

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Katedra Ekologie



Česká zemědělská
univerzita v Praze

Diplomová práce

Molekulární fylogeneze rodu *Necrophila* Kirby & Spence, 1828 (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae)

Bc. Markéta Jonáková

Vedoucí práce: Ing. Pavel Jakubec, Ph.D.

2024

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Markéta Jonáková

Ochrana přírody

Název práce

Molekulární fylogeneze rodu *Necrophila* Kirby & Spence, 1828 (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae)

Název anglicky

Molecular phylogeny of the genus *Necrophila* Kirby & Spence, 1828 (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae)

Cíle práce

- Sepsat literární rešerši zabývající se evolucí a ekologií žijících druhů podčeledi Silphinae
- Pomocí Sangerova sekvenování získat molekulární data pro analýzu genů zájmových druhů rodu *Necrophila* sensu lato.
- Rekonstruovat fylogenetické vztahy v rámci rodu *Necrophila* sensu lato a otestovat druhovou validitu.

Metodika

Studentka prověde extrakci DNA z jednotlivých exemplářů zájmových druhů a pomocí PCR následně vybrané úseky DNA namnoží a zjistí pořadí nukleotidů za využití Sangerovy sekvenace. Takto získaná haplotypová data dále doplní o sekvence již dříve publikované ve specializovaných databázích (např. GenBank), provede jejich alignment, vybere substituční model, vygeneruje fylogenetický strom a provede jeho evaluaci. Získané informace potom bude dále interpretovat a diskutovat.

Doporučený rozsah práce

30

Klíčová slova

fylogeneze, Silphinae, forenzní entomologie, evoluce, taxonomie

Doporučené zdroje informací

- Boudinot, B.E., Fikáček, M., Lieberman, Z.E., Kusy, D., Bocak, L., Mckenna, D.D., et al. (2022) Systematic bias and the phylogeny of Coleoptera—A response to Cai et al. (2022) following the responses to Cai et al. (2020). *Systematic Entomology*, 1–10.
- Cai, C., Tihelka, E., Giacomelli, M., Lawrence, J.F., Ślipiński, A., Kundrata, R., et al. (2022) Integrated phylogenomics and fossil data illuminate the evolution of beetles. *Royal Society Open Science*, 9.
- King, J.E., Riegler, M., Thomas, R.G. & Spooner-Hart, R.N. (2015) Phylogenetic placement of Australian carrion beetles (Coleoptera: Silphidae). *Austral Entomology*, 54, 366–375.
- Růžička, J., Qubaiová, J., Nishikawa, M. & Schneider, J. (2015) Revision of Palearctic and Oriental *Necrophila* Kirby et Spence, part 3: subgenus *Calosilpha* Portevin (Coleoptera: Silphidae: Silphinae). *Zootaxa*, 4013, 451–502.
- Růžička, J., Schneider, J., Qubaiová, J. & Nishikawa, M. (2012) Revision of Palaeartic and Oriental *Necrophila* Kirby & Spence, part 2: Subgenus *Chrysosilpha* Portevin (Coleoptera: Silphidae). *Zootaxa*, 33–58.
- Růžička, J. & Schneider, J. (2011) Revision of Palaeartic and Oriental *Necrophila* Kirby & Spence, part 1: subgenus *Deutosilpha* Portevin (Coleoptera: Silphidae). *Zootaxa*, 1–12.
- Sikes, D.S. & Venables, C. (2013) Molecular phylogeny of the burying beetles (Coleoptera: Silphidae: Nicrophorinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69, 552–565.
-

Předběžný termín obhajoby

2023/24 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Pavel Jakubec, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

Ing. Karolina Mahlerová

Elektronicky schváleno dne 22. 2. 2023

prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 23. 2. 2023

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 12. 10. 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědom/a, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědoma, že odevzdáním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne.....

.....

Bc. Markéta Jonáková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Pavlu Jakubci, Ph.D., Ing. Karolině Mahlerové a prof. Mgr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za poskytnutá data a především za velmi milý přístup, pomoc, ochotu a trpělivost při zpracování diplomové práce.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá analýzou fylogenetických vztahů v rámci rodu *Necrophila* Kirby et Spence, 1828. Tento rod, patřící do podčeledi mrchožroutovitých (Silphinae), v současnosti zahrnuje 15 druhů rozdělených do pěti podrodů. Podrody *Calosilpha* Portevin, 1920, *Chrysosilpha* Portevin, 1921, *Deutosilpha* Portevin, 1920 a *Eusilpha* Semenov-Tian-Shanskij, 1890 jsou známé z východní palearktické a orientální oblasti a podrod *Necrophila* Kirby et Spence, 1828 se vyskytuje v oblasti nearktické. Tato molekulární fylogeneze je založena na dvou mitochondriálních genech COI a 16S, které byly získány z lihových či suchých preparátů zájmových druhů za použití Sangerovy metody sekvenování a doplněné o sekvence z veřejné databáze NCBI. Dva druhy rodu *Thanatophilus* Leach, 1815 a dva druhy rodu *Necrodes* Leach, 1815 byly zvoleny jako vnější skupina (tzv. outgroup). Druhovú validita byla ověřena na základě výpočtu genetické vzdálenosti. Výsledný fylogenetický strom, zahrnující celkem jedenáct druhů rodu *Necrophila* Leach, 1815, byl zrekonstruován na základě metody maximum likelihood a Bayesovské inference. Výsledná topologie fylogenetického stromu zobrazuje podrod *Necrophila* jako nejvíce oddělenou linii od ostatních podrodů. Podrody *Calosilpha* a *Chrysosilpha* jsou vyhodnoceny jako sesterské linie a podrod *Eusilpha* je příbuznou linií k těmto podrodům. Tato rekonstrukce fylogenetických vztahů v rámci rodu *Necrophila* může být základem pro budoucí studie zabývající se evoluční historií a distribucí této skupiny brouků.

Klíčová slova

fylogeneze, taxonomie, evoluce, Silphinae

Abstract

This master's thesis examines the phylogenetic relationships within the genus *Necrophila* Kirby et Spance, 1828. This genus, belonging to the subfamily Silphinae, currently consists of 15 species divided into five subgenera. Subgenera *Calosilpha* Portevin, 1920, *Chrysosilpha* Portevin, 1921, *Deutosilpha* Portevin, 1920 and *Eusilpha* Semenov-Tian-Shansky, 1890 are occur in Eastern Palearctic regions and Oriental regions and the subgenus *Necrophila* Kirby et Spence, 1828 occurs in Nearctic region. This molecular phylogeny is based on two mitochondrial genes COI and 16S, which were obtained from alcohol or dry preparations of the species of interest by Sanger sequencing and supplemented with sequences from the NCBI database. Two species of the genus *Thanatophilus* Leach, 1815 and two species of the genus *Necrodes* Leach, 1815 were selected as an outgroup. Species validity was verified by calculating pairwise distances. The phylogenetic tree, including a total of eleven species of the genus *Necrophila*, was reconstructed based on maximum likelihood and Bayesian inference. The resulting topology of the phylogenetic tree depicts the subgenus *Necrophila* as the most separated lineage from the other subgenera. The subgenera *Calosilpha* and *Chrysosilpha* are evaluated as sister lineages and the subgenus *Eusilpha* is a related lineage to these subgenera. Thus, this reconstruction of phylogenetic relationships within the genus *Necrophila* may provide a basis for future studies dealing with the evolutionary history and distribution of this group of beetles.

Keywords

phylogeny, taxonomy, evolution, Silphinae

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Cíle.....	2
3.	Literární rešerše.....	3
3.1	Taxonomie podčeledi Silphinae	3
3.2	Rozšíření.....	4
3.3	Ekologie.....	5
3.3.1	Stanovištní nároky	5
3.3.2	Potravní specializace a životní strategie	6
3.4	Morfologie podčeledi Silphinae	8
3.4.1	Morfologie dospělců podčeledi Silphinae	8
3.4.2	Morfologie larvy podčeledi Silphinae	9
3.4.3	Morfologie dospělců tribu Silphini.....	9
3.4.4	Morfologie dospělců tribu Nicrophorini.....	9
3.4.5	Morfologie larev tribu Silpini	10
3.4.6	Morfologie larvy tribu Nicrophorini.....	10
3.5	Rod <i>Necrophila</i> Kirby et Spence	11
3.5.1	Podrod <i>Deutosilpha</i> Portevin.....	12
3.5.2	Podrod <i>Chrysosilpha</i> Portevin.....	12
3.5.3	Podrod <i>Calosilpha</i> Portevin.....	13
3.5.4	Podrod <i>Eusilpha</i> Semenov-Tian-Shanskij.....	14
3.5.5	Podrod <i>Necrophila</i> Kirby et Spence	14
3.6	Principy používaných molekulární metod	16
3.6.1.	Extrakce DNA	16
3.6.2	Polymerázová řetězová reakce	17
3.6.3	Gelová elektroforéza.....	18
3.6.4	Sangerova metoda sekvenování DNA.....	19

3.7	Fylogenetické stromy.....	19
3.7.1	Metoda maximum likelihood.....	21
3.7.2	Bayesovská inference	22
4.	Metodika	23
4.1	Sběr dat	23
4.2	Laboratorní část	25
4.2.1	Extrakce DNA	25
4.2.2	Amplifikace fragmentů DNA pomocí PCR.....	27
4.2.3	Vizualizace PCR produktu pomocí gelové elektroforézy	28
4.2.4	Přečistění PCR produktu a sekvenování DNA	29
4.3	Zpracování dat	29
4.3.1	Ověření kvality sekvence DNA	29
4.3.2	Zarovnání a sloučení sekvencí	30
4.4	Rekonstrukce fylogenetických stromů	31
4.4.1	Maximum likelihood	31
4.4.2	Bayesovská analýza	32
4.5	Ověření druhové validity	33
5.	Výsledky	34
6.	Diskuse.....	36
6.1	Faktory ovlivňující výsledky	36
6.2	Evoluční a geografické souvislosti	36
6.3	Porovnání výsledků s dalšími studii	37
7.	Závěr	39
8.	Seznam literatury	40
9.	Přílohy	48

1. Úvod

Podčeleď Silphinae, neboli mrchožroutovití, zahrnuje zejména nekrofágní druhy brouků, které mají široké rozšíření především v holarktické oblasti (Anderson et Peck 1985). I když se jedná o nepříliš početnou skupinu brouků, hraje tento hmyz zásadní roli při rozkladu mrtvých zvířat, a tím tak významně přispívá ke koloběhu živin v suchozemských ekosystémech (Peck 2001). V posledních letech také přibývá studií, které se zabývají ekologií mrchožravých druhů, jelikož tyto druhy mají vysoký potenciál být využívány ve forenzní entomologii (Matuszewski 2011; Jakubec et al. 2021b).

V nedávné reklasifikaci byla čeleď Silphidae zařazena jako podčeleď čeledi Staphylinidae (drabčíkovití), která je nejrozmanitější čeledí v rámci nadčeledi Staphylinoidea, a latinské označení Silphidae bylo změněno na Silphinae (Cai et al. 2022). Tato podčeleď obsahuje dva triby (Silphini a Nicrophorini), které jsou navzájem poměrně odlišné jak morfologicky, tak svými potravními strategiemi a způsobem života (Ractliffe 1996).

Fylogeneze a taxonomie jednotlivých rodů patřící do této podčeledi zatím není zcela prozkoumána. Jednou ze skupin mrchožroutů, kde doposud chybí podrobnější taxonomická studie založená na molekulárních datech, je rod *Necrophila* Kirby et Spence, 1828 vyskytující se v holarktické oblasti (Sikes 2016). Tento rod obsahuje v současné době 15 druhů zařazených do pěti podrodů; *Eusilpha* Semenov-Tian-Shanskij, 1890, *Calosilpha* Portevin, 1920, *Chrysozilpha* Portevin, 1920, *Deutosilpha* Portevin, 1920 a *Necrophila* s. str. Kirby et Spence, 1828 (Newton 2022).

V dřívějších publikovaných studiích, které se zabývají fylogenezí podčeledi Silphinae, jsou použita molekulární data k rekonstrukci fylogenetických stromů, avšak výsledky nezahrnují všechny podrody rodu *Necrophila* (Dobler et Müller 2000; Ikeda et al. 2008; King et al. 2015). Ikeda et al. (2008) na základě použitých metod maximální parsimonie a Bayesovské analýzy stanovil ve své předběžné analýze následující topologii: *Necrophila* + (*Eusilpha* + (*Calosilpha* + *Chrysozilpha*)). Dále existují publikace, ve kterých jsou použity morfologické znaky podrodu *Deutosilpha*, *Chrysozilpha* a *Calosilpha* ke stanovení fylogenetických vztahů v rámci těchto podrodů (Růžička et Schneider 2011; Růžička et al. 2012; Růžička et al. 2015), avšak studie zabývající se revizí podrodu *Eusilpha* zatím není publikována.

Tato práce zabývající se molekulární fylogenezí rodu *Necrophila* může přispět k lepšímu porozumění příbuzenských vztahů v rámci daných druhů a podrodů, a tím tak vytvořit základ pro následné budoucí práce, které se budou zabývat evoluční historií a fylogeografií této skupiny brouků.

2. Cíle

Cílem této diplomové práce je sepsat literární rešerši o ekologii a evoluci žijících druhů podčeledi Silphinae a zanalyzovat fylogenetické vztahy v rámci rodu *Necrophila* Kirby et Spence na základě molekulárních dat, které budou získány v podobě nukleotidových sekvencí vybraných genů zájmových druhů. Na základě analýzy těchto dat budou výsledky prezentovány v podobě fylogenetického stromu, který bude vypočten a zrekonstruován pomocí vybraných substitučních modelů. Tímto způsobem bude následně možné určit genetickou podobnost mezi druhy a podrody.

3. Literární rešerše

3.1 Taxonomie podčeledi Silphinae

Podčeď Silphinae neboli mrchožroutovití je relativně málo početná skupina brouků, která doposud obsahuje kolem 200 druhů (Newton 2022). Tato podčeď, která se řadí do čeledi Staphylinidae (drabčíkovití), je vymezena na dva triby: Silphini (mrchožrouti) a Nicrophorini (hrobařici) (Cai et al. 2022). Do tribu Silphini se řadí 12 rodů (*Aclypea* Reitter, 1884, *Dendroxena* Motschoulsky, 1858 *Diamesus* Hope, 1840, *Heterosilpha* Portevin, 1926, *Heterotemna* Wollaston, 1864, *Necrodes* Leach, 1815, *Necrophila* Kirby et Spence, 1828, *Oiceoptoma* Leach, 1815, *Oxyletrum* Gistel, 1848, *Ptomaphila* Kirby et Spence, 1828, *Silpha* Linnaeus, 1758, *Thanatophilus* Leach, 1815) zahrnujících 112 druhů. Méně početnější trib Nicrophorini se třemi rody (*Eonecrophorus* Kurosawa, 1985, *Nicrophorus* Fabricius, 1876, *Ptomascopus* Kraatz, 1876) obsahují 72 druhů (Sikes 2016).

Taxonomické zařazení této skupiny brouků do čeledi Staphylinidae bylo provedeno skrze nejnovější fylogenetické studie (Cai et al. 2022). Do té doby byla tato skupina považována za samostatnou čeď Silphidae, která se řadila do nadčeledi Staphylinoidea (Sikes 2016) a čeď Staphylinidae byla považována za sesterskou skupinu k čeledi Silphidae (Grebennikov et Newton 2012). V minulosti došlo ke změnám v taxonomii mrchožroutovitých vícekrát. Do tehdejší čeledi Silphidae se dříve zahrnovaly i taxony, které jsou nyní považovány za samostatné čeledi (Peck 2001). Například se jedná o skupinu Agyrtidae, která byla vymezena jako podčeď a dnes je tato skupina brána jako samostatná čeď, která je sesterskou skupinou k čeledi Leiodidae, ta byla dříve také zařazena k tehdejší čeledi Silphidae (Lawrence et Newton 1982; Peck 1990; McKenna et al. 2015).

V současnosti se do nadčeledi Staphylinoidea řadí čeledi Agyrtidae, Colonidae, Hydraenidae, Leodidae, Ptiliidae a Staphylinidae (Cai et al. 2022). Čeď Staphylinidae je považována za nejrozmanitější čeď brouků, do které se v současnosti řadí 35 podčeledí s více než 64 tisíci druhy a poddruhy (Newton 2022). Tato čeď vznikla během pozdního triasu a rané jury před 209 až 184 miliony lety. Následně se diverzifikovala v období od rané jury do pozdní křídly, což vedlo k velké rozmanitosti forem a životních strategií u této skupiny brouků (Cai et al. 2022).

Podčeleď Silphinae je považována za monofyletickou skupinu (Dobler et Müller 2000; Ikeda et al. 2008; McKenna et al. 2015; Song et al. 2021). Hansen (1997) ve své fylogenetické studii dokazuje tuto monofylii skrze analýzu založenou na řadě morfologických znaků. Dále tento předpoklad potvrzují i studie, kde byly zkoumány fylogenetické vztahy v rámci podčeledi skrze molekulární znaky (Dobler et Müller 2000; Ikeda et al. 2008). Dobler et Müller (2000) ve studii dále dokazuje monofylii podčeledi Silphinae a jejich dvou tribů Silphini a Nicrophorini.

3.2 Rozšíření

V současnosti podčeleď Silphinae vykazují široké rozšíření se zástupci na všech kontinentech kromě Antarktidy a s centrem výskytu v palearktické oblasti (Dobler et Müller 2000; Růžička 2015; Sikes 2016). Mrchožrouti jsou obecně rozšířenější než hrobařici. To může pravděpodobně souviset s jejich větší druhovou diverzitou, možným vyšším stářím a s vyšší tolerancí k teplejšímu klimatu. Tato tolerance může být spojena s mezidruhovou konkurencí. Hrobařici obecně preferují menší mršiny a mohou hůře odolávat konkurentům jako jsou mravenci, mouchy či druhy z čeledi Scarabaeidae, které jsou v teplejších oblastech hojnější (Trumbo 1990; Sikes 2008).

V holarktické oblasti se vyskytuje nejvíce druhů mrchožroutů patřících do rodu *Aclypea*, *Dendroxena*, *Necrodes*, *Necrophila*, *Oiceoptoma*, *Silpha* a *Thanatophilus* (Sikes 2016). Rody *Silpha* a *Thanatophilus* jsou také rozšířeny v oblasti afrotropické (Růžička 2015). V Austrálii a Nové Guineji se nachází dva endemické druhy z rodu *Ptamophila* a jeden druh z rodu *Diamesus*, který se také nachází v jihovýchodní Asii (King et al. 2015; Růžička et al. 2023). Druh *Diamesus bimaculatus* Portevin, 1914 je endemickým druhem na ostrově Taiwan (Růžička 2015; Růžička et al. 2023). Rod *Heterosilpha* je znám z nearktické oblasti (Severní Amerika) a v jihozápadní nearktické a neotropické oblasti se vyskytuje rod *Oxelytrum* (Sikes 2016).

Rod *Heterotemna* obsahující tři druhy je endemický na Kanárských ostrovech u severozápadního pobřeží Afriky (Růžička 2015). Avšak dle novější publikace zabývající se fylogenetickými vztahy tohoto rodu není zřejmě *Heterotemna* samostatným rodem, jelikož skrze fylogenetickou analýzu molekulárních dat byl umístěn rod *Heterotemna* do rodu *Silpha* (Mahlerová et al. 2021).

Hrobařici jsou méně rozšířeni a vyskytují se především v mírném pásu severní polokoule. V Asii jsou rozšířeny rody *Eonecrophorus* Kurosawa, 1985 a *Ptomascopus* Kraatz, 1876. Rod *Nicrophorus* Fabricius, 1775 má široké rozšíření v holarktické oblasti a známy jsou i některé druhy v Malajsii, na Nové Guinei, v severní Africe a v horských biotopech v Jižní Americe (Peck 2001). Hrobařici pravděpodobně vznikli na konci rané křídy před 144–124 miliony let ve východním Palearktu, odkud dále tato skupina brouků expandovala do nearktické a orientální oblasti (Sikes et Venables 2013; Cai et al. 2014; Toussaint et Condamine 2016).

3.3 Ekologie

3.3.1 Stanovištní nároky

Ekologie jednotlivých druhů patřících do podčeledi Silphinae může být variabilní. Tito zástupci se mohou lišit v preferovaných habitatech a lze je rozdělit do dvou skupin – druhy typické pro lesní prostředí (např. *Dendroxena quadrimaculata* (Scopoli, 1772), *Necrodes littoralis* (Linnaeus, 1758), *Oiceoptoma thoracicum* (Linnaeus, 1758), *Phosphuga atrata atrata* (Linnaeus, 1758), *Nicrophorus vespilloides* Herbst, 1784) a druhy nalézající se v otevřené krajině (např. *Thanatophilus rugosus* (Linnaeus, 1758), *T. sinuatus* (Fabricius, 1775), *Silpha tristis* Illiger, 1798, *Nicrophorus antennatus* (Reitter, 1884), *N. vespillo* (Linnaeus, 1758), *N. sepultor* Charpentier, 1825, *N. vestigator* Herschel, 1807) (Novák 1962; Růžička 1994; Dekeirsschieter 2011).

Některé druhy také mohou upřednostňovat určité typy půd. Touto hypotézou se zabýval například Jakubec et Růžička (2015), kde ve své studii uvádí, že výskyt druhu *Silpha obscura* (Linnaeus, 1758) a *Thanatophilus sinuatus* (Fabricius, 1775) byl významně vyšší v lokalitách s černozeměmi než s fluvizeměmi. Černozemní půdy také preferovali hrobařici (*Nicrophorus antennatus* (Stephens, 1830), *N. germanicus* (Linnaeus, 1758), *N. sepultor*), kteří jsou vedeny na Červeném seznamu ohrožených druhů bezobratlých České republiky (Růžička 2005). Tyto černozemní lokality tak mohou být z hlediska ochrany přírody velice cenné (Jakubec et Růžička 2015). Pro většinu druhů hrobařiků rodu *Nicrophorus* jsou vhodné sprašové půdy, zatímco lehké písčité substráty jsou pro většinu druhů nepříznivé. Na spraších se vyskytují například druhy *N. vespillo*, *N. sepultor*, *N. interruptus*, oproti tomu druh *N. vestigator* je znám svou preferencí písčitých suchých půd (Novák 1965).

Dalšími vlivy na početnost populace druhů mohou být povětrnostní a teplotní podmínky dané lokality (Novák 1962). Nadprůměrně nízké teploty s vysokým množstvím srážek zvláště v jarním období mohou způsobit zpomalení aktivity druhů a vývoj jejich potomků může být opožděn (Novák 1965).

Dalším faktorem ovlivňujícím početnost dané populace a druhovou diverzitu může být fragmentace krajiny (Gibbs et Stanton 2001; Trumbo et Bloch 2000). Gibbs et Stanton (2001) ve své studii prokázali vyšší početnost a druhovou bohatost vybraných druhů z podčeledi Silphinae vyskytujících se v nefragmentovaných lesních biotopech v porovnání s lesy fragmentovanými. Oproti tomu Trombiková et Kočárek (2008) signifikantní vliv lesní fragmentace na početnost druhů z podčeledi Silphinae neprokázali. To by mohlo být vysvětleno tím, že některé druhy vázané na lesy jsou schopné kolonizovat i velmi jejich malé izolované fragmenty a pravděpodobně jsou schopny létat z jednoho fragmentu lesa na další přes biotopy (pole a louky), kterým se běžně vyhýbají (Trombiková et Kočárek 2008).

3.3.2 Potravní specializace a životní strategie

Dospělci a larvy podčeledi Silphinae se převážně živí mršinami, avšak existuje mezi nimi několik linií, které se specializují na různé způsoby získávání potravy. Některé rody jsou zcela specializovány na predátorský způsob života. Jedná se o rody *Phosphuga*, *Ablattaria*, *Dendroxena* a část rodu *Silpha*, které mohou lovit různé druhy plžů či housenek (Sikes 2016). Rod *Aclypea* je znám jako zástupce výhradních fytofágů, kteří mohou představovat škůdce pro různé druhy rostlin (Anderson et Peck 1984). Většina zástupců podčeledi jsou však obligátně či fakultativně nekrofágní. Do této skupiny se řadí rod *Thanatophilus*, *Necrodes*, *Oiceoptoma*, *Nicrophorus* a část rodu *Silpha* (Ikeda et al. 2008).

Na základě preferovaného způsobu získávání potravy se mohou druhy odlišovat svou schopností letu. Zatímco v tribu Nicrophorini jsou výhradně létavé druhy, do tribu Silphini patří i některé druhy s omezenou schopností letu a druhy zcela nelétavé. Dospělci většiny letuschopných druhů mrchožroutů jsou nekrofágní, zatímco dospělci nelétavých druhů se živí především půdními bezobratlými. Schopnost letu umožňuje nekrofágům efektivně nacházet mršiny, které jsou časově i prostorově těžko předvídatelné (Ikeda et al. 2007). Naproti tomu u nelétavých predátorů bylo zjištěno postupné zvýšení investic do reprodukčních strategií, a to ve vyšší produkci a velikosti

vajec, než je tomu u druhů létavých. Odlišné trofické preference v průběhu evoluce mrchožroutů tedy mohou vést ke změně různých životních strategií, a tím tak obecně zvyšovat mezidruhovou rozmanitost uvnitř této skupiny brouků (Ikeda et al. 2008).

Samice nekrofágních druhů mrchožroutů klade svá vajíčka do půdy nebo na povrch půdy poblíž mršin velkých obratlovců, aniž by poskytovala nadále péči o své potomstvo (Sikes 2016). Dospělci se často vyskytují na velkých mršinách, které mají více než 300 gramů, jelikož tyto mršiny poskytují hojný zdroj potravy pro velké množství brouků (Sikes 2008). Vajíčka se líhnou během 4-5 dní a larvy se poté živí zbývajícími částmi mršiny (Anderson 1982). Na větších mršinách se obvykle vyskytuje více mrchožravých druhů, které si mohou konkurovat (Matuszewski et al. 2016). Mrchožrouti obvykle kolonizují mršiny v raném nebo středním stadiu rozkladu, a tímto způsobem tak konkurují mouchám se zdroji potravy (Anderson 1982). Dřívější kolonizátor zpravidla ovlivňuje svého konkurenta nepřímo tím, že snižuje dostupné zdroje a zároveň se může často vyskytovat konkurence mezi různými životními stádii konkurentů (Matuszewski et Mađra-Bielewicz 2022). Například rod *Necrodes* obvykle kolonizuje mršiny v pozdějším stadiu rozkladu, oproti tomu mouchy čeledi bzučivkovití (Calliphoridae) se vyskytují na mršině v rané fázi rozkladu, a tím snižují dostupnost potravy pro mrchožrouty. Zároveň dospělci rodu *Necrodes* zabíjí obvykle larvy bzučivek ve třetí fázi instaru, během kterého vrcholí jejich krmení, a tím tak brouci zpomalují rozklad mršiny způsobenými jejich konkurenty (Matuszewski et Mađra-Bielewicz A. 2022).

Hrobařici (rod *Nicrophorus*) se na rozdíl od mrchožroutů vyznačují svou unikátní rodičovskou péčí o potomstvo (Scott 1998). Vyhledávají mršiny obvykle menšího vzrůstu vážící do 300 gramů, které následně zahrabávají a pohřbívají do podzemní krypty (Sikes 2016). Mršinu daný pár nalezne skrze feromony, které u ní sameček vylučuje, aby k místu přilákal samičku (Eggert et Müller 1992). Mršina je zbavena chlupů či peří a přeměněna na potravinovou kouli, nad níž následně samička klade v půdní chodbě vajíčka (Ractliffe 1996). Mršina je dále potravou pro vylíhnuté larvy, které jsou v prvních fázích larválního stádia krmeny rodiči, a poté se larvy živí mršinou samy (Scott 1998). Doba larválního stádia je přibližně jeden týden, následné stádium kukly trvá dva týdny (Ractliffe 1996). Rychlost rozkládání mršiny je zpomalována pomocí análních sekretů, které dospělci vylučují, a tím tak chrání místo před možnými patogeny plísněmi, které se na rozkládající mršině mohou tvořit (Scott

1998). Hrobařici konkurují mouchám se zdroji potravy zahrabáváním těla pod zem, tak i skrze mutualistické vztahy s roztoči rodu *Poecilochirus* G. Canestrini et R. Canestrini, 1882, které se živí vajíčky much a jsou přenášeny na tělech brouků (Sun et Kilner 2020). U hrobařiků lze také najít příklady parazitického způsobu života, a to u druhu *Ptomascopus morio* Kraatz, 1877, který je známý jako hnízdní parazit na rodu *Nicrophorus* (Trumbo et al. 2001).

3.4 Morfologie podčeledi Silphinae

3.4.1 Morfologie dospělců podčeledi Silphinae

Zástupci podčeledi Silphinae jsou většinou středně velcí brouci, jejichž délka těla je průměrně 14 až 28 mm. Největším zástupcem této podčeledi je považován rod *Diamesus*, který má délku až 45 mm (Lawrance et Šlipiňski 2013). Mezi nejmenší zástupce patří rod *Thanatophilus* měřící kolem 8 mm (Hůrka 2005). Přestože se dospělci značně liší velikostí a tvarem, lze při jejich určování použít určité spolehlivé morfologické znaky (Byrd et Castner 2001).

Tělo je obvykle černé, ale může se vyznačovat oranžovými, žlutými nebo červenými skvrnami (Byrd et Castner 2001). Tvar těla je vejčitý až středně protáhlý, mírně až silně dorzoventrálně zploštělý. Tělo bývá širší směrem k zadní části spíše než k přední. Většinou bývá holá horní část těla, zatímco spodní strana může být hustě pokrytá dlouhými chlupy (Byrd et Castner 2001; Sikes 2016). Hlava je prognátní s dobře vyvinutými a velkými očima vystupujícími do stran (Lawrance et Šlipiňski 2013). Tykadla jsou paličkovitá nebo se postupně rozšiřující složená z 11 článků (Lawrance et Šlipiňski 2013; Sikes 2016). Mandibuly jsou symetrické, úzké a mohou být zakončeny subapikálním zubem (Lawrance et Šlipiňski 2013). Maxilární palpy jsou čtyřčlánkové, zatímco labiální palpy jsou složeny ze tří článků (Lawrance et Šlipiňski 2013). Štítek (scutellum) bývá velký a dobře vyvinutý, štít (pronotum) je zvětšený a málokdy ochlupený (Peck 2001). Krovky u většiny zástupců této podčeledi nejsou zkrácené. Zkrácenými krovkami se vyznačuje rod *Diamesus*, *Necrodes* a zástupci tribu *Nicrophorini*, u kterých bývá odhaleno 1–5 abdominálních segmentů (Sikes 2016).

3.4.2 Morfologie larvy podčeledi Silphinae

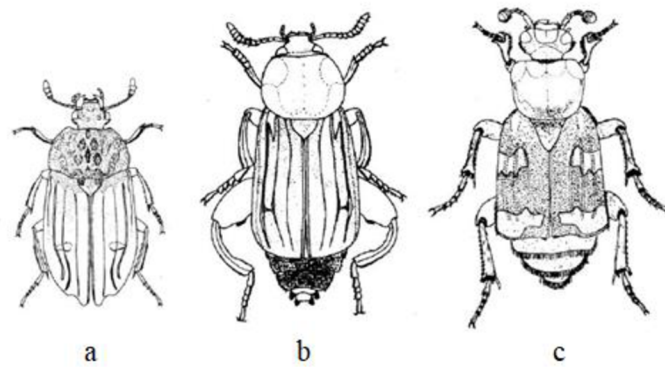
Larvy dosahují velikosti v rozmezí od 12 do 40 mm (Sikes 2016). Tvar těla je podlouhlý, mírně až silně zploštělý. Hlava prognátní nebo mírně skloněná, bez diferencované krční oblasti. Tykadla jsou složena ze tří článků. Mandibuly jsou symetrické a zakončeny jedním nebo více zuby (Lawrance et Ślipiński 2013). Abdomen (zadeček) se skládá z deseti článků, na jehož konci je viditelný jeden pár dvoučlankových nebo jednočlankových urogomf (Lawrance et Ślipiński 2013). Typ a zbarvení larvy se v rámci tribů výrazně liší (Sikes 2016).

3.4.3 Morfologie dospělců tribu Silphini

Zástupci mrchožroutů se vyznačují dorzoventrálně zploštělým tělem většinou tmavé barvy a mohou měřit 8–25 mm (Hůrka 2005; Sikes 2016). Na hlavě se nenachází epistomální šev a čelní štítek (clypeus) je srostlý se svrchním pyskem (labrum) (Anderson et Peck 1985). Tykadla jsou složena z 11 segmentů, které se postupně ke konci rozšiřují (Ractlife 1996). Druhý článek tykadel je viditelný (Anderson et Peck 1985). Pronotum má typicky větší šířku než délku a u některých druhů může být barevné (Anderson et Peck 1985). Na krovkách jsou zřetelná většinou tři podélná žebra s výjimkou rodu *Ablattaria*, u kterého se žebra na krovkách nenachází (Hůrka 2005).

3.4.4 Morfologie dospělců tribu Nicrophorini

Dospělci hrobaříků měří okolo 25 mm a vyznačují se černým zbarvením nebo kombinací červenooranžové až sytě žluté barvy (Ractlife 1996). Clypeus a labrum jsou zřetelně oddělené epistomálním švem (Sikes 2016). Tykadla jsou stejně jako u mrchožroutů složena z 11 článků, avšak druhý článek tykadel je zkrácený a poslední čtyři segmenty tvoří paličkovitý tvar (Obr. 1) (Anderson et Peck 1985). Krovky jsou zpravidla zkrácené, a tudíž mohou být viditelné 3 až 4 abdominální články (Ractlife 1996). Umístění a počet žlutých či oranžových skvrn na krovkách je důležitým morfologickým znakem k rozlišení druhů tohoto tribu (Anderson et Peck 1985). Žebra na krovkách nejsou zřetelně viditelná, spíše jen naznačená (Sikes 2016).



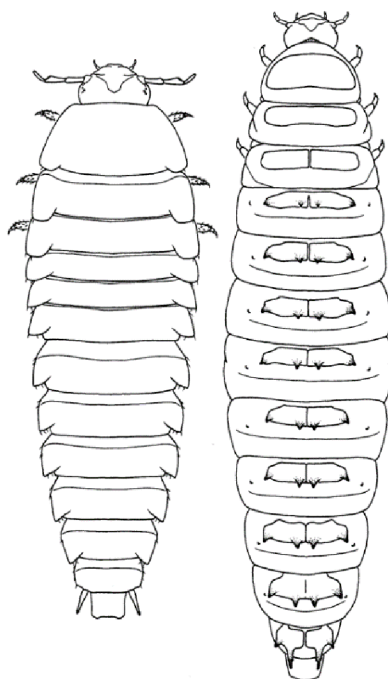
Obrázek 1: Dospělci podčeledi Silphinae; (a) *Thanatophilus sinuatus*
 (b) *Necrodes littoralis*, (c) *Nicrophorus interruptus* (Šustek 1981)

3.4.5 Morfologie larev tribu Silpini

Larvy zástupců tohoto tribu mají tělo silně sklerotizované, pigmentované, většinou jsou tmavého zbarvení. Typ larvy je zpravidla kampodeiformní (Obr. 2) (Newton 1991; Sikes 2016). Po stranách hlavy je šest jednoduchých oček (stemma) (Ractlife 1996). Hřbetní destičky (tergity) a břišní destičky (ventrity) jsou velké a dobře rozlišitelné. Tergity jsou laterálně vyklenuté a zakrývají jednotlivé články těla. Druhý abdominální ventrit je celý nebo může být rozdělen na tři části. Tento morfologický znak je důležitý při určování larev do druhů (Anderson et Peck 1985). Dalším důležitým znakem k určování rodů larev mrchožroutů je délka a počet článků urogomf na konci zadečku. Jednočlánkovými urogomfy se vyznačují rody *Aclypea* a *Heterosilpha*, ostatní rody mají urogomfy dvoučlánkové (Anderson et Peck 1985).

3.4.6 Morfologie larvy tribu Nicrophorini

Larvy zástupců hrobaříků mají tělo slabě pigmentované, nesklerotizované a světlého zbarvení (Newton 1991; Růžička 1992). Larva je eruciformního typu (Obr. 2) (Newton 1991; Sikes 2016). Na hlavě je jeden pár stemmat (Anderson et Peck 1985). Tergity jsou malé se čtyřmi malými ostny (Ractlife 1996). Ventrity jsou většinou redukované. Ventrální sklerotizace na 9. a 10. abdominálním článku je důležitým znakem k určování druhů larev hrobaříků (Anderson et Peck 1985). Urogomfy na konci zadečku jsou jednočlánkové (Anderson et Peck 1985). Podrobnému popisu larev středoevropských druhů hrobaříků se zabývá práce Růžička 1992.



Obrázek 2: (a) larva tribu Silphini (b) larva tribu Necrophorini (Ractlife 1996)

3.5 Rod *Necrophila* Kirby et Spence

Rod *Necrophila* patřící do tribu Silphini zahrnuje v současnosti 15 druhů rozdělených do pěti podrodů; *Eusilpha* Semenov-Tian-Shanskij, 1890, *Calosilpha* Portevin, 1920, *Chrysilpha* Portevin, 1920 a *Deutosilpha* Portevin, 1920, které pochází z orientální a východní palearktické oblasti, a podrod *Necrophila* Kirby et Spence, 1828 pocházející z oblasti nearktické (Sikes 2008; Newton 2022).

Původně podrody *Deutosilpha* a *Calosilpha* byly klasifikovány v rámci rodu *Eusilpha* (Portevin 1920). Následně Portevin (1926) zařadil tyto dvě skupiny jako samostatné rody příbuzné k rodům *Chrysilpha* a *Eusilpha*. Poté teprve až Peck (2001) a Sikes (2008) zařadili podrody *Deutosilpha*, *Calosilpha*, *Chrysilpha* a *Eusilpha* do rodu *Necrophila*.

Ekologie tohoto rodu zatím není dostatečně prozkoumána. Nejvíce o ekologii, životní strategii a reprodukci je doposud známo o druhu *Necrophila* s. str. *americana*, který se vyskytuje v lesních biotopech i v otevřených prériích (Anderson 1982; Lingafelter 1995; Trumbo et Sikes 2021). Většina druhů patřící do podrodů *Calosilpha*, *Chrysilpha* a *Deutosilpha* jsou známé svou preferencí pro lesní biotopy, zatímco podrod *Eusilpha* se vyskytuje striktně v nelesních ekosystémech jako jsou louky, stepi či ruderální stanoviště (Jan Růžička, 2024, in verb.). Mezi druhy v rámci tohoto rodu může být také rozdílnost v potravní strategii. Zatímco většina druhů

je považována za nekrofágní, u druhů *N. (Eusilpha) japonica* (Motschulsky, 1862) a *N. (Eusilpha) jakowlewi* (Semenov-Tian-Shanski, 1891) byl zjištěn predátorský způsob života (Ikeda et al. 2008).

Studium potravních preferencí, životních strategií a vývoje druhů patřících do rodu *Necrophila* může být důležité z hlediska využití těchto informací ve forenzní entomologii, jelikož zejména obligátní nekrofágové jsou považováni za stěžejní bioindikátory k určení odhadu doby smrti u nalezených lidských těl (Amendt et al. 2004; Matuszewski 2011; Jakubec et al. 2021a). Druhy z rodu *Necrophila*, který mají potenciál k využití ve forenzní entomologii jsou například *N. (Calosilpha) brunnicollis* (Kraatz, 1877) a *Necrophila s. str. americana* (Jakubec et al. 2021b; Lutz et al. 2018).

3.5.1 Podrod *Deutosilpha* Portevin

Podrod *Deutosilpha* zahrnuje dva druhy *N. (D.) rufithorax* (Wiedemann, 1823) a *N. (D.) luciae* Růžička et Schneider, 2011. Tyto druhy jsou doposud známy z jihovýchodní Asie. Druh *N. (D.) rufithorax* je rozšířen na Indickém poloostrově, jižně od hlavního himalájského horského hřebene. Druh *N. (D.) luciae* byl pozorován v Thajsku, Laosu a v čínské provincii Sichuan (Růžička et Schneider 2011) (viz. příloha 1).

Dospělci tohoto podrodu se vyznačují zploštělým tělem a měří 17,5–22,5 mm. Hlava je černá s kovově modrým leskem, černým ústním ústrojím a žlutou gulou. Oči jsou malé a nijak výrazně nevyčnívající. Nápadným typickým znakem je oranžové pronotum šestihranného tvaru se čtyřmi černými skvrnami, které jsou uspořádány do půlkruhu (Obr. 3). Scutellum je velké s vlnitými bočními okraji. Elytra s nevýrazně vyvinutými dvěma žebry a naznačeným třetím vnějším žebrem jsou na bočních okrajích tmavě modrá až fialová a na ventrální straně jsou světle kovově modrá. Holeně (tibia) jsou zahnuté (výrazněji u samců) (Růžička et Schneider 2011).

3.5.2 Podrod *Chrysilpha* Portevin

V současnosti podrod *Chrysilpha* zahrnuje tři druhy; *N. (C.) formosa* (Laporte de Castelnau, 1832), *N. (C.) renatae* (Portevin, 1920), *N. (C.) viridis* (Motschulsky, 1861). Druh *N. (C.) formosa* má z těchto druhů největší rozšíření. Nachází se v Laosu, Vietnamu, Thajsku, Malajsií a na indonéských ostrovech Sumatra, Jáva a Bali. *N. (C.) renatae* je endemickým druhem na indonéském ostrově Sulawesi.

Endemický výskyt má také druh *N. (C.) viridis* na pěti Filipínských ostrovech (Růžička et al. 2012) (viz. příloha 2).

Délka těla dospělců tohoto podrodu se pohybuje od 12 do 18,5 mm. Tělo je zploštělé, kovově modré nebo zelené. Gula bývá někdy červenohnědá až žlutá. Oči jsou velké a nápadně vyčnívající po stranách hlavy. Pronotum šestihranného tvaru je kovově modré či zelenomodré s oranžovými pruhy po stranách (*N. (C.) renatae*, *N. (C.) viridis*) nebo je barva pronota oranžová se čtyřmi černými skvrnami uspořádanými do čtverce (*N. (C.) formosa*) (Obr. 4). Scutellum je malé s mírně zvlněnými bočními okraji. Elytra jsou zploštělá se třemi zřetelně vyvinutými žebry. Vnější žebra (třetí) jsou výrazně kratší. Holeně (tibiae) jsou téměř rovné, abdomen je slabě sklerotizovaný (Růžička et al. 2012).

3.5.3 Podrod *Calosilpha* Portevin

V současnosti se řadí do tohoto podrodu čtyři druhy; *N. (C.) brunnicollis*, *N. (C.) cyaniventris* (Motschulsky, 1870), *N. (C.) cyaneocephala* (Portevin, 1914) a *N. (C.) ioptera* (Kollar et Redtenbacher, 1844). Druh *N. (C.) brunnicollis* je rozšířen v Bhútánu, východní Číně, na dálném východě Ruska, v Koreji a Japonsku. Rozšíření druhu *N. (C.) cyaniventris* je známo od severní Indie přes Nepál, Thajsko, Vietnam až po Jižní Čínu. Druh *N. (C.) ioptera* se vyskytuje v Pákistánu, severní Indii a Nepálu. *N. (C.) cyaniventris* je endemickým druhem na ostrově Taiwan (Růžička et al. 2015) (viz. příloha 3).

Dospělci tohoto rodu měří 11,9–23,1 mm. Černá až kovově lesklá hlava je zploštělá s řadou dlouhých vzpřímených žlutých štětín za očima. Oči jsou malé a nepříliš nápadně vystupující. Pronotum je oválné až šestiúhelníkového tvaru a oranžové barvy (*N. (C.) cyaniventris*, *N. (C.) brunnicollis* a *N. (C.) cyaneocephala*) (Obr. 5). U druhu *N. (C.) ioptera*, se na pronotu objevuje nápadná hnědá až černá skvrna. Občas se tento znak také vyskytuje u druhu *N. (C.) brunnicollis* a *N. (C.) cyaneocephala*. Scutellum je malé se zvlněnými okraji. Elytra i scutellum mají hnědou až tmavě hnědou barvu s modře nebo zeleně kovovým leskem. Tři žebra na krovkách jsou výrazně vyvinuta stejně jako u podrodu *Chrysilpha*, avšak abdomen bývá silně sklerotizovaný (Růžička et al. 2015).

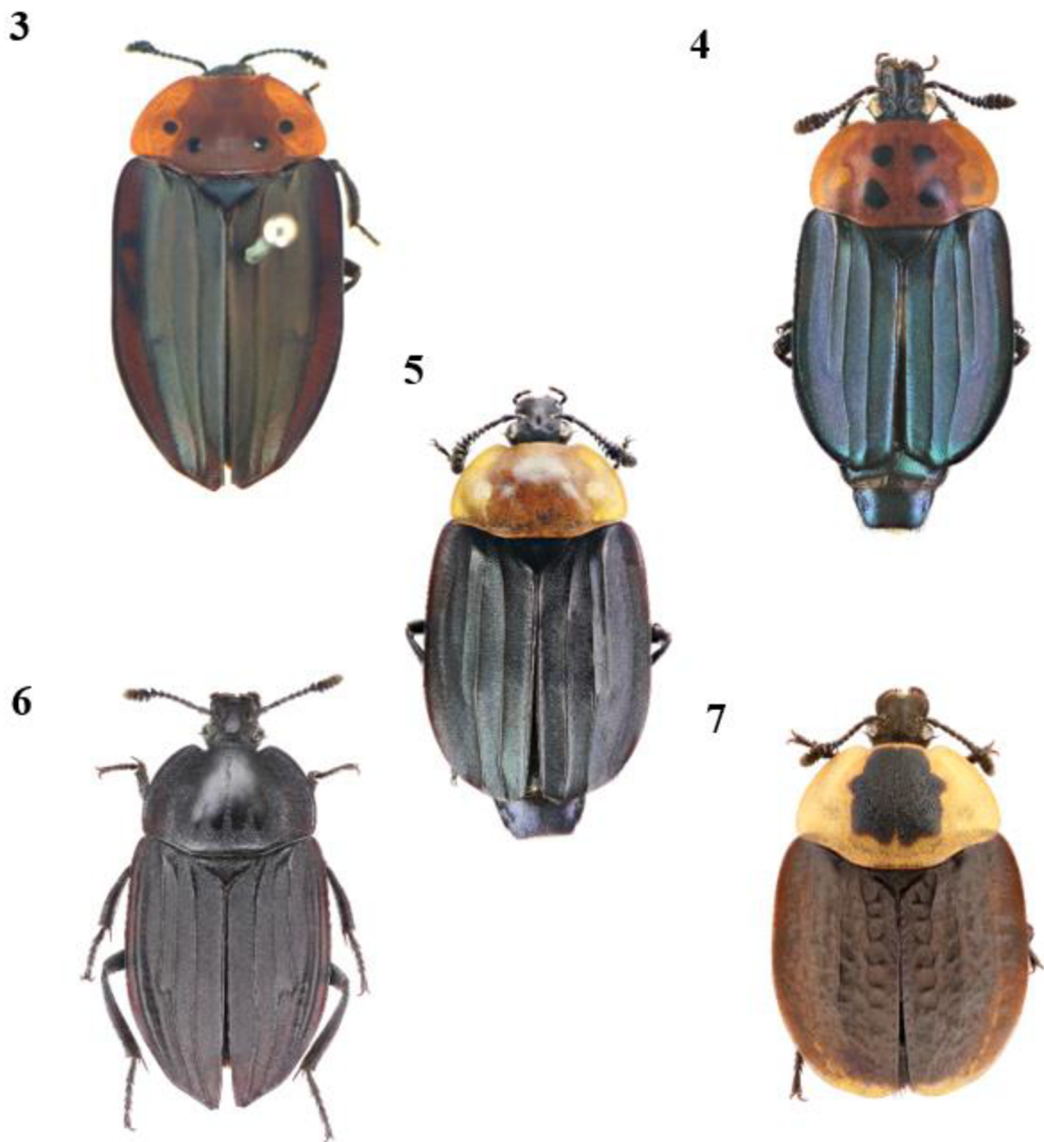
3.5.4 Podrod *Eusilpha* Semenov-Tian-Shanskij

Podrod *Eusilpha* v současnosti zahrnuje pět druhů; *N. (E.) cyaneocincta* (Fairmaire, 1878), *N. (E.) jakowlewi* (Semenov-Tian-Shanskij, 1891), *N. (E.) japonica* (Motschulsky, 1862), *N. (E.) subcaudata* (Fairmaire, 1888), *N. (E.) thibetana* (Fairmaire, 1894). Druhy *N. (E.) cyaneocincta* a *N. (E.) thibetana* jsou známé svým výskytem v kontinentální Číně v provincii Sečuán. Druh *N. (E.) jakowlewi* je rozšířen v severozápadní čínské provincii Gansu, jihovýchodní čínské provincii Zhejiang, na japonském ostrově Tsuchima a v Severní a Jižní Korei. Výskyt druhu *N. (E.) japonica* je znám v Japonsku, v Severní a Jižní Koreji a na ostrově Tchaj-wan. Druh *N. (E.) subcaudata* se nachází v čínské provincii Sečuán a v jižní čínské provincii Yunnan (Růžička 2015). Počet druhů tohoto podrodu není v současnosti zcela jasný. Některé druhy budou synonymizovány v budoucí publikované revizi podrodu *Eusilpha* (Jan Růžička, 2024, in verb.).

Dospělci tohoto podrodu se typicky vyznačují černým zbarvením těla a lesklou plochou na středu pronota (Obr. 6). Druhy se mezi sebou liší variabilitou ve struktuře žeber na krovkách a v umístění tečkování na pronotu (Jan Růžička, 2024, in verb.).

3.5.5 Podrod *Necrophila* Kirby et Spence

Do tohoto podrodu se řadí jediný druh *Necrophila* s. str. *americana*, který je široce rozšířen na celé východní polovině Spojených států amerických a v jižní Kanadě. Dospělci měří 13,8–20 mm a vyznačují se typickým žlutým štítem s jemným tečkováním a s centrální černou skvrnou (Obr. 7). Elytra jsou černá, výrazně tvarovaná, zakrývající téměř celý abdomen a jsou zakulacená u samců, zatímco u samic jsou elytra mírně protáhlá (Ratcliffe 1996).



Obrázek 3–7: Habitus *N. (Deutosilpha) rufithorax* (3), *N. (Chrysilpha) formosa* (4), *N. (Calosilpha) cyaniventris* (5), *N. (Eusilpha) jakowlewi* (6), *Necrophila* s. str. *americana* (7)

3.6 Principy používaných molekulární metod

Molekulární metody se stávají stále důležitějšími technikami ve výzkumu zabývající se taxonomií, fylogenezí a populační genetikou v rámci různých skupin organismů včetně hmyzu (např. Dobler et Müller 2000; Ikeda et al. 2008; Lagisz et al. 2010). Pro stanovení fylogenetických vztahů se využívají molekulární markery, jejichž porovnáním, lze sledovat vzájemné vztahy mezi organismy. Standardní postup pro získání těchto markerů je extrakce DNA, amplifikace vybraného markeru pomocí PCR, purifikace a sekvenování (Snustad et Simmons 2009). Níže jsou popsány obecné principy jednotlivých metod.

3.6.1. Extrakce DNA

Extrakce neboli izolace deoxyribonukleové kyseliny (DNA) je proces, při kterém dochází k oddělení DNA od proteinů, membrán a dalšího buněčného materiálu obsaženého v buňce pomocí chemických a fyzikálních metod. Tento proces je klíčový v různých analýzách v molekulární biologii a vyžaduje pečlivé zacházení s biologickým materiálem, aby se zabránilo možné kontaminaci vzorku. DNA může být izolována z jaderných, mitochondriálních či chloroplastových genomů a použití těchto typů DNA závisí na tom, k jaké analýze bude dále používána (Elkins 2013).

DNA může být získávána z různých typů tkání, krve či tělních tekutin (Gupta 2019). K izolaci DNA menších organismů, jako je hmyz, lze použít celého jedince nebo jeho část, například končetinu (Gilbert et al. 2007). DNA je izolována z jedinců, nebo jejich částí, uchovaných ve fixační kapalině, např. 96 % EtOH, který je vhodný k dlouhodobému uchovávání materiálu pro DNA analýzy (Novák et al. 2023). DNA lze získat také ze suchého materiálu, avšak u muzejních či sušených preparátů je míra degradace DNA vyšší, než např. u vzorků uchovávaných v mrazu či 96 % EtOH. (Tian et Yu 2013; Gilbert et al. 2007).

Extrakce DNA může být provedena manuálně nebo za použití dostupných komerčních sad (kitů) (Gupta 2019). Tyto kity, obsahující potřebné chemikálie, zkumavky, filtrační kolonky a návody k použití, jsou navrženy k efektivní izolaci DNA a usnadňují proces v laboratoři (Wang et al. 2019). Obecně se proces skládá ze tří základních kroků. Prvně probíhá lýza buněčné membrány za účelem uvolnění DNA do lýzačního roztoku. Poté dochází k enzymatickému štěpení (denaturaci) proteinů, aby byla DNA od proteinů oddělena. Následně probíhá izolace DNA od ostatních

buněčných složek a vymývání vzorku, aby byly odstraněny možné kontaminanty. Postup extrakce DNA se může částečně lišit v závislosti na používané metodě a typu vzorku (Elkins 2013).

3.6.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce neboli PCR (polymerase chain reaction) je inovativní metoda umožňující rychle amplifikovat danou sekvenci DNA na základě střídání teplot, a tím tak efektivně detekovat i nízké koncentrace DNA. Tato metoda se pro svou efektivitu a rychlost stala klíčovým nástrojem pro různé genetické analýzy (Mullis 1990).

PCR probíhá za použití specifických primerů, které na základě svých krátkých oligonukleotidových sekvencí určují oblast DNA (templát), která bude množena. K reakci je dále potřebný enzym DNA polymeráza, která syntetizuje nový řetězec DNA. Nejčastěji se používá Taq polymeráza, která je vysoce odolná vůči střídání teplot během reakce. Dále jsou potřebné nukleotidy, reakční pufr, hořčnaté ionty a voda (Alberts et al. 1998).

Reakce probíhá v zařízení termocykléru, který umožňuje měnit teploty velmi rychle, přesně a udržovat konkrétní dobu určených teplot v každé fázi reakce. Princip PCR je založen na opakujících se třech základních fázích, a to je denaturace, nasedání primerů (annealing) a extenze (elongace). První fáze denaturace probíhá za velmi vysokých teplot (okolo 95 °C), aby došlo k narušení vodíkových můstků mezi bázemi a dvouvláknový úsek DNA se rozpojil na jednovláknový. V druhé fázi annealingu probíhající za nižších teplot (50–65 °C) nasedají primery, které jsou komplementární k oběma koncům jednovláknového templátu. Třetí fáze elongace probíhá při teplotě 70–75 °C, ve které se dotváří nové vlákno DNA za pomoci DNA polymerázy a volných nukleotidů. Cyklus se následně několikrát opakuje, obvykle je potřeba 25–30 cyklů a vznikají exponenciálně se namnožené úseky určité části DNA (Alberts et al. 1998; Joshi et Deshpande 2010).

3.6.3 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je laboratorní technika, která se používá pro separaci a analýzu fragmentů DNA, RNA či proteinů. Základním principem je pohyblivost fragmentů v připraveném gelu, kde působí elektrické napětí. Systém se skládá ze dvou protilehlých nabitých elektrod (anody a katody). Princip spočívá v migraci daných fragmentů DNA, které mají záporný náboj směrem ke kladně nabitě katodě. Fragmety se pohybují v agarozovém gelu, který umožňuje oddělování fragmentů podle jejich velikosti, jelikož kratší fragmenty migrují rychleji než delší. Vzorky je zapotřebí mít v gelu ve stejné řadě, k tomu je používán plastový hřeben (Alberts et al. 1998; Lee et al. 2012).

Následná vizualizace výsledků probíhá pomocí UV světla. DNA je viditelná pod UV světlem, jelikož se při přípravě gelu přidává do roztoku ethidiumbromid, GelRed či jiné fluorescenční barvivo, které mají schopnost se navázat na molekulu DNA (Sigmon et Larcom 1996). V současnosti je více používán GelRed, jelikož se jedná o bezpečnější a šetrnější alternativu oproti ethidiumbromidu, který je vysoce toxický (Anjomshoa et Torkzadeh-Mahani 2016). Výsledkem jsou viditelné fragmenty rozdělené podle velikosti. Pro srovnání délek jsou používány referenční fragmenty tzv. DNA žebříky (DNA ladder), které mají stanovenou určitou známou velikost (Lee et al. 2012).

Jedním z hlavních způsobů využití gelové elektroforézy je kontrola PCR produktů, jelikož tato metoda spolehlivě umožňuje zjistit, zda amplifikace daných úseků DNA proběhla úspěšně a jestli mohou být vzorky využity pro následující analýzy. Například přítomnost více fragmentů v jedné linii značí nespecifickou amplifikaci či možnou kontaminaci vzorku. Také míra viditelnosti vzorků pod UV světlem představuje množství amplifikovaných fragmentů DNA (Alberts et al 1998; Isbir et al. 2013).

3.6.4 Sangerova metoda sekvenování DNA

Sekvenování DNA je proces stanovení přesné sekvence nukleotidů v molekule DNA. Určité sekvence DNA jsou klíčovou informací potřebnou k detekci genetických podobností, evoluční historie a různých fylogenetických analýz (Alberts et al 1998).

Sangerovo sekvenování je metoda založená na syntéze nového vlákna DNA za použití DNA polymerázy a modifikovaných dideoxyribonukleotidů (ddNTPs), které svým chemickým složením syntézu ukončují, jelikož postrádají OH skupinu. Dále je k reakci za potřebí primer stanovující začátek syntézy a nemodifikované deoxyribonukleotidy (dNTPs) potřebné k tvoření řetězců DNA. V průběhu reakce se tvoří různě dlouhé sekvence DNA, jelikož při náhodném přidání ddNTP do řetězce se syntéza zastaví (Sanger et al 1977). Fragментy se dále vizualizují na gelové či kapilární elektroforéze (Alberts et al. 1998). Jelikož ddNTP jsou barevně fluorescenčně značeny, je tímto způsobem možné stanovit přesné pořadí bazí daného fragmentu DNA (Smith et al. 1986).

3.7 Fylogenetické stromy

Fylogenetické stromy vycházejí z principu fylogeneze, která je založena na studiu příbuzenských vztahů mezi organismy, jejich evolučního vývoje a společných předků. Tyto vztahy hrají klíčovou roli k pochopení evoluční historie a v utváření druhové rozmanitosti na Zemi (Flegr 2005). Skrze rekonstrukce fylogenetických stromů lze vizualizovat, jak pravděpodobně jednotlivé druhy vznikaly oddělením od společného předka. Na základě různých metod lze odhadovat stáří jednotlivých linií a času, kdy se linie od sebe odštěpily (Hall 2018.). První fylogenetické stromy byly rekonstruovány na základě podobnosti a odlišnosti morfologických znaků mezi studovanými organismy. Avšak s příchodem různých genetických analýz jsou v současnosti častěji vytvářené fylogenetické stromy na základě molekulární dat (Flegr 2005; Hall 2018).

Molekulární fylogeneze je založena na principu porovnání pořadí nukleových kyselin DNA, RNA či aminokyselin v proteinech (Snustad et Simmons 2009). Sekvence se liší od společného předka, jelikož dochází k mutacím a některé mutace se mohou ve vyvíjející se populaci zafixovat, a to buď náhodně nebo skrze selekci. Aby bylo možné rekonstruovat fylogenetické stromy, je potřeba určit dané

předpoklady o procesu nukleotidových substitucí skrze různé typy evolučních modelů (Hall 2018).

Fylogenetický strom je složen z kořene, větví, vnitřních a vnějších uzlů (Hall 2018). Vnější uzly (listy) představují tzv. operační taxonomickou jednotku (Operational Taxonomic Unit OTU) (Flegr 2005). OTU představuje studovaný druh nebo taxon, které jsou v případě molekulárních analýz symbolizovány danými sekvencemi (Snustad et Simmons 2009). Tato informace obsahuje faktická data, ze kterých se odvozuje vše ostatní ve stromu. Vnitřní uzly symbolizují poslední hypotetické předky spojených OTU. Větve spojují uzly a kořen stromu symbolizuje nejpríbuznějšího společného předka všech ostatních OTU. Pokud se jedná o kladogram, kdy se nenachází u stromu časová osa, představují větve stromu pořadí, ve kterém se dané OTU diverzifikovali. U fylogramu, který je znázorňován s časovou osou, představují délky větví evoluční rychlost skrze vzniklé množství změn mezi předkem a potomkem (např. počet mutací) (Hall 2018).

Fylogenetické stromy mohou být zakořeněné nebo nezakořeněné. V samotných studovaných sekvencích není dostatek informací, které by mohly určit kořen stromu. Proto se k umístění kořene stromu používá vnější skupina (outgroup), která není předmětem studovaného OTU. Jedná se o jednu nebo více sekvencí, které se liší od sekvencí vnitřní skupiny více než sekvence vnitřní skupiny navzájem. Nezakořeněný strom představuje pouze vztahy mezi danými OTU, aniž by definovaly průběh evoluce (Snustad et Simmons 2009; Hall 2018).

Metody rekonstrukce fylogenetických stromů jsou založené buď na principu výpočetních algoritmů, na základě kterých je sestaven jeden fylogenetický strom, nebo na principu kritéria optimality (např. metody maximální parsimonie či maximální věrohodnosti), pomocí kterého je vygenerováno více stromů a optimální strom je vybrán na základě zvolených kritérií (Flegr 2005). Každá z metod má své výhody i omezení a při výběru metody lze zvážit určitá výkonnostní kritéria. Těmi může být například efektivnost, tedy míra toho, jak rychle metoda konverguje ke správnému stromu, výpočetní rychlost či robustnost (měřítko, do jaké míry metoda toleruje odchylky od daných předpokladů a zároveň zhotovuje nejvhodnější stromy) (Hillis et al. 1996).

Níže jsou popsány principy metod, které byly zvoleny k rekonstrukci fylogenetických stromů v praktické části, jelikož jsou tyto metody doposud považované za nejpřesnější (Hall 2005; Ogden et Rosenberg 2006).

3.7.1 Metoda maximum likelihood

Metoda maximum likelihood (maximální věrohodnosti) je statistická metoda, která pomáhá určit fylogenetický strom, ve kterém je daná topologie nejpravděpodobnější. Princip je založen na porovnávání různých modelů nukleotidových substitucí na konkrétním souboru dat pomocí výpočtu logaritmické pravděpodobnosti (Hall 2018). Vstupními daty jsou nukleotidové sekvence, přičemž pořadí větvení a délky větví stromů jsou neznámé. Proto je potřeba specifikovat konkrétní evoluční model určující způsob, jakým program bude propočítávat délky větví. Skrze metodu maximum likelihood je vyhodnocována pravděpodobnost, že zvolený evoluční model vygeneruje pozorované sekvence a fylogeneze jsou následně odvozeny na základě nalezení nejpravděpodobnějších stromů.

Tato metoda je velice efektivní, jelikož obvykle poskytuje odhady, které mají nižší rozptyl než u jiných metod (Swofford et al. 1996).

Jelikož nelze se stoprocentní pravděpodobností určit, že zrekonstruovaný fylogenetický strom je ten, který reprezentuje skutečný vývoj evoluce, používá se způsob vyhodnocení spolehlivosti těchto odhadů. Nejpoužívanější metodou pro odhad spolehlivosti fylogenetických stromů je metoda bootstrapping (Hall 2018). Jedná se o metodu používající opakovaný výběr (resampling). Princip spočívá v porovnání původního výsledku s výsledky získanými na základě náhodného výběru dat, které mají stejnou velikost jako původní datová sada. Výsledky jsou interpretovány jako hodnoty bootstrapu uváděné v procentech. Tato hodnota udává, v kolika procentech zrekonstruovaných stromů se vyskytuje na daném místě určitý uzel. Čím je vyšší hodnota u daného uzlu, tím je vyšší podpora v původních datech. Hodnota tedy vyjadřuje stupeň podpory pro přítomnost daného větvení ve studovaných datech, nelze ji vysvětlit jako míru pravděpodobnosti existence této větve v evoluční linii (Flegr 2005).

3.7.2 Bayesovská inference

Tato statistická metoda je založena na principu výpočtu posteriorní pravděpodobnosti, která udává pravděpodobnost nějakého stavu, který nastane za podmínky jiného jevu. Od metody maximum likelihood se liší tím, že hledá strom, který je nejpravděpodobnější vzhledem k vstupním datům a zvolenému substitučnímu modelu. Výsledkem je soubor více stromů, které jsou vyhodnoceny jako nejvíce pravděpodobné (Huelsenbeck et al. 2001).

Programy (např. BEAST či Mr. Bayes) používají algoritmy tzv. Markov chain Monte Carlo (MCMC) a zhotovují tak fylogenetické stromy tím, že nejprve vyberou nějaký strom jako výchozí bod a určí jeho pravděpodobnost. Následně částečně změní topologii stromu, vypočítají jeho pravděpodobnost a pokud je tato pravděpodobnost vyšší než u předchozího stromu, je tento strom přijat. Tento proces se opakuje několikrát za sebou do té doby, dokud se pravděpodobnost mezi stromy výrazně neliší. Poté je zjišťována konvergence dat, která představuje měřítko, jestli algoritmus dosáhl maxima či minima funkce, která byla řešena. Pokud dochází ke konvergenci dat, je řešení nalezeno a jsou vyhodnoceny shody nejpravděpodobnějších stromů (Hall 2018).

4. Metodika

4.1 Sběr dat

Na molekulární fylogenezi rodu *Necrophila* byly použity DNA sekvence jedenácti druhů z celkových patnácti druhů patřící do tohoto rodu. Vzorke pěti druhů byly poskytnuty od prof. Mgr. Jana Růžičky, Ph.D. jako lihové nebo suché preparáty, ze kterých se následně sekvenovaly vybrané úseky DNA.

Pro analýzu byly vybrány sekvence dvou mitochondriálních genů COI a 16S, které jsou označeny jedinečným identifikátorem pro každý druh (Tab. 1). Tyto geny byly zvoleny, jelikož sekvence mitochondriálních genů lze jednodušeji získat i ze suchého materiálu a zároveň geny COI a 16S jsou používány na této skupině brouků již v dřívějších publikacích (Ikeda et al. 2008; King et al. 2015; Růžička et al. 2023).

Na molekulární analýzu byl jako outgroup zvoleny dva druhy rodu *Thanatophilus* a dva druhy rodu *Necrodes* (Tab. 1) na základě publikovaných prací (např. Růžička 2023, Mahlerová 2021).

DNA sekvence deseti druhů (včetně outgroup) byly získány z databáze NCBI (Sayers et al. 2022). NCBI (The National Center for Biotechnology Information) je mezinárodní volně dostupná databáze, která je součástí knihovny United States National Library of Medicine sídlící v areálu americké agentury NIH (National Institutes of Health), a poskytuje informace o vědeckých datech především z oblasti molekulární biologie (Sayers et al. 2022). Na sběr dat pro analýzu byla využita databáze GenBank, ze které byly staženy potřebné nukleotidové sekvence. Dále v NCBI byl využit nástroj BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), který umožňuje identifikovat podobné sekvence skrze algoritmus, který porovnává sekvence nukleotidů nebo proteinů s daty v databázi (Obr. 8) (Altschul et al. 1990).

Tabulka 1: Přehled druhů použitých na molekulární fylogenezi. Sekvence genu, která je vybarvena zeleně byla získána z lihového nebo suchého vzorku. Modře označené sekvence byly získány z databáze NCBI.

ingroup					
Rod	Podrod	Druh	Popsal	Accession number	
				COI	16S
<i>Necrophila</i>	<i>Calosilpha</i>	<i>cyaniventris</i>	(Motschulsky, 1870)	JRUC_SIL_0058	JRUC_SIL_0058
<i>Necrophila</i>	<i>Calosilpha</i>	<i>cyaneocephala</i>	(Portevin, 1914)	JRUC_SIL_0068	JRUC_SIL_0068
<i>Necrophila</i>	<i>Calosilpha</i>	<i>brunnicollis</i>	(Kraatz, 1877)	AB770482	AB285550
<i>Necrophila</i>	<i>Eusilpha</i>	<i>subcaudata</i>	(Fairmaire, 1888)	JRUC_SIL_0061	JRUC_SIL_0061
<i>Necrophila</i>	<i>Eusilpha</i>	<i>japonica</i>	(Motschulsky, 1862)	AB606552	AB285539
<i>Necrophila</i>	<i>Eusilpha</i>	<i>jakowlewi</i>	(Semenov-Tian-Shanskij, 1891)	AB761601	AB285547
<i>Necrophila</i>	<i>Eusilpha</i>	<i>cyaneocincta</i>	(Fairmaire, 1878)	JRUC_SIL_0050	JRUC_SIL_0050
<i>Necrophila</i>	<i>Chrysosilpha</i>	<i>formosa</i>	(Laporte de Castelnau, 1832)	AB606437.1	AB285553
<i>Necrophila</i>	<i>Chrysosilpha</i>	<i>viridis</i>	(Motschulsky, 1861)	PP054246	PP038339
<i>Necrophila</i>	<i>Chrysosilpha</i>	<i>renatae</i>	(Portevin, 1920)	JURC_NR	JURC_NR
<i>Necrophila</i>	<i>Necrophila</i>	<i>americana</i>	(Linnaeus, 1758)	GU176343.1	AB285543
outgroup					
<i>Thanatophilus</i>		<i>sinautus</i>	(Fabricius, 1775)	AB606435	AB285548
<i>Thanatophilus</i>		<i>rugosus</i>	(Linnaeus, 1758)	AB606434	AB285546
<i>Necrodes</i>		<i>littoralis</i>	(Linnaeus, 1758)	AB606438	AB285536
<i>Necrodes</i>		<i>nigricornis</i>	Harold, 1875	AB606433	AB285544

BLAST® » blastn suite » results for RID-Z4574XHN016 Home Recent Results Saved Strategies Help

[< Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

Job Title **Nucleotide Sequence**

RID **Z4574XHN016** Search expires on 03-15 05:04 am [Download All](#)

Program **BLASTN** [Citation](#)

Database **nt** [See details](#)

Query ID **lcl|Query_3541065**

Description **None**

Molecule type **dna**

Query Length **515**

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) Show **100**

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Necrodes nigricornis mitochondrial gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	Necrodes nigric...	952	952	100%	0.0	100.00%	550	AB285544.1
<input checked="" type="checkbox"/> Necrodes nigricornis voucher NES37 mitochondrion, complete genome	Necrodes nigric...	924	924	100%	0.0	99.03%	18503	NC_071380.1
<input checked="" type="checkbox"/> Necrodes littoralis mitochondrion, complete genome	Necrodes littoralis	846	846	100%	0.0	96.31%	17830	NC_056196.1
<input checked="" type="checkbox"/> Necrodes littoralis mitochondrial gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	Necrodes littoralis	835	835	100%	0.0	95.92%	547	AB285536.1

Obrázek 8: Příklad vyhledávání podobných sekvencí v programu BLAST (Altschul et al. 1990)

4.2 Laboratorní část

4.2.1 Extrakce DNA

DNA byla izolována z nohy (druhého páru) daného druhu. Pro extrakci DNA byl využit komerčně využívaná kity Tissue DNA Isolation Kit (Geneaid) a NucleoSpin DNA Insect Mini kit (Macherey-Nagel), který je navržen pro účinnou izolaci DNA ze vzorků hmyzu. V laboratoři se postupovalo dle následujících kroků dle protokolu NucleoSpin DNA Insect, Mini kit (Macherey-Nagel):

Krok 1. Příprava vzorku

- Do mikrozkušavky typu Eppendorf se vložila končetina
- Bylo přidáno 100 µl elučního pufru (BE)

Krok 2. Lyzování vzorku

- Bylo přidáno 40 µl pufr MG a 10 µl Liquid proteinázy K
- Obsah zkumavky byl promíchán ve vortexu
- Zkumavka byla vložena do centrifugy na dobu 30 sekund při 11 000 x g

Krok 3. Vázání (DNA Binding)

- Byl přidán 600 µl pufr MG a následně se obsah zkumavky na 3 sekundy promíchal ve vortexu

- Poté proběhlo odstředování na 30 sekund při 11 000 x g
- Kolonka byla vložena do 2 ml sběrné zkumavky
- Do kolonky byl přidán 500–600 µl supernatantu
- Obsah zkumavky byl centrifugován na dobu 30 sekund při 11 000 x g
- Kolonka byla vložena do nové sběrné zkumavky.

Krok 4. Vymývání

- Do roztoku byl přidán 500 µl pufru BW
- Následně se roztok centrifugoval při 11 000 x g po dobu 30 sekund
- Proteklý roztok ve zkumavce byl vyhozen a následně bylo přidáno 500 µl pufru B5
- Zkumavka se centrifugovala při 11 000 x g po dobu 30 sekund
- Obsah zkumavky byl vylit a kolonka byla vložena do stejné zkumavky
- Dále proběhla centrifugace po dobu 30 sekund při 11 000 x g, aby se kolona vysušila

Krok 5. Eluce vysoce čisté DNA

- Zkumavku byla vyhozena a kolonka vložena do nové
- Do kolonky bylo přidáno 100 µl elučního pufru BE
- Roztok byl inkubován za pokojové teploty jednu minutu a následně centrifugován při 11 000 x g po dobu 30 sekund

Postup extrakce DNA na základě protokolu Tissue DNA Isolation Kit (Geneaid):

Krok 1. Disociace tkání

- Do zkumavky s končetinou bylo přidáno 200 µl GT pufru a 20 µl proteinázy K
- Obsah zkumavky byl promíchán na 5 sekund ve vortexu a následně inkubován při 60 °C po dobu 30 minut

Krok 2. Lyzování

- Do zkumavky bylo přidáno 200 µl GBT pufru
- Roztok byl na 5 sekund promíchán ve vortexu a následně inkubován při 60 °C po dobu 20 minut
- 200 µl elučního pufru bylo předehřáto na 60 °C

Krok 3. Binding

- Do roztoku byl přidán ethanol a obsah smíchán na 10 sekund ve vortexu
- Roztok byl následně přesunut do zkumavky s kolonou GS a dvě minuty centrifugován při 14 000 x g
- Kolonka byla umístěna do nové zkumavky

Krok 4. Vymývání

- Do kolonky byl přidáno 400 µl pufru W1
- Směs byla centrifugována 30 sekund a obsah zkumavky byl vylit a kolonka byla vložena do stejné zkumavky
- Dále proběhla centrifugace po dobu tří minut při 14 000 x g, aby se kolona vysušila

Krok 5. Eluce DNA

- Kolonka byla umístěna do čisté zkumavky a bylo přidáno 100 µl elučního pufru
- Roztok byl inkubován po dobu pěti minut a poté centrifugován na 30 sekund při 14 000 x g

4.2.2 Amplifikace fragmentů DNA pomocí PCR

Po extrakci DNA byla následně v laboratoři připravena směs na amplifikaci DNA. PCR premix obsahoval PPP master mix (Top bio, s.r.o.), primery, ddH₂O a DNA. PCR proběhla v celkovém objemu 26 µl [24 µl mastermixu : 2 µl templátové DNA].

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR v jednotkách µl

PPP Master mix (Top bio, s.r.o.)	12,5
ddH ₂ O	9,5
Primer forward	1
Primer reverse	1
DNA	2

Pro amplifikaci genu COI (cytochrom oxidáza I) byly využity forward primer C1-J-2183 alias Jerry a reverse primer TL2-N-3014 alias Pat. Pro amplifikaci genu 16S byl použit forward primer LR-J-12887 alias 16Sbr a reverse primer LR-N-13398 alias 16Sar (Simon et al 1994).

Tabulka 4: Primery použité k amplifikaci genu COI a 16S

Gen	Primer	Sekvence
mtDNA COI	C1-J-2183 (Jerry)	5' – CAACATTTATTTTGATTTTTTGG - '3
	TL2-N-3014 (Pat)	5' – TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA – '3
mtDNA 16S	LR-J-12887 (16Sbr)	5' – CTCCGGTTTGAAGCTCAGATCA - '3
	LR-N-13398 (16Sar)	5' – CGCCTGTTTATCAAAAACAT - '3

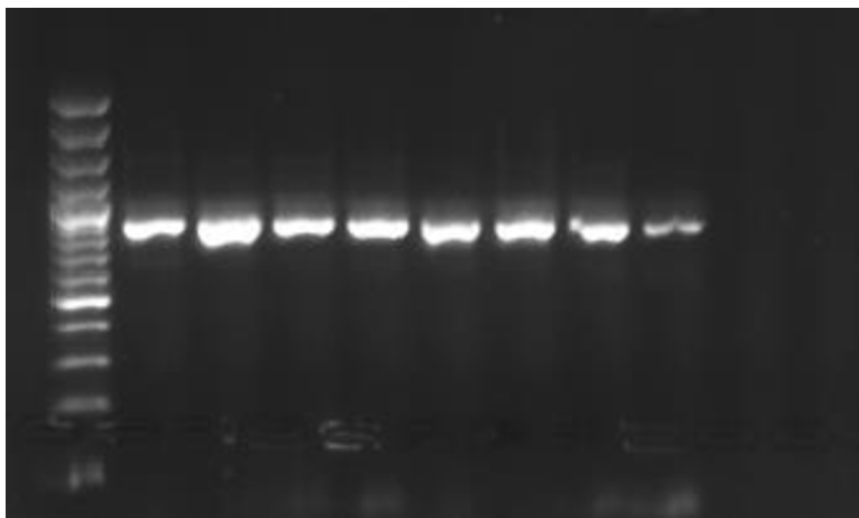
Tabulka 5: Cyklus teplot při PCR

Krok	COI (Jerry a Pat)	16S (16SBr a 16Sar)
Iniciální denaturace	95 °C na 3 min	95 °C na 3 min
Počet cyklů	40	40
Denaturace	95 °C na 30 s	95 °C na 30 s
Annealing	50 °C na 30 s	54,5 °C na 30 s
Extenze	72 °C na 45 s	72 °C na 45 s
Finální extenze	72 °C na 10 min	72 °C na 10 min

4.2.3 Vizualizace PCR produktu pomocí gelové elektroforézy

Pro kontrolu úspěšnosti amplifikace DNA byla využita vizualizace fragmentů pomocí gelové elektroforézy. Nejprve byl připraven 1 % agarozový gel. Do Erlenmeyerovy baňky bylo přidáno 80 ml 1x TBE a 0,8 g agarózy. Směs byla následně promíchána a zahřívána v mikrovlnné troubě, dokud se agaróza nerozpustila. Po ochlazení byl do baňky přidán ethidiumbromid (1,5 µl), který se váže do struktury DNA a díky vlastnostem emitace světla tak umožňuje vizualizaci DNA fragmentů pod UV světlem. Směs byla následně nalita do vany, do které byl poté vložen hřeben na vytvoření jamek. Po ztuhnutí vzniknul gel a do jamek byly napipetovány PCR produkty společně s DNA Gel Loading Dye (6X) (ThermoFisher Scientific) (1 µl Loading Dye: 5 µl PCR produktu). Elektroforéza proběhla pod napětím 90 V po dobu 20 minut.

Následně byl výsledek vizualizován pod UV světlem. Úspěšnost PCR potvrzuje jeden proužek u každého vzorku (Obr. 9)



Obrázek 9: Vizualizace fragmentů pomocí elektroforézy 1 – žebřík 100 bp, 2–8 PCR produkty COI, 9 pozitivní kontrola, 10 negativní kontrola

4.2.4 Přečištění PCR produktu a sekvenování DNA

Před sekvenáční PCR byly PCR produkty přečištěny a odstraněny možné kontaminanty, zbylé primery a nepoužité nukleotidy. K tomuto kroku byla použita enzymatická purifikace pomocí ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems™). Postupovalo se v laboratoři dle protokolu výrobce, s modifikací prodloužení doby inkubace. Do PCR zkumavky bylo přidáno 5 μ l PCR produktu a 2 μ l ExoSAP – IT. Směs se následně inkubovala ve 37 °C na 30 minut, tím došlo k odstranění zbývajících primerů a nukleotidů a proběhla následná inkubace na 80 °C po dobu 30 minut kvůli inaktivaci činidla ExoSAP – IT. Následně byla připravena směs na sekvenáční PCR do celkového objemu 8 μ l dle instrukcí sekvenáční laboratoře BIOCEV. Připravené vzorky byly poslány do výzkumného pracoviště BIOCEV (Vestec, Česká republika), kde proběhlo sekvenování vzorků metodou obousměrného Sangerova sekvenování.

4.3 Zpracování dat

4.3.1 Ověření kvality sekvence DNA

Data exportována ze sekvenátoru byla obdržena ve formátu ab1. Kvalita sekvenování jednotlivých markerů byla ověřena v programu Chromas v2.6.6. (Technelysium Pty Ltd). V programu lze ověřit kvalitu sekvence tím, že se nenachází více vrcholů korespondujících křivek na pozici jedné báze a vrcholy se vzájemně

4.4 Rekonstrukce fylogenetických stromů

4.4.1 Maximum likelihood

K rekonstrukci fylogenetického stromu pomocí zvolené metody maximum likelihood se pracovalo v softwaru IQ TREE webserver (Trifinopoulos *et al.* 2016) a FigTree v1.4.4 (Rambaut 2018). Nejprve byl do online softwaru IQtree nahrán FASTA soubor se sekvencemi (Obr. 12). Analýza byla provedena při 1000 bootstrap opakování (replicates) na základě substitučního modelu TIM+F+G4 vybraného podle BIC (Bayesian information criterion). Substituční model byl zvolen pomocí ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.* 2017) implementovaného v IQ TREE webserver (Trifinopoulos *et al.* 2016). Po zpracování dat a výpočtu byl výsledek vizualizován v programu Figtree v1.4.4 (Rambaut 2018), kde následně proběhla grafická úprava zrekonstruovaného fylogenetického stromu a vizualizace číselné podpory bootstrap na základě metody maximum likelihood.

The image shows the configuration interface of the IQ-TREE webserver, divided into several sections:

- Input Data:**
 - Alignment file: C:\fakepath\novy_COIa16S.fas
 - Use example alignment: Yes
 - Sequence type: Auto-detect, DNA, Protein, Codon, DNA->AA, Binary, Morphology
 - Partition file: This field is optional.
 - Partition type: Edge-linked, Edge-unlinked
- Substitution Model Options:**
 - Substitution model: Auto
 - FreeRate heterogeneity: Yes [+R]
 - Rate heterogeneity: Gamma [+G], Invar. sites [+I]
 - #rate categories: 4
 - State frequency: Empirical (from data), AA model (from matrix), ML-optimized, Codon F1x4, Codon F3x4
 - Ascertainment bias correction: Yes [+ASC]
- Branch Support Analysis:**
 - Bootstrap analysis: None, Ultrafast, Standard
 - Number of bootstrap alignments: 1000
 - Create .ufboot file: Yes (write bootstrap trees to .ufboot file)
 - Maximum iterations: 1000
 - Minimum correlation coefficient: 0.99
 - Single branch tests: Yes
 - SH-aLRT branch test: No, Yes, #replicates: 1000
 - Approximate Bayes test: Yes
- IQ-TREE Search Parameters:**
 - Perturbation strength: 0.5
 - IQ-TREE stopping rule: 100

Obrázek 12: Nastavení parametru a výpočtu dle metody ML v softwaru IQtree (Trifinopoulos *et al.* 2016)

4.4.2 Bayesovská analýza

K výpočtu Bayesovské analýzy se pracovalo v programu Mr. Bayes v3.2.7. (Ronquist et al. 2012). Do programu byl nahrán soubor sekvencí ve formátu NEXUS a následně byl spuštěn výpočet příkazem „execute“. Analýza byla provedena na základě substitučního modelu GTR+F+G4 (invgamma). Výpočet proběhl po dobu 10 000 000 generací a průměrná směrodatná odchylka rozdělení četností (split frequencies) dosáhla hodnoty 0.005562 (Obr. 13). Výsledky analýzy byly vizualizovány v programu Figtree v1.4.4. (Rambaut 2018).

```
Max standard deviation of split frequencies: 0.005562

Continue with analysis? (yes/no): no

Analysis completed in 6 hours 35 mins 44 seconds
Analysis used 23744.12 seconds of CPU time
Likelihood of best state for "cold" chain of run 1 was -4306.43
Likelihood of best state for "cold" chain of run 2 was -4306.43

Acceptance rates for the moves in the "cold" chain of run 1:
With prob. (last 100) chain accepted proposals by move
26.3 % ( 24 %) Dirichlet(Revmat)
29.5 % ( 24 %) Slider(Revmat)
25.1 % ( 29 %) Dirichlet(Pi)
25.8 % ( 32 %) Slider(Pi)
26.8 % ( 20 %) Multiplier(Alpha)
27.2 % ( 25 %) Slider(Pinvar)
8.1 % ( 0 %) Dirichlet(Ratemultiplier)
30.8 % ( 27 %) Slider(Ratemultiplier)
1.0 % ( 0 %) ExtSPR(Tau,V)
0.4 % ( 0 %) ExtTBR(Tau,V)
1.3 % ( 0 %) NNI(Tau,V)
2.3 % ( 1 %) ParsSPR(Tau,V)
24.6 % ( 24 %) Multiplier(V)
29.8 % ( 25 %) Nodeslider(V)
25.6 % ( 25 %) TLMultiplier(V)

Acceptance rates for the moves in the "cold" chain of run 2:
With prob. (last 100) chain accepted proposals by move
26.2 % ( 28 %) Dirichlet(Revmat)
29.5 % ( 22 %) Slider(Revmat)
25.2 % ( 28 %) Dirichlet(Pi)
25.6 % ( 30 %) Slider(Pi)
26.4 % ( 23 %) Multiplier(Alpha)
27.2 % ( 31 %) Slider(Pinvar)
6.7 % ( 34 %) Dirichlet(Ratemultiplier)
30.8 % ( 30 %) Slider(Ratemultiplier)
0.9 % ( 1 %) ExtSPR(Tau,V)
0.4 % ( 0 %) ExtTBR(Tau,V)
1.2 % ( 3 %) NNI(Tau,V)
2.2 % ( 0 %) ParsSPR(Tau,V)
25.8 % ( 25 %) Multiplier(V)
30.0 % ( 23 %) Nodeslider(V)
25.5 % ( 21 %) TLMultiplier(V)

Chain swap information for run 1:
-----
      1      2      3      4
1 |          0.11  0.01  0.00
2 | 1665102          0.28  0.07
3 | 1667640 1667004          0.46
4 | 1667162 1665969 1667043

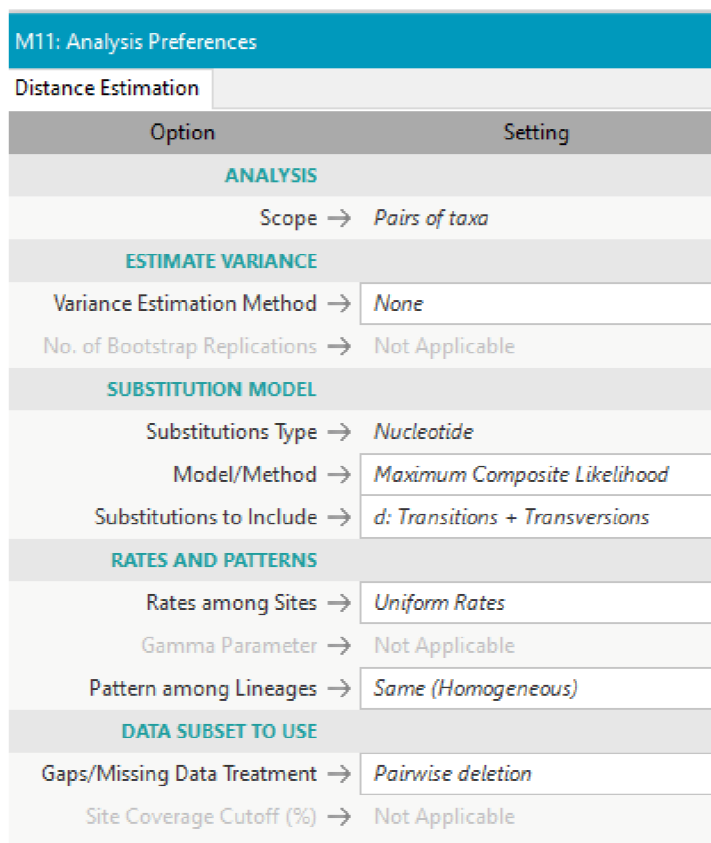
Chain swap information for run 2:
-----
      1      2      3      4
1 |          0.11  0.01  0.00
2 | 1667032          0.31  0.08
3 | 1666341 1666228          0.45
4 | 1665768 1667586 1667045
```

Obrázek 13: Výpočet Bayesiánské analýzy v programu Mr. Bayes v3.2.7. (Ronquist et al. 2012)

4.5 Ověření druhové validity

K ověření druhové validity byl použit výpočet genetické vzdálenosti (Compute pairwise distances) v programu MEGA v11.0.13. (Tamura et al. 2021). Do programu byl nahrán soubor se zarovnanými sekvencemi genů COI zájmových druhů. Analýza byla provedena pomocí modelu Maximum Composite Likelihood (Tamura et al. 2004) a následný výpočet proběhl na základě nastavených parametrů (Obr. 14). Výsledné hodnoty genetických vzdáleností u každého druhu byli promítnuty do tabulky (viz. příloha 4). Hodnoty představují počet rozdílů mezi dvěma porovnávanými sekvencemi. Čím větší je hodnota, tím více jsou sekvence navzájem odlišné a pokud je tato hodnota rovna nule, sekvence jsou identické (Hall 2018).

Pro ověření druhové validity byla spočítána průměrná hodnota pro každý podrod. Pokud jsou výsledné průměry nižší v rámci daného podrodu než mezi podrody navzájem, mohou být považovány dané druhy za validní.



Option	Setting
ANALYSIS	
Scope →	<i>Pairs of taxa</i>
ESTIMATE VARIANCE	
Variance Estimation Method →	<i>None</i>
No. of Bootstrap Replications →	<i>Not Applicable</i>
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type →	<i>Nucleotide</i>
Model/Method →	<i>Maximum Composite Likelihood</i>
Substitutions to Include →	<i>d: Transitions + Transversions</i>
RATES AND PATTERNS	
Rates among Sites →	<i>Uniform Rates</i>
Gamma Parameter →	<i>Not Applicable</i>
Pattern among Lineages →	<i>Same (Homogeneous)</i>
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment →	<i>Pairwise deletion</i>
Site Coverage Cutoff (%) →	<i>Not Applicable</i>

Obrázek 14: Nastavení parametrů pro výpočet genetických vzdáleností v programu MEGA v11.0.13. (Tamura et al. 2021)

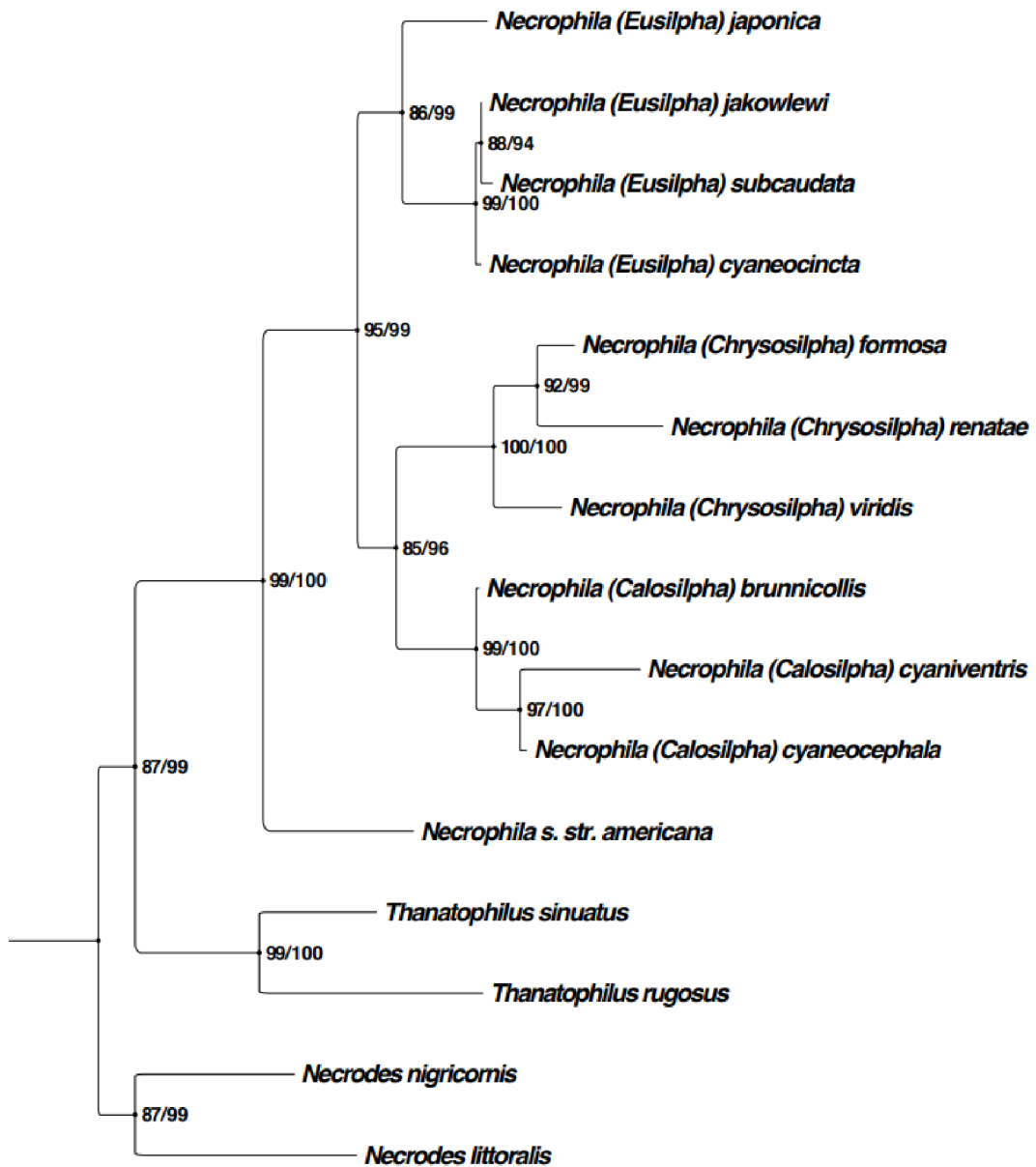
5. Výsledky

Molekulární fylogeneze rodu *Necrophila* byla celkově analyzována na základě patnácti druhů včetně čtyř druhů zvolených jako outgroup. Rod *Necrophila* je monofyletickou skupinou s vysokou podporou (Obr. 15) a jednotlivé podrody (*Calosilpha*, *Chrysosilpha*, *Eusilpha*) jsou také monofyletické. Fylogenetický strom, zrekonstruovaný na základě mitochondriálních genů COI (607 bp), 16S (519 bp) a výpočtu dle metod maximum likelihood a Bayesovské analýzy, zobrazuje následující topologii podrodů: *Necrophila* + (*Eusilpha* + (*Calosilpha* + *Chrysosilpha*)) (Obr.10). Podrod *Necrophila* je zobrazen jako nejvíce oddělená linie od ostatních podrodů. Podrody *Calosilpha* a *Chrysosilpha* jsou vyhodnoceny jako sesterské linie a podrod *Eusilpha* je příbuznou linií k těmto podrodům. Jednotlivé klastry jsou silně podpořeny na základě vypočtené hodnoty bootstrapu (ML) a posteriorní pravděpodobnosti (BI) (Obr. 15).

Druhová validita byla ověřena skrze výpočet genetických vzdáleností mezi každou dvojicí druhů. Průměrné výsledné hodnoty jsou nižší v rámci podrodů než mezi podrody navzájem (Tab. 6). Nejnížší hodnota genetické vzdálenosti (0,0318) byla vypočtena v rámci podrodu *Calosilpha*. Nejvíce geneticky odlišné jsou mezi sebou podrody *Necrophila* a *Chrysosilpha*, jelikož jsou průměrné hodnoty vzdáleností nejvyšší (0,1194). Mezi druhy rodu *Necrophila* a druhy zvolenými jako outgroup byly hodnoty genetických vzdáleností nejvyšší (viz. příloha 4). Nejnížší hodnota genetické vzdálenosti (0,0036) v rámci podrodu byla vypočtena mezi druhy *N. (Eusilpha) jakowlewi* a *N. (E.) subcaudata* (viz. příloha 4).

Tabulka 6: Průměrné hodnoty genetických vzdáleností mezi podrody rodu *Necrophila*

Podrody	<i>Calosilpha</i>	<i>Eusilpha</i>	<i>Chrysosilpha</i>	<i>Necrophila</i>
<i>Calosilpha</i>	0,0318			
<i>Eusilpha</i>	0,0826	0,0332		
<i>Chrysosilpha</i>	0,0758	0,0951	0,0472	
<i>Necrophila</i>	0,1003	0,0946	0,1194	0



Obrázek 15: Fylogenetický strom vypočítaný na základě metod maximum likelihood a Bayesovské inference. Hodnoty představují podpory jednotlivých uzlů na základě hodnot bootstrapu (ML)/ posteriorní pravděpodobnosti (BI).

6. Diskuse

6.1 Faktory ovlivňující výsledky

Výsledná topologie fylogenetického stromu může být spojena s různými faktory. K tomu, aby molekulární fylogeneze tohoto rodu byla co nejvěrohodnější, je zapotřebí dostatek validních dat. V této analýze určuje množství dat počet druhů a délky sekvencí vybraných mitochondriálních genů. Ikeda et al. (2008) či King et al. (2015), které se zabývají molekulární fylogenezí podčeledi Silphinae, zahrnují do svých publikací mitochondriální i jaderné geny. S využitím například dalšího jaderného genu, který by byl do této analýzy zahrnut, mohla být interpretace výsledků podpořena na základě většího počtu molekulárních znaků.

Výsledný počet druhů, které bylo možné do analýzy zahrnout, závisel na tom, zda byl druh k dispozici jako preparát, v jakém byl preparát stavu či zda byla potřebná sekvence daných genů již v databázi NCBI. K rekonstrukci fylogenetických vztahů v rámci celého rodu *Necrophila* by bylo vhodné zahrnout do analýzy druhy z podrodu *Deutosilpha*, které zatím nejsou zahrnuty v žádné studii zabývající se fylogenetickými vztahy v rámci podčeledi Silphinae. Při zpracování praktické části této práce byl k analýze poskytnut druh *Necrophila (Deutosilpha) rufithorax*, avšak sekvence genů COI a 16S tohoto druhu se nepodařilo získat. To může být pravděpodobně tím, že se jednalo o suchý a poměrně starý preparát, ze kterého je těžší dané sekvence získat, jelikož část dané DNA může být degradována a zachovává se hůře než v případě lihových vzorků. V takových případech je možné použít novější metody sekvenování (např. Next-generation sequencing), skrze které by bylo pravděpodobně možné dané sekvence získat, avšak tato metoda je dražší a nebyl na ni dostatek financí.

6.2 Evoluční a geografické souvislosti

Klastry, které oddělují jednotlivé podrody, znázorňují odštěpení linií na základě genetických odlišností. Tyto genetické rozdíly mezi jednotlivými podrody mohou být způsobeny například geografickým vymezením daných podrodů. To je především znatelné u podrodu *Necrophila*, který je rozšířen ve východní oblasti Severní Ameriky, oproti tomu ostatní podrody jsou typické pro jihovýchodní a východní Asii. To může být důvod, proč je podrod *Necrophila* ve výsledném fylogenetickém stromu nejvíce oddělen od ostatních podrodů. Zároveň geografické rozšíření druhu

Necrophila s. str. americana by mohlo značit, že tato separátní linie je evolučně starší z důvodu možné historické kolonizace přes Beringovu úžinu. Pokud by byly známy druhy vyskytující se v západní části Severní Ameriky, byly by evolučně mladší a více příbuzné asijským druhům.

Asijské druhy jsou ve výsledném fylogenetickém stromu uskupeny do třech linií podle podrodů, z toho jednu linii tvoří podrod *Eusilpha* a dvě sesterské linie podrodů *Chrysozilpha* a *Calosilpha*. Tato topologie může souviset s geografickým rozšířením podrodů a také s jejich morfologií, jelikož podrody *Calosilpha* a *Chrysozilpha* jsou si více morfologicky podobné oproti podrodu *Eusilpha*. Zároveň podrody *Calosilpha* a *Eusilpha* zahrnují druhy, které se vyskytují v kontinentální Asii, oproti tomu druhy z podrodu *Chrysozilpha* jsou typické pouze pro orientální oblast. Tato geografická a výsledná fylogenetická souvislost by mohla značit, že východní část kontinentální Asie byla historicky kolonizována těmito dvěma liniemi nezávisle. Avšak k odhadům stáří jednotlivých linií by bylo zapotřebí využití dalších analýz, které by pomohly určit souvislosti s možnými směry kolonizace a evoluční historií tohoto rodu.

6.3 Porovnání výsledků s dalšími studii

Druhy patřící rodu *Necrophila* byly dosud zkoumané především na základě morfologických znaků (Růžička et al. 2011; Růžička et al. 2012; Růžička et al. 2015), skrze které lze studovat fylogenetické vztahy a definovat nové druhy. Tyto výsledky se mohou či nemusí vždy shodovat s molekulárními analýzami. To je například znatelné u druhů podrodu *Chrysozilpha*, kde výsledný klastr zobrazuje jako nejvíce příbuzný druh *N. (C.) formosa* s druhem *N. (C.) renatae*. Oproti tomu Růžička et al. (2012) v taxonomické revizi zabývající se tímto podrodem, udává na základě morfologických znaků jako nejvíce příbuzný druh *N. (C.) renatae* s druhem *N. (C.) viridis*.

U podrodu *Calosilpha* stanovil Růžička et al. (2015) na základě shodnosti morfologických znaků dvě linie, ve kterých je nejvíce podobný druh *N. (C.) brunnicollis* s druhem *N. (C.) cyanocephala* a druhou linií tvoří druh *N. (C.) cyaniventris* s *N. (C.) ioptera*. Avšak na základě molekulárních znaků jsou nejvíce příbuzné druhy *N. (C.) cyanocephala* a *N. (C.) cyaniventris*. Zároveň do této molekulární analýzy není zahrnut druh *N. (C.) ioptera*, jelikož nebyl tento druh jako

preparát k dispozici, a tudíž je tím tato interpretace fylogenetických vztahů značně ovlivněna.

Shodnost morfologických a molekulárních znaků může být také znatelná u podrodu *Eusilpha*. Výraznou genetickou podobnost mezi sebou vykazují druhy *N. (E.) jakowlewi* a *N. (E.) cyaneocincta* na základě vypočtené hodnoty genetické vzdálenosti (0,0049) a zároveň také druhy *N. (E.) jakowlewi* a *N. (E.) subcaudata* (0,0036). Tyto podobnosti znázorňuje i délka linií ve fylogenetickém stromu (Obr. 15). V budoucí taxonomické revizi podrodu *Eusilpha*, budou pravděpodobně na základě podobnosti morfologických znaků synonymizovány druhy *N. (E.) jakowlewi* a *N. (E.) cyaneocincta* (Jan Růžička, 2024, in verb.). Dle mé výsledné analýzy jsou tyto druhy mezi sebou značně podobné i na základě molekulárních znaků (viz. příloha 4).

Fylogenetické vztahy v rámci rodu *Necrophila* jsou doposud nejasné, jelikož studie zabývající se molekulární fylogenezí podčeledi Silphinae zahrnují do svých analýz pouze některé druhy z rodu *Necrophila*. Dobler et al. (2000) publikovali první molekulární fylogenezi podčeledi Silphinae, avšak součástí této analýzy je pouze druh *Necrophila s. str. americana*. Doposud nejvíce druhů rodu *Necrophila* zahrnul ve své molekulární analýze Ikeda et al. (2008), který poprvé stanovil topologii *Necrophila* + (*Eusilpha* + (*Calosilpha* + *Chrysosilpha*)), která je shodná s výsledky v této práci. Avšak Ikeda et al. (2008) zahrnul do analýzy pouze šest druhů rodu *Necrophila*, ve které je obsažen i druh *N. (C.) kurosawai*, který později Růžička et al. (2015) v taxonomické revizi synonymizoval s druhem *N. (C.) brunnicollis*. Fylogenetické vztahy dále studoval King et al. (2015), který se především zabýval australskými druhy podčeledi Silphinae. King et al. (2015) zahrnul do analýzy i čtyři druhy rodu *Necrophila*, které značí také shodnou topologii podrodů *Eusilpha* + (*Calosilpha* + *Chrysosilpha*).

Celkově se tedy fylogenetické postavení podrodů v rámci rodu *Necrophila* shoduje s již uvedenými studiemi, avšak výsledná molekulární fylogeneze v této práci zahrnuje druhy z rodu *Necrophila*, které doposud do ostatních molekulárních analýz zahrnuté nebyly.

7. Závěr

Jedním z cílů v této diplomové bylo sepsat literární rešerši o ekologii a evoluci žijících druhů podčeledi Silphiane. Toto téma je zpracováno v první polovině rešerše a cíl považuji za splněný. Avšak na základě dostupných studií je patrné, že ekologie tribu Nicrophorini je zatím prozkoumána o něco více než u tribu Silphini. Zejména doposud chybí podrobnější studie o ekologii a evoluci zájmového rodu *Necrophila*.

V této diplomové práci byly za využití molekulárních metod rekonstruovány fylogenetické vztahy rodu *Necrophila*. Výsledný fylogenetický strom je sestavený na základě vybraných mitochondriálních markerů zájmových druhů a zvolených substitučních modelů. Skrze tuto molekulární analýzu může být rod *Necrophila* včetně zahrnutých podrodů považován za monofyletickou skupinu na základě vysoké podpory jednotlivých uzlů ve fylogenetickém stromu. Zároveň jako u všech fylogenetických analýz je výsledná topologie stromu ovlivněna různými faktory, které by měly být brány v úvahu při interpretaci výsledných fylogenetických vztahů. Zároveň skrze použití různých evolučních modelů lze průběh evoluce studovaných taxonomických linií odhadovat jen s určitou pravděpodobností. I přesto, že do výsledného fylogenetického stromu nemohlo být zahrnuto všech pět podrodů rodu *Necrophila*, jsou ve výsledné molekulární analýze rekonstruovány fylogenetické vztahy v rámci většiny druhů patřících do tohoto rodu a cíl této diplomové práce považuji za splněný.

Výsledná molekulární fylogeneze rodu *Necrophila* přispívá k lepšímu porozumění příbuzenských vztahů v rámci daných druhů a podrodů, a tím vytváří základ pro budoucí práce, které se budou zabývat evoluční historií a fylogeografií této skupiny brouků. Ta je důležitá jak z hlediska dekompozičních procesů v přírodě, tak i v uplatnění ve forenzní entomologii.

8. Seznam literatury

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Walter P., 1998: Essential Cell Biology. Garland Publishing Inc., New York.

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. et Lipman D. J., 1990: Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403–410.

Amendt J., Krettek R. et Zehner R., 2004: Forensic entomology. *Naturwissenschaften* 91: 51–65.

Anderson R. S., 1982: Resource partitioning in the carrion beetle (Coleoptera: Silphidae) fauna of southern Ontario: ecological and evolutionary considerations. *Canadian Journal of Zoology* 60: 1314–1325.

Anderson R. S. et Peck S. B., 1984: Bionomics of Nearctic species of *Aclypea* Reitter: Phytophagous "carrion" beetles (Coleoptera: Silphidae). *Pan-Pacific Entomologist* 60: 248–255.

Anderson R. S. et Peck S. B., 1985: The carrion beetles of Canada and Alaska (Coleoptera: Silphidae and Agyrtidae). *The insects and arachnids of Canada, Part 13. Biosystematics Research Institute, Ottawa.*

Anjomshoa M. et Torkzadeh-Mahani M., 2016: Competitive DNA-binding studies between metal complexes and GelRed as a new and safe fluorescent DNA dye. *Journal of Fluorescence* 26: 1505–1510.

Byrd H. et Castner J. L., 2001: *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations.* CRC Press, Boca Raton.

Cai C. Y., Thayer M. K., Engel M. S., Newton A. F., Ortega-Blanco J., Wang B. et Huang D. Y., 2014: Early origin of parental care in Mesozoic carrion beetles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 14170–14174.

Cai C., Tihelka E., Giacomelli M., Lawrence J. F., Ślipiński A., Kundrata R., Yamamoto S., Thayer M.K., Newton A. F., Leschen R. A. B., Gimmel M. L., Lü L., Engel M. S., Bouchard P., Huang D., Pisani D. et Donoghue P. C., 2022: Integrated phylogenomics and fossil data illuminate the evolution of beetles. *Royal Society Open Science* 9: 211771.

- Dekeirsschieter J., Verheggen F. J., Haubruge E. et Brostaux Y., 2011: Carrion beetles visiting pig carcasses during early spring in urban, forest and agricultural biotopes of Western Europe. *Journal of Insect Science* 11: 1–13.
- Dobler S. et Müller J. K., 2000: Resolving phylogeny at the family level by mitochondrial cytochrome oxidase sequences: phylogeny of carrion beetles (Coleoptera, Silphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 390–402.
- Eggert A. K. et Müller J. K., 1992: Joing breeding in female burying beetles. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 31: 237–242.
- Elkins K. M., 2013: *Forensic DNA Biology: A Laboratory Manual*. Academic Press, Towson.
- Flegr J., 2005: *Evoluční biologie*. Academia, Praha.
- Gibbs J. P. et Stanton E. J., 2001: Habitat fragmentation and arthropod community change: carrion beetles, phoretic mites, and flies. *Ecological Applications* 11: 79–85.
- Gilbert M. T. P., Moore W., Melchior L. et Worobey M., 2007: DNA Extraction from Dry Museum Beetles without Conferring External Morphological Damage. *PLoS One* 2: e272.
- Grebennikov V. V. et Newton A. F., 2012: Detecting the basal dichotomies in the monophylum of carrion and rove beetles (Insecta: Coleoptera: Silphidae and Staphylinidae) with emphasis on the Oxytelinae group of subfamilies. *Arthropod Systematics & Phylogeny* 70: 133–165.
- Gupta, N., 2019: DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology* 36: 116–117.
- Hall T., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Hall B. G., 2005: Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22: 792–802.
- Hall B. G., 2018: *Phylogenetic trees made easy: a how-to manual*. Oxford University Press, New York.

- Hansen M., 1997: Phylogeny acid classification of the staphyliniform beetle families (Coleoptera). *Biologiske Skrifter* 48: 1–339.
- Hillis D. M., Moritz C. et Mable B. K., 1996: Applications of molecular systematics: The state of the field and a look to the future. In: Hillis D. M., Moritz C. et Mable B. K. (eds.): *Molecular systematics*, Sinauer Associates, Massachusetts.
- Huelsenbeck J. P., Ronquist F., Nielsen R. et Bollback J. P., 2001: Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310–2314.
- Hůrka K., 2005: Brouci České a Slovenské republiky. Kabourek, Zlín.
- Ikeda H., Kubota K., Kagaya T. et Abe T., 2007: Flight capabilities and feeding habits of silphine beetles: are flightless species really “carrion beetles”? *Ecological Research* 22: 237–241.
- Ikeda H., Kagaya T., Kubota K. et Abe T., 2008: Evolutionary relationships among food habit, loss of flight, and reproductive traits: life-history evolution in the Silphinae (Coleoptera: Silphidae). *Evolution* 62: 2065–2079.
- Jakubec P. et Růžička J., 2015: Is the type of soil an important factor determining the local abundance of carrion beetles (Coleoptera: Silphidae)? *European Journal of Entomology* 112: 747–754.
- Jakubec P., Kadlec J. et Šípek P., 2021a: Standardized laboratory methodology for the evaluation of foraging strategies in necrophilous beetles: a case study of *Necrophila* (*Calosilpha*) *brunnicollis* (Coleoptera: Silphidae). *Journal of Medical Entomology* 58: 40–46.
- Jakubec P., Qubaiová J., Novák M. et Růžička J., 2021b: Developmental biology of forensically important beetle, *Necrophila* (*Calosilpha*) *brunnicollis* (Coleoptera: Silphidae). *Journal of Medical Entomology* 58: 64–70.
- Joshi M. et Deshpande J., 2010: Polymerase chain reaction. *International Journal of Biomedical Research* 2: 8197.
- Kalyaanamoorthy S., Minh B. Q., Wong T. K. F., Haeseler A. et Jermini L. S., 2017: ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14: 587–589.

- King J. E., Riegler M., Thomas R. G. et Spooner-Hart R. N., 2015: Phylogenetic placement of Australian carrion beetles (Coleoptera: Silphidae). *Austral Entomology* 54: 366–375.
- Lagisz M., Port G. et Wolff K., 2010: A cost-effective, simple and high-throughput method for DNA extraction from insects. *Insect Science* 17: 465–470.
- Lawrence J. F. et Newton A. F., J., 1982: Evolution and classification of beetles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 261–290.
- Lawrence J.F. et Ślipiński A., 2013: *Australian Beetles Volume 1: Morphology, Classification and Keys*. CSIRO, Collingwood.
- Lee P., Costumbrado J., Hsu C. et Kim Y., 2012: Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* 62: 3923.
- Lingafelter, S. W., 1995: Diversity, habitat preferences, and seasonality of Kansas carrion beetles (Coleoptera: Silphidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* 68: 214–223.
- Lutz L., J. Amendt et G. Moreau, 2018: Carcass concealment alters assemblages and reproduction of forensically important beetles. *Forensic Science International* 291: 124–132.
- Mahlerová K., Jakubec P., Novák M. et Růžička J., 2021: Description of larval morphology and phylogenetic relationships of *Heterotemna tenuicornis* (Silphidae). *Scientific Reports* 11: 16973.
- Matuszewski S., 2011: Estimating the pre-appearance interval from temperature in *Necrodes littoralis* L. (Coleoptera: Silphidae). *Forensic Science International* 21: 180–188.
- Matuszewski S., Frątczak K., Konwerski S., Bajerlein D., Szpila K., Jarmusz M. et Mądra A., 2016: Effect of body mass and clothing on carrion entomofauna. *International Journal of Legal Medicine* 130: 221–232.
- Matuszewski S. et Mądra-Bielewicz A., 2022: Competition of insect decomposers over large vertebrate carrion: *Necrodes* beetles (Silphidae) vs. blow flies (Calliphoridae). *Current Zoology* 68: 645–656.

- McKenna D. D., Farrell B. D., Caterino M. S., Farnum C. W., Hawks D. C., Maddison, D. R. et Thayer M. K., 2015: Phylogeny and evolution of Staphyliniformia and Scarabaeiformia: forest litter as a stepping stone for diversification of nonphytophagous beetles. *Systematic Entomology* 40: 35–60.
- Mullis K. B., 1990: The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 262: 56–65.
- Newton A. F., 1991: Silphidae. In: Stehr F. W. (eds.): *Immature Insects, Volume 2*. Kendall Hunt, Dubuque.
- Newton A. F., 2022: Staphyliniformia world catalog database. In: Bánki, O. (eds.): *Catalogue of Life Checklist*. <https://doi.org/10.48580/dfqf-3gk>
- Novák M., Jakubec P. et Růžička J., 2023: Klíč k larvám mrchožroutů České republiky (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae: Silphini). Key to the carrion beetle larvae of the Czech Republic (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae: Silphini). *Klapalekiana* 59: 73–83.
- Ogden T. H. et Rosenberg M. S., 2006: Multiple sequence alignment accuracy and phylogenetic inference. *Systematic Biology* 55: 314–328.
- Peck S. B., 1990: Insecta: Coleoptera Silphidae and the associated families Agyrtidae and Leiodidae. In: Dindal D. L. (ed.): *Soil Biology Guide*. New York: John Wiley & Sons.
- Peck S. B., 2001: American beetles, Volume 1: Archostemata, Myxophaga, Adephaga, Polyphaga: Staphyliniformia. Boca Raton, London, New York, Washington, CRC Press.
- Rambaut A., 2018: Figtree ver 1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Ratcliffe B. C., 1996: The carrion beetles (Coleoptera: Silphidae) of Nebraska. *Bulletin of the University of Nebraska State Museum* 13: 1–100.
- Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P., Ayres D. L., Darling A., Höhna S. et Huelsenbeck J. P., 2012: MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.

- Růžička J., 1992: The immature stages of central European species of *Nicrophorus* (Coleoptera, Silphidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 89: 113–135.
- Růžička J., 1994: Seasonal activity and habitat associations of Silphidae and Leiodidae: Cholevinae (Coleoptera) in central Bohemia. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 58: 67–78.
- Růžička J., 2005: Silphidae (carrion beetles). In: Farkač J., Král D. et Škorpík M. (eds): *Red List of Threatened Species in the Czech Republic. Invertebrates*. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha: 429–430.
- Růžička J., 2015: Silphidae. In: Löbl I. et Löbl D. (eds): *Catalogue of Palaearctic Coleoptera Volume 2. Hydrophiloidea – Staphylinoidea, Revised and Updated Edition*. Brill, Leiden & Boston.
- Růžička J., Jakubec P., Mahlerová K., Šípková H. et Nishikawa M., 2023: Integrative taxonomy and species distribution models of the genus *Diamesus* Hope, 1840 (Coleoptera: Staphylinidae: Silphinae). *Scientific Reports* 13: 3192.
- Sanger F., Nicklen S. et Coulson, A.R., 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463–5467.
- Sayers E. W., Bolton E. E., Brister J. R., Canese K., Chan J., Comeau D. C., Connor R., Funk K., Kelly C., Kim S., Madej T., Marchler-Bauer A., Lanczycki C., Lathrop S., Lu Z., Thibaud-Nissen F., Murphy T., Phan L., Skripchenko Y., Tse T. et Sherry S. T., 2022: Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research* 50: 20–26.
- Scott M. P., 1998: The ecology and behaviour of burying beetles. *Annual Review of Entomology* 43: 595–618.
- Sigmon J. et Larcom L., 1996: The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. *Electrophoresis* 17: 1524–1527.
- Sikes D. S., 2008: *Encyclopedia of entomology*. Springer Science & Business Media, Gainesville.

- Sikes D. S. et Venables C. 2013: Molecular phylogeny of the burying beetles (Coleoptera: Silphidae: Nicrophorinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 552–565.
- Sikes D. S., 2016: Silphidae. In: Beutel R. G. et Leschen R. A. B. (eds): *Coleoptera, Beetles. Volume 1: Morphology and Systematics. Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyphaga partim.* 2nd edition. *Arthropoda: Insecta, Handbook of Zoology.* de Gruyter, Berlin, Boston.
- Simons C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H. et Flook P, 1994: Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651–701.
- Smith L. M., Sanders J. Z., Kaiser R. J., Hughes P., Dodd C., Connell C. R., Heiner C., Kent S. et Hood L.: 1986: Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321: 674–679.
- Snustad P. D. et Simmons M. J., 2009: *Principles of genetics.* Wiley, Minnesota.
- Song N., Zhai Q. et Zhang, Y., 2021: Higher-level phylogenetic relationships of rove beetles (Coleoptera, Staphylinidae) inferred from mitochondrial genome sequences. *Mitochondrial DNA, Part A, DNA mapping, sequencing, and analysis* 32: 98–105.
- Sun S. J. et Kilner R. M., 2020: Temperature stress induces mites to help their carrion beetle hosts by eliminating rival blowflies. *ELife* 9, 55649.
- Šustek Z., 1981: Mrchožroutoví Čkoslovenska (Coleoptera, Silphidae). [Key to identification of insects: Carrion beetles of Czechoslovakia (Coleoptera, Silphidae)]. *Zprávy Československé Společnosti Entomologické při ČSAV, Klíče k určování hmyzu* 2: 1–47.
- Swofford D. L., Olsen G. J., Wadell P. J. et Hillis D. M., 1996: Phylogenetic inference. In: Hillis D. M., Moritz C. et Mable B. K. (eds.): *Molecular Systematics*, 2nd Edition, Sinauer Associates, Sunderland (MA).
- Tamura K., Nei M. et Kumar S., 2004: Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101: 11030–11035.

Tamura K., Stecher G. et Kumar S., 2021: MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027.

Thompson J. D., Higgin D. G. et Gibson T. J., 1994: CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.

Tian E. W. et Yu H., 2013: A simple and rapid DNA extraction protocol of small insects for PCR amplification. *Entomological News* 123: 303–310.

Toussaint E. F. et Condamine F. L. 2016: To what extent do new fossil discoveries change our understanding of clade evolution? A cautionary tale from burying beetles (Coleoptera: Nicrophorus). *Biological Journal of the Linnean Society* 117: 686–704.

Trifinopoulos J., Nguyen L.-T. von Haeseler A. et Minh B. Q., 2016: IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Research* 44: 232–235.

Trombiková K. et Kočárek P., 2008: There is not any influence of forest fragmentation on carrion beetles (Coleoptera: Silphidae) in agricultural landscape. *Environmental Changes and Biological Assessment* 4: 381–385.

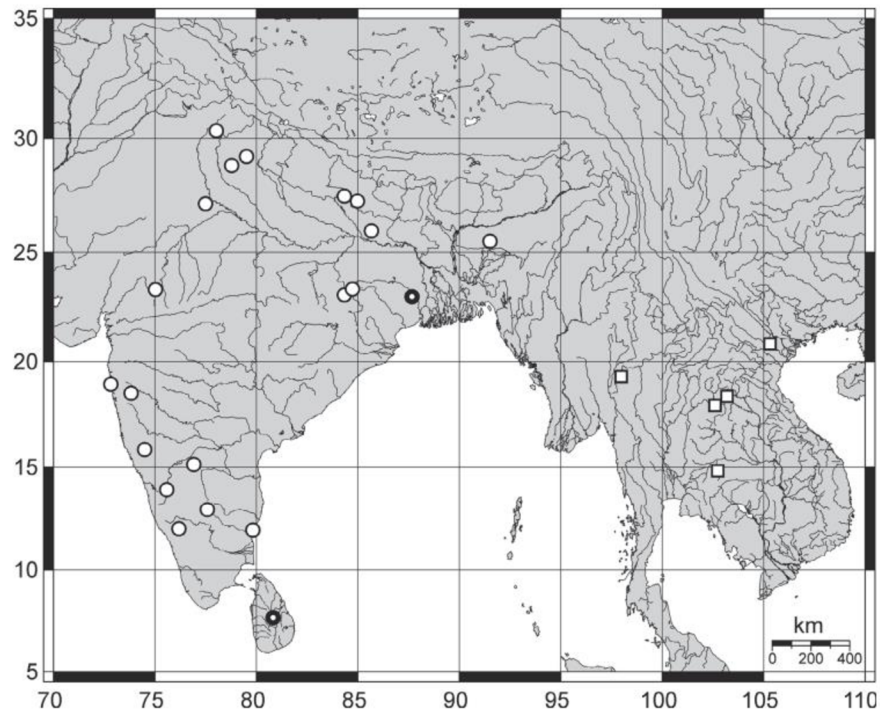
Trumbo S. T., Kon M. et Sikes, D., 2001: The reproductive biology of *Ptomascopus morio*, a brood parasite of *Nicrophorus*. *Journal of Zoology* 255: 543–560.

Trumbo S. T. et Sikes D. S., 2021: Resource concealment and the evolution of parental care in burying beetles. *Journal of Zoology* 315: 175–182.

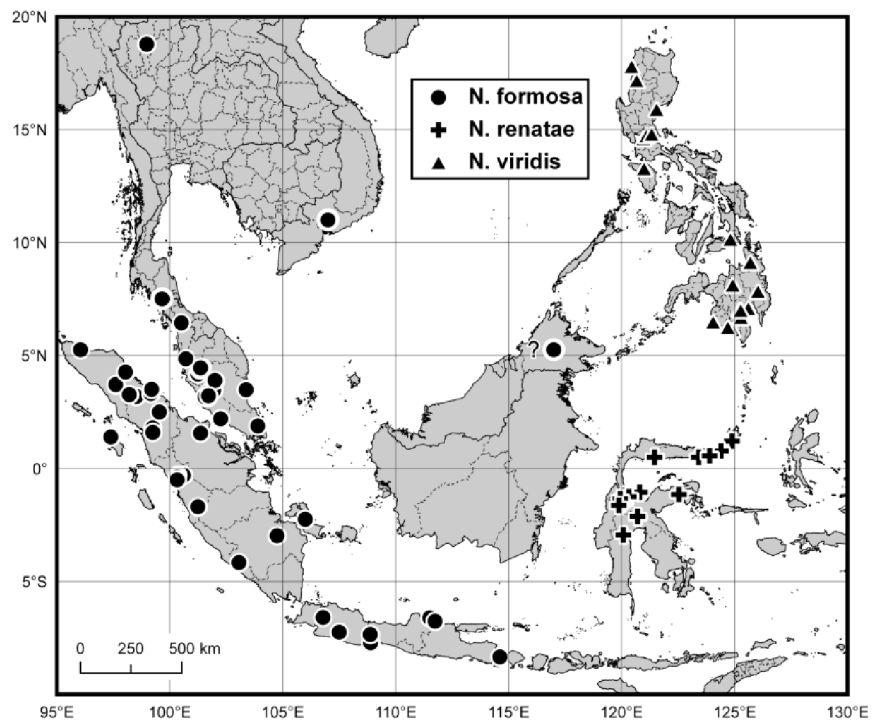
Wang Y. S., Dai T. M., Tian H., Wan F. H. et Zhang G. F., 2019): Comparative analysis of eight DNA extraction methods for molecular research in mealybugs. *PloS One* 14: e0226818.

9. Přílohy

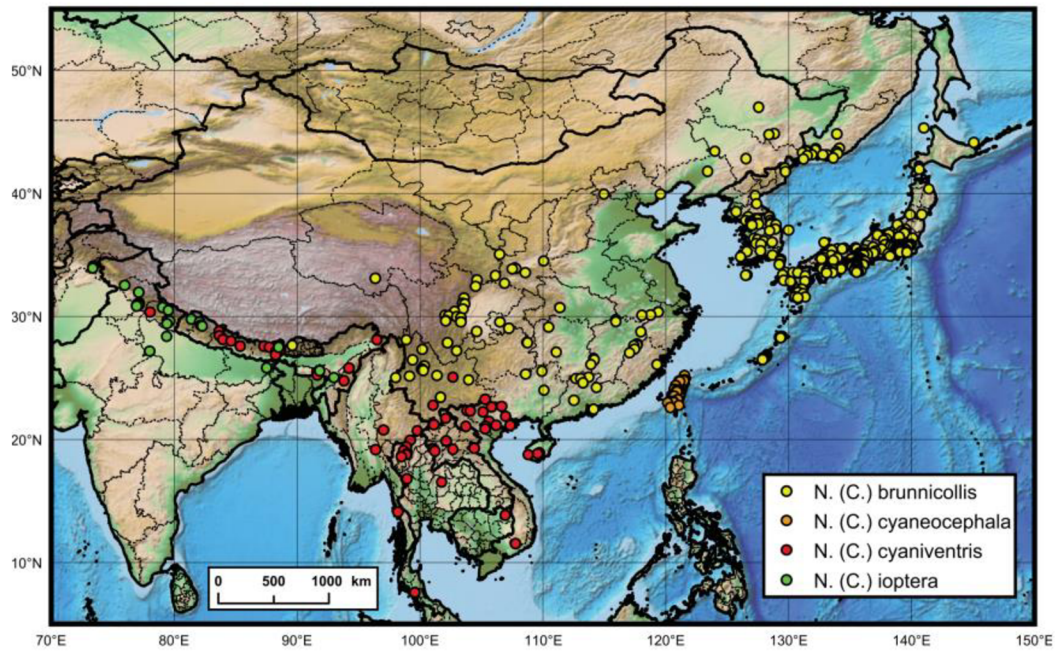
Příloha 1: Mapa rozšíření podrodu *Deutosilpha* Portevin (Růžička et al. 2011)



Příloha 2: Mapa rozšíření podrodu *Chrysilpha* Portevin (Růžička et al. 2012)



Příloha 3: Mapa rozšíření podrodu *Calosilpha* Portevin (Růžička et al. 2015)



Příloha 4: Hodnoty vypočtené genetické vzdálenosti (Compute pairwise distances) mezi dvojicí zájmových druhů

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. <i>N. (Calosilpha) cyaniventris</i>															
2. <i>N. (Calosilpha) cyaneocephala</i>	0,0416														
3. <i>N. (Calosilpha) brunnicollis</i>	0,0429	0,0110													
4. <i>N. (Eusilpha) japonica</i>	0,0724	0,0729	0,0744												
5. <i>N. (Eusilpha) jakowlewi</i>	0,0867	0,0867	0,0824	0,0611											
6. <i>N. (Eusilpha) cyaneocincta</i>	0,0839	0,0868	0,0797	0,0611	0,0049										
7. <i>N. (Eusilpha) subcaudata</i>	0,0897	0,0897	0,0854	0,0597	0,0036	0,0085									
8. <i>N. (Chrysozilpha) formosa</i>	0,0823	0,0763	0,0791	0,0878	0,0939	0,0941	0,0955								
9. <i>N. (Chrysozilpha) viridis</i>	0,0752	0,0693	0,0652	0,0865	0,0884	0,0884	0,0900	0,0499							
10. <i>N. (Chrysozilpha) renatae</i>	0,0764	0,0779	0,0808	0,0885	0,1088	0,1090	0,1105	0,0404	0,0514						
11. <i>Necrophila</i> s. str. <i>americana</i>	0,1063	0,0987	0,0958	0,1054	0,0894	0,0909	0,0926	0,1275	0,1097	0,1210					
12. <i>Thanatophilus sinuatus</i>	0,1332	0,1445	0,1380	0,1431	0,1351	0,1337	0,1333	0,1435	0,1299	0,1541	0,1067				
13. <i>Thanatophilus rugosus</i>	0,1363	0,1372	0,1357	0,1494	0,1321	0,1323	0,1356	0,1416	0,1259	0,1419	0,1340	0,0792			
14. <i>Necrodes littoralis</i>	0,1408	0,1301	0,1254	0,1201	0,1221	0,1208	0,1188	0,1350	0,1242	0,1439	0,1121	0,1121	0,1199		
15. <i>Necrodes nigricornis</i>	0,1223	0,1301	0,1286	0,1301	0,1232	0,1235	0,1235	0,1408	0,1218	0,1399	0,1151	0,1055	0,1277	0,1013	