

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
Katedra biologických disciplín

Studijní program: **Zemědělská specializace (N4106)**

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

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Barcoding českých denních motýlů

Autor:	Patrik Škopek
Vedoucí práce:	Sucháčková Alena, RNDr. Ph.D.
Konzultant práce:	Faltýnek Fric Zdeněk, RNDr. Ph.D. Berec Michal, doc. Mgr. Ph.D.

České Budějovice, 2020

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Patrik ŠKOPEK**
Osobní číslo: **Z17431**
Studijní program: **B4106 Zemědělská specializace**
Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**
Název tématu: **Barcoding českých denních motýlů**
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 :

V dávných dobách molekulární biologie, tedy zhruba před 20 lety, byla vybrána první polovina genu "cytochrom oxidáza podjednotka 1" jako univerzální gen pro identifikaci živočichů. Od té doby se zjistilo, že univerzálnost využití má jisté slabiny a ukazuje se, že i využití pro delimitaci druhů má svá úskalí, přesto je tento gen vhodným nástrojem pro řešení otázek zejména z biogeografie. Pro několik evropských států existují kompletně zpracované databáze tohoto genu u denních motýlů - Bavorsko, Finsko, Rumunsko a Španělsko. Srovnáním těchto dat s daty u několika osekvenovaných českých vzorků jsme došli k závěru, že naše druhy nemusí být nejpříbuznější těm nejbližším (bavorským) a kompletně zpracovaná data o českých motýlech poslouží jako základ pro řadu budoucích studií i jako podklad pro účinnou ochranu přírody.

Cílem této práce je:

- vyizolovat DNA denních motýlů z území ČR
- osekvenovat u všech mitochondriální gen cytochrome oxidase subunit I (tzv. barcode)
- výsledky srovnat s daty z ostatních zemí, kde byl kompletní "barcoding" zpracován

Rozsah grafických prací: podle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 25

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

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.*

DINCA, V., ZAKHAROV, E.V., HEBERT, P.D.N. & VILA, R. (2011) Complete DNA barcode reference library for a country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proc. R. Soc. B - Biol. Sci.* 278: 347-355.

Dinca, V., Montagud, S., Talavera, G., Hernandez-Roldan, J., Munguira, M.L., Garcia-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. *Scientific Reports* 5: 12395.

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. *Spixiana* 34: 47-58.

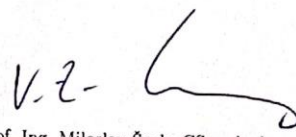
Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Alena Bartoňová

Konzultant bakalářské práce: RNDr. Zdeněk Faltýnek Fric, Ph.D.
ENTÚ AV ČR

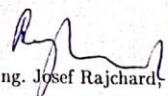
Ostatní konzultanti: Mgr. Michal Berec, Ph.D.
Katedra biologických disciplin

Datum zadání bakalářské práce: 16. listopadu 2018

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2020


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


JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Štefánikova 1908, 370 06 Česká Budějovice


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

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

Podpis:

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

V Českých Budějovicích, 13. 4. 2020

Podpis:

Poděkování:

Rád bych zde poděkoval RNDr. Aleně Sucháčkové, Ph.D. za odborné vedení, za pomoc a rady při zpracování této práce. Dále děkuji RNDr. Zdeňku Faltýnku Fricovi, Ph.D. za cenné připomínky a vstřícnost při konzultacích.

Abstrakt:

Cílem této práce bylo vyizolovat DNA denních motýlů z území ČR a osekvenovat u všech mitochondriální gen cytochrom c oxidázu podjednotku 1 (tzv. barcode), abych zjistil jejich genetickou příbuznost, vnitrodruhové vztahy a geografické odlišnosti. Druhým úkolem bylo porovnat získané sekvence DNA s ostatními státy Evropy. Vyizoloval jsem DNA z noh motýlů, naklonoval vybraný úsek DNA pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce) a ověřil kvalitu PCR produktů pomocí elektroforézy. Produkty PCR byly osekvenovány. Celkově bylo v této práci použito 500 sekvencí z 87 druhů (61,7 % fauny). Z těchto sekvencí byl sestaven fylogenetický strom metodami maximální věrohodnosti a Baysovské inference. Za účelem nalezení potencionální kryptické biodiverzity a odlišných linií byly pomocí analýzy GMYC všechny druhy rozděleny do čtyř skupin: 71 druhů (81,6 %) patřící do jedné entity, 4 druhy (4,6 %) sloučené do dvou entit, 10 druhů (11,5 %) rozděleno na více entit (potencionální kryptická diverzita) a 2 druhy (2,3 %) rozdělené a sloučené s jiným druhem. K českým vzorkům 33 druhů z čeledi Lycaenidae byly přidány vzorky pocházející s Rumunska a Německa a jejich příbuznost byla porovnána na základě fylogenetického stromu. Pro 10 druhů (30,3 %) chyběla data pro jednu ze srovnávacích zemí, 19 druhů (57,7 %) bylo příbuzných jak rumunským, tak německým vzorkům, 1 druh (3 %) byl příbuzný rumunským vzorkům, 1 druh (3 %) byl příbuzný německým vzorkům a 2 druhy (6 %) tvořily samostatnou českou větev. Tato práce sloužila jako předběžná studie české motýlí mitochondriální diverzity a účinnosti barcodingu, ale k dokončení studie je potřeba více dat.

Klíčová slova: DNA, barcoding, sekvence, denní motýli

Abstract:

The aim of this thesis was to extract DNA of Czech butterflies and sequence their mitochondrial gene cytochrome c oxidase subunit I (i.e., the barcode), in order to uncover their genetic and intraspecific relationships and geographical differences. Moreover, I compared the sequences with data from other European countries. I extracted DNA from butterfly legs, amplified the target DNA fragment with PCR (polymerase chain reaction), and checked the PCR product quality on an agarose gel. PCR products were sequenced. In total, I collated 500 sequences from 87 species (61.7% of the Czech fauna). Phylogenetic trees were built by maximum likelihood and Bayesian inference methods. To reveal the potential cryptic diversity and lineages, I used GMYC analysis. The results of GMYC were distributed into four groups: 71 species (81.6%) contained a single entity, two species pairs (4.6%) were merged into two entities, 10 species (11.5%) were split into more entities (potential cryptic diversity) and two species (2.3%) were both split and merged with a different species. To Czech samples of 33 Lycaenid species, I added database samples from Romania and Germany. Their relationships were compared based on a phylogenetic tree. In the case of 10 species (30.3%), data from one country was missing. In 19 species (57.7%), the Czech samples were related to both Romanian and German samples. One species (3%) was related to Romanian samples and one species to German samples. Two Czech species (6%) formed a separate branch in the tree. This work served as a preliminary study into the Czech butterfly mitochondrial diversity and barcoding efficacy, but more data is needed to complete the study.

Keywords: DNA, barcode, sequence, butterflies

Obsah:

1. Úvod:	1
1.1 DNA Barcoding	1
1.2 Databanky	2
1.3 Motýli (Lepidoptera)	3
1.4 Fauna denních motýlů v Evropě	4
1.5 Fauna denních motýlů v České republice	5
1.6 Vliv čtvrtohorního klimatu na motýly	6
1.7 Barcoding motýlů v Evropě	9
2. Cíl práce:	13
3. Metodika:	14
3.1 Sběr vzorků	14
3.2 Izolace DNA	14
3.3 PCR	15
3.4 Elektroforéza	16
3.5 Úprava sekvencí a fylogenetické analýzy	16
3.6 Analýza GMYC	17
3.7 Porovnání českých vzorků modráskovitých (Lycaenidae) s rumunskými a německými vzorky	17
4. Výsledky:	19
4.1 Topologie fylogenetických stromů	20
4.2 Výsledky analýzy GMYC	20
4.3 Porovnání českých vzorků modráskovitých (Lycaenidae) s rumunskými a německými vzorky	22
5. Diskuze:	23
5.1 Získané vzorky a sekvence	23
5.2 Porovnání topologie stromů s publikovanými daty	24
5.3 Analýza rozdělení na druhy (GMYC)	24
5.4 Porovnání výsledků GMYC s pyrenejským barcodingem	26
5.5 Porovnání českých a zahraničních vzorků čeledi Lycaenidae	26
6. Závěr:	28
7. Přehled použité literatury a zdrojů:	29
8. Přílohy:	37

1. Úvod:

1.1 DNA Barcoding

DNA Barcoding je technika sloužící k identifikaci druhů pomocí krátké sekvence DNA (tzv. barcode = čárového kódu), kde je tradiční taxonomická identifikace obtížná, nebo není možná (Lahaye a kol., 2008), a to nejen kvůli složité taxonomii, ale i pro správné přiřazení rozličných životních stádií k dospělcům známých druhů (Hebert a kol., 2003). Barcoding je také často rychlejší a levnější metoda než náročná morfologická identifikace druhu (Valentini a kol., 2009). DNA Barcoding hraje také roli při posuzování biologické rozmanitosti současných i minulých společenstev zvířat a rostlin. V dnešní době je sekvenování celkem běžné v řadě studií kvůli větší dostupnosti a nižší ceně. K identifikaci různých skupin druhů se používaly různé úseky genomu. Hebert a kol. (2003) zjistili, že genová sekvence dostatečně účinná pro rozlišení převážné většiny živočišných druhů je gen pro cytochrom c oxidázovou podjednotku I (*COI*) z mitochondriálního genomu. Jedná se o 648 bp (bp = base pairs čili páry bází) dlouhý fragment DNA sekvenovaný z 5' konce (Ward a kol., 2005). Tato velikost fragmentu umožňuje dostatečné rozlišení pro identifikaci kryptických druhů, čímž rozšiřuje přehledy o biologické rozmanitosti založené na taxonomii (Hebert a kol., 2004 b; Jung a kol., 2011). Mitochondriální geny mají vysoký počet kopií, což umožňuje získat větší výtěžek mtDNA ze stopových vzorků ve srovnání s jadernou DNA (Dawnay a kol., 2007). Druhy byly vymezeny konkrétní sekvencí nebo pevnou skupinou velmi podobných sekvencí (Ward a kol., 2005). Mezi další výhody barcodingu patří poskytování systematiky širší veřejnosti (biomedicína, zemědělství atd.) a identifikace a popisování nově objevených druhů (Savolainen a kol., 2005). Sekvence cytochrom c oxidázy podjednotky 1 (*COI*), která je univerzální u zvířat, se nepoužívá u většiny rostlin kvůli mnohem pomalejší rychlosti mutace (Kress a kol., 2005; Li a kol., 2015). Proto se u rostlin využívá například 800 bp dlouhý segment genu maturázy K (*matK*) z chloroplastové DNA. *MatK* se používá buď samotný, nebo obohacený o nekódující oblasti *trnH* nebo *pspA* (Hollingsworth a kol., 2009). U hub se nejčastěji používá interní transkribovaný spacer (*ITS*) z jaderné ribozomální DNA (Hollingsworth a kol., 2011; Coissac a kol., 2016). *ITS* se také široce používá k identifikaci rostlin a zvířat, ale je problematický kvůli příliš vysoké mutační rychlosti a vysoké míře možných kontaminací.

1.2 Databanky

Jednou z databanek obsahující databázi nukleotidových sekvencí formálně popsanych druhů je GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Společnost GenBank je součástí Mezinárodní databáze nukleotidových sekvencí (INSDC, <http://www.insdc.org/>) a podílí se na evropském nukleotidovém archivu (ENA, <https://www.ebi.ac.uk/ena>) a na databázi DNA japonské databanky (DDBJ, <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>). Databáze GenBank je také propojena s Národním centrem pro biotechnologické informace (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), který jí zpřístupňuje data, např.: popis sekvence, vědecký název a taxonomii zdrojového organismu, opakující se oblasti a místa mutací nebo modifikací. Sekvence pro databanky jsou získávány z laboratoří a projektů zabývajících se sekvenováním. Sekvence lze nahrát například pomocí portálu BankIt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/>) nebo přes NCBI. Japonská datová banka spolu s Evropským archivem nukleotidů si denně vyměňují data s GenBank, čímž zajišťují globální pokrytí. Sekvence z GenBank jsou přístupné pomocí flexibilního systému Entrez (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Search/entrezfs.html>), který pokrývá spolu z GenBank dalších 35 biologických databází. Databáze Entrez obsahují kromě sekvencí i genomové mapy, populace a fylogenetické sekvence. K vyhledávání podobnosti sekvencí v databankách a identifikaci druhu slouží program BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), (Benson a kol., 2007, 2015, 2018).

Další možností identifikace je poslat sekvenci neznámého původu na webové stránky CBOL („The Consortium for the Barcode of Life“, <http://www.ibol.org/phase1/cbol/>). To je mezinárodní iniciativa pro výzkum a vývoj barcodingu. Slouží k identifikaci druhů organismů podle odvozené sekvence z části genu *COI*. Za pár sekund vygeneruje název druhu (pokud existuje referenční sekvence) nebo název nejbližšího příbuzného taxonu (pokud neexistuje žádná referenční sekvence pro porovnání druhů v databázi), (Buhay, 2009). Každá databáze je propojena s vědeckou literaturou prostřednictvím PubMed a PubMed Central (Benson a kol., 2007, 2015, 2018).

Další z mezinárodních databází pomáhající shromažďovat, identifikovat a analyzovat záznamy DNA barcodu je „Barcode of Life Data System“ (BOLD; Ratnasingham a Hebert, 2007; <http://www.boldsystems.org/>). Používá algoritmus založený na jednoduchém modelu vzdálenosti k určení prvních 20 shod se sekvencemi

známých druhů registrovaných v databázi. Poskytuje také souhrn taxonomické identifikace a fylogenetický strom (Strugnell a Lindgren, 2007). Část databáze BOLD je veřejně k dispozici výzkumným orgánům a projektům. Spojuje molekulární, morfologická a distribuční data. Úložiště BOLDu se skládá z dvoufázového záznamu – stránkou se sekvencí a stránkou obsahující data vzorku (datum a místo chycení vzorku, souřadnice a geografický pohled včetně měřítka, obrázek), (Ratnasingham a Hebert, 2007). K datu 3/2020 obsahuje 7 206 717 sekvencí od 543 099 druhů (http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine).

1.3 Motýli (Lepidoptera)

Denní motýli jsou nápadnou skupinou, kterou v terénu nelze přehlédnout. Disponují pestrou barevností blanitých křídel a patří mezi nejkrásnější bezobratlé. Díky specifickým nárokům a rozmanitému způsobu života jsou důležitým článkem při vyhodnocování stavu životního prostředí a jsou zdrojem cenných informací pro výzkumné laboratoře (Laryszová, 2010). Klíčové jsou zejména výzkumy vývojové biologie, genetiky, ekologie, biogeografie, chování zvířat, změny klimatu a vzájemných vztahů hmyzu a rostlin (Wiemers a kol., 2018). Řád Lepidoptera (motýli) představuje jednu z nejrozmanitějších skupin hmyzu s téměř 180 000 popsánymi druhy z odhadovaného půl milionu druhů (Kristensen a kol., 2007; van Nieukerken a kol., 2011). Většinu diverzity řádu Lepidoptera tvoří noční motýli, denní motýli tvoří asi jen 20 000 druhů. Diverzita motýlů je největší v tropech, zejména v Neotropické oblasti (oblast Jižní Ameriky) s přibližně 8 000 druhy denních motýlů (Lamas, 2004; Lavinia a kol., 2017). Ze všech řádů hmyzu mají Lepidoptera největší množství sekvencí DNA barcodu v databázích (Huemer a kol., 2014). K datu 3/2020 databáze BOLD obsahuje 1 748 282 záznamů od 114 767 druhů a poskytuje pokrytí více jak poloviny známých druhů.

1.4 Fauna denních motýlů v Evropě

Populace motýlů v Evropě poslední desetiletí nepříjemně klesají (Thomas a kol., 2004; <https://www.iucnredlist.org/>). Podle současného seznamu (Wiemers a kol., 2018) je v Evropě známo 496 druhů denních motýlů, které patří do šesti čeledí: 246 druhů do čeledi Nymphalidae (babočkovití), 130 druhů do čeledi Lycaenidae (modráskovití), 57 druhů do čeledi Pieridae (běláskovití), 47 druhů do čeledi Hesperidae (soumračníkovití), 15 druhů do čeledi Papilionidae (otakárkovití) a 1 druh do čeledi Rionidae (pestrobarvcovití). Evropa se dělí na dva oddělené regiony podle odlišnosti v druhové skladbě motýlů – na středomořské země a země severně a východně od Alp a Pyrenejí. Tyto dva regiony se překrývají na úrovni pouze 160 druhů (Ulrich a Buszko, 2003). Ve středomořských zemích žije více druhů než severněji (viz obr. 1). Na pyrenejském poloostrově žije kolem 50 % evropské populace motýlů.

V Evropě došlo v posledním století k podstatným ztrátám biotopů a přírodních stanovišť (van Swaay a kol., 2006). Hlavní příčinou úbytku motýlů v Evropě je zánik jejich stanovišť postupným rozšiřováním zemědělství a lesnictví. Zemědělské i lesnické zásahy do krajiny zničily řadu mokřadních stanovišť, zanikly meze, louky, občasné pasené stráně a okraje polních cest. Užívání insekticidů a chemických hnojiv vytlačilo citlivější druhy motýlů ze zemědělské krajiny (Beneš a kol., 2002). Je důležité získávat údaje o míře úbytku v různých skupinách volně žijících živočichů, aby bylo možné určit a zacílit ochranná opatření (van Swaay a kol., 2006). Pozorované úbytky zapříčiněné těmito negativními zásahy do krajiny vedly k zahájení desítek programů na ochranu motýlů (Warren a Bourn, 2011; Bubová a kol., 2016). Chráněná území jsou nezbytná pro zachování biologické rozmanitosti. Úbytek motýlů indikuje špatný stav přírody, jejich aktivní ochrana zajistí ochranu většiny druhového bohatství bezobratlých (Konvička a kol., 2010). Pro účinnou ochranu je nutné řádně identifikovat druhy ohrožené vyhynutím a za tímto účelem se sestavují tzv. červené seznamy. Hodnocení pozic druhů na těchto seznamech by mělo být založeno na důkladných znalostech jejich biologie a ekologie (Margules a Pressey, 2000; Mattila a kol., 2006; Bubová a kol., 2016). I přesto, že motýli tvoří jednu z nejvíce studovaných skupin bezobratlých, jsou takové znalosti dostupné pouze pro velmi omezený počet jejich druhů (van Swaay a kol., 2002; Wenzel a kol., 2006; Müller a kol., 2010, Bubová a kol., 2016).



Obr. 1: Počet v evropských státech aktuálně žijících druhů denních motýlů včetně pravidelných migrantů a reintrodukovaných druhů (reálné číslo je o něco nižší, protože druh je klasifikován jako vyhynulý až po několika letech, kdy nebyl zaznamenán), (Wiemers a kol., 2018).

1.5 Fauna denních motýlů v České republice

Na území České republiky se nachází 141 druhů denních motýlů (jejich výčet, české i latinské názvy včetně popisů obsahuje Příloha I.), dalších 19 druhů již vyhynulo (Wiemers a kol., 2018, Obr. 1.).

Na jižní Moravě napojené na Panonskou nížinu se nacházejí některé teplomilné jihoevropské druhy, ale i druhy kontinentálních stepí. Další takové druhy žijí v České kotlině, kam pronikly přes kaňon Labe. Významnou roli sehrál člověk a jeho několik tisíc let trvající působení, které v době extenzivního zemědělství udržovalo heterogenitu krajiny. Člověk působením v krajině rozšiřoval bezlesí a tím umožňoval přežití mnoha druhů nelesních stanovišť. Boreální druhy se vyskytují často ve vyšších horských polohách, rašeliništích a některé i ve smíšených mezofilních lesích.

Na území České republiky se nenacházejí rozsáhlejší horské masivy a okrajová pohoří dosahují maximálně výšek 1 400–1 600 m. I přesto zde byl zaznamenán izolovaný výskyt několika horských druhů, častějších v Alpách nebo Karpatech, např.: *Erebia ephron*, *Erebia sudetica* (Laštůvka a Liška, 2011). V pohořích (Šumava, Jeseníky) je také největší diverzita motýlů. Dohromady tvoří druhy žijící na území České republiky značně heterogenní soubor různého geografického původu a obývajících stanoviště rozdílného charakteru (Laštůvka a Liška, 2011). Příklady druhů dalších stanovišť: běžné louky (*Polyommatus icarus*, *Maniola jurtina*, *Coenonympha pamphilus*), stepi (*Polyommatus damon*, *Chazara briseis*, *Spialia sertorius*), vlhké louky (*Boloria selene*, *Lycaena hippothoe*), rašeliniště (*Boloria eunomia*, *Vacciniina optilete*), řídké lesy (*Euphydryas maturna*, *Parnassius mnemosyne*), křoviny (*Iphiclides podalirius*, *Satyrium pruni*). Jako v ostatních státech Evropy, i v České republice ubývá přírodních stanovišť rozšiřujícím se zemědělstvím (Konvička a Beneš, 2005). Celkem u nás vyhynulo už 19 druhů motýlů, někteří v průběhu 20. století, jako např.: *Colias chrysotheme* (žlutásek úzkolemý; Esper, 1781), *Neptis sappho* (bělopásek hrachorový; Pallas, 1771), *Coenonympha hero* (okáč hnědý; Linnaeus, 1760). Další druhy vyhynuly poměrně nedávno – např. *Colias myrmidone* (žlutásek barvoměnný; Esper, 1781).

1.6 Vliv čtvrtohorního klimatu na motýly

Pravidelné klimatické změny v pleistocénu měly vliv na vnitrodruhovou genetickou rozmanitost, kterou můžeme pozorovat, pokud získáme barcodes z jedinců stejného druhu z více lokalit. Tyto klimatické změny vedly ke změnám v distribuci druhů, vymírání populací, izolaci, evoluci a migraci (Schmitt a Hewitt, 2004), přičemž rychlost těchto jednotlivých událostí závisela na úrovni tolerance jednotlivých druhů (Dennis a kol., 1991). Tyto procesy mohly například snížit přizpůsobivost (adaptabilitu) populací v důsledku genetického ochuzení (Schmitt a Hewitt, 2004). Během pleistocenního zalednění se jižní druhy izolovaly a vyvíjely nezávisle. Populace severních druhů zůstávaly propojené, popř. byly mobilnější a mohly migrovat na velké vzdálenosti. Střední Evropa (od Uralu po Britské ostrovy) tvoří jeden region s podobnou strukturou fauny a rozsahem jednotek. Směrem na jih se endemita zvyšuje, zatímco faunální struktury zmenšují prostorové nároky (Dennis a kol., 1991).

Geografická oblast, kterou druh obývá v době maximálního ústupu z větší části areálu rozšíření se nazývá refugium a může být jak v době ledové, tak i meziledové (Stewart a kol., 2010). Velikosti refugií, délky doby výskytu druhů v nich, a také umístění refugií formovaly současnou genetickou variabilitu uvnitř druhů. Kategorie refugií (obr. 2) zahrnují tradiční jižní refugia pro teplomilné druhy a ekvivalentní severská refugia pro druhy přizpůsobené chladu. Dále i kryptická refugia na sever nebo na jih od hlavních oblastí (Stewart a kol., 2010). Střídáním dob ledových a meziledových se společenstva rozpadala a znovu se tvořily nové ekosystémy i společenstva. Docházelo ke změnám v rozšíření druhů. Teplomilné druhy se šířily směrem na sever v dobách meziledových a druhy přizpůsobené chladu na jih v dobách ledových (Schmitt a Varga, 2012).

Refugia doby ledové

1) Jižní refugia

Teplomilné druhy se v době ledové obecně vyskytovaly na Pyrenejském, Apeninském a Balkánském poloostrově a rozšiřovaly se během teplých klimatických fází, jako je současná doba meziledová (Stewart a kol., 2010). Příkladem jsou třeba druhy listnatých lesů. Jižní refugia teplomilných druhů byla často obklopena rozšířenými chladnými suchými stepními oblastmi (Petit a kol., 2003).

2) Kryptická severní refugia

Kryptická severní refugia jsou refugia doby ledové pro teplomilné taxony umístěná ve vyšších zeměpisných šířkách (Stewart a kol., 2010). Mohla se vyskytovat v hlubokých chráněných údolích, která poskytovala vhodné mikroklima pro teplomilné druhy (Stewart a Lister, 2001).

Refugia doby meziledové

1) Severská refugia

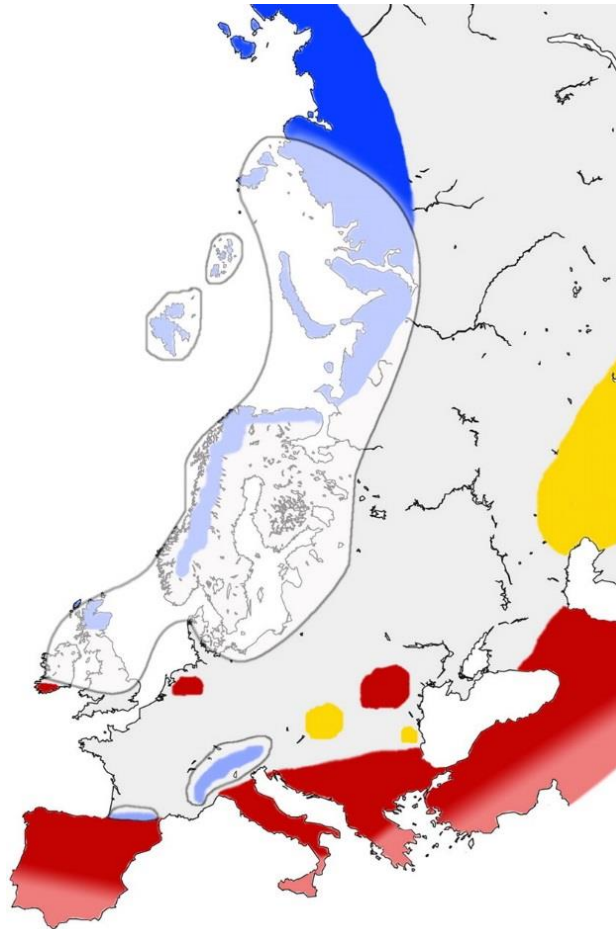
Severská refugia jsou regiony, kde druhy přizpůsobené chladu přežívají v dobách meziledových. Na severní polokouli se severská refugia nacházejí v nejsevernějších částech kontinentální Eurasie a Severní Ameriky (Stewart a kol., 2010). Během dob ledových bylo mnoho druhů, přizpůsobených chladu, rozšířenějších než dnes.

2) Kryptická jižní refugia

Kryptická jižní refugia byla refugia umožňující přežití chladnomilných druhů rozšířených v nižších zeměpisných šířkách. Tato refugia měla obvykle horskou topografii, jako jsou Alpy a Pyreneje (Stewart a kol., 2010). Populace druhů, adaptované na chlad v kryptických jižních refugiích, byly často obklopeny během dob meziledových populacemi teplomilných druhů, které se rozšířily ze svých refugií dob ledových (Stewart a kol., 2010).

Oceánicko-kontinentální gradient

Krom výše popsaného severojižního gradientu ve změnách velikostí areálu druhů pravděpodobně existoval ještě oceánicko-kontinentální gradient. „Oceánická“ adaptace znamená přizpůsobení na vlhčí a méně proměnlivé klima doby meziledové, zatímco „kontinentální“ adaptace na sušší klima s větší sezónní variabilitou, které se vyskytovalo v dobách ledových. Tento gradient vysvětluje expanzi stepních druhů během doby ledové směrem do Evropy (Stewart a kol., 2010).



Obr. 2: Obecná klasifikace evropských refugií. Červená: refugia dob ledových pro teplomilné druhy (jižní refugia a severní kryptická refugia). Modrá: refugia dob meziledových pro chladnomilné druhy (severní refugia a kryptická jižní refugia). Žlutá: refugia doby meziledové pro druhy kontinentálního klimatu (oceánicko-kontinentální gradient), (převzato ze Stewart a kol., 2010).

1.7 Barcoding motýlů v Evropě

Budování databází pro jednotlivé země je důležité hlavně z důvodu získání informací o genetických vztazích napříč Evropou. Zjistí se, zda se používá stejný název pro stejný druh v různých zemích. Značně pomůže s hledáním kryptických druhů a pomůže i se správným zařazením chybně určených druhů.

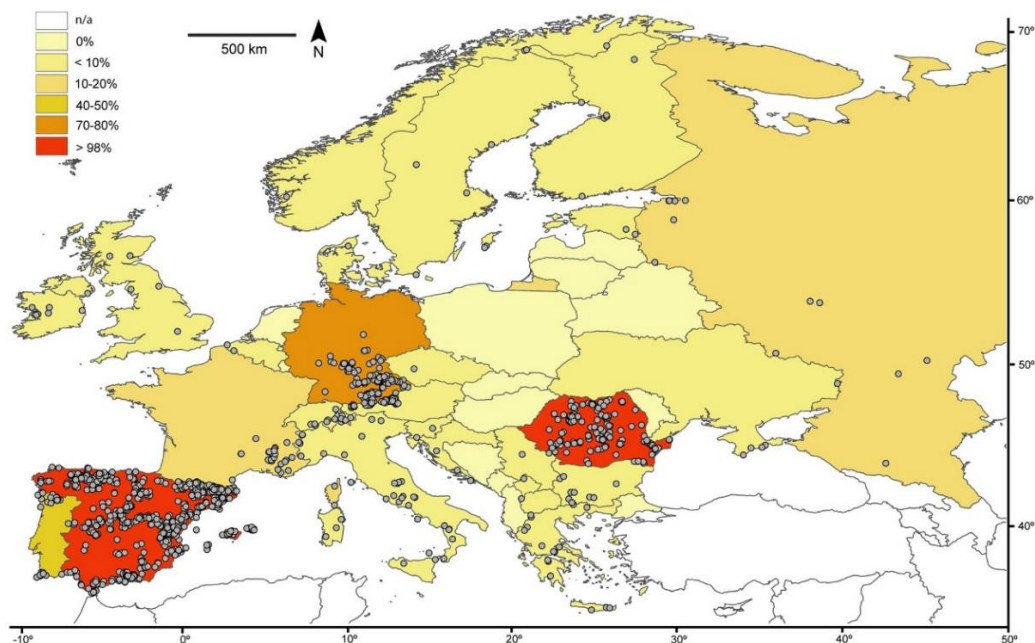
První zemí v Evropě, která vytvořila dataset barcodu denních motýlů bylo Rumunsko. Studie (Dincă a kol., 2011) byla zaměřena na 180 druhů motýlů patřící

do šesti čeledí: Nymphalidae, Papilionidae, Pieridae, Lycaenidae, Riodinidae a Hesperidae vyskytujících se v Rumunsku, což je asi jedna třetina evropské motýlí fauny. Rumunsko obsahuje pět ekoregionů a je dobrým příkladem země mírného pásu. Pro jejich studii bylo získáno 1387 sekvencí *COI* pro 180 druhů motýlů, což bylo 99 % druhů s potvrzeným výskytem v Rumunsku za posledních 30 let v době vzniku studie. Vzorky byly odebrány ze 135 lokalit od dubna 2006 do června 2009. Průměrně bylo sekvenováno 7,7 vzorku na jeden druh. Studie jim ukázala, že DNA barcode dokázal správně identifikovat 90 % druhů v této oblasti. Zbývajících 10 % (devět párů úzce příbuzných druhů) zahrnovalo případy parafylie (4 dvojice – 4,5 %), polyfylie (2 dvojice – 2,2 %) nebo sdílely barcode s blízkými příbuznými druhy (3 dvojice – 3,3 %). Čtyři případy parafylie a dva polyfylie vykazovaly krátké větve, to znamenalo nízkou úroveň mezidruhové genetické vzdálenosti (mezi 0,15 % a 0,58 %). Kromě zmíněných tří dvojic byly všechny haplotypy druhově specifické, takže vzorky šlo přiřadit ke správnému taxonu. Tři dvojice druhů, které sdílely DNA barcode, byly úzce příbuzné a dva z nich pravidelně hybridizovaly (*Colias crocea* – *Colias erate* a *Pieris napi* – *Pieris bryoniae* (tab. 1). Genetická vzdálenost k nejbližšímu sousednímu taxonu se pohybovala od 0 do 11,1 %, v průměru 4,7 %. Patnáct dvojic druhů (16 %) vykazovalo překrývání mezi jejich maximální vnitrodruhovou genetickou variabilitou a minimální mezidruhovou odlišností (divergencí) od jiného taxonu. Výskyt kryptických taxonů (tj. zatím nepopsaných, morfologicky neodlišitelných druhů) byl nepravděpodobný, protože u osmi případů (4,4 %), kde byla zaznamenána hluboká vnitrodruhová divergence, byla část sekvencí velmi podobná sekvencím blízkého příbuzného taxonu, což naznačuje intrograsi nebo neúplné třídění linií v sekvenovaném genu (např. *Polyommatus napi* a *Polyommatus bellargus*).

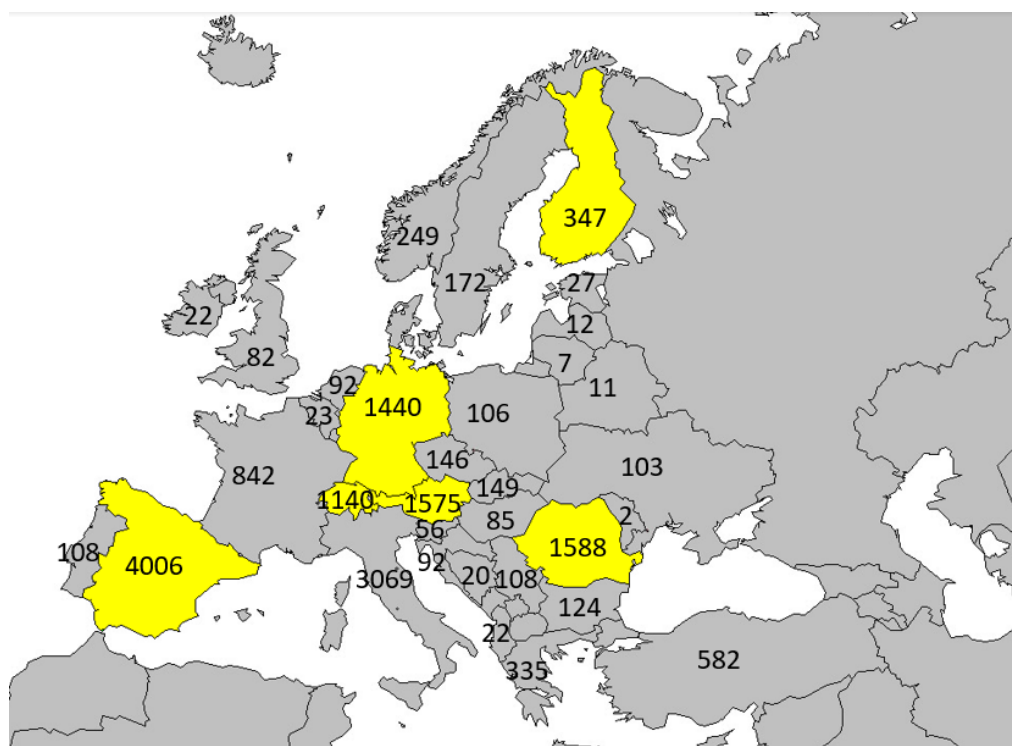
Další studie DNA barcodů (Dincă a kol., 2015) byla zaměřena na Pyrenejský poloostrov. Autoři získali 3502 sekvencí z 228 uznaných druhů patřících do šesti čeledí, s průměrně 15,4 exempláři na druh z různých zeměpisných oblastí, včetně pevninského Španělska, Portugalska, Andorry a Baleárských ostrovů. Pyrenejský poloostrov je centrum motýlí diverzity, zahrnuje asi 50 % evropské motýlí fauny. Sekvence DNA byly pro 93,9 % z 228 druhů monofyletické, pro 2,6 % byly polyfyletické a 3,5 % sdílely DNA barcode. Všechny druhy, které sdílely barcode patří do čeledi Lycaenidae. Dvě ze šesti motýlích čeledí (Pieridae, Papilionidae) obsahovaly ze 100 % monofyletické druhy. V rámci této studie byl tento pyrenejský dataset

následně sloučen se všemi ostatními veřejnými záznamy pro evropské motýly v databázi BOLD (obr. 3) a byl vytvořen dataset s 5782 sekvencemi DNA z 299 druhů (cca 60% fauny evropských motýlů) s průměrně 19,3 exempláři na druh. Ve srovnání s pyrenejským datasetem tento soubor obsahoval větší geografické rozšíření a pokrytí taxonu (71 dalších druhů). Když se geografické pokrytí a počet taxonů rozšířil po celé Evropě, úroveň monofylie klesla na 84,6 % z 299 druhů. 8,0 % bylo polyfyletických a 7,4 % sdílely DNA barcode. Poté už pouze čeleď Papilionidae obsahovala ze 100 % monofyletické druhy. Evropský dataset byl analyzován metodou GMYC (Generalized Mixed Yule-Coalescent), který hledá fylogeneticky významné jednotky a tím pádem potenciální kryptickou rozmanitost a zvýraznění odlišných linií. Výsledkem bylo 27,7 % druhů, které byly rozděleny do dvou nebo více entit, které představují potenciální kryptickou biologickou rozmanitost.

V roce 2011 vznikla studie v Bavorsku (Hausmann a kol., 2011) zaměřená nejen na denní motýly, ale i na větší noční motýly (Macroheterocera). Dataset se skládal ze sekvencí pro 1264 z 1338 druhů motýlů. V současné době se vyskytuje na území Německa 174 druhů denních motýlů. Dále vznikla studie s barcodingem středoasijských motýlů (Lukhtanov a kol., 2009), která ve skutečnosti zahrnovala dataset z celého území bývalého SSSR. V posledních letech zpracovaly celé fauny denních motýlů i Rakousko a Finsko (Huemer a kol., 2014) a Švýcarsko (Litman a kol., 2018), (obr. 4).



Obr. 3: Mapa Evropy ilustrující intenzitu odběru vzorků a pokrytí taxonu (procento druhů přítomných v každé zemi se záznamy barcodu DNA) pro evropský dataset použitý pro studii Dincě a kol., 2015.



Obr. 4: Žlutě jsou vyznačeny evropské státy se zpracovanými barcodovými knihovnami motýlí fauny. Čísla ukazují počet jedinců denních motýlů v jednotlivých státech v databázi BOLD k 3. 2. 2020.

2. Cíl práce:

Cílem této práce bylo získat a osekvenovat úsek mitochondriální DNA (tzv. barcode) velké části druhů českých denních motýlů za účelem zjištění jejich genetické příbuznosti, vnitrodruhových vztahů a geografické či habitatové různorodosti.

Druhým úkolem bylo porovnat získané sekvence DNA s dalšími státy Evropy, aby se zjistil původ našich českých populací a popřípadě i jejich unikátnost.

3. Metodika:

Základem laboratorní práce byla izolace DNA z noh motýlů, která byla dále vystavena polymerázové řetězové reakci (PCR), umožňující cyklickou klonaci vybraných úseků DNA. Za pomoci elektroforézy na agarózovém gelu pak byla ověřena kvalita PCR produktů, které se poslaly na sekvenování nukleových kyselin – určení pořadí nukleotidů v úseku DNA. Následovala úprava a srovnání (tzv. aligning) nasekvenované DNA. Upravené sekvence se tak daly porovnávat, třídit a řadit pomocí specializovaných programů, které mi mohly poskytnout geografický pohled na motýlí biodiverzitu a určit příbuznost a vývojové linie.

3.1 Sběr vzorků

V první řadě se musely sehnat všechny druhy motýlů žijící na našem území. Byly použity některé sekvence, které už byly zhotovené pro jiné výzkumy (Bartoňová a kol., 2019; Maresova a kol., 2019), dále vzorky motýlů již připravených k izolaci. Všechny ostatní druhy musely být za účelem této práce odchytny z volné přírody (Tabulka I.). Kvůli možné vnitrodruhové variabilitě nebo morfologické podobnosti některých druhů se sbíralo a použilo k dalším krokům více vzorků jednoho druhu. Všem vzorkům celých těl motýlů byly odebrány nohy a přemístěny do mikrozkušavek (tzv. eppendorfek). Každá eppendorfka musela být řádně označena.

3.2 Izolace DNA

V závislosti na čase jsem izoloval 8 až 30 vzorků naráz. Izolaci jsem prováděl pomocí sady Genomic DNA Minit kit dle návodu. Prvním krokem bylo přidání 200 μ l lyzačního pufru (GT Buffer) do každé z eppendorfek za pomoci pipety. V něm jsem za pomoci pestlí rozdrtil nohy motýlů na co nejmenší části, aby došlo k homogenizaci vzorku. Poté jsem přidal 20 μ l Proteinázy K, která slouží k degradaci bílkovin v buněčných lyzátech a za pomoci vortexu jsem vzorky promíchal. Eppendorfky jsem poté umístil do inkubačního zařízení na nejméně 14 hodin, kde se inkubovaly při teplotě 60 °C. Po inkubaci jsem přidal 200 μ l GBT pufru (GBT Buffer), vzorek jsem promíchal a dal inkubovat na dalších 20 minut. Dále jsem přidal 200 μ l analytického lihu (ethanol) a vzorky jsem znovu promíchal. Následně jsem

přepipetoval obsah eppendorfek do připravených kolonek. Kolonky jsou mikrozkušavky (GD column) ve sběrných 2 mililitrových zkumavkách (Collection Tube). Poté jsem kolonky umístil do centrifugy na 2 minuty při 15 000 otáčkách za minutu. Kolonky jsem pak přemístil do nových sběrných nádob a staré jsem vyhodil. Do kolonky jsem přidal 400 μ l promývacího W1 pufru (W1 Buffer) a pak byly kolonky znovu centrifugovány 30 sekund. Vylil jsem obsah sběrné nádoby a přidal 600 μ l dalšího promývacího pufru (WASH Buffer) a opět se centrifugovalo 30 sekund. Poté jsem znovu vylil obsah sběrné nádoby a pokračoval s dalšími třemi minutami v centrifuze – vysoušení. Po skončení jsem přemístil kolonky do nových eppendorfek. Do každé eppendorfky jsem přidal 70 μ l předehřátého (60 °C) elučního roztoku (Elution Buffer), který uvolňuje vázanou DNA v kolonce. Elution Buffer se nechal působit minimálně 10 minut. Následně se centrifugovalo 30 sekund, tím se uvolnily templáty DNA do eppendorfek, které jsem uskladnil v mrazáku (-20 °C).

3.3 PCR

Amplifikoval se mitochondriální gen cytochrom c oxidáza podjednotka 1 (*COI*). Nejdříve jsem potřeboval vytvořit Master Mix, ve kterém probíhala PCR reakce. Ten se skládal z 4 μ l PCR H₂O, 6,25 μ l Bioline RedMix a dvou univerzálních primerů – 0,625 μ l Forward primer LCO a 0,625 μ l Reverse primer NANCY (Monteiro a Pierce, 2001; Wahlberg a Wheat, 2008). Sekvence primeru LCO je: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GTC AAC AAA TCA TAA AGA TAT TGG 3' a sekvence primeru Nancy: 5' ATT AAC CCT CAC TAA AGG G CCT GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC 3'. Primery obsahovaly promotory (T7promoter a T3) pro usnadnění sekvenování. Uvedené objemy jsou uvedeny na 1 vzorek. Dle počtu vzorků se násobně navyšovaly i objemy jednotlivých složek Master Mixu. Všechny chemikálie se skladovaly podchlazené. Připravený Master Mix jsem přepipetoval na speciální destičku obsahující mikrozkušavky. Do každé mikrozkušavky jsem přepipetoval 11,5 μ l Master Mixu a 2 μ l templátu DNA. Destičku jsem protřepal a umístil do termocykleru k amplifikaci DNA.

PCR probíhala následujícím způsobem: 3 minuty počáteční denaturace (zahřátí na 95 °C) – rozpojení vodíkových můstků, poté 40 cyklů – 30 sekund (94 °C), 30 sekund (60 °C) a 30 sekund (72 °C). Proces končí 10minutovou finální elongací (72 °C). Výsledkem jsou desítky miliard amplifikovaných fragmentů DNA.

3.4 Elektroforéza

Pomocí elektroforézy na agarózovém gelu jsem ověřil kvalitu produktů PCR. Zviditelnily se a oddělily různě dlouhé skupiny řetězců DNA. Nejprve bylo třeba vyrobit 1,5 % agarózový gel. Rozmíchal jsem 1,5 g práškové agarózy ve 100 ml TAE pufru (TAE Buffer). Směs jsem dal do mikrovlnné trouby na 1,5 min. Gel měl mít po vyndání z trouby rosolovitou konzistenci. Poté jsem přidal do gelu 1 μ l barviva GEL-RED a promíchal směs. Dále jsem gel přelil do připravené vaničky s hřebínky (vytvoří jamky pro vnesení vzorků) a počkal 20 minut, než gel ztuhne. Po ztuhnutí gelu jsem vaničku vložil do elektroforetické vany s elektroforetickým pufrem. Následovalo přepipetování vzorků do jamek v gelu. Do jedné jamky jsem přidal samostatně velikostní ladder k odhadu velikosti DNA fragmentů. Po přepipetování jsem uzavřel vaničku a napojil anodu a katodu. Při konstantním napětí 150 V po dobu 25 minut se záporné nabitě řetězce nukleových kyselin prodíraly směrem ke kladné elektrodě. Po proběhnutí elektroforézy jsem gel vyndal z vaničky a umístil pod UV transiluminátor s kamerou s černým filtrem k fotodokumentaci. Fotografie ukázala, u kterých vzorků proběhla PCR úspěšně a vznikl PCR produkt (Obr. 5). PCR produkty byly odeslány do firmy Macrogen (Amsterdam, Nizozemsko), kde byly na komerční bázi osekvenovány na sekvenátoru typu ABI3730XL.

3.5 Úprava sekvencí a fylogenetické analýzy

Získané sekvence byly nejprve porovnány s databází pomocí algoritmu BLAST a případné kontaminace byly vymazány. Pak byly sekvence zkontrolovány v programu Geneious (Kearse a kol., 2012) a následně zarovnány metodou CLUSTAL-W. K sekvencím získaným v rámci tohoto projektu byly přidány sekvence s ostatním projektů laboratoře a také sekvence vzorků pocházejících z území České republiky získané z databází GenBank a BOLD. Jako outgroup (zakořenění stromu) byly použity dvě sekvence vřetenušek (rod *Zygaena*) z databáze GenBank.

Fylogenetické stromy byly vytvořeny metodou maximální věrohodnosti (maximum likelihood) a metodou Bayesovské inference. Konsenzuální strom maximální věrohodnosti byl spočítán v programu IQTREE (Nguyen a kol., 2015) pomocí IQTREE webového serveru (Trifinopoulos a kol., 2016), metodou ultrafast *bootstrap* (Minh a kol., 2013). Dichotomický Bayesovský strom byl spočítán

v programu Beast 1.10 (Suchard a kol., 2018). Speciační model byl nastaven jako *Speciation: Yule process* a molekulární hodiny jako *strict clock*. Analýza byla počítána na 15 milionů generací ve 3 nezávislých bězích. Podobnost těchto běhů byla přezkoumána v programu Tracer 1.6 (Rambaut a kol., 2014). Stromy ze všech tří běhů byly spojeny a následně byl nalezen jediný nejlepší strom. Substituční model pro Bayesovskou analýzu byl použit GTR + I + G nalezený pomocí programu PartitionFinder 2 (Lanfear a kol., 2017).

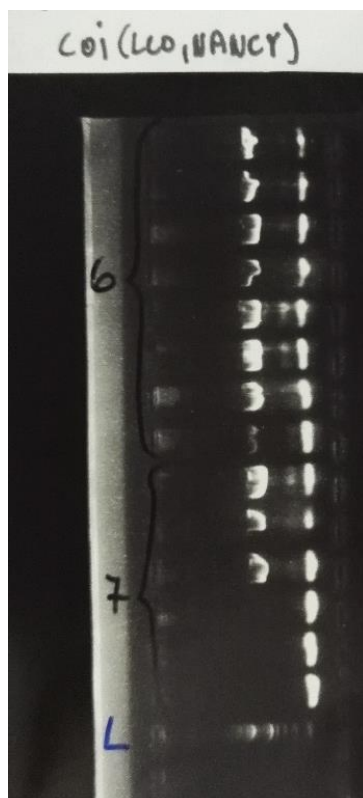
3.6 Analýza GMYC

Rozdělení větví na entity (potenciální druhy) bylo provedeno na Bayesovském stromě metodou ST-GMYC (*single threshold Generalized Mixed Yule Coalescent*) v knihovně splits (Ezard a kol., 2009) v programu R. Následně jsem jednotlivé entity rozdělil do čtyř skupin: (1) jeden taxonomický druh = jedna entita, (2) více taxonomických druhů spadá do jedné entity, (3) jeden taxonomický druh byl rozdělen na více entit, (4) jeden taxonomický druh byl rozdělen na více entit a současně došlo ke sloučení s dalším druhem. V případech (2), (3) a (4) jsem hledal, zda je toto rozdělení sympatrické (tj. entity/druhy se vyskytují společně na stejném území – ve stejném kraji) či alopatrikové (entity/druhy se vyskytují geograficky jinde).

3.7 Porovnání českých vzorků modráskovitých (*Lycaenidae*) s rumunskými a německými vzorky

Pro tuto analýzu bylo použito 125 sekvencí od 33 českých druhů (75 % fauny čeledi *Lycaenidae*). Tyto sekvence byly porovnávány s databázovými vzorky z Rumunska (Dincă a kol., 2011) a Německa (Hausmann a kol., 2011) k určení jejich vzájemné příbuznosti. Z Rumunska bylo k dispozici 316 sekvencí a z Německa 110 sekvencí. Zvoleny byly tyto dvě země, protože mají zpracované barcodingové knihovny pro denní motýly a jejich fauny se z větší části překrývají s českou faunou. Nejdříve byl v programu Beast 1.10 spočítán Bayesovský strom, kde byl speciační model nastaven jako *Coalescent: Constant Size* a molekulární hodiny jako *strict clock*. Analýza byla počítána na 10 milionů generací ve 3 nezávislých bězích a substituční model byl použit GTR + I.

Podle topologie stromu jsem pak druhy rozdělil do pěti skupin: 1) chybí data pro jednu ze srovnávacích zemí (nebo obě), 2) české vzorky příbuzné jak rumunským, tak německým vzorkům (nedá se určit), 3) české vzorky (většinou) příbuzné rumunským, 4) české vzorky (většinou) příbuzné německým a 5) většina českých vzorků tvoří samostatnou skupinu (větev).

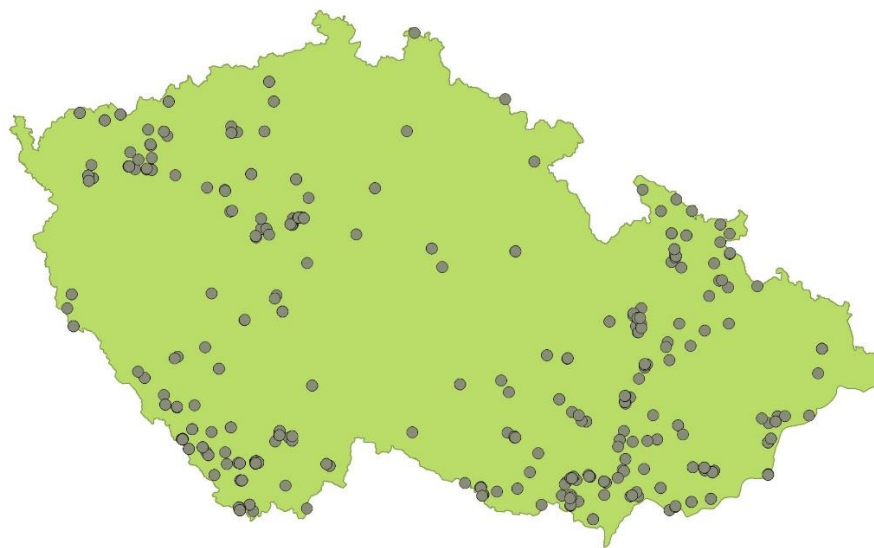


Obr. 5: Fotografie gelu z UV transiluminátoru ukazující, zda u jednotlivých vzorků proběhla PCR reakce a byl získán PCR produkt (levý sloupec bílých pruhů).

4. Výsledky:

Dohromady bylo za pomoci spolupracovníků nasbíráno 787 vzorků motýlů 120 druhů z celkových 141 druhů žijících na našem území (tj. 85 % české fauny; Příloha I.), s průměrně 6,55 vzorku na 1 druh. Vzorky byly nasbírány z přibližně 300 lokalit po České republice (obr. 6). Ve své práci jsem izoloval 255 vzorků a 532 vzorků bylo použito z jiných projektů pracoviště. Z těchto vzorků bylo úspěšně získáno 398 sekvencí z 82 druhů (58,2 % fauny) s průměrem 5 sekvencí na 1 druh. Dalších 102 sekvencí z 11 druhů bylo získáno z databází (GenBank, BOLD). Celkově bylo v této práci použito 500 sekvencí z 87 druhů (61,7 % fauny).

Z tohoto počtu 232 sekvencí náleželo k 34 druhům z čeledi Nymphalidae (55,7 %), 125 sekvencí k 33 druhům z čeledi Lycaenidae (75 %), 1 sekvence k 1 druhu z čeledi Riodinidae (100 %), 130 sekvencí k 11 druhům z čeledi Pieridae (68,8 %), 10 sekvencí k 7 druhům z čeledi Hesperidae (46,6 %) a 2 sekvence k 1 druhu z čeledi Papilionidae (20 %).



Obr. 6: Lokality sběru motýlů použité pro tuto práci.

Fylogenetické analýzy

4.1 Topologie fylogenetických stromů

Na bázi stromu vytvořeného metodou maximální věrohodnosti se nachází čeleď Papilionidae (Příloha II.). Nymphalidae je monofyletická čeleď, Lycaendiae a Rionidae jsou spolu také monofyletické. V tomto stromě není monofyletická čeleď Pieridae, tvoří dvě větve. První větev zahrnuje druhy *Pieris manni*, *P. rapae* a *P. napi*. Druhou větev tvoří *Colias* spp., *Aporia crataegi*, *Leptidea juvernica* a *L. sinapsis*. Druhou čeledí rozdělenou na dvě větve jsou Hesperiiidae. V první větvi je většina druhů, v té druhé pouze *Carcharodus alceae*.

Ve stromu vytvořeném metodou Bayesovské inference je čeleď Pieridae také rozdělena na dvě větve. Lycaenidae už zde ale netvoří monofylii s Rionidae, zde je na samostatné větvi. I zde tvoří Hesperiiidae dvě větve. Jedna z větví Hesperiiidae je sesterská s Riodinidae.

4.2 Výsledky analýzy GMYC

Všech 500 sekvencí patřících k 87 druhům bylo analyzováno metodou GMYC za účelem nalezení potenciální kryptické biodiverzity a odlišných linií. Všechny druhy byly rozděleny do čtyř skupin: 1) všechny vzorky daného druhu patří do jedné entity (správně určené druhy tvořící aktuální biodiverzitu), 2) dva nebo více druhů patří do jedné entity, 3) jeden druh je rozdělen na více entit (potenciální kryptická diverzita) a 4) jeden druh rozdělen a sloučen s jiným druhem.

Ve skupině (1) se nachází 71 druhů (81,6 %) z celkového počtu druhů. Ve skupině (2) jsou celkem 4 druhy (4,6 %) sloučené do dvou entit. Osm sekvencí *Pseudophilotes vicrama* a tři sekvence *Pseudophilotes baton* byly sloučeny jako jedna entita. Všechny vzorky *P. vicrama* pocházejí ze středočeského kraje, zatímco vzorky *P. baton* z okolí Šumavy. Dvě sekvence *Colias erate* vytvořily jednu entitu dohromady s dvěma sekvencemi *Colias crocea*. Všechny vzorky rodu *Colias* jsou sympatrické – pocházejí z okolí centrální Moravy. Ve skupině (3) je 10 druhů (11,5 %) a jsou to: *Pieris rapae*, *Colias palaeno*, *Boloria selene*, *Aphantopus hyperantus*, *Maniola jurtina*, *Melanargia galathea*, *Melitaea athalia*, *Melitaea aurelia*, *Coenonympha glycerion* a *Erebia medusa*, které se rozdělily do dvou či více

entit. Vzorky *Aphantopus hyperantus*, *Melitaea aurelia* a *Erebia medusa* nevykazovaly geografické rozdělení. *Pieris rapae* rozdělený do dvou entit (46:7) obsahoval ve druhé entitě 6 vzorků z GenBanku (z Olomouce) a 1 vzorek analyzovaný pro tuto práci (z Českých Budějovic). Druh *Colias palaeno* rozdělený v poměru 10:3:29:1 sekvencí na entitu. První entita s deseti vzorky byla smíšená – 8 vzorků ze Šumavy (Jezerní slat', Světlík, Kapličské rašeliniště) a 2 vzorky ze Slavkovského lesa. Druhá entita se třemi vzorky byla ze vzorků na Šumavě (Kapličské rašeliniště, Záhvozdí), třetí entita obsahuje vzorky ze Šumavy a Krušných hor. Entita s jedním vzorkem je ze Šumavy (Záhvozdí). Druh *Boloria selene* byl rozdělený do pěti entit (3:3:4:2:13). První entita obsahuje vzorky z Bílých Karpat (Hrčánky, Sidonie), druhá entita pouze ze Sidonie. Třetí entita obsahuje 3 vzorky ze Sidonie a 1 vzorek ze Slavkovského lesa (Nová ves u Sokolova). Čtvrtá entita zahrnuje 2 vzorky z Bílých Karpat (Hrčánky a Sidonie). V poslední entitě se nachází vzorky z Bílých Karpat, Slavkovského lesa a Šumavy. Všechny vzorky *Maniola jurtina* (10:57:2:1) pocházejí ze dvou lokalit – okolí Českého Krumlova a PR Terasy (Uherské Hradiště). První dvě entity jsou z obou lokalit, třetí o dvou vzorcích jsou z PR Terasy a čtvrtá entita pochází z Českého Krumlova. Druh *Melanargia galathea* byl rozdělen do čtyř entit (2:14:3:1) se všemi vzorky taktéž od Českého Krumlova a PR Terasy. První entita má 1 vzorek z Českého Krumlova a druhý z PR Terasy. Druhá i třetí entita je také rozdělena mezi tyto dvě lokality. Vzorek čtvrté entity je z PR Terasy. Druh *Aphantopus hyperantus* se rozdělil do dvou entit (2:2). Všechny vzorky jsou z okolí Českého Krumlova. Druh *Melitaea athalia* rozdělena do dvou entit (2:2). Jeden vzorek je z Krušných hor, ostatní z Moravy. Dalším rozděleným druhem je *Melitaea aurelia* rozdělená do dvou entit (2:1). Všechny vzorky jsou sympatrické z okolí jihovýchodní Moravy. Druh *Coenonympha glycerion* byl rozdělen do dvou entit (1:1). Jeden vzorek je z Olomouce a druhý z Podyjí. Posledním rozděleným druhem je *Erebia medusa* rozdělena do dvou entit (1:1). Oba vzorky jsou ze středních Čech.

Skupina (4), 2 druhy (2,3 %) - zajímavým případem je rozdělení *Polyommatus coridon* do dvou entit v poměru sekvencí (5:12) a zároveň sloučení těchto 12 sekvencí s *Polyommatus bellargus* (12+3).

4.3 Porovnání českých vzorků modráskovitých (Lycaenidae) s rumunskými a německými vzorky

U 33 druhů z čeledi Lycaenidae jsem porovnal příbuznost českých vzorků se vzorky pocházejícími s Rumunska a Německa. Všechny druhy jsem rozdělil do pěti skupin: 1) chybí data pro jednu ze srovnávacích zemí (nebo obě), 2) české vzorky příbuzné jak rumunským, tak německým vzorkům (nedá se určit), 3) české vzorky (většinou) příbuzné rumunským, 4) české vzorky (většinou) příbuzné německým a 5) většina českých vzorků tvoří samostatnou skupinu (větev).

Ve skupině (1) se nachází celkem 10 druhů (30,3 % z porovnávaných druhů). Pro druhy *Satyrium ilicis*, *Cupido decoloratus*, *Cupido alcetas*, *Glaucopsyche alexis*, *Pseudophilotes vicrama*, *Lycaena alciphron* a *Lycaena dispar* chybí německé vzorky. *Cupido alcetas* tvoří samostatnou českou i rumunskou větev. Druhům *Polyommatus damon* a *Vacciniina optilete* chybí rumunské vzorky. *Vacciniina optilete* tvoří samostatnou českou a německou větev. Pro druh *Pseudophilotes baton* chybí jak německé, tak rumunské vzorky (v Rumunsku se tento druh nevyskytuje a v Německu je pravděpodobně velmi vzácný). Ve skupině (2) se nachází 19 druhů (57,7 %) u kterých nešla určit příbuznost: *Satyrium pruni*, *Satyrium w-album*, *Cupido minimus*, *Cupido argiades*, *Plebejus argus*, *Polyommatus amandus*, *Polyommatus dorylas*, *Polyommatus coridon*, *Polyommatus bellargus*, *Aricia agestis*, *Aricia artaxerxes*, *Cyaniris semiargus*, *Phengaris alcon*, *Phengaris arion*, *Phengaris teleius*, *Phengaris nausithous*, *Scolitantides orion*, *Lycaena tityrus*, *Lycaena phlaeas*. Ve skupině (3) je 1 druh (3 %), který je příbuzný rumunským druhům: *Thecla betulae* (české vzorky tvořily větev společně s rumunskými, německé tvořily vlastní větev). Ve skupině (4) je také 1 druh (3 %), kde jsou naše vzorky příbuzné těm německým: *Aricia eumedon* (české vzorky tvořily větev společně s německými, rumunské tvořily vlastní větev). Ve skupině (5), kde české vzorky tvořily samostatnou větev, jsou 2 druhy (6 %): *Plebejus argyrognomon* a *Polyommatus thersites*.

5. Diskuze:

Tato práce byla zaměřena na osekvenování úseku mitochondriální DNA většího množství druhů českých denních motýlů za účelem souhrnného přehledu české fauny a porovnání výsledků a příbuznosti s dalšími státy Evropy.

5.1 Získané vzorky a sekvence

Pro tuto práci byly dohromady posbírány vzorky celkem od 120 druhů ze 141 druhů. Takové zastoupení (85 % fauny) je celkem vysoké vzhledem k vzácnosti velké části druhů. I přesto měla např.: studie Dincă a kol. (2011) 99 % fauny Rumunska a studie Dincă a kol. (2015) přes 90 % fauny Pyrenejského poloostrova. Mezi 21 chybějících druhů patří např.: *Thymelicus sylvestris*, *Satyrrium spini* nebo *Nymphalis xanthomelas*. Zlepšit by se dalo zastoupení vzorků na druh. Průměrně sice mám cca 6 vzorků na 1 druh, ale u většiny jen 1 až 2 vzorky a u pár druhů naopak až desítky vzorků. Je důležité mít více vzorků od každého druhu z hlediska variability výskytu a vnitrodruhové odlišnosti. Ze vzorků, které jsem zpracovával, nebo byly zpracovány v jiných projektech, nevyšly všechny. Z části izolací se nepodařilo získat sekvenci kvůli horší kvalitě vzorku (stáří vzorku nebo špatnému skladování) nebo kvůli kontaminaci. Tyto vzorky se musí osekvenovat znova na dva kratší úseky DNA, pomocí primerů LCO/K699 a Ron/Nancy. Kratší sekvence mají větší šanci na úspěch při amplifikaci u vzorků s fragmentovanou DNA. Celkem jsem získal sekvence pouze od 82 druhů (398 vzorků) z celkových 120 získaných druhů (787 vzorků). To je malé množství z hlediska práce zaměřené na celkovou faunu České republiky. Pro lepší a komplexnější studii je důležité zahrnout chybějící druhy a dosekvenovat všechny vzorky s co nejvyšší úspěšností, aby se získal kompletní dataset pro celou zemi. Z hlediska čeledí mám nedostatečné zastoupení druhů pro některé čeledi, např.: 20 % Papilionidae, 53,3 % Hesperidae a 46,6 % Nymphalidae. Zastoupení pro čeleď Lycaenidae (75 %) a Pieridae (68,8 %) je sice vyšší, ale nedosahuje většinového zastoupení (alespoň 90 %) pro souhrnný přehled.

Vzorky dalších druhů pro tuto práci byly už většinou sesbírány spolupracovníky Entomologického ústavu BC AV, ale nebyly zatím databázovány ani sekvenovány a budou do práce zahrnuty v další fázi projektu.

5.2 Porovnání topologie stromů s publikovanými daty

Fylogenetický strom dle Wiemers a kol. (2019) založený na několika genech se s ML stromem z této práce shoduje na úrovni čeledí na pozici čeledi Papilionidae. Všechny ostatní čeledi jsou monofyletické. Čeleď Rionidae a Lycaenidae jsou v této studii příbuzné.

Strom z barcodingu středoasijských motýlů (Lukhtanov a kol., 2009) je oproti mému dvojnásobně rozvětvený na úrovni čeledí. Čeleď Pieridae je zde ve třech větvích, jednou tvoří monofýlii z čeledi Papilionidae, po druhé s čeledí Nymphalidae. Čeleď Lycaenidae je sesterská jedné větví čeledi Nymphalidae. Čeleď Nymphalidae je zde v šesti větvích (jedna z nich je postupně se rozdělující v dalších sedm větví).

Strom sestavený z celých genomů (Espeland a kol., 2018) – Papilionidae na stejné pozici. Dle této studie jsou Lycaenidae a Rionidae rovněž spolu monofyletické. Žádná čeleď není rozdělena do dvou větví. Čeleď Hesperidae mají blíže bázi než v mém stromu a Nymphalidae je více odvozenější.

Rozdíl ve fylogenetickém signálu, který dává mitochondriální DNA (mtDNA) a jaderná DNA (nuDNA), je na úrovni fylogeneze celé skupiny denních motýlů způsoben tzv. saturací mtDNA, což znamená, že mitochondriální genom je už zmutovaný natolik, že vzdáleně příbuzné organismy mohou mít podobné sekvence.

5.3 Analýza rozdělení na druhy (GMYC)

Ve většině případů analýza přiřadila jednu entitu k jednomu druhu (81,6 %). To znamená, že zmíněných 81,6 % (71 druhů) bylo správně určeno v terénu, analýzou správně zařazeno a lze tyto druhy snadno určit pomocí jejich barcodu.

V druhé skupině (sloučené druhy) jsou dva druhy z rodu *Pseudophilotes* a dva druhy z rodu *Colias*. Stejného výsledku dosáhla též studie Dincă a kol. (2011) zabývající se barcodingem Rumunska. Všechny mé vzorky rodu *Colias* pocházejí z okolí centrální Moravy. Mezi blízkými příbuznými druhy rodu *Colias* často dochází k hybridizaci. Sdílením podobných stanovišť a rostlinných nároků zvyšují pravděpodobnost hybridizace (Brunton, 1998). Častou hybridizací sdílejí introgresí významnou část svých genomů (Wang a Porter, 2004). Proto je u nich fylogeneze obtížná a vysvětluje to zařazení *Colias erate* mezi *C. crocea*.

Druhy *Pseudophilotes vicrama* a *Pseudophilotes baton* jsou morfologicky téměř stejné. Rozlišit je lze pouze na základě studie genitálií – liší se pouze tvarem kopuláku (Settele a kol., 2015). Důvodem sloučení do jedné entity bude jejich velice blízká příbuznost. Housenky obou druhů požívají pouze druhy mateřídoušek. V ČR jsou v současnosti oba druhy značně geograficky izolované, takže nemůže dojít k jejich záměně. Druh *Pseudophilotes vicrama* se nachází pouze lokálně v teplých oblastech blízko Prahy, Českém krasu, Českém středohoří a v okolí Mostu (Beneš a kol., 2002). A to v málo početných populacích. Druh *P. baton* žije pouze na Šumavě a Novohradských horách taktéž ve velmi málo početných koloniích. Ve většině lokalitách vymřeli (Beneš a kol., 2002).

Ve třetí skupině jsou druhy: *Pieris rapae*, *Colias palaeno*, *Boloria selene*, *Aphantopus hyperantus*, *Maniola jurtina*, *Melanargia galathea*, *Melitaea athalia*, *Melitaea aurelia*, *Coenonympha glycerion* a *Erebia medusa*. Ve většině případů mají vzorky rozdělených entit stejná místa výskytu a bude se jednat pouze o větší mitochondriální vnitrodruhovou variabilitu.

Čtvrtá skupina zahrnuje rozdělení *Polyommatus coridon* do dvou entit. Z celkem 17 sekvencí byly v této práci analyzovány pouze dvě. Oba vzorky pochází z Moravy (Vyškov a Havraníky). Zbylých 15 sekvencí pochází z GenBanku. Ani u jednoho vzorku není lokalita, pouze země Česká republika, takže nemohu posoudit případné geografické rozdělení. Těchto 17 sekvencí se rozdělilo na dvě entity (jedna s 5 vzorky a druhá z 12 vzorky). Vytvořená entita s 12 vzorky se zároveň sloučila se všemi třemi vzorky *Polyommatus bellargus*. Dva vzorky *Polyommatus bellargus* jsou z Moravy (Olomouc a Pavlovice), třetí vzorek je z Jihočeského kraje blízko k hranicím (Studánky). Zajímavé je, že zmíněných 15 sekvencí *Polyommatus coridon* z GenBanku (+ 2 sekvence analyzované k této práci) se rozdělilo do výše uvedených entit po 12 a 5 vzorku. Mohlo tedy dojít ke špatnému popisu, kvůli značné podobnosti samic těchto druhů, ale oba druhy jsou známé tím, že mohou hybridizovat a jejich vztahy jsou dosti složité (Talavera a kol., 2013). Oba druhy byly v minulosti v České republice hojně rozšířené, ale jejich stavy klesly kvůli rekultivaci a ztrátě stanovišť (Beneš a kol., 2002). Druh *Polyommatus coridon* má početnější populace v teplejších oblastech (největší lokality výskytu ve středních Čechách a jižní Moravě; Beneš a kol., 2002). Za to *Polyommatus bellargus* je na pokraji vymření na celém území České republiky. Lokálně je rozšířenější na Jižní Moravě, vzácně z okolí Prahy, Českém středohoří, Polabí a v poslední době i v jihozápadních Čechách (Beneš a kol., 2002).

Na úrovni jednotlivých druhů a skupin příbuzných druhů může být rozdíl v informaci z mtDNA a nuDNA způsoben infekcí bakterií *Wolbachia* (cytoplazmatický endosymbiotický parazit), která způsobuje párovací nekompatibilitu mezi infikovanými a zdravými jedinci (Toews a Brelsford, 2012). Dále může být rozdíl způsoben adaptivní introgrací mtDNA, demografickými rozdíly, asymetrickou disperzí závislou na pohlaví a pohybem hybridní zóny. Když populace zažijí období geografické izolace a následného sekundárního kontaktu, mohou se také signály mtDNA a jaderného genomu lišit (Toews a Brelsford, 2012).

5.4 Porovnání výsledků GMYC s pyrenejským barcodingem

Analýza GMYC úplného datového souboru pyrenejských druhů podle studie Dincă a kol. (2015) představujících 299 druhů ukázala 55,9 % (167 druhů) jako samostatné entity, 16,4 % (49 druhů) bylo zahrnuto s jiným druhem a 27,7 % (83 druhů) bylo rozděleno do dvou až čtyř entit. Oproti této práci ale měli víc jak třikrát více druhů, takže byla větší šance na nalezení kryptických druhů. Čím více vzorků budeme mít, tím více se jich rozdělí, nebo naopak sloučí do nových entit. Příklady kryptických druhů, které byly rozděleny v pyrenejském barcodingu: *Leptidea sinapis*, *L. reali* (bělásek Realův; Reissinger, 1989) a *L. juvernica*, a dále *Polyommatus icarus* a *P. celina* (Austaut, 1879). A příklady druhů, které byly naopak sloučeny: *Pieris napi* - *P. bryoniae*, *Polyommatus ripartii* (modrásek drsný; Freyer, 1830) - *P. nephohiptamenos* (Brown a Coutsis, 1978) a *Erebia medusa* - *E. polaris* (Staudinger, 1871).

5.5 Porovnání českých a zahraničních vzorků čeledi Lycaenidae

Porovnával jsem příbuznost českých vzorků z čeledi Lycaenidae se vzorky pocházejícími s Rumunska a Německa. Výsledky jsem rozdělil do skupin na základě příbuznosti nebo chybějících údajů. Ke čtyřem druhům z 33 druhů bylo možné přiřadit příbuznost k jedné ze dvou zemí, popř. české vzorky tvořily samostatnou větev.

Druh *Thecla betulae* byl jediný druh, jehož vzorky byly více příbuzné rumunským než německým (české vzorky tvořily větev společně s rumunskými, německé tvořily vlastní větev). Jedná se o suchomilný a teplomilný druh. České a rumunské populace mohou být propojené teplou panonskou nížinou (popř.

železnými vraty z pontické oblasti Rumunska). Německé populace mohou být více izolované (hory na hranicích), popř. propojené se západní Evropou. Vyskytuje se v celé Evropě a Asii. Je rozšířen po celém území ČR, kromě chladných horských oblastí. Váže se na výslunné křovinaté svahy, prosluněné paseky a sady (Beneš a kol., 2002). Je vázán především na trnku obecnou (*Prunus spinosa*; Linné, 1753), (Beneš a kol., 2002).

Na druhou stranu, spíše vlhkomilný druh *Aricia eumedon* byl více příbuzný německým vzorkům (české vzorky tvořily větev společně s německými, rumunské tvořily vlastní větev). Možná jsou české populace *A. eumedon* izolované od těch rumunských teplými oblastmi na území ČR, oproti českým a německým horským a podhorským oblastem, kde se vytvořily propojené populace nesužovány teplými oblastmi. Vyskytuje se ostrůvkovitě od jihozápadní Evropy až po východní Asii. Vyžaduje vlhké louky, květnaté údolní louky, včetně lesních palouků, vlhké příkopy cest apod., (Beneš a kol., 2002). Žije roztroušeně na celém území ČR, především v pahorkatinách vázán na svou živnou rostlinu – kakost luční (*Geranium pratense*; Linné, 1753). Ve vysokých polohách chybí (Beneš a kol., 2002).

Samostatnou větev s českými vzorky tvořily dva druhy: *Plebejus argyrognomon* a *Polyommatus thersites*. Druh *Plebejus argyrognomon* je suchomilný a teplomilný druh. Roztroušeně se vyskytuje po celé Evropě. Biotopově se váže na travnaté stepi, lesostepi a suché louky (Beneš a kol., 2002). Živná rostlina je čičorka pestrá (*Coronilla varia*; Linné, 1753) a kozinec sladkolistý (*Astragalus glycyphyllos*; Linné, 1753). V České republice se vyskytuje především v okolí Prahy, Českém středohoří a na Moravě (Beneš a kol., 2002). Druh *Polyommatus thersites* je taktéž suchomilný a teplomilný druh. Vyskytuje se po celé jižní Evropě. Váže se na skalní stepi a lesostepi, výslunné kamenité stráně a sprašové stepi (Beneš a kol., 2002). Je vázán na živné rostliny: vičenec písečný (*Onobrychis arenaria*; Miller, 1754) a vičenec setý (*O. viciifolia*; Scopoli, 1752). Jeho výskyt v České republice je omezen na nejbližší okolí Prahy, České středohoří, Polabí, Český kras a jižní Čechy a Moravu (Beneš a kol., 2002). U těchto ostrůvkovitě rozšířených druhů (*P. argyrognomon* a *P. thersites*, ale i *A. eumedon*.) mohlo dojít k izolování populací a jejich samostatnému vývoji, a proto tvoří oddělené větve.

6. Závěr:

Cílem této práce bylo získat a osekvenovat úsek mitochondriální DNA (tzv. barcode) velké části druhů českých denních motýlů a tyto sekvence podrobit specializovaným programům k určení jejich příbuznosti, nalezení kryptických druhů a určení původu. Bylo získáno 120 druhů ze 141 druhů žijících na území ČR. Toto zastoupení (85 % fauny) je celkem vysoké, ale kvůli horší kvalitě vzorků či kontaminaci byly získány sekvence pouze od 87 druhů (61,7 % fauny). Ze sekvencí byly vytvořené fylogenetické stromy metodou maximální věrohodnosti a Bayesovské inference. Ve stromě podle metody maximální věrohodnosti se nachází monofyletické čeledi Nymphalidae, Lycaenidae a Rionidae. Na bázi stromu se nachází čeleď Papilionidae. Čeledi Pieridae a Hesperiiidae jsou rozdělené do dvou větví. Ve stromu vytvořeném metodou Bayesovské inference je čeleď Pieridae také rozdělena na dvě větve. Čeleď Lycaenidae je zde monofyletická. Čeleď Hesperiiidae je i zde rozdělená na dvě větve. Jedna z větví Hesperiiidae je sesterská s Riodinidae. Všechny 500 sekvencí patřících 87 druhům bylo analyzováno metodou GMYC za účelem nalezení potencionální kryptické biodiverzity a odlišných linií. Pouze 10 druhů (11,5 %) se rozdělilo na dvě či více entit a mohlo by se jednat o potencionální kryptickou biodiverzitu. Avšak většina případů rozdělených entit měla stejná místa výskytu, tudíž se nejspíš bude jednat pouze o mitochondriální vnitrodruhovou variabilitu. Porovnával jsem příbuznost českých vzorků z čeledi Lycaenidae se vzorky pocházejícími s Rumunska a Německa. U většiny druhů nelze zjistit příbuznost, nebo nemáme data pro jednu či obě země. Z 33 druhů z čeledi Lycaenidae (75% fauny) jsem zjistil pouze 1 druh příbuzný rumunským vzorkům, 1 druh příbuzný německým vzorkům a 2 druhy, jehož vzorky tvoří samostatnou českou větev. Pro širší zkoumání příbuznosti je nutno získat údaje pro každý druh v každé ze zkoumaných zemí. Dále by bylo důležité získat sekvence chybějících druhů z čeledi, a nakonec porovnat i další čeledi a další země.

7. Přehled použité literatury a zdrojů:

Alberti, B. (1943). Zur Frage der Hybridisation zwischen *Colias erate* Esp., hyale L. und edusa F. und ueber Umgrenzung der 3 Arten. *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft*, 33, 606-625.

Bartoňová, A. S., Beneš, J., Fric, Z. F., & Konvička, M. (2019). Genetic confirmation of *Aricia artaxerxes* (Fabricius, 1793) (Lepidoptera, Lycaenidae) in the Czech Republic, its conservation significance and biogeographic context. *Nota Lepidopterologica*, 42, 163.

Beneš, J., Konvička, M., Dvořák, J., Fric, Z., Havelda, Z., Pavlíčko, A., ... & Weidenhoffer, Z. (2002). Motýli České republiky. Rozšíření a ochrana I., II.

Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Wheeler, D. L. (2007). GenBank. *Nucleic acids research*, 36(suppl_1), D25-D30.

Benson, D. A., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2015). GenBank. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D30.

Benson, DA, Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, KD, & Sayers, EW (2018). GenBank. *Research of Nucleic acid*, 46 (D1), D41-D47.

Brunton, C. F. (1998). The evolution of ultraviolet patterns in European *Colias* butterflies (Lepidoptera, Pieridae): a phylogeny using mitochondrial DNA. *Heredity*, 80(5), 611-616.

Bubová, T., Kulma, M., Vrabec, V., & Nowicki, P. (2016). Adult longevity and its relationship with conservation status in European butterflies. *Journal of Insect Conservation*, 20(6), 1021-1032.

Buhay, J. E. (2009). "COI-like" sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology*, 29(1), 96-110.

Coissac, E., Hollingsworth, P. M., Laverigne, S., & Taberlet, P. (2016). From barcodes to genomes: extending the concept of DNA barcoding. *Molecular ecology*, 25(7), 1423-1428.

Dawnay, N., Ogden, R., McEwing, R., Carvalho, G. R., & Thorpe, R. S. (2007). Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic science international*, 173(1), 1-6.

Dennis, RLH, Williams, WR, a Shreeve, TG (1991). Multivariační přístup ke stanovení faunálních struktur mezi evropskými druhy motýlů (Lepidoptera: Rhopalocera). *Zoological Journal of Linnean Society*, 101 (1), 1-49.

Descimon, H., & Mallett, J. (2009). Bad Species In: Settele J, Shreeve T, Konvič M, Van Dyck H, editors. Ecology of Butterflies in Europe.

Dincă, 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. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1704), 347-355.

Dincă, V., Montagud, S., Talavera, G., Hernández-Roldán, J., Munguira, M. L., García-Barros, E., ... & Vila, R. (2015). DNA barcode reference library for Iberian butterflies enables a continental-scale preview of potential cryptic diversity. *Scientific Reports*, 5, 12395.

Espeland, M., Breinholt, J., Willmott, K. R., Warren, A. D., Vila, R., Toussaint, E. F., ... & Jarzyna, M. A. (2018). A comprehensive and dated phylogenomic analysis of butterflies. *Current Biology*, 28(5), 770-778.

Ezard, T., Fujisawa, T. and Barraclough, T.G., 2009. Splits: species' limits by threshold statistics. *R package version*, 1(11), p.r29.

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

Hausmann, A., Haszprunar, G., Segerer, A. H., Speidel, W., Behounek, G., & Hebert, P. D. (2011). Now DNA-barcoded: the butterflies and larger moths of Germany. *Spixiana*, 34(1), 47-58.

Hebert P.D.N., *et al.* Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species, *Proc. Biol. Sci.*, 270 (2003), pp. S96-S99

Hebert PDN, Penton EH, Burns JM *et al.* (2004 b) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 101, 14812-14817.

Hollingsworth, Group, C. P. W., P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., ... & Fazekas, A. J. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794-12797.

Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PloS one*, 6(5).

Huemer, P., Mutanen, M., Sefc, K. M., & Hebert, P. D. (2014). Testing DNA barcode performance in 1000 species of European Lepidoptera: large geographic distances have small genetic impacts. *PLoS One*, 9(12).

Jung, S., Duwal, R. K., & Lee, S. (2011). COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 266-270.

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 (12): 1647–1649.

Konvička, M., & Beneš, J. (2005). Denní motýli. *Online: www.usbe.cas.cz/cervenakniha/texty/tax_skupiny/konvickabenes_motyli.pdf, version from, 2, 2008.*

Konvička, M., Beneš, J., & Fric, Z. (2010). Ochrana denních motýlů v České republice—Analýza stavu a dlouhodobá strategie.

Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A. & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8369–8374.

Kristensen, N. P., Scoble, M. J., & Karsholt, O. L. E. (2007). Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. *Zootaxa*, 1668(1), 699-747.

- Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., ... & Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2923-2928.
- Lamas, G. (2004). Checklist: Part 4A. Hesperioidea-Papilionoidea. *Atlas of neotropical Lepidoptera*, 1-439.
- Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T. and Calcott, B., 2017. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 34(3), pp.772-773.
- Laryszová, P. (2010). Ekologicko-faunistická charakteristika denních motýlů (Lepidoptera) hornické krajiny (Důl Staříč).
- Laštůvka, Z., & Liška, J. (2011). *Komentovaný seznam motýlů České republiky*. Biocont Laboratory.
- Lavinia, P. D., Bustos, E. O. N., Kopuchian, C., Lijtmaer, D. A., García, N. C., Hebert, P. D., & Tubaro, P. L. (2017). Barcoding the butterflies of southern South America: Species delimitation efficacy, cryptic diversity and geographic patterns of divergence. *PloS one*, 12(10).
- Li, X., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y., & Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Reviews*, 90(1), 157-166.
- Litman, J., Chittaro, Y., Birrer, S., Praz, C., Wermeille, E., Fluri, M., ... & Gonseth, Y. (2018). A DNA barcode reference library for Swiss butterflies and forester moths as a tool for species identification, systematics and conservation. *PloS one*, 13(12).
- 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. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1302-1310.

- Maresova, J., Habel, J. C., Neve, G., Sielezniew, M., Bartonova, A., Kostro-Ambroziak, A., & Fric, Z. F. (2019). Cross-continental phylogeography of two Holarctic Nymphalid butterflies, *Boloria eunomia* and *Boloria selene*. *PloS one*, *14*(3).
- Margules, C. R., & Pressey, R. L. (2000). Systematic conservation planning. *Nature*, *405*(6783), 243.
- Mattila, N., Kaitala, V., Komonen, A., Kotiaho, J. S., & Päävinen, J. (2006). Ecological determinants of distribution decline and risk of extinction in moths. *Conservation Biology*, *20*(4), 1161-1168.
- Minh BQ, Nguyen MAT, Haeseler von A (2013) Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution* *30* (5): 1188–1195.
- Monteiro A, Pierce NE. 2001. Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1alpha gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* *18*: 264–281.
- Müller, F., Baessler, C., Schubert, H., & Klotz, S. (2010). Long-term ecological research. *Springer, Berlin*, *10*(1007), 978-090.
- Nguyen L-T, Schmidt HA, Haeseler von A, Minh BQ (2015) IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* *32* (1): 268–274
- Petit, R. J., Aguinagalde, I., de Beaulieu, J. L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., ... & Mohanty, A. (2003). Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *science*, *300*(5625), 1563-1565.
- Porter, A. H., & Geiger, H. (1995). Limitations to the inference of gene flow at regional geographic scales—an example from the *Pieris napi* group (Lepidoptera: Pieridae) in Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, *54*(4), 329-348.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D. and Drummond, A.J., 2014. Tracer 1.6. URL: <http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>.

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364.

Savolainen Vincent, Robyn S Cowan, Alfried P Vogler, George K Roderick And Richard Lane. (2005). Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding.

Settele, J., Steiner, R., Reinhardt, R., Feldmann, R., Hermann, G., 2015. Schmetterlinge: Die Tagfalter Deutschlands. Ulmer Eugen Verlag, Stuttgart (Hohenheim).

Schmitt, T., & Hewitt, GM (2004). Genetický vzorec ohrožení a ztráty populace: případová studie motýlů. *Molecular Ecology*, 13 (1), 21-31.

Schmitt, T., & Varga, Z. (2012). Extra-Mediterranean refugia: the rule and not the exception? *Frontiers in Zoology*, 9(1), 22.

Stewart, J. R., & Lister, A. M. (2001). Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(11), 608-613.

Stewart, J. R., Lister, A. M., Barnes, I., & Dalén, L. (2010). Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1682), 661-671.

Strugnell, J. M., & Lindgren, A. R. (2007). A barcode of life database for the Cephalopoda? Considerations and concerns. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 17(2-3), 337-344.

Suchard, M.A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D.L., Drummond, A.J. and Rambaut, A., 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus evolution*, 4(1), p. vey016.

Talavera, G., Lukhtanov, V. A., Rieppel, L., Pierce, N. E., & Vila, R. (2013). In the shadow of phylogenetic uncertainty: the recent diversification of *Lysandra* butterflies through chromosomal change. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3), 469-478.

Thomas, J. A., Telfer, M. G., Roy, D. B., Preston, C. D., Greenwood, J. J. D., Asher, J., ... & Lawton, J. H. (2004). Comparative losses of British butterflies, birds, and plants and the global extinction crisis. *Science*, *303*(5665), 1879-1881.

Toews, D. P., & Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, *21*(16), 3907-3930.

Trifinopoulos J, Nguyen L-T, Haeseler von A, Minh BQ (2016) W-IQ-TREE: a fast-online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* *44*(W1): W232–5

Ulrich, W., & Buszko, J. (2003). Species–area relationships of butterflies in Europe and species richness forecasting. *Ecography*, *26*(3), 365-373.

Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in ecology & evolution*, *24*(2), 110-117.

van Nieukerken, E. J., Kaila, L., Kitching, I. J., Kristensen, N. P., Lees, D. C., Minet, J., ... & Wahlberg, N. (2011). Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z.-Q.(Ed.) *Animal biodiversity: an outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa*, *3148*(1), 212-221.

van Swaay, C. A. M. (2002). The importance of calcareous grasslands for butterflies in Europe. *Biological Conservation*, *104*(3), 315-318.

van Swaay, C., Warren, M., & Loïs, G. (2006). Využití biotopů a trendy evropských motýlů. *Journal of Insect Conservation*, *10* (2), 189-209.

Wahlberg N, Wheat CW. 2008. Genomic outposts serve the phylogenomic pioneers: designing novel nuclear markers for genomic DNA extractions of lepidoptera. *Systematic Biology* *57*: 231–242.

Wang, B., & Porter, A. H. (2004). An AFLP-based interspecific linkage map of sympatric, hybridizing *Colias* butterflies. *Genetics*, *168*(1), 215-225.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.

Warren, M. S., & Bourn, N. A. (2011). Ten challenges for 2010 and beyond to conserve Lepidoptera in Europe. *Journal of Insect Conservation*, 15(1-2), 321-326.

Wenzel, M., Schmitt, T., Weitzel, M., & Seitz, A. (2006). The severe decline of butterflies on western German calcareous grasslands during the last 30 years: a conservation problem. *Biological Conservation*, 128(4), 542-552

Wiemers, M., Balletto, E., Dincă, V., Fric, Z. F., Lamas, G., Lukhtanov, V., ... & Wahlberg, N. (2018). An updated checklist of the European butterflies (Lepidoptera, Papilionoidea). *ZooKeys*, (811), 9.

Wiemers, M., Chazot, N., Wheat, C. W., Schweiger, O., & Wahlberg, N. (2019). A complete time-calibrated multi-gene phylogeny of the European butterflies. *BioRxiv*, 844175.

8. Přílohy:

Příloha I. Seznam druhů denních motýlů vyskytujících se na území České republiky, počet vzorků (materiál) a sekvencí každého z nich získaných pro barcoding české motýlí fauny.

druh (latinsky)	popis	druh (česky)	materiál	Získané sekvence	Databázové sekvence
Papilionidae			5	1	1
<i>Iphiclides podalirius</i>	(Linnaeus, 1758)	otakárek ovocný	0	0	
<i>Papilio machaon</i>	(Linnaeus, 1758)	otakárek fenyklový	1	0	
<i>Parnassius mnemosyne</i>	(Linnaeus, 1758)	jasoň dymnivkový	2	1	1
<i>Parnassius apollo</i>	(Linnaeus, 1758)	jasoň červenooký	0	0	
<i>Zerynthia polyxena</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	pestrokřídlec podražcový	2	0	
Hesperiidae			38	10	0
<i>Heteropterus morpheus</i>	(Pallas, 1771)	soumračník černohnědý	1	0	
<i>Carterocephalus palaemon</i>	(Pallas, 1771)	soumračník jitrocelový	4	0	
<i>Ochlodes sylvanus</i>	(Esper, 1777)	soumračník rezavý	2	0	
<i>Hesperia comma</i>	(Linnaeus, 1758)	soumračník čárkovaný	5	1	
<i>Thymelicus acteon</i>	(Rottemburg, 1775)	soumračník žlutoskvmný	5	1	
<i>Thymelicus sylvestris</i>	(Poda, 1761)	soumračník metlicový	0	0	
<i>Thymelicus lineola</i>	(Ochsenheimer, 1808)	soumračník čárečkovaný	4	3	
<i>Spialia sertorius</i>	(Hoffmansegg, 1804)	soumračník skořicový	2	0	
<i>Carcharodus alceae</i>	(Esper, 1780)	soumračník slézový	6	2	
<i>Erynnis tages</i>	(Linnaeus, 1758)	soumračník máčkový	1	0	
<i>Pyrgus malvae</i>	(Linnaeus, 1758)	soumračník jahodníkový	2	0	
<i>Pyrgus carthami</i>	(Hübner, 1813)	soumračník proskurníkový	1	1	
<i>Pyrgus serratulae</i>	(Rambur, 1839)	soumračník mochnový	1	0	
<i>Pyrgus armonicanus</i>	(Oberthür, 1910)	soumračník podobný	1	1	
<i>Pyrgus alveus</i>	(Hübner, 1803)	soumračník bělopásný	3	1	
Pieridae			139	65	65
<i>Leptidea juvernica</i>	Williams, 1946	bělásek luční	7	0	10
<i>Leptidea sinapis</i>	(Linnaeus, 1758)	bělásek hrachorový	10	0	13
<i>Gonepteryx rhamni</i>	(Linnaeus, 1758)	žluťásek řešetlákový	5	1	
<i>Colias hyale</i>	(Linnaeus, 1758)	žluťásek čičorečkový	2	1	
<i>Colias alfaciensis</i>	(Ribbe, 1905)	žluťásek jižní	5	0	
<i>Colias erate</i>	(Esper, 1805)	žluťásek tolicový	2	2	
<i>Colias crocea</i>	(Geoffroy, 1785)	žluťásek čilimníkový	2	2	
<i>Colias palaeno</i>	(Linnaeus, 1760)	žluťásek borůvkový	82	43	

<i>Aporia crataegi</i>	(Linnaeus, 1758)	bělásek ovocný	3	3	
<i>Pontia edusa</i>	(Fabricius, 1777)	bělásek rezedkový	3	0	
<i>Pteris brassicae</i>	(Linnaeus, 1758)	bělásek zelný	1	0	
<i>Pteris rapae</i>	(Linnaeus, 1758)	bělásek řepový	13	10	42
<i>Pteris bryoniae</i>	(Hübner, 1806)	bělásek horský	1	0	
<i>Pteris napi</i>	(Linnaeus, 1758)	bělásek řepkový	2	1	
<i>Pteris mannii</i>	(Mayer, 1851)	bělásek jižní	1	1	
<i>Anthocharis cardamines</i>	(Linnaeus, 1758)	bělásek řeřichový	0	0	
Riodinidae			1	1	0
<i>Hamearis lucina</i>	(Linnaeus, 1758)	pestrobarvec petrkličový	1	1	
Lycaenidae			282	110	15
<i>Lycaena helle</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	ohniváček rdesnový	0	0	
<i>Lycaena alciphron</i>	(Rottemburg, 1775)	ohniváček modrolesklý	4	3	
<i>Lycaena dispar</i>	([Haworth], 1802)	ohniváček černočárny	2	2	
<i>Lycaena hippothoe</i>	(Linnaeus, 1760)	ohniváček modroleký	1	0	
<i>Lycaena phlaeas</i>	(Linnaeus, 1760)	ohniváček černokřídlý	8	5	
<i>Lycaena virgaureae</i>	(Linnaeus, 1758)	ohniváček celíkový	1	0	
<i>Lycaena tityrus</i>	(Poda, 1761)	ohniváček černoskvřnný	2	1	
<i>Thecla betulae</i>	(Linnaeus, 1758)	ostruháček březový	1	1	
<i>Favonius quercus</i>	(Linnaeus, 1758)	ostruháček dubový	1	0	
<i>Callophrys rubi</i>	(Linnaeus, 1758)	ostruháček ostružinový	0	0	
<i>Satyrrium pruni</i>	(Linnaeus, 1758)	ostruháček švestkový	4	4	
<i>Satyrrium ilicis</i>	(Esper, 1779)	ostruháček česvinový	4	4	
<i>Satyrrium w-album</i>	(Knoch, 1782)	ostruháček jilmový	1	1	
<i>Satyrrium spini</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	ostruháček trnkový	0	0	
<i>Satyrrium acaciae</i>	(Fabricius, 1787)	ostruháček kapiniový	2	0	
<i>Celastrina argiolus</i>	(Linnaeus, 1758)	modrásek krušinový	1	0	
<i>Phengaris alcon</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	modrásek hořcový	12	5	
<i>Phengaris arion</i>	(Linnaeus, 1758)	modrásek černoskvřnný	1	1	
<i>Phengaris teleiüs</i>	(Bergsträsser, 1779)	modrásek očkovaný	2	1	
<i>Phengaris nausithous</i>	(Bergsträsser, 1779)	modrásek bahenní	6	2	
<i>Pseudophilotes vicrama</i>	(Moore, 1865)	modrásek východní	19	8	
<i>Pseudophilotes baton</i>	(Bergsträsser, 1779)	modrásek černočárny	6	3	
<i>Scolitantides orion</i>	(Pallas, 1771)	modrásek rozchodníkový	2	2	
<i>Glaucopteryx alexis</i>	(Poda, 1761)	modrásek kozincový	5	4	
<i>Cupido argiades</i>	(Pallas, 1771)	modrásek štírovníkový	2	2	
<i>Cupido decoloratus</i>	(Staudinger, 1886)	modrásek tolicový	6	2	
<i>Cupido alcetas</i>	(Hoffmansegg, 1804)	modrásek čičorkový	5	2	
<i>Cupido minimus</i>	(Fuessly, 1775)	modrásek nejmenší	6	3	
<i>Plebejus argus</i>	(Linnaeus, 1758)	modrásek černošedý	17	1	

<i>Plebejus idas</i>	(Linnaeus, 1760)	modrásek obecný	16	0	
<i>Plebejus argyrognomon</i>	(Bergsträsser, 1779)	modrásek podobný	56	12	
<i>Agriades optilete</i>	(Knoch, 1781)	modrásek stříbroskvrnný	12	4	
<i>Aricia eumedon</i>	(Esper, 1780)	modrásek bělopásný	2	1	
<i>Cyaniris semiargus</i>	(Rottemburg, 1775)	modrásek lesní	1	1	
<i>Aricia artaxerxes</i>	(Fabricius, 1793)	modrásek pumpavový	23	11	
<i>Aricia agestis</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	modrásek tmavohnědý	18	9	
<i>Polyommatus bellargus</i>	(Rottemburg, 1775)	modrásek jetelový	3	3	
<i>Polyommatus coridon</i>	(Poda, 1761)	modrásek vikvicový	2	2	15
<i>Polyommatus thersites</i>	(Cantener, 1835)	modrásek vičencový	3	3	
<i>Polyommatus daphnis</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	modrásek hnědoskvrnný	1	0	
<i>Polyommatus amandus</i>	(Schneider, 1792)	modrásek ušlechtilý	4	3	
<i>Polyommatus dorylas</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	modrásek komonicový	8	3	
<i>Polyommatus icarus</i>	(Rottemburg, 1775)	modrásek jehlicový	3	0	
<i>Polyommatus damon</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	modrásek ligrusový	9	1	
Nymphalidae			321	211	21
<i>Neptis rivularis</i>	(Scopoli, 1763)	bělopásek tavníkový	2	0	
<i>Limnitis populi</i>	(Linnaeus, 1758)	bělopásek topolový	1	0	
<i>Limnitis camilla</i>	(Linnaeus, 1764)	bělopásek dvouřadý	0	0	
<i>Issoria lathonia</i>	(Linnaeus, 1758)	perleťovec malý	1	0	
<i>Brenthis hecate</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	perleťovec dvouřadý	0	0	
<i>Brenthis ino</i>	(Rottemburg, 1775)	perleťovec kopřivový	0	0	
<i>Brenthis daphne</i>	(Bergsträsser, 1780)	perleťovec ostružinový	5	3	
<i>Argynnis paphia</i>	(Linnaeus, 1758)	perleťovec stříbropásek	3	0	
<i>Argynnis aglaja</i>	(Linnaeus, 1758)	perleťovec velký	1	0	
<i>Argynnis niobe</i>	(Linnaeus, 1758)	perleťovec maceškový	1	1	
<i>Argynnis adippe</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	perleťovec prostřední	1	0	
<i>Boloria eunomia</i>	(Esper, 1800)	perleťovec mokřadní	13	13	
<i>Boloria aquilonaris</i>	(Stichel, 1908)	perleťovec severní	0	0	
<i>Boloria selene</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	perleťovec dvanáctitečný	29	25	
<i>Boloria euphrosyne</i>	(Linnaeus, 1758)	perleťovec fialkový	2	2	
<i>Boloria dia</i>	(Linnaeus, 1767)	perleťovec nejmenší	2	0	
<i>Apatura iris</i>	(Linnaeus, 1758)	batolec duhový	0	0	
<i>Apatura ilia</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	batolec červený	0	0	
<i>Araschnia levana</i>	(Linnaeus, 1758)	babočka síťkovaná	3	0	

<i>Vanessa cardui</i>	(Linnaeus, 1758)	babočka bodláková	1	0	
<i>Vanessa atalanta</i>	(Linnaeus, 1758)	babočka admirál	3	0	
<i>Inachis io</i>	(Linnaeus, 1758)	babočka paví oko	1	0	2
<i>Aglais urticae</i>	(Linnaeus, 1758)	babočka kopřivová	2	0	
<i>Polygonia c-album</i>	(Linnaeus, 1758)	babočka bílé C	1	0	2
<i>Nymphalis polychloros</i>	(Linnaeus, 1758)	babočka jilmová	0	0	2
<i>Nymphalis xanthomelas</i>	(Esper, 1781)	babočka vrbová	0	0	
<i>Nymphalis antiopa</i>	(Linnaeus, 1758)	babočka osiková	0	0	2
<i>Euphydryas aurinia</i>	(Rottemburg, 1775)	hnědásek chrastavcový	3	3	3
<i>Euphydryas maturna</i>	(Linnaeus, 1758)	hnědásek osikový	9	8	
<i>Melitaea didyma</i>	(Esper, 1778)	hnědásek květelový	25	8	
<i>Melitaea phoebe</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	hnědásek diviznový	0	0	
<i>Melitaea cinxia</i>	(Linnaeus, 1758)	hnědásek kostkovaný	0	0	
<i>Melitaea diamina</i>	(Lang, 1789)	hnědásek rozrazilový	3	1	
<i>Melitaea britomartis</i>	Assmann, 1847	hnědásek podunajský	2	1	
<i>Melitaea athalia</i>	(Rottemburg, 1775)	hnědásek jitrocelový	7	4	
<i>Melitaea aurelia</i>	Nickerl, 1850	hnědásek černýšový	11	3	
<i>Coenonympha pamphilus</i>	(Linnaeus, 1758)	okáč poháňkový	4	3	
<i>Coenonympha tullia</i>	(Müller, 1764)	okáč střibrokový	2	0	
<i>Coenonympha glycerion</i>	(Borkhausen, 1788)	okáč třeslicový	5	2	
<i>Coenonympha arcania</i>	(Linnaeus, 1760)	okáč strdivkový	2	2	
<i>Pararge aegeria</i>	(Linnaeus, 1758)	okáč pýrový	2	0	
<i>Lasiommata maera</i>	(Linnaeus, 1758)	okáč ječmínkový	3	2	
<i>Lasiommata megera</i>	(Linnaeus, 1767)	okáč zední	3	0	
<i>Melanargia galathea</i>	(Linnaeus, 1758)	okáč bojínkový	22	20	
<i>Hipparchia hermione</i>	(Linnaeus, 1764)	okáč bělopásný	0	0	
<i>Hipparchia fagi</i>	(Scopoli, 1763)	okáč medyňkový	1	1	
<i>Hipparchia semele</i>	(Linnaeus, 1758)	okáč metlicový	4	3	
<i>Minois dryas</i>	(Scopoli, 1763)	okáč ovsový	2	2	
<i>Brintesia circe</i>	(Fabricius, 1775)	okáč voňavkový	3	3	
<i>Arethusana arethusa</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	okáč kostřavový	0	0	
<i>Chazara briseis</i>	(Linnaeus, 1764)	okáč skalní	20	11	
<i>Hyponephele lycaon</i>	(Kühn, 1774)	okáč šedohnědý	5	0	
<i>Aphantopus hyperantus</i>	(Linnaeus, 1758)	okáč prosíčkový	8	4	
<i>Maniola jurtina</i>	(Linnaeus, 1758)	okáč luční	76	70	
<i>Lopinga achine</i>	(Scopoli, 1763)	okáč jílkový	0	0	10
<i>Erebia euryale</i>	(Esper, 1805)	okáč rudopásný	3	0	
<i>Erebia ligea</i>	(Linnaeus, 1758)	okáč černohnědý	8	4	
<i>Erebia sudetica</i>	Staudinger, 1861	okáč menší	5	4	
<i>Erebia medusa</i>	([Denis & Schiffermüller], 1775)	okáč rosičkový	3	2	

<i>Erebia aethiops</i>	(Esper, 1777)	okáč kluběnkový	2	1	
<i>Erebia epiphron</i>	(Knoch, 1783)	okáč horský	6	5	
		CELKEM	787	398	102
				500	

Příloha II. Fylogenetický strom vytvořený pomocí metody maximální věrohodnosti (ML) ze sekvencí cytochromu c oxidázy českých motýlů.

