

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2013

Lucie Kampová

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra botaniky**



**Molekulární fylogeneze rodu *Dilophotes*
Waterhouse, 1879 ze Sumatry**

Diplomová práce

Lucie Kampová

Studijní obor: Tělesná výchova – učitelství biologie pro střední školy

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

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

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně. Uvedla jsem všechny literární prameny a publikace, ze kterých jsem čerpala.

V Olomouci dne

Bc. Lucie Kampová

Děkuji vedoucímu práce za konzultace, poskytnutý materiál pro izolaci DNA a připomínky k rukopisu diplomové práce. A rovněž děkuji ostatním kolegům za pomoc během práce v laboratoři molekulární systematiky.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Lucie Kampová

Název práce: Molekulární fylogeneze rodu *Dilophotes* Waterhouse, 1879 ze Sumatry

Typ práce: diplomová práce

Pracoviště: Katedra botaniky, PřF UP v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt:

Tropická fauna hmyzu je velmi bohatá a nedostatečně poznaná. Pro studium taxonomicky nezpracovaných skupin je možné použít sekvence DNA a na jejich základě definovat biologické druhy, sestavit molekulární fylogenezi skupiny a studovat evoluci znaků. Sekvenovala jsem tři molekulární mitochondriální markery *cox1*, *nad5* a *rrnL* pro zástupce rodu *Dilophotes* Waterhouse, 1879 (Coleoptera: Lycidae) z celého areálu tohoto rodu. Matice obsahovala 144 terminálních linií včetně použité mimoskupiny a 102 linií po vyfiltrování taxonů, pro které nebyly některé markery k dispozici. Celkem bylo identifikováno 39 druhů na základě sekvencí DNA a morfologie. Topologie fylogenetických stromů byla podobná pro různé metody alignmentu a metody výpočtu. Zjistila jsem, že bazální linie rodu *Dilophotes* se vyskytují v kontinentální Asii, především v Číně a Indočíně. Terminální linie osídlily oblast Velkých Sund a Filipín. *Dilophotes* náleží k druhům chráněných proti predátorům a většina druhů je aposematically zbarvených. Zjistila jsem sexuální polymorfismus několika druhů z oblasti Velkých Sund. Samice těchto druhů napodobují vzor *Cautires/Calochromus* a samci vzor *Libnetis*. Evoluce těchto vzorů je důsledkem rozdílů ve velikosti těla a s tím souvisejícím omezením možnosti napodobovat lokální vzory po osídlení nového areálu. Dále jsem zjistila vznik unikátních vzorů demonstrovaných jediným druhem. Výsledky ukazují na roli evolučních omezení a možnost vzniku nových vzorů *de novo* v multidruhových společenstvech aposematically zbarvených nejedlých brouků čeledi Lycidae.

Klíčová slova: druhová diversita, molekulární fylogeneze, mtDNA, mimikry, *Dilophotes*

Počet stran: 48

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Lucie Kampová

Title: Molecular phylogeny of the genus *Dilophotes* Waterhouse, 1879 from Sumatra

Type of thesis: Master Thesis

Department: Department of Botany, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

Supervisor: Prof. Ladislav Bocák, Ph.D.

The year of presentation: 2013

Abstract:

Tropical fauna is extremely species-rich and only partially known. Taxonomically poorly known lineages can be studied using DNA markers. We can delineate biological species, investigate their phylogenetic relationships and infer the evolution of traits using molecular data. Three mitochondrial markers, *cox1*, *nad5* and *rrnL* were obtained for representatives of the beetle genus *Dilophotes* Waterhouse, 1879 (Coleoptera: Lycidae). The data matrix included 144 terminals including an outgroup and after filtering for terminals with complete representation of all three markers the resulting matrix included 102 terminals. I identified 39 species using molecular phylogeny and morphological information. The topology was similar when inferred using various alignment methods and optimization criteria for tree building. The results show continental Asia as an ancestral range of *Dilophotes* where basal lineages are distributed. Terminal lineages dispersed to the Greater Sunda Islands and the Philippines. *Dilophotes* is a member of the species rings of aposematically coloured unpalatable species. Several species express sexually linked polymorphism which developed independently in several lineages. The females resemble the pattern of *Cautires/Calochromus* and males the pattern of *Libnetis*. The evolution of these patterns is linked to the differences in the body size and these differences constrained the evolution of the pattern in respective sex. I suppose that the local patterns were adopted by advergence after dispersal to a new range. Further, I found the presence of the unique patterns represented by a single species. The results show a role of evolutionary constraints in the evolution of warning colouration and a possibility of *de novo* evolution of a new pattern in the multispecies communities of unpalatable aposematically coloured communities of net-winged beetles.

Keywords: species diversity, molecular phylogeny, mtDNA, mimicry, *Dilophotes*

Number of pages: 48

Number of appendices: 0

Language: Czech

OBSAH

1. Úvod.....	9
1. 1 Cíl práce	12
2. Materiál a metody.....	14
2. 1 Materiál	14
2. 2 Laboratorní práce: izolace DNA, PCR amplifikace, čištění PCR produktu, cycle	17
sequencing, sekvenování	17
2. 3 Analýza dat: editace sekvencí, alignment, fylogenetické analýzy	19
3. Výsledky.....	21
3. 1 Terénní pozorování, mimetické vzory, velikost těla.....	21
3. 2 Sekvenování a fylogenetické analýzy	22
3. 3 Fylogenetické analýzy	23
4. Diskuse a závěr.....	38
5. Literatura	45

SEZNAM TABULÍ

Tabule 1. Zástupci druhů patřících do aposematických komplexů.	35
Tabule 2. Vybrané barevné vzory rodu <i>Dilophotes</i>	35
Tabule 3. Fylogram rodu <i>Dilophotes</i> získaný metodou Bayesiánské analýzy.	36
Tabule 4. Normalizovaný strom (chronogram) rodu <i>Dilophotes</i>	37
Tabule 5. Velikost krovky monochromatických a polychromatických jedinců.	38

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled materiálu pro mimoskupinové srovnání.....	14
Tabulka 2: Přehled studovaného materiálu, který byl nově sekvenován.	15
Tabulka 3: Přehled primerů použitých ke studii.....	18
Tabulka 4: Podmínky PCR amplifikace pro jednotlivé geny	18
Tabulka 5: Přehled délky krovek a šířky humeru sekvenovaných jedinců.	23
Tabulka 6: Průměrné velikosti těl a směrodatná odchylka monomorfických a polymorfických samců a samic.	25
Tabulka 7: Morfometrické znaky sekvenovaných zástupců rodu <i>Dilophotes</i>	26
Tabulka 8: Získané druhy rodu <i>Dilophotes</i>	29
Tabulka 9: Vnitrodruhové vzdálenosti <i>Dilophotes</i> sp. V, geny <i>rrnL</i> , <i>nad5</i> , <i>cox1</i>	30
Tabulka 10: Vnitrodruhové vzdálenosti <i>Dilophotes</i> sp. V, gen <i>rrnL</i>	30
Tabulka 11: Vnitrodruhové vzdálenosti <i>Dilophotes</i> sp. V, gen <i>cox1</i>	30
Tabulka 12: Vnitrodruhové vzdálenosti <i>Dilophotes</i> sp. V, gen <i>nad5</i>	31
Tabulka 13: Vnitrodruhové vzdálenosti <i>Dilophotes</i> sp. AE, gen <i>rrnL</i>	31
Tabulka 14: Vnitrodruhové vzdálenosti <i>Dilophotes</i> sp. AE, gen <i>cox1</i>	32
Tabulka 15: Vnitrodruhové vzdálenosti <i>Dilophotes</i> sp. AE, gen <i>nad5</i>	32
Tabulka 16: Zastoupení bazí – všechny geny.....	33
Tabulka 17: Seznam druhů tribu Dilophotini	33

1. Úvod

Molekulární metody studia fylogeneze otvírají nové možnosti pro studium evoluce různých organismů. Tato práce se zaměřuje na několik témat: (i) na základě sekvencí DNA budou definovány biologické druhy, (ii) bude vytvořena molekulární fylogeneze skupiny popisující příbuzenské vztahy mezi druhy a (iii) na základě této fylogenetické hypotézy bude popsána evoluce mimetických vzorů ve studované skupině.

Jako modelová skupina pro tuto studii byl zvolen rod *Dilophotes* Waterhouse, 1879 z čeledi Lycidae (Insecta: Coleoptera). Tento rod je klasifikován v tribu Dilophotini, podčeledi Scarelinae (Bocák & Bocáková 2008). Rod *Dilophotes* obsahuje poměrně velký počet druhů, jejichž areály jsou limitovány na jednotlivé ostrovy nebo horské oblasti. Naprostá většina druhů je aposematicky zbarvena a je součástí mimetických komplexů obsahujících jiné skupiny čeledi Lycidae a množství dalších skupin brouků, eventuálně ploščic nebo motýlů. Toto zbarvení se uplatňuje jako signál ve vztahu predátor-kořist informující o ochraně této skupiny brouků před predátory (Eisner et al. 2008).

Čeďed' Lycidae je kosmopolitně rozšířena kromě Antarktidy a Nového Zélandu. Dosud bylo popsáno přibližně 4600 druhů, kteří jsou klasifikováni ve 160 rodech (Kleine 1933; Bocák & Bocáková 2008).

Pro výskyt zástupců čeledi Lycidae je typické zastíněné a vlhké lesní či keřovité prostředí. Jen málo rodů této čeledi dokáže žít na místech vystavených přímému slunečnímu svitu. Typický pro všechny Lycidy je pomalý a těžkopádný let, který je dán slabou sklerotizací jejich těla (Bocák & Bocáková 2008). Larvy se živí fermentovanými tekutinami hniajícího dřeva, zatímco dospělí jedinci potravu nepřijímají (Bocák & Matsuda 2003). Délka vývoje a počet larválních instarů nejsou doposud známy, dlouhý vývoj jedinců chovaných v inšektáriích však naznačuje, že k dokončení vývoje je typicky zapotřebí 3-5 let (Bocák & Matsuda 2003; Burakowski 1988; Hayashi 1986; Miller 1988, 1997; Wong 1996). Silná vazba larválních stádií na rozkládající se dřevo, jejich omezená pohyblivost a citlivost na vysychání, omezuje podstatně jejich vagilitu. Podobně omezené jsou schopnosti pohybu dospělců, kteří po celý, typicky jen několika týdenní život, zůstávají v nejnižších patrech tropického deštného lesa. Proto se druhy této čeledi vyskytují v malých, mnohdy velmi izolovaných areálech.

Aposematické zbarvení je spojeno s nejedlostí všech druhů čeledi Lycidae pro většinu predátorů. Nejedná se o druhy jedovaté, ale spíše zapáchající a mimořádně hořké (Bocák & Matsuda 2003). Jako obranu proti predátorům využívají brouci čeledi Lycidae vypouštění silně zapáchající hemolymfy na okrajích krovek, na tykadlech a mezi články končetin. Pro Lycidae je typické aposematické zbarvení (Lindsley et al. 1961; Bocák 2003). Obvykle se

jedná o černo-červené nebo černo-žluté vzory. Občas se vyskytují také druhy se sítovaným zbarvením vyznačujícím se tmavým podkladem se světle barevnými žebry krovek. V některých oblastech se vyskytují jedinci s tříbarevnými krovkami, například na Papui se jedná o některé druhy rodu *Cladophorus* Guérin-Méneville, 1830 (Bocák & Bocáková 2008). Tyto barevné vzory bývají striktně omezeny na určitou oblast, kde jsou sdíleny větším počtem druhů. Lycidae mohou vytvářet agregace až o 15 druzích a v těchto skupinách mohou být přítomni také jiní zástupci třídy Insecta s podobnými barevnými vzory (Carpenter & Ford 1933; Bocák L., osobní sdělení). Takové chování je typické pro aposematicky chráněné organismy, protože náklady na edukaci predátora jsou sdíleny větším počtem druhů. Rod *Dilophotes* patří do skupiny s výrazným pestrým zbarvením a zapáchá podobně jako ostatní druhy této čeledi (Bocák L., osobní sdělení).

Podobně jako v mnoha jiných skupinách tropického hmyzu je poznání diversity čeledi Lycidae velmi omezené. Proto sekvenování velkého počtu jedinců může sloužit k odhadům skutečné diversity čeledi. Identifikace druhů na základě sekvencí DNA je v posledních letech rozvíjena velmi intenzivně projektem "Barcoding of Life" (Hebert et al. 2003). Základním stavebním pilířem tohoto projektu je myšlenka využití krátkých sekvencí mitochondriálního genu *cox1*, které jsou jedinečné pro každý biologický druh k identifikaci druhů. Principem této metody je vybrání takového markeru, který podléhá mutacím dostatečně rychle, aby bylo možné od sebe rozlišovat jednotlivé druhy a zároveň dostatečně pomalu, aby rozdíl mezi jedinci stejného druhu byly minimální. Zde se využívá tzv. degenerace genetického kódu, což je jedna z jeho základních vlastností. Jedná se o výběr genů kódujících proteiny, jež mají na třetí pozici v kodonech synonymní mutace. To znamená, že funkce proteinu není nijak ovlivněna. Vhodným kandidátem je v tomto případě mitochondriální DNA (mtDNA), která je, na rozdíl od jaderné DNA (nDNA), komprimovaná, což znamená bez intronů a rovněž je typická haploidní dědičností a nízkým procentem rekombinací. Například mitochondriální gen *cox1*, jako jeden z molekulárních markerů vybraných pro tuto práci, je typický pro svou vysokou míru fylogenetického signálu z důvodu četných jednonukleotidových substitucí na třetích pozicích v kodonech, což souvisí se značnou evoluční rychlostí. Dalšími mitochondriálními geny použitými v této práci byly *nad5* a *rrnL* mtDNA (Smith et al. 2012). Využití několika markerů je nutné pro zajištění vyšší stability větví a možnosti srovnání fylogenetického signálu produkovaného různými markery. Vzhledem k tomu, že morfologicky založená klasifikace studované skupiny je v současnosti nepoužitelná pro evoluční studie, použití molekulárního markeru je alternativním řešením a morfologické informace mohou být použity pouze k následnému ověření výsledků fylogenetické analýzy.

Dalším aspektem hodným studie je evoluce mimetických vzorů v této skupině. Existence mimetických komplexů, kdy nepříbuzné druhy sdílejí podobné zbarvení, je jeden z nejnápadnějších příkladů evoluce (Bates 1861; Müller 1879) a již od konce 19. století jsou definovány dva typy mimikry. Jsou to Mülleriánské mimikry a Batesiánské mimikry. O mimikry hovoříme v případě, že vzhled, případně i chování potenciální kořisti, jsou signálem pro predátora, aby se vzdal útoku na chráněný organismus. Nezbytnou podmínkou je, že tyto znaky se musejí vyvíjet u nepříbuzných organismů v důsledku působení přírodního výběru a nesmějí být náhodně vzniklým znakem blízce příbuzných organismů bez působení predátora.

Tato studie je zaměřena na Mülleriánské mimikry. Ty vycházejí z předpokladu, že dva organismy, oba ochráněné před útokem predátora, jsou si nepodobné. Vzhledem k evoluční výhodnosti sdílení nákladů na učení predátora je předpokládáno, že tyto organismy konvergují ke stejnému mimetickému vzoru. Müllerův specifický model asociativního učení, zahrnující „stálé n“ v daném období, nebyl podpořen a několik experimentů v současnosti naznačuje, že predátor se může na dvou odlišných nepoživatelných kořistech naučit, že se jim má vyhnout. Nicméně, Müllerův hlavní pohled, že nové, nepoživatelné formy mají vyšší úmrtnost než obvyklé nepoživatelné druhy jako výsledek predace, byl dobře podporován terénními pokusy. Roste povědomí, že vztahy mezi Mülleriánskými mimetiky mohou být zprostředkovány mnoha faktory, zahrnují efekt společného působení mezi mimetiky, kteří se liší ve způsobu krytí, míře zobecnění mezi varovnými signály a doprovodnými změnami hustoty kořisti jako faktory ovlivňujícími rozvoj mimikry (Sherratt 2008).

Tradiční Mülleriánské mimikry, ve kterých se nepoživatelné druhy navzájem napodobují pro vzájemný prospěch, jsou jedny z nejdéle rozpoznávaných a nejlépe studovaných mutualismů. Mnoho motýlů, blanokřídlů, jiný hmyz nebo dokonce obratlovci jako např. ryby nebo koráloví hadi (Wickler 1968; Edmunds 1974; Turner 1977; Joron & Mallet 1998), patří do kruhu Mülleriánské mimikry uvnitř lokální oblasti. Výhody Batesiánských mimikry, ve kterých požitelní mimetici infikují parazity nepoživatelných vzorů napodobováním těchto varovných barevných vzorů, jsou zcela zřejmé. Oproti tomu Mülleriánské mimikry, ve kterých jsou oba partneři nepoživatelní, nejsou tak snadno přijatelné. První otázkou je, jak vznikne aposematické zbarvení. Jakákoliv demonstrace nápadného zbarvení v přítomnosti naivních predátorů musí nevyhnutelně vést k útokům na potenciální kořist, eliminaci mutovaných, nápadně zbarveným jedinců, a tím k zániku aposematického signálu v samém počátku jeho vývoje. Mülleriánské mimikry, ačkoliv intuitivně se jedná o velmi jednoduchý koncept, zůstávají v tomto směru velmi problematické. Další dosud nedořešenou otázkou je,

zda se jedná o mutualismus nebo o parazitování méně chráněných, eventuálně nechráněných druhů na druzích, které jsou již predátory hodnoceny jako nejedlé, jedovaté nebo nebezpečné a tedy již strpěly náklady učení predátora. Pokud by Mülleriánské mimikry měly být mutualismem, tak bychom mohli očekávat viditelné důkazy pro vzájemnou evoluční konvergenci. Avšak, důkazy pro vzájemnou konvergenci jsou slabé. Alternativním vysvětlením je advergence zbarvení jednoho chráněného druhu k vzoru jiného chráněného druhu, jak to bylo popsáno v čeledi Lycidae (Bocák & Yagi 2010). V tomto případě je důkaz založen na následné migraci nepříbuzných jinak zbarvených druhů do areálu, kde jsou již stabilizované mimetické komplexy a je předpokládána následná advergence k těmto vzorům. Rod *Dilophotes* má omezený areál a tento časový posun, v zapojení do mimetických okruhů, je možným vysvětlením. Otázkou je, jakým způsobem došlo k vytvoření mimetických vzorů v tomto rodu. Je zřejmé, že poznání evoluce mimikry v jednotlivých případech může přispět k pochopení tohoto konceptu i po více než sto letech od jeho zveřejnění (Müller 1879).

1. 1 Cíl práce

Cíle práce jsou následující:

1. Fylogeneze skupiny - na základě sekvencí DNA sestavit molekulární fylogenezi skupiny a ověřit, zda je možné na základě dosažených výsledků, definovat biologické druhy.

Molekulární data umožňují sestavení fylogenetických stromů. Výhodou použití molekulárních dat je možnost získání velkého objemu informací pro sestavení molekulární fylogeneze. Vzhledem k nezávislosti používaných markerů je možno využít molekulární data k testování momentálně akceptované klasifikaci studované skupiny. V této studii je primárním cílem sestavení molekulární fylogeneze skupiny, a proto nebyl sekvenován homologický fragment *cox1* mtDNA jako v projektu Barcoding, ale větší počet mitochondriálních genů. Předpokládám, že větší množství informací poskytne robustnější podporu pro definici druhů. Samotná molekulární data nemohou s jistotou rozhodnout o tom, zda se jedná o populaci jediného druhu nebo o samostatné biologické druhy. Ačkoliv arbitrárně je často uvažováno o 3% divergenci v mitochondriálních proteiny kódujících genech jako hranici mezi druhy, toto pravidlo není možné brát absolutně a je vhodné studovat paralelně i morfologii populací a druhů pro určení druhu. Proto morfologie jedinců tvořících jednotlivá monophyla byla srovnávána s morfologií sesterských skupin a za biologický druh byly označeny pouze skupiny jedinců lišících se rovněž morfologicky.

2. Evoluce mimetických vzorů – zjistit, zda podobné aposematické zbarvení je příkladem mimikry a popsat evoluci mimikry ve studované skupině.

Dalším směrem výzkumu je řešení obecných otázek týkajících se evoluce této skupiny. Vzhledem k tomu, že většina druhů je aposematicky zbarvených a jsou chráněni zápachem proti napadení predátory (Bocák & Bocáková 2008; Eisner et al. 2008) bude část práce zaměřena na studium evoluce mimikry.

Mülleriánské mimikry, u kterých jsou oba partneři nepoživatelní pro predátory, jsou často uvažovány jako příklad mutualismu. Dříve studované systémy mimetických druhů, (*Limenitis* – *Danaus* (Nymphalidae) v Severní Americe, *Bombus* – *Psithyrus* (Apidae) v Evropě a *Heliconius* – *Lamparus* (Nymphalidae) v tropické oblasti Jižní Ameriky, *Metriorrhynchus* v Jihovýchodní Asii, přinesly důkazy pro jednostrannou advergenci, ale žádný přesvědčující důkaz pro vzájemnou konvergenci, ačkoliv konvergence je tradičně uvažována jako mechanismus evoluce společných vzorů (Müller 1879). Dále, modely nepředpokládají polymorfismus v Mülleriánských systémech. Vycházejí totiž z adaptacionistického přístupu, že nevýhodnost nějaké vlastnosti, v tomto případě matoucí přítomnost dvou nebo více vzorů na jediné lokalitě, povede dříve nebo později k vytvoření jediného vzoru a tím se omezí náklady na edukaci predátora. V rozporu s tímto předpokladem není mimetický polymorfismus neobvyklý a je přítomen i v rodu *Dilophotes*. Vysvětlení, jak vznikl tento polymorfismus a proč nebyl dosud odstraněn, je předmětem této práce.

2. Materiál a metody

2.1 Materiál

Modelovou skupinou pro studium mimikry byla čeleď Lycidae ze skupiny Elateriformia (kovařici a příbuzné čeledi). V jihovýchodní Asii žije cca 1500 druhů čeledi Lycidae, kteří vytvářejí množství různých mimetických vzorů.

Materiál ke studiu byl poskytnut školitelem. V terénu byl materiál uložen v 96 % lihu a do izolace uložen v -20°C . Tento materiál byl použitý ke zpracování studie. Pouze *Dilophotes* byli sekvenováni v rámci této studie.

Celkem bylo sekvenováno 127 exemplářů rodu *Dilophotes* zastupujících neznámý počet druhů ze Sumatry (86 exemplářů), Javy (5 exemplářů), Malaisie (6 exemplářů), Bornea (7 exemplářů), Laosu (7 exemplářů), Kalimantanu (13 exemplářů), Číny (1 exemplář) a Thajska (2 exempláře). Do mimoskupiny bylo zahrnuto 21 taxonů z předchozí studie (Bocák et al. 2008). Jednotlivé taxony a data získaná z Genbank jsou uvedeny v tabulce 1 a 2.

Pro každého sekvenovaného jedince byla měřena délka krovek a šířka hrudi (Tab. 3). Krovka byla měřena v oblasti humeru (šířka) a od kloubu po apex (délka). Velikost krovky byla použita místo velikosti jedince pro snadnou definovatelnost a obtíže při měření jedinců poškozených při izolaci DNA.

Tabulka 1: Přehled materiálu pro mimoskupinové srovnání.

Název rodu	Číslo vzorku	číslo GenBank			Lokalita
		<i>nad5</i>	<i>cox1</i>	<i>rrnL</i>	
<i>Duliticola</i>	L01	DQ181339.1	DQ181185	-	Malaysia, Sabah
<i>Libnetis</i>	L02	DQ181186	DQ181340	-	Malaysia, Sabah
<i>Lycus</i>	L03	DQ181341.1	DQ181187	-	South Africa
<i>Lyropaeus</i>	L11	DQ181190	DQ181344	DQ180968	Malaysia
<i>Dihammatus</i>	L12	DQ181191	DQ181345	DQ180969	Malaysia
<i>Plateros</i>	L13	DQ181192	DQ181346	DQ180970	Malaysia
<i>Scarelus</i>	L15	DQ181194	DQ181348	-	Malaysia, Sabah
<i>Calochromus</i>	L16	DQ181195	DQ181349	DQ180973	China
<i>Lyponia</i>	L17	DQ181196	DQ181350	DQ180974	China
<i>Macrolycus</i>	L18	DQ181197	DQ181351	DQ180975	China
<i>Calopteron</i>	L25	DQ181201	DQ181355	-	Ecuador
<i>Plateros</i>	243	DQ181213	DQ181367	-	Malaysia
<i>Dilophotes</i>	244	DQ181214	DQ181368	DQ180992.1	Malaysia, Sabah
<i>Platycis</i>	348	DQ181217	DQ181371	DQ180995	Czech Republic
<i>Lycoprogenthes</i>	358	DQ181218	DQ181372	DQ180996	Indonesia
<i>Dictyopectera</i>	570	DQ181221	DQ181375	DQ180999	Japan, Toyama
<i>Pyropterus</i>	574	DQ181225	DQ181379	DQ181003	Japan, Ishikawa
<i>Lopheros</i>	578	DQ181383.1	DQ181229.1	DQ181007.1	Japan
<i>Lycoprogenthes</i>	801	DQ181243	DQ181397	DQ181021	Indonesia
<i>Libnetis</i>	1002	DQ181252	DQ181406	DQ181030	Indonesia

Tabulka 2: Přehled studovaného materiálu, který byl nově sekvenován.

Číslo vzorku	Taxon	Lokalita
A001	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A002	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A003	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A004	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A005	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A006	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A007	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A008	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A009	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A010	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A011	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A012	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A013	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A014	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A015	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A016	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
A060	<i>Dilophotes</i>	Philippines, Negros, Mt. Canlaon, Apr. 2007, Bolm lgt.
TH001	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH002	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH003	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH004	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH005	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH006	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH007	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH008	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH009	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH010	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH011	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH012	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH013	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH014	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH015	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH016	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH017	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH018	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH019	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH020	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH021	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH022	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH023	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH024	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH025	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH026	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH027	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH028	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH029	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH030	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26. Jan -1.Feb 2005, 1600-2200 m, Bolm lgt.
TH031	<i>Dilophotes</i>	China 1, Kuban
TH032	<i>Dilophotes</i>	Borneo, Sabah, km 53 KK-Tambunan, 1650m,Gn.Emas, 22 Mar-6 Apr 2000, Bolm lgt.
TH033	<i>Dilophotes</i>	C Kalimantan prov., 60km SE Muara Teweh,150m, 1.20.25S 115.20.16 E, 24. -28.Jun2001, Bolm lgt.C78
TH034	<i>Dilophotes</i>	Borneo, Sabah, km 53 KK-Tambunan, 1650m,Gn.Emas, 22 Mar-6 Apr 2000, Bolm lgt.
TH035	<i>Dilophotes</i>	Borneo, Sabah, km 53 KK-Tambunan, 1650m,Gn.Emas, 22 Mar-6 Apr 2000, Bolm lgt.
TH036	<i>Dilophotes</i>	Borneo, Sabah, km 53 KK-Tambunan, 1650m,Gn.Emas, 22 Mar-6 Apr 2000, Bolm lgt.
TH037	<i>Dilophotes</i>	Borneo, Sabah, km 53 KK-Tambunan, 1650m, Gn.Emas, 22 Mar-6 Apr 2000, Bolm lgt.

TH038	<i>Dilophotes</i>	Malaysia, Pahang, Tanah Rata, Gn. Jasar, 1600 m, 3.-9. Feb 2005, Bolm Igt.
TH039	<i>Dilophotes</i>	Java (C), Gn. Lawu, 8km W of Sarangan, 1850 m, 10.-11. May 2001, Bolm Igt.
TH040	<i>Dilophotes</i>	Java (C), Gn. Lawu, 8km W of Sarangan, 1850 m, 10.-11. May 2001, Bolm Igt.
TH041	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Barat, Pasaman, Gn. Talamau, 1000 m, 14.-15. Jan 2005, Bolm Igt.
TH042	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Gn. Talamau, 17 km E Simpangempat, 750 m, 21.-25. May 2001, Bolm Igt., (Ophir mts)
TH043	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Gn. Talamau, 17 km E Simpangempat, 750 m, 21.-25. May 2001, Bolm Igt., (Ophir mts)
TH044	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Barat, Lake, Maninjau, E coast, 800 m, 12.-23. Jan 2005
TH045	<i>Plateros</i>	Sumatra (S), SW coast Ranau lake, 1200 m, 1.-4. June 2001, Bolm Igt.
TH046	<i>Dilophotes</i>	Laos C., Bolikhamsai pr., BAN NAPE env., Jendek & Sausa leg., 7.-16. May 2004
TH047	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sinabung, 1400-2000 m, 29.-30. Jan 2005, Bolm Igt.
TH048	<i>Dilophotes</i>	Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sinabung, 1400-2000 m, 29.-30. Jan 2005, Bolm Igt.
TH049	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Gn. Tujuh, 5 km E Kersik Dua, 1900 m, 3.-5. May 2001, Bolm Igt.
TH050	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Gn. Tujuh, 5 km E Kersik Dua, 1900 m, 3.-5. May 2001, Bolm Igt.
TH051	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Gn. Tujuh, 5 km E Kersik Dua, 1900 m, 3.-5. May 2001, Bolm Igt.
TH052	<i>Dilophotes</i>	W Jawa,Puncak Pass, 10 km of Cipanas, 1250-1600m, 8-20.Oct. 2002, Bolm Igt.
TH053	<i>Dilophotes</i>	W Jawa,Puncak Pass, 10 km of Cipanas, 1250-1600m, 8-20.Oct. 2002, Bolm Igt.
TH054	<i>Dilophotes</i>	W Jawa,Puncak Pass, 10 km of Cipanas, 1250-1600m, 8-20.Oct. 2002, Bolm Igt.
TH055	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Jambi, Kersik Tua, Gn. Kerinci, 1600-2200 m, 19.-22. Jan 2005, Bolm Igt.
TH056	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Jambi, Kersik Tua, Gn. Kerinci, 1600-2200 m, 19.-22. Jan 2005, Bolm Igt.
TH057	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Jambi, Kersik Tua, Gn. Kerinci, 1600-2200 m, 19.-22. Jan 2005, Bolm Igt.
TH058	<i>Plateros</i>	W Sumatra prov., Kerinci, Seblat N. P., 24 km NE Tapan, Muara Sako E env., 400-550 m, 4.-18. March, L. Dembicky leg.
TH059	<i>Dilophotes</i>	W Sumatra prov., Kerinci, Seblat N. P., 24 km NE Tapan, Muara Sako E env., 400-550 m, 4.-18. March, L. Dembicky leg.
TH060	<i>Dilophotes</i>	W Sumatra prov., Kerinci, Seblat N. P., 24 km NE Tapan, Muara Sako E env., 400-550 m, 4.-18. March, L. Dembicky leg.
TH061	<i>Dilophotes</i>	Malaysia, Pahang, Road Ipoh Kg. Raja, 51 km E of Ipoh, 1100 m, 4. Feb 2005
TH062	<i>Dilophotes</i>	Malaysia, Pahang, Cameron Highland, Tanah Rata, 1400 - 1650 m, 4. - 11. Apr 2005, Bednarik leg., Bolm Igt.
TH063	<i>Dilophotes</i>	Malaysia, Pahang, Cameron Highland, Tanah Rata, 1400 - 1650 m, 4. - 11. Apr 2005, Bednarik leg., Bolm Igt.
TH064	<i>Dilophotes</i>	Thailand, Chiagma, pr., Dui Pui Nat. Park, P. Prudek RM., Oboril Igt., 27. Apr 2002
TH065	<i>Dilophotes</i>	Thailand, Chiagma, pr., Dui Pui Nat. Park, P. Prudek RM., Oboril Igt., 27. Apr 2002
TH066	<i>Dilophotes</i>	Borneo,Sabah, km 53 KK-Tambunan,1650m,Gn.Emas, 22 Mar-6 Apr 2000, Bolm Igt.
TH067	<i>Dilophotes</i>	Borneo,Sabah, km 53 KK-Tambunan,1650m,Gn.Emas, 22 Mar-6 Apr 2000, Bolm Igt.
TH068	<i>Dilophotes</i>	Malaysia, Pahang, Cameron Highland, Tanah Rata, 1600 m, 3.-20. AFeb 2005, P. Cechovsky, Bolm Igt.
TH069	<i>Dilophotes</i>	Malaysia, Pahang, Cameron Highland, Tanah Rata, 1600 m, 3.-20. AFeb 2005, P. Cechovsky, Bolm Igt.
TH070	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, July 2004
TH071	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, July 2004
TH072	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, July 2004
TH073	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, July 2004
TH074	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Jambi, Kersik Tua, Gn. Kerinci, 1600-2200 m, 19.-22. Jan 2005, Bolm Igt.
TH075	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Jambi, Kersik Tua, Gn. Kerinci, 1600-2200 m, 19.-22. Jan 2005, Bolm Igt.
TH076	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Jambi, Kersik Tua, Gn. Kerinci, 1600-2200 m, 19.-22. Jan 2005, Bolm Igt.
TH077	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Jambi, Kersik Tua, Gn. Kerinci, 1600-2200 m, 19.-22. Jan 2005, Bolm Igt.
TH078	<i>Dilophotes</i>	NE Laos, Hua Phan prov., Ban Saluei, 1500 m, 10. May 2004, F. Kanirer leg.
TH079	<i>Dilophotes</i>	NE Laos, Hua Phan prov., Ban Saluei, 1500 m, 10. May 2004, F. Kanirer leg.
TH080	<i>Dilophotes</i>	NE Laos, Hua Phan prov., Ban Saluei, 1500 m, 10. May 2004, F. Kanirer leg.
TH081	<i>Dilophotes</i>	NE Laos, Hua Phan prov., Ban Saluei, 1500 m, 10. May 2004, F. Kanirer leg.
TH082	<i>Libnetis</i>	Sumatra, Gn. Merapi, 5 km E of Kotobaru, 1600 m, 18.-25. May 2001, Bolm Igt.
TH083	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Gn. Merapi, 5 km E of Kotobaru, 1600 m, 18.-25. May 2001, Bolm Igt.
TH084	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Gn. Merapi, 5 km E of Kotobaru, 1600 m, 18.-25. May 2001, Bolm Igt.
TH085	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Gn. Merapi, 5 km E of Kotobaru, 1600 m, 18.-25. May 2001, Bolm Igt.
TH086	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Gn. Merapi, 5 km E of Kotobaru, 1600 m, 18.-25. May 2001, Bolm Igt.
TH087	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Gn. Merapi, 5 km E of Kotobaru, 1600 m, 18.-25. May 2001, Bolm Igt.
TH088	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.

TH089	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.
TH090	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.
TH091	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.
TH092	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.
TH093	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.
TH094	<i>Macrolycus</i>	Laos HUA Phan prov. 38 km S of Sam Neua, Saleui, 1500 m, 9.-22. May 2009, Bednarik Igt.
TH095	<i>Dilophotes</i>	Laos HUA Phan prov. 38 km S of Sam Neua, Saleui, 1500 m, 9.-22. May 2009, Bednarik Igt.
TH096	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.
TH097	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.
TH098	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.
TH099	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.
TH100	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.
TH101	<i>Dilophotes</i>	S Kalimantan prov. 10 km E of Loksado, 600-1100 m, 18.-23. Jun 2001, Bolm Igt.
TH102	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, Sept 2004
TH103	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, Sept 2004
TH104	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, Sept 2004
TH105	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, Sept 2004
TH106	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, Sept 2004
TH107	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, Sept 2004
TH108	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, Sept 2004
TH109	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, Sept 2004
TH110	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, Sept 2004
TH111	<i>Dilophotes</i>	Sumatra, Dembicky, Sept 2004

2. 2 Laboratorní práce: izolace DNA, PCR amplifikace, čištění PCR produktu, cycle sequencing, sekvenování

K izolaci DNA jsem použila svalovinu z metathoraxu nebo celý metathorax včetně zadních nohou a isolovala DNA s použitím Wizard SV96 Purification Kit (Promega Inc.). Do mikrozkušavek se vzorky jsem přidala 200 µl homogenizačního pufru, 20 µl 10% SDS a 10 µl roztoku proteinasy K (10 mg/ml). Specifické části molekuly DNA jsem amplifikovala pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím primerů uvedených v Tab. 3.

Typická PCR reakce obsahovala 5 µl 10xPCR pufr, 2 µl 50mM MgCl₂, 1,25 µl dNTP 2mM každého dNTP - deoxynukleotid trifosfátu (Fermentas Inc.), 10mM páru primerů, 0,12 µl Platinum Taq DNA polymerasy 5U/µl (Invitrogen Inc.) a 1-4 µl templátu dle koncentrace, aby reakce obsahovala celkem 10-30 ng templátu. Objem byl doplněn do 50 µl. Podmínky PCR reakce jsou uvedeny v tab. 4.

Ke zjištění výsledků PCR byla použita elektroforéza a barvení ethidium bromidem. Produkty PCR byly vyčištěny na MultiScreen filtračních destičkách (MILLIPORE) a koncentrace DNA změřena na spektrofotometru NanoDrop-1000.

Sekvenační reakce byla provedena podle manuálu výrobce sekvenačního kitu (Applied

Biosystems). Reagencie pro cycle sequencing: 2 µl terminační reakční směs Big Dye v. 1.1, 2µl primeru 1,6 pmol, tj. 3, 2 pmol v každé reakci, 1 µl cycle sequencing pufr 1-4 µl templátu a destilovaná voda doplněná do 10 µl celkového objemu na reakci.

Byly sekvenovány tři fragmenty: 780 bp mitochondriální velké podjednotky ribozomální DNA (*rrnL*) s přilehlým krátkým fragmentem NADH dehydrogenázy podjednotky 1 mtDNA, 1100 bp fragment cytochrome oxidázy 1mtDNA (*cox1*), *tRNA-Leu* a cytochrome oxidázy 2 mtDNA (*cox2*) a 1180 bp NADH dehydrogenázy 5 mtDNA (*nad5*) a přilehlé tRNA geny (dále jsou tyto fragmenty označeny jako *rrnL*, *cox1* a *nad5*). Použité primery jsou uvedeny v tabulce 4. Purifikovaný PCR produkt byl sekvenován pomocí ABI3130 s automatickým použitím BigDye Terminator Cyclor Sequencing Kit v. 1.1. Pro každý vzorek jsem si připravila dvě cycle sequencing reakce s primery použitými pro amplifikaci.

Tabulka 3: Přehled primerů použitých ke studii

gen / mtDNA	Primery/ R - reverse, F - forward	autor
<i>cox1</i>	JerryM 23F CAA CAY YTA TTT TGR TTY TTT GG	Bocak a kol., 2008
	Marcy 27R TAR TTC RTA TGW RCA ATA YCA YTG RTG	Bocak a kol., 2008
<i>nad5</i>	OF1 28F CCT ACT CCT GTT TCT GCT TTA GTT CAT TC	Bocak a kol., 2008
	R6 29R GAA ACG AAA AAT CGT ATT TAA TTT CGA CT	Bocak a kol., 2008
<i>rrnL</i>	16a 20F CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT	Simon et al., 1994
	ND1A 27R GGT CCC TTA CGA ATT TGA ATA TAT CCT	Simon et al., 1994
	ND1-2 24R ATC AAA AGG AGC TCG ATT AGT TTC	Simon et al., 1994

Tabulka 4: Podmínky PCR amplifikace pro jednotlivé geny

cox1, nad5

1. 94°C – 1 min
 2. 94°C – 1 min
 3. 45°C – 1 min
 4. 72°C – 2 min
-
- }

40 cyklů
-
5. 72°C – 10 min
 6. 4°C – 1 h
 7. 15°C – nekonečno, pauze

rrnL/16a, NDI-A

1. 96°C – 2 min
2. 96°C – 30 sec
3. 41°C – 30 sec
4. 72°C – 1:45 min

5. 72°C – 10 min
6. 4°C – 1 h
7. 15°C – nekonečno, pause

40 cyklů

rrnL/16a, NDI-2

1. 96°C – 2 min
2. 96°C – 30 sec
3. 41°C – 30 sec
4. 72°C – 2 min

5. 72°C – 10 min
6. 4°C – 1 h
7. 15°C – nekonečno, pause

40 cyklů

2. 3 Analýza dat: editace sekvencí, alignment, fylogenetické analýzy

Sekvenátor poskytuje výsledky měření ve formě grafu, který zachycuje úroveň fluorescence označených fragmentů procházejících před laserovým snímačem. Sekvence byly editovány pomocí programu Sequencher 4.6 (Gene Codes Corp.), který umožňuje složit protilehlá čtení k sobě a porovnat je. Sekvence byly exportovány pro další analýzu ve formátu fasta a alignovány programem ClustalX verze 1.83 při nastavení penalizací 22.5 pro otevření mezery a 0.83 pro prodloužení (Thompson et al. 1997). Mitochondriální proteiny kódující geny jsou délkově téměř nevariabilní a obsahují minimum indelů. Fragment *rrnL* a krátké tRNA geny sice obsahoval indely, ale relativně vysoká podobnost příbuzných taxonů ingroup z jediného rodu zařazených do analýzy umožňovala bezproblémové vytvoření alignmentu, a proto bylo použito pouze defaultní nastavení a nebyl testován vliv modifikace parametrů na alignment.

Získaná matice byla rozčleněna dle genů na 8 particí pro fylogenetickou analýzu: *rrnL* mtDNA, *tRNA-Leu* (1), *nad1* mtDNA, *cox1* mtDNA, *tRNA-Leu* (2), *cox2* mtDNA, *nad5* mtDNA a *tRNAs*.

Fylogenetická analýza byla provedena s využitím tří optimalizačních kritérií. Nejprve byla data analyzována podle kritéria parsimonie aplikovaného v programu TNT 1.1 (Goloboff

et al. 2003). Byla využita metoda ratchet pro rychlejší nalezení nejkratšího stromu a tento byl nalezen 10x než byla analýza ukončena. Pro bootstrap analýzu bylo generováno 1000 náhodně modifikovaných matic, které byly analyzovány stejným postupem. Z vyprodukovaných maximálně parsimonních kladogramů byl vygenerován majoritní kladogram a z něj získány podpory jednotlivých větví.

Datová matice byla dále analyzována s použitím kritéria maximální pravděpodobnosti v programu RAxML 7.2.3 (Stamatakis 2006a; Stamatakis et al. 2008). Datový soubor byl rozdělen podle genů do particí, proteiny kódující geny byly dále rozděleny podle pozic nukleotidů v kodonech a pro výpočet byl použitý substituční model GTRCAT (Stamatakis 2006b). Pro bootstrap analýzu bylo použito 100 pseudomatic. Výsledky byly sumarizovány do majoritního konsensuálního stromu, jako v případě parsimonní analýzy. Dále byla data analyzována programem MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck 2000). Jednotlivé partice byly nezávislé a pro výpočet byl použitý obecný časový reverzibilní model s kategorií invariantních míst a gama distribuovaných vazeb (GTR+I+G). Čtyři řetězce byly spouštěny současně pro 30 milionů generací a byla vzorkována každá 1000. generace. Všechny fragmenty byly posuzovány samostatně a vzájemně nevázané. Po ukončení analýzy byly vyhodnoceny pravděpodobnosti v programu Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond 2004) a následně vyřazeny stromy před dosažením stacionární fáze a zpětné pravděpodobnosti byly stanoveny ze zbývajících stromů.

Před výpočtem chromatogramu pro určení stáří štěpení jednotlivých větví byla testována hypotéza molekulárních hodin. Nulová hypotéza L0 říká, že molekulární hodiny platí a L1 hypotéza je odmítá. Chí-čtvercová hodnota je dána $2\log L = 2(\log L_0 - \log L_1)$, kde L0 a L1 jsou pravděpodobnosti stromů při vynucených a relaxovaných rychlostech evoluce. P-hodnota je počítána pro s-2 stupně volnosti, kde s je počet koncových větví na stromě (Felsenstein 1981). Vzhledem k absenci fosílií a nemožnosti externí kalibrace fylogenetického stromu pomocí tektonických dat byl nastaven vznik ingroup na hodnotu 1 a věk jednotlivých štěpení uvnitř ingroup byl hodnocen jako fragment od vzniku ingroup. Výpočet byl proveden pomocí bayesiánského přístupu v programu Beast 1.7.1 (Drummond & Rambaut 2007) za použití GTR+I+G modelu nukleotidové substituce, zjištěným pomocí AICc kritéria v programu JModelTest 0.1.1 (Posada 2008) a při nastavení relaxovaných molekulárních hodin. Konvergence byla vyhodnocena v programu Tracer 1.5 (Rambaut & Drummond 2004) a generace před dosažením stacionární fáze byly vyřazeny z dalších analýz. Výsledné 50% konsensuální fylogenetické stromy byly vypočteny v programu PAUP* verze 4.0b10 (Swofford 2002).

3. Výsledky

3. 1 Terénní pozorování, mimetické vzory, velikost těla

Materiál byl nasbírán v oblasti Velkých Sund, Indočínské oblasti (Malajský poloostrov, Vietnam, Laos, Thajsko), Filipín, Číny, Japonska a severovýchodní Indie. Podstatná část vzorků pochází ze Sumatry a druhy pohlavně dimorfické zásadní pro tuto studii byly odebrány z agregovaných skupin brouků na okraji horského lesa v oblasti Gunung Sibayak (Severní Sumatra, 3°13'13"N 98°29'58"E). Tato agregace byla pozorována na ploše cca 600 čtverečných metrů a pouze jednotlivé exempláře byly během návštěvy nalezeny mimo tuto oblast. Agregaci vytvořilo více druhů náležejících do několika podčeledí: *Dilophotes* (Ateliinae: Dilophotini), *Libnetis* (Libnetinae), *Plateros* (Lycinae: Platerodini), *Cautires* a *Xylobanus* (Lycinae: Metriorrhynchini). Celkem byly v agregaci nalezeny 4 aposematické vzory (typy *Libnetis*, *Cautires* a *Dilophotes*-tmavý se světlými humerami a žlutý). Další podobní jedinci byli nasbíráni v širší oblasti a dalších několik desítek druhů patřících k rodům ilustrovaných v tabuli 1.

Ve studovaném materiálu převažovaly dva barevné vzory zaznamenané v rodu *Dilophotes*: černo-červení a žluto-černí jedinci (Tabule 2). Přitom na základě vnější morfologie nebylo možné určit, o kolik druhů se jedná a zda podobní jedinci náleží k jednomu druhu. Celkem bylo určeno v rodu *Dilophotes* 9 barevných vzorů (Tabule 2). Žluto-černé (YB) a červeno-černé (RB) vzory představují druhy zúčastněné v rozsáhlých mimetických skupinách, které jsou přítomny v celé oblasti Velkých Sund a Malajského poloostrova. Další vzory mají omezený výskyt: pruhovaný se vyskytuje v nížinách Sumatry a Bornea, černý nalezneme na Cameronově vysočině v Malaysii a v některých horských oblastech jižního Bornea. Žlutý vzor a hnědý se žlutými rameny (HUM) se vyskytuje velmi zřídka a jsou v oblasti Velkých Sund a Malajského poloostrova zastoupeny jen v rodu *Dilophotes*.

Samci a samice se liší velikostí těla (Tab. 5 a Tabule 5), samci jsou drobnější a přibližují se svou velikostí vzoru *Libnetis*. Samičky jsou větší, blízké velikosti rodů *Calochromus*, *Xylobanus* a *Cautires*. Velikost těla druhů, náležejících ke žluto-černému aposematickému vzoru, se pohybuje od 4 do 7 mm. Druhy červeno-černě zbarvené jsou větší a jejich velikost se pohybuje od 6 do 23 mm. Ačkoliv se tato rozpětí překrývají, většina jedinců se liší ve velikosti podle příslušnosti k danému vzoru a vytvářejí se takto zřetelné mimetické skupiny definované i velikostí těla. V tab. 6 a 7 jsou uvedena čísla vzorků, průměrné hodnoty délky krovky a šířky v humerech, průměry a směrodatné odchylky pro jednotlivá pohlaví a monomorfické, resp. polymorfické skupiny druhů. Ukazuje se, že

monomorfické skupiny náleží vždy ke žluto-černému vzoru a samci a samice se méně odlišují ve velikosti těla. Polymorfické druhy mají samce žluto-černě zbarvené a samice červeno-černě zbarvené. Rozdíl mezi velikostí těla samců a samic je větší než v případě monomorfických druhů (Tabule 5).

3. 2 Sekvenování a fylogenetické analýzy

Byly získány sekvence pro 39 druhů rodu *Dilophotes* (Tab. 8). Tyto druhy byly označeny kódy A-Z a AA-AX. Za druh byly považovány soubory jedinců sdílejících podobnou morfologii a podobnou sekvenci DNA. Při designaci druhů byl vzat v úvahu geografický původ vzorků a bylo preferováno zařazení jedinců do jediného druhu i v případech, kdy se jedinci např. mírně lišili zbarvením a sekvence proteiny kódujících markerů se lišila méně než ve 3% bazí. Na základě fylogenetické analýzy byl zjištěn počet druhů. Jako obecné pravidlo se uvádí genetická vzdálenost 3% mezi sekvencemi mtDNA. Zjištěná vnitrodruhová variabilita činila méně než 1% (Tab. 9). Pro druhy s větším počtem sekvenovaných exemplářů byla zjištěna variabilita: pro druh *Dilophotes sp. V*, gen *rrnL* byla zjištěna vzdálenost od 0,0% do 0,17% (Tab. 10). Pro gen *cox1* byla hodnota od 0,0% do 0,51% (Tab. 11). Pro gen *nad5* byla získaná hodnota od 0,0% do 0,2% (Tab. 12). Pro druh *Dilophotes sp. AE*, gen *rrnL*, byla vzdálenost 0, 0% (Tab. 13), u genu *cox1* 0,0% (Tab. 14) a u genu *nad5* se vzdálenost pohybovala od 0,0% do 0,1% (Tab. 15). Vzhledem k omezenému počtu druhů, které byly k dispozici z většího počtu lokalit, nemohl být podrobně hodnocen vliv geografického původu na genetickou diferenciaci populací.

Zastoupení bazí odráží obvyklou převahu AT v mitochondriálním genomu. Fragment vykazoval převahu T (thymin) od 29,56 % do 47,28 % a A (adenin) od 23,33 % do 41,15 %. Méně bylo C (cytosin) od 6,08 % do 22,53 % a G (guanin) od 7,43 % do 18,82 %. Zastoupení bazí je uvedeno pro jednotlivé geny v Tab. 16.

Alignované sekvence byly sestaveny do matice o 144 taxonech a 3188 bazích. Pozice jednotlivých fragmentů byla následující: *rrnL* mtDNA pozice 1-625, *tRNA-Leu* pozice 626-688, ND1 mtDNA pozice 689-813, *cox1* mtDNA pozice 814-1596, *tRNA-Leu* pozice 1597-1659, *cox1* mtDNA pozice 1660-1919, *nad5* mtDNA pozice 1920-2933 a *tRNAs* pozice 2934-3188. Následně pro testování vlivu chybějících dat byla analyzována matice taxonů, pro které se podařilo získat všechny fragmenty DNA. Tato matice obsahovala 102 taxonů (23 outgroup, 79 ingroup). V této matici byly zastoupeny všechny druhy definované na základě morfologie a sekvencí jak je uvedeno výše.

3. 3 Fylogenetické analýzy

Pro výpočet fylogenetického stromu byly použity metody maximální parsimonie, bylo vyprodukováno 26 maximálně parsimonních stromů o délce 17 401 kroků. Tyto stromy byly použity k vytvoření majoritního konsenzuálního stromu a bylo zjištěno, že topologická variabilita je soustředěna pouze uvnitř kládů odpovídajících jednotlivým druhům. Monofylie rodu *Dilophotes* získala v této analýze vysokou bootstrapovou podporu, podobně jednotlivé druhy byly robustně podporované.

Dále byla použita Bayesiánská analýza, kterou byl získán fylogenetický strom (Tabule 3). Prestacionární fáze analýzy byla identifikována v programu Tracer a byla vyhodnocena dosažená úroveň zpětných pravděpodobností v jednotlivých analýzách.

Jako třetí metoda byla použita analýza metodou maximum likelihood (program RAxML) a byl získán jediný strom.

Podpora pro monofilii rodu *Dilophotes* byla vysoká ve všech provedených analýzách a podobně bylo dosaženo naprosté shody v definici kládů označených jako biologické druhy. Proto je pro ilustraci uveden pouze strom vyprodukovaný Bayesiánskou analýzou zobrazený v Tabuli 3 a jeho topologie je použita pro další diskusi. Pro určení doby vzniku polymorfismu v rodu *Dilophotes* byl vytvořen chromatogram v programu Beast (Tabule 4).

Zjištěné výsledky je možné shrnout následovně: (1) rod *Dilophotes* je monofyletický, (2) druhy sdílející stejný aposematický vzor si ve většině případů nejsou příbuzné a jejich podobnost je možno vysvětlit jako důsledek konvergence nebo advergence k modelu, (3) sexuální polymorfismus se vyvinul v rodu *Dilophotes* nezávisle v několika skupinách, (4) doba vzniku polymorfismu v těchto druzích se liší.

Tabulka 5: Přehled délky krovek a šířky humeru sekvenovaných jedinců.

Číslo	MONO /POLY	sex	velikost krovky (mm)		L * W	Monomorfický samec		Polymorfický samec		Monomorfická samice		Polymorfická samice	
			šířka (W)	délka (L)		šířka (W)	délka (L)	W	L	W	L	W	L
TH046	MONO	FEM	0,887319	6,25	5,5457438								
TH069	MONO	MALE	0,529278	4,375	2,3155913	0,52928	4,375						
TH048	MONO	MALE	0,62268	5,125	3,191235	0,62268	5,125						
TH061	MONO	MALE	0,607113	5,125	3,1114541	0,60711	5,125						
TH063	MONO	FEM	0,809484	6,4375	5,2110533					0,809484	6,4375		
TH038	MONO	MALE	0,684948	6,3125	4,3237343	0,68495	6,3125						
TH068	MONO	MALE	0,560412	5,09375	2,8545986	0,56041	5,09375						
TH078	MONO	FEM	0,700515	6,25	4,3782188								

TH026	POLY	FEM	0,93402	7,5625	7,0635263							0,93402	7,5625
TH028	POLY	FEM	0,856185	7,1875	6,1538297							0,856185	7,1875
TH029	POLY	FEM	0,653814	6,3125	4,1272009							0,653814	6,3125
TH030	POLY	FEM	0,793917	6,5	5,1604605							0,793917	6,5
A003	POLY	FEM	0,669381	5,375	3,5979229							0,669381	5,375
A004	POLY	MALE	0,5370615	4,34375	2,3328609		0,537062	4,34375					
A006	POLY	FEM	0,700515	6,375	4,4657831							0,700515	6,375
A009	POLY	MALE	0,544845	4,21875	2,2985648		0,544845	4,21875					
A014	POLY	MALE	0,451443	4,4375	2,0032783		0,451443	4,4375					
TH003	POLY	FEM	1,011855	8,25	8,3478038							1,011855	8,25
TH010	POLY	MALE	0,653814	5,15625	3,3712284		0,653814	5,15625					
TH019	POLY	MALE	0,544845	4,53125	2,4688289		0,544845	4,53125					
TH027	POLY	FEM	0,902886	6,9375	6,2637716							0,902886	6,9375
TH047	POLY	FEM	0,684948	6,4375	4,4093528							0,684948	6,4375
TH066	POLY	FEM	0,6615975	5,28125	3,4940618							0,661598	5,2813
TH088	POLY	MALE	0,575979	4,0625	2,3399147		0,575979	4,0625					
TH091	POLY	MALE	0,5993295	4,5	2,6969828		0,59933	4,5					
TH096	POLY	MALE	0,653814	4,5625	2,9830264		0,653814	4,5625					
TH097	POLY	FEM	0,529278	4	2,117112							0,529278	4
TH099	POLY	MALE	0,560412	4,53125	2,5393669		0,560412	4,53125					
TH100	POLY	MALE	0,544845	4,1875	2,2815384		0,544845	4,1875					
TH101	POLY	MALE	0,482577	3,6875	1,7795027		0,482577	3,6875					
A011	POLY	MALE	0,607113	5,15625	3,1304264		0,607113	5,15625					
A012	POLY	MALE	0,575979	4,625	2,6639029		0,575979	4,625					
TH006	POLY	FEM	0,700515	5,5625	3,8966147							0,700515	5,5625
TH049	POLY	FEM	0,77835	6,3125	4,9133344							0,77835	6,3125
TH050	POLY	MALE	0,560412	4,21875	2,3642381		0,560412	4,21875					
TH074	POLY	MALE	0,544845	4,65625	2,5369345		0,544845	4,65625					
TH075	POLY	MALE	0,544845	4,71875	2,5709873		0,544845	4,71875					
TH032	POLY	MALE	0,669381	5,8125	3,8907771		0,669381	5,8125					
TH034	POLY	MALE	0,669381	5,3125	3,5560866		0,669381	5,3125					
TH036	POLY	FEM	0,700515	5,9375	4,1593078							0,700515	5,9375
TH067	POLY	MALE	0,716082	5,8125	4,1622266		0,716082	5,8125					
TH051	?	MALE	0,560412	5,15625	2,8896244								
A001	?	FEM	0,793917	6,875	5,4581794								
TH039	?	FEM	0,809484	7,25	5,868759								
TH040	?	FEM	0,949587	7,8125	7,4186484								
TH035	?	FEM	0,747216	8,875	6,631542								
A0016	?	FEM	0,809484	6,6875	5,4134243								
TH023	?	MALE	0,482577	6,5625	3,1669116								

Tabulka 6: Průměrné velikosti těl a směrodatná odchylka monomorfických a polymorfických samečů a samic.

Monomorfický-samec		Polymorfický-samec		Monomorfická-samice		Polymorfická-samice			
šířka (W) směr. odch.	délka (L) směr. odch.	šířka (W) směr. odch.	délka (L) směr. odch.	šířka (W) směr. odch.	délka (L) směr. odch.	šířka (W) směr. odch.	délka (L) směr. odch.		
17		35		11		24			
0,57964165	4,8988971	0,582428186	4,70669643	0,7288186	6,0852273	0,763431625	6,31380208		
0,0739496	0,7501245	0,06510736	0,51371479	0,1331535	0,9525963	0,115742291	0,9425804		
Délka POLY/délka MONO (samci)				0,96076655	Délka POLY/délka MONO (samice)				1,03756225

Tabulka 7: Morfometrické znaky sekvenovaných zástupců rodu *Dilophotes*.

Druh	Číslo vzorku	MONO /POLY	Vzor**	sex	Lokalita
A	TH046	MONO	Y	FEM	Laos, Ban Nape
AG	TH069	MONO	B	MALE	Malaysia, Cameron Highland
AK	TH048	MONO	Y	MALE	Sumatra, Gn Sinabung
AL	TH061	MONO	B	MALE	Malaysia, Road Ipoh Kg. Raja
AL	TH063	MONO	B	FEM	Malaysia, Cameron Highland
B	TH038	MONO	B	MALE	Malaysia, Cameron Highland
B	TH068	MONO	B	MALE	Malaysia, Cameron Highland
C	TH078	MONO	Y	FEM	Laos, Ban Saluei
D	TH041	MONO	Yb	MALE	Sumatra, Gn. Talamau
D	TH044	MONO	Yb	FEM	Sumatra, Lake, Maninjau
E	TH079	MONO	R	FEM	Laos, Ban Saluei
F	TH080	MONO	B	FEM	Laos, Ban Saluei
G	TH042	MONO	Y	MALE	Sumatra, Gn. Talamau
G	TH043	MONO	Y	MALE	Sumatra, Gn. Talamau
H	A008	MONO	Y	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
H	TH007	MONO	Y	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
H	TH008	MONO	Y	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
H	TH009	MONO	Y	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
H	TH015	MONO	Y	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
I	A060	MONO	B	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
J	TH095	MONO	R	MALE	Laos, Ban Saleui
K	TH093	MONO	YB	MALE	Kalimantan, Loksado
M	244	MONO	YB	FEM	Borneo, km 53 KK-Tambunan
P	A007	MONO	H	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
P	TH014	MONO	H	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
P	TH020	MONO	H	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
P	TH021	MONO	H	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
P	TH022	MONO	H	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
Q	TH081	MONO	R	MALE	Laos, Ban Saleui
R	TH031	MONO	R	MALE	China, Shanxi
S	TH037	?	RB	FEM	Borneo, km 53 KK-Tambunan
W	TH059	MONO	YB	MALE	Sumatra, Kerinci
W	TH060	MONO	YB	FEM	Sumatra, Kerinci
X	TH054	MONO	RBb	FEM	Jawa, Puncak Pass
Z	TH077	MONO	YB	FEM	Sumatra, Kerinci
Z	TH083	MONO	YB	FEM	Sumatra, Gn. Merapi
AB	TH052	POLY	BY/BR	FEM	Jawa, Puncak Pass
AB	TH053	POLY	BY/BR	MALE	Jawa, Puncak Pass
AC	TH055	POLY	BY/BR	MALE	Sumatra, Kerinci
AC	TH056	POLY	BY/BR	FEM	Sumatra, Kerinci
AC	TH057	POLY	BY/BR	MALE	Sumatra, Kerinci
AC	TH076	POLY	BY/BR	MALE	Sumatra, Kerinci
AD	TH033	POLY	B/BrB	MALE	Kalimantan, Muara Teweh

AD	TH089	POLY	B/BrB	MALE	Kalimantan, Loksado
AD	TH090	POLY	B/BrB	MALE	Kalimantan, Loksado
AD	TH092	POLY	B/BrB	MALE	Kalimantan, Loksado
AD	TH098	POLY	B/BrB	FEM	Kalimantan, Loksado
AE	A002	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	A005	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	A010	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	A013	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	A015	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH001	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH002	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH004	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH005	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH012	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH013	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH016	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH018	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH024	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH025	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH026	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH028	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH029	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AE	TH030	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AH	A003	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AH	A004	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AH	A006	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AH	A009	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AH	A014	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AH	TH003	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AH	TH010	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AH	TH019	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
AH	TH027	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AH	TH047	POLY	BY/BR	FEM	Sumatra, Gn Sinabung
AJ	TH066	POLY	RB	FEM	Borneo, km 53 KK-Tambunan
AJ	TH088	POLY	B/BrB	MALE	Kalimantan, Loksado
AJ	TH091	POLY	B/BrB	MALE	Kalimantan, Loksado
AJ	TH096	POLY	B/BrB	MALE	Kalimantan, Loksado
AJ	TH097	POLY	B/BrB	FEM	Kalimantan, Loksado
AJ	TH099	POLY	B/BrB	MALE	Kalimantan, Loksado
AJ	TH100	POLY	B/BrB	MALE	Kalimantan, Loksado
AJ	TH101	POLY	B/BrB	MALE	Kalimantan, Loksado
L	A011	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
L	A012	POLY	BY/BR	MALE	Sumatrai, Gn Sibayak
L	TH006	POLY	BY/BR	FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
T	TH049	POLY	BY/BR	FEM	Sumatra, Gn. Tujuh
T	TH050	POLY	BY/BR	MALE	Sumatra, Gn. Tujuh

T	TH074	POLY	BY/BR	MALE	Sumatra, Kerinci
T	TH075	POLY	BY/BR	MALE	Sumatra, Kerinci
Y	TH032	POLY	BY/BR	MALE	Borneo, km 53 KK-Tambunan
Y	TH034	POLY	BY/BR	MALE	Borneo, km 53 KK-Tambunan
Y	TH036	POLY	BY/BR	FEM	Borneo, km 53 KK-Tambunan
Y	TH067	POLY	BY/BR	MALE	Borneo, km 53 KK-Tambunan
AA	TH051	?		MALE	Sumatra, Gn. Tujuh
AF	A001	?		FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
AI	TH039	?		FEM	Java, Gn. Lawu
AI	TH040	?		FEM	Java, Gn. Lawu
AM	TH035	?		FEM	Borneo, km 53 KK-Tambunan
N	A0016	?		FEM	Sumatrai, Gn Sibayak
O	TH023	?		MALE	Sumatrai, Gn Sibayak

Tabulka 7: Pokračování

*Druhy z Indie, Thajska a Laosu nebyly zahrnuty do hodnocení		
**	Y	žlutý
	B	černý
	BR	černo-červený
	BY	černo-žlutý
	BY/BR	samec černo-žlutý, samice černo-červená
	R	červený
	H	černý se světlými skvrnami na ramenou
	Yb	žlutý se zatmaveným apexem krovek
	B/BrB	samec černý, samice s hnědou bází krovek

Tabulka 8: Získané druhy rodu *Dilophotes*

DRUH	Vzorek
A	TH046
AG	TH069
AK	TH048
AL	TH061
AL	TH063
B	TH038
B	TH068
C	TH078
D	TH041
D	TH044
E	TH079
F	TH080
G	TH042
G	TH043
H	A008
H	TH007
H	TH008
H	TH009
H	TH015
I	A060
J	TH095
K	TH093
M	244
P	A007
P	TH014
P	TH020
P	TH021
P	TH022
Q	TH081
R	TH031
S	TH037
W	TH059
W	TH060
X	TH054
Z	TH077
Z	TH083
AB	TH052
AB	TH053
AC	TH055

DRUH	Vzorek
AC	TH056
AC	TH057
AC	TH076
AD	TH033
AD	TH089
AD	TH090
AD	TH092
AD	TH098
AE	A002
AE	A005
AE	A010
AE	A013
AE	A015
AE	TH001
AE	TH002
AE	TH004
AE	TH005
AE	TH012
AE	TH013
AE	TH016
AE	TH018
AE	TH024
AE	TH025
AE	TH026
AE	TH028
AE	TH029
AE	TH030
AH	A003
AH	A004
AH	A006
AH	A009
AH	A014
AH	TH003
AH	TH010
AH	TH019
AH	TH027
AH	TH047
AJ	TH066
AJ	TH088

DRUH	Vzorek
AJ	TH091
AJ	TH096
AJ	TH097
AJ	TH099
AJ	TH100
AJ	TH101
L	A011
L	A012
L	TH006
T	TH049
T	TH050
T	TH074
T	TH075
Y	TH032
Y	TH034
Y	TH036
Y	TH067
AA	TH051
AF	A001
AI	TH039
AI	TH040
AM	TH035
N	A0016
O	TH023
U	TH064
U	TH065
V	TH070
V	TH071
V	TH072
V	TH073
V	TH102
V	TH103
V	TH104
V	TH105
V	TH106
V	TH107
V	TH108
V	TH109
V	TH111

Tabulka 9: Vnitrodruhové vzdálenosti *Dilophotes* sp. V, geny *rrnL*, *nad5*, *cox1*

Matice nekorigovaných vzdáleností pro gen *cox1*, *nad5*, *rrnL*

	73	74	75	76	94	95	96	97	98			
73 TH070	-											
74 TH071	0.00129	-										
75 TH072	0.00064	0.00129	-									
76 TH073	0.00032	0.00096	0.00032	-								
94 TH102	0.00032	0.00161	0.00096	0.00064	-							
95 TH103	0.00096	0.00161	0.00096	0.00064	0.00064	-						
96 TH104	0.00064	0.00129	0.00064	0.00064	0.00032	0.00032	0.00032	-				
97 TH105	0.00064	0.00129	0.00064	0.00032	0.00032	0.00032	0.00032	0.00000	-			
98 TH106	0.00129	0.00193	0.00129	0.00096	0.00096	0.00032	0.00064	0.00064	0.00064	-		
99 TH107	0.00096	0.00161	0.00096	0.00064	0.00064	0.00064	0.00032	0.00032	0.00096	-		
100 TH108	0.00096	0.00161	0.00096	0.00064	0.00064	0.00064	0.00032	0.00032	0.00096	0.00096	-	
101 TH109	0.00161	0.00225	0.00161	0.00129	0.00129	0.00129	0.00096	0.00096	0.00096	0.00096	0.00096	-
102 TH111	0.00161	0.00225	0.00161	0.00129	0.00129	0.00129	0.00096	0.00096	0.00096	0.00161	0.00161	-

pokračování

	99	100	101	102
99 TH107	-			
100 TH108	0.00064	-		
101 TH109	0.00129	0.00064	-	
102 TH111	0.00129	0.00064	0.00129	-

Tabulka 10: Vnitrodruhové vzdálenosti *Dilophotes* sp. V, gen *rrnL*

	73	74	75	76	94	95	96	97	98
73 TH070	-								
74 TH071	0.00000	-							
75 TH072	0.00166	0.00166	-						
76 TH073	0.00000	0.00000	0.00166	-					

pokračování

94 TH102	0.00000	0.00000	0.00166	0.00000	-								
95 TH103	0.00000	0.00000	0.00166	0.00000	0.00000	-							
96 TH104	0.00000	0.00000	0.00166	0.00000	0.00000	0.00000	-						
97 TH105	0.00000	0.00000	0.00166	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-					
98 TH106	0.00000	0.00000	0.00166	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-				
99 TH107	0.00000	0.00000	0.00166	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-			
100 TH108	0.00000	0.00000	0.00166	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-		
101 TH109	0.00000	0.00000	0.00166	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-	
102 TH111	0.00000	0.00000	0.00166	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-

pokračování

	99	100	101	102
99 TH107	-			
100 TH108	0.00000	-		
101 TH109	0.00000	0.00000	-	
102 TH111	0.00000	0.00000	0.00000	-

Tabulka 11: Vnitrodruhové vzdálenosti *Dilophotes* sp. V, gen *cox1*

	73	74	75	76	94	95	96	97	98
73 TH070	-								
74 TH071	0.00255	-							
75 TH072	0.00000	0.00255	-						

pokračování

76	TH073	0.00000	0.00255	0.00000	-					
94	TH102	0.00000	0.00255	0.00000	0.00000	-				
95	TH103	0.00000	0.00255	0.00000	0.00000	0.00000	-			
96	TH104	0.00000	0.00255	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-		
97	TH105	0.00000	0.00255	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-	
98	TH106	0.00128	0.00383	0.00128	0.00128	0.00128	0.00128	0.00128	0.00128	-
99	TH107	0.00000	0.00255	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00128
100	TH108	0.00128	0.00383	0.00128	0.00128	0.00128	0.00128	0.00128	0.00128	0.00255
101	TH109	0.00255	0.00511	0.00255	0.00255	0.00255	0.00255	0.00255	0.00255	0.00128
102	TH111	0.00255	0.00511	0.00255	0.00255	0.00255	0.00255	0.00255	0.00255	0.00383

pokračování

	99	100	101	102	
99	TH107	-			
100	TH108	0.00128	-		
101	TH109	0.00255	0.00128	-	
102	TH111	0.00255	0.00128	0.00255	-

Tabulka 12: Vnitrodruhové vzdálenosti *Dilophotes* sp. V, gen *nad5*

	73	74	75	76	94	95	96	97	98	
73	TH070	-								
74	TH071	0.00000	-							
75	TH072	0.00000	0.00000	-						
76	TH073	0.00000	0.00000	0.00000	-					
94	TH102	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-				
95	TH103	0.00099	0.00099	0.00099	0.00099	0.00099	-			
96	TH104	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00099	-		
97	TH105	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00099	0.00000	-	
98	TH106	0.00099	0.00099	0.00099	0.00099	0.00099	0.00000	0.00099	0.00099	-
99	TH107	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00099	0.00000	0.00000	0.00099
100	TH108	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00099	0.00000	0.00000	0.00099
101	TH109	0.00099	0.00099	0.00099	0.00099	0.00099	0.00198	0.00099	0.00099	0.00198
102	TH111	0.00099	0.00099	0.00099	0.00099	0.00099	0.00198	0.00099	0.00099	0.00198

pokračování

	99	100	101	102	
99	TH107	-			
100	TH108	0.00000	-		
101	TH109	0.00099	0.00099	-	
102	TH111	0.00099	0.00099	0.00198	-

Tabulka 13: Vnitrodruhové vzdálenosti *Dilophotes* sp. AE, gen *rrnL*

	10	11	14	17	18	32	33	34	35	
10	A002	-								
11	A005	0.00000	-							
14	A010	0.00000	0.00000	-						
17	A013	0.00000	0.00000	0.00000	-					
18	A015	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-				
32	TH001	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-			
33	TH002	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-		
34	TH004	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-	
35	TH005	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-
39	TH016	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
40	TH018	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
44	TH024	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
45	TH025	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
46	TH026	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
47	TH029	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
48	TH030	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

pokračování

	39	40	44	45	46	47	48
39 TH016	-						
40 TH018	0.00000	-					
44 TH024	0.00000	0.00000	-				
45 TH025	0.00000	0.00000	0.00000	-			
46 TH026	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-	
47 TH029	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-
48 TH030	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000

Tabulka 14: Vnitrodruhové vzdálenosti *Dilophotes* sp. AE, gen *cox1*

	10	11	14	17	18	32	33	34	35
10 A002	-								
11 A005	0.00000	-							
14 A010	0.00000	0.00000	-						
17 A013	0.00000	0.00000	0.00000	-					
18 A015	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-				
32 TH001	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-			
33 TH002	0.00128	0.00128	0.00128	0.00128	0.00128	0.00128	-		
34 TH004	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00128	-	
35 TH005	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00128	-
39 TH016	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00128	0.00000
40 TH018	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00128	0.00000
44 TH024	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00128	0.00000
45 TH025	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00128	0.00000
46 TH026	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00128	0.00000
47 TH029	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00128	0.00000
48 TH030	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00128	0.00000

pokračování

	39	40	44	45	46	47	48
39 TH016	-						
40 TH018	0.00000	-					
44 TH024	0.00000	0.00000	-				
45 TH025	0.00000	0.00000	0.00000	-			
46 TH026	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-		
47 TH029	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-	
48 TH030	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-

Tabulka 15: Vnitrodruhové vzdálenosti *Dilophotes* sp. AE, gen *nad5*

	10	11	14	17	18	32	33	34	35
10 A002	-								
11 A005	0.00000	-							
14 A010	0.00099	0.00099	-						
17 A013	0.00099	0.00099	0.00000	-					
18 A015	0.00099	0.00099	0.00000	0.00000	-				
32 TH001	0.00000	0.00000	0.00099	0.00099	0.00099	-			
33 TH002	0.00099	0.00099	0.00000	0.00000	0.00000	0.00099	-		
34 TH004	0.00000	0.00000	0.00099	0.00099	0.00099	0.00000	0.00099	-	
35 TH005	0.00000	0.00000	0.00099	0.00099	0.00099	0.00000	0.00099	0.00000	-
39 TH016	0.00000	0.00000	0.00099	0.00099	0.00099	0.00000	0.00099	0.00000	0.00000
40 TH018	0.00000	0.00000	0.00099	0.00099	0.00099	0.00000	0.00099	0.00000	0.00000
44 TH024	0.00099	0.00099	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00099	0.00000	0.00099
45 TH025	0.00099	0.00099	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00099	0.00000	0.00099
46 TH026	0.00099	0.00099	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00099	0.00000	0.00099
47 TH029	0.00000	0.00000	0.00099	0.00099	0.00099	0.00000	0.00099	0.00000	0.00000
48 TH030	0.00099	0.00099	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00099	0.00000	0.00099

pokračování

	39	40	44	45	46	47	48
39 TH016	-						
40 TH018	0.00000	-					
44 TH024	0.00099	0.00099	-				

pokračování

```

45 TH025 0.00099 0.00099 0.00000 -
46 TH026 0.00099 0.00099 0.00000 0.00000 -
47 TH029 0.00000 0.00000 0.00099 0.00099 0.00099 -
48 TH030 0.00099 0.00099 0.00000 0.00000 0.00000 0.00099 -

```

Tabulka 16: Zastoupení bazí – všechny geny

	A	C	G	T	PRŮMĚRNÁ DÉLKA	
Průměr	0.31639	0.12821	0.15825	0.39715	3111.72	
<i>rrnL</i>	0.30468	0.09739	0.18091	0.41702	603.13	
<i>tRNA/Leu</i>	0.31048	0.06774	0.16212	0.45966	61.43	
<i>ND1</i>	0.23325	0.06080	0.17375	0.53221	124.81	
<i>cox1</i>	0.36369	0.20986	0.13087	0.29558	783.00	
<i>tRNA/Leu</i>	0.40831	0.11216	0.15051	0.32902	58.43	
<i>cox1i</i>	0.41150	0.22526	0.07425	0.28899	260.00	
<i>nad5</i>	0.25730	0.08173	0.18815	0.47281	1009.22	
<i>tRNAs</i>	0.36249	0.08626	0.14835	0.40290	211.71	

Tabulka 17: Seznam druhů tribu Dilophotini

Dilophotes Waterhouse, 1879 [typový druh *Dilophotes pygmaeus* Waterhouse, 1878]
Subgenus *Dilophotes* [typový druh *Dilophotes pygmaeus* Waterhouse, 1878]

<i>abnormis</i> Kleine, 1926	Philippines
<i>anthracinus</i> Bic, 2002	Laos
<i>apicalis</i> Pic, 1912	Java
<i>atricollis</i> Pic, 1926	Taiwan
<i>atrорufus</i> Kiesenwetter, 1879	Japan
<i>bolavensis</i> Bic, 2002	Laos
<i>bugnioni</i> Bourgeois, 1909	Ceylon
<i>comes</i> Kleine, 1926	Philippines
<i>commendatus</i> Kleine, 1929	Malaysia
<i>corporaali</i> Pic, 1921	Sumatra
<i>costatus</i> Kleine, 1930	Malaysia
<i>depressicornis</i> Pic, 1921	Malaysia
<i>depressicornis</i> Pic, 1923	Indochina
<i>dilaticornis</i> Pic, 1925	Tonkin
<i>discoxIdalis</i> Pic, 1921	Borneo
<i>diversipennis</i> Pic, 1922	Yunnan
<i>dohertyi</i> Pic, 1912	Malaysia
<i>exilis</i> Waterhouse, 1878	Assam, Borneo
<i>fruhstorferi</i> Pic, 1912	Java
<i>grossus</i> Kleine, 1930	Malaysia
<i>holzschuhi</i> Bic, 2002	Bhutan
<i>jendeki</i> Bic, 2002	Laos
<i>kubani</i> Bic, 2022	Laos
<i>laosensis</i> Bic, 2002	Laos
<i>libnetoides</i> Nakane, 1971	Taiwan

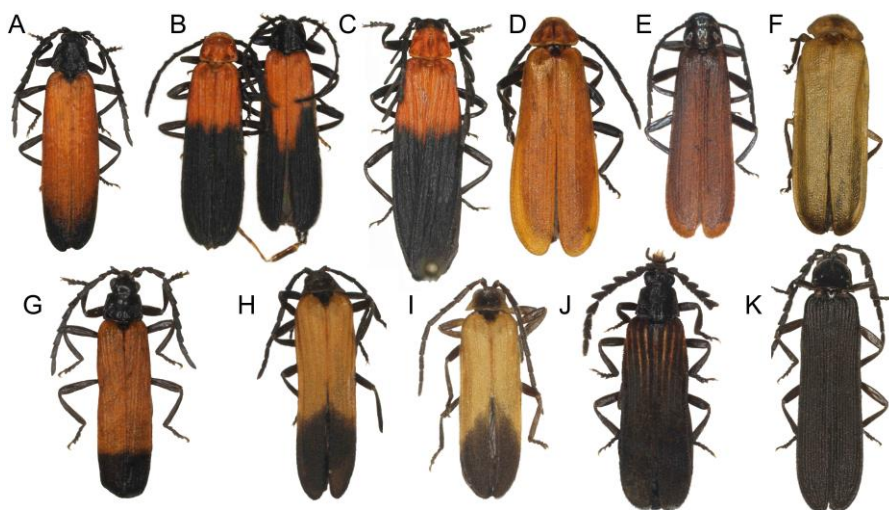
<i>lizipingensis</i> Bic, 2002	China
<i>longipennis</i> Pic, 1912	Java
<i>luteus</i> Bic, 2002	Laos
<i>major</i> Kleine, 1929	Malaysia
<i>monticola</i> Kleine, 1931	Java
<i>notatipennis</i> Pic, 1921	Java
<i>ohirai</i> Ohbayashi, 1956	Japan, Taiwan
<i>pacholatkoii</i> Bic, 2002	Thailand
<i>particularis</i> Pic, 1928	Cochin
<i>pulchellus</i> Kleine, 1926	Borneo
<i>pygmaeus</i> Waterhouse, 1879	Borneo
<i>rubripennis</i> Pic, 1912	Java
<i>sausai</i> Bic, 2002	Laos
<i>serenus</i> Kleine, 1933	Java
<i>shelfordi</i> Bourgeois, 1906	Borneo
<i>sulciceps</i> Pic, 1921	Sumatra
<i>vandykei</i> Nakane, 1970	Japan
<i>vittatus</i> Pic, 1925	Sumatra

Tabulka 17: pokračování

Subgenus *Mesolycus* Gorham, 1883d:398 [typový druh *Mesolycus puniceus* Gorham 1883; syn of *Dilophotes* by Bocak 1988] [= *Biphilodes* Kazantsev, 2000b:329] [typový druh *Dilophotes ilyai* Kazantsev 2000; syn. Kazantsev 2004 p. 13] [= *Flabellodilophotes* Pic, 1912e:9] [typový druh *Flabellodilophotes obscurus* Pic 1912; syn. Kazantsev 2004 p. 13]

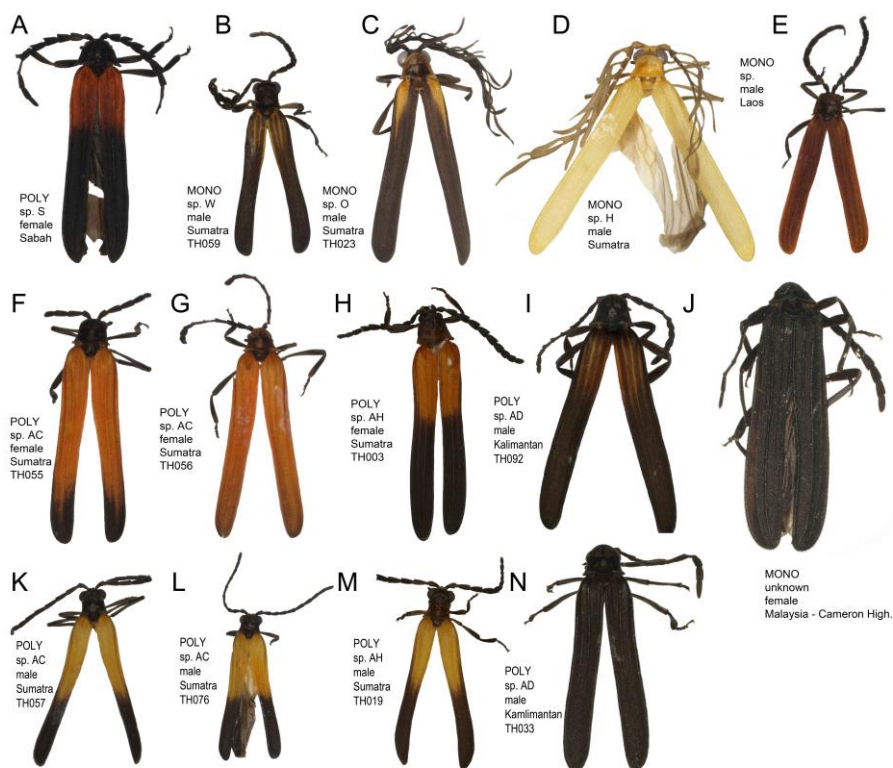
<i>berezowskii</i> Kazantsev, 2000	China
<i>bhutanensis</i> Bic, 2002	Bhutan
<i>carinatus</i> Pic, 1925	Sumatra
<i>dispar</i> Kleine, 1931	Java
<i>holzschuhi</i> Bic, 2002	Bhutan
<i>hubeicus</i> Kazantsev, 2004	China
<i>ilyai</i> Kazantsev, 2000	China
<i>indianus</i> Kazantsev, 1993	India
<i>legitimus</i> Kleine, 1925	Borneo
<i>mediozonatus</i> Nakane, 1955	Japan
<i>nietneri</i> Kleine, 1929	Ceylon
<i>niger</i> Kleine 1929	India
<i>nigrosuturalis</i> Kleine , 1931	Java
<i>obscurus</i> Pic, 1912	Borneo
<i>pallidus</i> Kleine, 1933	Borneo
<i>qinlinganus</i> Kazantsev, 2000	China
<i>sexualis</i> Pic, 1925	Sumatra
<i>tibetanus</i> Kazantsev, 2000	China
<i>tricostatus</i> Kleine, 1925	Borneo

Tabule 1. Zástupci druhů patřících do aposematických komplexů.



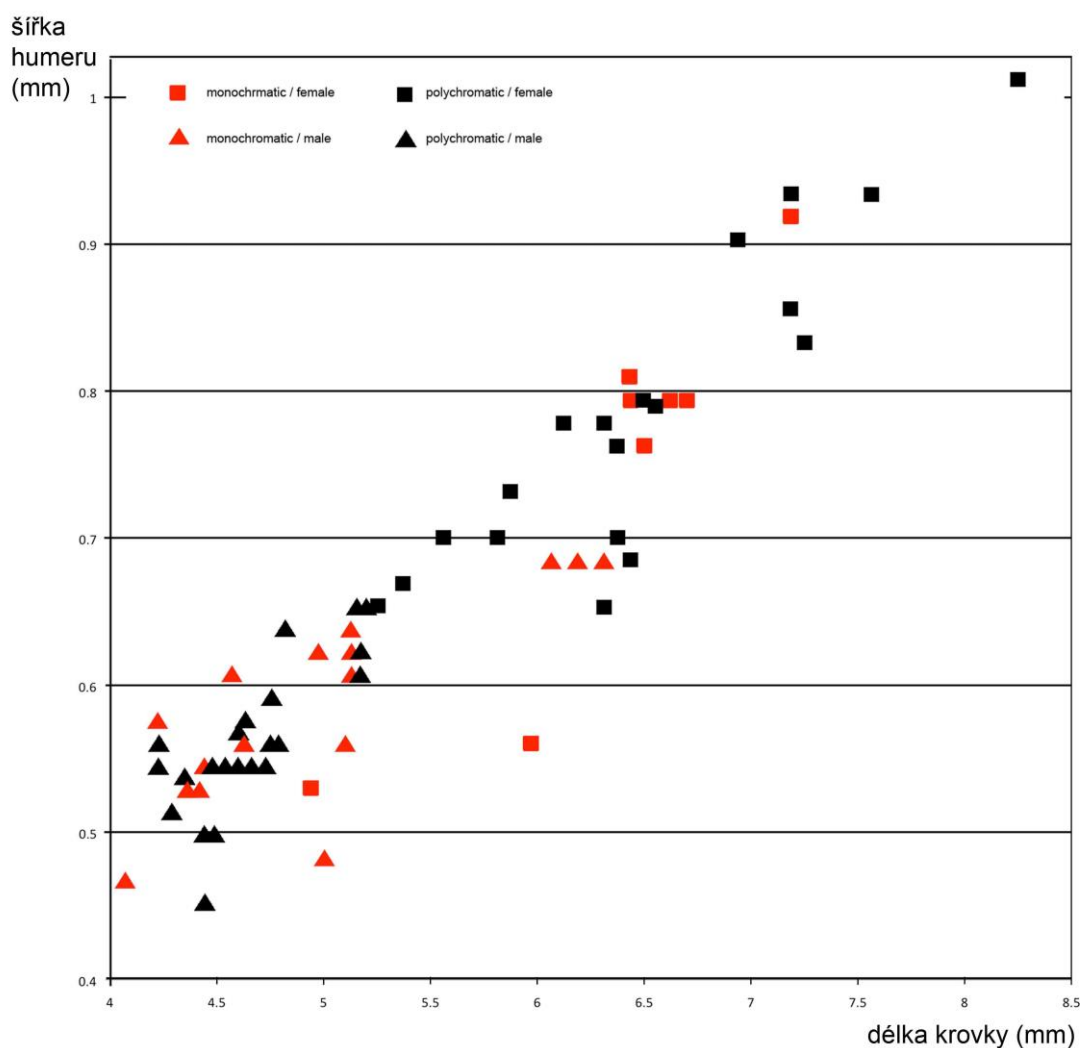
Tabule 1. Zástupci druhů patřících do aposematických komplexů se zastoupením rodu *Dilophotes*: A-C *Calochromus* spp. (Sumatra), D *Calochromus* sp. (Indie), E *Calochromus* sp. (Laos), F Lampyridae indet. (Sumatra), H, I *Libnetis* spp. (Sumatra), J *Plateros* sp. (Kalimantan), *Plateros* sp. (Malaysia, Cameron Highlands).

Tabule 2. Vybrané barevné vzory rodu *Dilophotes*



Tabule 2. Vybrané barevné vzory rodu *Dilophotes* ze kontinentální Asie, Sumatry, Bornea a Malajsie (MONO - monochromatický druh, POLY - polymorfický druh, THXXX - identifikační označení exempláře, který byl sekvenován).

Tabule 5. Velikost krovky monochromatických a polychromatických jedinců.



Tabule 5. Velikost krovky monochromatických a polychromatických jedinců druhů rodu *Dilophotes* ze Sumatry a Malajsie

4. Diskuse a závěr

Fylogeneze a fylogeografie

Vzhledem k chaotické taxonomii rodu *Dilophotes* jsem se nepokoušela formálně determinovat druhy, ale jednotlivé druhy byly označeny kódy a byly definovány ex post na základě molekulárně fylogenetické analýzy. Vzhledem k tomu, že materiál pro srovnání je uložen v obtížně dosažitelných muzejních sbírkách v zahraničí a navíc, část druhů byla stanovena na základě samic, které není možno klasifikovat, řešení taxonomických problémů není součástí této studie. Pro vyřešení taxonomie skupiny by byl nutný rozsáhlý srovnávací materiál a s velkou pravděpodobností bude nutno přistoupit k arbitrážní designaci samců z

typových lokalit, aby bylo možné použití jmen definovaných na základě samic.

Vzhledem k tomu, že samotná molekulární data nejsou spolehlivá pro definici biologických druhů bez podrobné znalosti vnitrodruhové variability, výsledek molekulárně fylogenetické analýzy byl srovnáván s informacemi získanými disekcí samčích genitálií. Zjistila jsem, že druhy delimitovány na základě sekvencí DNA, odpovídají druhům definovanými na základě morfologie pohlavních orgánů samců. Získaná DNA data umožnila identifikaci samic a jejich přiřazení ke konspecifickým samcům. Samice v morfologických znacích vykazovaly značnou uniformitu a nebylo je možné na základě morfologie určit (Bic 2002). Počet identifikovaných druhů (39) reprezentuje pravděpodobně pouze malý zlomek skutečné diverzity rodu *Dilophotes*. Materiál pro tuto studii byl nasbíráán v krátkém časovém rozmezí a na omezeném počtu lokalit, takže nález velkého počtu dalších druhů je velmi pravděpodobný.

Evoluce mimetických vzorů

Modelová skupina

Jako modelová skupina pro studium Mülleriánských mimikry jsem použila rod *Dilophotes* vzhledem k jeho vhodným vlastnostem. Tento rod patří do čeledi Lycidae, ve které jsou všichni zástupci chráněni proti predátorům přítomností hořkých a zapáchajících látek (Eisner et al. 2008). Navíc, rod *Dilophotes* představuje linii s výjimečnou fenotypickou diverzitou vyúsťující v evoluci většího počtu mimetických vzorů (Tabule 2). Rozmanitost barev a schopnost vytvářet kontrastní vzory umožňuje zapojení do různých mimetických kruhů vyskytujících se na různých lokalitách. Funkce barevných vzorů pro signalizování nepoživatelnosti je typická pro chráněné organismy a evoluce vzorů založených na nepoživatelnosti je indikována sdílením fenotypů mezi nepříbuznými druhy rodu *Dilophotes* a s nepříbuznými rody čeledi *Lycidae* (Tabule 1). Je tedy možné předpokládat, že druhy rodu *Dilophotes* budou pod selekčním tlakem ovlivňujícím jejich zbarvení, případně jiné charakteristiky ovlivňující jejich vnímání predátory.

Evoluce mimetických vzorů

Evoluce Mülleriánských mimetických vzorů je velmi intuitivním případem evoluce, přesto přetrvávají některé otázky, kdy není možné najít podporu pro výsledky teoretických modelů v reálných situacích v přírodě. Kontroverze kolem Mülleriánských mimikry se týkají několika aspektů:

1. vedou Mülleriánské mimikry nutně k evoluci jediného mimetického vzoru na dané lokalitě? Ačkoliv teoreticky je snadnější naučit predátora jediný vzor než několik vzorů, v přírodě jsou na jediné lokalitě často přítomny chráněné organismy signalizující svou nejedlost různými způsoby.

2. vznikají sdílené aposematické vzory konvergencí nebo advergencí? První model publikoval Müller (1979) a uvažoval situaci, že dva nepodobné druhy jsou přirozeným výběrem selektovány tak, že výsledný vzor je intermediární vůči vzorům ancestrálním. Migrace mohou ovšem vytvářet situaci, kdy se chráněný druh dostává do oblasti jiného vzoru a je nucen se adaptovat, tedy advergovat k lokálnímu aposematickému vzoru.

3. mohou Mülleriánští mimici parazitovat na přítomnosti hojnějších mimetických vzorů v oblasti? Mülleriánské mimikry jsou považovány za případ, kdy všechny zúčastněné organismy jsou chráněny, tedy všichni profitují na společné ochraně a současně všichni se podílejí na edukaci predátora. Pokud ovšem uvažujeme advergenci, tak predátor je edukován před migrací odlišně zbarveného nejedlého organismu do nového areálu a znejistění predátora při přítomnosti dalších jemu neznámých vzorů vytváří více náklady pro jeho edukaci, které nesou i místní druhy. Jedná se tedy o faktickou parazitaci nového člena mimetické skupiny na dříve získané ochraně ostatních organismů.

Je zbarvení druhů rodu *Dilophotes* důsledkem evoluce Mülleriánských mimikry?

Nejprve jsem hledala důkaz pro Mülleriánské mimikry a bylo nutné zjistit, jaká část aposematických vzorů je sdílena v důsledku příbuznosti nositelů aposematických vzorů a jaká část vzorů je sdílena nepříbuznými druhy a je tedy možné jejich vzájemnou podobnost přičíst predačnímu výběru. Na základě zde vytvořené molekulární fylogeneze je možné odvodit nezávislý původ sdílených aposematických vzorů u nepříbuzných druhů. Druhy, které se podobají, nejsou ve většině případů navzájem příbuzné a sdílejí zbarvení s druhy náležejícími do různých podčeledí a tribů. Jedná se tedy o evoluci mimikry a sdílené aposematické zbarvení není důsledkem sdílení společného předka.

Bazální klády vyskytující se v Asii severně od šíje Kra obsahovaly pouze jednobarevně zbarvené druhy ve shodě s jednobarevně zbarvenými druhy jiných podčeledí čeledi Lycidae ve stejné oblasti. Analýza rozložení těchto barevných vzorů ukázala, že monomorfní formy s vysokou pravděpodobností reprezentují ancestrální stav. Počet mimetických vzorů

zaznamenaných v tomto regionu je nízký. Rody *Libnetis* a *Plateros* jsou v kontinentální Asii uniformně zbarveny a druhy rodu *Dilophotes* se jim silně podobají. Tyto regiony považují za ancestrální areály, z nichž se rod *Dilophotes* rozšířil na jih. Tomu odpovídá i tektonická historie kontinentální oblasti jihovýchodní Asie, která je podstatně stabilnější a nebyla v Terciéru opakovaně zaplavována jako oblast Velkých Sund (Hall 1998). V kontinentální Asii se nevyskytují druhy vykazující sexuální dimorfismus.

Vedou Mülleriánské mimikry nutně k evoluci jediného mimetického vzoru na dané lokalitě?

Větší počet mimetických vzorů různých druhů v rodě *Dilophotes* je doložen na více lokalitách Velkých Sund a kontinentální Malajsie (Malajský poloostrov). V této oblasti se vyskytuje větší počet taxonů čeledi Lycidae (Bocák & Bocáková 2008) a tyto vytvářejí větší počet aposematických vzorů vyskytujících se současně na stejných lokalitách. Vzory v této oblasti jsou komplikovanější v tom smyslu, že krovky jsou typicky pestře zbarveny v humerální části a černě zbarveny v apikální polovině nebo čtvrtině. Tyto vzory jsou vázány alespoň částečně na velikost těla. Žluto-černé druhy jsou obecně menší a jsou tvořeny pravidelně druhy rodů *Plateros* a *Libnetis*. Černo-červené vzory jsou známy především v rodech *Cautires*, *Xylobanus* a *Calochromus* a jejich nositelé patří k druhům s větším tělem. Průměrná velikost těla druhů rodu *Dilophotes* je na pomezí mezi typickou velikostí těla v rodech *Libnetis* a *Plateros* a velikostí těla rodů *Xylobanus*, *Cautires* a *Calochromus* (Tabulka 6). Nedokonalá podobnost je zdrojem omylu predátora a vede k opakovanému napadání nepoživatelné kořisti, proto je možné očekávat, že přírodní výběr povede k řešení situace omezující omyly predátorů.

V přítomnosti většího počtu aposematických vzorů na lokalitě mohou reagovat druhy rodu *Dilophotes* (po osídlení oblasti nebo změnách areálů v rámci oblasti) několika způsoby:

a) zachovat nebo vyvinout mimetický vzor nesdílený s jinými chráněnými organismy, které se rodu *Dilophotes* podobají velikostí a tvarem těla. Takovým případem je druh *Dilophotes* sp. H, který je zbarvený žlutě jako jediný z druhů vyskytujících se na Sumatře. Podobný druh se vyskytuje v Laosu (*Dilophotes* sp. A), kde se ovšem vyskytují i žlutě zbarvené druhy rodů *Plateros*, *Cautires* a *Xylobanus*. Tento druh si mohl zachovat původní zbarvení, které se vyvinulo mimo dnešní areál nebo mohl toto zbarvení vyvinout *in situ*. V obou případech toto ukazuje na možnost vývoje nebo přetrvání více mimetických vzorů na jediné lokalitě a odporuje popisu modelu Mülleriánských mimikry jako jevu vedoucího k evoluci jediného vzoru na lokalitě.

Vznikají sdílené aposematické vzory konvergenčí nebo advergenčí?

Prostředí, obývané výrazně aposematicky zbarvenými druhy čeledi Lycidae, vede k vývoji na pohlaví vázaného polymorfismu u některých zástupců rodu *Dilophotes*. Celkem 10 druhů *Dilophotes* vytváří dvě samostatné sexuálně definované aposematické formy a každá z nich se podobá jinému modelu (Tabule 4). Fylogenetický strom a hodnocení morfologie, včetně kopulačních orgánů, prokázaly, že tyto druhy mají samice podobající se červeno-černému vzoru středně velkých druhů čeledi Lycidae a samce podobající se žluto-černému vzoru druhů s drobným tělem. Vzhledem k tomu, že se jedná pravidelně o terminální linie, považujeme toto za důkaz, že k jejich evoluci dochází dodatečně v prostředí, kde je přítomen větší počet aposematických vzorů a toto je důkazem advergentní evoluce vzorů v rodu *Dilophotes*. Výsledky dále poukazují na existenci vztahu mezi převzatým mimetickým vzorem a velikostí těla. Monomorfické druhy mají menší rozdíl ve velikosti těla mezi pohlavími než druhy polymorfické (Tabulka 5 a Tabule 5). To odpovídá selekčnímu tlaku pro samice s větším tělem a samce s menším tělem po získání příslušných odlišných aposematických vzorů pro samce a samice. Naproti tomu samci a samice monomorfických druhů nejsou tomuto tlaku vystaveni. Z důvodu malého množství identifikovaných jedinců nemohla být provedena podobnější analýza. Ačkoliv se domníváme, že vzor rodu *Cautires* poskytuje lepší ochranu pro samice, podobnost rodu *Dilophotes* a *Cautires* je očividně nedokonalá. Rod *Dilophotes* má menší a štíhlejší tělo než většina forem rodu *Cautires* (Tabule 1).

Vícevzorová agregace v terénu: parazitace vzácných vzorů na hojných vzorech?

V Oblasti Gunung Sibayak byla pozorována agregace několika stovek jedinců obsahující rody *Dilophotes*, *Plateros*, *Libnetis* a *Cautires*. Toto seskupení obsahovalo jedince náležející k několika mimetickým vzorům.

Seskupení nepoživatelných jedinců sdílejících stejný aposematický vzor je běžná strategie omezující útoky predátorů a agregace aposematicky zbarvených druhů byla považována jako faktor podporující počáteční fázi evoluce nového aposematického signálu (Sherratt 2008). Model jednoho barevného vzoru reprezentujícího jediný druh byl považován za navození funkce příbuzenského výběru v procesu učení predátorů (Guilford 1985). Agregace pozorovaná v oblasti Gunung Sibayak ovšem obsahovala nejen více druhů, ale i více vzorů. Různé druhy z několika podčeledí vytvářely seskupení a s ohledem na vysoký počet jedinců pravděpodobně velmi efektivně komunikovaly při vytváření agregace. Možnosti komunikace druhů čeledi Lycidae nebyly studovány. Potenciálně přichází v úvahu využití

zapáchajících látek odrazujících predátory současně jako signálu pro agregaci chráněných druhů.

Ačkoli byl žluto-černý vzor převažující v pozorovaném seskupení, byly zastoupeny také další vzory (Tabule 3). Domníváme se, že tato skutečnost je důkaz modelu předpovídajícího výhodnost být součástí agregace, nejen pro nedokonale mimeticky zbarvené jedince, ale také pro členy jiných mimetických kruhů. V tomto případě ovšem nositelé vzácných vzorů parazitují na přítomnosti hojného chráněného vzoru a poškozují jeho nositele, který nese náklady na poučení predátora (Sherratt 2008).

Tyto výsledky navíc ukazují, že soubor mimetických vzorů pozorovaný u rodu *Dilophotes* je výsledkem souhry několika faktorů. Velikost těla představuje parametr vybírající vzor pro každé pohlaví, ale jsou zde zjevná omezení omezující podobnost a některé faktory vedoucí k vytváření rozdílných aposematických signálů u některých druhů (typy STR, Yel a HUM, Tabule 3). Pozorovaná přítomnost aposematických vzorů u rozdílných druhů reprezentuje s největší pravděpodobností kompromis mezi omezeními, které ovlivňují tvar, velikost a zbarvení těla, a přírodním výběrem preferujícím, v ideálním případě, jeden aposematický signál na jednom místě. Ačkoli možnost různých predátorů ovlivňující jednotlivé mimetické kruhy nemůže být vyloučena, překrývání velikostí, sdílená biologie a chování naznačují, že většina predátorů se živí jak malými, tak středně velkými jedinci.

Velmi silná selekce proti vzácnému fenotypu nepoživatelné kořisti byla odvozena z terénních pozorování (Mallet & Barton 1989; Kapan 2001). Celý rod *Dilophotes* sdílí vzory vyskytující se v kontinentální Asii. Předpokládáme, že ancestrálními jsou monomorfní aposematické vzory. Na Velkých Sundách jsme pozorovali v případě monomorfních druhů rodu *Dilophotes* pouze typy napodobující žluto-černý vzor *Libnetis*. Proto předpokládáme, že změna samic, původně zbarvených jako rod *Libnetis*, na vzor rodu *Calochromus/Cautires* nastala jako sekundární krok v adaptaci na místní mimetický systém. Samice s velkým tělem sdílející barevný vzor rodu *Libnetis* s ostatními chráněnými druhy, pravděpodobně nezískaly dostatečnou ochranu a výskyt mutace zodpovědné za červené zbarvení byl pozitivně selektován z důvodu nižší predace, když se podobaly vzoru rodu *Cautires*. Tato hypotéza předpokládá schopnost predátorů velmi přesně rozlišovat mezi nepatrnými změnami mimetických vzorů, jinak by tento posun nebyl možný. Kromě toho, k vysvětlení pozorovaného rozmístění vzorů u rodu *Dilophotes*, se domníváme, že Mülleriánské mimikry (všechny druhy jsou nepoživatelné) se vyvíjí advergentně. To znamená Batesiánskou cestou, jak popsali Bocák & Yagi (2010). V případě tohoto vývoje, červeně zbarvené samice rodu

Dilophotes parazitují v původním mimetickém kruhu a neplatí za učení predátorů v rané fázi vývoje vzoru, která představuje kritickou fázi. Jiným zajímavým faktorem je možnost vzniku nového vzoru nebo přetrvání vzoru původem z jiné oblasti v prostředí mnohavzorových společenství. Druhy *Dilophotes* sp. H (Yel) a sp. N, O (HUM) jsou jedinými zástupci svého vzoru v oblasti.

Pozorované složení mnohadruhových mimetických kruhů poukazuje na docela složitou situaci. Omezení hrají očividně mnohem důležitější roli v evoluci mimetických vzorů, než se původně předpokládalo. Tato omezení jsou obtížně popsatelná u zjednodušených teoretických modelů, proto jsme při jejich identifikaci závislí na terénních pozorováních a odvození jejich vzniku z fylogeneckých informací. Rod *Dilophotes* se nebyl schopen posunout k silnějšímu a častějšímu vzoru rodu *Cautires* kvůli obecně malé velikosti těla a vyřešil problém malých samců a velkých samic sexuálně vázaným polymorfismem. Přesto, přinejmenším samice se nikdy nestaly dokonalým mimetickým modelem a jsou nejmenšími členy mimetického kruhu vzoru rodu *Cautires*.

Interakce mezi větším počtem druhů syntopicky vyskytujících se mimetických vzorů, vliv počtu jedinců v každém mimetickém kruhu na intenzitu selekce, omezení vyplývající z velikosti těla a vznik sexuálně vázaného polymorfismu u rodu *Dilophotes* vytváří unikátní aposematický systém neznámý v jiných skupinách. Kromě toho, druhy neschopné napodobit místní vzory, vytvářejí unikátní aposematické vzory a mohou mít prospěch z přítomnosti jiných aposematicky zbarvených Lycidů. Tyto hypotézy nastiňují otázku o reakci predátora na nový mimetický vzor v mnohavzorovém společenství aposematicky zbarvených jedinců. Proměnlivost mimetických signálů zde uváděná, obecně počítající s tradičním Mülleriánským modelem, předpovídá konvergenci ke sdílení vzoru mezi chráněnými organismy. Možnost disperse druhů rodu *Dilophotes* mezi oblastmi s různými aposematickými vzory ovšem naznačuje spíše advergentní evoluci, jak byla popsána např. Bocákem a Yagim (Bocak a Yagi 2010).

5. Literatura

Bates H. W. 1961. „Contributions to an insect fauna of the Amazon valley. Lepidoptera: Heliconidae". *Transactions of the Linnean Society*, 23: 495-566.

Bic V. 2002. Review of the genus *Dilophotes* Waterhouse (Coleoptera: Lycidae) of the Palaearctic Region and Indochina. *Zootaxa*, 59: 1-26.

Bocák L. 2003. Mimicry evolution in South East Asian Metriorrhynchinae (Insecta: Coleoptera). In: *Insect molecular phylogenetics*, Okazaki, 2003. Research News, Supplementum.

Bocák L. & Bocáková M. 2008. Phylogeny and classification of the family Lycidae (Insecta: Coleoptera). *Annales Zoologici*, 58: 695-720.

Bocák L., Bocáková 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.

Bocák L. & Matsuda K. 2003. Review of immature stages of the family Lycidae (Insecta: Coleoptera). *Journal of Natural History*, 37: 1463-1507.

Bocák L. & Yagi T. 2010. Evolution of mimicry patterns in *Metriorrhynchus* (Coleoptera: Lycidae): the history of dispersal and speciation in southeast Asia. *Evolution : International Journal of Organic Evolution*, 64 (1): 39-52.

Burakowski B. 1988. Observations on the larval morphology and biology of *Omalisus fontisbellaquei* Fourcroy (Coleoptera, Homalidae). *Polskie Pismo Entomologiczne*, 58: 571-574.

Carpenter G. D. H. & Ford E. B. 1933. *Mimicry*. London: Methuen & Co. Ltd.

Drummond A. J. & Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.

Edmunds M. 1974. Defence in Animals. *Longmans*, Harlow, Essex.

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.

Felsenstein J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17 (6): 368-376.

Goloboff P., Farris J. & Nixon K. 2003. T. N. T.: Tree analysis using new technology. Available at: <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny> (accessed on March 1, 2008).

Guilford, T. 1985. Is kin selection involved in the evolution of warning coloration? *Oikos*, 45: 31-36 .

Hall R. 1998. The plate tectonics of Cenozoic SE Asia and the distribution of land and sea. *Evolution*, 10: 99-131.

Hayashi N. 1986. Key to the families of Coleoptera based on the larval characters, in Morimoto K. and Hayashi N. (eds). *The Coleoptera of Japan in Color, Volume I*, (Osaka: Hoykusha Publishing Co.), pp. 202-218, plates 1-113 [in Japanese].

Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L. & deWaard J. R. 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270: 313-321.

Huelsenbeck J. P., Rannala B., & Masly J. P. 2000. Accommodating phylogenetic uncertainty in evolutionary studies. *Science*, 288: 2349-2350.

Joron M. & Mallet J. 1998. Diversity in mimicry: paradox or paradigm? *Trends in Ecology & Evolution*, 13: 461-466.

Kapan D. D. 2001. Three-butterfly system provides a field test of Müllerian mimicry. *Nature*, 409: 338-340.

- Kleine R. 1933. *Coleopterorum Catalogus auspiciis et auxilio W. Junk editus S. Schenkling. Pars 128: Lycidae.* W. Junk, Berlin.
- Linsley E. G., Eisner T. & Klots A. B. 1961. Mimetic Assemblages of Sibling species of Lycid Beetles. *Evolution*, 15: 15-29.
- Mallet J. & Barton N. H. 1989. Strong natural selection in a warning-color hybrid zone. *Evolution*, 43: 421-431.
- Miller R. S. 1988. Behavior of *Calopteron reticulatum* (F.) larvae (Coleoptera: Lycidae). Ohio. *Journal of Science*, 88: 119-120.
- Miller R. S. 1997. Immature stages of *Plateros floralis* (Melsheimer) and discussion of phylogenetic relationships (Coleoptera: Lycidae). *Coleopterologists Bulletin*, 51: 1-12.
- Müller F. 1879. "Ituna and Thyridia; a remarkable case of mimicry in butterflies. (R. Meldola translation)". *Proclamations of the Entomological Society of London*, 1879: 20-29.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25 (7): 1253-6.
- Rambaut A. & Drummond A. J. 2004. Tracer version 1.4. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer> (accessed on July 1, 2010).
- Sherratt T. N. 2008. The evolution of Müllerian mimicry. *Naturwissenschaften*, 95: 681-695.
- Smith M. A., Bertrand C., Crosby K., Eveleigh E. S., Fernandez-Triana J., Fisher B. L., Gibbs J., Hajibabaei M., Hallwachs W., Hind K., Hrcek J., Huang D. W., Janda M., Janzen D. H., Li Y., Miller S. E., Packer L., Quicke D., Ratnasingham S., Rodriguez J., Rougerie R., Shaw M. R., Sheffield C., Stahlhut J. K., Steinke D, Whitfield J., Wood M., Zhou X. 2012. Wolbachia and DNA barcoding insects: patterns, potential, and problems. *PLOS ONE*, 7 (5): e36514.

Stamatakis A. 2006a. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688-2690.

Stamatakis A. 2006b. Phylogenetic models of rate heterogeneity: A high performance computing perspective. In: *International parallel and distributed processing symposium, Proceedings 20th IEEE international parallel & distributed processing symposium*, 2006, pp. 278.

Stamatakis A., Hoover P. & Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAXML web-servers. *Systematic Biology*, 75: 758-771.

Swofford D. L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony. v. 4.0b10. Sunderland, MA: *Sinauer*.

Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.

Turner J. R. G. 1977. Butterfly mimicry-the genetical evolution of an adaptation. *Evolution Biology*, 10: 163-206.

Waterhouse C. O. 1879. On the different forms occurring in the Coleopterous family Lycidae, with description of new genera and species. *Transactions of the Entomological Society*, London: 95-118.

Wickler W. 1968. Mimicry in Plants and Animal. *McGraw-Hill*, New York.

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.