

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Ekologie



Bc. Tereza Štochlová

**Srovnání reprodukčních parametrů střeoevropských populací kriticky ohroženého
druhu motýla – okáče skalního (*Chazara briseis*)**

Comparison of reproductive parameters of Central European populations of the critically
endangered Hermit butterfly (*Chazara briseis*)

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Ondřej Sedláček, Ph. D.

Praha, 2021

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.08.2021

Bc. Tereza Štochlová

PODĚKOVÁNÍ

Předně děkuji svému školiteli, RNDr. Ondřeji Sedláčkovi, Ph. D., za rady, ochotu a čas, který mi během tvorby této práce věnoval. Děkuji také celému týmu Laboratoře chromozomiky Přírodovědecké fakulty Jihočeské Univerzity – jmenovitě RNDr. Petru Nguyenovi, Ph. D., RNDr. Anně Voleníkové, RNDr. Martině Dalíkové, Ph. D., a Mgr. Monice Kreklové – za podporu a velkou pomoc s laboratorní částí práce. Dále děkuji panu Miloši Andresovi, a to za poskytnutí jedinců na výzkum a předání cenného know-how o chovu, a také za věnovaný čas a rady v průběhu, které mi hlavně v začátcích velmi pomohly. V neposlední řadě pak děkuji svým nejbližším – Mgr. Tomáši Charvátovi a Bc. Elišce Pšeničkové za pomoc s chovem, když jsem potřebovala; a svým rodičům, za jejich dlouholetou podporu, poskytnutí zázemí i materiálu a celkovou pomoc během tvorby této práce.

ABSTRAKT

Okáč skalní (*Chazara briseis*) je motýl z čeledi babočkovitých (Nymphalidae), obývající převážně krátkostébelné suché stepi. Ve střední Evropě je kriticky ohrožený. V současnosti je proto předmětem mnoha ochranných aktivit, a to včetně reintrodukcí. Při takových translokacích jedinců je důležité, aby původní a zdrojová populace byly sobě ve všech ohledech co nejpodobnější. V této práci proto byli chováni jedinci dvou forem tohoto druhu, *Ch. briseis pannonica* (rakouská populace) a *Ch. briseis bataia* (česká populace), a byly zaznamenávány jejich reprodukční charakteristiky a sledovány rozdíly mezi těmito dvěma formami. Během dvou sezón se podařilo úspěšně rozmnožit 5 rakouských a 8 českých samic. Rakouská a česká populace se mezi sebou lišily hlavně v načasování líhnutí dospělců a začátku kladení samic – rakouští jedinci jsou fenologicky posunutí o týden až 14 dní dříve. Jednotlivé populace stejného druhu se mezi sebou mohou lišit také přítomností wolbachie (*Wolbachia pipientis*). Tato bakterie může ovlivňovat poměr pohlaví v populaci a také reprodukční chování jedinců. U české populace existovalo podezření na její přítomnost. Část české populace v chovu proto byla léčena antibiotiky, a reprodukční parametry byly následně porovnávány mezi léčenou ($n = 8$) a neléčenou ($n = 7$) částí populace. Dospělci z chovu okáče skalního z obou populací poté byli na přítomnost wolbachie oscreenováni. Ačkoliv u české populace byly amplifikovány určité produkty, po jejich sekvenaci se ukázalo, že se o wolbachii nejedná. Léčení antibiotiky však na jedince mělo vliv a snižovalo líhivost vajíček. U okáče skalního byla také potvrzena přítomnost chromozomu W, vhodný marker pro určování pohlaví prvních instarů larev se však nepodařilo nalézt.

Klíčová slova: motýli, Nymphalidae, *Chazara briseis*, reprodukce, chov, populační ekologie, ochranný management, wolbachie

ABSTRACT

The Hermit butterfly *Chazara briseis* is a species from the family Nymphalidae, inhabiting mostly short-stemmed dry steppes. In Central Europe, it is critically endangered. It is therefore currently the subject of many conservation activities, including reintroductions. In such translocations of individuals, it is important that the native and source populations be as closely related as possible in all respects. Therefore, individuals of two forms of this species, *Ch. briseis pannonica* (Austrian population) and *Ch. briseis bataia* (Czech population) were bred and their reproductive characteristics were recorded and the differences between the two forms were observed. During two seasons 5 Austrian and 8 Czech females were successfully bred. The Austrian and Czech populations differed mainly in the timing of adult hatching and the beginning of the laying of eggs by females – Austrian individuals are phenologically shifted to one week to 14 days earlier. Individual populations of the same species may also differ from each other in the presence of *Wolbachia pipientis*. This bacterium can affect the sex ratio in a population as well as the reproduction behavior of individuals. There was a suspicion of its presence in the Czech population. Therefore, a part of the Czech population was treated with antibiotics, and reproductive parameters were subsequently compared between the treated ($n = 8$) and untreated ($n = 7$) parts of the population. Adults of *Ch. briseis* from both populations were then screened for the presence of *Wolbachia*. Although certain products were amplified in the Czech population, after their sequencing it turned out that it is not *Wolbachia*. However, antibiotic treatment affected the individuals and reduced egg hatching. The presence of the W chromosome was also confirmed in *Ch. briseis* but a suitable marker for determining the sex of the first instar of the larvae was not found.

Keywords: butterflies, Nymphalidae, *Chazara briseis*, reproduction, breeding, population ecology, conservation management, *Wolbachia*

OBSAH

1 Úvod.....	1
1.1 Okáč skalní (<i>Chazara briseis</i>) – ekologie, rozšíření a ochrana	2
1.1.1 Rozšíření a ekologie.....	2
1.1.2 Ohrožení a ochrana	5
1.2 Reintrodukce a záchranné chovy v ochraně motýlů.....	8
1.2.1 Záchranný chov a reintrodukce okáče skalního.....	9
1.3 Působení wolbachie na její hostitele.....	10
1.4 Cíle práce	14
2 Metodika.....	16
2.1 Chov okáče skalního.....	16
2.1.1 Průběh chovu	16
2.1.2 Problémy během chovu.....	20
2.2 Laboratorní analýza	22
2.2.1 Izolace genomové DNA (gDNA)	22
2.2.2 Sekvenace a skládání genomu.....	24
2.2.3 Detekce chromozomu W.....	25
2.2.4 Detekce bakterie rodu <i>Wolbachia</i>	26
2.2.5 Určování pohlaví larev.....	29
2.3 Srovnání populačních dat	31
3 Výsledky.....	32
3.1 Reprodukční parametry populací.....	32
3.2 Detekce wolbachie.....	39
3.3 Detekce chromozomu W a určování pohlaví larev.....	41
4 Diskuze.....	43
4.1 Reprodukční charakteristiky a chov okáče skalního	43
4.2 Wolbachie u okáče skalního	46
5 Závěr.....	48
6 Použitá literatura	49
7 Přílohy	59

1 ÚVOD

Motýli jsou jednou z nejprominentnějších skupin hmyzu. Důležití jsou jak svojí početností – v České republice se s cca 3 500 druhy jedná o čtvrtý nejpočetnější řád (Čížek et al., 2019) –, tak i významem. Kromě jejich klasických funkcí v ekosystémech, jako je opylování nebo zdroj potravy pro ostatní živočichy, jsou motýli – a zvláště denní motýli – podstatní i pro ochranu přírody. Jsou totiž nejvíce prozkoumanou skupinou hmyzu (Lewis & Senior, 2011) a zároveň také dobrými bioindikátory změn v krajině (Thomas et al., 2004).

Motýli z dnešní krajiny, alespoň co se týče Evropy, ubývají. To dokladují mnohé studie – z České republiky vymizelo 11 % druhů denních motýlů (Čížek et al., 2019; Konvička et al., 2010) a u mnohých druhů se po celé Evropě snižují početnosti (Čížek et al., 2019; Habel & Schmitt, 2018; Konvička et al., 2010; Thomas et al., 2004). Důvodů je hned několik, a všechny souvisí s činností člověka. Převážně jde o degradaci a fragmentaci biotopů, mechanizaci a intenzifikaci zemědělství, a také nevhodně nastavenou péči o chráněná území (Konvička et al., 2010; Schmitt & Rákosy, 2007; Thomas, 2016; Van Dyck et al., 2009). Motýli jsou na změny v krajině náchylní, protože ke svému přežití potřebují mozaiku více různých stanovišť blízko u sebe, navíc v naprosté většině případů jsou to druhy raně sukcesních stanovišť, takže jsou závislí na opakovaných zásazích do krajiny (Konvička et al., 2010).

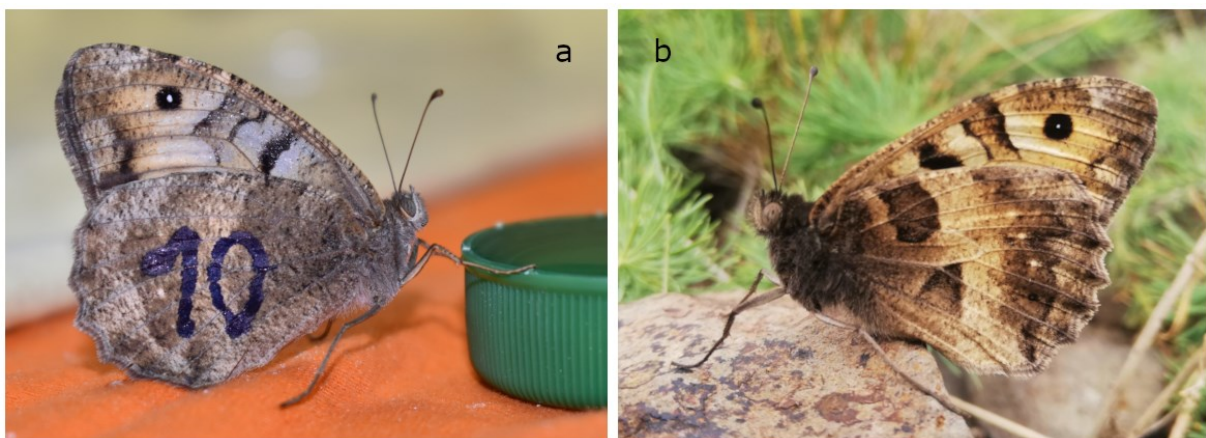
V rámci snah o záchranu mnoha mizejících druhů motýlů a s nimi i celých jejich stanovišť se praktikují rozsáhlé managementové zásahy, mnohdy je však na záchranu konkrétního druhu na daném místě již pozdě a je tak potřeba populaci pomoci umělou translokací z jiného stanoviště. Vzhledem k tomu, že z výše uvedených důvodů mohou být motýli dobrými deštníkovými druhy, je pak podařená záchrana populace určitého druhu motýla dobrým znamením pro celý biotop. Zaručit úspěch takové akce je však často velmi náročné, neboť je potřeba dopodrobna znát ekologii zájmového druhu (Thomas et al., 2009), navíc se od sebe jednotlivé populace téhož druhu mohou podstatně odlišovat, a střet dvou různých genetických linií na jednom místě by danému druhu mohl naopak uškodit (Dincă et al., 2018).

Tato práce se tedy zabývá jedním z takových ohrožených druhů motýlů, jejichž záchrana přispěje i k zachování celého jejich biotopu – okáčem skalním (*Chazara briseis*). Tento motýl má ve svém areálu mnoho různých linií, které se od sebe navzájem odlišují. Pro jeho záchranu v České republice bylo potřeba jednak důkladně zjistit jeho konkrétní ekologické nároky, ale také odhalit skutečné rozdíly mezi jeho střeoevropskými liniemi. Tato práce se podrobně zabývá dvěma z nich – jedinci z českých Loun a rakouského Hundsheimu.

1.1 OKÁČ SKALNÍ (*CHAZARA BRISEIS*) – EKOLOGIE, ROZŠÍŘENÍ A OCHRANA

1.1.1 Rozšíření a ekologie

Okáč skalní (*Chazara briseis*, Linnaeus, 1764) je poměrně velký motýl z čeledi babočkovitých (Nymphalidae) – rozpětí křídel se pohybuje mezi 52–66 mm (Macek et al., 2015, viz obr. 1). Jedná se o dlouhověký, jednogenerační druh, dospělci žijí několik týdnů, a to během července až září (Kadlec et al., 2010). Zaznamenáno bylo dožití samice i 60 dnů (Baranovská & Moravec, 2020). Motýl se vyskytuje v severní Africe, jižní a střední Evropě, a dále na východ přes jižní Rusko, Turecko a Írán až do střední Asie (Beneš et al., 2002; Sucháčková Bartoňová et al., 2021a). V rámci areálu se historicky rozlišuje několik poddruhů či barevných forem okáče skalního. Na území České republiky se pak tyto poddruhy (či formy) nacházely dva: *Ch. briseis bataia* (Fruhstorfer, 1909) v Čechách, *Ch. briseis pannonica* (Moucha & Varin, 1959) na Moravě (John et al., 2018). Forma *pannonica* se dále vyskytuje v podunajské nížině od Bavorska, přes Rakousko až po Rumunsko, forma *bataia* se nachází pouze v Čechách a Sasku. Kromě toho se ve střední Evropě rozlišuje ještě třetí forma nebo poddruh, *Chazara briseis briseis*, kterou je možné nalézt v západní části Německa a Francii (John et al., 2018). Tyto formy se od sebe liší zbarvením (Moucha & Procházka, 1962), zároveň existuje podezření, že na rozdíl od ostatních je populace vyskytující se v Čechách nakažena wolbachii (Faltýnek Fric, nepublikovaná data). Geneticky, dle sekvenace cytochrom c oxidázy I (COI), však ne všechny tyto formy mají přesvědčivou podporu. Všechny středoevropské populace se na základě COI dají zařadit do stejné skupiny (Sucháčková Bartoňová et al., 2021a), je tedy otázkou, zda označení poddruhy je pro tyto formy správné. Zcela zřetelně se však druh dá rozdělit do tří skupin – severní Afrika, východní část regionu a evropské populace (Sucháčková Bartoňová et al., 2021a, viz obr. 2).

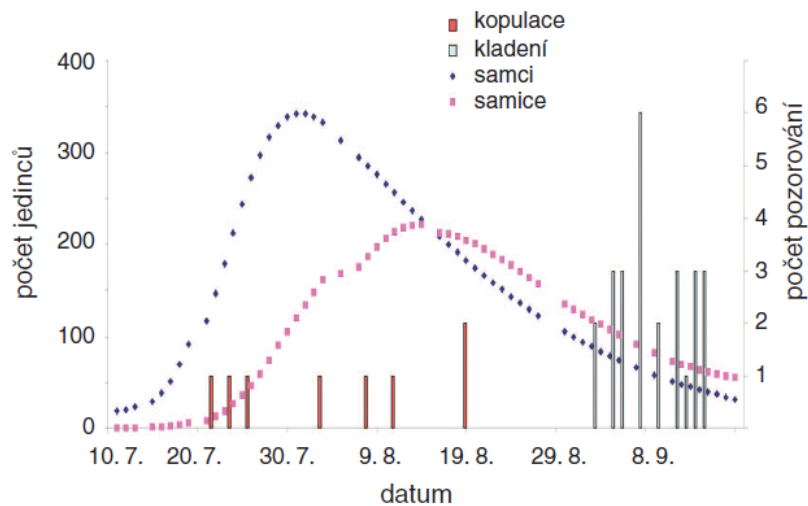


Obrázek 1: Okáč skalní (*Chazara briseis*): a) samice (Foto: A. Štochlová), b) samec (Foto: O. Sedláček).

v okolí Loun, a to v suchém a teplém prostředí na svazích vulkanických čedičových kopců (Kadlec et al., 2010; Vrba et al., 2009, 2021). Živnými rostlinami pro housenky tohoto druhu jsou různé druhy trav – převážně kostřav, jako jsou například kostřava walliská (*Festuca valesiaca*) nebo kostřava ovčí (*Festuca ovina*), ale živit se mohou i na jiných rodech trav, jako je sveřep vzpřímený (*Bromus erectus*) (Baranovská & Moravec, 2020; Beneš et al., 2002; Macek et al., 2015). Důležitou podmínkou vhodného habitatu pro okáče skalního jsou pak obnažené plochy holé země či kamenitá místa tak, aby vegetace byla rozvolněná a nevytvářela zapojený porost (Dolek & Geyer, 2002; Seufert & Grosser, 1996). Dospělci dále využívají vyšší, květnaté porosty jako zdroj nektaru, kde hojně sají na nektarodárných rostlinách jako jsou hlaváč (*Scabiosa spp.*), bodlák (*Carduus spp.*) nebo hvozdík (*Dianthus spp.*) (Vrba et al., 2021). Motýli také užívají křoviny jako místa k odpočinku, především v poledních hodinách a samčí část populace pak vyhledává vyvýšená místa k hájení teritorií (Beneš et al., 2002; Macek et al., 2015).

K přežití motýl potřebuje rozsáhlá území, na kterých vytváří početné populace – pokud je lokalita menší než 1 ha, jedinci již považují biotop za suboptimální a vyhledávají jiná stanoviště (Kadlec et al., 2010; Seufert & Grosser, 1996). Vzhledem k tomu, že se však jedná o poměrně mobilní druh motýla, populace může být zachována, pokud je vytvořena síť ploch o rozloze alespoň 1 ha v relativní blízkosti tak, aby mezi nimi mohlo docházet k výměně jedinců – můžeme tak mluvit o metapopulační struktuře (Beneš et al., 2002; Johannesen et al., 1997). Nejvyšší naměřené doletové vzdálenosti jedinců se pohybují okolo 7 km (Kadlec et al., 2010; Vrba et al., 2009), nicméně takto dlouhé přelety jsou vzácné – zúčastní se jich pouze jednotky procent jedinců (Seufert & Grosser, 1996; Vrba et al., 2009).

Dospělci okáče skalního se líhnou v průběhu července, nejprve samci, poté samice – jedná se o protandrický druh (Baranovská & Moravec, 2020; Kadlec et al., 2009, obr. 3). Ihned po vylíhnutí se motýli páří. Z pozorování na lokalitách vyplývá, že samice začínají klást vajíčka až cca tři týdny po spáření (Beneš et al., 2002; Kadlec et al., 2009, 2010). Je to chování známé i u jiných druhů okáčů, které vzniklo jako adaptace na dlouhá sucha v průběhu léta. Pokud jsou vajíčka nakladena až později, housenky, které se z nich vylíhnou, mají již v pozdním létě a brzkém podzimu více potravy (García-Barros, 1988). V umělém odchovu toto chování bylo také pozorováno (García-Barros, 2000), jindy se však naopak neprojevovalo a samice začínaly klást již několik dní po oplození (Andres, 2018).



Obrázek 3: Graf znázorňující odhady počtu jedinců okáče skalního na vrchu Raná získané pomocí demografických modelů v průběhu sezony v porovnání s počty pozorovaných kopulací a kladení vajíček. Převzato dle Vrba et al. (2009)

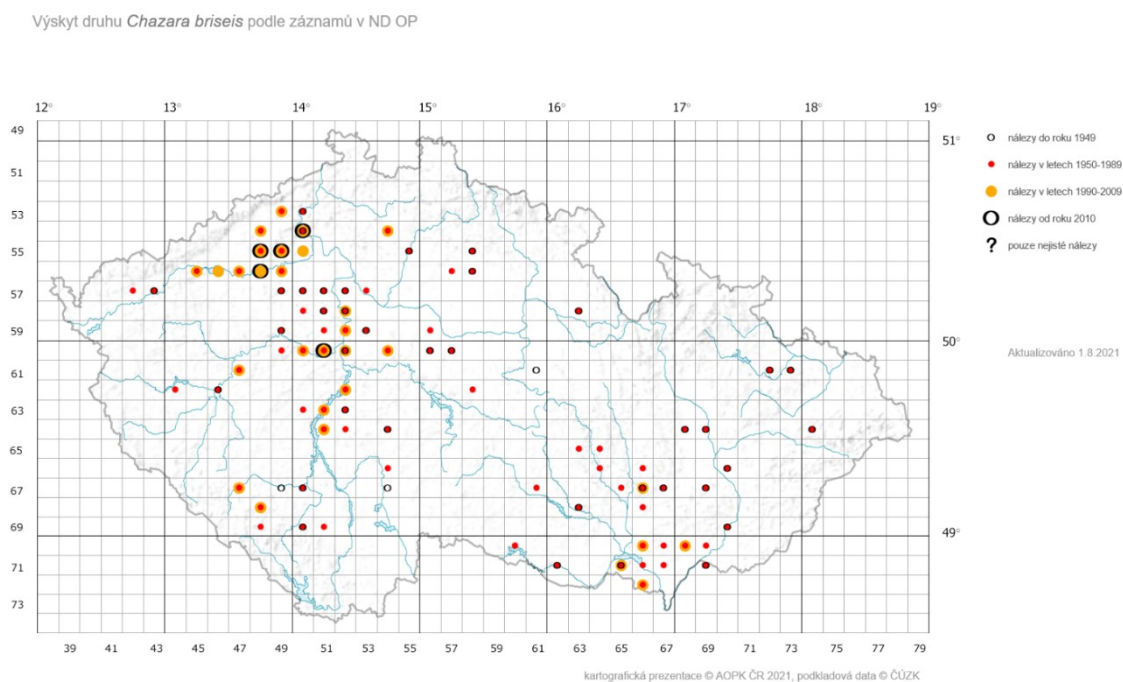
Vajíčka jsou kladena jednotlivě na místech s rozvolněnou vegetací, a to buď přímo na listy, nebo na kameny v okolí živné rostliny (Beneš et al., 2002; Seufert & Grosser, 1996). Larvy se líhnou po cca dvou týdnech a přezimují v 1. až 3. instaru (Andres, 2018; Kadlec et al., 2010; Seufert & Grosser, 1996; Sucháčková Bartoňová et al., 2021a). Kuklení probíhá převážně během června (Andres et al., 2019, 2020; Seufert & Grosser, 1996), a to pod zemí či v drnu trav, v komůrce vystlané hedvábím (Andres, 2018; Seufert & Grosser, 1996). Stádium kukly trvá tři až čtyři týdny, během července se pak začínají líhnout dospělci (Andres, 2018; Seufert & Grosser, 1996).

Vzhledem k tomu, že okáci skalní potřebují ke svému přežití rozsáhlá území s mozaikou různých biotopů, jsou tedy ideálními bioindikátory krátkostébelných stepí (Baranovská & Moravec, 2020; Vrba et al., 2021). Pokud se na lokalitě daří tomuto motýlovi, bude se zde pravděpodobně nacházet vhodné prostředí i pro mnohé jiné druhy – od rostlin až po obratlovce (Baranovská & Moravec, 2020).

1.1.2 Ohrožení a ochrana

Ačkoliv má okáč skalní poměrně rozsáhlý areál a ve značné jeho části je stále poměrně běžným druhem (van Swaay et al., 2010; van Swaay & Warren, 1999; Zarikian & Kalashian, 2016), na mnoha místech naopak ubývá. Pokles početností je hlášen převážně ze střední Evropy, ale úbytky jsou hlášeny i odjinud, například z chorvatských ostrovů (Sucháčková Bartoňová et al., 2021a; Vrba et al., 2009; Withrington & Verovnik, 2008). Ze států střední Evropy motýl pravděpodobně již vyhynul na Slovensku a v Polsku, v ostatních zemích (převážně na sever od Alp) je kriticky ohrožen (Sucháčková Bartoňová et al., 2021a; Vrba et al., 2009).

V České republice je vývoj početností populací okáče skalního podobný – v minulosti se jednalo o poměrně běžného motýla (Moucha & Procházka, 1962), ale v průběhu druhé poloviny 20. století postupně ubýval, a to i z chráněných území (Beneš et al., 2002; Hrabák & Povolný, 1996, viz obr. 4). Na přelomu tisíciletí vyhynul na Moravě, kde jeho poslední lokality byly na Pálavě (Beneš et al., 2002). Motýl vymizel i z okolí Prahy, kde dříve býval běžným, dokonce typickým druhem (Kadlec et al., 2008). Kolem roku 2010 pak vymřel i na své předposlední lokalitě v Českém krasu (Vrba et al., 2009), a tak se jeho poslední životaschopná metapopulace zachovala na několika lokalitách lounské části Českého středohoří (Macek et al., 2015; Vrba et al., 2009). V roce 2009 zde byla metapopulace odhadována na 1900 jedinců (Vrba et al., 2009), úbytek motýla však pokračoval, a v roce 2017 zůstala jediná lokalita na vrchu Raná s populací přibližně 400-500 jedinců (Baranovská & Moravec, 2020; Vrba et al., 2021).



Obrázek 4: Výskyt okáče skalního v České republice. Převzato z Nálezové databáze ochrany přírody AOPK ČR.

Kolaps většiny populací dříve takto běžného druhu byl pro vědeckou společnost nejprve překvapením (Habel & Schmitt, 2012). Genetické studie, které se okáčem skalním zabývaly, neodhalily v populacích žádné problémy (Johannesen et al., 1997; Kadlec et al., 2010) a motýl mizel i ze stanovišť, kde se dříve vyskytoval v hojném počtu (Kadlec et al., 2010). Vzhledem k tomu, že se jedná o druh přizpůsobený na sucho, by mu klimatická změna neměla vadit, ba naopak (Sucháčková Bartoňová et al., 2021a). Faktorů, které v takto masivním úbytku tohoto

druhu hrály roli, je však hned několik. Nejzásadnějším problémem byly ztráty vhodného habitatu – zarůstání dané poklesem pastvy, degradace stanovišť invazemi nepůvodních druhů, či dokonce nevhodná péče o chráněná území (Baranovská & Moravec, 2020; Kadlec et al., 2009; Konvička et al., 2010; Withrington & Verovnik, 2008). To, že byl doposud nějaký druh běžný, není zárukou toho, že se s takovými změnami v krajině bude schopen dobře vyrovnat, naopak na ně může být stejně citlivý jako druhy vzácné (Gaston & Fuller, 2007). Vzhledem k časté fluktuaci v početnostech hmyzích populací je navíc potřeba, aby lokalita nebyla izolovaná, ale v doletové vzdálenosti se nacházely další vhodné biotopy – i pokud je obývaná lokalita rozsáhlá, nemusí se na ní druh dlouhodobě udržet (Fagan et al., 2001).

U okáče skalního může být problémem také zmiňovaná prodleva mezi oplozením a začátkem kladení. Mnoho samic totiž kvůli tomu zahyne ještě dříve, než začnou klást vajíčka, a efektivní velikost populace se tím pádem snižuje (Kadlec et al., 2010). Dalším faktorem je potřeba velkého území – motýl je přizpůsobený na fungování ve velkých metapopulacích a jedná se tedy o poměrně dobře mobilní druh. Takové středně mobilní druhy jsou ale právě nejvíce náchylné k vymírání ve fragmentované krajině, protože více vyhledávají nová stanoviště, jejich odliv z vhodných lokalit je větší než u sedentárních druhů a mortalita při migraci na nový biotop je tak příliš vysoká (Thomas, 2000). Zároveň zde velkou roli může hrát inbrední deprese (Habel & Schmitt, 2018). Díky své mobilitě si druh za příznivých podmínek udržuje vysokou genetickou variabilitu. V momentě, kdy migrace mezi lokalitami již není možná a populace prochází bottleneckem, mají možnost se projevit škodlivé recesivní alely. Na rozdíl od toho jsou sedentární druhy zvyklé na přežívání v malých, geneticky málo diverzifikovaných populacích, a tedy při izolaci lokality a zmenšování populací tímto efektem tolik netrpí (Habel & Schmitt, 2012). Okáč skalní má navíc pouze jednu generaci za sezónu a není tedy schopen dostatečně plasticky reagovat na rychle se měnící prostředí, jako druhy vícegenerační (Van Dyck et al., 2009).

Okáč skalní je v evropském Červeném seznamu motýlů veden jako téměř ohrožený (van Swaay et al., 2010), v českém Červeném seznamu bezobratlých je však zaznamenán jako ohrožený kriticky (Beneš & Konvička, 2017) a silně ohrožený je i dle vyhlášky č. 395/1992 Sb. Protože i jeho poslední populace na území ČR byla na pokraji vymření, byl pro okáče skalního v roce 2018 schválen Regionální akční plán (RAP) (John et al., 2018). V něm bylo naplánováno pokračování managementových zásahů na lokalitě Raná a dalších místech, kde se motýl v minulosti vyskytoval, z nichž některé probíhaly i před zavedením RAP a měly na populaci druhu pozitivní efekt (John et al., 2020).

Nejdůležitějším bodem péče o lokality tohoto druhu je zavedení extenzivní pastvy. Motýl se vyvíjel v době glaciálních cyklů pod tlakem velkých kopytníků, a je tak na jejich pastvu výborně adaptován (Baranovská & Moravec, 2020; Sucháčková Bartoňová et al., 2021a). Housenky při jakémkoliv vyrušení padají z listů trav k zemi, mají navíc noční aktivitu (Kadlec et al., 2009). Jediné možné poškození kopyty tak může nastat v době kuklení, kdy jedinec několik dní setrvává ve fázi nepohyblivé prepupy (Baranovská & Moravec, 2020). Důležité však je, aby pastva nebyla příliš intenzivní a na lokalitě byla ponechána i místa s vyšší, nektaronosnou vegetací. Zároveň je vhodné zvířata na noc odvádět z lokality, aby velká část vyměšování proběhla mimo stanoviště a nedocházelo tak k obohacení lokality nutrienty (John et al., 2018). Pastvu je ideální provádět brzy zjara, případně celoročně s nižší intenzitou (John et al., 2018). Tam, kde pastva nestačí nebo není možná, je na místě provádět seč, a to včetně vyhrabání stáří, a dále různé disturbance terénu (Cremene et al., 2005; John et al., 2018; Seufert & Grosser, 1996; Sucháčková Bartoňová et al., 2021a). Rozvolňování vegetace kopyty či jinými zásahy je přitom pro okáče skalního zásadní - i na Rané motýl přežil pravděpodobně jen díky sešlapové aktivitě rogalistů a paraglidistů, kteří kopec využívají jako startovací plochu (Vrba et al., 2009).

Kromě péče o lokality a rozšiřování území s vhodným biotopem pro motýla RAP dále také počítá se záchranným chovem a reintrodukcemi (viz dále).

1.2 REINTRODUKCE A ZÁCHRANNÉ CHOVY V OCHRANĚ MOTÝLŮ

Reintrodukce je záměrné převezení a vypuštění druhu člověkem na místě, ze kterého dříve vyhynul, a to za účelem ochrany druhu. Jedná se o techniku aktivního managementu v ochraně přírody, díky níž již bylo několik druhů zachráněno před vyhynutím (Ewen et al., 2012). Přesto může jít o metodu kontroverzní, neboť neodborně provedená reintrodukce může přírodě naopak uškodit – například tím, že se zásahem ohrozí zdrojová populace druhu (Armstrong & Seddon, 2008). Z toho důvodu byly vytvořeny pokyny, kterých je třeba se při provádění reintrodukcí držet (IUCN/SSC, 2013). Z nich nejdůležitější jsou, aby reintrodukce měla opodstatnění – tedy žádné ostatní možnosti ochrany druhu již nebyly efektivní, dále aby zdrojová populace druhu nebyla ohrožena, ekologie druhu byla dostatečně známá, a tak se zvýšila šance na úspěch reintrodukce, a ochrana druhu byla na lokalitě zajištěna i do budoucna. Důležité také je, aby zdrojová populace byla geneticky a ekologicky co nejpodobnější původní, vyhynulé populaci daného druhu (Sedláček & Kadlec, 2019; Štochlová, 2018).

Z motýlů byl reintrodukovan například ohniváček černočárny (*Lycaena dispar*), a to na počátku 20. století do Velké Británie (Duffey, 1977). Jedná se tak o nejstarší známý pokus reintrodukce

motýla (Mattoni et al., 2003). Pravděpodobně nejznámější a neúspěšnější je pak reintrodukce modráška černoskvrnného (*Phengaris arion*), taktéž na Britské ostrovy (Thomas et al., 2009). V České republice byl úspěšně reintrodukován na několik lokalit například modrásek hořcový (*Phengaris alcon* f. *alcon*), v Praze pak např. modrásek vičencový (*Polyommatus thersites*) (Sedláček & Kadlec, 2019).

V rámci snahy omezit ohrožení donorské populace a zároveň mít dostatečný počet jedinců pro vypuštění na nové lokalitě se během procesu přípravy na reintrodukce často přistupuje k záchranným chovům. Tato strategie je často úspěšná a díky eliminaci predace a dohledu nad pářením jedinců se v mnohých případech chovu daří a jedinci mohou být posléze vypouštěni zpět do přírody (Porter & Ellis, 2011; Robert, 2009). Chovy však přinášejí i svoje rizika. Některé druhy nelze chovat vůbec nebo jen velmi těžko – jedinci se nechtějí pářit, vznikají vývojové vady apod. (Mattoni et al., 2003; Wagner et al., 1997). Jindy sice daný druh chovat lze, kvůli relaxaci selekce však mají chovaní jedinci menší fitness než motýli divocí (Robert, 2009). Například při dlouhodobém chovu běláška zelného (*Pieris brassicae*) se projeví rozdíly v počtu nakladených vajíček a také hmotnosti dospělců a rozpětí jejich křídel (Lewis & Thomas, 2001). Komerčně chovaní monarchové stěhovaví (*Danaus plexippus*) zase neprojevovali migrační chování, které je pro tyto motýly jinak typické (Oberhauser, 2019). Při založení chovu pouze z několika málo jedinců a následném příbuzenském křížení se pak u jedinců mohou objevit projevy inbrední deprese. Chované inbrední populace druhu *Bicyclus anynana* měly více sterilních vajíček a nižší míru přežívání jednotlivých stádií (van Oosterhout et al., 2000), inbrední samci téhož druhu byli také oproti outbredním jedincům méně úspěšní v páření (Joron & Brakefield, 2003). Je proto žádoucí motýly chovat v podmínkách, které budou co nejpodobnější jejich přirozenému prostředí, a zachovávat přitom co nejvyšší genetickou diverzitu (Schultz et al., 2009).

1.2.1 Záchranný chov a reintrodukce okáče skalního

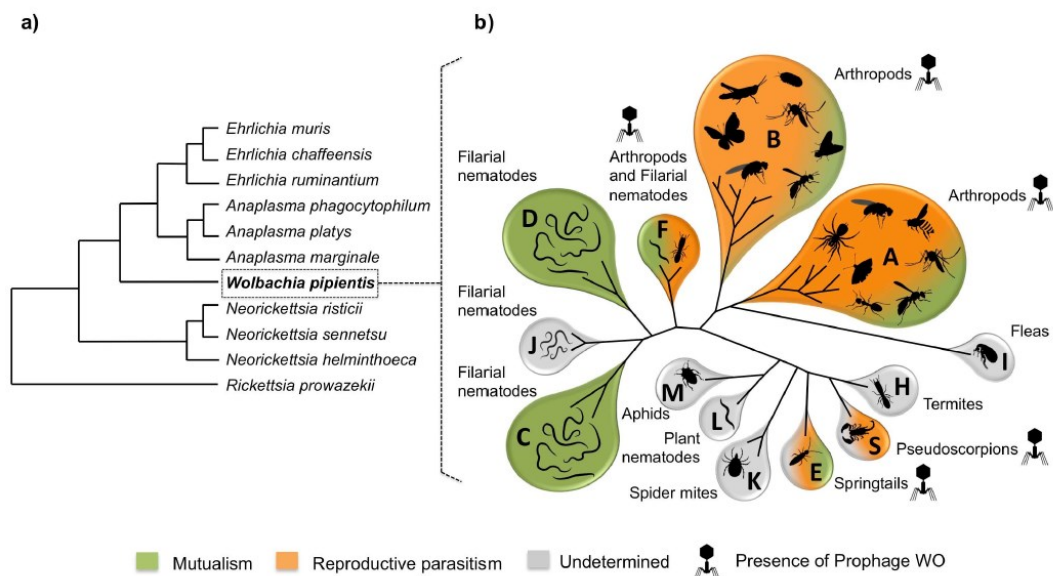
Pro okáče skalního byl záchranný chov založen v roce 2014, a to dvěma odchycenými páry (John et al., 2018). Zpočátku chov provázely problémy – okáč skalní se ukázal jako druh na chov velmi náročný (Andres, 2018), navíc se objevily vývojové defekty při přechodech housenek mezi jednotlivými instary, dané pravděpodobně příbuzenským křížením (John et al., 2018). Přesto se podařilo asi 30 jedinců dochovat do dalšího roku, a od roku 2015 probíhalo umístování přebytečných vajíček na lokality v okolí Rané, převážně na Dlouhou horu (John et al., 2018). Postupem času se podařilo metodiku chovu zvládnout a od roku 2017 jsou do chovu každoročně dováženi noví dva jedinci odchycení v přírodě, čímž se podařilo zabránit

inbreedingu a odstranit vývojové vady (Andres et al., 2019; Sucháčková Bartoňová et al., 2021a). Kromě populace z Rané byli chováni také jedinci z populace rakouských Hainburských vrchů (Hundsheim) (Sucháčková Bartoňová et al., 2021a).

Po zavedení RAP v roce 2018 se přistoupilo k systematickým reintrodukcím okáče skalního na předem vytipovaných místech s aktivním managementem. Na různých lokalitách, především v Českém středohoří, ale i v Českém krasu, se v několika fázích vypouštěly jak housenky, tak i dospělci motýla (Andres et al., 2019, 2020; Baranovská & Moravec, 2020). Ne na všech lokalitách byly reintrodukce úspěšné – například na Křížových vršcích a Písečném vrchu se populaci nepodařilo obnovit, důvodem byla nejspíš příliš malá rozloha vhodného území (Andres et al., 2019, 2020). Neúspěšný byl i pokus o reintrodukcii rakouské populace okáčů na NPR Mohelenská hadcová step (Sucháčková Bartoňová et al., 2021a). Naopak jinde se okáčovi začalo dařit. V roce 2020 byla původní populace na Rané odhadována na 700-1000 jedinců, z populací reintrodukovaných v minulých letech pak ta na Dlouhé hoře činila zhruba 400-500 dospělců, na Čičově 300-400 imág (Andres et al., 2020). Reintrodukce pak probíhala dále i na vrchu Radobýl, kde bylo vypuštěno 50 jedinců z chovu a dalších 30 se zde vylíhlo z dovezených housenek (Andres et al., 2020). Mimo České středohoří se v současné chvíli okáč skalní vyskytuje také v Českém krasu na lokalitě Třesina, kde byla v létě 2020 odhadnuta početnost na 80-100 dospělců, a v pražském Radotínském údolí s početností 50-60 imág (Andres et al., 2020, viz obr. 4).

1.3 PŮSOBNÍ WOLBACHIE NA JEJÍ HOSTITELE

Wolbachie (*Wolbachia pipientis*, Hertig, 1936) je gram-negativní bakterie z třídy Alphaproteobacteria, řád Rickettsiales. Jedná se o endosymbionta přenášeného z matky na potomky, který se vyskytuje pouze u bezobratlých (Werren et al., 2008). Prvně byla wolbachie objevena v roce 1924 u komára pisklavého (*Culex pipiens*) (Hertig & Wolbach, 1924). Vyskytuje se u mnoha různých taxonů z řad členovců a hlístic čeledi Filariidae (Bandi et al., 1998; Taylor & Hoerauf, 1999). Z členovců se nachází u stejnonožců (Bouchon et al., 2009), pavouků (Werren & Windsor, 2000), štírků (Lefoulon et al., 2020), roztočů (Ros et al., 2009) a především hmyzu (Werren et al., 1995). Ačkoliv rozeznáváme pouze jediný druh wolbachie, jedná se o druh velmi diverzifikovaný. V současnosti se wolbachie dělí na 17 tzv. superskupin, tedy geneticky odlišných monofyletických linií, označených písmeny (A-F, H-Q, S) (Kaur et al., 2021; Lefoulon et al., 2020; Ros et al., 2009). Mezi superskupinami ovšem může docházet k rekombinacím (Werren et al., 2008). Některé ze superskupin jsou široce rozšířeny, jiné se vyskytují pouze v jednom omezeném taxonu hostitelských druhů (obr. 5). V každé superskupině se pak



Obrázek 5: Schematická reprezentace a) fylogenetických vztahů wolbachie v rámci skupiny Anaplasmataceae, a b) fylogenetický strom hlavních a dobře rozeznatelných Wolbachia superskupin. Převzato dle Kaur et al. (2021)

vyskytuje mnoho různých kmenů této bakterie, přičemž jeden hostitelský druh, či dokonce samotný jedinec, může být nakažen více kmeny (Werren et al., 1995, 2008).

Wolbachie je schopna svým hostitelem manipulovat, a to hned několika způsoby. Pravděpodobně nejrozšířenější je cytoplazmatická inkompatibilita (CI) (Hiroki et al., 2004). V takovém případě nejsou schopni se rozmnožit nakažení samci s neinfikovanými samicemi – vzhledem k tomu, že wolbachie se šíří na potomky pouze z matky, toto spáření by jí nepřineslo žádnou výhodu. Cytoplazmatická inkompatibilita může být jednocestná nebo dvoucestná. Ve druhé situaci dochází k tomu, že se mezi sebou u jednoho druhu potkají dva různé kmeny wolbachie, které jsou vzájemně nekompatibilní – a tak se spolu nemohou spářit ani dva jedinci, kteří jsou sice oba wolbachia pozitivní, ale každý je nakažen jiným kmenem (Werren et al., 2008).

Dalším rozšířeným jevem je zabíjení samců (male-killing, MK). Toto chování bakterii pomůže v případě, že mezi sebou larvy kompetují o potravu nebo dochází ke kanibalismu (Jiggins et al., 1998). Pokud samci nepřežijí, zvýší se fitness infikovaných samic, které tak wolbachii mohou šířit dále (Charlat et al., 2007). Proto k zabíjení samců dochází nejčastěji během embryogeneze (Hurst et al., 1999; Werren et al., 2008), ovšem v případě, že je bakterie v tomto neúspěšná, může dojít ke smrti samců i později během vývoje larev (Charlat et al., 2007; Mitsuhashi et al., 2004).

Wolbachie dále také umí feminizovat genetické samce. Feminizace není tak rozšířená jako cytoplazmatická inkompatibilita nebo male-killing, ale vyskytuje se například u korýšů, pavouků,

polokřídlych a motýlů (Kaur et al., 2021). Při feminizaci i male-killingu se tedy v potomstvu líhnou pouze samice, rozdíl je v tom, že v případě MK líhnivost dosahuje pouze okolo 50 %, zatímco při feminizaci je líhnivost téměř 100% (Jiggins et al., 1998). Zároveň, pokud se wolbachie v hostiteli odstraní za pomoci antibiotik, poměr pohlaví potomstva se vrátí k proporci 1:1, jde-li o male-killing; pokud se však jedná o feminizaci, budou se po přeléčení líhnout pouze samci (Hiroki et al., 2002). Roli zde však mohou hrát i jiné faktory. Například u dvou příbuzných druhů zavíječů – *Ostrinia furnacalis* a *O. scapularis* – byla převaha samic připisována původně feminizaci (Kageyama et al., 1998, 2002, 2003), později se však ukázalo, že wolbachie zabíjí samce, samice ale naopak nepřežijí bez ní (Kageyama & Traut, 2004).

Dalším méně častým projevem nákazy je partenogeneze, kterou wolbachie umí vyvolat u bezobratlých s haplodiploidním způsobem určení pohlaví (Salunkhe et al., 2014). V neoplozených vajíčkách má bakterie totiž vliv na zdvojení chromozomů, takže nakažené samice produkují dvakrát tolik dcer (Charlat et al., 2003).

Kromě toho však v mnoha případech wolbachie může být svým hostitelům i prospěšná, a jejich vztah se tak mění z parazitického na mutualistický. Například octomilku obecnou (*Drosophila melanogaster*) wolbachie chrání proti infekcím běžných RNA virů (Brownlie & Johnson, 2009). Dále jsou známe případy, kdy wolbachie zlepšuje plodnost hostitele, zvyšuje fitness a délku života (Kaur et al., 2021; Narita et al., 2009). U hlístic jsou dokonce zaznamenány pouze mutualistické vztahy, většinou obligátní, ve kterých wolbachie sama neumí vytvářet některé vitaminy a kofaktory, zatímco u hostitelských hlístic bez wolbachie nedochází ke správnému rozmnožování (Kaur et al., 2021; Werren et al., 2008).

Různé kmeny wolbachie mohou na stejného hostitele působit různými způsoby, a to bez ohledu na jejich příbuznost – i velmi blízké kmeny mohou hostitelem manipulovat rozdílně, a naopak (Kageyama et al., 2003). Jak již bylo zmíněno, jeden druh či jedinec může být současně nakažen více kmeny. Ty se mohou vzájemně ovlivňovat a vytlačovat (Narita et al., 2007a; Werren et al., 2008), ovšem nemusí to tak být vždy (Narita et al., 2007b).

Všechny tyto interakce vyvolávají reakce v hostitelských druzích. Například, pokud je část populace nakažena kmenem wolbachie způsobujícím cytoplazmatickou inkompatibilitu, může se vytvořit reprodukční bariéra a wolbachie tak přispěje k oddělení a evoluci nových druhů (Charlat et al., 2003). To platí hlavně v případě, že se jedná o dvoucestnou CI, infekce wolbachii je nicméně pravděpodobně pouze jedním z faktorů, který k takové evoluci přispívá – pouze samotná nákaza k oddělení druhů nestačí (Hernández-Roldán et al., 2016; Kaur et al., 2021).

Možná zajímavější jsou však evoluční odpovědi v rámci jednoho druhu. U babočkovitých motýlů *Acraea encedon* a *A. encedana* došlo po masivním rozšíření male-killing kmenu wolbachie ke změně námluvního chování – samice se začaly shromažďovat na viditelných místech tak, aby k nim samci měli lepší přístup, a byly ihned přístupné k páření (Jiggins et al., 2000b). Samci si z nich naopak vybírali přednostně ty, které nebyly wolbachii infikované (Jiggins et al., 2000b). Tím mohlo dojít ke stabilizaci a zachování populace (Randerson et al., 2000). Evoluce proti nákaze je patrná i geneticky – například některé populace motýla *Hypolimnas bolina* z čeledi babočkovitých si během několika desetiletí vyvinuly rezistenci vůči zabíjení samců indukovanému wolbachii (Mitsubishi et al., 2011), u jiných populací stejného druhu však tato rezistence pozorována nebyla (Dyson & Hurst, 2004). Po potlačení MK však wolbachie začala s hostitelem manipulovat jinak – projevila se zde cytoplazmatická inkompatibilita (Hornett et al., 2008).

O tom, jak moc je wolbachie rozšířená, se vedou diskuze – tradičně se uvádí, že nakaženo je kolem 20 % hmyzu a alespoň 16 % všech členovců (Brownlie & Johnson, 2009; Werren & Windsor, 2000). Tato čísla jsou nicméně pravděpodobně podhodnocena, neboť ve studiích bylo použito pouze několik jedinců od každého zkoumaného druhu, a tedy infekce s nízkou prevalencí nebyly zachyceny (Jiggins et al., 2001). Jiné analýzy udávají čísla vyšší – nakaženo by mělo být 66 % hmyzích druhů, prevalence u každého z nich je však buď velmi vysoká, nebo velmi nízká (Hilgenboecker et al., 2008). V každém případě se jedná o široce rozšířeného symbionta. Vertikální přenos na potomky je často velmi účinný, téměř 100% (Hiroki et al., 2005; Jiggins et al., 1998; Narita et al., 2009), ale nemusí tomu tak být vždy (Jiggins et al., 2000a; Narita et al., 2007b). Méně účinný přenos může být způsoben podmínkami prostředí nebo například interakcí s dalšími symbionty (Kaur et al., 2021). Rozšíření wolbachie však přispívá také přenos horizontální – a to i mezi zcela nepříbuznými druhy. Wolbachie se mezi nimi přenáší pomocí společné živné rostliny nebo skrz parazitaci a predaci (Li et al., 2017; Sintupachee et al., 2006; Vavre et al., 1999; Werren et al., 1995). Je možné, že wolbachie může více expandovat také kvůli člověku (Werren, 1997).

Co se týče motýlů, i v této skupině je nakaženo velké množství druhů. Ahmed et al. (2015) nákazu potvrdili u 43 % zkoumaných druhů, když ale započítali pravděpodobnosti neodhalené infekcí s nízkou prevalencí, odhadli, že by nakaženo mohlo reálně být až kolem 80 % motýlích druhů. Ilinsky & Kosterin (2017) pak wolbachii odhalili u téměř 60 % zkoumaných druhů. Z denních motýlů je wolbachie potvrzena u všech čeledí kromě Riodinidae, přičemž největší diverzita kmenů je známa u modráskovitých (Lycaenidae) (Salunkhe et al., 2014).

Wolbachie byla u několika druhů motýlů zkoumána velmi intenzivně. *Acraea encedon* byl první druh, u kterého se prokázalo wolbachii indukované zabíjení samců (společně se sluněčkem dvojtečným (*Adalia bipunctata*), (Hurst et al., 1999)). Kromě výše zmíněných druhů motýlů se rozsáhlý výzkum dělal například také na žluťáskovi *Eurema hecabe*, u kterého se vyskytují dva různé kmeny wolbachie – jeden způsobující cytoplazmatickou inkompatibilitu, druhý feminizaci (Hiroki et al., 2004; Narita et al., 2007b).

U okáče skalního se wolbachii nepodařilo detekovat (Ilinsky & Kosterin, 2017), a to ani ve studii, která provedla screening několika desítek jedinců (Sucháčková Bartoňová et al., 2021a).

1.4 CÍLE PRÁCE

Vzhledem k tomu, že okáč skalní je v posledních letech v České republice cílem mnoha ochrannářských aktivit, z nichž značná část spočívá v reintrodukcích, je potřeba, aby jeho ekologie byla dopodrobna známá, a to včetně rozdílů mezi jednotlivými formami (nebo tradičně poddruhy). Ačkoliv má poslední česká metapopulace tohoto motýla jeden unikátní haplotyp, přesto je geneticky rakouským populacím poměrně příbuzná (Sucháčková Bartoňová et al., 2021a). Není však známo, zda a jak se od sebe formy *bataia* a *pannonica* liší ekologicky a v reprodukci. Různé populace stejného druhu motýla se mezi sebou mohou lišit například počtem generací za sezónu (Blau, 1981), délkou života dospělců (Gotthard et al., 1994), nebo intervaly mezi kladením (Duplouy et al., 2013). Při reintrodukcích či posilování stávajících populací druhů jedinci odjinud je potřeba, aby zdrojová populace byla co nejpříbuznější populaci původní geneticky, ekologicky i fenologicky. Proto je hlavním cílem této práce zvládnout chov dvou populací okáče skalního – rakouské z Hundsheimu a české z Loun – a kvantifikovat jejich reprodukční charakteristiky, konkrétně načasování líhnutí jedinců, délku dožití jedinců, délku intervalu kladení samic, počty nakladených vajíček za den a za sezónu, líhivost housenek apod., a tyto parametry následně mezi těmito dvěma populacemi porovnat.

Jednotlivé populace se mezi sebou mohou lišit i přítomností wolbachie (Hernández-Roldán et al., 2016; Sucháčková Bartoňová et al., 2021b). Ta může ovlivňovat různé reprodukční charakteristiky (Dyson & Hurst, 2004). Infikovaní jedinci mohou například produkovat více (Mains et al., 2013) či naopak méně vajíček (Mariño et al., 2017). Dalším cílem práce je tedy potvrdit, zda je česká populace okáče skalního wolbachii infikována, a zjistit, jak wolbachie se svým hostitelem v tomto případě manipuluje. Proto je záměrem část české populace v chovu vyléčit antibiotiky na bázi tetracyklinu a porovnat reprodukční charakteristiky těchto jedinců s jedinci z téže populace, kteří jsou ovšem wolbachia pozitivní. Protože jedním z nejčastějších vlivů

wolbachie je ovlivňování pohlaví hostitele (Werren et al., 2008), je cílem také molekulárními metodami rozpoznat pohlaví prvních instarů housenek a porovnat jejich poměry jak u české populace a přeléčených jedinců, tak i u rakouské populace.

2 METODIKA

2.1 CHOV OKÁČE SKALNÍHO

Jedinci, chováni pro účely této diplomové práce, pocházeli z výše popsaného záchranného chovu okáče skalního (Andres, 2018). Byli chováni po tři sezóny, a to v letech 2018, 2019 a 2020. Chov probíhal v obci Kamenný Újezd, okres Rokycany, nadmořská výška 378 m. n. m., průměrná teplota v červenci 16–17 °C, počet dnů se srážkami 1 mm a více 100–120 (www.edpp.cz, 2021). V prvních dvou letech byly ve stejných podmínkách chovány rakouská populace (forma *pannonica*) a česká populace (forma *bataia*), a to následovně:

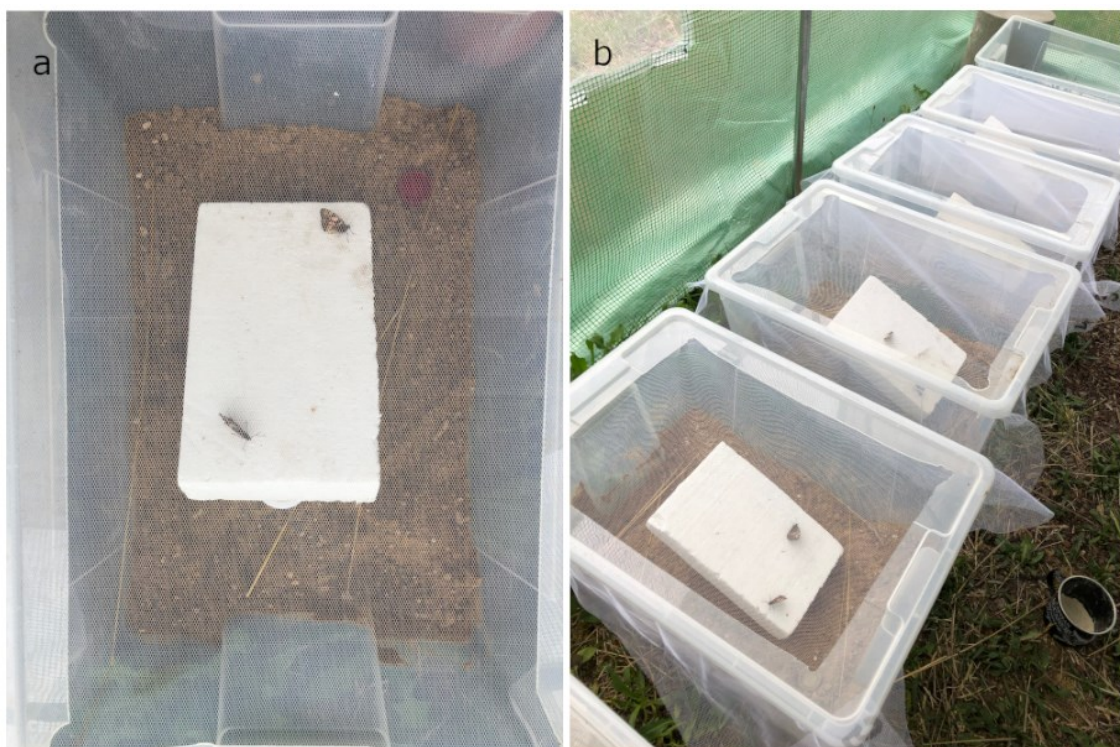
- v roce 2018 se jednalo o 12 samic a 14 samců z rakouské populace, 11 samic a 11 samců z české populace
- v roce 2019 šlo o 3 samice a 5 samců z rakouské populace, 11 samic a 11 samců z české populace.

V roce 2020 pak již byli chováni pouze čeští jedinci, nicméně populace byla rozdělena na dvě poloviny, přičemž jedna z nich byla léčena antibiotiky dle Mitsushashi et al. (2004) s následujícími úpravami. V chovu tedy bylo 11 léčených samic, 11 léčených samců, 10 neléčených samic a 20 neléčených samců. Léčeným jedincům byl před začátkem ovipozice podáván 3 dny roztok s monohydrátem doxycyklinu s koncentrací 1 mg na 1 ml roztoku, po třech dnech byl vyměněn za tetracyklin hydrochlorid též koncentrace z důvodu lepší rozpustnosti, a léčba probíhala další 3 dny.

2.1.1 Průběh chovu

Chov probíhal na základě doporučení Miloše Andrese, který má na starosti záchranný chov okáče skalního pro reintrodukce (Andres, 2018).

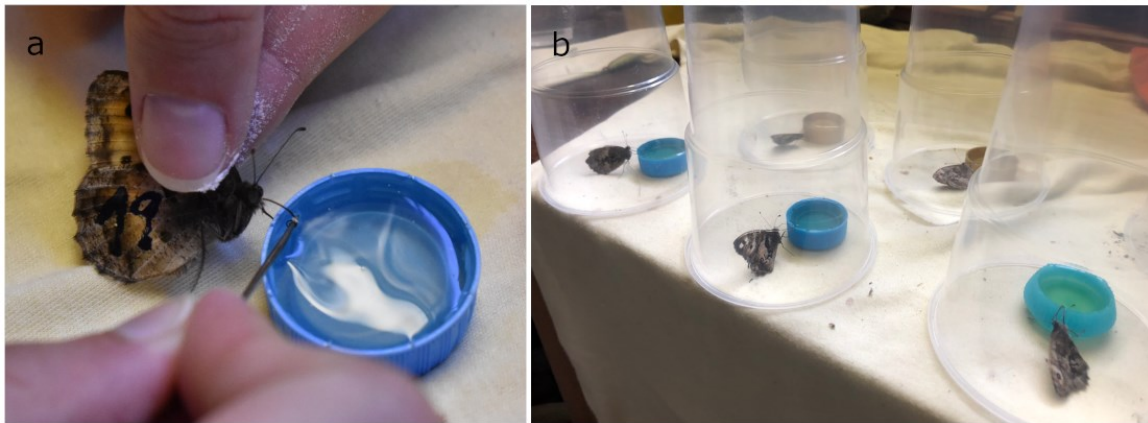
Jedinci byli chováni v plastových krabicích po dvou, případně třech, vždy s jednou samicí a jedním či dvěma samci. Dno krabic bylo pokryto písčitém substrátem a stébly trav, dále se zde nacházelo polystyrenové přístřeší poskytující stín a nádobka s vodou. Část substrátu nacházející se pod polystyrenem byla udržována vlhká. Každá krabice byla překryta tylovou látkou, přes níž bylo položeno víko krabice s vyříznutým otvorem (viz obrázek 6a). Všechny krabice byly umístěny ve fóliovníku (obr. 6b). Motýli byli do chovného zařízení umisťováni vždy ráno před 9. hod, večer po ukončení aktivity byli hromadně přemístěni do chovných klecí, a to z důvodu vybírání nakladených vajíček z krabic a krmení jedinců.



Obrázek 6: Krabice v chovném zařízení; a) pohled shora, b) rozmístění krabic ve fóliovníku. (Foto: T. Štochlová)

Dospělci byli krmeni ručně, vždy ráno před přesunem do chovného zařízení. Jedinec byl uchopen u báze předních křídel, a to pomoučenými prsty z důvodu co nejmenšího ořezu křídelních šupinek. Pomocí preparační jehly byl pak jedinci rozvinut sosák, který byl následně ponořen do krmného roztoku (viz obrázek 7). Krmící se motýl byl přiklopen průhledným plastovým kelímkem. Po dokončení krmení dospělec odstoupil od nádoby s roztokem a mohl tak být přemístěn zpět do klícky. V případě, že si motýl namočil křídla či zadeček v roztoku, byl na okamžik rychle ponořen do vody. Pokud se jedinec vzpíral krmení, byl nejprve nechán odpočinut a krmení bylo vyzkoušeno znovu za několik minut, pokud byla snaha i přesto neúspěšná, byl sosák motýla přidržen v roztoku preparační jehlou po dobu cca půl minuty. Krmný roztok tvořila voda (0,7 l), sacharóza (cukr krystal, 5 lžiček), fruktóza nebo glukóza (3 lžičky), med (3–4 lžičky) a multivitaminová šumivá tableta. Roztok byl uchováván v lednici a vyndáván pouze 1–2 hodiny před krmením. Každé tři dny byla umíchána nová várka. Ruční krmení zajistilo kontrolu nad příjmem energie všech jedinců a zároveň zabránilo možnému poškození jedinců vlivem ulpívání roztoku na křídlech, šíření plísní v krabicích, a také omezilo vnik mravenců do krabic.

Přes den byli jedinci ponecháváni v zařízení v klidu tak, aby mohlo probíhat páření a kladení vajíček, pouze za velmi horkých dnů byl vzduch ve fóliovníku ochlazován vodou. Samice

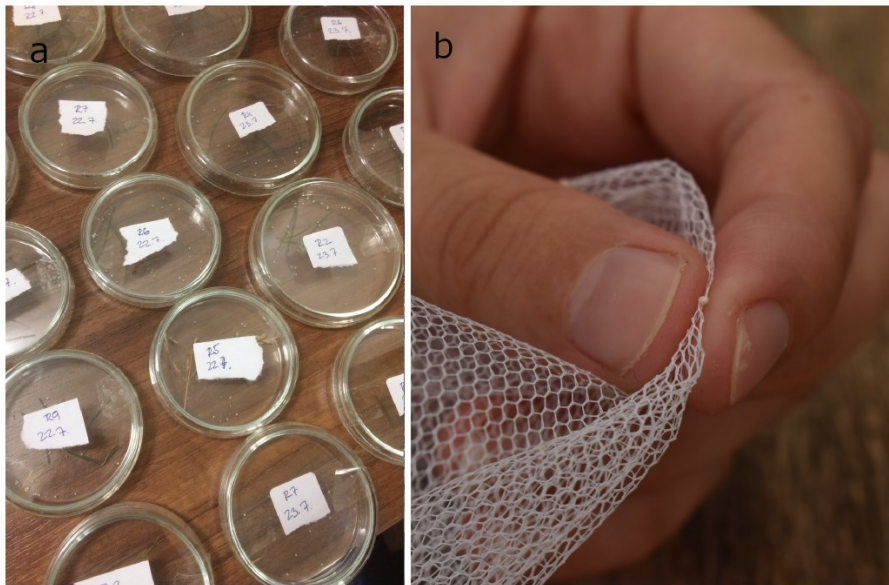


Obrázek 7: Krmení dospělců; a) rozvinutí sosáku jedince preparační jehlou, b) krmící se jedinci (Foto: A. Štochlová).

kladly vajíčka na tyl, stébla trávy, ale i kameny či stěny krabice (obrázek 8). Vajíčka byla z krabic vybírána každý den a skladována v Petriho miskách společně s několika stébla trav (obrázek 9a). Pro správné sejmutí vajíčka z tylu tak, aby nedošlo k jeho poškození, bylo třeba vajíčko podebrat zespodu v místě přichycení a tyl protáhnout mezi prsty. Vajíčko tak ulpělo na prstu (viz obrázek 9b). Když byla vajíčka nakladena na stěny krabice, byla podebrána zespodu navlhčeným prstem. Samice kladly vajíčka i v případě, že nebyla oplozená. To se dalo poznat zvláště po několika dnech, protože vajíčko postupně ztrácelo svůj rovnoměrný soudečkovitý tvar.



Obrázek 8: Vajíčka nakladená na a) tylu, b) stěně krabice, c) kameni, d) části rostliny. (Foto: A. Štochlová)



Obrázek 9: a) Uskladnění vajíček v Petriho miskách (Foto: T. Štochlová), b) proces snímání vajíčka z tylu (Foto: A. Nagy).

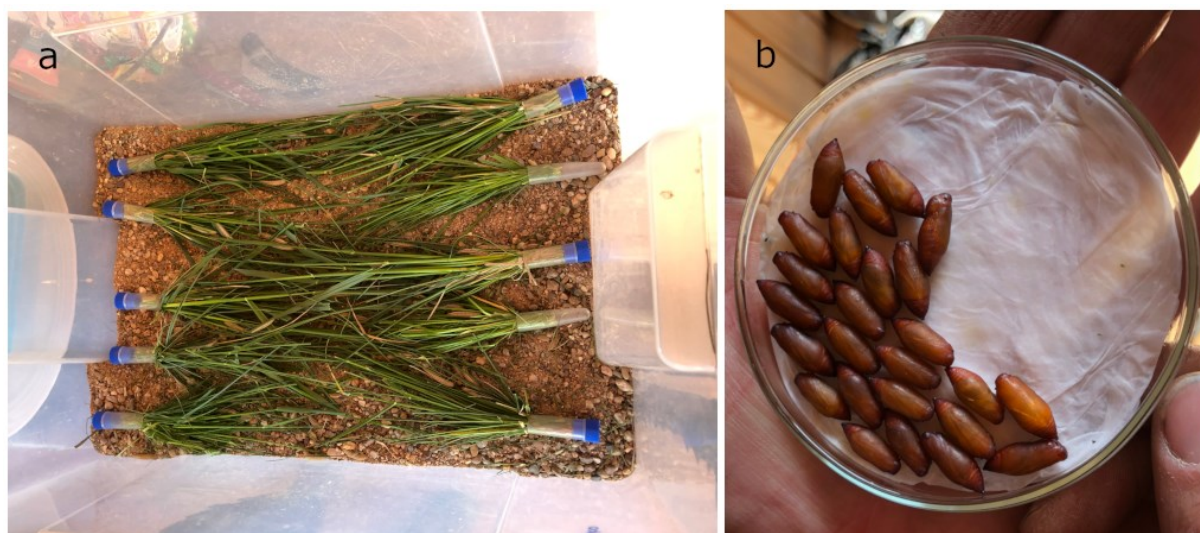
Poté, co se z oplozených vajíček začaly líhnout housenky, byly jejich počty zaznamenávány každý den. Jedna polovina larev byla vždy zamražena v tekutém dusíku pro potřeby následných laboratorních analýz. Každá housenka byla přemístěna do samostatné zkumavky pro zabránění potenciální kontaminace DNA jedince jiným ze vzorků. Druhá polovina byla přemístěna do květináčů s živnými rostlinami, konkrétně několika druhy kostřav (*Festuca* spp.). Menší trsy kostřav byly nasázeny v písčitém substrátu, který byl vespod podložen několikacentimetrovou vrstvou hrubého šterku. Květináče byly připraveny s předstihem tak, aby kostřavy stihly dobře zakořenit. Květináče byly zalévány jednou za několik dní, a to pouze lehce, doprostřed nádoby tak, aby živné rostliny měly jak zelená, tak i suchá stébla (viz obrázek 10). Nádoby byly překryty průsvitnou monofilovou tkaninou, která byla upevněna k okraji květináče gumičkou



Obrázek 10: Housenky a) těsně po vylíhnutí v Petriho misce (Foto: A. Štochlová), b) v květináčích na polosuchých kostřavách (Foto: T. Štochlová).

tak, aby bylo zabráněno vniku predátorů k larvám. Do každého květináče bylo umístěno přibližně 50 housenek.

Takto byly larvy uchovávány od léta až do následujícího jara. Přes zimu nebylo s květináči příliš manipulováno, pouze bylo dohlédnuto na to, aby drny kostřav zcela nevyschly. V průběhu května, kdy byla většina živných rostlin již zkonsumována, byly přeživší housenky přemístěny do nových květináčů. Tento proces byl zopakován a larvy takto byly dochovány až do zakuklení, které proběhlo přímo v substrátu v květináčích. Lepší, nicméně časově náročnější alternativou je odebrání housenek z květináčů a jejich dochování na písčitém substrátu, do kterého jsou každý den přidávána čerstvá stébla živné rostliny v jakémsi umělém drnu (viz obrázek 11a) (Andres, 2018). Písek je po začátku kuklení třeba každé tři dny procházet a kukly dochovat v Petriho miskách na vlhkých ubrouscích (obr. 11b). Těsně před vykuklením (tzn. po ztmavnutí kukel) se pak kukly umístí do krabice s pískem a řídkou vrstvou sena (Andres, 2018).



Obrázek 11: a) Umělé drny s housenkami posledních instarů, b) skladování kukel na vlhkém ubrousku v Petriho misce (Foto: T. Štochlová).

Vykuklení dospělci byli odebráni přibližně po 3 hodinách – tedy po vyrovnání křídel. Motýli byli označeni na křídlo a ponecháni v klíčkách dva dny ve tmě před prvním krmením. Poté byli znovu páření v chovném zařízení popsaném výše.

2.1.2 Problémy během chovu

V průběhu chovu se vyskytlo mnoho různých problémů. Následuje výčet těch nejpodstatnějších a jejich možná řešení.

Příliš vysoká teplota v chovném zařízení. Zpočátku se nedařilo držet teplotu ve fóliovníku na únosné hodnotě pod 40 °C, především v extrémně horkém létě v r. 2018, což se projevilo dehydratací a úhynem některých jedinců. Bylo proto zavedeno několik opatření: střecha

zařízení byla pokryta stříbrnou odrazivou fólií, a zároveň podložena netkanou textilií tak, aby se mezi střechou fóliovníku a touto textilií tvořily vzduchové kapsy; v horní části zařízení také byly vyříznuty doplňkové větrací otvory. Během extrémně horkých letních dní bylo doplněno ještě chlazení vodou, jednak rozprašovačem uvnitř fóliovníku, a jednak hadicí shora.

Záněty zadečku dospělců. U některých jedinců se vyskytlo nepřírozené nafouknutí zadečku. To značilo pravděpodobný zánět či bakteriální infekci. V době tohoto projevu již není možné jedince efektivně léčit, pokud je nakažená samice, tato přestává klást. Pro prevenci těchto zánětů je třeba důsledně pravidelně připravovat nový krmný roztok a čistit nádoby používané ke krmení. Zánět může také vzniknout častým ponecháváním jedince na vlhkém substrátu přes noc (M. Andres, os. kom.).

Samice klade pouze prázdné vaječné obaly. Před úspěšným spářením samice kladou vajíčka neoplozená. V některých případech se objevilo kladení neoplozených vajíček, nebo dokonce prázdných, potrháných vaječných obalů i poté, co byly pozorovány pokusy o páření. Zčásti pomohla výměna samců, některé samice však i přesto oplozeny nebyly. Pro zlepšení kondice samic je možné motýly nechat vždy obden odpočívat ve tmě mimo chovné zařízení (M. Andres, os. kom.). Někteří jedinci také mohou mít problém, pokud je v krmném roztoku a pro vlhčení substrátu používána chlorovaná voda (Andres, 2018).

Predace vajíček a housenek. I přes to, že byly jak krabice pro kladení, tak i květináče pro chov housenek zabezpečeny sítkami, v obou byl pozorován výskyt predátorů, a to zejména různých druhů pavouků. Napadány byly jak vajíčka, tak housenky různých instarů (viz obrázek 12). Predátoři byli ze zařízení odstraňováni a zvláště u květináčů proběhly pokusy o lepší utěsnění, problém však nebyl stoprocentně vyřešen. Možností je lepší příprava chovného zařízení před započatím chovu. Krabice ve fóliovníku je možné položit na dřevěné podlahy, které je pak třeba potřít vrstvou přípravku proti hmyzu – v záchranném chovu okáže se osvědčit Chemstop Ecofix (Andres, 2018). Květináče s živnými rostlinami je pak možné připravit tak, že se do nich zasadí drny kostřav, nechají se projít periodou vyschnutí (drny budou tak z poloviny suché), a pak se na 24 hodin ponoří do sudu s vodou. Tím se odstraní všichni škůdci, kteří se do té doby mohli usídlit v substrátu (Andres, 2018).

Vajíčka také mohou být parazitována drobněnkami (*Trichogramma* spp.) (Andres, 2018), tento problém však v tomto chovu nebyl pozorován. Drobněnky totiž nejsou aktivní za sucha a tepla, proto se nevyskytují v prostředí fóliovníku (Andres, 2018).



Obrázek 12: Predace housenky pavoukem. (Foto: T. Štochllová)

Úhyn housenek. Velkým problémem pro dostatečné rozmnožení chovu je značný úhyn housenek během roku, který není způsoben predací. Důvodem je převážně přílišná zálivka květináčů. Je opravdu nutné kostravy udržovat v polosuchém stavu a substrát nechávat dostatečně vyschnout. Housenky jsou schopny přežít, pokud se nechají rostliny v květináči mírně přeschnout, naopak při přílišné vlhkosti často hynou.

Nevykuklení dospělců. Mnoho jedinců bylo dochováno až do stadia kukly, značná část z nich se ovšem nevykuklila. Příčinou bylo pravděpodobně poškození kukel při manipulaci s květináči. Tomuto problému se dá předejít chovem posledních instarů housenek na umělých drnech a následné přechovávání kukel v Petriho miskách způsobem popsáným výše.

Deformace vylíhnutých dospělců. Někteří jedinci měli po vykuklení deformovaná křídla, případně rozdvojený sosák. Příčiny nejsou známe.

2.2 LABORATORNÍ ANALÝZA

Pro účely laboratorních analýz byli dva dospělí jedinci *Ch. briseis* zamrazeni v tekutém dusíku a posláni na sekvenaci (viz dále). Všichni ostatní dospělci byli uchováni v 96% ethanolu. Larvy byly zamrazeny v tekutém dusíku a uchovávány v -20 °C.

2.2.1 Izolace genomové DNA (gDNA)

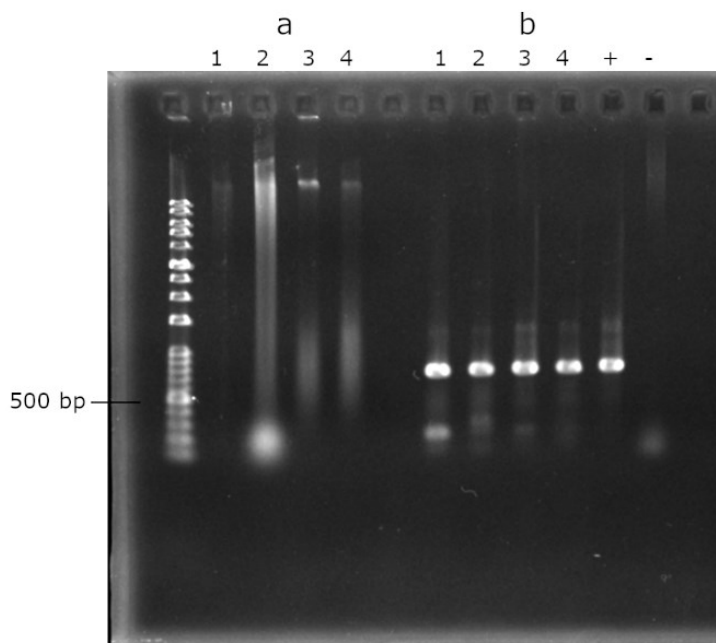
Izolace gDNA ze vzorků proběhla několika způsoby, v závislosti na typu vzorku.

Pro účely Illumina sekvenování genomu samce a samice *Ch. briseis* byla gDNA izolována z hrudi dospělců pomocí soupravy MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen, Hilden, Německo) dle návodu výrobce. Pro sekvenování dlouhých čtení pomocí technologie Oxford Nanopore byla gDNA izolována ze zadečku stejné samice pomocí soupravy Nanobind Tissue Big DNA Kit (Circulomics Inc, Baltimore, MD, USA) dle výrobcem optimalizovaného protokolu pro izolaci gDNA z hmyzu.

U parentální generace byla gDNA extrahována z abdomenů a končetin dospělců pomocí cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB), a to podle protokolu Winnepenninckx et al. (1993) s následujícími úpravami. Tkáň byla homogenizována tloučkem a inkubována přes noc ve 37 °C v 750 µl extrakčního pufru, který se skládal z 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH = 8), 40 mM EDTA (pH = 8), 0,2% β-mercaptoethanolu, 1,4 M NaCl a 0,1 mg/ml proteinázy K. Po inkubaci byl k roztoku přidán stejný objem chloroformu, roztok byl promíchán a zcentrifugován po dobu 10 min při 14000 otáčkách za minutu (rpm) ve 4 °C. Do nové zkumavky byla přenesena vodná fáze roztoku, k níž byla přidána RNáza A tak, aby výsledná koncentrace byla 0,1 mg/ml extrakčního pufru. Po zahřátí byl ke směsi přidán isopropanol ve 2/3 poměru k objemu roztoku a promíchaný roztok byl ponechán 30 min při pokojové teplotě. Poté byla směs zcentrifugována po dobu 15 min při 14000 rpm a teplotě 4 °C. Na dně zkumavek se tak vytvořily pelety vysrážené DNA, které byly dvakrát promyty 70% ethanolem a mezitím vždy zcentrifugovány při 14000 rpm po dobu 10 min. Nakonec byla DNA dle velikosti peletu rozpuštěna v ≈ 30 µl ultračisté vody.

K izolaci gDNA z prvních instarů housenek F1 generace byly vyzkoušeny dvě komerční soupravy – QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Německo) a NucleoSpin Tissue XS Kit (Macherey-Nagel, Düren, Německo). V obou případech byly dodrženy protokoly od výrobce. Tkáň byla nejprve homogenizována tloučkem v menším množství pufru, pak byl ke vzorku přidán zbývající objem pufru a proteináza K, směs byla zvortexována a inkubována přes noc v 56 °C. Další den byl ke vzorku přidán lyzační pufr a 100% ethanol a vzorek byl napipetován na kolonku, na níž se DNA navázala a vzorek byl zcentrifugován. Membrána s navázanou DNA byla dvakrát promyta a posléze eluována do nové zkumavky elučním puftrem. Obě soupravy se ukázaly jako účinné a pro potřeby této práce dostačující (viz obr. 13). Pro následující izolace housenek byla používána už jen souprava Macherey-Nagel z důvodu lepší cenové dostupnosti.

Koncentrace DNA a její kvalita byla změřena pomocí spektrofotometrického přístroje NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).



Obrázek 13: Výsledky různých způsobů izolace gDNA, a) čistá vyizolovaná gDNA, b) cytochrom c oxidáza I. DNA bylo izolováno: 1 – metodou CTAB z abdomenu, 2 – soupravou Macherey-Nagel z končetin dospělého, 3 – soupravou Macherey-Nagel z larvy prvního instaru, 4 – soupravou Qiagen z larvy prvního instaru. + – pozitivní kontrola, - – negativní kontrola

2.2.2 Sekvence a skládání genomu

Příprava na sekvenaci a následné skládání genomu proběhlo v Laboratoři chromozomiky Přírodovědecké fakulty Jihočeské Univerzity (PřF JU), a to RNDr. Petrem Nguyenem, Ph.D. a jeho týmem.

Příprava a sekvenace Illumina sekvenačních knihoven byla provedena firmou Novogene (HK) Co., Ltd. (Hong Kong, Čína). Genomová DNA byla náhodně fragmentována a fragmenty o velikosti 350 párů bází (bp) byly použity k přípravě knihoven pomocí soupravy NEBNext® DNA Library Prep Kit dle doporučení výrobce. Knihovny byly sekvenovány na platformě NovaSeq. Celkem bylo získáno 82,8 milionů párových čtení o délce 150 bp pro samici a 96,1 milionů párových čtení pro samce.

Pro sekvenování na platformě Oxford Nanopore byla gDNA obohacena o fragmenty delší než 10 Kbp pomocí soupravy Short Read Eliminator XS Kit (Circulomics Inc). Knihovna byla připravena pomocí soupravy SQK-LSK109 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) dle doporučení výrobce a sekvenována na průtokové komůrce R9.4.1 a platformě MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies). Báze byly z primárních dat vyvolány pomocí guppy 4.4.1. s použitím „flip-flop“ algoritmu (Oxford Nanopore Technologies).

Sekvenováním pomocí technologie Oxford Nanopore bylo získáno cca 5 Gbp dlouhých čtení (průměrná kvalita čtení 13,3, prům. délka 7545 bp), která byla použita k sestavení draftu samičího genomu. Data byla bez dalšího filtrování poskládána pomocí nástroje Flye (verze 2.8; Kolmogorov et al., 2019) s parametrem “--nano-raw” s využitím výpočetních zdrojů národní gridové infrastruktury MetaCentrum podporované projektem e-Infrastruktura CZ (e-INFRA LM2018140). Výsledná sekvence genomu obsahující oba haplotypy měla délku 822,4 Mbp a sestávala z 15330 fragmentů (statistika N50 cca 98 kbp). Kompletnost genomu byla ověřena pomocí nástroje BUSCO (verze 3.0.2; Seppey et al., 2019) s ortologním setem pro skupinu Insecta. Výsledné hodnoty BUSCO skóre, kompletních ortologů 62.8 % [unikátních 56.8 %, duplikovaných 6.0 %], fragmentovaných 16.6 % a chybějících 20.6 %, ukazují, že je genomová sekvence značně fragmentovaná a chybí v ní pětina ortologů konzervovaných u hmyzu.

2.2.3 Detekce chromozomu W

Pro detekci samičího pohlavního chromozomu W byla použita metoda genomové *in situ* hybridizace (GISH) (Mediouni et al., 2004). V té se používá fluorescenčně značená celogenomová sonda nanosená na chromozomální preparáty.

Preparáty meiotických chromozomů byly připraveny tzv. *spreading* metodou (Mediouni et al., 2004). Izolace genomové DNA pro potřeby GISH byla provedena metodou CTAB (viz výše) a tato DNA byla posléze naznačena tzv. *nick translací* fluorochromem Cy3-dUTP (Jenna Bioscience, Jenna, Německo) dle protokolu z práce Hejníčková et al. (2019). Pro tuto práci byly použity preparáty a sonda, které byly předem připraveny v Laboratoři chromozomiky PřF JU.

Před nanesením sondy byly preparáty nejprve inkubovány s RNázou A (100 µg/ml) ve 37 °C po dobu 1 hod. Poté byly 30 min blokovány v 5x Denhardtovo reagens ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Následně byly preparáty denaturovány 70% formamidem ve 2x SSC při teplotě 68 °C, a to po dobu 3,5 min a poté odvodněny částečně vychlazenou ethanolovou řadou. Hybridizační směs na každý preparát obsahovala 250 ng značené samičí sondy, samčí kompetitorovou DNA v nadbytku (3 µg) a 25 µg sonikované DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich). Kompetitorová DNA byla předem fragmentována inkubací v 99 °C po dobu 20 min. Do hybridizační směsi byl přidán 3M octan sodný a vychlazený 100% ethanol v objemu 2,5násobek směsi. Roztok byl zcentrifugován po dobu 20 min při 14000 rpm a 4 °C. Vysrážená DNA byla promyta 70% ethanolom a znovu zcentrifugována po dobu 10 min při 14000 rpm. Po odpipetování ethanolu a mírném oschnutí peletu při pokojové teplotě byla sonda rozpuštěna

v 50% deionizovaném formamidu a 10% dextran sulfátu ve 2x SSC při 37 °C po dobu cca 35 min. Poté byla směs denaturována 5 min při 90 °C, a pak ihned zchlazena vložím na led.

Na každý chromozomální preparát byla nanášena hybridizační směs v objemu 10 µl a preparát byl následně překryt krycím sklem a přetřen kaučukovým lepidlem Fixogum Rubber Cement (Marabu GmbH, Tamm, Německo). Následně byly preparáty 3 dny hybridizovány při 37 °C. Poté bylo lepidlo odstraněno a preparáty byly ponořeny do 1% tritonu X-100 v 0,1x SSC. Následovalo promytí 1% tritonem X-100 v 0,1x SSC o teplotě 62 °C po dobu 5 min a poté 1% Ilfotolem (ILFORD Imaging Europe GmbH, Bergisch Gladbach, Německo) po dobu 2 min. Po mírném oschnutí preparátů na ně bylo napipetováno fluorescenční barvivo chromatinu DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) rozpuštěné v činidle proti vyhasínání fluorescence DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan) v koncentraci 0,5 µg/ml. Preparát byl překryt novým krycím sklem, které bylo zafixováno lakem na nehty. Chromozomy s navázanou sondou byly nafoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Německo) a fotografie následně upraveny v programu Adobe Photoshop Elements 2020.

2.2.4 Detekce bakterie rodu *Wolbachia*

Na přítomnost *Wolbachia* sp. ve vzorcích byly pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) screenovány všechny samice, které během chovu měly potomky. Byla tedy namíchána PCR reakce o finálním objemu 10 µl/vzorek, která kromě 1 µl templátu (5–10 ng/µl DNA) obsahovala 2 µl 5x OneTaq Quick-Load Buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 0,8 µl 2,5 mM dNTPs, 0,05 µl OneTaq Quick-Load DNA Polymerase (New England Biolabs), 5,35 µl H₂O a po 0,2 µl forward a reverse primerů v duplexu. Amplifikovány byly dva geny: *Wolbachia surface protein* gen (*wsp*) (Braig et al., 1998) a bakteriální gen účastnící se buněčného cyklu *Filamenting temperature-sensitive mutant Z* (*ftsZ*) (Werren & Jaenike, 1995). Pro amplifikaci těchto genů byly použity primery: pro *wsp* gen F: 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3' a R: 5'-AAAAATTAAACGCTACTCCA-3'; pro *ftsZ* gen F: 5'-GTTGTCGCAAATACCGATGC-3' a R: 5'-CTTAAGTAAGCTGGTATATC-3'.

V termocykleru probíhala reakce následovně: nejprve proběhla počáteční denaturace při 94 °C po dobu tří minut, poté se 30x opakovala denaturace při stejné teplotě po dobu 30 sekund, nasedání primerů při 52 °C po dobu 30 sekund a syntéza po dobu jedné minuty při 68 °C. Reakce byla zakončena syntézou při 68 °C po dobu 5 min.

Pro zobrazení amplifikovaných produktů na gelu bylo napipetováno 5 μ l vzorku na 1% gel a elektroforéza se nechala běžet 35 min při 135 V. Jako pozitivní i negativní kontrola přítomnosti wolbachie byly použity vzorky zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*), jako negativní kontrola kontaminace reakce byl použit vzorek, do kterého byla místo templátu přidána voda. Gel byl nabarven pomocí ethidium bromidu (1 mg/ml) a zobrazen pod UV světlem.

Pro vzorky, u kterých byly na gelu viditelné produkty, byla PCR reakce zopakována ve dvojnásobném objemu, tentokrát ovšem pouze pro *wsp* gen. 12 μ l vzorku se posléze napipetovalo na 1,5% gel a nechalo se běžet při 70 V cca 1 hod tak, aby se od sebe všechny produkty dobře odseparovaly. Z nabarveného gelu poté byly pod UV světlem vyříznuty produkty společné většině vzorků. Tyto proužky byly přečištěny pomocí soupravy Wizard SV Gel a PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) dle protokolu od výrobce s následujícími úpravami. K vyříznutému gelu se přidal roztok pro navázání na membránu, směs se zahřála a napipetovala na kolonku. Vzorky byly zcentrifugovány. Pro lepší navázání byl tento krok zopakován, kolonka byla poté dvakrát promyta a DNA eluována do elučního pufu. Koncentrace výsledného produktu byla změřena pomocí Qubit 3.0 fluorometru (Thermo Fisher Scientific).

Vzhledem k tomu, že koncentrace vzorků byla pro další postup příliš nízká, byla DNA znovu amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí (viz výše) a posléze opět přečištěna pomocí Wizard SV Gel a PCR Clean-Up System kitu. Vzorky byly znovu přeměřeny na Qubit fluorometru.

Takto připravené vzorky byly pomocí kitu pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) vloženy do vektoru prostřednictvím ligační reakce, která kromě PCR produktu obsahovala ligační pufr (5 μ l), vektor (1 μ l s konc. 50 ng/ μ l), T4 DNA ligázu (1 μ l) a vodu. Množství PCR produktu a vody se dopočítávalo dle velikosti insertu tak, aby poměr počtu molekul byl 1 díl vektoru ku 3 dílům insertu. Celkový objem reakce byl 10 μ l. Bylo postupováno dle protokolu od výrobce. Reakce byla ponechána přes noc ve 4 °C. Poté se vektor vnesl do DH5 α kmenu buněk *Escherichia coli*, a to pomocí tzv. *heatshock* metody. 50 μ l buněk s 2,5 μ l ligační reakce bylo ponecháno 30 minut na ledu, pak se vzorky vložily přesně na 90 sekund do 42 °C a ihned poté na 90 sekund zpět na led. Ke vzorkům bylo přidáno 800 μ l LB média se solí (10 g peptonu, 5 g kvasničného extraktu a 10 g NaCl na 1 l média) a následně byly inkubovány 60 min při 37 °C tak, aby proběhlo zotavení buněk.

Po vyndání z termostatu byly zkumavky zcentrifugovány po dobu 3 min na 4000 x g tak, aby se buňky usadily na dně. Ze zkumavek bylo odpipetováno 700 µl média. Buňky byly promícháním pipetou resuspendovány a zbylých 150 µl média s buňkami bylo vyseto na plotny s LB médiem, do kterého byl přidán 1,5% agar, 70 µl ampicilinu (konc. 100 µg/ml), 250µM IPTG a X-Gal s konc. 40 µg/ml. Médium s buňkami bylo rozetřeno očkovací hokejkou do sucha. Plotny byly inkubovány přes noc ve 37 °C.

Několik kolonií buněk, do kterých se dle bílého zbarvení kolonie podařilo zaklonovat požadovaný insert, bylo přeočkováno na nové plotny a inkubováno 3–6 hodin ve 37 °C. Zároveň byl proveden klontest. PCR reakce obsahovala 12,2 µl H₂O s templátem, 4 µl 5x OneTaq Quick-Load Buffer (New England Biolabs), 1,6 µl 2,5 mM dNTPs, 0,2 µl OneTaq Quick-Load DNA Polymerase (New England Biolabs), 1 µl 10µM M13 F primeru a 1 µl 10µM M13 R primeru. V termocykleru byla nastavena počáteční denaturace na 94 °C po dobu tří minut, poté se 35x opakovala denaturace při 94 °C po dobu 30 sekund, nasedání primerů při 57 °C po dobu 30 sekund a syntéza po dobu 1 min a 30 sek při 68 °C. Nakonec opět proběhla syntéza při 68 °C po dobu 5 min. 3 µl produktu bylo vizualizováno na 1,5% gelu, který běžel 35 min při 135 V.

Koloniemi, které se v klontestu prokázaly jako vhodné – tedy měly očekávanou délku produktu – bylo naočkováno 3 ml tekutého LB média s ampicilinem s konc. 100 µg/ml. Zkumavky byly třepány přes noc v 37 °C. Ráno byl obsah zkumavek zcentrifugován 1 min při 10000 x g tak, aby se na dně vytvořil pelet buněk. Médium bylo odpipetováno a plazmidy dále byly očištěny pomocí kitu NucleoSpin Plasmid DNA Purification (Macherey-Nagel, Düren, Německo), postup dle protokolu od výrobce. Buňky byly zlyzovány a DNA navázána na kolonku. Membrána kolonky poté byla dvakrát promyta a DNA eluována do elučního pufru. Koncentrace a čistota DNA byla změřena pomocí přístroje NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

5 µl každého vzorku s koncentrací cca 500 ng/µl bylo odesláno na sekvenaci Sangerovou metodou do společnosti SEQme s.r.o. (Dobříš, Česká republika). Dodané sekvence byly ořezány od vektoru a primerů pomocí programu BioEdit (verze 7.2.5; Hall, 1999) a porovnány s nukleotidovou databází (nt; NCBI Resource Coordinators, 2018) pomocí Basic Local Alignment Search Tool algoritmu (BLAST; Altschul et al., 1990).

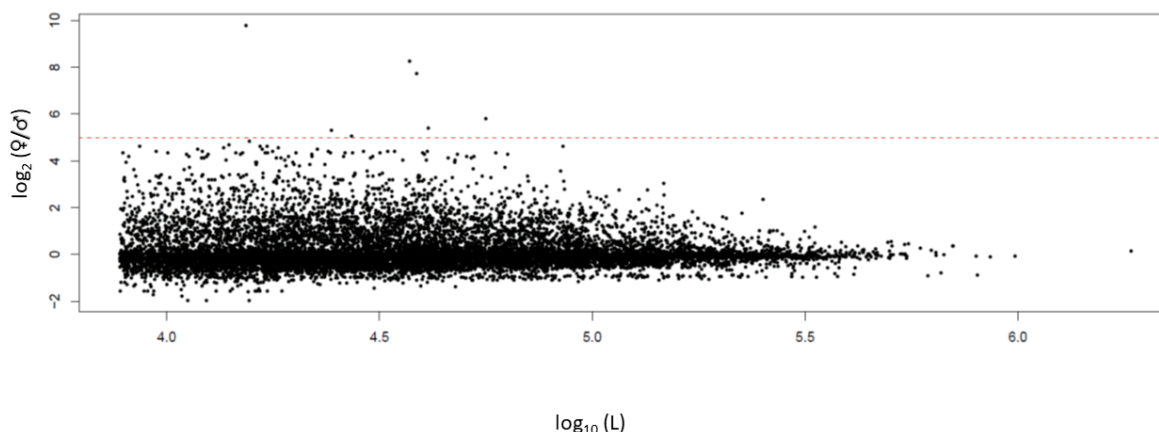
2.2.5 Určování pohlaví larev

Pro přípravu primerů k určování pohlaví prvních instarů larev *Ch. briseis* byly identifikovány kandidátní pohlavně vázané sekvence. Tento proces proběhl opět v Laboratoři chromozomiky Přírodovědecké fakulty Jihočeské Univerzity RNDr. Petrem Nguyenem, Ph.D. a jeho týmem.

K identifikaci sekvencí z chromozomu W bylo použito srovnání hloubky čtení („coverage“) a k-merů mezi samcem a samicí. Srovnání hloubky čtení bylo provedeno podle Mongue et al., (2017). Samčí a samičí Illumina čtení byla filtrována pomocí nástroje cutadapt (verze 1.15; Martin, 2011) s parametry:

```
„-j 0 -b  
GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATCACGATCTCGTATGCCGTCT  
TCTGCTTG -b  
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA  
TCT -B  
GATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCACATCACGATCTCGTATGCCGTCT  
TCTGCTTG -B  
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGA  
TCT --nextseq-trim=20 --minimum-length=100“.
```

Filtrovaná čtení byla mapována k složenému samičímu genomu pomocí bowtie2 (verze 2.2.9; Langmead & Salzberg, 2012) s parametry „--very-sensitive-local --no-discordant --no-mixed“. Hloubka čtení na bázi byla spočtena pomocí nástroje bedtools genomecov s parametrem „-d“ ze softwarového balíčku BEDTools (verze 2.25, Quinlan & Hall, 2010). Z datasetů byly pomocí bedtools subtract odstraněny repetitivní sekvence identifikované pomocí nástroje RepeatMasker (verze 4.0.7; Smit et al., 2013) a následně byla pro každé pohlaví spočtena hodnota mediánu pro každý fragment pomocí bedtools groupby. Na závěr byl pro každý fragment spočten \log_2 poměru samičího a samčího mediánu hloubky čtení [$\log_2 (\frac{\text{♀}}{\text{♂}})$]. Ten je na obr. 14 vynesena proti \log_{10} délky fragmentu. Jako kandidátní sekvence vázané na chromozom W byly vybrány fragmenty s $\log_2 (\frac{\text{♀}}{\text{♂}}) > 5$ (viz Tabulka 1).



Obrázek 14: Srovnání mediánu normalizované hloubky čtení na fragment mezi samicí a samcem *Ch. briseis*. Červená přerušovaná čára označuje hraniční hodnotu $\log_2(\frac{\text{♀}}{\text{♂}}) > 5$; L – délka fragmentu.

Srovnání k-merů mezi samcem a samicí bylo provedeno podle Carvalho & Clark (2013). K-mery dlouhé 15 b byly generovány z konkatenovaných párových čtení a filtrovány na základě kvality pomocí jellyfish count (verze 1.1.11; Marçais & Kingsford, 2011) s parametry „-m 15 -c 4 --both-strands --quality-start=33 --min-quality=20“. Dále byly s pomocí jellyfish dump odstraněny k-mery s četností < 3, tj. „--lower-count=3“. Následné porovnání samčích a samičích k-merů bylo provedeno skriptem YGS.pl (Carvalho & Clark, 2013). Pro kandidátní sekvence identifikované analýzou hloubky čtení byl zjištěn počet validovaných unikátních k-merů a procento validovaných unikátních k-merů chybějících v samčích datech (viz Tabulka 1). Na základě těchto hodnot byly pro ověření pomocí PCR vybrány tři fragmenty, jmenovitě contig_163, contig_707 a contig_6775, na které byly navrženy primery pomocí nástroje Primer3 (Untergasser et al., 2012).

Tabulka 1: Kandidátní sekvence vázané na chromozom W *Ch. briseis*

Fragment	$\log_2(\frac{\text{♀}}{\text{♂}})$	VSC_K	P_VSC_K
contig_163	5.805	2180	57,8
contig_707	5.408	2403	56,7
contig_6629	7.714	70	60,0
contig_608	8.270	35	60,0
contig_6775	5.068	1877	68,9
contig_1446	5.291	0	-
contig_4603	9.792	61	59,0

VSC_K – validované unikátní k-mery; P_VSC_K - % validovaných unikátních k-merů chybějících v samčích datech; tučně zvýrazněny fragmenty byly dále ověřované pomocí PCR.

Všechny nově navržené primery byly následně vyzkoušeny vždy nejprve na čtyřech vzorcích DNA: z jedné české samice, jedné rakouské samice, jednoho českého samce a jednoho rakouského samce. Byla namíchána 10 μ l PCR reakce, která obsahovala 5,75 μ l H₂O, 2 μ l 5x OneTaq Quick-Load Buffer (New England Biolabs), 0,8 μ l 2,5 mM dNTPs, 0,05 μ l OneTaq Quick-Load DNA Polymerase (New England Biolabs), 0,2 μ l forward primeru, 0,2 μ l reverse primeru a 1 μ l templátu. Termocykler byl nastaven na 3 min na 94 °C pro počáteční denaturaci, a pak se 35x opakoval cyklus 30 sek 94 °C pro denaturaci, 30 sek 60 °C pro nasedání primerů a 45 sek 68 °C pro syntézu. Závěrečná syntéza trvala 5 min při 68 °C. Amplifikované produkty byly v množství 7,5 μ l naložovány na 1% gel a puštěny při 135 V na 40 min. Gel byl obarven ethidium bromidem a zobrazen pod UV světlem.

Pro ty dvojice primerů, u kterých výsledky prvotních testů naznačovaly rozdíl mezi pohlavími, byla reakce zopakována. Byla vyzkoušena optimalizace teploty nasedání primerů, prostřednictvím gradientu teplot od 56 do 64 °C, v rozestupech po 1 nebo 2 °C. Následně byly primery testovány na širším vzorku jedinců. Pro kontrolu správného nasedání také byly vybrané produkty vyřezány z gelu, naklonovány a poslány na sekvenaci Sangerovou metodou (pro postup viz kap 2.2.4). Dodané sekvence byly následně v programu Geneious (verze R11; <https://www.geneious.com/>) srovnány s nukleotidovou databází a sekvencemi z osekvenovaného genomu okáče skalního.

2.3 SROVNÁNÍ POPULAČNÍCH DAT

Během chovu byla zaznamenávána tato data: denní počet nakladených vajíček, denní počet vylíhnutých housenek, doba života, doba kladení, průběh kladení, průběh líhnutí housenek, počet dní od nakladení vajíček po vylíhnutí housenek.

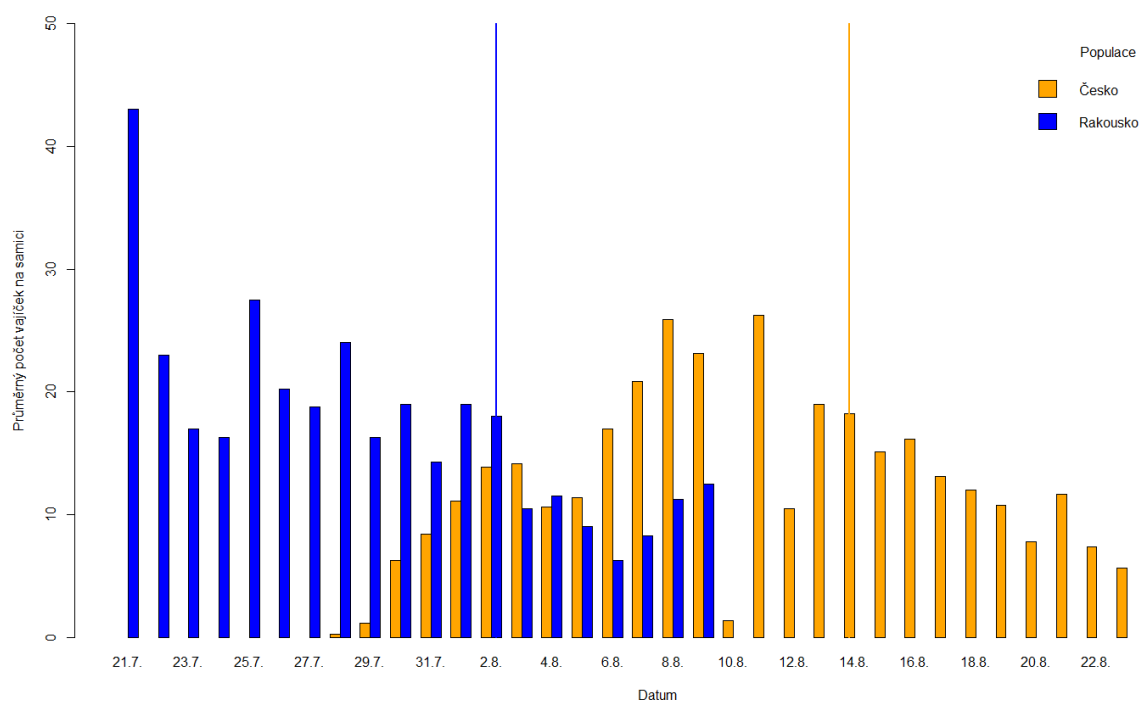
Data byla zpracována v programu RStudio (verze 1.4.1717, RStudio Team, 2019). Pro porovnání populací mezi sebou byla použita analýza variance (ANOVA). Vzhledem k malému počtu pozorování byly statistické testy použity pouze pro větší soubory jedinců. Pro porovnání mediánů byl použit Mood's median test.

3 VÝSLEDKY

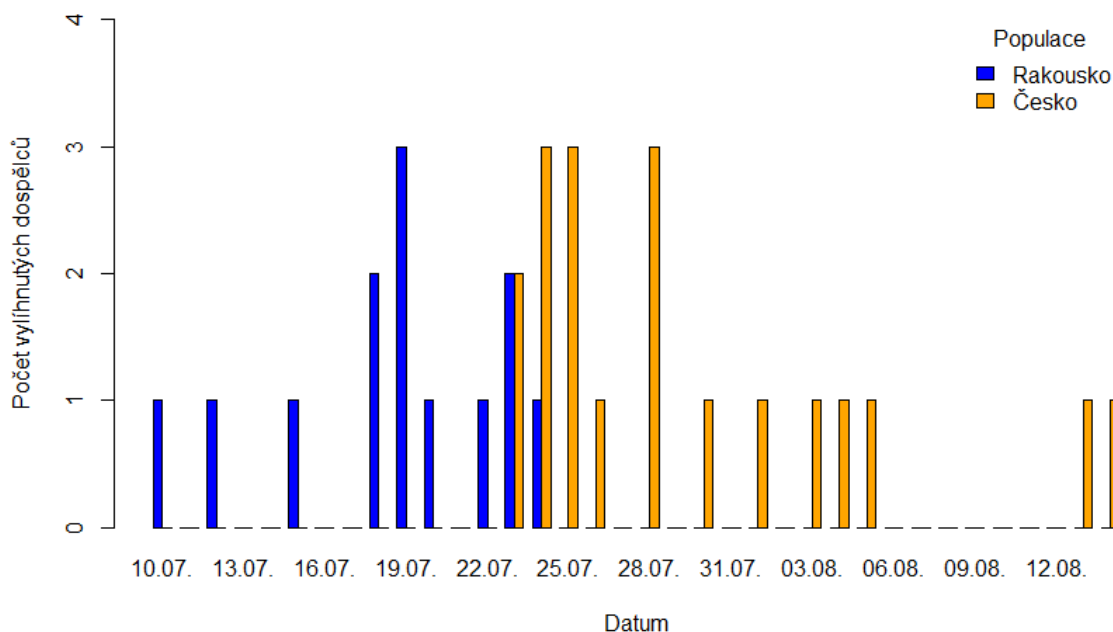
3.1 REPRODUKČNÍ PARAMETRY POPULACÍ

Ne všechny samice se podařilo úspěšně spářit. V roce 2018 kladly oplozená vajíčka 4 samice z rakouské populace a 5 samic z české populace. Jedna z oplozených rakouských samic uhynula předčasně vlivem zranění sosáku. V roce 2019 byla oplozena pouze 1 rakouská samice a 3 české. V roce 2020 se housenky líhly od 8 neléčených a 7 léčených samic.

V roce 2018 začaly první samice klást vajíčka 21. 7., poslední kladení pak proběhlo 6. 9. V roce 2019 kladení probíhalo od 23. 7. do 16. 9. V obou letech byl patrný fenologický posun mezi jednotlivými populacemi – rakouská populace začínala klást přibližně o týden dříve než populace česká (Mood's median test, $p < 0,001$, $X^2_{1df} = 29,64$, viz obr. 15 a Přílohu 2). Tento posun byl dán dřívějším líhnutím dospělců rakouské populace (viz obr. 16). V roce 2020 probíhalo kladení českou populací od 28. 7. do 23. 9. Mezi léčenými a neléčenými jedinci v tomto ohledu nebyl patrný výrazný rozdíl.



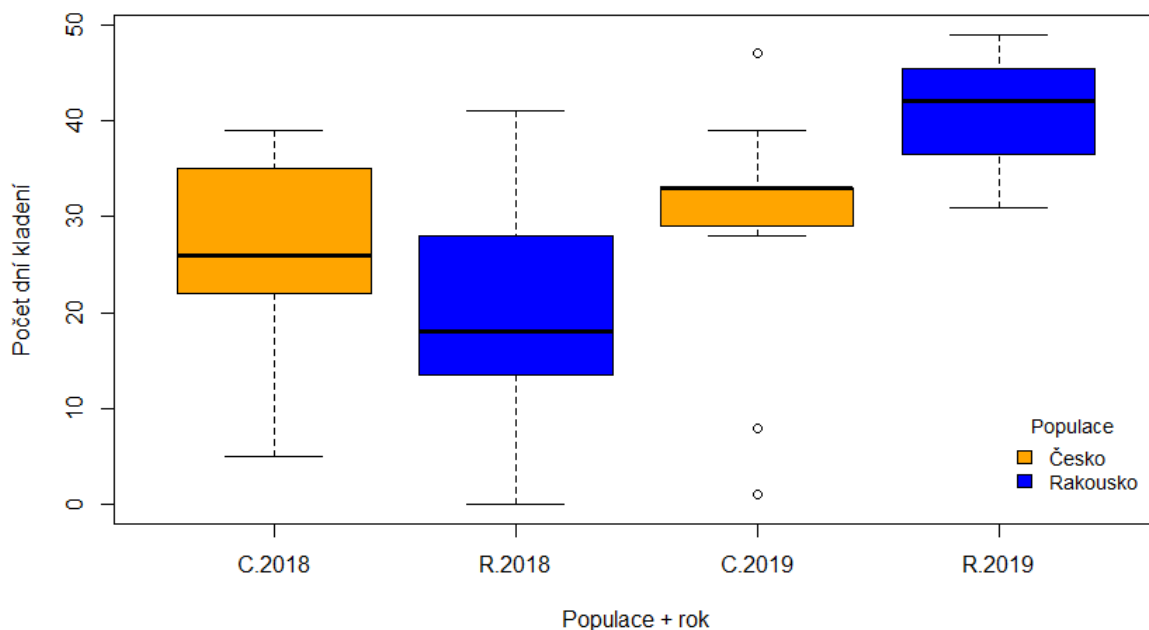
Obrázek 15: Průměrný počet nakladených vajíček oplozenou samicí za den v průběhu sezóny. Svislé čáry značí medián pro každou populaci.



Obrázek 16: Lihnutí dospělců během sezóny 2019.

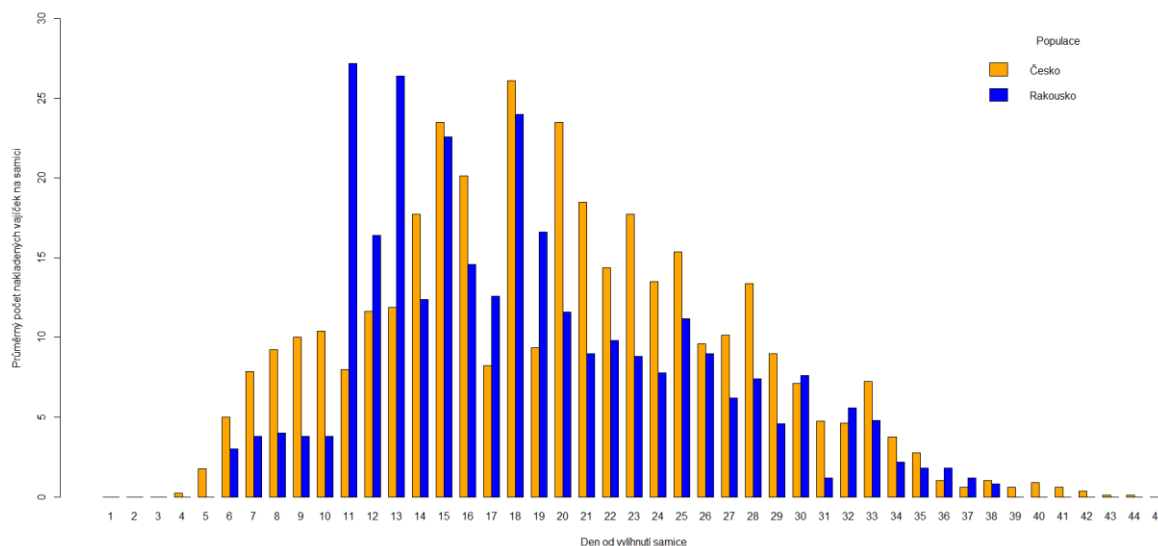
Nejdelší pozorovaná doba dožití jedinců okáče skalního byla 93 dní. Průměrná doba života pro rakouskou populaci za oba roky dosahovala $41,7 (\pm 19,2)$ dní ($n = 15$), pro českou populaci pak $44,1 (\pm 19,0)$ dní ($n = 22$). Jedinci z obou populací se dožívali stejné doby (ANOVA, $p = 0,72$, $F = 0,13$). Při srovnání dat z roku 2020 byla průměrná doba života pro neléčené jedince $45,1 (\pm 17,9)$ dní ($n = 10$), pro léčenou část populace $56,1 (\pm 11,6)$ dní ($n = 10$). Doba života se pro léčené a neléčené jedince nelišila (ANOVA, $p = 0,12$, $F = 2,65$).

Vajíčka kladly i ty samice, které nebyly úspěšně spářeny. Nejdelší doba od začátku do konce kladení jedné samice byla 57 dní; pokud jsou započítány jen oplozené samice, pak je to 53 dní. Průměr pro rakouskou populaci za rok 2018 a 2019 byl $24,1 (\pm 14,4)$ dní při započítání všech samic ($n = 15$) a $25,8 (\pm 6,7)$ dní při započítání pouze oplozených samic ($n = 4$). Pro českou populaci tento průměr činil $27,7 (\pm 11,8)$ dní pro všechny samice ($n = 22$) a $30,9 (\pm 5,5)$ dní pro oplozené samice ($n = 8$). Doba kladení se mezi populacemi nelišila (ANOVA, $p = 0,40$, $F = 0,74$), signifikantní vliv na dobu kladení neměla ani daná sezóna (ANOVA, $p = 0,09$, $F = 3,12$; obr. 17). U neléčených jedinců z roku 2020 byla průměrná délka kladení $35,0 (\pm 15,1)$ dní pro všechny ($n = 10$) a $33,1 (\pm 14,6)$ pro oplozené samice ($n = 8$). Pro léčené jedince se jedná o $34,3 (\pm 10,1)$ dní u všech ($n = 10$) a $35,4 (\pm 8,9)$ u oplozených samic ($n = 7$). Doba kladení byla pro všechny jedince stejná (ANOVA, $p = 0,91$, $F = 0,01$).



Obrázek 17: Doba kladení všech samic obou populací v sezónách 2018 a 2019.

Doba od vylíhnutí dospělé samice po začátek kladení se pohybovala od 3 do 13 dnů. Při srovnání rakouské a české populace mezi nimi nebyl patrný výrazný rozdíl (Mood's median test, $p = 1$, $X^2_{1df} < 0,001$; viz. obr. 18).

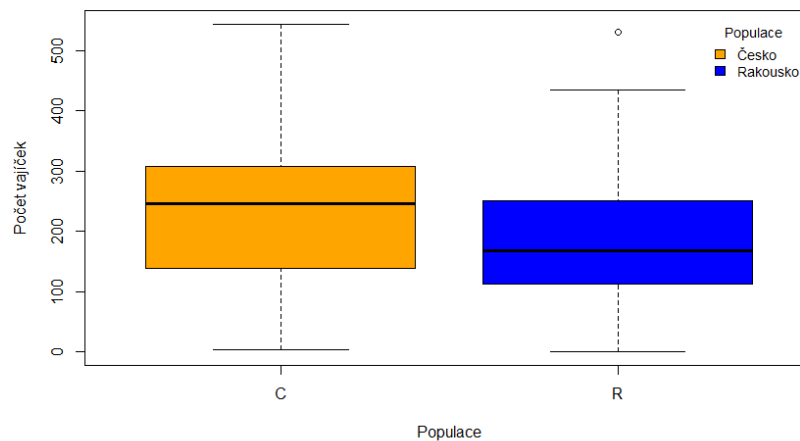


Obrázek 18: Preovipoziční doba oplozených samic obou populací v obou sezónách.

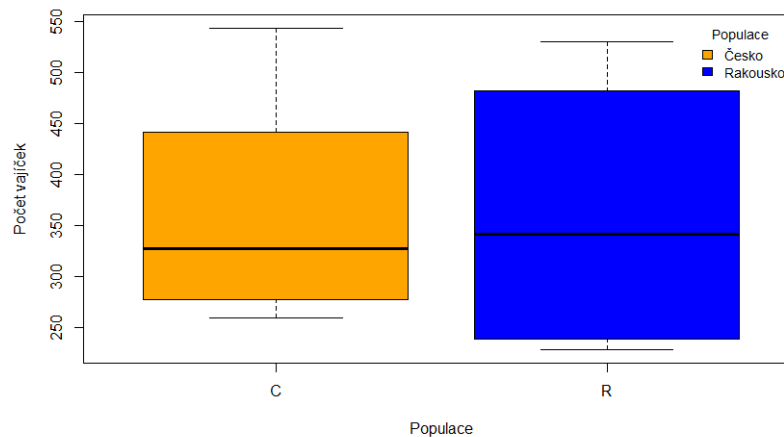
Maximální počet vajíček nakladený jednou samicí během jednoho dne byl 77. Průměrně jedna rakouská samice za den nakladla 5,3 (0–77) vajíček, jedna česká 6,0 (0–45) vajíček. Při započítání pouze těch samic, které kladly oplozená vajíčka, jsou čísla 11,0 (0–77) pro rakouské

($n = 4$) a 9,7 (0–45) pro české ($n = 8$) samice. Pro rok 2020 byl průměrný počet vajíček na neléčenou samici a den 10,0 (0–75, $n = 8$), na léčenou samici 7,8 (0–53, $n = 7$). Nejvíce vajíček samice kladly týden až dva po začátku kladení, poté jejich produkce začala postupně klesat. Poslední přibližně týden před koncem kladení již každá samice nekladla denně více, než 5 vajíček (viz obr. 18).

Maximální počet nakladených vajíček jednou samicí činil 716 kusů. Při srovnání české a rakouské populace za roky 2018 a 2019 činil průměrný počet vajíček nakladených jednou samicí za oba roky z rakouské populace 203,8 ($\pm 152,0$) ($n = 15$), u české populace byl průměr 237,0 ($\pm 137,7$) vajíček ($n = 22$). Počty nakladených vajíček se mezi populacemi tedy neliší (ANOVA, $p = 0,49$, $F = 0,49$, viz obr. 19). V těchto číslech jsou však započítány i samice, které nekladly dobře. Při srovnání pouze těch samic, od kterých byli potomci, jsou průměry nakladených vajíček na samici následující: 360,3 ($\pm 146,2$) pro rakouskou populaci ($n = 4$) a 361,9 ($\pm 102,8$) pro českou populaci ($n = 8$) (obr. 20).

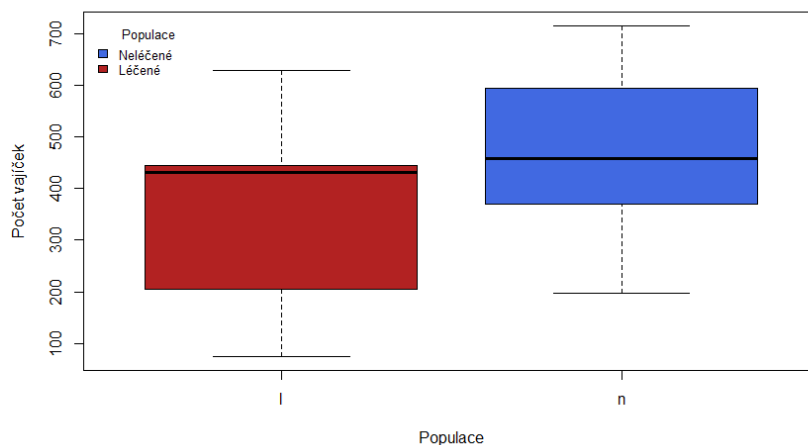


Obrázek 19: Celkový počet nakladených vajíček pro všechny samice.



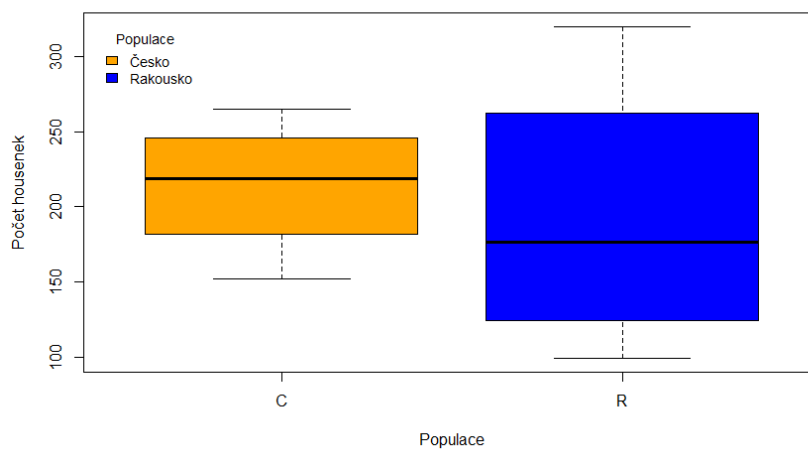
Obrázek 20: Celkový počet nakladených vajíček pro oplozené samice.

Za rok 2020 byl průměrný počet vajíček na samici 454,7 ($\pm 173,7$) pro neléčené ($n = 10$) a 356,3 ($\pm 174,1$) pro léčené jedince ($n = 10$). Při započítání pouze oplozených samic se průměry posunou na 439,3 ($\pm 189,0$) pro neléčené ($n = 8$) a 371,6 ($\pm 171,4$) pro léčenou část populace ($n = 7$). Mezi léčenými a neléčenými jedinci se počty nakladených vajíček nelišily (ANOVA, $p = 0,22$, $F = 1,60$, obr. 21).

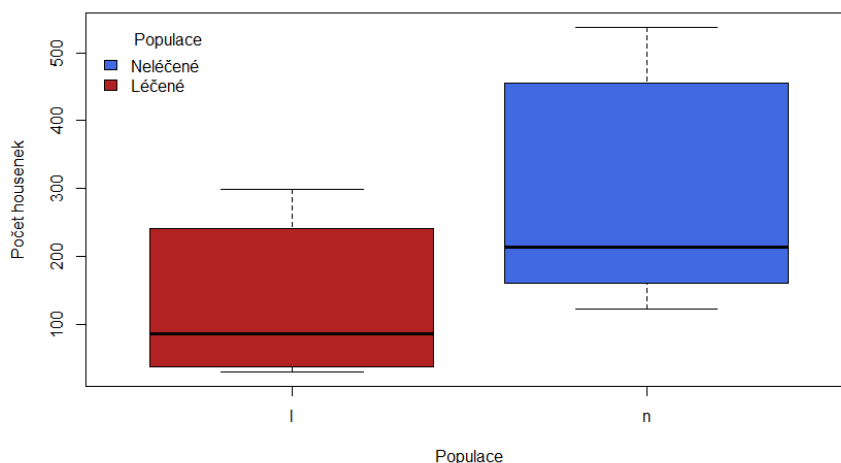


Obrázek 21: Celkový počet nakladených vajíček pro všechny léčené a neléčené samice v sezóně 2020.

Maximální celkový počet vylíhnutých housenek od jedné samice činil 538 jedinců. Průměr na jednu oplozenou samici za roky 2018 a 2019 byl 193,0 ($\pm 94,9$) pro Rakousko ($n = 4$) a 213,6 ($\pm 39,1$) pro Česko ($n = 8$) (obr. 22). V roce 2020 byl průměr vylíhnutých housenek na samici pro neléčenou část populace 289,6 ($\pm 165,9$) ($n = 8$), pro léčenou část populace to bylo 138,0 ($\pm 117,0$) ($n = 7$). Od jedinců, kteří nebyli léčení, se líhlo signifikantně více housenek, než od léčené části samic (ANOVA, $p = 0,03$, $F = 5,62$; obr. 23).



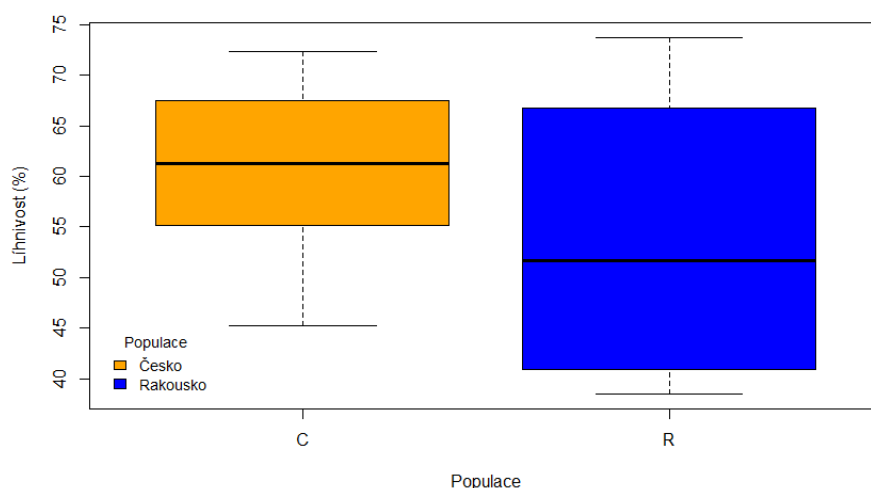
Obrázek 22: Celkový počet vylíhnutých housenek pro rakouskou a českou populaci.



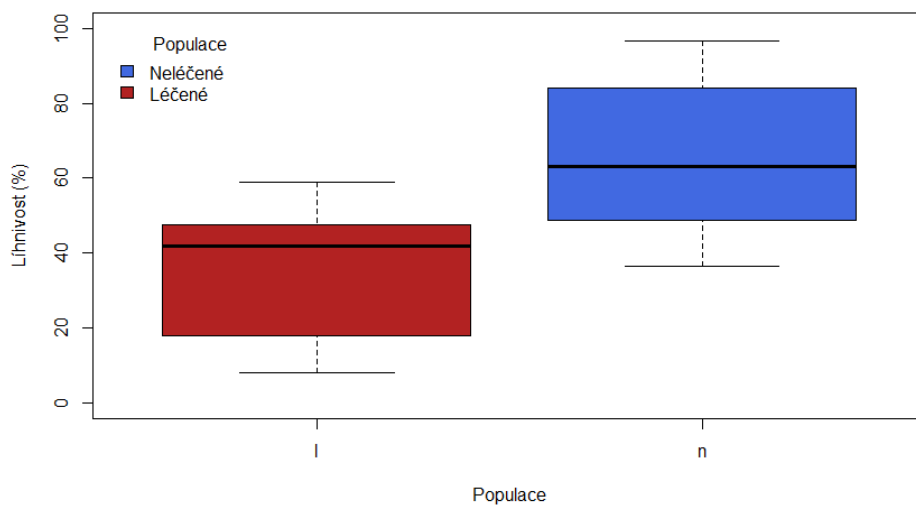
Obrázek 23: Celkový počet vylíhnutých housenek v sezóně 2020 po léčenou a neléčenou část populace.

Maximální počet vylíhnutých housenek od jedné samice za jeden den byl 49. Průměrný počet vylíhnutých housenek na samici a den u rakouské populace činil 5,65 (0–43) housenek ($n = 4$), u české populace byl tento průměr téměř stejný: 5,62 (0–30) housenek ($n = 8$). Pro neléčené jedince z roku 2020 7,28 (0–49) housenek ($n = 8$), pro léčené 2,88 (0–35) housenek ($n = 7$).

Celková líhivost daných populací byla za roky 2018 a 2019 pro rakouskou populaci 53,87 % ($n = 4$), pro českou 60,67 % ($n = 8$) (obr. 24). Neléčená část jedinců měla v roce 2020 líhivost 65,63 % ($n = 8$), léčená část jedinců pak 34,35 % ($n = 7$). Léčení jedinci měli signifikantně nižší líhivost než jedinci neléčení (ANOVA, $p = 0,01$, $F = 8,83$; viz obr. 25).

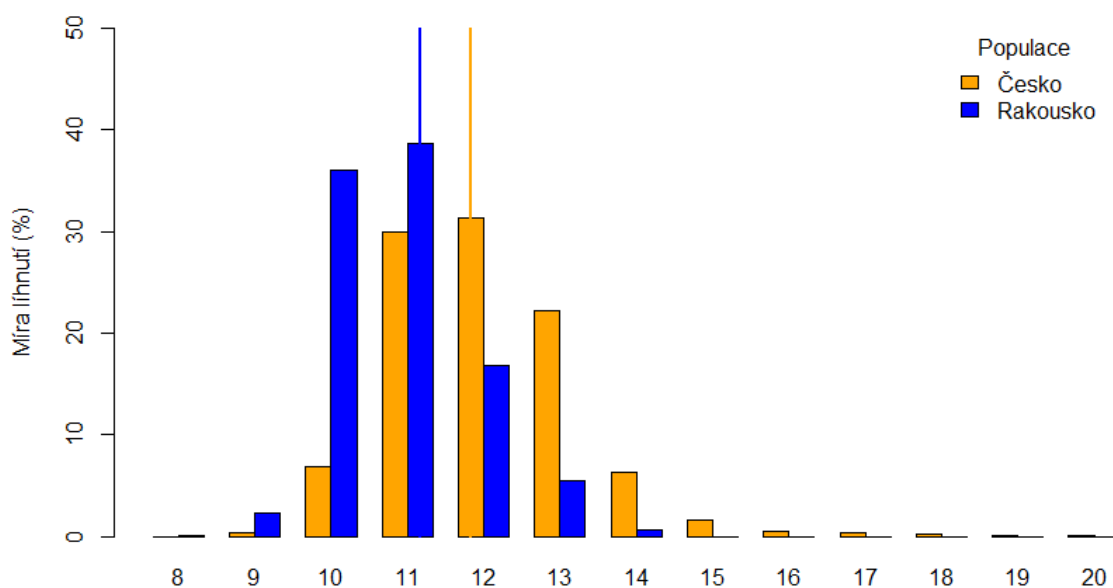


Obrázek 24: Líhivost housenek pro českou a rakouskou populaci.



Obrázek 25: Líhivost housenek léčené a neléčené části populace.

Housenky se líhly 8–20 dní po dni naklazení, ovšem naprostá většina líhnutí probíhala 10.–13. den po naklazení. Největší podíl housenek od rakouských samic se líhl 11. den od naklazení ($n = 5$), od českých samic 12. den od naklazení ($n = 8$, Mood's median test, $p < 0,001$, $X^2_{1df} = 29,89$). Housenky od českých samic se líhly po větší množství dnů, než housenky samic rakouských (obr. 26).



Obrázek 26: Líhnutí housenek české a rakouské populace v čase. Svislé čáry značí medián pro každou populaci.

Shrnutí reprodukčních dat je v Tabulce č. 2, podrobná data je pak možné nalézt v Příloze 1.

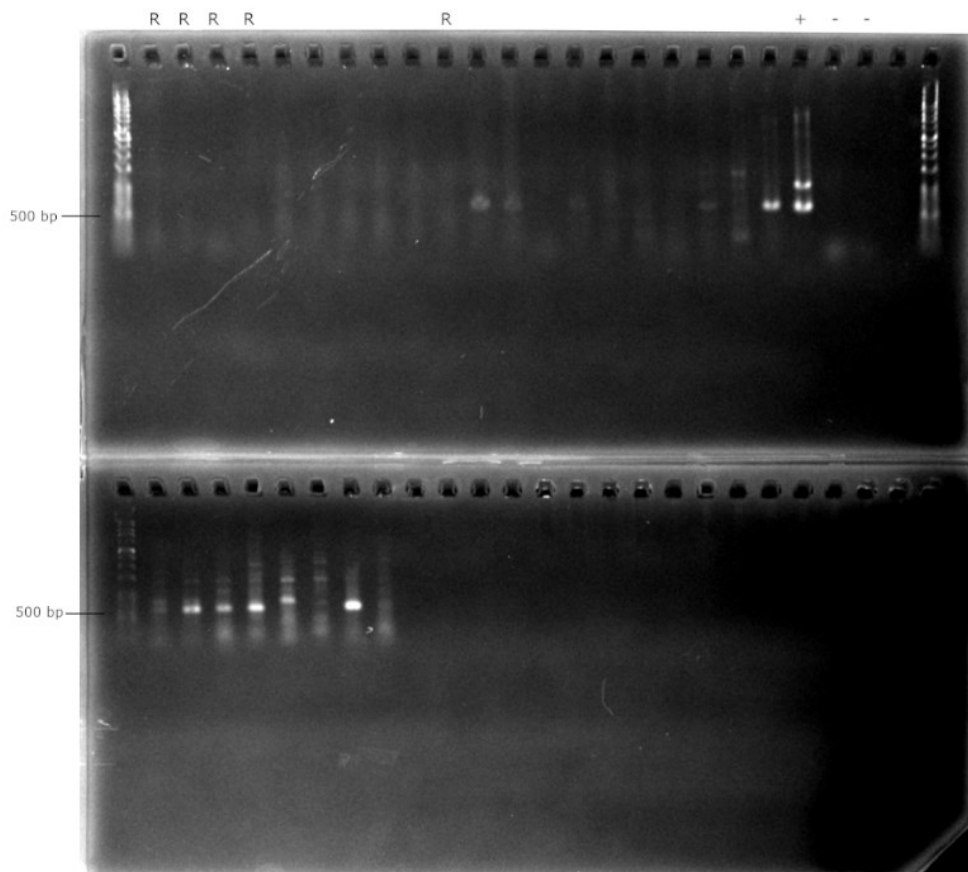
Tabulka 2: Shrnutí reprodukčních dat z chovu okáče skalního.

	Rakousko	Česko
Doba života (dny)	41,7 (± 19,2)	44,1 (± 19,0)
Doba kladení (dny)	25,8 (± 6,7)	30,9 (± 5,5)
Celkový počet vajíček	360,3 (± 146,2)	361,9 (± 102,8)
Celkový počet housenek	193,0 (± 94,9)	213,6 (± 39,1)
Líhivost (%)	53,87	60,67
	Neléčení	Léčení
Doba života (dny)	45,1 (± 17,9)	56,1 (± 11,6)
Doba kladení (dny)	33,1 (± 14,6)	35,4 (± 8,9)
Celkový počet vajíček	439,3 (± 189,0)	371,6 (± 171,4)
Celkový počet housenek	289,6 (± 165,9)	138,0 (± 117,0)
Líhivost (%)	65,63	34,35

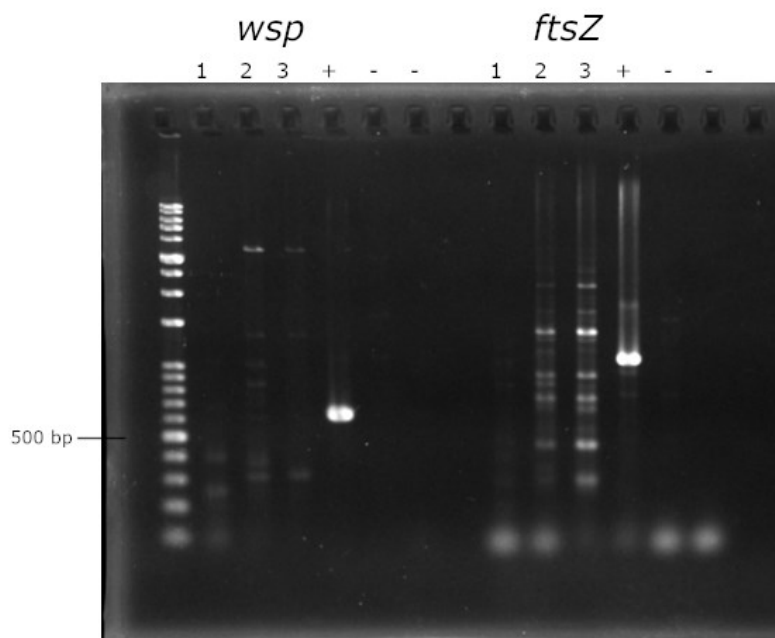
3.2 DETEKCE WOLBACHIE

V prvotním screeningu všech samic u některých vzorků české populace byly amplifikované produkty, které délkou zhruba odpovídaly délce očekávané pro *wsp* gen (viz obr. 27). Stejně tomu bylo i v původním testování okáče skalního na wolbachii, na jehož výsledcích byla založena původní teze pro tuto práci (Faltýnek Fric, nepublikovaná data). Poté, co byly některé ze vzorků puštěny na gel znovu, pomaleji a zvláště jak pro gen *wsp*, tak i *ftsZ*, se však ukázalo, že primery se vážou na více míst a výsledné produkty jsou o ≈ 200 bp kratší, nebo naopak delší (obr. 28).

V původním testování okáče skalního produkty na sekvenaci zaslané nebyly (Faltýnek Fric, os. kom.). Po srovnání dodaných sekvencí vzorků z této práce s databází se ukázalo, že amplifikované produkty nejsou *wsp* gen wolbachie, ale odpovídají LINE RTE repetitivním sekvencím přítomných v genomu různých druhů motýlů čeledi Nymphalidae (pro konkrétní sekvence viz Přílohu 3).



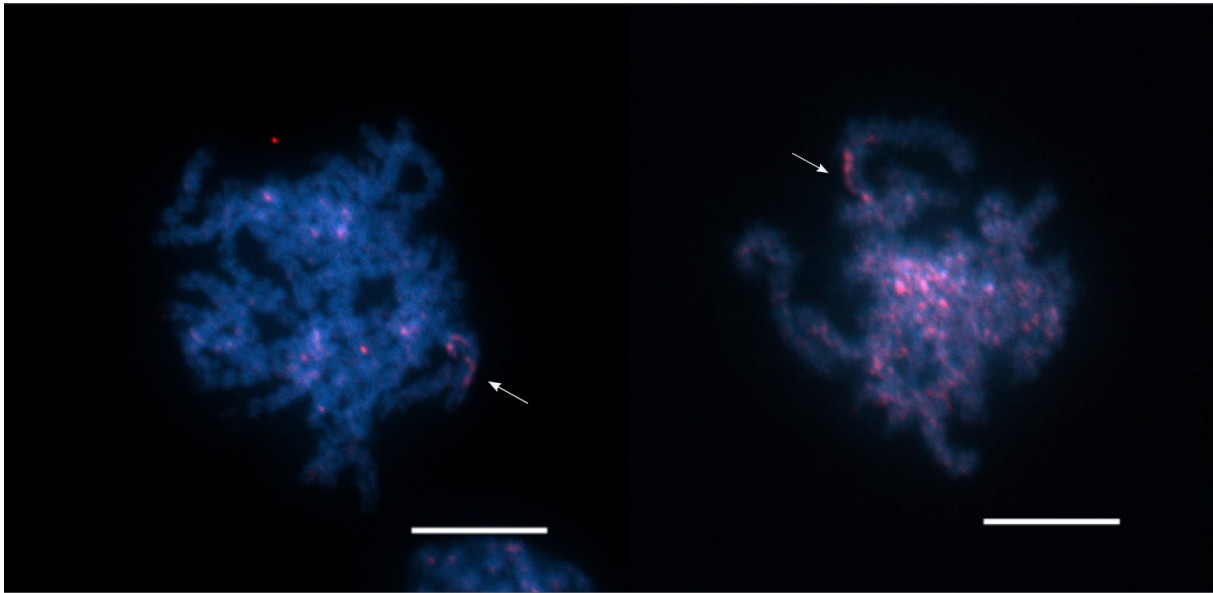
Obrázek 27: První výsledky screeningu samic na wolbachii, použity primery pro geny *wsp* a *ftsZ*. Rakouské samice jsou označeny písmenem R. + – pozitivní kontrola, - - negativní kontroly



Obrázek 28: Amplifikované produkty různých samic okáče skalního (1–3) při použití primerů pro gen *wsp* a *ftsZ*. + – pozitivní kontrola, - - negativní kontroly

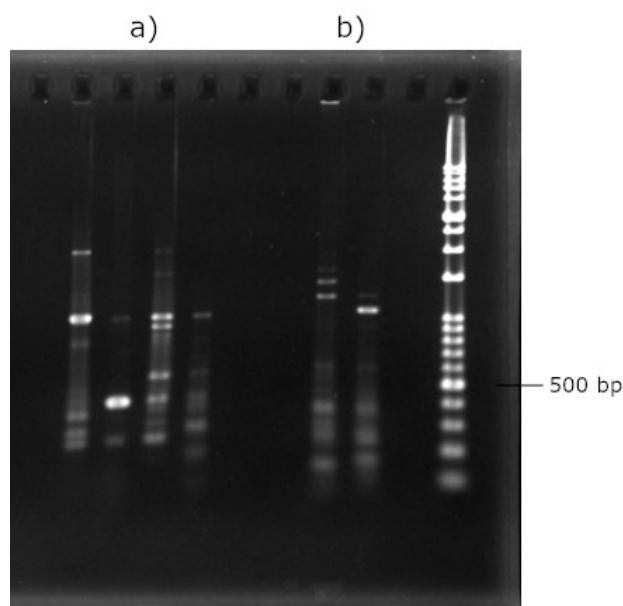
3.3 DETEKCE CHROMOZOMU W A URČOVÁNÍ POHLAVÍ LAREV

Chromozom W byl u samice okáče skalního detekován, navázaná sonda zde byla dobře viditelná (obr. 29).



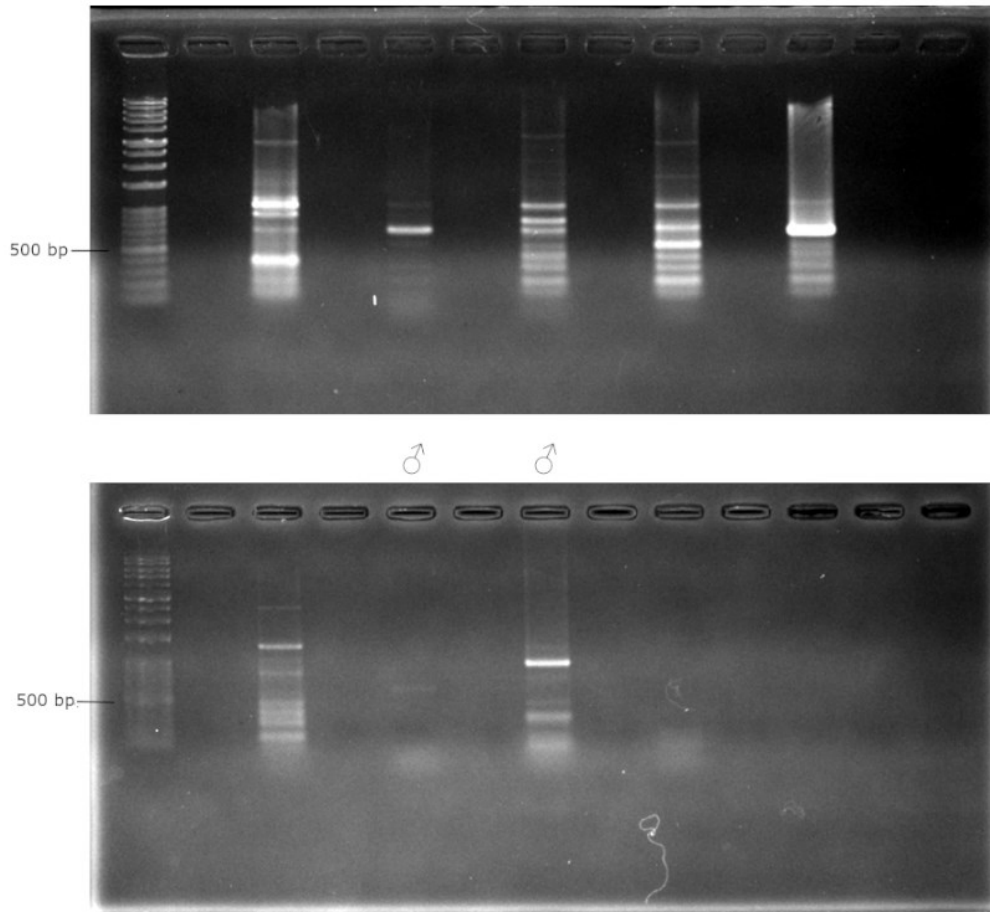
Obrázek 29: Chromozomy okáče skalního ve fázi pachytene s navázanou sondou na chromozomu W (označeno šipkou). Měřítko 10 μm .

I přesto, že bylo navrženo a vyzkoušeno velké množství (22) párů primerů, ani jeden z nich nebyl pro určování pohlaví spolehlivý. V prvních pokusech se primery vázaly na DNA všech jedinců (obr. 30b). Některé z primerů pak amplifikovaly jiné produkty v závislosti na dané populaci, ovšem ne rozdíl mezi pohlavími (obr. 30a). Po navržení nových primerů a jejich optimalizaci se produkty amplifikovaly u všech samic, ale stále i u některých samců (obr. 31).



Obrázek 30: Amplifikované produkty při použití různých primerů určených k sexingu larev, v pořadí a) český samec, rakouský samec, česká samice, rakouská samice, negativní kontrola; b) český samec, rakouská samice, negativní kontrola.

Po srovnání osekvenovaných produktů s genomem okáče skalního bylo zjištěno, že se tyto primery vážou nejen na požadovanou část W chromozomu, ale i na satelitní sekvence v jiných místech genomu.



Obrázek 31: Amplifikované produkty při použití posledních navržených primerů k sexingu larev. Samci jsou označeni symbolem ♂.

4 DISKUZE

4.1 REPRODUKČNÍ CHARAKTERISTIKY A CHOV OKÁČE SKALNÍHO

Chov okáče skalního se podařilo zvládnout a bylo tak možné pozorovat rozdíly mezi jednotlivými populacemi a odchovat jedince do dalších let. Chov nicméně provázelo mnoho problémů. Ukázalo se totiž, že tento druh motýla je poměrně náročný na důkladnou péči a žádnou z fází chovu není možné podcenit (viz kap. 2.1.2). K úspěšnému rozmnožení většiny jedinců tak byla potřeba určitá praxe – v roce 2020 již chov fungoval lépe než v předchozích dvou letech. Vzhledem k časové náročnosti navíc nebylo technicky možné pokusit se do chovu zařadit více jedinců. Všechny tyto problémy ovlivnily množství sesbíraných dat. Proto nebylo možné provést rozsáhlejší statistické analýzy, neboť síla testu by při tomto množství pozorování nebyla dostatečná. I přes to jsou některé zásadní jevy z tohoto odchovu zřetelně patrné.

Česká a rakouská populace, respektive poddruhy či formy *bataia* a *pannonica*, se mezi sebou liší hlavně ve fenologickém posunu líhnutí dospělců, a tedy i jejich následném začátku kladení v průběhu sezóny. Rakouští jedinci se začínají líhnout o cca týden až 14 dní dříve než jedinci z české populace a tento rozdíl je pak zřejmý i v začátku kladení. Výsledky také naznačují, že česká populace má o něco delší dobu kladení, statisticky však tento rozdíl nebyl prokázán a pro potvrzení tohoto závěru by bylo potřeba více dat. Stejná je situace i co se týče doby od naklazení vajíček po líhnutí housenek – forma *bataia* ji má opět o něco delší, nicméně tento výsledek také nelze spolehlivě doložit. V parametrech, jako jsou doba života, počty naklazených vajíček a počty vylíhnutých housenek, nebyl mezi populacemi patrný rozdíl.

Maximální doba dožití jedince byla 93 dní. To je o 32 dní více, než byla maximální doba života zaznamenána v dřívějších pracích (Baranovská & Moravec, 2020; Kadlec et al., 2010). Nicméně je třeba poznamenat, že v přírodních podmínkách by se vzhledem k opotřebovanosti křídel takovéto doby žádný jedinec dožít pravděpodobně nemohl. Nejnižší doba dožití bez zjevné příčiny úhynu pak byla 11 dní, což odpovídá dřívějším pozorováním (Kadlec et al., 2010). Průměrná doba dožití v chovu se pak pohybovala okolo 40 dní, což je více, než bylo dříve pozorováno v chovu okáče skalního ve Španělsku (García-Barros, 2000). Tam se chované samice dožívaly 21–42 dnů.

Při srovnání doby kladení se stejným španělským chovem byla tato doba v chovu této práce opět delší: 25,8 a 30,9 dní pro rakouské a české samice oproti 14,7 dnům pro španělské samice okáče skalního (García-Barros, 2000). Naopak průměrný počet vajíček na samici a den byl u španělské populace vyšší a čísla méně varíovala (García-Barros, 2000). Otázkou zůstává, zda

jsou tyto rozdíly dány rozdíly v technice chovu motýla, nebo se jedná o ekologický rozdíl mezi jednotlivými formami druhu. V záchranném chovu okáče skalního M. Andrese se denní počet vajíček na samici pohybuje také o něco výše – odhadem 20–50 vajíček za den, poté nastává snižování počtu ke konci sezóny (Andres, 2018). To může být způsobeno tím, že v tomto chovu jsou samice do chovného zařízení umisťovány obden, druhý den jsou vždy ponechávány v klidu, v chladu a tmě. Po zavedení tohoto opatření bylo pozorováno zlepšení kondice samic a rovnoměrnější kladení (Andres, os. kom.).

Motýli formy *pannonica* se začali líhnout začátkem července, formy *bataia* v půlce července, a kladení probíhalo až do poloviny září. Tato data odpovídají dřívějším pozorováním (Kadlec et al., 2009, 2010; Seufert & Grosser, 1996), zároveň se shodují s průběhem záchranného chovu okáče skalního v daných letech (Andres et al., 2019, 2020).

Celkový počet nakladených vajíček (≈ 350) jednou samicí byl u všech populací, a to včetně populace chované ve Španělsku, podobný (García-Barros, 2000). V záchranném chovu okáče skalního Miloše Andrese byl pak celkový počet nakladených vajíček jednou samicí vyšší, a to 400–500 kusů (Sucháčková Bartoňová et al., 2021a). To je pravděpodobně dáno lepším zvládnutím chovu, počty nakladených vajíček byly vyšší i v poslední sezóně chovu této práce.

U okáče skalního, stejně jako u jiných druhů velkých okáčů, byla pozorována dlouhá preovipoziční doba, a to jak v přírodě (Kadlec et al., 2010), tak i v chovu (García-Barros, 2000). Kadlec et al. (2010) odhadovali preovipoziční dobu na 12–27 dní, tomu odpovídají i pozorování García-Barros (2000), kde tato doba trvala 12–30 dní. V chovu této práce se však toto chování neprojevilo, některé samice začínaly klást oplozená vajíčka již 4 dny po vylíhnutí, nejdéle bylo kladení vajíček pozorováno 13 dní po vylíhnutí samice. Údaje ze záchranného chovu jsou podobné – Andres (2018) uvádí, že samice se páří čtvrtý den po vylíhnutí, dalších pět dní po spáření začínají klást. Zajímavé také je, že bylo možné pozorovat určitý rozdíl mezi sezónami. V roce 2019 preovipoziční doba ani v jednom případě nepřesáhla 10 dní (viz Příloha 1). To bylo pravděpodobně dáno tím, že v prvním roce chovu byly samice před jeho začátkem delší dobu uchovávané v chladu a tmě. Zda je krátká preovipoziční doba v chovu dána například tím, že v umělém prostředí je stálý přísun nektaru a jedná se tedy o plastickou behaviorální reakci na současné podmínky prostředí, nebo se tento druh přizpůsobil na vlhčí klima střední Evropy, by bylo záhodno ověřit dalším výzkumem ve volné přírodě.

Líhivost byla poměrně nízká, průměrně 53,9 % pro rakouskou a 60,7 % pro českou populaci. To bylo způsobeno pravděpodobně dvěma faktory. Jedním z důvodů byla zmiňovaná predace

vajíček – vysátí vajíčka pavouky nebylo na první pohled patrné, a i napadená vajíčka byla do celkové sumy započítávána. Nelze vyloučit ani poškození vajíček při jejich sběru. Vajíčka jsou na stébla nebo tyl přilepena, a při neopatrné manipulaci se vajíčko může poškodit vznikem podtlaku a mikroprasklinami. Přesto je v líhivosti jednotlivých samic určitá variabilita (viz Příloha 1), kterou se nepodařilo vysvětlit – všechna vajíčka byla skladována ve stejných podmínkách. Pozdější spáření samic, kdy by samice nejprve kladly pouze neoplozená vajíčka a to zpětně zapříčinilo bias ve výpočtu líhivosti, však v prvních dvou letech roli nejspíš nehrálo, neboť se housenky líhly většinou již z prvních nakladených vajíček.

Líhnutí housenek probíhalo hlavně 10.–13. den od naklazení vajíček. Velmi zřídka se housenky však líhly už 8., nebo naopak až 20. den po naklazení. Je otázka, zda takto vybočující záznamy nebyly způsobeny chybou při sčítání jedinců (přehlédnutím nakladeného vajíčka v krabici nebo přehlédnutím již vylíhnuté housenky). V každém případě se jedná o zlomky procent, hlavní část líhnutí 10.–13. den je však kratší doba inkubace, než tomu bylo u záchranného chovu, kde se tato doba pohybovala mezi 13 a 15 dnem (Andres, 2018). Je možné, že tento rozdíl je zapříčiněn teplotou, i v rámci daného chovu se inkubační doba snižovala se zvyšující se teplotou (Andres, 2018). To by odpovídalo i klasické koncepci sumy efektivních teplot v ontogenetickém vývoji hmyzu (Ratte, 1985).

Při analýze všech dat vyvstala otázka, které samice do datového souboru zahrnout – zda všechny, včetně těch, které např. nekladly dobře, nebo pouze některé, u nichž se zdálo, že reprodukční chování probíhá normálně. Místo arbitrárního výběru pouze dobře kladoucích samic byly zvoleny dvě varianty – jednak zahrnutí kompletně všech jedinců, a poté tatáž analýza pouze těch samic, od kterých bylo potomstvo. Při srovnání těchto dvou postupů se ukázalo, že to výsledky příliš neovlivnilo. Například průměr nakladených vajíček byl pouze pro oplozené samice vyšší, nicméně rozdíly mezi jednotlivými populacemi zůstaly v zásadě stejné. Naopak bylo patrné, že je ve všech sledovaných parametrech často velká variabilita na úrovni jednotlivých samic, jež nebyla vysvětlena žádným z kontrolovaných faktorů.

Chov pro tuto práci byl realizován v Kamenném Újezdě v okrese Rokycany, kde panují studenější a vlhčí podmínky, než je tomu na původních stanovištích obou populací. To by však pro výsledky této práce nemělo hrát roli, protože obě dvě populace byly chovány vůči sobě ve stejných podmínkách, v prostředí fóliovníku bylo sucho a teplo, a navíc v letech 2018 a 2019 panovalo na celém území ČR horké a suché léto.

Pro další výzkum reprodukčních charakteristik okáče skalního a rozdílů mezi jeho jednotlivými formami je nutné počítat s tím, že chov tohoto druhu je poměrně časově i technicky náročný. Zároveň výsledky z chovu nemusí plně odpovídat situaci v přírodě, a tak by veškerá data bylo třeba dále porovnat s pozorováními z terénu.

4.2 WOLBACHIE U OKÁČE SKALNÍHO

Bylo prokázáno, že wolbachie se u jedinců okáče skalního z chovu nevyskytovala. Produkty, které se u jedinců české populace amplifikovaly při použití primerů pro *wsp* gen wolbachie, jsou repetitivní sekvence genomu tohoto motýla. Je možné tedy potvrdit výsledky předchozích prací (Ilinsky & Kosterin, 2017; Sucháčková Bartoňová et al., 2021a), které wolbachii u okáče skalního také neobjevily. Z toho vyplývá, že předběžné výsledky začínajících výzkumů mohou být zcela mylné a je potřeba je důkladně ověřovat před vyvozováním závěrů. Vzhledem k tomu, že wolbachie tedy nijak neovlivňuje reprodukční chování ani poměr pohlaví střeoevropských populací okáče skalního, není v tomto případě v ochranářské praxi nutné se tohoto faktoru obávat.

Přesto, že wolbachie nemohla reprodukční charakteristiky jedinců v chovu nijak ovlivňovat, měl pokus o léčení jedinců antibiotiky signifikantní vliv na celkový počet a líhivost housenek. Nižší byl i počet nakladených vajíček, ačkoliv ten nebyl statisticky průkazný. Je proto pravděpodobné, že antibiotika oslabila dané jedince a ti poté měli problémy s reprodukcí. To mohlo být způsobeno buď odstraněním jiných endosymbiontů, nebo snížením příjmu potravy během podávání antibiotik (Dale & Welburn, 2001; Srivastava & Auclair, 1976). Vliv byl ovšem i tak individuální, někteří jedinci se s antibiotiky vyrovnali lépe a housenky se od nich líhly po celou dobu kladení, od jiných jedinců se pak housenky začaly líhnout až později, anebo sice celou dobu, ale velmi málo (viz Příloha 1).

Pokusy o určování pohlaví prvních instarů housenek nebyly úspěšné. Ačkoliv přítomnost W chromozomu zde byla potvrzena a mělo by tak být možné nalézt sekvenci unikátní pouze pro samice, chromozom W u motýlů obsahuje mnoho repetitivních sekvencí a často prochází fúzí s autozomy, takže je složité nějakou unikátní sekvenci nalézt (Sahara et al., 2012; Traut et al., 2008). Cíl určovat pohlaví housenek byl do práce zahrnut na základě podezření infekce wolbachii – vzhledem k tomu, že wolbachie u okáče skalního potvrzena nebyla, pravděpodobnost, že poměr pohlaví housenek je vychýlen, značně klesá.

V záchranném chovu okáče skalního však přesto bylo ze začátku pozorováno vyšší množství samic, poté se poměr pohlaví vyrovnal (Andres, os. kom.). Pokud tomu tak opravdu bylo, je

možné, že to bylo způsobeno inbrední depresí, která může mít na jedince jednoho pohlaví větší vliv než na jedince pohlaví opačného. Tak je tomu například u druhu *Bicyclus anynana*, kde vlivem variability genu určujícího pohlaví na chromozomu Z inbrední homozygotní samci hynou během embryonálního vývoje (Van 't Hof, os. kom.). Tato práce již položila základ pro případné budoucí pokusy o určování pohlaví housenek okáče skalního. Pokud by tedy bylo potřeba v budoucnu na tomto základu stavět, bylo by pravděpodobně nutné osekvenovat ještě alespoň jednu nebo dvě další samice, neboť mezi jedinci existuje i vnitrodruhová variabilita, kterou nebylo snadné odlišit od rozdílů mezi pohlavími. Další možností je také pohlaví určovat pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) a sledovat množství daného markeru na chromozomu Z – tato varianta v práci nebyla použita z důvodu větší finanční náročnosti. Zda vychýlení poměru pohlaví způsobuje inbreeding, nebo případně jiný druh endosymbionta než je wolbachie, však už nebylo otázkou, která by byla součástí této práce, a proto byly snahy o determinaci pohlaví vzhledem k problémům s nalezením vhodného markeru ukončeny před jeho úspěšným vymezením.

5 ZÁVĚR

V této práci se v umělém chovu podařilo rozmnožit jedince okáče skalního a popsat jeho reprodukční charakteristiky. Podrobná znalost těchto základních parametrů je důležitá pro plánování ochranných aktivit od propočtů velikosti životaschopných populací, přes provádění reintrodukčních pokusů až po plánování managementu. Česká a rakouská populace, tedy formy *bataia* a *pannonica*, jsou si geneticky poměrně příbuzné a v mnoha směrech, jako je doba života, průběh kladení a celkové počty nakladených vajíček, jsou si velmi podobné. Možná infekce wolbachii české populace byla vyvrácena, jednotlivé formy se tedy mezi sebou neliší ani v tomto ohledu. Přesto je mezi nimi znatelný rozdíl ve fenologii – dospělci formy *pannonica* se líhnou dříve a také dříve začínají klást vajíčka. Načasování letu imag a reprodukce může mít pro jednotlivé populace obývající různé ekologické podmínky adaptivní význam. Tato práce také významně pokročila v metodice určování pohlaví tohoto druhu genetickou cestou, byť další kroky bude ještě potřeba doladit. Zvládnutí této metody může mít důležité implikace pro poznání evoluční ekologie nejen tohoto konkrétního druhu motýla.

Okáč skalní je v současné době v České republice důležitým druhem pro ochranu přírody, protože snahy o jeho záchranu přispívají k celkové biologické rozmanitosti ekosystémů, jako jsou suché stepi a jiné krátkostébelné trávníky. Vzhledem k tomu, že okáč skalní byl, a stále do jisté míry je, na našem území na pokraji vymření, byl jeho chov a následné reintrodukce jedinou možností, jak tento druh a jeho českou formu zachránit. Je možné, ba dokonce pravděpodobné, že se v podobné situaci tento a jiné druhy motýlů budou nacházet na různých místech znovu. Výsledky této práce ukazují, s jakými problémy se pokusy o navrácení druhů na opuštěná stanoviště mohou potýkat a na co si dát pozor – jaké překážky mohou vyvstat během záchranných chovů, a jak dopodrobna je potřeba porovnat mezi sebou původní a potenciální zdrojovou populaci před tím, než dojde k finálnímu rozhodnutí o transferu jedinců.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- Ahmed, M. Z., Araujo-Jnr, E. V., Welch, J. J., & Kawahara, A. Y. (2015). *Wolbachia* in butterflies and moths: Geographic structure in infection frequency. *Frontiers in Zoology*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12983-015-0107-z>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andres, M. (2018). *Problematika chovu okáče skalního (Chazara briseis)*. Nепublikovaná práce.
- Andres, M., Kopecký, V., & Moravec, P. (2019). *Zpráva o realizaci Regionálního akčního plánu pro okáče skalního (Chazara briseis) v roce 2019*. <https://www.zachranneprogramy.cz/regionalni-akcni-plany/okac-skalni-chko-ceske-stredohori/>
- Andres, M., Skala, P., Kopecký, V., & Moravec, P. (2020). *Zpráva o realizaci Regionálního akčního plánu pro okáče skalního (Chazara briseis) v roce 2020*. <https://www.zachranneprogramy.cz/regionalni-akcni-plany/okac-skalni-chko-ceske-stredohori/>
- Armstrong, D. P., & Seddon, P. J. (2008). Directions in reintroduction biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 23(1), 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.10.003>
- Bandi, C., Anderson, T. J. C., Genchi, C., & Blaxter, M. L. (1998). Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 265(1413), 2407–2413. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0591>
- Baranovská, E., & Moravec, P. (2020). Ochrana a reintrodukce okáče skalního v lounské části Českého středohoří. *Ochrana přírody*, 3.
- Beneš, J., & Konvička, M. (2017). Hesperoidea a Papilionoidea (denní motýli). In R. Hejda, J. Farkač, & K. Chobot (Ed.), *Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Bezobratlí*. (s. 206–210). Agentura ochrany přírody a krajiny ČR.
- Beneš, J., Konvička, M., Dvořák, J., Fric, Z., Havelda, Z., Pavlíčko, A., Vrabec, V., & Weidenhoffer, Z. (2002). *Motýli České republiky: Rozšíření a ochrana II* (J. Beneš & M. Konvička (ed.)). SOM.
- Blau, W. S. (1981). Life history variation in the black swallowtail butterfly. *Oecologia*, 48(1), 116–122. <https://doi.org/10.1007/BF00346997>
- Bouchon, D., Rigaud, T., & Juchault, P. (2009). Evidence for Widespread *Wolbachia* Infection in Isopod Crustaceans: Molecular Identification and Host Feminization. *Proceedings: Biological Sciences*, 265(1401), 1081–1090.
- Braig, H. R., Zhou, W., Dobson, S. L., & O'Neill, S. L. (1998). Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Journal of Bacteriology*, 180(9), 2373–2378. <https://doi.org/10.1128/jb.180.9.2373-2378.1998>
- Brownlie, J. C., & Johnson, K. N. (2009). Symbiont-mediated protection in insect hosts.

- Trends in Microbiology*, 17(8), 348–354. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.05.005>
- Carvalho, A. B., & Clark, A. G. (2013). Efficient identification of Y chromosome sequences in the human and *Drosophila* genomes. *Genome Research*, 23(11), 1894–1907. <https://doi.org/10.1101/gr.156034.113>
- Charlat, S., Davies, N., Roderick, G. K., & Hurst, G. D. D. (2007). Disrupting the timing of *Wolbachia*-induced male-killing. *Biology Letters*, 3(2), 154–156. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0584>
- Charlat, S., Hurst, G. D. D., & Merçot, H. (2003). Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. *Trends in Genetics*, 19(4), 217–223. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00024-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00024-6)
- Čížek, L., Beneš, J., & Konvička, M. (2019). Úbytek hmyzu: Špatně zdokumentovaná katastrofa? *Živa*, 5, 247–250.
- Cremene, C., Groza, G., Rakosy, L., Schileyko, A. A., Baur, A., Erhardt, A., & Baur, B. (2005). Alterations of steppe-like grasslands in Eastern Europe: A threat to regional biodiversity hotspots. *Conservation Biology*, 19(5), 1606–1618. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00084.x>
- Dale, C., & Welburn, S. C. (2001). The endosymbionts of tsetse flies: Manipulating host-parasite interactions. *International Journal for Parasitology*, 31(5–6), 628–631. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00151-5)
- Dincă, V., Bálint, Z., Vodă, R., Dapporto, L., Hebert, P. D. N., & Vila, R. (2018). Use of genetic, climatic, and microbiological data to inform reintroduction of a regionally extinct butterfly. *Conservation Biology*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1111/cobi.13111>
- Dolek, M., & Geyer, A. (2002). Conserving biodiversity on Calcareous grasslands in the Franconian Jura by Grazing: A comprehensive approach. *Biological Conservation*, 104(3), 351–360. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(01\)00200-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(01)00200-2)
- Duffey, E. (1977). *The Re-establishment of the Large Copper Butterfly Lycaena Dispar Batava Obth. on Woodwalton Fen National Nature Reserve, Cambridgeshire, England, 1969-73*. 12, 143–158.
- Duploux, A., Ikonen, S., & Hanski, I. (2013). Life history of the Glanville fritillary butterfly in fragmented versus continuous landscapes. *Ecology and Evolution*, 3(16), 5141–5156. <https://doi.org/10.1002/ece3.885>
- Dyson, E. A., & Hurst, G. D. D. (2004). Persistence of an extreme sex-ratio bias in a natural population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), 6520–6523. <https://doi.org/10.1073/pnas.0304068101>
- Ewen, J. G., Armstrong, D. P., Parker, K. A., & Seddon, P. J. (2012). Reintroduction Biology: Integrating Science and Management. In *Reintroduction Biology: Integrating Science and Management*. <https://doi.org/10.1002/9781444355833>
- Fagan, W. F., Meir, E., Prendergast, J., Folarin, A., & Karieva, P. (2001). Characterizing population vulnerability for 758 species. *Ecology Letters*, 4(2), 132–138. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00206.x>

- García-Barros, E. (2000). Comparative data on the adult biology, ecology and behaviour of species belonging to the genera *Hipparchia*, *Chazara* and *Kanetisa* in central Spain (Nymphalidae: Satyrinae). *Nota Lepidopterologica*, 23(2), 119–140.
- García-Barros, E. (1988). Delayed ovarian maturation in the butterfly *Hipparchia semele* as a possible response to summer drought. *Ecological Entomology*, 13(4), 391–398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1988.tb00371.x>
- Gaston, K. J., & Fuller, R. A. (2007). Biodiversity and extinction: Losing the common and the widespread. *Progress in Physical Geography*, 31(2), 213–225. <https://doi.org/10.1177/0309133307076488>
- Gotthard, K., Nylin, S., & Wiklund, C. (1994). Adaptive variation in growth rate: life history costs and consequences in the speckled wood butterfly, *Pararge aegeria*. *Oecologia*, 99(3–4), 281–289. <https://doi.org/10.1007/BF00627740>
- Habel, J. C., & Schmitt, T. (2012). The burden of genetic diversity. *Biological Conservation*, 147(1), 270–274. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.11.028>
- Habel, J. C., & Schmitt, T. (2018). Vanishing of the common species: Empty habitats and the role of genetic diversity. *Biological Conservation*, 218(January), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.12.018>
- Hall, T. A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT* (7.2.5; s. 95–98).
- Hejníčková, M., Koutecký, P., Potocký, P., Provazníková, I., Voleníková, A., Dalíková, M., Visser, S., Marec, F., & Zrzavá, M. (2019). Absence of W Chromosome in Psychidae Moths and Implications for the Theory of Sex Chromosome Evolution in Lepidoptera. In *Genes* 10(12):1016. <https://doi.org/10.3390/genes10121016>
- Hernández-Roldán, J. L., Dapporto, L., Dincă, V., Vicente, J. C., Hornett, E. A., Šíchová, J., Lukhtanov, V. A., Talavera, G., & Vila, R. (2016). Integrative analyses unveil speciation linked to host plant shift in *Spialia* butterflies. *Molecular Ecology*, 25(17), 4267–4284. <https://doi.org/10.1111/mec.13756>
- Hertig, M., & Wolbach, S. B. (1924). On rickettsia-like micro-organisms in insects. *The Journal of Medical Research*, 44(3).
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., & Werren, J. H. (2008). How many species are infected with *Wolbachia*? - A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*, 281(2), 215–220. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x>
- Hiroki, M., Ishii, Y., & Kato, Y. (2005). Variation in the prevalence of cytoplasmic incompatibility-inducing *Wolbachia* in the butterfly *Eurema hecabe* across the Japanese archipelago. *Evolutionary Ecology Research*, 7(6), 931–942.
- Hiroki, M., Kato, Y., Kamito, T., & Miura, K. (2002). Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). *Naturwissenschaften*, 89(4), 167–170. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0303-5>
- Hiroki, M., Tagami, Y., Miura, K., & Kato, Y. (2004). Multiple infection with *Wolbachia* inducing different reproductive manipulations in the butterfly *Eurema hecabe*.

- Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1549), 1751–1755.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2769>
- Hornett, E. A., Duploux, A. M. R., Davies, N., Roderick, G. K., Wedell, N., Hurst, G. D. D., & Charlat, S. (2008). You can't keep a good parasite down: Evolution of a male-killer suppressor uncovers cytoplasmic incompatibility. *Evolution*, 62(5), 1258–1263.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00353.x>
- Hrabák, R., & Povolný, D. (1996). Interesting Butterflies of the Czech Republic. *Holarctic Lepidoptera*, 3(1), 1–6.
- Hurst, G. D. D., Jiggins, F. M., Schulenburg, J. H. G. Von Der, Bertrand, D., West, S. A., Goriacheva, I. I., Zakharov, I. A., Werren, J. H., Stouthamer, R., & Majerus, M. E. N. (1999). Male-Killing *Wolbachia* in Two Species of Insect. *Proceedings: Biological Sciences*, 266(1420), 735–740.
- Ilinsky, Y., & Kosterin, O. E. (2017). Molecular diversity of *Wolbachia* in Lepidoptera: Prevalent allelic content and high recombination of MLST genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109, 164–179.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.12.034>
- IUCN/SSC. (2013). IUCN guidelines for reintroductions and other conservation translocations. In *Ecological Applications* (Roč. 20, Číslo 7).
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.07.030>
- Jiggins, F. M., Bentley, J. K., Majerus, M. E. N., & Hurst, G. D. D. (2001). How many species are infected with *Wolbachia*? Cryptic sex ratio distorters revealed to be common by intensive sampling. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1472), 1123–1126. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1632>
- Jiggins, F. M., Hurst, G. D. D., Dolman, C. E., & Majerus, M. E. N. (2000a). High-prevalence male-killing *Wolbachia* in the butterfly *Acraea encedana*. *Journal of Evolutionary Biology*, 13(3), 495–501. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00180.x>
- Jiggins, F. M., Hurst, G. D. D., & Majerus, M. E. N. (1998). Sex ratio distortion in *Acraea encedon* (Lepidoptera: Nymphalidae) is caused by a male-killing bacterium. *Heredity*, 81(1), 87–91. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00357.x>
- Jiggins, F. M., Hurst, G. D. D., & Majerus, M. E. N. (2000b). Sex-ratio-distorting *Wolbachia* causes sex-role reversal in its butterfly host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1438), 69–73. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.0968>
- Johannesen, J., Schwing, U., Seufert, W., Seitz, A., & Veith, M. (1997). Analysis of gene flow and habitat patch network for *Chazara briseis* (Lepidoptera: Satyridae) in an agricultural landscape. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(5), 419–427.
[https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(97\)00026-4](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(97)00026-4)
- John, V., Andres, M., Skala, P., & Číp, D. (2018). *Regionální akční plán pro okáče skalního (Chazara briseis)*. <https://www.zachranneprogramy.cz/regionalni-akcni-plany/okac-skalni-chko-ceske-stredohori/>
- John, V., Beneš, J., Číp, D., Andres, M., & Konvička, M. (2020). Ochrana motýlů v době klimatické. *Ochrana přírody*, 3.

- Joron, M., & Brakefield, P. M. (2003). Captivity masks inbreeding effects on male mating success in butterflies. *Nature*, 424(6945), 191–194. <https://doi.org/10.1038/nature01713>
- Kadlec, T., Benes, J., Jarosik, V., & Konvicka, M. (2008). Revisiting urban refuges: Changes of butterfly and burnet fauna in Prague reserves over three decades. *Landscape and Urban Planning*, 85(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2007.07.007>
- Kadlec, T., Vrba, P., Kepka, P., Schmitt, T., & Konvicka, M. (2010). Tracking the decline of the once-common butterfly: Delayed oviposition, demography and population genetics in the hermit *Chazara briseis*. *Animal Conservation*, 13(2), 172–183. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2009.00318.x>
- Kadlec, T., Vrba, P., & Konvička, M. (2009). Microhabitat requirements of caterpillars of the critically endangered butterfly *Chazara briseis* (L.) (Nymphalidae, Satyrinae) in the Czech Republic. *Nota Lepidopterologica*, 32(1), 39–46.
- Kageyama, D., Hoshizaki, S., & Ishikawa, Y. (1998). Female-biased sex ratio in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*: Evidence for the occurrence of feminizing bacteria in an insect. *Heredity*, 81(3), 311–316. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6883910>
- Kageyama, D., Nishimura, G., Hoshizaki, S., & Ishikawa, Y. (2002). Feminizing *Wolbachia* in an insect, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Heredity*, 444–449. <https://doi.org/10.1038/sj/hdy/6800077>
- Kageyama, D., Nishimura, G., Hoshizaki, S., & Ishikawa, Y. (2003). Two kinds of sex ratio distorters in a moth, *Ostrinia scapularis*. *Genome*, 46(6), 974–982. <https://doi.org/10.1139/g03-083>
- Kageyama, D., & Traut, W. (2004). Opposite sex-specific effects of *Wolbachia* and interference with the sex determination of its host *Ostrinia scapularis*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1536), 251–258. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2604>
- Kaur, R., Shropshire, J. D., Cross, K. L., Leigh, B., Mansueto, A. J., Stewart, V., Bordenstein, S. R., & Bordenstein, S. R. (2021). Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia*: A centennial review. *Cell Host & Microbe*, 29(6), 879–893. <https://doi.org/10.20944/preprints202103.0338.v1>
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, 37(5), 540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>
- Konvička, M., Beneš, J., & Fric, Z. (2010). *Ochrana denních motýlů v České republice - Analýza stavu a dlouhodobá strategie*. <http://www.lepidoptera.cz/publikace/ochrana-dennich-motylu-v-ceske-republice-analyza-stavu-a-dlouhodobost-strategie>
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Lefoulon, E., Clark, T., Borveto, F., Perriat-Sanguinet, M., Moulia, C., Slatko, B. E., & Gavotte, L. (2020). Pseudoscorpion *Wolbachia* symbionts: Diversity and evidence for a new supergroup S. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01863-y>

- Lewis, O. T., & Senior, M. J. M. (2011). Assessing conservation status and trends for the world's butterflies: the Sampled Red List Index approach. *Journal of Insect Conservation*, *15*(1), 121–128. <https://doi.org/10.1007/s10841-010-9329-8>
- Lewis, O. T., & Thomas, C. D. (2001). Adaptations to captivity in the butterfly *Pieris brassicae* (L.) and the implications for ex situ conservation. *Journal of Insect Conservation*, *5*(1), 55–63. <https://doi.org/10.1023/A:1011348716934>
- Li, S. J., Ahmed, M. Z., Lv, N., Shi, P. Q., Wang, X. M., Huang, J. L., & Qiu, B. L. (2017). Plant-mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. *ISME Journal*, *11*(4), 1019–1028. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.164>
- Macek, J., Laštůvka, Z., Beneš, J., & Traxler, L. (2015). *Motýli a housenky střední Evropy IV.: Denní motýli*. Academia.
- Mains, J. W., Brelsfoard, C. L., Crain, P. R., Huang, Y., & Dobson, S. L. (2013). Population impacts of *Wolbachia* on *Aedes albopictus*. *Ecological Applications*, *23*(2), 493–501. <https://doi.org/10.1890/12-1097.1>
- Marçais, G., & Kingsford, C. (2011). A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of k-mers. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *27*(6), 764–770. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr011>
- Mariño, Y. A., Rodrigues, J. C. V., & Bayman, P. (2017). *Wolbachia* affects reproduction and population dynamics of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*): Implications for biological control. *Insects*, *8*(1). <https://doi.org/10.3390/insects8010008>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal*, *17*. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Mattoni, R., Longcore, T., Krenova, Z., & Lipman, A. (2003). Mass rearing of the endangered Palos Verdes blue butterfly (*Glaucopsyche lygdamus palosverdesensis*: Lycaenidae). *Journal of Research on the Lepidoptera*, *37*, 55–67.
- Mediouni, J., Fuková, I., Frydrychová, R., Marec, F., Fuková, I., Marec, F., & Dhouibi, M. H. (2004). Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia*, *57*(2), 184–194. <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589391>
- Mitsubishi, W., Fukuda, H., Nicho, K., & Murakami, R. (2004). Male-Killing *Wolbachia* in the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *112*, 57–64. https://doi.org/10.1007/978-3-642-12340-5_13
- Mitsubishi, W., Ikeda, H., & Muraji, M. (2011). Fifty-year trend towards suppression of *Wolbachia*-induced male-killing by its butterfly host, *Hypolimnas bolina*. *Journal of Insect Science*, *11*(92), 1–15. <https://doi.org/10.1673/031.011.9201>
- Mongue, A. J., Nguyen, P., Voleníková, A., & Walters, J. R. (2017). Neo-sex Chromosomes in the Monarch Butterfly, *Danaus plexippus*. *G3 (Bethesda, Md.)*, *7*(10), 3281–3294. <https://doi.org/10.1534/g3.117.300187>
- Moucha, J., & Procházka, F. (1962). *Motýli*. Státní nakladatelství dětské knihy.
- Narita, S., Kageyama, D., Nomura, M., & Fukatsu, T. (2007a). Unexpected mechanism of

- symbiont-induced reversal of insect sex: Feminizing *Wolbachia* continuously acts on the butterfly *Eurema hecabe* during larval development. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(13), 4332–4341. <https://doi.org/10.1128/AEM.00145-07>
- Narita, S., Nomura, M., & Kageyama, D. (2007b). Naturally occurring single and double infection with *Wolbachia* strains in the butterfly *Eurema hecabe*: Transmission efficiencies and population density dynamics of each *Wolbachia* strain. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(2), 235–245. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00333.x>
- Narita, S., Shimajiri, Y., & Nomura, M. (2009). Strong cytoplasmic incompatibility and high vertical transmission rate can explain the high frequencies of *Wolbachia* infection in Japanese populations of *Colias erate poliographus* (Lepidoptera: Pieridae). *Bulletin of Entomological Research*, 99(4), 385–391. <https://doi.org/10.1017/S0007485308006469>
- NCBI Resource Coordinators. (2018). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D8–D13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1095>
- Oberhauser, K. S. (2019). Captivity concerns for monarch butterflies. *Nature*, 573, 501–502.
- Porter, K., & Ellis, S. (2011). Securing viable metapopulations of the Marsh Fritillary butterfly, *Euphydryas aurinia*, (Lepidoptera: Nymphalidae) in Northern England. *Journal of Insect Conservation*, 15(1), 111–119. <https://doi.org/10.1007/s10841-010-9328-9>
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(6), 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Randerson, J. P., Jiggins, F. M., & Hurst, L. D. (2000). Male killing can select for male mate choice: A novel solution to the paradox of the lek. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1446), 867–874. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1083>
- Ratte, H. T. (1985). *Temperature and Insect Development BT - Environmental Physiology and Biochemistry of Insects* (K. H. Hoffmann (ed.); s. 33–66). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70020-0_2
- Robert, A. (2009). Captive breeding genetics and reintroduction success. *Biological Conservation*, 142(12), 2915–2922. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.07.016>
- Ros, V. I. D., Fleming, V. M., Feil, E. J., & Breeuwer, J. A. J. (2009). How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1036–1043. <https://doi.org/10.1128/AEM.01109-08>
- RStudio Team. (2019). *RStudio: Integrated Development for R*. RStudio, Inc. <http://www.rstudio.com/>
- Sahara, K., Yoshido, A., & Traut, W. (2012). Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research*, 20(1), 83–94. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9262-z>
- Salunkhe, R. C., Narkhede, K. P., & Shouche, Y. S. (2014). Distribution and Evolutionary

- Impact of *Wolbachia* on Butterfly Hosts. *Indian Journal of Microbiology*, 54(3), 249–254. <https://doi.org/10.1007/s12088-014-0448-x>
- Schmitt, T., & Rákósy, L. (2007). Changes of traditional agrarian landscapes and their conservation implications: A case study of butterflies in Romania. *Diversity and Distributions*, 13(6), 855–862. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2007.00347.x>
- Schultz, C. B., Dzurisin, J. D., & Russell, C. (2009). Captive rearing of Puget blue butterflies (*Icaricia icarioides blackmorei*) and implications for conservation. *Journal of Insect Conservation*, 13(3), 309–315. <https://doi.org/10.1007/s10841-008-9174-1>
- Sedláček, O., & Kadlec, T. (2019). Reintrodukce denních motýlů v ČR – zbytečná zábava, nebo legitimní nástroj ochrany přírody? *Živa*, 6.
- Seppey, M., Manni, M., & Zdobnov, E. M. (2019). BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1962, 227–245. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9173-0_14
- Seufert, W., & Grosser, N. (1996). A population ecological study of *Chazara briseis* (Lepidoptera, Satyrinae). In J. Settele, C. Margules, P. Poschlod, & K. Henle (Ed.), *Species Survival in Fragmented Landscapes* (s. 268–274). Kluwer Academic.
- Sintupachee, S., Milne, J. R., Poonchaisri, S., Baimai, V., & Kittayapong, P. (2006). Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. *Microbial Ecology*, 51(3), 294–301. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9036-x>
- Smit, A., Hubley, R., & Green, P. (2013). *RepeatMasker Open* (4.0). <http://www.repeatmasker.org>
- Srivastava, P. N., & Auclair, J. L. (1976). Effects of antibiotics on feeding and development of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae). *Canadian Journal of Zoology*, 54(7), 1025–1029. <https://doi.org/10.1139/z76-115>
- Štochlová, T. (2018). *Reintrodukce motýlů (Lepidoptera)*. Univerzita Karlova.
- Sucháčková Bartoňová, A., Konvička, M., Marešová, J., Bláhová, D., Číp, D., Skala, P., Andres, M., Hula, V., Dolek, M., Geyer, A., Böck, O., Kadlec, T., & Faltýnek Fric, Z. (2021a). Extremely endangered butterflies of scattered Central European dry grasslands under current habitat alteration. *Insect Systematics and Diversity*.
- Sucháčková Bartoňová, A., Konvička, M., Marešová, J., Wiemers, M., Ignatev, N., Wahlberg, N., Schmitt, T., & Faltýnek Fric, Z. (2021b). *Wolbachia* affects mitochondrial population structure in two systems of closely related Palearctic blue butterflies. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82433-8>
- Taylor, M. J., & Hoerauf, A. (1999). *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitology Today*, 15(11), 437–442. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(99\)01533-1](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(99)01533-1)
- Thomas, C. D. (2000). Dispersal and extinction in fragmented landscapes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1439), 139–145. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.0978>
- Thomas, J. A. (2016). Butterfly communities under threat. *Science*, 353(6296), 216–218.

<https://doi.org/10.1126/science.aaf8838>

- Thomas, J. A., Simcox, D. J., & Clarke, R. T. (2009). Successful conservation of a threatened *Maculinea* butterfly. *Science*, 325(5936), 80–83.
<https://doi.org/10.1126/science.1175726>
- Thomas, J. A., Telfer, M. G., Roy, D. B., Preston, C. D., Greenwood, J. J. D., Asher, J., Fox, R., Clarke, R. T., & Lawton, J. H. (2004). Comparative Losses of British Butterflies, Birds, and Plants and the Global Extinction Crisis. *Science*, 303(5665), 1879–1881.
<https://doi.org/10.1126/science.1095046>
- Traut, W., Sahara, K., & Marec, F. (2008). Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development*, 1(6), 332–346. <https://doi.org/10.1159/000111765>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40(15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Van Dyck, H., Van Strien, A. J., Maes, D., & Van Swaay, C. A. M. (2009). Declines in common, widespread butterflies in a landscape under intense human use. *Conservation Biology*, 23(4), 957–965. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01175.x>
- van Oosterhout, C., Zulstra, W. G., van Heuven, M. K., & Brakefield, P. M. (2000). Inbreeding Depression and Genetic Load in Laboratory Metapopulations of the Butterfly *Bicyclus Anynana*. *Evolution*, 54(1), 218–225.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00022.x>
- van Swaay, C., Cuttelod, A., Collins, S., Maes, D., López Munguira, M., Šašić, M., Settele, J., Verovnik, R., Verstrael, T., Warren, M., Wiemers, M., & Wynhof, I. (2010). European red list of butterflies. In *Publications Office of the European Union*. Publications Office of the European Union. <https://doi.org/10.2779/83897>
- van Swaay, C., & Warren, M. (1999). Red Data Book of European Butterflies (Rhopalocera). In *Nature and Environment*, 99. Council of Europe Publishing.
- Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P., & Boulétreau, M. (1999). Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution*, 16(12), 1711–1723.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026084>
- Vrba, P., Grill, S., Kadlec, T., Papaj, V., & Konvička, M. (2021). How do adults of the critically endangered hermit butterfly (*Chazara briseis*) utilise their habitat? (Lepidoptera, Satyrinae). *Journal of Insect Conservation*, 25(1), 39–48.
<https://doi.org/10.1007/s10841-020-00287-3>
- Vrba, P., Kadlec, T., & Konvička, M. (2009). Přežije okáč skalní v České republice? *Živa*, 1.
- Wagner, D. L., Wallace, M. S., Boettner, G. H., & Elkinton, J. S. (1997). Status Update and Life History Studies on the Regal Fritillary (Lepidoptera: Nymphalidae). *Grasslands of northeastern North America: ecology and conservation of native and agricultural landscapes*, cm, 261–275. [http://naba.org/chapters/nabambc/downloads/Wagner et al 1997 - Regal.pdf](http://naba.org/chapters/nabambc/downloads/Wagner%20et%20al%201997%20-%20Regal.pdf)
- Werren, J. H. (1997). Biology of *Wolbachia*. *Annual review of entomology*. Vol. 42, 124, 587–

- Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E. (2008). *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 741–751. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>
- Werren, J. H., & Jaenike, J. (1995). *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. *Heredity*, 75(3), 320–326. <https://doi.org/10.1038/hdy.1995.140>
- Werren, J. H., & Windsor, D. M. (2000). *Wolbachia* infection frequencies in insects: Evidence of a global equilibrium? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1450), 1277–1285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1139>
- Werren, J. H., Zhang, W., & Guo, L. R. (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 261(1360), 55–63. <https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0117>
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T., & De Wachter, R. (1993). Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genet*, 12.
- Withrington, D. K. J., & Verovnik, R. (2008). *Butterflies (Rhopalocera) of the Croatian Islands* (s. 3–25).
- www.edpp.cz. (2021). *Kamenný Újezd: povodňový plán obce - Charakteristika zájmového území*. https://www.edpp.cz/kuj_charakteristika-zajmoveho-uzemi/
- Zarikian, N., & Kalashian, M. (2016). Diversity and Abundance of Nymphalidae (Lepidoptera) in Kotayk Province, Armenia. *Indian Journal of Entomology*, 78(1), 77. <https://doi.org/10.5958/0974-8172.2016.00015.8>

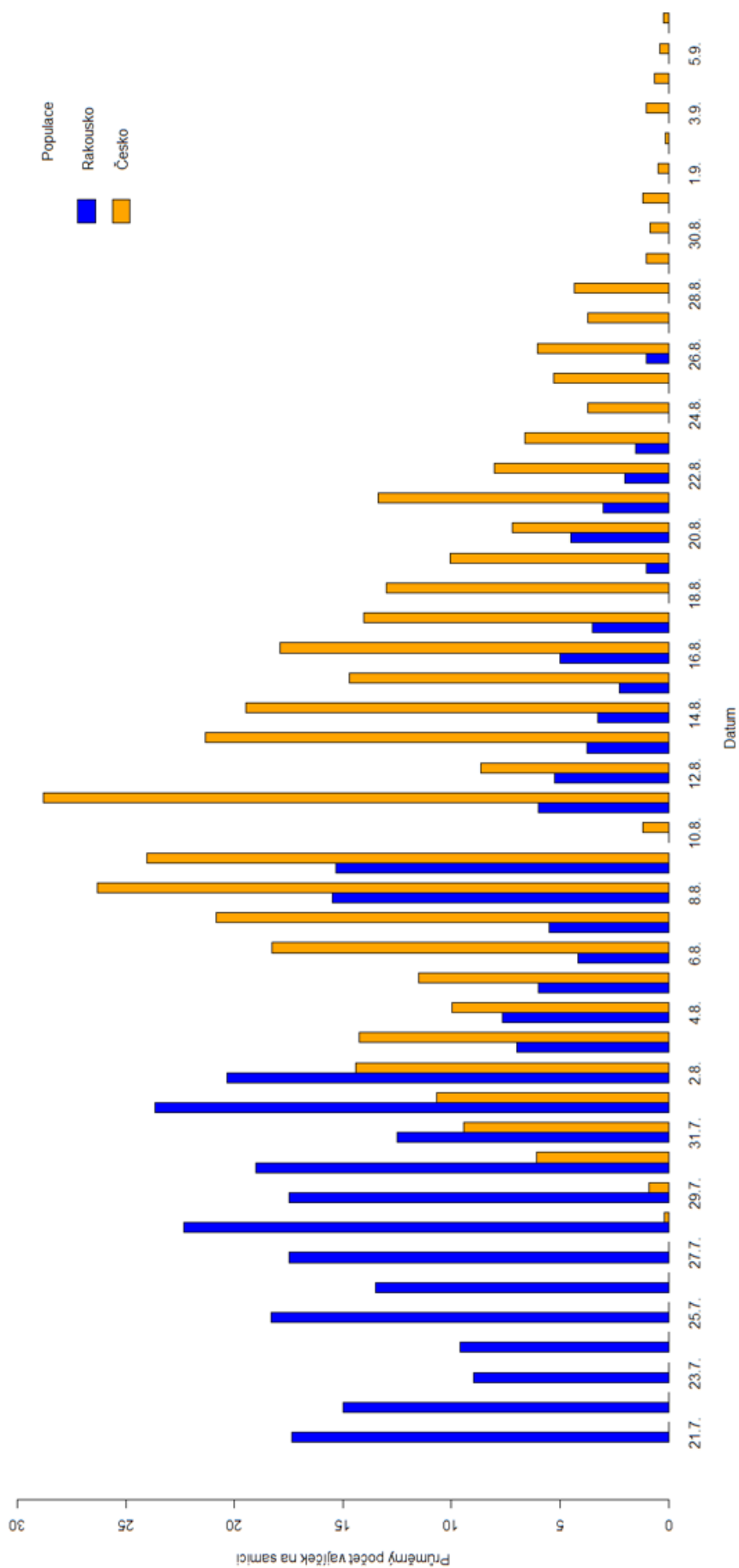
7 PŘÍLOHY

Příloha 1: Tabulka s reprodukčními parametry jednotlivých samic v chovu okáče skalního (*Chazara briseis*)

samice	populace	rok	vajíčka	housenky	lhnivost	začátek kladení	konec kladení	doba kladení	vyfíhnutí	úhyn	doba života
R1	Rakousko	2018	23	0	0	21.07.	NA	NA	09.07.	NA	NA
R2	Rakousko	2018	249	149	59,84	21.07.	06.08.	16	09.07.	10.08.	32
R3	Rakousko	2018	0	0	0	NA	NA	0	06.07.	26.07.	20
R4	Rakousko	2018	434	320	73,73	21.07.	18.08.	28	11.07.	19.08.	39
R5	Rakousko	2018	530	204	38,49	21.07.	18.08.	28	11.07.	18.08.	38
R6	Rakousko	2018	122	0	0	21.07.	01.08.	11	12.07.	02.08.	21
R7	Rakousko	2018	131	0	0	22.07.	08.08.	17	12.07.	31.08.	50
R8	Rakousko	2018	77	19	24,68	21.07.	25.07.	4	12.07.	26.07.	14
R9	Rakousko	2018	204	0	0	21.07.	08.08.	18	13.07.	31.08.	49
R10	Rakousko	2018	103	0	0	24.07.	25.08.	32	13.07.	28.08.	46
R3.2	Rakousko	2018	405	0	0	28.07.	07.09.	41	NA	12.09.	NA
R8.2	Rakousko	2018	132	0	0	28.07.	17.08.	20	NA	05.09.	NA
L1	Česko	2018	259	177	68,34	01.08.	27.08.	26	18.07.	16.09.	60
L2	Česko	2018	165	0	0	29.07.	18.08.	20	20.07.	18.08.	29
L3	Česko	2018	36	0	0	31.07.	05.08.	5	21.07.	05.08.	15
L4	Česko	2018	279	186	66,67	30.07.	31.08.	32	22.07.	12.09.	53
L5	Česko	2018	53	0	0	01.08.	14.08.	13	24.07.	28.08.	37
L6	Česko	2018	276	152	55,07	30.07.	23.08.	24	25.07.	28.08.	35
L7	Česko	2018	307	222	72,31	28.07.	23.08.	26	25.07.	27.08.	33
L8	Česko	2018	139	0	0	30.07.	07.09.	39	26.07.	08.09.	44
L9	Česko	2018	285	0	0	30.07.	06.09.	38	26.07.	07.09.	43
L10	Česko	2018	438	265	60,50	30.07.	06.09.	38	26.07.	06.09.	42
L+	Česko	2018	200	0	0	31.07.	01.09.	32	NA	31.08.	NA
M2	Rakousko	2019	251	0	0	24.07.	03.09.	42	15.07.	13.09.	60
M3	Rakousko	2019	168	0	0	23.07.	09.09.	49	18.07.	10.10.	84
R4.4	Rakousko	2019	228	99	43,42	27.07.	26.08.	31	22.07.	07.09.	47
1	Česko	2019	79	0	0	29.07.	05.08.	8	25.07.	05.08.	11
2	Česko	2019	544	246	45,22	30.07.	06.09.	39	25.07.	14.09.	51

samice	populace	rok	vajíčka	housenky	líhivost	začátek kladení	konec kladení	doba kladení	vyfíhnutí	úhyn	doba života
3	Česko	2019	445	246	55,28	31.07.	31.08.	32	25.07.	20.10.	87
4	Česko	2019	3	0	0	02.08.	02.08.	1	25.07.	28.08.	34
5	Česko	2019	347	215	61,96	30.07.	28.08.	30	25.07.	06.09.	43
6	Česko	2019	127	0	0	01.08.	26.09.	47	25.07.	26.10.	93
L1.1	Česko	2019	328	0	0	03.08.	04.09.	33	28.07.	07.09.	41
L1.2	Česko	2019	287	0	0	05.08.	06.09.	33	28.07.	13.09.	47
L4.2	Česko	2019	233	0	0	31.07.	01.09.	33	25.07.	03.09.	40
L6.1	Česko	2019	181	0	0	04.08.	05.09.	33	28.07.	07.09.	41
L6.2	Česko	2019	204	0	0	13.08.	09.09.	28	04.08.	21.09.	48
1	neléčené	2020	202	122	60,40	28.07.	23.08.	26	23.07.	24.08.	32
2	neléčené	2020	514	438	85,21	01.08.	23.09.	53	23.07.	29.09.	68
3	neléčené	2020	369	177	47,97	31.07.	19.08.	19	23.07.	20.08.	28
4	neléčené	2020	594	0	0	28.07.	23.09.	57	23.07.	06.10.	75
5	neléčené	2020	649	538	82,90	01.08.	17.09.	47	23.07.	18.09.	57
6	neléčené	2020	716	473	66,06	30.07.	29.08.	30	23.07.	29.08.	37
7	neléčené	2020	389	142	36,50	31.07.	07.09.	38	23.07.	07.09.	46
8	neléčené	2020	478	237	49,58	28.07.	08.09.	42	23.07.	09.09.	48
9	neléčené	2020	439	0	0	03.08.	31.08.	28	23.07.	04.09.	43
10	neléčené	2020	197	190	96,45	30.07.	09.08.	10	23.07.	09.08.	17
11	léčené	2020	467	223	47,75	03.08.	13.09.	41	23.07.	14.09.	53
12	léčené	2020	74	0	0	11.08.	24.08.	13	22.07.	25.08.	34
13	léčené	2020	428	35	8,18	04.08.	09.09.	36	22.07.	13.09.	53
14	léčené	2020	436	257	58,94	29.07.	17.09.	50	22.07.	04.10.	74
15	léčené	2020	120	29	24,17	07.08.	29.08.	22	22.07.	07.09.	47
16	léčené	2020	443	0	0	01.08.	08.09.	38	22.07.	19.09.	59
17	léčené	2020	317	38	11,99	17.08.	15.09.	29	21.07.	18.09.	59
18	léčené	2020	628	298	47,45	01.08.	07.09.	37	21.07.	13.09.	54
20	léčené	2020	205	86	41,95	28.07.	30.08.	33	21.07.	02.10.	73
21	léčené	2020	445	0	0	30.07.	12.09.	44	21.07.	14.09.	55

Příloha 2: Kladení rakouské a české populace okáče skalního (*Chazara briseis*) v čase, pro všechny samice v chovu



Příloha 3: Sekvence genomu okáče skalního (*Chazara briseis*) amplifikované při použití *wsp* primerů

>sekvence_1

GCATTTTTTCAGTTTACACTGAGATAGTGAATTTATCATGTACGGACCTAATATCG
ATGAGATACCTATTATAGCGTTGGAAAATTGACAATGTGGATAGAGATAGACAC
AAGCAGTAAAAGA

>sekvence_2

GCATCTTGGGACCCCAACGACCATCAGCTCTTCGAAATATGCGCCCCGCCATTT
CCACATTAGTTTTGCGACTCGCCGAGCTATGTTCGGTGACTTTGGTTCTCCTACGG

>sekvence_3

CCTACCATCAGCTCTTCGAACTATGTGCCCTGCTCATTTCCACTTCAGTTTCGCG
ACTCGCTGGGCTATGTTCGGTGACTTGGTTCTCCTATGGATATCCTCATTTTTATTTT
ATCTCGCAAGGATATTCCGAGCTCTCTCCATCGCCCGCTAGTGACCCCGAGCCTTC
TTATGTTAGTGACTACGTCTCGGATCCGTAATTCATCACTGGTAACCATAGACGTA
TGAAATTTCTGATAACACACACTGGTTCGAAGACTTTAGTCTTCAGGCACTAAGG
GATTTTGAATAGCCCCACACTACTAGGTTCAAAAACCTTCTAAATAATCTTTAAG
CGGATTTGCACTT

>sekvence_4

TTGTATCGAAGGTGTGTAATGTAAGTCTGCCAAGCCACACTTTGCCAGTGTGGTG
GACTATGAACATAGCCCTTCCCCTTAATTAGAGACCTATGCCTATTAGCGGAAGT
GGAAATGGGTGGGGCACGAAGTTCGAAGAGCTGTTGGTCATTGGTGTGCCAAGG
TGC

>sekvence_5

CAACCGCGGAATCCAACCTCGACTGGACAGCGTTCGGGAAGCTCCGAGATGTTTTT
TCGTCCATAATACCTCAGTGCCTGAAGACTAAAGTCGTCGAACAGTACGTGTTGT
CAGTGATGATTGACGGATCTGAGACATGGTCGCTAACTATGGACCTCATAAGAAG
GCTCAGGATCACTTAGTGGGCGATGGAGAGAGGTATGCTCGGAGTATCCCTGCGA
GATCAGAAATGGGGAGATCCGTAGGAGAACCAAAGTCACCGACATAGCTCGGCG
AGTCGCGGAACCTGAAGTGAAAAGAATGAGGCAATTAGTTTGAAGAGCTGATGG
TCATTGAGGTCCCAAGGTGT

>sekvence_6

ACACCTTGGGACCTCAATGACCATCAGCTCTTCAAATAATTGCCTCGTTCTTTTT
CACTTCAGTTCCGCGACTCGCCGGGCTATGTTCGGTGACTTTGGTTCTCCTACGGAT
CTCCCCATTTCTGATCTCGCAGGGATACTCCGAGCATAGCTCTCTCCATCGCCCGC
TGAGTGATCCTGAGCCTTCTTATGAGGTCCATAGTTAGCGACCATGTCTCAGATCC
GTCAATCATCACTGACAACACGTAAGTTCGACGACTTTAGTCTTCAGGCACTGA
GGTATTTTGGACGAGAAAACATCTCGGAGCTTCCCGAACGCTGTCCAGTTCGAGTT
GGATTCCGCGGTTG

>sekvence_7

CAACCGCGGAATCCAACCTCGACTGGACAGCGTTCGGGAAGCTCCGAGATGTTTTT
TCGTCCAGAATACCTCAGTGCCTGAAGACTAAAGTCGTCGAACAGTACGTGTTGT
CAGTGATGATTGACGGATCTGAGACATGGTCGCTAACTATGGACCTCATAAGAAG
GCTCAGGATCACTCAGCGGGCGATGGAGAGAGCTATGCTCGGAGTATCCCTGCG

AGATCAGAAATGGGGAGATCCGTAGGAGAACC₈AAAGTCACAGACATAGCTCGGC
GAGTCGCGGAACTGAAGTGAAAAAGAACGAGGCAATTAGTTTGAAGAGCTGATG
GTCATTGAGGTCCCAAGGTGT

>sekvence_8

ACACCTTGGGACTCCAACGACATCAGCTCTTCGTA₈CTATGTACTCTCCTATTGCCA
CTTCAGTTTCGCAAGTCGCTGAGCTATACGGGTCTCCTCATTCTGATTTACCAG
GGATACTCCGAGCATAGCTGTCTCCATCACCCGCTGAGTGACTCTGAACCTTCTTT
CTATTCTTCTTTGTTGCCATCCCTTCACCTTGTATATCGTTGGACATAGATTTCTC
ATGTGCACGTCATCCTATCGATATTGCCGGTCTCATCCAATTCTTCCCCAAAAGCA
TGACGATATCGCTGGACCAGCGAGATGGTTACCTTTCTACAA