

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Katedra biologických disciplín

Bakalářská práce

**Původ a genetická rozmanitost českých
populací kriticky ohroženého hnědáka
květelového**

Vypracovala: Petra Stašová
Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů
Studijní program: Zemědělská specializace
Vedoucí práce: Mgr. Michal Berec, Ph.D.
Školitel: RNDr. Zdeněk Faltýnek Fric, Ph.D.

České Budějovice

2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petra STAŠOVÁ**

Osobní číslo: **Z15237**

Studijní program: **B4106 Zemědělská specializace**

Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**

Název tématu: **Původ a genetická rozmanitost českých populací kriticky ohroženého hnědáka květelového**

Zadávací katedra: **Katedra biologických disciplin**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Hnědásek květelový (*Melitaea didyma*) kdysi patřil k běžným druhům naší motýlí fauny. Během posledních desetiletí však zaznamenal velmi silný ústup a vymřel na většině českých (a moravských) populací. Nicméně v roce 2017 byl zaznamenán jeho nečekaný výskyt na třech různých místech, kde již byl několik let nezvěstný. Je možné, že druh mohl přežít v mikrorefugiu v okolí, nemůžeme však vyloučit ani nelegální introdukci odjinud. Pokud se jedná o autochtonní populace, je nutné na lokalitách zahájit péči vhodnou pro nároky tohoto druhu motýla.

Cílem této práce je:

- vyizolovat DNA hnědásků květelových z území ČR i z jiných míst v Evropě
- osekvenovat alespoň jeden marker (mitochondriální gen Cytochrome Oxidase Subunit I, tzv. barcode)
- pomocí populačně genetických a fylogenetických metod porovnat materiál z různého území a zjistit míru příbuznosti mezi jednotlivými populacemi (F_{st} , haplotypové sítě, fylogenetické stromy)

Rozsah grafických prací: 3
Rozsah pracovní zprávy: 25
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

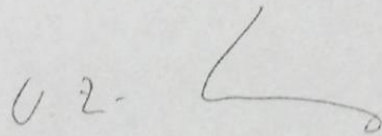
- BENEŠ, J., KONVIČKA, M., DVOŘÁK, J., FRIC, Z., HAVELDA, Z., PAVLÍČKO, A., VRABEC, V. & WEIDENHOFFER, Z. [eds] (2002) *Motýli České republiky: Rozšíření a ochrana I, II. Butterflies of the Czech Republic: Distribution and conservation I, II.* Společnost pro ochranu motýlů, Praha, 857 pp.
- EHRlich PR & HANSKI I (2004) *On the wings of checkerspots.* Oxford University Press, Oxford.
- JUNKER M., ZIMMERMANN M., RAMOS A., GROS P., KONVIČKA M., NÉVE G., RÁKOSY L., TAMMARU T., CASTILHO R., SCHMITT T. (2015) Three in One-Multiple Faunal Elements within an Endangered European Butterfly Species. *PLoS ONE* 10: e0142282.
- KADLEC T., VRBA P., KEPKA P., SCHMITT T., KONVIČKA M. (2010) Tracking the decline of once-common butterfly: delayed oviposition, demography and population genetics in the Hermit, *Chazara briseis*. *Animal Conservation* 13: 172-183.
- MACEK, J. [eds] (2015) *Motýli a housenky střední Evropy. IV., Denní motýli.* Vydání 1. Praha, Academia. 539 pp.

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Michal Berec, Ph.D.
Katedra biologických disciplin

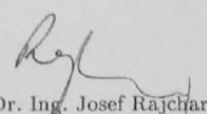
Konzultant bakalářské práce: RNDr. Zdeněk Faltýnek Fric, Ph.D.
Katedra zoologie

Datum zadání bakalářské práce: 7. listopadu 2017

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2018


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentůvák 1888, 370 05 České Budějovice


doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 7. listopadu 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „**Původ a genetická rozmanitost českých populací kriticky ohroženého hnědáka květelového**“ vypracovala na základě vlastních zjištění a materiálů uvedených v přehledu použité literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

.....

Petra Stašová

Poděkování

Především bych chtěla moc poděkovat Zdeňkovi Faltýnkovi Fricovi za ohromnou trpělivost, ochotu, pomoc a čas věnovaný mé bakalářské práci. Dále bych chtěla poděkovat Janě Marešové za její rady a čas strávený v laboratoři při trpělivém vysvětlování používaných analýz. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat mému vedoucímu práce Michalovi Bercovi. Můj velký dík patří také rodičům a kamarádům za psychickou podporu během mého studia.

Anotace:

V mé bakalářské práci jsem se zaměřila na u nás kriticky ohrožený druh z jinak kosmopolitně rozšířené čeledi hnědásků (*Melitaeinae*), hnědáška květelového (*Melitaea didyma*). Na většině území byl tento druh považován za vyhynulý, avšak objevily se nové populace na některých lokalitách České republiky. Cílem mé práce bylo zjistit, zda jsou tyto populace autochtonní a zařadit české populace z pohledu poddruhu.

Klíčová slova:

Melitaea didyma, *Melitaeinae*, populační genetika, molekulární fylogeneze, kriticky ohrožené druhy, Česká republika, Střední Evropa

Annotation:

In my bachelor thesis I focused on a critically endangered species from the cosmopolitan family of Melitaeinae, the spotted fritillary (*Melitaea didyma*). In the Czech Republic, this species was considered as extinct from majority of its original distribution sites, but but new populations appeared in some Czech localities. The aim of my work was to find out if these populations are indigenous and to classify the Czech population as a subspecies.

Key words:

Melitaea didyma, Melitaeinae, population genetics, molecular phylogeny, critically endangered species, Czech Republic, Central Europe

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární rešerše.....	3
3. Metodika.....	6
3.1 Materiál.....	6
3.2 Izolace dna.....	8
3.3 PCR.....	8
3.4 Elektroforéza.....	9
3.5 Sekvenace a tvorba alignmentu.....	9
3.6 Anylýzy.....	9
3.6.1 Substituční modely.....	9
3.6.2 Bayesovská analýza.....	10
3.6.3 Haplotypové sítě.....	10
4. Výsledky.....	11
5. Diskuze.....	14
5.1 Příslušnost české populace k poddruhu <i>M. d. neera</i>	14
5.2 Původ české populace.....	14
5.3 Genetický drift u českých populací viditelný na pseudogenu.....	15
5.4 Doporučení pro ochranu.....	16
6. Závěr.....	18
7. Seznam použité literatury.....	19
8. Přílohy.....	23

1. Úvod

Hnědásci (Melitaeinae) jsou jednou z mnoha podčeledí babočkovitých (Nymphalidae). Tato čeleď je jednou z druhově nejbohatších čeledí nadčeledi Papilionoidea, která zahrnuje další tři čeledi denních motýlů: Lycaenidae (modráskovití), Pieridae (běláskovití) a Papilionidae (otakárkovití) (Ehrlich, 1958a, Kristensen, 1976, Scoble, 1992). Podle tradičního dělení se zbývající čeleď denních motýlů, Hesperioidea (soumračníkovití), řadí jako samostatná nadčeleď Hesperioidea. Avšak nejnovější genetické práce tento tradiční systém nepotvrzují (Espeland et al., 2018).

Čeleď Nymphalidae je charakteristická velmi redukovanými předními končetinami a úplným vymizením nezmenšených tarzálních drápků, které se jinak nacházejí u všech tří párů nohou téměř veškerého hmyzu (Ehrlich a Hanski, 2004). Babočky tedy vždy používají pouze dva páry kráčivých končetin. Jsou střední velikosti se zbarvením, kde dominuje oranžová, červená a černá či hnědá.

Hnědásci jsou monofyletickou skupinou obsahující přibližně 270 druhů motýlů. Tato podčeleď má téměř globální rozšíření. Vyskytují se na všech kontinentech kromě Austrálie, do Afriky a Orientální oblasti však z celé podčeledi zasahuje pouze po jediném druhu (Ehrlich a Hanski, 2004). U nás bylo z této skupiny zaznamenáno 8 druhů (Beneš et. al., 2002), z nichž jsou však v současnosti 2 druhy v České republice vyhynulé a další 3 druhy jsou na pokraji vymření (Hejda et. al., 2017). Ohrožení jsou především kvůli cílenému zalesňování a postupnému zarůstání lokalit, které tak činí jednotlivé populace hnědásků od sebe izolované. Této situaci se dá zabránit hlavně aktivním managementem jako například zahájením extenzivní pastvy koz, mozaikovitým vyžínáním vysokostébelné vegetace, bráněním sukcesi dřevin a občasným vypalováním částí přerůstajících ploch v zimním období.

Jedním z kriticky ohrožených druhů v České republice je i hnědásek květelový (*Melitaea didyma* (Esper, 1779)). Tento druh byl až do letošního léta považován za vyhynulý v Čechách a na Moravě přežíval jen na hrstce lokalit na

jihu. V roce 2017 se však objevila řada nálezů z okolí Brna, Vysočiny a dokonce i Českého Krasu (osobní sdělení Pavel Skala a Pavel Vrba). Cílem této práce bylo zjistit, zda jsou tyto nově nalezené populace opravdu autochtonní. A to porovnáním zástupce nově nalezené populace se zástupci populací z jiných zemí, aby případně mohly být nastoleny pro tento druh vhodné podmínky na dané lokalitě. Dílčím cílem bylo zjistit, kam vlastně patří česká populace hnědáška květelového z pohledu poddruhové úrovně. Úkolem tedy bylo vyizolovat DNA hnědášků květelových z území České republiky, a i jiných míst v Evropě, osekvenovat alespoň jeden marker (mitochondriální gen pro cytochrom c oxidázu I, tzv. barcode), a nakonec pomocí populačně genetických a fylogenetických metod porovnat materiál z různého území a zjistit míru příbuznosti mezi jednotlivými populacemi (haplotypové sítě, fylogenetické stromy).

2. Literární rešerše

Higgins (1978, 1981) rozlišil podčeď hnědásků na tři podtriby, Euphydryina, Melitaeina a Phyciodina, které byly později potvrzeny Wahlbergem a Zimmermannem (shrnutí v Ehrlich a Hanski, 2004). Tato skupina se stala významnou při výzkumu Paula Ehrliche v 60. letech, který pracoval s americkým druhem *Euphydryas editha* (Boisduval, 1852) v souvislosti s populační biologii hmyzu (Ehrlich a Hanski, 2004). Dalším význačným modelovým druhem je hnědásek kostkovaný (*Melitaea cinxia* (L., 1758)), zejména pro výzkum genetických a demografických procesů souvisejících s prostorovou metapopulační strukturou.

Používání hnědásků jako modelových organismů vyvolalo nejen mimořádně rychlý pokrok v populační biologii, ale také byly položeny základy ekologie, populační genetiky a s tím byly i potvrzeny hypotézy o metapopulační dynamice (Ehrlich a Hanski, 2004). Předmětem zkoumání se stali především pro jejich životní strategii. Hnědásci totiž tvoří velmi sedentární populace, většinou s vysokou lokální denzitou a omezenou možností přeletů mezi koloniemi (Beneš et al., 2002). Zvláštností je i jejich vývoj, kdy samice klade snůšku o počtu 100-200 vajíček, to umožňuje snazší dohledání a pozorování všech stádií hnědásků. Snůšky jsou však zranitelnější a náchylnější k lokální extinkci (Ehrlich a Hanski, 2004) a zřejmě to bude i důvodem, proč řada druhů hnědásků zaznamenává ústup (Beneš et al., 2002).

Jedním z druhů, které v České republice zaznamenaly silný úbytek je hnědásek květelový (*Melitaea didyma*). Tento druh má západopalearktický areál s rozšířením v severní Africe, celé jižní a střední Evropě, Pobaltí, Balkánu, jižní polovině východní Evropy, Kavkazu, na východě přes Střední Asii až po střední Sibiř, Altaj a Mongolsko. Na tak velkém areálu tvoří několik poddruhů, ve střední Evropě by se měly střetávat poddruhy dva, *Melitaea didyma didyma* (Esper, 1778) ze západní části a *Melitaea didyma neeri* (Fischer von Röslerstamm, 1840) v části východní (Pazhenkova a Lukhtanov, 2016). Příslušnost k těmto poddruhům nebyla u české populace zjišťována. V minulosti byl hnědásek květelový rozšířen po téměř celé České republice, zejména v teplejších

oblastech. V druhé polovině 20. století zaznamenal drastický úbytek populací, v Čechách je nyní považován za nezcitlivý (v roce 2010 vymizela i donedávna početná populace v Českém krasu). V izolovaných a někde i početných populacích přežívá nadále na západní, střední a jižní Moravě (Macek et. al., 2015). V Červeném seznamu je uveden jako kriticky ohrožený, vymřel v 9 krajích, přežívá pouze v 5 krajích (Hejda et. al., 2017). Na druhé straně se situace v roce 2017 velmi zlepšila. Kromě svých obvyklých lokalit byl hnědásek květelový zaznamenán na řadě míst, kde už nebyl dlouho pozorován, jako je okolí Brna, v jihlavské části Českomoravské vrchoviny, a dokonce byl zaznamenán i na Třesině v Českém krasu (ústní sdělení Pavel Skala, Pavel Vrba, diskusní fórum Motýlí klenoty na www.facebook.com).

Může se vyskytovat od nížin do hor, je xeromorfem 1. stupně. Vázán je především na otevřené květnaté xerothermní trávníky, skalní stepi a lesostepi se solitárními dřevinami, suché extenzivní pastviny, hlavně na vápencovém podkladu a váté písky. Také na některé typy antropogenních stanovišť (výslunné hráze a navigace podél vodních toků, zarůstající vinohrady nebo železniční násypy málo frekventovaných lokálních tratí). Vždy se jedná o biotopy v pozdějším stadiu sukcese (spíše trávníky než obnažené biotopy), kde se vyskytují i místa bez vegetace nebo s řídkým vegetačním krytem (Beneš et al., 2002, Macek et al., 2015). Zde tvoří velmi sedentární populace o vysoké lokální hustotě, ale s omezenou schopností přeletů mezi populacemi. Jde o protandrický druh. Samci vyhledávají samice aktivním patrolováním. Zřetelný je i pohlavní dimorfismus, kdy samice je výrazně větší a šedavá oproti menšímu a živě zbarvenému samci (Beneš et al., 2002). Populace v České republice jsou monovoltinní, letová perioda začíná počátkem července a končí počátkem srpna. Z vajíček, která jsou kladena v hromadných snůškách na spodní stranu listů živné rostliny, se líhnou housenky vyskytující se od srpna do května. Zajímavostí housenek je, že ačkoli jako druh využívají širokou paletu živných rostlin, tak se jako jedinci adaptují na určitý druh živné rostliny, kterou až do zakuklení již nemění, proto si v chovech jen těžce zvykají na jiný druh živné rostliny. Avšak u západní severoamerické populace druhu *Euphydryas editha* bylo pozorováno 2 či více larválních hostitelů, tím si populace i metapopulace zajišťovaly celkovou stabilitu (Bouhgtton and

Singer, 2004). Předpokládá se, že odolnost populace extinkci závisí nejen na dostupnosti živné rostliny, ale také na tom, jak dlouho zůstane na jaře požitelná a její odolnosti případnému suchu či vysokým teplotám (Singer, 1972, Hellmann, 2002a). Když se v habitatu vyskytuje více živných rostlin, může se snůška na těchto druzích mezi sebou rok od roku dramaticky měnit v počtu vajíček, a to především kvůli změnám kvality a kvantity rostlin. Občas jsou tyto změny čistě ekologické a někdy mají za následek rychlou evoluci v tom, co motýli preferují. Rozvíjející se závislost na dané živné rostlině je pak činí více zranitelné vůči lidským zásahům. Jako příklad si můžeme uvést evropské druhy živící se jitrocelem kopinatým. Jitrocel kopinatý se stal vzácným či nevyhovujícím potom, co bylo nahrazeno lehké spásání a tradiční způsoby seče, to se stalo osudným mnoha evropským druhům hnědásků. Také je to jedním z důvodů lokální extinkce hnědáška kostkovaného (*Melitaea cinxia*) na Ålandech (Ehrlich a Hanski, 2004).

Housenky od začátku žijí jednotlivě, jednotlivě také zimují, a to ve zhotovených záředcích v opadance či rostlinném stelivu, ve střední Evropě zpravidla ve 2. instaru. Po přezimování se sluní na listech různých bylin, svlékají se 6x, což je velmi atypické u denních motýlů. Ke kuklení si vybírají hlavně suchou vegetaci či kmeny (Macek et al., 2015).

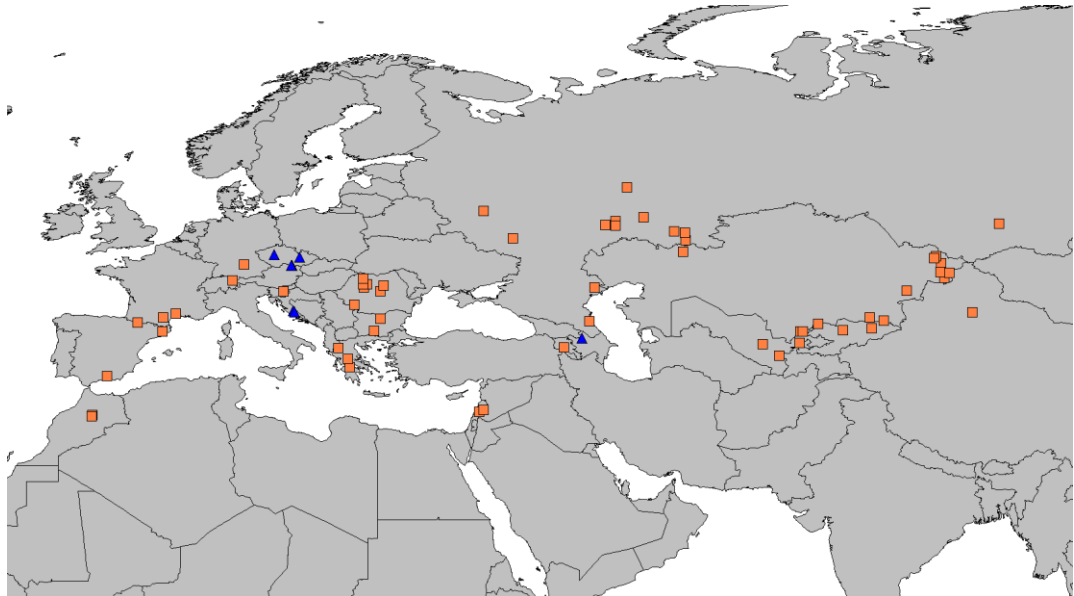
Ve střední Evropě se potravou housenek i dospělců stávají například rostliny z rodu divizna (*Verbascum* L. spp.), rozrazil (*Veronica* L. spp.), černýš rolní (*Melampyrum arvense* L.) a lnice květel (*Linaria vulgaris* Mill.), nejvíce využívanými rostlinami jsou však čistec přímý (*Stachys recta* L.) a jitrocel kopinatý (*Plantago lanceolata* L.) (Beneš et al., 2002). Rostliny čeledi jitrocelovitých, kozlíkovitých či krtičníkovitých obsahují iridoidní glykosidy, ty pravděpodobně činí hnědáška květelového nepoživatelným pro predátory, vyznačují se nepříjemnou hořkou chutí (Macek et al., 2015).

Pazhenkova & Lukhtanov (2016) a Pazhenkova et. al. (2016) se zabývali mitochondriální diverzitou hnědáška květelového na úrovni téměř celého areálu rozšíření, vzorky ze střední Evropy však v jejich pracích chybí. V obou pracích zjistili obrovskou vnitrodruhovou variabilitu obzvláště v západní části Evropy.

3. Metodika

3.1 Materiál

Vzorky sestávaly z dospělých jedinců nasbíraných ve volné přírodě v různých zemích, mezi nimiž byla Česká republika, Francie, Chorvatsko, Irán, Itálie, Rakousko a Švýcarsko (Obr. 1, Tab. 1). Vzorky byly konzervovány vysušením. Pro izolaci DNA z těchto vzorků byly primárně použity končetiny jedinců. Pro ujasnění příbuzenských vztahů těchto jedinců jsem dále použila 141 sekvencí hnědásků rodu *Melitaea* získaných z databází National Center For Biotechnology Information, tzn. GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a BARCODE OF LIFE DATA SYSTEM v.4., tzv. BOLD (<http://www.boldsystems.org/>) (Příloha 1).



Obrázek 1 Původ vzorků použitých do analýz. Modré trojúhelníky označují vlastní vzorky, oranžové čtverečky data získaná z veřejných databází.

Tabulka 1 Seznam jedinců hnědásků sekvenovaných v této diplomové práci.

Kód	Druh	Stát	Lokalita	Latituda	Longituda	Úspěšnost sekvenace
PS-01	<i>Melitaea didyma</i>	Švýcarsko	Umgebung Mörel	46.358632	8.041402	ne
PS-02	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Pěčíkov–Dráty	49.720297 2	16.7897506	pseudogen
PS-03	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Mohelno	49.107637 2	16.1841078	ne
PS-04	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Mohelno	49.107637 2	16.1841078	ne
PS-05	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Havraníky	48.806388 9	15.99	ne
PS-06	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Mašovice	48.844166 7	15.9727778	pseudogen
PS-07	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Havranické vřesoviště	48.806388 9	15.99	ano
PS-08	<i>Melitaea didyma</i>	Chorvatsko	Štikovo	43.9019	16.308246	pseudogen
PS-09	<i>Melitaea interposita</i>	Gruzie	NP Vashlovani	41.14456	46.57831	ano
PS-10	<i>Melitaea didyma</i>	Švýcarsko	Umgebung Mörel	46.358632	8.041402	pseudogen
PS-11	<i>Melitaea didyma</i>	Rakousko	Hundsheim			ne
PS-12	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Havranické vřesoviště	48.806388 9	15.99	ne
PS-13	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Kras–Třesina	49.964253 6	14.1332319	ne
PS-14	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Kras–Třesina	49.964253 6	14.1332319	kontaminace
PS-15	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Pěčíkov–Dráty	49.720297 2	16.7897506	pseudogen
PS-16	<i>Melitaea didyma</i>	Francie	Provence, Col de Vence			ne
PS-17	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Č. kras, Komárkova step	49.937910 8	14.1602769	ne
PS-18	<i>Melitaea didyma</i>	Slovensko	Chrámeč, Vinohrady	48.274885	20.170721	ne
PS-19	<i>Melitaea didyma</i>	Chorvatsko	Knin	44.0506	16.149596	pseudogen
PS-20	<i>Melitaea didyma</i>	Chorvatsko	Štikovo	43.9019	16.308246	pseudogen
PS-21	<i>Melitaea didyma</i>	Švýcarsko	Umgebung Mörel	46.358632	8.041402	pseudogen
PS-22	<i>Melitaea</i> sp.	Írán	Isfahan, Kashan-Maymeh Road, E of Ghamsar	33.75076	51.47275	ano
PS-23	<i>Melitaea</i> sp.	Írán	Isfahan, Kashan-Maymeh Road, E of Ghamsar	33.75076	51.47275	ano
PS-24	<i>Melitaea didyma</i>	Česká republika	Mašovice	48.844166 7	15.9727778	ne

3.2 Izolace dna

Pomocí kitu Genomic DNA Mini Kit (Tissue) od firmy Geneaid se extrahovala DNA, dle pokynů výrobce. Živočišná tkáň byla vložena do eppendorfky, k ní se přidalo 200 µl GT pufru. K homogenizaci materiálu posloužila mikropestle, k takto vzniklé směsi bylo odměřeno 20 µl proteinázy K. Směs byla poté odstředěna a stočena. Vzniklý vzorek byl vložen do inkubátoru na 4 hodiny o 60 °C.

Po vyjmutí z inkubátoru a přidání 200 µl GBT pufru, byla směs vložena do inkubátoru zpět alespoň na 2 hodiny. Po uplynutí této doby bylo ke směsi přidáno 200 µl čistého ethanolu, poté byla opět zvortexována a stočena. V tuto chvíli bylo důležité vložit Elution pufr do inkubátoru, aby byl v dalších postupech použit zahřátý.

Dalším krokem byla příprava GD kolonky a Collection Tube. Pomocí pipety bylo do kolonky přidáno 620 µl vyrobené směsi, a to celé nadále umístěno do centrifugy na 20 minut. Po uplynutí doby byla směs z Collection Tube vyjmuta a přidána do nové čisté kolonky. Do kolonky bylo přidáno 400 µl W1 pufru a znovu vše vloženo do centrifugy po dobu 30 vteřin. Z Collection Tube byla poté vylita kapalina a do kolonky se napipetovalo 600 µl Wash pufru, kolonka se vložila zpět do centrifugy, kde setrvala nejdříve 30 vteřin, pak byla odstraněna tekutina, dále po dobu 3 minut.

Obsah kolonky byl umístěn do předpřipravené čisté eppendorfky. Do směsi bylo přidáno 60 µl zahřátého Elution pufru, opět celé centrifugováno po dobu 30 vteřin. Výsledkem byla vyizolovaná DNA.

3.3 PCR

PCR byla provedena pro první polovinu mitochondriálního genu pro cytochrom c oxidázu podjednotka I, nazývaný jako „barcode region“. Původně jsem plánovala využít nejčastěji využívaný primerový pár HybLCO a HybHCO, ale kvůli problémům s amplifikací vzorků, jsem byla nucena využít kratší úsek s primery RON a HybHCO, který se u většiny vzorků amplifikovat povedlo. Primery měly jednoduššímu sekvenování k sobě připojeny univerzální promotory, u „forward“

primerů to byl T7 promotor, u „reverse“ primerů pak T3 promotor. Celé sekvenční primery včetně promotorů byly tedy následující: RON: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG GGA GCY CCW GAT ATA GCT TTC CC 3', HybHCO: 5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG GT AAA CTT CAG GGT GAC CAA AAA ATC A 3'. Reakce byla namíchána do 25 µl mixu, který obsahoval 12,5 µl PPP Master Mixu, 8,5 µl PCR vody, 1 µl forward primer, 1 µl reverse primer a 2 µl DNA. PCR reakce proběhla v termocykleru dle protokolu z práce Wahlberg & Wheat (2008).

3.4 Elektroforéza

Jako podklad pro elektroforézu byl použit 1,5% agarózový gel, který byl připraven rozpuštěním 1,5 g agarózy v 100 ml 1x TAE pufru a následným 3 minutovým rozehrátím v mikrovlnné troubě. Gel byl po nalití do připravené formy s hřebínkem nechán asi 30 minut tuhnout. Poté na něj bylo nanášeno 5 µl PCR produktu smíchaného s barvivem (Cyber Green) do prvního otvoru byl dán marker (ladder). Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě a napětí 150 V po dobu 25 minut.

3.5 Sekvenace a tvorba alignmentu

Úspěšné produkty elektroforézy byly zaslány do firmy Macrogen. Produkt PCR byl sekvenován pouze v jednom směru.

Srovnání homologických úseků, tzv. alignment, jsem prováděla pomocí programu Geneious v. 7.1.9, kdy jsem zároveň odstranila počáteční a konečné úseky primerů a sekvenční sekvence jsem zkrátila na stejnou délku.

3.6 Anylýzy

3.6.1 Substituční modely

Výsledný dataset sekvencí se srovnanými homologickými úseky jsem rozdělila na 3 potenciální části podle pozic nukleotidů. Vhodnost rozdělení na tyto tři části

a také vhodnost příslušného substitučního modelu jsem testovala programem Partition Finder 1.1.1. Model byl vybírán podle hodnoty BIC (Bayesiánské informační kritérium), kde nižší hodnota znamená vhodnější model.

3.6.2 Bayesovská analýza

Fylogenetický strom jsem počítala pomocí Bayesovské analýzy v programu MrBayes 3.2.64b. Výpočet jsem prováděla ve čtyřech paralelních bězích, každý se čtyřmi Markovovými řetězci a „teplotě“ 0,2. Analýza běžela v deseti milionech generacích, prvních 30 % generací, které sloužily jako testovací data, bylo po kontrole na konvergenci paralelních běhů odstraněno (tzn. burnin).

3.6.3 Haplotypové síť

Vztahy na nižší než druhové úrovni, tedy příbuzenské vztahy mezi jedinci či populacemi, nebývají ovlivňovány pouze oddělováním jednotlivých větví, jako je tomu u fylogenetických metod. Proto jsou na tuto úroveň vhodnější jiné metody, zobrazující síťové vztahy mezi studovanými jedinci. Pro výpočet jsem použila program TCS v. 1.21 (Clement et. al., 2000), který využívá metodu tzv. statistické parsimonie. Tento program funguje v prostředí JAVA, dokáže tak pracovat na různých počítačových platformách. Výsledky z výpočtů jsem zobrazila v TCS Beautifer (tcsBU) (Santos et. al., 2015), volně přístupném na webovém rozhraní (<http://cibio.up.pt/software/tcsBU/>).

4. Výsledky

Srovnávání různých substitučních modelů a potenciačního rozdělení datasetu metodou implementovanou v programu PartitionFinder upřednostňovalo rozdělení datasetu zvláště pro každý kodon (lnL= -4618.0206, BIC = 12097.27, 440 parametrů) (Tab. 2).

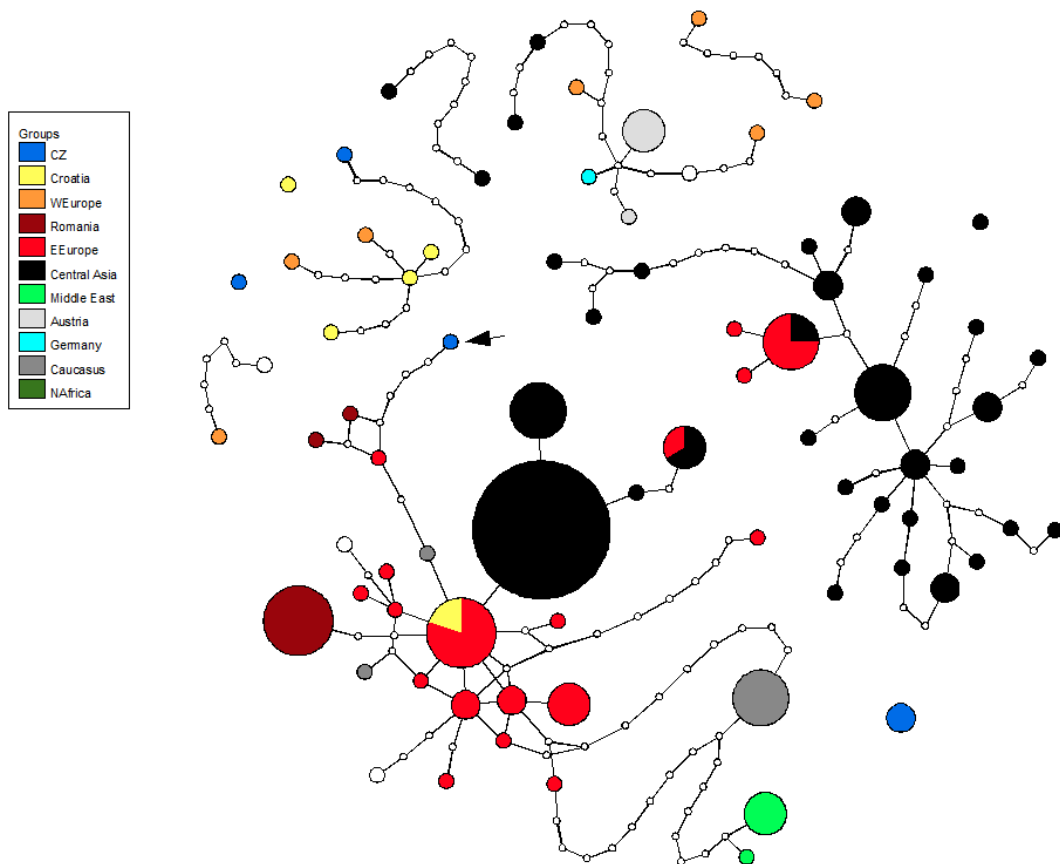
Tabulka 2 Substituční modely použité k výpočtům fylogenetických vztahů.

Pozice kodonu	Nejlepší model (BIC)	Druhý nejlepší model (BIC)	Použitý model
1.	TIM+G (6075.13)	GTR+G (6076.53)	GTR+G
2.	TrNef+G (2131.67)	TrN+G (2135.76)	TrNef+G
3.	TrN (1110.32)	TIM (1112.59)	TrN

Při sekvenování vzorků hnědáka květelového (*Melitaea didyma*), došlo u většiny vzorků k osekvenování jaderné kopie mitochondriálního genu, tzv. pseudogenu, označovanému také jako NUMT (viz Tab. 1). Na rozdíl od mitochondriálního genu COI měly sekvence těchto pseudogenů velkou variabilitu, a protože pseudogen nekóduje žádný protein, obsahovaly několik insercí či delecí, které se normálně v tomto mitochondriálním genu u motýlů nevyskytují. Pouze jediného vzorku z Havranického vřesoviště (PS7) byla sekvenace mitochondriálního genu úspěšná.

Fylogenetický strom (Obr. 2) ukazuje, že vzorky jediného úspěšně osekvenovaného vzorku spadají do blízkosti rumunským populacím čili do poddruhu *Melitaea didyma neera*. Pseudogeny vytvořily na fylogenetickém stromu samostatnou větev sesterskou dvěma vzorkům z Kazachstánu (BPAL2556-14 a BPAL2768-15, označených v databázi GenBank jako COI), která byla sesterská s jinými druhy hnědáků jako je *Melitaea trivialis* (Denis and Schiffermüller, 1775), *M. casta* (Kollar, 1849) či *M. perseae* (Kollar, 1849). Na druhé straně pseudogeny také obsahovaly geografickou informaci. Zatímco jedinci z populací pocházející jižně od Alp (Chorvatsko, Švýcarsko) byli identičtí, české vzorky se od sebe lišily, ale v rámci lokality byly stejné, což by napovídalo genetickému driftu.

Výsledky z analýz TCS ukazují několik separátních haplotypových sítí (Obr. 3). Podobně jako u fylogenetického stromu patří vzorek PS7 do stejné haplotypové sítě jako *M. d. neera*, pseudogeny tvoří samostatnou haplotypovou síť.



Obrázek 3 Haplotypová síť ukazující příbuznost mezi vzorky. Šipkou je označen úspěšně osekvenovaný vzorek z Havranického vřesoviště (Znojemsko).

5. Diskuze

5.1 Příslušnost české populace k poddruhu *M. d. neera*

Podle Pazhenkové et. al. (2015) a Pazhenkové a Lukhtanova (2016) komplex *Melitaea didyma* představuje buď jeden velice diverzifikovaný polyfyletický druh nebo řadu monofyletických taxonů. Problém však je, že tyto druhy nemohou být dobře morfologicky definovány a jejich stanovení pouze na rozdílech v mitochondriálním genu není dostatečné.

Melitaea didyma a *Melitaea didyma neera* jsou morfologicky odlišnými druhy, které byly považovány za oddělené poddruhy (Higgins, 1941, Larsen, 1974, Benyamini, 2002, Tshikolovets, 2011). Podle COI genu nejsou monofyletické, to potvrzuje závěr, že jsou nezávislými rodovými liniemi evoluce. Proto Pazhenková et. al. (2015) nastolili hypotézu, že komplex *Melitaea didyma* je tvořen z 12 druhů. Kdy 5 druhů (*M. liliputana*, *M. occidentalis*, *M. didyma*, *M. neera*, *M. mauretanic*) může být rozpoznáno fylogenetickým konceptem druhů a zbývajících 7 druhů (*M. interrupta Colenati*, *M. turkestanica*, *M. mixta Evans*, *M. chitralensis Moore*, *M. latonigena Eversmann*, *M. didymoides*, *M. sutschana*) pomocí fylogenetického a biologického konceptu druhů. Předmětem předložené práce však není taxonomická revize, a tak mohu jen konstatovat, že česká populace patří k taxonu *Melitaea (didyma) neera*.

5.2 Původ české populace

Původ české populace hnědáka květeloého z východní větve tohoto druhu, což naznačují topologie stromů a sítí získaných ze sekvencí COI i pseudogenu, koresponduje s podobným původem i u dalších lučních motýlů, jako je okáč rosičkový (*Erebia medusa* (Denis and Schiffermüller, 1775)) (Schmitt and Müller, 2007) či modrásek vikvicový (*Polyommatus coridon* (Poda, 1761)) (Kosuch et al., 2017). Podle těchto fylogeografických analýz je to důsledkem postglaciálního šíření z refugií v jihovýchodní Evropě či v Panonii, kdy cesta do českých končin byla ze západní strany blokována pohořími Šumavy, Českého lesa a Krušných hor. V dobách ledových v období Pleistocénu, byly druhy mírného pásu omezeny

výskytem do nižších geografických šířek, což vedlo k jejich izolaci. K změnám v distribuci těchto druhů docházelo během glaciálních cyklů, což přispělo k tomu, že v evoluci těchto refugií se odlišné rodové linie chovaly jako odlišná centra. Po skončení doby ledové se odlišné rodové linie znovu setkaly a došlo tak k hybridizaci (Schmitt and Müller, 2007)

5.3 Genetický drift u českých populací viditelný na pseudogenu

Wright (1931, 1932) poukázal na to, že by náhodný genetický drift, který se vyskytuje kvůli omezené velikosti populace, mohl být významným faktorem v evoluci. Genetický drift způsobuje náhodné změny ve frekvenci genů, to může vyvolat u populace přechod z adaptivní zóny proti gradientu selekce a příležitostně vstoupit do nové adaptivní zóny, která může obsahovat vyšší stupně adaptace. Genetický drift si také můžeme představit jako proces náhodného zkoumání adaptivních zón, pomocí dočasně špatně se adaptujícího způsobu, kdy stále existuje možnost, že můžeme najít fenotyp, který umožní snazší adaptaci. Adaptivní zóny se mohou lišit prostředím, v čase i prostoru, proto izolované populace často cestují z jedné adaptivní zóny do druhé v hlavním rozsahu. Poté mohou znovu obsadit hlavní rozsah a tím nahradit původní typ, když se zde nachází dostatečná reprodukční izolace. Evoluce ovládaná genetickým driftem není závislá na vztahu mezi adaptivními zónami v různých prostředích. Proto genetický drift může hrát důležitou roli otevíráním nových vývojových cest, které by jinak sama přirozená selekce neumožnila.

Ve výzkumech, které jsou založeny na metodě PCR, jsou mitochondriální pseudogeny začleněné v nukleárních genomech (numts) často nechtěnými složkami. Jejich hojnost se liší v různých eukaryotických druzích. Mohou být odvozeny od všech typů mitochondriálních sekvencí, lišících se velikostí, také mohou nést různé stupně podobnosti k jejich mitochondriálním duplikátům. Když jsou pak mitochondriální sekvence transferovány do jádra, stávají se nefunkčními pseudogeny.

Míra mutace v jádru je nižší než mutace mitochondrie, proto když jsou pseudogeny výsledkem starší translokace do jádra, dávají informace o původních sekvencích mitochondriálního genu. Studium těchto pseudogenů nám poskytuje informace o jejich původu, evoluční historii a fylogenetickém vztahu druhu, reprezentují tedy fosilní rodovou linii, která se vyvinula souběžně s jejich mitochondriálními duplikáty (Pérez et. al., 2017).

České vzorky se v tomto pseudogenu od sebe lišily v rámci populací, a zároveň byly stejné v rámci lokality, což bylo ale ukázáno jen na případu dvou populací, z nichž pouze jedna zahrnovala více jedinců. Platnost tvrzení, že české populace postihl genetický drift by bylo třeba ověřit na více jedincích z každé populace.

5.4 Doporučení pro ochranu

Výsledky této práce bohužel nedovedou rozlišit, zda se nově objevené populace či ty, které zaznamenaly vysoký nárůst jedinců, nějak liší od původních českých populací, ani odkud se tam popřípadě dostaly. Bylo by vhodné zkoumat druh z genetického hlediska více, protože návrat druhu je zajímavý fenomén, pravděpodobně zapříčiněný globálním oteplováním. Výsledky by se tak daly generalizovat a vztáhnout k odpovědi druhů změnu klimatu. Mnou použitý marker (COI) bohužel nevykazoval dostatečnou variabilitu a nepodařilo se ho naamplifikovat u dostatečného množství vzorků, aby se dalo rozlišit, které populace jsou nejpříbuznější k českým vzorkům. Bylo by vhodné přidat další markery, jak mitochondriální, tak jaderné, popř. provést analýzu mikrosatelitů. Největší vhléd by do věci samozřejmě vnesly populačně genomické metody (např. RAD sekvenování), které je ale zatím ovšem finančně náročné a také náročné na kvalitu vzorků. Další potřebnou věcí by byl kvalitní sběr vzorků v celé Evropě (hlavně okolí České republiky) a osekvenování muzejních vzorků vymizelých českých populací, aby se daly srovnat s populacemi současnými. Tím bychom pak zjistili, zda se druh zpětně šíří z jihu, či pouze ze zbývajících českých populací a ve stávajících populacích došlo pouze ke zlepšení situace. Vzhledem

k tomu, že se jedná o zajímavý a ohrožený druh, navrhuji, aby se jeho populace chránily v nových oblastech výskytu, a to ať se jedná o nové populace šířící se do České republiky odjinud, nebo vznikly ze zbylých populací.

Při ochraně druhů je velmi důležité udržovat nejen velké množství různých mikrostanovišť, sukcesních stádií vegetace, ale i přechodné zóny. Tak, aby se krajina nestala jen řadou homogenních chráněných úseků, na kterých se vyskytuje pouze minimum cílených druhů na úkor druhů ostatních. Druhové složení vegetace je nutnou podmínkou, stejně jako její povrchová struktura. Vegetace totiž poskytuje nejen potravu, ale i úkryt, nocoviště, zimoviště, místo pro teritoriální chování a v neposlední řadě i orientační body. Proto je důležitá různá výška vegetace, různé světelné poměry či zápoj křovin a struktura drnu. Je potřeba si uvědomit, že každé vývojové stadium má jiné nároky na zdroje vegetace, z toho vyplývá, že je nutné zajistit bohatou nabídku zdrojů, a to nejlépe v těsném sousedství. Velice důležitým faktorem, aby mohla populace přežít, je mikroklimatická diverzita. Ta zahrnuje stín, závětrné plošky či obnažená místa podloží, které poskytují různé podmínky napomáhající při změnách počasí. Především je důležité, aby byla chráněna celá populace. Čím početnější populace, tím větší je pravděpodobnost jejího přežití, a to kvůli genetickým problémům, fluktuacím početnosti a enviromentální nepředvídatelnosti. Populace mají omezenou disperzi a vyskytují se v prostorově ohraničených koloniích, to vede k populační dynamice. Proto je povinností chránit sítě nedalekých stanovišť, i když jsou dočasně neobývané.

K vytvoření „ideálních“ biotopů je nutná jejich řízená péče, ta zahrnuje seče, pastvy, výřezy křovin, mechanické narušování drnu a řízené vypalování. Veškeré kroky je nutno mít promyšlené, protože každý zásah zvyšuje mortalitu a může mít pro populaci fatální následek. Proto je vhodné zásahy rozčlenit v čase, ideálně i podle typu péče. Udržujeme tedy různorodou mozaiku, kde se nachází místa dočasně vyňatá ze zásahu. Tato místa zaujímají větší plochu v menších biotopech než v rozsáhlejších (Konvička et. al., 2005).

6. Závěr

Hlavním cílem práce bylo zjistit, původ české populace hnědáška květelového z pohledu poddruhu. Kdy:

1. Kvůli výskytu pseudogenů u většiny vzorků, byl původ zjištěn pouze vzorku jediného. A to u vzorku z Havranického vřesoviště (NP Podyjí), kde sekvenace mitochondriálního genu proběhla úspěšně a ukázala, že tento vzorek spadá do poddruhu *Melitaea didyma neera* a zároveň do blízkosti k rumunským populacím.
2. Díky výskytu pseudogenů bylo umožněno zjistit geografickou informaci. Jedinci z populací vyskytujících se jižně od Alp (Chorvatsko, Švýcarsko) byli identičtí, české vzorky byly stejné pouze v rámci lokality, to může poukazovat na genetický drift. České vzorky byly na fylogenetickém stromu umístěny na bázi vzorků ze Švýcarska a Chorvatska. Všechny evropské sekvence pseudogenů byly sesterské ke dvěma sekvencím z Kazachstánu, v databázi GenBank označených jako COI. Tato topologie by mohla ukazovat na historické rozšíření druhu do Evropy z východu. Celá tato větev pak byla příbuzná jiným druhům hnědášků, a to k *Melitaea trivialis*, *M. casta* a *M. persea*.

7. Seznam použité literatury

1. **Beneš J., Konvička M., Dvořák J., Fric Z., Havelda Z., Pavlíčko A., Vrabec V., Weidenhoffer Z. 2002.** Motýli České republiky: Rozšíření a ochrana I/Butterflies of the Czech Republic: Distribution and Conservation I. SOM. Praha.
2. **Boughton D. A. 1998.** Ecological and Behavioral Mechanisms of Colonization in a Metapopulation of the Butterfly *Euphydryas Editha*. PhD dissertation, University of Texas, Austin.
3. **Clement M., Posada D., Crandall K. A. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol*, 9: 1657–1659 .
4. **Dinca V., Zakharov E.V., Hebert P.D., Vila R. 2011.** Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proc Biol Sci* 278:347–55.
5. **Dinca V., Montagud S., Talavera G., Hernández-Roldán J., Munguira M.L., García-Barros E., Hebert P.D.N., Vila R. 2015.** DNA barcode reference library for Iberian butterflies enables a continental-scale preview of potential cryptic diversity. *Sci Rep* 5: 12395.
6. **Ehrlich P.R. 1958a.** The comparative morphology, phylogeny and higher classification of the butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea). *Univ Kansas Sci Bull* 39: 305–370.
7. **Ehrlich P. R., Hanski I. 2004.** *On the Wings of Checkerspots: A Model System for Population Biology*. Oxford University Press, USA.
8. **Espeland M., Breinholt J., Willmott R. K., Warren D. A, Vila R., Toussaint E. F. A., Maunsell C. S., Aduse-Poku K., Talavera G., Eastwood R., Jarzyna A. M., Guralnick R., Lohman J. D., Pierce E. N., Kawahara Y. A. 2018.** A Comprehensive and Dated Phylogenomic Analysis of Butterflies. *Curr Biol* 28: 1–9
9. **Hausmann A., Haszprunar G., Segerer A.H., Speidel W., Behounek G., Hebert P.D.N. 2011.** Now DNA-barcoded: the butterflies and larger moths of Germany (Lepidoptera: Rhopalocera, Macroheterocera). *Spixiana* 34: 47–58.

10. **Hejda R., Farkač J. & Chobot K. [eds.] 2017.** Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí. Příroda, Praha, 36: 1–612.
11. **Higgins L. G. 1978.** A revision of the genus *Euphydryas* scudder (Lepidoptera: Nymphalidae). *Entomologist's Gazette* 29: 109–115.
12. **Huemer P., Hebert P.D.N. 2015.** DNA-Barcoding der Schmetterlinge (Lepidoptera) Vorarlbergs (Österreich) - Erkenntnisse und Rückschlüsse. *inatura – Forschung online* 15(Suppl. 1): 1–33.
13. **Klímová M. 2007.** Populační struktura a přežívání hnědáška květeloého (*Melitaea didyma*) v Národní přírodní rezervaci Mohelenská hadcová step. [Diplomová práce]. Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, České Budějovice.
14. **Konvička M., Beneš J., Čížek L. 2005.** Ohrožený hmyz nelesních stanovišť: ochrana a management. *Sagittaria*, Olomouc.
15. **Kosuch J., Hochkirch A., Schmitt T. 2017.** Extra-Mediterranean glacial refugia in a Mediterranean faunal element: the phylogeography of the chalk-hill blue *Polyommatus coridon* (Lepidoptera, Lycaenidae). *Sci Rep* 7: 43533.
16. **Kristensen N. P. 1976.** Remarks on the family level phylogeny of butterflies (Insecta, Lepidoptera, Rhopalocera). *Syst Zool* 14: 25–33.
17. **Lande R. 1975.** Natural selection and random genetic drift in phenotypic evolution, Museum of comparative zoology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts.
18. **Leneveu J., Chichvarkhin A., Wahlberg N. 2009.** Varying rates of diversification in the genus *Melitaea* (Lepidoptera: Nymphalidae) during the past 20 million years. *Biol J Linn Soc* 97:346–361.
19. **Lukhtanov V.A., Sourakov A., Zakharov E.V., Hebert P.D. 2009.** DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification. *Mol Ecol Res* 9:1302–1310.
20. **Lukhtanov V.A., Pazhenkova E.A., Novikova A.V. 2016.** Mitochondrial chromosome as a marker of animal migratory routes: DNA barcoding

- revealed Asian (non-African) origin of a tropical migrant butterfly *Junonia orithya* in south Israel. *Comp Cytogen* 10: 671–677.
21. **Lukhtanov V.A. 2017.** A new species of *Melitaea* from Israel, with notes on taxonomy, cytogenetics, phylogeography and interspecific hybridization in the *Melitaea perseus* complex (Lepidoptera, Nymphalidae). *Comp Cytogen* 11: 325–357.
 22. **Macek J., Laštůvka Z., Beneš J., Traxler L. 2015.** *Motýli a housenky střední Evropy.*: Academia, Praha.
 23. **Pazhenkova E. A., Zakharov E. V., Lukhtanov V. A. 2015.** DNA barcoding reveals twelve lineages with properties of phylogenetic and biological species within *Melitaea didyma sensu lato* (Lepidoptera, Nymphalidae). In: Lukhtanov VA, Kuznetsova VG, Grozeva S, Golub NV (Eds) Genetic and cytogenetic structure of biological diversity in insects. *ZooKeys* 538: 35–46.
 24. **Pazhenkova E. A., Lukhtanov V. A. 2016.** Chromosomal and mitochondrial diversity in *Melitaea didyma* complex (Lepidoptera, Nymphalidae): eleven deeply diverged DNA barcode groups in one non-monophyletic species? *Comp Cytogen* 10: 697–717.
 25. **Pérez T., Rodríguez F., Fernández M., Albornoz J., Domínguez A. (2017).** Ancient mitochondrial pseudogenes reveal hybridization between distant lineages in the evolution of the *Rupicapra* genus. *Gene* 628: 63–71.
 26. **Santos A. M., Cabezas M. P., Tavares A. I., Xavier R., Branco M. 2015.** TcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. *Bioinformatics*, 32: 627–628.
 27. **Scoble M. J. 1992.** *The Lepidoptera: Form, Function And Diversity.* Oxford University Press, Oxford.
 28. **Schmitt T., Müller P. 2007.** Limited hybridization along a large contact zone between two genetic lineages of the butterfly *Erebia medusa* (Satyrinae, Lepidoptera) in Central Europe. *J Zool Syst Evol Res* 45: 39–46.
 29. **Singer M. C. 1982.** Quantification of host preference by manipulation of oviposition behavior in the butterfly *Euphydryas editha*. *Oecologia* 52: 224–229

30. **Wahlberg N., Zimmermann M. 2000.** Pattern of phylogenetic relationships among members of the tribe Melitaeini (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from mtDNA sequences. *Cladistics* 16:347–363
31. **Wahlberg, N., & Wheat, C. W. 2008.** Genomic outposts serve the phylogenomic pioneers: designing novel nuclear markers for genomic DNA extractions of Lepidoptera. *Sys Bio* 57: 231–242.
32. **Wright S. 1931.** Evolution and Mendelian population. *Genetics* 16: 97–159

8. Přílohy

Příloha 1 Seznam hnědásků rodu *Melitaea* z publikovaných zdrojů, využitých pro srovnání s předloženou bakalářskou prací. Sloupeček „group“ označuje, do které zeměpisné oblasti v haplotypové síti (Obr. 3) byl vzorek od *Melitaea didyma* zařazen.

Kód vzorku	Druh	Group	Původ	GenBank Accession Number	Publikováno v
BPAL219 1-13	<i>Melitaea acentria</i>			KY777529	Lukhtanov 2017
BPAL223 4-13	<i>Melitaea acentria</i>			KY777528	Lukhtanov 2017
BPAL275 9-15	<i>Melitaea acentria</i>			KY777527	Lukhtanov 2017
BPAL319 1-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777576	Lukhtanov 2017
BPAL319 2-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777546	Lukhtanov 2017
BPAL319 3-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777539	Lukhtanov 2017
BPAL319 4-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777540	Lukhtanov 2017
BPAL325 7-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777541	Lukhtanov 2017
BPAL335 9-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777544	Lukhtanov 2017
BPAL336 0-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777543	Lukhtanov 2017
BPAL336 1-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777542	Lukhtanov 2017
BPALB12 5-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777535	Lukhtanov 2017
BPALB12 6-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777531	Lukhtanov 2017
BPALB12 7-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777530	Lukhtanov 2017
BPALB12 8-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777574	Lukhtanov 2017
BPALB12 9-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777532	Lukhtanov 2017
BPALB13 0-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777536	Lukhtanov 2017
BPALB13 1-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777534	Lukhtanov 2017
BPALB13 2-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777538	Lukhtanov 2017
BPALB13 3-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777533	Lukhtanov 2017
BPALB13 8-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777545	Lukhtanov 2017
BPALB14 9-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777537	Lukhtanov 2017
BPALB15 1-16	<i>Melitaea acentria</i>			KY777575	Lukhtanov 2017

BPAL230 2-14	Melitaea casta			KY777549	Lukhtanov 2017
BPAL230 3-14	Melitaea casta			KY777550	Lukhtanov 2017
BPAL230 4-14	Melitaea casta			KY777553	Lukhtanov 2017
BPAL230 5-14	Melitaea casta			KY777554	Lukhtanov 2017
BPAL230 6-14	Melitaea casta			KY777552	Lukhtanov 2017
BPAL230 7-14	Melitaea casta			KY777551	Lukhtanov 2017
casta-M8	Melitaea casta			KY867399	Lukhtanov 2017
casta-M9	Melitaea casta			KY867400	Lukhtanov 2017
BPAL258 5-14	Melitaea deserticola			KY777572	Lukhtanov 2017
BPAL258 6-14	Melitaea deserticola			KY777571	Lukhtanov 2017
BPAL268 6-14	Melitaea deserticola			KY777565	Lukhtanov 2017
BPAL270 4-14	Melitaea deserticola			KY777564	Lukhtanov 2017
BPAL285 7-15	Melitaea deserticola			KY777566	Lukhtanov 2017
BPAL286 0-15	Melitaea deserticola			KY777569	Lukhtanov 2017
BPAL288 5-15	Melitaea deserticola			KY777568	Lukhtanov 2017
BPAL288 6-15	Melitaea deserticola			KY777567	Lukhtanov 2017
BPAL289 8-15	Melitaea deserticola			KY777570	Lukhtanov 2017
1-7	Melitaea didyma	ZEvropa		AF187763	Wahlberg & Zimmermann 2000
188031	Melitaea didyma	VEvropa		KT792899	Pazhenkova et al. 2015
2005- LOWA- 822	Melitaea didyma	Centrální Asie		FJ663788	Lukhtanov et al. 2009
2005- LOWA- 823	Melitaea didyma	Centrální Asie		FJ663787	Lukhtanov et al. 2009
2005- LOWA- 824	Melitaea didyma	Centrální Asie		FJ663786	Lukhtanov et al. 2009
224011	Melitaea didyma	VEvropa		KT792900	Pazhenkova et al. 2015
225015	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KT792901	Pazhenkova et al. 2015
226015	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KT792902	Pazhenkova et al. 2015
227015	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KT792903	Pazhenkova et al. 2015

228015	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KT792904	Pazhenkova et al. 2015
229016	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KT792905	Pazhenkova et al. 2015
92015	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KT792898	Pazhenkova et al. 2015
AC6-7	Melitaea didyma	ZEropa	Španělsko	FJ462251	Leneveu et al. 2009
AC7-8	Melitaea didyma	ZEropa	Francie	FJ462252	Leneveu et al. 2009
BC ZSM Lep 21547	Melitaea didyma	Německo	Německo	JF415717	Hausmann et al. 2011
BPAL250 7-14	Melitaea didyma	Centrální Asie	Uzbekistán	KY086109	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL255 6-14	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086110	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL271 8-14	Melitaea didyma	Střední východ	Izrael	KY777573	Lukhtanov 2017
BPAL276 6-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086111	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL276 7-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086112	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL276 8-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086113	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL276 9-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086114	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL277 0-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086115	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL277 1-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086116	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL277 2-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086117	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL294 6-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086121	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL294 7-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086122	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL296 9-15	Melitaea didyma	VEvropa	Bulharsko	KY086126	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL299 1-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086130	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL299 2-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086131	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL299 5-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086132	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL299 7-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086133	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL299 8-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086134	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL299 9-15	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086135	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL302 3-15	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KY086141	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL303 5-15	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KY086142	Pazhenkova & Lukhtanov 2016

BPAL303 6-15	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KY086143	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL304 4-15	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KY086144	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL304 8-15	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KY086145	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL308 6-15	Melitaea didyma	VEvropa	Řecko	KY086153	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL308 7-15	Melitaea didyma	VEvropa	Bulharsko	KY086154	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL308 9-15	Melitaea didyma	Chorvatsko	Slovinsko	KY086155	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL309 0-15	Melitaea didyma	Chorvatsko	Slovinsko	KY086156	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL316 4-16	Melitaea didyma	VEvropa	Řecko	KY086158	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL316 5-16	Melitaea didyma	VEvropa	Řecko	KY086159	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL316 6-16	Melitaea didyma	VEvropa	Řecko	KY086160	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL316 7-16	Melitaea didyma	VEvropa	Řecko	KY086161	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL316 8-16	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KY086162	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL316 9-16	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KY086163	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL317 0-16	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KY086164	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL317 3-16	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KY086165	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL347 8-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086172	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL347 9-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086173	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL348 0-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086174	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL348 2-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086175	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL348 8-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086176	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL349 6-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086179	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL350 3-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kyrgyzstán	KY086180	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL350 4-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kyrgyzstán	KY086181	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL350 5-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kyrgyzstán	KY086182	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL351 2-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086183	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL351 3-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086184	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPAL351 4-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KY086185	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPALB18 6-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Rusko	KY086194	Pazhenkova & Lukhtanov 2016

BPALB18 7-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Rusko	KY086195	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPALB18 9-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Rusko	KY086197	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
BPALB19 0-16	Melitaea didyma	Centrální Asie	Rusko	KY086196	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
CCDB- 03033 G03	Melitaea didyma	Kavkaz	Rusko	KT874713	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 03033 H08	Melitaea didyma	Kavkaz	Rusko	KT874716	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17951 A10	Melitaea didyma	Centrální Asie	Čína	KT874698	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17951 A11	Melitaea didyma	Centrální Asie	Čína	KT874725	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17951 B04	Melitaea didyma	Střední východ	Sýrie	KT874738	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17951 B05	Melitaea didyma	SAfrika	Maroko	KT874712	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17966 B05	Melitaea didyma	Centrální Asie	Tádžikistán	KT874700	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17966 C01	Melitaea didyma	Rakousko	Rakousko	KT874733	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17966 C02	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KT874695	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17966 C03	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KT874737	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17966 C04	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KT874735	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17966 C05	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KT874709	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17966 C06	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KT874703	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17966 C07	Melitaea didyma	Kavkaz	Arménie	KT874748	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17966 C08	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KT874718	Pazhenkova et al. 2015
CCDB- 17966 C09	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kazachstán	KT874707	Pazhenkova et al. 2015

CCDB-17966 C10	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kyrgyzstán	KT874710	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17966 C11	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kyrgyzstán	KT874742	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17966 C12	Melitaea didyma	Centrální Asie	Uzbekistán	KT874726	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17966 D01	Melitaea didyma	Centrální Asie	Uzbekistán	KT874745	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17966 D03	Melitaea didyma	Centrální Asie	Tádžikistán	KT874722	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17966 D04	Melitaea didyma	Centrální Asie	Tádžikistán	KT874694	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17966 D05	Melitaea didyma	Centrální Asie	Tádžikistán	KT874715	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17966 G12	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KT874720	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17966 H01	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	KT874730	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17966 H03	Melitaea didyma	Centrální Asie	Kyrgyzstán	KT874746	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17966 H04	Melitaea didyma	Rakousko	Rakousko	KT874743	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17966 H05	Melitaea didyma	Rakousko	Rakousko	KT874721	Pazhenkova et al. 2015
CCDB-17968 E10	Melitaea didyma	Střední východ	Izrael	KT874744	Pazhenkova et al. 2015
LOWAB0 15-07	Melitaea didyma	Kavkaz	Arménie	KY118818	Lukhtanov et al. 2016
LOWAB0 16-07	Melitaea didyma	Kavkaz	Arménie	KY118819	Lukhtanov et al. 2016
LOWAB0 63-07	Melitaea didyma	Kavkaz	Arménie	KY118820	Lukhtanov et al. 2016
M27	Melitaea didyma	VEvropa	Bulharsko	KY086212	Pazhenkova & Lukhtanov 2016
MD11	Melitaea didyma	VEvropa	Bulharsko	KT792908	Pazhenkova et al. 2015
NW107-5	Melitaea didyma		Maroko	FJ462253	Leneveu et al. 2009
NW99-12	Melitaea didyma	VEvropa	Rusko	FJ462249	Leneveu et al. 2009
RV-06-G478	Melitaea didyma	ZEropa	Španělsko	KP870836	Dinca et al. 2015

RV-06-M962	Melitaea didyma	Rumunsko	Rumunsko	HQ004792	Dinca et al. 2011
RV-06-M973	Melitaea didyma	Rumunsko	Rumunsko	HQ004793	Dinca et al. 2011
RV-06-M995	Melitaea didyma	Rumunsko	Rumunsko	HQ004791	Dinca et al. 2011
Rvcoll. 090111X Z00	Melitaea didyma	ZEvropa	Španělsko	KP870744	Dinca et al. 2015
RVcoll.08 -M265	Melitaea didyma	Rumunsko	Rumunsko	HQ004789	Dinca et al. 2011
RVcoll.08 -M300	Melitaea didyma	Rumunsko	Rumunsko	HQ004790	Dinca et al. 2011
RVcoll.10 -C421	Melitaea didyma	Rumunsko	Rumunsko	KP870704	Dinca et al. 2015
RVcoll.11 -D602	Melitaea didyma	ZEvropa	Španělsko	KP870593	Dinca et al. 2015
RVcoll.11 -D609	Melitaea didyma	ZEvropa	Španělsko	KP870659	Dinca et al. 2015
RVcoll.11 -J885	Melitaea didyma	Rumunsko	Rumunsko	KP870749	Dinca et al. 2015
TLMF Lep 08290	Melitaea didyma	Rakousko	Rakousko	KP253180	Huemer & Hebert 2015
BPAL246 9-14	Melitaea higginsii			KY777548	Lukhtanov 2017
BPAL248 2-14	Melitaea higginsii			KY777547	Lukhtanov 2017
BPAL254 2-14	Melitaea interrupta			KY777514	Lukhtanov 2017
NA	Melitaea perseae			KY777510	Lukhtanov 2017
BPAL168 9-12	Melitaea perseae			KY777517	Lukhtanov 2017
BPAL169 6-12	Melitaea perseae			KY777513	Lukhtanov 2017
BPAL170 4-12	Melitaea perseae			KY777511	Lukhtanov 2017
BPAL229 3-14	Melitaea perseae			KY777507	Lukhtanov 2017
BPAL229 4-14	Melitaea perseae			KY777509	Lukhtanov 2017
BPAL229 5-14	Melitaea perseae	Centrální Asie	Kazachstán	KY777508	Lukhtanov 2017
BPAL234 9-14	Melitaea perseae			KY777522	Lukhtanov 2017
BPAL235 1-14	Melitaea perseae			KY777524	Lukhtanov 2017
BPAL235 2-14	Melitaea perseae			KY777523	Lukhtanov 2017
BPAL248 0-14	Melitaea perseae			KY777505	Lukhtanov 2017
BPAL248 1-14	Melitaea perseae			KY777506	Lukhtanov 2017
BPAL294 8-15	Melitaea perseae			KY777525	Lukhtanov 2017

BPAL295 9-15	Melitaea persea			KY777526	Lukhtanov 2017
BPAL297 5-15	Melitaea persea			KY777518	Lukhtanov 2017
BPAL297 6-15	Melitaea persea			KY777519	Lukhtanov 2017
BPAL297 7-15	Melitaea persea			KY777515	Lukhtanov 2017
BPAL297 9-15	Melitaea persea			KY777521	Lukhtanov 2017
BPAL298 0-15	Melitaea persea			KY777520	Lukhtanov 2017
BPAL298 3-15	Melitaea persea			KY777512	Lukhtanov 2017
BPAL298 4-15	Melitaea persea			KY777516	Lukhtanov 2017
NW43-10	Melitaea persea			KY867397	Lukhtanov 2017
NW43-9	Melitaea persea			KY867398	Lukhtanov 2017
AC3-3	Melitaea pseudoala	Centrál ní Asie	Kyrgyzstán	FJ462250	Leneveu et al. 2009
BPAL285 8-15	Melitaea trivía			KY777561	Lukhtanov 2017
BPAL285 9-15	Melitaea trivía			KY777562	Lukhtanov 2017
BPAL309 8-15	Melitaea trivía			KY777555	Lukhtanov 2017
BPAL311 5-15	Melitaea trivía			KY777560	Lukhtanov 2017
BPAL311 6-15	Melitaea trivía			KY777559	Lukhtanov 2017
BPAL312 1-15	Melitaea trivía			KY777558	Lukhtanov 2017
BPAL312 2-15	Melitaea trivía			KY777557	Lukhtanov 2017
BPAL312 5-15	Melitaea trivía			KY777556	Lukhtanov 2017
BPALB11 2-16	Melitaea trivía			KY777563	Lukhtanov 2017