letu, aparence a rozpětí předních křídel. Druhy z Evropy a druhy s nízkou diverzitou jsou převážně druhy s vyšší formou živné rostliny (keře, stromy), s delší dobou letu a s delšími křídly. Druhy opačných vlastností (nižší forma živné rostliny, kratší doba letu a kratší křídla) jsou převážně z jihu a východu. Délka doby letu vyšla částečně rozdílně u obou metod. U BAPS

kategorií vyšel kratší let pro jižní a evropské druhy a u haplotypových kategorií pro jižní a východní druhy. Větší druhy s delšími křídly a delší dobou letu bývají obvykle generalisté využívající široké trofické areály (Bartoňová et al. 2014). To by mohlo naznačovat, že generalisté se k nám dostávali převážně ze západu (všudypřítomné, lesní druhy). Sedavé druhy s menšími křídly a kratší dobou letu obývající nespojitá nerovnoměrná stanoviště jsou spíše specialisté (Bartoňová et al. 2014). To by zase ukazovalo na příchod specialistů z východu a jihu (luční a stepní druhy).

Genetická rozmanitost napříč Evropou byla uznána jako částečný důsledek izolace glaciálních dob v jižních refugiích a postglaciální kolonizace směrem na sever (Schmitt & Hewitt 2004). Dle výsledků analýz lesní druhy a všudypřítomné druhy se k nám dostaly ze západu, stepní a luční z jihu a východu, popřípadě jsou kontinentálně-temperátní. Původ stepních druhů by mohl být vysvětlen expanzí stepních druhů do Evropy během pozdního pleistocénu (Oceánsko-kontinentální gradient) (Stewart et al. 2010). Původ lučních druhů z východních větví těchto druhů mohl být následkem postglaciálního šíření z refugií v jihovýchodní Evropě (Stašová 2018). Cesty ze západu byly blokovány pohořími Šumavy, Českého lesa a Krušných hor, což by vysvětlovalo původy druhů otevřených stanovišť z východu, kde se nachází migrační koridory. Nicméně záleží, která linie se k nám dostala, protože dost druhů, co jsou ze západu, má jinde v Evropě i svou východní linii. Teplomilné druhy mohly být propojené teplou panonskou nížinou z východu a vlhkomilné druhy mohly být těmito teplými oblastmi na území ČR izolovány (Škopek 2020). Mediteránní druhy se k nám dostávaly postglaciální kolonizací směrem na sever (Schmitt & Hewitt 2004). Druhy mírného pásu byly omezeny výskytem do nižších geografických šířek v dobách ledových Pleistocénu (Stašová 2018). Je ale třeba brát v potaz, že některé kategorie platí jen pro střední Evropu či ČR (např. východní, západní), jiné platí pro skoro celé území (např. mix evropských linií).

## 7 Závěr

Doplnil jsem dataset barcodů motýlů České republiky a získal vzorky od 140 druhů žijící na našem území (z 142 druhů, tj. 98,6 % české fauny). Celkem (za pomoci spolupracovníků a za využití sekvencí z databáze BOLD) obsahoval dataset 22 489 sekvencí s průměrně 160,6 vzorky na druh. Pro dosažení kompletního datasetu doporučuji doplnit o chybějící druhy – *Melitaea phoebe* a *Hyponphele lycaon*. Na základě kvantifikací a vyhodnocení napadených vzorků nitrobuněčnými parazity, bakteriemi rodu *Wolbachia* byla potvrzena hypotéza 2 - Promořenost bakterií *Wolbachia* je v ČR vysoká, bakterie se vyskytuje u velké části druhů a testovaných vzorků. Ve své studii jsem zjistil, že bakterií *Wolbachia* bylo nakaženo 108 druhů z 133 testovaných druhů (81,2 %), tedy většina českých druhů denních motýlů a pozitivní nález infekce byl u 401 vzorků (40,2 % studovaných vzorků). Mohl jsem také potvrdit tvrzení Ahmed et al. (2015) že přibližně 80 % druhů a čtvrtina až třetina jedinců je infikována bakterií *Wolbachia*. Odhalil jsem 40 různých kmenů bakterie *Wolbachia* a druhy s nulovou, nízkou i vysokou prevalencí. Většina kmenů (27) byla nalezena pouze u 1-3 druhů, z toho 17 kmenů infikovalo pouze jeden druh. Na druhou stranu některé kmeny bakterie byly nalezeny u 20 a více druhů (například kmen 10, který byl nalezen u 25 druhů). Mé doporučení pro další výzkum je otestovat zbývajících 10 druhů českých denních motýlů a zvýšit počet vzorků na druh pro optimalizovanější výsledky. Dále by mohlo být otestováno, zda původ linií má vliv na prevalenci *Wolbachia*.

Všechny druhy jsem rozdělil do kategorií linií přítomných v ČR jak na základě klastrů vytvořených analýzou BAPS, tak na základě polohy haplotypů nalezených v ČR a haplotypů od nich vzdálených s maximálně dvěma mutacemi. Dle rozdělení BAPS u nás máme kromě druhů s nízkou diverzitou nejvíce evropské a temperátně-kontinentální linie druhů motýlů, následované liniemi z Apenin/Balkánu a Balkánu/východu. Máme zde taky několik druhů se smíšenými evropskými liniemi a západními liniemi a pár druhů se střeoevropskými liniemi a smíšenými východními liniemi. Nejvíce druhů v kategoriích vzniklých na základě haplotypových sítí bylo v kategoriích nízká diverzita, nízká diverzita v rámci rozšířené linie, stabilní rozšířené linie, příbuznost Balkán/východ, temperátně-kontinentální linie a mix haplotypů. Následovaly kategorie expandující rozšířené linie a příbuznost Apeniny/Balkán. Nejméně druhů bylo zařazeno do kategorií střeoevropská linie a příbuznost se západem. Na základě shodnutí mezi těmito dvěma metodami můžeme odhadnout, že mezi populacemi existuje slabá genetická diferenciace nebo mezi nimi probíhá tok genů. Mezi populacemi, které byly zařazeny rozdílně, existuje silná genetická diferenciace a dochází k malému toku genů. Dále byly testovány užitím přímých ordinačních analýz CCA závislosti mezi těmito původy českých vzorků a vzorci biotopových nároků, funkčních vlastností a ohroženosti motýlů. Na základě těchto analýz potvrzují i hypotézu 1 - biotopové nároky a funkční vlastnosti motýlů mají vliv na to, která genetická linie se bude v České republice vyskytovat. Zároveň je předurčen osud motýlů: míra ohroženosti také vysvětlí výskyt genetických linií. Závislost mezi vysvětlovanými kategoriemi BAPS a vysvětlujícími proměnnými znaky – biotopy byla při analýze všech proměnných průkazná. Interaktivním výběrem byly zvoleny za proměnné vysvětlující nejvíce variability ubikvita a xerotermofil-1. Závislosti mezi kategoriemi BAPS

a proměnného znaku ohrožení, a kategoriemi BAPS a funkčních vlastností (traitů) byly taktéž průkazné. Interaktivním výběrem byly vybrány délka doby letu, aparence a rozpětí předních křídel za znaky s nejvyšší vysvětlující variabilitou. Závislost haplotypových sítí pomocí vysvětlujících proměnných znaků (biotopů) vyšla neprůkazně, ale interaktivní výběr ukázal, že nejvíce variability vysvětlily ubikvista, mezofil-3 a tyrfofil (prokázala závislost mezi zmíněnými biotopy a kategorií haplotypových sítí). Závislost haplotypových sítí pomocí proměnného znaku ohrožení vyšla průkazná. Vysvětlovaná kategorie haplotypových sítí pomocí funkčních vlastností (traitů) ukázala, že nejvíce variability prokazují aparence (forma živné rostliny) a délka doby letu.

Haplotypy vs. biotopy nejsou v konfliktu, všudypřítomné a lesní druhy jsou mix, západ, popř. expandují či mají nízkou diverzitu. Také lze říct, že nelesní druhy jsou kontinentálně-temperátní, široce rozšířené, stabilní, Balkán/východ, Apenin/Balkán či střední Evropa. BAPS vs funkční vlastnosti: 1. osa: pokud má motýl delší dobu letu a jeho housenka žere keř/strom, a je větší (větší křídla), má druh větší pravděpodobnost, že se k nám dostane ze západu, nebo je rozšířen skrz celou Evropu, nebo má nízkou diverzitu skrz areál. Naopak, když má motýl krátkou dobu letu či jeho housenka žere trávy, byliny, je pravděpodobnější, že se k nám rozšířil z Balkánu/východu, Apenin/Balkánu, ze střední Evropy či žije ta linie pouze mimo Mediterán (tj. temperátně-kontinentální). BAPS vs biotopy: 1. osa: všudypřítomné druhy mají větší šanci, že se k nám dostane víc linií (evropských či východních) anebo jdou ze západu, zatímco stepní druhy jdou z jihu, východu, střední Evropy, jsou kontinentálně-temperátní nebo z Evropské linie.

## 8 Literatura

- Agrawal AA. 2019. Advances in understanding the long-term population decline of monarch butterflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116** (17): 8093–8095.
- Ahmed MZ, Araujo-Jnr EV, Welch JJ, Kawahara AY. 2015. *Wolbachia* in butterflies and moths: geographic structure in infection frequency. *Frontiers in Zoology* **12** (1): 1-9.
- Ahmed MZ, Breinholt JW, Kawahara AY. 2016. Evidence for common horizontal transmission of *Wolbachia* among butterflies and moths. *BMC evolutionary biology* **16** (1): 1-16.
- Awise JC. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography* **36** (1): 3-15.
- Baldo L, Lo N, Werren JH. 2005. Mosaic nature of the *Wolbachia* surface protein. *Journal of Bacteriology* **187** (15): 5406-5418.
- Baldo L, et al. 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and environmental microbiology* **72** (11): 7098-7110.
- Bartoňová A, Beneš J, Konvička M. 2014. Generalist-specialist continuum and life history traits of Central European butterflies (Lepidoptera)-are we missing a part of the picture? *European Journal of Entomology* **111** (4): 543.
- Bartoňová A, Beneš J, Fric ZF, Chobot K, Konvička M. 2016. How universal are reserve design rules? A test using butterflies and their life history traits. *Ecography* **39** (5): 456-464.
- Bartoňová Sucháčková A, Beneš J, Fric ZF, Konvička M. 2019. Genetic confirmation of *Arícia artaxerxes* (Fabricius 1793) (Lepidoptera, Lycaenidae) in the Czech Republic, its conservation significance and biogeographic context. *Nota Lepidopterologica* **42**: 163.
- Bartoňová Sucháčková A, et al. 2021. Extremely endangered butterflies of scattered central European dry grasslands under current habitat alteration. *Insect Systematics and Diversity* **5** (5): 6.
- Bartoňová Sucháčková A, Konvička M, Marešová J, Wiemers M, Ignatev N, Wahlberg N, Schmitt T, Fric ZF. 2021. *Wolbachia* affects mitochondrial population structure in two systems of closely related Palaearctic blue butterflies. *Scientific Reports* **11** (1): 3019.
- Behjati S, Tarpey PS. 2013. What is next generation sequencing? *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice* **98** (6): 236-238.
- Beneš J, Konvička M, Dvořák J, Fric Z, Havelda Z, Pavlíčko A, Vrabec V, Weidenhoffer Z. 2002. Motýli České republiky. Rozšíření a ochrana I, II. Butterflies of the Czech Republic: Distribution and Conservation, I, II.). SOM, Prague.
- Beneš J. 2018. Genetická rozmanitost českých populací kriticky ohrožených modrásků (Lepidoptera, Lycaenidae). [MSc. Thesis]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Bennett KD, Provan J. 2008. What do we mean by ‘refugia’? *Quaternary Science Reviews* **27** (27-28): 2449-2455.

- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. 2007. GenBank. Nucleic acids research **36** (suppl\_1): 25-30.
- Benson DA, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. 2015. GenBank. Nucleic acids research **43**: 30.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Ostell J, Pruitt KD, Sayers EW. 2018. GenBank. Research of Nucleic acid **46** (D1): D41-D47.
- Berezki J, Rácz R, Varga Z, Tóth JP. 2015. Controversial patterns of *Wolbachia* infestation in the social parasitic *Maculinea* butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Organisms Diversity & Evolution* **15**: 591-607.
- Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL. 1998. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Journal of bacteriology* **180** (9): 2373-2378.
- Bubová T, Kulma M, Vrabec V, Nowicki P. 2016. Adult longevity and its relationship with conservation status in European butterflies. *Journal of Insect Conservation* **20** (6): 1021-1032.
- Buhay JE. 2009. "COI-like" sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology* **29** (1): 96-110.
- Burney CW, Brumfield RT. 2009. Ecology predicts levels of genetic differentiation in Neotropical birds. *The American Naturalist* **174** (3): 358-368.
- Comes HP, Kadereit JW. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in plant science* **3** (11): 432-438.
- D'Ercole J, et al. 2021. A DNA barcode library for the butterflies of North America. *PeerJ* **9**, e11157.
- Dapporto L, Cini A, Vodá R, Dincă V, Wiemers M, Menchetti M, Vila R. 2019. Integrating three comprehensive data sets shows that mitochondrial DNA variation is linked to species traits and paleogeographic events in European butterflies. *Molecular Ecology Resources*, **19** (6): 1623-1636.
- Darwin C. 1859. *On the origin of species*. Published on **24** (1): 364–382
- Dawnay N, Ogden R, McEwing R, Carvalho GR, Thorpe RS. 2007. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic science international* **173** (1): 1-6.
- Dawson AG. (2013). *Ice age earth: late quaternary geology and climate*. Routledge.
- de Lattin G. 1967. *Grundriss der zoogeographie* (Vol. 12). G. Fischer.
- D'Ercole J, Dincă V, Opler PA, Kondla N, Schmidt C, Phillips JD, Robbins R, Burns JM, Miller SE, Grishin N, Zakharov EV. 2021. A DNA barcode library for the butterflies of North America. *PeerJ* **9**, e11157.



- Dincă V, Zakharov EV, Hebert PD, Vila R. 2011. Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278** (1704): 347-355.
- Dincă V, Montagud S, Talavera G, Hernández-Roldán J, Munguira ML, García-Barros E, Hebert PD, Vila R. 2015. DNA barcode reference library for Iberian butterflies enables a continental-scale preview of potential cryptic diversity. *Scientific Reports* **5**: 12395.
- Dincă V, Dapporto L, Somervuo P, Vodá R, Cuvelier S, Gascoigne-Pees M, Huemer P, Mutanen M, Hebert PDN, Vila R. 2021. High resolution DNA barcode library for European butterflies reveals continental patterns of mitochondrial genetic diversity. *Communications Biology* **4** (1): 1-11, 315.
- Duron O, Bouchon D, Boutin S, Bellamy L, Zhou L, Engelstädter J, Hurst GD. 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC biology* **6**: 1-12.
- Forister ML, Pelton EM, Black SH. 2019. Declines in insect abundance and diversity: We know enough to act now. *Conservation Science and Practice* **1** (8): 80.
- Fox R, et al. (2015). *The State of the UK's Butterflies 2015*. Butterfly Conservation and the Centre for Ecology & Hydrology, Wareham, Dorset.
- Hays JD, Imbrie J, Shackleton NJ. 1976. Variations in the Earth's Orbit: Pacemaker of the Ice Ages: For 500,000 years, major climatic changes have followed variations in obliquity and precession. *Science* **194** (4270): 1121-1132.
- Hebert PDN, et al. 2003. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species, *Proc. Biol. Sci.* **270**: 96-99.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. (2004 b) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **101** (41): 14812-14817.
- Hejda R, Farkač J, Chobot K. 2017. Červený Seznam Ohrožených Druhů České Republiky: Bezobratlí: Red List of Threatened Species of Czech Republic: Invertebrates. *Příroda*. 1-611.
- Hewitt GM. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological journal of the Linnean Society* **58** (3): 247-276.
- Hewitt GM. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological journal of the Linnean Society* **68** (1-2): 87-112.
- Hewitt GM. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405** (6789): 907-913.
- Ho SY, Saarma U, Barnett R, Haile J, Shapiro B. 2008. The effect of inappropriate calibration: three case studies in molecular ecology. *PLoS One* **3** (2), e1615.



- Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK, Ellison AM. 2014. Rarefaction and extrapolation with hill numbers: A framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs* **84**: 45–67.
- Cheng L, Connor TR, Sirén J, Aanensen DM, Corander J. 2013. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 1224–1228
- Ilinsky Y, Kosterin OE. 2017. Molecular diversity of *Wolbachia* in Lepidoptera: prevalent allelic content and high recombination of MLST genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **109**: 164-179.
- Jiggins FM, Hurst GD, Schulenburg JHG, Majerus ME. 2001. Two male-killing *Wolbachia* strains coexist within a population of the butterfly *Acraea encedon*. *Heredity* **86** (2): 161-166.
- Jolley K, Bray J, Maiden MCJJ. 2018. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST. org website and their applications. *Wellcome open research*, **3** (124).
- Jung S, Duwal RK, Lee S. 2011. COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). *Molecular Ecology Resources* **11** (2): 266-270.
- Kearse M, et al. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28** (12): 1647–1649.
- Kelly M, Gráda CÓ. 2013. The waning of the little ice age: climate change in early modern Europe. *Journal of Interdisciplinary History* **44** (3): 301-325.
- Konvička M, Beneš J, Fric Z. 2010. Ochrana denních motýlů v České republice—Analýza stavu a dlouhodobá strategie. Available from <http://www.lepidoptera.cz/> (accessed March 2023).
- Kristensen NP, Scoble MJ, Karsholt OLE. 2007. Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. *Zootaxa* **1668** (1): 699-747.
- Kropf M, Kadereit JW, Comes HP. 2002. Late Quaternary distributional stasis in the submediterranean mountain plant *Anthyllis montana* L. (Fabaceae) inferred from ITS sequences and amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* **11** (3): 447-463.
- Lamas G. 2004. Checklist: Part 4A. Hesperioidea-Papilionoidea. *Atlas of neotropical Lepidoptera*. 1-439.
- Lande R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* **241** (4872): 1455-1460.
- Laštůvka Z, Liška J. 2011. Komentovaný seznam motýlů České republiky. Biocont Laboratory.
- Lavinia PD, Bustos EON, Kopuchian C, Lijtmaer DA, García NC, Hebert PD, Tubaro PL. 2017. Barcoding the butterflies of southern South America: Species delimitation efficacy, cryptic diversity and geographic patterns of divergence. *PloS one* **12** (10), e0186845.

- Lavinia PD, Nunez Bustos EO, Kopuchian C, Lijtmaer DA, Garcia NC, Hebert PD, Tubaro PL. 2017. Barcoding the butterflies of southern South America: Species delimitation efficacy, cryptic diversity and geographic patterns of divergence. *PloS one* **12** (10), e0186845.
- Leigh JW, Bryant D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* **6**: 1110–1116
- Liu Y, Miao H, Hong XY. 2006. Distribution of the endosymbiotic bacterium *Cardinium* in Chinese populations of the carmine spider mite *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Applied Entomology* **130** (9-10): 523-529.
- Lucek K, Bouaouina S, Jospin A, Grill A, de Vos JM. 2021. Prevalence and relationship of endosymbiotic *Wolbachia* in the butterfly genus *Erebia*. *BMC ecology and evolution* **21** (1): 1-12.
- Lukhtanov VA, Sourakov A, Zakharov EV, Hebert PD. 2009. DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification. *Molecular ecology resources* **9** (5): 1302-1310.
- Macek J. 2015. Motýli a housenky střední Evropy IV. Denní motýli. Academia.
- Macoun J, Králík F. 2020. Glacial history of the Czech Republic. In *Glacial Deposits in North-East Europe*. CRC Press. 389-405.
- Maes D, Van Dyck H. 2001. Butterfly diversity loss in Flanders (north Belgium): Europe's worst case scenario? *Biological conservation* **99** (3): 263-276.
- Maes D, et al. 2019. Integrating national Red Lists for prioritising conservation actions for European butterflies. *Journal of insect conservation* **23** (2): 301-330.
- Maresova J, Habel JC, Neve G, Sielezniew M, Bartonova A, Kostro-Ambroziak A, Fric ZF. 2019. Cross-continental phylogeography of two Holarctic Nymphalid butterflies, *Boloria eunomia* and *Boloria selene*. *PloS one* **14** (3).
- Margules CR, Pressey RL. 2000. Systematic conservation planning. *Nature* **405** (6783): 243.
- Martin JF, Gilles A, Lörtscher M, Descimon H. 2002. Phylogenetics and differentiation among the western taxa of the *Erebia tyndarus* group (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **75** (3): 319-332.
- Maslin M. 2016. Forty years of linking orbits to ice ages. *Nature* **540** (7632): 208-209.
- Mattila N, Kaitala V, Komonen A, Kotiaho JS, Päivinen J. 2006. Ecological determinants of distribution decline and risk of extinction in moths. *Conservation Biology* **20** (4): 1161-1168.
- Mayr E. 1954. *Evolution as a Process*, eds Huxley J, Hardy AC, Ford EB. 157-180.
- Monteiro A, Pierce NE. 2001. Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1alpha gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **18**: 264–281.

- Morag N, Klement E, Saroya Y, Lensky I, Gottlieb Y. 2012. Prevalence of the symbiont *Cardinium* in *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) vector species is associated with land surface temperature. *The FASEB Journal* **26** (10): 4025-4034.
- Müller F, Baessler C, Schubert H, Klotz S. 2010. Long-term ecological research. Springer, Berlin **10** (1007): 978-090.
- Musil R. 1985. Paleobiography of terrestrial communities in Europe during the Last Glacial. 1-83.
- NatureServe. 2019. NatureServe. Available from [www.natureserve.org](http://www.natureserve.org) (accessed March 2023).
- Paradis E. 2010. Pegas: An R package for population genetics with an integrated–modular approach. *Bioinformatics* **26**: 419–420.
- Paradis E. 2018. Analýza haplotypových sítí: Metoda randomizovaného minimálního spanning tree. *Methods in Ecology and Evolution* **9**: 1308–1317.
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* **79** (2): 361-382.
- Pelton EP, Schultz CB, Jepsen SJ, Black SH, Crone EE. 2019. Western monarch population plummets: Status, probable causes, and recommended conservation actions. *Frontiers in Ecology and Evolution* **7**: 258.
- Porter AH, Geiger H. 1995. Limitations to the inference of gene flow at regional geographic scales—an example from the *Pieris napi* group (Lepidoptera: Pieridae) in Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* **54** (4): 329-348.
- R Core Team, R. 2019. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Available from <https://www.R-project.org/> (accessed March 2023).
- Ratnasingham S, Hebert PD. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes* **7** (3): 355-364.
- Russell JA, Goldman-Huertas B, Moreau CS, Baldo L, Stahlhut JK, Werren JH, Pierce NE. 2009. Specialization and geographic isolation among *Wolbachia* symbionts from ants and lycaenid butterflies. *Evolution* **63** (3): 624-640.
- Russell JA. 2012. The ants (Hymenoptera: Formicidae) are unique and enigmatic hosts of prevalent *Wolbachia* (Alphaproteobacteria) symbionts. *Myrmecological News* **16** (January 2011): 7-23.
- Salunke BK, Salunkhe RC, Dhotre DP, Walujkar SA, Khandagale AB, Chaudhari R, Shouche YS. 2012. Determination of *Wolbachia* diversity in butterflies from Western Ghats, India, by a multigene approach. *Applied and Environmental Microbiology* **78** (12): 4458-4467.
- Savolainen V, Cowan RS, Vogler AP, Roderick GK, Lane R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360** (1462): 1805-1811.

- Schmitt T, Seitz A. 2001. Allozyme variation in *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): identification of ice-age refugia and reconstruction of post-glacial expansion. *Journal of Biogeography* **28** (9): 1129-1136.
- Schmitt T, Giessler A, Seitz A. 2003. Did *Polyommatus icarus* (Lepidoptera: Lycaenidae) have distinct glacial refugia in southern Europe? Evidence from population genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* **80** (3): 529-538.
- Schmitt T, Hewitt GM. 2004. The genetic pattern of population threat and loss: a case study of butterflies. *Molecular Ecology* **13** (1): 21-31.
- Schmitt T, Röber S, Seitz A. 2005. 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** (4): 419-431.
- Schmitt T, Hewitt GM, Müller P. 2006. Disjunct distributions during glacial and interglacial periods in mountain butterflies: *Erebia epiphron* as an example. *Journal of Evolutionary Biology* **19** (1): 108-113.
- Schmitt T, Müller P. 2007. Limited hybridization along a large contact zone between two genetic lineages of the butterfly *Erebia medusa* (Satyrinae, Lepidoptera) in Central Europe. *J Zool Syst Evol Res* **45**: 39-46.
- Schmitt T, Rákósy L, Abadjiev S, Müller P. 2007. Multiple differentiation centres of a non-Mediterranean butterfly species in south-eastern Europe. *Journal of Biogeography* **34** (6): 939-950.
- Schmitt T. 2007. Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in zoology* **4**: 1-13.
- Schmitt T, Besold J. 2010. Upslope movements and large scale expansions: the taxonomy and biogeography of the *Coenonympha arcania*-*C. darwiniana*-*C. gardetta* butterfly species complex. *Zoological Journal of the Linnean Society* **159** (4): 890-904.
- Stašová P. 2018. Původ a genetická rozmanitost českých populací kriticky ohroženého hnědáka květelového. [BSc. Thesis]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Stewart JR, Lister AM. 2001. Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology & Evolution* **16** (11): 608-613.
- Stewart JR, Dalén L. 2008. Is the glacial refugium con.
- Stewart JR, Lister AM, Barnes I, Dalén L. 2010. Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277** (1682): 661-671.
- Strugnell JM, Lindgren AR. 2007. A barcode of life database for the Cephalopoda? Considerations and concerns. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **17** (2-3): 337-344.

- Sumi T, Miura K, Miyatake T. 2013. No seasonal trend in infection of the pale grass blue butterfly, *Zizeeria maha* (Lepidoptera: Lycaenidae), by *Wolbachia*. *Applied entomology and zoology* **48**: 35-38.
- Škopek P. 2020. Barcoding českých denních motýlů [BSc. Thesis]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice.
- Šmilauer P, Lepš J. 2014. *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO 5*. Cambridge university press.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular ecology* **7** (4): 453-464.
- Tagami Y, Miura K. 2004. Distribution and prevalence of *Wolbachia* in Japanese populations of Lepidoptera. *Insect molecular biology* **13** (4): 359-364.
- Talbot SL, Shields GF. 1996. Phylogeography of brown bears (*Ursus arctos*) of Alaska and paraphyly within the Ursidae. *Molecular phylogenetics and evolution*: **5** (3): 477-494.
- Taylor MJ, Bordenstein SR, Slatko B. 2018. Microbe Profile: *Wolbachia*: a sex selector, a viral protector and a target to treat filarial nematodes. *Microbiology (Reading)*. Nov; **164** (11): 1345-1347. DOI: 10.1099/mic.0.000724. Epub 2018 Oct 12. PMID: 30311871; PMCID: PMC7008210.
- Thogmartin WE, et al. 2017. Restoring monarch butterfly habitat in the Midwestern US: 'all hands on deck.'. *Environmental Research Letters* **12**: 74005.
- Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2003. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics* **1**: 2-3.
- Toju H, Fukatsu T. 2011. Diversity and infection prevalence of endosymbionts in natural populations of the chestnut weevil: relevance of local climate and host plants. *Molecular Ecology* **20** (4): 853-868.
- Tonkin-Hill G, Lees JA, Bentley SD, Frost SDW, Corander J. 2018. RhierBAPS: An R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS. *Wellcome Open Research* **3**: 93.
- Ulrich W, Buszko J. 2003. Species–area relationships of butterflies in Europe and species richness forecasting. *Ecography* **26** (3): 365-373.
- Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends in ecology & evolution* **24** (2): 110-117.
- van Nieuwerkerken EJ, Kaila L, Kitching IJ, Kristensen NP, Lees DC, Minet J, Wahlberg N. 2011. Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z.-Q.(Ed.) *Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa* **3148** (1): 212-221.
- van Swaay CAM. 2002. The importance of calcareous grasslands for butterflies in Europe. *Biological Conservation* **104** (3): 315-318.

- Wagner DL. 2018. Trends in biodiversity: Insects. In Encyclopedia of the Anthropocene. Oxford, England: Elsevier. 131–143.
- Wahlberg N, Wheat CW. 2008. Genomic outposts serve the phylogenomic pioneers: designing novel nuclear markers for genomic DNA extractions of lepidoptera. *Systematic Biology* **57**: 231–242.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert, PD. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **360** (1462): 1847-1857.
- Warren MS, Bourn NA. 2011. Ten challenges for 2010 and beyond to conserve Lepidoptera in Europe. *Journal of Insect Conservation* **15** (1-2): 321-326.
- Wenzel M, Schmitt T, Weitzel M, Seitz A. 2006. The severe decline of butterflies on western German calcareous grasslands during the last 30 years: a conservation problem. *Biological Conservation* **128** (4): 542-552.
- Wepprich T, Adrion JR, Ries L, Wiedmann J, Haddad NM. 2019. Butterfly abundance declines over 20 years of systematic monitoring in Ohio, USA. *BioRxiv*, 613786. *PLoS One* **14** (7), e0216270.
- Werren JH, Windsor D, Guo LR. 1995. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **262** (1364): 197-204.
- Werren JH, Windsor DM. 2000. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **267** (1450): 1277-1285.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology* **6** (10): 741-751.
- West SA, Cook JM, Werren JH, Godfray HCJ. 1998. *Wolbachia* in two insect host–parasitoid communities. *Molecular ecology* **7** (11): 1457-1465.
- Wiemers M, Balletto E, Dincă V, Fric ZF, Lamas G, Lukhtanov V, Munguira ML, van Swaay CA, Vila R, Vliegenthart A, Wahlberg N. 2018. An updated checklist of the European butterflies (Lepidoptera, Papilionoidea). *ZooKeys* **811**: 9.
- Wiwatanaratanabutr I, Kittayapong P. 2009. Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus*. *Journal of invertebrate pathology* **102** (3): 220-224.



## 9 Samostatné přílohy

Příloha I. Seznam získaných druhů denních motýlů vyskytujících se na území České republiky s počtem získaných sekvencí ze vzorků a sekvencí z databanek.

Druh (latinsky)	Popis	Druh (česky)	Získané sekvence	Databázové sekvence
<b>Papilionidae</b>			<b>29</b>	<b>569</b>
<i>Iphiclides podalirius</i>	Linnaeus 1758	otakárek ovocný	3	142
<i>Papilio machaon</i>	Linnaeus 1758	otakárek fenýklový	2	255
<i>Parnassius mnemosyne</i>	Linnaeus 1758	jasoň dymnívkový	23	137
<i>Zerynthia polyxena</i>	Denis & Schiffermüller 1775	pestrokřídlec podražcový	1	35
<b>Hesperiidae</b>			<b>85</b>	<b>2672</b>
<i>Heteropterus morpheus</i>	Pallas 1771	soumračník černohnědý	3	43
<i>Carterocephalus palaemon</i>	Pallas 1771	soumračník jitrocelový	7	210
<i>Ochlodes sylvanus</i>	Esper 1777	soumračník rezavý	5	174
<i>Hesperia comma</i>	Linnaeus 1758	soumračník čárkovaný	9	364
<i>Thymelicus acteon</i>	Rottemburg 1775	soumračník žlutoskvrnitý	3	177
<i>Thymelicus sylvestris</i>	Poda 1761	soumračník metlicový	11	235
<i>Thymelicus lineola</i>	Ochsenheimer 1808	soumračník čárečkovaný	9	367
<i>Spialia sertorius</i>	Hoffmansegg 1804	soumračník skořicový	5	198
<i>Carcharodus alceae</i>	Esper 1780	soumračník slézový	3	181
<i>Erynnis tages</i>	Linnaeus 1758	soumračník máčkový	2	120
<i>Pyrgus malvae</i>	Linnaeus 1758	soumračník jahodníkový	5	69
<i>Pyrgus carthami</i>	Hübner 1813	soumračník proskurníkový	3	62
<i>Pyrgus serratulae</i>	Rambur 1839	soumračník mochnový	8	78
<i>Pyrgus armonicus</i>	Oberthür 1910	soumračník podobný	8	193
<i>Pyrgus alveus</i>	Hübner 1803	soumračník bělopásný	4	201
<b>Pieridae</b>			<b>147</b>	<b>3610</b>
<i>Leptidea juvernica</i>	Williams 1946	bělásek luční	4	176
<i>Leptidea sinapis</i>	Linnaeus 1758	bělásek hrachorový	6	493
<i>Gonepteryx rhamni</i>	Linnaeus 1758	žlutásek řešetlákový	4	184
<i>Colias hyale</i>	Linnaeus 1758	žlutásek čičorečkový	7	114
<i>Colias alfaciensis</i>	Ribbe 1905	žlutásek jižní	10	153
<i>Colias erate</i>	Esper 1805	žlutásek tolicový	4	33
<i>Colias crocea</i>	Geoffroy 1785	žlutásek čilimníkový	7	284
<i>Colias palaeno</i>	Linnaeus 1760	žlutásek borůvkový	43	120
<i>Aporia crataegi</i>	Linnaeus 1758	bělásek ovocný	8	138
<i>Pontia edusa</i>	Fabricius 1777	bělásek rezedkový	4	147
<i>Pieris brassicae</i>	Linnaeus 1758	bělásek zelný	4	266

<i>Pieris rapae</i>	Linnaeus 1758	bělásek řepový	28	870
<i>Pieris bryoniae</i>	Hübner 1806	bělásek horský	4	70
<i>Pieris napi</i>	Linnaeus 1758	bělásek řepkový	6	299
<i>Pieris mannii</i>	Mayer 1851	bělásek jižní	2	113
<i>Anthocharis cardamines</i>	Linnaeus 1758	bělásek řeřichový	6	150
<b>Riodinidae</b>			<b>2</b>	<b>47</b>
<i>Hamearis lucina</i>	Linnaeus 1758	pestrobarvec petrklíčový	2	47
<b>Lycaenidae</b>			<b>322</b>	<b>6083</b>
<i>Lycaena helle</i>	Denis & Schiffermüller 1775	ohniváček rdesnový	1	35
<i>Lycaena alciphron</i>	Rottemburg 1775	ohniváček modrolesklý	6	91
<i>Lycaena dispar</i>	Haworth 1802	ohniváček černočárny	9	101
<i>Lycaena hippothoe</i>	Linnaeus 1760	ohniváček modroleký	6	83
<i>Lycaena phlaeas</i>	Linnaeus 1760	ohniváček černokřídlý	8	290
<i>Lycaena virgaureae</i>	Linnaeus 1758	ohniváček celíkový	7	80
<i>Lycaena tityrus</i>	Poda 1761	ohniváček černoskvrnný	6	129
<i>Thecla betulae</i>	Linnaeus 1758	ostruháček březový	2	57
<i>Favonius quercus</i>	Linnaeus 1758	ostruháček dubový	2	117
<i>Callophrys rubi</i>	Linnaeus 1758	ostruháček ostružinový	5	183
<i>Satyrrium pruni</i>	Linnaeus 1758	ostruháček švestkový	9	36
<i>Satyrrium ilicis</i>	Esper 1779	ostruháček česvinový	6	79
<i>Satyrrium w-album</i>	Knoch 1782	ostruháček jilmový	4	49
<i>Satyrrium spini</i>	Denis & Schiffermüller 1775	ostruháček tmkový	5	92
<i>Satyrrium acaciae</i>	Fabricius 1787	ostruháček kapiniový	8	54
<i>Celastrina argiolus</i>	Linnaeus 1758	modrásek krušinový	2	251
<i>Phengaris alcon</i>	Denis & Schiffermüller 1775	modrásek hořcový	4	63
<i>Phengaris arion</i>	Linnaeus 1758	modrásek černoskvrnný	7	76
<i>Phengaris teleius</i>	Bergsträsser 1779	modrásek očkovaný	9	172
<i>Phengaris nausithous</i>	Bergsträsser 1779	modrásek bahenní	5	140
<i>Pseudophilotes vicrama</i>	Moore 1865	modrásek východní	6	115
<i>Pseudophilotes baton</i>	Bergsträsser 1779	modrásek černočárny	7	89
<i>Leptotes pirithous</i>	Linnaeus 1767	modrásek tažný	1	144
<i>Scolitantides orion</i>	Pallas 1771	modrásek rozchodníkový	9	40
<i>Glaucopsyche alexis</i>	Poda 1761	modrásek kozincový	4	202
<i>Cupido argiades</i>	Pallas 1771	modrásek štírovníkový	6	93
<i>Cupido decoloratus</i>	Staudinger 1886	modrásek tolicový	6	18
<i>Cupido alcetas</i>	Hoffmansegg 1804	modrásek čičorkový	3	62
<i>Cupido minimus</i>	Fuessly 1775	modrásek nejmenší	8	192
<i>Plebejus argus</i>	Linnaeus 1758	modrásek černočárny	11	293
<i>Plebejus idas</i>	Linnaeus 1760	modrásek obecný	3	330
<i>Plebejus argyrognomon</i>	Bergsträsser 1779	modrásek podobný	18	60
<i>Agriades optilete</i>	Knoch 1781	modrásek stříbroskvrnný	4	224



<i>Aricia eumedon</i>	Esper 1780	modrásek bělopásný	6	98
<i>Cyaniris semiargus</i>	Rottemburg 1775	modrásek lesní	7	145
<i>Aricia artaxerxes</i>	Fabricius 1793	modrásek pumpavový	13	201
<i>Aricia agestis</i>	Denis & Schiffermüller 1775	modrásek tmavohnědý	21	318
<i>Polyommatus bellargus</i>	Rottemburg 1775	modrásek jetelový	11	119
<i>Polyommatus coridon</i>	Poda 1761	modrásek vikvicový	8	120
<i>Polyommatus thersites</i>	Cantener 1835	modrásek vičencový	15	92
<i>Polyommatus daphnis</i>	Denis & Schiffermüller 1775	modrásek hnědoskvrný	2	83
<i>Polyommatus amandus</i>	Schneider 1792	modrásek ušlechtilý	8	74
<i>Polyommatus dorylas</i>	Denis & Schiffermüller 1775	modrásek komonicový	9	101
<i>Polyommatus icarus</i>	Rottemburg 1775	modrásek jehlicový	22	621
<i>Polyommatus damon</i>	Denis & Schiffermüller 1775	modrásek ligrusový	3	71
<b>Nymphalidae</b>			<b>534</b>	<b>8389</b>
<i>Neptis rivularis</i>	Scopoli 1763	bělopásek tavníkový	1	32
<i>Limenitis populi</i>	Linnaeus 1758	bělopásek topolový	2	17
<i>Limenitis camilla</i>	Linnaeus 1764	bělopásek dvouřadý	4	54
<i>Issoria lathonia</i>	Linnaeus 1758	perleťovec malý	8	152
<i>Brenthis hecate</i>	Denis & Schiffermüller 1775	perleťovec dvouřadý	2	39
<i>Brenthis ino</i>	Rottemburg 1775	perleťovec kopřivový	7	97
<i>Brenthis daphne</i>	Bergsträsser 1780	perleťovec ostružinový	9	99
<i>Argynnis paphia</i>	Linnaeus 1758	perleťovec stříbropásek	5	142
<i>Argynnis aglaja</i>	Linnaeus 1758	perleťovec velký	5	129
<i>Argynnis niobe</i>	Linnaeus 1758	perleťovec maceškový	2	95
<i>Argynnis adippe</i>	Denis & Schiffermüller 1775	perleťovec prostřední	4	110
<i>Boloria eunomia</i>	Esper 1800	perleťovec mokřadní	21	289
<i>Boloria aquilonaris</i>	Stichel 1908	perleťovec severní	1	37
<i>Boloria selene</i>	Denis & Schiffermüller 1775	perleťovec dvanáctitečný	18	140
<i>Boloria euphrosyne</i>	Linnaeus 1758	perleťovec fialkový	2	135
<i>Boloria dia</i>	Linnaeus 1767	perleťovec nejmenší	9	82
<i>Apatura iris</i>	Linnaeus 1758	batolec duhový	6	44
<i>Apatura ilia</i>	Denis & Schiffermüller 1775	batolec červený	3	62
<i>Araschnia levana</i>	Linnaeus 1758	babočka sítkovaná	5	67
<i>Vanessa cardui</i>	Linnaeus 1758	babočka bodláková	2	301
<i>Vanessa atalanta</i>	Linnaeus 1758	babočka admirál	3	229
<i>Inachis io</i>	Linnaeus 1758	babočka paví oko	5	99
<i>Aglais urticae</i>	Linnaeus 1758	babočka kopřivová	6	168
<i>Polygonia c-album</i>	Linnaeus 1758	babočka bílé C	3	147

<i>Nymphalis polychloros</i>	Linnaeus 1758	babočka jilmová	5	88
<i>Nymphalis xanthomelas</i>	Esper 1781	babočka vrbová	3	18
<i>Nymphalis antiopa</i>	Linnaeus 1758	babočka osiková	4	98
<i>Euphydryas aurinia</i>	Rottemburg 1775	hnědásek chrastavcový	6	175
<i>Euphydryas maturna</i>	Linnaeus 1758	hnědásek osikový	10	37
<i>Melitaea didyma</i>	Esper 1778	hnědásek květelový	10	249
<i>Melitaea cinxia</i>	Linnaeus 1758	hnědásek kostkovaný	4	132
<i>Melitaea diamina</i>	Lang 1789	hnědásek rozrazilový	5	82
<i>Melitaea britomartis</i>	Assmann 1847	hnědásek podunajský	41	56
<i>Melitaea athalia</i>	Rottemburg 1775	hnědásek jitrocelový	12	217
<i>Melitaea aurelia</i>	Nickerl 1850	hnědásek černýšový	28	101
<i>Coenonympha pamphilus</i>	Linnaeus 1758	okáč poháňkový	9	305
<i>Coenonympha tullia</i>	Müller 1764	okáč stříbrooký	23	360
<i>Coenonympha glycerion</i>	Borkhausen 1788	okáč třeslicový	3	78
<i>Coenonympha arcania</i>	Linnaeus 1760	okáč strdivkový	4	120
<i>Pararge aegeria</i>	Linnaeus 1758	okáč pýrový	6	351
<i>Lasiommata maera</i>	Linnaeus 1758	okáč ječmínkový	6	186
<i>Lasiommata megera</i>	Linnaeus 1767	okáč zední	4	374
<i>Melanargia galathea</i>	Linnaeus 1758	okáč bojínkový	25	201
<i>Hipparchia hermione</i>	Linnaeus 1764	okáč bělopásný	1	70
<i>Hipparchia fagi</i>	Scopoli 1763	okáč medyňkový	2	75
<i>Hipparchia semele</i>	Linnaeus 1758	okáč metlicový	3	116
<i>Minois dryas</i>	Scopoli 1763	okáč ovsový	8	63
<i>Brintesia circe</i>	Fabricius 1775	okáč voňavkový	8	104
<i>Arethusana arethusana</i>	Denis & Schiffermüller 1775	okáč kostřavový	4	72
<i>Chazara briseis</i>	Linnaeus 1764	okáč skalní	9	129
<i>Aphantopus hyperantus</i>	Linnaeus 1758	okáč prosíčkový	19	121
<i>Maniola jurtina</i>	Linnaeus 1758	okáč luční	83	772
<i>Lopinga achine</i>	Scopoli 1763	okáč jílkový	3	40
<i>Erebia euryale</i>	Esper 1805	okáč rudopásný	16	305
<i>Erebia ligea</i>	Linnaeus 1758	okáč černohnědý	13	95
<i>Erebia sudetica</i>	Staudinger 1861	okáč menší	5	16
<i>Erebia medusa</i>	Denis & Schiffermüller 1775	okáč rosičkový	5	79
<i>Erebia aethiops</i>	Esper 1777	okáč kluběnkový	2	92
<i>Erebia epiphron</i>	Knoch 1783	okáč horský	12	246
		<b>CELKEM</b>	<b>1119</b>	<b>21370</b>
			<b>22489</b>	

Příloha II. Seznam testovaných druhů českých denních motýlů na přítomnost bakterie *Wolbachia* s počtem testovaných a pozitivních vzorků včetně výčtu specifických kmenů bakterie.

Druh (latinsky)	Počet testovaných vzorků	Počet pozitivních vzorků	Kmeny bakterie <i>Wolbachia</i>
<i>Aglais urticae</i>	7	1	593
<i>Anthocharis cardamines</i>	6	1	564
<i>Apatura ilia</i>	4	0	-
<i>Apatura iris</i>	5	3	61, 564, 577
<i>Aphantopus hyperantus</i>	19	6	297
<i>Aporia crataegi</i>	5	0	-
<i>Araschnia levana</i>	8	6	40
<i>Arethusana arethusa</i>	18	1	583
<i>Argynnis adippe</i>	4	0	-
<i>Argynnis aglaja</i>	5	2	564, 583
<i>Argynnis niobe</i>	2	0	-
<i>Argynnis paphia</i>	6	4	10, 581/116
<i>Aricia agestis</i>	9	6	18,594, 631
<i>Aricia artaxerxes</i>	13	12	18, 594
<i>Aricia eumedon</i>	6	0	-
<i>Boloria aquilonaris</i>	1	1	564
<i>Boloria dia</i>	8	2	10
<i>Boloria eunomia</i>	1	0	-
<i>Boloria euphrosyne</i>	2	0	-
<i>Boloria selene</i>	7	0	-
<i>Brenthis daphne</i>	9	0	-
<i>Brenthis ino</i>	10	2	63, 698
<i>Brintesia circe</i>	8	0	-
<i>Callophrys rubi</i>	6	4	431, 663
<i>Carcharodus alceae</i>	6	1	61
<i>Carterocephalus palaemon</i>	5	5	564, 698
<i>Celastrina argiolus</i>	5	5	10, 577
<i>Coenonympha arcania</i>	5	5	564, 698
<i>Coenonympha glycerion</i>	10	0	-
<i>Coenonympha pamphilus</i>	9	5	583, 584
<i>Coenonympha tullia</i>	25	14	10, 561, 577, 581
<i>Colias alfacariensis</i>	8	8	561, 561/694
<i>Colias crocea</i>	6	6	61, 605
<i>Colias erate</i>	4	4	61, 593, 605
<i>Colias hyale</i>	8	8	294, 561
<i>Colias myrmidone</i>	2	1	583
<i>Cupido alcetas</i>	3	3	577

<i>Cupido argiades</i>	7	5	10, 577
<i>Cupido decoloratus</i>	2	1	577
<i>Cupido minimus</i>	7	1	581/116
<i>Cyaniris semiargus</i>	6	1	10
<i>Erebia aethiops</i>	2	1	63
<i>Erebia epiphron</i>	13	4	61, 296, 593
<i>Erebia euryale</i>	16	4	564, 698, 561/694, 581/116
<i>Erebia ligea</i>	14	7	521, 698
<i>Erebia medusa</i>	7	6	10, 561, 564, 561/694
<i>Erebia sudetica</i>	1	0	-
<i>Erebia tages</i>	6	6	61, 593, 605
<i>Euphydryas maturna</i>	9	3	577, 581, 698
<i>Favonius quercus</i>	4	1	10
<i>Glaucopsyche alexis</i>	1	0	-
<i>Gonepteryx rhamni</i>	4	1	698
<i>Hamearis lucina</i>	1	1	577
<i>Hesperia comma</i>	11	7	296, 581, 583, 581/116
<i>Heteropterus morpheus</i>	6	3	561, 561/694
<i>Hipparchia fagi</i>	3	2	61, 593
<i>Hipparchia hermione</i>	2	1	594
<i>Chazara briseis</i>	16	0	-
<i>Inachis io</i>	5	1	10
<i>Iphiclides podalirius</i>	4	4	577
<i>Issoria lathonia</i>	7	1	564
<i>Lasiommata maera</i>	8	4	564, 698, 700
<i>Lasiommata megera</i>	6	0	-
<i>Leptidea juvernica</i>	9	6	10, 577
<i>Leptidea sinapis</i>	5	5	577
<i>Leptotes pirithous</i>	1	0	-
<i>Limenitis camilla</i>	5	0	-
<i>Limenitis populi</i>	4	2	10, 577
<i>Lopinga achine</i>	7	3	605, 698
<i>Lycaena alciphron</i>	6	0	-
<i>Lycaena dispar</i>	10	1	575
<i>Lycaena hippothoe</i>	5	0	-
<i>Lycaena phlaeas</i>	7	6	564, 581, 583, 581/116
<i>Lycaena tityrus</i>	7	7	10, 583, 594
<i>Lycaena virgaureae</i>	7	6	698
<i>Maniola jurtina</i>	19	1	583
<i>Melanargia galathea</i>	8	7	61, 564, 593, 698
<i>Meleageria athalia</i>	10	2	583, 700
<i>Meleageria aurelia</i>	27	3	73, 538, 672
<i>Meleageria britomartis</i>	45	8	199, 561, 577, 583, 584, 698
<i>Meleageria cinxia</i>	4	1	639
<i>Meleageria diamina</i>	5	3	64, 581, 606

<i>Meleageria didyma</i>	14	8	561, 577, 583, 593, 605, 581/116
<i>Minois dryas</i>	9	9	564, 581, 581/116
<i>Neptis rivularis</i>	3	2	63, 583
<i>Nymphalis antiopa</i>	2	1	695
<i>Nymphalis polychloros</i>	5	2	564, 695
<i>Nymphalis xanthomelas</i>	4	3	270
<i>Ochlodes sylvanus</i>	5	5	698
<i>Papilio machaon</i>	3	2	10, 577
<i>Pararge aegeria</i>	9	9	10, 577
<i>Parnassius mnemosyne</i>	27	4	61, 564, 581, 593
<i>Phengaris alcon</i>	12	6	575, 721
<i>Phengaris arion</i>	7	7	683, 685
<i>Phengaris nausithous</i>	4	1	10
<i>Phengaris teleius</i>	11	4	564, 575, 583
<i>Pieris brassicae</i>	5	2	10
<i>Pieris mannii</i>	5	1	10
<i>Pieris napi</i>	6	1	10
<i>Pieris rapae</i>	15	4	10, 61, 561
<i>Plebejus argus</i>	14	2	431, 561
<i>Plebejus argyrognomon</i>	23	10	294, 561
<i>Plebejus idas</i>	7	3	292, 294, 564
<i>Polygonia c-album</i>	4	3	577
<i>Polyommatus amandus</i>	10	5	19, 583, 593, 605
<i>Polyommatus bellargus</i>	10	3	10, 561, 639
<i>Polyommatus coridon</i>	5	1	593
<i>Polyommatus damon</i>	1	1	61
<i>Polyommatus daphnis</i>	1	1	564
<i>Polyommatus dorylas</i>	6	3	581/116
<i>Polyommatus icarus</i>	21	2	577, 593
<i>Polyommatus thersites</i>	6	1	18
<i>Pontia edusa</i>	3	3	577
<i>Pseudophilotes baton</i>	5	2	561
<i>Pseudophilotes vicrama</i>	4	0	-
<i>Pyrgus alveus</i>	6	3	583, 561/694
<i>Pyrgus armonicanus</i>	3	0	-
<i>Pyrgus carthami</i>	5	0	-
<i>Pyrgus malvae</i>	8	7	561, 583, 561/694
<i>Pyrgus serratulae</i>	8	3	10, 577
<i>Satyrium acaciae</i>	9	9	10, 577
<i>Satyrium ilicis</i>	5	4	23, 612
<i>Satyrium pruni</i>	11	6	23, 612
<i>Satyrium w-album</i>	4	4	10, 577
<i>Scolitantides orion</i>	6	1	564
<i>Spialia sertorius</i>	7	1	581
<i>Thecla betulae</i>	1	0	-

<i>Thymelicus acteon</i>	7	4	583, 581/116
<i>Thymelicus lineola</i>	12	2	564, 577
<i>Thymelicus sylvestris</i>	8	3	10, 564
<i>Vanessa atalanta</i>	3	0	-
<i>Vanessa cardui</i>	2	1	10
<i>Zerynthia polyxena</i>	2	0	-
<b>CELKEM</b>	<b>997</b>	<b>401</b>	

Příloha III. Přehled všech nalezených kmenů bakterie *Wolbachia* a jimi infikovaných druhů.

Kmen	Druhy infikovaných motýlů
10	<i>Boloria dia</i> , <i>Cyaniris semiargus</i> , <i>Favonius quercus</i> , <i>Inachis io</i> , <i>Phengaris nausithous</i> , <i>Pieris brassicae</i> , <i>Pieris manni</i> , <i>Pieris napi</i> , <i>Vanessa cardui</i> , <i>Erebia medusa</i> , <i>Coenonympha tullia</i> , <i>Polyommatus bellargus</i> , <i>Thymelicus sylvestris</i> , <i>Celastrina argiolus</i> , <i>Cupido argiades</i> , <i>Leptidea juvernica</i> , <i>Limenitis populi</i> , <i>Papilio machaon</i> , <i>Pararge aegeria</i> , <i>Pyrgus serratulae</i> , <i>Satyrium acaciae</i> , <i>Satyrium w-album</i> , <i>Argynnis paphia</i> , <i>Lycaena tityrus</i> , <i>Pieris rapae</i>
18	<i>Polyommatus thersites</i> , <i>Aricia artaxerxes</i> , <i>Aricia agestis</i>
19	<i>Polyommatus amandus</i>
23	<i>Satyrium ilicis</i> , <i>Satyrium pruni</i>
40	<i>Araschnia levana</i>
61	<i>Carcharodus alceae</i> , <i>Polyommatus damon</i> , <i>Pieris rapae</i> , <i>Erebia epiphron</i> , <i>Apatura iris</i> , <i>Parnassius mnemosyne</i> , <i>Melanargia galathea</i> , <i>Hipparchia fagi</i> , <i>Colias erate</i> , <i>Erebia tages</i> , <i>Colias crocea</i>
63	<i>Erebia aethiops</i> , <i>Neptis rivularis</i> , <i>Brenthis ino</i>
64	<i>Meleageria diamina</i>
73	<i>Meleageria aurelia</i>
199	<i>Meleageria britomartis</i>
270	<i>Nymphalis xanthomelas</i>
292	<i>Plebejus idas</i>
294	<i>Plebejus idas</i> , <i>Colias hyale</i> , <i>Plebejus argyrognomon</i>
296	<i>Hesperia comma</i> , <i>Erebia epiphron</i>
297	<i>Aphantopus hyperantus</i>
431	<i>Plebejus argus</i> , <i>Callophrys rubi</i>
521	<i>Erebia ligea</i>
538	<i>Meleageria aurelia</i>
561 561/694	<i>Pseudophilotes baton</i> , <i>Erebia medusa</i> , <i>Coenonympha tulila</i> , <i>Polyommatus bellargus</i> , <i>Pieris rapae</i> , <i>Meleageria britomartis</i> , <i>Plebejus argyrognomon</i> , <i>Colias hyale</i> , <i>Plebejus argus</i> , <i>Colias alfacariensis</i> , <i>Heteropterus morpheus</i> , <i>Meleageria didyma</i> , <i>Pyrgus malvae</i> , <i>Erebia medusa</i> , <i>Coenonympha tulila</i> , <i>Colias alfacariensis</i> , <i>Heteropterus morpheus</i> , <i>Pyrgus malvae</i> , <i>Erebia euryale</i> , <i>Pyrgus alveus</i>
564	<i>Anthocharis cardamines</i> , <i>Boloria aquilonaris</i> , <i>Issoria lathonia</i> , <i>Polyommatus daphnis</i> , <i>Scolitantides orion</i> , <i>Erebia medusa</i> , <i>Coenonympha tulila</i> , <i>Thymelicus sylvestris</i> , <i>Plebejus idas</i> , <i>Phengaris teleius</i> , <i>Thymelicus lineola</i> , <i>Minois dryas</i> , <i>Lycaena phlaeas</i> , <i>Argynnis aglaja</i> , <i>Nymphalis polychloros</i> , <i>Carterocephalus palaemon</i> , <i>Coenonympha arcania</i> , <i>Erebia euryale</i> , <i>Lasiommata maera</i> , <i>Apatura iris</i> , <i>Parnassius mnemosyne</i> , <i>Melanargia galathea</i>

575	<i>Lycaena dispar, Phengaris teleius, Phengaris alcon</i>
577	<i>Cupido alcetas, Cupido decoloratus, Hamearis lucina, Iphiclides podalirius, Leptidea sinapis, Polygonia c-album, Pontia edusa, Celastrina argiolus, Cupido argiades, Leptidea juvernica, Limenitis populi, Papilio machaon, Pararge aegeria, Pyrgus serratulae, Satyrium acaciae, Satyrium w-album, Meleageria britomartis, Meleageria didyma, Thymelicus lineola, Euphydryas maturna, Polyommatus icarus, Apatura iris</i>
581 581/116	<i>Spialia sertorius, Hesperia comma, Minois dryas, Lycaena phlaeas, Euphydryas maturna, Parnassius mnemosyne, Meleageria diamina, Argynnis paphia, Hesperia comma, Meleageria didyma, Minois dryas, Lycaena phlaeas, Erebia euryale, Cupido minimus, Polyommatus dorylas, Thymelicus acteon</i>
583	<i>Arethusana arethusa, Colias myrmidone, Maniola jurtina, Lycaena tityrus, Polyommatus amandus, Meleageria britomartis, Hesperia comma, Meleageria didyma, Pyrgus malvae, Phengaris teleius, Lycaena phlaeas, Argynnis aglaja, Pyrgus alveus, Thymelicus acteon, Coenonympha pamphilus, Meleageria athalia, Neptis rivularis</i>
584	<i>Meleageria britomartis, Coenonympha pamphilus</i>
593	<i>Aglais urticae, Polyommatus coridon, Polyommatus amandus, Meleageria didyma, Polyommatus icarus, Erebia epiphron, Parnassius mnemosyne, Melanargia galathea, Hipparchia fagi, Colias erate, Erebia tages</i>
594	<i>Hipparchia hermione, Lycaena tityrus, Aricia artaxerxes, Aricia agestis</i>
605	<i>Lopinga achine, Polyommatus amandus, Meleageria didyma, Colias erate, Erebia tages, Colias crocea</i>
606	<i>Meleageria diamina</i>
612	<i>Satyrium ilicis, Satyrium pruni</i>
631	<i>Aricia agestis</i>
639	<i>Meleageria cinxia, Polyommatus bellargus</i>
663	<i>Callophrys rubi</i>
672	<i>Meleageria aurelia</i>
683	<i>Phengaris arion</i>
685	<i>Phengaris arion</i>
695	<i>Nymphalis antiopa, Nymphalis polychloros</i>
698	<i>Lopinga achine, Gonepteryx rhamni, Lycaena virgaureae, Ochlodes sylvanus, Meleageria britomartis, Erebia ligea, Coenonympha arcania, Carterocephalus palaemon, Erebia euryale, Lasiommata maera, Euphydryas maturna, Melanargia galathea, Brenthis ino</i>
700	<i>Lasiommata maera, Meleageria athalia</i>
721	<i>Phengaris alcon</i>



Příloha IV. Přehled kategorií linií přítomných v České republice s přiřazenými druhy rozdělné analýzou BAPS. Druhy, které byly zařazeny do dvou kategorií jsou označeny tučně.

Kategorie linie přítomné v ČR	Výčet zařazených druhů
(1) nízká diverzita (pouze jeden klastř v celém druhu)	<i>Heteropterus morpheus, Spialia sertorius, Ochloides sylvanus, Erynnis tages, Colias crocea, Colias erate, Leptidea sinapis, Iphiclides podalirius, Nymphalis antiopa, Vanessa atalanta, Polygonia c-album, Vanessa cardui, Inachis io, Apatura iris, Issoria lathonia, Araschnia levana, Argynnis paphia, Neptis rivularis, Nymphalis xanthomelas, Lopinga achine, Brintesia circe, Minois dryas, Erebia euryale, Erebia medusa, Coenonympha tulila, Phengaris alcon, Cupido argiades, Celastrina argiolus, Plebejus argyrognomon, Thecla betulae, Cupido decoloratus, Lycaena dispar, Lycaena helle, Satyrium ilicis, Hamearis lucina, Satyrium pruni, Lycaena virgaureae</i>
(2) evropské linie (linie široce rozšířené po Evropě včetně ČR)	<i>Thymelicus acteon, Anthocharis cardamines, Aporia crataegi, Pieris manni, Gonepteryx rhamni, Euphydryas aurinia, Brenthis daphne, Brenthis hecate, Apatura ilia, Nymphalis polychloros, Boloria selene, Pararge aegeria, Erebia aethiops, Arethusana arethusa, Chazara briseis, Coenonympha glycerion, Coenonympha pamphilus, Hipparchia semele, Aricia agestis, Phengaris arion, Cyaniris semiargus, Lycaena tityrus, Satyrium w-album, <b>Carcharodus alceae, Limenitis camilla, Boloria dia, Cupido alcetas, Polyommatus amandus, Plebejus argus, Cupido minimus</b></i>
(3) mix evropských linií přítomných v ČR	<i>Thymelicus sylvestris, Pieris brassicae, Pieris napi, Colias palaeno, Pieris rapae, Papilio machaon, Melitaea aurelia, Aglais urticae, Aphantopus hyperantus, Satyrium acaciae, Polyommatus icarus, Callophrys rubi</i>
(4) západní linie (vzorky z ČR jsou příbuzné se vzorky ze západní Evropy)	<i>Pyrgus armoricanus, Coenonympha arcania, Hipparchia hermione, Lasiommata megera, Erebia sudetica, Pseudophilotes baton, Lycaena hippothoe, Lycaena phlaeas, Leptotes pirithous, Favonius quercus, <b>Pyrgus serratulae</b></i>
(5) příbuznost Apeniny/Balkán	<i>Hesperia comma, Erebia ephron, Polyommatus dorylas, Aricia eumedon, Satyrium spini, <b>Polyommatus amandus, Plebejus argus, Cupido</b></i>

	<i>minimus</i> , <i>Pyrgus serratulae</i> , <i>Argynnis adippe</i> , <i>Melitaea cinxia</i> , <i>Polyommatus bellargus</i> , <i>Polyommatus thersites</i> , <i>Erebia ligea</i>
(6) příbuznost Balkán/východ (vzorky z ČR jsou příbuzné vzorkům z Balkánu nebo Balkánu + východní Evropa/Asie)	<i>Pyrgus alveus</i> , <i>Pyrgus carthami</i> , <i>Thymelicus lineola</i> , <i>Colias alfacariensis</i> , <i>Parnassius mnemosyne</i> , <i>Melitaea diamina</i> , <i>Melitaea didyma</i> , <i>Lasiommata maera</i> , <i>Lycaena alciphron</i> , <i>Aricia artaxerxes</i> , <i>Polyommatus coridon</i> , <i>Polyommatus daphnis</i> , <i>Scolitantides orion</i> , <i>Pseudophilotes vicrama</i> , <b><i>Carcharodus alceae</i></b> , <b><i>Cupido alcetas</i></b> , <b><i>Hipparchia fagi</i></b>
(7) středoevropská linie	<i>Zerynthia polyxena</i> , <i>Argynnis aglaja</i> , <i>Argynnis niobe</i> , <i>Melanargia galathea</i> , <b><i>Polyommatus thersites</i></b> , <b><i>Hipparchia fagi</i></b> , <b><i>Pieris bryoniae</i></b> , <b><i>Phengaris nausithous</i></b>
(8) kontinentálně-temperátní linie (vzorky z ČR jsou příbuzné vzorkům obývajícím podobný zeměpisný pás a linie není přítomna ve Středomoří)	<i>Carterocephalus palaemon</i> , <i>Colias hyale</i> , <i>Leptidea juvernica</i> , <i>Boloria aquilonaris</i> , <i>Boloria eunomia</i> , <i>Boloria euphrosyne</i> , <i>Brenthis ino</i> , <i>Euphydryas maturna</i> , <i>Limenitis populi</i> , <i>Glaucopsyche alexis</i> , <i>Polyommatus damon</i> , <i>Plebejus idas</i> , <i>Agriades optilete</i> , <i>Phengaris teleius</i> , <b><i>Limenitis camilla</i></b> , <b><i>Boloria dia</i></b> , <b><i>Argynnis adippe</i></b> , <b><i>Melitaea cinxia</i></b> , <b><i>Polyommatus bellargus</i></b> , <b><i>Pieris bryoniae</i></b> , <b><i>Phengaris nausithous</i></b>
(9) směs východních linií	<i>Pontia edusa</i> , <i>Melitaea athalia</i> , <i>Melitaea britomartis</i> , <i>Maniola jurtina</i> , <b><i>Erebia ligea</i></b>

Příloha V. Přehled kategorií vzniklých na základě polohy haplotypů nalezených v ČR a haplotypů od nich vzdálených s maximálně dvěma mutacemi. Druhy, které byly zařazeny do dvou kategorií jsou označeny tučně.

Kategorie haplotypových sítí	Výčet zařazených druhů
(1) nízká diverzita nebo expanze	<i>Heteropterus morpheus</i> , <i>Ochlodes sylvanus</i> , <i>Colias erate</i> , <i>Nymphalis antiopa</i> , <i>Polygonia c-album</i> , <i>Inachis io</i> , <i>Araschnia levana</i> , <i>Nymphalis xanthomelas</i> , <i>Minois dryas</i> , <i>Phengaris alcon</i> , <i>Cupido argiades</i> , <i>Phengaris arion</i> , <i>Pseudophilotes baton</i> , <i>Thecla betulae</i> , <i>Cupido decoloratus</i> , <i>Hamearis lucina</i> , <i>Satyrium pruni</i>
(2) nízká diverzita v rámci rozšířené linie	<i>Erynnis tages</i> , <i>Iphiclides podalirius</i> , <i>Apatura ilia</i> , <i>Issoria lathonia</i> , <i>Argynnis niobe</i> , <i>Argynnis paphia</i> , <i>Nymphalis polychloros</i> , <i>Neptis rivularis</i> , <i>Aglais urticae</i> , <i>Pararge aegeria</i> , <i>Satyrium acaciae</i> , <i>Celastrina argiolus</i> , <i>Lycaena dispar</i> , <i>Satyrium ilicis</i> , <i>Lycaena tityrus</i> , <i>Satyrium w-album</i> , <b><i>Boloria dia</i></b> , <b><i>Apatura iris</i></b> , <b><i>Polyommatus amandus</i></b>
(3) součást expandující rozšířené linie	<i>Thymelicus acteon</i> , <i>Pyrgus armoricanus</i> , <i>Carterocephalus palaemon</i> , <i>Spialia sertorius</i> , <i>Aporia crataegi</i> , <i>Colias crocea</i> , <i>Vanessa atalanta</i> , <i>Vanessa cardui</i> , <i>Erebia euryale</i> , <i>Coenonympha pamphilus</i> , <i>Phengaris teleius</i>
(4) součást stabilní rozšířené linie	<i>Pyrgus alveus</i> , <i>Pyrgus serratulae</i> , <i>Leptidea juvernica</i> , <i>Pieris manni</i> , <i>Gonepteryx rhamni</i> , <i>Leptidea sinapis</i> , <i>Boloria selene</i> , <i>Erebia aethiops</i> , <i>Arethusana arethusana</i> , <i>Coenonympha glycerion</i> , <i>Erebia medusa</i> , <i>Hipparchia semele</i> , <i>Aricia agestis</i> , <i>Plebejus argus</i> , <i>Lycaena hippothoe</i> , <i>Cyaniris semiargus</i> , <b><i>Carcharodus alceae</i></b>
(5) střeoevropská linie	<i>Zerynthia polyxena</i> , <i>Argynnis aglaja</i> , <i>Boloria aquilonaris</i> , <i>Boloria eunomia</i> , <i>Melanargia galathea</i> , <i>Plebejus argyrognomon</i> , <b><i>Pieris bryoniae</i></b> , <b><i>Polyommatus thersites</i></b>
(6) příbuznost Balkán/východ	<i>Thymelicus lineola</i> , <i>Hipparchia fagi</i> , <i>Colias alfacariensis</i> , <i>Parnassius mnemosyne</i> , <i>Melitaea diamina</i> , <i>Melitaea didyma</i> , <i>Euphydryas maturna</i> , <i>Lasiommata maera</i> , <i>Lycaena alciphron</i> , <i>Polyommatus coridon</i> , <i>Polyommatus dorylas</i> , <i>Scolitantides orion</i> , <i>Pseudophilotes vicrama</i> , <b><i>Carcharodus alceae</i></b> , <b><i>Cupido alcetas</i></b>
(7) kontinentálně-temperátní linie	<i>Pyrgus carthami</i> , <i>Colias hyale</i> , <i>Euphydryas aurinia</i> , <i>Melitaea britomartis</i> , <i>Brenthis daphne</i> , <i>Boloria</i>

	<i>euphrosyne, Brenthis ino, Limenitis populi, Lopinga achine, Coenonympha tulila, Glaucopsyche alexis, Aricia artaxerxes, Polyommatus damon, Polyommatus daphnis, Lycaena helle, Plebejus idas, <b>Phengaris nausithous, Agriades optilete, Pieris bryoniae, Argynnis adippe, Melitaea cinxia, Boloria dia</b></i>
(8) příbuznost se západem	<i>Coenonympha arcania, Hipparchia hermione, Lasioommata megera, Erebia sudetica, Lycaena phlaeas, Leptotes pirithous, Favonius quercus, <b>Apatura iris, Cupido alcetas</b></i>
(9) příbuznost Apeniny/Balkán	<i>Hesperia comma, Pontia edusa, Brenthis hecate, Chazara briseis, Erebia epiphron, Polyommatus bellargus, Aricia eumedon, Satyrium spini, Lycaena virgaureae, <b>Argynnis adippe, Melitaea cinxia, Polyommatus amandus, Polyommatus thersites</b></i>
(10) mix haplotypů	<i>Thymelicus sylvestris, Pieris brassicae, Anthocharis cardamines, Pieris napi, Colias palaeno, Pieris rapae, Papilio machaon, Melitaea athalia, Melitaea aurelia, Limenitis camilla, Brintesia circe, Aphantopus hyperantus, Maniola jurtina, Erebia ligea, Polyommatus icarus, Cupido minimus, Callophrys rubi</i>