JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B410 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

OVLIVŇUJÍ PARAZITOIDI VÝŠKOVOU DISTRIBUCI HORSKÝCH MOTÝLŮ? OKÁČI V KRKONOŠÍCH.

Autor: Bc. Klára Stuchlová

Vedoucí práce: doc. Mgr. Martin Konvička, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jan Hrček, Ph.D.

České Budějovice, duben 2014

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

V Českých Budějovicích, 25. 4. 2014 ……

Stuchlová

Díky této diplomové práci jsem strávila několik nezapomenutelných večerů a nocí v okouzlující přírodě krkonošských hor, poznala řadu nových, milých lidí a vyzkoušela si dosud nepoznané věci. Za tyto nové zkušenosti a zážitky vděčím Martinu Konvičkovi. Tímto mu také děkuji za jeho vstřícnost a čas, který si na mě vždy našel. Nemenší dík patří Mírovi. Nejen za pomoc a trpělivost při hledání housenek, ale vlastně tak celkově za všechno. Dále chci poděkovat Martinu Librovi, bez kterého bych stěží objevila tolik parazitoidů a izolace DNA by zajisté nebyla tak úspěšná. Míše Borovanské za ochotu zasvětit mě do problematiky molekulárních metod. Zdeňkovi Fricovi za přečtení. Děkuji také své rodině, přátelům a všem, kteří mi poskytli radu, či mě jakkoliv podpořili pokaždé, když bylo třeba.

SOUHRN

Parazitoidi představují různorodou, avšak poměrně málo studovanou skupinu hmyzu, která je adaptovaná na usmrcování svého hostitele. Jednou z nevyřešených otázek souvisejících se systémem parazitoid–hostitel je reakce na globální klimatickou změnu u specializovaných druhů hmyzu adaptovaných na chladná prostředí, například na vysokohorské biotopy. Ve střední Evropě se jedná kupříkladu o holarktické okáče rodu *Erebia* Dalman, 1986 (Nymphalidae: Satyrinae). Cílem práce bylo provést vzorkování housenek nížinných a horských okáčů, odchovat housenky za účelem zjištění míry infestace a určit hostitelskou specificitu parazitoidů kombinací klasických a molekulárních metod. Celkem bylo na 14 lokalitách, podél výškového gradientu v Krkonoších, nalezeno 39 housenek okáče lučního *(Maniola jurtina)*, sedm housenek okáče horského *(Erebia epiphron)* a čtyři housenky okáče rudopásného *(Erebia euryale)*. U druhu *Maniola jurtina* byla zjištěna více než třetinová infestace pravděpodobně lumkem *Ichneumon caloscelis*. U vysokohorských okáčů rodu *Erebia* nebyli nalezeni žádní parazitoidi. Výsledky tedy naznačují možnost vyšší míry infestace parazitoidy u motýlů z nižších poloh než u vysokohorských druhů. Faktorů, které mohou ovlivňovat míru infestace parazitoidy u motýlů je mnoho, proto si tato problematika žádá další sledování. Předkládaná práce také dokládá časovou náročnost sběru solitérně žijících housenek na běžných rostlinách. Molekulární determinace parazitoidů pomocí DNA barcodingu je bez větších problémů možná, nicméně s jistými omezeními.

Klíčová slova: parazitoid, Satyrinae, nadmořská výška, Krkonoše

ABSTRACT

Parasitoids represent a diverse and little studied group of insects, employing variety of adaptations to utilize and kill their hosts. Among the unresolved issues related to the host–parasitoids interactions are responses of such interactions to global climate change, especially in cases specialized insect species adapted to cold environments such as alpine habitats. Example of such hosts are the Holarctic butterflies of the genus *Erebia* Dalman, 1986 (Nymphalidae: Satyrinae) inhabiting mountains of Central Europe. The aim of this study was sampling caterpillars of lowland and mountain Satyrinae butterflies, rearing the caterpillars to determine the degree of infestation and determine the host specificity of parasitoids using combination of classical and molecular methods. I sampled 39 caterpillars of the Meadow Brown *(Maniola jurtina)*, seven caterpillars of the Mountain Ringlet *(Erebia epiphron)* and four caterpillars of the Large Ringlet *(Erebia euryale)* at 14 habitats along the altitudinal gradient in Krkonoše Mountains. It was found more than a one-third parasitization by *Ichneumon caloscelis* among *Maniola jurtina* caterpillars and no parasitoids among the mountain species. It suggests the possibility of a higher rate of infestation among species living at lower altitudes than at higher altitudes. There are many factors affecting the parasitization's rate among butterflies. This issue requires further monitoring. This study demonstrates the time-consuming sampling of solitary living caterpillars on common plants. Molecular determination of parasitoids using DNA barcoding is possible without major problems, but with certain restrictions.

Key words: parasitoid, Satyrinae, altitude, Krkonoše Mountain

OBSAH

1 ÚVOD 7

2 CÍLE PRÁCE 9

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED 10

3.1 Biologie parazitoidů řádu Lepidoptera 10

3.2 Biologie motýlů rodu *Erebia* 12

3.3 Molekulární detekce parazitoidů 13

4 METODIKA 15

4.1 Zájmové území 15

4.2 Sledované druhy 15

4.3 Hledání housenek 18

4.4 Chov housenek 18

4.5 Detekce parazitoidů 19

5 VÝSLEDKY 20

5.1 Sběr housenek 21

5.2 Chov housenek a parazitoidů 21

5.3 Detekce parazitoidů a srovnání míry infestace 22

6 DISKUZE 24

7 ZÁVĚR 28

8 LITERATURA 29

9 PŘÍLOHY 36

9.1 Tabulky 36

9.2 Obrázky 41

1 ÚVOD

Klimatické změny vyvolávající kromě zvyšování průměrné teploty rovněž nepředvídatelné a proměnlivé změny v regionálním klimatu a častější výskyt extrémních povětrnostních jevů (Hulme *et al.*, 1999), ovlivňují celé ekosystémy a společenstva, včetně vztahů mezi parazitoidy a jejich hostiteli (Stireman *et al.*, 2005). Ačkoliv je mnoho současných studií věnováno problematice globálního oteplování a jeho dopadu na biocenózy, relativně málo prací se zabývá ovlivněním hostitelsko–parazitických interakcí. Parazitoidi jsou mnohdy potravními specialisty a nacházejí se na poměrně vysokých příčkách potravního řetězce, proto jsou obzvláště náchylní ke změnám, které mohou nastat u hostitelských populací (Jeffs *et* Lewis, 2013).

Obecně organismy na změny klimatu reagují přesunem do míst s vhodnějšími klimatickými podmínkami (často do vyšších zeměpisných šířek a nadmořských výšek), změnou fenologie nebo *in situ* fyziologickými adaptacemi (Bellard *et al.*, 2012). Jak uvádí Menéndez *et al.* (2008), invazní a expandující druhy hmyzu mohou být v nově osídlených areálech napadány nižším počtem parazitoidů a celkově parazitovány v menší míře. Nevyhnutelné zpoždění, se kterým parazitoidi reagují na změny v populacích svých hostitelů a následné snížení počtu infestovaných jedinců tak může mimo jiné ovlivnit i roli parazitoidů jako přirozených regulátorů škůdců zemědělských plodin (Thomson *et al.*, 2010).

Jednou z nevyřešených otázek souvisejících s reakcí systému parazitoid–hostitel na globální klimatickou změnu jsou poměry u specializovaných druhů hmyzu adaptovaných na chladná prostředí, například na vysokohorské biotopy. Ve střední Evropě se jedná kupříkladu o holarktické okáče rodu *Erebia* Dalman, 1986 (Nymphalidae: Satyrinae). Tito motýli dosahují vysoké diverzity v horských oblastech nad hranicí lesa, kde se v extrazonálních biogeocenozách vyskytuje jedinečná flora a fauna, složená z glaciálních reliktů či endemických druhů. Současné oteplování, důsledek klimatických změn, umožňuje teplomilnějším

organismům, včetně parazitoidů, pronikat z nižších poloh do vyšších nadmořských výšek (Konvička *et al.*, 2013). To může mít za následek mimo jiné zvýšení míry parazitace u populací vysokohorských okáčů. S ohledem na potenciální ohrožení vysokohorské fauny, obývající omezené území, je překvapivé, jak málo prací se zabývá ekologickými požadavky evropských vysokohorských druhů bezobratlých. Ačkoliv se předpokládá, že hmyz, díky krátkému životnímu cyklu, zareaguje velice rychle na nastávající klimatické změny (Bale *et al.*, 2002).

2 CÍLE PRÁCE

- provést vzorkování housenek nížinných a horských okáčů podél výškového gradientu v Krkonoších

- odchovat housenky s cílem určit míru infestace a hostitelskou specificitu parazitoidů

- identifikovat nedospělá stádia okáčů a parazitoidy kombinací klasických a molekulárních metod

Práce poslouží k získání základních údajů o výskytu motýlích parazitoidů v Krkonošském národním parku a stane se základem rozsáhlejšího sledování dopadů klimatických změn na mezidruhové interakce ve středoevropských pohořích.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 BIOLOGIE PARAZITOIDŮ ŘÁDU LEPIDOPTERA

Parazitoidi jsou jednou z druhově nejpočetnějších ekologických skupin hmyzu (Heraty, 2009). Dospělí jedinci se živí převážně nektarem, larvy se vyvíjejí nejčastěji uvnitř těla (endoparazitismus) nebo na tělech (ektoparazitismus) různých vývojových stádií členovců. Od klasických parazitů se parazitoidi liší tím, že hostitele během svého vývoje usmrcují (Askew, 1971). Častými hostiteli parazitoidů jsou vývojová stadia motýlů (řád Lepidoptera).

Z hlediska systematického náleží parazitoidi motýlů do řádů blanokřídlých (Hymenoptera) a dvoukřídlých (Diptera). v rámci řádu Diptera jsou nejběžnější a nejvýznamnější endoparazitoidi motýlů zahrnuti v čeledi kuklicovití (Tachinidae). Její příslušníci parazitují vždy larvu a někteří svého hostitele usmrcují až po zakuklení. Pro tuto skupinu je charakteristická absence bodavého kladélka. Parazitoidi z řádu Hymenoptera disponují kladélkem, kterým umisťují vajíčko dovnitř těla hostitele. Nejvýznamnější parazitoidy larev evropských motýlů v tomto řádu představují zástupci čeledí lumčíkovitých (Braconidae) a lumkovitých (Ichneumonidae) a několik druhů z čeledi lesknatkovití (Eulophidae). Některé druhy čeledi Ichneumonidae dokončují svůj vývoj až po zakuklení hostitele, jiné napadají přímo kukly. Jak uvádí Shaw *et al.*, 2009, vajíčka motýlů parazitují zástupci čeledi drobněnkovití (Trichogrammatidae) a vejcomarovití (Scelionidae).

Parazitoidi, kteří svého hostitele při kladení vajíček usmrtí nebo jej paralyzují a zastaví jeho vývoj, jsou nazýváni idiobionti. Typickými idiobionty jsou ektoparazité, případně parazité kukel. Naopak koinobionti umožňují hostiteli po infestaci další vývoj. Koinobionti jsou specializovaní endoparazité, adaptovaní na imunitní reakci konkrétního hostitele. Svou oběť mohou usmrtit až v dalším vývojovém stádiu. (Askew *et* Shaw, 1986). Pokud dojde k usmrcení hostitele v následující fázi vývoje, hovoříme o *egg-larval* parazitoidech nebo *larval-pupal* parazitoidech. *Egg-larval* parazitoidi se u evropských motýlů příliš nevyskytují,

zástupce *larva-pupal* parazitoidů nalezneme v čeledi Tachinidae a Ichneumonidae. v některých případech se primární parazitoidi mohou stát hostiteli jiných, sekundárních parazitoidů a hovoříme o tzv. hyperparazitismu. Hyperparazitoidi jsou striktně specializovaní a nemohou být primárními parazity, představiteli jsou některé druhy z čeledi Ichneumonidae a nadčeledi chalcitek (Chalcidoidea) (Shaw *et al.*, 2009).

Ve všech suchozemských ekosystémech sehrávají parazitoidi velice důležitou roli. I přes nepopiratelný vliv parazitoidů na ekologii, vývoj, chování a fyziologii svých hostitelů je k dispozici jen relativně málo studií zabývajících se interakcemi mezi motýly a jejich parazitoidy (Shaw *et al.*, 2009). Předmětem zkoumání jsou zejména druhy využívané ke kontrole zemědělských škůdců, například bělásků z rodu *Pieris* Schrank, 1801 (viz Firake *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2007), a zavíječů rodu *Diatraea* Guilding, 1828 (viz Rossi *et* Fowler, 2003), nebo parazitoidi ochranářsky zajímavých motýlů (tzv. vlajkových druhů) např. modrásků rodu *Maculinea* van Eecke, 1915 (viz Hochberg *et al.*, 1996; Thomas *et* Elmes, 1993). Vzhledem k chybějícím znalostem týkajících se interspecifických interakcí v trofickém řetězci a řadě dezinformací a nejasností v některých literárních zdrojích (Shaw *et al.*, 2009), je nezbytné provést další experimenty a pečlivé taxonomické studie s cílem poznat parazitoidy jednotlivých druhů motýlů, vymezit oblasti, ve kterých dochází k infestaci a zejména odhalit konkrétní dopad parazitoidů na hostitelské populace.

Porozumět důkladně vazbám mezi parazitoidy a jejich hostiteli je však z mnoha důvodů složité. Některé druhy parazitoidů nejsou striktně monofágní a řada z nich napadá více hostitelských druhů, které mohou být vzájemně příbuzné nebo obývají specifická území (Stireman *et* Singer, 2003). V těchto potravních sítích dochází ke spletitým mezidruhovým interakcím. Samotné spolehlivé vyhodnocení procentuálního zastoupení parazitovaných jedinců v populaci hostitele je také komplikované. Přispívají k tomu jednak obtížně hledatelná vajíčka, larvy a zejména kukly motýlů a také odlišnosti v chování napadených a nenapadených larev. Z tohoto důvodu může být jedna skupina během sběru vzorků snadněji přístupná (Shaw *et al.*, 2009). Kromě toho se napadené larvy mnohdy vyvíjejí rozdílnou rychlostí než larvy

parazitoidů prosté. Jejich vývoj bývá zpomalen, v jiných případech naopak urychlen a přechod do dalšího vývojového stádia hostitele nastává dříve. Z těchto důvodů, jsou vždy při odběru vzorků již někteří hostitelé mrtví a část naopak ještě nebyla napadena (Shaw, 1990).

Úspěšnost parazitoidů při hledání hostitele závisí na biotických a abiotických faktorech prostředí. Výskyt a nahloučení živných rostlin pro hostitele nebo způsob života cílového hmyzu, zejména skutečnost zda žije solitérně nebo ve skupinách, patří mezi základní biotické činitele (Stireman *et* Singer, 2003). Tlak a vlhkost vzduchu, vítr, déšť a především teplota prostředí jsou abiotické faktory významně ovlivňující populační dynamiku hmyzu, parazitoidy nevyjímaje (Weisser *et al.*, 1997). Klomp (1959) uvádí pozitivní vztah mezi délkou slunečního svitu a efektivitou hledání hostitele u parazitoida *Carcelia obesa* (Tachinidae). Jeden z hlavních abiotických činitelů, teplota prostředí, má vliv například na intenzitu imunitní odpovědi napadeného hostitele vůči infestaci (Godfray *et al.*, 1994; Fellowes *et al.*, 1999) a také na obranné chování potencionálního hostitele (Bannerman *et al.*, 2011). Parazitoidi jsou ke změnám teplot méně tolerantní než jejich hostitelé (Karban, 1998) a s narůstající teplotou se zvyšuje pravděpodobnost usmrcení parazitoida hostitelem (Thomas *et* Blanford, 2003).

3.2 BIOLOGIE MOTÝLŮ RODU *EREBIA*

Okáči patří do čeledi babočkovití (Nymphalidae Rafinesque, 1815), podčeledi okáčovití (Satyrinae Boisduval, 1833). Jedná se o hnědé motýly s tmavými skvrnami, které připomínají oka. Rozpětí křídel se udává v rozmezí 35–60 mm. Různé druhy obývají jak strmé, na jih orientované suťové stráně v horách, tak i louky a mýtiny na severu holarktické oblasti. Délka života dospělců nepřesahuje 10–14 dní a létají zpravidla od června do srpna. Okáči bývají často protandričtí. Samice kladou vajíčka na trsy trav. Hnědé, šedivé nebo zelené larvy se líhnou v pozdním létě, aktivují ve dne a následně přezimují v L_1 nebo L_2 instaru při bázi rostlin nebo ukryté pod kameny. Na jaře, po obnovení vývoje, jsou housenky aktivní vpodvečer a v noci. Housenky univoltinních druhů se v pátém larválním instaru kuklí a během 14 dní se

líhnou imaga. Housenky semivoltinních okáčů tohoto rodu znovu zimují v L_4 stádiu (Wipking *et* Mengelkoch, 1994).

Douwes (1980) uvádí prodloužený, dvouletý vývoj některých druhů hmyzu jako možnou reakci na nepředvídatelné nepříznivé nebo potravně chudé období. Dvouletý vývoj může také snižovat rozsah napadení housenek parazitoidy. Wipking *et* Mengelkoch (1994) popisují dvouletý vývojový cyklus u 14 druhů okáčů. Dlouhodobě sledovaná oscilace populační hustoty dokládá vyšší počet imag v lichých letech, kdy je také pozorována nejvyšší míra infestace u mladých housenek prvního a druhého instaru. Parazitoidi napadající početně silnou populaci zřejmě negativně ovlivňují populační denzitu motýlů v následujícím roce. Parazitoidi semivoltinních druhů vykazují nízkou hostitelskou specializaci, v opačném případě by vlivem selekčního tlaku došlo k synchronizaci jejich vývoje s hostitelovým (Varkonyi *et al*., 2002). O druhové specificitě parazitoidů, které napadají okáče, neexistuje mnoho záznamů. Tabulka 1 (Shaw *et al.,* 2009) a Tabulka 2 (Home of Ichneumonoidea, 2014) zaznamenávají druhy parazitoidů, které byly dokumentovány u vybraných okáčů, kterými se tato práce zabývá.

3.3 MOLEKULÁRNÍ DETEKCE PARAZITOIDŮ (Hebert *et al*., 2003)

Klasické metody identifikace druhů založené na morfologických či fyziologických znacích disponují řadou omezení. Nejen vnitrodruhová genotypová a fenotypová variabilita může být při determinaci klasickými metodami zavádějící. Problém nastává také u kryptických druhů a vývojových stádií, u kterých se klasické metody identifikace nedají použít nebo dochází k nepřesnostem a následně chybným závěrům při určování druhové příslušnosti. V současnosti stále hojněji využívané molekulární metody jsou průlomovým nástrojem, který slouží k determinaci těžko určitelných druhů.

DNA barcoding (vhodný český ekvivalent neexistuje) je metoda, která na základě druhově specifického úseku DNA zařazuje testovaný vzorek do již existující taxonomie. Pro tuto determinaci se využívá druhově specifické mitochondriální DNA kódující enzym dýchacího řetězce cytochromoxidázu I (COI, 648 bp).

Výhodou COI sekvence jsou velmi kvalitní univerzální primery pro 5´ konec, což umožňuje amplifikaci sekvence u většiny živočišných druhů. Sekvence získané touto metodou se označují *barcode* (čárový kód).

Před samotnou identifikací druhu na základě DNA barcodingu je potřeba izolovat DNA, získané úseky amplifikovat pomocí PCR a provést sekvenování, které stanoví pořadí nukleotidů v řetězci, tedy primární strukturu DNA. Následuje porovnání sekvence vzorku se známými sekvencemi druhů v databázi BOLD. Barcode of Life Data System (BOLD) je databáze shromažďující získané sekvence jednotlivých druhů, jejich kopie jsou odesílány do dalších veřejných databází (např. GenBank). BOLD přiřadí sekvenci ke konkrétnímu druhu za předpokladu, že odlišnost vzorku a referenční sekvence je méně než 1%. Tato hranice však nebyla ověřena pro všechny biologické druhy a může být tedy zavádějící (Nielsen *et* Matz, 2006).

4 METODIKA

4.1 ZÁJMOVÉ ÚZEMÍ

Terénní část práce proběhla v Krkonošském národním parku (KRNAP), který se nachází na severu Čech, na jižní hranici Polska je jeho obdobou Karkonoski Park Narodowy (KPN). Celková rozloha parku na české straně je 36400 ha, z toho 18400 ha leží v ochranném pásmu.

V Krkonoších se nalézající největší plochy ležící nad hranicí lesa (nad 1200 až 1350 m n. m.) v České republice. Unikátní je zejména zdejší arkto-alpínská tundra tvořená jedinečnou mozaikou ekosystémů alpínských vrcholů (lišejníková tundra), klečových porostů, rašelinišť náhorních plošin a trávníků (travnatá tundra) a závětrných svahů ledovcových karů Krkonoš (květnatá tundra). Zde žijí reliktní a endemické druhy rostlin a živočichů (KRNAP, 2014).

Sběr housenek proběhl ve dvou termínech. První sběr v termínu 19.–25. 5. 2013 se uskutečnil v oblastech s nadmořskou výškou 500–750 m n. m. (Čistá, Černý Důl – důl, Hříběcí boudy, Černý důl – louka, Černý důl – louka 2, Dolní Štěpnice). Podruhé se vyhledávalo ve dnech 17. 6.–21. 6. 2013 v lokalitách s nadmořskou výškou 750–1500 m n. m. (Hříběcí boudy, Friesovy boudy, Lahrovy boudy, Přední a Zadní Rennerovky, Výrovka, Dvorská bouda, Strážné, Luční hora) (Tabulka 3).

4.2 SLEDOVANÉ DRUHY

Zaměřila jsem se na housenky okáčů (Nymphalidae: Satyrinae). Samičky okáčů kladou vajíčka do trsů trav. Vajíčka, respektive mladé housenky ještě ve vaječných obalech, nebo jejich první instary přezimují a na jaře se mladé housenky živí na travách. U některých druhů se hovoří o dvouletém vývoji, kdy podruhé zimuje vzrostlá housenka.

Následuje přehled druhů okáčů (Nymphalidae: Satyrinae) připadajících v úvahu v zájmovém území. Není-li uvedeno jinak, pocházejí informace od Tolman *et* Lewington (2009):

Okáč černohnědý *Erebia ligea* (Linnaeus, 1758) (Obrázek 1)

Eurosibiřský druh, rozšířený od západní Evropy po Japonsko, v Evropě chybí ve Středomoří, ale zasahuje na daleký sever. Ve střední Evropě se vyskytuje ve světlinách horských lesů a pasekách v nadmořských výškách 800 až 1200 m n. m. Může zalétat i nad hranici lesa. v horských údolních nivách a kaňonovitých údolích sestupuje do 400 m n. m. V posledních dekádách byl detekován ústup z nižších poloh (Konvička *et al.* 2003). Okáč černohnědý je univoltinní druh, přezimují vajíčka nebo housenky ve vaječných obalech.

Okáč horský *Erebia epiphron* (Knoch, 1783) (Obrázek 2)

Vysokohorský druh, rozšířený ve většině pohoří kontinentu, zasahujících nad horní hranici lesa, včetně Britských ostrovů a německého pohoří Harz, ale chybějící ve Skandinávii, v poloostrovním Španělsku, v jihovýchodní části Balkánského poloostrova a původně též v Krkonoších. Univoltinní až semivoltinní druh, vázaný na hřebenové holiny nad hranicí lesa (ca od 1300 m n. m.). Holiny využívá také jako biokoridory k sestupu na stanoviště pod přirozenou hranicí lesa. Solitérně žijící housenky přezimují pod trsy nízkých trav. Populace na východním hřebenu Krkonoš byla uměle založena ve 30. letech 20. století z jedinců pocházejících z Hrubého Jeseníku. Genetická studie ukázala, že se při transferu podařilo přenést prakticky veškerou alozymovou diverzitu zakladatelské populace (Schmitt *et al.* 2005).

Okáč rosičkový *Erebia medusa* (Denis *et* Schiffermüller, 1775) (Obrázek 3)

Eurosibiřský druh, vyskytující se v oblastech od střední Francie přes střední Evropu, Balkánský poloostrov, východní Evropu do hor jižní a východní Sibiře, Mongolska, severní Číny po Kamčatku a povodí Amuru. Obývá mezofilní i vlhčí louky,

lesostepi, křovinaté stráně, světliny a paseky v listnatých lesích. Lokálně od nížin do hor, do 850 m n. m. V ČR roztroušeně po celém území, v intenzivně obhospodařovaných oblastech ubývá, místy vymizel. Motýl s jednogeneračním vývojem, vajíčka jsou kladena jednotlivě na vrcholky stébel trav, housenky přezimují v zemi při kořenech travních drnů.

Okáč rudopásný *Erebia euryale* (Esper, 1805) (Obrázek 4)

Evropský druh vázaný na horské oblasti, obývá většinu vyšších pohoří kontinentu, ale chybí ve Fennoskandii. Vyskytuje se především v oblastech při horní hranici lesa a vystupuje i nad ní. Dále žije ve světlinách horských lesů, lesních loukách a pasekách od 700 m n. m., v Krkonoších nejčastěji v pásmu klimaxových smrčin. Druh s víceletým larválním vývojem, který v některých pohořích vykazuje výrazné dvouleté výkyvy početnosti (Klečková *et al., in press*). Vajíčka jsou kladena na konce listů tenkolistých trav.

Okáč prosíčkový *Aphantopus hyperantus* (Linnaeus, 1758) (Obrázek 5)

Palearktický motýl vyskytující se v Evropě od Pyrenejí, přes Irsko a Velkou Británii dále na Sibiř až do temperátních oblastí Číny a Koreje. V České republice je kromě nejvyšších hor hojný a všeobecně rozšířený. Obývá louky nejrůznějších typů, též lesní lemy, řídké lesy, okraje lesních cest, náspy a vlhčí ruderály. Vajíčka kladena jednotlivě k bázi trav. Univoltinní druh, larvy jsou solitérní a žír probíhá v noci.

Okáč luční *Maniola jurtina* (Linnaeus, 1758) (Obrázek 6)

Západopalearktický druh vyskytující se od Maghrebu a Britských ostrovů po západní Sibiř. Ubikvista obývající všechny typy luk. Živnou rostlinou jsou běžné druhy trav. Samičky kladou obvykle několik vajíček blízko sebe. Obecně je tento druh poměrně sedentární a výrazně protandrický. V České republice je hojný, vyskytuje se od nížin do hor.

4.3 HLEDÁNÍ HOUSENEK

Sběr housenek se uskutečnil ve dvou termínech. První sběr (19.–25. 5. 2013) proběhl v oblastech s nadmořskou výškou 500–750 m n. m. Podruhé (17. 6.–21. 6. 2013) byly vzorky získány v lokalitách s nadmořskou výškou 750–1500 m n. m. Vyhledávání housenek probíhalo v době předpokládané aktivity housenek, tedy v brzkých ranních (5:00–8:00 h) a večerních až nočních hodinách (19:00–2:00 h).

K vyhledávání a sběru housenek bylo využíváno dvou technik, smýkání a přímé vyhledávání. Smýkání za pomoci smýkací sítě bylo výhodné zejména při sběru v nižších polohách s vyšším travním porostem (Obrázek 7). Vybrané louky se soustavně procházely a smýkalo se přednostně na porostech trav. Po několika úderech smýkadla bylo nutné síť prohlédnout a vybrat obsah, aby se odlovené housenky neporanily. S rostoucí nadmořskou výškou (zhruba od 1320 m n. m.), zejména pak v oblastech krkonošské alpínské tundry (Obrázek 8) nebylo možné tento způsob odchytu housenek efektivně využívat a housenky byly vyhledávány přímým prohlížením trsů tenkolistých trav, za soumraku a po setmění pomocí ruční svítilny.

Odchycené housenky byly jednotlivě, spolu s několika listy živné rostliny, umísťovány do plastových uzavíratelných misek s otvory pro cirkulaci vzduchu. Misky byly označovány pořadovým číslem, lokalitou, kde ke sběru došlo a druhem, o který se jedná.

4.4 CHOV HOUSENEK

Housenky byly odchovávány individuálně v průhledných plastových miskách (průměr 9 cm, hloubka 4,5 cm). Stěny misek byly dostatečně perforovány, aby do nádobky mohl proudit vzduch a odváděla se tím přebytečná vlhkost. Nádoby s housenkami byly umístěny na světlém místě s pokojovou teplotou a ponechány přirozenému světelnému režimu.

Housenkám byla každý den, popřípadě obden, podávaná čerstvá živná rostlina *ad libitum*. Jednalo se o směs různých druhů trav (například *Festuca* spp.,

Poa spp.). Při krmení bylo zároveň odstraněno staré krmivo a trus, který by mohl být potencionálním zdrojem infekce. Do chovných misek housenek, které se zakuklily, byl nadále dáván čerstvý rostlinný materiál, který napomáhal udržování stálé vlhkosti v nádobce. Housenky, které dokončily vývoj v dospělce, byly pokládány za nenapadené parazitoidem. Pokud se z housenky vylíhl dospělý parazitoid, byl uchován v ethanolu p.a. Stejně tak všechny uhynulé housenky a kukly byly umístěny do uzavíratelných mikrozkumavek a zality absolutním ethanolem p.a. a tím připraveny pro další analýzu.

4.5 DETEKCE PARAZITOIDŮ

Housenky byly vypreparovány pod binokulární lupou. Nalezení parazitoidi byli konzervováni v ethanolu p.a., stejně tak část tkáně napadených housenek, nejčastěji pokožka.

Následně byla v molekulární laboratoři oddělení ekologie a ochrany přírody (Biologické centrum AV ČR, v.v.i.; Entomologický ústav; Branišovská 31/1160, 370 05; České Budějovice) provedena izolace genomové DNA pomocí sady Genomic DNA Mini Kit – Tissue (Geneaid) dle přiloženého protokolu. Vzorky tkání byly nejprve vysušeny, následně k nim bylo napipetováno 200 µl lyzačního GT pufru (GT Buffer). Za pomoci mikrotloučku byla provedena homogenizace, poté bylo přidáno 20 µl proteinázy K (Proteinase K) a vše bylo důkladně promícháno. Vzorky byly přes noc inkubovány při teplotě 60 °C, během inkubace byly několikrát protřepány. Dále bylo přidáno 200 µl GBT pufru (GBT Buffer), vše bylo promícháno a následovala inkubace při 60 °C po dobu 20 minut. Během inkubace byly vzorky každých 5 minut promíchány. Poté bylo přidáno 200 µl absolutního ethanolu a vzorky byly opět důkladně protřepány. Do 2ml sběrných zkumavek (Collection Tube) byly vloženy mikrozkumavky s kolonkou (GD column), do kterých byly lyzáty následně přepipetovány a centrifugovány po dobu 2 minut při otáčkách 14000 x g. Sběrné zkumavky spolu se stočenou kapalnou složkou byly vyhozeny a nahrazeny novými. Bylo přidáno 400 µl promývacího W1 pufru (W1 Buffer) a opět byly vzorky centrifugovány 30 sekund při otáčkách 14000 x g.

Stočená kapalina byla vylita a ke vzorkům bylo přidáno 600 µl druhého promývacího pufru (Wash Buffer), znovu proběhla centrifugace (30 s/14000 x g). Kapalná část byla odstraněna a následovala centrifugace po dobu 3 minut při otáčkách 14000 x g, poté byly sběrné zkumavky nahrazeny novými. Ke vzorkům bylo přidáno 100 µl předehřátého (60 °C) elučního roztoku (Elution Buffer) a nechalo se 5 minut inkubovat. Poté proběhla centrifugace (30 s/14000 x g) a tím byl získán templát DNA. Vzorky byly uskladněny v -20 °C.

Následně byly vzorky podrobeny polymerázové řetězové reakci (PCR). Všechny potřebné chemikálie a vzorky byly při práci uchovávány podchlazené, na ledu. Byl vytvořen reakční PCR Master Mix smícháním 12,5 µl PPP Master Mixu (Top-Bio), 1 µl 0.1 µM 5´ univerzálního primeru LCO1490 (5'-ggtcaacaaatcataaagatattgg-3') a stejného množství o totožné koncentraci 3´ univerzálního primeru HC02198 (5'-taaacttcagggtgaccaaaaaatca-3') (Folmer *et al.*, 1994), 2 µl templátu DNA a 8,5 µl PCR H_2O. PCR Master Mix spolu se vzorky DNA byl napipetován na destičku, která byla po zavření protřepána a podrobena amplifikaci v termocykleru, při parametrech: 5min počáteční denaturace při 94 °C, poté 35 cyklů střídání 94 °C (30 s), 47 °C (30 s) a 72 °C (90 s). Proces byl ukončen 10min finální elongací při 72 °C.

Kvalita PCR produktů byla ověřena gelovou elektroforézou. Byl připraven 1,5% agarózový gel, který byl v elektoforetické nádobě zalit 1x TAE pufrem. Vždy 5 µl PCR produktu bylo smícháno s 2 µl fluorescenčního barviva SYBR® Green I a naneseno do jamek v gelu. Do jamek byla napipetována také negativní a pozitivní kontrola. Pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů byl do první a poslední jamky v řadě nanesen DNA marker (LowRanger 100bp DNA Ladder, Norgen Biotek Corp.). Po proběhnutí elektroforézy (konstantní napětí 150 V/30 min) byly separované fragmenty DNA vizualizovány ve fotodokumentačním zařízení a získané PCR produkty byly následně odeslány k osekvenování do laboratoře Macrogen Korea (10F, 254 Beotkkot-ro; Geumcheon-gu, Seoul; Rep. of Korea). Získané sekvence byly upraveny pomocí programu Geneious 7.1.3. Následně byly porovnány s databází BOLD.

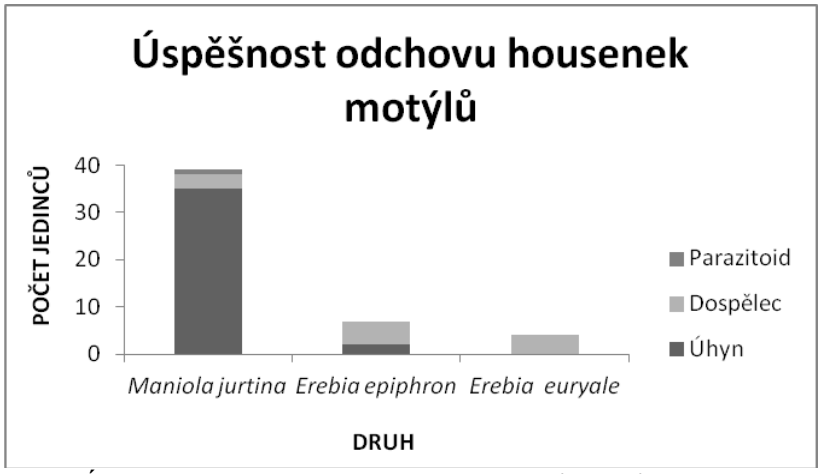
5 VÝSLEDKY

5.1 SBĚR HOUSENEK

Průběh sběru housenek shrnuje Tabulka 4. První sběr (19. 5.–24. 5. 2013) probíhal celkem 30 hodin ve dvou osobách (tj. 60 osobohodin), přičemž převážně smýkáním bylo nalezeno 39 housenek, a to výhradně okáče lučního. Sběr v druhém termínu (17. 6.–21. 6. 2013) trval celkem 22,5 hodin ve dvou osobách (tj. 45 osobohodin). Přímým vyhledáváním pomocí ruční svítilny se podařilo nalézt sedm housenek okáče horského (Obrázek 9) a čtyři housenky okáče rudopásného. Housenky dalších druhů okáčů se nalézt nepodařilo.

5.2 CHOV HOUSENEK A PARAZITOIDŮ

Z celkového počtu 39 nalezených housenek různých instarů okáče lučního *(Maniola jurtina)* se podařilo odchovat tři dospělce a jednu parazitickou vosičku (Obrázek 10, Obrázek 11). Zbylých 35 larev během odchovu uhynulo. Ze sedmi larev okáče horského *(Erebia epiphron)* se vylíhlo pět dospělých motýlů, jedna larva a jedna kukla uhynuly. Všechny čtyři housenky okáče rudopásného *(Erebia euryale)* se za několik dní po sběru zakuklily a úspěšně se proměnily v dospělce. Celkovou úspěšnost odchovů shrnuje Graf 1.



Graf 1. Úspěšnost odchovu housenek nalezených druhů motýlů.

5.3 DETEKCE PARAZITOIDŮ A SROVNÁNÍ MÍRY INFESTACE

Z celkového počtu 35 uhynulých housenek okáče lučního bylo s jistotou vypreparováno 14 larev parazitoidů (Obrázek 12), u dalších čtyř vzorků se nedalo s jistotou určit, zda se jednalo o parazitoidy či o tkáň motýla. U okáče horského (sedm housenek) a okáče rudopásného (čtyři housenky) se nepodařilo získat žádného parazitoida, míra infestace je tudíž nula procent, toto číslo však pochází z extrémně malých vzorků.

Izolaci DNA bylo celkem podrobeno 18 vzorků vypreparovaných parazitoidů z housenek okáče lučního (včetně čtyř, u kterých nebylo jisté, zda se jedná o parazitoida), 18 vzorků hostitelských housenek a jeden vzorek dospělého parazitoida. Z celkového počtu 37 vzorků, které byly podrobeny izolaci DNA a následné polymerázové řetězové reakci, se podařilo získat 31 PCR produktů (11 vypitvaných parazitoidů, čtyři pravděpodobné vzorky parazitoidů, 15 housenek, jeden vzorek dospělého parazitoida). Nepodařil se však získat PCR produkt jednoho vypreparovaného parazitoida, pravděpodobně hbitěnky (Bethylidae) Haliday, 1840 (Obrázek 13).

Jak ukázalo porovnání získaných DNA sekvencí s databází BOLD, všechny vzorky housenek náležely okáči lučnímu. K tomuto druhu náležely i čtyři vzorky, u kterých nebylo s jistotou určeno, zda se jedná o parazitoida. Konečně, 11 vzorků (Obrázek 14) patřilo larvám parazitoidů a jeden vzorek dospělému parazitoidu. Celková míra infestace parazitoidy u okáče lučního tudíž odpovídá 33,3–38,5 %, uvážíme-li skutečnost, že se u dvou vzorků parazitoidů nepodařilo izolovat DNA a nebylo tedy možné potvrdit druhovou příslušnost molekulárními metodami.

Sloučením vzorků vysokohorských druhů rodu *Erebia* (Tabulka 5) a následným testováním rozdílu míry infestace mezi nížinným okáčem a horskými okáči pomocí chi-kvadrát testu, byl zjištěn signifikantní rozdíl v infestaci (χ^2 = 5,484; p = 0,019; p < 0,05), tj. vyšší míra infestace u nížinného druhu. Tato hodnota však pochází z nízkého počtu vzorků.

Tabulka 5. Míra infestace parazitoidy u okáčů rozdílného výškového gradientu.

	Počet infestovaných jedinců	**Počet neinfestovaných jedinců**
Nížinný okáč	14*	25
Vysokohorští okáči	0	11

* - celkový počet s jistotou vypreparovaných parazitoidů

Všichni izolovaní parazitoidi patřili do čeledi lumkovití (Ichneumonidae) Haliday, 1838, podčeledi Ichneumoninae Latreille, 1802. S největší pravděpodobností se jednalo o lumka *Ichneumon caloscelis* (Wesmael, 1845), jehož sekvence DNA se v databázi BOLD nejpřesněji shodovaly se sekvencemi získanými z vypreparovaných parazitoidů. U dvou vzorků přicházel v úvahu ještě druh *Ichneumon sculpturatus* (Holmgren, 1864).

6 DISKUZE

Smýkáním a sběrem housenek motýlů z čeledi okáčovitých podél výškového gradientu v Krkonoších se podařilo získat 39 housenek nížinného okáče lučního a pouze 11 housenek vysokohorských druhů okáčů rodu *Erebia* (sedm housenek okáče horského a čtyři housenky okáče rudopásného).

Housenky všech zmíněných druhů okáčů, od třetího larválního instaru výše, bývají aktivní v podvečerních hodinách a jejich nalezení v terénu komplikuje fakt, že žijí jednotlivě na travách, rostlinách, které jsou na lokalitách okáčů všudypřítomné. V kontrastu například s housenkami žijícími pospolitě na shlukovitě se vyskytujících bylinách (například housenky velkých baboček na kopřivě dvoudomé, viz Gathmann *et al.*, 2006) nebo s jednotlivě žijícími housenkami vázanými na vzácné byliny (např. housenkami modrásků rodu *Maculinea* viz Kéry *et al.*, 2001), je obtížné housenky okáčů najít. Přímé vyhledávání larev ve vyšších polohách je časově náročnější a méně efektivní, než smýkání na loukách s vyšším bylinným porostem. Pokud by kvantitativní vzorek housenek vypovídající o míře infestace parazitoidy měl činit alespoň 100 jedinců, bylo by, dle časové náročnosti sběru vzorků pro tuto práci, zapotřebí smýkat housenky ve dvou osobách přibližně 79 hodin nebo sbírat 204 hodin.

Z taxonomického hlediska převládli v zjištěném spektru parazitoidů lumci rodu *Ichneumon* (Linnaeus, 1758). Jedná se převážně o endoparazitoidy, kteří napadají motýlí hostitele ve stádiu kukly (Hinz *et* Horstmann, 2007). Po napadení vývoj hostitele zastaví, hovoříme tedy o idiobiontech (Askew *et* Shaw, 1986). Uvnitř tohoto rodu však existuje několik výjimek, mezi které patří i lumek *Ichneumon caloscelis*, který byl v rámci této práce identifikován jako parazitoid u získaných housenek okáče lučního. Tento parazitoid napadá larvu hostitele a svůj vývoj dokončuje až ve stádiu kukly, jedná se tedy o *larval-pupal* koinobionta (Shaw, 1977). *Ichneumon caloscelis* je známý parazitoid okáče lučního (Home of Ichneumonoidea, 2014) a jeho výskyt v ČR je potvrzen (Fauna Europea, 2014). U některých vzorků parazitoidů byla, kromě předešlého druhu, navržena pravděpodobná příslušnost k druhu *Ichneumon sculpturatus* (Holmgren, 1864). Jeho

výskyt v České republice však není doložen (Fauna Europea, 2014). Navíc se dle dostupných informací jedná o generalizovaného parazitoida ohniváčků rodu *Lycaena* (Fabricius, 1807) či obecně čeledi modráskovitých (Lycaenidae). Oproti tomu *Ichneumon caloscelis* je známý lumek parazitující široké spektrum druhů okáčů v rámci podčeledi Satyrinae. Známé skutečnosti o obou druzích srovnává Tabulka 6.

V jednom případě patřil vypreparovaný parazitoid pravděpodobně do čeledi hbitěnkovití (Bethylidae), nepodařilo se však izolovat DNA pro molekulární určení druhu. Zástupci čeledi hbitěnkovití jsou ektoparazitoidy larev, příležitostně kukel motýlů (Lepidoptera) a brouků (Coleoptera). Jak uvádí Macek *et al.* (2007) v ČR je známo 37 druhů a ve srovnání s jinými skupinami blanokřídlých je studium čeledi Bethylidae stále v počáteční fázi.

Vzhledem k nízké úspěšnosti hledání housenek horských druhů okáčů a jejich nulové infestaci, vypovídá tato práce jen o parazitoidech okáče lučního. Zjištěná míra infestace housenek okáče lučního lumkem *Ichneumon caloscelis* byla přibližně třetinová. Shaw (1977) uvádí velice podobnou míru parazitace (33 %) totožným lumkem u okáče lučního (vzorek: devět housenek) na pobřeží severovýchodní Anglie. Tento autor dále zjistil 58% míru napadení lumkem *I. caloscelis* u okáče metlicovitého (*Hipparchia semele* (Linnaeus, 1758) (vzorek: 19 housenek) a u okáče lipnicového 7% infestace (15 housenek) (*Pyronia tithonus* (Linnaeus, 1767). Dowdeswell (1962) uvádí u okáče lučního 60% parazitaci druhem *Apanteles tetricus* (Reinhard, 1880) (syn. *Cotesia sessilis* (Geoffroy, 1785). Avšak podobně jako v případě předkládané práce pochází tato hodnota z nízkého počtu vzorků (39). Gibbs *et al*. (2004) se zabýval parazitoidy dvou druhů okáčů rodu *Pararge* Hübner, 1819. Zjistil 25% infestaci u 32 vajíček okáče *Pararge xiphia* (Fabricius, 1775) a 26% infestaci u 46 vajíček okáče pýrového (*Pararge aegeria* (Linnaeus, 1758). V obou případech se jednalo o tentýž druh parazitoida *Trichogramma gicai* (Pintureau *et* Stefanescu, 2000), který napadá výhradně vajíčka hostitelů. Další kvantitativní práce zabývající se parazitoidy okáčovitých neexistují, respektive mi nejsou známy.

U vysokohorských okáčů rodu *Erebia* se nepodařilo v rámci této práce zjistit žádného parazitoida, což zdánlivě podporuje předpoklad nižší infestace ve vyšších nadmořských výškách. Nicméně získané vzorky byly příliš malé a je potřeba provést další sběry, které by zajistily vypovídající množství vzorků. Lze se ovšem spekulativně domnívat, že relativně vysoká infestace podhorského okáče lumkem *I. caloscelis* může, zejména při spodní hranici výskytu, negativně ovlivňovat populační dynamiku motýlů rodu *Erebia* a tudíž, v suboptimálních podmínkách pro jejich vývoj, výskyt okáčů rodu *Erebia* limitovat. Měnící se klimatické podmínky a především růst průměrných ročních teplot umožňují organismům pronikat do výše položených oblastí. Tato skutečnost může umožnit rozšíření hostitelsky nespecifického parazitoida *I. caloscelis* do lokalit vysokohorských okáčů. V této souvislosti je znepokojující skutečnost, že prakticky neexistují informace dokumentující vztahy okáčů rodu *Erebia* s parazitoidy.

Pouze Wipking *et* Mengelkoch (1994) uvádí jako parazitoidy okáčů rodu *Erebia* druhy *Casinara subglabra* Thomson (Campopleginae), *Cotesia telengai* (Tobias, 1972) (Braconidae), *Hygroplitis* spp. Thomson, 1895 (Braconidae) a *Aleiodes tristis* Wesmael, 1838 (Braconidae). Bohužel se v této práci neuvádí informace o míře infestace ani o hostitelské specificitě jednotlivých parazitoidů. Sonderegger (2005) odchoval z housenek několika druhů okáčů tyto parazitoidy: lumčíka *Aleiodes tristis* Wesmael, 1838 (z okáče tatranského *Erebia pharte* (Hübner, 1804), lumčíka *Cotesia telengai* (Tobias, 1972) (z okáče skvrnitého *Erebia manto* (Denis *et* Schiffermüller, 1775), lumčíka *Hygroplitis* sp. Thomson, 1895 (z okáče tatranského a okáče mramorovaného *Erebia tyndarus* (Esper, 1781), lumka *Casinaria subglabra* Thomson, 1887 (z *Erebia oeme* (Hübner, 1804) a okáče skvrnitého), Ichneumonidae sp. (z okáče drobnookého *Erebia alberganus* (Prunner, 1798), Braconidae sp. (z okáče *Erebia flavofasciata* Heyne, 1895) a ze skupiny Tachinidae zaznamenal infestaci druhem kuklice *Phryxe magnicarnus* Zetterstedt, 1838 (u *Erebia montana* (de Prunner, 1798), a *Ramonda ringdahl* Villeneuve, 1922 (u okáče drobnookého a *Erebia mnestra* (Hübner, 1804). Ani v této práci nejsou ovšem uvedeny kvantitativní údaje potřebné pro odhad míry infestace.

DNA barcoding je rychlá a praktická metoda mapování biodiverzity s širokým využitím. Využití nachází zejména v identifikaci kryptických druhů, různých vývojových stádií nebo v objasňování potravního řetězce. Například Rougerie *et al.* (2011) využil tuto metodu v mapování vztahů hostitel–parazitoid, kdy izoloval DNA hostitele z vnitřností dospělého parazitoida. Tento postup umožňuje dokumentovat problematiku parazitoidů bez nutnosti odchovu juvenilních stádií hostitelů a zároveň umožňuje určit dosud neznámé hostitele odchytem dospělých parazitoidů.

Určení druhů pomocí DNA barcodingu a porovnáním získaných sekvencí DNA v databázi BOLD však nemusí být přesné. Úspěšnost samotné izolace DNA mohou narušit zbytky tkání hostitelského druhu, které mohou na parazitoidech ulpět během preparace a mohou ovlivnit výsledky sekvenování. Některé sekvence DNA lze pomocí existujících databází zařadit pouze do vyšších taxonomických jednotek, než je druh. Existují studie naznačující neschopnost DNA barcodingu od sebe vzájemně rozlišit dva příbuzné druhy, které se vyčlenily relativně nedávno (Mendelson *et* Shaw, 2005). V neposlední řadě zde není dostatečně pokrytá fauna parazitoidů a nelze vyloučit výskyt determinačních omylů, zanesených do databází sekvencí. Je doporučováno používat DNA barcoding ve spolupráci s dalšími taxonomickými metodami. V samotné databázi barcodů se nacházejí dostupné údaje o druhu (biologie, taxonomie, geografie), umožňující nejpřesnější možné určení.

7 ZÁVĚR

Cílem práce bylo provést vzorkování housenek nížinných a horských okáčů, odchovat housenky za účelem zjištění míry infestace a určit hostitelskou specificitu parazitoidů. Celkem bylo na 14 lokalitách, podél výškového gradientu v Krkonoších, nalezeno 39 housenek okáče lučního *(Maniola jurtina)*, sedm housenek okáče horského *(Erebia epiphron)* a čtyři housenky okáče rudopásného *(Erebia euryale)*. Preparací housenek nížinného okáče lučního a jedním přímým odchovem parazitoida z housenky, byla u tohoto druhu zjištěna více než třetinová infestace, pravděpodobně lumkem *Ichneumon caloscelis*. U vysokohorských okáčů rodu *Erebia* nebyli nalezeni žádní parazitoidi.

Výsledky tedy naznačují možnost vyšší míry infestace parazitoidy u motýlů z nižších poloh, než u vysokohorských druhů. Z důvodu nízkého počtu vzorků však nebyla provedena statistická analýza dat. Faktorů, které mohou ovlivňovat míru infestace parazitoidy u motýlů je mnoho, proto si tato problematika žádá další sledování.

Tato práce také dokládá časovou náročnost sběru solitérně žijících housenek na běžných rostlinách. Pro získání vypovídajícího množství vzorků by bylo vhodné sbírat delší dobu a ve více lidech. Žádoucí by bylo získat vzorky z více lokalit a to nejlépe v oblastech, kde je vysoká druhová diverzita okáčů. Molekulární determinace parazitoidů pomocí DNA barcodingu je bez větších problémů možná, nicméně s jistými omezeními.

8 LITERATURA

Askew, R. R., 1971. Parasitic Insects. Heniemann. London. 316 pp.

Askew, R.R., Shaw, M.R., 1986. Parasitoid communities: their size, structure and development. Insect Parasitoids (eds J. Waage & D. Greathead). Academic Press, London. 225–264.

Bale, J. S., Masters, G. J., Hodkinson, I. D., Awmack, C., Bezemer, T. M., Brown, V. K., *et al*., 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. Global Change Biology 8, 1–16.

Bannerman, J. A., Gillespie, D. R., Roitberg, B. D., 2011. The impacts of extreme and fluctuating temperatures on trait–mediated indirect aphid–parasitoid interactions. Ecological entomology 36, 490–498.

Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., Courchamp, F., 2012. Impacts of climate change on the future of biodiversity. Ecology letters 15, 365–377.

Douwes, P., 1980. Periodical appearance of species of the butterfly genera *Oeneis* and *Erebia* in Fennoscandia (Lepidoptera, Satyridae). Entomologia generalis 6, 151–157.

Dowdeswell, W. H., 1962. a further study of the butterfly *Maniola jurtina* in relation to natural selection by *Apanteles tetricus*. Heredity 17, 513–523.

Fauna Europea, 2014. [cit. 2014-04-20]. Dostupné z WWW: http://www.faunaeur.org/

Fellowes, M. D. E., Kraaijeveld, A. R., Godfray, H. C. J., 1999. Crossresistance following artificial selection for increased defense against parasitoids in *Drosophila melanogaster*. Evolution, 53. 966–972.

Fink, U., Völkl, W., 1995. The effect of abiotic factors on foraging and oviposition success of the aphid parasitoid, *Aphidius rosae*. Oecologia 103. 371–378.

Firake, D. M., Lytan, D., Behere, G. T., Thakur, N. A., 2012. Host plants alter the reproductive behavior of *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) and its solitary larval endo-parasitoid, *Hyposoter ebeninus* (Hymenoptera: Ichneumonidae) in a cruciferous ecosystem. Florida Entomologist 95, 905–913.

Folmer, O., M. Black, W. hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase c subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3, 294–299.

Gathmann, A., Wirooks, L., Eckert, J., Schuphan, I., 2006. Spatial distribution of *Aglais urticae* (L.) and its host plant *Urtica dioica* (L.) in an agricultural landscape: implications for Bt maize risk assessment and post-market monitoring. Environmental Biosafety Research 5, 27–36.

Gibbs, M., Broad, G. R., Polaszek, A., 2004. *Trichogramma gicai* Pintureau & Stefanescu, 2000 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) reared as an egg parasitoid of the Madeiran endemic butterfly, *Pararge xiphia* (Lepidoptera: Satyridae). Bocagiana 214, 1–5.

Godfray, H. C. J., Hassell, M. P., Holt, R. D., 1994. The population dynamic consequences of phenological asynchrony between parasitoids and their hosts. Journal of Animal Ecology 63, 1–10.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 270, 313–321.

Heraty, J., 2009. Parasitoid biodiversity and insect pest management. Insect biodiversity: science and society, 445–462.

Hinz, R., Horstmann, K., 2007. Über Wirtsbeziehungen europäischer Ichneumon-Arten (On the host relationships of European species of *Ichneumon* Linnaeus (Insecta, Hymenoptera, Ichneumonidae, Ichneumoninae). Spinxiana 30, 39–63.

Hochberg, M. E., Elmes, G. W., Thomas, J. A., Clarke, R. T., 1996. Mechanisms of local persistence in coupled host-parasitoid associations: the case model of *Maculinea rebeli* and *Ichneumon eumerus*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 351, 1713–1724.

Home of Ichneumonoidea. [cit. 2014-04-20]. Dostupné z WWW: http://www.taxapad.com/local.php?newwolp=82839447

Hulme, M., Mitchell, J., Ingram, W., Lowe, J., Johns, T., New, M., Viner, D., 1999. Climate change scenarios for global impacts studies. Global Environmental Change 9, 3–19.

Jeffs, C. T.; Lewis, O. T., 2013. Effects of climate warming on host–parasitoid interactions. Ecological Entomology 38, 209–218.

Karban, R., 1998. Caterpillar basking behavior and nonlethal parasitism by tachinid flies. Journal of insect behavior 11, 713–723.

Kéry, M., Matthies, D., Fischer, M., 2001. The effect of plant population size on the interactions between the rare plant *Gentiana cruciata* and its specialized herbivore *Maculinea rebeli*. Journal of Ecology 89, 418–427.

Kleckova, I., Vrba, P., Konvicka, M., in press. Quantitative evidence for biennial life cycle and its spatial variation in the mountain butterfly *Erebia euryale* in the Czech Republic.

Klomp, H., 1959. Infestations of forest insects and the role of parasites. Proc. 15th int. Congr. Zool.(1958), 797–802.

Konvicka, M., Maradova, M., Benes, 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.

KRNAP. Správa Krkonošského národního parku [cit. 2014-04-06]. Dostupné z WWW: http://www.krnap.cz/

Macek, J., Strejcek, J., Straka, J., 2007. Annotated checklist of the Aculeata (Hymenoptera) of the Czech Republic and Slovakia. Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae 11, 21–40.

Mendelson, T. C., Shaw, K. L., 2005. Rapid speciation in an arthropod: The likely force behind an explosion of new Hawaiian cricket species revealed. Nature 433, 375–376.

Menéndez, R., González-Megías, A., Lewis, O.T., Shaw, M.R., Thomas, C.D., 2008. Escape from natural enemies during climate-driven range expansion: a case study. Ecological Entomology 33, 413–421.

Nielsen, R., Matz, M., 2006. Statistical approaches for DNA barcoding. Systematic biology 55, 162–169.

Rossi, M. N., Fowler, H. G., 2003. Temporal patterns of parasitism in *Diatraea saccharalis Fabr*.(Lep., Crambidae) populations at different spatial scales in sugarcane fields in Brazil. Journal of applied entomology 127, 501–508.

Rougerie, R., Smith, M., Fernandez-Triana, J., Lopez-Vaamonde, C., Ratnasingham, S., Hebert, P. D., 2011. Molecular analysis of parasitoid linkages (MAPL): gut contents of adult parasitoid wasps reveal larval host. Molecular Ecology 20, 179–186.

Shaw, M. R., 1977. On the distribution of some Satyrid (Lep.) larvae at a coastal site in relation to their Ichneumonid (Hym.) parasite. Entomologist's Gazette 28, 133–134.

Shaw, M. R., 1990. Parasitoid of European butterflies and their study. In: Kudrna, O. (ed.) Butterflies of Europe. Introduction to Lepidopterolgy, Wiesbaden, Germany 2, 449–479.

Shaw, M. R., Stefanescu C., van Nouhuys, S., 2009. Parasitoids of European butterflies. 130–156. In: "*Ecology of Butterflies in Europe*" (J. Settele, T. Shreeve, M. Konvička, H. van Dyck, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, 526 pp.

Schmitt, T., Cizek, O., Konvicka, M., 2005. Genetics of a butterfly relocation: large, small and introduced populations of the mountain endemic *Erebia epiphron silesiana*. Biological Conservation 123, 11–18.

Sonderegger P., 2005. Die Erebien der Schweiz (Lepidoptera: Satyrinae, Genus *Erebia*). Biel, Switzerland, 712 pp.

Stireman, J. O., Singer, M. S., 2003. Determinants of parasitoid-host associations: insights from a natural tachinid-lepidopteran community. Ecology 84, 296–310.

Stireman, J. O., Dyer, L. A., Janzen, D. H., Singer, M. S., Lill, J. T., Marquis, R. J., *et al.,* 2005. Climatic unpredictability and parasitism of caterpillars: implications of global warming. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 17384–17387.

Tanaka, S., Nishida, T., Ohsaki, N., 2007. Sequential rapid adaptation of indigenous parasitoid wasps to the invasive butterfly *Pieris brassicae*. Evolution 61, 1791–1802.

Thomas, M. B., Blanford, S., 2003. Thermal biology in insect-parasite interactions. Trends in Ecology & Evolution 18, 344–350.

Thomas, J. A., Elmes, G. W., 1993. Specialized searching and the hostile use of allomones by a parasitoid whose host, the butterfly *Maculinea rebeli*, inhabits and nests. Animal behaviour 45, 593–602.

Thomson, L. J., Macfadyen, S., Hoffmann, A. A., 2010. Predicting the effects of climate change on natural enemies of agricultural pests. Biological control 52, 296–306.

Tolman T., Lewington R., 2009. Collins Butterfly Guide: The Most Complete Field Guide to the Butterflies of Britain and Europe. Harper Collins, London, 384 pp.

Varkonyi, G., Hanski, I., Rost, M., Itamies, J., 2002. Host-parasitoid dynamics in periodic boreal moths. Oikos 98, 421–430.

Weisser, W., Völkl, W., Hassell, P., 1997. The importance of adverse weather conditions for behaviour and population ecology of an aphid parasitoid. Journal of Animal Ecology 66, 386–400.

Wipking, W., Mengelkoch, C., 1994. Control of alternate-year flight activities in high-alpine Ringlet butterflies (*Erebia*, Satyridae) and Burnet moths (*Zygaena*, Zygaenidae) from temperate environments. Insect life-cycle polymorphism. Springer Netherlands. 313–347.

9 PŘÍLOHY

9.1 TABULKY

Tabulka 1. Přehled parazitoidů vybraných druhů čeledi Satyridae dle Shaw *et al.* (2009).

HYMENOPTERA				
Čeleď	**Podčeleď**	**Parazitoid**	**Předpokl. hostitel**	**Potvrzený hostitel**
Ichneumonidae	Anomaloninae	*Agrypon delarvatum* (Gravenhorst, 1829)	<Satyrinae	
		Erigorgus foersteri (Mocsary, 1897)	<Satyrinae	*Aphantopus hyperantus*
		Erigorgus melanops (Förster, 1855)	<Satyrinae	*Maniola jurtina*
	Campoleginae	*Campoletis annulata* (Gravenhorst, 1829)		*Maniola jurtina*
		Hyposoter sp. Förster 1869	<Maniolini	*Maniola jurtina*
	Ichneumoninae	*Ichneumon caloscelis* Wesmael, 1844	<Satyrinae	*Maniola jurtina*
		I. gracilicornis Gravenhorst, 1829		*Maniola jurtina*
		I. novemalbatus Kriechbaumer, 1875	<Satyrinae	
Braconidae	Euphorinae	*Meteorus versicolor* (Wesmael, 1835)		*Manila jurtina*
	Microgastrinae	*Cotesia tetrica* (Reinhard, 1880)	<Satyrinae	*Maniola jurtina*
		Cotesia tibialis (Curtis, 1830)	<Satyrinae	*Maniola jurtina*
		Cotesia vestalis (Haliday,1834)	<Satyrinae	*Maniola jurtina*
	Rogadinae	*Aleiodes coxalis* (Spinola, 1808)	<Satyrinae	*Maniola jurtina*, *Erebia* sp.
Chalcidoidea (nadčeleď)	Pteromalidae (čeleď)	*Coelopisthia pachycera* Masi, 1924		*Maniola jurtina*
	Chalcididae (čeleď)	*Brachymeria femorata* (Panzer, 1801)		*Maniola jurtina*
DIPTERA				
Bombyliidae		*Villa* sp. Lioy, 1864	<Satyrinae	

„<“ = některé druhy

Tabulka 2. Přehled známých parazitoidů u druhů okáčů, kterými se zabývá tato práce dle Home of Ichneumonoidea (2014).

Maniola jurtina		
Aleiodes bicolor (Spinola, 1808)	*Aleiodes coxalis* (Spinola, 1808)	*Campoletis annulata* (Gravenhorst, 1829)
Cotesia notha (Marshall, 1885)	*Cotesia sessilis* (Geoffroy, 1785)	*Cotesia tibialis* (Curtis, 1830)
Cotesia vestalis (Haliday, 1834)	*Diphyus raptorius* (Linnaeus, 1758)	*Erigorgus melanops* (Forster, 1855)
Ichneumon affector Tischbein, 1879	*Ichneumon caloscelis* Wesmael, 1845	*Ichneumon extensorius* Linnaeus, 1758
Ichneumon gracilicornis Gravenhorst, 1829	*Ichneumon insidiosus* Wesmael, 1845	*Ichneumon novemalbatus* Kriechbaumer, 1875
Ichneumon phaeostigmus Wesmael, 1857	*Ichneumon pseudocaloscelis* Heinrich, 1949	*Meteorus versicolor* (Wesmael, 1835)
Spilichneumon anurus (Thomson, 1888)		
Aphantopus hyperanthus		
Cotesia spuria (Wesmael, 1837)	*Erigorgus foersteri* (Mocsary, 1897)	*Ichneumon affector* Tischbein, 1879

Tabulka 3. Přehled a stručný popis lokalit, ve kterých sběr proběhl housenek.

Lokalita	Nadm. výška [m n. m.]	Popis
Čistá	500	mezofilní ovsíková louka
Černý Důl – důl	650	mezofilní ovsíková louka
Hříběcí boudy	750	květnatá horská louka
Černý důl – louka	650	mezof. ovsíková louka, jižní svah
Dolní Štěpnice	500	sušší louka, jižní svah
Friesovy boudy	1150	horské smilkové trávníky
Lahrovy boudy	1050	horské smilkové trávníky
Přední a Zadní Rennerovky	1200	horské smilkové trávníky
Výrovka	1350	mozaika vysokohorských holí a kleče
Dvorská bouda	1320	světliny horského lesa
Strážné	850	květnatá horská louka
Luční hora (bouda)	1500	travnaté alpínské hole porostlé klečí

Tabulka 4. Shrnutí průběhu a úspěšnosti vzorkování housenek.

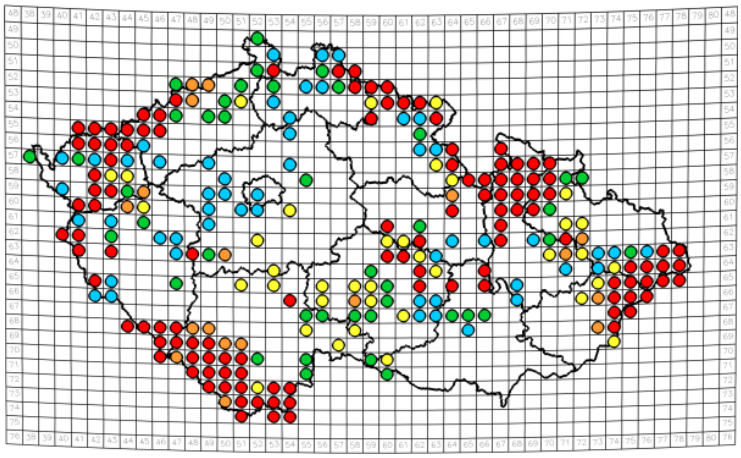
Datum [2013]	Sběr od–do [h]		Lokalita	Nadm. výška [m n. m.]	Druh	Počet
19. 5.	19:30	21:30	Čistá	500	–	–
20. 5.	14:45	15:45	Černý Důl (důl)	650	–	–
	18:00	21:00	Hříběcí boudy	750	–	–
	22:00	23:00	ČD (důl)	650	–	–
21. 5.	20:00	22:30	Černý důl (louka)	650	*Maniola jurtina*	6
22. 5.	6:00	9:00	ČD (louka)	650	–	–
	13:00	15:30	Dolní Štěpanice	500	–	–
	18:00	21:00	ČD (louka)	650	*Maniola jurtina*	14
23. 5.	5:00	8:00	ČD (louka)	650	–	–
	18:00	22:00	ČD (louka)	650	*Maniola jurtina*	9
24. 5.	18:00	23:00	ČD (louka)	650	*Maniola jurtina*	10
17. 6.	17:30	18:30	Hříběcí boudy	750	–	–
	19:00	22:00	Friesovy boudy	1150	–	–
	23:00	24:00	ČD (louka)	650	–	–
18. 6.	19:00	21:00	Lahrovy boudy	1050	–	–
	21:00	22:30	Přední a Zadní Rennerovky	1200	–	–
	22:45	24:00	Výrovka	1350	*Erebia epiphron*	1
19. 6.	19:00	21:00	Dvorská bouda	1320	*Erebia euryale*	1
	21:15	22:30	Výrovka	1350	*Erebia epiphron, E. euryale*	1, 1
	23:00	1:00	Luční hora (bouda)	1500	*Erebia epiphron*	2
20. 6.	19:30	21:00	Strážné	850	–	–
	21:30	22:00	Dvorská bouda	1320	*Erebia euryale*	1
	22:00	23:00	Výrovka	1350	–	–
	23:15	01:00	Luční hora (bouda)	1500	*Erebia epiphron*	3
21. 6.	19:30	21:00	Přední a Zadní Rennerovky	1200	–	–
	21:45	23:00	Výrovka	1350	*Erebia euryale*	1

Tabulka 6. Dostupné informace o druhu *Ichneumon caloscelis* a *Ichneumon sculpturatus* dle Home of Ichneumonoidea (2014).

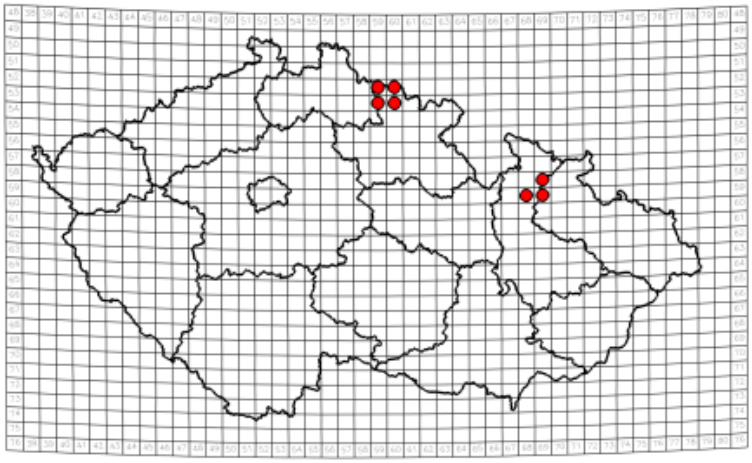
Parazitoid	**Výskyt v ČR**	**Hostitel**		
		latinsky	**česky**	**čeleď**
Ichneumon caloscelis	ANO	*Brintesia circe* (Fabricius, 1775)	okáč voňavkový	Satyridae
		Hipparchia semele (Linnaeus, 1758)	okáč metlicový	
		Maniola jurtina (Linnaeus, 1758)	okáč luční	
		Pyronia tithonus (Linnaeus, 1767)	okáč lipnicový	
Ichneumon sculpturatus	žádná data	*Lycaena phlaeas* (Linnaeus, 1761)	ohniváček černokřídlý	Lycaenidae
		Lycaena rutila (Werneburg, 1864)	ohniváček černočárný	
		Lycaena tityrus (Poda, 1761)	ohniváček černoskvrnný	
		Agriades optilete (Knoch, 1781)	modrásek stříbroskvrnný	

9.2 OBRÁZKY

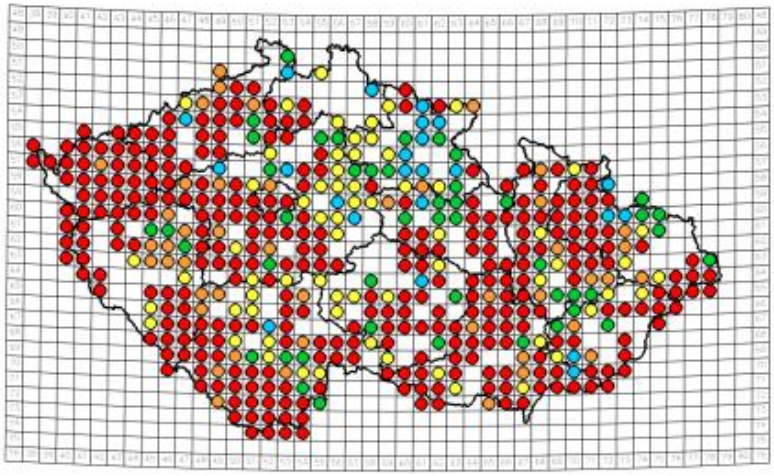
Obrázek 1. Rozšíření okáče černohnědého *(Erebia ligea)* v ČR.



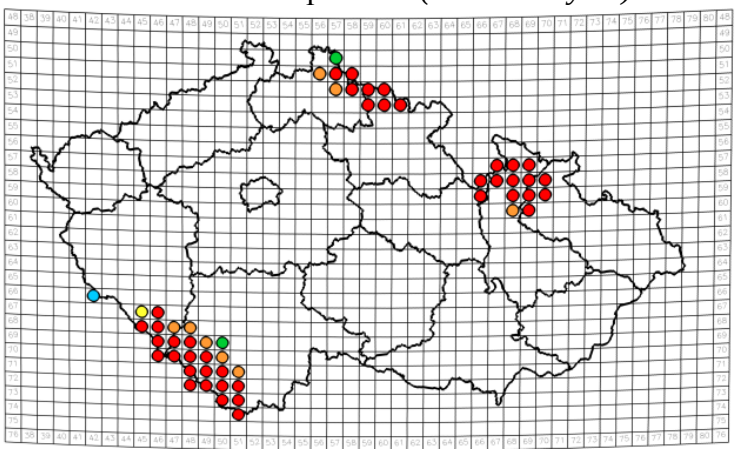
Obrázek 2. Rozšíření okáče horského *(Erebia epiphron)* v ČR.



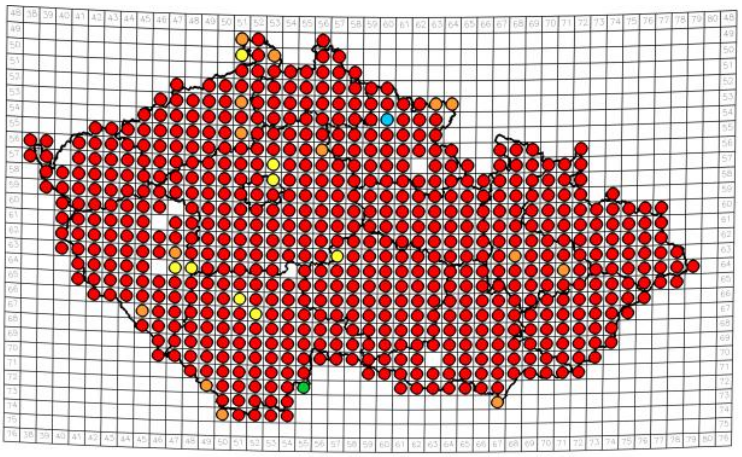
Obrázek 3. Rozšíření okáče rosičkového *(Erebia medusa)* v ČR.



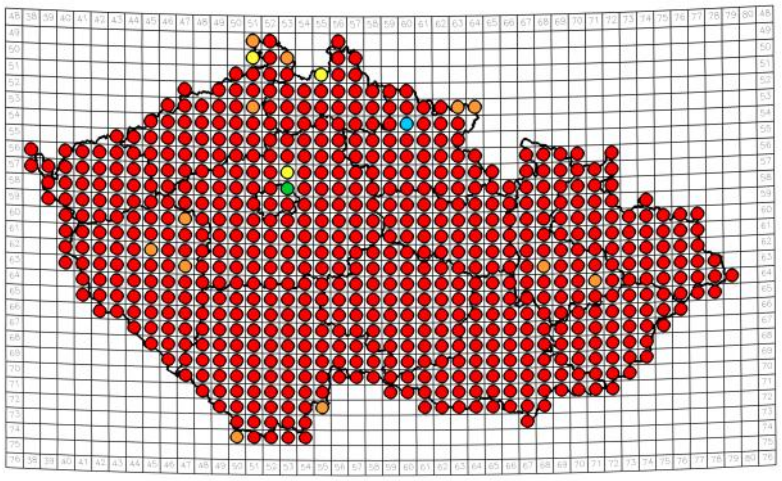
Obrázek 4. Rozšíření okáče rudopásného *(Erebia euryale)* v ČR.



Obrázek 5. Rozšíření okáče prosíčkového *(Aphantopus hyperanthus)* v ČR.



Obrázek 6. Rozšíření okáče lučního *(Maniola jurtina)* v ČR



Mapy: nepublikované mapy z projektu „Mapování motýlů ČR“ (Barvy ukazují rok posledního nálezu pro daný fauvistický čtverec: sytě červená po r. 2002, oranžová po r. 1995 žlutá po r. 1980 zelená po r. 1950 modrá před r. 1950).

Obrázek 7. Lokalita Černý důl (louka). Místo vhodné ke smýkání.

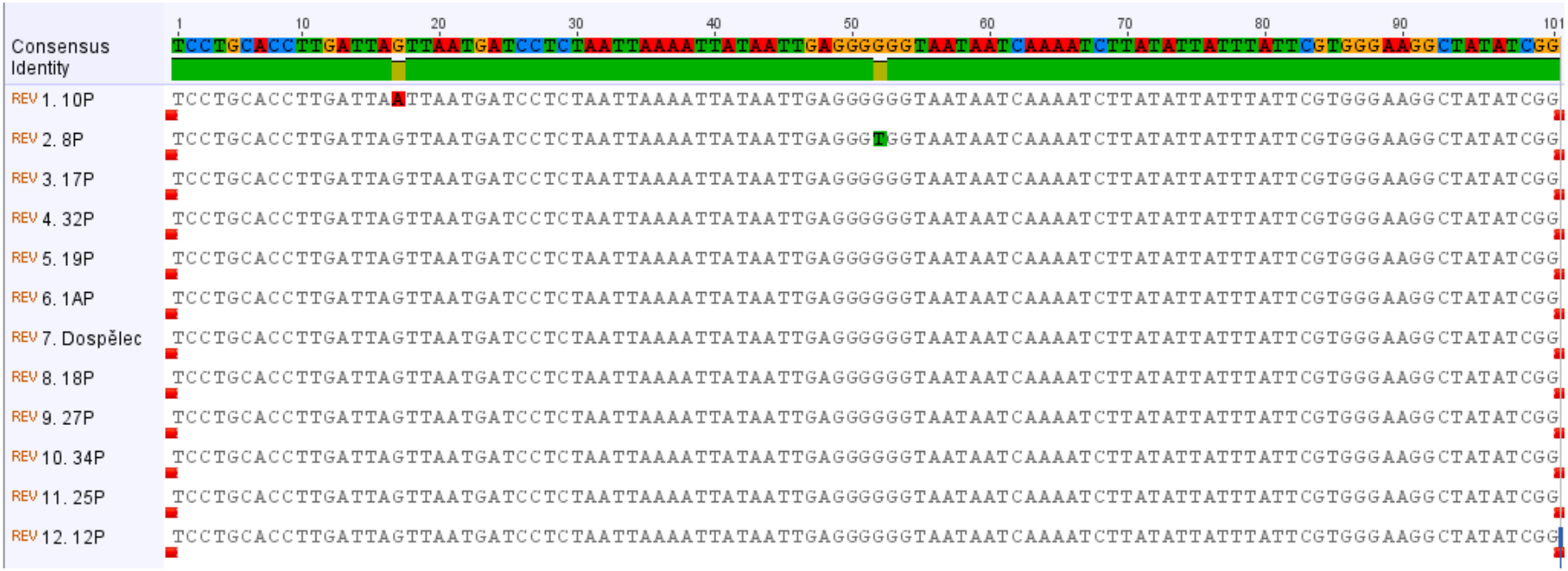
Obrázek 8. Lokalita Luční hora, kde je smýkání neefektivní, nutnost ručního sběru. Fotografováno v pozdních večerních hodinách.

Obrázek 9. Housenka okáče horského *(Erebia epiphron)* na živné rostlině.

Obrázek 10. Odchovaný parazitoid okáče lučního – lumek *(Ichneumon caloscelis).*

Obrázek 11. Odchovaný parazitoid okáče lučního – lumek *(Ichneumon caloscelis)*, detailní snímek.

Obrázek 12. Vypreparovaná larva parazitoida z housenky okáče lučního.

Obrázek 13. Vypreparovaný parazitoid z housenky okáče lučního.

Obrázek 14. Část sekvencí DNA získaných parazitoidů. Zvýrazněné pozice ukazují variabilitu sekvencí u dvou vzorků.