

Škola doktorských studií v biologických vědách  
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

# **Chladová odolnost horských a nížinných motýlů**

Disertační práce

**Mgr. Pavel Vrba**

Školitel: doc. Mgr. Martin Konvička, Ph.D.  
Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, katedra zoologie  
Biologické centrum AVČR, v.v.i, Entomologický ústav

České Budějovice, 2015

This thesis should be cited as:

Vrba P, 2015: Chladová odolnost horských a nížinných motýlů. Ph.D. Thesis. University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic, 73 pp.

#### ■ Annotation

The thesis deals with ecophysiology of overwintering larvae of two butterfly genera, *Colias* and *Erebia*. It focuses on identification of supercooling point, survival of various low temperature regimes and composition of cryoprotective substances. Results are presented in the context of distributional limits of individual species, their habitat requirements and their potential endangerment due to environmental and habitat changes.

#### ■ Declaration

Prohlašuji, že svoji disertační práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 22.12.2014

.....

Pavel Vrba

This thesis originated from a partnership of Faculty of Science, University of South Bohemia, and Institute of Entomology, Biology Centre of the ASCR, supporting doctoral studies in the Entomology study programme.



Přírodovědecká  
fakulta  
Faculty  
of Science



#### ■ Financial support

Funding was provided by the Grant agency of the Czech Republic (P505/10/1630, P505/10/2167) and the University of South Bohemia (144/2010/100).

#### ■ Acknowledgements

I would like to thank my supervisor, Martin Konvička for his guidance, inspiration and support during my Ph.D. study. I am grateful to Oldřich Nedvěd for introducing me to methods of investigations of insect cold hardiness and Matthias Dolek for fruitful discussions about ecology of *Colias palaeno* butterfly. I'd also like to thank Simona Bonelli and Cristiana Cerrato who allowed me the remarkable fieldwork in Italian Alps. And finally, I am obliged to many friends and colleagues, who helped me in various stages of fieldwork and captive rearing of experimental material: Alena Bartoňová, Jiří Beneš, Dita Horázná, Gabriela Mikešová, David Novotný, Anežka Pavlíková, Irena Slámová, Michal Zapletal and Jitka Zelová.

## List of papers and author's contribution

The thesis is based on the following papers (listed chronologically):

- I. Vrba P., Konvička M., Nedvěd O., 2012: Reverse altitudinal cline in cold hardiness among *Erebia* butterflies. *CryoLetters* 33, 251–258. IF(2012)=0,837  
*Pavel Vrba reared experimental material, conducted the experiments and participated on data analysis and paper writing.*
  
- II. Vrba P., Dolek M., Nedvěd O., Zahradníčková H., Cerrato C., Konvička M., 2014: Overwintering of the boreal butterfly *Colias palaeno* in central Europe. *CryoLetters* 35, 247–254. IF(2013)=0,640  
*Pavel Vrba participated on rearing of experimental material, conducted the experiments and participated on data analysis and paper writing.*
  
- III. Vrba P., Nedvěd O., Konvička M., 2014: Contrasting supercooling ability in lowland and mountain European *Colias* butterflies. *Journal of Entomological Science* 49, 63–69. IF(2013)=0,367  
*Pavel Vrba reared experimental material, conducted the experiments and data analysis, participated on paper writing.*

Co-author agreement:

Pavel Vrba declares that he is the first author of all presented papers. Oldřich nedvěd, the co-author of all presented papers, fully acknowledges the major contribution of Pavel Vrba in all presented papers.

.....  
Oldřich Nedvěd

# Obsah

|   |    |
|---|----|
| Úvod.....   | 1  |
| Kapitola I.....   | 27 |
| Vrba P., Konvička M., Nedvěd O., 2012: Reverse altitudinal cline in cold<br>hardiness among <i>Erebia</i> butterflies. <i>CryoLetters</i> 33, 251–258.  |    |
| Kapitola II.....  | 41 |
| Vrba P., Dolek M., Nedvěd O., Zahradníčková H., Cerrato C., Konvička M.,<br>2014: Overwintering of the boreal butterfly <i>Colias palaeno</i> in central Europe.<br><i>CryoLetters</i> 35, 247–254. |    |
| Kapitola III.....   | 59 |
| Vrba P., Nedvěd O., Konvička M., 2014: Contrasting supercooling ability in<br>lowland and mountain European <i>Colias</i> butterflies. <i>Journal of Entomological<br/>    Science</i> 49, 63–69.   |    |
| Summary.....  | 71 |
| Future perspectives.....  | 72 |
| Appendix.....   | 73 |



## Úvod

Denní motýli jsou, díky své velikosti a nápadnosti, mezi odbornou i laickou veřejností velmi populární skupinou hmyzu. K dispozici jsou velmi dobré znalosti jejich rozšíření, biotopových nároků i etologie. Zároveň jde o skupinu v současnosti silně ohroženou (Van Swaay et al., 2010). Ve střední a západní Evropě dochází ve 2. polovině 20. století k výraznému ochuzování lokálních společenstev motýlů, hlavně díky dalekosáhlým změnám v zemědělství a lesnictví, které rozbily tradiční biotopovou mozaiku v krajině. Stále více biotopově náročnějších motýlů tak bylo vytlačeno do malých izolovaných refugií, v horším případě lokálně vymřelo (Beneš et al., 2002; Thomas, 2005; Gaston a Fuller, 2007).

Vzhledem k popularitě denních motýlů dokumentuje mnoho studií změny v areálech různých druhů v souvislosti s probíhajícími klimatickými změnami (Konvička et al., 2003; Parmesan et al., 1999; Wilson et al., 2005). Ty mohou z ochránářského hlediska představovat další problém, zvláště pro specializované horské druhy, žijící často na nevelkých a vzájemně izolovaných stanovištích (Schmitt et al., 2005, Dirnböck et al., 2011, Konvička et al. 2014). Poznání komplexních ekofyziologických adaptací, které tyto druhy omezují na klimaticky velmi specifické horské prostředí je proto velmi významné z hlediska budoucích ochránářských strategií. Vzhledem k jejich komplexnosti je jejich poznání stále neúplné. K jejich poznání přispívá tato práce, zaměřená na ekofyziologii vybraných druhů evropských horských a nížinných denních motýlů. Změny klimatických poměrů na stanovištích jistě postihují všechna vývojová stadia, v podmínkách střední Evropy je jednou z nejproblematictějších fází vývoje přezimování housenek, na které je práce zaměřena.

Nízké teploty jsou jedním z hlavních abiotických faktorů limitujících výskyt hmyzu i jiných organismů. Exotermní organismy mají značně limitované možnosti regulace tělesné teploty (Stevenson, 1985), jejich přežívání, zvláště v chladných severských nebo polárních oblastech limituje jednak získání dostatečného množství tepla pro dokončení vývoje v časově velmi omezené části sezóny (Roff, 1980), a především schopnost přežívání teplotních extrémů. Omezené možnosti regulace tělesné teploty u hmyzu závisí na velikosti těla a především na teplotě okolního prostředí (Stevenson, 1985). Ta často závisí i na stanovištní heterogenitě lokalit, která podmiňuje přítomnost různorodých úkrytů, osluněných a stinných míst a podobně. Aktivní

využívání mikroklimaticky vhodných mikroprostředí, odpovídající tvaru a velikosti těla daného druhu, představuje hlavní možnost regulace teploty těla (např. Bakken, 1976; Casey, 1992; Klečková et al. 2014). Etologické adaptace v diurnální i sezónní aktivitě tak spolu s vhodným výběrem mikrostanovišť mohou snížit pravděpodobnost vystavení extrémně nízkým teplotám (Somme, 1989; Huey, 1991). I přes to je však překonávání teplotních extrémů nutnou součástí přežití v chladných oblastech, což vyústilo ve vznik speciálních strategií a adaptací k jejich překonání.

## **Ekofyziologie hmyzu při nízkých teplotách**

Citlivost na nízké teploty je u hmyzu a dalších exotermních organismů determinována hlavně bodem mrznutí vody. Z hlediska biologických funkcí vody má výskyt mrazivých teplot velký vliv na organizaci společenstev, na úrovni jedinců má často letální efekt při promrznutí tělesných tekutin (Franks et al., 1990). Z těchto důvodů byla přežívání hmyzu při teplotách pod bodem mrazu věnována velká pozornost a první studie v 2. polovině 20. století vedly k odhalení dvou základních strategií. Hmyz (i ostatní exotermní organismy) přežívá nízké teploty buď udržováním tělesných tekutin v kapalném stavu (druhy k mrazu citlivé) nebo naopak schopností přežít tvorbu ledových krystalů v těle (druhy mrazu odolné) (Salt, 1961; Zachariassen, 1985). Toto rozdělení tvořilo po dlouhou dobu hlavní rámec pro studium ekofyziologie hmyzu za nízkých teplot, kdy došlo k dobrému pochopení mechanismů chladové odolnosti (např. Storey, 1997; Ramlov, 2000; Duman, 2001).

Druhy k mrazu citlivé (*freeze-avoiding species*) udržují tělní tekutiny v kapalném stavu i při teplotách pod bodem jejich mrznutí. Tato teplota, nazývaná bod podchlazení (*supercooling point*), je tedy pro přežití jedince klíčová a je v jeho zájmu ji při nepříznivých podmínkách dostatečně snížit. Hlavními užívanými mechanismy jsou odstranění pevných částic (sloužících jako krystalizační jádra) z trávicí trubice, akumulace látek, které snižují bod mrznutí tělesných tekutin a tvorba proteinů, které omezují tvorbu a růst krystalů v těle. Vzhledem sezónnosti klimatu na velké části zemského povrchu podléhá i stupeň chladové odolnosti takových druhů během roku značným změnám. Nižší chladovou odolnost hmyzích jedinců přijímajících potravu uvádí již Salt (1966). Obsah potravních částic ve střevě během příznivého období roku má velký vliv na zvýšení bodu podchlazení, protože tyto partikule slouží jako krystalizační jádra, přičemž toto zvýšení může být velmi výrazné, až o 20°C



(Zachariassen, 1985). Vyprázdnění trávicí trubice je tak podstatným krokem k výraznému snížení bodu podchlazení, jeho další snižování potom zajištěno akumulací různých látek, které fungují jako kryoprotektanty. Jsou to především polyoly a cukry (glycerol, sorbitol, trehalóza, glukóza) (Somme, 1982; Ramlov, 2000). Pro omezení funkce potenciálních krystalizačních jader jsou syntetizovány také specializované proteiny (Duman, 2001). Těmito mechanismy může hmyz bod podchlazení velmi výrazně snížit, např. až k  $-40^{\circ}\text{C}$  u píďalky *Epirrita autumnata* (Borkhausen, 1794) (Tenow a Nilssen, 1990) nebo arktického chvostoskoka *Gomphiocephalus hodgsoni* Carpenter 1908 (Sinclair a Sjursen, 2001).

Druhy mrazu odolné (*freeze-tolerant species*) vykazují obvykle vyšší teplotu mrznutí tělních tekutin (nejčastěji  $-5$  až  $-10^{\circ}\text{C}$ ) a úspěšně přežívají tvorbu ledových krystalů v těle. Ledové krystaly jsou však omezeny na extracelulární prostory, osmotickou dehydratací buněk je zajištěno, že k mrznutí nedojde uvnitř buněk (Ramlov, 2000). Napomáhají tomu i specializovaná nukleační tělíška (*ice nucleating agents*), která slouží jako krystalizační jádra a jsou syntetizována během podzimu v extracelulárních prostorech (Zachariassen, 1982). Jako kryoprotektanty jsou z velké části využívány obdobné chemické látky jako u druhů k mrazu citlivých, některé však hrají odlišnou roli – cukry jsou využívány k ochraně membrán, proteiny pak ke kontrole velikosti a rozložení ledových krystalů v těle (Zachariassen, 1985; Ramlov, 2000). Druhy hmyzu z této skupiny patří k teplotně nejodolnějším druhům na Zemi vůbec. Ve zmrzlém stavu jsou schopny přežít extrémně nízké teploty ( $-40$  až  $-80^{\circ}\text{C}$ ), tedy ve většině případů nižší než bod podchlazení u druhů k mrazu citlivých (Bale, 1996). Příkladem může být arktická můra *Gynaephora groenlandica* (Wocke, 1874) – její přezimující larvy mrznou zhruba při  $-8^{\circ}\text{C}$ , mohou však přežít až teploty kolem  $-70^{\circ}\text{C}$  (Kukal et al., 1988).

Jako zvláštní kategorie chladové odolnosti je někdy uváděna kryoprotektivní dehydratace, objevená u arktického chvostoskoka *Onychiurus arcticus* (Tullberg, 1876). Stejně jako další ostatní druhy tohoto řádu, i tento patří mezi druhy k mrazu citlivé. Bod podchlazení nastává během letního období již při hodnotě  $-6,5^{\circ}\text{C}$ , druh je však během zimy schopen přežít teploty klesající i pod  $-20^{\circ}\text{C}$  (Coulson et al., 1995; Block et al., 1994). Strategie spočívá ve velmi výrazné dehydrataci buněk (redukce vody na méně než 10% původního obsahu) spojené s produkcí trehalózy. Ta funguje jako anhydroprotektant s funkcí stabilizace buněčných membrán při ztrátě vody. Výsledkem je výrazné snížení bodu podchlazení až na hodnoty kolem  $-30^{\circ}\text{C}$ .

S přibývajícím studiem na poli chladové odolnosti hmyzu se stále více ukazuje, že toto základní rozdělení strategií je pouze rámcové a nemělo by být používáno jako jediné a hlavní měřítko chladové odolnosti. Například u některých druhů k mrazu citlivých lze skutečně pozorovat vysokou míru přežívání jedinců se snižující se teplotou až k bodu podchlazení, kde mortalita skokově vzroste. Příkladem mohou být prezimující vajíčka píďalky *Epirrita autumnata* (Tenow a Nilssen, 1990), z denních motýlů pak několik horských druhů studovaných v rámci této práce: žluťásek borůvkový (*Colias palaeno* (Linnaeus, 1761)) (Vrba et al., 2014), nebo horší okáči *Erebia sudetica* (Staudinger, 1861) a *Erebia tyndarus* (Esper, 1781) (Vrba et al., 2012). U takových druhů je skutečně hodnota bodu podchlazení hlavním a relevantním měřítkem chladové odolnosti. U jiných druhů ale nastává mortalita již při teplotách mnohem vyšších než bod podchlazení a tato tak nemůže být způsobena promrznutím tkání (Bale, 1987).

Mechanismy poškození nízkými teplotami nad bodem mrazu zůstávají relativně málo známé, největší vliv mají pravděpodobně změny konformace proteinů za nízkých teplot (Ramlov, 2000) a poškození lipidů v membránách (Turnock a Bodnaryk, 1991). Například u zavíječe *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller, 1775) byl v laboratorních podmínkách zjištěn bod podchlazení  $-24^{\circ}\text{C}$ , značná mortalita nastávala i při teplotách vysoko nad touto hodnotou (Andreadis et al., 2005). U anholocyklických mšic *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) nebo *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758), které mají v zimním období bod podchlazení mezi  $-24$  až  $-27^{\circ}\text{C}$  nastává výrazná mortalita již při krátkodobých expozicích teplotám o  $15 - 18^{\circ}\text{C}$  vyšších (Bale, 1996). Negativní efekt takových teplot potom velmi závisí na době expozice, letální efekt má akumulace chladového poškození při určité době expozice nízkým teplotám. U takových druhů je pak samotná hodnota bodu podchlazení velmi nespolehlivým indikátorem chladové odolnosti, zimní mortalita některých druhů je na ní zcela nezávislá (Bale, 1987; 1996). Někteří autoři tak navrhují podrobnější modely klasifikace chladové odolnosti, které kromě potenciálně letálního efektu zmrznutí zahrnují i kumulativní chladová poškození, která výrazněji závisí na době expozice (Bale, 1996; Nedvěd, 1998).

Reakce na nízké teploty je tedy většinou komplexnějšího charakteru. Velmi důležitý se zdá být právě faktor času, po který je hmyz exponován různým teplotám a pro plné pochopení teplotních limitů různých druhů je třeba experimentálně testovat kombinace teplot a dob expozice, které jsou pro dané druhy a jejich biotopy ekologicky relevantní (Turnock a Fields, 2005). Mortalita není způsobena jen teplotami nižšími než

bod podchlazení (které způsobí přímé promrznutí tkání), ale i akumulací chladového poškození při teplotách vyšších. Navíc, adaptace na tyto dva typy chladového poškození se zdají být na sobě nezávislé (Turnock et al., 1998).

Při posuzování těchto vlivů v ekologickém kontextu pak nesmíme zapomínat na konkrétní výběr mikrostanovišť pro přezimování. V souvislosti s výše zmíněnou regulací bodu podchlazení pomocí krystalizačních jader se zdá být velmi podstatný vliv vlhkosti na mikrostanovišti, protože voda nebo sníh při kontaktu s hmyzím tělem působí jako krystalizační jádra zvnějšku a mohou výrazně zvyšovat hodnotu bodu podchlazení. Výrazné zvýšení bodu podchlazení v přítomnosti vnější vlhkosti na exoskeletu bylo prokázáno u přezimujících monarchů (*Danaus plexippus* (Linnaeus, 1758)) (Larsen a Lee, 1994) a vlhkost na mikrostanovišti tak výrazně ovlivňuje jejich chladovou odolnost. Podobné výsledky jsme zjistili při pilotních experimentech s hibernujícími housenkami okáčů rodu *Erebia* (prozatím na malém počtu experimentálních jedinců – viz Apendix), kdy byly zjištěné body podchlazení při kontaktu těla larev s ledovou tříští výrazně vyšší než při předchozích experimentech a housenky byly navíc schopny toto zmrznutí při vyšší teplotě přežít. To ukazuje, že v přírodních podmínkách může být plasticita těchto strategií u jednotlivých druhů mnohem větší než se dříve předpokládalo (Turnock a Fields, 2005; Mercader a Scriber, 2008).

S teplotou a vlhkostí na mikrostanovištích při přezimování souvisí další důležitý faktor – sněhová pokrývka. Kromě výše zmíněného zvyšování bodu podchlazení při kontaktu s tělem hmyzu ale její přítomnost podstatně zvyšuje teplotu půdy (Gerland et al., 2000) a chrání organismy přezimující při zemi před vystavením extrémně nízkým teplotám. Pozitivní efekt sněhové pokrývky na přežívání zimujících housenek byl prokázán u severského přástevníka *Pyrrharctia isabella* (Smith, 1797) (Marshall a Sinclair, 2012) nebo můry *Mamestra configurata* (Walker, 1856) (Turnock et al., 1983). V kontextu současných klimatických změn, redukce zimní sněhové pokrývky byla pozorována na mnoha lokalitách (Dye, 2002; Kreyling a Hugh, 2011). To může představovat značné riziko pro druhy adaptované na přezimování sněhem chráněných mikrostanovištích. Příkladem může být okáč *Erebia tyndarus* – ačkoliv se jedná o vysokohorského motýla, letální teplota pro přezimující housenky se pohybuje kolem  $-8^{\circ}\text{C}$  (Vrba et al., 2012).

Samotná identifikace bodu podchlazení tedy nemůže být jediným vodítkem pro popis dynamických procesů chladové odolnosti u hmyzu, kdy chladové poškození i při relativně vyšších teplotách může hrát stejně důležitou roli jako poškození mrazem (Bale,

1987). Navíc, i měření skutečných letálních teplot v laboratorních podmínkách může při vyloučení některých environmentálních faktorů působících v přírodě značně zkreslovat informaci o přežívání zimního období v přírodních podmínkách (Bale, 1996).

### **Sezónní změny chladové odolnosti a aklimační mechanismy**

Na snižování negativního efektu nízkých teplot se velkou měrou podílí schopnost aklimatizace na nízké teploty, která nastává při méně extrémních teplotách předcházejících zimnímu období (Lee et al., 1987). Tyto adaptace byly popsány u druhů k mrazu odolných i citlivých a jsou velmi významné v oblastech Tato schopnost byla poprvé popsána u much *Sarcophaga crassipalpis* Macquart, 1839 a *Sarcophaga bullata* Parker, 1916. Za normálních podmínek přežilo dvouhodinovou expozici na  $-10^{\circ}\text{C}$  pouze asi 10% jedinců, hodnota přežívání však stoupla až na 90% po předchozí dvouhodinové expozici při  $0^{\circ}\text{C}$ . Tato příprava na nepříznivé podmínky je často spojena přímo se snižováním hodnoty bodu podchlazení, který se před nástupem teplotně nepříznivé části roku výrazně snižuje. Příkladem může být strategie výše zmíněného chvostoskoka *Onychiurus arcticus*, který díky dehydrataci buněk a jevům s ní spojeným dosahuje v zimním období bodu podchlazení kolem  $-30^{\circ}\text{C}$ , avšak v létě mrzne již při teplotách kolem  $-6,5^{\circ}\text{C}$  (Coulson et al., 1995; Block et al., 1994). Dalším příkladem, kde se autoři pokusili zobecnit vývoj chladové odolnosti a přežívání jedinců během sezóny, mohou být změny hodnot bodu podchlazení u horského kůrovce *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, 1902 (Coleoptera: Curculionidae). U tohoto druhu dochází rovněž v závislosti na teplotě ke změnám v hodnotách bodu podchlazení v rozmezí zhruba od  $-10^{\circ}\text{C}$  v letním období po asi  $-20^{\circ}\text{C}$  v zimě. Během sezóny lze rozlišit tři stupně chladové odolnosti: (1) v letním období larvy přijímají potravu a vykazují nízkou chladovou odolnost, (2) v podzimním a jarním období larvy nepřijímají potravu a vyprazdňují trávicí trubici (eliminace krystalizačních jader), (3) v zimním období se nacházejí ve stavu hluboké chladové odolnosti – obsahují vysoké koncentrace glycerolu a ochranných proteinů. (Regniere a Bentz, 2007).

Teplotní situace v přírodě ale může být dosti variabilní a živočichové musí často procházet mnoha cykly střídání vyšších a nižších teplot, opakujících se v krátké době. Mnohé studie ukazují, že při opakovaných krátkodobých přesunech hmyzích jedinců z nízkých teplot do vyšších se prodlužuje doba jejich přežívání. Například u potměníka *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) se doba přežívání při  $5^{\circ}\text{C}$  výrazně zvýšila při

každodenní dvouhodinové expozici teplotě 20°C (Renault et al., 2004). Pokud však byli brouci přeneseni na stejnou dobu do teplot 10 a 15 °C, rozdíl v době přežívání již byl mnohem méně výrazný. Rozdíl je zřejmě způsoben tím, že teplota 15°C představuje pro tento druh spodní práh vývoje. Při teplotách nad touto hodnotou tak může docházet k aktivní nápravě škod způsobených chladovým poškozením, například konformačních změn proteinů, které jsou často reverzibilními procesy (Franks, 1985). Právě ekofyziologické reakce hmyzu v tomto teplotním rozmezí (mezi nejvyšší teplotou již způsobující chladové poškození a spodním prahem pro normální metabolismus a vývoj) jsou i z ekologického hlediska velmi podstatné, doposud však známé jen pro minimum druhů (Turnock a Fields, 2005).

Zcela opačný efekt ale může mít střídání teplot pro druhy adaptované na přežití dlouhých období extrémně nízkých teplot v zimním období. U mouchy *Eurosta solidaginis* (Fitch, 1855) tak bylo prokázáno, že zvyšování teplot během zimního období (které jedinci přečkávají ve stavu vysoké adaptace na chlad a metabolickém klidu) vede k předčasnému vyčerpání metabolických rezerv a následnému zvýšení mortality i plodnosti přeživších jedinců (Irwin a Lee, 2000). Podobně, vyšší mortalita imág babočky paví oko (*Inachis io* (Linnaeus, 1758)) a b. kopřivové (*Aglais urticae* (Linnaeus, 1758)) byla pozorována u motýlů zimujících ve vyšších teplotách (Pullin a Bale, 1989). Simulace různých teplotních režimů během zimy u přezimujících kukel otakárka *Papilio canadensis* (Rothschild & Jordan, 1906) ukázaly, že jak vyšší teploty tak kratší zimní období působí rovněž značné zvýšení mortality a je zřejmě hlavním limitujícím faktorem určujícím jižní hranici areálu druhu (Mercader a Scriber, 2008). Výskyt stálých nízkých teplot během zimního období je tak pravděpodobně nutným faktorem pro mnoho druhů adaptovaných na překonání dlouhých období při nízkých teplotách a bez možnosti příjmu potravy (Tauber et al., 1986).

### **Vztah chladové odolnosti a diapauzy**

Další důležitou otázkou je souvislost mezi mechanismy zvyšování chladové odolnosti a diapauzou. Většina druhů hmyzu i ostatních členovců, obývajících chladnější biotopy překonává nepříznivé období roku ve stavu metabolického klidu – diapauzy (Danks, 1987). Diapauza i mechanismy chladové odolnosti jsou důležitými ekofyziologickými přizpůsobeními pro přežití nepříznivých podmínek, vztah mezi nimi však zatím není zcela objasněn (Denlinger, 1991; Izumi et al., 2007). Řada členovců vykazuje schopnost

zvyšovat odolnost proti chladu nezávisle na stadiu podléhajícímu diapauze (Denlinger, 1991). Příkladem může být pavouk *Achearanea tepidariorum* (Koch, 1841). Tento druh se vyskytuje v mírném i subtropickém pásu a ve všech oblastech výskytu prochází diapauzou, která je indukována zkracující se fotoperiodou (Tanaka, 1992). Schopnost významného snižování bodu podchlazení s příchodem nepříznivých podmínek však vykazují pouze populace obývající mírný pás. To ukazuje, že snižování bodu podchlazení při adaptaci na nepříznivé podmínky nemusí být nutně s diapauzou spojeno (Tanaka, 1997). Také u přezimujících kukel běláška zelného (*Pieris brassicae* (Linnaeus, 1758) nebyly zjištěny významné rozdíly v bodu podchlazení u diapauzujících a nediapauzujících jedinců; u obou skupin ale byl rozdíl v přežívání nízkých teplot nad bodem podchlazení (Pullin a Bale, 1989). U jiných studovaných druhů byly naopak zjištěny výrazné rozdíly v hodnotě bodu podchlazení mezi stejnými vývojovými stadii, z nichž jedna skupina diapauzu podstoupila a druhá nikoliv. Příkladem může být obaleč *Lobesia botrana* (Denis & Schiffermüller 1775), u kterého byly zjištěny významně nižší hodnoty bodu podchlazení u diapauzujících larev ve srovnání s larvami, které diapauzu nepodstoupily (Andreadis et al., 2005); podobné výsledky ukázalo i studium dalšího druhu obaleče, *Adoxophyes orana* (Fischer von Röslerstamm 1834) (Milonas a Savopoulou-Soultani, 1999). Rovněž při studiu molekulárních mechanismů chladové odolnosti u zavíječe *Chilo suppressalis* byla zjištěna syntéza většího množství ochranných proteinů u larev během diapauzy (Sonoda et al., 2006).

I když tedy vztah diapauzy a mechanismů chladové odolnosti není dosud detailně znám, oba děje spolu pravděpodobně těsně souvisejí hlavně v chladných oblastech, kde je schopnost diapauzy důležitou součástí strategií k překonání teplotně nepříznivé části sezóny (Hodkinson, 2005). V tomto kontextu může být navíc z dalšího hlediska podstatné (již výše zmíněné) časté střídání teplot během zimního období. Diapauza je dynamický proces s několika následnými fázemi a je iniciován ještě před započítím výrazně nepříznivých podmínek vnějšími stimuly, především fotoperiodou. Jakmile je nastartována, před proběhnutím všech nutných fází je ireverzibilní, tato fáze však končí ještě v průběhu zimy, relativně dlouho před návratem podmínek příznivých pro vývoj (Košťál, 2006). Například u hibernujících housenek okáče rosičkového (*Erebia medusa*), které byly vystaveny různým teplotním režimům během zimy, se housenky při relativně vyšších teplotách probouzely a pokračovaly ve vývoji již v únoru při teplotě 7°C. Ve srovnání s housenkami z chladnějších podmínek ale vykazovaly mnohem vyšší

mortalitu a následně menší hmotnost kukel a velikost imág (Stuhldreher et al., 2014). Ve studii zahrnuté v této práci (Vrba et al., 2012) ukazujeme, že na rozdíl od studovaných horských zástupců rodu *Erebia* jsou housenky tohoto druhu tolerantní ke zmrznutí, což by mohlo být z metabolického hlediska výhodnější v nižších polohách s větší variabilitou teplot a sněhové pokrývky během zimy (cf. Sinclair et al., 2003; Turnock a Fields, 2005). Tato částečně protichůdná zjištění ukazují opět na nutnost dalších a komplexnějších studií pro ekologicky relevantnější podmínky (Bale, 1996).

## **Evoluce mechanismů chladové odolnosti**

I přes variabilitu různých mechanismů v rámci obou hlavních strategií chladové odolnosti, můžeme citlivost či odolnost k mrznutí považovat za základní alternativní strategie pro překonávání nízkých teplot (Convey, 2000). Ani přes narůstající spektrum druhů, u kterých byly mechanismy chladové odolnosti studovány, zůstává nejasné, jaké faktory mají vliv na distribuci obou alternativních strategií mezi taxony (Sinclair et al., 2003). Většina druhů suchozemských členovců, u kterých byly tyto strategie studovány, náleží mezi druhy k mrazu citlivé (Block, 1991; Somme, 1999) a tato strategie se tedy zdá být fylogeneticky původní. Nasvědčuje tomu i takřka výlučný výskyt této strategie u bazálních skupin členovců (např. Somme, 1982). Mezi hmyzem je citlivost k mrznutí rovněž převládající strategií, nicméně s pokračujícími výzkumy byla mrazová odolnost potvrzena u mnoha řádů. U skupin Blattodea a Orthoptera byly dokonce nalezeny pouze druhy mrazu odolné; u zástupců řádů Coleoptera, Hymenoptera, Diptera a Lepidoptera byly zjištěny obě strategie (Sinclair et al., 2003). Vzhledem k distribuci obou strategií mezi taxony je tedy pravděpodobné, že citlivost k mrznutí je mezi členovci fylogeneticky bazální strategií a odolnost k mrazu se vyvinula několikrát a nezávisle na sobě u mnoha skupin.

Sinclair et al. (2003) předkládají hypotézu o výhodnosti každé z obou strategií v oblastech s různými klimatickými podmínkami. Druhy mrazu odolné většinou převažují v oblastech s velmi chladnými a předvídatelnými podmínkami během zimního období (jako jsou kontinentální a arktické oblasti), kde tato strategie zajišťuje jednak přežití dlouhého období velmi nízkých teplot a jednak větší toleranci k vyschnutí (Ring a Danks, 1994). Zajímavé je zjištění, že mezi studovanými hmyzími taxony převládá každá ze strategií v jiné zemské hemisféře – na severní polokouli patří do skupiny druhů k mrazu odolných pouze 29 % studovaných druhů, kdežto na jižní

polokouli celých 85 %. Výsledky by samozřejmě mohly být ovlivněny větším počtem studovaných taxonů na severní polokouli, podrobnější analýzy však ukázaly, že rozdíly v distribuci obou strategií jsou statisticky průkazné; rozšiřující se spektrum studovaných druhů na jižní polokouli tuto hypotézu dále potvrzuje (Sinclair a Chown, 2005). Možné vysvětlení spočívá v rozdílnosti převládajících klimatických podmínek na obou hemisférách. Na jižní polokouli – vzhledem k menší rozloze pevnin – převládá oceánské klima s relativně vysokými minimálními teplotami, avšak klima je v rámci roku více variabilní s menším rozsahem předvídatelných sezónních změn (např. Addo-Bediako et al., 2000). Za těchto podmínek může hmyz dobře využít výhod mírnějšího klimatu k příjmu potravy po větší část roku, odolnost ke zmrznutí pak zaručuje přežití při náhlých a nepředvídatelných poklesech teplot. Přítomnost potravy ve střevě po většinu roku navíc zvyšuje hodnotu bodu podchlazení (potravní částice fungují jako krystalizační jádra při mrznutí), za této situace se tak dále zvyšuje výhodnost odolnosti ke zmrznutí (Sinclair et al., 2003). V převažujících podmínkách severní polokoule (sezónní, předvídatelné klima s velmi nízkými zimními teplotami), se hmyz naopak může připravit na nadcházející nepříznivé podmínky pomocí postupné akumulace ochranných látek, vyprázdnění trávicího traktu apod. a tím snížit bod podchlazení na hodnoty zaručující přežití i extrémně nízkých teplot. Díky těmto hlubokým změnám pak takové druhy nejsou adaptovány na opakované přechody z klidového do aktivního stavu během zimního období a velké výkyvy teplot během zimního období tak mohou způsobit vyčerpání metabolických rezerv a následné zvýšení mortality (např. Irvin a Lee, 2000). Z tohoto hlediska mohou mít recentní klimatické změny směřující např. k větším teplotním výkyvům během středoevropských zim negativní následky na horské nebo severské druhy, které jsou jinak dobře adaptovány k přežití extrémních (avšak předvídatelných) podmínek.

### **Vliv teploty v klimatickém kontextu**

Recentní klimatické změny spojené se zvyšováním průměrných teplot mají významný vliv na živočišná společenstva (Walther et al., 2002). Poměrně rozsáhlá evidence existuje o šíření mnoha druhů do vyšších zeměpisných šířek a do větších nadmořských výšek, mnoho studií se zabývá právě denními motýly (Parmesan, 1996; Hill et al., 2002; Konvička et al., 2003; Wilson et al., 2005; Braschler a Hill, 2007), naproti tomu překvapivě málo informací je k dispozici o ústupu chladnomilných druhů ze spodních



hranic jejich vertikálního rozšíření nebo jižních oblastí areálů (Franco et al., 2006; Parmesan et al., 1999). Tato disproporce může být způsobena např. tím, že v teplejších oblastech jsou druhy více limitovány biotickými interakcemi než přímo teplotními změnami (Davis et al., 1998).

Za předpokladu, že i na spodních teplotních hranicích výskytu druhů má klima zásadní vliv, ústup druhů z těchto oblastí může být přehlížen horší detekovatelností úplného vymření ve srovnání s kolonizacemi nebo jen nedostatečným množstvím dat o rozšíření (Konvička et al., 2003; Parmesan et al., 1999). Mnoho chladnomilných druhů navíc obývá malé a izolované ostrůvky vhodných biotopů v nižších polohách nebo v jižnějších oblastech, což může zkreslovat informaci o změně areálu (Stefanescu et al., 2004). Fragmentace výskytu takových druhů spolu se zmenšováním jejich populací tak může vést k jejich vymření v mnoha regionech (Wilson et al., 2005). Ohrožení takových druhů v nižších polohách může dále zvyšovat větší degradace biotopů (Warren et al., 2001). Horské druhy přitom nemusí být v bezpečí ani ve vysokých polohách, což způsobuje právě jejich specializace na drsné podmínky. Výskytem jsou často omezeny na izolované horské masívy a díky nížinným bariérám se nemají v případě klimatické změny kam šířit (Hodkinson, 2005). To představuje potenciální ochránářský problém, protože horské oblasti hostí specifickou biodiverzitu s velkým podílem endemických či reliktních druhů (Vila et al., 2005; Schmitt et al., 2006); toto nebezpečí může být akutnější v rozlohou menších a nižších horských masivech jako jsou Hercynská pohoří nebo Karpaty.

Negativní vliv teplejšího klimatu na společenstva motýlů ukazuje například Wilson et al. (2005). Ve španělském pohoří Sierra de Guadarrama se celé sledované společenstvo motýlů během 30 let posunulo o více než 200m do vyšších nadmořských výšek. Detailnější studie jednoho z druhů, běláška ovocného (*Aporia crataegi* (Linnaeus, 1758)), ukázala, že jeho ústup ze spodní hranice výskytu byl zapříčiněn větší mortalitou larev v důsledku přehřívání v letním období (Merrill et al., 2008). Zaměříme-li se konkrétně na horské druhy, příkladem může být práce Franco et al. (2006), srovnávající současné a historické rozšíření třech chladnomilných motýlů na Britských ostrovech. Horský okáč *Erebia epiphron* zde v důsledku teplejšího klimatu ustoupil z nižších poloh výskytu, přestože stav jeho biotopů zde zůstal nezměněn. Právě tento příklad ale ukazuje na mnohdy obtížnou zobecnitelnost takových výsledků pro jiné regiony. Tento druh se vyskytuje i v České republice, kde obývá alpské hole nad hranicí lesa v Hrubém Jeseníku. Ve 30. letech 20. století byl ale odtud introdukovan do Krkonoš,

kde osídlil i níže položené, člověkem vytvořené louky, které se v Hrubém Jeseníku nevyskytují (Konvička et al., 2010). To naopak ukazuje, že ekofyziologické limity pro přežití motýla leží níže než původní rozšíření jeho biotopů a správně cílený management může velmi napomoci zvýšení populační početnosti. Podobně, Scalercio et al. (2014) sledovali změny v rozšíření vysokohorského okáče *Erebia cassioides* (Reiner & Hochenwarth, 1792) v izolovaném refugiu druhu v jihoitalském pohoří Pollino. Rozloha území obývaného motýlem se zde za posledních 30 let významně snížila a na rozdíl od minulosti dnes většina populace žije pouze nad hranicí lesa; zde však došlo výraznému a neočekávanému zvýšení populační početnosti. To ukazuje, že v případě konkrétních druhů nemusí být očekávané dopady klimatické změny fatální. Je třeba brát v potaz i skutečnost, že řada horských druhů musela během holocénu přežít velmi podstatnou redukci vhodných stanovišť v izolovaných refugiích během období atlantiku, kdy bylo klima výrazně teplejší než dnes (Prentice et al., 2000).

Uvedené příklady tak ukazují, že přibývající studie pokoušející se modelovat budoucí změny v rozšíření různých druhů jak z hlediska klimatu (Settele et al., 2008; Sinclair et al., 2011; Russell et al., 2012) tak potenciálních biotopových změn (De Groot et al., 2009) jsou pro konkrétní druhy nedostatečným nástrojem pro odhad skutečných dopadů klimatických změn právě kvůli absenci znalostí o konkrétních ekofyziologických adaptacích jednotlivých druhů z hlediska komplexních environmentálních vlivů v kombinaci s mikrostanovištními preferencemi (Turnock a Fields, 2005; Ellis, 2011).

Doplnění těchto znalostí si klade za cíl tato práce, která se zabývá ekofyziologií vybraných zástupců denních motýlů, konkrétně hibernujících housenek. Denní jsou vhodnou modelovou skupinou, z hlediska všeobecné ochrany hmyzu je lze považovat za vhodnou „deštníkovou“ skupinu z mnoha hledisek – popularita a snadná determinovatelnost v terénu, značná druhová bohatost i citlivost k environmentálním změnám (New, 1997).

### **Přehled studovaných druhů a získávání experimentálního materiálu**

Práce se zabývá zástupci dvou rodů denních motýlů s holarktickým rozšířením: *Erebia* Dalman, 1816 a *Colias* Fabricius, 1807. Obě skupiny dosahují značných druhových bohatostí v chladných a horských oblastech, ale lze zde najít i dostatek zástupců z nižších poloh pro porovnání jejich ekofyziologických adaptací. Studováno bylo 9

druhů splňujících předem stanovená kritéria vzhledem k požadavkům na větší množství experimentálního materiálu: (1) snadná dosažitelnost početných populací v rámci střední Evropy, (2) přezimování ve stadiu housenky a (3) vývoj na běžných a snadno kultivovatelných živných rostlinách.

Pro získání housenek byly v terénu sbírány oplozené samice, které byly v zajetí vykladeny přímo na živné rostliny, předpěstované v květináčích. Ty byly umístěny v drátěných klecích (o velikosti 50 x 50 x 100cm) potažených monofilovým pletivem, dobře propouštějícím sluneční záření. Kladoucí samice byly přikrmovány slabým cukerným roztokem. Po vylíhnutí byly housenky ponechány vývoji na živných rostlinách bez dalších zásahů (vyjma zalévání živných rostlin) až do podzimu, kdy vstoupily do diapauzy (listopad), kdy byly květináče přemístěny do chladové místnosti s konstantní teplotou 5°C pro aklimatizaci před započítáním experimentů, která trvala minimálně 2 týdny. Počty dostupného materiálu z chovů se mezidruhově značně lišily i přesto, že získání většího množství vajíček během sezóny nebylo problémem. Přežívání housenek během letního a zimního období a během aklimace se naopak mezidruhově značně lišilo, celkově nebyla efektivita příliš vysoká pravděpodobně díky obtížně ovlivnitelným faktorům při hromadných chovech, jako je šíření bakteriálních a plísňových infekcí. Studované druhy a efektivitu získávání experimentálního materiálu uvádí následující seznam:

***Erebia medusa*** (Denis & Schiffermüller, 1775) – jeden z mála zástupců převážně horské supiny okáčů, který se vyskytuje i v nižších polohách. Druh s eurosibiřským areálem, ve střední Evropě obývá vysokostébelné trávníky, lesostepi a otevřené lesy od nížin až po ca 1200 m n. m. Housenky se živí různými druhy trav, v chovech byla použita kostřava ovčí (*Festuca ovina agg.*) a sveřep vzpřímený (*Bromus erectus* Huds.). Přezimují ve třetím instaru v trsech trav při zemi. V rámci výzkumu bylo vykladeno 39 samic nasbíraných v jižních Čechách (Český Krumlov), dochováno 116 housenek.

***Erebia sudetica*** (Staudinger, 1861) – představitel druhu obývajícího nižší horské polohy, rozšířen pouze v Evropě (v ČR původní pouze v Hrubém Jeseníku). Obývá otevřená místa v horských lesích a lavinové kary ve výškách 600 – 2000 m n. m. (v Hrubém Jeseníku 700 – 1450 m), nejhojnější je při horní hranici lesa. Housenka přezimuje ve 2. instaru a živí se travami, v chovech byla použita kostřava nízká (*Festuca supina* Schul) a metlička křivolaká (*Avenella flexuosa* (L.)). Během výzkumu

bylo vykladeno celkem 57 samic pocházejících z Hrubého Jeseníku a dochovat se podařilo 76 housenek.

***Erebia epiphron*** (Knoch, 1783) – evropský horský druh okáče, který obývá převážně alpské hole nad hranicí lesa od 350 (Skotsko) po 2600 m n. m. V ČR je původní pouze v Hrubém Jeseníku (1300 – 1490 m n. m.). Částečně semivoltinní druh, poprvé housenky přezimují v prvním instaru. Živí se travami, v chovech byla použita kostřava nízká (*Festuca supina*) a metlička křivolaká (*Avenella flexuosa*). V rámci výzkumu bylo vykladeno celkem 49 samic z Hrubého Jeseníku, pro experimenty bylo dochováno 80 housenek.

***Erebia tyndarus*** (Esper, 1781) – vysokohorský okáč, výskytem omezený na centrální část evropských Alp. Obývá otevřená travnatá místa při hranici lesa a nad ní (1200 – 2700 m n. m.). Housenky se živí tenkolistými druhy trav a přezimují v prvním instaru. Jako živná rostlina v chovech sloužila kostřava nízká (*Festuca supina*). V rámci výzkumu bylo vykladeno celkem 52 samic pocházejících z Ötztálských Alp, do experimentální fáze se podařilo dochovat pouze 56 kusů. U tohoto i dvou předchozích druhů byla nespornou komplikací malá velikost přezimujících housenek a tím pádem i jejich těžší dohledatelnost v trsech trav; dále pravděpodobně i jejich větší citlivost k bakteriálním a houbovým nákazám v polopřirozených hromadných chovech.

***Colias palaeno*** (Linnaeus, 1761) – boreomontánní druh žluťáška, který obývá rašeliništní a horské biotopy s živnou rostlinou – vlochyní bahenní (*Vaccinium uliginosum* L.). Přezimuje housenka třetího instaru na listech živné rostliny. V rámci výzkumu bylo vykladeno celkem 68 samic pocházejících ze Šumavy, do fáze experimentů bylo dochováno 208 housenek, což umožnilo detailnější ekofyziologické experimenty než u ostatních druhů.

***Colias phicomone*** (Esper, 1780) – vysokohorský druh žluťáška, výskytem omezený na evropská pohoří, kde obývá alpské hole nad hranicí lesa (900 – 2500 m n. m.). Housenky se živí mnoha druhy bobovitých rostlin (Fabaceae), v chovech byla použita tollice vojtěška (*Medicago sativa* L.). Přezimují ve třetím instaru na listech živných rostlin. Pro účely výzkumu bylo vykladeno celkem 75 samic (pocházejících z Ötztálských Alp) a získáno velké množství vajíček a mladých housenek, problémem však byla jejich velké mortalita během podzimu. Do fáze experimentů se dosud podařilo dochovat pouze 18 kusů.

***Colias hyale*** (Linnaeus, 1758) – široce rozšířený a hojný druh žluťáška, vyskytující se od střední Evropy po SV Čínu. Housenky se živí na širokém spektru

bobovitých rostlin (Fabaceae). Vyskytuje se na rozmanitých typech nelesních biotopů, ve střední Evropě od nížin po ca 1800 m n. m., preferuje kulturní krajinu s kulturami píce. Housenky přezimují ve třetím instaru na listech živných rostlin, pro účely výzkumu byly chovány na tolici vojtěšce (*Medicago sativa*). Celkem bylo vykladeno 22 samic nasbíraných v jižních Čechách (České Budějovice), do stadia experimentů bylo dochováno pouze 26 kusů housenek rovněž díky vysoké podzimní mortalitě.

***Colias alfacariensis*** Ribbe, 1905 – stepní druh žluťáka rozšířený od JZ Evropy do střední Asie. Ve střední Evropě obývá pouze xerothermní stepní biotopy v teplých oblastech. Housenky se živí čičorkou pestrou (*Coronilla varia* L.) a podkivkou chocholátou (*Hippocrepis comosa* L.). Pro účely výzkumu byly housenky chovány na čičorce pestré, vykladeno bylo celkem 28 samic nasbíraných v jižních Čechách (Český Krumlov), pro experimenty bylo získáno 28 housenek, jejichž podzimní mortalita byla rovněž vysoká.

***Colias crocea*** (Fourcroy, 1785) – teplomilný migrant, který v Evropě trvale přežívá pouze v oblasti Středozeří. Pravidelně zalétá do střední Evropy, kde vytváří několik následných generací v letním období. Často se objevuje v kulturní krajině s kulturami píce, housenky se jinak živí na širokém spektru bobovitých rostlin (Fabaceae). Pro účely výzkumu byly chovány na tolici vojtěšce (*Medicago sativa*). Vykladeno bylo celkem 38 samic nasbíraných na střední Moravě (Holešov), do podzimu bylo dochováno 46 housenek, které však uhynuly během aklimatizace v 5°C; ani v této teplotě pravděpodobně nejsou schopny dlouhodobě přežít, což limituje areál trvalého výskytu motýla pouze na nejteplejší oblasti Středozeří (viz kap. 3).

## **Cíle práce**

Práce se zabývá různými aspekty chladové odolnosti zimujících larev dvou skupin denních motýlů: *Colias* a *Erebia*. Vybrány byly druhy obývající různé nadmořské výšky i biotopy. U obou skupin bylo cílem popsat a porovnat různé úrovně chladové odolnosti: (1) Zjištění bodů podchlazení a tím i základních strategií pro přežívání nízkých teplot; (2) identifikace letálních teplot při krátkodobých expozicích v návaznosti na výsledky předchozích experimentů; (3) testování potenciálního chladového poškození larev při delších expozicích v různých sériích teplot nad zjištěnými letálními hodnotami. Společně s teplotními experimenty provést i (4) analýzy obsahu kryoprotektivních látek. V závislosti na dostupnosti materiálu od různých druhů analyzovat i rozdíly v geografické variabilitě chladové odolnosti u různých populací. Zjištěné výsledky dát do kontextu rozšíření a biotopových nároků jednotlivých druhů (a populací) a jejich potenciálního ohrožení v důsledku možných environmentálních nebo biotopových změn.

## Literatura

- Addo-Bediako, A., Chown, S.L., Gaston, K.J. (2000). Thermal tolerance, climatic variability and latitude. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267, 739–745.
- Andreadis, S.S., Milonas, P.G., Savopoulou-Soultani, M. (2005). Cold hardiness of diapausing and non-diapausing pupae of the European grapevine moth, *Lobesia botrana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 117, 113–118.
- Bakken, G.S. (1976). A heat transfer analysis of animals: Unifying concepts and the application of metabolism chamber data to field ecology. *Journal of Theoretical Biology* 60, 337–384.
- Bale, J.S. (1987). Insect cold hardiness: freezing and supercooling – an ecophysiological perspective. *Journal of Insect Physiology* 33, 899–908.
- Bale, J.S. (1996). Insect cold hardiness: a matter of life and death. *European Journal of Entomology* 93, 369–382.
- Beneš, J., Konvička, M., Dvořák, J., Fric, Z., Havelka, Z., Pavlíčko, A., Vrabec, V., Weidenhoffer, Z. (eds) (2002). *Motýli České republiky: Rozšíření a ochrana I., II.* SOM, Praha, 857pp.
- Block, W. (1991). To freeze or not to freeze ? Invertebrate survival of sub-zero temperatures. *Functional Ecology* 5, 284–290.
- Block, W., Webb, N.R., Coulson, S., Hodkinson, I.D., Borland, M.R. (1994). Thermal adaptation in the Arctic collembolan *Onychiurus arcticus* (Tullberg). *Journal of Insect Physiology* 40, 715–722.
- Braschler, B., Hill, J.K. (2007). Role of larval host plants in the climate-driven range expansion of the butterfly *Polygonia c-album*. *Journal of Animal Ecology* 76, 415–423.
- Casey, T.M. (1992). Biophysical ecology and heat-exchange in insects. *American Zoologist* 32, 225–237.
- Convey, P. (2000). How does cold constrain life cycles of terrestrial plants and animals? *CryoLetters* 21, 73–82.

- Coulson, S.J., Hodkinson, I.D., Strathdee, A.T., Block, W., Webb, N.R., Bale, J.S., Borland, M.R. (1995). Thermal environments of Arctic soil organisms during winter. *Arctic and Alpine Research* 27, 364–370.
- Danks, H.V. (1987). *Insect dormancy: an ecological perspective*. Biological survey of Canada (terrestrial arthropods), Natural Museum of Natural Sciences, Ottawa. 439pp.
- Davis, A.J., Jenkinson, L.S., Lawton, J.H., Shorrocks, B., Wood, S. (1998). Making mistakes when predicting shifts in species range in response to global warming. *Nature* 391, 783–786.
- De Groot, M., Rebeusek, F., Grobelnik, V., Govedic, M., Salamun, A., Veronik, R. (2009). Distribution modelling as an approach to the conservation of a threatened alpine endemic butterfly (Lepidoptera: Satyridae). *European Journal of Entomology* 106: 77–84.
- Denlinger, D.L. (1991). Relationship between cold hardiness and diapause. In: Lee, R.E., Denlinger, D.L. (eds): *Insect at Low Temperature*. Chapman & Hall, New York and London, pp. 174–198.
- Dirnböck, T., Esek, F., Rabitsch, W. (2011). Disproportional risk for habitat loss of high-altitude endemic species under climate change. *Global Change Biology* 17, 990–996.
- Duman, J.G. (2001). Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annual Review of Physiology* 63, 327–357.
- Dye, D.G. (2002). Variability and trends in the annual snow-cover cycle in Northern Hemisphere land areas, 1972–2000. *Hydrological processes* 16, 3065–3077.
- Ellis, C.J. (2011). Predicting the biodiversity response to climate change: challenges and advances. *Systematics and Biodiversity* 9, 307–317.
- Franco, A.M.A., Hill, J.K., Kitchke, C., Collingham, Y.C., Roy, D.B., Fox, R., Huntley, B., Thomas, C.D. (2006). Impacts of climate warming and habitat loss on extinctions at species' low-latitude range boundaries. *Global Change Biology* 12, 1545–1553.
- Franks, F. (1985). *Biophysics and Biochemistry at Low Temperatures*. Cambridge University Press, U.K. 210pp.



- Franks, F., Mathias, S.F., Hatley, R.H.M, Baust, J.G., Hvidt, A., Chapman, D., Jaenicke, R. (1990). Water, temperature and life. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 326, 517–533.
- Gaston, K.J., Fuller, R.A. (2007). Biodiversity and extinction: losing the common and the widespread. *Progress in Physical Geography* 31, 213–225.
- Gerland, S., Liston, G.E., Winter, J.G., Orbaek, J.B., Ivanov, B.V. (2000). Attenuation of solar radiation in Arctic snow: field observations and modelling. *Annals of Glaciology* 31, 364–368.
- Hill, J.K., Thomas, C.D., Fox, R., Telfer, M.G., Willis, S.G., Asher, J., Huntley, B. (2002). Responses of butterflies to twentieth century climate warming: implications for future ranges. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269, 2163–2171.
- Hodkinson, I.D. (2005). Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. *Biological Reviews* 80, 489–513.
- Huey, R.B. (1991). Physiological consequences of habitat selection. *American Naturalist* 137, 91–115.
- Irwin, J.T., Lee, R.E., Jr. (2000). Mild winter temperatures reduce survival and potential fecundity of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Physiology* 46, 655–661.
- Izumi, Y., Sonoda, S., Tsumuki, H. (2007). Effects of diapause and cold-acclimation on the avoidance of freezing injury in fat body tissue of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Journal of Insect Physiology* 53, 685–690.
- Klečková, I., Konvička, M., Klečka, J. (2014). Thermoregulation and microhabitat use in mountain butterflies of the genus *Erebia*: Importance of fine-scale habitat heterogeneity. *Journal of Thermal Biology* 41, 50–58.
- Konvička, M., Maradová, M., Beneš, J., Fric, Z., Kepka, P. (2003). Uphill shifts in distribution of butterflies in the Czech Republic: effects of changing climate detected on a regional scale. *Global Ecology and Biogeography* 12, 403–410.

- Konvička, M., Beneš, J., Schmitt, T. (2010). Ecological limits vis-à-vis changing climate: relic *Erebia* butterflies in insular Sudeten mountains. In: Habel, J.C., Assmann, T. (eds): *Relict Species: Phylogeography and Conservation Biology*. Springer, Heidelberg, 341–355.
- Konvička, M., Mihaly, C.V., Rákosy, L., Beneš, J., Schmitt, T. (2014). Survival of cold-adapted species in isolated mountains: the population genetics of the Sudeten ringlet, *Erebia sudetica sudetica*, in the Jeseník Mts., Czech republic. *Journal of Insect Conservation* 18, 153–161.
- Košťál, V. (2006). Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* 52, 113–127.
- Kreyling, J, Hugh, A.L.H. (2011). Vanishing winters in Germany: soil frost dynamics and snow cover trends, and ecological implications. *Climate Research* 46, 269–276.
- Kukal, O., Serianni, A.S., Duman, J. G. (1988). Glycerol metabolism in a freeze-tolerant arctic insect: an in vivo <sup>13</sup>C NMR study. *Journal of Comparative Physiology B* 158, 175–183.
- Larsen, K.J., Lee, R.E., Jr, (1994). Cold tolerance including rapid cold-hardening and inoculative freezing of fall migrant monarch butterflies in Ohio. *Journal Of Insect Physiology*. 40, 859–864.
- Lee, R.E., Jr., Chen, C.-P., Denlinger, D.L. (1987). A rapid cold-hardening process in insects. *Science* 238, 1415–1417.
- Marshall, K.E., Sinclair, B.J. (2012). Threshold temperatures mediate the impact of reduced snow cover on overwintering freeze tolerant caterpillars. *Naturwissenschaften* 99, 33–41.
- Mercader, R.J., Scriber, J.M. (2008). Asymmetrical thermal constraints on the parapatric species boundaries of two widespread generalist butterflies. *Ecological Entomology* 33, 37–45.
- Merrill, R.M., Gutiérrez, D., Lewis, O.T., Gutiérrez, J., Díez, S.B., Wilson, R.J. (2008). Combined effects of climate and biotic interactions on the elevational range of a phytophagous insect. *Journal of Animal Ecology* 77, 145–155.
- Milonas, P.G., Savopoulou-Soultani, M. (1999). Cold hardiness in diapause and non-diapause larvae of the summer fruit tortrix, *Adoxophyes orana* (Lepidoptera : Tortricidae). *European Journal of Entomology* 96, 183–187.

- Nedvěd, O. (1998). Modelling the relationship between cold injury and accumulated degree days in terrestrial arthropods. *Cryo-Letters* 19, 267–274.
- New, T.R. (1997). Are Lepidoptera an effective ‘umbrella group’ for biodiversity conservation? *Journal of Insect Conservation* 1: 5–12.
- Parmesan, C. (1996). Climate and species’ range. *Nature* 382, 765–766.
- Parmesan, C., Ryrholm, N., Stefanescu, C., Hill, J.K., Thomas, C.D., Descimon, H., Huntley, B., Kaila, L., Kullberg, J., Tammaru, T., Tennent, W.J., Thomas, J.A., Warren, M. (1999). Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature* 399, 579–583.
- Prentice, I.C., Jolly, D., BIOME 6000 participants (2000). Mid-Holocene and glacial-maximum vegetation geography of the northern continents and Africa. *Journal of Biogeography* 27, 507–519.
- Pullin, A.S., Bale, J.S. (1989). Effects of low temperature on diapausing *Aglais urticae* and *Inachis io* (Lepidoptera, Nymphalidae): cold hardiness and overwintering survival. *Journal of Insect Physiology* 35, 277–281.
- Ramlov, H. (2000). Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals. *Human Reproduction* 15, 26–46.
- Regniere, B., Bentz, B. (2007). Modeling cold tolerance in the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae*. *Journal of Insect Physiology* 53, 559–572.
- Renault, D., Nedvěd, O., Hervant, F., Vernon, P. (2004). The importance of fluctuating thermal regimes for repairing chill injuries in the tropical beetle *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) during exposure to low temperature. *Physiological Entomology* 29, 139–145.
- Ring, R.A., Danks, H.V. (1994). Desiccation and cryoprotection: overlapping adaptations. *CryoLetters* 15, 181–190.
- Roff, D. (1980). Optimising development time in a seasonal environment: the ups and downs of clinal variation. *Oecologia* 45, 202–208.

- Russell, B.D., Harley, C.D.G., Wernberg, T., Mieszkowska, N., Widdicombe, S., Hall-Spencer, J.M., Connell, S. D. (2012). Predicting ecosystem shifts requires new approaches that integrate the effects of climate change across entire systems. *Biology Letters* 8, 164–166.
- Salt, R.W. (1961). Principles of insect cold hardiness. *Annual Review of Entomology* 6, 55–74.
- Salt, R.W. (1966). Factors influencing nucleation in supercooled insects. *Canadian Journal of Zoology* 4, 117–133.
- Scalercio, S., Bonacci, T, Mazzei, A., Pizzolotto, R., Brandmayr, P. (2014). Better up, worse down: bidirectional consequences of three decades of climate change on a relict population of *Erebia cassioides*. *Journal of Insect Conservation* 18, 643–650.
- Settele, J., Kudrna, O., Harpke, A., Kühn, I., Van Swaay, C., Veronik, R., Warren, M., Wiemers, M., Hanspach, J., Hickler, T., Kühn, E., Van Halder, I., Veling, K., Vliegenthart, A., Wynhoff, I., Schweiger, O. (2008). *Climatic Risk Atlas of European Butterflies*. Pensoft, Sofia-Moscow, 712pp.
- Schmitt, T., Čížek, O., Konvička, M. (2005). Genetics of a butterfly relocation: large, small and introduced populations of the mountain endemic *Erebia ephron silesiana*. *Biological Conservation* 123, 11–18.
- Schmitt, T., Hewitt, G.M., Müller, P. (2006). Disjunct distributions during glacial and interglacial periods in mountain butterflies: *Erebia ephron* as an example. *Journal of Evolutionary Biology* 19, 108–113.
- Sinclair, B.J., Sjørnsen, H. (2001). Cold tolerance of the Antarctic springtail *Gomphiocephalus hodgsonii* (Collembola, Hypogastruridae). *Antarctic Science* 13, 271–279.
- Sinclair, B.J., Addo-Bediako, A., Chown, S.L. (2003). Climatic variability and the evolution of insect freeze tolerance. *Biological Reviews* 78, 181–195.
- Sinclair, B.J., Chown, S.L. (2005). Climatic variability and hemispheric differences in insect cold tolerance: support from southern Africa. *Functional Ecology* 19, 214–221.
- Sinclair, S.J., White, M.D., Newell, G.R. (2011). How Useful Are Species Distribution Models for Managing Biodiversity under Future Climates? *Ecology and Society* 15, Article 8

- Sonoda, S., Fukumoto, K., Izumi, Y., Yoshida, H., Tsumuki, H. (2006). Cloning of heat shock protein genes (*hsp90* and *hsc70*) and their expression during larval diapause and cold tolerance acquisition in the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 63, 36–47.
- Somme, L. (1982). Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73A, 519–543.
- Somme, L. (1989). Adaptations of terrestrial arthropods to the alpine environment. *Biological Reviews* 64, 367–407.
- Somme, L. (1999). The physiology of cold hardiness in terrestrial arthropods. *European Journal of Entomology* 96, 1–10.
- Stefanescu, C., Herrando, S., Páramo, F. (2004). Butterfly species richness in the north-west Mediterranean Basin: the role of natural and human-induced factors. *Journal of Biogeography* 31, 905–915.
- Stevenson, R.D. (1985). Body size and limits to the daily range of body-temperature in terrestrial ectotherms. *American Naturalist* 125, 102–117.
- Storey, K.B. (1997). Organic solutes in freezing tolerance. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 117, 319–326.
- Stuhldreher, G., Hermann, G., Hartmann, T. (2014). Cold-adapted species in a warming world – an explorative study on the impact of high winter temperatures on a continental butterfly. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 151, 270–279.
- Tanaka, K. (1992). Photoperiodic control of diapause and climatic adaptation of the house spider, *Achearanea tepidariorum* (Araneae: Theridiidae). *Functional Ecology* 6, 545–552.
- Tanaka, K. (1997). Evolutionary relationships between diapause and cold hardiness in the house spider, *Achearanea tepidariorum* (Araneae: Theridiidae). *Journal of Insect Physiology* 43, 271–274.
- Tauber, M.J., Tauber, C.A., Masaki, S. (1986). *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, Oxford. 426pp.

- Tenow, O., Nilssen, A. (1990). Egg cold hardiness and topoclimatic limitations to outbreaks of *Epirrita autumnata*. Northern Fennoscandia. *Journal of Applied Ecology* 27, 723–734.
- Thomas, J.A. (2005). Monitoring change in the abundance and distribution of insects using butterflies and other indicator groups. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360, 339–357.
- Turnock, W.J., Lamb, R.J., Bodnaryk R.P. (1983). Effects of cold stress during diapause on the survival and development of *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae). *Oecologia* 56, 185–192.
- Turnock, W.J., Boivin, G., Ring, R.A. (1998). Interpopulation differences in the coldhardiness of *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae). *Canadian Entomologist* 130, 119–129.
- Turnock, W.J., Fields, P.G. (2005). Winter climates and cold hardiness in terrestrial insects. *European Journal of Entomology* 102, 561–576.
- Turnock, W.J., Bodnaryk, R.P. (1991). Latent cold injury and its conditional expression in the bertha armyworm, *Mamestra configurata* (Noctuidae: Lepidoptera). *Cryo-Letters* 12, 377–384.
- Van Swaay, C., Cuttelod, A., Collins, S., Maes, D., López Munguira, M.L., Šašić, M., Settele, J., Veronik, R., Verstrael, T., Warren, M., Wiemers, M., Wynhoff, I. (2010). European Red List of Butterflies. Publications Office of the European Union, Luxembourg, 47 pp.
- Vila, M., Vidal-Romani, J.R., Bjorklund, M. (2005). The importance of time scale and multiple refugia: Incipient speciation and admixture of lineages in the butterfly *Erebia triaria* (Nymphalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36, 249–260.
- Walther, G.R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Berber, T.J.C., Fromentin, J.M., Hoegh-Guldberg, O., Bairlein, F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416, 389–395.
- Warren, M.S., Hill, J.K., Thomas, J.A., Asher, J., Fox, R., Huntley, B., Roy, D.B., Telfer, M.G., Jeffcoate, S., Harding, P., Jeffcoate, G., Willis, S.G., Greatorex-Davies, J.N., Moss, D., Thomas, C.D. (2001). Rapid responses of British butterflies to opposing forces of climate and habitat change. *Nature* 414, 65–69.

- Wilson, R.J., Gutierrez, D., Gutierrez, J., Martinez, D., Agudo, R., Monserrat, V.J. (2005). Changes to the elevational limits and extent of species ranges associated with climate change. *Ecology Letters* 8, 1138–1146.
- Zachariassen, K.E. (1982). Nucleating agents in cold-hardy insects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 73, 557–562.
- Zachariassen, K.E. (1985). Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological Reviews* 65, 799–832.





# Kapitola I.

## **REVERSE ALTITUDINAL CLINE IN COLD HARDINESS AMONG *EREBIA* BUTTERFLIES**

Vrba P., Konvička M., Nedvěd O.

CryoLetters

2012

Doplňující informace: Appendix

## Souhrn:

Recentní klimatické změny způsobují posuny areálů mnoha motýlích druhů do vyšších zeměpisných šířek i vyšších nadmořských výšek. Tyto změny představují vážnou hrozbu především pro chladnomilné horské druhy obývající rozlohou omezené ostrovy vhodných biotopů. Konkrétní ekofyziologické adaptace těchto druhů, které omezují jejich výskyt na horské oblasti, jsou však dosud z velké části neznámé.

Studovali jsme chladovou odolnost přezimujících housenek čtyř druhů motýlů z druhově početného holarktického rodu *Erebia*, který se vyznačuje velkou druhovou bohatostí v horských oblastech. Zkoumány byly druhy s jádrem výskytu v různých nadmořských výškách, měřeny byly body podchlazení a nejvyšší letální teploty.

Výsledky ukazují, že i blízké příbuzné druhy využívají při přezimování různé strategie k překonávání nízkých teplot z hlediska tolerance nebo naopak citlivosti ke zmrznutí tělních tekutin. Jediný druh, jehož housenky přeživaly zmrznutí byl zástupce obývající nejnižší polohy – okáč rosičkový (*Erebia medusa*), u tohoto druhu byla zároveň zjištěna nejnižší letální teplota ( $-21^{\circ}\text{C}$ ). U horských zástupců *E. epiphron* a *E. sudetica* byly zjištěny vyšší hodnoty; letální teplota u okáče *E. epiphron* byla zhruba o  $5^{\circ}\text{C}$  vyšší než bod podchlazení, což ukazuje na pravděpodobnou citlivost k chladovému poškození nezpůsobenému mrazem. Překvapivě, nejvyšší letální teplota byla zjištěna u vysokohorského okáče *E. tyndarus* ( $-8,1^{\circ}\text{C}$ ).

Chladová odolnost zkoumaných druhů se tak zcela nepředpokládaně snižovala od druhů obývajících nižší polohy k motýlům vysokohorským. Tento jev vysvětlujeme výrazným ochranným vlivem sněhové pokrývky na stanovištích, která je silná a dlouhotrvající ve vysokých polohách a naopak slabá a nepředvídatelná v polohách nižších. Nepředvídatelnost a větší fluktuace teplot na níže položených stanovištích okáče *E. medusa* zde rovněž zvyhodňuje toleranci jeho housenek ke zmrznutí.

# REVERSE ALTITUDINAL CLINE IN COLD HARDINESS AMONG *EREBIA* BUTTERFLIES

Pavel Vrba, Martin Konvička and Oldřich Nedvěd\*

Faculty of Science, University of South Bohemia, Branisovska 31, 37005 Ceske Budejovice, Czech Republic and Institute of Entomology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Branisovska 31, 37005 Ceske Budejovice, Czech Republic.

\*Corresponding author                      email:nedved@prf.jcu.cz.

## Abstract

There is strong evidence for a shifting of range boundaries by many temperate butterfly species to higher altitudes and latitudes. Climate change represents a potential threat to mountain fauna. Nevertheless, information on ecophysiological limits of individual species is scarce. We studied the lower thermal limits of four species representing the prevailing mountain Holarctic butterfly genus *Erebia*. We measured the cold tolerance of hibernating larvae, namely the supercooling point (SCP) and the lower lethal temperature (LLT). Three mountain species were freeze avoiding, with various levels of SCP (–8 to –22°C), and LLT close to SCP. The only exception was lowland *E. medusa*, whose caterpillars were freeze tolerant with LLT (–21°C) slightly below its SCP (–17°C). Surprisingly, LLT was highest in the alpine *E. tyndarus* and lowest in *E. medusa* inhabiting lower altitudes with higher mean winter temperatures. We explain the observed reversed altitudinal cline in cold hardiness by the buffering function of snow cover in the hibernacula of caterpillars that is strong at high mountains but irregular, unpredictable and thus unreliable in lowlands.

**Keywords:** Alpine habitats, butterfly ecology, climate change, snow cover

## INTRODUCTION

Current discussions on the potential effects of global climatic change, or global warming, on biodiversity (e.g 15, 38, 61) highlight the potential threats to cold-adapted species restricted in distribution to high altitude mountain habitats (10). In temperate

regions of the northern hemisphere, habitats above the timberline represent extrazonal islands, inhabited by distinct biotic communities, consisting partly of species shared with more northerly areas (i.e.; glacial relics, shared with tundra biomes of the high Arctic), partly of high mountains endemics (42). Climatic warming, already causing shifts of vegetation belts to higher elevations (21, 9), shall in effect shrink the effective area of the high mountain biotopes, thus diminishing the habitats' carrying capacity for individual populations, fragmentation of current distribution areas, and/or genetic breakdowns of the populations (44, 40, 12, 33). Given the high degree of endemism in isolated mountain habitats, this may result in high extinction rates, especially in relatively low-elevated mountain systems with only limited area of alpine biotopes (5, 7).

Insects are expected to show rapid responses to climate change, because they have short life cycles and their populations vary considerably over space and time (1). Given the potential threat to mountain-restricted fauna, it is rather surprising how little research has been conducted into the ecological requirements of high altitude invertebrates, including such a popular model group as butterflies (39, 19). Indeed, the ecology of mountain and arctic butterflies has been highlighted as the last unconquered frontier in European butterfly ecology (45). Although there is good evidence that some mountain species are already moving their distributions upslope (10, 7), it can only be guessed which mechanistic factors are responsible for these shifts. Models of distribution shifts, such as those based on habitat distribution (5) or climatic envelopes (46), offer only crude tools for predicting the fates of individual species. There are observations of alpine butterflies colonising newly established openings situated in lower-elevation woodlands (23), and hence behaving contrary to established predictions. Without understanding the mechanistic (e.g., ecophysiological) limits restricting mountain specialists to their current distribution, it is impossible to predict individual species' and communities' responses to climatic change.

Recent studies of the cold hardiness of lepidopteran caterpillars are focused mainly on individual strongly cold-adapted species, especially of the family Arctiidae (31). Butterflies from the genus *Erebia* Dalman, 1816 (Lepidoptera: Nymphalidae, Satyrinae) represent a good model system for comparative studies of ecophysiological limits of high altitude species. This Holarctic genus includes over a hundred species, plus multiple locally endemic subspecific forms (56), most of them occurring in cold environments (e.g. 53, 14), although a few exceptions exist (43, 51). Europe is

particularly species-rich, with the Alps representing a *bona fide* speciation centre, hosting 45 species, most of them endemic (58). All *Erebia* species have a single generation per year, all develop on grasses (Poaceae), overwinter in larval stage and hibernate in grass tussocks near the soil level (53). Individual species differ in their preferred altitude within Central Europe, sometimes very strictly (27, 4).

In this paper, we measured how four available *Erebia* species differing in altitude range and habitat use differ in cold hardiness of their overwintering larvae. For testing the hypothesis that species living at higher altitudes are more cold-hardy than species from lower elevations, we compared the supercooling point (temperature of crystallization), lower lethal temperature and lower lethal time of diapausing caterpillars.

## MATERIALS AND METHODS

### *Species studied*

Selected *Erebia* species cover an altitudinal cline from lowland to alpine habitats. *E. medusa* was sampled in lowland Czech Republic, *E. sudetica* and *E. epiphron* in Hruby Jeseník Mts., Eastern Sudetans, Czech Republic, and *E. tyndarus* in the Austrian Alps (Table 1).

*Erebia medusa* (Denis & Schiffermüller, 1775) represents a lowland species in our study. Its Eurosiberian distribution ranges from France to northern China. In Central Europe, it inhabits forest clearings and late-succession grasslands with scattered bushes (e.g. extensively used meadows, forest-steppes) from lowlands up to 1000 m altitude, in both dry and wet conditions (39). Third instar larvae overwinter in grass tussocks slightly above the soil level.

*Erebia sudetica* (Staudinger, 1861) inhabits a disjunctive range in European mountains: Hruby Jeseník Mts (Czech Republic), Massif Central (France), the southern Carpathians (Romania) and a few spots in the Swiss Alps. The altitude range is between 600 and 2000 m; in the Czech Republic it is between 700 and 1450 m (27). It inhabits clearings including avalanche fields in the mountain forests and is most common around the timberline. It overwinters as second instar larva.

*Erebia epiphron* (Knoch, 1783), a subalpine species, occurs in most European mountains overtopping the timberline: Scotland and NW England, the Vosges Mts., Cantabrian Mts., Pyrenees, Alps, Carpathians, Dinarids and Hruby Jeseník Mts. The altitudinal range is from 350 m (Scotland) to 2600 m, the distribution is restricted to

grasslands above the timberline (1300 to 1500 m) in the Czech Republic. Development in these conditions takes one to two years (25, 51), larvae overwinter for the first time in the first instar.

*Erebia tyndarus* (Esper, 1781), an alpine species, is restricted to the Central Alps, between 1200 and 2700 m. It inhabits mainly open grassy and flowery pastures and stony slopes above the timberline; grassy clearings in sparse woods near the timberline may be used at its lower altitude limits. It overwinters as first instar larva.

#### *Rearing and storage conditions*

Wild-captured fertilized females (*E. tyndarus*: 52 individuals, *E. sudetica*: 57 individuals, *E. epiphron*: 49 individuals, *E. medusa*: 30 individuals) were transported in small boxes to an outdoor rearing facility in lowland semi-natural conditions in Ceske Budejovice (49°00' N, 14°25' E, 400 m a.s.l.). The facility, situated in a half-shaded garden corner, consisted of wired cages (50 x 50 x 100 cm) covered by mesh. Each of the cages contained a flower pot with grass tussocks brought from the original localities. We released the females (up to 15 per cage) to the cages, and fed them with a 5% sugar solution to maximize their life span and hence the number of eggs laid. The grass *Festuca supina* Schur was used as larval host plant for *E. tyndarus* (20), a mix of *F. supina* and *Avenella flexuosa* (L.) Drejer for *E. sudetica* and *E. epiphron*, and *F. ovina* L. agg. for *E. medusa*. After the larvae hatched, we let them develop without interruptions, except for occasional watering of the grass.

In early November, after the larvae stopped feeding and entered winter diapause (they hid in grass tussocks at the soil level), we transferred them with their potted grass tussocks to an air-conditioned room at a constant +5°C. The grass was regularly sprayed with water.

#### *Cold hardiness measurements*

In January, we removed individual larvae from grass and measured their cold hardiness. The supercooling point (SCP) was measured individually in sixteen individuals per species using the thermocouple device (2). Liquid nitrogen was the cooling medium and the cooling rate was controlled at 1 degree per minute. After the exotherm appeared on the line recorder, the larva was kept in the cooling device until its body temperature decreased again to the value of the crystallization temperature. The chamber was then removed from the cooling device to +5°C, the body temperature was

left to increase (after body ice melted). The larva was then removed from the chamber and kept in a Petri dish at 5°C for 24 hours. Subsequently it was transferred into the laboratory and survival was checked as presence of spontaneous movement or reaction to mechanical stimulus.

To measure lower lethal temperature (LLT), groups of ten larvae were put on dry filter paper in a Petri dish, and placed in a pre-cooled incubator. The dishes were situated in a box insulated by plastic foam and granular ice from its surroundings to provide slow cooling (compare to 35, 54) on a negative exponential basis to the set up temperature measured inside the dish by resistor thermometer. Series of 3–5 temperatures close to and above SCP were used in those species where larvae did not survive freezing during SCP measurement, while temperatures below SCP were also used in one species whose larvae survived freezing. Larvae were removed after 24 hours and treated as above to check their survival. LLT50 was calculated using logistic regression method (17) in Statistica 9 (55).

We also measured lethal time (Lt) at selected temperatures using the same method as for LLT, with exposure times from one to seven days. The logistic equation was expressed in the form that enabled direct estimation of Lt50 together with its standard error:  $S = \exp(a \cdot (1 - t/Lt)) / (1 + \exp(a \cdot (1 - t/Lt)))$ , where S is survival between 1 and 0, t is the exposure time at selected temperature, and a is a parameter describing the shape of the curve (how quickly the survival declines).

## RESULTS

Supercooling points of all species had symmetric distribution, means and medians were similar (difference from 0 to 0.4°C). Mean SCP differed among species (ANOVA:  $F_{3,60} = 47.00$ ,  $p < 10^{-6}$ ). *Erebia epiphron* showed the lowest mean SCP, followed by *E. medusa* and *E. sudetica*, which attained similar values (Tukey HSD test:  $p = 0.36$ , all other comparisons  $p < 10^{-3}$ ), while *E. tyndarus* displayed the highest value (Tab. 1). Caterpillars of *E. medusa* survived these SCP measurements, suggesting that they were freeze-tolerant.

Lower lethal temperature calculated for 24 hours exposure was close to mean SCP in two species, *E. sudetica* and *E. tyndarus* (Tab. 1). In *E. epiphron*, LLT was by 5 degrees higher, which means that there was a substantial chilling injury not caused by freezing. On the other hand, LLT in *E. medusa* was lower by 4 degrees than SCP, which confirmed the freezing tolerance of this species. Lethal times at temperatures a few

degrees above LLT showed that the caterpillars were really able to survive prolonged harsh conditions with slowly accumulating chilling injury.

**Table 1.** Origin of the populations of studied butterflies, their mean supercooling point (SCP  $\pm$  standard deviation and letters indicating differences according to post hoc test following ANOVA), lower lethal temperature after 24 h exposure (LLT) and lethal time (Lt) at selected temperature  $\pm$  standard error.

| species                | original locality             | latitude [°N] | longitude [°E] | altitude [m] | SCP [°C]                     | LLT [°C] | Lt [days]               |
|------------------------|-------------------------------|---------------|----------------|--------------|------------------------------|----------|-------------------------|
| <i>Erebia medusa</i>   | Cesky Krumlov, Czech Republic | 48.83         | 14.32          | 600          | -17.0 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup> | -21.1    | (-18°)<br>6.8 $\pm$ 1.3 |
| <i>Erebia sudetica</i> | Praded Mt., Czech Republic    | 50.08         | 17.23          | 1320         | -15.1 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup> | -15.1    | (-13°)<br>5.2 $\pm$ 0.7 |
| <i>Erebia epiphron</i> | Praded Mt., Czech Republic    | 50.06         | 17.23          | 1460         | -22.0 $\pm$ 3.2 <sup>a</sup> | -17.1    | –                       |
| <i>Erebia tyndarus</i> | Sölden, Windachtal, Austria   | 46.96         | 11.08          | 1950         | -8.4 $\pm$ 2.8 <sup>c</sup>  | -8.1     | –                       |

## DISCUSSION

### *Comparison among species*

Among four butterflies from the genus *Erebia* forming a cline from lowland to high alpine species, overwintering larvae of the high-alpine specialist *E. tyndarus* displayed the lowest tolerance to low temperatures during diapause, regarding both supercooling point and the lower lethal temperature. In the three other species, the situation differed for supercooling point and lowest lethal temperature. For the former, the lowland *E. medusa* and mountain *E. sudetica* exhibited intermediate and identical values, whereas the subalpine *E. epiphron* displayed the lowest value. For the latter, the subalpine *E. epiphron* and the mountain *E. sudetica* displayed identical intermediate values, while the lowland *E. medusa* survived the lowest temperatures. Both measures of cold hardiness thus reveal a non-intuitive trend of species occurring in the highest elevations being less tolerant to low temperatures than species from lower elevations.

Perhaps the most surprising result is the poor ability of *E. tyndarus* to survive low temperatures. This butterfly inhabits the highest altitudes among the four species studied, with optimum in the alpine belt (30, 53). This counterintuitive finding suggests that although *E. tyndarus* has to cope with a harsh and unpredictable alpine climate



during the vegetation season (cf. 3, 18), its diapausing larvae do not experience many low subzero temperatures during overwintering. This must be facilitated by overwintering below continuous and thick snow cover, whose insulating properties ensure rather mild and stable conditions. Exceptional is also the relatively small difference between SCP and LLT in freeze tolerant *E. medusa*. The interspecific comparison was facilitated by using unified acclimation conditions (constant +5°C) for all species; real conditions in the field may differ among the localities of origin.

#### *Role of snow cover*

It has been convincingly demonstrated that thick snow cover significantly increases soil temperature (11, 22) and can significantly increase survival of hibernating moth larvae (60, 29, 31, 32) and gall-forming wasps (47). In connection with recent climate changes, decreasing duration of snow cover was observed at many localities (8, 24). However, central European mountains are humid and snow accumulates during autumn before very low temperatures occur (62).

Ambient temperatures in the overwintering habitats of *E. sudetica* and *E. epiphron* often drop below their supercooling points, suggesting that insulation by snow cover is important. In the Jeseník Mts., *E. sudetica* occurs mainly in wind-shielded valley headwalls with a high snow accumulation (28), but also at lower-elevated clearings, where the snow cover is less predictable. In the same mountains (27) and elsewhere in Europe (4, 10), *E. epiphron* survives at summit grasslands, where the snow may get quite low locally due to blowing winds (16). Among ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae), differences in cold hardiness are known to be bound to differences in overwintering microhabitats on hill slopes and summits (34).

#### *Freeze avoidance and tolerance*

The three mountain/alpine species are freeze intolerant, i.e., not able to survive freezing of their body liquids (62), and avoid this by lowering their supercooling point. In contrast, the lowland representative *Erebia medusa* displayed a freeze tolerance strategy, surviving the freezing of body liquids. This was shown by both survival after cooling the body back to the supercooling temperature, when gradual freezing of body water was observed as the exotherm, and by the difference between mean SCP and LLT. Cumulative chill injury is probably present at least in *E. sudetica* (35), which thus belong to the cold hardiness class Snow White (in sense of 36).

Freeze avoidance appears as a more common and evolutionary ancestral situation in hexapods in cold environments (50), even in such extremes as in the Antarctic springtail *Gomphiocephalus hodgsoni* Carpenter (Collembola) (49). Freeze avoiding ectotherms are better adapted to climatically stable environments, where they invest into metabolically costly cryoprotective substances (48). In contrast, freeze tolerance is favoured in climatically unstable environments, such as the southern hemisphere oceanic regions with unpredictable frosts (50).

Higher incidence of freeze tolerance evolved in colder arctic and boreal areas (59), e.g. in the moth *Gynaephora groenlandica* (Wocke), which repeatedly overwinters in the high Arctic (25). The incidence of freeze tolerance in the temperate zone was significantly higher in habitats more exposed to temperature changes (higher probability of freeze-thaw cycles, 48), which is in line with the adoption of freeze tolerance in *E. medusa*, a species of lower-altitudes with unpredictable snow cover. Relatively higher temperature under snow cover increases utilisation of nutrients. Important metabolic suppression by freezing was observed in the freeze-tolerant arctiid caterpillar *Pyrrharctia isabella* (JE Smith) (32). Freeze tolerance is energetically less costly, and the evolution of freeze tolerance also in *E. medusa* appears quite logical.

In contrast with the other three species investigated, *E. medusa* overwinters as relative large, third-instar larva (53). Larger body size physically increases the supercooling point (13) and it, again, may prioritize the freeze tolerance strategy. It is intriguing in this context that the two largest European *Erebia*, *E. euryale* (Esper) and *E. ligea* (L.), that inhabit mountain woodlands, overwinter as eggs, and display partial biennial development (63).

### *Conclusion*

To summarise, the low temperature limits found for the four *Erebia* representatives covered by this study form an altitudinal cline opposite to superficial suggestions as stated in the aims of this study. The patterns found illustrate a great diversity of ecophysiological adaptations to sustain winter frosts, even within a single genus. They show that in predicting responses of cold-adapted species to warming climate we must consider the complexity of both intrinsic (ecophysiology) and extrinsic (climatic and microclimatic patterns) factors, defining the distribution limits of individual species. In addition to larval diapause, requirements of both immature and adult stages during vegetation seasons may have a decisive role. We are still at the beginning of understanding the species-specific factors, considering the distribution

changes of habitats, which by definition encompass all the combined needs (6). Last, but not least, the diversity of winter-surviving strategies in the cold-adapted *Erebia* butterflies represents a fascinating challenge for the use of the phylogenetic comparative method (52).

**Acknowledgements:** We thank David Novotny, Irena Slamova and Michal Zapletal for help in the field. The study was supported by the Czech Science Foundation (P505/10/1630) and the University of South Bohemia (144/2010/100).

## REFERENCES

1. Bale JS, Masters GJ, Hodkinson ID, Awmack C, Bezemer TM, Brown VK, Butterfield J, Buse A, Coulson JC, Farrar J, Good JEG, Harrington R, Hartley S, Jones TH, Lindroth RL, Press MC, Symrnioudis I, Watt AD & Whittaker JB (2002) *Global Change Biology* **8**, 1–16.
2. Brunnhofer V, Nedvěd O & Hodková M (1991) *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **88**, 349–350.
3. Brussard PF & Ehrlich PR (1970) *Ecology* **51**, 119–129.
4. Čížek O, Bakešová A, Kuras T, Beneš J & Konvička M (2003) *Acta Oecologica – International Journal of Ecology* **24**, 15–23.
5. De Groot M, Rebeusek F, Grobelnik V, Govedic M, Salamun A & Verovnik R (2009) *European Journal of Entomology* **106**, 77–84.
6. Dennis RLH (1993) *Butterflies and climate change*. Manchester University Press.
7. Dieker P, Drees C & Assmann T (2011) *Biological Conservation* **144**, 2810–2818.
8. Dye DG (2002): *Hydrological processes* **16**, 3065–3077.
9. Feeley KJ, Silman MR, Bush MB, Farfan W, Cabrera KG, Malhi Y, Meir P, Revilla NS, Quisiyupanqui MNR & Saatchi S (2010) *Journal of Biogeography* **38**, 783–791.
10. Franco AMA, Hill JK, Kitchke C, Collingham YC, Roy DB, Fox R, Huntley B & Thomas CD (2006) *Global Change Biology* **12**, 1545–1553.
11. Gerland S, Liston GE, Winther JG, Orbaek JB & Ivanov BV (2000) *Annals of Glaciology* **31**, 364–368.
12. Habel JC, Ivinskis P & Schmitt T (2010) *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* **56**, 383–393.

13. Hahn DA, Martin AR & Porter SD (2008) *Environmental Entomology* **37**, 1074–1080.
14. Haubrich K & Schmitt T (2007) *Molecular Ecology* **16**, 3643–3658.
15. Hill JK, Thomas CD, Fox R, Telfer MG, Willis SG, Asher J & Huntley B (2002). *Proceedings of the Royal Society of London B* **269**, 2163–2171.
16. Jeník J (1961) [*Alpine vegetation of Krkonose, Kralicky Sneznik and Hruby Jeseník: The theory of anemo-orographical systems*], ČSAV, Praha. [In Czech]
17. Ju R-T, Wang F, Xiao Y-Y & Li B (2010): *Cryoletters* **31**, 445–453.
18. Junker M, Wagner S, Gros P & Schmitt T (2010) *Oecologia* **164**, 971–980.
19. Karl I & Fischer K (2009) *Functional Ecology* **23**, 1132–1138.
20. Kiffmann R (1978) *Alpenpflanzenflora: Echte Gräser*. Kiffmann.
21. Klanderud K & Birks HJB (2003) *Holocene*, **13**, 1–6.
22. Kobayashi D, Ishikawa N & Nishio F (1988): *Cold Regions Science and Technology* **15**, 131–136.
23. Konvička M, Beneš J & Schmitt T (2009) *In: Survival on Changing Climate – Phylogeography and Conservation of Relict Species* (eds) JC Habel, T Assmann, Springer, Heidelberg
24. Kreyling J & Hugh ALH (2011): *Climate Research* **46**, 269–276.
25. Kukul O (1984). *Life history and adaptations of a high arctic insect, Gynaephora groenlandica (Wocke) (Lepidoptera: Lymantriidae)*. M.Sc. thesis, University of Guelph, Guelph. 108pp.
26. Kuras T, Beneš J, Konvička M & Honč L (2001a) *Atalanta* **32**, 187–196 + xii
27. Kuras T, Konvička M, Beneš J & Čížek O (2001b) *Časopis Slezského Muzea Opava (A)* **50**, 57–81.
28. Kuras T, Beneš J, Fric Z & Konvička M (2003) *Population Ecology* **45**, 115–123.
29. Lamb RJ, Turnock WJ & Hayhoe HN (1985) *The Canadian Entomologist* **117**, 727–736.
30. Lepidopterologen Arbeitsgruppe (1987) *Tagfalter und ihre Lebensraume: Arten, Gefährdung, Schutz*. Fotorotar, Egg.
31. Marshall KE & Sinclair BJ (2011) *Journal of Experimental Biology* **214**, 1205–1212.
32. Marshall KE & Sinclair BJ (2012) *Naturwissenschaften* **99**, 33–41.
33. Matter SF, Doyle A, Illerbrun K, Wheeler J & Roland J (2011) *Insect Science* **18**, 385–392.

34. Nedvěd O (1993) *European Journal of Entomology* **90**, 465–470.
35. Nedvěd O (1998) *Cryoletters* **19**, 267–274.
36. Nedvěd O (2000). *Cryoletters* **21**, 339–348.
37. Nedvěd O, Hodková M, Brunnhofer V & Hodek I (1995) *Cryoletters* **16**, 108–113.
38. Parmesan C (2006) *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* **37**, 637–669.
39. Robinet C & Roques A (2010) *Integrative Zoology* **5**, 132–142.
40. Scalercio S (2009) *European Journal of Entomology* **106**, 231–239.
41. Schmitt T (1993) *Atalanta* **24**, 33–56.
42. Schmitt T (2009) *Frontiers in Zoology* **6**, 9 DOI: 10.1186/1742-9994-6-9
43. Schmitt T & Mueller P (2007) *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **45**, 39–46.
44. Schmitt T, Čížek O & Konvička M (2005) *Biological Conservation* **123**, 11–18.
45. Settele J, Dolek M, Dover J & Konvička M (2009) In *Ecology of Butterflies in Europe*, (eds) J Settele, T Shreeve, M Konvička, H Van Dyck, pp. 353–370. Cambridge University Press.
46. Settele J, Kudrna O, Harpke A, Kühn I, van Swaay C, Verovnik R, Warren M, Wiemers M, Hanspach J, Hickler T, Kühn E, van Halder I, Veling K, Vliegenthart A, Wynhoff I & Schweiger O (2008) *Biorisk* **1**, 1–710.
47. Shorthouse JD, Zuchlinski JA & Courtin GM (1980). *The Canadian Entomologist*, **112**, 225–229.
48. Sinclair BJ, Chown SL (2003a) *Biological Reviews* **78**, 181–195.
49. Sinclair BJ & Sjørnsen H (2011) *Antarctic Science* **13**, 271–279.
50. Sinclair BJ, Vernon P, Klok CJ & Chown SL (2003b) *Trends in Ecology and Evolution* **18**, 257–262.
51. Slámová I, Klečka J & Konvička M (2011a) *Journal of Insect Conservation* **24**, 230–246.
52. Slámová I, Peňa C, Witthauer H & Wahlberg N (2011b) In: *Program a zborník abstraktov from VI Lepidopterologické kolokvium, 30. 9. 2011, PF UPJŠ, ÚBEV, Košice, Slovensko*, p. 17. [In Czech]
53. Sonderegger P (2005) *Die Erebie der Schweiz (Lepidoptera: Satyrinae, Genus Erebia)*. Private publication, W. Gassmann, Biel, Switzerland, 712 pp, 73 pl.

54. Staněk J (1998) <http://www.mzp.cz/ris/ais-ris-info-copy.nsf/da28f37425da72f7c12569e600723950/19407d93791fdfe08025688b00389f98?OpenDocument>
55. StatSoft Inc. (2010) *STATISTICA version 9.1*. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com)
56. Tennent WJ (2008) *Zootaxa* 1900, 1–109.
57. Terblanche JS, Hoffmann AA, Mitchell KA, Rako L, le Roux PC & Chown SL (2011) *Journal of Experimental Biology* **214**, 3713–3725.
58. Tolman T & Lewington R (2008) *Collins Butterfly Guide*. HarperCollins Publishers, London. 384 pp.
59. Turnock WJ & Fields PG (2005) *European Journal of Entomology* **102**, 561–576.
60. Turnock WJ, Lamb RJ & Bodnaryk RP (1983) *Oecologia* **56**, 185–192.
61. Wilson RJ, Gutierrez D, Gutierrez J, Martinez D, Agudo R & Monserrat VJ (2005). *Ecology Letters* **8**, 1138–1146.
62. Zachariassen KE (1985) *Physiological Reviews* **65**, 799–832.
63. Zakharova EYu (2010) *Entomological Review* **90**, 669–678.

# Kapitola II.

## **OVERWINTERING OF THE BOREAL BUTTERFLY *COLIAS PALAENO* IN CENTRAL EUROPE**

Vrba P., Dolek M., Nedvěd O., Zahradníčková H., Cerrato C.,  
Konvička M.

CryoLetters  
2014

## **Souhrn:**

Žluťásek borůvkový (*Colias palaeno* (Linnaeus, 1761)) je motýl s boreomontánním rozšířením, centrum jeho evropského rozšíření je v severní části kontinentu. Ve střední Evropě se vyskytuje lokálně na ostrůvcích vhodných biotopů v horách a na rašeliništích a v mnoha regionech patří k ustupujícím druhům.

Studovali jsme ekofyziologii přezimujících housenek (chladová odolnost, složení kryoprotektantů, přežívání po ukončení diapauzy) z dvou rozdílných populací (horská rašeliništní populace ze Šumavy a vysokohorská populace z italských Alp).

Přezimující housenky motýla jsou citlivé k zmrznutí, jejich letální teplota se pohybovala těsně nad (velmi nízkým) bodem podchlazení ( $-25$  až  $-27^{\circ}\text{C}$ ). Při delších expozicích housenek z české populace teplotě  $-26^{\circ}\text{C}$  stoupala s delší dobou expozice, polovina experimentálních jedinců zahynula při době expozice 9,4 dne.

Obě populace se značně lišily v obsahu kryoprotektantů v těle. Housenky z české populace obsahovaly celkově více kryoprotektivních látek, především glycerolu (5% hmotnosti) a cukrů (trehalóza 0,8%, glukóza 0,2%) než populace alpská (glycerol 0,3%, trehalóza 0,6%, glukóza 0,3%). Tyto významné rozdíly však neměly vliv na chladovou odolnost housenek, která byla u obou skupin srovnatelná, konkrétní role jednotlivých kryoprotektivních složek v procesu chladové odolnosti tak zasluhuje další výzkum. Glycerol pravděpodobně zajišťuje vysokou odolnost housenek k vyschnutí. Ve stadiu přezimujících housenek je tak motýl velmi odolný k nízkým teplotám i vyschnutí při srovnání s dalšími zkoumanými středoevropskými druhy hmyzu.

Srovnání jarního vývoje housenek, umístěných přes zimu v rozdílných teplotních podmínkách (konstantní teplota  $5^{\circ}\text{C}$  vs. přírodní podmínky) neukázalo žádný rozdíl v přežívání a schopnosti vývoje k imágu. Rozdíl byl pouze v nižší hmotnosti po přezimování u larev umístěných ve vyšší teplotě, tento rozdíl byl však později kompenzován při příjmu potravy.

Celkově tedy žluťásek borůvkový patří k velmi odolným druhům z hlediska tolerance k nízkým teplotám a vlhkosti, což přispívá k jeho schopnosti přežít na celé škále drsných klimatických podmínek v celém velkém areálu.



# OVERWINTERING OF THE BOREAL BUTTERFLY *COLIAS PALAENO* IN CENTRAL EUROPE

Pavel Vrba<sup>1</sup>, Matthias Dolek<sup>2</sup>, Oldřich Nedvěd<sup>1,3</sup>, Helena Zahradníčková<sup>3</sup>,  
Cristiana Cerrato<sup>4</sup>, Martin Konvička<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Science, University of South Bohemia, Branisovska 31, 37005 Ceske  
Budejovice, Czech Republic

<sup>2</sup>Büro Geyer und Dolek, Obere Dorfstraße 16, 82237 Wörthsee, Germany

<sup>3</sup>Institute of Entomology, Biology Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic,  
Branisovska 31, 37005 Ceske Budejovice, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Life Science and System Biology, University of Turin, Via Accademia  
Albertina 13, 10123 Torino, Italy

\*Corresponding autor

e-mail: nedved@prf.jcu.cz

## Abstract

*Colias palaeno* (Linnaeus, 1761) (Lepidoptera: Pieridae) is a butterfly with boreal distribution with declining populations in peat bogs and subalpine habitats in Central Europe. We investigated the cold tolerance of overwintering caterpillars from one mountain population from Czech Republic (960m a.s.l.) and one alpine population from Italy (2000m a.s.l.). The caterpillars were freeze-avoiding, with lower lethal temperature close to their very low supercooling point (−25 to −27°C). The Czech mountain population accumulated high concentrations of glycerol (5% fresh mass) and sugars (trehalose 0.8%, glucose 0.2%), while the Italian alpine population only moderate amounts of glycerol (0.3%) and sugars (trehalose 0.6%, glucose 0.3%) without effect on their cold hardiness. We hypothesize that the high concentration of glycerol contributes to the high desiccation tolerance. Larvae that overwintered at 5°C had a lower body mass than those overwintering in natural conditions, indicating a metabolic weight loss, but both groups survived equally well.

**Keywords:** cold hardiness, cryoprotective polyols, insect conservation, mountain ecology

## INTRODUCTION

Low temperatures affect insect survival, particularly in extremely cold environments, e.g. polar regions and mountains. In such regions, insects have to complete their development in a very limited part of the season (39) and have to deal with temperature extremes during overwintering (15, 31). On the other hand, some characteristics of these unique habitats may contribute to the survival of overwintering insects. Predictable snow cover insulates grounddwelling organisms against low ambient temperatures, improving their survival if compared with organisms living in areas with unpredictable snow cover (10, 33, 52). Similarly, humid *Sphagnum* tussocks in boggy habitats buffer against microclimatic fluctuations (49). Survival of extreme winter conditions on these sites depends on complex adaptations, including various cold hardiness strategies combined with selection of an appropriate microhabitat (27, 54). From a conservation point of view, recent changes of temperature and (or) precipitation regimes should be risky for species inhabiting limited extrazonal habitats, e. g. cold peat bogs or high mountains (40, 14).

### *Physiology of overwintering*

Each of the two main strategies of coping with subzero temperatures, freeze tolerance (ability to survive freezing of body liquids) and freeze avoidance (mechanisms preventing freezing of body liquids) (e.g. 42), is advantageous in certain climatic contexts (50). Supercooling capacity and protection against chill injury are both enhanced by the synthesis and accumulation of cryoprotective substances, including glycerol, glucose, sorbitol and trehalose (45, 38). Glycerol functions as an antifreeze, decreasing the freezing temperature, and as a cryoprotectant binding free water (32) and preventing protein denaturation (7). However, the mere accumulation of glycerol does not provide freeze tolerance (45), it seems to provide cryoprotection only in combination with other physiological changes (9). Decrease of water content is not necessary for decreasing supercooling point (SCP) or enhancing survival of insects (30).

### *Model species distribution and activity*

*Colias palaeno* (Linnaeus, 1761) (Pieridae), a member of the species-rich and cosmopolitan genus *Colias* Fabricius, 1807, is a Boreal zone butterfly, inhabiting a vast circumpolar range in northern Eurasia, from approximately the 50° parallel northwards. In addition, it forms multiple relic populations situated more southerly, in higher-elevated and cooler areas of the temperate zone (51). In North America it is replaced by the vicarious *Colias chippewa* Edwards, 1872, inhabiting similar habitats with *Vaccinium* host plants (26, 51).

Within its huge range, *C. palaeno* occurs in a wide range of habitats, provided that its host plant, *Vaccinium uliginosum* L., is present. In temperate Central Europe, *C. palaeno* occurs as a glacial relic at two main habitat types: cold peat-bogs, i.e. azonal oligotrophic wetlands in submountain and mountain elevations, from approximately 400m altitude onwards, and open, sometimes drier, heathlands at and above the timberline in high-elevations of the Alps (5, 6, 47). Adults usually occur from late May to early August, depending on elevation and weather conditions, males patrolling the habitat, females ovipositing singly on host plant leaves. Larvae are commonly reported to overwinter on dry leaves attached to the stems by silk fibre or falling with the leaf to the ground, mainly in the lower parts of the host plant (19, 28); recent observations from southern Bavaria, however, show that most caterpillars leave the host plant already in August and overwinter at *Sphagnum* covered ground (Dolek et al., unpublished).

Many of the relic populations at southern outposts of the range of *C. palaeno* are declining at present (8, 37). This particularly applies for the populations inhabiting *Sphagnum*-bogs within submontane and mountain elevational zones. The species is thus extinct in Belgium (the Ardennes) as well as in northern and some central states of Germany.

A stronghold of Central European importance is the prealpine hill and bog area in southern Bavaria, containing hundreds of localities. Since the 1990s, a loss of about 50% of localities occurred in this area (6). Concurrently in the Czech Republic, the species lost about 40% of its mid-20th century distribution. Local extinctions are also known from the lower mountains of Austria and Switzerland. In the Alps, *C. palaeno* exploits both drier and wet habitats above the timberline, from approximately 1800 m onwards. Although precise quantitative data on past and current distribution are not available, the species does not seem to be threatened in the Alps (11).

Central European populations and high altitude alpine populations are considered as different subspecies, *C. p. europome* (Esper, 1778) and *C. p. europomene* (Ochsenheimer, 1808), respectively. Direct exchanges of individuals between the prealpine bog and hill area and the Alps are unlikely.

Several reasons have been implicated to explain the losses of lower-elevation populations, including habitat degradation (drainage, successional changes) (8), and climatic warming (cf. 41). Any such conjectures are premature, however, as there is practically no information regarding the ecophysiological limits of the species' persistence. Obtaining such information may shed some light on persistence patterns of northern species in more southerly latitudes, and thus on their future prospects.

In this paper, we investigated the lower thermal survival limits of *C. palaeno* diapausing larvae. We compared larvae from two contrasting southerly-situated populations, one from mountain-zone peat bogs in the Šumava Mts., Czech Republic, and one from the timberline in the Alps, Italy. We measured how these two geographically and altitudinally distinct populations differed in their cold hardiness, expressed as supercooling point, lower lethal temperature and postdiapause survival. We also studied their physiological adaptations to cold winter conditions through analysis of body content of cryoprotectants.

## MATERIALS AND METHODS

### *Rearing experimental individuals*

We used hibernating caterpillars of *C. palaeno*, originating from two distinct localities in the Czech Republic and Italy. The Czech mountain population (Šumava Mts., 49°02'N, 13°40'E, 960 m a.s.l.) inhabits a mosaic of *Sphagnum*-bog, wet grasslands and waterlogged *Picea abies* – *Betula pubescens* woodlands. Here, fertilized females ( $n = 45$ ) were captured in July 2010, and transported to an outdoor rearing facility. The Italian alpine population (Alpi Lepontine, 46°10'N, 8°10'E, 2000 m a.s.l.) inhabits dwarf shrubland habitats at the timberline containing the host plant *Vaccinium uliginosum*. Here, we directly collected 30 third-instar larvae from *V. uliginosum* leaves in September 2011, and transported them to the same rearing facility.

The rearing facility, located in lowland semi-natural conditions (a half-shaded garden corner) in Ceske Budejovice, Czech Republic (49°00'N, 14°25'E, 400 m a.s.l.)

consisted of wired cages (50 x 50 x 100cm) covered by nylon mesh. Each of the cages contained a flower pot with a *V. uliginosum* plant.

From the mountain population, we released up to five females into each cage and fed them with a 5% sucrose solution to increase their life span and hence the number of eggs laid. After the larvae hatched, we let them develop without disturbance, except for watering the host plants. In the first decade of November, after the larvae stopped feeding and entered winter diapause, being rolled in dry leaves of *V. uliginosum* attached to stems, we transferred the pots to an air-conditioned room with constant 5°C temperature and about 40% humidity. The plants were regularly sprayed with water to avoid desiccation.

Larvae from the alpine population were already showing signs of entering diapause when released to the cages. After a few days in the rearing facility, they were treated identically as the mountain ones.

#### *Cold hardiness measurements*

In January, we removed individual larvae from the host plant and measured their cold hardiness. The supercooling point (SCP) was measured individually in sixteen individuals per population using a line recorder with hand-made thermocouples (18), which were attached to the body of the experimental caterpillars (12). Larvae were gradually cooled above liquid nitrogen and cooling rate was controlled at 1 degree per minute. After the exotherm appeared on the line recorder, the larva was kept in the cooling device until its body temperature decreased again to the value of crystallization temperature. The chamber was then removed from the cooling device to an ambient 5°C, the body temperature was left to increase (after body ice melted). The larva was then removed from the chamber and kept in a Petri dish at 5°C for 24 hours. Survival was subsequently checked at 20°C as presence of spontaneous movement or reaction to mechanical stimuli.

To measure lower lethal temperature (LLT), groups of ten larvae were put on dry filter paper in a Petri dish, and placed in a pre-cooled incubator. The dishes were situated in a box insulated by plastic foam and granular ice from its surroundings to provide slow cooling on a negative exponential basis to the set up temperature measured inside the dish by resistor thermometer. Series of temperatures close to and above SCP were used. Larvae were removed after 24 hours and treated as above to check their

survival. LLT50 was calculated using the logistic regression method in Statistica 10 (46) software package.

We also measured lethal time (Lt) at selected temperature above SCP using the same method as for LLT, with exposure times from one to seven days. Again, Lt50 was calculated using logistic regression.

#### *Analysis of cryoprotectants*

Eighteen individuals from the mountain population and seven individuals from the alpine population were analyzed individually. Diapausing larvae were frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , then melted, homogenized in 70% ethanol, samples centrifuged, supernatant derivatized with O-methylhydroxylamine (oximation) and trimethylsilylimidazol (silylation). After derivatization, the concentrations of low-molecular mass sugars and polyols (putative cryoprotectants) were determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry (23, 25). Chemicals used during analysis were purchased from Sigma-Aldrich Co. Concentrations were expressed as  $\mu\text{g}/\text{mg}$  fresh body mass. Differences between the two populations were analyzed using *t*-test with independent samples (Statistica 10). Standard probability value of 0.05 for decision of significance was lowered in this series of several parallel tests (Table 1) using the Sidak correction (1).

In addition to *t*-tests, we also used the redundancy analysis (RDA), a constrained ordination method that compares the entire composition of samples with respect to external predictors; in this case, entire polyol profiles with respect to the origin of the individuals. We used the CANOCO programme, statistically testing for the difference between populations using the Monte-Carlo permutation test with 999 repetitions (29).

#### *Postdiapause growth*

Ten caterpillars from the mountain population that overwintered outdoors and ten that overwintered at constant  $5^{\circ}\text{C}$  were transferred in April to laboratory rearing conditions: 14L:10D photoperiod and  $20^{\circ}\text{C}$ . They were placed individually into Petri dishes (15 cm diameter) and fed with *V. uliginosum* twigs with young leaves. Their body mass was measured after the transfer and then after one and two weeks. Pupation and adult eclosion were recorded, sex of the adults was determined. Differences between the two treatments were analyzed by *t*-test with independent samples (Statistica 10).

## RESULTS

### *Cold hardiness*

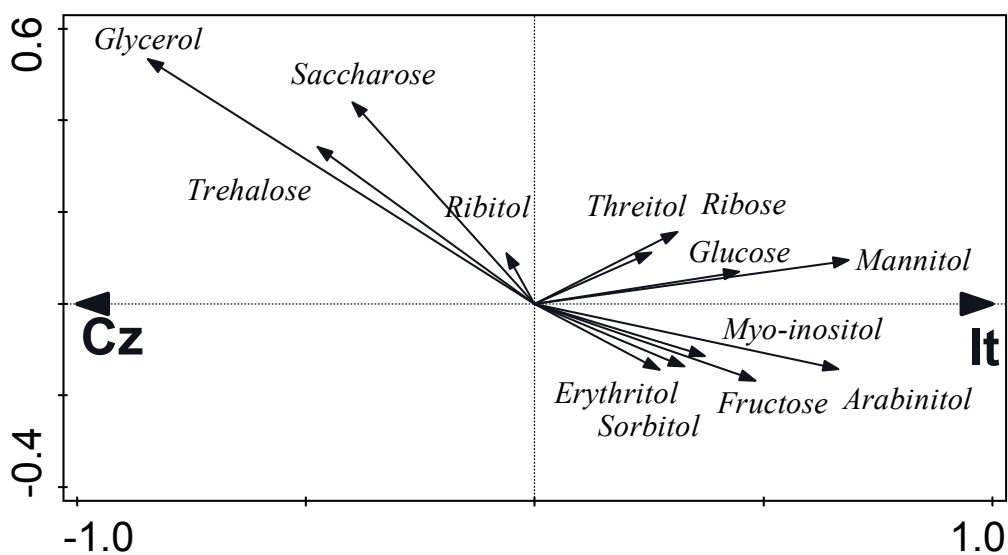
Overwintering larvae of *Colias palaeno* did not survive SCP measurements with freezing of their body fluids, and thus exhibited the freeze-avoiding strategy. Mean SCP ( $\pm$ SD) were  $-24.8\pm 3.9^{\circ}\text{C}$  (mountain population) and  $-26.8\pm 2.7^{\circ}\text{C}$  (alpine population); the difference was not significant ( $t$ -test:  $t_{30} = 1.72$ ,  $P = 0.10$ ). The lower lethal temperature, estimated for the mountain population only ( $-26^{\circ}\text{C}$ ), was very close to the SCP. Survival of overwintering larvae of the mountain population at  $-26^{\circ}\text{C}$  decreased with exposure duration according to logistic regression  $S = \frac{e^{1.56 - 0.167 \cdot ED}}{1 + e^{1.56 - 0.167 \cdot ED}}$ , Lt50 was 9.4 days. It follows that hibernating larvae of *C. palaeno* are highly cold-resistant, able to survive extreme winter conditions.

### *Polyols*

The Czech mountain population larvae exhibited much higher total concentrations of polyols and sugars, mainly glycerol and trehalose, than the alpine Italian population. On the other hand, the alpine population larvae had a higher concentration of glucose (Tab. 1). Glycerol formed by far most of the osmotically active body substances in the mountain population, whereas trehalose, followed by glucose and glycerol in comparable concentrations, were most prominent in the alpine population. Another sugar that had concentration about 1  $\mu\text{g}/\text{mg}$  was saccharose, in both populations, whereas the other compounds were present in concentrations too low to substantially contribute to cold hardiness and they did not differ between the two populations. RDA analysis (Fig. 1) also pointed to a highly significant difference between the two populations in the composition of cryoprotective polyols.

**Table 1:** Contents of cryoprotectants in overwintering caterpillars of *Colias palaeno* expressed in  $\mu\text{g}$  per mg fresh mass. Differences between the Czech mountain and Italian alpine populations significant on the adjusted probability level are expressed in **bold**.

|              | Czech mountain |       | Italian alpine |       | <i>t</i> | <i>P</i>        |
|--------------|----------------|-------|----------------|-------|----------|-----------------|
|              | Mean           | SD    | Mean           | SD    |          |                 |
| Glycerol     | 47.72          | 21.53 | 2.901          | 2.155 | 5.43     | <b>0.000016</b> |
| Arabinitol   | 0.167          | 0.032 | 0.191          | 0.073 | 1.17     | 0.25            |
| Ribitol      | 0.031          | 0.013 | 0.031          | 0.019 | 0.01     | 0.99            |
| Fructose     | 0.360          | 0.068 | 0.442          | 0.129 | 2.09     | 0.048           |
| Glucose      | 1.994          | 0.417 | 2.971          | 0.958 | 3.62     | <b>0.0014</b>   |
| Mannitol     | 0.159          | 0.027 | 0.210          | 0.071 | 2.61     | 0.016           |
| Sorbitol     | 0.248          | 0.041 | 0.304          | 0.109 | 1.91     | 0.068           |
| Myo-inositol | 0              | 0     | 0.036          | 0.094 | 1.66     | 0.11            |
| Saccharose   | 1.163          | 0.391 | 0.841          | 0.271 | 1.99     | 0.059           |
| Trehalose    | 8.397          | 1.860 | 5.237          | 2.509 | 3.46     | <b>0.0021</b>   |
| Threitol     | 0.041          | 0.028 | 0.055          | 0.018 | 1.26     | 0.22            |
| Erythritol   | 0.078          | 0.067 | 0.127          | 0.044 | 1.78     | 0.088           |
| Ribose       | 0.099          | 0.058 | 0.150          | 0.046 | 2.05     | 0.052           |
| $\Sigma$     | 60.46          | 21.54 | 13.50          | 3.947 | 5.66     | <b>0.000009</b> |



**Fig. 1.** Profiles of polyols in the Czech mountain (Cz;  $n=18$ ) and Italian alpine (It;  $n=7$ ) overwintering larvae of the butterfly *Colias palaeno*. RDA ordination diagram (1st and 2nd ordination axes). The origin of samples (Cz vs. It) explained 68% of variation in the polyol profiles; the proportional variation attributable to individual ordination axes was 0.678 (1st), 0.270 (2nd), 0.040 (3rd) and 0.006 (4th). Monte-Carlo test:  $F = 48.5$ ,  $P < 0.001$ .



### *Postdiapause growth*

The initial body mass of caterpillars after overwintering in natural conditions was slightly higher ( $10.8 \pm 2.1$  mg) than after overwintering at constant  $5^{\circ}\text{C}$  ( $8.6 \pm 2.2$  mg;  $t_{16} = 2.18$ ,  $P = 0.044$ ). The difference after one week ( $54 \pm 14$  mg vs.  $37 \pm 20$  mg;  $t_{14} = 1.86$ ,  $P = 0.083$ ) was not significant due to a high variability in the  $5^{\circ}\text{C}$  treatment. The smaller individuals that overwintered at constant  $5^{\circ}\text{C}$  grew more slowly than the larger ones, however, so that the individual differences in body mass increased. After two weeks, differences in body mass between the two treatments were not significant ( $238 \pm 79$  vs.  $212 \pm 115$  mg;  $t_{12} = 0.49$ ,  $P = 0.640$ ), although the individual differences within  $5^{\circ}\text{C}$  treatment were still apparent. Pupation was delayed in the smaller individuals; the post-diapause larval development lasted 19 days in the fastest individual and 31 days in the slowest one. However, the differences in body mass and duration of development might be influenced by the bias in sex of individuals, because there were more females (6F:1M) in the outdoor treatment and more males (2F:5M) in the  $5^{\circ}\text{C}$  treatment. However, the mass after two weeks did not differ between the two sexes (females:  $247 \pm 90$ , males:  $261 \pm 32$  mg;  $t_{10} = 0.27$ ,  $P = 0.691$ ). Postdiapause survival was 7 out of 8 and 7 out of 10 individuals in the two treatments.

## DISCUSSION

### *Cryoprotectants*

Interestingly, the two populations differed substantially in the content and composition of cryoprotectants. Although the samples differed in their previous history and year of sampling, the long acclimation procedure was equal for them. It seems that the high content of glycerol, found in the mountain but not in the alpine population, is not necessary for efficient cold hardiness. There are examples of other Lepidoptera with both positive and no relationship between glycerol content and cold hardiness. Changes in glycerol content from November through December to March correlated with SCP in the Asiatic rice borer *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): 34, 41, 22% of haemolymph;  $-11$ ,  $-13$ ,  $-5^{\circ}\text{C}$ ; while trehalose content did not (21). For field-collected larvae of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae), SCP remained low in November and December ( $-24$  and  $-24.5^{\circ}\text{C}$ ) and increased in February ( $-23^{\circ}\text{C}$ ), while the glycerol concentration increased during this period (probably 0.6, 2.8,

10.5% – there is a mismatch in magnitudes in the article) and trehalose content remained about 0.1% (3). In the forest tent caterpillar *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae), glycerol content was about 16% dry weight in November and January while only about 3% in August and April. However, SCP remained between  $-30^{\circ}\text{C}$  and  $-35^{\circ}\text{C}$  all year round (48). In larvae of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), mean SCP values decreased from  $-6$  to  $-9^{\circ}\text{C}$  from November to December together with an increase of trehalose concentration from 0.7 to 5.2% fresh weight, while glycerol content remained at about 5%. However, SCP was lowest in February ( $-9.2^{\circ}\text{C}$ ) while both trehalose and glycerol contents dropped (0.3; 0.5%) (4).

The higher concentration of glucose in the alpine population can be explained as retaining the initial intrinsic higher content of the source for synthesis of other cryoprotectants, while in the mountain population, the source was mostly utilized for this purpose. Such inverse pattern was found in the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae) (48).

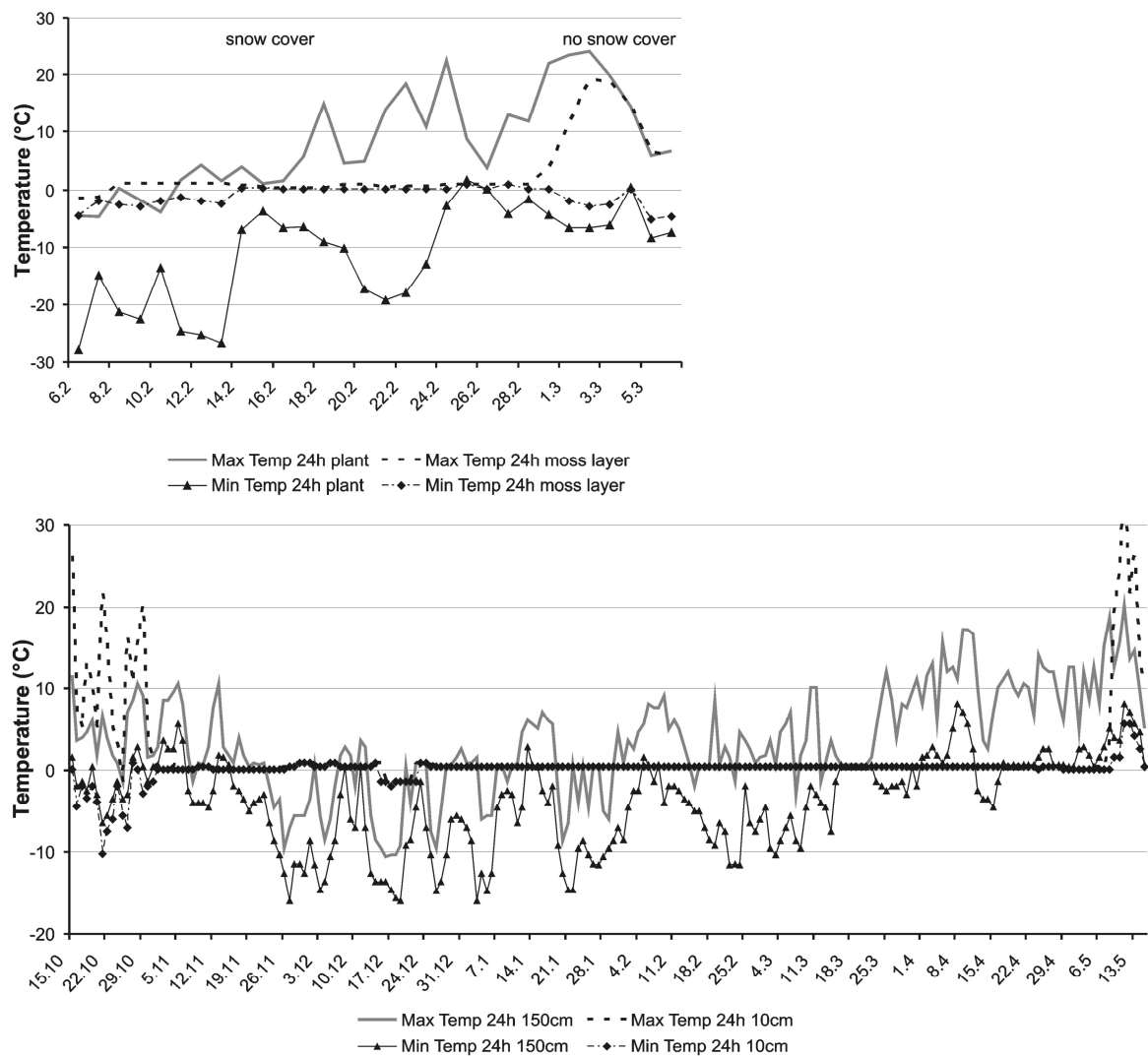
The high glycerol concentration in *C. palaeno* may rather function as a protection against desiccation since glycerol is hygroscopic. The caterpillars survived several months of exposure at constant  $5^{\circ}\text{C}$  and low relative air humidity with no apparent changes in body structure. Unfortunately, we did not measure their water content. Under snow, in the Alps, humidity is 100% from November until April. Snow cover may be temporarily low in the Bavarian and Czech mountains, and twigs with caterpillars exposed. Low temperatures in field (Fig. 2) interact with low humidity on twigs. The relationship between drought and glycerol content during winter was studied in larvae of the rice stem borer *Chilo suppressalis*: glycerol concentration was significantly higher (48% of haemolymph) and SCP lower ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) at low soil moisture (25%) than at higher moisture (35%,  $-7^{\circ}\text{C}$ ). Trehalose concentration displayed an opposite trend (20).

### *Survival*

Overwintering caterpillars of the butterfly *Colias palaeno* were freeze-avoiding, with lower lethal temperature close to the supercooling point. The measures of cold hardiness in two widely separated populations were extremely low in comparison to numerous insect species occurring in temperate Central Europe (e.g., SCP in ladybirds *Coccinella septempunctata*:  $-15^{\circ}\text{C}$ , *Ceratomegilla undecimnotata*:  $-19^{\circ}\text{C}$  (36); bugs *Pyrrhocoris apterus*:  $-15^{\circ}\text{C}$  (22); *Graphosoma lineatum*:  $-17^{\circ}\text{C}$  to  $-18^{\circ}\text{C}$  (44); five

gerrid semi-aquatic bugs: SCP:  $-10.5$  to  $-20.5^{\circ}\text{C}$ , LLT:  $-8$  to  $-16^{\circ}\text{C}$  (16). The supercooling point was similar in magnitude to the mountain bark beetle *Ips typographus*:  $-20$  to  $-22^{\circ}\text{C}$  (24), and the alpine butterfly *Erebia ephron* ( $-22^{\circ}\text{C}$ ), which inhabits similar habitats as the *C. palaeno* mountain and alpine populations, respectively. *E. ephron* nevertheless displayed higher values of LLT ( $-17^{\circ}\text{C}$ ), while two of its congeners of alpine habitats, *E. tyndarus* and *E. sudetica*, displayed still higher values:  $-8$  to  $-15^{\circ}\text{C}$  (52). In three other species of *Colias* butterflies, both lowland and alpine, SCP was much higher ( $-18$  to  $-14^{\circ}\text{C}$ ) (53).

In any case, the values found for *C. palaeno* document a safe survival of low temperatures by its overwintering larvae. Furthermore, the two *C. palaeno* populations did not differ in cold hardiness, although the Czech mountain population likely experiences occasional snow-melts, while the Italian alpine population is likely insulated by snow for most of the winter. This is well illustrated using temperature measurements from the Italian alpine population, and from a population in Bavaria, inhabiting conditions similar to the Czech mountain population studied here (Breitmoos peat bog,  $47^{\circ}45'\text{N}$ ,  $12^{\circ}46'\text{E}$ , altitude 400 m) (Fig 2). Evidently, low subzero temperatures are never experienced by the larvae overwintering in the moss layer and insulated by snow. They can be, however, experienced by larvae spending winters at host plant twigs. It would be worth to quantify the fraction of individual populations overwintering in these frost-exposed situations, contrary to those overwintering in the moss layer, because only the former larvae might be threatened by deep frosts. Even at the twigs, however, temperatures below  $-20^{\circ}\text{C}$  occurred for only brief periods of time, while several days of continuous exposure to such frosts would be necessary for substantial mortality. The role of snow cover for survival of lepidopteran larvae was recently stressed (34, 52).



**Fig. 2.** Comparison of minimum and maximum daily temperatures likely experienced by overwintering larvae of the butterfly *Colias palaeno*. a) A mountain population (Breitmoos peat bog, southern Bavaria), measurements taken next to twigs of the *Vaccinium uliginosum* host plant (plant) and on the ground (moss layer). b) An alpine population (Alpi Lepontine, Italy), measurements taken at 1.5 m and near the ground (10 cm, where larvae start overwintering diapause). Note that the two measurements cover different periods of time.

The *C. palaeno* larval overwintering at constant temperature, which was relatively higher than the temperatures experienced outdoors, was probably accompanied with a higher metabolic rate, and resulted in higher mass loss. Depletion of energetic reserves even at moderately low winter temperatures was reported in caterpillars of the oak processionary moth *Thaumetopoea processionea* (Lepidoptera: Notodontidae) (35) and the parasitic wasp *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiinae) (13). Our caterpillars

survived the unnatural conditions of constant 5°C well, compensating for their mass loss after the onset of feeding and successfully developing into adults.

In any case, the unusually high cold hardiness and desiccation tolerance arguably contribute to *C. palaeno*'s wide distribution. Its larvae experience a wide diversity of conditions, from northern tundra and boreal woodlands to high altitudes, and may even experience deep frosts if overwintering at host plant twigs in more continental parts of their ranges.

The reasons of the *C. palaeno* low latitude populations' recent decline remain unexplained, the overwintering abilities of the larval stage safely rule out overwintering larval mortality as the responsible factor. Neither relatively higher average winter temperatures that appear as a consequence of climate warming nor very low temperatures and low humidity that may occur in the overwintering microhabitat due to decreased snow cover would cause a substantial larval mortality. Causes of the declines should be sought for in other factors, such as (possibly climate-driven) changes in host plant quality (cf. 2), possible phenological mismatches between larval spring emergence and host plant leaves flushing (cf. 43), or perhaps increased infestation by pathogens or parasitoids (cf. 17) or microclimatic conditions during summer development. In any case, results of this study highlight the efficiency of low temperature adaptations of cold-adapted insects, and point to a possibly high diversity of physiological mechanisms to achieve their impressive cold hardiness.

**Acknowledgements:** We are grateful to A. Bartonova, A. Pavlikova, P. Vlasanek and M. Zapletal for help with rearing the caterpillars. The study was supported by the Czech Science Foundation (P505/10/1630, P505/10/2167), the University of South Bohemia (144/2010/100) and the Bavarian Academy of Nature Conservation and Landscape management (ANL). The study is part of the ANL research project “Development of management strategies for habitats and species of the annexes of the Habitats Directive: Analysis of the reasons for the largescale decline of *Colias palaeno*”.

## REFERENCES

1. Abdi H (2007) In *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. (ed) Salkind NJ, Thousand Oaks (CA), Sage, pp. 103–107.
2. Ammunet T, Klemola T & Saikkonen K (2011) *Ecography* **34**, 848–855.
3. Andreadis SS, Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E & Savopoulou-Soultani M (2008) *Physiol. Entomol.* **33**, 365–371.
4. Andreadis SS, Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E & Savopoulou-Soultani M (2011) *CryoLetters* **32**, 297–307.
5. Anwander H (2010) *Merkblatt Artenschutz* **33**, Bayerisches Landesamt für Umwelt, Augsburg.  
[http://www.lfu.bayern.de/natur/artenhilfsprogramme\\_zoologie/merkblaetter/doc/33.pdf](http://www.lfu.bayern.de/natur/artenhilfsprogramme_zoologie/merkblaetter/doc/33.pdf)
6. Anwander H, Dolek M & Scherzinger C. (2013) *Colias palaeno* (Linnaeus, 1761) – Hochmoorgelbling. pp. 164–167. In: Bräu, M., Bolz, R., Kolbeck, H., Nunner, A., Voith, J. & Wolf, W.: *Tagfalter in Bayern*. – Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer. 784 pp.
7. Belous AM & Bondarenko VA (1982) *Strukturnye izmeneniya biologicheskikh membran pri okhlazhdenii* [*Structural changes in biological membranes upon cooling*]. Kiev: Naukova Dumka, 255 pp.
8. Beneš J, Konvička M, Dvořák J, Fric Z, Havelda Z, Pavlíčko A, Vrabec V & Weidenhoffer Z (eds) (2002) *Motýli České republiky: Rozšíření a ochrana* [*Butterflies of the Czech Republic: Distribution and Conservation*] I, II. SOM, Praha, 857 pp.
9. Bennett VA & Lee RE (1997) *J. Exp. Biol.* **200**, 185–192.
10. Boggs CL & Inouye DW (2012) *Ecol. Lett.* **15**, 502–508.
11. Bonelli S, Cerrato C, Loglisci N & Balletto E (2011) *J. Insect. Conserv.* **15**, 879–890.
12. Brunnhofer V, Nedvěd O & Hodková M (1991) *Acta Entomol. Bohemos.* **88**, 349–350.
13. Colinet H, Hance T & Vernon P (2006) *Environ. Entomol.* **35**, 228–236.
14. De Groot M, Rebeusek F, Grobelnik V, Govedic M, Salamun A & Verovnik R (2009) *Eur. J. Entomol.* **106**, 77–84.
15. Dillon ME, Frazier MR & Dudley R (2006) *Integr. Comp. Biol.* **46**, 49–61.

16. Ditrich T & Košťál V (2011) *Physiol. Entomol.* **36**, 261–270.
17. Gripenberg S, Hamer N, Brereton T, Roy DB & Lewis OT (2011) *Ecol. Entomol.* **36**, 271–281.
18. Hanson AA & Venette RC (2013) *CryoLetters* **34**, 261–267.
19. Havel L (1970) *Sbor. Jihoč. Muz. Č. Bud.* **10**, 80–84 [In Czech].
20. Hou M, Han Y & Lin W (2009b) *Entomol. Sci.* **12**, 155–161.
21. Hou M, Lin W & Han Y (2009a) *Environ. Entomol.* **38**, 1182–1188.
22. Kalushkov P & Nedvěd O (2000) *Eur. J. Entomol.* **97**, 149–153.
23. Košťál V & Šimek P (1995) *J. Insect Physiol.* **41**, 627–634.
24. Košťál V, Doležal P, Rozsypal J, Moravcová M, Zahradníčková H & Šimek P (2011) *J. Insect Physiol.* **57**, 1136–1146.
25. Košťál V, Zahradníčková H, Šimek P & Zelený J (2007) *J. Insect Physiol.* **53**, 580–586.
26. Kudrna O, Harpke A, Lux K, Pennerstorfer J, Schweiger O, Settele J & Wiemers M (2011) *Distribution atlas of butterflies in Europe*. Gesellschaft für Schmetterlingsschutz, Halle, Germany. 576 pp.
27. Layne JR, Edgar CL & Medwith RE (1999) *Am. Midl. Nat.* **141**, 293–304.
28. Lepidopterologen Arbeitsgruppe 1987: *Tagfalter und ihre Lebensräume. Schweiz und angrenzende Gebiete. Arten, Gefährdung, Schutz*. Schweizerischer Bund für Naturschutz, Basel. 516 pp.
29. Lepš J & Šmilauer P 2003: *Multivariate analysis of ecological data using CANOCO*. Cambridge University Press, Cambridge. 282 pp.
30. Li NG & Zachariassen KE (2006) *Biol. Bull.* **33**, 483–487.
31. Li NG (2012) *CryoLetters* **33**, 134–142.
32. Lovelock JE (1953) *Biochim. Biophys. Acta* **11**, 28–36.
33. Marshall KE & Sinclair BJ (2011a) *J. Exp. Biol.* **214**, 1205–1212.
34. Marshall KE & Sinclair BJ (2011b) *Naturwissenschaften* **99**, 33–41.
35. Meurisse N, Hoch G, Schopf A, Battisti A & Gregoire JC (2012) *Agr. Forest Entomol.* **14**, 239–250.
36. Nedvěd O (1993) *Eur. J. Entomol.* **90**, 465–470.
37. Nilsson SG, Franzén M & Jönsson E (2008) *Insect Conserv. Diver.* **1**, 197–207.
38. Ramlov H (2000) *Hum. Reprod.* **15**, 26–46.
39. Roff D (1980) *Oecologia* **45**, 202–208.
40. Schmitt T, Čížek O & Konvička M (2005) *Biol. Conserv.* **123**, 11–18.

41. Settele J, Kudrna O, Harpke A, Kühn I, van Swaay C, Verovnik R, Warren M, Wiemers M, Hanspach J, Hickler T, Kühn E, van Halder I, Veling K, Vliegenthart A, Wynhoff I & Schweiger O (2008) *Climatic Risk Atlas of European Butterflies*. Pensoft, Sofia-Moscow, 712 pp.
42. Sinclair BJ, Vernon P, Klok CJ & Chown SL (2003) *Trends Ecol. Evol.* **18**, 257–262.
43. Singer MC & Parmesan C (2010) *Philos. T. R. Soc. B* **365**, 3161–3176.
44. Šlachta M, Vambera J, Zahradníčková H & Košťál V (2002) *J. Insect Physiol.* **48**: 1031–1039.
45. Somme L (1982) *Comp. Biochem. Physiol. A* **73**, 519–543.
46. StatSoft Inc. (2011) *STATISTICA (data analysis software system), version 10*. www.statsoft.com.
47. Tolman T & Lewington R (2008) *Collins Butterfly Guide*. HarperCollins Publishers, London. 384 pp.
48. Trudeau M, Mauffette Y, Rochefort S, Han E & Bauce E (2010) *Environ. Entomol.* **39**, 498–504.
49. Turlure C, Choutt J, Baguette M & vanDyck H (2010) *Glob. Change Biol.* **16**, 1883–1893.
50. Turnock WJ & Fields GF (2005) *Eur. J. Entomol.* **102**, 561–576.
51. Verhulst J (2000–2001) *Les Colias du Globe. Monograph of the Genus Colias*. Goecke & Evers, Germany, Vol. **1** (text), 263 pp. (December 2000), Vol. **2** (plates), pp. 264–308, 183 pls. (January 2001).
52. Vrba P, Nedvěd O & Konvicka M (2013) *J. Entomol. Sci.*, in press
53. Vrba P, Konvička M & Nedvěd O (2012) *CryoLetters* **33**, 251–258.
54. Wagner D, Doak P, Sformo T, Steiner PM & Carlson B (2012) *Environ. Entomol.* **41**, 180–187.



# Kapitola III.

## **CONTRASTING SUPERCOOLING ABILITY IN LOWLAND AND MOUNTAIN EUROPEAN *COLIAS* BUTTERFLIES**

Vrba P., Nedvěd O., Konvička M.

Journal of Entomological Science

2014

**Souhrn:**

Studie se zabývá body podchlazení u přezimujících housenek čtyř středoevropských motýlů z celosvětově rozšířeného rodu *Colias*. Vybrané druhy reprezentují různé typy biotopů v různých klimatických podmínkách, od suchých stepních trávníků po chladné alpské hole a rašeliniště.

Zjištěné hodnoty dobře reflektují velkou diverzitu adaptací k různým environmentálním podmínkám. Nejnižší hodnota ( $-24,8^{\circ}\text{C}$ ) byla zjištěna u rašeliništního a horského žlutáška borůvkového (*Colias palaeno*), vyšší hodnoty byly zjištěny u stepního specialisty *C. alfacariensis* ( $-18,6^{\circ}\text{C}$ ), nížinného generalisty *C. hyale* ( $-14,5^{\circ}\text{C}$ ) a specialisty alpských trávníků *C. phicomone* ( $-13,8^{\circ}\text{C}$ ). Housenky všech studovaných druhů byly citlivé ke zmrznutí. Housenky teplomilného středomořského migranta *C. crocea* vesměs nepřežily dvoutýdenní aklimaci při teplotě  $5^{\circ}\text{C}$ , což ukazuje, že trvalý výskyt motýla je pravděpodobně limitován na nejteplejší středomořské pobřeží a ostrovy.

Srovnání bodů podchlazení těchto druhů je pouze prvním krokem k pochopení jejich komplexních ekofyziologických adaptací, mohou však již reflektovat diverzitu podmínek v obývaných oblastech a biotopech. Obdobně jako u dříve studovaných okáčů rodu *Erebia*, nesledují zjištěné hodnoty klimatický gradient od teplejších oblastí k chladnějším, ale reflektují spíše mikroklimatické podmínky na místech, kde housenky přezimují s pravděpodobně významným vlivem přítomnosti sněhové pokrývky.

# Contrasting supercooling ability in lowland and mountain European *Colias* butterflies

Pavel Vrba<sup>1\*</sup>, Oldřich Nedvěd<sup>1,2</sup>, Martin Konvička<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Science, University South Bohemia, Branisovska 31c, 370 05 Ceske Budejovice Czech Republic

<sup>2</sup>Biological Centre CAS, Institute of Entomology, Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice Czech Republic

\*Correspondence: vrba\_pavel@centrum.cz

**Abstract** We report different values of supercooling points (SCP) of overwintering larvae of 4 European species belonging to the globally-distributed butterfly genus *Colias*. The selected species represent diverse habitat and altitude preferences, from dry and warm steppe grasslands to alpine meadows and peat bogs. The Mediterranean migrant *C. crocea* Geoffroy did not survive the acclimation temperature of 5°C. All 4 remaining species were freeze-susceptible. *Colias palaeno* (L.), a peat bogs species, showed a high degree of cold hardiness (mean SCP: -24.8°C). It was followed by the steppe grassland specialist *C. alfacariensis* Ribbe (-18.6°C). Alpine *C. phicomone* (Esper) (-13.8°C) and lowland generalist *C. hyale* (L.) (-14.5°C) exhibited similar high values. We argue that besides ambient temperature, the specific microclimate at overwintering sites, and continentality influencing snow cover influence the diversity of cold hardiness in *Colias* butterflies.

**Key words** butterfly ecology, diapause, frost survival, mountain habitats, grasslands, Palaerctic region, Pieridae

Temperature is one of the most important environmental factors influencing insect survival. This is particularly prominent in cold mountain or polar regions, where insect activity is restricted to only short periods of the year and complex strategies of winter period survival have evolved (Roff 1980, Boggs and Inouye 2012). The bulk of Lepidoptera cold hardiness studies target pest species (e.g., Andreadis et al. 2008, Hou et al. 2009), with only few studies focusing on species native to arctic or alpine (Dillon

et al. 2006, Vrba et al. 2012) environments. These species, however, may be particularly sensitive to temperature-mediated habitat loss caused by recent climatic warming (Boggs and Murphy 1997, Dirnböck et al. 2011, Konvička et al. 2003). The ecophysiological adaptations and constraints restricting cold-adapted specialists to cold environments remain largely unknown.

Each of the 2 insect cold hardiness strategies (freeze tolerance and freeze avoidance) seems to be advantageous in certain climatic contexts (Turnock and Fields 2005). The role of microclimate at overwintering sites is also important, mainly the buffering role of snow cover or moss hummocks (Marshall and Sinclair 2011b, Vrba et al. 2012). Winter survival, thus, depends on combinations of physiological mechanisms and microhabitat use (Layne et al. 1999, Wagner et al. 2012). Because freezing is lethal for freeze avoidant species, their SCP is slightly lower than, or equal to, their lower lethal temperature, and SCP gives a rough estimation of their cold hardiness.

The species-rich globally-distributed butterfly genus *Colias* (F.) (Lepidoptera: Pieridae) is remarkable for its diversification in a wide range of nonforested habitats, from tropical savannas and temperate grasslands to arctic and alpine tundras (Verhulst 2000 - 2001). Out of about 80 species described to date, 9 species occur in Central Europe, but even here, they display remarkable diversity of altitude ranges (lowland to alpine), habitats (wetlands to dry steppes), and life histories (sedentary, partial and obligatory migrants) (Tolman and Lewington 2008). All species overwinter as larvae, which facilitates comparison of larval cold hardiness.

We report here how overwintering larvae of 5 ecologically divergent European *Colias* species differ in their cold hardiness, mainly supercooling points, and related cold-survival strategies. We initially hypothesised that species inhabiting cooler mountain environments should exhibit lower SCP values than lowland species. Alternatively (*cf.* Vrba et al. 2012), species occurring in regions and habitats with reliable insulation by snow cover may abandon the investment to antifreeze adaptations, which may result in higher SCP values than in species overwintering in habitats with little snow.

## Materials and Methods

The 5 studied species form an altitudinal cline from alpine cold habitats to warm lowlands (Verhulst 2000 - 2001, Tolman and Lewington 2008). *Colias phicomone*

(Esper) is an alpine species, restricted to Europe and distributed in the Cantabrian Mts., Pyrenees, Alps and Eastern Carpathians. Its altitudinal range is 900 - 2500 m, its habitats include alpine grasslands and pastures, its larvae feed on various Fabaceae (e.g., *Astragalus*, *Medicago*, *Trifolium*). The development is univoltine, with one generation per year.

*Colias palaeno* (L.) is a widely-distributed species of the Eurasian Boreal zone, with more southerly outposts in mountainous regions between France and Japan. Its habitats include open taiga woodlands, peat-bogs and alpine heathlands, provided that its single host plant, *Vaccinium uliginosum* L., is present. The altitude range in Central Europe is 400 - 2200 m. A single generation occurs per year.

*Colias hyale* (L.) is distributed from Central Europe to NE China. In Central Europe, it occurs from sea level up to approx. 1800 m on a wide-range of nonforested habitats, preferring farmlands with Fabaceae fodder crops used as larval host plants (e.g., *Medicago sativa*, *Trifolium* spp.). The species is polyvoltine, regularly forming three generations per year in lowland Central Europe, and behaves as a highly mobile partial migrant in northern part of its range.

*Colias alfacariensis* Ribbe, 1905

This steppe grasslands specialist is distributed from southwestern Europe to Central Asia. In Central Europe, it displays a distinct association with dry and warm seminatural grasslands in lower-elevated regions. Its larval hosts include *Coronilla varia* and *Hippocrepis comosa*. Polyvoltine species with three generations per year in Central Europe.

*Colias crocea* (Fourcroy, 1785)

an obligatory migrant, permanently surviving in the Mediterranean region and regularly advancing toward Central and Northern Europe with progression of season. It can reach Central Europe already in early summer, but the highest numbers are encountered from late August to October, corresponding to the third or fourth annual generation. Often encountered on Fabaceae field crops.

Wild-captured fertilized females of each studied species were left to oviposit in an outdoor rearing facility in lowland seminatural conditions in Ceske Budejovice, Czech Republic (49°00'N, 14°25'E, 400 m a.s.l.). *Colias crocea*, *C. hyale* and *C. alfacariensis* were captured as the autumn generation in lowlands of the Czech Republic. The two univoltine species, *C. palaeno* and *C. phicomone*, originated from mountain peat-bogs

in Sumava Mts., SW Czech Republic (49°00'N, 13°34'E, altitude 400 m) and Otztaler Alps, Austria (46°58'N, 11°05'E, altitude 2000 m), respectively.

The rearing facility, situated in a half-shaded garden corner, consisted of wired cages (50 × 50 × 100 cm) covered by nylon mesh. Each cage contained 2 flower pots with the respective host plants. We released up to 5 females into each cage, fed them by 5% sugar solution to maximize their life span and hence the number of eggs laid. After the larvae hatched, we left them to develop without disturbance, except for watering the host plants.

During November, we transferred the dormant larvae from outdoor cages to a constant laboratory temperature of 5°C for standardized acclimation. They remained stored at this temperature until early January.

Sixteen larvae per species were used to estimate the supercooling point (SCP), using a thermocouple device (Brunnhofer et al. 1991). The cooling rate was controlled at 1 degree per minute. After the exotherm appeared, the larva was kept in the cooling device until its body temperature decreased again to the value of the crystallization temperature. The chamber was then removed from the cooling device, the body ice left to melt and the body temperature was left to increase to 5°C. The larva was then removed from the chamber and kept in a Petri dish at 5°C for 24 h. Subsequently, it was transferred into the laboratory, and survival was checked as presence of spontaneous movement or reaction to mechanical stimuli.

## Results

Of the 46 *C. crocea* larvae tested, none survived the acclimation temperature (5°C). They were gradually dying in the cold room, and no surviving larvae were found after 2 weeks.

The remaining 4 species exhibited the freeze-avoidant strategy, not surviving freezing of their body fluids. The mean SCP differed among species ( $F = 11.73$ ,  $df = 3$ ,  $P < 0.0001$ ). The strongest degree of cold hardiness, with the extremely low value of  $SCP = -24.8 \pm 3.9^\circ\text{C}$ , was found in the mountain butterfly *C. palaeno*, whose SCP was significantly lower than in all 3 remaining species (Tukey HSD:  $P < 0.05$ ). The steppe grasslands specialist *C. alfacariensis* displayed the second lowest value ( $-18.6 \pm 8.1^\circ\text{C}$ ); it differed from *C. palaeno*, but not from the remaining 2 species (Tukey HSD:

$P < 0.05$ ). Still higher and similar values were found in the alpine species *C. phicomone* ( $-13.8 \pm 3.5^\circ\text{C}$ ) and the common farmland species *C. hyale* ( $-14.5 \pm 4.0^\circ\text{C}$ ) (Fig. 1).

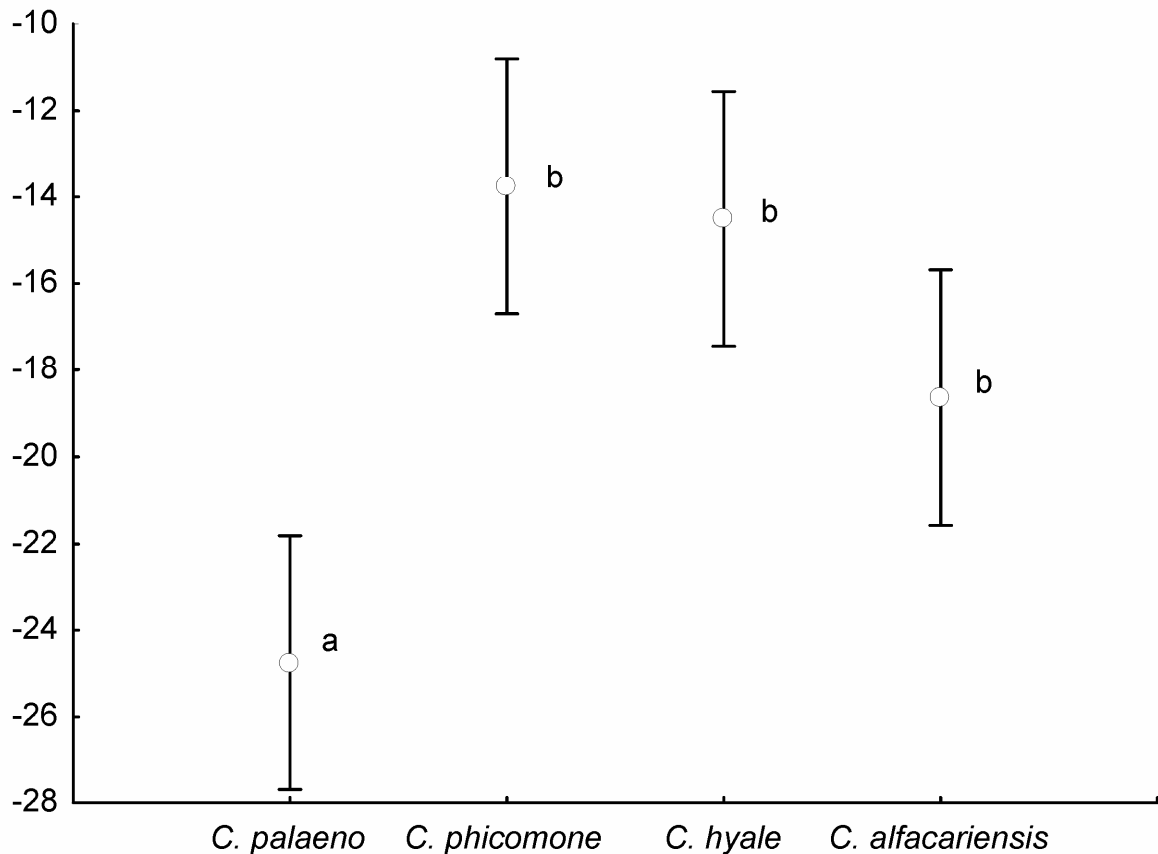
## Discussion

Identification of supercooling point and cold hardiness strategy represents just the necessary first step toward understanding of how insects survive cold parts of the year. The differences among 5 *Colias* butterflies inhabiting Central Europe, however, nicely reflect the diversity of conditions within their distribution ranges.

*Colias palaeno*, the most cold-hardy species, inhabits a huge northern geographic range, within which it occupies a variety of habitats including humid bogs of European low mountains, heathlands above the timberline, boreal forest openings, and treeless tundra (Verhulst 2000 - 2001). Whereas, snow cover insulates the diapausing larvae from deep frosts in oceanic parts of the range, the frosts become deeper and snow cover less reliable in more continental regions of Eurasia. We show elsewhere (Vrba et al., unpubl data) that *C. palaeno*'s lowest lethal temperature ( $-26^\circ\text{C}$ ) is very close to the SCP in this species and that, at this temperature, 50% of individuals survive for almost 10 days. *Colias palaeno* larvae, thus, appear adapted for surviving extremely cold temperatures, even without insulation by snow, which makes it one of the most cold-hardy butterfly species assessed so far.

The distribution of *C. alfacariensis*, with the second-lowest SCP value, includes steppic grasslands of continental Eurasia. In these continental areas, its larvae likely encounter deep continental frosts with little snow cover (*cf.* Li and Zachariassen 2006), requiring good cold hardiness adaptations. The SCP value found for this species, however, is within the range commonly reported for temperate Lepidoptera (e.g., Dennis 1993).

A counterintuitive situation applies to *C. phicomone*, a species of alpine grasslands with low ambient winter temperatures. We have shown elsewhere, using the predominately mountain butterfly genus *Erebia* Dalman, that species of the high alpine habitats can display higher SCP (*E. tyndarus* Esper:  $-8.4 \pm 2.8^\circ\text{C}$ ) than related species of the mountain belt (*E. sudetica* Staudinger:  $-15.1 \pm 4.4^\circ\text{C}$ ) or lowland species (*E. medusa* Denis & Schiffermüller:  $-17.0 \pm 2.3^\circ\text{C}$ ) (Vrba et al. 2012). The most obvious explanation is again insulation by snow cover (Marshall and Sinclair 2011a,b), which is durable and hence reliable at high altitudes in European mountains, probably allowing *C.*



**Fig. 1. ANOVA comparison of supercooling points among four European species of *Colias* butterflies. Means and SD of values measured in sixteen diapausing 3rd instar larvae per species.**

*phicomone* and other high alpine butterflies to abandon their freeze protection, in contrast to congeneric butterflies of continental steppes. A corresponding difference was found in 2 syntopic ladybird beetles; whereas *Ceratomegilla undecimnotata* (Schneider) overwintering exposed to air had a mean SCP of  $-19^{\circ}\text{C}$ , *Coccinella septempunctata* (L.) overwintering at ground level insulated in plant material had a SCP of  $-15^{\circ}\text{C}$  (Nedvěd 1993).

Due to unpredictable snow cover, *C. hyale* frequently encounters snowless episodes in lowlands of temperate Europe. Its SCP value, however, was similar to that of alpine *C. phicomone*, seemingly contradicting the snow cover explanation for the alpine species. On the other hand, *C. hyale* is a highly mobile species, considered as “partial migrant” by some authors and not able to overwinter in more northerly countries (Asher et al. 2001). Its high SCP value provides indirect evidence that its



occurrence in more northerly locations depends on immigration from regions with milder winters.

The Mediterranean migrant *C. crocea* did not survive the acclimation temperature of 5°C. At such a temperature, the majority of lepidopteran larvae would stop feeding, entering a quiescence, if not already being in diapause. Ability to increase cold hardiness during cold acclimation is generally dependent on previously entering the diapause state (Košťál et al. 2011). This result confirms that no proper diapause exists in *C. crocea* (cf. Tolman and Lewington 2008), but also suggests that *C. crocea* winter larvae cannot survive in those parts of the Mediterranean basin where temperatures drop below 5°C for continuous periods of several weeks, precluding them to heat up and feed for at least parts of days. This effectively restricts *C. crocea* winter distribution to such thermally favorable parts of the Mediterranean as islands and coastal lowlands.

Given the diversity of *Colias* SCP values, it is tempting to speculate on phylogenetic aspects of the pattern. Unfortunately, no comprehensive *Colias* phylogeny has been published, and the existing studies focus on either North American (Pollock et al. 1998, Wheat and Watt 2008, Schoville et al. 2011) or European (Brunton 1998) representatives, with minimum overlaps in taxa sampling. The phylogeny by Brunton (1998) suggests that northern and presumably cold-hardy species (represented by *C. palaeno* in this study) should be ancestral, with subsequent radiation into a clade containing temperate species with moderate SCP values (including *C. hyale*, *C. alfariensis* and *C. phicomone*), and a clade containing Mediterranean and/or migrant species (including *C. crocea*). From this hypothesis, efficient cold hardiness in ancestral *Colias* spp., weakened as their descendants dispersed toward warmer areas, is expectable. This is contradicted by Pollock et al. (1998) or Wheat and Watt (2008), who proposed the Palearctic migrants *C. crocea* and *C. erate* (Esper) as ancestral. Until a more comprehensive phylogeny encompassing both Eurasian and American representatives is available, speculations onto the evolution of cold hardiness variation within *Colias* remain premature.

In conclusion, the values of the supercooling point in the freeze avoiding larvae of European *Colias* butterflies do not follow a simple temperature-related gradient, and both very low and moderate SCP values exist in both mountain and lowland species. Besides ambient temperature, individual species thermal niches are influenced by the reliability of snow cover (continentality gradient), and the migration ability allowing some species to regularly recolonise thermally suboptimal habitats.

## Acknowledgments

The authors thank A. Bartonova, P. Vlasanek and M. Zapletal for help with rearing the caterpillars and to J. Benes for fruitful discussions. The study was supported by the Czech Science Foundation (P505/10/1630), and the University of South Bohemia (144/2010/100).

## References cited

- Andreadis, S. S., Z. Vryzas, E. Papadopoulou-Mourkidou and M. Savopoulou-Soultani. 2008.** Age-dependent changes in tolerance to cold and accumulation of cryoprotectants in overwintering and non-overwintering larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis*. *Physiol. Entomol.* 33: 365-371.
- Asher, J., M. Warren, R. Fox, P. Harding and G. Jeffcoate. [eds.] 2001.** The Millennium Atlas of Butterflies in Britain and Ireland. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Boggs, C. L. and D. W. Inouye. 2012.** A single climate driver has direct and indirect effects on insect population dynamics. *Ecol. Lett.* 15: 502-508.
- Boggs, C. L. and D. D. Murphy. 1997.** Community composition in mountain ecosystems: climatic determinants of montane butterfly distributions. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 6: 39-48.
- Brunnhofer, V., O. Nedvěd and M. Hodková. 1991.** Methodical improvement for measuring of supercooling point in insects. *Acta Entomol. Bohemos.* 88: 349-350.
- Brunton, C. F. A. 1998.** The evolution of ultraviolet patterns in European *Colias* butterflies (Lepidoptera, Pieridae): a phylogeny using mitochondrial DNA. *Heredity* 80: 611-616.
- Dennis, R. L. H. 1993.** Butterflies and Climate Change. Manchester University Press, Manchester.
- Dillon, M. E., M. R. Frazier and R. Dudley. 2006.** Into thin air: Physiology and evolution of alpine insects. *Integr. Comp. Biol.* 46: 49-61.
- Dirnböck, T., F. Essel and W. Rabitsch. 2011.** Disproportional risk for habitat loss of high altitude endemic species under climate change. *Glob. Change Biol.* 17: 990-996.
- Hou, M., W. Lin and Y. Han. 2009.** Seasonal changes in supercooling points and glycerol content in overwintering larvae of the asiatic rice borer from rice and water-oat plants. *Environ. Entomol.* 8: 1182-1188.
- Konvička, M., M. Maradová, J. Beneš, Z. Fric and P. Kepka. 2003.** Uphill shifts in distribution of butterflies in the Czech Republic: effects of changing climate detected on a regional scale. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 12: 403-410.
- Košťál, V., H. Zahradníčková and P. Šimek. 2011.** Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 13041-13046.

- Layne, J. R., C. L. Edgar and R. E. Medwith. 1999.** Cold hardiness of the woolly bear caterpillar (*Pyrrharctia isabella* Lepidoptera: Arctiidae). *Am. Midl. Nat.* 141: 293-304.
- Li, N. G. and K. E. Zachariassen. 2006.** Water balance and adaptation strategy in insects of Central Yakutia to extreme climatic conditions. *Biol. Bull.* 33: 483-487.
- Marshall, K. E. and B. J. Sinclair. 2011a.** The sub-lethal effects of repeated freezing in the woolly bear caterpillar *Pyrrharctia isabella*. *J. Exp. Biol.* 214: 1205-1212.
- Marshall, K. E. and B. J. Sinclair. 2011b.** Threshold temperatures mediate the impact of reduced snow cover on overwintering freeze tolerant caterpillars. *Naturwissenschaften* 99: 33-41.
- Nedvěd, O. 1993.** Comparison of cold hardiness in two ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae) with contrasting hibernation behaviour. *Eur. J. Entomol.* 90: 465-470.
- Pollock, D. D., W. B. Watt, V. K. Rashbrook and E. V. Iyengar. 1998.** Molecular phylogeny for *Colias* butterflies and their relatives (Lepidoptera: Pieridae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91: 524- 531.
- Roff, D. 1980.** Optimising development time in a seasonal environment: the ups and downs of clinal variation. *Oecologia* 45: 202-208.
- Schoville, S. D., M. Stuckey and G. K. Roderick. 2011.** Pleistocene origin and population history of a neoendemic alpine butterfly. *Mol. Ecol.* 20: 1233-1247.
- Tolman, T. and R. Lewington. 2008.** *Collins Butterfly Guide*. HarperCollins Publishers, London.
- Turnock, W. J. and G. F. Fields. 2005.** Winter climates and cold hardiness in terrestrial insects. *Eur. J. Entomol.* 102: 561-576.
- Verhulst, J. 2000–2001.** *Les Colias du Globe*. Monograph of the Genus *Colias*. Goecke & Evers, Germany, Vols 1+2.
- Vrba, P., M. Konvička and O. Nedvěd. 2012.** Reverse altitudinal cline in cold hardiness among *Erebia* butterflies. *Cryo Lett.* 33: 251-258.
- Wagner, D., P. Doak, T. Sformo, P. M. Steiner and B. Carlson. 2012.** Overwintering physiology and microhabitat use of *Phyllocnistis populiella* (Lepidoptera: Gracillariidae) in interior Alaska. *Environ. Entomol.* 41: 180-187.
- Wheat, C. W. and W. B. Watt. 2008.** A mitochondrial-DNA-based phylogeny for some evolutionary genetic model species of *Colias* butterflies (Lepidoptera, Pieridae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 47: 893-902.



## Summary

Our research on hibernating larvae of four *Erebia* butterflies showed that even closely related (congeneric) species may employ contrasting strategies of cold hardiness: freeze tolerance (ability to survive freezing of body tissues) and freeze avoidance (decreasing freezing temperature using cryoprotectants). The only species exhibited freeze-tolerant strategy was the predominantly lowland representative, *Erebia medusa*; this species also showed the lowest lethal temperature ( $-21^{\circ}\text{C}$ ). Mountain representatives *E. epiphron* and *E. sudetica* displayed intermediate values; in *E. epiphron* the lethal temperature was about  $5^{\circ}\text{C}$  higher than supercooling point, which points to sensitivity to accumulating chill injury, not connected to freezing. The highest lethal temperature ( $-8.1^{\circ}\text{C}$ ) was found in the alpine species *E. tyndarus*. Related *Erebia* butterflies thus form a counterintuitive altitudinal cline of cold hardiness, with lowland species displaying strong cold tolerance, whereas alpine species cannot withstand extremely low temperatures; this is likely due to insulation of their mountain habitats by snow, contrasting with lowland habitats exposed to fluctuating temperatures.

Overwintering larvae of *Colias palaeno*, boreo-montane species inhabiting cold peat bogs, exhibit extremely strong cold and desiccation tolerance. Using freeze-avoiding strategy, lethal temperatures by short-term expositions was about  $-26^{\circ}\text{C}$ . By comparing two geographically distinct populations, substantial differences in contents of cryoprotective substances was found; surprisingly with no effect on their cold hardiness, which was comparable. Comparing postdiapause survival of larvae overwintering in different temperature treatments (constant  $5^{\circ}\text{C}$  vs natural conditions) showed no differences in survival and development into adults. However, initial spring body mass of larvae overwintering in warmer treatment was lower, but compensated by spring feeding. Thus, this species is apparently able to survive in wide variety of harsh conditions in cold northern and boggy habitats.

Identifications of supercooling points of four related *Colias* butterflies hibernating larvae confirmed a wide diversity of adaptations on environmental conditions. The mentioned species *C. palaeno* exhibited the lowest value ( $-24.8^{\circ}\text{C}$ ), followed by steppe grassland specialist *C. alfacariensis* ( $-18.6^{\circ}\text{C}$ ), lowland generalist *C. hyale* ( $-14.5^{\circ}\text{C}$ ) and alpine grassland specialist *C. phicomone* ( $-13.8^{\circ}\text{C}$ ). Additionally, our attempts of ascertain these values for the mediterranean migrant *C. crocea* failed due to death of all experimental larvae in acclimation temperature ( $5^{\circ}\text{C}$ ) during two weeks, which

probably limits its permanent occurrence to the warmest Mediterranean coast and islands. Although this comparison represents only the first step in understanding their overall cold hardiness, it convincingly reflects the diversity of conditions within distribution ranges and habitats. All studied species were freeze-avoiding, distribution of values of their supercooling points (counterintuitively, analogically to the *Erebia* group) did not follow temperature-related gradient of their habitats.

## **Future perspectives**

Our results of winter cold hardiness and survival of temperate butterflies allowed us insight to the diversity of strategies used for winter survival, however, in confrontation with existing literature and our experiences with captive rearing, brought more questions than answers. We are still on the beginning of understanding, how individual species cope with very complex environmental and microhabitat conditions.

Focusing on temperature, more complex and ecologically relevant experiments are needed, especially longer-term survival of different temperature regimes in various stages of diapause, including investigations of temperature fluctuations. This will possess a more realistic tool for predicting insect winter survival, taking into account potential reparatory mechanisms of non-freezing cold injury or longer-term influence on metabolism of an overwintering insect. In association with this, the potential effect of environmental humidity must be taken into account, because it can influence the cold tolerance fundamentally, as we show in Chapter I.

In association with cold tolerance, more detailed investigations of the role of cryoprotective substance in various stages of the season (diapause) is needed, because their role in specific stages of winter cold hardiness is not sufficiently known (Chapter II.). And finally, the phylogenetic aspect of cold tolerance diversity should be investigated, namely in the genus *Colias*, where no comprehensive phylogeny has been published so far (Chapter III.).

## Appendix

Supercooling points (SCP) of hibernating larvae of *Erebia* butterflies when body was in contact with ice

| species                | original locality                | latitude<br>[°N] | longitude<br>[°E] | altitude<br>[m] | SCP<br>[°C] | Survival<br>after 24h |
|------------------------|----------------------------------|------------------|-------------------|-----------------|-------------|-----------------------|
| <i>Erebia medusa</i>   | Cesky Krumlov,<br>Czech republic | 48.83            | 14.32             | 600             | -3,35       | Yes                   |
| <i>Erebia medusa</i>   | Cesky Krumlov,<br>Czech republic | 48.83            | 14.32             | 600             | -4,59       | Yes                   |
| <i>Erebia medusa</i>   | Cesky Krumlov,<br>Czech republic | 48.83            | 14.32             | 600             | -5,56       | Yes                   |
| <i>Erebia medusa</i>   | Cesky Krumlov,<br>Czech republic | 48.83            | 14.32             | 600             | -2,1        | Yes                   |
| <i>Erebia medusa</i>   | Cesky Krumlov,<br>Czech republic | 48.83            | 14.32             | 600             | -7,31       | No                    |
| <i>Erebia medusa</i>   | Cesky Krumlov,<br>Czech republic | 48.83            | 14.32             | 600             | -0,26       | Yes                   |
| <i>Erebia medusa</i>   | Cesky Krumlov,<br>Czech republic | 48.83            | 14.32             | 600             | -1,06       | Yes                   |
| <i>Erebia medusa</i>   | Cesky Krumlov,<br>Czech republic | 48.83            | 14.32             | 600             | -2,33       | Yes                   |
| <i>Erebia medusa</i>   | Cesky Krumlov,<br>Czech republic | 48.83            | 14.32             | 600             | -3,44       | Yes                   |
| <i>Erebia medusa</i>   | Cesky Krumlov,<br>Czech republic | 48.83            | 14.32             | 600             | -0,18       | Yes                   |
| <i>Erebia tyndarus</i> | Sölden, Windachtal,<br>Austria   | 46.96            | 11.08             | 1950            | -4,77       | Yes                   |
| <i>Erebia tyndarus</i> | Sölden, Windachtal,<br>Austria   | 46.96            | 11.08             | 1950            | -2,58       | Yes                   |
| <i>Erebia tyndarus</i> | Sölden, Windachtal,<br>Austria   | 46.96            | 11.08             | 1950            | -2,17       | Yes                   |
| <i>Erebia tyndarus</i> | Sölden, Windachtal,<br>Austria   | 46.96            | 11.08             | 1950            | -1,03       | Yes                   |
| <i>Erebia tyndarus</i> | Sölden, Windachtal,<br>Austria   | 46.96            | 11.08             | 1950            | -2,67       | Yes                   |
| <i>Erebia tyndarus</i> | Sölden, Windachtal,<br>Austria   | 46.96            | 11.08             | 1950            | -3,66       | Yes                   |
| <i>Erebia tyndarus</i> | Sölden, Windachtal,<br>Austria   | 46.96            | 11.08             | 1950            | -2,06       | No                    |
| <i>Erebia sudetica</i> | Praded Mt., Czech<br>Republic    | 50.08            | 17.23             | 1320            | -5,36       | Yes                   |

© for non-published parts Pavel Vrba

vrba\_pavel@centrum.cz

Chladová odolnost horských a nížinných motýlů  
2015

All rights reserved  
For non-commercial use only

University of South Bohemia in České Budějovice  
Faculty of Science  
Branišovská 1760  
CZ-37005 České Budějovice, Czech Republic

Phone: +420 387 776 201  
www.prf.jcu.cz, e-mail: sekret-fpr@prf.jcu.cz