

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Fylogeneze a fylogeografie modrásků rodu *Cacyreus*
jako nástroj hledání původu invazního *C. marshalli***

Diplomová práce

Bc. Lukáš Bešta

Školitel: RNDr. Zdeněk Faltýnek Fric, Ph.D. (EntÚ)

České Budějovice 2020

BEŠTA L. 2020. Fylogeneze a fylogeografie modrásků rodu *Cacyreus* jako nástroj hledání původu invazního *C. marshalli*. [Phylogeny and phylogeography of blues from genus *Cacyreus* as a tool of finding invasive *C. marshalli*. Mgr. Thesis, in Czech.] – 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

I studied phylogeny and phylogeography of 7 species of African genus *Cacyreus* (Lepidoptera: Lycaenidae). For the purposes of analyses I used sequences of a mitochondrial gene for cytochrome oxidase 1 (COI) and two nuclear genes for wingless (Wg) and elongation factor 1 alpha (EF1 α). The results of these molecular-genetic analyses were confirmed by the different morphological structures present in the genitals of studied samples.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 20. 5. 2020

.....

Lukáš Bešta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval především mému školiteli RNDr. Zdeňkovi Faltýnkovi Fricovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky, pomoc se zpracováním analýz a v neposlední řadě za sehnání studovaného materiálu. Dále bych chtěl poděkovat Nikolaii Ignatevovi za pomoc s disekcí a nafocením kopulačních orgánů a Michalovi Rindošovi a Aleně Sucháčkové Bartoňové za zaučení v laboratoři, jak izolovat DNA a provést PCR reakci a ověřit její úspěšnost pomocí elektroforézy.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 ROD <i>CACYREUS</i>	1
2.1 Taxonomie a rozšíření rodu <i>Cacyreus</i>	1
2.2 Introdukce <i>Cacyreus marshalli</i> do Evropy	3
2.3 Jednotlivé druhy rodu <i>Cacyreus</i>	5
2.3.1. <i>Cacyreus lingeus</i> (Stoll, 1782) – Obr. 8, 9	6
2.3.2 <i>Cacyreus virilis</i> (Aurivillius, 1924) – Obr. 11, 12	6
2.3.3 <i>Cacyreus darius</i> (Mabille, 1877) – Obr. 14	8
2.3.4 <i>Cacyreus audeoudi</i> (Stempffer, 1936) – Obr. 16	8
2.3.5 <i>Cacyreus dicksoni</i> (Pennington, 1962) – Obr. 18, 19	9
2.3.6 <i>Cacyreus palemon</i> (Stoll, 1782) – Obr. 21, 22	10
2.3.7 <i>Cacyreus palemon ghimirra</i> (Talbot, 1935) – Obr. 23, 24	10
3 CÍLE PRÁCE	12
4 METODIKA	13
4.1 Materiál	13
4.2 Izolace DNA	13
4.3 PCR	14
4.4 Elektroforéza	15
4.5 Přečištění PCR produktů a sekvenace	15
4.6 Analýzy	15
4.6.1 Alignování sekvencí	15
4.6.2 Substituční modely	15
4.6.3 Bayesovská analýza	15
4.6.4 Maximum Likelihood	16
4.6.5 BEAST – datování	16
4.6.5 Haplotypové sítě	16
4.7 Disekce kopulačních orgánů	16
5 VÝSLEDKY	17
5.1 Použité vzorky, úspěšnost PCR a sekvenace	17
5.2 Substituční modely	17
5.3 Fylogenetické stromy	18
5.4 Molekulární datování	18
5.6 Haplotypové sítě	22
5.6.1 Haplotypová síť <i>C. palemon</i>	22

5.6.2 Haplotypová síť <i>C. marshalli</i> a <i>C. dicksoni</i>	23
5.6.3 Haplotypová síť <i>C. audedoudi</i> a <i>C. virilis</i>	24
5.6.4 Haplotypová síť <i>C. lingeus</i>	25
5.6.5 Haplotypová síť <i>C. darius</i>	26
5.7 Taxonomie založená na morfologii kopulačních orgánů	27
6 DISKUZE	31
6.1 Fylogenetická a fylogeografická analýza.....	31
7 ZÁVĚR	35
8 RESUME	36
9 INFORMAČNÍ ZDROJE	37
9.1 Seznam literatury	37
9.2 Seznam internetových zdrojů.....	40
10 SEZNAM PŘÍLOH	41

1 ÚVOD

Současné taxonomické pojetí všech organismů se zakládá na aplikaci molekulárně genetických metod. Během posledních dvaceti let se tato metodika značně rozšířila a začala se používat i na modrásky (např. Wiemers 2003, Kandul et al. 2004, Fric et al. 2007, Vodolazhsky et al. 2009, Wiemers et al. 2010, Vila et al. 2011, Talavera et al. 2013, Stradomsky 2016, Fric et al. 2019), přesto tato čeleď denních motýlů zůstává stále bez detailní fylogenetické analýzy. Prozatímni výzkum se zabýval převážně druhově bohatými nebo nějak zajímavými rody modrásků jako např. *Polyommatus* (Vila et al. 2011) nebo *Phengaris* (Fric et al. 2007). Stradomsky v roce 2016 publikoval fylogenetický systém podčeledi Polyommatinae založený na základě tří markerů u vybraných zástupců různých rodů, ale přesto se jedná pouze o jakousi kostru této podčeledi s absencí některých rodů (např. *Harpentryreus*) a zařazení většiny druhů.

Předmětem této práce je podtrib Cacyreina, do kterého patří pouze rody *Cacyreus* a *Harpentryreus*, u nichž prozatím nebyla vypracovaná žádná fylogenetická ani fylogeografická studie, tudíž jejich systematické členění je stále založeno pouze na makroskopicky velmi obtížně rozlišitelných znacích na křídlech mezi některými druhy a částečně také na morfologických odlišnostech jejich kopulačních orgánů. Rod *Cacyreus* je široce rozšířeným africkým rodem modrásků s výskytem dosahujícím i na Arabský poloostrov a od 90. let 20. století silně expandující po Evropě, kde se začíná projevovat jako škůdce na pelargoních. Z těchto důvodů tato práce přináší zcela nové a užitečné poznatky o fylogenezi a fylogeografii vybraných druhů tohoto rodu.

2 ROD CACYREUS

2.1 Taxonomie a rozšíření rodu *Cacyreus*

Systematické zařazení rodu *Cacyreus* je následující:

Čeleď: Lycaenidae Leach, 1815

Podčeleď: Polyommatinae Swainson, 1827

Tribus: Polyommatini Swainson, 1827

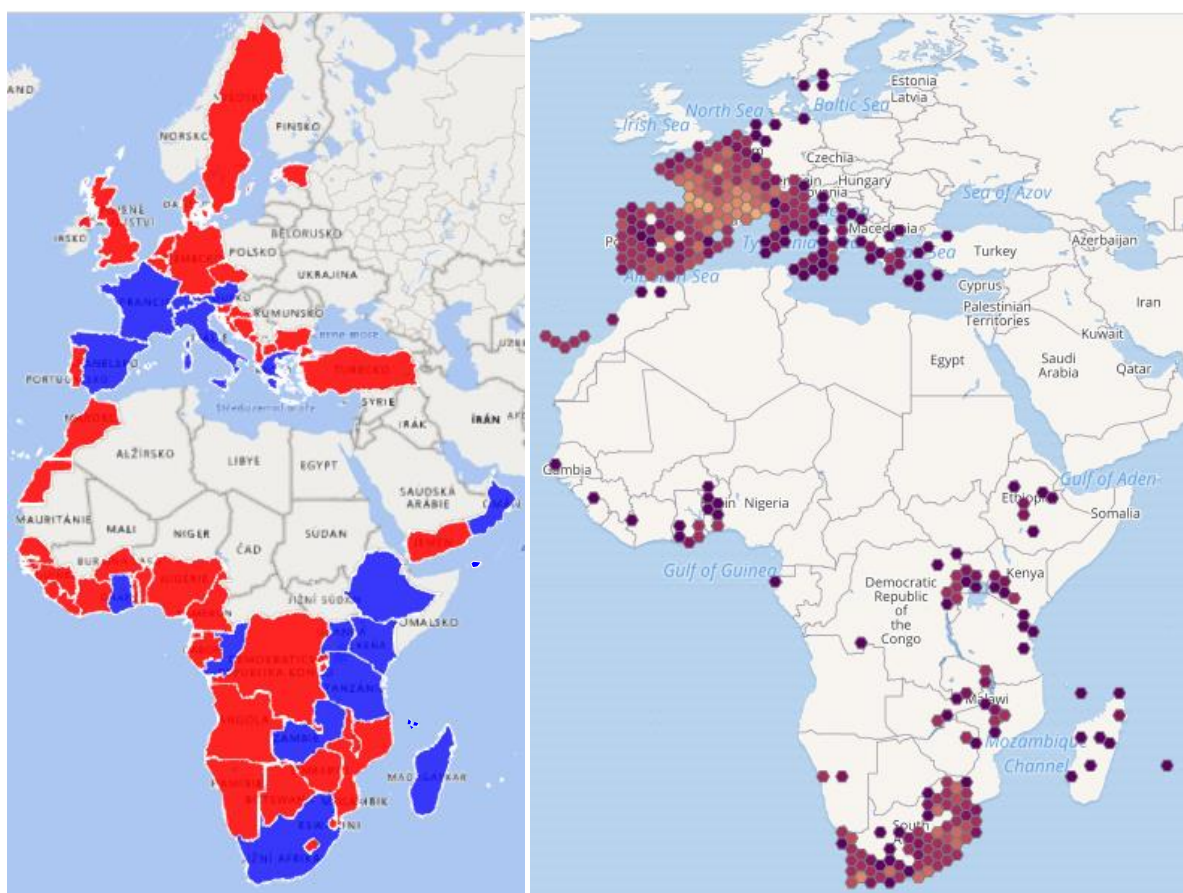
Podtribus: Cacyreina Stradomsky, 2016

Rod: *Cacyreus* Butler, 1898

Na základě morfologických a molekulárních metod se do podčeledi Polyommatinae řadí tribus Lycaenesthini a Polyommatini, oba velice bohatě zastoupené v afrotropické oblasti (Ackery et al. 1995, Stradomsky 2016). Tribus Polyommatini zahrnuje 22 podtribů, z čehož se v afrotropickém regionu vyskytují následující: Cacyreina, Brephidiina, Azanina,

Lampidina, Zizulina, Castaliina, Leptotina, Zizeeriina, Oboroniina, Polyommata a endemické Actizerina a Uranothaumatina. Až na podtrib Oboroniina a Polyommata se jedná o poměrně druhově chudé skupiny, přičemž celosvětově bohatý podtrib Polyommata zahrnuje v afrotropické oblasti pouze několik málo rodů a druhů (Ackery et al. 1995).

V původní nomenklatuře se uvádí rod *Hyreus* Hübner, 1819, který byl později přejmenován na rod *Cacyreus* Butler, 1898, protože v původním rodu *Hyreus* nebyly ustanoveny žádné typové druhy („type-species“). Jako tzv. typový druh rodu *Cacyreus* byl zvolen *Papilio lingeus* Stoll, dnes nazývaný *Cacyreus lingeus* Stoll, 1782 (Williams 2018). Rod *Cacyreus* zahrnuje 9 druhů, jejichž stálé rozšíření je v současnosti kromě Afriky ještě na Arabském poloostrově a od začátku 90. let 20. století v Evropě (Obr. 1).



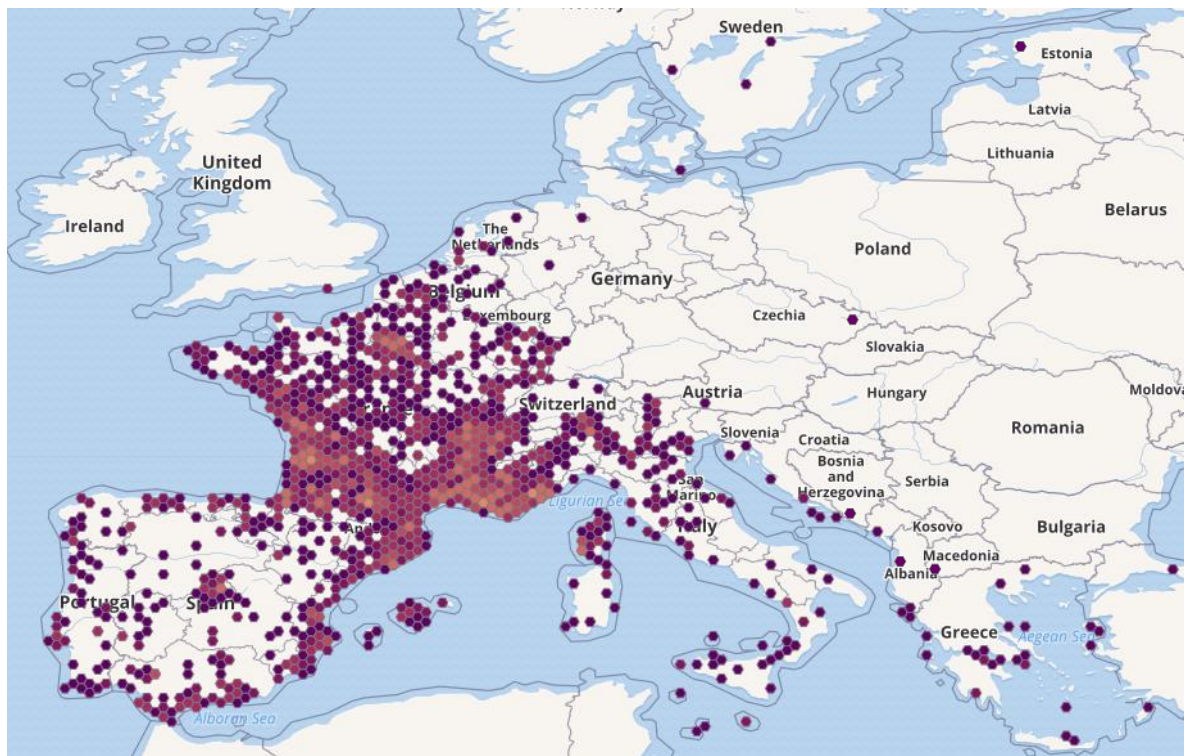
Obr. 1. Mapa vlevo ukazuje rozšíření rodu *Cacyreus*. Modře jsou vyznačeny země, ze kterých pocházejí vzorky použité v této práci. Červeně jsou znázorněny další státy, ze kterých pochází alespoň jeden oficiální nález některého z druhů tohoto rodu (Soyhan 2013, Langourov & Simov 2017, Micevski N. & Micevski B. 2017, Williams 2018, www.lepidoptera.cz). Mapa vpravo udává početnost záznamů rodu *Cacyreus* dle databáze webové stránky www.gbif.org.

2.2 Introdukce *Cacyreus marshalli* do Evropy

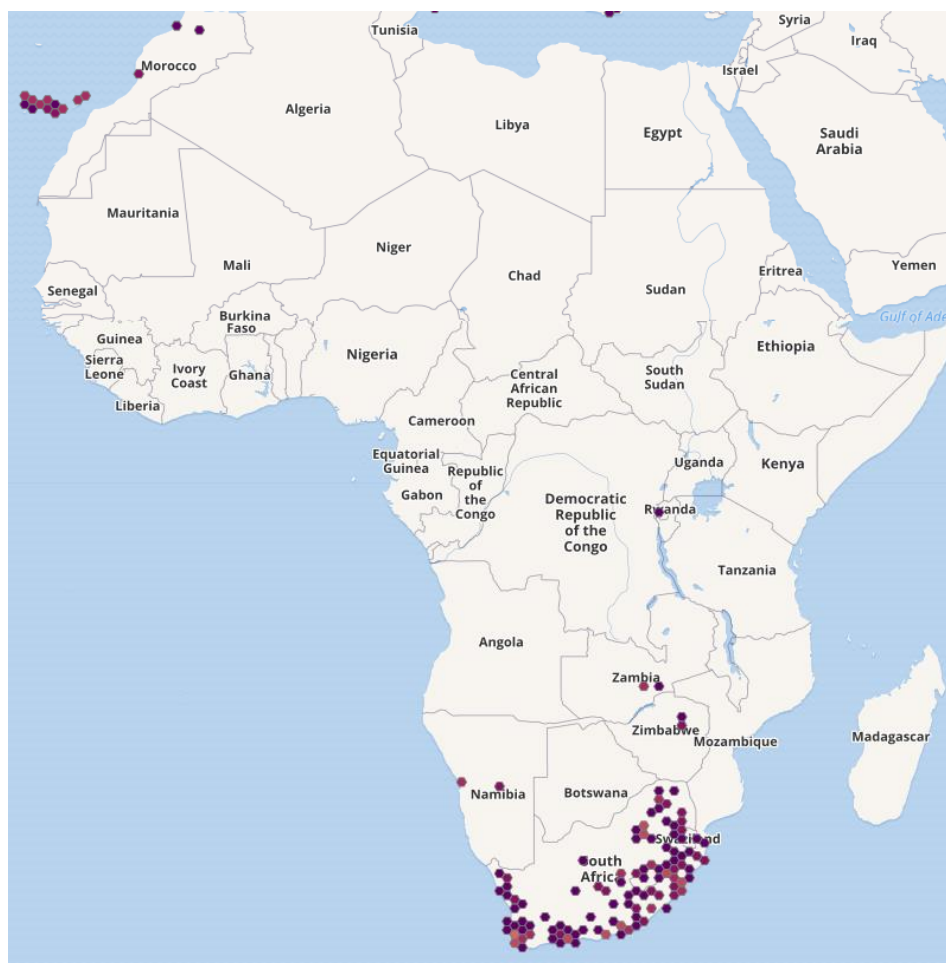
Modrásci rodu *Cacyreus* byli dlouho považováni za pouze africké motýly. První záznam z Evropy pochází z roku 1978, kdy byly nalezeny dvě housenky druhu *Cacyreus marshalli* (modrásek muškátový) v Chesthuntu (Hertfordshire ve Velké Británii), které byly dovezeny na pelargoniích z Jihoafrické republiky (Sarto i Monteys 1992), kde by měl být původ daného druhu (Obr. 3). Pelargonie (*Pelargonium* sp.) je jednou z živných rostlin housenek tohoto motýla (Raynor 1990). V roce 1987 byly pozorovány požerky odpovídající *C. marshalli* na pelargoniích na ostrově Mallorca (Sarto i Monteys 1992). Hypotézu o zavlečení tohoto motýla na pelargoniích do Evropy dále potvrzují první odchyty 5 samců a 8 samic od 15. do 20. listopadu roku 1989 na jihovýchodě ostrova Mallorca, oblast Paguera (Troukens 1991). Následující studie ukázaly, že se druh rozšířil po celém ostrově, vytvořil stabilní populaci a stal se významným škůdcem na pěstovaných pelargoniích (Sarto i Monteys & Masó 1991). Podobná situace se opakovala i na dalších dvou Baleárských ostrovech (Ibiza a Menorca) a dále na pevnině ve Španělsku (Sarto i Monteys 1992).

Další nález z Evropy pochází z 3. srpna 1991, kdy byl chycen jeden samec v Anderlechtu (Brusel, Belgie). V okolí byla pěstována spousta pelargonií, tudíž se usuzuje, že jeho výskyt v Belgii, měl pravděpodobně stejnou příčinu jako na Mallorce. Je ale nemožné zjistit, zda jeho původ zavlečení byl z ostrova Mallorca, jiné části Evropy nebo přímo z jižní Afriky (Troukens 1991).

Následně začal *C. marshalli* expandovat po celé jižní Evropě (Obr. 2) i dalších místech ve Středozeří. Postupně se šířil po pevnině ve Španělsku (Castellón de la Plana, Valencie 1992; Dénia duben 1993; Granada červenec 1993), kam byl pravděpodobně omylem introdukovan z Baleárských ostrovů (protože není příliš dobrý migrant), kde již vytvářel stabilní populace (Sarto i Monteys 1992). Dále expandoval do Francie, sousedního Portugalska, Maroka a následně do Itálie, kde byl prvně zaznamenán v Římě v roce 1996 (TARRIER 1998). Na Balkánském poloostrově se prvně objevil mezi lety 2008 a 2009 ve Slovinsku, Chorvatsku a Řecku (Langourov & Simov 2017). Současné nálezy z palearktické oblasti dále pocházejí z Kanárských ostrovů, Madeiry, Korsiky, Sardinie, Sicílie, Malty, Švýcarska a jednotlivě z Velké Británie, Nizozemska, Belgie, Německa, Rakouska, Turecka, Švédska, Dánska, Estonska, Bulharska, Bosny a Hercegoviny, Albánie, Černé Hory a Makedonie (Soyhan 2013, Langourov & Simov 2017, Micevski N. & Micevski B. 2017). V České republice byla zatím doložena pouze jedna samice z 24. 7. 2015 z Ostravy-Poruby (www.lepidoptera.cz).



Obr. 2. Aktuální nálezy expandujícího *C. marshalli* v Evropě. Zdroj: [www. gbif.org](http://www.gbif.org)



Obr. 3. Rozšíření *C. marshalli* mimo Evropu. Zdroj: [www. gbif.org](http://www.gbif.org)

2.3 Jednotlivé druhy rodu *Cacyreus*

Pro rod *Cacyreus* prozatím nebyly zpracovány žádné fylogenetické analýzy, a proto je systematika tohoto rodu založena pouze na morfologických znacích. Tento rod se dá rozdělit na základě tvaru křídel, odlišných znaků na rubu křídel a potravy housenek do dvou skupin (Larsen 2005). Do tzv. „lingeus“ skupiny patří druhy mající více zaoblená křídla s modrým zbarvením u samců (*C. lingeus*, *virilis*, *audeoudi*). Zástupci této skupiny se vyskytují v téměř celé subsaharské Africe, v Ománu a na ostrovech západní části Indického oceánu (Obr. 6). Housenky těchto druhů se živí převážně na rostlinách z čeledi Lamiaceae. Do tzv. „palemon“ skupiny se řadí druhy vyznačující se trojúhelníkovitým tvarem předních křídel s převážně hnědým zbarvením (*C. palemon*, *marshalli*, *dicksoni*, *ethiopicus*, *niebuhri*). Původní výskyt těchto druhů je v jižní a východní Africe a v Jemenu (Obr. 7). Housenky zástupců této skupiny se živí převážně na rostlinách z čeledi Geraniaceae. Jediným nezařazeným druhem je *C. darius*, který by měl patřit do skupiny „lingeus“ kvůli modrému zbarvení křídel a živným rostlinám housenek z čeledi Lamiaceae.



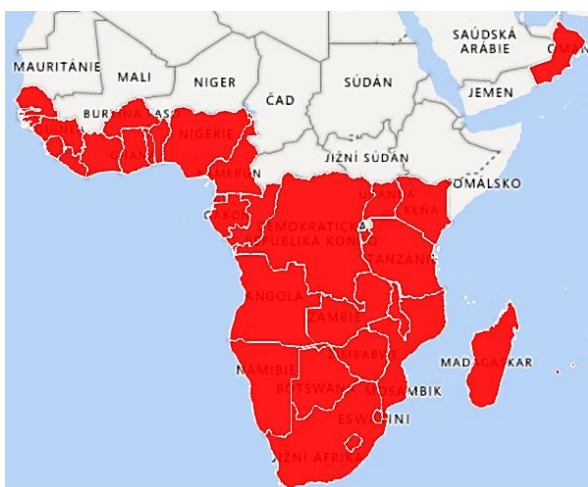
Obr. 4. *C. lingeus* – skupina „lingeus“.

Zdroj: Williams 2018.

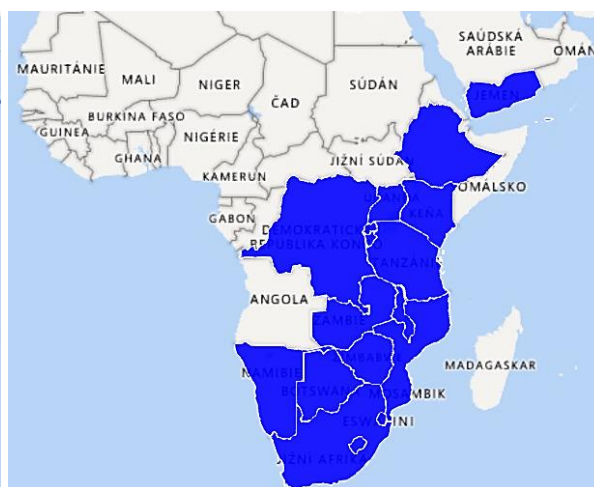


Obr. 5. *C. palemon* – skupina „palemon“.

Zdroj: Williams 2018



Obr. 6. Rozšíření skupiny „lingeus“.



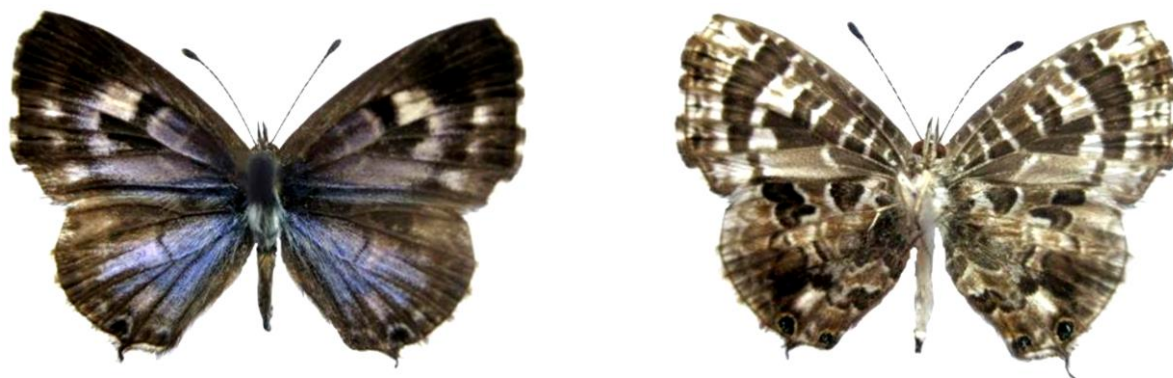
Obr. 7. Rozšíření skupiny „palemon“.

2.3.1. *Cacyreus lingeus* (Stoll, 1782) – Obr. 8, 9

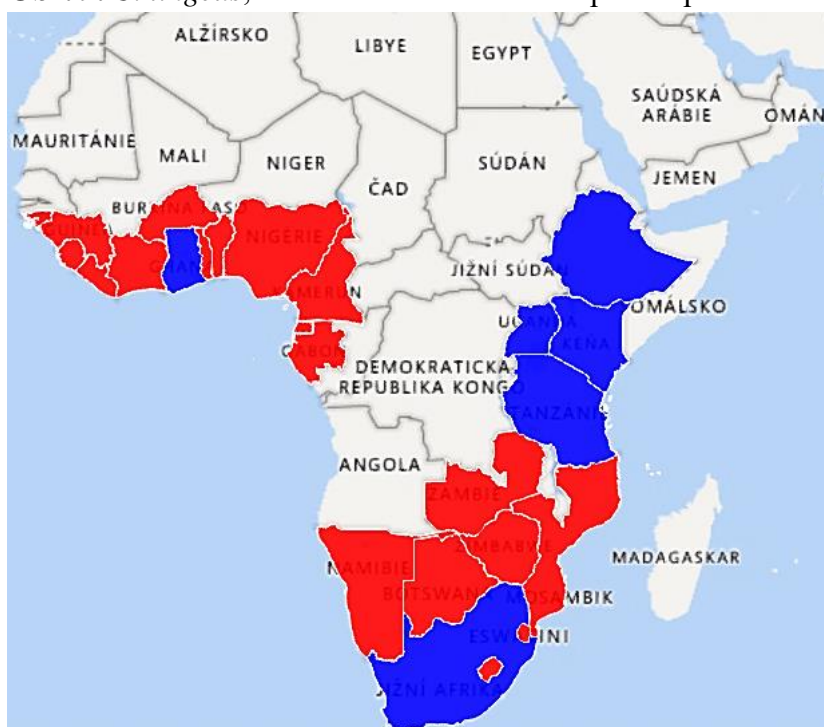
Druh, který je hojně rozšířený v jižní a západní Africe (Obr. 10) na vlhčích savanách, zalesněných stanovištích nebo v zahradách. Je velmi podobný druhu *C. virilis*, od kterého lze většinou rozlišit na základě znaků na rubu křídel (Williams 2018).



Obr. 8. *C. lingeus*, samec. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel (Williams 2018).



Obr. 9. *C. lingeus*, samice. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel (Williams 2018).



Obr. 10. Mapa rozšíření *C. lingeus*. Modře jsou vyznačeny státy, odkud pochází vzorky použité v této práci, červeně další země výskytu.

2.3.2 *Cacyreus virilis* (Aurivillius, 1924) – Obr. 11, 12

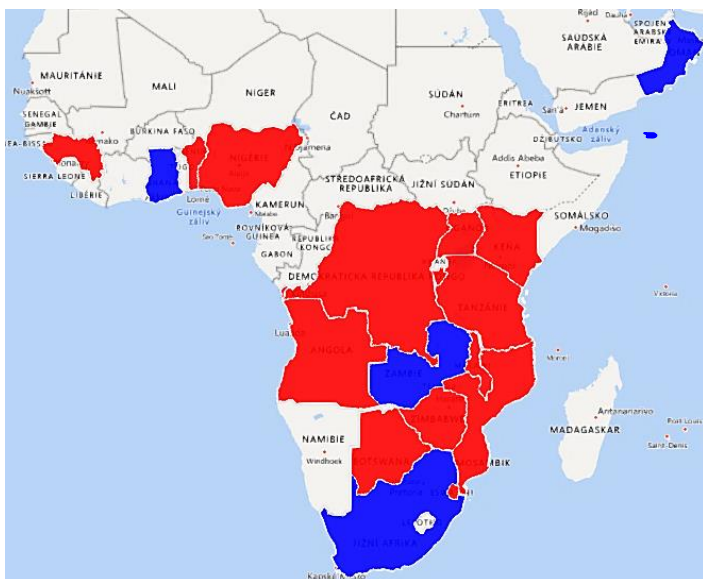
Jedná se o široce rozšířený druh na savanách a v částečně zalesněných oblastech v jižní a západní Africe s výskytem ještě na Arabském poloostrově v Ománu a na ostrově Sokotra (Obr. 13). Druh je velmi obtížně makroskopicky rozlišitelný od podobného *C. lingeus*. Při identifikaci může pomoci fakt, že je svoji biotopovou vazbou více vázán na sušší oblasti (Williams 2018). Jednoznačné rozlišení obou druhů je možné pomocí kopulačních orgánů.



Obr. 11. *C. virilis*, samec. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel (Williams 2018).



Obr. 12. *C. virilis*, samice. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel (Williams 2018).



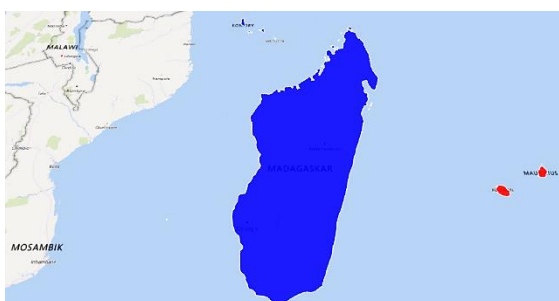
Obr. 13. Mapa rozšíření *C. virilis*. Modře jsou vyznačeny státy, odkud pochází vzorky použité v této práci, červeně další země výskytu.

2.3.3 *Cacyreus darius* (Mabille, 1877) – Obr. 14

Jedná se o ostrovní druh rozšířený na Madagaskaru, Komorských ostrovech, Réunionu a Mauriciu (Obr. 15) (Williams 2018).



Obr. 14. *C. darius*, samec. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel. Foto: autor



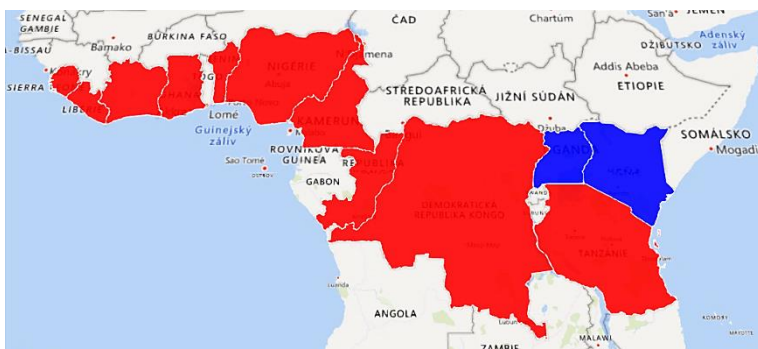
Obr. 15. Mapa rozšíření *C. darius*. Modře jsou vyznačeny státy, odkud pochází vzorky použité v této práci, červeně další země výskytu.

2.3.4 *Cacyreus audeoudi* (Stempffer, 1936) – Obr. 16

Jedná se o poměrný vzácný druh rozšířený ve střední Africe (Obr. 17) převážně v zalesněných oblastech a na vlhčích savanách (Williams 2018).



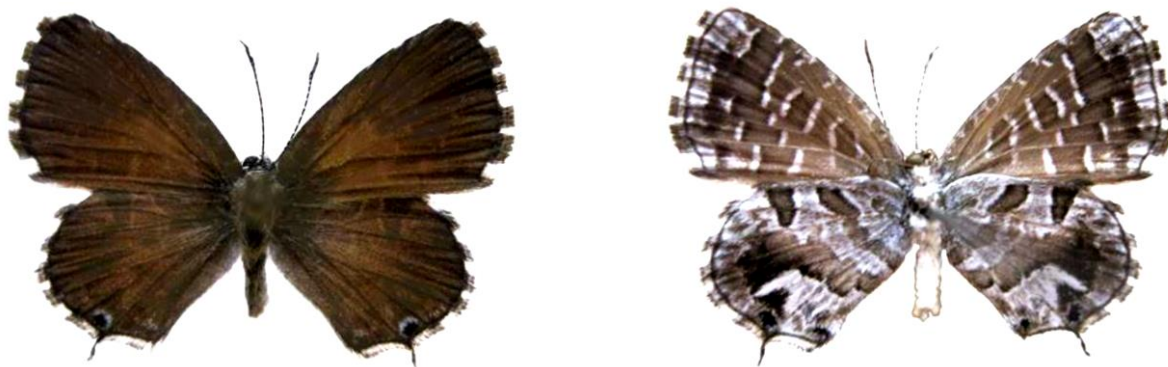
Obr. 16. *C. audeoudi*, samec. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel. Foto: autor



Obr. 17. Mapa rozšíření *C. audeoudi*. Modře jsou vyznačeny státy, odkud pochází vzorky použité v této práci, červeně další země výskytu.

2.3.5 *Cacyreus dicksoni* (Pennington, 1962) – Obr. 18, 19

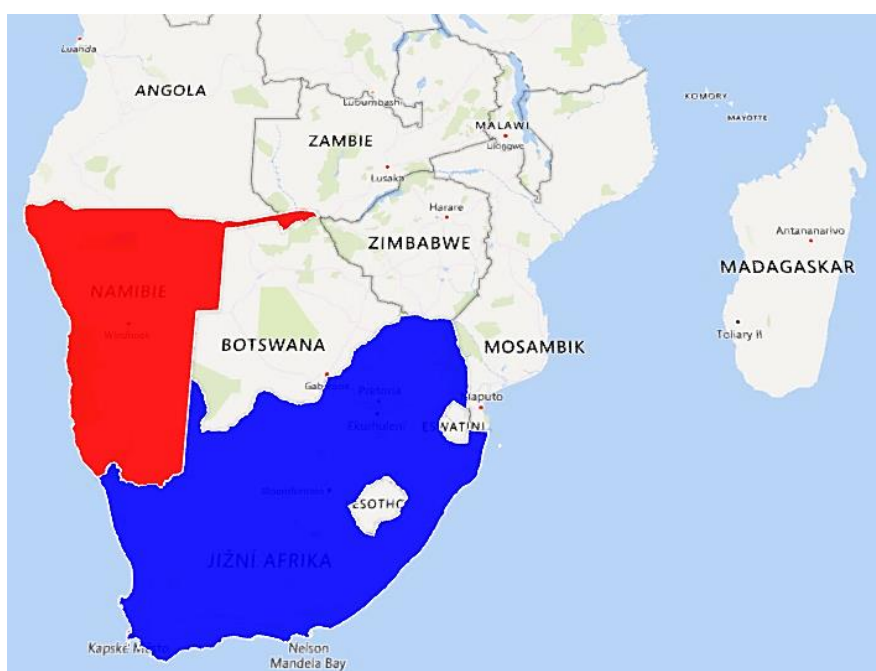
Druh je rozšířený pouze v jižní části Afriky (Obr. 20) a vyskytuje se na tamní specifické suchomilné vegetaci (fynbos a „succulent karoo“). Je velmi podobný druhu *C. marshalli*, od kterého se liší kovovým leskem na svrchu křídel a tmavšími okraji křídel (Williams 2018). Spolehlivě se dají rozlišit pouze pomocí kopulačních orgánů.



Obr. 18. *C. dicksoni*, samec. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel (Williams 2018).



Obr. 19. *C. dicksoni*, samice. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel (Williams 2018).



Obr. 20. Mapa rozšíření *C. dicksoni*. Modře je vyznačen stát, odkud pochází vzorky použité v této práci, červeně další země výskytu.

2.3.6 *Cacyreus palemon* (Stoll, 1782) – Obr. 21, 22

Pro název tohoto druhu se často nesprávně využívá synonymum *Cacyreus tespis* (Herbst, 1804) nebo *Cacyreus fracta* (Grünberg, 1911). Jde o druh, u něhož jsou popsány dvě formy, resp. jeden poddruh. První forma se nazývá *C. palemon* (Stoll, 1782) nebo také *C. palemon palemon* (Stoll, 1782), *C. tespis* (Herbst, 1804), *C. tespis tespis* (Herbst, 1804), *C. fracta* (Grünberg, 1911), *C. fracta fracta* (Grünberg, 1911) a *C. palemon* f. *fracta* (Grünberg, 1912). Rozšíření tohoto poddruhu by mělo být ve většině státech jižní Afriky (Obr. 25) (Williams 2018). V této práci bude pro tuto „základní formu“ využíván původní název *C. palemon palemon* (Stoll, 1782).



Obr. 21. *C. palemon palemon*, samec. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel. Foto: autor



Obr. 22. *C. palemon palemon*, samice. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel (Williams 2018).

2.3.7 *Cacyreus palemon ghimirra* (Talbot, 1935) – Obr. 23, 24

Za poddruh předcházejícího zástupce je považován *Cacyreus palemon ghimirra* (Talbot, 1935) nebo také nazývaný *C. tespis ghimirra* (Talbot, 1935) a *C. fracta ghimirra* (Talbot, 1935). Tento poddruh by se měl vyskytovat pouze v Etiopii (Williams 2018), ačkoliv z výsledků této práce vychází jeho rozšíření i v Keni a Malawi (Obr. 25). V této práci bude

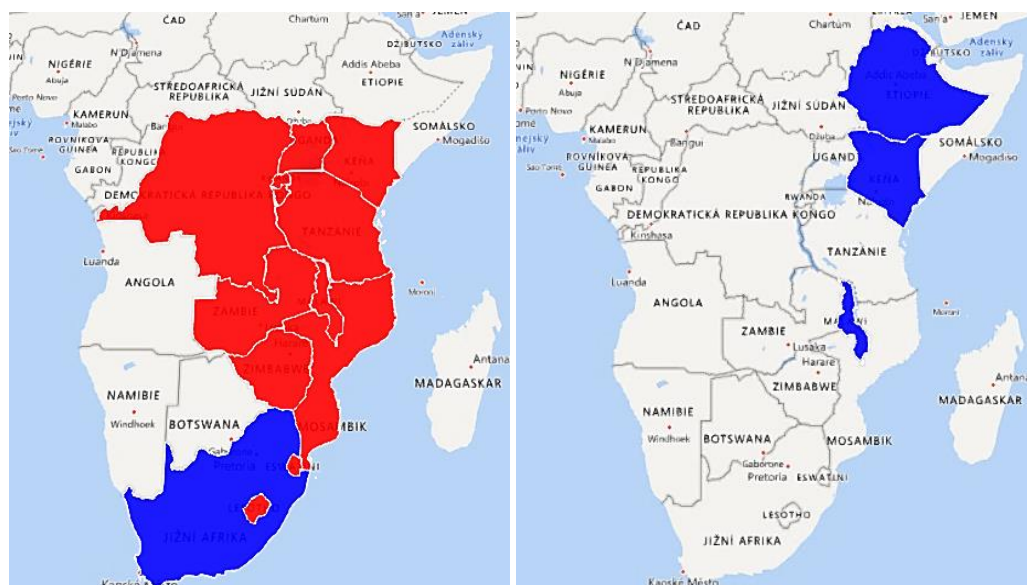
tento poddruh pojmenováván jako *C. palemon ghimirra* (Talbot, 1935). Odlišnost tohoto poddruhu od *C. palemon palemon* je pozorovatelná na kopulačních orgánech a kresbě křídel.



Obr. 23. *C. palemon ghimirra*, samec. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel. Foto: autor



Obr. 24. *C. palemon ghimirra*, samice. Vlevo svrchní a vpravo spodní strana křídel. Foto: autor



Obr. 25. Vlevo mapa rozšíření *C. palemon palemon* a vpravo *C. palemon ghimirra*. Modře jsou vyznačeny státy, odkud pochází vzorky použité v této práci, červeně další země výskytu (Williams 2018).

3 CÍLE PRÁCE

- vyizolovat DNA ze vzorků různých druhů rodů *Cacyreus* a *Harpencyreus* z odlišných převážně afrických zemí
- získat sekvence pro mitochondriální marker cytochrom oxidázy 1 (COI) a nukleární wingless (Wg) a elongační faktor 1 alfa (EF1 α)
- pomocí fylogenetických metod zjistit vzájemné vztahy jednotlivých druhů těchto dvou rodů na základě sekvencí výše zmíněných markerů
- vypracovat fylogeografickou analýzu u široce rozšířených druhů a zjistit původ druhu *C. marshalli* zavlečeného do Evropy v 90. letech 20. století
- srovnat výsledky fylogenetické analýzy s morfologickými rozdíly na kopulačních orgánech u jednotlivých druhů rodu *Cacyreus*

4 METODIKA

4.1 Materiál

Vzorky motýlů mně byly poskytnuty mým školitelem (Z. Faltýnkem Fricem), které shromažďoval během svých expedic různými převážně africkými státy. Značná část vzorků dále pochází od soukromých sběratelů (V. Hula, J. Morrall, V. Mráček, H. Selb, J. Šklíba) a dva vzorky byly použity z vlastních exemplářů *C. marshalli* z Řecka. Celkově jsem použil pro izolaci DNA 111 vzorků pocházejících z 15 států (Zambie, Jihoafrická republika, Keňa, Kongo, Uganda, Ghana, Etiopie, Malawi, Kamerun, Libérie, Madagaskar, Komorské ostrovy, Omán, Jemen (Sokotra) a Řecko). Jako „outgroups“ jsem použil modrásky *Lampides boeticus* (Linnaeus, 1767) a *Uranotauma falkensteini* (Dewitz, 1879), jež jsou zástupci rodů, které by měly být sesterské k rodu *Cacyreus* (cf. Stradomsky 2016, Chazot et al. 2019).

4.2 Izolace DNA

DNA jsem získával z nožiček suchých vzorků, přičemž pro její extrakci jsem použil kit Genomic DNA Mini Kit (Tissue) od firmy Geneaid a postupoval jsem dle nepatrně modifikovaného návodu výrobce. Do mikrozkuhavky Eppendorf (1,5 ml) jsem umístil dvě suché nožičky, které jsem homogenizoval pomocí mikropestle a následně zalil 200 µl GT pufru. K suspenzi jsem přidal 20-25 µl proteinázy K (dle stáří vzorku). Poté jsem směs zvortexoval, centrifugoval a ponechal v inkubátoru při teplotě 60 °C přes noc (cca 10 hod). Druhý den jsem ke směsi přidal 200 µl GBT pufru a vše nechal inkubovat při teplotě 60 °C další 2 hodiny s příležitostným protřepáním. Po uplynutí této doby jsem přidal 200 µl čistého ethanolu a poté vše důkladně promíchal a stočil na centrifuze. V následujícím kroku jsem kapalnou fázi z mikrozkuhovek opatrně odpipetoval a přenesl do připravených GD kolonek umístěných ve „sběrných trubičkách“ (Collection Tube). Poté jsem kolonky 2 minuty centrifugoval při výkonu 14000 otáček za minutu. Sběrné trubičky jsem nahradil novými a do GD kolonek jsem přidal 400 µl W1 pufru a následně vše centrifugoval po dobu 30 sekund. Kapaliny ze sběrných trubiček jsem vylil, do GD kolonek jsem napipetoval 600 µl Wash pufru a vše jsem opět centrifugoval, nejprve 30 sekund a po následném vylití kapaliny další 2 minuty. Poté jsem GD kolonky umístil do připravených mikrozkuhovek Eppendorf. Dvnitř kolonky jsem napipetoval 80 µl Ellution pufru předehřátého na 60 °C. V posledním kroku jsem kolonky umístěné v mikrozkuhovkách 30 sekund centrifugoval, přičemž na dně Eppendorfek by měla zůstat v roztoku přečištěná DNA.

4.3 PCR

Získanou DNA jsem amplifikoval pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce) pro mitochondriální gen cytochrom oxidázy I (COI) a dva nukleární markery wingless (Wg) a elongační faktor 1 alfa (EF1 α). Pro dané geny jsem použil běžně využívané primery pro motýly, které zmiňuje např. Wahlberg & Wheat (2008). Pro první část markeru COI (COIa) jsem použil primer HybLCO-HybHCO a v případě negativního výsledku primer HybRon-HybHCO, který poskytuje ale kratší nukleotidovou sekvenci. Pro jaderný gen wingless jsem použil primer HybLepWG1-HybLepWG2 a pro první část elongačního faktoru 1 alfa primer HybStarsky-HybMonicaR. Všechny primery jsou shrnuty v Tabulce 1. PCR reakční směs byla tvořena 4 μ l dH₂O, 6,25 μ l PPP Mastermixu (Bioline 2x MyTaq HS Red Mix), 0,625 μ l „forward“ primeru, 0,625 μ l „reverse“ primeru a 1 μ l DNA extraktu. Celkově tedy PCR reakce probíhala v objemu 12,5 μ l.

Po několika testech jsem jako nejvhodnější program pro amplifikaci genu COI a wingless vyhodnotil následující:

94 °C 5 min.

35 cyklů

92 °C 1 min. - denaturace

52 °C 1 min. - nasedání primeru

72 °C 1 min. - prodlužování

72 °C 5 min. - závěrečné prodloužení

Pro gen EF1 α jsem použil následující program:

95 °C 5 min.

40 cyklů

94 °C 30 s. - denaturace

55 °C 30 s. - nasedání primeru

72 °C 90 s. - prodlužování

72 °C 10 min. - závěrečné prodloužení

Tabulka 1. Použité primery.

GEN	ČÁST	TYP	NÁZEV	SEKVENCE
COI	1	F	HybLCO	5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'
	1	R	HybHCO	5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA 3'
	1	F	HybRon	5'GGAGCYCCWGATATAGCTTTCCC 3'
	1	R	HybHCO	5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA 3'
WG	1	F	HybLepWG1	5'GGARTGYAARTGYCAYGGYATGTCTGG 3'
	1	R	HybLepWG2	5'ACTICGCARCACCARTGGAATGTRCA 3'
EF1 α	1	F	HybStarsky	5'ACATYAACATTGTCGTSATYGG 3'
	1	R	HybMonicaR	5'CATRTTGTCCKCCGTGCCARCC 3'

4.4 Elektroforéza

Ověření úspěšného průběhu PCR reakce jsem prováděl pomocí elektroforézy na zhruba 1,5% agarózovém gelu, který jsem připravoval povařením 1,5 g agarózy ve zhruba 100 ml TAE pufru v mikrovlnné troubě po dobu cca 3 minut. Po rozpuštění agarózy jsem do roztoku přidal 1 μ l fluorescenčního barviva GelRed. Namíchaný gel jsem nalil do elektroforetické vany s hřebínky a nechal zhruba 30 minut tuhnout. Následně jsem vždy do první dírky v gelu nanесl 2 μ l tzv. ladderu a do ostatních dírek napipetoval po 2 μ l PCR produktu. Po několika testech jsem jako optimální podmínky pro průběh elektroforézy vyhodnotil 120 V po dobu 35 minut.

4.5 Přečištění PCR produktů a sekvenace

Do každé z 96 jamek destičky jsem napipetoval 2 μ l směsi enzymů (FastAP a Exo I smíchané v poměru 135 μ l ku 85 μ l). Na základě výsledků elektroforézy jsem vybral vzorky, u kterých PCR reakce proběhla úspěšně a jejich PCR produkty jsem nanесl do jednotlivých jamek s enzymy. Enzymatické přečištění bylo dokončeno v thermal cycleru při nastaveném programu 37 °C po dobu 40 minut a poté 85 °C po dobu 15 minut.

Destičky jsem následně poslal k sekvenaci do firmy Macrogen (<http://www.macrogen.com/en/main/index.php>).

4.6 Analýzy

4.6.1 Alignování sekvencí

Získané sekvence jsem alignoval v programu Geneious Prime verze 2019.0.4. Sekvence jsem jednotlivě zkontroloval, začátky a konce zkrátil a některé ručně modifikoval, pokud se jednalo o zjevné chyby při sekvenaci.

4.6.2 Substituční modely

Pro nalezení vhodného substitučního modelu nukleotidů jsem použil program PartitionFinder v.1.1.1 (Lanfear et al. 2012). Tento program testuje vhodnost rozštěpení připraveného datasetu sekvencí, k čemuž přiřadí nejvhodnější substituční model na základě nejnižšího tzv. Bayesiánského informačního kritéria (BIC). Jako základ pro rozštěpení datasetu jsem použil partice dle jednotlivých genů a jednotlivých pozic nukleotidů v genech.

4.6.3 Bayesovská analýza

Pro rekonstrukci fylogenetického stromu touto metodou jsem využil program MrBayes v.3.2 (Ronquist et al. 2012). Při výpočtu jsem použil 4 běhy o 4 řetězcích na 5 000 000 generací

při samplingu 1000 a teplotě 0.2. Pro výpočet konsenzuálního stromu jsem prvních 20 % výpočtů vyřadil jako tzv. „burnin“. Dataset jsem rozdělil podle výsledků z PartitionFinder.

4.6.4 Maximum Likelihood

Fylogenetický strom jsem rovněž rekonstruoval metodou Maximum Likelihood pomocí programu IQTree 1.6.10 (Nguyen et al. 2015) s 1000 náhodným resamplingem dat (tzv. „bootstraps“).

4.6.5 BEAST – datování

Pro datování vzniku jednotlivých větví fylogenetického stromu jsem použil program BEAST v.1.8.4 (Drummond et al. 2012). Vzhledem k absenci detailní fylogeneze modrásků jsem použil pouze jediný sekundární kalibrační bod, vycházející z Chazot et al. (2019), nastavený na 11,51 Mya (SD=1.5) pro oddělení předka *Cacyreus* od „outgroupů“. Použil jsem 50 000 000 generací a analýzu jsem třikrát zopakoval. Výsledky jsem porovnal v programu Tracer v.1.7.1 (Rambaut et al. 2018) a z každého běhu jsem prvních 20 % vyřadil jako „burnin“ a zbytek jsem sloučil dohromady pomocí programu LogCombiner v.1.8.4 (Drummond et al. 2012). Nejlepší strom jsem vybral podle Maximum tree credibility pomocí programu TreeAnnotator v.1.8.4 (Drummond et al. 2012). Pro odhad chronogramu jsem použil rozvolněný logaritmický model hodin a konstantní koalescentní model.

4.6.5 Haplotypové sítě

Pro zkonstruování haplotypových sítí jsem použil program TCS v.1.21 (Clement et al. 2000), který pracuje na principu statistické parsimonie. Síť jsem následně upravil v programu TCS Beautifier (Santos et al. 2016).

4.7 Disekce kopulačních orgánů

Pro vyjmutí sklerotizovaných kopulačních orgánů jsem nejprve povařil část zadečků v roztoku 10% KOH po dobu zhruba 10 minut a následně jsem odstranil měkké tkáně. Vypreparované pohlavní orgány jsem poté uložil do glycerolu.

5 VÝSLEDKY

5.1 Použité vzorky, úspěšnost PCR a sekvenace

Celkově jsem použil 102 vzorků z rodu *Cacyreus* a 9 vzorků z rodu *Harpencyreus*, přičemž se mi podařilo izolovat DNA u 76 vzorků rodu *Cacyreus* a u 6 vzorků rodu *Harpencyreus*.

Pro první část mitochondriálního genu cytochrom oxidázy (COI) se mi podařilo získat vhodné sekvence u 73 vzorků rodu *Cacyreus*, z toho je 10 exemplářů *C. marshalli*, 4 exempláře *C. dicksoni*, 1 exemplář *C. palemon palemon*, 6 exemplářů *C. palemon ghimirra*, 3 exempláře *C. audeoudi*, 17 exemplářů *C. virilis*, 23 exemplářů *C. lingeus* a 9 exemplářů *C. darius*. Pro rod *Harpencyreus* jsem pro gen COI mtDNA získal sekvence 3 jedinců *H. marungensis* a 2 jedinců *H. aequatorialis*. Pro analýzu jsem dále použil sekvence z databáze NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), konkrétně 21 sekvencí druhu *C. marshalli*, 5 sekvencí *C. darius*, 1 sekvenci *C. virilis* a 1 sekvenci *C. lingeus*.

Dále se mi podařilo získat vhodné sekvence pro nukleární gen wingless (Wg) u 40 vzorků rodu *Cacyreus* a u žádného jedince z rodu *Harpencyreus*. Pro gen elongačního faktoru 1 alfa (EF1 α) jsem získal vhodné sekvence u 61 vzorků rodu *Cacyreus* a u 3 z rodu *Harpencyreus*. Vzorky, u kterých byly získány použitelné sekvence jednotlivých markerů, jsou v příloze 3. Bohužel u 28 vzorků se mi nepodařilo amplifikovat DNA pro žádný marker, proto tyto vzorky nejsou zahrnuty ve fylogenetických ani fylogeografických analýzách, ale některé z nich jsem použil v kapitole 5.7 zabývající se taxonomií na základě kopulačních orgánů.

5.2 Substituční modely

Celkově jsem získal 9 možných oddílů (tři pro COI, tři pro Wg a tři pro EF1 α). Substituční schéma jsem následně komprimoval do sedmi substitučních modelů (Tabulka 2).

Tabulka 2. Substituční modely.

SUBSET	BEST MODEL	# SITES	PARTITION NAMES
1	HKY+G	496	coi_1a_pos1
2	TRN+G	496	coi_1a_pos2
3	F81	495	coi_1a_pos3
4	K81UF	138	wingl_pos1
5	F81+G	550	wingl_pos2, ef1a_pos2
6	JC+G	550	ef1a_pos3, wingl_pos3
7	HKY+G	414	ef1a_pos1

5.3 Fylogenetické stromy

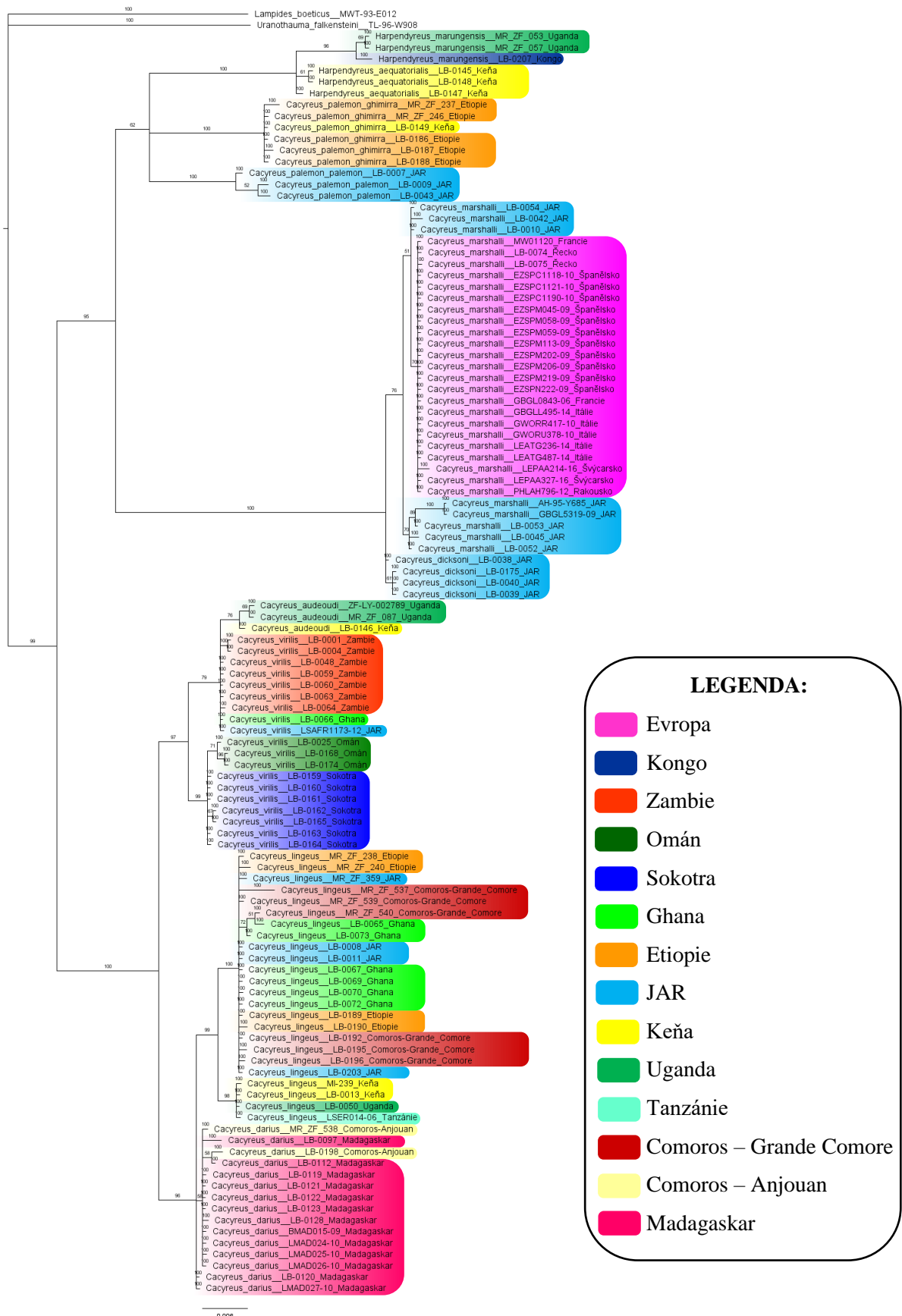
Na základě fylogenetických stromů rekonstruovaných pomocí Bayesovské analýzy (Obr. 26) a metody Maximum Likelihood (Obr. 27) se rod *Cacyreus* rozděluje do dvou hlavních větví.

Jedna větev zahrnuje druhy *C. palemon ghimirra*, *C. palemon palemon*, *C. marshalli* a *C. dicksoni*. V této větvi se dále objevuje rod *Harpendyreus* jako sesterská skupina druhů *C. palemon palemon* a *C. palemon ghimirra*. Analýzy dále ukázaly, že *C. marshalli* vyskytující se v Evropě patří do stejné větve jako vzorky z Jihoafrické republiky. Druh *C. dicksoni* je dle Bayesovské analýzy sesterskou skupinou a dle metody Maximum Likelihood parafyletickým taxonem druhu *C. marshalli*.

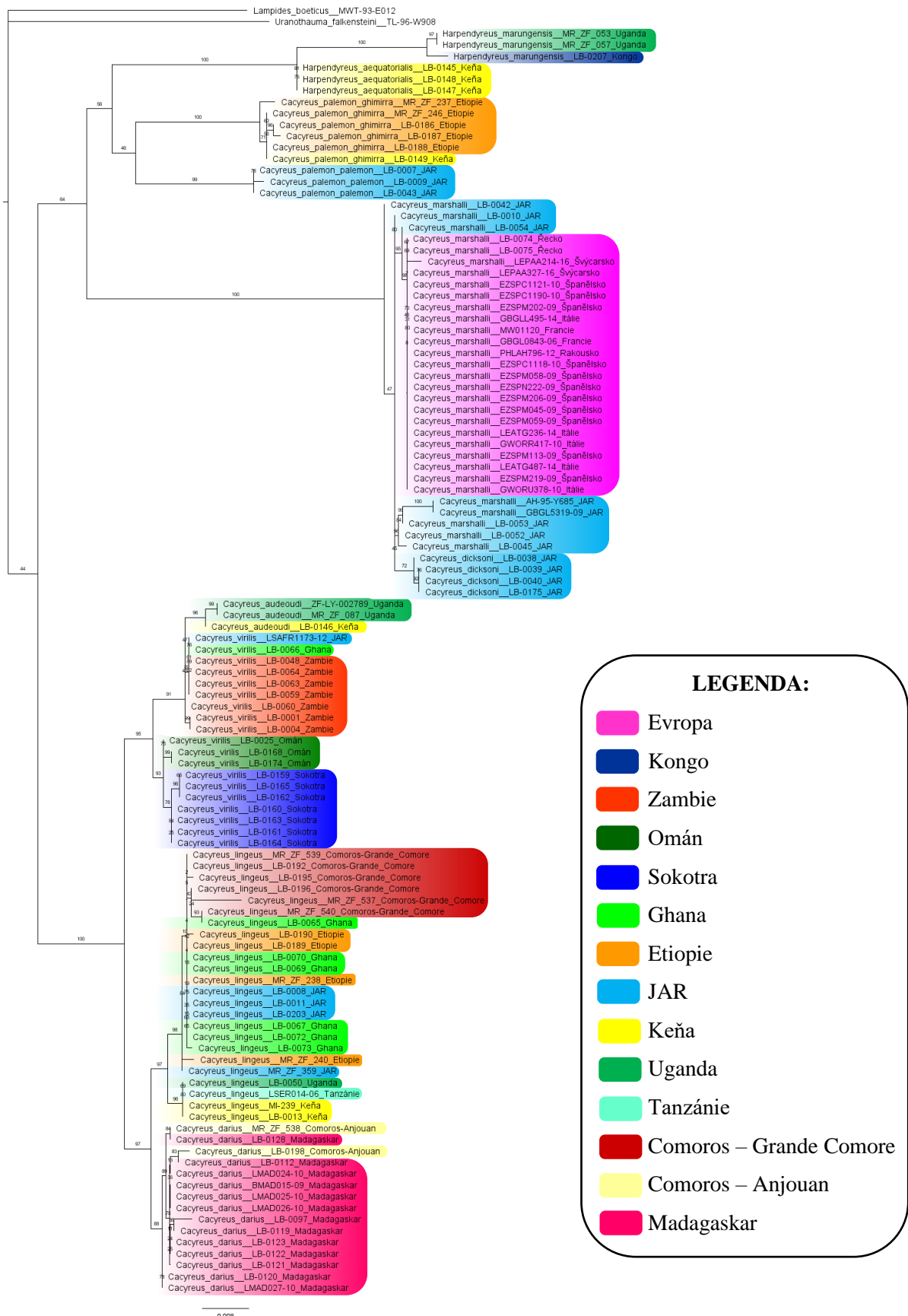
Do druhé větve se řadí *C. audeoudi*, *C. virilis*, *C. lingeus* a *C. darius*. Z kladogramů (Obr. 26 a 27) je patrné, že druh *C. virilis* vytváří dvě podskupiny. První se vyskytuje mimo Afriku (na ostrově Sokotra a v Ománu) a druhá v pevninské části Afriky. S pevninskou populací *C. virilis* je parafyletický druh *C. audeoudi*. Druhy *C. lingeus* a *C. darius* jsou sesterskými monofyletickými skupinami. *C. lingeus* se dále dělí do dvou větví, zástupci jedné větve se vyskytují v Keni, Ugandě a Tanzánii, zatímco druhou větev tvoří nálezy z Ghany, Etiopie, Jihoafrické republiky a z ostrova Grande Comore (nejzápadnější z Komorských ostrovů). *C. darius* se na základě použitých vzorků vyskytuje na Madagaskaru a na Komorských ostrovech pouze na ostrově Anjouan.

5.4 Molekulární datování

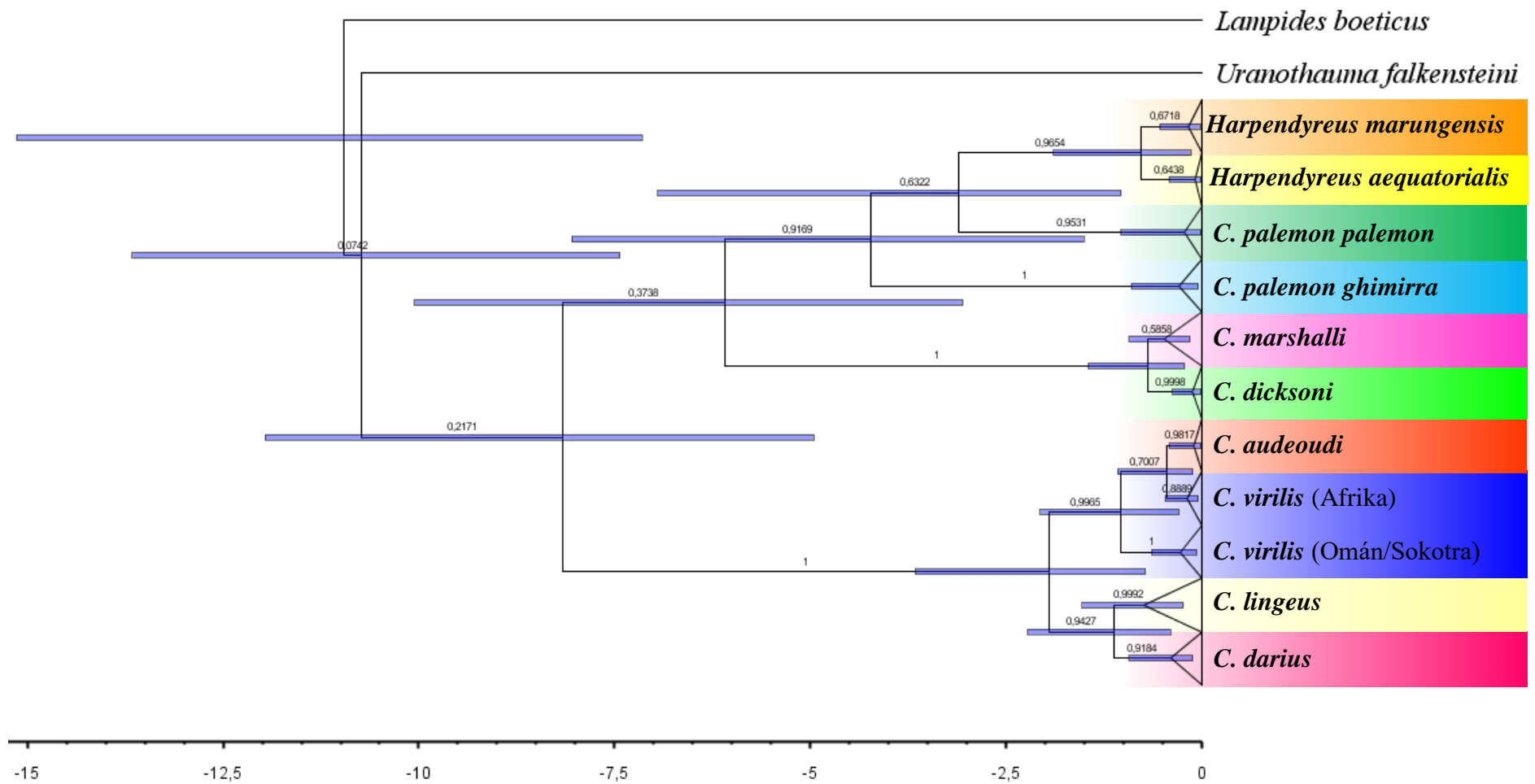
Vzhledem k omezené znalosti fylogeneze modrásků bylo obtížné stanovit dostatek kalibračních bodů, proto je potřeba výsledky molekulárního datování (Obr. 28) brát pouze orientačně. Nicméně z výsledků vyplývá, že rod *Cacyreus* se rozdělil do dvou větví před zhruba 8,2 miliony let. První větev se před cca 6,1 miliony let rozdělila na skupinu obsahující *C. marshalli* a *C. dicksoni* a skupinu zahrnující druh *C. palemon* a dle použitých vzorků i rod *Harpendyreus*. *C. palemon* se dále rozdělil na *C. palemon palemon* a *C. palemon ghimirra* před zhruba 4,3 miliony let. Diferenciace *C. marshalli* a *C. dicksoni* se odehrála poměrně nedávno, přibližně před 0,75 miliony let. Druhá větev byla dlouhou dobu kompaktní a k její diverzifikaci došlo před zhruba 2 miliony let. Jednou populací byl *C. virilis* vyskytující se v Africe, ze kterého se před cca 1,1 milionem let diferencoval *C. virilis* vyskytující se v Ománu a na ostrově Sokotra. Od původní africké populace *C. virilis* se před zhruba 0,5 milionem let odštěpil *C. audeoudi*. Druhou vzniklou skupinou byl předek *C. lingeus* a *C. darius*, ze kterého tyto monofyletické taxony vznikly před přibližně 1,2 milionem let.



Obr. 26. Fylogeneze rodu *Cacyreus* a *Harpendyreus* rekonstruovaná metódou Bayesovské inference (MrBayes 3.2) a založená na mitochondriálném genu COI a nukleárních markerech Wg a EF1 α . Čísła větví určují jejich podporu.



Obr. 27. Fylogeneze rodu *Cacyreus* a *Harpendyreus* rekonstruovaná metódou Maximum Likelihood založená na mitochondriálnom genu COI a nukleárných markeroch Wg a EF1 α a počítaná v programe IQTree. Čísla vetví určujú jejich podporu.



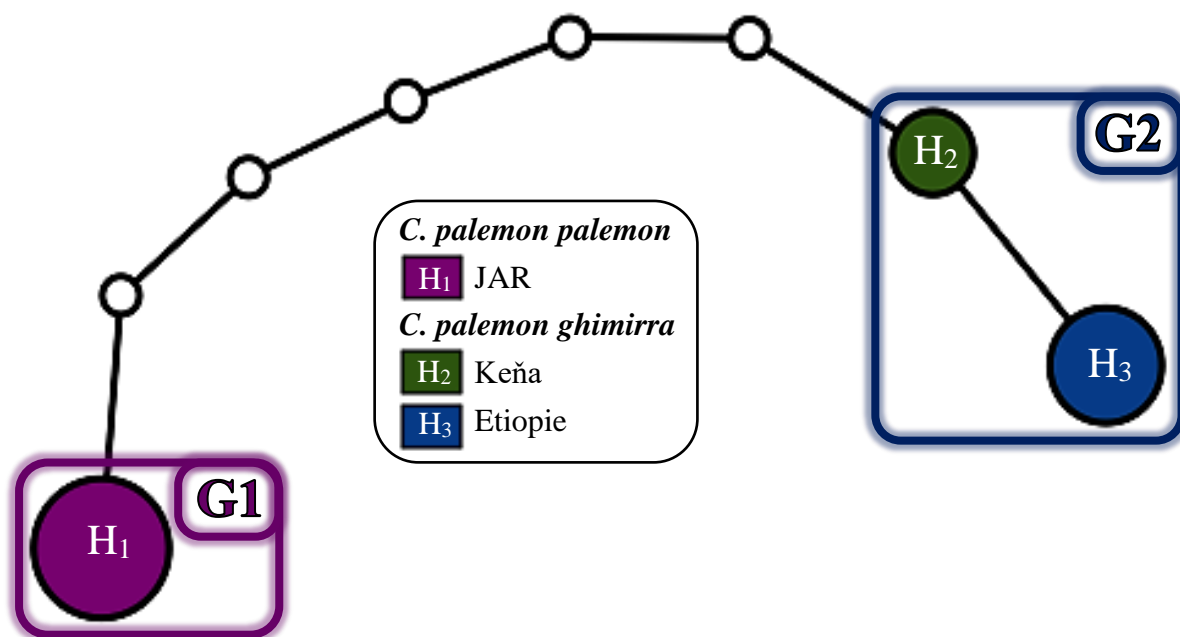
Obr. 28. Chronogram fylogenetických událostí rodu *Cacyreus* a *Harpendyreus* založený na mitochondriálním genu COI a nukleárních markerech Wg a EF1 α počítaný v programu BEAST. Modré úsečky udávají 95% HPD interval a osa pod chronogramem stáří v milionech let. Čísla větvi určují jejich podporu.

5.6 Haplotypové sítě

Pro *C. palemon palemon* a *C. palemon ghimirra* jsem neměl k dispozici dostatek vhodných sekvencí mitochondriálního genu, a proto jsem haplotypovou síť těchto poddruhů vytvořil na základě sekvencí nukleárního genu EF1 α . Pro druhy *C. marshalli*, *C. dicksoni* a pro zástupce skupiny „lingeus“ (*C. audeoudi*, *virilis*, *lingeus* a *darius*) jsem zkonstruoval haplotypové sítě na základě sekvencí mitochondriálního genu COI. Celkově jsem pro jednotlivé druhy rodu *Cacyreus* zjistil 23 haplotypů tvořících 10 haplotypových skupin.

5.6.1 Haplotypová síť *C. palemon*

Haplotypovou síť druhu *C. palemon* (Obr. 29) jsem vytvořil na základě sekvencí nukleárního genu EF1 α o délce 428 pb od 3 zástupců *C. palemon palemon* a 3 exemplářů *C. palemon ghimirra*. Z výsledků vyplývá, že *C. palemon palemon* je v Jihoafrické republice zastoupen haplotypem H₁ tvořícím samostatnou haplotypovou skupinu G1, která je geneticky značně odlišná od haplotypové skupiny G2, jenž zahrnuje dva haplotypy (H₂ a H₃) poddruhu *C. palemon ghimirra*. Tato zjištění koreluje s rozložením větví v kladogramech.

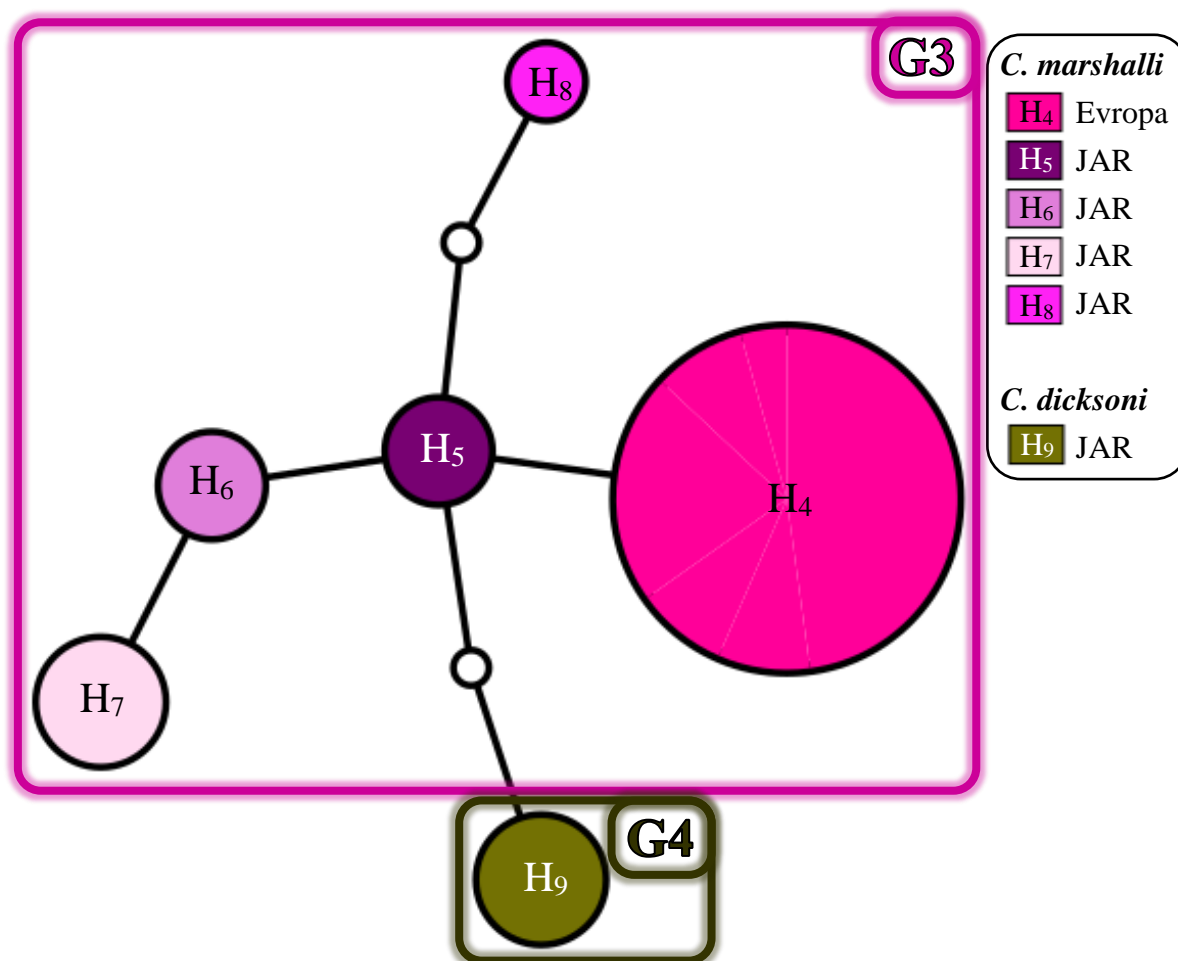


Obr. 29. Haplotypová síť *C. palemon palemon* a *C. palemon ghimirra* rekonstruovaná na základě nukleárního genu EF1 α s označením haplotypů (H) a barevně zarámovanými haplotypovými skupinami (G). Malé černě ohraničené kružky na spojnicích mezi jednotlivými haplotypy znázorňují samostatné mutace, které musely proběhnout při jejich diferenciaci.

5.6.2 Haplotypová síť *C. marshalli* a *C. dicksoni*

Pro rekonstrukci haplotypové sítě jsem použil 31 sekvencí *C. marshalli* a 3 sekvence *C. dicksoni* mitochondriálního genu COI o délce 406 pb. V celé Evropě vytváří *C. marshalli* patrně pouze jeden haplotyp (H₄), zatímco v Jihoafrické republice se jedná o čtyři různé haplotypy (H₅-H₈). Z obrázku 30 je patrné, že celá Evropská populace pochází z haplotypu H₅ z Jihoafrické republiky, což potvrzuje hypotézu o jeho zavléčení do Evropy. Všechny haplotypy *C. marshalli* dohromady tvoří jednu haplotypovou skupinu G3 (Obr. 30).

C. dicksoni vytváří v Jihoafrické republice minimálně jeden haplotyp (H₉), který se velmi podobá haplotypům *C. marshalli*, což potvrzuje vzájemné parafyletické postavení těchto taxonů v kladogramu (Obr. 27). Jelikož se jedná o samostatný druh, řadím jeho haplotyp do samostatné haplotypové skupiny G4.

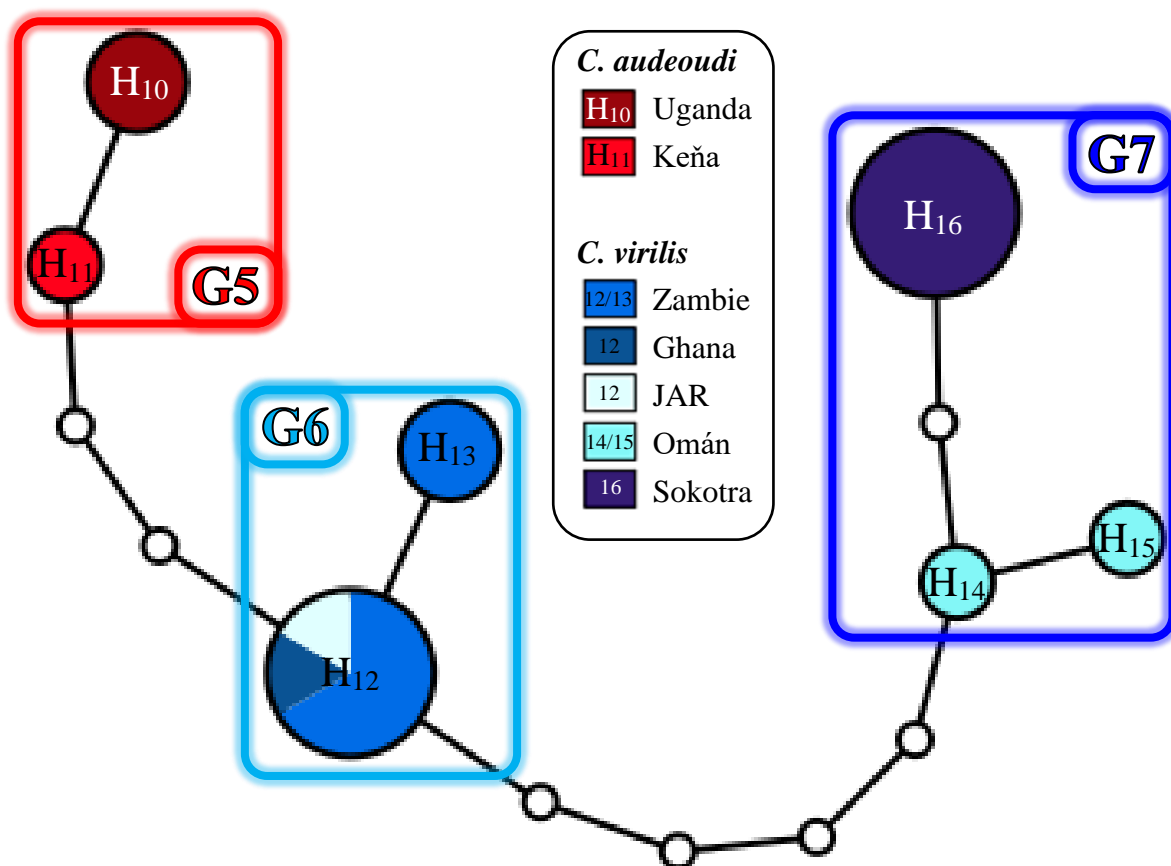


Obr. 30. Haplotypová síť druhů *C. marshalli* a *C. dicksoni* rekonstruovaná na základě mitochondriálního genu COI s označením haplotypů (H) a barevně zarámovanými haplotypovými skupinami (G). Malé černě ohraničené kroužky na spojnících mezi jednotlivými haplotypy znázorňují samostatné mutace, které musely proběhnout při jejich diferenciaci.

5.6.3 Haplotypová síť *C. audeoudi* a *C. virilis*

Pro druh *C. audeoudi* jsem měl k dispozici pouze 3 sekvence mitochondriálního genu COI o délce 414 pb, ale i na základě těchto vzorků lze konstatovat, že tento druh vytváří dva haplotypy, jeden s výskytem v Ugandě (H₁₀) a druhý v Keni (H₁₁). Tyto haplotypy sdružují do haplotypové skupiny G5 (Obr. 31).

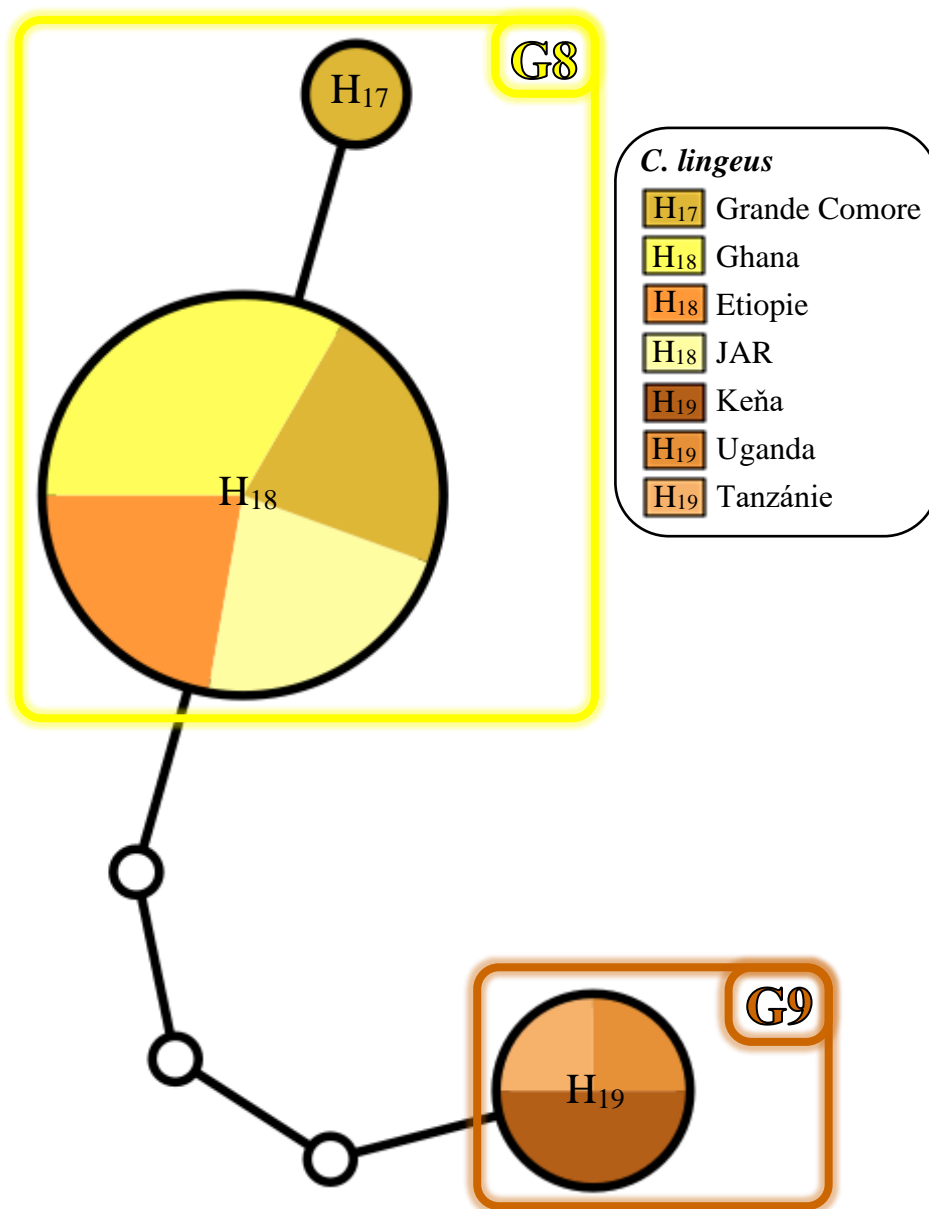
Pro zkonstruování haplotypové sítě *C. virilis* jsem použil 16 sekvencí genu COI o délce 414 pb. Tento druh vytváří 5 haplotypů (H₁₂-H₁₆), které náleží dvěma haplotypovým skupinám. Široce rozšířený haplotyp H₁₂ se vyskytuje v Zambii, Ghaně a Jihoafrické republice a patří do haplotypové skupiny G6 spolu s haplotypem H₁₃, který se rovněž vyskytuje v Zambii. V Ománu se vyskytují dva haplotypy (H₁₄ a H₁₅), které společně s haplotypem H₁₆ vyskytujícím se na ostrově Sokotra tvoří haplotypovou skupinu G7 (Obr. 31). Tato haplotypová rozdělení přesně odpovídají jednotlivým větvím fylogenetického stromu.



Obr. 31. Haplotypová síť druhů *C. audeoudi* a *C. virilis* rekonstruovaná na základě mitochondriálního genu COI s označením haplotypů (H) a barevně zarámovanými haplotypovými skupinami (G). Malé černě ohraničené kroužky na spojnicích mezi jednotlivými haplotypy znázorňují samostatné mutace, které musely proběhnout při jejich diferenciaci.

5.6.4 Haplotypová síť *C. lingeus*

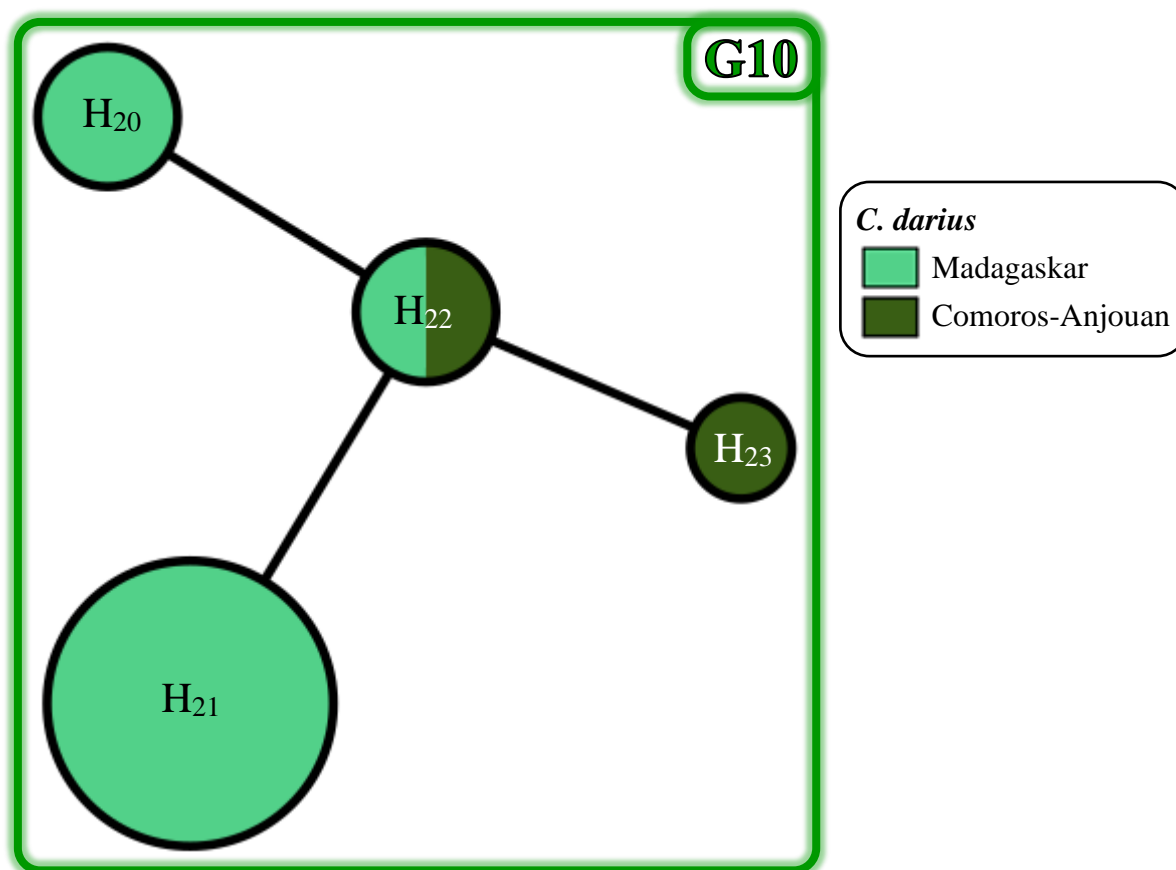
Haplotypovou síť jsem vytvořil na základě 23 sekvencí mitochondriálního genu COI o délce 354 pb. Z výsledků vyplývá, že tento druh tvoří 3 haplotypy (H₁₇-H₁₉) sdružující se do dvou haplotypových skupin. Široce rozšířený haplotyp H₁₈ se vyskytuje v Etiopii, Ghaně, Jihoafrické republice a na ostrově Grande Comore, kde se rovněž objevuje i haplotyp H₁₇ náležející do stejné haplotypové skupiny G8. Haplotyp H₁₉ se vyskytuje v Keni, Ugandě a Tanzánii a vytváří vlastní haplotypovou skupinu G9 (Obr. 32).



Obr. 32. Haplotypová síť druhu *C. lingeus* rekonstruovaná na základě mitochondriálního genu COI s označením haplotypů (H) a barevně zarámovanými haplotypovými skupinami (G). Malé černě ohraničené kroužky na spojnicích mezi jednotlivými haplotypy znázorňují samostatné mutace, které musely proběhnout při jejich diferenciaci.

5.6.5 Haplotypová síť *C. darius*

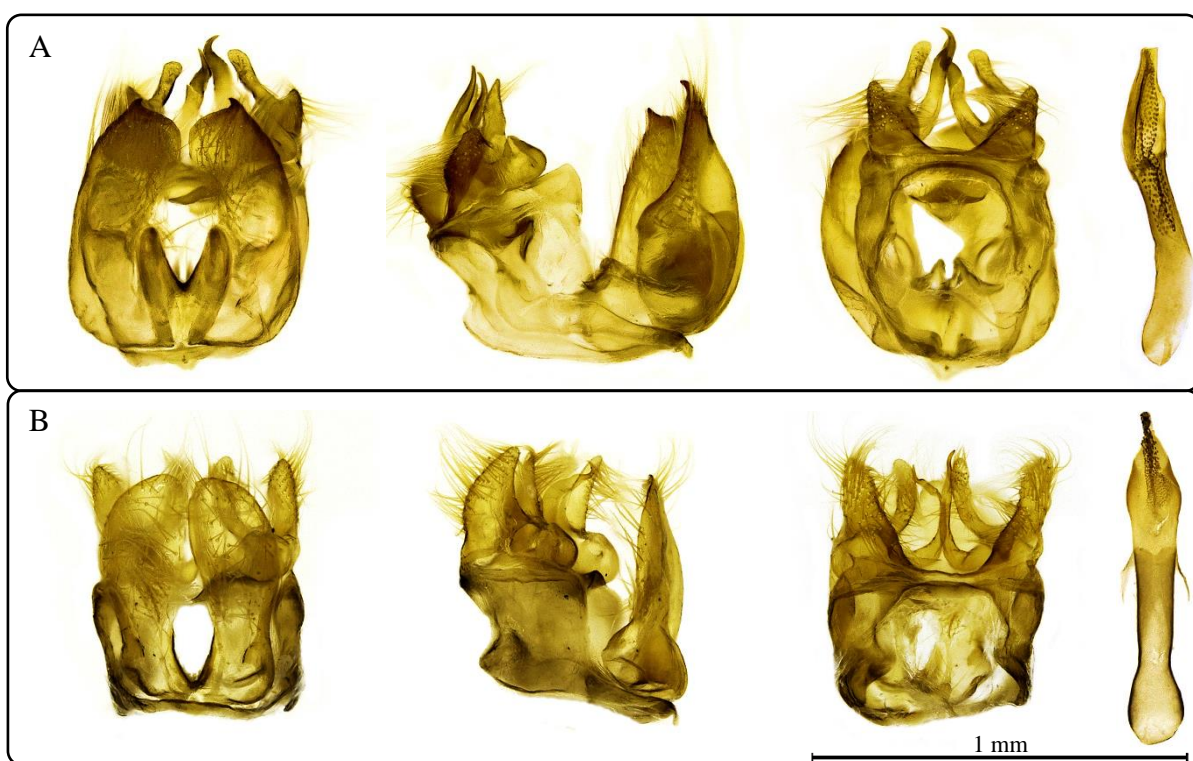
Haplotypovou síť jsem zkonstruoval na základě 14 sekvencí mitochondriálního genu COI o délce 522 pb. Z obrázku 33 je patrné, že *C. darius* vytváří 4 haplotypy (H₂₀-H₂₃), které dohromady tvoří jednu haplotypovou skupinu G10. Haplotypy H₂₀ a H₂₁ se objevují pouze na Madagaskaru. Na Madagaskaru a zároveň na Komorských ostrovech, konkrétně na ostrově Anjouan, se vyskytuje společný haplotyp H₂₂, který potvrzuje, že historicky muselo dojít k rozšíření *C. darius* z jednoho z těchto ostrovů. Na Anjouanu se objevuje ještě samostatný haplotyp H₂₃.



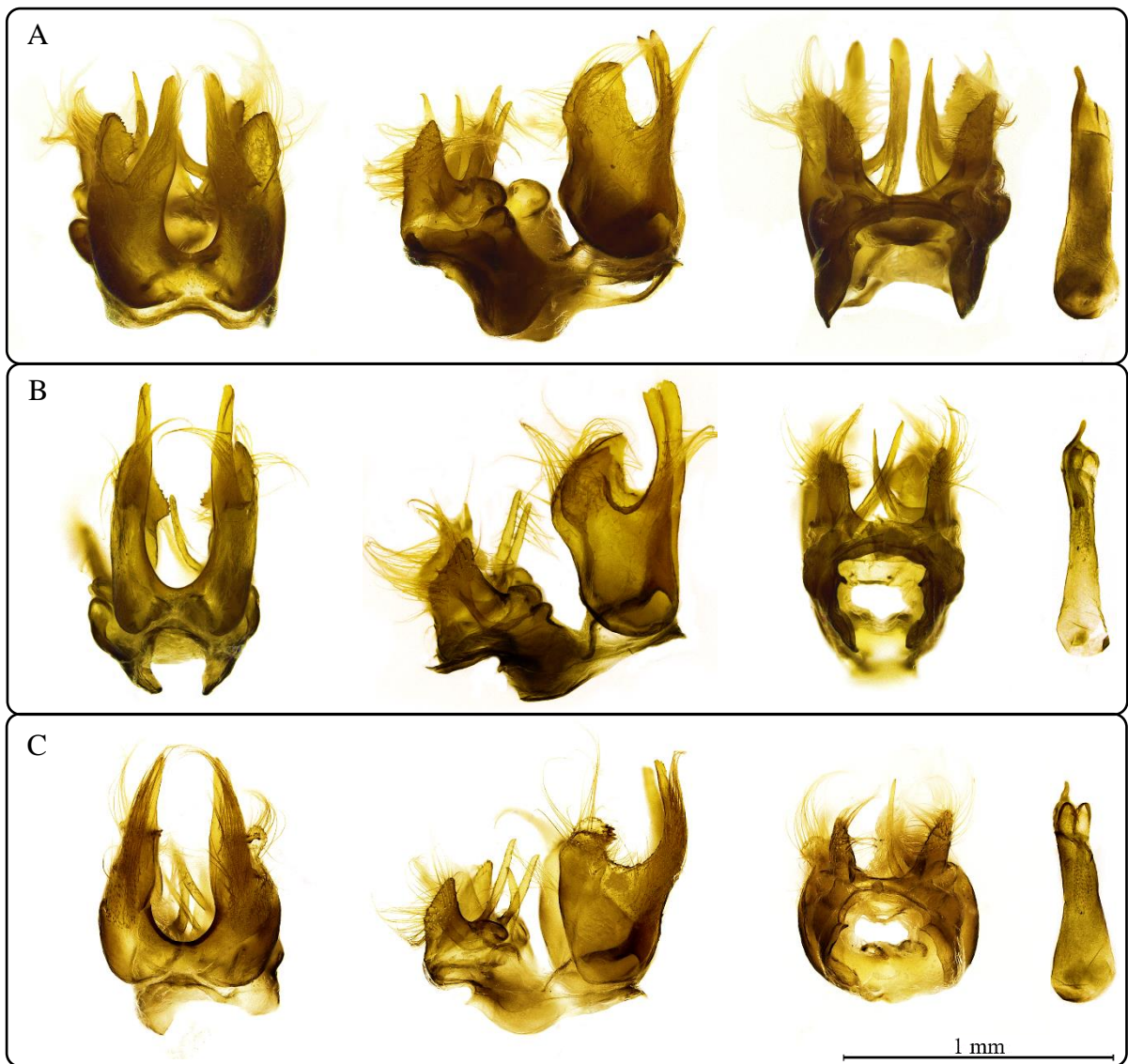
Obr. 33. Haplotypová síť druhu *C. darius* rekonstruovaná na základě mitochondriálního genu COI s označením haplotypů (H) a barevně zarámovanou haplotypovou skupinou (G).

5.7 Taxonomie založená na morfologii kopulačních orgánů

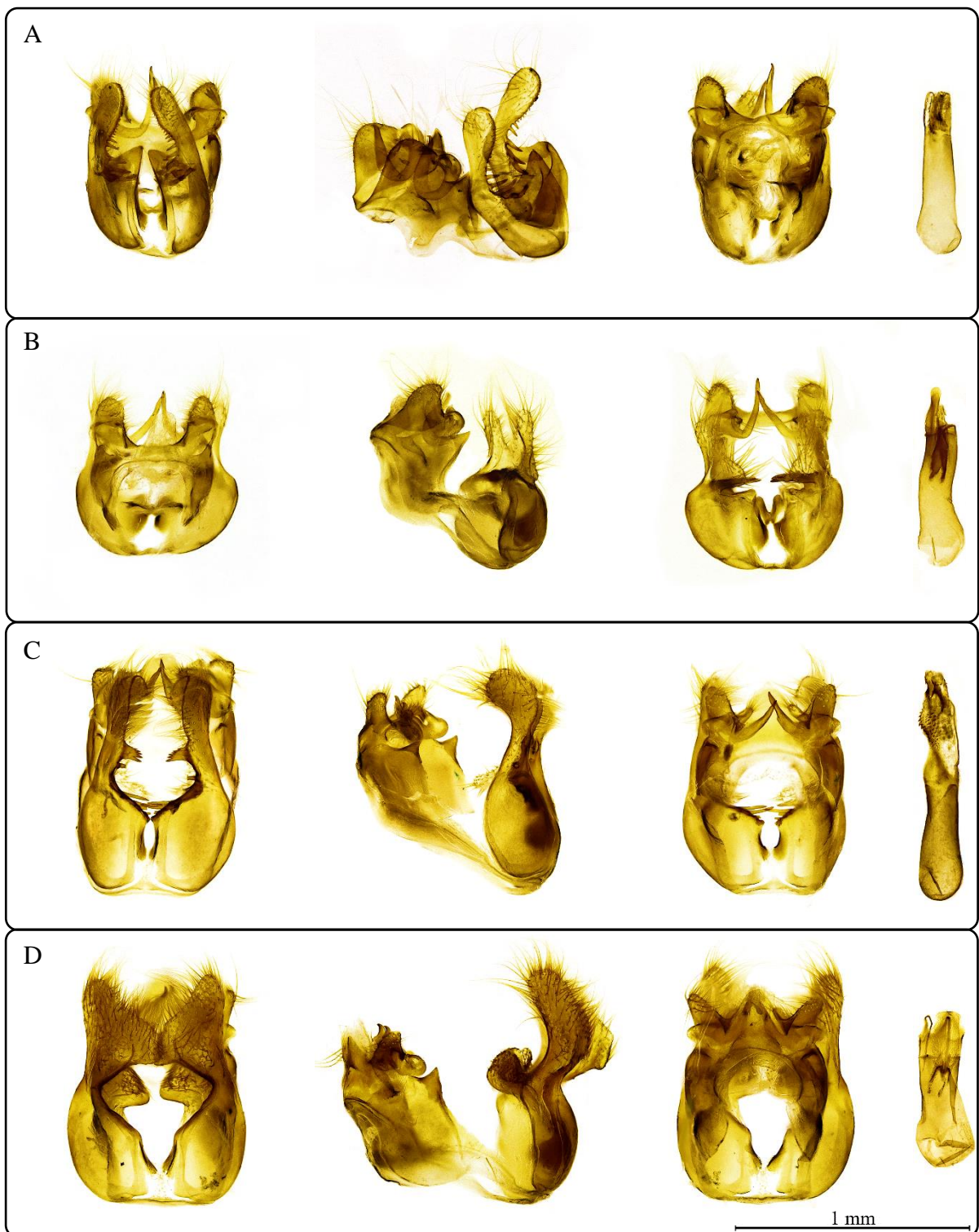
Rozdílné morfologické struktury na sklerotizovaných kopulačních orgánech studovaných vzorků potvrzují výše prezentované výsledky fylogenetických analýz. Celkově jsem provedla disekci genitálií u 39 vzorků rodu *Cacyreus*. V této práci je vyobrazeno 27 kopulačních orgánů kvůli naprosté identičnosti některých z nich. Při porovnání samčích kopulačních orgánů (Obr. 34, 35, 36) studovaných druhů jsou patrné signifikantní rozdíly ve tvaru valv a v přítomnosti či absenci dalších morfologických struktur. Pro srovnání samičích genitálií se mi podařilo vyhotovit vhodné fotografie pouze u čtyř vzorků (Obr. 37), přesto na nich nejsou patrné výrazné rozdíly mezi zobrazenými druhy. V příloze 2 lze nalézt fotografie genitálií dalších vybraných exemplářů, ale kvalita těchto snímků odpovídá domácím podmínkám kvůli omezené možnosti nafotit dané vzorky v laboratoři.



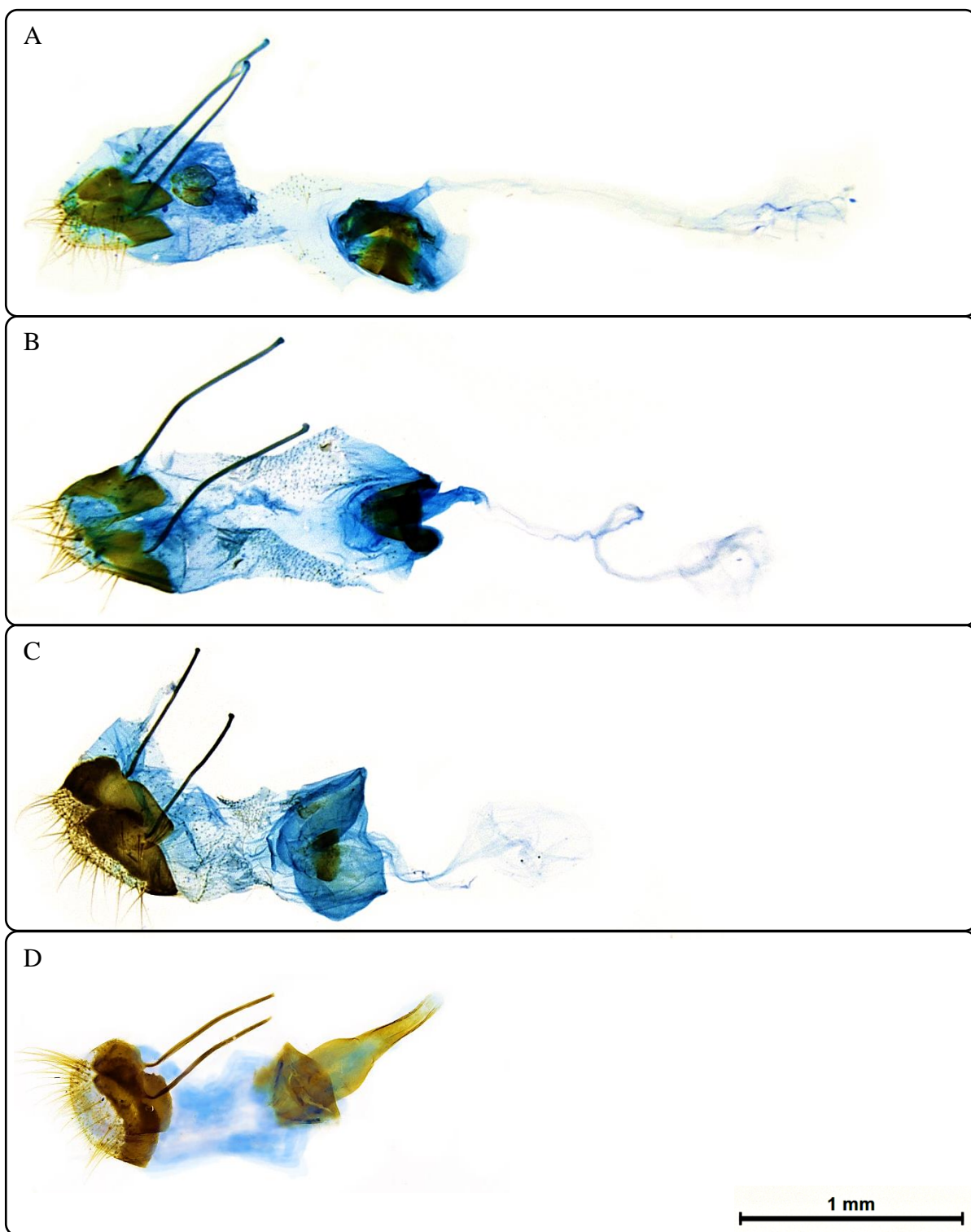
Obr. 34. Srovnání genitálií. **A:** *C. marshalli* (LB-0010) – JAR; **B:** *C. dicksoni* (LB-0039) – JAR. Zleva doprava je vyobrazena ventrální, laterální a dorzální strana celého samčího kopulačního orgánu a aedeagus.



Obr. 35. Srovnání genitálií *C. palemon*. **A:** *C. palemon ghimirra* (MR_ZF_246) – Etiopie; **B:** *C. palemon ghimirra* – Malawi; **C:** *C. palemon palemon* (LB-0043) – JAR. Zleva doprava je vyobrazena ventrální, laterální a dorzální strana celého samčího kopulačního orgánu a aedeagus.



Obr. 36. Srovnání genitálií skupiny „lingeus“. **A:** *C. audeoudi* (MR_ZF_087) – Uganda; **B:** *C. virilis* (LB-0001) – Zambie; **C:** *C. lingeus* (MR_ZF_238) – Etiopie; **D:** *C. darius* (MR_ZF_538) – Comoros-Anjouan. Zleva doprava je vyobrazena ventrální, laterální a dorzální strana celého samčího kopulačního orgánu a aedeagus.



Obr. 37. Srovnání samičích genitálií. **A:** *C. lingeus* (LB-0011) – JAR; **B:** *C. lingeus* (LB-0050) – Uganda; **C:** *C. palemon ghimirra* (LB-0149) – Keňa; **D:** *C. marshalli* (LB-0074) – Řecko.

6 DISKUZE

Jako hlavní cíl této práce jsem si stanovil zjistit vzájemnou fylogenezi jednotlivých druhů rodu *Cacyreus*, jejichž dosavadní taxonomická klasifikace byla založena pouze na kresbě křídel a morfologických znacích. Dalším úkolem bylo potvrdit předpokládaný původ invazního druhu *C. marshalli* zavlečeného do Evropy z Jihoafrické republiky (Sarto i Monteys 1992). Pro dosažení těchto cílů jsem použil stejné molekulárně genetické metody jako další práce zabývající se podobnou problematikou (např. Wahlberg & Saccheri 2007, Lohman et al. 2008, Fric et al. 2019).

6.1 Fylogenetická a fylogeografická analýza

Na základě mitochondriálního genu cytochrom oxidázy 1 (COI) a nukleárních markerů wingless (Wg) a elongačního faktoru 1 alfa (EF1 α) zpracovaných Bayesovskou analýzou, metodou Maximum Likelihood a molekulárním datováním jsem potvrdil, že se rod *Cacyreus* rozdělil do dvou hlavních větví před zhruba 8,2 miliony let (Obr. 28). Toto rozdělení do tzv. skupiny „palemon“ a skupiny „lingeus“ již uvádí Larsen (2005). Fylogenetická analýza potvrdila, že do skupiny „palemon“ patří předpokládané druhy *C. palemon palemon*, *C. palemon ghimirra*, *C. marshalli* a *C. dicksoni*, které se rovněž podobají makroskopicky, tj. trojúhelníkovitým tvarem křídel, převážně hnědým zbarvením a živnými rostlinami housenek hlavně z čeledi Geraniaceae. Do skupiny „lingeus“ (charakterizované zaoblenějšími modrými křídly a živnými rostlinami housenek převážně z čeledi Lamiaceae) jsem potvrdil příslušnost druhů *C. audeoudi*, *C. virilis*, *C. lingeus* a *C. darius*.

Z analýz práce vyplývá, že *C. palemon palemon* a jeho poddruh *C. palemon ghimirra* se geneticky již poměrně výrazně odlišují, přičemž k jejich diferenciaci došlo již před přibližně 4,3 miliony let (Obr. 28). Tuto jejich diferenciaci jsem potvrdil i významně odlišnými morfologickými znaky na jejich kopulačních orgánech (Obr. 35), a proto je navrhuji považovat za samostatné druhy. Pro fylogenetickou analýzu jsem v práci použil pět vzorků *C. palemon ghimirra* pocházejících z předpokládaného výskytu v Etiopii, ale zároveň jsem použil jeden vzorek původem z Keni (LB-0149), čímž se jedná dle dostupných informací o nový stát výskytu tohoto poddruhu. Na základě morfologických znaků na kopulačních orgánech u dalšího jednoho vzorku, který není zahrnutý ve fylogenetických analýzách, jsem prokázal výskyt *C. palemon ghimirra* ještě ve státě Malawi, pro něhož se rovněž jedná o nový druhový nález. Williams (2018) uvádí, že poddruh *C. palemon ghimira* by se měl vyskytovat pouze na území Etiopie a v ostatních afrických státech by se mělo jednat o formu *C. palemon palemon*. Bohužel nelze dohledat popis ani žádné obrázky poddruhu *ghimirra*, proto nelze s naprostou

jistotou říct, že moje vzorky z Etiopie, Keni a Malawi odpovídají tomuto poddruhu. U taxonu *C. palemon* existuje forma *fracta* (Grünberg, 1911), která byla popsána z Ugandy z území severně od Albertova jezera z hor Ruwenzori. Ackery (1995) a Williams (2018) tuto formu uvádí jako synonymum k *C. palemon palemon*, ale pokud by byl tento materiál identický s použitými vzorky *C. palemon ghimirra* z Etiopie, Keni a Malawi, tak by název *fracta* měl přednost před *ghimirra*.

Dalším zjištěním je velmi blízká příbuznost rodu *Harpendyreus* právě k větvi *C. palemon*. Stradomsky (2016) uvádí, že rody *Cacyreus* a *Harpendyreus* jsou sesterskými skupinami, přičemž se jako jediné dva rody řadí do podtribu Cacyreina. Z analýz vyplývá, že rod *Harpendyreus* je sesterskou skupinou *C. palemon palemon*, od kterého se odštěpil teprve před cca 3,2 miliony let. Pro jednoznačné fylogenetické zařazení rodu *Harpendyreus* bude potřeba mít k dispozici více druhů tohoto rodu a vypracovat detailnější fylogenetickou analýzu. Nicméně i ze získaných výsledků lze jednoznačně konstatovat, že řazení rodu *Harpendyreus* spolu s rodem *Cacyreus* do podtribu Cacyreina je naprosto oprávněné.

Na základě výsledků fylogenetických a fylogeografických analýz 23 vzorků *C. marshalli* pocházejících z šesti evropských států jsem potvrdil, že patrně celá evropská populace patří jednomu haplotypu (H₄), který pochází z haplotypu (H₅) původem z Jihoafrické republiky (Obr. 30). Tímto zjištěním jsem potvrdil tvrzení Sorta i Monteyse (1992) a dalších autorů o původu *C. marshalli* v Evropě.

Na základě Bayesovské analýzy vystupuje druh *C. dicksoni* jako sesterská skupina druhu *C. marshalli*, kdežto metodou Maximum Likelihood by byl *C. dicksoni* parafyletickým taxonem *C. marshalli*. Z modelu haplotypové sítě (Obr. 30) je patrné, že *C. dicksoni* vytváří v Jihoafrické republice vlastní haplotyp (H₉), který by se dal ale zařadit společně se všemi haplotypy druhu *C. marshalli* do jedné haplotypové skupiny. Evoluční historie *C. dicksoni* jako samostatného druhu je velmi krátká (zhruba 0,75 milionů let), což vysvětluje jeho nejednoznačné postavení v kladogramech. Makroskopické rozlišení *C. dicksoni* od *C. marshalli* je rovněž velmi obtížné, ale potvrzení, že se jedná o dva samostatné druhy, mně poskytly odlišné morfologické znaky na kopulačních orgánech (Obr. 34).

Všechny vyhotovené analýzy rozdělují druh *C. virilis* do dvou větví. K této separaci došlo přibližně před 1,1 milionem let (Obr. 28). Jednu větev tvoří široce rozšířená haplotypová skupina G6 vyskytující se v pevninské části Afriky (v Zambii, Ghaně a Jihoafrické republice). Významným zjištěním je výskyt *C. virilis* v Ghaně (vzorek LB-0066), pro níž se jedná dle oficiálně dostupných informací o první nález tohoto druhu. Druhou větev *C. virilis* tvoří zástupci haplotypové skupiny G7, kteří se vyskytují v Ománu a na ostrově Sokotra (Obr. 31).

Historický původ ostrova Sokotra je nejednoznačný, ale určitě sahá do dob před vznikem druhu *C. virilis*. Někteří autoři tvrdí, že se ostrov oddělil od afrického kontinentu před minimálně 70 miliony let (Kopp 1999) a od Arabského poloostrova, konkrétně od oblasti Dhofar v Ománu, se začal oddalovat před zhruba 35 miliony let, přičemž současné polohy bylo dosaženo před minimálně 15 miliony let (Batelka 2012). Vzhledem k poměrně nedávnému vzniku *C. virilis* před zhruba 2 miliony let patrně někde v subsaharské Africe a separaci zmíněných haplotypových skupin *C. virilis* před cca 1,1 milionem let se dá usuzovat, že *C. virilis* byl do oblasti JZ Asie zavlečen. Je jasné, že populace na Sokotře a v Ománu pocházejí ze společného zavlečeného předka do této oblasti, nelze ale jednoznačně říct, zda rozšíření v této oblasti pochází z Ománu či ostrovní populace na Sokotře. Genetická diverzifikace mezi oběma haplotypovými skupinami *C. virilis* není ale prozatím patrna v kresbě křídel ani v morfologii kopulačních orgánů (Příloha 2 – Obr. 1) vzhledem k poměrně krátké evoluční historii.

Z fylogenetických stromů je zřejmé, že druh *C. audeoudi* je parafyletický k větvi *C. virilis* vyskytující se v pevninské části Afriky, přičemž k této separaci došlo před zhruba 0,5 milionem let. Přestože se jedná o nedávnou genetickou diferenciaci, na základě morfologických znaků na kopulačních orgánech se jednoznačně jedná o samostatný druh (Obr. 36). Toto tvrzení rovněž potvrzuje haplotypová síť (Obr. 31), ze které je patrné, že *C. audeoudi* vytváří vlastní haplotypovou skupinu G5 tvořenou dvěma haplotypy (H₁₀ a H₁₁).

Široce rozšířený druh *C. lingeus* tvoří dvě haplotypové skupiny, přičemž zástupci skupina G8 reprezentují široce rozšířený haplotyp H₁₈ vyskytující se v Etiopii, Ghaně, Jihoafrické republice a na ostrově Grande Comore, kde se rovněž objevuje i haplotyp H₁₇, zatímco haplotypová skupina G9 se vyskytuje v Keni, Ugandě a Tanzánii. Významným zjištěním je výskyt *C. lingeus* právě na Komorských ostrovech, konkrétně na zmíněném ostrově Grande Comore. Tento ostrov je ze všech čtyř sopečných Komorských ostrovů nejbližší položený k pevnině Afriky a nejmladší, vznikl před zhruba 0,5 milionem let (Nougier et al. 1986). Tento jeho vznik jednoznačně indikuje, že *C. lingeus* musel být na Grande Comore zavlečen z pevniny, protože vznik druhu *C. lingeus* vychází na základě molekulárního datování před přibližně 1,2 miliony let.

Doposud byl na Komorských ostrovech známý výskyt pouze druhu *C. darius* (viz Williams 2018). Dle výsledků této práce je ale výskyt *C. darius* lokalizován na ostrově Anjouan, který vznikl dle odhadů před zhruba 11,5 miliony let (Nougier et al. 1986) a je geograficky blíže položený k Madagaskaru, kde se rovněž vyskytuje. Nelze ale určit ancestrální ostrov výskytu tohoto druhu, neboť v době jeho vzniku před cca 1,2 milionem let

již existovalo více okolních ostrovů. Jednoznačně ale mohu konstatovat, že historicky muselo dojít k migraci *C. darius* mezi Madagaskarem a Anjouanem z důvodu výskytu společného haplotypu H₂₂ na obou ostrovech.

7 ZÁVĚR

Tato práce poskytuje první komplexně zpracovanou fylogenetickou analýzu rodu *Cacyreus*. Výsledky potvrdily předpokládané rozdělení tohoto rodu do dvou hlavních větví, do tzv. skupiny „palemon“ (*C. palemon palemon*, *C. palemon ghimirra*, *C. marshalli* a *C. dicksoni*) a skupiny „lingeus“ (*C. audeoudi*, *C. virilis*, *C. lingeus* a *C. darius*). K této separaci došlo před zhruba 8,2 miliony let.

Fylogenetická analýza ukazuje na to, že rod *Harpencyreus* je sesterskou skupinou druhu *C. palemon*. Tato velmi blízká příbuznost rodu *Harpencyreus* k rodu *Cacyreus* bude potřeba potvrdit detailnější fylogenetickou analýzou dalších druhů tohoto rodu.

Práce dále navrhuje rozdělení poddruhů *C. palemon palemon* a *C. palemon ghimirra* na dva samostatné druhy z důvodu rozdílných morfologických znaků na jejich kopulačních orgánech a genetické diferenciaci, která se odehrála před zhruba 4,3 miliony let.

Výsledky fylogeografických analýz potvrdily předpokládaný původ zavlečení invazního druhu *C. marshalli* do Evropy z Jihoafrické republiky.

Bylo zjištěno několik nových druhových nálezů pro různé africké státy. Konkrétně se jedná o první nález druhu *C. palemon ghimirra* v Keni a Malawi, *C. virilis* v Ghaně a *C. lingeus* na Komorských ostrovech, specificky na ostrově Grande Comore.

8 RESUME

This paper provides a first complexly processed phylogeny analysis of genus *Cacyreus*. The results confirmed the assumption that this genus is divided into two main branches, the so-called section palemon (*C. palemon palemon*, *C. palemon ghimirra*, *C. marshalli* a *C. dicksoni*) and the section lingeus (*C. audeoudi*, *C. virilis*, *C. lingeus* a *C. darius*). This differentiation took place about 8,2 million years ago.

Phylogeny analysis shows that genus *Harpencyreus* is a sister group of the species *C. palemon*. It will be necessary to further validate this very close genetic relationship between genera *Harpencyreus* and *Cacyreus* by means of a more detailed phylogeny analysis of the other species from genus *Harpencyreus*.

Furthemore, this work suggests to divide the subspecies *C. palemon palemon* and *C. palemon ghimirra* into two separate species due to their disparete morphological features found on their genitals and genetic differentiations that occurred about 4,3 million years ago.

The results of the phylogeography analysis confirmed the presumed origin of the expansion of the invasive *C. marshalli* into Europe from the South African Republic.

Records of several new species from different African countries were also found, specifically *C. palemon ghimirra* from Kenya and Malawi, *C. virilis* from Ghana and *C. lingeus* from Comoro Islands, but only from one island in particular, called Grande Comore.

9 INFORMAČNÍ ZDROJE

9.1 Seznam literatury

- ACKERY P. R., SMITH C. R. & VANE-WRIGHT R. 1995. *Carcasson's African Butterflies: An Annotated Catalogue of the Papilionoidea and Hesperioidea of the Afrotropical Region*. Csiro Publishing. Pp. 816.
- BATELKA J. 2012. Socotra Archipelago – a lifeboat in the sea of changes: advancement in Socotran insect biodiversity survey. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* 52: 1-26.
- CLEMENT M., POSADA D. & CRANDALL K. A. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9(10): 1657-1659.
- DRUMMOND A. J., SUCHARD M. A. XIE D. & RAMBAUT A. 2012. Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29(8): 1969-1973.
- FRIC Z. F., WAHLBERG, N., PECH, P. & ZRZAVÝ, J. 2007. Phylogeny and classification of the *Phengaris-Maculinea* clade (Lepidoptera: Lycaenidae): total evidence and phylogenetic species concepts. *Systematic Entomology* 32 (3): 558–567.
- CHAZOT N., WAHLBERG N., FREITAS A. V. L., et al. 2019. Priors and Posteriors in Bayesian Timing of Divergence Analyses: The Age of Butterflies Revisited. *Systematic Biology* 68(5): 797-813.
- KANDUL N. P., LUKHTANOV V. A., DANTCHENKO A. V. et al. 2004. Phylogeny of *Agrodiaetus* Hübner 1822 (Lepidoptera: Lycaenidae) inferred from mtDNA sequences of COI and COII and nuclear sequences of EF1-alpha: karyotype diversification and species radiation. *Systematic Biology* 53(2) 278-298.
- KOPP H. 1999. Abiotische Faktoren. Pp. 3-22. In: WRANIK W. *Sokotra: Mensch und Natur*. Jemen-Studien 14. Wiesbaden.
- LANFEAR R., CALCOTT B. HO S. Y. W. & GUINDON S. 2012. PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution models for Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution* 29(6): 1698-1701.
- LANGOUROV M. S. & SIMOV N. P. 2017. New Data on the Expansion of the Geranium Bronze, *Cacyreus marshalli* Butler, 1898 (Lepidoptera, Lycaenidae) in the Eastern Part

- of the Balkan Peninsula, with Some Biological Notes. *Acta Zoologica Bulgarica Supplement* 9: 301-304.
- LARSEN T. B. 2005. *Butterflies of West Africa*. Apollo Books, Stenstrup, Denmark. Pp. 865.
- LOHMAN D. J., PEGGIE D., PIERCE N. E. & MEIER R. 2008. Phylogeography and genetic diversity of a widespread Old World butterfly, *Lampides boeticus* (Lepidoptera: Lycaenidae). *BMC Evolutionary Biology* 8: 301.
- MARKO K. & VEROVNIK R. 2009. First record of *Cacyreus marshalli* (Lycaenidae) from the Balkan Peninsula. *Nota lepidopterologica* 32 (1): 81-82.
- MICEVSKI N. & MICEVSKI B. 2017. *Cacyreus marshalli* (Butler, 1898) (Lepidoptera: Lycaenidae) Confirmed for the Republic of Macedonia. *Bulletin of the Natural History Museum Plovdiv* 2: 17-20.
- NGUYEN L.-T., SCHMIDT H., von HAESELER A. & MINH B. Q. 2015. IQ-Tree: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 32(1): 268-274.
- NOUGIER J., CANTAGREL J. M. & KARCHE J. P. 1986. The Comores archipelago in the western Indian Ocean: volcanology, geochronology and geodynamic setting. *Journal of African Earth Sciences* 5(2): 135-145.
- RAMBAUT A., DRUMMOND A. J., XIE D., BAELE G. & SUCHARD M. A. 2018. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67(5): 901-904.
- RAYNOR E. M. 1990. The occurrence of a *Cacyreus* species (Lep.: Lycaenidae) in Majorca. *Entomologist's Record* 102: 250.
- RONQUIST F., TESLENKO M., van der MARK P. et al. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology* 61(3): 539-542.
- SANTOS A. M., CABEZAS M. P., TAVARES A. I., XAVIER R & BRANCO M. 2016. tcsBU: a tool to extend TCS network layout and visualization. *Bioinformatics* 32(4):627-628.

- SARTO i MONTEYS V. 1992. Spread of Southern African Lycaenid butterfly, *Cacyreus marshalli* Butler, 1898 (Lep: Lycaenidae) in the Balearic Archipelago (Spain) and considerations on its likely introduction to continental Europe. *Journal of Research on the Lepidoptera* 31: 24-34.
- SARTO i MONTEYS V. & MASÓ A. 1991. Confirmación de *Cacyreus marshalli* Butler, 1898 (Lycaenidae, Polyommatainae) como nueva especie para la fauna europea. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas* 17: 173-183.
- SOYHAN T., BAŞER S. & NAZARI V. 2013. First record of *Cacyreus marshalli* Butler, 1898 (Lycaenidae) from Turkey. *Nota lepidopterologica* 36(2): 189-190.
- STRADOMSKY B. V. 2016. A molecular phylogeny of the subfamily Polyommatainae (Lepidoptera: Lycaenidae). *Caucasian entomological bulletin* 12(1): 145-156.
- TALAVERA G., LUKHTANOV V. A., PIERCE N. E. & VILA R. 2013. Establishing criteria for higher level taxonomic classification using molecular data: the systematic of *Polyommatus* blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Cladistics* 29: 166-192.
- TARRIER M. 1998. *Cacyreus marshalli* Butler, 1898, a new species for France, Portugal and Morocco (Lepidoptera Lycaenidae). *Alexandria* 20(2-3): 143-144.
- TROUKENS W. 1991. *Cacyreus marshalli* Butler, 1898 aangetroffen in België (Lepidoptera: Lycaenidae). *Phegea* 19(4): 129-131.
- VILA R. B., MACNIVE R., GOLDMAN-HUERTAS B., REE R. H. et al. 2011. Phylogeny and palaeoecology of *Polyommatus* blue butterflies show Beringia was a climate-regulated gateway to the New World. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278: 2737-2744.
- VODOLAZHISKY D. I., WIEMERS M., STRADOMSKY B. V. 2009. A comparative analysis of mitochondrial and nuclear DNA sequences in blue butterflies of subgenus *Polyommatus* (s. str.) Latreille, 1804 (Lepidoptera: Lycaenidae: *Polyommatus*). *Caucasian Entomological Bulletin* 5(1): 115-120.
- WAHLBERG N. & SACCHERI I. 2007. The effects of Pleistocene glaciations on the phylogeography of *Melitaea cinxia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *European Journal of Entomology* 104: 675-684.

- WAHLBERG N. & WHEAT C. W. 2008. Genomic outposts serve the phylogenomic pioneers: designing novel nuclear markers for genomic DNA extractions of Lepidoptera. *Systematic Biology* 57: 231-242.
- WIEMERS M. 2003. Chromosome differentiation and the radiation of the butterfly subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: *Polyommatus* – a molecular phylogenetic approach. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Bonn: Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität. Pp 203.
- WIEMERS M., STRADOMSKY B. V. & VODOLAZHISKY D. I. 2010. A molecular phylogeny of *Polyommatus* s. str. and *Plebicula* based on mitochondrial COI and nuclear ITS2 sequences (Lepidoptera: Lycaenidae). *European Journal of Entomology* 107(3): 325-336.
- WILLIAMS M. C. 2018. Afrotropical butterflies 17th edition. In: WILLIAMS M. C. *Butterflies and skippers of the Afrotropical Region*. Official Journal of the Lepidopterists' Society of Africa.

9.2 Seznam internetových zdrojů

- Cacyreus marshalli* Butler, 1989. *GBIF* [online]. [cit. 10.11.2019]. Dostupné z: <https://www.gbif.org/species/1932752>
- Mapování a ochrana motýlů České republiky. Modrásek muškátový – *Cacyreus marshalli* Butler 1898. *Mapování a ochrana motýlů České republiky* [online]. [cit. 21.10.2020]. Dostupné z: <http://www.lepidoptera.cz/motyli/modrasek-muskatovy-cacyreus-marshalli-butler-1898>
- National Center for Biotechnology Information. *National Center for Biotechnology Information* [online]. [cit. 15.03.2020]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

10 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 – Fotografie imag vybraných vzorků. Foto: autor

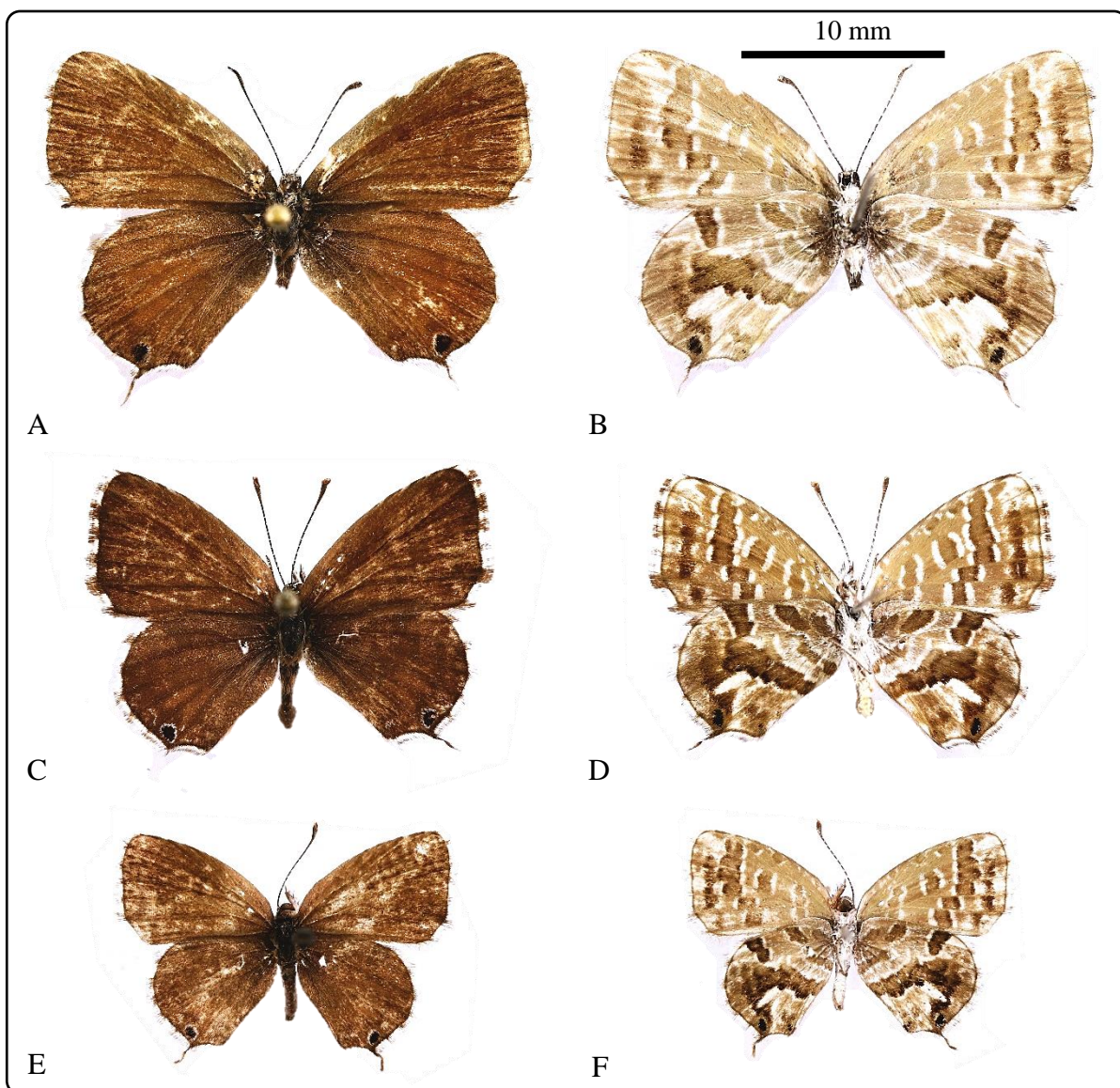
- Obr. 1** – *Cacyreus marshalli*
- Obr. 2** – *Cacyreus dicksoni*
- Obr. 3** – *Cacyreus palemon ghimirra*
- Obr. 4** – *Cacyreus palemon palemon*
- Obr. 5** – *Cacyreus virilis*
- Obr. 6** – *Cacyreus lingeus*
- Obr. 7** – *Cacyreus darius*
- Obr. 8** – *Cacyreus audeoudi*
- Obr. 9** – *Harpencyreus aequatorialis*
- Obr. 10** – *Harpencyreus marungensis*
- Obr. 11** – *Harpencyreus notoba*

Příloha 2 – Fotografie kopulačních orgánů vybraných vzorků. Foto: autor

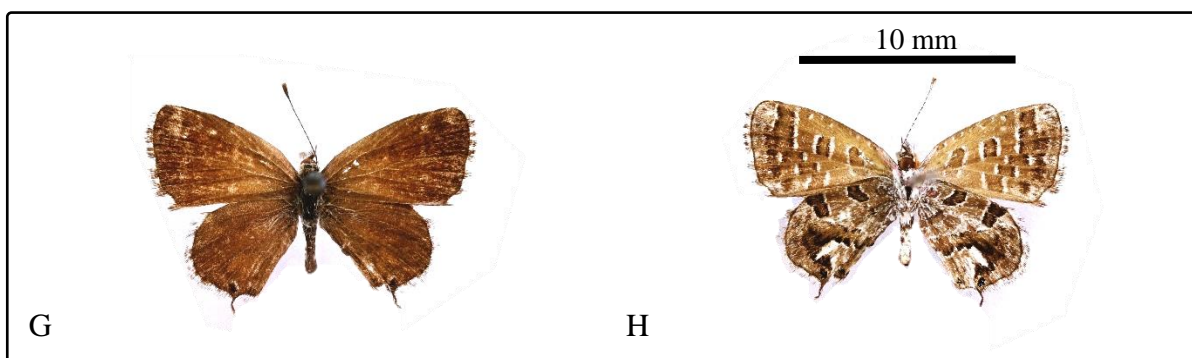
- Obr. 1** – *Cacyreus virilis*
- Obr. 2** – *Cacyreus lingeus*
- Obr. 3** – *Cacyreus darius*, *C. palemon ghimirra*, *C. palemon palemon*
- Obr. 4** – *Cacyreus marshalli*

Příloha 3 – Seznam studovaných vzorků s názvem druhu, kódovým označením (ID), lokalizací nálezu, GPS souřadnicemi, použitými markery (COI, Wg, EF1 α), typem haplotypu (H) a haplotypovou skupinou (G) s jejím barevným označením.

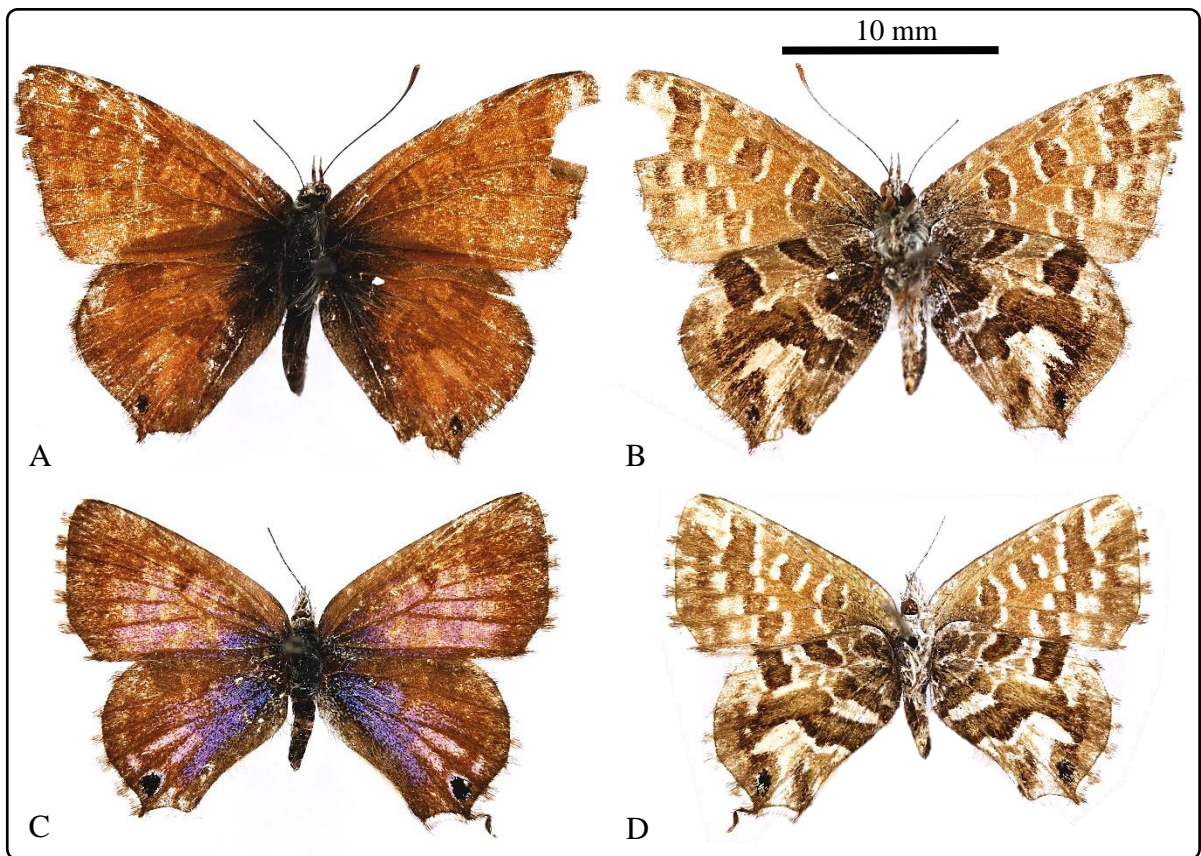
Příloha 1 – Fotografie imag vybraných vzorků.



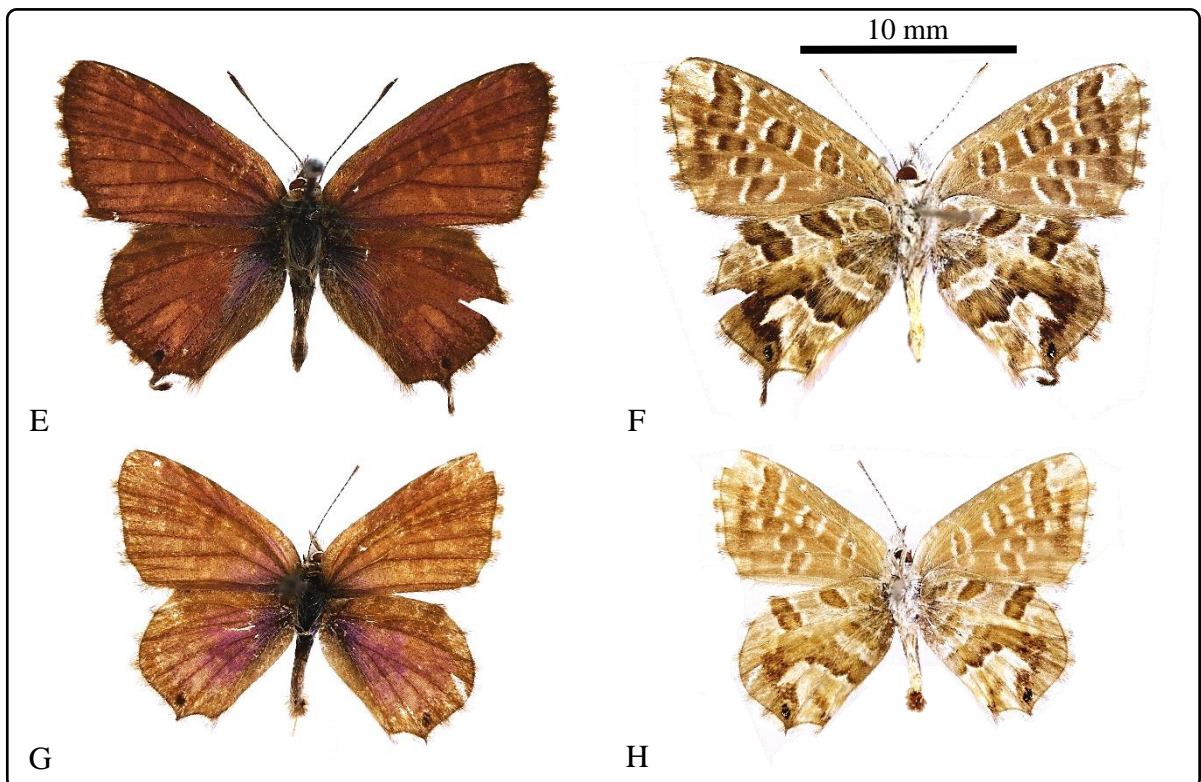
Obr. 1. *Cacyreus marshalli*, dorzální a ventrální strana. A-B: Řecko, samice (LB-0074); C-D: Španělsko, samec; E-F: JAR, samec (LB-0010).



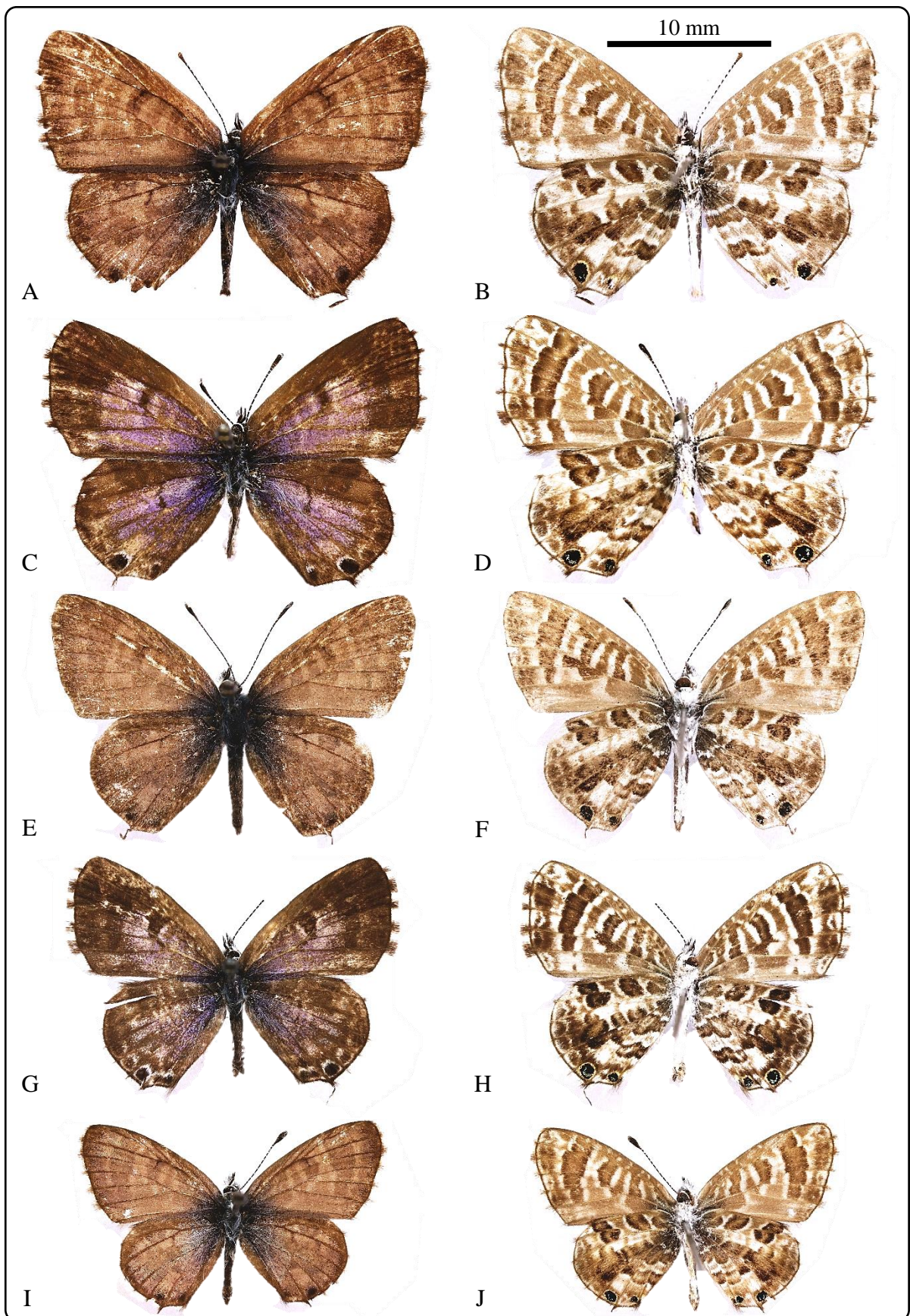
Obr. 2. *Cacyreus dicksoni*, dorzální a ventrální strana. G-H: JAR, samec (LB-0040).



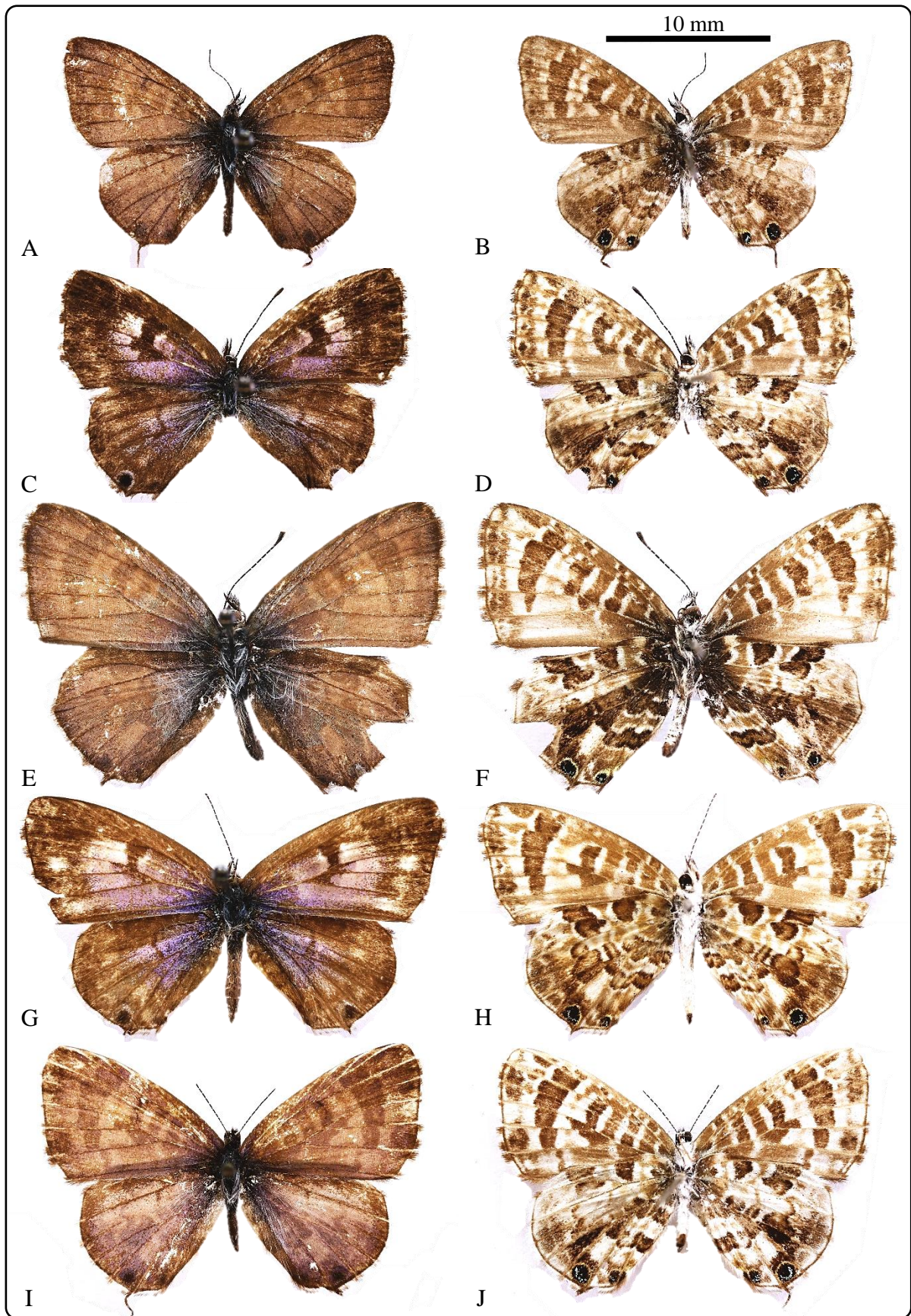
Obr. 3. *Cacyreus palemon ghimirra*, dorzální a ventrální strana. A-B: Etiopie, samec (MR_ZF_237); C-D: Keňa, samice (LB-0149).



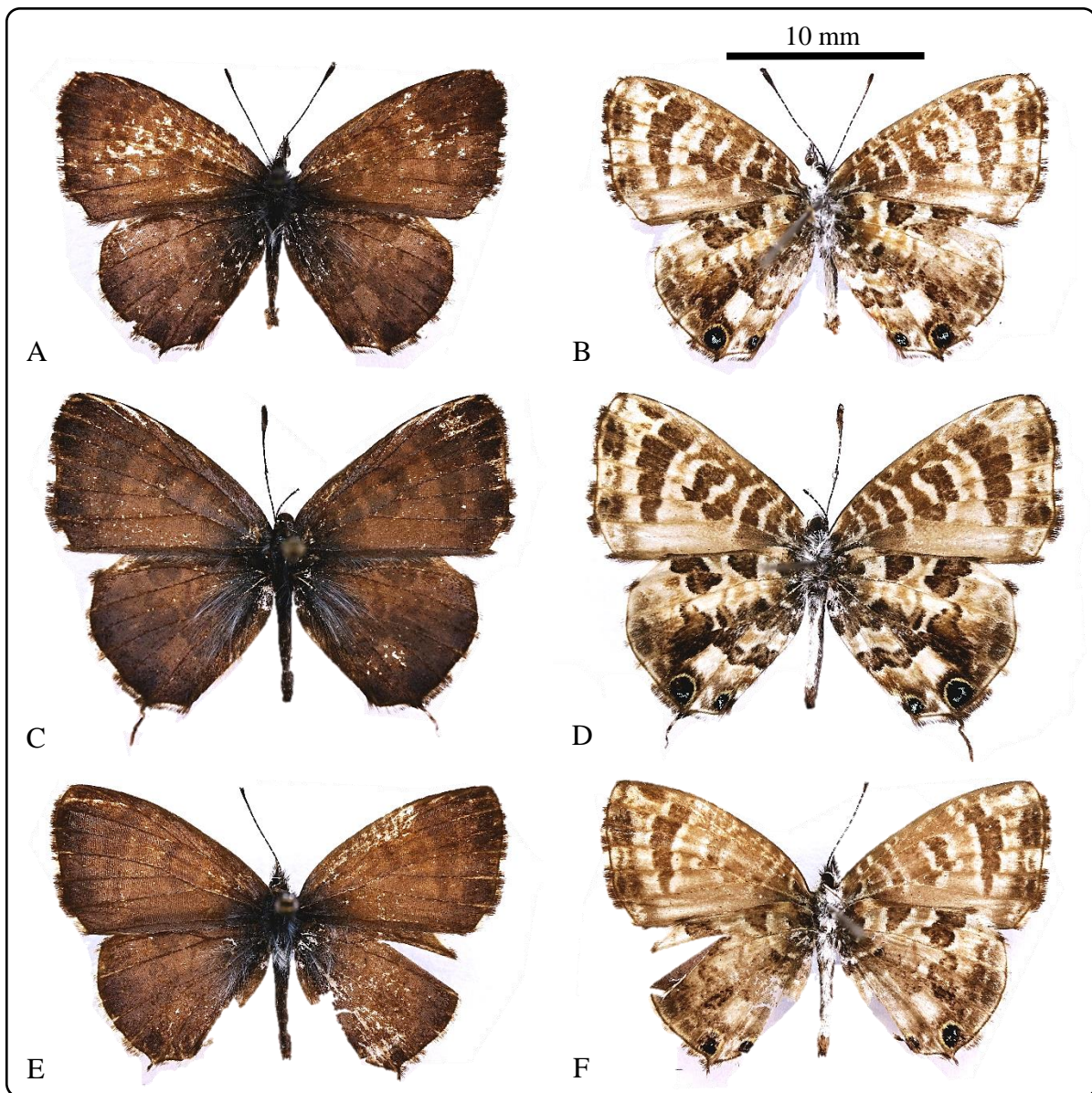
Obr. 4. *Cacyreus palemon palemon*, dorzální a ventrální strana. E-F: JAR, samec (LB-0007); G-H: JAR, samec (LB-0043).



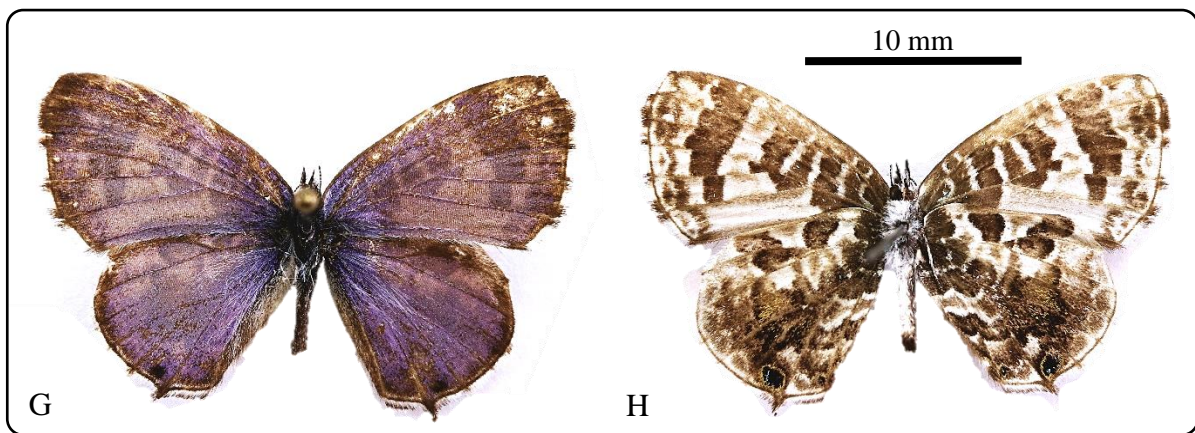
Obr. 5. *Cacyreus virilis*, dorzální a ventrální strana. A-B: Zambie, samec (LB-0063); C-D: Zambie, samice (LB-0064); E-F: Sokotra, samec (LB-0164); G-H: Sokotra, samice (LB-0163); I-J: Omán, samec (LB-0168).



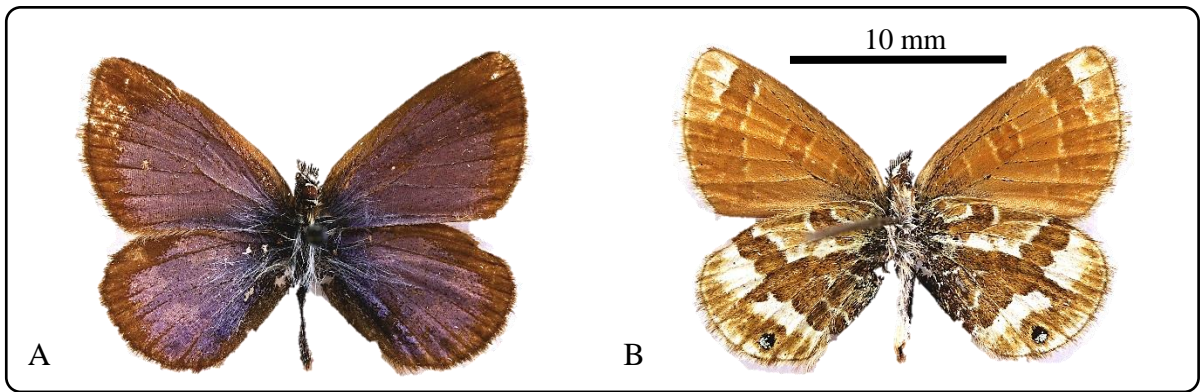
Obr. 6. *Cacyreus lineus*, dorzální a ventrální strana. A-B: Komorské ostrovy - Grande Comore, samec (LB-0196); C-D: Komorské ostrovy - Grande Comore, samice (LB-0195); E-F: Etiopie, samec (LB-0190); G-H: JAR, samice (LB-0203); I-J: Ghana, samec (LB-0069).



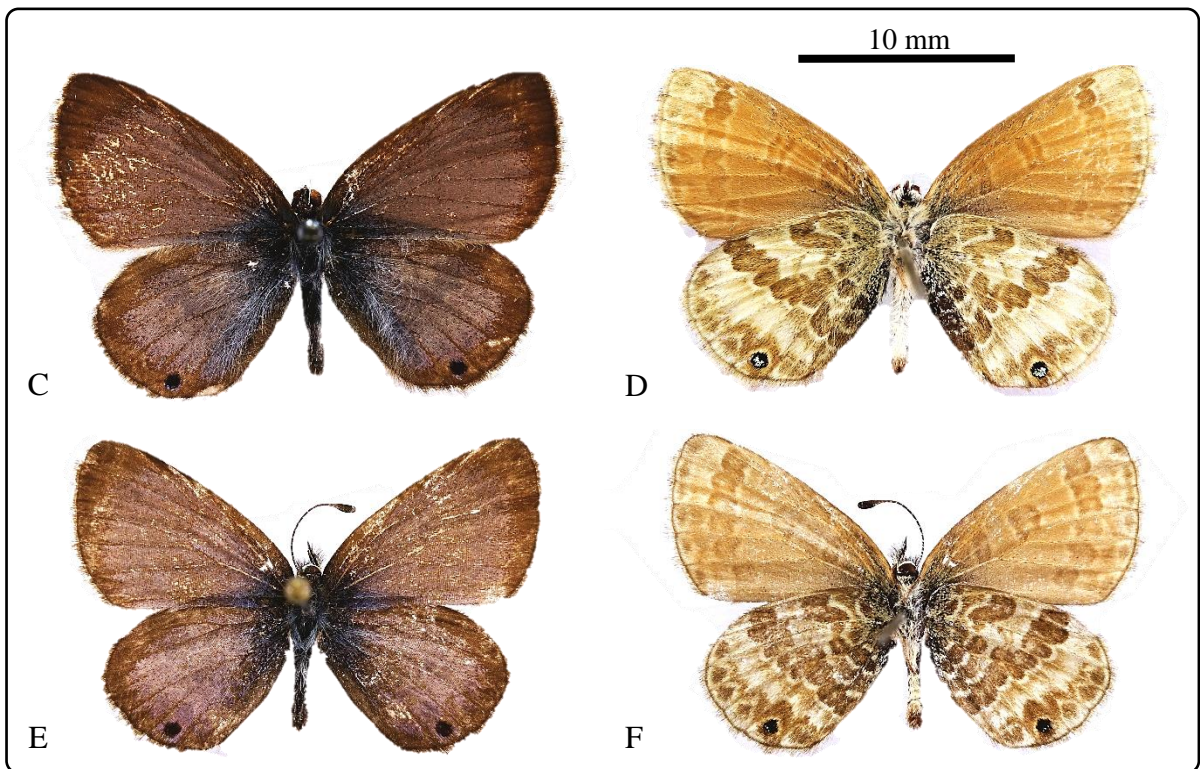
Obr. 7. *Cacyreus darius*, dorzální a ventrální strana. A-B: Madagaskar, samec (LB-0122); C-D: Madagaskar, samec (LB-0128); E-F: Komorské ostrovy - Anjouan, samec (LB-0198).



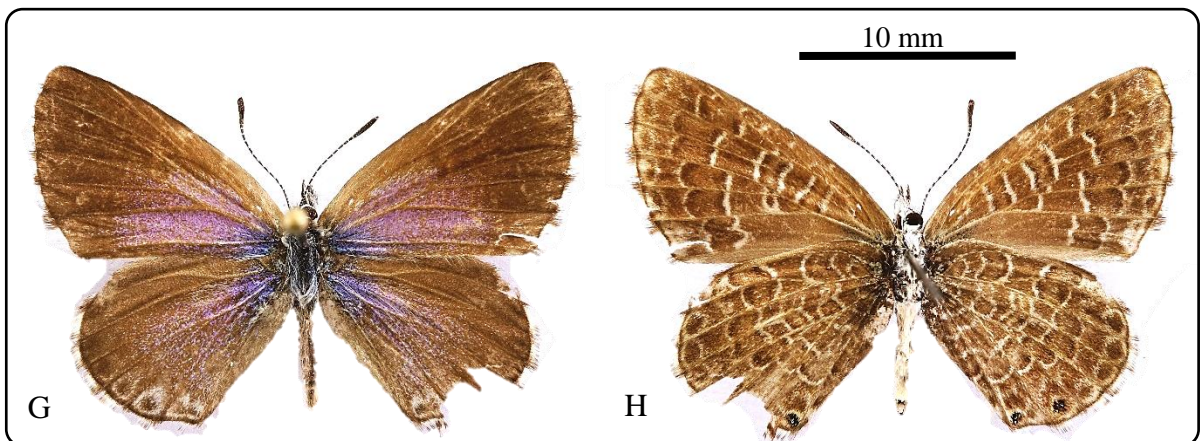
Obr. 8. *Cacyreus audeoudi*, dorzální a ventrální strana. G-H: Uganda, samec (MR_ZF_087).



Obr. 9. *Harpendyreus aequatorialis*, dorzální a ventrální strana. A-B: Keňa, samec (LB-0148).

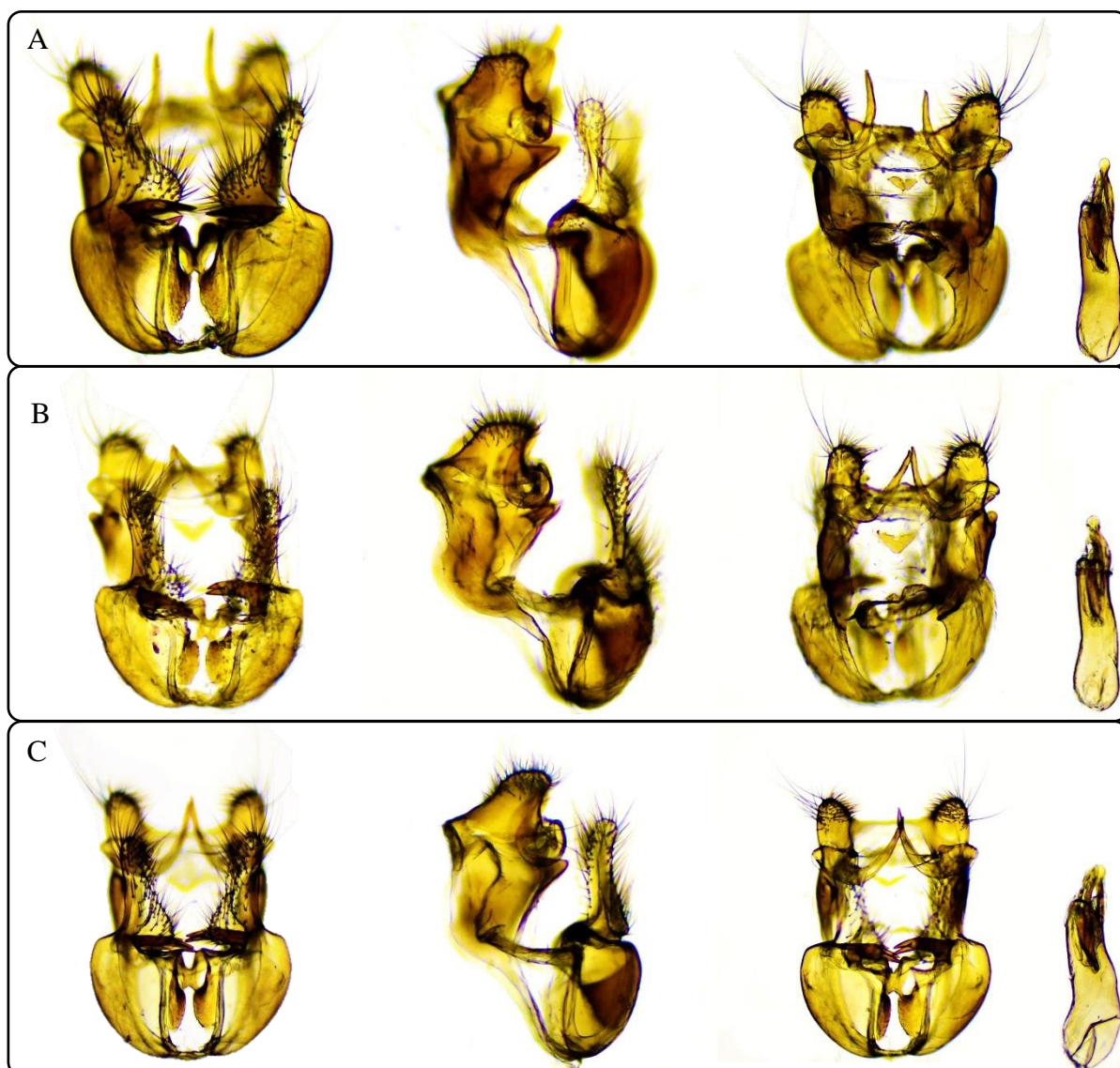


Obr. 10. *Harpendyreus marungensis*, dorzální a ventrální strana. C-D: Kongo, samec (LB-0207); E-F: Uganda, samec (MR_ZF_057).

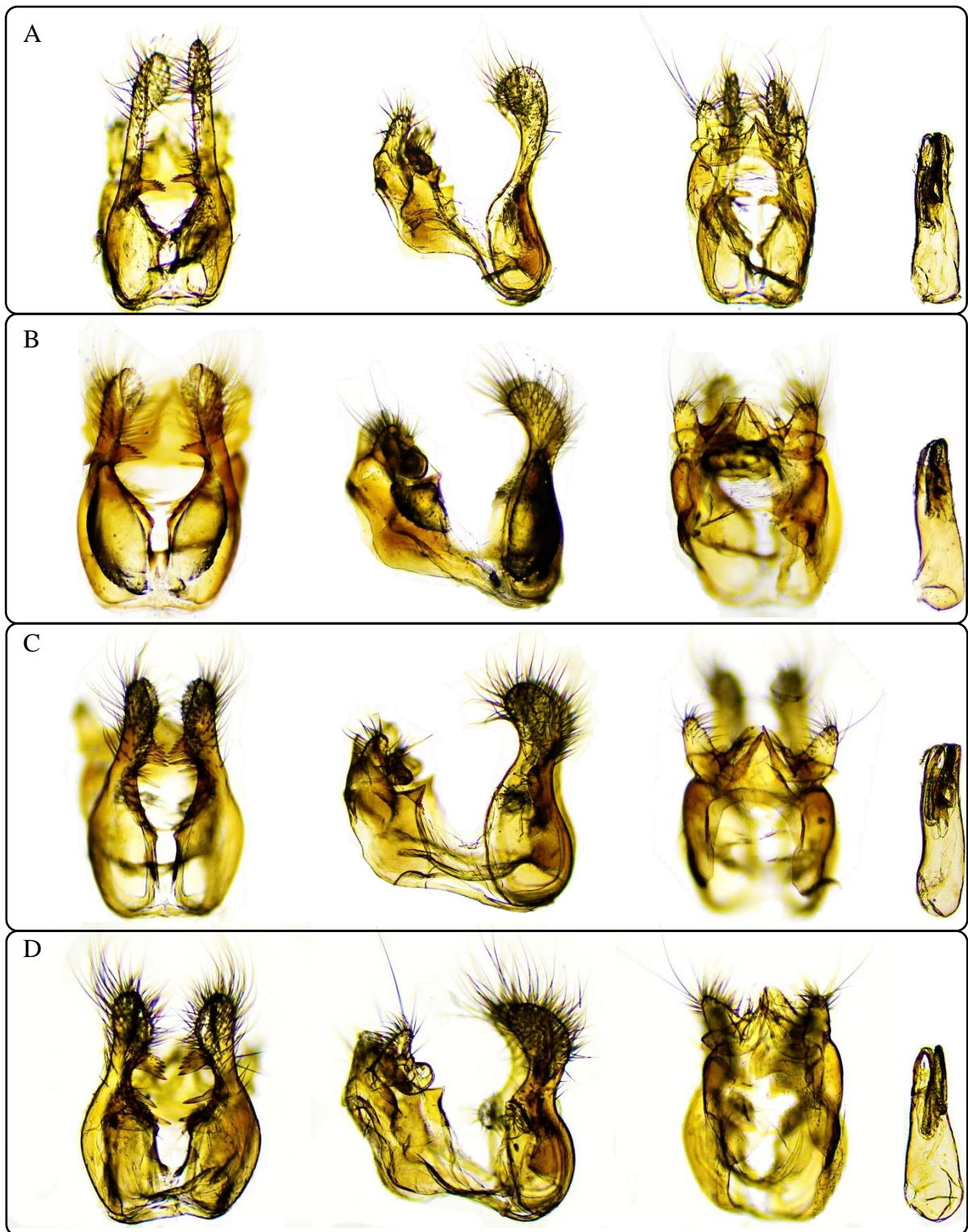


Obr. 11. *Harpendyreus notoba*, dorzální a ventrální strana. G-H: JAR, samec.

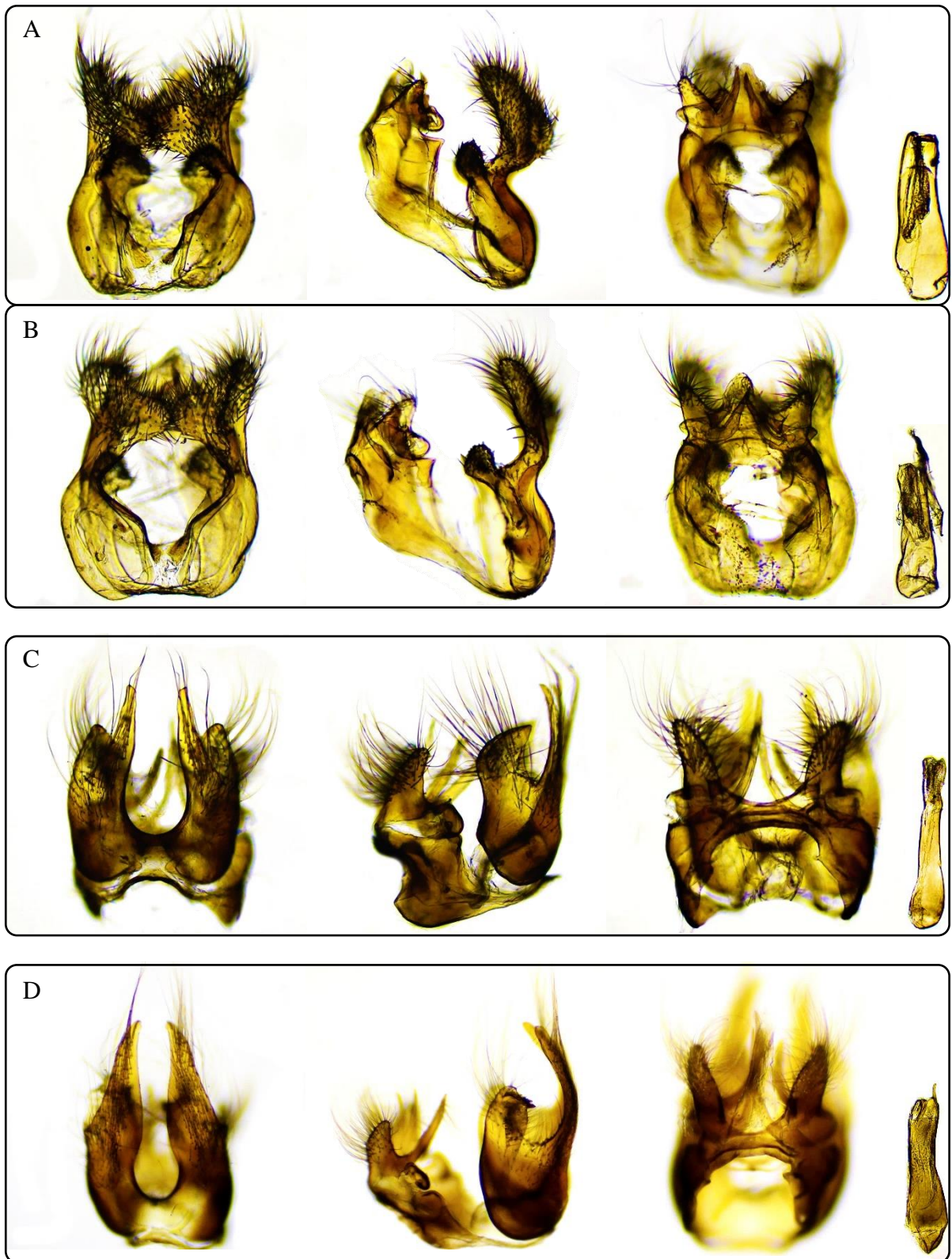
Příloha 2 – Fotografie kopulačních orgánů vybraných vzorků.



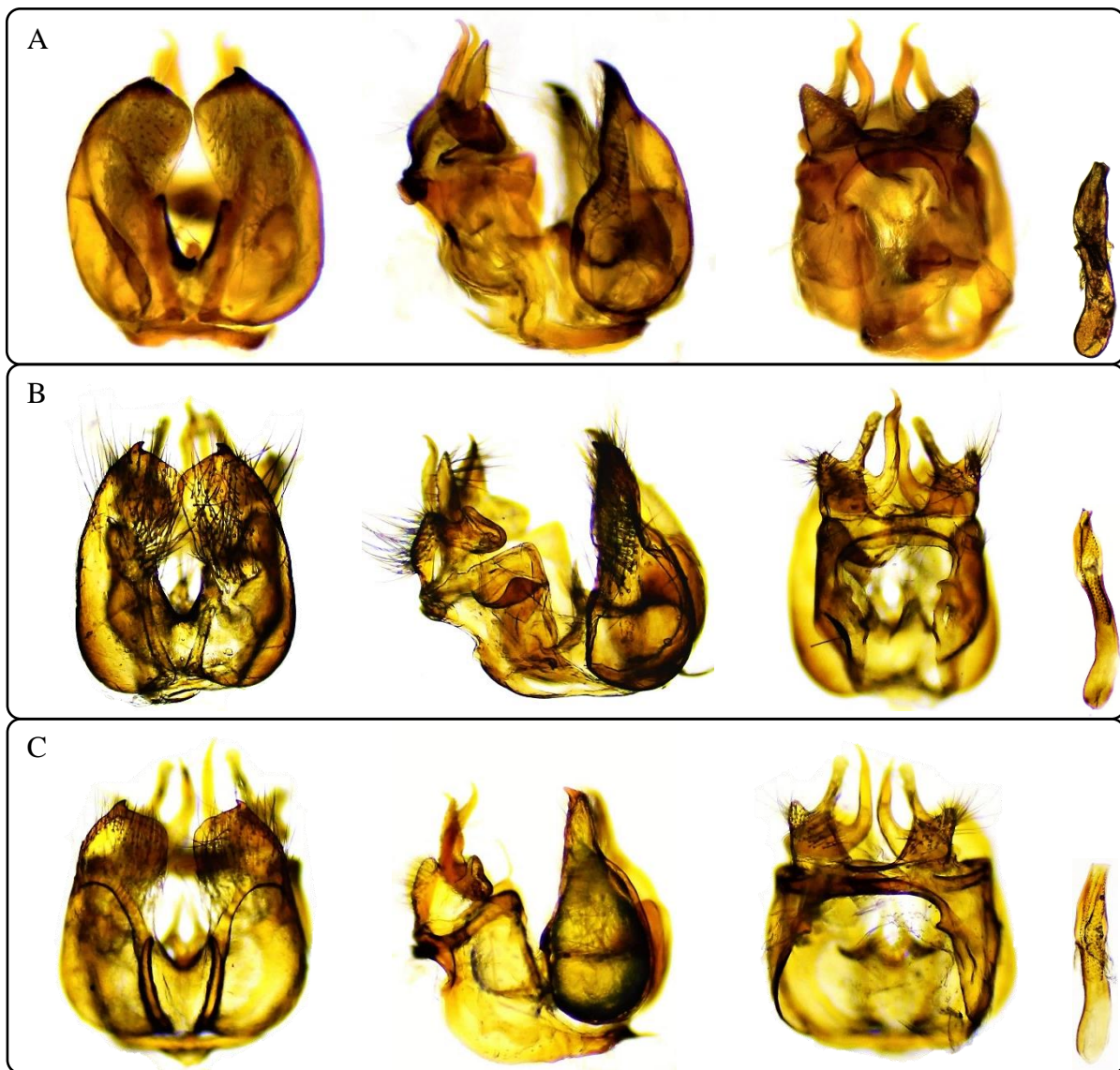
Obr. 1. Srovnání samčích genitálií *C. virilis*. **A:** Zambie (LB-0048); **B:** Omán (LB-0025); **C:** Sokotra (LB-0159). Zleva doprava je vyobrazena ventrální, laterální a dorzální strana celého kopulačního orgánu a aedeagus.



Obr. 2. Srovnání samčích genitálií *C. lingeus*. **A:** Ghana (LB-0067); **B:** Etiopie (LB-0189); **C:** JAR (LB-0008); **D:** Komorské ostrovy - Grande Comore (LB-0192). Zleva doprava je vyobrazena ventrální, laterální a dorzální strana celého kopulačního orgánu a aedeagus.



Obr. 3. A: *C. darius* (LB-0128) – Madagaskar; **B:** *C. darius* (LB-0198) – Komorské ostrovy - Anjouan; **C:** *C. palemon ghimirra* (LB-0188) – Etiopie; **D:** *C. palemon palemon* (LB-0007) – JAR. Zleva doprava je vyobrazena ventrální, laterální a dorzální strana celého samčího kopulačního orgánu a aedeagus.



Obr. 4. Srovnání samčích genitálií *C. marshalli*. **A:** JAR (LB-0052); **B:** JAR (LB-0042); **C:** Španělsko - Barcelona. Zleva doprava je vyobrazena ventrální, laterální a dorzální strana celého kopulačního orgánu a aedeagus.

Příloha 3 – Seznam studovaných vzorků s názvem druhu, kódovým označením (ID), lokalizací nálezů, GPS souřadnicemi, použitými markery (COI, Wg, EF1 α), typem haplotypu (H) a haplotypovou skupinou (G) s jejím barevným označením.

Druh	ID	Země	Lokalita	GPS	COI	Wg	EF1 α	H	G
<i>C. audeoudi</i>	LB-0146	Keňa	Kabaru forest, Nyeri	0.375839S 36.885840E	/	-	/	11	5
<i>C. audeoudi</i>	MR_ZF_087	Uganda	Western region, Kibale Forest NP, Kyanyawara	0.561192N 30.356959E	/	-	-	10	5
<i>C. audeoudi</i>	ZF_LY_002789	Uganda	Central Region, Mpigi, Mpanga Forest NR	0.206198N 32.301642E	/	-	-	10	5
<i>C. darius</i>	LB-0097	Madagaskar	Fianarantsoa prov., Ranomafana NP, hilltop with radiotower	21.25136S 47.40747E	/	/	/	-	-
<i>C. darius</i>	LB-0112	Madagaskar	Fianarantsoa prov., Ranomafana NP, Ambatolahy village	21.25121S 47.43333E	-	/	/	21	10
<i>C. darius</i>	LB-0119	Madagaskar	Fianarantsoa prov., Ranomafana NP, hilltop with radiotower	21.25136S 47.40747E	/	/	/	21	10
<i>C. darius</i>	LB-0120	Madagaskar	Fianarantsoa prov., Ranomafana NP, hilltop with radiotower	21.25136S 47.40747E	/	-	/	20	10
<i>C. darius</i>	LB-0121	Madagaskar	Fianarantsoa prov., Ranomafana NP, hilltop with radiotower	21.25136S 47.40747E	/	/	/	21	10
<i>C. darius</i>	LB-0122	Madagaskar	Fianarantsoa prov., Ranomafana NP, hilltop with radiotower	21.25136S 47.40747E	/	/	/	21	10
<i>C. darius</i>	LB-0123	Madagaskar	Fianarantsoa prov., Ranomafana NP, hilltop with radiotower	21.25136S 47.40747E	/	/	/	21	10
<i>C. darius</i>	LB-0128	Madagaskar	Fianarantsoa prov., Ranomafana NP, Ambatolahy village	21.25121S 47.43333E	/	/	/	22	10
<i>C. darius</i>	BMAD015-09	Madagaskar	Antsiranana	12.332S 49.352E	/	-	-	21	10
<i>C. darius</i>	LMAD024-10	Madagaskar	Toliara prov.	18.2707S 45.4036E	/	-	-	21	10
<i>C. darius</i>	LMAD025-10	Madagaskar	Toliara prov.	22.6433S 44.1717E	/	-	-	21	10
<i>C. darius</i>	LMAD026-10	Madagaskar	Fianarantsoa	20.5951S 46.5629E	/	-	-	21	10
<i>C. darius</i>	LMAD027-10	Madagaskar	Fianarantsoa	20.5946S 46.5463E	/	-	-	20	10
<i>C. darius</i>	LB-0198	Komorské ostrovy	Anjouan, Ouani, env. of Patsy	12.154817S 44.433877E	/	-	/	23	10
<i>C. darius</i>	MR_ZF_538	Komorské ostrovy	Anjouan, Dinri	12.22109S 44.44568E	/	-	-	22	10
<i>C. dicksoni</i>	LB-0038	JAR	Keiskie Road near Calvinia	31.657944S 19.895944 E	/	/	/	9	4
<i>C. dicksoni</i>	LB-0039	JAR	Keiskie Road near Calvinia	31.657944S 19.895944 E	/	-	/	9	4
<i>C. dicksoni</i>	LB-0175	JAR	Brandkop	32.9679742S, 20.4825544E	/	/	/	9	4
<i>C. dicksoni</i>	LB-0040	JAR	Keiskie Road near Calvinia	31.657944S 19.895944 E	/	-	/	-	-
<i>C. lingeus</i>	LB-0008	JAR	Western Cape, nr. Montagu	33.74668S 20.26175E	/	/	/	18	8
<i>C. lingeus</i>	LB-0011	JAR	Western Cape, nr. Montagu	33.74668S 20.26175E	/	/	/	18	8
<i>C. lingeus</i>	LB-0203	JAR	KZN, Blyde, Berlin falls	24.843828S 30.842617E	/	/	/	18	8
<i>C. lingeus</i>	MR_ZF_359	JAR	Western Cape, nr. Montagu	33.746681S 20.26175E	/	-	-	18	8
<i>C. lingeus</i>	LB-0065	Ghana	Volta, Amedzofe, Mountain Paradise	6.850941N 0.420421E	/	/	/	18	8
<i>C. lingeus</i>	LB-0067	Ghana	Volta, Amedzofe, Mountain Paradise	6.850941N 0.420421E	/	/	/	18	8
<i>C. lingeus</i>	LB-0069	Ghana	Volta, Hohoe, Wli Waterfalls	7.118949N 0.593262E	/	-	/	18	8
<i>C. lingeus</i>	LB-0070	Ghana	Central region, Kakum Forest, Abrafo	5.340634N 1.374773W	/	-	/	18	8
<i>C. lingeus</i>	LB-0072	Ghana	Volta, Hohoe, Wli Waterfalls	7.118949N 0.593262E	/	/	/	18	8

Druh	ID	Země	Lokalita	GPS	COI	Wg	EF1 α	H	G
<i>C. lingueus</i>	LB-0073	Ghana	Central, Cape Coast, Hans Cottage	5.179992N, 1.310252W	/	/	/	18	8
<i>C. lingueus</i>	LB-0189	Etiopie	Dorze Lodge	6.182222N 37.576389E	/	-	/	18	8
<i>C. lingueus</i>	LB-0190	Etiopie	Dorze Lodge	6.182222N 37.576389E	/	-	/	18	8
<i>C. lingueus</i>	MR_ZF_238	Etiopie	Dorze Lodge	6.182222N 37.576389E	/	-	-	18	8
<i>C. lingueus</i>	MR_ZF_240	Etiopie	Dorze Lodge	6.182222N 37.576389E	/	-	-	18	8
<i>C. lingueus</i>	LB-0192	Komorské ostrovy	Grande Comore, Moroni, between Mvouni and Karthala	11,72286S 43.31092E	/	-	/	18	8
<i>C. lingueus</i>	LB-0195	Komorské ostrovy	Grande Comore, Ivembeni	11,49904S 43.33362E	/	-	/	17	8
<i>C. lingueus</i>	LB-0196	Komorské ostrovy	Grande Comore, Ivembeni	11,49904S 43.33362E	/	/	/	18	8
<i>C. lingueus</i>	MR_ZF_539	Komorské ostrovy	Grande Comore, Ivembeni	11,49904S 43.33362E	/	-	-	18	8
<i>C. lingueus</i>	MR_ZF_540	Komorské ostrovy	Grande Comore, Ivembeni	11,49904S 43.33362E	/	-	-	18	8
<i>C. lingueus</i>	MR_ZF_537	Komorské ostrovy	Grande Comore, Moroni, between Mvouni and Karthala	11,72286S 43.31092E	/	-	-	-	-
<i>C. lingueus</i>	LSER014-06	Tanzánie	Serengeti	2.369081S 34.701854E	/	-	-	19	9
<i>C. lingueus</i>	LB-0013	Keňa	Kimaeti Hills	0.605000N 34.410000E	/	-	/	19	9
<i>C. lingueus</i>	MI_239	Keňa	Malakisi	0.681222N 34.416153E	/	-	-	19	9
<i>C. lingueus</i>	LB-0050	Uganda	Central Region, Mpigi, Mpanga Forest NR	0.206198N 32.301642E	/	-	/	19	9
<i>C. marshalli</i>	LB-0010	JAR	Calitzdorp, Huis River	33.49586S 21.648972E	/	/	/	5	3
<i>C. marshalli</i>	LB-0042	JAR	Calitzdorp, Huis River	33.49586S 21.648972E	/	/	/	8	3
<i>C. marshalli</i>	LB-0045	JAR	Odtshoorn, Swartberg Pass	33.36350S 22.064973E	/	/	/	6	3
<i>C. marshalli</i>	LB-0052	JAR	Calitzdorp, Huis River	33.49586S 21.648972E	/	/	/	6	3
<i>C. marshalli</i>	LB-0053	JAR	Calitzdorp, Huis River	33.49586S 21.648972E	/	/	/	7	3
<i>C. marshalli</i>	LB-0054	JAR	Calitzdorp, Huis River	33.49586S 21.648972E	/	/	/	5	3
<i>C. marshalli</i>	GBGL5319-09	JAR	Western Cape, Capetown	33.933S 18.5E	/	-	-	7	3
<i>C. marshalli</i>	AH-95-Y685	JAR	Capetown, Pinelands	33.93S 18.5E	/	/	-	7	3
<i>C. marshalli</i>	LB-0074	Řecko	Korfu, Moraitika	39.483780N 19.927386E	/	-	/	4	3
<i>C. marshalli</i>	LB-0075	Řecko	Korfu, Moraitika	39.483780N 19.927386E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	EZSPC1118-10	Španělsko	Comunidad de Madrid	40.603N 3.708W	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	EZSPC1121-10	Španělsko	Comunidad de Madrid	40.603N 3.708W	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	EZSPC1190-10	Španělsko	Catalonia, Tarragona, Ametlla de Mar, Baix Ebre	40.795N 0.601E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	EZSPM045-09	Španělsko	Castilla y Leon, Ponferrada	42.523N 6.597W	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	EZSPM058-09	Španělsko	Mallorca, Genova	39.57N 2.592E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	EZSPM059-09	Španělsko	Mallorca, Genova	39.57N 2.592E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	EZSPM113-09	Španělsko	Comunidad de Madrid, Tres Cantos	40.603N 3.708W	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	EZSPM202-09	Španělsko	Catalonia, Girona, Cantalops, Alt Emporda	42.423N 2.926E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	EZSPM206-09	Španělsko	Mallorca, Es Teix, Valldemossa	39.718N 2.643E	/	-	-	4	3

Druh	ID	Země	Lokalita	GPS	COI	Wg	EF1 α	H	G
<i>C. marshalli</i>	EZSPM219-09	Španělsko	Asturias, Oviedo, Casco urbano	43.361N 5.9W	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	EZSPN222-09	Španělsko	Catalonia, Girona, Viladrau, Osona	41.842N 2.358E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	GBGL0843-06	Francie	Maruejols-les-Gardons (100 m), Herault	44.0054106N 4.1317633E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	GBGLL495-14	Itálie	Tuscany, La Pocca	44.3371578N 11.4067661E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	GWORR417-10	Itálie	Calabria, Cosenza, Praia a Mare	39.8936N 15.7834E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	GWORU378-10	Itálie	Calabria, Cosenza, Praia a Mare	39.9001N 15.7789E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	LEATG236-14	Itálie	Trentino-Alto Adige/Sudtirool	46.5N 11.345E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	LEATG487-14	Itálie	Trentino-Alto Adige/Sudtirool	46.5N 11.345E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	LEPAA214-16	Švýcarsko	Valais, Zwischbergen	46.1842N 8.15097E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	LEPAA327-16	Švýcarsko	Ticino, Rivera	46.0867N 8.92546E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	PHLAH796-12	Rakousko	Tirol, Osttirol	46.829N 12.768E	/	-	-	4	3
<i>C. marshalli</i>	MW01120	Francie	Maruejols-les-Gardons (100 m), Herault	44.0054106N 4.1317633E	/	-	-	4	3
<i>C. palemon palemon</i>	LB-0007	JAR	W. Paarl, Du Toits Kloof	33.637S 19.467E	-	-	/	1	1
<i>C. palemon palemon</i>	LB-0009	JAR	Odtshoorn, Swartberg Pass	33.36350S 22.064973E	-	/	/	1	1
<i>C. palemon palemon</i>	LB-0043	JAR	Greyton, Riviersonderend Mountaings - Bushman Trial	34.038861S 19.625167E	/	/	/	1	1
<i>C. palemon ghimirra</i>	LB-0149	Keňa	Kabaru forest, Nyeri	0.375839S 36.885840E	/	/	/	2	2
<i>C. palemon ghimirra</i>	LB-0186	Etiopie	Dorze Lodge	6.182222N 37.576389E	/	-	/	3	2
<i>C. palemon ghimirra</i>	LB-0187	Etiopie	Dorze Lodge	6.182222N 37.576389E	/	-	/	3	2
<i>C. palemon ghimirra</i>	LB-0188	Etiopie	Dorze Lodge	6.182222N 37.576389E	/	-	-	-	-
<i>C. palemon ghimirra</i>	MR_ZF_237	Etiopie	Dorze Lodge	6.182222N 37.576389E	/	-	-	-	-
<i>C. palemon ghimirra</i>	MR_ZF_246	Etiopie	Dorze Lodge	6.182222N 37.576389E	/	-	-	-	-
<i>C. virilis</i>	LB-0001	Zambie	Ndola env., Nsobe Game Park	13.23128S 28.4486E	/	/	/	13	6
<i>C. virilis</i>	LB-0004	Zambie	Ndola env., Fiwale Hill	13.12189S 28.42836E	/	/	/	13	6
<i>C. virilis</i>	LB-0066	Ghana	Amedzofe, Mountain Paradise	6.850941N 0.420421E	/	/	/	12	6
<i>C. virilis</i>	LB-0048	Zambie	Mwinilunga, Samwirang Hill	11.742169S 24.507828E	/	/	/	12	6
<i>C. virilis</i>	LB-0059	Zambie	Mwinilunga, Samwirang Hill	11.742169S 24.507828E	/	-	/	12	6
<i>C. virilis</i>	LB-0060	Zambie	Mwinilunga, Samwirang Hill	11.742169S 24.507828E	/	/	/	12	6
<i>C. virilis</i>	LB-0063	Zambie	NW Province, Chivoma env., Mwanamutowa	12.2226S 24.13178E	/	/	/	12	6
<i>C. virilis</i>	LSAFR1173-12	JAR	Gauteng prov., Hekpoort	25.938S 27.639E	/	-	-	12	6
<i>C. virilis</i>	LB-0064	Zambie	NW Province, Ikelenge, Kalene Hill	11.11522S 24.12247E	-	/	/	-	-
<i>C. virilis</i>	LB-0025	Omán	Rakhyut	16.7650867N 53.3355411E	/	/	/	14	7
<i>C. virilis</i>	LB-0168	Omán	Dhofar, Araanoot vic.	16.7028756N 53.147958E	/	-	/	15	7
<i>C. virilis</i>	LB-0174	Omán	Khalal	20.1686578N 58.6396869E	/	/	/	15	7

Druh	ID	Země	Lokalita	GPS	COI	Wg	EF1 α	H	G
<i>C. virilis</i>	LB-0159	Sokotra	Wadi Deneghen	12.5333331N 53.9666669E	/	/	/	16	7
<i>C. virilis</i>	LB-0160	Sokotra	Wadi Deneghen	12.5333331N 53.9666669E	/	-	/	16	7
<i>C. virilis</i>	LB-0161	Sokotra	Wadi Deneghen	12.5333331N 53.9666669E	/	-	/	16	7
<i>C. virilis</i>	LB-0162	Sokotra	Wadi Deneghen	12.5333331N 53.9666669E	/	/	/	16	7
<i>C. virilis</i>	LB-0163	Sokotra	Wadi Deneghen	12.5333331N 53.9666669E	/	-	/	16	7
<i>C. virilis</i>	LB-0164	Sokotra	Wadi Deneghen	12.5333331N 53.9666669E	/	/	/	16	7
<i>C. virilis</i>	LB-0165	Sokotra	Wadi Deneghen	12.5333331N 53.9666669E	/	/	/	16	7
<i>H. aequatorialis</i>	LB-0145	Keňa	Kabaru forest, Nyeri	0.375839S 36.885840E	/	-	/	-	-
<i>H. aequatorialis</i>	LB-0147	Keňa	Kabaru forest, Nyeri	0.375839S 36.885840E	-	-	/	-	-
<i>H. aequatorialis</i>	LB-0148	Keňa	Kabaru forest, Nyeri	0.375839S 36.885840E	/	-	/	-	-
<i>H. marungensis</i>	LB-0207	Kongo	Beni Nord-Kivu	0.4815569N 29.4528236E	/	-	-	-	-
<i>H. marungensis</i>	MR_ZF_053	Uganda	Western region, Kibale Forest NP, Kyanyawara	0.561192N 30.356959E	/	-	-	-	-
<i>H. marungensis</i>	MR_ZF_057	Uganda	Western region, Kibale Forest NP, Kyanyawara	0.561192N 30.356959E	/	-	-	-	-

/ ... použitelná sekvence DNA

- ... nevhodná sekvence DNA nebo netestováno