

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Přírodovědecká fakulta**

**Katedra zoologie**



**MOLEKULÁRNÍ FYLOGENEZE TRIBU CALOCHROMINI  
(COELOPTERA: LYCIDAE)**

Diplomová práce

**Bc. Michal Motyka**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2014**

**Vedoucí práce: Prof. Ing. Ladislav Bocák Ph.D.**

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením vedoucího Prof. Ing. Ladislava Bocáka, Ph.D. a použil jsem pouze uvedené bibliografické zdroje.

Olomouc 1.7. 2014

### **Poděkování**

Děkuji Prof. Ing. Ladislavu Bocákovi, Ph.D. za konzultace. Dále bych rád poděkoval Mgr. Renatě Bílkové za pomoc při práci v laboratoři. Nesmím opomenout všechny své kamarády a rodinu za vytvoření zázemí při tvorbě této diplomové práce.

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora: Bc. Michal Motyka

Název práce: Molekulární fylogeneze tribu Calochromini (Coleoptera: Lycidae)

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra zoologie

Vedoucí práce: Prof. Ing. Ladislav Bocák, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2014

## **Abstrakt**

Calochromini jsou kosmopolitně rozšířená skupina čeledi Lycidae obsahující přibližně 300 druhů. V tribu jsou klasifikovány rody *Adoceta* Bourgeois, 1882, *Caloptognatha* Green, 1954, *Calochromus* Guérin-Méneville, 1833, *Lucaina* Duges, 1879, *Lygistopterus* Mulsant, 1838 a *Macrolygistopterus* Pic, 1929. Cílem práce je vytvoření fylogenetické hypotézy s použitím molekulárních markerů. K tomu byly sekvenovány markery 18S, 28S jaderná rRNA a 16S rRNA, COI mtDNA, ND5 mitochondriální DNA. Fylogenetické stromy byly sestaveny pomocí metod maximální parsimonie, bayesiánské metody a maximum likelihood. Všechny analýzy potvrdily monofylii tribu Calochromini, avšak nebyla potvrzena monofylie morfologicky definovaných rodů. Rody *Adoceta* a *Lygistopterus* v topologii stromu vytvářely pouze terminální linie uvnitř morfologicky definovaného rodu *Calochromus*. Dosavadní studium morfologie neposkytlo žádné morfologické znaky, které by definovaly jednotlivé podskupiny v rodu *Calochromus*. Pro návrh robustní fylogeneticky založené klasifikace je nutné podrobnější studium morfologie a rozšíření počtu sekvenovaných taxonů.

Klíčová slova: Lycidae, Calochromini, 16S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA, COI mtDNA, ND5 mtDNA

Počet stran: 53

Počet příloh: 8

Jazyk: Český

## **Bibliographic identification**

First name and surname of the author: Bc. Michal Motyka

Name of the thesis: Molecular phylogeny of tribe Calochromini (Coleoptera: Lycidae)

Type of thesis: Diploma thesis

Workplace: Department of zoology

Thesis supervisor: Prof. Ing. Ladislav Bocák, Ph.D.

Year of defence: 2014

## **Abstract**

The Calochromini (Coleoptera: Lycidae) is spread worldwide with around 300 known species. Six genera are classified in Calochromini: *Adoceta* Bourgeois, 1882, *Caloptognatha* Green, 1954, *Calochromus* Guérin-Méneville, 1833, *Lucaina* Duges, 1879, *Lygistopterus* Mulsant, 1838 and *Macrolygistopterus* Pic, 1929. Primary aim of this thesis is to create a phylogenetic hypothesis with application of molecular markers. 18S, 28S nuclear rRNA and 16S rRNA, COI mtDNA, ND5 mitochondrial DNA were sequenced. The criterion of maximum parsimony, bayesian analysis and maximum likelihood were used to analyze the dataset. All analyzes supported the monophyly of the tribe Calochromini, however monophyly of morphologically-defined genera was not confirmed. Genera *Adoceta* and *Lygistopterus* created only terminal lines in a tree topology within morphologically defined genus *Calochromus*. The existing morphological studies provided no morphological characters which would define different subgroups in the genus *Calochromus*. Detailed study of the morphology and increase in the number of sequenced data is necessary to design a robust phylogenetically based classification.

Keyword: Lycidae, Calochromini, 16S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA, COI mtDNA,  
ND5 mtDNA

Number of pages: 53

Number of appendices: 8

Language: Czech

## Obsah

1. Úvod .....	7
2. Cíle práce .....	9
3. Materiál a metody .....	10
3.1 Materiál .....	10
3.2 Izolace DNA ze svalové tkáně .....	14
3.3 PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	15
3.4 Sekvenační reakce .....	16
3.5 Čištění produktu sekvenační reakce .....	16
3.6 Sekvenování .....	16
3.7 Analýza chromatogramů, vytvoření alignmentu .....	17
4. Fylogenetické analýzy .....	18
4.1 Analýza metodou RAxML (Randomized Accelerated Maximum Likelihood) .....	18
4.2 Analýza metodou maximální parsimonie .....	18
4.3 Bayesiánská analýza .....	19
5. Výsledky .....	20
5.1 Výsledky analýz sekvencí .....	20
5.2 Výsledky fylogenetických analýz .....	24
6. Diskuze a závěr .....	27
7. Seznam použité literatury .....	29
8. Seznam příloh .....	34

## 1. Úvod

Čeď Lycidae je druhově velmi bohatá skupina brouků, která zahrnuje na 150 rodů a více než 4000 popsaných druhů (Bocak *et al.*, 2008). V dřívějších klasifikacích byla tato čeď zařazena společně s čedmi Brachypsectridae, Cantharidae, Drilidae, Lampyridae, Omalisidae, Phengodidae, Rhagophthalmidae a Telegeusidae v nadčedi Cantharoidea (Lawrence & Newton, 1982). Tyto čedi spojovala podobná morfologie odvozená od slabě sklerotizované kutikuly dospělců. Pozdější studie prokázaly, že i přes významné morfologické odlišnosti, jsou Cantharoidea polyfylum a jednotlivé linie jsou příbuzné čedím Cerophytidae, Elateridae, Eucnemidae a Throscidae. Spojením těchto skupin vznikla nadčeď Elateroidea (Lawrence & Newton, 1995).

Čeď Lycidae je kosmopolitně rozšířená, zástupci se nevyskytují, vzhledem ke svým nárokům na prostředí, pouze v arktických a aridních oblastech bez dřevinné vegetace. Centra jejich diverzity jsou oblasti okolo rovníků, směrem k polům se druhová bohatost prudce snižuje. Celkem bylo popsáno okolo 4200 druhů (Bocak *et al.*, 2008), počet popsaných druhů v posledních letech prudce roste (Bocak, 2001a, 2001b; Bocak *et al.* 2006; Bocakova, 2001, 2003; Dvorak & Bocak, 2007; Kazantsev, 2005a, 2005b; Tvardík & Bocak, 2001). Poměr mezi popsanými a neznámými druhy v tropických oblastech dosahuje až 1:24 (Dvorak & Bocak, 2007, 2009). Klasifikace čedi Lycidae byla v posledních letech modifikována na základě molekulárně fylogenetických studií. Tribus Calochromini Lacordaire, 1857 získal rank podčedi (Kleine, 1933; Bocak & Bocakova, 1990) a později na základě fylogenetické hypotézy, byl hodnocen pouze na tribus v podčedi Lycinae (Bocak & Bocakova, 2008). Čeď Lycidae aktuálně obsahuje 6 podčedí: Ateliinae, Dictuyopterinae, Dexorinae, Libnetinae, Lycinae a Lyropaeinae. Podčeď Lycinae je druhově nejbohatší a zahrnuje kromě tribu Calochromini 13 dalších tribů: Calopterini Green, Conderini Bocak, Dihammagini Bocak et Bocakova, Eurrhacini Bocakova, Erotini Leconte, Leptolycini Leng et Mutchler, Lycini Laporte, Lyponiini Bocak et Bocakova, Macrolycini Kleine, Metriorrhynchini Kleine, Platerodini Kleine, Slipinskiini Bocak et Bocakova, Thonalmini Kleine et Bocakova, (Bocak & Bocakova 2008). Tribus Calochromini obsahuje rody *Adoceta* Bourgeois, 1882, *Caloptognatha* Green, 1954, *Calochromus* Guérin-Méneville, 1833, *Dumbrellia* Lea, 1909, *Lucaina* Duges, 1879, *Lygistopterus* Mulsant, 1838 a *Macrolygistopterus* Pic, 1929. Původně byly do tribu zahrnuty i rody *Lycoprogenthes* Pic, 1915, (Kleine, 1933) a *Falsocalochromus* Pic, 1942 (Bocak & Bocakova, 1990), ale na základě morfologických

studií byl *Lycoprogenthes* přesunut do podčeledi Erotinae Leconte, 1881 (Bocak, 2002) a *Falsocalochromus* Pic, 1942 byl přesunut do podčeledi Lyropaeinae (Masek & Bocak, 2014)

Dospělci čeledi Lycidae jsou v naprosté většině případů okřídlení, neotenie samic byla prokázána pouze u několika linií. Samice neotenních linií zůstávají larviformní, pouze dochází ke strukturním změnám ve stavbě chitinové kutikuly a otevření kopulačních orgánů (Bocak & Bocakova, 1990; Wong, 1996; Bocakova *et al.*, 2007; Levkanicová & Bocak, 2009). Tato vlastnost společně se slabou sklerotizací těla a následnou neschopností disperze na vzdálené stanoviště znamená, že Lycidae jsou vhodná modelová skupina ke studiu evoluce neotenních linií (Bocak *et al.*, 2008; Bocak & Yagi, 2010; Malohlava & Bocak, 2010). Vzhledem k předchozím charakteristikám brouci čeledi Lycidae vyvinuli antipredační strategie, jako vylučování zápachajících a mírně jedovatých látek (Moore & Brown, 1981; Bocak *et al.*, 2008). Hemolymfa s obsahem těchto látek se nejčastěji objevuje v důsledku praskání intersegmentálních membrán a kutikuly na kloubech a na žebrech krovek. Hlavní složkou je kyselina lycidí, která je schopná odpudit většinu běžných predátorů s výjimkou tesaříků z rodu *Elytroleptus*, kteří ji ale nejsou schopni vstřebat a použít na svou ochranu (Eisner *et al.*, 2008). Díky této antipredační strategii se vyvinulo výrazné aposematické zbarvení, které varuje potenciální predátory (Alatalo & Mappes, 1996). Takto chránění jedinci se často shlukují do agregací a tím posilují výsledný efekt zbarvení (Linsley *et al.*, 1961). V těchto agregacích se sdružují i jiné skupiny hmyzu, které využívají batesiánské mimikry, například zástupci rodu *Elytroleptus*, *Rhinotia haemoptera* nebo motýli *Neofelderia rata*, *Snellenia lineata* a *Lycomorpha fulgens*. (Moore & Brown, 1989)



## 2. Cíle práce

Současné znalosti o tribu Calochromini a jeho taxonomii se zakládají pouze na primárních popisech v taxonomických publikacích M. Pica, R. Kleineho a C. O. Waterhouse (Waterhouse, 1878; Pic, 1921, 1925; Kleine, 1926, 1928, 1933). Práce těchto autorů byla zaměřena především na vnější morfologické znaky, v menším rozsahu na studiu samčích genitálií. Pokusy o vyjádření příbuzenských vztahů vycházely z postulátu, že morfologická podobnost (například ve zbarvení nebo velikosti a tvaru těla) ukazuje na blízkou příbuznost daných druhů. Takové znaky jsou ovšem vystaveny přírodnímu výběru (selekce maximální podobnosti v mimetických komplexech) a tím je omezena jejich hodnota pro vytvoření fylogenetické hypotézy (Sklenařová *et al.*, 2014).

Hlavním cílem této studie je objasnění fylogenetických vztahů v rámci tribu Calochromini na základě neutrálního zdroje informací, v tomto případě sekvencích jaderných a mitochondriálních genů. K vytvoření fylogeneze byly použity fragmenty genů 16S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA a COI mtDNA, ND5 mtDNA. Molekulární data poskytují velký objem informací, které jsou nezávislé na vnějších ekologických podmínkách, a proto vhodné pro testování fylogeneze skupiny. Bylo záměrně použito větší množství molekulárních markerů pro vyšší podporu výsledné fylogeneze. Výsledky studie jsou určeny pro kritickou revizi klasifikace.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Materiál

Exempláře k izolaci byly vybrány s ohledem na pokrytí co největšího počtu zoogeografických oblastí. Důraz byl kladen především na rozšíření matice o jedince tribu Calochromini Lacordaire, 1857 z Číny, Laosu a Ameriky. Do studie byl rovněž zahrnut jedinec z doposud nesekvenovaného rodu *Macrolygistopterus*. Celkový počet exemplářů se rozšířil o 48 na celkový počet 80 (Tabulka 1).

Vzorky pocházejí ze sbírky školitele, sbírány byly v letech 2000-2012. V terénu byl materiál fixován pomocí 96% alkoholu. Konzervace byla provedena odvodněním pomocí několikanásobné výměny alkoholu. Následně byly vzorky uloženy v -20 °C.

Tabulka 1.: Seznam vzorků

Číslo vzorku	Rod:	Lokalita
UPOL MT0001	<i>Calochromus</i>	China, Yunnan, Habashan, 10.6.2002, S. Bečvář lgt.
UPOL MT0002	<i>Calochromus</i>	Malaysia, Sabah, Sacan 25km SE Sapulut, Batu Punggul 23.5.2001, F. Ciampor lgt.
UPOL MT0003	<i>Calochromus</i>	N Laos, Oudomkai, V. Kubáň lgt.
UPOL MT0004	<i>Calochromus</i>	Malaysia, W Johor, 20km S of Mersing, Jemaluang, 300 m n. m., 1.-14.1. 2003, P. Čelechovský lgt.
UPOL MT0005	<i>Calochromus</i>	Indonesia, Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26.1.-1.2.2005, 1600-2200 m n.m., Bolm lgt.
UPOL MT0006	<i>Calochromus</i>	China, Yunnan, Habashan, 10.6.2002, S. Bečvář lgt.
UPOL MT0007	<i>Calochromus</i>	Borneo, Sabah, Tibow, 45 km NE of Sapulut, 600-900 m n. m., 7.-15.4. 2000, Bolm lgt.
UPOL MT0008	<i>Calochromus</i>	NE Laos, Hua Phan prov, Ban Saluei, Phu Phan, 20.13 N 103.59 E, 1500 m n. m., 10.5. 2004, F. Kantner lgt.
UPOL MT0009	<i>Calochromus</i>	India N, Utteranda state Ca 30km N of Cajebiowan Khati vill. en., 2200 m n. m., 28.6.2003, M. Tryzna lgt.
UPOL MT0010	<i>Calochromus</i>	Malaysia, Johor 20 km N of Kota Tinggi, 30.1.2005, P. Čelechovský lgt.
UPOL MT0011	<i>Calochromus</i>	Malaysia, Pahang, Tanah Rata , 1600 m n. m., 18.-22.4. 2000, Bolm lgt.
UPOL MT0012	<i>Calochromus</i>	Malaysia, Sabah Tibow 45 km NE of Sapulut, 600-900 m n. m., 7.-15.4. 2000, Bolm lgt.
UPOL MT0013	<i>Calochromus</i>	NE India, W Arunachal pr. betw. Dirang & Bomdila Pass, 27°19'N 92°22'E, 1900±300 m n.m., 12.-16.6.2004, L. Dembický lgt.
UPOL MT0014	<i>Calochromus</i>	Malaysia, Borneo, Sabah km 53 road kk-Tambunan Gn. Emas, 1650, 22.3.-6.4. 2000, Bolm lgt.
UPOL MT0015	<i>Calochromus</i>	S India, Kunchappanai, 2000, Pacholátko & Dembický lgt.
UPOL MT0016	<i>Calochromus</i>	S India, Kunchappanai, 2000, Pacholátko & Dembický lgt.
UPOL MT0017	<i>Calochromus</i>	S India, Kunchappanai, 2000, Pacholátko & Dembický lgt.

UPOL MT0018	<i>Calochromus</i>	S India, Kunchappanai, 2000, Pacholátko & Dembický lgt.
UPOL MT0019	<i>Adoceta</i>	South Africa, Limpopo Loubad (Waterberg) 24.29.15" S 28.11.12" E, 1378 m, 22.-24. 11. 2009, Ahrens & Fabrigi lgt.
UPOL MT0020	<i>Adoceta</i>	NW Zambia, NW Kasempa E of Mutumbw, 5.11.2008, Snižek lgt.
UPOL MT0021	<i>Adoceta</i>	NW Zambia, 9.-17.12. 2007, M. Bednařík lgt.
UPOL MT0022	<i>Adoceta</i>	South Africa, E. Kwazulu, Natal NE Ndumo, W border Tembe Elephant park, Maputoland, 80 m n. m., 29.12. 2007 - 9.1. 2008, M. Snižek lgt.
UPOL MT0023	<i>Adoceta</i>	E Kenya, E 729, Sosoma, 202 km E of Thika, 20.11. 2007, Snižek lgt.
UPOL MT0025	<i>Calochromus</i>	Indonesia, Papua, Biak, Mniber , 0.43.28" S 135.46.01" E, 16.-22.12. 2006, S. Bílý lgt.
UPOL MT0026	<i>Calochromus</i>	N India, Uttaranchal Sl., 30 km N Bajeshwar SE of Dhakuri ia., 2750 m n. m., 25.-26.6. 2003, Z. Kejval & M.Tryzna lgt.
UPOL MT0027	<i>Adoceta</i>	Kenya, Eastern Nguni, N of Ngomeni, 30.12. 2007, Snižek lgt.
UPOL MT0028	<i>Adoceta</i>	South Africa, Limpopo prov., 12. 2006, M. Bednařík lgt.
UPOL MT0029	<i>Adoceta</i>	South Africa, E. Kwazulu, Natal NE Ndumo, W border Tembe Elephant park, Maputoland, 80 m n. m., 29.12.2007 – 9.1.2008, M. Snižek lgt.
UPOL MT0030	<i>Lygistopterus</i>	Greece, Peloponnisos prov. Dirrahi, Neohori 40 km SE Megalopoli, 1200 m n. m., 17.6. 2006, Bolm lgt.
UPOL MT0031	<i>Calochromus</i>	S India, Kunchappanai, 2000, Pacholátko & Dembický lgt.
UPOL MT0032	<i>Calochromus</i>	Indonesia, Sumatra barat Pasaman. Gn. Talaman 1000 m n. m., 14.-15.1. 2005, Bolm lgt.
UPOL MT0033	<i>Adoceta</i>	Kenya, NW Makefikeng Zeerust env. (N4), 11.12. 2008, Snižek lgt
UPOL MT0034	<i>Calochromus</i>	NE Laos, Hua Phan prov., Ban Saluei>Phu PhanMt., 20°12'13,5"N 104°01'E10, 1340-1870 m n. m., 2.-22.6. 2011, Vít Kubáň & Lao coll. lgt.
UPOL MT0035	<i>Calochromus</i>	Sumatra, Gn Merapi 5 km E of Kotobaru, 1600 m n. m., 18.-25.5. 2001, Bolm lgt.
UPOL MT0036	<i>Calochromus</i>	NE Laos, Xieng Khouang prov., Phonsavan (30 km NE) phou Sane Mt., 19°38,20'N 103°20,20'E, 1400-1600 m n. m., 10.-30.5. 2009, V. Kubáň lgt.
UPOL MT0037	<i>Calochromus</i>	Malaysia, Pahang Tanah Rata, Cameron h., 3.-20.2. 2005, 1600m, P. Čelechovský lgt.
UPOL MT0038	<i>Calochromus</i>	China, Sichuan prov., Daxue Shan, N of San Ya, 28,43°N 101,57°N, 2700 m n. m., 6.-12.1. 2005, M. Tryzna lgt.
UPOL MT0039	<i>Calochromus</i>	SW Cambodia, 20 km SE Koh Kong, Tatai riv., 11,34°N 103.07°E, 200 m n. m, 5. 2005, E. Jendek & O. Sausa lgt.
UPOL MT0040	<i>Calochromus</i>	Malaysia, W Pahang, Cameron Highlands, Tanah Rata, 1500-1800 m n. m., 2.-26.2. 2004, P. Pacholátko lgt.
UPOL MT0041	<i>Calochromus</i>	Indonesia, E Kalimantan, ca. 55 km W of Balik Papan Pt Faraj Surya (area), 01°13,3'N 116°21'E, 100 m n. m., 24.-25.+29. 11. 2011, J. Hájek, J.Scheider & P. Votruba lgt.

UPOL MT0043	<i>Calochromus</i>	Malaysia, Kelantan Rd Kp. Raja>Gn. Muang, Lalang Pandrak, 4,63°N 101,45°E, 1400-1700 m n. m., 1.-26.4. 2006, P. Čelechovský lgt.
UPOL MT0044	<i>Calochromus</i>	Indonesia, E Kalimantan ca. 55 km W of Balik Papan Pt Faraj Surya (area), 01°13,3'N 116°21'E, 100 m n. m., 24.-25.+29. 11. 2011, J. Hájek, J.Scheider & P. Votruba lgt.
UPOL MT0045	<i>Calochromus</i>	Indonesia, E Kalimantan ca. 55 km W of Balik Papan Pt Faraj Surya (area), 01°13,3'N 116°21'E, 100 m n. m., 24.-25.+29. 11. 2011, J. Hájek, J.Scheider & P. Votruba lgt.
UPOL MT0046	<i>Calochromus</i>	C Laos, Khammouan prov., Ban Khoun Ngeun env., 18,07°N 104,29°E, 250 m n. m., 20.-29. 5. 2004, E. Jendek and O. Šausa lgt.
UPOL MT0047	<i>Calochromus</i>	NE Laos, Houa Phan prov., Phou Pan, 20,12°N 104,01°E, 1700 m n. m., 17.5.-3.6. 2007, C. Holzschuh lgt.
UPOL MT0048	<i>Calochromus</i>	China, Jiangxi prov., Jinggangshan. ZhuFeng, 26°31'51,54''N 114°8'46,02''E, 680 m n. m., 29.4.2011, Kubeček lgt.
UPOL MT0049	<i>Calochromus</i>	Malaysia, Perak, 19 th mile road Tapah-Ringlet, 4°22'42''N 101°19'44''E, 600-650 m n. m., 25.-27.2. 2012, Kundrata, Kubeček & Fusek lgt.
UPOL MT0050	<i>Calochromus</i>	C Laos, Khammouan prov., Ban Khoun Ngeun env. 18,07°N 104,29°E, 250 m n. m., 20.-29.5. 2004, E. Jendek and O. Šausa lgt.
UPOL MT0051	<i>Calochromus</i>	NE Laos, Houa Phan prov., Phou Pan, 20,12°N 104,01°E, 1700 m n. m., 17.5.-3.6. 2007, V. Kubáň lgt.
UPOL MT0052	<i>Calochromus</i>	NE Laos, Hua Phanprov. Ban Saluei, Phu phan, 20°13'N 103,59°E, 1500 m n. m., 10.5. 2004, F. Kantner lgt.
UPOL MT0053	<i>Calochromus</i>	China, mer. Yunnan prov. Pass 20 km NW from Zhongdien, 15.-17.6. 2005, Ivo Jeniš lgt.
UPOL MT0054	<i>Calochromus</i>	Laos, Lao Pako, 2002, M. Štrba lgt.
UPOL MT0055	<i>Calochromus</i>	Malaysia, W. Kelantan 30 km NW of Gua Musang Ulu Lalat Mt., kampong Sungai OM 800-1000 m n. m., 21.6.-14.7. 2010, P. Čelechovský lgt.
UPOL MT0056	<i>Calochromus</i>	China, W Sichuan, West of Zhier (Zi'er), 28.22,293°N 101.32,701°E, 2866 m n. m., 2.-5.6. 2006, R. Sehnal & M. Trýzna lgt.
UPOL MT0057	<i>Calochromus</i>	Malaysia, Kelantan, 20 km NE Kp. Raja, "Temiar Rafflesia Sanctum", 4°39'20,8"N 101°29'40,5"E, 795 m n. m., 26.2. 2012, Kundrata, Fusek lgt.
UPOL MT0058	<i>Calochromus</i>	SW Cambodia, 20 km SE Koh Kong, Tatai riv., 11,34°N 103.07°E, 200 m n. m., 5. 2005, E. Jendek & O. Sausa lgt.
UPOL MT0059	<i>Calochromus</i>	Malaysia, 30 km NE Raub, 2002, E. Jendek lgt.
UPOL MT0060	<i>Adoceta</i>	South Africa, Limpopo prov., 12. 2006, M. Bednařík lgt.
UPOL MT0061	<i>Calochromus</i>	China, Shanxi 100 km S of Xian, Xiuyanba, Kubáň lgt.
UPOL MT0062	<i>Calochromus</i>	India N, Uttaranchal state, 30 km N Bajeshwar, 2600-2800 m n. m., 25.-26.6. 2003, Z. Kejval & M. Tryzna lgt.
UPOL MT0063	<i>Calochromus</i>	India N, Uttaranchal state, 30 km N Bajeshwar, 2600-2800 m n. m., 25.-26.6. 2003, Z. Kejval & M. Tryzna lgt.
UPOL MT0064	<i>Calochromus</i>	S India, Kunchappanai, 2000, Pacholátko & Dembický lgt.

UPOL MT0065	<i>Calochromus</i>	S India, Kunchappanai, 2000, Pacholátko & Dembický lgt.
UPOL MT0066	<i>Calochromus</i>	S India, Kunchappanai, 2000, Pacholátko & Dembický lgt.
UPOL MT0067	<i>Calochromus</i>	S India, Kunchappanai, 2000, Pacholátko & Dembický lgt.
UPOL MT0068	<i>Calochromus</i>	Malaysia, W. Kelantan 30 km NW of Gua Musang Ulu Lalat Mt., kampong Sungai OM, 800-1000 m n. m., 21.6.-14.7. 2010, P. Čechovský lgt.
UPOL MT0069	<i>Calochromus</i>	Malaysia, W. Kelantan 30 km NW of Gua Musang Ulu Lala Mt., kampong Sungai OM, 800-1000 m n. m., 21.6.-14.7. 2010, P. Čelechovský lgt.
UPOL MT0070	<i>Calochromus</i>	Laos, Bunet, 2001, Pachol lgt.
UPOL MT0071	<i>Calochromus</i>	S India, Kunchappanai, 2000, Pacholátko & Dembický lgt.
UPOL MT0072	<i>Calochromus</i>	S India, Kunchappanai, 2000, Pacholátko & Dembický lgt.
UPOL MT0073	<i>Macrolygistopterus</i>	Ecuador, Cosanga euv., 12. 2010, Bolm lgt.
UPOL MT0074	<i>Calochromus</i>	California, Ventura county, 16.12. 2006, M.S. Caterino lgt.
UPOL MT0075	<i>Calochromus</i>	China, Guanxi prov., Madershan, 1100-1800 m n. m., 31.5.-2.6. 2012, Living & Zh Liu lgt.
UPOL MT0076	<i>Calochromus</i>	China, Guanxi prov., Gengwang Laoshan, 5.-6.5. 2012, Living lgt.
UPOL MT0077	<i>Calochromus</i>	China, Hubei prov., Dashennongjia, 1500-1800 m n. m., 17.-20.6. 2012, Living lgt.
UPOL MT0078	<i>Calochromus</i>	China, Hubei prov., Dashennongjia, 1500-1800 m n. m., 17.-20.6. 2012, Living lgt.
UPOL MT0079	<i>Calochromus</i>	NE Laos, Houa Phan prov., Phou Pan, 20,12°N 104,01°E, 1300-1900 m n. m., 1.-15.5. 2010, C. Holzschuh lgt.
UPOL MT0080	<i>Calochromus</i>	China, Sichuan prov., Ya'an. Tianquan. Labahe, 1500-2500 m n. m., 8.-9.7. 2012, Living & MC Chen lgt.
UPOL 000347	<i>Calochromus</i>	Malaysia, 2000, Bolm leg.
UPOL 000124	<i>Calochromus</i>	Malaysia, 2000, Bolm leg.
UPOL 000033	<i>Calochromus</i>	Malaysia, 2000, Bolm leg.
UPOL 000L16	<i>Calochromus</i>	China, Shaaxi, 2000, Bolm leg.
UPOL 000400	<i>Calochromus</i>	Kelantan
UPOL VK0086	<i>Calochromus</i>	Malaysia, Pahang, Cameron Highlands, 2.-26.2. 2004, Pacholátko

---

### 3.2 Izolace DNA ze svalové tkáně

DNA byla izolována pomocí kitu DNeasy (Qiagen) ze svaloviny metathoraxu. Dokladový exemplář byl vypreparován a uložen ve sbírce laboratoře molekulární systematiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. Mikrozkumavka se svalovinou byla umístěna na 20 minut do vakuového koncentrátoru, který byl nastaven na pokojovou teplotu. Po vysušení bylo do mikrozkumavek přidáno 180  $\mu$ l ATK pufru a 20  $\mu$ l 5% proteinázy K a byla provedena homogenizace s pomocí plastické tyčinky. Takto připravené vzorky byly inkubovány v termobloku o teplotě 56 °C. Po rozložení svaloviny bylo ke vzorku přidáno 200  $\mu$ l AL pufru a byla provedena krátká centrifugace. V dalším kroku bylo přidáno 200  $\mu$ l alkoholu a vzorky byly znova centrifugovány. Obsah mikrozkumavek byl přepipetován do kolonky, která byla vložena ve sběrné mikrozkumavce. Následovala centrifugace 1 minutu při 8000 rpm. V dalším kroku bylo do kolonky přidáno 500  $\mu$ l AW1 a centrifugováno 1 minutu při 8000 rpm. Následně bylo přidáno 500  $\mu$ l AW2 a centrifugováno 3 minuty při 14000 rpm. Poté byla kolonka přenesena do nové sběrné mikrozkumavky a centrifugována 1 minutu při 1400 rpm. V dalším kroku byla kolonka přemístěna na mikrozkumavku o objemu 200  $\mu$ l, následně bylo připipetováno 200  $\mu$ l nuklease-free H<sub>2</sub>O a centrifugováno 1 minutu při 8000 rpm. Totéž se opakovalo s přidáním 100  $\mu$ l nuklease-free H<sub>2</sub>O, tento roztok byl zmražen na -80 °C. Koncentrace první eluce byla měřena pomocí spektrofotometru Nanodrop ND-1000, po případném naředění nebo koncentrování byla výsledná DNA použita pro polymerázovou řetězovou reakci.

### 3.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Master mix k amplifikaci obsahoval:

1. 0,12  $\mu$ l Taq polymerázy (INVITROGEN)
2. 1  $\mu$ l 10  $\mu$ mol primer (Tabulka 2)
3. 1  $\mu$ l 10  $\mu$ mol primer (Tabulka 2)
4. 1  $\mu$ l templátu
5. 1,25  $\mu$ l 2 mM dNTPS
6. 2  $\mu$ l 50 mM MgCl<sub>2</sub>
7. 5  $\mu$ l 10x PCR pufru
8. 38,55  $\mu$ l destilované vody

Tabulka 2.: Primery použité při amplifikaci

Fragment	Kódové označení	Sekvence (5' > 3')
<b>18S rRNA</b>	b5.0	TAA CCG CAA CAA CTT TAA T
	ai	CCT GAG AAA CGG CTA CCA CAT C
	bi	GAG TCT CGT TCG TTA TCG GA
	a2.0	ATG GTT GCA AAG CTG AAA C
<b>28S rRNA</b>	ff	TTA CAC ACT CCT TAG CGG AT
	dd	GGG ACC CGT CTT GAA ACA C
<b>16S rRNA</b>	16a	CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT
	ND1A	GGT CCC TTA CGA ATT TGA ATA TAT CCT
	ND1-2	ATC AAA AGG AGC TCG ATT AGT TTC
<b>COI mtDNA</b>	JerryM	CAA CAY YTA TTT TGR TTY TTT GG
	MarcyM	TAR TTC RTA TGW RCA ATA YCA YTG RTG
	JerryN	CAA CAY YTA TTY TGA TTY TTY GG
	MarcyN	TTC RTA WGT TCA RTA TCA TTG RTG
<b>ND5 mtDNA</b>	OF1	CCT ACT CCT GTT TCT GCT TTA GTT CAT TC
	R6	GAA ACG AAA AAT CGT ATT TAA TTT CGA CT
	R2M	AAT TGA ASC CAA AAA GAG GTA TAT CAC TG

Cykly polymerázové řetězové reakce byly nastaveny na tyto hodnoty:

1. 96 °C na 2 minuty
2. 40 cyklů při 96 °C na 30 sekund
3. 41 °C na 30 sekund
4. 72 °C na 105 sekund

Poté 72 °C na 10 minut a konečné zchlazení na 4 °C.

Výsledný produkt byl kontrolován pomocí elektroforézy a purifikován.

### **3.4 Sekvenační reakce**

Roztok pro sekvenační reakci byl připraven podle protokolu firmy ABI Applied Biosystems, množství přidané destilované vody bylo závislé na objemu PCR produktu:

1. 1-4 µl PCR produktu
2. 2 µl 1,6 µmol primeru
3. 1 µl Big Dye
4. 1 µl sekvenační pufr

### **3.5 Čištění produktu sekvenační reakce**

Do každé jamky v destičce s produktem sekvenační reakce bylo připipetováno 75 µl 95% ethanolu a 3 µl 3 M octanu sodného, vzniklý produkt byl protřepán a položen na led. Precipitace trvala 10 minut a alkohol byl následně vyklepnut. Zbytkový alkohol byl odsán pomocí filtračního papíru a centrifugací destičky. Poté bylo připipetováno 100 µl 70% ethanolu a destička byla centrifugována 30 minut při 15 °C. Alkohol byl opět vyklepnut, destička byla zakryta savým papírem a centrifugována po dobu 10 sekund. Tento postup byl opakován třikrát. Čistý sekvenační produkt byl nakonec vysušen pomocí vakuového koncentrátoru.

### **3.6 Sekvenování**

Vyčištěný produkt sekvenační reakce byl rozpuštěn pomocí formamidu a následně vložen do čtyřkapilárního sekvenátoru ABI 3130 (Applied Biosystems) k sekvenaci.



### 3.7 Analýza chromatogramů, vytvoření alignmentu

Pomocí programu Sequencing Analysis (Applied Biosystems) byly analyzovány primární chromatogramy. Editace sekvencí byla prováděna v programu Sequencher verze 4.6 (Gene Code, Inc.), upravené sekvence byly exportovány ve formátu FASTA. Pro zjištění kořene fylogenetického stromu byly přidány sekvence homologických fragmentů genů mimoskupiny z databáze GenBank. Jako outgroup byly stanoveny rody *Dihammatus* Waterhouse, 1879, *Lopheros* Leconte, 1881, *Lycus* Fabricius, 1787, *Lyponia* Waterhouse, 1878, *Macrolycus* Waterhouse, 1878, *Metriorrhynchus* Gemminger et Harold, 1869, *Thonalmus* Bourgeois, 1882 a *Platycis* Thompson, 1864. Takto vzniklá matice byla uložena ve formátu FASTA a alignována v programu ClustalX (Higgins & Sharp, 1988), který byl v defaultním nastavení. Výsledná matice byla kontrolována na kódující kodony aminokyselin a uložena ve formátu NEXUS. V programu Se-AL (Rambaut, 2010a) byly odstraněny začáteční a koncové úseky sekvencí, které vykazovaly výskyt nepřesného čtení bází. Takto upravené matice pro jednotlivé geny byly konkatenovány pomocí skriptu v jazyku Perl, který byl spuštěn na počítači s OS Linux (OpenSuSe). Pořadí jednotlivých fragmentů genů bylo 16S rDNA, tRNA-Leu, ND1 cds mtDNA, cds mtDNA COI, tRNA-Leu, cds mtDNA COII, cds mtDNA ND5, tRNA-Glu, tRNA-Ser.

#### **4. Fylogenetické analýzy**

Výsledná matice byla analyzována pomocí bayesiánské analýzy v programu Mr.Bayes 3.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), metodou maximální parsimonie pomocí programu T.N.T. (Goloboff *et al.*, 2008) a maximální pravděpodobnosti v programu RAxML (Stamatakis, 2006).

##### **4.1 Analýza metodou RAxML (Randomized Accelerated Maximum Likelihood)**

Datová matice byla analyzována metodou RAxML skriptem, který byl napsán v jazyce Perl a ovládal se pomocí příkazového řádku na počítači s operačním systémem Linux. Strom vytvořený metodou maximální pravděpodobnosti byl importován pomocí programu Fig Tree v. 1.3.1 (Rambaut, 2010b), ve kterém byl upraven a vyexportován jako soubor ve formátu emf. Následně byl upraven v grafickém editoru Adobe Illustrator.

Cílem metody maximum likelihood je výpočet pravděpodobnosti, že z našeho modelu evolučních změn vznikne počáteční nukleotidová sekvence. Porovnává jednotlivé fylogeneze a hledá tu s největší pravděpodobností. Pro sestavení počátečního stromu je použit program DNAPARS. Nejdříve prohledá okolí počátečního stromu ulomením a následným přemístěním do nejvzdálenějších míst stromu a spočítá pravděpodobnost takto vzniklé topologie. V takto pozměněném stromu se optimalizují délky větví pouze u změněných. Přesná pravděpodobnost a optimalizace se počítá jen u stromů s nejvyšším odhadem pravděpodobnosti. Program vždy pracuje jen s tím nejlepším stromem. V případě, že najde lepší, je původní strom z analýzy odstraněn.

##### **4.2 Analýza metodou maximální parsimonie**

Matice byla exportována pomocí programu PAUP\* (Swofford, 2002) do formátu NEXUS a analyzována pomocí programu T.N.T. v. 1.1. Výstupem programu byl soubor obsahující maximálně parsimonní stromy a pro výpočet statistické podpory větví byly vygenerovány stromy pomocí pseudoreplikací. Následně byl soubor analyzován v programu PAUP\* pro vytvoření konsenzuálních stromů.

Program T.N.T. využívá algoritmu rychlého vyhledávání stromů Ratchet (Nixon, 1999). Při použití metody maximální parsimonie se hledá strom nebo skupina stromů s co

možná nejmenším počtem kroků. Čím strom obsahuje méně kroků, tím je hypotéza jednodušší. Pokud je nějaký znak sdílen, tak má společný původ. V případě vzniku konfliktu mezi znaky, které neposkytují stejný výsledek, tak se daný znak označí za homoplazii (Hall, 2001). Znaky, které se vyskytují pouze u jednoho jedince (případně u všech), se z analýzy automaticky vyřazují (Hall, 2001).

### **4.3 Bayesiánská analýza**

Základem této statistické metody je odhad pravděpodobnosti, že je naše hypotéza pravdivá. Posuzuje se sekvence DNA, evoluční model a topologie stromu. Cílem této metody je nalézt takový strom, který je maximálně pravděpodobný při daných sekvencích a evolučním modelu. Bayesiánská analýza nevyprodukuje pouze jeden strom, ale celou sérii stromů s podobnými pravděpodobnostmi.

Analýza byla provedena v programu Mr. Bayes 3.2 na severu Cipres (Miller, 2010). Analýza byla nastavena na 40 000 000 generací se dvěma paralelními běhy a čtyřmi vlákny.

## 5. Výsledky

### 5.1 Výsledky analýz sekvencí

Celkem bylo získáno 263 sekvencí rodů *Calochromus*, *Lygisterus*, *Macrolygisterus* a *Adoceta*. Taxon byl zařazen do analýzy, pokud byla získána minimálně jedna sekvence. Tyto vzorky byly amplifikovány a sekvenovány pro fragmenty genů 16S rRNA, COI mtDNA a ND5 mtDNA. Následně byli sekvenováni vybraní zástupci jednotlivých rodů pro fragmenty genů 18S rRNA a 28S rRNA (Tabulka 3).

Tabulka 3: Amplifikace jednotlivých vzorků (ano - úspěšná sekvenace, ne – neúspěšná sekvenace, x – nesekvencováno).

Vzorek	18s	28s	16s	COI	N5
MT001	ano	ano	ano	ano	ano
MT002	ano	ano	ano	ano	ano
MT003	x	x	ano	ano	ano
MT004	ano	ano	ano	ano	ano
MT005	x	x	ano	ano	ano
MT006	x	x	ano	ano	ano
MT007	x	x	ano	ano	ano
MT008	x	x	ne	ano	ano
MT009	x	x	ano	ne	ano
MT010	x	x	ano	ano	ano
MT011	x	x	ano	ano	ano
MT012	ano	ano	ano	ano	ano
MT013	x	x	ano	ano	ano
MT014	ano	ano	ano	ano	ano
MT015	x	x	ne	ano	ano
MT016	x	x	ne	ano	ano
MT017	ano	ano	ano	ano	ano
MT018	x	x	ano	ne	ne
MT019	ano	ano	ano	ano	ano
MT020	x	x	ano	ano	ano
MT021	x	x	ano	ano	ano
MT022	x	x	ano	ano	ano
MT023	x	x	ano	ano	ano

MT024	x	x	ne	ne	ne
MT025	x	x	ne	ano	ano
MT026	x	x	ano	ne	ne
MT027	x	x	ano	ano	ano
MT028	x	x	ano	ano	ano
MT029	x	x	ano	ano	ano
MT030	ano	ano	ano	ano	ano
MT031	x	x	ne	ano	ano
MT032	ano	ano	ano	ano	ano
MT033	x	x	ano	ano	ano
MT034	x	x	ano	ano	ano
MT035	x	x	ano	ano	ano
MT036	x	x	ano	ano	ano
MT037	x	x	ano	ano	ano
MT038	x	x	ano	ne	ne
MT039	x	x	ano	ano	ano
MT040	x	x	ano	ano	ano
MT041	x	x	ano	ano	ano
MT042	x	x	ne	ne	ne
MT043	x	x	ano	ano	ano
MT044	x	x	ano	ano	ano
MT045	x	x	ano	ano	ano
MT046	x	x	ano	ano	ne
MT047	ano	ano	ano	ano	ano
MT048	x	x	ano	ano	ano
MT049	ano	ano	ano	ano	ano
MT050	x	x	ano	ano	ano
MT051	ano	ano	ano	ano	ano
MT052	x	x	ano	ano	ano
MT053	x	x	ano	ano	ne
MT054	ano	ano	ano	ano	ne
MT055	x	x	ano	ano	ano
MT056	x	x	ano	ano	ne
MT057	ano	ano	ano	ano	ano
MT058	x	x	ano	ano	ano
MT059	ano	ano	ano	ano	ano

MT060	ano	ano	ne	ano	ano
MT061	x	x	ano	ano	ano
MT062	ano	ano	ano	ano	ano
MT063	x	x	ano	ano	ano
MT064	ano	ano	ano	ano	ano
MT065	x	x	ano	ano	ano
MT066	x	x	ano	ano	ano
MT067	ano	ano	ano	ano	ano
MT068	ano	ano	ano	ano	ano
MT069	ano	ano	ano	ano	ne
MT070	ano	ano	ano	ano	ano
MT071	x	x	ano	ano	ano
MT072	x	x	ano	ano	ano
MT073	ano	ano	ano	ano	ano
MT074	ano	ano	ano	ano	ano
MT075	ano	ano	ano	ano	ne
MT076	ano	ano	ano	ano	ne
MT077	x	x	ano	ano	ano
MT078	x	x	ano	ne	ano
MT079	x	x	ano	ano	ne
MT080	x	x	ano	ne	ano

Fragment genu 16S rRNA se podařil amplifikovat u 69 jedinců s průměrnou délkou 806 bází a zastoupením jednotlivých nukleotidů A = 35.59 %, T = 41.37 %, C = 8.16 % a G = 14.87 %. Kompletní gen 18S rRNA byl amplifikován pro 28 jedinců s průměrnou délkou 1864 párů bází a zastoupením nukleotidů A = 25.79 %, T = 23.54 %, C = 22.92 % a G = 27.75 %. Gen 28S rRNA byl sekvenován pro 28 jedinců se zastoupením nukleotidů A = 25.54 %, T = 20.15 %, C = 23.15 % a G = 31.16 % a průměrnou délkou 631 párů bází. Nejvíce vzorků se podařilo amplifikovat pro gen COI mtDNA a to 72 jedinců (zastoupení nukleotidů: A = 31.17 %, T = 45.32 %, C = 8.37 % a G = 15.14 % průměrná délka 1064 párů bází. Fragment genu ND5 mtDNA byl získán pro 65 jedinců, zastoupení nukleotidů A = 31.17 %, T = 45.32 %, C = 8.37 % a G = 15.14 %, průměrná délka 1230 párů bází. Matice vzniklá konkatencí jednotlivých fragmentů obsahovala 5586 pozic pro každý vzorek (Tabulka 4).

Sekvence fragmentů genů 18S rRNA a 28S rRNA vykazovaly velmi nízkou míru genetické vzdálenosti mezi jedinci. Nejvyšší rozdíl byl mezi vzorky MT025 a MT012 1,6 % u genu 18S rRNA. U genu 28S rRNA byla největší genetická vzdálenost zjištěna mezi vzorky MT070, MT073 a MT076, dosahovala shodně 2,3 % (Příloha 4, Příloha 5) Genetické vzdálenosti u genů 16S rRNA, COI mtDNA a ND5 mtDNA dosahovaly mnohem vyšších hodnot a byly variabilnější. Z nízkých hodnot genetických vzdáleností můžeme usuzovat, že se jedná pravděpodobně o jeden druh. O jedince jednoho druhu se zřejmě jedná u vzorků MT080 a MT075; MT004 a MT069; MT003 a MT036; MT046 a MT054; MT041 a MT044; MT046 a MT054; MT62 a MT63; MT060 a MT028; MT050 a MT070; MT043 a MT40; MT015 a MT016; MT002 a MT007; MT014 a LB124; MT049 a MT057; MT059 a MT68 (Příloha 6, Příloha 7, Příloha 8).

Zjištěné vysoké průměrné zastoupení bází adeninu a thyminu u genů kodujících mitochondriální proteiny je obvyklé (Simon *et al.*, 1994).

Tabulka 4. Pozice jednotlivých fragmentů v super-matici a jejich délka

fragment	pozice v matici	počet bází
18S	1-1865	1865
28S	1866-2496	630
16S	2497-3107	610
tRNA Leu	3108-3299	191
COI	3300-4081	781
tRNA Leu	4082-4140	58
COII	4141-4364	223
ND5	4365-5385	1020
tRNAs	5386-5586	200

## 5.2 Výsledky fylogenetických analýz

### RAxML

Metodou optimalizačního kritéria maximum likelihood jsem získal maximálně pravděpodobný strom pro daný dataset a majoritní konsenzuální strom s hodnotou bootstrapové podpory jednotlivých větví.

### Maximální parsimonie

Programem T.N.T. jsem získal 2 stejně maximálně parsimonní stromy, které měly délku 15282 kroků. Takto vyprodukované stromy se lišily pouze topologií terminálních větví. Index konzistence byl 0,2433, index retence 0,5892 a index homoplazie dosáhl hodnot 0,7567. V datové matici bylo 3519 znaků konstantních, 1687 bylo parsimonně informativních a 380 bylo variabilních, ale parsimonně neinformativních.

### Bayesiánská analýza

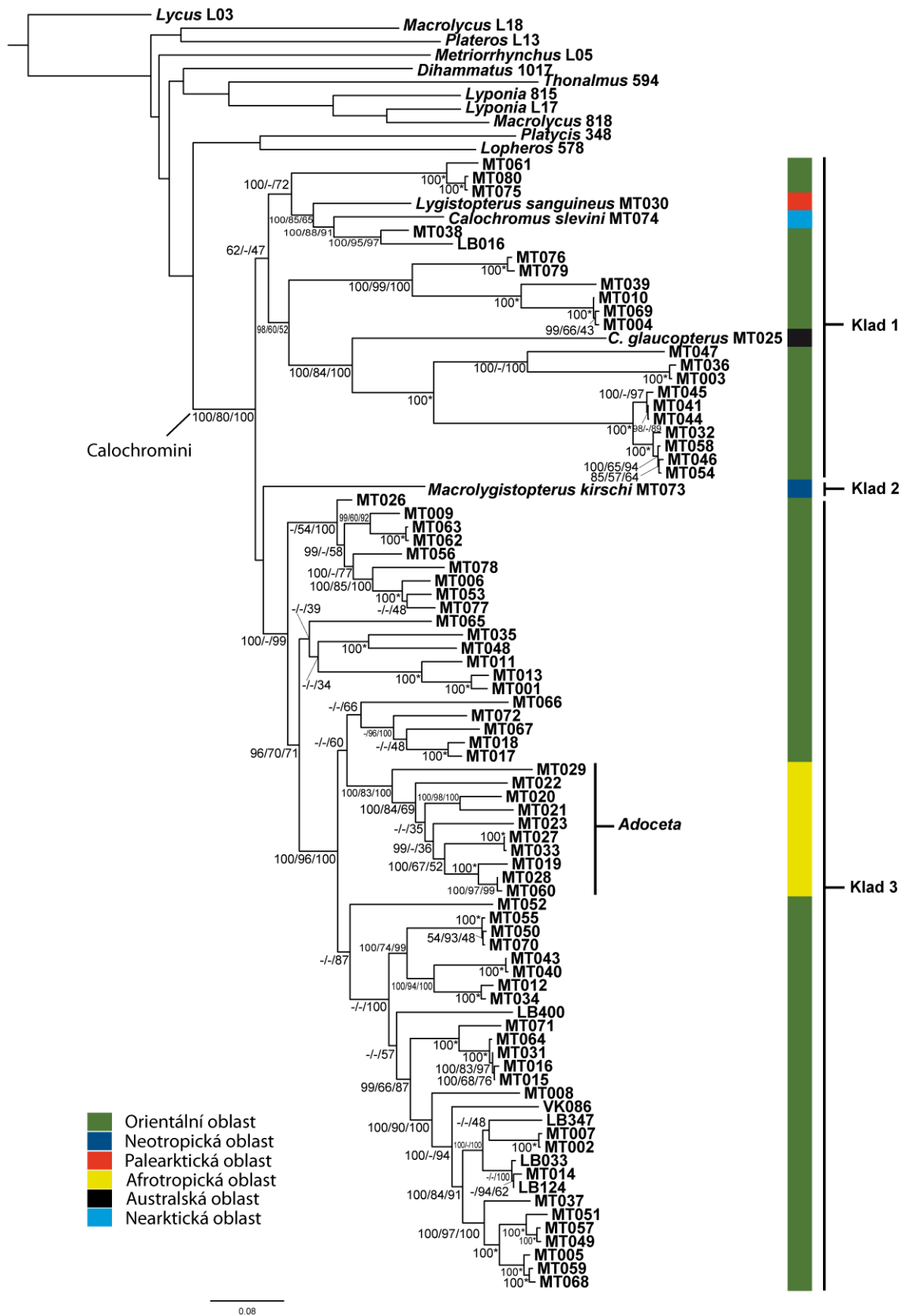
Datová matice byla následně analyzována programem Mr.Bayes a bylo vytvořeno 40 000 000 generací stromů, z kterých byl uložen každý 1000. strom vzhledem k nízké změně topologie mezi generacemi. Prestacionární fáze byla identifikována v programu Tracer jako fáze narůstající pravděpodobnosti a obsahovala 7 000 stromů, které byly z analýzy odstraněny. Ze zbylých 55 000 stromů reprezentujících stacionární fázi byl sestaven 50% majoritní konsenzuální strom (Příloha 3).

Pomocí metody maximální pravděpodobnosti a bayesiánskou metodou byly získány stromy, které byly plně rozlišené a lišily se pouze v uspořádání některých terminálních linií. V topologii kladogramu vytvořeného metodou maximální parsimonie se vyskytovaly polytomie. Všechny fylogenetické analýzy potvrdily monofylii tribu Calochromini, kdy nejnižší hodnota podpory, 80%, byla u stromu vytvořeného pomocí parsimonie. (Obr. 1, Příloha 2, Příloha 3).

Rody, které byly historicky definovány na základě morfologických znaků, nevytvářely monofyla, ale v topologii stromu se vyskytovaly pouze jako terminální linie s vysokou podporou (mimo vzorku MT073 reprezentujícího rod *Macrolygistopterus* (Obrázek 1, Příloha 2, Příloha 3). Morfologicky definovaný rod *Lygistopterus*, v analýze



zastoupený typovým druhem *Lygistopterus sanguineus* (vzorek UPOL MT0030) v žádné analýze neměl postavení bazální linie. Ve všech topologiích byl *L. sanguineus* součástí kládu tvořeného druhy rodu *Calochromus* z Orientální a Nearktické oblasti (Obrázek 1). Tento klád byl v sesterské pozici ke skupině, ve které se nacházel typový druh rodu *Calochromus* z Australské oblasti a vzorky z Orientální oblasti. Rodu *Macrolygistopterus* (vzorek UPOL MT0073) byl v sesterské pozici k samostatné větvi sdružující některé druhy rodu *Calochromus* a všechny druhy klasifikované na základě morfologie jako *Adoceta*. Rod *Adoceta* vytváří monofyletickou skupinu s velkou podporou ve všech analýzách, ale v rámci topologie zaujímá pouze pozici terminální linie uvnitř jediné linie široce definovaného rodu *Calochromus*.



Obrázek 1.: Fylogram vytvořený pomocí metody RAxML. Bootstrap podpora ukazuje (zleva doprava) hodnoty posteriorních pravděpodobností, maximum parsimony a maximum likelihood (hodnota 100\* vyjadřuje 100% podporu u všech použitých metod). Barevně jsou zaznačeny zoogeografické oblasti.

## 6. Diskuze a závěr

Moderní zoologická klasifikace musí být založena na fylogenetické příbuznosti (Henning, 1955, 1966). Tribus Calochromini byl morfologicky definován strukturou genitálií, absencí prothorakálních žeber a absencí příčných žeber na krovkách. Ve všech molekulárních analýzách byla potvrzena monofylie takto definovaného tribu Calochromini a tím splněn základní požadavek pro akceptování tohoto tribu ve fylogenetické klasifikaci.

Další otázkou byly příbuzenské vztahy mezi základními liniemi tribu Calochromini. Dosavadní klasifikace tribu Calochromini na úrovni rodu byla postavena spíše na povrchní podobnosti a nebyla nikdy kriticky hodnocena vypovídací hodnota jednotlivých znaků pro konstrukci fylogeneze. Rody byly definovány na základě přítomnosti / absence prodlouženého rostra (*Lygisterus* a *Macrolygisterus* versus ostatní rody), krátkého a robustního, ale spíše drobného těla (*Adoceta* versus ostatní rody). Tyto znaky mohou být velmi silně ovlivněny přírodním výběrem (Sklenarova *et al.*, 2014), a proto se tato studie primárně soustřeďuje na konstrukci fylogenetické hypotézy na základě sekvencí jaderných a mitochondriálních fragmentů DNA. Tyto markery nejsou ovlivněny stejnými procesy jako výše uvedené morfologické znaky, a proto předpokládáme, že poskytnou nezávislou informaci o příbuznosti jednotlivých skupin v tribu Calochromini a budou základem pro kritické posouzení monofylie dříve definovaných taxonů ze skupiny rodů a následnou revizi rodové klasifikace tribu Calochromini. Analýza je založena na pěti fragmentech genů, které poskytují dostatečné množství informací pro konstrukci fylogeneze.

Výsledky molekulární analýzy jsou ve zjevném rozporu s dosavadní klasifikací a zpochybňují klasifikaci založenou na morfologické podobnosti. Rod *Lygisterus* byl definován na základě modifikace hlavové kapsuly, která je protažena v dlouhé rostrum. Tato adaptace umožňuje příjem nektaru z květů rostlin a je přizpůsobením životu v aridních oblastech, kde není k dispozici jiný zdroj tekutin. Tento znak je proto variabilní a vyvinul se nezávisle např. v tribu Metriorrhynchini: rody *Leptotrichalus* a *Porrostoma* z Australské oblasti mají vyvinuté rostrum, zatímco většina ostatních rodů má kompaktní hlavovou schránku (Bocak, 2002). Podobně je vyvinuto rostrum v tribu Lycini, ale nepřítomno v nearktickém a neotropickém blízké příbuzném tribu Calopterini (Bocak & Bocakova, 2008). Dalším rodem akceptovaným dlouhodobě v klasifikaci tribu Calochromini je *Adoceta* Bourgeois, 1882. Tento rod zahrnuje afrotropické druhy tribu Calochromini a jejich společným znakem je drobné, poměrně krátké a široké tělo. Tento rod reprezentoval pouze terminální linii v kladu tři, proto předpokládám, že tato skupina má monofyletický původ

a zahrnuje linie diversifikované v Subsaharské Africe. Vzhledem k převládajícímu suchému klimatu se druhy vyvíjely v méně příznivých podmínkách a toto se mohlo projevit v miniaturizaci těla. Pouze dva druhy rodu *Adoceta* se vyskytují v Neaktické oblasti, a to v Arizoně a Novém Mexiku (*Adoceta ignita* a *Adoceta apicalis*). Pravděpodobně se jedná o druhy příbuzné ostatním druhům tribu Calochromini v dané oblasti a morfologicky připomínají rod *Adoceta* pouze v důsledku výskytu v podobných klimatických podmínkách.

Vysoká diversita tropického holometabolního hmyzu přináší zásadní problém pro systematickou entomologii. Dosavadní znalosti o tribu Calochromini jsou velmi omezené. Úkolem moderní fylogenetické systematiky je vytvořit přirozený systém a v něm delimitovat rody na základě fylogenetické příbuznosti. Molekulární fylogeneze ukazuje na nutnost redefinice základních linií na úrovni rodu v tribu Calochromini. Dosud se však nepodařilo identifikovat morfologické znaky, které by podpořily definici alespoň některých dříve definovaných taxonů, a proto v této studii nenavrhuji formální taxonomické změny.

## 7. Seznam použité literatury

Alatalo, R. V. & Mappes J. (1996): Tracking the evolution of warning signals. *Nature* **382**: 708–710.

Bocak, L. (2001a): New species of the genus *Wakarumbia* from Sulawesi (Coleoptera: Lycidae). *The Raffles Bulletin of Zoology* **49**: 259–267.

Bocak, L. (2001b): New taxa of *Leptolycus* (Coleoptera: Lycidae) from the Dominican Republic. *Folia Heyrovskyana* **9**: 203–210.

Bocak, L. (2002): Generic revision and phylogenetic analysis of the Metriorrhynchinae (Coleoptera: Lycidae). *European Journal of Entomology* **99**: 315–351.

Bocak, L. & Bocakova, M. (1990): Revision of the supergeneric classification of the family Lycidae (Coleoptera). *Polskie Pismo Entomologiczne* **59**: 623–676.

Bocak, L. & Bocakova, M. (2008): Phylogeny and Classification of the Family Lycidae (Insecta: Coleoptera). *Annales Zoologici* **58**: 695–720.

Bocak, L. & Yagi, T. (2010): Evolution of mimicry patterns in *Metriorrhynchus* (Coleoptera: Lycidae): the history of dispersal and speciation in Southeast Asia. *Evolution* **64**: 39–52.

Bocak, L., Matsuda, K. & Yagi, T. (2006): A revision of *Metriorrhynchus* from the Philippines with molecular evidence of an Australian origin of the Oriental *Metriorrhynchus* fauna (Coleoptera: Lycidae). *European Journal of Entomology* **103**: 115–126.

Bocak, L., Bocakova, M., Hunt T. & Vogler A. P. (2008): Multiple ancient origins of neoteny in Lycidae (Coleoptera): consequences for ecology and macroevolution. *Proceedings of the Royal Society B* **275**: 2015–2023.

Bocakova, M. (2001): Revision and phylogenetic analysis of the subfamily Platerodinae (Coleoptera: Lycidae). *European Journal of Entomology* **98**: 53–85.

Bocakova, M. (2003): New Libnetini from China, Nepal, and Laos (Coleoptera, Lycidae). *Biologia* **58**: 173–177.

Bocakova, M., Bocak, L., Hunt, T., Teravainen, M. & Vogler, A. P. (2007): Molecular phylogenetics of Elateriformia (Coleoptera): evolution of bioluminescence and neoteny *Cladistics* **23**: 477–496.

Dvorak, M. & Bocak, L. (2007): *Sulabanus* gen. nov., a new genus of Lycidae (Coleoptera) from Sulawesi. *Zootaxa* **1611**: 1–24.

Dvorak, M. & Bocak, L. (2009): Ten new species of *Wakarumbia* Bocak, 1999 from Sulawesi (Coleoptera: Lycidae), with a key to males of the genus. *Zootaxa* **2282**: 51–61.

Eisner, T., Schroeder, F. C., Snyder, N., Grant, J. B., Aneshansley, D. J., Utterback, D., Meinwald, J. & Eisner, M. (2008): Defensive chemistry of lycid beetles and of mimetic cerambycid beetles that feed on them. *Chemoecology* **18**: 109–119.

Goloboff, P., Farris, J. & Nixon, K. (2008): T.N.T: a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* **24**: 774–786.

Hall, B. G. (2001): *Phylogenetic trees made easy. A how-to manual for molecular biologists.* 255 pp., Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts

Hennig, W. (1955): Meinungsverschiedenheiten über das System der niederen Insekten. *Zoologischer Anzeiger* **155**: 21–30.

Hennig, W. (1966): *Phylogenetic Systematics.* 263 pp., University Illinois Press, Urbana

Huelsenbeck, J. F., Ronquist, F. (2001): MRBAYES: Bayesian inference in phylogenetic trees. *Bioinformatics Applications Note* **17**: 754–755.

Lawrence, J. F. & Newton, A. F. (1995): Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). pp. 779–1006. In: Pakaluk, J. & Slipinski, S. A. (eds.): Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa. 29

Kazantsev, S. V. (2005a): Review of *Aferos* Kazantsev (Coleoptera, Lycidae), with a note on *Staepteron cyanoxanthum* (Bourgeois). *Zootaxa* **830**: 1–23.

Kazantsev, S. V. (2005b): *Neolyrium* gen. n., first South American genus of net-winged beetles with 10-segmented antennae (Coleoptera: Lycidae). *Zootaxa* **1064**: 51–64.

Kleine, R. (1926): Die Lyciden der Philippinen-Inseln. *The Philippine Journal of Science* **31**: 33–81.

Kleine, R. (1928): Neue Indische Lycidae nebst faunistischen Bemerkungen. *Indian Forest Record* **13**: 221–269.

Kleine, R. (1933): Coleopterorum Catalogus auspiciis et auxilio W. Junk editus S. Schenkling. Pars 128: Lycidae. 145 pp., Berlin.

Levkanicova, Z. & Bocak, L. (2009): Identification of net-winged beetle larvae (Coleoptera: Lycidae) using three mtDNA fragments: a comparison of their utility. *Systematic Entomology* **34**: 210–221.

Linsley, E. G., Eisner, T. & Klots, A. B. (1961): Mimetic assemblages of sibling species of Lycid Beetles. *Evolution* **15**: 15–29.

Malohlava, V. & Bocak, L. (2010): Evidence of extreme habitat stability in a Southeast Asian biodiversity hotspot based on the evolutionary analysis of neotenic net-winged beetles. *Molecular Ecology* **19**: 4800–4811.

Masek, M., Ivie, M. A., Palata, V. & Bocak, L. (2014): Molecular phylogeny and classification of Lyropaeini (Coleoptera: Lycidae) with description of larvae and new species of *Lyropaeus*. *Raffles Bulletin of Zoology* **62**: 136–145

Miller, M.A. (2010): CIPRES Science Gateway survey results.  
<http://www.phylo.org/tools/survey2.html>

Moore, B. P. & Brown, W. V. (1981): Identification of warning odour components, bitter principles and antifeedants in an aposematic beetle - *Metriorrhynchus rhipidium* (Coleoptera: Lycidae). *Insect Biochemistry* **15**: 493–499.

Moore, B. P. & Brown, W.V. (1989) Graded levels of chemical defence in mimics of lycid beetles of the genus *Metriorrhynchus* (Coleoptera). *Journal of the Australian Entomological Society* **28**: 229–233.

Nixon, K. C. (1999): The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* **15**: 407–414.

Pic, M. (1921): Contribution a l'étude des Lycides. *L'Échange*, **405**: 5–8.

Pic, M. (1925): Malacodermes exotiques. *L'Échange*, **420**: 9–12.

Rambaut, A. (2010a): Se-AL Sequence Alignment Editor. University Of Edinburg.  
Online: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>

Rambaut, A. (2010b): Fig Tree. University Of Edinburg.  
Online: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Simon, C., Fratti, F., Beckenbach, A., Crespi, B. Liu, H. & Flook, P. (1994): Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**: 951–701.



Sklenarova, K., Kubecek, V. & Bocak, L. (2014): Subtribal classification of Metriorrhynchini (Insecta: Coleoptera: Lycidae): an integrative approach using molecular phylogeny and morphology of adults and larvae. *Arthropod Systematics and Phylogeny* **72(1)**: 37–54.

Stamatakis, A. (2006): RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688–2690.

Swofford, D. L. (2002): PAUP\*; Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 4.0b10. Sunderland: Sinauer.

Tvardík, D. & Bocak, L. (2001): Review of the genus *Plateros* Bourgeois (Coleoptera; Lycidae) from Sulawesi. *Zootaxa* **16**: 1–12.

Waterhouse, C. O. (1878): On the different forms occurring in the Coleopterous family Lycidae, with description of new genera and species. *Transactions of the Entomological Society* **1878**: 95–118.

Wong, A. T. C. (1996): A new species of neotenous beetle, *Duliticola hoiseni* (Insecta: Coleoptera: Cantharoidea: Lycidae) from Peninsular Malaysia and Singapore. *Raffles Bulletin of Zoology* **44**: 173–187.

## **8. Seznam příloh**