

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Genetický pohled na mizejícího motýla: situace druhu
Argynnis niobe

Diplomová práce

Bc. Dan Leština

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

České Budějovice 2015

Leština, D: Genetický pohled na mizejícího motýla: situace druhu *Argynnis niobe*, [Population genetics and phylogeography of a vanishing species: the case of *Argynnis niobe*. Mgr, Theses, in Czech.]- 71p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

This study evaluates the state of the Niobe fritillary (*Argynnis niobe*) in Europe, both in terms of (a) current knowledge of its distributional changes and of (b) the genetics of the surviving populations. It uses mitochondrial sequences and microsatellite markers to assess the phylogeographic history of the species, and the impact of the multiple local extinctions at the same time. The data are evaluated by a standard set of methods genetics and phylogeography population and a brief synthesis including recommendations for conservation management is given.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 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,
14.12.2015

Poděkování:

Martinu Konvičkovi;

Všem zahraničním kolegům za vydatnou pomoc;

Spolupracovníkům v terénu i v laboratoři, kterých je víc, než se na toto místo vejde.

Obsah

Úvod	1
<i>Literární přehled problematiky a možných metodických přístupů</i>	3
<i>Cíle práce</i>	8
Metodika	9
<i>Studovaný druh</i>	9
<i>Rešerše rozšíření</i>	10
<i>Analýza existujících genetických dat</i>	10
<i>Získání tkáňových vzorků</i>	12
<i>Odběr tkání a extrakce DNA</i>	14
<i>Použité mikrosatelitové markery</i>	14
<i>Analýza mikrosatelitových dat</i>	16
Výsledky	18
<i>Současné a historické rozšíření druhu</i>	18
<i>Analýza existujících genetických dat</i>	21
<i>Analýza mikrosatelitů</i>	25
Diskuse	33
<i>Syntéza údajů o rozšíření</i>	33
<i>Analýza sekvencí – mezidruhová úroveň</i>	34
<i>Analýza sekvencí – vnitrodruhová úroveň</i>	35
<i>Analýza mikrosatelitů</i>	38
<i>Závěry, souvislosti a možné praktické důsledky</i>	40
Seznam zdrojů	42
Přílohy	55
<i>Příloha 1 – Zdroje informací o rozšíření</i>	55
<i>Příloha 2 – Sekvence COI</i>	59
<i>Příloha 3 – Použité mikrosatelitové lokusy</i>	60
<i>Příloha 4 – Párové F_{st}</i>	61
<i>Příloha 5 – IntNJ síť</i>	62
<i>Příloha 6 – Evluace výsledků STRUCTURE</i>	63
<i>Příloha 7 – Structure plot pro celý dataset</i>	65
<i>Příloha 8 – Fylogenetický strom</i>	66

Úvod

Vzájemné genetické vztahy populací každého druhu by se měly stát jednou ze základních informací pro jakýkoli výzkum nebo aplikaci zabývající se daným organismem v divoké přírodě (Amos & Balmford 2001, Frankham *et al.* 2002, Frankham 2010). I u denních motýlů, vnímaných jako modelová skupina pro ekologii a evoluční biologii (Boggs *et al.* 2003) bylo v posledních letech představeno mnoho poznatků, které značně mění význam všech předchozích výzkumů týkajících se daného druhu a tím i náš pohled na jejich biologii (Schmitt *et al.* 2005b, Wahlberg & Saccheri 2007, Dinca *et al.* 2011, Duplouy & Hanski 2015, Kreuzinger *et al.* 2015).

Genetická data jsou mj. základním zdrojem informací o historii daných druhů (např. Hewitt 2004, Schmitt & Varga 2012, Husemann *et al.* 2014). Bez nich bychom mohli jen těžko odvodit, že např. okáč rosičkový (*Erebia medusa*) pravděpodobně přežil ledové doby krom mediteránních refugií i na severní straně Karpat (Hammouti *et al.* 2010, Besold & Schmitt 2015), nebo že geograficky velmi vzdálené populace vzácného drobného okáče *Coenonympha rhodopensis* jsou ve skutečnosti téměř identické a tedy izolované teprve krátkou dobu (Louy *et al.* 2013).

Perlet'ovec maceškový, *Argynnis (Fabriciana) niobe* (Linnaeus, 1758), na kterého se zaměřuje tato práce, je zajímavým a z mnoha ohledů jedinečným motýlem, který si zaslouží podrobné studium. Bezprecedentní je jeho vymizení z velké části evropského areálu, které navíc můžeme dát do přímé souvislosti s lidskými aktivitami. Reprezentuje zajímavou skupinu organismů vázaných na velmi ranně sukcesní biotopy a jako denní motýl a tedy nápadný a veřejností pozitivně vnímaný živočich by se mohl stát deštníkovým druhem, jehož ochranou by bylo zajištěno přežití i ostatních druhů s podobnými nároky (cf. např. Konvička *et al.* 2005, Tryjanowski *et al.* 2011).

Fakt, že *A. niobe* je relativně mobilní druh, ale na druhou stranu se nevyrovná těm nejmobilnějším migrantům, ho činí poměrně zranitelným ke změnám ve struktuře krajiny. Málo mobilní specialisté mohou dlouhou dobu přežít na jednom místě, např. v rezervaci, i pokud zaniknou jejich biotopy v širší krajině. Naopak extrémně mobilních druhů, které mohou přeletět až stovky kilometrů, se např. změny velikosti „zrna“ krajinné mozaiky také nedotknou. Nejzranitelnější jsou ty druhy, jejichž prostorová populační dynamika se odehrává v tom prostorovém měřítku, v jakém se odehrávají případné změny krajiny (cf. Baguette *et al.* 2000, Thomas 2000, Louy *et al.* 2007, Habel & Schmitt 2012, Engler *et al.*

2014), a to právě *A. niobe* s častými přesuny v délce několika kilometrů zřejmě je (Leština 2012, Leština *et al.* in prep.).

Zdá se, že na tyto své vlastnosti už doplácí. Jistě se jedná se o jednoho z nejrychleji mizejících motýlů ve většině svého areálu ve střední a západní Evropě, i když spolehlivé souhrnné informace nejsou v literatuře k dispozici. Evropský červený seznam (Van Swaay *et al.* 2010) ho hodnotí jako téměř ohroženého (NT) pro Evropskou unii a dokonce jako málo dotčeného (LC) pro Evropu jako celek. To zdánlivě nesouhlasí s předchozím tvrzením, ale je třeba brát v úvahu, že do EU spadají velké oblasti (středo-)východní a jižní Evropy, kde zřejmě někde skutečně neubývá, ale hlavně odtud zpravidla neexistují spolehlivá data. Alarmující neshody např. mezi stavem publikovaným v posledním evropském atlasu rozšíření motýlů (Kudrna *et al.* 2015), který nereflektuje žádné změny od r. 1981, a skutečným stavem v přírodě si žádají aktualizaci a revizi.

Přestože je to tedy velmi pozoruhodný druh, specificky jím se zabývaly pouze dvě práce indexované v databázi Web of Knowledge (WoK). Jednou z nich je článek zveřejňující v předstihu metody použité v této a dalších našich pracích (Zima *et al.* 2013). Druhým článkem o perleťovci maceškovém ve WoK je studie Salze a Fartmanna (2009) zaměřující se na ovipozici a další aspekty jeho života na písččných dunách na německém pobřeží Severního moře. Neexistují tedy relevantní vědecké údaje o jeho životě v běžné krajině střední Evropy, odkud především mizí.

Podobně jako němečtí kolegové jsme se nejdříve zabývali přežíváním druhu na lokální a regionální škále (Leština 2012, Leština *et al.* 2012, Leština *et al.* in prep.). V hlubokých údolích Javorníků a moravských Beskyd, které jsou poslední oblastí jeho výskytu v České republice, se nám podařilo do značné míry potvrdit naši domněnku, že, stejně jako jeho příbuzný perleťovec prostřední, *Argynnis adippe* (Denis & Schiffermüller, 1775), není vázaný na konkrétní lokalitu, např. zde na konkrétní údolí, ale jedinci se často přesouvají na delší vzdálenosti. Analyzovali jsme rozsáhlý datový soubor získaný pomocí zpětných odchytů (tzv. metoda Mark, Release, Recapture, MRR) ve dvou velkých sousedních údolích, při kterém např. zaznamenali mnoho přeletů přes hřeben mezi nimi. Charakteristiky doletu ve srovnání s literaturou také odpovídaly mobilním druhům a odhady populační velikosti byly velké, a i to napovídá tomu, že z pohledu těchto motýlů je jedna populace prostorově velmi rozlehlá a zřejmě jsme jí neobsáhli ve svém studijní ploše celou.

MRR studii jsem doplnil populačně-genetickým výzkumem českých lokalit. Výsledky jsou v souladu s daty z MRR, ukázalo se, že v rámci moravských Karpat nelze v našich genotypových datech vylížit prostorovou strukturu, genetická odlišnost lokalit je

minimální a nezávisí na jejich vzájemné geografické vzdálenosti a že rozdíly v genetické diverzitě mezi *A. niobe* a *A. adippe* nelze přičítat současné izolaci lokalit, ale historickým událostem (Leština 2012, Leština *et al.* in prep., další nepublikovaná data).

Jedním ze základních cílů této práce je zasadit naše dřívější lokální poznatky do geografického kontextu. Představují-li české populace jednu spojitou genetickou jednotku, je nasnadě se ptát, patří-li do této jednotky i přilehlé slovenské populace, potažmo další dále na jih a východ. Zároveň vyvstává otázka, jaký je vztah těchto populací k čerstvě izolovaným populacím v západní Evropě, když tento druh prakticky zmizel z území mezi nimi.

Literární přehled problematiky a možných metodických přístupů

Z výše zmiňovaných překvapivých zjištění v literatuře jmenujme např. Grilla *et al.* (2007), kteří se zabývali introgresí genetické informace jednoho druhu okáče r. *Maniola* do druhého. Jejich výsledky byly ale postaveny do úplně jiného světla, když Kreuzinger *et al.* (2015) oba zkoumané druhy z první studie přesvědčivě spojili do jednoho. Dále např. Vítáz *et al.* (1997) popsali nový druh *Polyommatus slovacus* na základě mnoha odlišností jedné populace *P. coridon* od všech okolních. Nový „druh“ se ale vůbec neliší geneticky, jak vyšlo najevo později, a tedy druhem není (Schmitt *et al.* 2005b). A najdeme i opačné případy, např. u zcela běžného modráška jehlicového (*Polyommatus icarus*) se pomocí jednoduché genetické analýzy (doplněné o morfometrickou), přišlo na to, že některé jihoevropské populace ve skutečnosti náleží na první pohled hodně podobnému, ale poměrně nepřibuznému severoafrickému druhu *P. celina* (Dinca *et al.* 2011). To rázem vnáší nové otázky do všech studií z daných regionů, ve kterých figurovali motýli označení jako *P. icarus*.

V literatuře patří mezi nejvíce studované druhy horští motýli, především díky relativně snadné interpretaci výsledků genetických studií z pohledu glaciálních cyklů, během kterých se dá s vysokou pravděpodobností předpokládat, že vysokohorské druhy v chladných obdobích sestupovaly do nižších poloh a v teplejších obdobích, např. dnes, přežívají v tzv. sky islands („nebeských ostrovech“), tj. na hřebenech pohoří a vrcholcích osamělých hor. Tyto posuny jsou samozřejmě významné i v kontextu pravděpodobných budoucích klimatických změn.

Jedná se zejm. o okáče r. *Erebia*, např. *E. euryale*, který pravděpodobně během glaciálů žil odděleně na úpatí jednotlivých pohoří, ve kterých se dnes vyskytuje, a přestože panovalo chladné podnebí, tak se v nížinách příliš nerozšířil a populace se nespojily (Schmitt & Haubrich 2008, Vila *et al.* 2011), podobně jako u druhů z komplexu *E. melampus/sudetica*

(Haubrich & Schmitt 2007). Obdobné obecné závěry vyplynuly i ze studia *E. epiphron* (Schmitt *et al.* 2005a, Schmitt *et al.* 2006b). Poslední z prací navíc dokládá zajímavý jev z Krkonoš, kam byl *E. epiphron* uměle vysazen ve 30. letech 20. století, přičemž nedošlo ke snížení genetické variability oproti zdrojové populaci v Jeseníkách. O něco složitější pattern odhalili Vila *et al.* (2005, 2006) u *E. triaria*, kde se některé populace obývající jednotlivá Španělská pohoří liší jen málo, zatímco jiné dělí hluboké rozdíly, což autoři interpretovali jako stopu po divergencích v jednotlivých glaciálních cyklech; populaci v pohoří Xistral navíc označili za evolučně významnou jednotku (ESU).

Podobně DeChaine & Martin (2004, 2005, 2006) usuzují na vliv jednotlivých glaciálních cyklů na rozrůžňování mitochondriálních haplotypů severoamerického jasoně *Parnassius smintheus*, přestože haplotypová síť je značně odlišná od *Erebia triaria* ve Španělsku. Tyto závěry jsou v mírném rozporu i s novější studií o *P. smintheus* (Todisco *et al.* 2012), která používá jak data svých předchůdců, tak i mitochondriální sekvence ze zbytku celého holoarktického areálu druhového komplexu *P. phoebus* (kam *P. smintheus* náleží), a to za použití modernějších statistických a fylogenetických metod. Vyplývá z ní, že se komplex nejdříve v dávné minulosti rozdělil na dvě linie, z nichž jednu dnes nalezneme v Eurasii a na Aljašce, a jednu ve zbytku Severní Ameriky. Následně na každém z kontinentů došlo během posledního glaciálu k promíchání populací a dnešní ostrůvkovité rozšíření souvisí až s ústupem po konci poslední doby ledové. Samotný závěr starších studií, že zjištěný pattern způsobila postupná kolonizace jednotlivých pohoří, nemusí být nutně chybný, ale minimálně v určení její datace se s novou prací rozchází.

Dalším horským systémem, kterému se v literatuře v posledních deseti letech věnovala značná pozornost, jsou horští žluťásci r. *Colias* ze stejných míst, jako *P. smintheus* (DeChaine & Martin 2005, Schoville *et al.* 2011, Schoville *et al.* 2012). Přestože se jejich historie jeví jako komplikovanější, docházelo zde zřejmě např. k mezidruhové hybridizaci a následnému bottlenecku zasahujícímu celý jeden druh, autoři se shodnou na tom, že v glaciálu nezůstali ani tyto motýli ve svých sky islands, ale rozšířili se do širšího okolí v nižších polohách.

V Evropě tomuto scénáři nejlépe odpovídá drobný okáč *Coenonympha rhodopenensis*, který má dnes velmi disjunktní areál v jihoevropských pohořích, ale přesto jsou jednotlivé populace jen málo odlišné od sebe navzájem (Louy *et al.* 2013). Tyto poznatky však nelze zobecnit na celý rod *Coenonympha*. Nížinný a teplomilný druh *C. arcania* přežil poslední glaciál ve dvou mediteránních refugiích a poté se plošně šířil na sever (Besold *et al.* 2008), zatímco taxony alpského bezlesí glaciál přečkaly relativně nedaleko svého současného

výskytu (Schmitt & Besold 2010). Vše nasvědčuje tomu, že historie populací se odvíjí spíše od historie specifických habitatů konkrétních druhů.

Toto tvrzení se potvrdilo při studiu populací 10 druhů motýlů v západní Kanadě (Bromilow & Sperling 2011), která ukázala, že historie krajiny má velký vliv na genetické vztahy současných populací jednotlivých druhů motýlů. Její autoři ale zdůrazňují, že tato implikace je jednosměrná, tedy že z genetických dat o jednom druhu nelze spolehlivě odvodit vývoj rozšíření jeho habitatu v krajině. Bylo to totiž až porovnání 10 druhů s rámcově podobnými nároky a přitom odlišnými haplotypovými sítěmi, co jim umožnilo s jakousi omezenou přesností odvozovat historii daného biotopu.

Dalším okruhem biogeografických témat, kterému byla věnována velká pozornost, je stav populací dnes běžných evropských motýlů během pleistocénu. Jedním studovaným systémem je okáč bojínkový (*Melanargia galathea*) a příbuzné jihoevropské druhy *M. lachesis* a *M. ines*, které vykazují známky složitého vývoje během glaciálních cyklů s mnoha mediteránními refugii a pravděpodobně s několika přesuny z Maghrebu do Evropy a zpět během posledních desítek tisíc let (Habel *et al.* 2005, Schmitt *et al.* 2006a, Habel *et al.* 2008, Habel *et al.* 2011b, Habel *et al.* 2011c).

Najdeme i práce věnující se lokální prostorové škále; je pozoruhodné, že dosavadní kusá data o populační struktuře *A. niobe* se značně liší od mnoha ostatních zkoumaných ohrožených druhů, např. od modráška černoskvřnného, *Phengaris arion* (Sielezniew & Rutkowski 2012, Ugelvig *et al.* 2012, Andersen *et al.* 2014), soumračníka žlutoskvřnného, *Thymelicus acteon* (Louy *et al.* 2007, Engler *et al.* 2014) nebo severoamerického okáče *Neonympha mitchellii francisi* (Milko *et al.* 2012).

O něco složitější je srovnání se studii zabývajícími se dalšími dvěma místně ohroženými druhy, hnědákem kostkovaným, *Melitaea cinxia* (např. Ehrich & Hanski 2004, Hanski 2011, Duploux & Hanski 2015) a hnědákem chrastavcovým (*Euphydryas aurinia*) (Joyce & Pullin 2003, Sigaard *et al.* 2008) Zkoumané lokality jsou ve všech případech zasazené do poměrně nehostinného okolí, ať už je to moře nebo intenzivně obdělávaná zemědělská krajina. V případě naší lokální genetické studie byla „matrix“, valašská venkovská krajina, pro motýly výrazně příznivější, což má na výsledky zásadní vliv (cf. např. Ricketts 2001, Eycott *et al.* 2012, Habel *et al.* 2013).

Studie o *E. aurinia* a *P. arion* ze severní Evropy ale dobře ukazují, jak jsou data o rozmístění genetické variability zásadní pro ochranu daných druhů. Také u severoamerického perleťovce *Argynnis (Speyeria) idalia* (Williams 2002, Williams *et al.* 2003, Keyghobadi *et al.* 2006) bylo odvozeno, kam se mají upínat snahy ochránců přírody

při managementu populací. Zajímavé jsou lokální studie o jasoni *Parnassius smintheus*, které dokládají, jak rychlý efekt může mít změna biotopu na genetiku motýlů (Keyghobadi *et al.* 1999, Keyghobadi *et al.* 2005a, Keyghobadi *et al.* 2005b, Caplins *et al.* 2014).

Většina výše zmíněných prací o populační genetice motýlů používá jako markery genetické variability buď sekvence funkčních genů, nejčastěji mitochondriálních, nebo tzv. allozymy. To jsou enzymy, které mají určitou variabilitu ve své struktuře, což lehce mění jejich chování při pohybu v gelu elektroforézy pod elektrickým napětím. Z elektroforetických gelů je posléze možné odečítat, které má daný jedinec varianty vybraných enzymů, tedy jeho genotyp, a to následně použít jako vstupní data populačně-genetických a dalších analýz (Thorpe & Solé-Cava 1994). Výhodou této metody je relativně nízká cena, nevýhodou je potřeba velkého množství materiálu, který se navíc musí skladovat hluboce zamražen, protože enzymy snadno degradují. To velmi ztěžuje možnosti terénního odběru vzorků a prakticky vylučuje využití staršího materiálu, který byl např. sbírán za jiným účelem (Freeland *et al.* 2011).

Naproti tomu DNA můžeme získat i ze vzorků starých i několik set tisíc let (Hagelberg *et al.* 2015, Hofreiter *et al.* 2015). Mitochondriální DNA (mtDNA) má navíc výhodu v tom, že se v každé buňce vyskytuje v několika kopiích a tak na její úspěšnou sekvenaci ve výsledku postačuje menší množství tkáně a celkově je práce s ní relativně snazší, než s jadernou DNA (Galtier *et al.* 2009). Jako výhoda bývá označována i téměř výlučně matrilineární dědičnost mtDNA, která výrazně zjednodušuje interpretaci zjištěných genealogií. Zjištěný fylogenetický strom je jednoduše rekonstrukcí historie samičí linie matek a dcer. Nevýhodou je, že pokud se historie této konkrétní linie z nějakého důvodu od ostatních odlišuje, tak to pomocí mtDNA nemůžeme zjistit (Toews & Brelsford 2012). Extrémním, ale relativně častým případem jsou introgrese mtDNA jednoho druhu do populací druhého druhu, které mohou být pozůstatkem třeba i jediné hybridizační události. mtDNA se poté přenáší v nezměněné podobě z generace na generaci, na rozdíl od situace ve zbytku genomu, ve kterém se cizí genetický materiál v průběhu času „naředí“ rekombinačními procesy. Samostatnou kapitolou u členovců jsou pak infekce bakteriemi r. *Wolbachia*, které mohou významně ovlivňovat výsledky různých analýz založených na mtDNA (Hurst & Jiggins 2005). Přesto je tento marker stále nenahraditelným zdrojem informací, zejména díky možnosti srovnání výsledků s velkým objemem studií z posledních několika desetiletí (Galtier *et al.* 2009), je však důležité ho konfrontovat s dalšími daty.

Většiny problémů mtDNA se dá vyvarovat použitím jaderné DNA. Zde se naopak musí výzkumníci při interpretaci dat vyrovnat s případnými konfliktními signály

jednotlivých zkoumaných lokusů, a hlavně s obecně menší variabilitou, alespoň ve funkčních genech. Nejpřímějším řešením by bylo sekvenovat velké množství lokusů a tím zachytit více variability, ale to je technologicky možné levně zajistit teprve několik posledních let díky rozvoji sekvenování nové generace (Next-Generation Sequencing, NGS).

Jednou z možností, kterou výzkumníci dříve obcházeli všechny tyto problémy a získávali genetická data velmi levně, jsou techniky nezaložené přímo na sekvencích, ale na získání určitého genetického profilu jiným způsobem, např. elektroforézou náhodně amplifikovaných fragmentů DNA (AFLP) nebo fragmentů získaných restričním štěpením DNA (RFLP). Ty se ale potýkají s omezeními týkajícími se porovnatelnosti mezi studii a aplikovatelnosti některých genetických přístupů (Behura 2006, Arif & Khan 2009, Freeland *et al.* 2011).

Další možností je genotypovat určité hypervariabilní úseky jaderné DNA, které byly předem v genomu identifikovány, ať už jde o bodové mutace (SNPs), nebo mikrosatelity (také nazývané krátké tandemové repetice, Short Tandem Repeats, STRs, nebo Simple Sequence Repeats, SSRs). Mikrosatelity jsou úseky v genomu utvářené repeticemi o dvou nebo několika bázích, které jako takové mají velkou náchylnost k mutacím v počtu těchto repetic a jsou tak ideální pro studium jemných detailů v rozložení genetické diverzity (viz např. Arif & Khan 2009, Turlure *et al.* 2014 ad.). Genotypy jedinců se stanovují pomocí PCR s primery v oblastech sousedících s vlastním mikrosatelitem (flanking regions) a následným pečlivým elektroforetickým oddělením PCR produktů podle velikosti. To je dnes nejčastěji prováděno kapilárově na strojích určených k sekvenování Sangerovou metodou, která také vyžaduje přesnou kapilárovou elektroforézu.

Velkou nevýhodou studia vybraných variabilních míst je, že pro jejich prvotní identifikaci je třeba znát velké části genomu a v nich požadované úseky vyhledat. Pro nemodelové organismy, pro které přečtený genom není k dispozici, to zpravidla znamená osekvenování velkého množství genetického materiálu *de novo*, což ale při dnešní relativní dostupnosti NGS přestává být problémem. Mikrosatelitové markery použité v této práci jsme s kolegy identifikovali již dříve (Zima *et al.* 2013) a využili pro studium lokálních vztahů populací *A. niobe* v ČR (Leština 2012, Leština *et al.* in prep.).

U motýlů (Lepidoptera) je identifikace funkčních mikrosatelitových markerů méně úspěšná a proto i méně častá v literatuře, než by se dalo očekávat, přičemž některé důvody se podařilo identifikovat, ale obecně na tuto problematiku není jednotný pohled (Meglec *et al.* 1998, Sarhan 2006, Meglec *et al.* 2007, Van't Hof *et al.* 2007). I přes tyto problémy se ale mikrosatelity dodnes často používají a prokazují se jako velmi užitečné nástroje pro hledání

odpovědí na přesně ten typ otázek, jaké si klade tato práce (Stevens *et al.* 2010, Habel *et al.* 2011a, Vandewoestijne *et al.* 2012, Smee *et al.* 2013, Andersen *et al.* 2014, Turlure *et al.* 2014).

Cíle práce

1. Shrnout dostupné informace o rozšíření *A. niobe* v Evropě a zhodnotit je z hlediska kvality dat a z hlediska vlastního stavu jednotlivých přežívajících populací.
2. Z dostupných genetických dat zhodnotit validitu *A. niobe* jako druhu a vyhodnotit jejich informativnost z hlediska historie jeho populací.
3. Analyzovat pomocí mikrosatelitových markerů všechny dostupné současné i historické populace *A. niobe* a tím:
 - a) odvodit jejich populační strukturu;
 - b) zjistit vztahy mezi přežívajícími populacemi, vzdálenými i blízkými;
 - c) zhodnotit pravděpodobnost možných biogeografických scénářů, a to jak s ohledem na vývoj druhu v geologické historii, tak na současnou vlnu vymírání v západní části jeho areálu.

Metodika

Studovaný druh

Perleťovec maceškový (*A. niobe*) náleží v rámci babočekovitých (Nymphalidae) do tribu Argynnini. S ostatními tzv. velkými perleťovci tvoří velký rod *Argynnis* Fabricius, 1807, v rámci něhož se řadí, společně s nejbližšími příbuznými jako je perleťovec prostřední (*A. adippe*), severoafrický druh *A. auresiana*, korsicko-sardinský druh *A. elisa*, východoasijský *A. nerippe* nebo himalájský *A. kamala* do podrodu *Fabriciana* Reuss, 1920.

Fylogeneze tribu byla nedávno revidována na základě dat z několika genů a morfologických znaků (Simonsen 2006, Simonsen *et al.* 2006, Simonsen 2007). Na genetická data o tomto druhu se ale v těchto pracích nelze spolehnout, protože při jejich přípravě zřejmě došlo k záměně vzorků, jak jsem zjistil během přípravy této práce. Simonsen *et al.* (2006) místo *A. niobe* z Dánska, jak uvádí v práci, použili *A. adippe* ze Španělska (viz též dále). Fylogenetické práce by z tohoto důvodu vyžadovaly drobnou revizi, ale jak napovídá má práce a především morfologické analýzy, fylogenetická pozice *A. niobe* zřejmě zůstane zachována.

A. niobe se vyskytuje od Pyrenejského ostrova po východní Asii, ale východní hranice rozšíření byla dosud uváděna různě (cf. Tuzov 2000, Beneš & Konvička 2002, Fujioka 2002, Tuzov 2003, Tolman 2008, Lang & Wang 2010, Eliasson 2012, Han *et al.* 2014), zřejmě kvůli nejasné důvěryhodnosti taxonomického zařazení nejvýchodnějších populací a obecně variabilní vnější morfologii velkých perleťovců s množstvím barevných forem a místních ras, znepřehledňujících situaci. Chybí v severní Africe, v nížinách jižní Evropy, v severozápadní Francii a na Britských ostrovech, a recentně se stahuje i ze střední a severní Evropy.

Živnou rostlinou jsou různé violky, např. *Viola odorata*, *V. canina*, *V. hirta* nebo *V. palustris* (Beneš & Konvička 2002, Salz & Fartmann 2009, Spitzer *et al.* 2009b). Významným faktorem je pro něj zřejmě teplota larválního mikrohabitatu, housenky se často sluní a stabilní populace najdeme pouze v těch oblastech, kde je dostupná vyhřátá obnažená půda, ať už z důvodu narušování domácími nebo divokými zvířaty, těžkou technikou, nebo v podobě navátého písku. Dospělci jsou jako dlouhověcí motýli značně závislí na zdrojích nektaru, a proto na místech výskytu musí být k dispozici v podobě květnatých lučních společenstev apod. Za větru nebo deště se stahují do větví keřů a stromů, zpravidla je tedy najdeme do vzdálenosti několika desítek metrů od nich (Beneš & Konvička 2002, Salz & Fartmann 2009, Spitzer *et al.* 2009b, Eliasson 2012, Leština 2012, vlastní pozorování při

sběru materiálu). Kombinace těchto habitatových nároků způsobuje, že *A. niobe* je dnes schopen dokončit svůj vývoj pouze na specifických místech.

Rešerše rozšíření

Východiskem byl atlas evropského rozšíření motýlů od Kudrny *et al.* (2015). Pro země, kde jsem měl pochybnosti o správnosti nebo aktuálnosti údajů, jsem si buď opatřil příslušnou literaturu, prostudoval národní nebo regionální databázi záznamů, nebo kontaktoval místní odborníky, pokud možno koordinátory národních mapování motýlů a podobných projektů. Vše jsem doplnil vlastními pozorováními při sběru materiálu k této práci a informacemi o lokalizaci zde použitých vzorků.

Celkem se k situaci v dané zemi nebo regionu, popř. k jednotlivým lokalitám vyjádřilo 19 vědců a amatérských entomologů z 12 zemí (Příloha 1). V celkem 15 zemích nebo menších samosprávních celcích jsem se dostal k aktuální informaci o všech známých záznamech, ať už v podobě komentáře národního koordinátora takto zaměřeného projektu, exportu z dané národní databáze, nebo webové aplikace umožňující data zobrazit.

Analýza existujících genetických dat

Ve veřejně přístupných databázích GenBank (Benson *et al.* 2012) a BOLD (Ratnasingham & Hebert 2007) jsem vyhledal veškeré záznamy o perleťovcích podrodu *Fabriciana*. Vyhledal jsem veškerá druhová jména a jejich synonyma podle Tuzova (2000). V databázi BOLD, která neumožňuje zadávání samotných druhových názvů, jsem u všech použil jak kombinaci s rodovým označením *Argynnis*, tak *Fabriciana* (běžně je užíváno oboje). BOLD dále umožnila vyhledat velké množství jedinců, které autoři záznamů z různých důvodů neurčili do druhů, a to pomocí takzvaných BINů (Barcode Index Numbers), automaticky generovaných clusterů sekvencí. Stáhl jsem tedy také všechny sekvence, které spadaly do stejných BINů, jako sekvence vyhledané podle druhových názvů (kromě jednoho případu evidentní záměny *A. aglaja* za *A. adippe* u vzorku BOLD:AAB2322; tohoto jedince jsem z analýz vyloučil a nestahoval jsem sekvence z BINu odpovídajícímu *A. aglaja*). Některé neurčené jedince jsem určil podle přiložených fotografií, určení jsem konzultoval se specialisty. Všechny tyto identifikace byly zaslány správcům databáze.

Analýzu jsem založil na úseku mitochondriálního genu pro cytochromoxidázu I (COI), který se využívá pro DNA barcoding a tvoří většinu databáze BOLD i značnou část sekvencí v GenBanku. Další sekvence tohoto genu jsem získal od kolegů z Institut de

Biologia Evolutiva v Barceloně , kteří mi laskavě poskytli data ze svých prací (Dincă *et al.* 2015 ad.) ještě před jejich publikací ve zmíněných databázích. Pro přehled všech použitých sekvencí viz Přílohu 2.

Nejdříve jsem z dat odstranil všechny sekvence vyskytující se v databázích opakovaně (většina sekvencí byla jednou v BOLD a jednou v GenBanku, několik bylo do GenBanku pravděpodobně nahráno vícekrát). Zbylé sekvence jsem uspořádal pomocí MUSCLE (Edgar 2004) se základním nastavením tak, jak je implementován v softwaru Geneious 7.1.7 (Kearse *et al.* 2012), s maximálním počtem iterací 8. Pro první analýzy jsem použil všechny sekvence v alignmentu, které jsem ořezal z obou stran tak, abych získal co nejdelší úsek s co největším počtem variabilních míst a s co nejmenším počtem mezer nebo chybějících dat.

Alignment jsem analyzoval jednak parsimonní metodou (Templeton *et al.* 1992) v programu TCS 1.21 se standardním 95 % limitem pro propojení (Clement *et al.* 2000, Clement *et al.* 2002), jednak pomocí různých metod implementovaných v programu PopART 1.7 (Leigh & Bryant 2015), tedy znovu pomocí metody TCS, dále Minimum Spanning Network (Bandelt *et al.* 1999) s Epsilon=0, Median Joining Network (Bandelt *et al.* 1999) s Epsilon 0 a 1 a konečně Integer Neighbor Joining (dále IntNJ; French *et al.* 2014) s různým nastavením tolerance.

Pro doplnění fylogenetického pohledu jsem k datasetu přidal outgroup (EULEP085-14 *Argynnis paphia*, EULEP177-14 *Argynnis pandora*, EULEP193-14 *Argynnis aglaja*, EZROM779-08 *Argynnis laodice*, vše databáze BOLD) a analyzoval likelihoodovou metodou PhyML (Guindon & Gascuel 2003) tak, jak je připravena v platformě phlogeny.fr (Dereeper *et al.* 2008). Podporu jednotlivých větví jsem spočetl Approximate likelihood-ratio testem (Anisimova & Gascuel 2006) na téže platformě.

Podle výsledků této analýzy jsem z původního neořezaného datasetu vybral sekvence odpovídající *A. niobe* a vytvořil z nich nový alignment. Před ořezáním jsem některé sekvence z alignmentu vyřadil tak, abych k analýze mohl použít co nejdelší úsek. Na obou koncích alignmentu jsem postupoval tak, že jsem vždy zkontroloval, jestli nejkratší sekvence obsahuje v celé své délce vůbec nějakou informaci, kterou neobsahuje žádná z dalších sekvencí. Pokud ne, a zároveň pokud by tato sekvence zásadně nerozšířila povědomí o rozšíření daného haplotypu, vyřadil jsem ji a zkontroloval další nejkratší sekvenci v pořadí. Tento nový alignment pro *A. niobe* jsem analyzoval stejně jako ten předchozí analyzující celý podrod *Fabriciana*.

Ilustrace pro tuto práci jsem se rozhodl zhotovit podle softwaru TCS 1.21, protože to je v literatuře velmi rozšířená metoda a poskytuje tak nejvíce možností přímého srovnání (např. Hart & Sunday 2007). (Protože ale obrázky exportovatelné z programu PopART jsou mnohem vhodnější k použití v publikaci, použil jsem tyto, pouze upravené v grafickém editoru tak, aby odpovídaly výsledkům z TCS 1.21).

Získání tkáňových vzorků

Snažil jsem se shromáždit maximum dostupného genetického materiálu druhu, zejména dostatečné množství jedinců z různých částí Evropy. Kontaktoval jsem zahraniční i české kolegy, kteří mi v několika případech vyhověli a poskytli materiál z vlastních sbírek, nebo ho i pro tuto práci přímo nasbírali. Většinou ale pomohli poskytnutím informací nezbytných k nalezení *A. niobe* v jejich zemi (lokalita, vhodný čas), podle nichž jsem poté odchytil na místě dospělé motýly. Materiál jsem doplnil o tkáňové vzorky z muzeí: Národní zemědělské muzeum Ohrada u Hluboké nad Vltavou, a Naturhistorisk Museum v dánském Aarhusu, Regionální Muzeum Kolín, Šarišské muzeum Bardejov (Slovensko).

Celkem jsem zpracoval 845 jedinců z přibližně 60 různých oblastí ve 27 zemích Evropy a Asie (pro přehled viz Obr. 1 a 2), z čehož jsem 460 jedinců v 7 různých zemích odchytil sám vlastních terénních výpravách.



Obr. 1: Přehled lokalizace všech použitých vzorků. Mapa nakreslena pomocí aplikace GPSvisualizer, mapový podklad © Příspěvatelé OpenStreetMap, licence CC-BY-SA.



Obr. 2: Lokalizace vzorků z těch regionů, odkud jsem získal alespoň 15 genotypů. Velikost značky odpovídá množství vzorků sebraných na dané konkrétní lokalitě, nejmenší $N=1$, největší $N=32$. V některých oblastech bylo 15 a více genotypů získáno na jedné lokalitě, v jiných jsem byl nucen sečíst počty z několika sousedních lokalit. Mapa neposkytuje dostatečné rozlišení českých populací, pro jejich přehled viz Leština (2012). Mapa nakreslena pomocí aplikace GPSvisualizer, mapový podklad © Příspěvatelé OpenStreetMap, licence CC-BY-SA.

Odběr tkání a extrakce DNA

Z živých exemplářů jsem odebíral vždy jednu kráčivou končetinu a fixoval ji čistým etanolem. Z vysušených vzorků jsem odebíral 3-4 nohy, a pokud to nebylo možné (např. exemplář nohy již postrádal), vzorek hrudní svaloviny. Také všechny vzorky sbírané mými spolupracovníky byly buď vysušené, nebo fixované absolutním etanolem. Oba tyto způsoby mají při pokojové teplotě po mnoho týdnů úspěšnost v uchování DNA blížící se 100% (vlastní pokus, data neukázána). Po použití jsem všechny vzorky, ve kterých zbylo byt nepatrné množství tkáně, zamrazil v absolutním etanolu při -20°C a uskladnil v prostorách Entomologického ústavu AVČR v Českých Budějovicích. Po skončení všech prací budou kvalitní vzorky přemístěny do některé z genetických bank.

DNA jsem extrahoval pomocí univerzálních komerčně dodávaných extrakčních kitů dle instrukcí výrobců (část pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen Inc., část pomocí Geneaid DNA Isolation Kit - Tissue). Finální eluci jsem prováděl 75 μl příslušného dodaného elučního pufru, následně jsem na suchou kolonku nanesl dalších 75 μl a provedl eluci znovu pro maximalizaci výtěžku a tyto dva extrakty následně odděleně uskladnil v -20°C jako pojistku proti možné degradaci jednoho z eluátů.

Použité mikrosatelitové markery

Jak jsme popsali dříve (Zima *et al.* 2013), mikrosatelity byly v genomu *A. niobe* nalezeny pomocí komerčně zadaného 454 pyrosekvenování knihovny obohacené o mikrosatelitové repetitivní sekvence. Obohacení (enrichment) v tomto případě znamená, že do suspenze kuliček, na kterých probíhala emulzní PCR, byly posléze přimíchány DNA sondy, pomocí kterých byly magneticky vytaženy kuličky s požadovanými sekvencemi. Další postup (tedy samotné pyrosekvenování) byl aplikován pouze na tyto vybrané kuličky, zbytek byl ze zkumavky odplaven.

Z bioinformatické analýzy readů 454 sekvenátoru poskytnuté dodavatelskou firmou bylo získáno celkem 388 mikrosatelitů, které by se mohly amplifikovat teoreticky nejkvalitnějšími primery. U nich jsme analyzovali další jednoduché biochemické parametry (možný vznik sekundárních struktur na primeru apod.) podle příručky firmy Premier Biosoft (2015) a pro 30 nejvhodnějších lokusů jsme nechali u firmy Generi Biotech (Hradec Králové, ČR) zakázkově nasyntetizovat klasické oligonukleotidové primery. S nimi jsme provedli několik PCR při různých reakčních podmínkách a kvalitu produktů jsme ověřovali horizontální agarózovou elektroforézou. Osmnáct z nich jsme na základě toho vybrali pro

další testování a nechali vyrobit příslušné forward primery značené fluorescenčními značkami umožňujícími „fragmentační analýzu“ (fragment analysis) na kapilárovém sekvenátoru uzpůsobeném pro klasickou Sangerovu metodu sekvenování DNA. Tyto primery byly nejdříve otestovány na osmi jedincích a na základě získaných výsledků jsme vybrali deset lokusů, které jsme publikovali (Zima *et al.* 2013). Šest z nich (Příloha 4) se stabilně amplifikovalo v multiplex-PCR reakcích (mPCR), a na nich jsem založil tuto práci. Multiplexace, čili provádění několika PCR zároveň v jedné mikrozkušavce, je nezbytná zejména z finančního pohledu, protože se tímto způsobem násobně snižují náklady na chemikálie a následné analýzy PCR produktů.

Těmito dvěma multiplexy jsem amplifikoval DNA všech 845 vzorků. Používal jsem Qiagen mPCR kit, a to v množství 5 μ l připraveného mastermixu, 4 μ l vody, 1 μ l ekvimolárně smíchaných primerů a 1,2 μ l templátové DNA v původní koncentraci vzešlé z izolačního postupu. Teplotní program jsem nastavil podle návodu ke kitu, s nasedací teplotou 57 °C. PCR produkty jsem odesílal do firmy Macrogen International (Soul, Jižní Korea) k fragmentační analýze. Hrubá data ve formě *.fsa souborů jsem zpracoval v programu Geneious 7.1.7 s pluginem pro práci s mikrosatelity.

Analýza mikrosatelitových dat

Pro prvotní vizualizace dat a export souborů pro další programy jsem používal software GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse 2006). Pomocí programu SPAGeDi (Hardy & Vekemans 2002) jsem spočítal základní populačně-genetické charakteristiky, a to jednak souboru všech vzorků, u kterých se mi podařilo genotypovat alespoň čtyři markery, jednak pro každou lokalitu, jednak pro různě sloučené skupiny lokalit podle jejich geografické blízkosti. Konkrétně uvádím počet vzorků na lokalitu, celkové procento chybějících dat v každém souboru, průměrný počet alel na lokus (N_A), průměrný počet alel na lokus přepočtený rarefrakcí na soubor o 30 genových kopiích (tj. 15 plně genotypovaných jedinců; možné vypočítat pouze pro soubory větší než 30 genových kopií pro každý lokus; značeno A_R), dále heterozygotitu očekávanou při Hardy-Weinbergově rovnováze (neboli genovou diverzitu, značeno H_e ; Hardy-Weinbergova rovnováha dále v textu jako H-W rovnováha), pozorovanou heterozygotitu (H_o) a k ní udávaný koeficient inbreedingu (F_I) společně s výsledkem permutačního testu na jeho odlišnost od 0 (permutace genových kopií mezi jedinci, čili test H-W rovnováhy).

Analýzou molekulární variance (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992) v softwaru Arlequin 3.5.1 (Excoffier & Lischer 2010) jsem rozdělil varianci v datech na varianci uvnitř populací, mezi populacemi a mezi skupinami populací („between groups“). Vzhledem k prostorovému rozmístění získaných vzorků jsem analyzoval dva odlišně upravené datasety. Do prvního jsem zařadil všech 828 vzorků, jako populace jsem definoval jednotlivé lokality odchytu (lokality jsem sloučil pouze v případech, kdy od sebe byly vzdáleny méně než 2 km) a do skupin lokalit jsem sdružil bezprostředně sousedící populace (řádově desítky kilometrů, s výjimkou Česka, Slovenska a Španělska, kde jsem získal vzorky z rozsáhlých území, ale jen velmi řídké pokrytých). Do druhého datasetu jsem vybral jen populace s více než 15 genotypovanými jedinci. Jedince z některých lokalit jsem v tomto případě sloučil do jedné populace tak, abych zvýšil počet jedinců ve výsledné populaci, ale zároveň aby byly vzdálenosti uvnitř této nové populace mnohem menší, než vzdálenosti od ostatních populací. Celkem v datasetu zbylo 607 jedinců v 24 nově definovaných populacích.

Test izolace způsobené vzdáleností (Isolation by Distance, IBD) jsem spočetl v softwaru GenAlEx, a to podle linearizovaných párových F_{st} mezi populacemi (pro všechny populace s alespoň 15 vzorky) a testoval jsem závislost na logaritmované geografické vzdálenosti Mantelovým testem s 9999 permutacemi. Protože výsledky frekvenčních statistik u německých populací jsou ovlivněné jejich nízkou genetickou diverzitou, provedl

jsem Mantelův test s mezipopulačním F_{st} ještě jednou na datasetu, ze kterého jsem německé populace vypustil, abych oddělil vliv těchto zvláštních populací od vlivu zbytku datasetu.

Pro bayesiánskou klastrovací analýzu v programu STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000) jsem použil obdobné dva datasety, jako pro analýzu AMOVA. První ($N = 828$) jsem ponechal kompletní, zatímco do druhého ($N = 607$), jsem vybral jen dobře ovzorkované populace (více než 15 jedinců). Jako priors jsem použil příslušnost jedinců k jednotlivým populacím. Pro každou hodnotu parametru k od 1 do 20 (k vyjadřuje počet klastrů, na který se má dataset rozdělit) jsem každý z datasetů jsem analyzoval desetkrát při 999999 permutacích. 10 výsledků pro každé k jsem sloučil programem STRUCTURE Harvester (Earl & vonHoldt 2012) a pro grafickou prezentaci uspořádal programem CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007). Sloupcové grafy jsem sestrojil pomocí vlastního R-skriptu založeného na volně dostupném skriptu (M. G. Johnson, Botanická zahrada v Chicagu, USA <https://github.com/mossmatters/Structure-Pipeline/blob/master/structureplot.R>; staženo v lednu 2015). Všechny tyto operace byly provedeny na počítačích sítě Národní Gridové Iniciativy Metacentrum.

Výsledky

Současné a historické rozšíření druhu

Na Pyrenejském a Apeninském poloostrově je *A. niobe* vnímán místními experty jako typický motýl vázaný na vysoká pohoří, se sporadickým výskytem v jejich okolí. Nepředpokládá se, že by se jeho populace výrazně zmenšovaly. V nížinných oblastech se nevyskytuje a nejsou známy důkazy o tom, že by se tam v historii vyskytoval. Obdobnou vazbu na vyšší polohy ukazují podrobná data o rozšíření v Srbsku a do určité míry je znatelná i ve Slovinsku. Také velká většina jedinců z Řecka v mojí sbírce vzorků byla odchycena nad 1200 m n. m.

Na druhou stranu již ze sousední Makedonie a Bulharska jsem získal početný materiál i z lokalit pod 400 m n. m. Na západním Balkáně není rozšíření motýlů do detailu známé, ale zpracoval jsem mj. tři zprávy o podrobných faunistických průzkumech určitých omezených území. Ve všech je *A. niobe* uváděn jako druh, který byl v dané oblasti znám v historii, ale během současných výprav se jeho výskyt nepodařilo potvrdit.

Ve Francii jsou informace také jen kusé. V nejnovějším atlasu motýlů Francie je poměrně podrobná mapka, která naznačuje jeho výskyt v pohořích na jihu a východě země, ale v některých oblastech není jasné, nakolik jsou tyto informace aktuální a především kde se druh vyskytoval v minulosti. Podle vyjádření několika místních znalců motýlů z různých oblastí i podle dat T. Lafranchise, autora atlasu, se ve velké části z načrtnutého rozšíření vyskytuje jen ve velmi nízkých hustotách, jak jsem naznačil ve své mapce. Zajímavá je zmínka o vývoji v oblasti Poitou-Charentes (JZ Francie), kterou před svou smrtí nadiktoval Robert Levesque Nielu Wildingovi v rámci přípravy regionálního atlasu rozšíření založeného na Levesqueově sbírce. *A. niobe* zde byl vzácný před rokem 1950, poté byl asi 40 let hojný, aby opět před několika lety úplně vymizel.

V rumunských, slovenských, polských a českých Karpatech jde o široce rozšířený a početný druh, stejně jako ve většině Alp.

V Panonské nížině je situace nejasná. V roce 2014 byla v nízko položené lokalitě Maďarsku objevena jedna populace, ale krom toho údaje chybějí. Na Slovensku je spíše vázán hory a pahorkatiny, ale existují i populace v písčítých nížinách v povodí Moravy (nebo do nedávna existovaly, nepodařilo se mi je na místě nalézt).

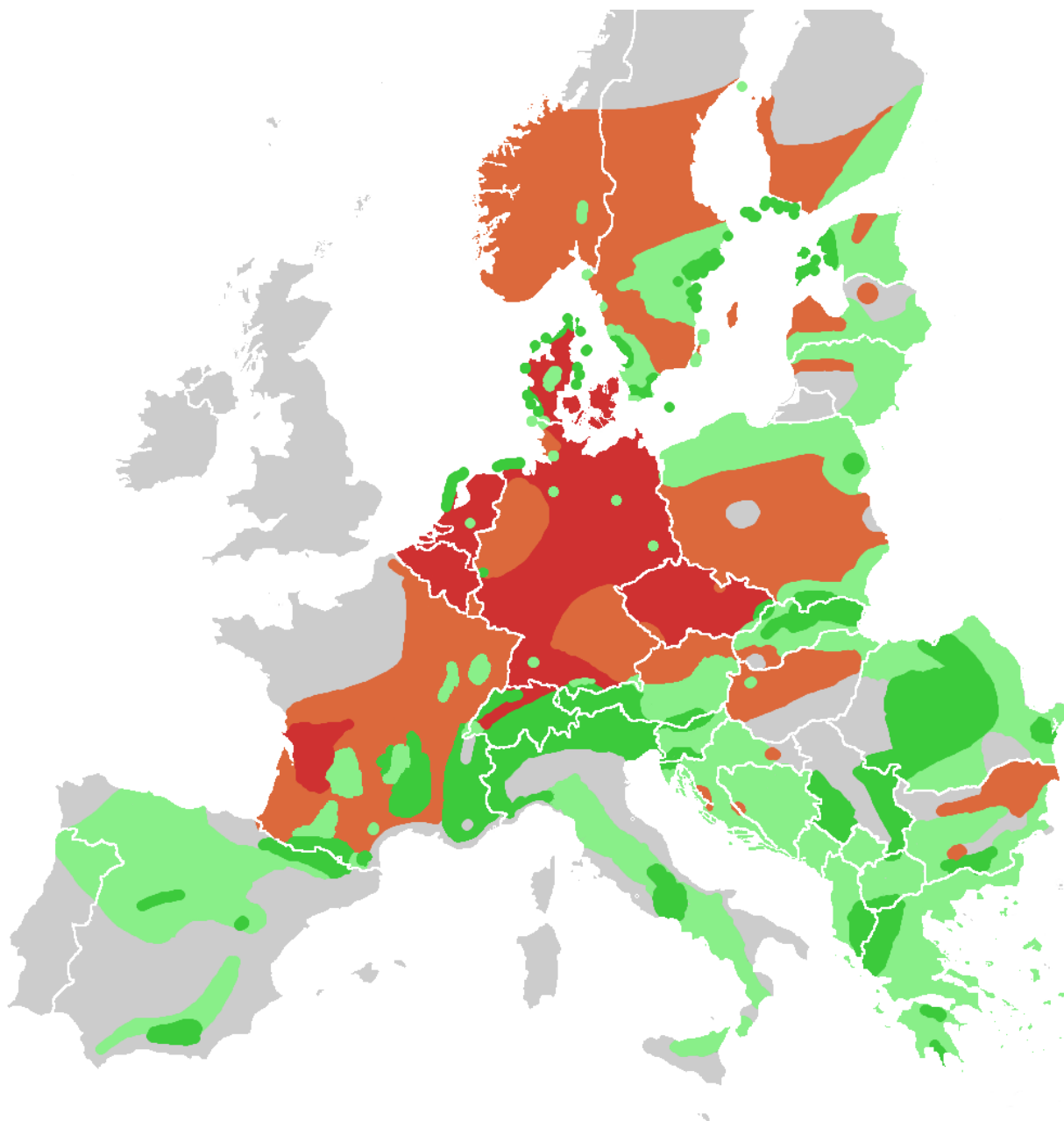
Podél východního pobřeží Severního moře a okolo Baltu je považován za ohrožený druh, ale lokálně početné populace se zde nachází na samotném pobřeží (nejčastěji do několika set metrů od moře na písčíných dunách). Zajímavostí jsou zmínky o dálkových

přeletech Baltského moře na ostrov Gotland a dokonce na severně položený ostrůvek Fjäderägg, obojí zřejmě z Finska (Eliasson 2012).

Naproti tomu na velké většině Česka, Německa, Belgie, Nizozemí, Dánska, Norska a Švédska se prokazatelně dříve *A. niobe* vyskytoval, ale v různých obdobích 20. a 21. století vymizel. Stejně tak i na Švýcarské plošině (nížinná část Švýcarska) existují historické záznamy, ale nyní se vyskytuje pouze v okolních pohořích (Alpy, Jura).

Výjimečná je přežívající populace v okolí Cách na belgicko-německém pomezí, s největší lokalitou u města Stolberg. *A. niobe* zde obsazuje především bývalé důlní výsypky s vysokou koncentrací těžkých kovů.

Získané údaje jsou načrtnuty v Obr. 3 a veškeré zdroje informací shrnují v Příloze 1.



Obr. 3: Náčrt aktuálních znalostí o stavu rozšíření *A. niobe* v Evropě. Tmavě zelená – početné populace; světle zelená – současné záznamy řídké a/nebo nepotvrzené; červená – prokazatelný historický výskyt, v současnosti vyhynulý; oranžová – pravděpodobně vyhynulý, ale historické a/nebo současné informace nejisté.

Analýza existujících genetických dat

Celkem se mi podařilo stáhnout sekvence COI z 147 unikátních jedinců podrodu *Fabriciana* z mnoha oblastí jejich výskytu, viz Tab. I. Všechny byly k dispozici v BOLD a 85 z nich i v GenBanku. Z nich bylo 39 označených jako *A. adippe*, 3 jako *A. kamala*, 3 jako *A. nerippe* (syn. *A. coreana*), 36 jako *A. niobe* a 65 bylo určeno pouze do řádu jako Lepidoptera. Podle přiložených fotografií se nám podařilo přesně identifikovat 56 z nich.

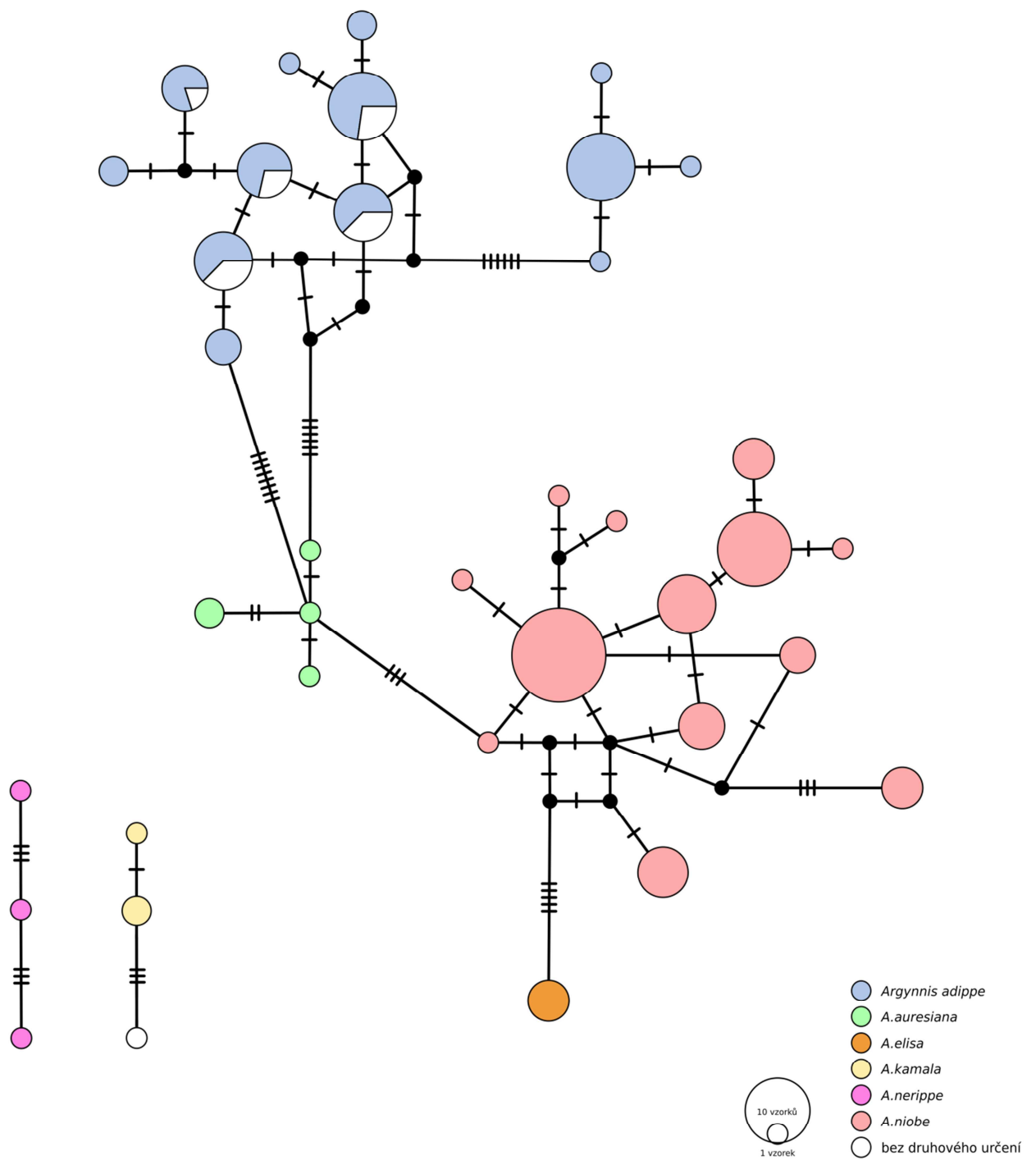
Při analýze všech stažených sekvencí jsem získal alignment o 147 sekvencích dlouhý 523 bazí, který neobsahoval žádné mezery ani chybějící data. TCS s 95 % limitem propojení sekvence rozdělil do tří sítí (Obr. 4). Jedna malá síť o třech haplotypech odpovídá *A. kamala*, druhá stejně velká *A. nerippe*. Zbylé sekvence, odpovídající *A. adippe*, *A. auresiana*, *A. elisa* a *A. niobe* byly shrnuty do jedné sítě.

Výsledky jednotlivých metod se v detailech lišily, a to i výsledky programu TCS 1.21 a metody TCS implementované v programu PopART. Tyto odlišnosti ale nikdy neměly vliv na interpretaci výsledků.

Sekvence *A. adippe* a většiny morfologicky neurčených jedinců tvoří v rámci velké sítě jednu jasně definovanou skupinu haplotypů. V rámci ní je jen slabá geografická struktura, pouze některé haplotypy mají omezený výskyt a i jedinci z velmi vzdálených míst často mají stejné haplotypy; výjimkou jsou jen jedinci z většiny Pyrenejského ostrova (jižně od samotných Pyrenejí), kteří se odlišují osmi bodovými mutacemi (geografický původ vzorků zde graficky neznázorněn).

Sekvence s genbankovým číslem DQ922851, která je v původní publikaci (Simonsen *et al.* 2006) popsána jako *A. niobe* pocházející z Dánska, náleží jednomu z běžných haplotypů *A. adippe*. Jedná se zřejmě o záměnu vzorků ze strany autorů, protože na stránkách jejich výzkumné skupiny (<http://www.nymphalidae.net/story.php?code=TS-13&search=57442>) je motýl popsán jako *A. adippe* ze španělských Pyrenejí, čemuž odpovídá i přiložená fotografie.

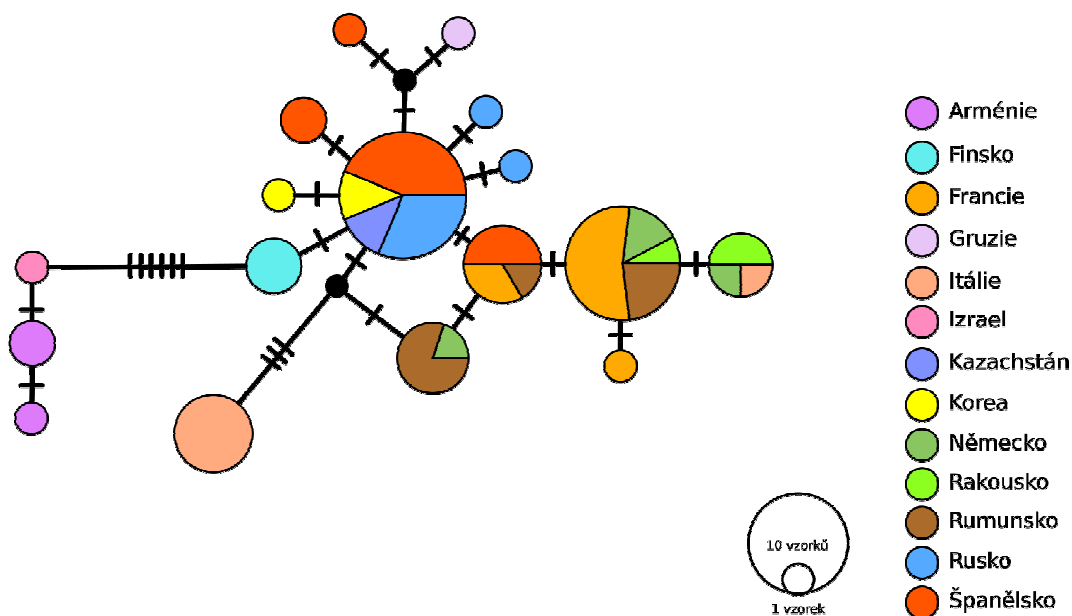
A. auresiana, *A. elisa* a *A. niobe* tvoří druhou skupinu. *A. auresiana* sdílí některé mutace i s *A. adippe*, proto se v síti zobrazuje mezi *A. adippe* a *A. niobe*. *A. elisa* zapadá přímo mezi sekvence *A. niobe*, ale je od nich oddělena sedmi mutacemi. Všech 69 sekvencí z *A. niobe* kromě výše popsaného DQ922851 tvoří jednu kompaktní podskupinu.



Obr. 4: TCS síť 148 sekvencí podr. *Fabriciana*.

Do nového alignmentu bylo vybráno 65 z nich, což mi umožnilo dosáhnout délky 612 bazí a tím lepšího rozlišení při konstrukci haplotypové sítě. Výsledné grafy se opět lišily v detailech, pro ilustraci uvádím dvojici nejrozdílnějších, tj. graf podle metody TCS 1.21 (Obr. 4) a podle IntNJ (Příloha 5). Obě TCS analýzy daly v tomto případě identický výsledek.

Geografická struktura není v těchto sítích příliš výrazná, ale můžeme pozorovat, že některé haplotypy se vyskytují jen v omezeném území, např. italský, finský nebo alpský. Nejvýraznější rozdíl od zbytku sekvencí mají sekvence z Arménie a z Izraele, které se liší šesti mutacemi od finského haplotypu (Obr. 5), a sedmi mutacemi od italského haplotypu, jednoho ze španělských haplotypů a jednoho velmi rozšířeného haplotypu (Příloha 5). Dva arménské a jeden izraelský haplotyp se naopak značně liší od jediné sekvence z Gruzie v této analýze. Druhé nejvýraznější oddělení je rozdíl čtyř mutací mezi italským haplotypem a několika dalšími. Italský haplotyp, společně s jednou sekvencí z Ruska, je neblíže k sekvencím *A. elisa* v Obr. 4.



Obr. 5: TCS síť 65 sekvencí *A. niobe*.

Analýza mikrosatelitů

Z 845 vzorků se mi u 828 podařilo určit genotyp na alespoň 4 z 6 lokusů, u 703 vzorků jsem určil genotyp na všech 6 lokusech. Základní charakteristiky pro jednotlivé populace jsem shrnul do Tab. I. Z dobře zastoupených populací mají nejmenší genetickou diverzitu (A_R a H_e) populace z Německa, přičemž ta z rezervace Schlangenberglu u Stolbergu v Severním Porýní-Vestfálsku měla v obou případech nižší hodnoty ($A_R = 2,82$ a $H_e = 0,33$). Ostatní populace dosáhly značně vyšších hodnot, vzájemně relativně podobných (A_R mezi 4,65 a 6,88; H_e mezi 0,46 a 0,57). Většina populací nebyla v H-W rovnováze.

AMOVA v obou případech ukázala na silně průkazné, ale relativně malé rozdíly mezi populacemi uvnitř skupin (4,54 % variability; $F_{sc} = 0,05$; $p < 0,001$ v prvním datasetu a 1,48 % variability; $F_{sc} = 0,02$; $p < 0,001$ v druhém datasetu), a na větší rozdíly mezi jednotlivými skupinami lokalit (5,49 % variability; $F_{st} = 0,10$; $p < 0,001$ v prvním datasetu a 5,09 % variability; $F_{st} = 0,06$; $p < 0,001$ v druhém datasetu).

Mantelův test ukázal na silně průkaznou IBD ($p < 0,0001$), a to v obou případech (párové F_{st} mezi populacemi na datasetu včetně německých vzorků i bez nich), viz Obr. 6.

Výsledné uspořádání klastrů odhadnutých programem STRUCTURE naznačovalo hierarchické uspořádání populací. Jako první oddělila analýza vzorky z Balkánu a Asie, následně dvě německé populace, poté vzorky z Česka a Slovenska; při vyšších k byly rozpoznatelné jako oddělené jednotky např. arménská, afgánská, estonská, rumunská nebo stolberská populace (Obr. 7 a Příloha 7).

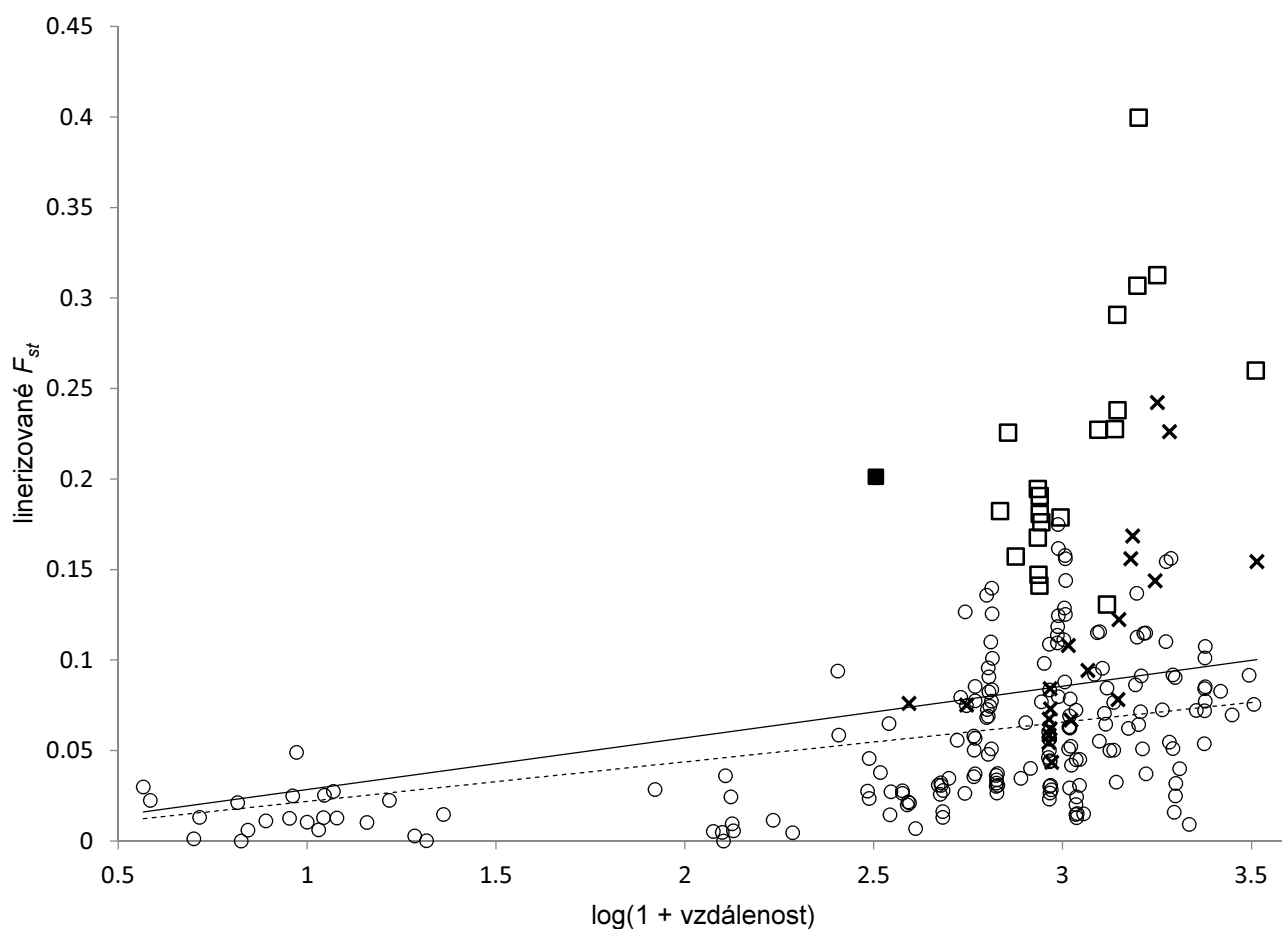
Metoda určení nejvhodnějšího k dle Evanna et al. (2012) v obou případech ukázala na $k = 2$, tedy rozdělení vzorků na severní a jižní skupinu (Příloha 6). Druhé nejvyšší skóre bylo pro $k = 4$ u datasetu s velkými populacemi a pro $k = 5$ u datasetu se všemi vzorky. Hodnoty neupraveného likelihoodu byly podobné u několika po sobě jdoucích k a měly velké směrodatné odchylky, takže nebylo možné spolehlivě určit, kde se nachází jejich peak (původní metoda určení nejvhodnějšího k , (Pritchard et al. 2000)). Nejvyšší byly v rozpětí 4 až 8 a 4 až 10 (Příloha 6).

Tab. I: Základní genetické charakteristiky populací vypočtené v programu SPAGeDI. N , počet vzorků zahrnutých do analýzy; chybějící data vyjádřená v procentu chybějících genových kopií (např. plně genotypovaný jedinec má pro 6 lokusů celkem 12 genových kopií); N_A , průměrný počet alel na jeden lokus; A_R , mezilokusový průměr rarefektovaných počtů alel pro 30 genových kopií (tzn. předpokládaný počet alel, pokud by bylo analyzováno 15 plně genotypovaných jedinců; míra alelické diverzity); H_e , očekávaná heterozygosita při H-W rovnováze, čili genová diverzita; H_o , pozorovaná heterozygosita; F_i , koeficient inbreedingu; P , signifikance permutačního testu H-W rovnováhy. Šedě jsou zvýrazněny hlavní skupiny lokalit, jejich součástí jsou na bílém pozadí.

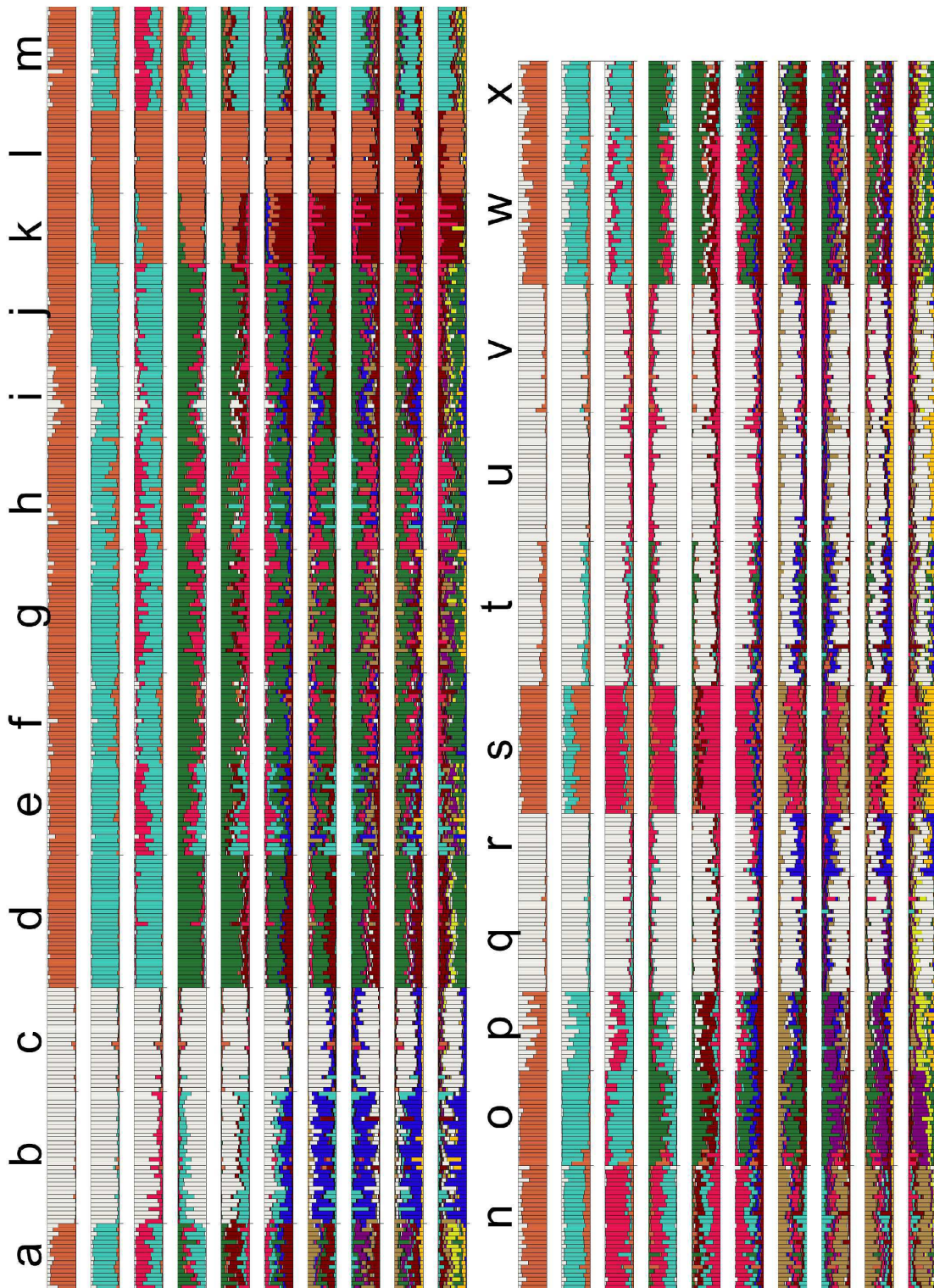
Analyzovaný soubor	N	Chybějící data	N_A	A_R	H_e	H_o	F_i	P
Všechny vzorky	828	2,9%	22,83	6,82	0,55	0,38	0,30	<0,001
Afghánistán	7	28,6%	2,17					
Arménie	32	5,2%	6,67	5,41	0,49	0,31	0,37	<0,001
Alpy	16	1,0%	5,33	5,18	0,46	0,32	0,30	<0,001
<i>Rakousko (Tyrolsko)</i>	8	0,0%	3,50					
<i>Švýcarsko</i>	6	2,8%	3,67					
<i>Itálie (Lombardie)</i>	1	0,0%	1,50					
<i>Itálie (Trentino)</i>	1	0,0%	1,17					
Bosna a Hercegovina	1	0,0%	1,83					
Bulharská Dobruža	1	0,0%	1,33					
Bulharsko (jih země)	34	1,5%	8,67	6,31	0,51	0,43	0,16	<0,001
<i>obl, Haskovo</i>	25	1,3%	7,50	6,23	0,51	0,43	0,16	<0,01
<i>obl, Karadžali</i>	7	0,0%	3,83					
<i>Hvoyna</i>	1	0,0%	1,83					
<i>Trigrad</i>	1	16,7%						
Bulharsko (Zemen)	1	0,0%	1,50					
Česko (Valašsko)	211	2,1%	13,50	6,35	0,52	0,38	0,27	<0,001
<i>Březitá</i>	9	0,0%	3,67					
<i>Bzové</i>	32	2,1%	6,50	5,53	0,55	0,45	0,19	<0,001
<i>Černé</i>	9	1,9%	4,33					
<i>Dinotice</i>	22	1,5%	6,83	6,03	0,51	0,35	0,33	<0,001
<i>Kobylská</i>	22	4,5%	6,83	6,31	0,52	0,42	0,21	<0,001
<i>Losový</i>	30	1,1%	7,00	5,88	0,52	0,34	0,36	<0,001
<i>Lušová</i>	27	0,0%	7,50	5,94	0,48	0,43	0,11	<0,05
<i>Podťaté</i>	17	2,9%	6,17					
<i>Vranča</i>	25	4,0%	6,33	5,61	0,51	0,35	0,32	<0,001
<i>Severní Valašsko</i>	14	1,2%	4,83					
<i>Sidonie</i>	4	4,2%	3,50					
Česko (historické vz.)	34	9,8%	6,67	5,80	0,50	0,36	0,30	<0,001
<i>Jihočeský kr,</i>	13	14,1%	4,17					
<i>Jihomoravský kr,</i>	4	12,5%	2,00					
<i>Královehradecký kr,</i>	5	10,0%	2,83					
<i>Moravskoslezský kr,</i>	3	0,0%	2,67					
<i>Olomoucký kr,</i>	1	0,0%	1,50					

Analyzovaný soubor	N	Chybějící data	N _A	A _R	H _e	H _o	F _i	P
<i>Středočeský kr,</i>	6	8,3%	3,17					
<i>Ústecký kr,</i>	1	0,0%	1,33					
<i>Vysočina</i>	1	0,0%	1,33					
Německo (Fríské ostrovy)	17	2,9%	3,17	3,16	0,39	0,18	0,54	<0,001
Německo (Stolberg)	20	0,0%	3,00	2,82	0,33	0,33	0,00	NS
Dánsko (Bornholm)	25	0,0%	5,83	5,28	0,51	0,45	0,11	<0,05
Dánsko (Aarhus)	30	2,8%	6,50	5,38	0,49	0,43	0,12	<0,05
Estonsko (Harju)	3	0,0%	2,67					
Estonsko (Saaremaa)	24	0,7%	7,00	6,21	0,56	0,45	0,21	<0,001
Španělsko (Andalusie)	10	6,7%	3,67					
Španělsko (střed)	11	1,5%	4,33					
Španělsko (Pyreneje)	7	2,4%	3,17					
Finsko	1	0,0%	1,67					
Francie	20	0,8%	6,83	6,01	0,55	0,34	0,39	<0,001
<i>Isère</i>	1	0,0%	1,17					
<i>jihovýchod</i>	19	0,9%	6,50	5,83	0,55	0,35	0,36	<0,001
Řecko (Peloponés)	6	0,0%	3,33					
<i>Lakónie</i>	2	0,0%	2,17					
<i>Chelmos</i>	4	0,0%	2,50					
Řecko-makedonské příhraničí	43	0,0%	9,50	6,15	0,51	0,38	0,26	<0,001
<i>Řecko (Epirus)</i>	2	0,0%	2,00					
<i>Řecko (Západní Makedonie)</i>	26	0,0%	7,33	5,79	0,50	0,41	0,18	<0,001
<i>Makedonie</i>	15	0,0%	5,33	5,33	0,49	0,32	0,35	<0,001
Chorvatsko (Primorje)	6	0,0%	3,67					
Chorvatsko (Split)	6	2,8%	3,17					
Indie	1	0,0%	1,00					
Itálie (Kalábrie)	2	0,0%	2,00					
Kyrgyzstán	1	0,0%	1,67					
Polsko	3	5,6%	2,17					
Rumunsko (Panonie)	37	1,4%	6,33	4,90	0,49	0,34	0,31	<0,001
<i>Kluž</i>	2	0,0%	2,33					
<i>Alba</i>	35	1,4%	5,67	4,65	0,49	0,34	0,32	<0,001
Rumunsko (Harghita)	3	11,1%	2,17					
Rumunsko (Maramureš)	2	0,0%	2,17					
Rumunsko (Tulcea)	3	0,0%	2,50					
Rumunsko-Srbské příhraničí	71	1,4%	11,67	6,12	0,50	0,38	0,25	<0,001
<i>Rumunsko (Caraș-Severin)</i>	1	0,0%	1,33					
<i>Rumunsko (Mehedinți)</i>	8	2,1%	3,83					
<i>Srbsko (Hora Stol)</i>	31	1,1%	7,50	5,84	0,49	0,41	0,16	<0,01
<i>Srbsko (Žagubica)</i>	31	1,6%	7,83	5,97	0,52	0,39	0,24	<0,001
Srbsko (Povlen)	35	1,9%	9,00	6,67	0,56	0,42	0,25	<0,001
Rusko (Burjatsko)	2	0,0%	2,17					
Rusko (Karačajevsko-Čerkesko)	2	0,0%	2,00					
Střední Slovensko a okolí	80	6,9%	11,83	6,88	0,57	0,41	0,27	<0,001
<i>Maďarsko (Teresztenye)</i>	1	0,0%	1,50					
<i>Slovensko (Bánskobystrický kr.)</i>	36	0,0%	9,67	6,70	0,57	0,44	0,23	<0,001

Analyzovaný soubor	N	Chybějící data	N_A	A_R	H_e	H_o	F_i	P
<i>Slovensko (Košický kr.)</i>	6	27,8%						
<i>Slovensko (Prešovský kr.)</i>	13	23,1%	4,50					
<i>Slovensko (Trenčianský kr.)</i>	5	6,7%	3,67					
<i>Slovensko (Žilinský kr.)</i>	20	3,3%	5,50	5,34	0,48	0,32	0,34	<0,001
Slovensko (Vihorlat)	1	16,7%						
Slovensko (západ)	18	4,6%	5,17	5,08	0,55	0,35	0,38	<0,001
<i>Slovensko (Bratislavský kr.)</i>	13	3,8%	4,33					
<i>Slovensko (Tranvský kr.)</i>	5	6,7%	3,00					
Jugoslávie	1	33,3%						

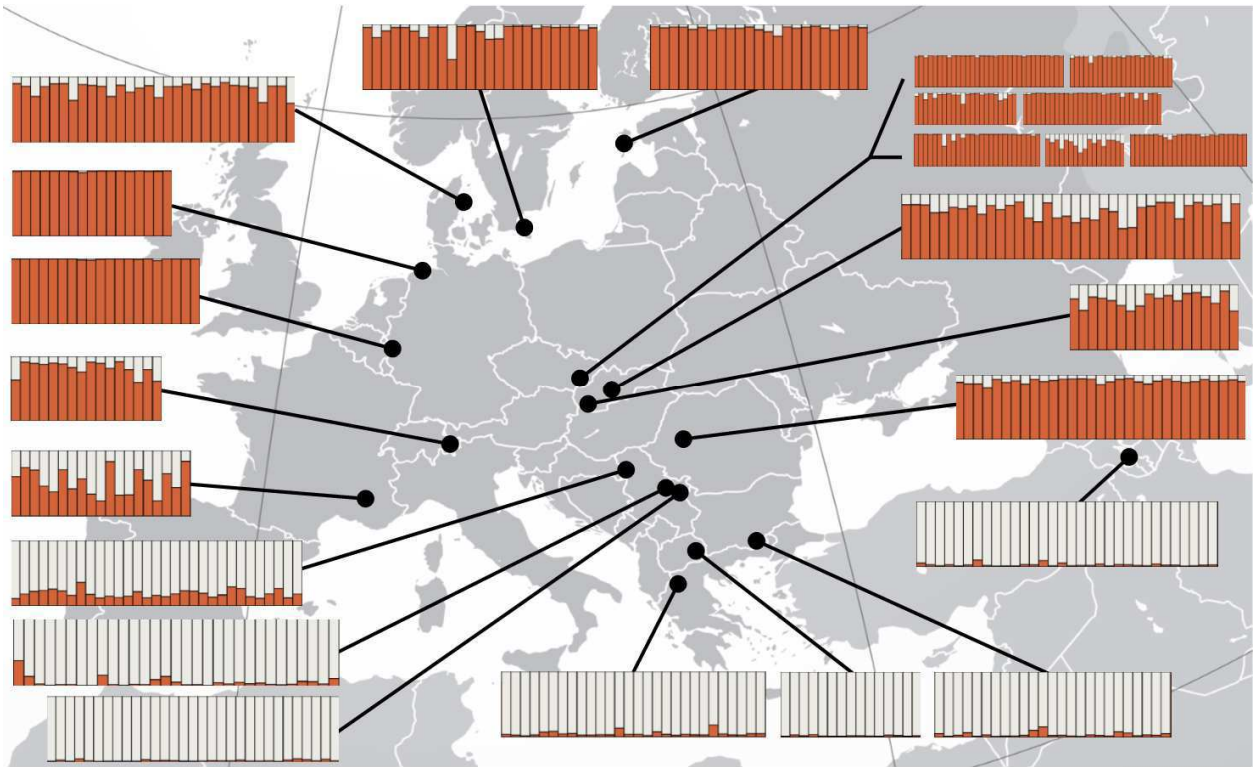


Obr. 6: Závislost genetické vzdálenosti vyjádřené jako linearizované F_{st} na geografické vzdálenosti, logaritmičsky transformované. ■ vzdálenosti mezi populací u Stolbergu a Frískými ostrovy; □ vzdálenosti mezi Stolbergem a ostatními populacemi; × vzdálenosti mezi Frískými ostrovy a ostatními; ○ vzájemné vzdálenosti ostatních populací. Plná čára – ilustrační přímka lineární regrese pro celý dataset; přerušovaná čára – ilustrační přímka lineární regrese pro dataset bez obou německých populací (průsečíky s osou y nastaven na 0).

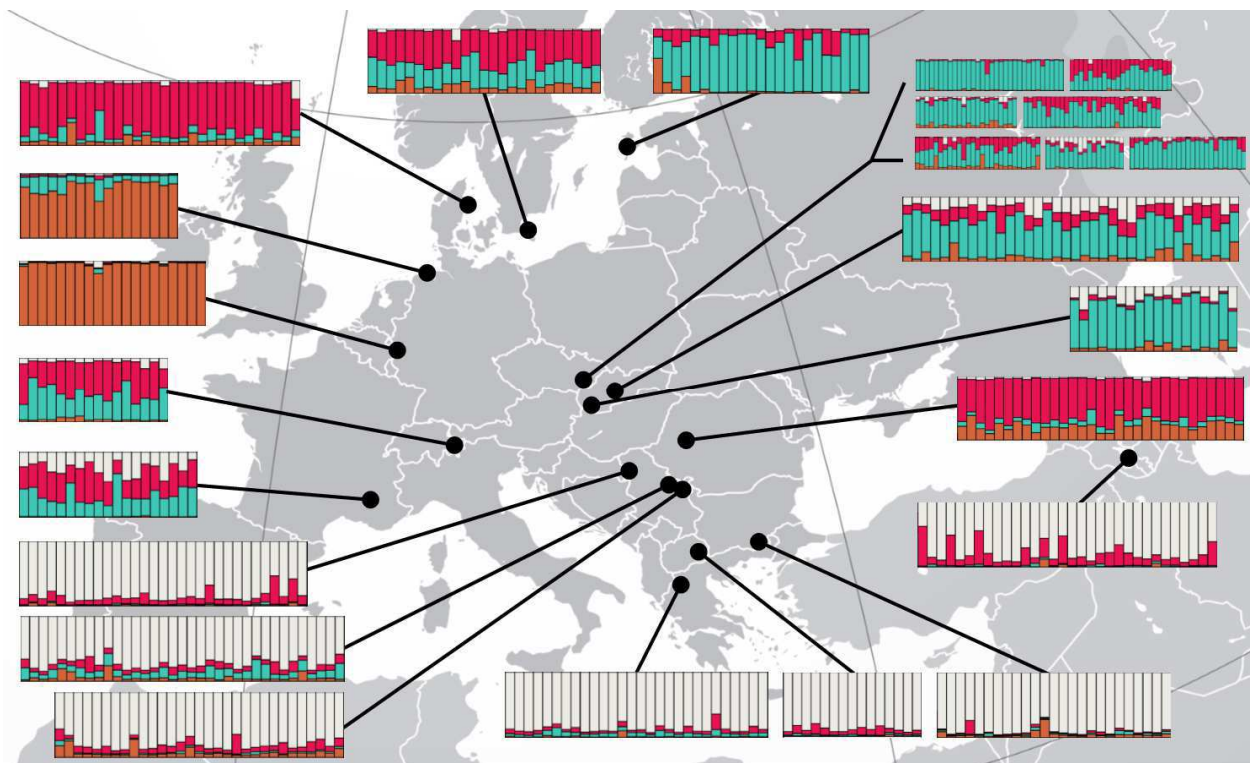


Obr. 7 Výsledky analýzy Structure pro velké populace. a – Alpy, b – Arménie, c – Bulharsko, d – Bzové, e – Dinotice, f – Kobylská, g – Losový, h - Lušová, i – Podťaté, j – Vranča, k – Frísko, l – Stolberg, m – Bornholm, n – Aarhus, o – Estonsko, p – Francie, q – Řecko, r – Makedonie, s – Rumunsko, t – Povlen, u – Stol, v – Žagubica, w - Stř. Slovensko, x - Záp. Slovensko

a)



b)



Obr. 8: Výsledky STRUCTURE pro velké populace promítnuté na mapu

Diskuse

Syntéza údajů o rozšíření

Druh je rozšířen od Pyrenejského poloostrova až po Koreu a Japonsko. Zatímco autorům z východní Asie je tento druh dobře známý (Fujioka 2002, Tuzov 2003, Lang & Wang 2010, Han *et al.* 2014), evropští autoři kladou často východní hranici rozšíření do oblasti Altaje (cf. Tuzov 2000, Beneš & Konvička 2002, Tuzov 2003, Tolman 2008, Eliasson 2012). Možná se jedná ze strany evropských vědců o konzervativní odhad, nezahrnující východnější populace vzhledem k předpokládané složité taxonomické situaci a zároveň dosavadní absenci genetických dat. Moje analýza korejských sekvencí ale ukazuje, že *A. niobe* tvoří kompaktní genetickou jednotku v celém Palearktu a dává asijským autorům za pravdu.

V Evropě motýl pravděpodobně vyhynul ve velké většině vnitrozemských nížinných oblastí na sever a západ od Alp a na jih od pobřeží Severního a Baltského moře. Tento alarmující stav nebyl dosud v literatuře shrnut, přestože místním entomologům je situace v mnoha regionech známá. Časová osa tohoto vymírání je v různých oblastech různá a zpravidla jen obtížně z dat odvoditelná. Např. zatímco v severských zemích se už od počátku 20. stol. dá z literatury usuzovat na jeho úbytek (Eliasson 2012), v hlavních oblastech výskytu v Čechách byl pravidelně nalézán ještě na přelomu 20. a 21. stol. (Entomologický ústav BC AV ČR 2015).

Vymizení z vnitrozemských nížin by mohlo naznačovat, že druh např. vlivem globálního oteplování ustupuje do vyšších nadmořských výšek. Tomu ale odporuje několik faktů. Předně, i v teplé jihovýchodní Evropě se dá nalézt na relativně nízko položených lokalitách (Makedonie, severní Řecko, Bulharsko). Dále mj. ve Skandinávii ustupuje od severu k jihu, pozorujeme tedy celkovou kontrakci areálu, nikoli jeho posun. Také na regionální škále je vidět, že ústup nesouvisí přímo s průměrnou teplotou, např. v Čechách mezi tradiční místa výskytu patřila Šumava a okolí, kde už vyhynul, zatímco v podhorských xerothermních lokalitách na JV Moravě se vyskytuje dodnes. Stejně tak v Německu vyhynul v hercynských pohořích, ale přežil v okolí Cách a na několika dalších nízko položených místech. Ani mikro- a mesohabitatové nároky druhu tomu neodpovídají – v krajíně vyhledává vždy ta nejteplejší místa.

Ze současného pohledu má druh v Evropě dvě zdánlivá „ekologická optima“. Přímořské, kde se vyskytuje především v písčných oblastech (viz např. nizozemský druhový název *Duinparelmoervlinder*, odkazující na jeho život na písčných dunách) a

horské ve vysokých pohořích. Zajímavá jsou místa ve vnitrozemí, kde dodnes přežil i pod 400 m n. m.: mimo Balkánský poloostrov se jedná bez výjimky o místa silně připomínající pobřežní duny (důlní krajina v Německu a váté písky v Německu a na Slovensku).

To by se dalo vysvětlit tím, že by dosud byla přehlížena diferenciace na nížinnou a horskou genetickou linii, přičemž nížinná by byla silně přizpůsobena životu na pohyblivém písku nebo podobných substrátech. Vymizení tohoto biotopu z moderní krajiny, které je dobře zdokumentované (např. Tropek & Řehounek 2012), by způsobilo omezení jejího výskytu. Horská linie by tím zůstala nedotčena. Výsledky genetických analýz (Obr. 8. Příloha 4) tomu ovšem neodpovídají. Nížinné populace v Dánsku, v Estonsku a na Slovensku tvoří oddělenou skupinu od středoevropských pohoří.

V jihovýchodní Evropě se v nížinách vyskytuje i v zemědělské krajině, ale na všech potvrzených lokalitách i v jejich širokém okolí je velký podíl obnažené půdy mimo pole (pěšiny, snosy kamenů, vypasená místa) v porovnání se současnou situací v Německu nebo Česku. Historické letecké snímky lokalit, kde byly odchyceni motýli získaní z českých muzeí (dostupné na kontaminace.cenia.cz), stejně jako další historické fotografie a malby, ukazují, že ještě před několika desetiletími byla česká krajina v tomto aspektu totožná s dnešním Balkánem. Tím lze dobře vysvětlit dřívější plošné rozšíření druhu ve střední Evropě.

A. niobe byl sice zřejmě již od vymizení přirozených činitelů blokujících nebo dynamicky obnovujících sukcesí (velcí býložravci, rozsáhlé požáry, klimatické extrémy zabraňující růstu stromů v glaciálech) do značné míry závislý na činnosti člověka, zejména na pastevectví. Je ale zajímavé, že v dnešní střední, západní a severní Evropě přežil často na lokalitách, které jsou člověkem ovlivněna velmi intenzivně, zejména ve vojenských výcvikových prostorech (např. západní Slovensko, východní Německo, několik v Dánsku, Švédsku, Nizozemsku; také poslední populace v jižních Čechách a na střední Moravě, které ale již obě zanikly), a v důlní krajině (okolí Stolbergu a Boxbergu, Německo).

Analýza sekvencí – mezidruhová úroveň

Haplotypová síť (Obr. 4) ukazuje, že sekvence jednotlivých druhů tvoří kompaktní genetické jednotky, ale současně odhaluje několik nesouladů s tradiční taxonomií a morfologickými daty.

Himalájský *A. kamala* a východoasijský *A. nerippe* jsou relativně vzdáleni ostatním druhům v analýze. Zdá se to logické z hlediska biogeografie, naznačovalo by to původ

podrodu ve střední nebo východní Asii, kde je také největší druhová diverzita, a následné rozšíření do Evropy a severní Afriky.

Tomu by odpovídal „polyfyletický“ původ severoafrického *A. auresiana*, naznačený s určitou podporou ve fylogenetickém stromě (Příloha 8) a kruhovým uspořádáním v haplotypové síti (Obr. 4), který by se dal vysvětlit zachováním určitého ancestrálního polymorfismu, který by byl při tomto scénáři pravděpodobný. Mnohem spíš je ale tento jev způsoben nedostatečnou délkou úseku použitého v analýze, kvůli které i jedna bodová mutace, která se náhodou vyskytla nezávisle u *A. auresiana* a *A. adippe*, měla vliv na výsledky. Není možné odvodit víc, než že *A. auresiana* je geneticky velmi blízký *A. adippe*, *A. niobe* a *A. elisa*.

Druhým nesouladem s tradiční taxonomií je, že sekvence korsicko-sardinského *A. elisa* (tvořící jeden haplotyp) ve všech analýzách zapadají mezi sekvence *A. niobe*. Zde se nabízí srovnání s novou studií komplexu středomořských okáčů r. *Maniola* (Kreuzinger *et al.* 2015), u kterých vyšlo najevo, že mnoho ostrovních druhů ve skutečnosti spadá do variability běžného *M. jurtina* a jejich druhový status tím byl zpochybněn.

Na takto konkrétní závěry neobsahují databáze dostatek dat, navíc mitochondriální DNA může mít značně odlišné chování od zbytku genomu (např. Kodandaramaiah *et al.* 2013), ale z mojí analýzy jasně vyplývá, že tato skupina druhů vyžaduje taxonomicko-fylogenetickou revizi. Simonsenova (2006) morfometrická analýza se navíc s mými genetickými daty navíc neshoduje v téměř žádném z popsaných detailů. Podle jeho dat tvoří zde zastoupené druhy hřebenový strom, ve kterém se nejdříve odvětvuje *A. kamala*, následovaný postupně *A. auresiana*, *A. niobe*, *A. elisa* a *A. adippe*, který by měl být sesterský *A. nerippe*. Z biogeografického hlediska je to složitější hypotéza, ale zároveň není a priori nijak vyloučená.

Shrnutí sekvencí čtyř druhů do jedné TCS sítě není neobvyklé, protože se jedná o značně konzervativní metodu detekce diference, která přibližně v polovině případů nedokáže blízké příbuzné druhy oddělit (Hart & Sunday 2007), což přesně odpovídá mým výsledkům.

Analýza sekvencí – vnitrodruhová úroveň

Pro tuto práci je nejdůležitější, že *A. niobe* tvoří geneticky kompaktní jednotku (pomineme-li jeho možný parafyletický status vzhledem k *A. elisa*), na rozdíl od až 28% ostatních tradičně uznávaných evropských druhů motýlů, u kterých COI naznačuje vnitrodruhové rozštěpení na dvě nebo více linií (Dincă *et al.* 2015). Je dokonce

homogennější, než velká většina motýlů. Podobné haplotypové sítě přes celý kontinent najdeme jen u tažných, ekologicky nesespecializovaných motýlů, jako jsou babočky *Aglais urticae* (Vandewoestijne *et al.* 2004), *Polygonia c-album* (Kodandaramaiah *et al.* 2011) a *Polygonia faunus* (Kodandaramaiah *et al.* 2012b), modrásek *Lampides boeticus* (Lohman *et al.* 2008), nebo u některých amerických motýlů z ruderálních stanovišť (Runquist *et al.* 2012). Z habitatových specialistů jsou známy podobné výsledky – haplotypy COI promísené v rámci celé Eurasie – u vysokohorského jasoně *Parnassius phoebus* (Todisco *et al.* 2012). Ohrožený okáč světlých lesů *Lopinga achine* má sice v Eurasii také jen několik málo blízké příbuzných haplotypů, jejich geografická struktura je ale výraznější, než u *A. niobe* (Kodandaramaiah *et al.* 2012a).

Naopak ostatní habitatoví specialisté většinou tvoří mnohem strukturovanější genetické sítě. Dobrymi příklady jsou okáč *Erebia medusa* (Hammouti *et al.* 2010), ohniváček *Lycaena dispar* (Lai & Pullin 2004) a hnědásek *Melitea cinxia* (Wahlberg & Saccheri 2007), který se často s *A. niobe* vyskytuje na stejných lokalitách a jehož mitochondriální haplotypy jsou i v rámci Evropy extrémně diferencované.

V geologicky nedávné minulosti tedy musel *A. niobe* mít spojitou populaci přes celý Palearkt, nebo se do celé oblasti rychle rozšířit, a to pravděpodobně z Evropy směrem na východ (všechny asijské sekvence se liší maximálně jednou mutací od nejčastějšího haplotypu, rozšířeného od Španělska po Koreu). Stranou tohoto scénáře stojí Apeninský poloostrov a Blízký východ, kde podle by možná mohly být unikátní linie; pro podpoření této hypotézy by ale bylo potřeba více genetických dat z těchto oblastí.

U jasoně *Paranssius apollo*, který je také specialistou na ranně sukcesní biotopy, spekuluji Todisco *et al.* (2010), že se šířil na větší území v glaciálech, kdy by pro něj mohlo prostředí být paradoxně příznivější. Poslednímu glaciálu přisuzují vznik přibližně podobné variability, jakou vidíme u *A. niobe* (s tím rozdílem, že není rozložena do celého areálu, ale vzniká v několika regionech nezávisle). Vzhledem k tomu, že tzv. mamutí stepi by mohly nárokům *A. niobe* také odpovídat, je tedy možné uvažovat o šíření na východ společně se stepními biotopy právě v posledním glaciálu, nebo při jeho nástupu.

Bylo by vhodné do palety znalostí doplnit sekvence dalších genů, fylogenetické inference založené na jednom krátkém úseku, navíc s popsány specifickými problémy s interpretací, nemohou být v detailech spolehlivé (Smith *et al.* 2012, Toews & Brelford 2012, Kodandaramaiah *et al.* 2013, Patricelli *et al.* 2013, Ritter *et al.* 2013, Huemer *et al.* 2014). Tato analýza ale může posloužit jako více než dostatečný základ k informovanému naplánování rozsáhlejší fylogeografické studie.

Analýza mikrosatelitů

Genetická diverzita byla až na výjimky relativně velká ve všech populacích. Populace na hranici souvislého rozšíření (Česko, západní Slovensko) mají podobné ukazatele diverzity jako populace dále na jihovýchod, nezdá se tedy, že by problémy, kterým druh v poslední době čelí, byly způsobeny obecným nedostatkem genetické variability. České a slovenské populace také nijak nevybočují hodnotami genetické diferenciace, nejsou dlouhodobě izolovány od ostatních.

Výjimkami jsou obě zkoumané populace ze západního Německa, které jsou značně geneticky ochuzené (Tab. I) a (patně díky tomu) vykazovaly největší hodnoty diferenciace od ostatních z celého datasetu (Příloha 3). Dosavadní přežívání i v izolaci na obou místech zřejmě umožňuje mimořádně příznivá kombinace vlastností místních habitatů.

Rezervace Schlangenberg u Stolbergu, kde je diverzita vůbec nejmenší, je pozůstatkem po starých dolech na zinek a měď, kvůli kterým je půda natolik nasycena těžkými kovy, že zde většina běžných rostlin nemůže růst. Důsledkem jsou častá místa bez vegetačního pokryvu, ideální pro vývoj housenek *A. niobe*. Ta jsou navíc obklopena jeho místní živnou rostlinou, těžké kovy tolerující, místně endemickou *Viola calaminaria*. Salz & Fartmann (2012) uvádí pokryvnost violek na místech vyhledávaných *A. niobe* na průměrně 10 %, což zhruba odpovídá mému pozorování na místě. Na žádné z ostatních lokalit, které jsem navštívil, nebyly violky na první pohled ve vegetaci vůbec patrné, a bližším průzkumu provedeném na několika lokalitách nikdy zdaleka nedosahovaly 1 % pokryvnosti (data neukázána).

Druhou z těchto populací jsou Východofríské ostrovy. Moje vzorky pochází z několika různých ostrovů, což pro populačně genetický výzkum není ideální, protože hrozí, že bych vnitropopulační diverzitu nadhodnotil zahrnutím více oddělených populací. Populace se ale naopak ukazuje jako druhá geneticky nejchudší. Také se zdá, že mořská hladina není pro *A. niobe* nepřekonatelná bariéra, viz hodnoty diferenciace Bornholmu od ostatních lokalit (Příloha 3) a zmínky o dálkových výsadcích na další ostrovy v Baltu (Eliasson 2012). I na Východofríských ostrovech je velké množství odhaleného substrátu (písku) a vysoká pokryvnost violek, průměrně 5 % na místech výskytu *A. niobe* (Salz & Fartmann 2009; pozn.: tuto oblast jsem nenavštívil, vzorky v analýzách pochází od C. Heineckeho z dolnosaské pobočky NABU).

Interpretace odchylek od H-W rovnováhy je obtížná, protože se v markerech vyskytují nulové alely (podrobnosti viz Zima *et al.* 2013). Stejně tak ukazatele genetické diverzity mohou být nulovými alelami ovlivněny, ale je-li jejich frekvence v populacích

podobná, nebude zkruseno porovnáni mezi nimi, ale pouze na mezidruhové úrovni. Ostatní závěry by nulovými alelami neměly být příliš ovlivněny (Pritchard *et al.* 2000, Chapuis & Estoup 2007, CHAPUIS *et al.* 2008, cf. Chapuis *et al.* 2009, Excoffier & Lischer 2010).

Přestože AMOVA odhalila vysoce průkaznou populační strukturu v celoevropském pohledu, drtivá většina variability v datasetu se nachází uvnitř populací. Mezipopulační rozdíly jsou menší, než např. u modráska *P. arion* na úrovni pouze Polska nebo Itálie (Rutkowski *et al.* 2009, Sielezniew & Rutkowski 2012, Sielezniew *et al.* 2015) a mnohonásobně menší, než u modráska *Phengaris rebeli* v Polsku (Rutkowski *et al.* 2009), dále než u okáče *Erebia medusa* ve studiích pokrývajících různé části střední Evropy (Schmitt & Seitz 2001, Schmitt & Muller 2007, Schmitt *et al.* 2007, Besold & Schmitt 2015), či u okáčů *Erebia euryale* v Alpách (Schmitt & Haubrich 2008), *Erebia ottomana* a *E. cassoides* na Balkáně (Louy *et al.* 2014), u perletovce *Boloria aquilonaris* v Ardenách (Turlure *et al.* 2014) a mnohem menší než u ohniváčka *Lycaena helle* na evropské škále (Habel *et al.* 2010, Habel *et al.* 2011d).

Tento výsledek souhlasí se sice slabou, ale silně průkaznou IBD (genetická diferenciace mezi dvojicí lokalit tedy závisí na jejich geografické vzdálenosti). AMOVA i IBD podporují tezi o slabém, ale existujícím genovém toku mezi jednotlivými oblastmi v Evropě. Popřípadě jedná-li se o počínající diferenciaci některých z nich, musí být jen nedávného data.

I na základě výsledků programu STRUCTURE lze dojít k podobným závěrům. Lokality nacházející se blízko od sebe STRUCTURE neodděluje ani při vysokých k (viz balkánský nebo česko-slovenský klastr) a ukazuje tak na jejich úplnou genetickou homogenitu. Vzdálenější lokality (Německo, Rumunsko, Dánsko, Estonsko) se oddělují postupně, což může znamenat buď omezený genový tok mezi nimi, nebo relativně nedávnou izolaci.

Zatímco metoda Evanno *et al.* (2005) ukazuje, že nejvhodnější je použití $k = 2$, čili nejnižší možné, hierarchická struktura klastrů a geograficky omezený výskyt většiny z nich ukazují na konzistentní signál v datech i pro vyšší k . Navíc při změně parametrů výpočtu, např. jiném sdružení jedinců do populací, vypnutí lokalit jako priors apod., se hierarchie klastrů nezměnila, ale výpočetně odvozená hodnota nejvhodnějšího k ano (data neukázána).

Závěry, souvislosti a možné praktické důsledky

A. niobe se během posledního století v Evropě proměnil z plošně rozšířeného motýla běžné venkovské krajiny na zdánlivě striktního specialistu na dva druhy biotopu. Pravděpodobně se ale v takto krátké době nezměnil motýl, ale samotná evropská krajina (cf. Wells *et al.* 2015). Je to tedy svého druhu „uprchlický druh“, refugee species (Kerley *et al.* 2012).

Kvůli konfliktu nároků na larvální mikrohabitat a zároveň na zásobu nektaru pro dospělce prakticky nemůže dokončit svůj vývoj na jednoduše ploše jednoho biotopu, což vylučuje dlouhodobé přežití v moderní intenzivně zemědělsky nebo lesnický obdělávané krajině. Lokality, kde přežívá, jsou vždy značně heterogenní a na škále metrů, max. desítek metrů, se nachází jak živná rostlina v teplém mikrohabitatě (zpravidla na obnažené půdě), tak i velké množství zdrojů nektaru, a také keře, stromy nebo jiné možnosti úkrytu před nepříznivými povětrnostními podmínkami (Salz & Fartmann 2009, Spitzer *et al.* 2009b, Salz & Fartmann 2012, Leština *et al.* in prep., vlastní pozorování při sběru materiálu). To ho předurčuje k obývání pouze těch biologicky nejhodnotnějších míst v dnešní Evropě.

Pokud bychom proto uvažovali nad jeho použitím jakožto deštníkového druhu, nabízelo by se srovnání s druhem, který je takto již využíván, modráskem černoskvřným, *Phengaris arion* (Spitzer *et al.* 2009a, Casacci *et al.* 2011). Výzkum v České republice ukázal, že na lokalitách, kde se *P. arion* vyskytuje, se nalézají biologicky hodnotnější společenstva motýlů i rostlin (Spitzer *et al.* 2009a); v rámci této studie se ale také na téměř všech lokalitách, kde byl nalezen *P. arion*, vyskytoval i *A. niobe* a naopak. Doporučení *P. arion* jako deštníkového druhu lze tedy přímo vztáhnout i na *A. niobe*. Tyto druhy se liší především svými disperzními schopnostmi a od nich odvozenými makrohabitatovými nároky; zatímco *P. arion* je schopen přežít v izolovaných populacích po dlouhou dobu, *A. niobe* obývá širší krajinu jako celek. Ve své roli v ochraně biotopů by se tak mohli dobře doplňovat.

Přestože byl odborníky považován za motýla spíše sedentárního, vytvářejícího místní kolonie (Bink 1992, Eliasson 2012), tvoří *A. niobe* jednu kompaktní genetickou jednotku napříč celou Eurasií, a vzájemná diferenciace populací v Evropě odpovídá tomu, co u jiných dosud zkoumaných ohrožených motýlů nalézáme na mnohem menší, zpravidla regionální škále. V rámci např. jednotlivých pohoří je pak populační struktura prakticky nepřítomná a zpravidla nalézáme tzv. otevřené populace, které si zachovávají velmi daleko dosahující genetické spojení s ostatními, a tím zřejmě i stabilní genetickou diverzitu. (snad s výjimkou okáče skalního, se kterým sdílí řadu dalších znaků; Johannesen *et al.* 1997, Kadlec *et al.* 2010).

Pro jeho přežití má jen malý význam zřizování izolovaných maloplošných chráněných území. Možnou výjimku lze uznat u stanovišť s extrémně vhodnou kombinací ekologických a environmentálních faktorů (např. lokalita u Stolbergu, která se ale také ukázala jako nedostatečně velká). Na druhou stranu, zachování jednotlivých regionálních metapopulací, např. na úrovni jednotlivých států nebo pohoří, je velmi žádoucí. Mělo by být možné v nich druh udržovat dlouhodobě a je pravděpodobné, že by se tím ochránil určitý unikátní genetický materiál.

Seznam zdrojů

- Amos W, Balmford A. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity* 87: 257-65
- Andersen A, Simcox DJ, Thomas JA, Nash DR. 2014. Assessing reintroduction schemes by comparing genetic diversity of reintroduced and source populations: A case study of the globally threatened large blue butterfly (*Maculinea anion*). *Biological Conservation* 175: 34-41
- Anisimova M, Gascuel O. 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539-52
- Arif IA, Khan HA. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation* 32: 9
- Artdatabanken, ed. 2015. Artportalen. 16. 4. 2015 www.artportalen.se
- Artsdatabanken, ed. 2015. Artskart 1.6. 16. 4. 2015 <http://artskart.artsdatabanken.no/>
- Baguette M, Petit S, Queva F. 2000. Population spatial structure and migration of three butterfly species within the same habitat network: consequences for conservation. *Journal of Applied Ecology* 37: 100-08
2015. *Argynnis niobe* (Mittlerer Perlmutterfalter) Datum. <http://bemann.alfahosting.org/Argynnisniobe.htm>
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48
- Behura SK. 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology* 15: 3087-113
- Beneš J, Konvička M. 2002. *Motýli České republiky: Rozšíření a ochrana*. Praha: SOM
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Clark K, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW, eds. 2012. GenBank. 1. 4. 2015 <http://nar.oxfordjournals.org/content/40/D1/D48.abstract>
<http://nar.oxfordjournals.org/content/40/D1/D48.full.pdf>
- Besold J, Schmitt T, Tammaru T, Cassel-Lundhagen A. 2008. Strong genetic impoverishment from the centre of distribution in southern Europe to peripheral Baltic and isolated Scandinavian populations of the pearly heath butterfly. *Journal of Biogeography* 35: 2090-101
- Besold J, Schmitt T. 2015. More northern than ever thought: refugia of the Woodland Ringlet butterfly *Erebia medusa* (Nymphalidae: Satyrinae) in Northern Central Europe. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 53: 67-75
- Bink FA. 1992. *Ecologische atlas van de dagvlinders of Noordwest-Europa*. Haarlem: Schuyt and CO
- Boggs CL, Watt WB, Ehrlich PR. 2003. *Butterflies: ecology and evolution taking flight*. University of Chicago Press.

- Bos F, Bosveld M, Groenendijk D, van Swaay C, Wynhoff I. 2006. De dagvlinders van Nederland, verspreiding en bescherming. Leiden: Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis
- Bromilow SM, Sperling FAH. 2011. Phylogeographic signal variation in mitochondrial DNA among geographically isolated grassland butterflies. *Journal of Biogeography* 38: 299-310
- Caplins SA, Gilbert KJ, Ciotir C, Roland J, Matter SF, Keyghobadi N. 2014. Landscape structure and the genetic effects of a population collapse. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 281
- Casacci LP, Witek M, Barbero F, Patricelli D, Solazzo G, Balletto E, Bonelli S. 2011. Habitat preferences of *Maculinea arion* and its *Myrmica* host ants: implications for habitat management in Italian Alps. *Journal of Insect Conservation* 15: 103-110
- Chapuis MP, Estoup A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24: 621-31
- CHAPUIS MP, Lecoq M, Michalakis Y, Loiseau A, Sword G, Piry S, Estoup A. 2008. Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Molecular ecology* 17: 3640-53
- Chapuis MP, Loiseau A, Michalakis Y, Lecoq M, Franc A, Estoup A. 2009. Outbreaks, gene flow and effective population size in the migratory locust, *Locusta migratoria*: a regional-scale comparative survey. *Molecular Ecology* 18: 792-800
- Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-59
- Clement M, Snell Q, Walker P, Posada D, Crandall K. 2002. TCS: Estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings* 2: 184
- CSCF, ed. 2015. CSCF-karch - Distribution des espèces. 16. 04. 2015 <http://www.cscf.ch/>
- DeChaine EG, Martin AP. 2004. Historic cycles of fragmentation and expansion in *Parnassius smintheus* (Papilionidae) inferred using mitochondrial DNA. *Evolution* 58: 113-27
- DeChaine EG, Martin AP. 2005. Historical biogeography of two alpine butterflies in the Rocky Mountains: broad-scale concordance and local-scale discordance. *Journal of Biogeography* 32: 1943-56
- DeChaine EG, Martin AP. 2006. Using coalescent simulations to test the impact of quaternary climate cycles on divergence in an alpine plant-insect association. *Evolution* 60: 1004-13
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36: W465-9
- Dinca V, Dapporto L, Vila R. 2011. A combined genetic-morphometric analysis unravels the complex biogeographical history of *Polyommatus icarus* and *Polyommatus celina* Common Blue butterflies. *Molecular Ecology* 20: 3921-35
- Dincă V, Montagud S, Talavera G, Hernández-Roldán J, Munguira ML, García-Barros E, Hebert PD, Vila R. 2015. DNA barcode reference library for Iberian butterflies enables a continental-scale preview of potential cryptic diversity. *Scientific reports* 5

- Duploux A, Hanski I. 2015. Small spermatophore size and reduced female fitness in an isolated butterfly population. *Ecological Entomology* 40: 167-74
- Earl D, vonHoldt B. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genet Resour* 4: 359-61
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792-97
- Ehrich PR, Hanski I. 2004. *On the Wings of Checkerspots: a Model system for Population Biology*. str. 408. Oxford: Oxford University Press
- Eliasson CU, ed. 2012. Argynnis niobe - hedpärlemorfjäril Artfaktablad. 16. 4. 2015
http://www.artfakta.se/Artfaktablad/Argynnis_Niobe_100977.pdf
- Engler JO, Balkenhol N, Filz KJ, Habel JC, Roedder D. 2014. Comparative Landscape Genetics of Three Closely Related Sympatric Hesperid Butterflies with Diverging Ecological Traits. *Plos One* 9
- Entomologický ústav BC AV ČR, ed. 2015. Databáze Mapování motýlů České republiky.
www.lepidoptera.cz
- Essayan R, Jugan D. 2007. Le projet de cartographie des Rhopalocères et Zygènes de Bourgogne et Franche-Comté (Lepidoptera). *Rev. sci. Bourgogne-Nature* 5: 27-29
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-20
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. ANALYSIS OF MOLECULAR VARIANCE INFERRED FROM METRIC DISTANCES AMONG DNA HAPLOTYPES - APPLICATION TO HUMAN MITOCHONDRIAL-DNA RESTRICTION DATA. *Genetics* 131: 479-91
- Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-67
- Eycott AE, Stewart GB, Buyung-Ali LM, Bowler DE, Watts K, Pullin AS. 2012. A meta-analysis on the impact of different matrix structures on species movement rates. *Landscape Ecology* 27: 1263-78
- Frankham R, Briscoe DA, Ballou JD. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Frankham R. 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. *Biological Conservation* 143: 1919-27
- Freeland JR, Kirk H, Petersen S. 2011. *Molecular Ecology*. Hoboken: Wiley-Blackwell
- French N, Yu S, Biggs P, Holland B, Fearnhead P, Binney B, Fox A, Grove-White D, Leigh JW, Miller W, Muellner P, Carter P. 2014. Evolution of *Campylobacter* species in New Zealand In *Campylobacter Ecology and Evolution*, ed. SK Sheppard, G Méric, str. 221-40. Norfolk, England: Caister Academic Press

- Fujioka T. 2002. *Argynnis (Fabriciana) niobe* in the world, with the description of a new subspecies discovered in Hokkaido. *Gekkan Mushi*: 3-10
- Galtier N, Nabholz B, Glemin S, Hurst GDD. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18: 4541-50
- García-Barros E, Munguira ML, Stefanescu C, Moreno AV. 2013. *Lepidoptera: Papilionoidea*. Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Grill A, Rajimann LEL, Van Ginkel W, Gkioka E, Menken SBJ. 2007. Genetic differentiation and natural hybridization between the Sardinian endemic *Maniola nurag* and the European *Maniola jurtina*. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1255-70
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704
- Habel JC, Schmitt T, Muller P. 2005. The fourth paradigm pattern of post-glacial range expansion of European terrestrial species: the phylogeography of the Marbled White butterfly (*Satyrinae*, *Lepidoptera*). *Journal of Biogeography* 32: 1489-97
- Habel JC, Meyer M, El Mousadik A, Schmitt T. 2008. Africa goes Europe: The complete phylogeography of the marbled white butterfly species complex *Melanargia galathea*/*M-lachesis* (*Lepidoptera* : *Satyridae*). *Organisms Diversity & Evolution* 8: 121-29
- Habel JC, Schmitt T, Meyer M, Finger A, Roedder D, Assmann T, Zachos FE. 2010. Biogeography meets conservation: the genetic structure of the endangered lycaenid butterfly *Lycaena helle* (Denis & Schiffermuller, 1775). *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 155-68
- Habel JC, Finger A, Schmitt T, Neve G. 2011a. Survival of the endangered butterfly *Lycaena helle* in a fragmented environment: Genetic analyses over 15 years. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49: 25-31
- Habel JC, Husemann M, Rodder D, Schmitt T. 2011b. Biogeographical dynamics of the Spanish Marbled White *Melanargia ines* (*Lepidoptera*: *Satyridae*) in the Western Mediterranean: does the Atlanto-Mediterranean refuge exist? *Biological Journal of the Linnean Society* 104: 828-37
- Habel JC, Lens L, Rodder D, Schmitt T. 2011c. From Africa to Europe and back: refugia and range shifts cause high genetic differentiation in the Marbled White butterfly *Melanargia galathea*. *Bmc Evolutionary Biology* 11
- Habel JC, Roedder D, Schmitt T, Neve G. 2011d. Global warming will affect the genetic diversity and uniqueness of *Lycaena helle* populations. *Global Change Biology* 17: 194-205
- Habel JC, Schmitt T. 2012. The burden of genetic diversity. *Biological Conservation* 147: 270-74
- Habel JC, Husemann M, Schmitt T, Dapporto L, Roedder D, Vandewoestijne S. 2013. A Forest Butterfly in Sahara Desert Oases: Isolation Does Not Matter. *Journal of Heredity* 104: 234-47
- Hagelberg E, Hofreiter M, Keyser C. 2015. Ancient DNA: the first three decades. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 370
- Hammouti N, Schmitt T, Seitz A, Kosuch J, Veith M. 2010. Combining mitochondrial and nuclear evidences: a refined evolutionary history of *Erebia medusa* (*Lepidoptera*: *Nymphalidae*):

Satyrinae) in Central Europe based on the COI gene. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 48: 115-25

Han T, Lee W, Lee Y, Kim N, Lee S, Park H. 2014. Barcoding old Korean lepidopteran specimens using newly designed specific primer pairs. *J Asia-Pac Entomol* 17: 679-84

Hanski IA. 2011. Eco-evolutionary spatial dynamics in the Glanville fritillary butterfly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 14397-404

Hardy OJ, Vekemans X. 2002. SPAGEDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 618-20

Hart MW, Sunday J. 2007. Things fall apart: biological species form unconnected parsimony networks. *Biology Letters* 3: 509-12

Haubrich K, Schmitt T. 2007. Cryptic differentiation in alpine-endemic, high-altitude butterflies reveals down-slope glacial refugia. *Molecular Ecology* 16: 3643-58

Hewitt GM. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 359: 183-95

Hofreiter M, Paijmans JLA, Goodchild H, Speller CF, Barlow A, Fortes GG, Thomas JA, Ludwig A, Collins MJ. 2015. The future of ancient DNA: Technical advances and conceptual shifts. *Bioessays* 37: 284-93

Huemer P, Mutanen M, Sefc KM, Hebert PDN. 2014. Testing DNA Barcode Performance in 1000 Species of European Lepidoptera: Large Geographic Distances Have Small Genetic Impacts. *Plos One* 9

Hurst GDD, Jiggins FM. 2005. Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272: 1525-34

Husemann M, Schmitt T, Zachos FE, Ulrich W, Habel JC. 2014. Palaeartic biogeography revisited: evidence for the existence of a North African refugium for Western Palaeartic biota. *Journal of Biogeography* 41: 81-94

Jakobsson M, Rosenberg NA. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801-6

Johannesen J, Schwing U, Seufert W, Seitz A, Veith M. 1997. Analysis of gene flow and habitat patch network for *Chazara briseis* (Lepidoptera: Satyridae) in an agricultural landscape. *Biochemical Systematics and Ecology* 25: 419-27

Joyce DA, Pullin AS. 2003. Conservation implications of the distribution of genetic diversity at different scales: a case study using the marsh fritillary butterfly (*Euphydryas aurinia*). *Biological Conservation* 114: 453-61

Kadlec T, Vrba P, Kepka P, Schmitt T, Konvicka M. 2010. Tracking the decline of the once-common butterfly: delayed oviposition, demography and population genetics in the hermit *Chazara briseis*. *Animal Conservation* 13: 172-83

Kalivoda H, Vítáz L, eds. 2015. 16. 4. 2015 <http://lepidoptera.sk/>

- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-49
- Kerley G, Kowalczyk R, Crowsigt J. 2012. Conservation implications of the refugee species concept and the European bison: king of the forest or refugee in a marginal habitat? *Ecography* 35: 519-29
- Keyghobadi N, Roland J, Strobeck C. 1999. Influence of landscape on the population genetic structure of the alpine butterfly *Parnassius smintheus* (Papilionidae). *Molecular Ecology* 8: 1481-95
- Keyghobadi N, Roland J, Matter SF, Strobeck C. 2005a. Among- and within-patch components of genetic diversity respond at different rates to habitat fragmentation: an empirical demonstration. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272: 553-60
- Keyghobadi N, Roland J, Strobeck C. 2005b. Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. *Molecular Ecology* 14: 1897-909
- Keyghobadi N, Unger KP, Weintraub JD, Fonseca DM. 2006. Remnant populations of the Regal Fritillary (*Speyeria idalia*) in Pennsylvania: Local genetic structure in a high gene flow species. *Conservation Genetics* 7: 309-13
- Kodandaramaiah U, Weingartner E, Janz N, Dalen L, Nylin S. 2011. Population structure in relation to host-plant ecology and *Wolbachia* infestation in the comma butterfly. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 2173-85
- Kodandaramaiah U, Konvicka M, Tammaru T, Wahlberg N, Gotthard K. 2012a. Phylogeography of the threatened butterfly, the woodland brown *Lopinga achine* (Nymphalidae: Satyrinae): implications for conservation. *Journal of Insect Conservation* 16: 305-13
- Kodandaramaiah U, Weingartner E, Janz N, Leski M, Slove J, Warren A, Nylin S. 2012b. Investigating Concordance among Genetic Data, Subspecies Circumscriptions and Hostplant Use in the Nymphalid Butterfly *Polygonia faunus*. *Plos One* 7
- Kodandaramaiah U, Simonsen TJ, Bromilow S, Wahlberg N, Sperling F. 2013. Deceptive single-locus taxonomy and phylogeography: *Wolbachia*-associated divergence in mitochondrial DNA is not reflected in morphology and nuclear markers in a butterfly species. *Ecol Evol* 3: 5167-76
- Konvička M, Beneš J, Čížek L. 2005. *Ohrožený hmyz nelesních stanovišť: ochrana a management*. Olomouc: Sagittaria
- Koren T, Letić G. 2014. Butterfly fauna (Lepidoptera: Rhopalocera) of Donji Emovci, Požega, Croatia. *NATURA SLOVENIAE* 16: 5-16
- Kreuzinger AJ, Fiedler K, Letsch H, Grill A. 2015. Tracing the radiation of *Maniola* (Nymphalidae) butterflies: new insights from phylogeography hint at one single incompletely differentiated species complex. *Ecol Evol* 5: 46-58
- Kudrna O, Pennerstorfer J, Lux K. 2015. *Distribution atlas of European butterflies and skippers*. Schwanfeld: Wiss. Verl. Peks.

- Lai BCG, Pullin AS. 2004. Phylogeography, genetic diversity and conservation of the large copper butterfly *Lycaena dispar* in Europe. *Journal of Insect Conservation* 8: 27-35
- Lang S-Y, Wang X-J. 2010. Study on some nymphalid butterflies from China-2. *Atalanta* 41: 221-28
- Languedoc-Roussillon lAdLedPjfd, ed. 2015. l'Atlas des Libellules et des Papillons de jour du Languedoc-Roussillon. 16. 4. 2015 <http://atlas.libellules-et-papillons-lr.org/>
- Leigh JW, Bryant D. 2015. popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6: 1110-16
- Leština D. 2012. Populační genetika dvou ohrožených druhů perleťovců moravských Karpat. Magisterská práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. 34 str.
- Leština D, Konvička M, Zima J, Jungova R, Zimmermann K, Beneš J, Tropek R, Fric Z, Kepka P, Spitzer L. 2012. Studying endangered species occurring in low population densities: *Argynnis* butterflies in Czech Carpathians. Předneseno na konferenci Future of Butterflies in Europe III, Wageningen, Nederland
- Leština D, Spitzer L, Fric Z, Kepka P, Tropek R, Zapletal M, Zimmermann K, Beneš J, Konvička M. in prep. Severe decline despite high genetic interconnection: population parameters of declining *Argynnis* butterflies in West Carpathians.
- Levesque R. 1984. Supplément au Catalogue des Lépidoptères de l'ouest Atlantique (1912-1922) d'Henri Gelin et Daniel Lucas. *Alexandria* 13: 219-31
- Lohman DJ, Peggie D, Pierce NE, Meier R. 2008. Phylogeography and genetic diversity of a widespread Old World butterfly, *Lampides boeticus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Bmc Evolutionary Biology* 8
- Louy D, Habel J, Schmitt T, Assmann T, Meyer M, Muller P. 2007. Strongly diverging population genetic patterns of three skipper species: the role of habitat fragmentation and dispersal ability. *Conservation Genetics* 8: 671-81
- Louy D, Habel JC, Abadjiev S, Schmitt T. 2013. Genetic legacy from past panmixia: high genetic variability and low differentiation in disjunct populations of the Eastern Large Heath butterfly. *Biological Journal of the Linnean Society* 110: 281-90
- Louy D, Habel JC, Abadjiev S, Rakosy L, Varga Z, Roedder D, Schmitt T. 2014. Molecules and models indicate diverging evolutionary effects from parallel altitudinal range shifts in two mountain Ringlet butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society* 112: 569-83
- Maes D, Van Dyck H. 1999. *Dagvlinders in Vlaanderen. Ecologie, verspreiding en behoud.* Antwerpen: Inst. v. Natuurbehoud en Vlaamse Vlinderwerkgroep
- Maravalhas E. 2003. *As Borboletas de Portugal. Distribuidor internacional, Apollo Books.*
- Meglec E, Pecsénye K, Varga Z, Solignac M. 1998. Comparison of differentiation pattern at allozyme and microsatellite loci in *Parnassius mnemosyne* (Lepidoptera) populations. *Hereditas* 128: 95-103
- Meglec E, Anderson SJ, Bourguet D, Butcher R, Caldas A, Cassel-Lundhagen A, Coeur d'Acier A, Dawson DA, Faure N, Fauvelot C, Franck P, Harper G, Keyghobadi N, Kluetsch C, Muthulakshmi M, Nagaraju J, Patt A, Petenian F, Silvain JF, Wilcock HR. 2007.

- Microsatellite flanking region similarities among different loci within insect species. *Insect Mol Biol* 16: 175-85
- Mihoci I, Sasic M, Vukovic M. 2007. Contribution to the butterfly fauna (Hesperioidea & Papilionoidea) of the Velebit Mountain, Croatia. *Natura Croatica* 16: 29-62
- Miljević M, Popović M, eds. 2015. Alciphron - database on insects of Serbia (Lepidoptera: Papilionidae), Habiprot. 16. 4. 2015 <http://www.habiprot.org.rs/Alciphron>
- Milko LV, Haddad NM, Lance SL. 2012. Dispersal via stream corridors structures populations of the endangered St. Francis' satyr butterfly (*Neonympha mitchellii francisci*). *Journal of Insect Conservation* 16: 263-73
- Päiväperhosseuranta, ed. 2015. Päiväperhosseuranta. 16. 4. 2015 <http://koivu.luomus.fi/nafi>
- Patricelli D, Sielezniew M, Ponikwicka-Tyszko D, Ratkiewicz M, Bonelli S, Barbero F, Witek M, Bus MM, Rutkowski R, Balletto E. 2013. Contrasting genetic structure of rear edge and continuous range populations of a parasitic butterfly infected by *Wolbachia*. *Bmc Evolutionary Biology* 13
- Peakall R, Smouse P. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-95
- Pollrich S, ed. 2015. Tagfalter von Sachsen. 16. 4. 2015 www.tagfalter-sachsen.de
- Premier Biosoft 2015. PCR Primer Design Guidelines, Datum přístupu: 2012. http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-59
- Ratnasingham S, Hebert PDN, eds. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). 1. 4. 2015 <Go to ISI>://WOS:000246244300001 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1890991/pdf/men0007-0355.pdf>
- Reinhardt R, Sbieszne H, Settele J, Fischer U, Fiedler G. 2007. Tagfalter von Sachsen. Dresden: Entomologische Nachrichten und Berichte, Beiheft 11.
- Ricketts TH. 2001. The matrix matters: Effective isolation in fragmented landscapes. *American Naturalist* 158: 87-99
- Ritter S, Michalski SG, Settele J, Wiemers M, Fric ZF, Sielezniew M, Sasic M, Rozier Y, Durka W. 2013. *Wolbachia* Infections Mimic Cryptic Speciation in Two Parasitic Butterfly Species, *Phengaris teleius* and *P. nausithous* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Plos One* 8
- Runquist EB, Forister ML, Shapiro AM. 2012. Phylogeography at large spatial scales: incongruent patterns of population structure and demography of Pan-American butterflies associated with weedy habitats. *Journal of Biogeography* 39: 382-96
- Rutkowski R, Sielezniew M, Szostak A. 2009. Contrasting levels of polymorphism in cross-amplified microsatellites in two endangered xerothermophilous, obligatorily myrmecophilous, butterflies of the genus *Phengaris* (Maculinea) (Lepidoptera: Lycaenidae). *European Journal of Entomology* 106: 457-69

- Salz A, Fartmann T. 2009. Coastal dunes as important strongholds for the survival of the rare Niobe fritillary (*Argynnis niobe*). *Journal of Insect Conservation* 13: 643-54
- Salz A, Fartmann T. 2012. Stress as a key factor for the Niobe Fritillary (*Argynnis niobe*) in heavy-metal grasslands Předneseno na konferenci Future of Butterflies in Europe III, Wageningen, Nederland
- Sarhan A. 2006. Isolation and characterization of five microsatellite loci in the Glanville fritillary butterfly (*Melitaea cinxia*). *Molecular Ecology Notes* 6: 163-64
- Sasic M, Mihoci I. 2011. Annotated checklist of Croatian butterflies with vernacular names. *Natura Croatica* 20: 425-36
- Šašić M, Popović M, Cuvelier S, Đurić M, Franeta F, Gascoigne-Pees M, Koren T, Maes D, Micevski B, Micevski N, Mølgaard MS, van Swaay C, Wynhoff I, Verovnik R. 2015. Contribution to the knowledge of the butterfly fauna of Albania. *Nota Lepidopterologica* 38: 29-45
- Schmitt T, Seitz A. 2001. Intraspecific allozymatic differentiation reveals the glacial refugia and the postglacial expansions of European *Erebia medusa* (Lepidoptera : Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 74: 429-58
- Schmitt T, Cizek O, Konvicka M. 2005a. Genetics of a butterfly relocation: large, small and introduced populations of the mountain endemic *Erebia epiphron silesiana*. *Biological Conservation* 123: 11-18
- Schmitt T, Varga Z, Seitz A. 2005b. Are *Polyommatus hispana* and *Polyommatus slovacus* bivoltine *Polyommatus coridon* (Lepidoptera : Lycaenidae)? The discriminatory value of genetics in taxonomy. *Organisms Diversity & Evolution* 5: 297-307
- Schmitt T, Habel JC, Zimmermann M, Muller P. 2006a. Genetic differentiation of the marbled white butterfly, *Melanargia galathea*, accounts for glacial distribution patterns and postglacial range expansion in southeastern Europe. *Molecular Ecology* 15: 1889-901
- Schmitt T, Hewitt GM, Muller P. 2006b. Disjunct distributions during glacial and interglacial periods in mountain butterflies: *Erebia epiphron* as an example. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 108-13
- Schmitt T, Muller P. 2007. Limited hybridization along a large contact zone between two genetic lineages of the butterfly *Erebia medusa* (Satyrinae, Lepidoptera) in Central Europe (vol 45, pg 39, 2007). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 45: 175-75
- Schmitt T, Rakosy L, Abadjiev S, Muller P. 2007. Multiple differentiation centres of a non-Mediterranean butterfly species in south-eastern Europe. *Journal of Biogeography* 34: 939-50
- Schmitt T, Haubrich K. 2008. The genetic structure of the mountain forest butterfly *Erebia euryale* unravels the late Pleistocene and postglacial history of the mountain coniferous forest biome in Europe. *Molecular Ecology* 17: 2194-207
- Schmitt T, Besold J. 2010. Upslope movements and large scale expansions: the taxonomy and biogeography of the *Coenonympha arcania*- *C-d arwiniana*- *C-gardetta* butterfly species complex. *Zoological Journal of the Linnean Society* 159: 890-904

- Schmitt T, Varga Z. 2012. Extra-Mediterranean refugia: The rule and not the exception? *Frontiers in Zoology* 9
- Schoville SD, Stuckey M, Roderick GK. 2011. Pleistocene origin and population history of a neoendemic alpine butterfly. *Molecular Ecology* 20: 1233-47
- Schoville SD, Lam AW, Roderick GK. 2012. A range-wide genetic bottleneck overwhelms contemporary landscape factors and local abundance in shaping genetic patterns of an alpine butterfly (Lepidoptera: Pieridae: *Colias behrii*). *Molecular Ecology* 21: 4242-56
- Sielezniew M, Dziekańska I. 2010. *Motyle dzienne*. Multico Oficyna Wydawnicza.
- Sielezniew M, Rutkowski R. 2012. Population isolation rather than ecological variation explains the genetic structure of endangered myrmecophilous butterfly *Phengaris (=Maculinea) arion*. *Journal of Insect Conservation* 16: 39-50
- Sielezniew M, Patricelli D, Rutkowski R, Witek M, Bonelli S, Bus MM. 2015. Population genetics of the endangered obligatorily myrmecophilous butterfly *Phengaris (=Maculinea) arion* in two areas of its European range. *Insect Conservation and Diversity* 8: 505-16
- Sigaard P, Pertoldi C, Madsen AB, Sogaard B, Loeschcke V. 2008. Patterns of genetic variation in isolated Danish populations of the endangered butterfly *Euphydryas aurinia*. *Biological Journal of the Linnean Society* 95: 677-87
- Simonsen T. 2006. Fritillary phylogeny, classification, and larval host plants: reconstructed mainly on the basis of male and female genitalic morphology (Lepidoptera : Nymphalidae : Argynnini). *Biological Journal of the Linnean Society* 89: 627-73
- Simonsen T. 2007. Comparative morphology and evolutionary aspects of the reflective under wing scale-pattern in Fritillary butterflies (Nymphalidae : Argynnini). *Zoologischer Anzeiger* 246: 1-10
- Simonsen TJ, Wahlberg N, Brower AVZ, de Jong R. 2006. Morphology, molecules and fritillaries: approaching a stable phylogeny for Argynnini (Lepidoptera : Nymphalidae). *Insect Syst Evol* 37: 405-18
- Smee MR, Pauchet Y, Wilkinson P, Wee B, Singer MC, French-Constant RH, Hodgson DJ, Mikheyev AS. 2013. Microsatellites for the Marsh Fritillary Butterfly: De Novo Transcriptome Sequencing, and a Comparison with Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Markers. *Plos One* 8
- Smith MA, Bertrand C, Crosby K, Eveleigh ES, Fernandez-Triana J, Fisher BL, Gibbs J, Hajibabaei M, Hallwachs W, Hind K, Hrcek J, Huang D-W, Janda M, Janzen DH, Li Y, Miller SE, Packer L, Quicke D, Ratnasingham S, Rodriguez J, Rougerie R, Shaw MR, Sheffield C, Stahlhut JK, Steinke D, Whitfield J, Wood M, Zhou X. 2012. *Wolbachia* and DNA Barcoding Insects: Patterns, Potential, and Problems. *PLoS ONE* 7: e36514
- Spitzer L, Benes J, Dandova J, Jaskova V, Konvicka M. 2009a. The Large Blue butterfly, *Phengaris [Maculinea] arion*, as a conservation umbrella on a landscape scale: The case of the Czech Carpathians. *Ecological Indicators* 9: 1056-63
- Spitzer L, Benes J, Konvicka M. 2009b. Oviposition of the Niobe fritillary (*Argynnis niobe*(Linnaeus, 1758)) at submountain conditions in the Czech Carpathians (Lepidoptera, Nymphalidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo* 30: 165-68

- Stefanescu C, ed. 2015. Catalan Butterfly Monitoring Scheme (CBMS), Museu de Granollers Ciències Naturals "La Tela". 16. 4. 2015 <http://www.catalanbms.org/>
- Stevens VM, Turlure C, Baguette M. 2010. A meta-analysis of dispersal in butterflies. *Biological Reviews* 85: 625-42
- Tagfalter-Monitoring Deutschland, ed. 2015. Datenzentrale. 1. 12. 2015 <http://vmapp.science4you.org/platform/tmd/tmd-top/home/index.do>
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF. 1992. A Cladistic-Analysis of Phenotypic Associations with Haplotypes Inferred from Restriction Endonuclease Mapping and DNA-Sequence Data .3. Cladogram Estimation. *Genetics* 132: 619-33
- Thomas CD. 2000. Dispersal and extinction in fragmented landscapes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 267: 139-45
- Thorpe J, Solé-Cava A. 1994. Invited Review. The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zool. Scr* 23: 3-18
- Todisco V, Gratton P, Cesaroni D, Sbordoni V. 2010. Phylogeography of *Parnassius apollo*: hints on taxonomy and conservation of a vulnerable glacial butterfly invader. *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 169-83
- Todisco V, Gratton P, Zakharov EV, Wheat CW, Sbordoni V, Sperling FAH. 2012. Mitochondrial phylogeography of the Holarctic *Parnassius phoebus* complex supports a recent refugial model for alpine butterflies. *Journal of Biogeography* 39: 1058-72
- Toews DPL, Brelsford A. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21: 3907-30
- Tolman T. 2008. *Collins Butterfly Guide*. London.
- Tropek R, Řehounek J. 2012. Bezobratlí postindustriálních stanovišť: význam, ochrana a management. České Budějovice: ENTÚ BC AV ČR & Calla
- Tryjanowski P, Hartel T, Baldi A, Szymanski P, Tobolka M, Herzon I, Golawski A, Konvicka M, Hromada M, Jerzak L, Kujawa K, Lenda M, Orłowski G, Panek M, Skorka P, Sparks TH, Tworek S, Wuczynski A, Zmihorski M. 2011. Conservation of farmland birds faces different challenges in Western and Central-Eastern Europe. *Acta Ornithologica* 46: 1-12
- Turlure C, Vandewoestijne S, Baguette M. 2014. Conservation genetics of a threatened butterfly: comparison of allozymes, RAPDs and microsatellites. *Bmc Genetics* 15
- Tuzov VK. 2000. *Guide to the BUTTERFLIES OF RUSSIA and adjacent territories*. Moscow: Sofia. 580 pp.
- Tuzov VK. 2003. Nymphalidae part I In *Guide to the Butterflies of the Palearctic region.*, ed. GC Bozano. Milano
- Tvrtekovic N, Sasic M, Mihoci I, Vukovic M, Bjelic M. 2012. Review of the butterfly fauna (Hesperioidea & Papilionoidea) of the Dinara mountain range. *Natura Croatica* 21: 471-81
- Ugelvig LV, Andersen A, Boomsma JJ, Nash DR. 2012. Dispersal and gene flow in the rare, parasitic Large Blue butterfly *Maculinea arion*. *Molecular Ecology* 21: 3224-36

- Van't Hof AE, Brakefield PM, Saccheri IJ, Zwaan BJ. 2007. Evolutionary dynamics of multilocus microsatellite arrangements in the genome of the butterfly *Bicyclus anynana*, with implications for other Lepidoptera. *Heredity* 98: 320-28
- Van Swaay C, Cuttelod A, Collins S, Maes D, Munguira ML, Šašić M, Settele J, Verovnik R, Verstrael T, Warren M, Wiemers M, Wynhof I. 2010. European Red List of Butterflies Luxembourg: Publications Office of the European Union
- Vandewoestijne S, Baguette M, Brakefield PM, Saccheri IJ. 2004. Phylogeography of *Aglais urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 630-46
- Vandewoestijne S, Turlure C, Baguette M. 2012. Development of novel microsatellite markers for a specialist species of Lepidoptera, *Boloria aquilonaris* (Nymphalidae), based on 454 sequences. *European Journal of Entomology* 109: 129-34
- Verovnik R, Rebeušek F, Jež M, Slovenije Dzpim, Brinovec M, Janžekovič F. 2012. Atlas dnevnih metuljev (Lepidoptera: Rhopalocera) Slovenije. Center za kartografijo favne in flore.
- Vila M, Vidal-Romani JR, 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: 249-60
- Vila M, Lundhagen AC, Thuman KA, Stone JR, Bjorklund M. 2006. A new conservation unit in the butterfly *Erebia triaria* (Nymphalidae) as revealed by nuclear and mitochondrial markers. *Annales Zoologici Fennici* 43: 72-79
- Vila M, Mari-Mena N, Guerrero A, Schmitt T. 2011. Some butterflies do not care much about topography: a single genetic lineage of *Erebia euryale* (Nymphalidae) along the northern Iberian mountains. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 49: 119-32
- Vitáz L, Bálint Z, Žitňan D. 1997. *Polyommatus slovacus* sp. nov. (Lepidoptera, Lycaenidae): the bivoltine relative of *Polyommatus coridon* in Slovakia. *Entomol. Probl.* 28: 1-8
- Vlinderfaunistiek DVW, ed. 2015. Vlindernet, versie 2. 16. 4. 2015 <http://www.vlindernet.nl/>
- Wagner W. 2003. A contribution to the knowledge of the Lepidoptera and Saltatoria fauna of the eastern Suevoian Alb mountains (Lepidoptera, Ensifera et Caelifera). Zur Kenntnis der Schmetterlings- und Heuschreckenfauna von Magerrasen der Ostalb (Lepidoptera, Ensifera et Caelifera). *Carolinea* 29: 73-118
- Wahlberg N, Saccheri I. 2007. The effects of Pleistocene glaciations on the phylogeography of *Melitaea cinxia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *European Journal of Entomology* 104: 675
- Wallis de Vries M. 2009. Focus on *Argynnis niobe* in the dunes of North Holland. Aandacht voor de duinparelmoervlinder in Kennemerland. *Vlinders* 24: 4-6
- Wells CN, Marko PB, Tonkyn DW. 2015. The phylogeographic history of the threatened *Diana fritillary*, *Speyeria diana* (Lepidoptera: Nymphalidae): with implications for conservation. *Conservation Genetics* 16: 703-16
- Williams BL. 2002. Conservation genetics, extinction, and taxonomic status: a case history of the regal fritillary. *Conservation Biology* 16: 148-57

- Williams BL, Brawn JD, Paige KN. 2003. Landscape scale genetic effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). *Molecular Ecology* 12: 11-20
- Zima J, Leština D, Konvička M. 2013. Characterization of ten polymorphic microsatellite markers for an endangered butterfly *Argynnis niobe* and their cross-species utility in the closely related species *A. adippe* (Lepidoptera: Nymphalidae). *European Journal of Entomology* 110: 383-87

Přílohy

Příloha 1 – Zdroje informací o rozšíření

Řazeno dle zemí od západu, dále dle typu a důležitosti zdrojů.

Pers. comm. uvádím i v případech, kdy se expert nevyjadřoval přímo k situaci v celém státu, ale vždy, když mi nějaká informace od něj napomohla k vytvoření náčrtu rozšíření.

Portugalsko

Maravalhas (2003)

García-Barros *et al.* (2013)

Španělsko

E. García-Barros, pers. comm.

Stefanescu (2015) <http://www.catalanbms.org/>

García-Barros *et al.* (2013)

Vlastní sbírka vzorků

Francie

T. Lafranchis, pers. comm. a nepublikovaná data

R. Levesque, pers. comm. (Poitou-Charentes, skrze pers. comm. s N. Wildingem)

N. Wilding, pers. comm. (především Poitou-Charentes a Correze)

D. Cheesman, pers. comm. (Lot)

D. Simpson, pers. comm. (Dordogne)

l'Atlas des Libellules et des Papillons de jour du Languedoc-Roussillon (2015)

<http://atlas.libellules-et-papillons-lr.org/> (Languedoc-Roussillon a okolí)

Levesque (1984) (Poitou-Charentes)

Essayan & Jugan (2007) (Bourgogne a Franche-Comté)

Vlastní sbírka vzorků

Belgie

Maes & Van Dyck (1999)

Bos *et al.* (2006)

Nizozemí

Vlinderfaunistiek (2015) <http://www.vlindernet.nl/>

Bos *et al.* (2006)

Wallis de Vries (2009)

Švýcarsko

CSCF (2015) <http://www.cscf.ch/>

Německo

A. Salz, pers. comm. (Severní Porýní-Westfálsko)

G. Kuna, pers. comm. (Durynsko)

Bamann (2015) <http://bemann.alfahosting.org/Argynnisniobe.htm> (Badensko-Würtenbersko)

Pollrich (2015) www.tagfalter-sachsen.de (Sasko)

Salz & Fartmann (2009)

Salz & Fartmann (2012)

Reinhardt *et al.* (2007) (Sasko)

Tagfalter-Monitoring Deutschland (2015) <http://vmapp.science4you.org/platform/tmd/tmd-top/home/index.do>

Wagner (2003) (Badensko-Würtenbersko)

Vlastní sbírka vzorků

Itálie

E. Balletto, pers. comm. a nepublikovaná data ze síťového mapování

Norsko

Artsdatabanken (2015) <http://artskart.artsdatabanken.no/>

Eliasson (2012) http://www.artfakta.se/Artfaktablad/Argynnis_Niobe_100977.pdf

Dánsko

A. Eskildsen, pers. comm.

T. T. Høye, A. Eskildsen *et al.*, [eds.]: Databáze záznamů o výskytu motýlů v Dánsku, NHM Aarhus. Nepublikovaná data (částečně dostupná z www.fugleognatur.dk)

Vlastní sbírka vzorků

Rakousko

Kudrna *et al.* (2015)

Vlastní pozorování a sbírka vzorků

Švédsko

Eliasson (2012) http://www.artfakta.se/Artfaktablad/Argynnis_Niobe_100977.pdf

Artdatabanken (2015) www.artportalen.se

Česká republika

J. Beneš, pers. comm.

M. Konvička, pers. comm.

D. Breiter, pers. comm. (Podorlicko)

Entomologický ústav BC AV ČR (2015)

Vlastní pozorování a sbírka vzorků

Slovinsko

Verovnik *et al.* (2012)

Polsko

M. Sielezniew, pers. comm. na základě nepublikované databáze všech dostupných záznamů

Sielezniew & Dziekańska (2010)

Chorvatsko

Koren & Letić (2014)

Mihoci *et al.* (2007)

Tvrtkovic *et al.* (2012)

Sasic & Mihoci (2011)

Kudrna *et al.* (2015)

Bosna a Hercegovina, Černá hora, Litva, Lotyšsko

Kudrna *et al.* (2015)

Slovensko

H. Kalivoda, pers. comm. a nepublikované údaje

L. Panigaj, pers. comm.

Kalivoda & Vít'az (2015)

Estonsko, Řecko, Bulharsko

Kudrna *et al.* (2015)

Vlastní sbírka vzorků

Maďarsko

S. Sáfián, pers. comm.

Kudrna *et al.* (2015)

Finsko

Eliasson (2012)

Päiväperhosseuranta (2015) <http://koivu.luomus.fi/nafi/>

Srbsko, Kosovo

M. Djuric, pers. comm.

Miljević & Popović (2015) <http://www.habiprot.org.rs/Alciphron>

Vlastní pozorování a sbírka vzorků

Albánie

Šašić *et al.* (2015)

Kudrna *et al.* (2015)

Makedonie

N. Micevski, pers. comm.

Kudrna *et al.* (2015)

Vlastní sbírka vzorků

Rumunsko

L. Rakosy, pers. comm

Kudrna *et al.* (2015)

Vlastní pozorování a sbírka vzorků

Příloha 2 – Sekvence COI

Tab. II: Seznam všech použitých sekvencí COI stažených z BOLD a GenBanku. * - sekvence z jiného vzorku, než je v databázích uvedeno. Je uváděna jako *A. niobe* z Dánska, se skutečnosti se jedná o *A. adippe* ze Španělska. ** - pravděpodobně špatná identifikace původních autorů, sekvence COI i fotografie jedince odpovídá *A. aglaja*. Tento vzorek byl vyloučen ze všech analýz.

BOLD Process ID	BOLD BIN	GenBank Accession n.	Původní určení	Naše určení podle fotografie	Určení podle COI	Sběratel	Datum odchyty	Země odchyty	Nižší samos. celek	Lokalita	Zem. šířka	Zem. délka	č. haplo-typu	Použito v analýze podr. Fabriciana	Použito v analýze A. niobe
LEFIJ539-10	BOLD:AAB2344	JF853656	A. adippe	-	A. adippe	T. Mutanen	24. 07. 2002	Finsko		Alandia, Jomala	60,046	19,993	n35	ano	ne
LEFIJ538-10	BOLD:AAB2344	JF853655	A. adippe	-	A. adippe	T. Mutanen	02. 08. 2009	Finsko		Karelia lagodensis, Rautjaervi	61,293	29,052	n36	ano	ne
GBLN0824-06	BOLD:AAB2344	DQ922852	A. adippe	-	A. adippe			Finsko					n36	ano	ne
GBLAD463-14	BOLD:AAB2344		A. adippe	-	A. adippe	P. Stamer	24. 07. 2008	Německo	Bavaria	Oberbayern, Diessen	479,378	110,874	n36	ano	ne
GBLAD223-14	BOLD:AAB2344		A. adippe	-	A. adippe	B. Kirchner	12. 08. 2013	Německo	Thuringia	Bad Blankenburg, Zeigerheim-Wachtelberg	507,167	112,333	n35	ano	ne
WMB4321-14	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	-	A. adippe	L. Dapporto		Itálie			44,101	10,242	n38	ano	ne
WMB4338-14	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	-	A. adippe	L. Dapporto		Itálie			39,217	16,14	n31	ano	ne
GWORZ026-10	BOLD:AAB2344	HM913940	Lepidoptera	-	A. adippe	A. Hausmann	06. 09. 1999	Itálie	Basilicata		399,919	157,931	n31	ano	ne
LON1175-12	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	-	A. adippe	A. Endrestol	03. 08. 2011	Norsko	Ostfold		59,056	10,921	n35	ano	ne
LEATG061-14	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	-	A. adippe	A. Otter	15. 08. 1998	Rakousko	Tirol		47,261	10,366	n32	ano	ne
LEATG060-14	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	-	A. adippe	S. Plattner	29. 07. 2002	Rakousko	Tirol		47,348	11,623	n32	ano	ne
EZHBA095-07	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	-	A. adippe	Y. Chevnin	10. 07. 2003	Rusko	Irkutsk		51,7	103,7	n36	ano	ne
EZHBA512-07	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	-	A. adippe	E.I. Malikova	06. 07. 1997	Rusko	Kemerovo		53,7	87,1	n36	ano	ne
LEFIG384-10	BOLD:AAB2344	HM876061	A. adippe	A. adippe	A. adippe	M. Mutanen, N. Mutanen & A. Mutanen	05. 07. 2009	Finsko		Regio Aboensis, Vihti	60,284	24,252	n36	ano	ne
LOWA830-06	BOLD:AAB2344	FJ663289	A. adippe	A. adippe	A. adippe	V. Lukhtanov	05. 07. 1998	Kazachstán		st-Kamenogorsk Region Syryanovsk distr. Landman	49,75	84,317	n5	ano	ne
LOWA713-06	BOLD:AAB2344	FJ663288	A. adippe	A. adippe	A. adippe	V. Lukhtanov	10. 07. 1984	Kazachstán	East Kazakhstan	Zyryanovsk distr., Borodino	49,483	84,1	n5	ano	ne
GWORO811-09	BOLD:AAB2344	GU688471	A. adippe	A. adippe	A. adippe	M. Seizmair	05. 07. 2009	Německo	Bavaria	Nantesbuch Bd. Heilbrunn / TOEL			n36	ano	ne
GBLAD449-14	BOLD:AAB2344		A. adippe	A. adippe	A. adippe	P. Stamer	22. 07. 2008	Německo	Bavaria	Oberbayern, Diessen	479,378	110,874	n35	ano	ne
GWORX514-09	BOLD:AAB2344	JF415670	A. adippe	A. adippe	A. adippe	P. Stamer	24. 07. 2008	Německo	Bavaria	Oberbayern, Diessen	479,333	110,833	n34	ano	ne

BOLD Process ID	BOLD BIN	GenBank Accession n.	Původní určení	Naše určení podle fotografie	Určení podle COI	Sběratel	Datum odchyty	Země odchyty	Nižší samos. celek	Lokalita	Zem. šířka	Zem. délka	č. haplo-typu	Použito v analýze podr. Fabriciana	Použito v analýze A. niobe
FBLMU446-09	BOLD:AAB2344	GU707091	A. adippe	A. adippe	A. adippe	W. Schacht	01. 07. 2009	Německo	Bavaria	Oberbayern, Martinsberg b. Inning	480,852	111,697	n35	ano	ne
GWORO720-09	BOLD:AAB2344	JF415669	A. adippe	A. adippe	A. adippe	A. Hausmann	26. 07. 2006	Německo	Bavaria	Oberbayern, Oberschleissheim, MW 20	482,572	11,545	n34	ano	ne
FBLMU403-09	BOLD:AAB2344	GU707127	A. adippe	A. adippe	A. adippe	A. H. Segerer	16. 07. 2009	Německo	Bavaria	Oberpfalz, Laaber, Endorfmuehle	490,769	11,865	n36	ano	ne
EZSPN582-09	BOLD:ACE8778	GU676561	A. adippe	A. adippe	A. adippe	Maravalhas	26. 07. 2008	Portugalsko		Tras-os-Montes, Ponte Pedrinha, Beca, Boticas	41,682	-7,71	n30	ano	ne
LEATC622-13	BOLD:AAB2344	KM573714	A. adippe	A. adippe	A. adippe	U. Hiermann	21. 08. 2013	Rakousko	Vorarlberg	Silbertal, Mittleres	47,06	10,02	n32	ano	ne
EZROM026-08	BOLD:AAB2344	HQ004013	A. adippe	A. adippe	A. adippe	V. Dinca	25. 06. 2006	Rumunsko	Buzau	Muntenia, Dealul Istrita, Breaza	45,083	26,517	n35	ano	ne
EZROM027-08	BOLD:AAB2344	HQ004014	A. adippe	A. adippe	A. adippe	V. Dinca & R. Vila	06. 06. 2007	Rumunsko	Caras-Severin	Banat, Baile Herculane (Pecinisca)	44,867	22,4	n35	ano	ne
EZROM776-08	BOLD:AAB2344	HQ004011	A. adippe	A. adippe	A. adippe	V. Dinca & R. Vila	05. 06. 2007	Rumunsko	Caras-Severin	Banat, Teregova	45,175	22,301	n35	ano	ne
2 EZROM025-08	BOLD:AAB2344	HQ004012	A. adippe	A. adippe	A. adippe	V. Dinca	29. 06. 2006	Rumunsko	Cluj	Cluj-Napoca, dealul Feleacului, Gheorgheni forest	46,717	23,633	n35	ano	ne
EULEP133-14	BOLD:AAB2344	KP871142	A. adippe	A. adippe	A. adippe	R. Voda	15. 08. 2010	Rumunsko	Harghita	Transylvania, Filpea-Galautas	46,87	25,41	n35	ano	ne
EZROM608-08	BOLD:AAB2344	HQ004009	A. adippe	A. adippe	A. adippe	V. Dinca & R. Vila	01. 06. 2007	Rumunsko	Maramures	Maramures, Cheile Babei	47,321	23,747	n35	ano	ne
EZROM572-08	BOLD:AAB2344	HQ004010	A. adippe	A. adippe	A. adippe	C. Corduneanu	07. 08. 2007	Rumunsko	Suceava	Moldavia, Sunatori, valea Colbul	47,383	25,483	n37	ano	ne
EZSPC927-10	BOLD:ACE8778	HM901764	A. adippe	A. adippe	A. adippe	M.L. Munguira	17. 07. 2009	Španělsko	Andalusia	Granada, Sierra de la Sagra	37,961	-2,558	n30	ano	ne
EZSPC1378-10	BOLD:ACE8778	HM901512	A. adippe	A. adippe	A. adippe	V. Dinca	24. 07. 2009	Španělsko	Aragon	Teruel, 2 km NW El Vallecillo	40,248	-1,582	n30	ano	ne
EZSPN1110-11	BOLD:ACE8778	JN272504	A. adippe	A. adippe	A. adippe	V. Dinca	21. 08. 2010	Španělsko	Aragon	Teruel, El Valecillo	40,247	-1,582	n28	ano	ne
EZSPM133-09	BOLD:ACE8778	GU675705	A. adippe	A. adippe	A. adippe	E. Garcia-Barros	02. 08. 2008	Španělsko	Asturias	Valle (Valle-Zurea), Lena	43,095	-5,858	n30	ano	ne
EZSPN621-09	BOLD:ACE8778	GU676527	A. adippe	A. adippe	A. adippe	F. Gonzalez	23. 08. 2008	Španělsko	Castilla y Leon	Leon, Compludo	42,475	-6,462	n27	ano	ne
EZSPN468-09	BOLD:ACE8778	GU676874	A. adippe	A. adippe	A. adippe	J. Hernandez-Roldan	03. 08. 2008	Španělsko	Castilla-La Mancha	Cuenca, Huelamo, Rio Jucar	40,316	-1,805	n30	ano	ne
EZSPN1060-11	BOLD:ACE8778	JN272496	A. adippe	A. adippe	A. adippe	E. Garcia-Barros	24. 07. 2008	Španělsko	Castilla-La Mancha	Cuenca, Mogorrita, Tragacete	40,344	-1,768	n30	ano	ne

BOLD Process ID	BOLD BIN	GenBank Accession n.	Původní určení	Naše určení podle fotografie	Určení podle COI	Sběratel	Datum odchyty	Země odchyty	Nižší samos. celek	Lokalita	Zem. šířka	Zem. délka	č. haplo-typu	Použito v analýze podr. Fabriciana	Použito v analýze A. niobe
EZSPN938-09	BOLD:ACE8778	GU676215	A. adippe	A. adippe	A. adippe	E. Garcia-Barros	06. 07. 2008	Španělsko	Castilla-La Mancha	Guadalajara, San Andres del Rey	40,643	-2,814	n30	ano	ne
EZSPN1099-11	BOLD:AAB2344	JN272499	A. adippe	A. adippe	A. adippe	R. Vila	19. 07. 2010	Španělsko	Catalonia	Lleida, Boixols, Alt Urgell	42,182	1,187	n31	ano	ne
EZSPN1107-11	BOLD:ACE8778	JN272502	A. adippe	A. adippe	A. adippe	R. Vila	31. 07. 2010	Španělsko	Catalonia	Tarragona, Coll de la Creu, Ports de Tortosa	40,741	0,196	n29	ano	ne
EZSPN1108-11	BOLD:ACE8778	JN272503	A. adippe	A. adippe	A. adippe	R. Vila	31. 07. 2010	Španělsko	Catalonia	Tarragona, Coll de la Creu, Ports de Tortosa	40,741	0,196	n30	ano	ne
EZSPC279-09	BOLD:AAB2344	KP870687	A. adippe	A. adippe	A. adippe	V. Dinca	04. 08. 2008	Španělsko	Catalonia		42,167	2,364	n31	ano	ne
EZSPC268-09	BOLD:ACE8778	KP870872	A. adippe	A. adippe	A. adippe	R. Vila	07. 08. 2008	Španělsko	Catalonia		42,324	2,34	n30	ano	ne
EZSPC282-09	BOLD:AAB2344	KP870913	A. adippe	A. adippe	A. adippe	R. Vila	07. 09. 2008	Španělsko	Catalonia		42,612	1,075	n32	ano	ne
EZSPN1047-11	BOLD:ACE8778	JN272495	A. adippe	A. adippe	A. adippe	S. Montagud, A. Perez-Onteniente & J. Herrero-Borgonon	27. 07. 2008	Španělsko	Comunidad Valenciana	Castellon, Font del Regatxal, Vilafranca	40,425	-0,325	n30	ano	ne
EZSPN559-09	BOLD:ACE8778	GU676585	A. adippe	A. adippe	A. adippe	J. Estela	17. 07. 2008	Španělsko	Comunidad Valenciana	Valencia, Teresa, Caroig	39,094	-0,914	n30	ano	ne
WMB3972-14	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	V. Dinca & R. Voda		Francie			43,635	6,556	n38	ano	ne
WMB3501-14	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	R. Vila	09. 08. 2010	Francie	Provence-Alpes-Cote d'Azur		44,032	6,172	n38	ano	ne
WMB1597-13	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	V. Dinca & R. Voda	09. 08. 2012	Francie	Provence-Alpes-Cote d'Azur		44,201	7,074	n38	ano	ne
WMB1734-13	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	V. Dinca & R. Voda	03. 08. 2012	Francie	Provence-Alpes-Cote d'Azur		43,352	5,826	n32	ano	ne
WMB1835-13	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	R. Vila	02. 08. 2011	Francie	Rhone-Alpes		44,559	5,36	n32	ano	ne
WMB4312-14	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	L. Dapporto		Itálie			44,166	10,628	n38	ano	ne
WMB2062-13	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	L. Dapporto	30. 07. 2012	Itálie	Basilicata		39,93	16,17	n31	ano	ne
GWORU354-10	BOLD:AAB2344	HM910580	Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	A. Hausmann	03. 08. 2001	Itálie	Calabria		399,001	157,789	n31	ano	ne
WMB2082-13	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	L. Dapporto	02. 08. 2012	Itálie	Sicily		37,97	14,77	n33	ano	ne
WMB2085-13	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	L. Dapporto	02. 08. 2012	Itálie	Sicily		37,97	14,77	n33	ano	ne

BOLD Process ID	BOLD BIN	GenBank Accession n.	Původní určení	Naše určení podle fotografie	Určení podle COI	Sběratel	Datum odchyty	Země odchyty	Nižší samos. celek	Lokalita	Zem. šířka	Zem. délka	č. haplo-typu	Použito v analýze podr. Fabriciana	Použito v analýze A. niobe
WMB2103-13	BOLD:AAB2344		Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	L. Dapporto	03. 08. 2012	Itálie	Sicily		37,84	14,06	n33	ano	ne
EZROM356-08	BOLD:AAB2344	KP870608	Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	S. Viader	30. 07. 2005	Španělsko	Catalonia		42,623	1,094	n32	ano	ne
EZROM357-08	BOLD:AAB2344	KP870958	Lepidoptera	A. adippe	A. adippe	S. Viader	19. 06. 2007	Španělsko	Catalonia		41,737	2,328	n31	ano	ne
GBLN0823-06	BOLD:AAB2344	DQ922851	A. niobe	A. adippe**	A. adippe			Španělsko					n31	ano	ne
LOWA714-06	BOLD:AAB2322	FJ663287	A. adippe	A. aglaja*	A. aglaja	V. Lukhtanov	10. 07. 1984	Kazachstán	East Kazakhstan	Zyryanovsk distr., Borodino	49,483	84,1	n1	ne	ne
WMB1461-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. auresiana	A. auresiana	M. Khaldi & Kh. Rebbas	16. 06. 2012	Alžírsko			36,63	4,598	n24	ano	ne
WMB3786-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. auresiana	A. auresiana	M. Khaldi & Kh. Rebbas	11. 07. 2012	Alžírsko	Bouira		36,483	4,251	n25	ano	ne
WMB666-12	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. auresiana	A. auresiana	R. Vila	03. 06. 2006	Maroko	Meknes-Tafilalet Region		32,986	-5,07	n23	ano	ne
4 WMB695-12	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. auresiana	A. auresiana	R. Vila, V. Dinca & R. Voda	02. 07. 2011	Maroko	Meknes-Tafilalet Region		33,542	-5,115	n23	ano	ne
WMB378-11	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. auresiana	A. auresiana	R. Vila, V. Dinca & R. Voda	25. 06. 2011	Maroko	Tangier-Tetouan Region		35,119	-5,194	n26	ano	ne
WMB233-11	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. elisa	A. elisa (A. niobe)	L. Dapporto	12. 07. 2009	Itálie	Sardinia		40,06	9,28	n10	ano	ne
WMB905-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. elisa	A. elisa (A. niobe)	L. Dapporto	01. 06. 2009	Itálie	Sardinia		40,049	9,3	n10	ano	ne
WMB1897-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. elisa	A. elisa (A. niobe)	X. Merit	17. 07. 2011	Itálie	Sardinia		40,079	9,355	n10	ano	ne
WMB760-12	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. elisa	A. elisa (A. niobe)	X. Merit	17. 07. 2011	Itálie	Sardinia		40,079	9,355	n10	ano	ne
GBLN0825-06	BOLD:AAJ8357	DQ922853	A. kamala	-	A. kamala			Indie					n3	ano	ne
MABUT280-12	BOLD:AAJ8357	KC158318	A. kamala	-	A. kamala	M. Zia	11. 07. 2012	Pakistán	Azad Kashmir	Kel	34,81	74,26	n4	ano	ne
MABUT279-12	BOLD:AAJ8357	KC158319	A. kamala	-	A. kamala	Q. Abbas	10. 07. 2012	Pakistán	Azad Kashmir	Kel	34,82	74,35	n4	ano	ne
LOWAB138-07	BOLD:AAJ8357		Lepidoptera	-	A. kamala	A. Sourakov	07. 06. 1997	Nepál			29	82,4	n2	ano	ne
GBLN4506-14	BOLD:ACD2166	KF723549	A. nerippe	-	A. nerippe		01. 10. 2010	Korea		Gg,Paju			n7	ano	ne

BOLD Process ID	BOLD BIN	GenBank Accession n.	Původní určení	Naše určení podle fotografie	Určení podle COI	Sběratel	Datum odchyty	Země odchyty	Nižší samos. celek	Lokalita	Zem. šířka	Zem. délka	č. haplo-typu	Použito v analýze podr. Fabriciana	Použito v analýze A. niobe
GBMIN18177-13	BOLD:ACD2166	JX445987	A. nerippe	-	A. nerippe		08. 07. 1976	Korea					n8	ano	ne
GBMIN18203-13	BOLD:ACD2166	JX445988	A. nerippe	-	A. nerippe		15. 07. 1975	Korea					n9	ano	ne
GBMIN18184-13	BOLD:ABY9182	JX445973	A. niobe	-	A. niobe		31. 07. 1959	Korea					n13	ano	ano
GBMIN18185-13	BOLD:ABY9182	JX445971	A. niobe	-	A. niobe		31. 07. 1959	Korea					n13	ano	ano
GBMIN18210-13	BOLD:ABY9182	JX445974	A. niobe	-	A. niobe		30. 07. 1959	Korea					n13	ano	ano
GBMIN18211-13	BOLD:ABY9182	JX445972	A. niobe	-	A. niobe		31. 07. 1959	Korea					n13	ano	ano
GBLN4488-14	BOLD:ABY9182	KF723548	A. niobe	-	A. niobe		15. 07. 2007	Rusko		S. Primorje Reg.			n13	ano	ano
LEFIJ540-10	BOLD:ABY9182	JF853657	A. niobe	A. niobe	A. niobe	T. Mutanen	21. 07. 2001	Finsko		Nylandia, Hanko	59,814	23,078	n21	ano	ano
LEFIJ279-10	BOLD:ABY9182	JF853516	A. niobe	A. niobe	A. niobe	M. Mutanen, N. Mutanen & A. Mutanen	18. 07. 2010	Finsko		Nylandia, Tammisaari	59,904	23,729	n21	ano	ano
LEFIJ280-10	BOLD:ABY9182	JF853517	A. niobe	A. niobe	A. niobe	M. Mutanen, N. Mutanen & A. Mutanen	18. 07. 2010	Finsko		Nylandia, Tammisaari	59,904	23,729	n21	ano	ano
LOWA211-06	BOLD:ABY9182	FJ663293	A. niobe	A. niobe	A. niobe	V. Lukhtanov	19. 07. 1998	Kazachstán		Ust-Kamenogorsk region	49,117	86,033	n13	ano	ano
LOWA212-06	BOLD:ABY9182	FJ663292	A. niobe	A. niobe	A. niobe	V. Lukhtanov	19. 07. 1998	Kazachstán		Ust-Kamenogorsk region	49,117	86,033	n13	ano	ano
GWORO812-09	BOLD:ABY9182	GU688468	A. niobe	A. niobe	A. niobe	M. Seizmair	14. 08. 2009	Německo	Bavaria	Samerberg (RO) Frasdorf			n19	ano	ano
GBLAD464-14	BOLD:ABY9182		A. niobe	A. niobe	A. niobe	P. Stamer	22. 07. 2008	Německo	Bavaria	Oberbayern, Diessen	479,378	110,874	n20	ano	ano
GWORA2504-09	BOLD:ABY9182	HM393220	A. niobe	A. niobe	A. niobe	R. Sturm	04. 08. 2005	Německo	Bavaria	Oberbayern, Sudelfeld, Arzmoos	47,67	12,04	n19	ano	ano
PHLAH743-12	BOLD:ABY9182	KM572347	A. niobe	A. niobe	A. niobe	P. Huemer	27. 06. 2012	Rakousko	Vorarlberg	Bludesch, Umg. Jordan	47,203	9,747	n18	ano	ano
EZROM034-08	BOLD:ABY9182	HQ004032	A. niobe	A. niobe	A. niobe	V. Dinca	18. 07. 2006	Rumunsko	Alba	Apuseni Mts., Rimetea (Piatra Secuiului)	46,45	23,567	n6	ano	ano
EZRMN337-08	BOLD:ABY9182	HQ004026	A. niobe	A. niobe	A. niobe	M. Goia	20. 06. 2008	Rumunsko	Cluj	Transylvania, Dealul Sf. Pavel (Cluj-Napoca)	46,767	23,5	n19	ano	ano
EZROM035-08	BOLD:ABY9182	HQ004031	A. niobe	A. niobe	A. niobe	V. Dinca & R. Vila	01. 06. 2007	Rumunsko	Maramures	Maramures, Cheile Babei	47,317	23,733	n19	ano	ano

BOLD Process ID	BOLD BIN	GenBank Accession n.	Původní určení	Naše určení podle fotografie	Určení podle COI	Sběratel	Datum odchyty	Země odchyty	Nižší samos. celek	Lokalita	Zem. šířka	Zem. délka	č. haplo-typu	Použito v analýze podr. Fabriciana	Použito v analýze A. niobe
EULEP139-14	BOLD:ABY9182	KP870945	A. niobe	A. niobe	A. niobe	G. Ardeleanu	28. 06. 2009	Rumunsko	Maramures	Maramures, Tibles	47,5	24,27	n19	ano	ano
EZROM781-08	BOLD:ABY9182	HQ004028	A. niobe	A. niobe	A. niobe	V. Dinca & R. Vila	24. 05. 2007	Rumunsko	Tulcea	Dobrogea, 8 Km S of Babadag (Babadag forest)	44,816	28,689	n20	ano	ano
EZROM783-08	BOLD:ABY9182	HQ004030	A. niobe	A. niobe	A. niobe	V. Dinca & R. Vila	05. 06. 2008	Rumunsko	Tulcea	Dobrogea, 8 Km S of Babadag (Babadag forest)	44,816	28,689	n20	ano	ano
EZROM599-08	BOLD:ABY9182	HQ004027	A. niobe	A. niobe	A. niobe	V. Dinca & R. Vila	24. 05. 2007	Rumunsko	Tulcea	Dobrogea, Babadag forest	44,816	28,689	n20	ano	ano
EZROM782-08	BOLD:ABY9182	HQ004029	A. niobe	A. niobe	A. niobe	V. Dinca	30. 06. 2008	Rumunsko	Tulcea	Dobrogea, Babadag forest (10 Km S of Babadag)	44,816	28,689	n20	ano	ano
EZSPN655-09	BOLD:ABY9182	GU676491	A. niobe	A. niobe	A. niobe	S. Montagud , J. A. Garcia-Alama & J. Garcia	17. 07. 2008	Španělsko	Andalusia	Granada, Albergue de S. Francisco, Gueejar Sierra	37,107	-3,392	n13	ano	ano
EZSPN730-09	BOLD:ABY9182	GU676417	A. niobe	A. niobe	A. niobe	S. Montagud , J. A. Garcia-Alama & J. Garcia	18. 07. 2008	Španělsko	Andalusia	Granada, Laguna Seca, Hueneja	37,097	-2,97	n13	ano	ano
EZSPC1218-10	BOLD:ABY9182	HM901417	A. niobe	A. niobe	A. niobe	V. Dinca	15. 07. 2009	Španělsko	Andalusia	Granada, Loma de San Francisco (Sierra Nevada)	37,112	-3,406	n13	ano	ano
EZSPC1201-10	BOLD:ABY9182	HM901401	A. niobe	A. niobe	A. niobe	M.L. Munguira	16. 07. 2009	Španělsko	Andalusia	Granada, San Juan (Sierra Nevada)	37,094	-3,115	n13	ano	ano
EZSPN825-09	BOLD:ABY9182	GU676325	A. niobe	A. niobe	A. niobe	J. Hernandez-Roldan	21. 06. 2008	Španělsko	Castilla y Leon	Avila, Hoyocasero, Venta Rasquilla	40,377	-5,018	n13	ano	ano
EZSPN528-09	BOLD:ABY9182	GU676930	A. niobe	A. niobe	A. niobe	J. Gonzalez	12. 06. 2007	Španělsko	Castilla y Leon	Leon, Vega de Gordon	42,917	-5,634	n13	ano	ano
EZSPC242-09	BOLD:ABY9182	KP870266	A. niobe	A. niobe	A. niobe	J. Dantart	19. 08. 2008	Španělsko	Catalonia		42,35	1,85	n6	ano	ano
EZSPC264-09	BOLD:ABY9182	KP870428	A. niobe	A. niobe	A. niobe	R. Vila & V. Dinca	01. 08. 2008	Španělsko	Catalonia		42,776	0,832	n6	ano	ano
EZSPC233-09	BOLD:ABY9182	KP870763	A. niobe	A. niobe	A. niobe	R. Vila	05. 07. 2008	Španělsko	Catalonia		42,765	0,711	n14	ano	ano
EZSPC247-09	BOLD:ABY9182	KP870263	A. niobe	A. niobe	A. niobe	R. Vila	09. 07. 2008	Španělsko	Catalonia		42,354	1,951	n6	ano	ano
EZSPC886-10	BOLD:ABY9182	HM901726	A. niobe	A. niobe	A. niobe	E. Garcia-Barros	26. 06. 2009	Španělsko	Comunidad de Madrid	Puerto de La Morcuera	40,867	-3,848	n13	ano	ano
EZSPN904-09	BOLD:ABY9182	GU676251	A. niobe	A. niobe	A. niobe	M.L. Munguira	10. 07. 2008	Španělsko	Comunidad de Madrid	Puerto de la Morcuera, Rascafria	40,876	-3,843	n13	ano	ano
EZSPC1083-10	BOLD:ABY9182	HM901284	A. niobe	A. niobe	A. niobe	M.L. Munguira	22. 06. 2008	Španělsko	Comunidad de Madrid	Manzanares el Real	40,752	3,838	n13	ano	ano
LOWAB001-07	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	A. Sourakov		Arménie			40,083	44,917	n11	ano	ano

BOLD Process ID	BOLD BIN	GenBank Accession n.	Původní určení	Naše určení podle fotografie	Určení podle COI	Sběratel	Datum odchyty	Země odchyty	Nižší samos. celek	Lokalita	Zem. šířka	Zem. délka	č. haplo-typu	Použito v analýze podr. Fabriciana	Použito v analýze A. niobe
LOWAB007-07	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	A. Sourakov		Arménie			40,083	44,917	n11	ano	ano
LOWAB053-07	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	A. Sourakov		Arménie			40,083	44,917	n11	ano	ano
SNA084-07	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	T. J. Simonsen	23. 07. 2002	Dánsko					n6	ano	ano
WMB3676-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	R. Vála	13. 08. 2011	Francie			45,637	6,048	n19	ano	ano
WMB3888-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	V. Dinca & R. Voda		Francie			44,209	7,1	n19	ano	ano
WMB3951-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	V. Dinca & R. Voda		Francie			43,323	5,703	n6	ano	ano
WMB3982-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	V. Dinca & R. Voda		Francie			43,831	6,955	n19	ano	ano
EZROM358-08	BOLD:ABY9182	KP870789	Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	S. Viader	24. 07. 2007	Francie			42,417	2,017	n6	ano	ano
WMB3511-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	R. Vála	11. 08. 2010	Francie	Provence-Alpes-Cote d'Azur		44,247	6,665	n19	ano	ano
WMB3513-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	R. Vála	11. 08. 2010	Francie	Provence-Alpes-Cote d'Azur		44,292	6,594	n17	ano	ano
WMB3517-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	R. Vála	11. 08. 2010	Francie	Provence-Alpes-Cote d'Azur		44,292	6,594	n19	ano	ano
WMB1617-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	V. Dinca & R. Voda	09. 08. 2012	Francie	Provence-Alpes-Cote d'Azur		44,198	7,152	n19	ano	ano
WMB1849-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	R. Vála	05. 08. 2011	Francie	Rhone-Alpes		44,886	5,568	n19	ano	ano
GWOTI211-12	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	M. Franzen		Gruzie			424,908	457,142	n15	ano	ano
WMB4322-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	L. Dapporto		Itálie			44,102	10,234	n12	ano	ano
WMB2022-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	L. Dapporto	29. 07. 2012	Itálie	Abruzzi		42,434	13,55	n12	ano	ano
WMB2061-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	L. Dapporto	30. 07. 2012	Itálie	Basilicata		39,93	16,17	n12	ano	ano
WMB2259-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	L. Dapporto	02. 07. 2009	Itálie	Calabria		38,388	16,207	n12	ano	ano
WMB802-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	R. Vála	11. 07. 2007	Itálie	Calabria		39,347	16,399	n12	ano	ano

BOLD Process ID	BOLD BIN	GenBank Accession n.	Původní určení	Naše určení podle fotografie	Určení podle COI	Sběratel	Datum odchyty	Země odchyty	Nižší samos. celek	Lokalita	Zem. šířka	Zem. délka	č. haplo-typu	Použito v analýze podr. Fabriciana	Použito v analýze A. niobe
WMB844-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	R. Vila	10. 07. 2007	Itálie	Calabria		39,903	16,14	n12	ano	ano
LEATC096-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	P. Huemer	26. 07. 2013	Itálie	Trentino-Alto Adige		46,543	10,489	n18	ano	ano
BPAL2233-13	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	V.A.Lukhtanov & A.V.Novikova	22. 06. 2013	Izrael			333,127	35,795	n11	ano	ano
GBLAB1809-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	A. H. Segerer	27. 07. 2005	Německo	Bavaria		473,895	10,32	n18	ano	ano
LEATG058-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	S. Erlebach	05. 07. 2002	Rakousko	Tirol	n19	47,215	11,199	n19	ano	ano
LEATG059-14	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	S. Erlebach	05. 07. 2002	Rakousko	Tirol		47,215	11,199	n18	ano	ano
EZHBA093-07	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	Y. Chevnin	11. 07. 2003	Rusko	Irkutsk	n22	51,6	103,6	n22	ano	ano
EZHBA094-07	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	Y. Chevnin	11. 07. 2003	Rusko	Irkutsk		51,6	103,6	n13	ano	ano
8 EZHBA096-07	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	Y. Chevnin	10. 07. 2003	Rusko	Irkutsk		51,7	103,7	n13	ano	ano
EZHBA097-07	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	Y. Chevnin	10. 07. 2003	Rusko	Irkutsk		51,7	103,7	n13	ano	ano
EZHBA098-07	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	Y. Chevnin	07. 07. 2003	Rusko	Irkutsk		51,7	103,7	n16	ano	ano
EZHBA296-07	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	A. Sakharov	27. 07. 1990	Rusko	Sakha-Yakutiya		61,8	129,7	n13	ano	ano
EZHBA297-07	BOLD:ABY9182		Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	A. Sakharov	27. 07. 1990	Rusko	Sakha-Yakutiya		61,8	129,7	n13	ano	ano
EZROM359-08	BOLD:ABY9182	KP870818	Lepidoptera	A. niobe	A. niobe	S. Viader	28. 06. 2003	Španělsko	Catalonia		42,623	1,094	n6	ano	ano

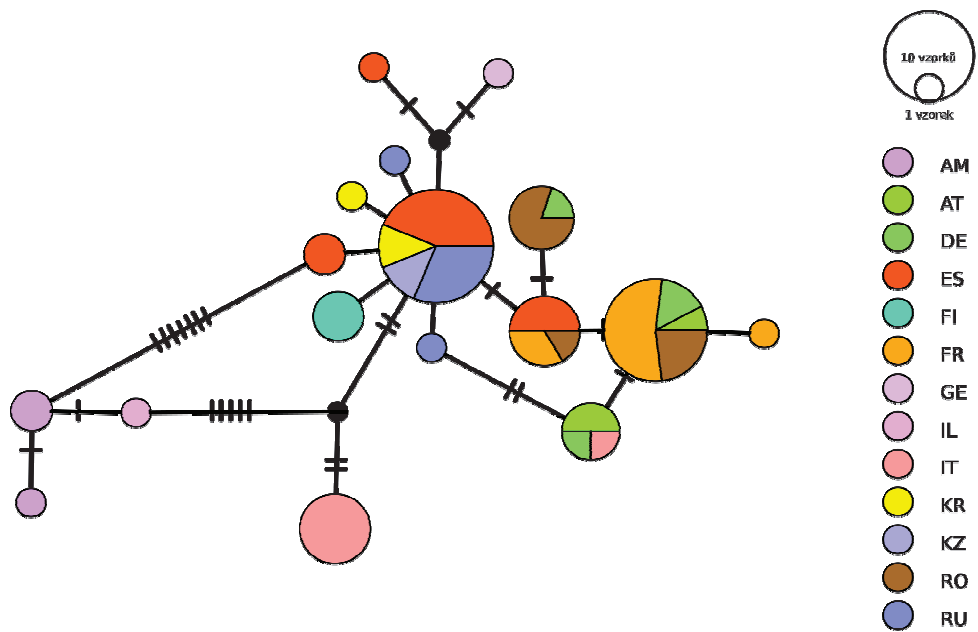
Příloha 3 – Použité mikrosatelitové lokusy

Tab. II: Použité mikrosatelitové lokusy, sekvence příslušných primerů a genetické charakteristiky lokusů (GenAlEx, na základě českých populací). Hodnoty pro celkové populace *A. adippe/A.niobe*. Set – set primerů pro multiplex PCR, N_a – průměrný počet alel na lokus, H_e – průměrná očekávaná heterozygosita, H_o – průměrná pozorovaná heterozygosita, F_{it} – koeficient inbreedingu. Podrobnosti viz Zima *et al.* (2013).

Kód	Sekvence primerů	Motiv	Set	N_a	H_e	H_o	F_{it}
An_25	F: TTTAAAAGAGCTTGCTGCGGT R: TGCATCAAATGTGTTACGTGC	tg	1	4	0,59	0,56	0,05
An_26	F: TGTCGAATCAAGAAATTAGAATGC R: CAAGAATTGCTCGTTTAAAAGTATT	atct	1	6	0,41	0,29	0,28
An_30	F: GCCATTATTGTATCCTCCTTGG R: CGTCAAAAGAGCAATCAGTGG	ttg	1	5	0,40	0,42	-0,02
An_20	F: TAGATCCAGTGGTCGCCTTT R: ATATGACAGTCGGGAGACGG	tgta	2	33	0,93	0,51	0,45
An_24	R: ATGAATGGAGTTTCGCCAAG F: GTGCAGGGAAGGAAGAGAAG	ag	2	10	0,66	0,50	0,25
An_27	F: ACCAAGTTCCACCCATCTGA R: CACAGAAGCCACTGCCACTA	ctt	2	6	0,24	0,27	-0,12

Příloha 4 – Párové F_{st}

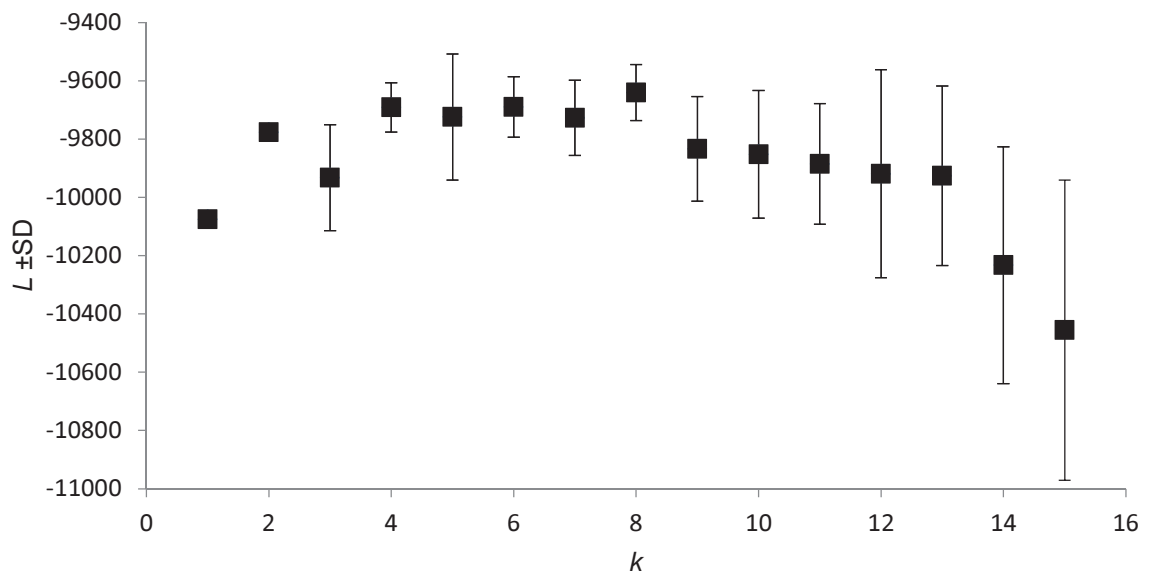
Tab. III: Párové F_{st} a jeho signifikance vypočtené v programu Arlequin.



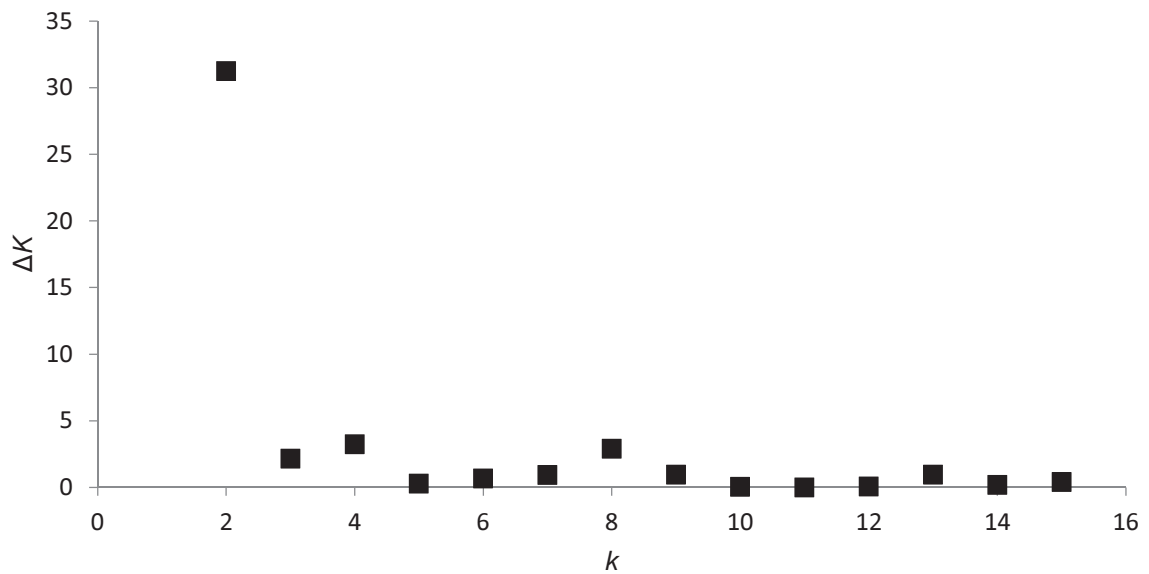
Obr 9. IntNJ síť ze sekvencí *A. niobe*.

Příloha 6 – Evluace výsledků STRUCTURE

a)

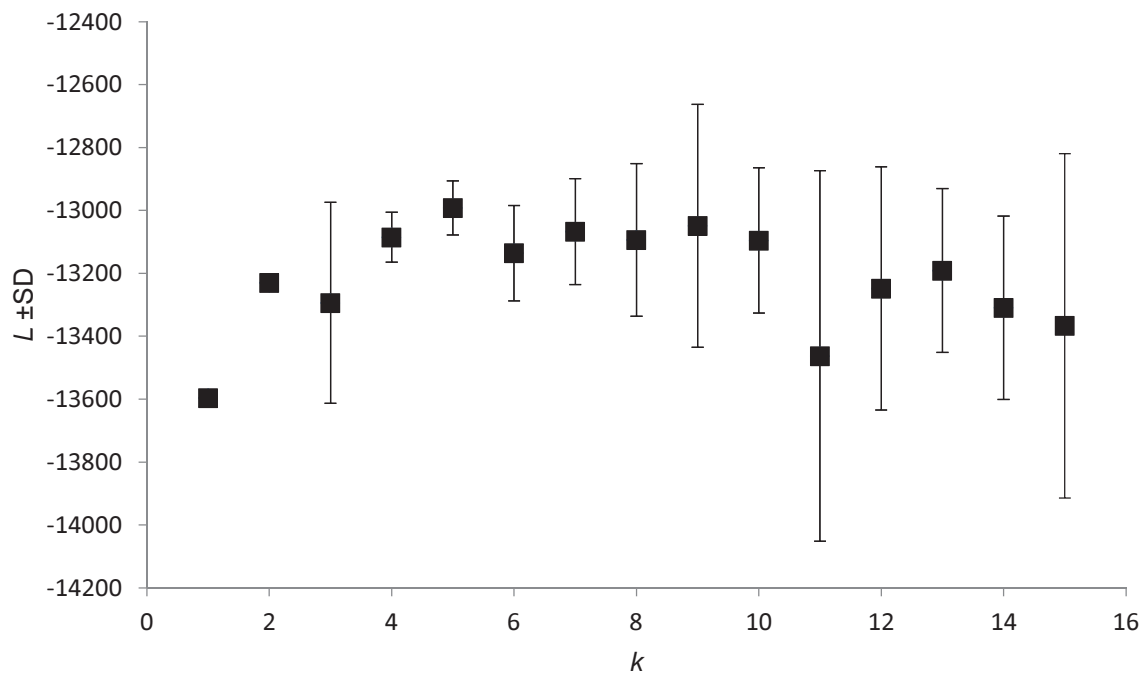


b)

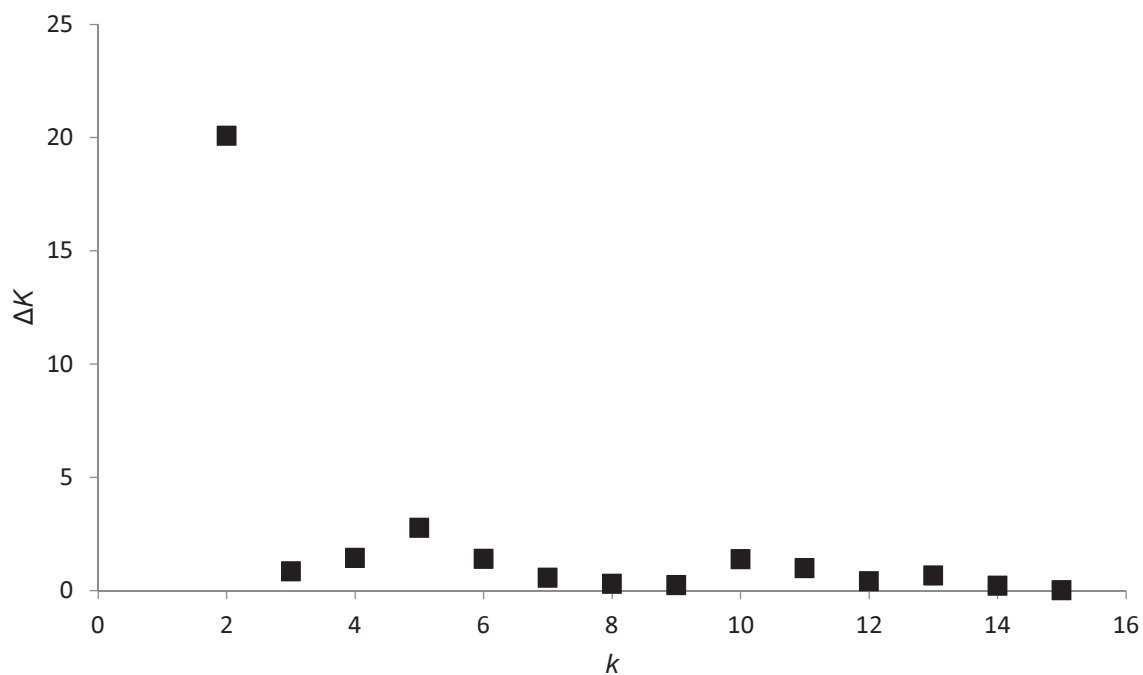


Obr. 10: Sumarizace výsledků ze STRUCTURE podle Evanno *et al.* (2005) pro dataset s 24 vybranými dobře zastoupenými populacemi: a) průměrný likelihood pro každé K vypočtený z 10 opakování a jeho směrodatná odchylka; b) ΔK , průměr absolutních hodnot druhých derivací likelihoodu, standardizovaný směrodatnou odchylkou likelihoodu.

a)



b)



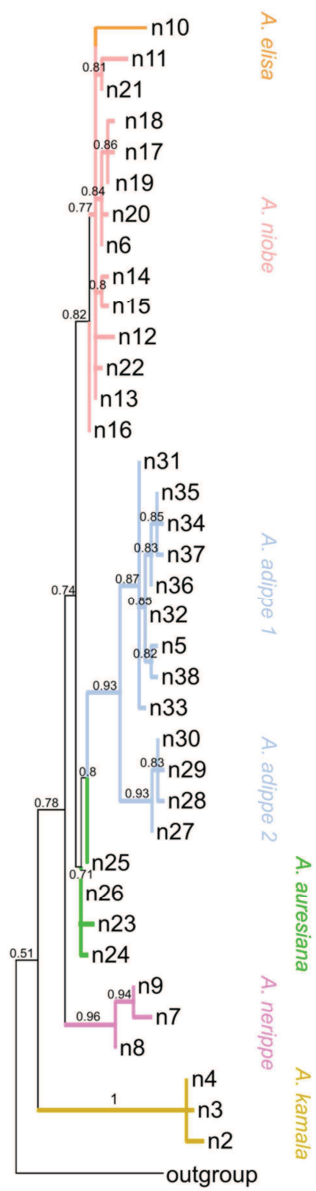
Obr. 11: Sumarizace výsledků ze STRUCTURE podle Evanno *et al.* (2005) pro všech s 828 vzorků: a) průměrný likelihood pro každé K vypočtený z 10 opakování a jeho směrodatná odchylka; b) ΔK , průměr absolutních hodnot druhých derivací likelihoodu, standardizovaný směrodatnou odchylkou likelihoodu.

Příloha 7 – Structure plot pro celý dataset



Obr. 12: STRUCTURE plot pro celý dataset; lokality viz Obr. 1.

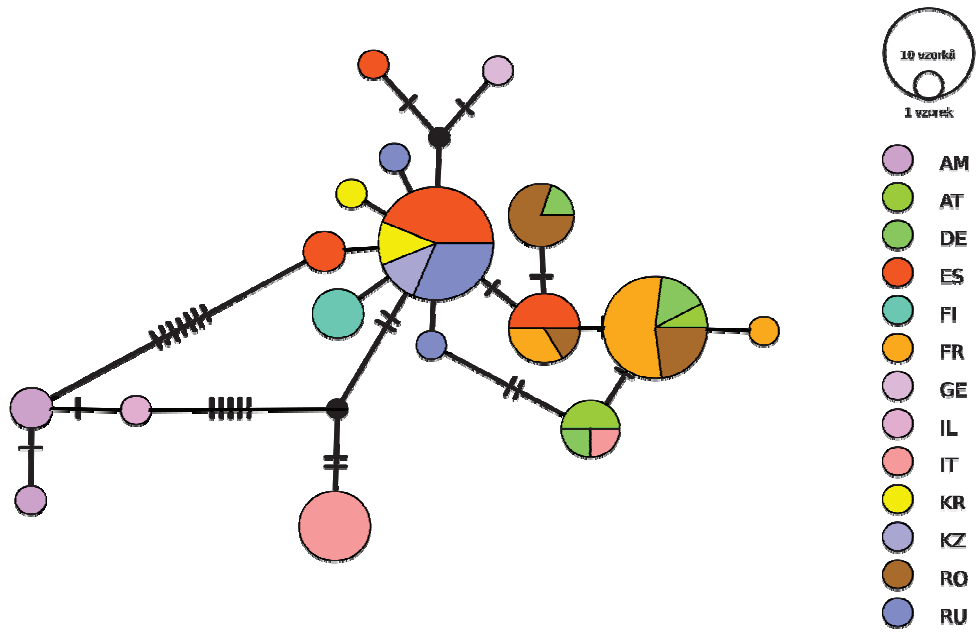
Příloha 8 – Fylogenetický strom



Obr. 13: Fylogenetický strom vypočtený programme PhyML

	Alpy	Arménie	Bulharsko	Bzové	Dinotice	Kobylská	Losový	Lušová	Podfaté	Vranča	Frísko	Stolberg	Bornholm	Aarhus	Estonsko	Francie	Řecko	Makedoni	Rumunskc	Povlen	Stol	Žagubica	Stř. Slover	Záp. Slove
Alpy	0																							
Arménie	0.07897	0																						
Bulharsko	0.13846	0.03591	0																					
Bzové	0.03007	0.06722	0.08085	0																				
Dinotice	0.0213	0.07865	0.12589	0.01271	0																			
Kobylská	0.05333	0.09188	0.13627	0.02913	0.04671	0																		
Losový	0.01743	0.07177	0.11136	0.01016	0.0013	0.02674	0																	
Lušová	0.02771	0.09712	0.13498	0.02437	0.02211	0.02076	0.00607	0																
Podfaté	0.01607	0.05107	0.10008	0.01241	0.00288	0.02478	0.0003	0.02196	0															
Vranča	0.02742	0.07772	0.11413	-0.00059	0.01041	0.01301	0.00629	0.0111	0.0128	0														
Frísko	0.04716	0.13375	0.1845	0.05847	0.05174	0.07773	0.05533	0.06312	0.04177	0.06817	0													
Stolberg	0.15859	0.20637	0.2382	0.1531	0.16284	0.12377	0.14367	0.12826	0.14979	0.16015	0.16751	0												
Bornholm	0.02723	0.06521	0.10311	0.03276	0.03496	0.03115	0.02594	0.02945	0.02999	0.03602	0.06997	0.13589	0											
Aarhus	0.03162	0.08397	0.13506	0.04249	0.0227	0.04209	0.02591	0.02938	0.02753	0.02998	0.07071	0.15419	0.04363	0										
Estonsko	0.04375	0.07908	0.1029	0.01453	0.01277	0.07075	0.01624	0.04509	0.02108	0.02441	0.08728	0.20055	0.05099	0.06292	0									
Francie	0.00535	0.06325	0.11006	0.04646	0.05443	0.06937	0.04158	0.06037	0.03726	0.05541	0.09931	0.17967	0.04193	0.06122	0.04386	0								
Řecko	0.11238	0.02997	0.01608	0.06955	0.10469	0.13874	0.09848	0.12819	0.0897	0.09741	0.18091	0.2629	0.09311	0.11864	0.08299	0.08819	0							
Makedoni	0.06919	0.02444	0.03656	0.04777	0.05339	0.09807	0.05343	0.07714	0.04418	0.05678	0.12574	0.23481	0.06051	0.06762	0.05287	0.07891	0.02271	0						
Rumunskc	0.03304	0.08482	0.11406	0.03356	0.02588	0.03679	0.01598	0.01467	0.02987	0.02979	0.0709	0.12059	0.02913	0.03067	0.05382	0.05947	0.10924	0.06702	0					
Povlen	0.06192	0.00909	0.02569	0.03581	0.05378	0.07875	0.04796	0.07202	0.03434	0.05484	0.10909	0.18522	0.05231	0.05868	0.04965	0.05049	0.01049	0.01435	0.06066	0				
Stol	0.10354	0.01578	0.01969	0.07186	0.09173	0.12267	0.07722	0.11161	0.06931	0.0991	0.14423	0.22524	0.07793	0.10134	0.08575	0.08986	0.01522	0.02691	0.0834	0.00462	0			
Žagubica	0.08765	0.03086	0.00692	0.04585	0.07623	0.08734	0.06451	0.08328	0.064	0.06779	0.13497	0.18539	0.06069	0.07942	0.07025	0.07303	0.01872	0.02301	0.05592	0.01151	0.01446	0		
Stř. Slover	0.02459	0.0674	0.08946	-0.00113	0.00567	0.03482	0.00955	0.02396	0.00533	0.00477	0.0627	0.15177	0.03353	0.02865	0.01441	0.03832	0.06742	0.03869	0.02791	0.03351	0.07363	0.05277	0	
Záp. Slove	0.03383	0.03937	0.0647	0.00571	0.0325	0.05511	0.03095	0.05977	0.02064	0.01682	0.08958	0.19053	0.04364	0.06382	0.01859	0.02941	0.03885	0.03903	0.06023	0.02139	0.05776	0.04006	0.00996	0

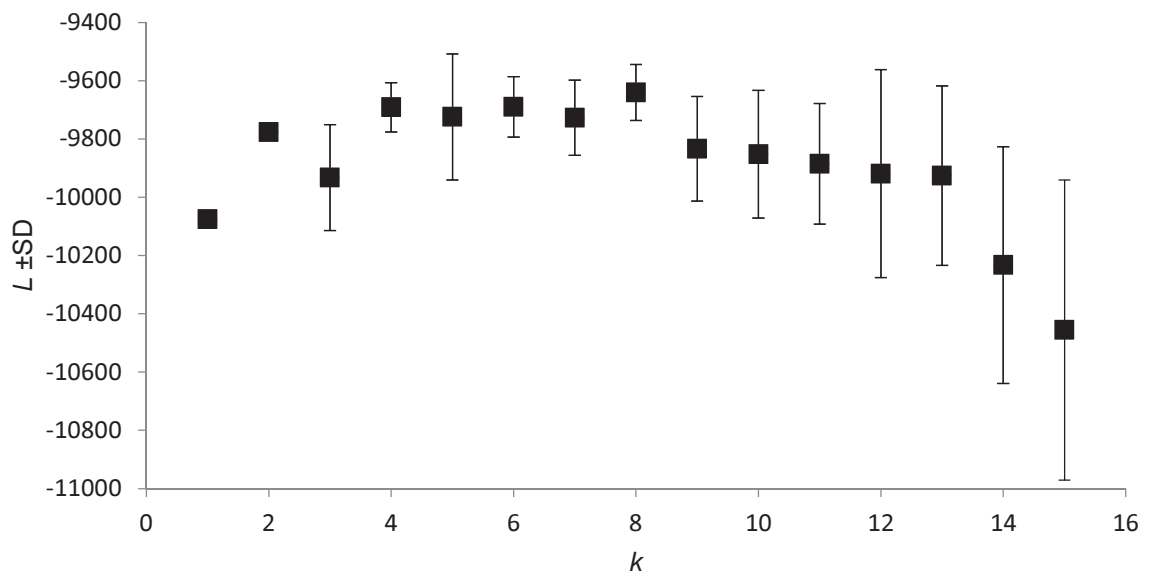
	Alpy	Arménie	Bulharsko	Bzové	Dinotice	Kobylská	Losový	Lušová	Podfaté	Vranča	Frísko	Stolberg	Bornholm	Aarhus	Estonsko	Francie	Řecko	Makedoni	Rumunskc	Povlen	Stol	Žagubica	Stř. Slover	Záp. Slove
Alpy	*																							
Arménie	0.00016	*																						
Bulharsko	0.00000	0.00232	*																					
Bzové	0.02498	0.00000	0.00000	*																				
Dinotice	0.13953	0.00000	0.00000	0.15668	*																			
Kobylská	0.00106	0.00000	0.00000	0.00778	0.00071	*																		
Losový	0.17399	0.00000	0.00000	0.18026	0.77576	0.01955	*																	
Lušová	0.02340	0.00000	0.00000	0.00823	0.02686	0.02728	0.35123	*																
Podfaté	0.31227	0.00276	0.00000	0.22868	0.71645	0.07384	0.81379	0.05138	*															
Vranča	0.07577	0.00000	0.00000	0.77096	0.32918	0.21553	0.47344	0.18426	0.32504	*														
Frísko	0.02679	0.00000	0.00000	0.00069	0.00623	0.00004	0.00079	0.00013	0.04630	0.00104	*													
Stolberg	0.00001	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00001	*												
Bornholm	0.02849	0.00000	0.00000	0.00207	0.00357	0.00393	0.00899	0.00190	0.01902	0.00323	0.00005	0.00000	*											
Aarhus	0.01278	0.00000	0.00000	0.00005	0.02330	0.00026	0.00762	0.00188	0.02616	0.00654	0.00002	0.00000	0.00009	*										
Estonsko	0.00509	0.00000	0.00000	0.08390	0.20034	0.00000	0.09580	0.00028	0.09926	0.03417	0.00002	0.00000	0.00004	0.00000	*									
Francie	0.57226	0.00026	0.00000	0.00234	0.00166	0.00000	0.00414	0.00001	0.03756	0.00172	0.00000	0.00000	0.00261	0.00004	0.00379	*								
Řecko	0.00000	0.00679	0.05731	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00002	*							
Makedoni	0.00325	0.11084	0.00945	0.00230	0.00278	0.00000	0.00134	0.00002	0.02852	0.00222	0.00001	0.00000	0.00035	0.00014	0.00082	0.00077	0.08393	*						
Rumunskc	0.02920	0.00000	0.00000	0.00158	0.02690	0.00299	0.09199	0.08410	0.03735	0.01204	0.00013	0.00000	0.00056	0.00400	0.00010	0.00026	0.00000	0.00050	*					
Povlen	0.00039	0.24184	0.00746	0.00048	0.00008	0.00000	0.00002	0.00000	0.01089	0.00005	0.00000	0.00000	0.00002	0.00001	0.00004	0.00044	0.14589	0.20009	0.00000	*				
Stol	0.00000	0.07239	0.02205	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00006	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.05657	0.03694	0.00000	0.36696	*			
Žagubica	0.00001	0.00408	0.29730	0.00012	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00040	0.00001	0.00000	0.00000	0.00003	0.00000	0.00000	0.00004	0.03575	0.07233	0.00002	0.11844	0.06459	*		
Stř. Slover	0.03740	0.00000	0.00000	0.78748	0.40508	0.00178	0.17564	0.00598	0.47120	0.43649	0.00006	0.00000	0.00079	0.00114	0.07101	0.00327	0.00000	0.00445	0.00341	0.00046	0.00000	0.00001	*	
Záp. Slove	0.07210	0.01246	0.00009	0.48597	0.03011	0.00052	0.02128	0.00009	0.22489	0.22689	0.00008	0.00000	0.00172	0.00001	0.12936	0.08289	0.00544	0.03671	0.00013	0.06742	0.00012	0.00471	0.28504	*



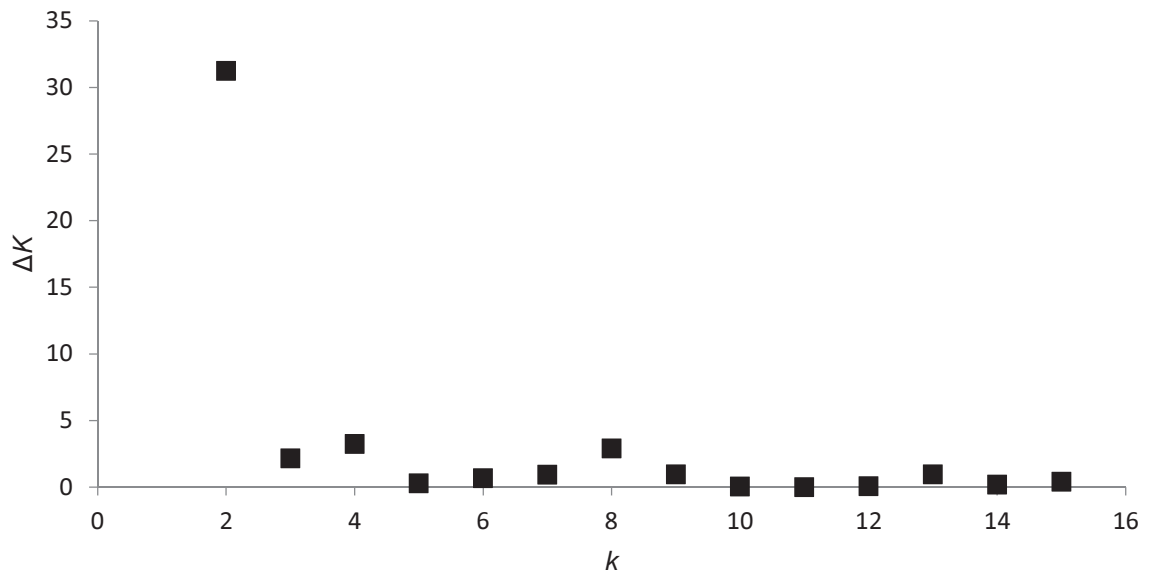
Obr 9. IntNJ síť ze sekvencí *A. niobe*.

Příloha 6 – Evluace výsledků STRUCTURE

a)

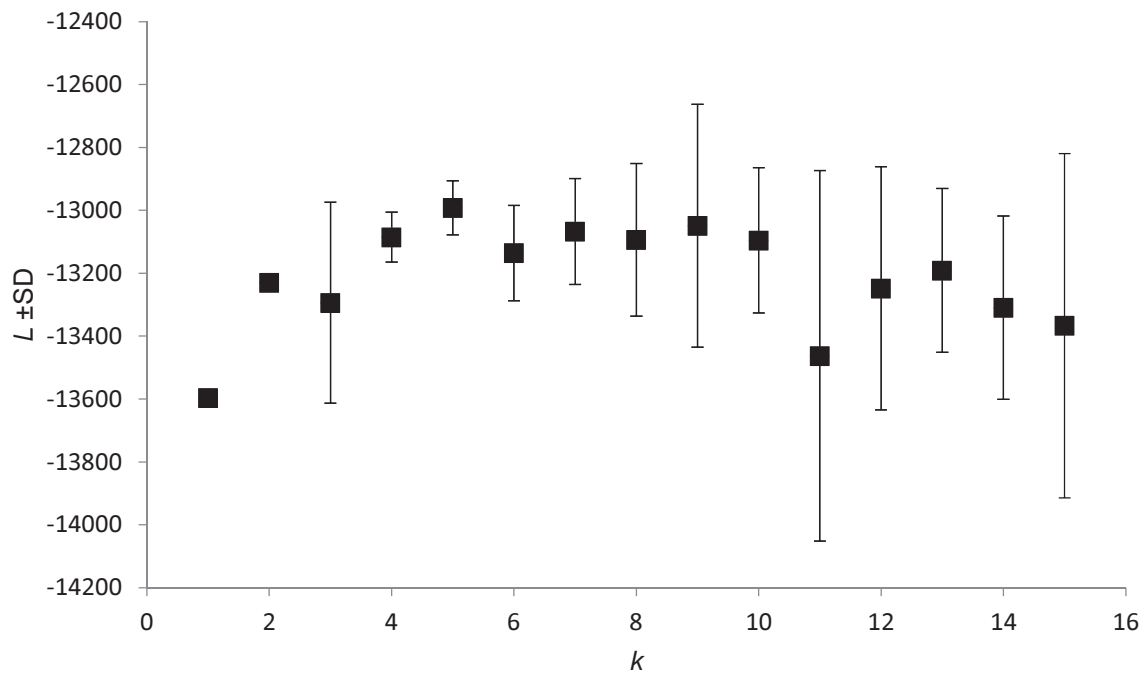


b)

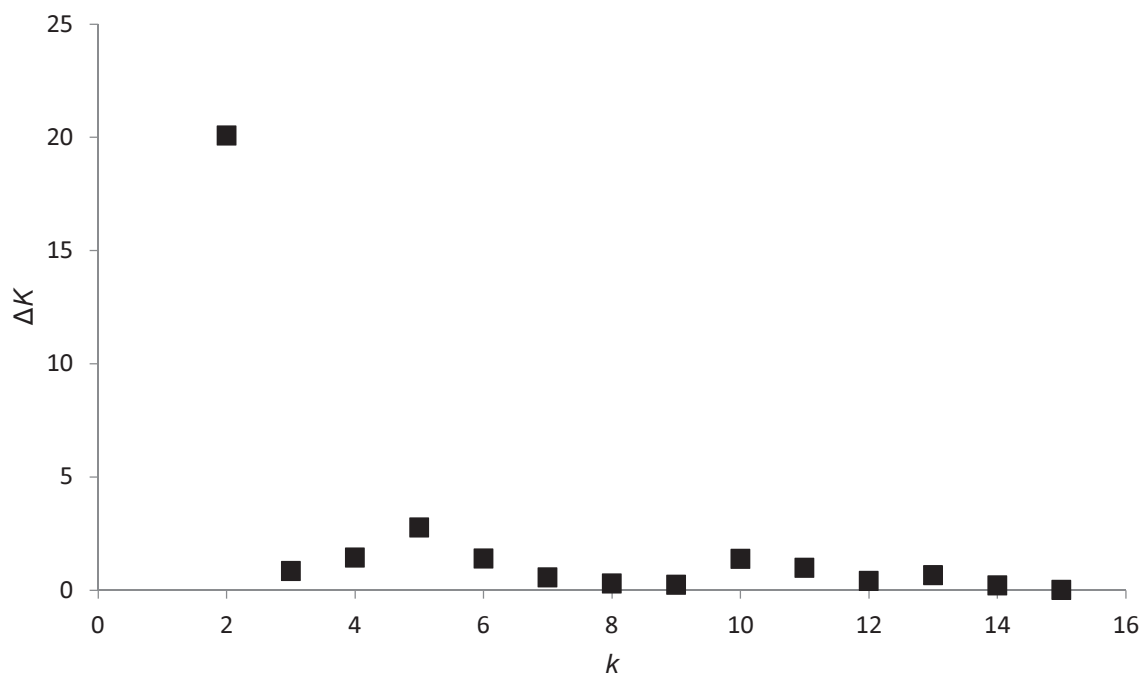


Obr. 10: Sumarizace výsledků ze STRUCTURE podle Evanno *et al.* (2005) pro dataset s 24 vybranými dobře zastoupenými populacemi: a) průměrný likelihood pro každé K vypočtený z 10 opakování a jeho směrodatná odchylka; b) ΔK , průměr absolutních hodnot druhých derivací likelihoodu, standardizovaný směrodatnou odchylkou likelihoodu.

a)

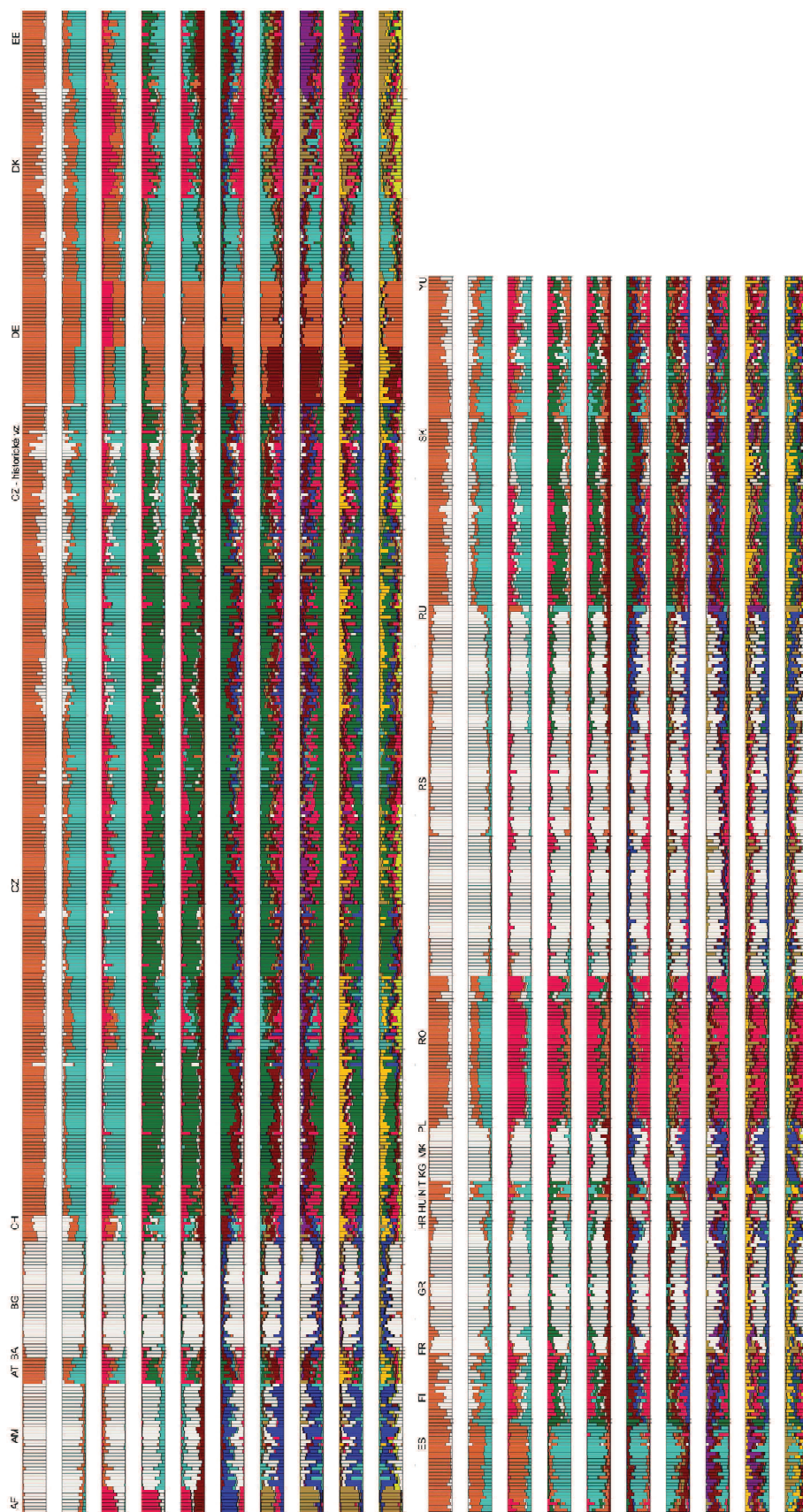


b)



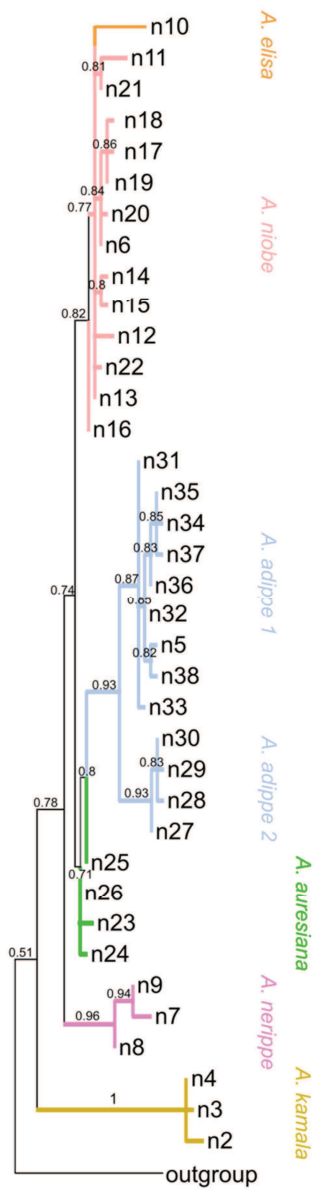
Obr. 11: Sumarizace výsledků ze STRUCTURE podle Evanno *et al.* (2005) pro všech s 828 vzorků: a) průměrný likelihood pro každé K vypočtený z 10 opakování a jeho směrodatná odchylka; b) ΔK , průměr absolutních hodnot druhých derivací likelihoodu, standardizovaný směrodatnou odchylkou likelihoodu.

Příloha 7 – Structure plot pro celý dataset



Obr. 12: STRUCTURE plot pro celý dataset; lokality viz Obr. 1.

Příloha 8 – Fylogenetický strom



Obr. 13: Fylogenetický strom vypočtený programme PhyML