

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Michaela Rusková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Molekulární fylogeneze tribu Platerodini
(Coleoptera: Lycidae)

Bakalářská práce

Michaela Rusková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

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

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. Ing. Ladislava Bocáka, Ph.D. a uvedla veškeré literární prameny a zdroje, ze kterých jsem čerpala.

V Olomouci dne

Michaela Rusková

Souhrn

Tato studie se zaměřuje na kosmopolitně rozšířený tribus Platerodini (Coleoptera: Lycidae). V minulosti byla klasifikace skupiny chaotická vzhledem k morfolgiecké uniformitě a nejasné interpretaci morfolgieckých znaků. Proto je tato studie založena na molekulárních datech. Cílem práce je vytvoření molekulární fylogenetické hypotézy založené na celosvětové fauně přibližně 100 druhů rodu *Plateros*, který obsahuje podstatnou část diversity této linie. Na základě mitochondriálních markerů *rrnL*, *cox1* a *nad5* mtDNA, byly vytvořeny metodami maximum likelihood a Bayesiánskou analýzou fylogenetické stromy. Byla vyhodnocena shoda topologie v závislosti na aplikovaných algoritmech a byla popsána fylogenetická a částečně i morfolgiecká diverzita v jednotlivých oblastech. Výrazná diverzita morfolgiecká i genetická byla zjištěna v oblasti Neotropické a v této oblasti došlo i k oddělení nejstarších kládů. V oblasti Orientální je i přes menší fylogenetickou diverzitu zjištěn vysoký počet druhů. Fauny jednotlivých oblastí byly odděleny velmi brzy v evoluci tribu Platerodini. Z analýz byl potvrzen dvojitý vstup rodu *Plateros* do Australské a Afrotropické oblasti. Také bylo ve studii prokázáno, že nepříbuzné skupiny napodobují stejné aposematické vzory. Morfolgie a zbarvení jsou významně ovlivněny přírodním výběrem vedoucím k vysoké morfolgiecké podobnosti.

Summary

This study focuses on the world-wide distributed tribe, Platerodini (Coleoptera: Lycidae). The classification of the tribe was chaotic in the past due to morphological uniformity and an unclear interpretation of morphological features. This is the reason why this work is based on molecular data. Its aim is to create a molecular phylogenetic hypothesis based on world-wide fauna of approximately 100 species of *Plateros*, which is comprised of a substantial part of species in this lineage. The phylogenetic trees were created using methods of maximum likelihood and Bayesian analysis based on mitochondrial markers *rrnL*, *cox1* and *nad5* mtDNA. The consensual topology was evaluated depending on applied algorithms. Phylogenetic and partly morphological diversity in individual areas was also described. Both significant morphological and genetical diversity were found in the Neotropical realm and this area was also identified as an ancestral region of *Plateros*. In contrast with the lower phylogenetic diversity, there was a high number of species found in the Indomalayan realm. Faunas of individual areas were separated very early in Platerodini evolution. Two independent dispersal events were inferred for the colonization of Afrotropical and Australasian realms. Further, it was shown that unrelated groups imitate the same aposematic patterns. Morphology and colour patterns are substantially affected by the natural selection leading to high morphological similarity.

Poděkování:

Děkuji Prof. Ing Ladislavu Bocákovi, Ph.D. za odborné konzultace, věnovaný čas a vedení této bakalářské práce. Ráda bych také poděkovala Prof. Ing. Miladě Bocákové, Ph.D. za poskytnutí materiálu pro studii a veškerý další přínos. Dále můj velký dík patří všem v laboratoři molekulární systematiky, kteří mi s neskutečnou trpělivostí pomáhali i ve chvílích, kdy jsem se zdála být úplně ztracená a dalším, kteří mi při vypracování práce podali pomocnou ruku.

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíle Práce.....	2
3. Literární přehled	3
3.1 Diverzita a její význam pro ochranu přírody.....	3
3.2 Fylogenetická systematika.....	4
3.3 Molekulární systematika.....	4
3.4 Využití sekvenování při studiu fylogeneze	5
3.5 Fylogenetické hypotézy	7
3.6 Metody konstrukce fylogenetických stromů	8
3.7 Modelová skupina	11
4. Metody.....	14
4.1. Biologický materiál	14
4.2. Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	14
4.3. Seznam použitých přístrojů a zařízení.....	15
4.4. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	16
4.5 Zpracování dat a metody fylogenetické analýzy	21
5. Výsledky.....	23
5.1. Alignovaný dataset	23
5.2. Výsledky fylogenetické analýzy.....	25
6. Diskuze	30
6.1 IQ-TREE.....	31
6.2 MrBayes	31
6.3 Geografické rozšíření jednotlivých kládů.....	32
6.4 Fylogenetická diversita jednotlivých oblastí, význam pro ochranu diversity	32
6.5 Další cíle pro studium fylogeneze	32
6.6 Mimetické vzory.....	33
7. Závěr.....	34
8. Literatura	35

Seznam obrázků

Obrázek 1: Mapa mitochondriálního genomu *Platerodrilus* sp.

Obrázek 2: Vybraní zástupci tribu Platerodini, rod *Plateros*

Obrázek 3: Fylogram rodu *Plateros* s vloženou outgroup vytvořený pomocí IQ-TREE

Obrázek 4: Fylogram rodu *Plateros* bez outgroup vytvořený pomocí IQ-TREE

Obrázek 5: Porovnání fylogramů vytvořených s použitím IQ-TREE a MrBayes

Obrázek 6: Výběr jedinců rodu *Plateros* z různých lokalit, pro morfologické porovnání

Seznam tabulek

Tabulka 1: Přehled primerů použitých k amplifikaci vzorků DNA

Tabulka 2: Teplotní podmínky a časový profil PCR reakce pro *cox1* mtDNA a *nad5* mtDNA

Tabulka 3: Teplotní podmínky a časový profil PCR reakce pro *rrnL* rDNA

Tabulka 4 : Teplotní podmínky a časový profil sekvenační reakce

Tabulka 5: Přehled vlastností alignovaných sekvencí ve finální matici bez outgroup a použité modely pro jednotlivé fragmenty

Tabulka 6: Přehled vlastností alignovaných sekvencí ve finální matici s outgroup a použité modely pro jednotlivé fragmenty

1. Úvod

Poznání diverzity, její ochrana a udržitelný management, to jsou hlavní cíle mnoha biologických oborů. Molekulární systematika zastává výraznou roli v dosahování prvního z výše uvedených. Zaměřuje se na poznání a pochopení dlouhodobé evoluce biodiverzity, která je na planetě nerovnoměrně rozšířená a odráží evoluci jednotlivých skupin organismů. Na základě stále se rozšiřujícího souboru dat se snažíme zkompletovat hypotézu o vývoji veškerých organismů. Taková hypotéza by byla důležitým mezníkem pro molekulární systematiku, a proto má studium diverzity dlouhou historii. Prvotně je studium založeno na sběru dat v terénu, studiu morfologie a v posledních dekádách na molekulární systematice. Tato studie přispívá ke studiu diverzity zpracováním nových dat, která vedou ke zpřesnění hypotézy o evoluční historii a klasifikaci tribu Platerodini a o vzniku diverzity této skupiny a směru jejího šíření mezi kontinenty.

V minulosti byla klasifikace této skupiny chaotická a byl vytvořen větší počet rodů, které nepředstavovaly přirozené jednotky. Proto byly tyto rody následně synonymizovány. Tribus Platerodini (Coleoptera: Lycidae) obsahuje v současnosti přes 900 popsáných druhů a 9 rodů: *Callolycus* Gorham, 1881, *Cavoplateros* Pic, 1913, *Falsocalleros* Pic, 1933, *Microlycus* Pic, 1922, *Neoplateros* Kazantsev, 2006, *Plateromimus* Kazantsev, 2006, *Plateros* Bourgeois, 1879, *Teroplas* Gorham, 1884, *Ultroplateros* Kazantsev, 2006. Jedná se o kosmopolitně rozšířený tribus se zástupci na všech kontinentech, s výjimkou arktických a antarktických oblastí. Největším rodem, co do počtu druhů v tribu Platerodini, je rod *Plateros*. Vzhledem ke globálnímu rozšíření druhů tohoto rodu, které je stejné jako celého tribu Platerodini, představuje rod *Plateros* dostačující modelovou skupinu pro základní výzkum fylogeneze celého tribu.

2. Cíle Práce

Dosavadní rozsah dat pro studium fylogeneze tropických skupin je velmi omezený a především jsou nedostupná data z některých tropických oblastí. Cílem této studie je vyprodukovat primární data pro sestavení molekulární fylogeneze rodu *Plateros*. Tato studie bude založena pouze na mitochondriálních markerech a bude vyhodnocena jejich schopnost poskytnout fylogenetický signál pro mělká a hluboká štěpení. Na základě fylogenetického stromu bude vyhodnoceno zastoupení velkých kládů v jednotlivých zoogeografických oblastech, tj. fylogenetická diverzita a identifikace ancestrálního území. Mimo to bude vyhodnoceno rozšíření mimetických vzorů v této skupině.

3. Literární přehled

3.1 Diverzita a její význam pro ochranu přírody

Studium biodiverzity je jedním ze základních biologických oborů. Vzhledem k populační explozi a rozvoji průmyslu, zemědělství a těžby se stupňuje tlak na původní ekosystémy. Reálně hrozí, že část biodiverzity nebude poznána dříve, než dojde k její likvidaci (Sodhi a kol. 2004). Přitom je všeobecně známo, že biodiverzita je cenným zdrojem i z hlediska ekonomických aktivit člověka, například z důvodu dalšího využití zatím neobjevených přírodních zdrojů (Watson a kol. 1995).

Biodiverzita není po celé souši rovnoměrně rozdělená, ale odráží složité klimatické, geologické a evoluční procesy (Olson a kol. 2001, Myers 2002, Field 2009). Z hlediska velikosti studovaného biologického systému lze definovat tři úrovně diverzity: ekosystémovou, druhovou a genetickou (Heywood a Watson 1995). Ekosystémová diverzita zahrnuje rozmanitost společenstev organismů a je hodnocena až na úrovni biomů. Zachovávání diverzity na úrovni druhů, eventuálně vyšších úrovních (tzv. fylogenetická diverzita), je nutné pro uchování zdrojů sloučenin pro využití člověkem a pro zachování celkové biodiverzity na planetě. Podobně uchování genetické diverzity v rámci populací, je potřebné pro další vývoj populací. Například zachování heterozygotnosti má přímý vliv na biologickou zdatnost populací v dlouhodobém časovém horizontu (Reed a Frankhman 2003).

Studium druhové a fylogenetické biodiverzity je předmětem této studie. Druhová diverzita je charakteristika společenstev představující rozmanitost druhů nejčastěji v určité oblasti, nebo prostředí (Ross 1972) nebo z jiného pohledu je to počet druhů v jednotlivých evolučních liniích srovnatelného stáří. Druh je základní taxonomickou jednotkou v oblasti katalogizace a mapování biodiverzity, i když samotná definice druhu je mnohdy obtížná. Přitom vymezení druhu často výrazně ovlivňuje následné členění organismů v klasifikačním systému. Druhy jsou skupiny přirozeně se křížících populací, které jsou reprodukčně izolované (evolučně je zabráněno interbreedingu) od ostatních takových skupin (Mayr 1970). Mezi jedinci druhu existuje stálý genový tok, ačkoliv nemusí být stejně intenzivní mezi jednotlivými populacemi a uvnitř populací. Poté je preferována delimitace jednotlivých dem, které se vyznačují tím, že všichni jedinci tvoří panmiktickou jednotku. Počty druhů v jednotlivých evolučních liniích vypovídají o úspěšnosti dané

skupiny, protože linie s malým počtem druhů jsou výrazně ohroženy vymíráním (Raup 1986, Brook a Alroy 2017).

Rychlost evoluce je možno hodnotit z hlediska evoluce morfologických znaků, tuto označujeme jako anagenetickou rychlost evoluce (Rabosky a kol. 2013, Freyman a Höhna 2017). Vedle tohoto existuje také taxonomická rychlost evoluce, neboli speciální tempo, které vyjadřuje schopnost linie produkovat druhy. Vzhledem k tomu, že nejsme schopni oddělit vymírání a speciaci, hovoříme v tomto případě o netto, neboli čisté speciaci, tj. rozdílu vymírání a vzniků druhů. Taxonomická rychlost evoluce se hodnotí na základě nárůstu počtu linií v průběhu času (Ho a kol. 2005).

3.2 Fylogenetická systematika

Fylogenetika je naprosto zásadní pro hodnocení diverzity z hlediska jejího stáří a evoluční odlišnosti. Proto je dnes jedním z rychle se rozvíjejících biologických oborů a umožňuje podrobné studium na různých úrovních. Primárně se zabývá stanovením příbuzenských vztahů mezi jednotlivými organismy. V minulosti se organismy klasifikovaly převážně na základě své morfologické podobnosti (Wiens 2004). Tato metoda je však v dnešní době již zastaralá, neboť organismy se často diferencují velmi složitým způsobem a morfologická odlišnost nemusí nutně znamenat odpovídající genetickou divergenci. Například dochází opakovaně k vývoji podobných struktur působením přírodního výběru v nepříbuzných skupinách – konvergence (Christin a kol. 2012) nebo nezávislému vývoji podobných struktur v příbuzných skupinách – paralelismy (Scotland 2011). Stále se však morfologické analýzy používají vzhledem k možnosti rychlého kódování znaků a malé náročnosti na vybavení. V posledních dekádách se doplňují metody studia fylogeneze o zkoumání organismů na molekulární úrovni a tento obor v současnosti označujeme pojmem molekulární nebo fylogenetická systematika.

3.3 Molekulární systematika

Molekulární systematika je proces vytváření fylogenetické hypotézy s použitím molekulárních dat, čímž dochází k výraznému pokroku a zjištění mnoha omylů vycházejících z čistě morfologického hodnocení (Bocák a kol. 2018). Molekulární fylogenetika zkoumá konkrétní molekulární znaky. Jedná se v tomto případě především o uspořádání pořadí bází nukleových kyselin nebo pořadí aminokyselin. Nukleové kyseliny a aminokyseliny se vyskytují u všech živých organismů, proto je lze použít pro zkoumání

veškerých taxonů a sjednotit tak postupy fylogenetických analýz. Především se používají mitochondriální markery, nebo ribozomální geny jako *LSU* rRNA a *SSU* rRNA (Caterino a kol. 2000, Nazari a kol 2007).

Možností je samozřejmě více, ovšem v dnešní době se pro zkoumání genomu nejčastěji využívají molekulárních metody genového sekvenování, které vytlačily ostatní metody například analýzy restričních fragmentů. Sekvenování je několik typů: Sangerovo sekvenování (Sanger 1977), sekvenování nové generace (Zhang a kol. 2011), nebo sekvenování třetí generace. Ovšem všechny spojuje výsledek v podobě zjištění sekvence bází nukleových kyselin zkoumaného organismu a metody se liší především objemem získaných dat. Na základě studia sekvencí, konzervativních a variabilních úseků DNA a jejich změn, je možné datovat evoluční události.

3.4 Využití sekvenování při studiu fylogeneze

V počátcích molekulární systematiky u hmyzu se začínalo sekvenováním *SSU* rRNA (18S) – neboli části malé ribozomální podjednotky eukaryot (Field 1988, Turbeville 1991). Ovšem při dalším používání tohoto fragmentu se začaly ukazovat i jeho nevýhody, kdy například mouchy (Diptera) mají v tomto úseku zvýšenou rychlost substituce proti jiným řádům Holometabola a nemohly být proto jednoduše analyzovány (Carmen a kol. 1992).

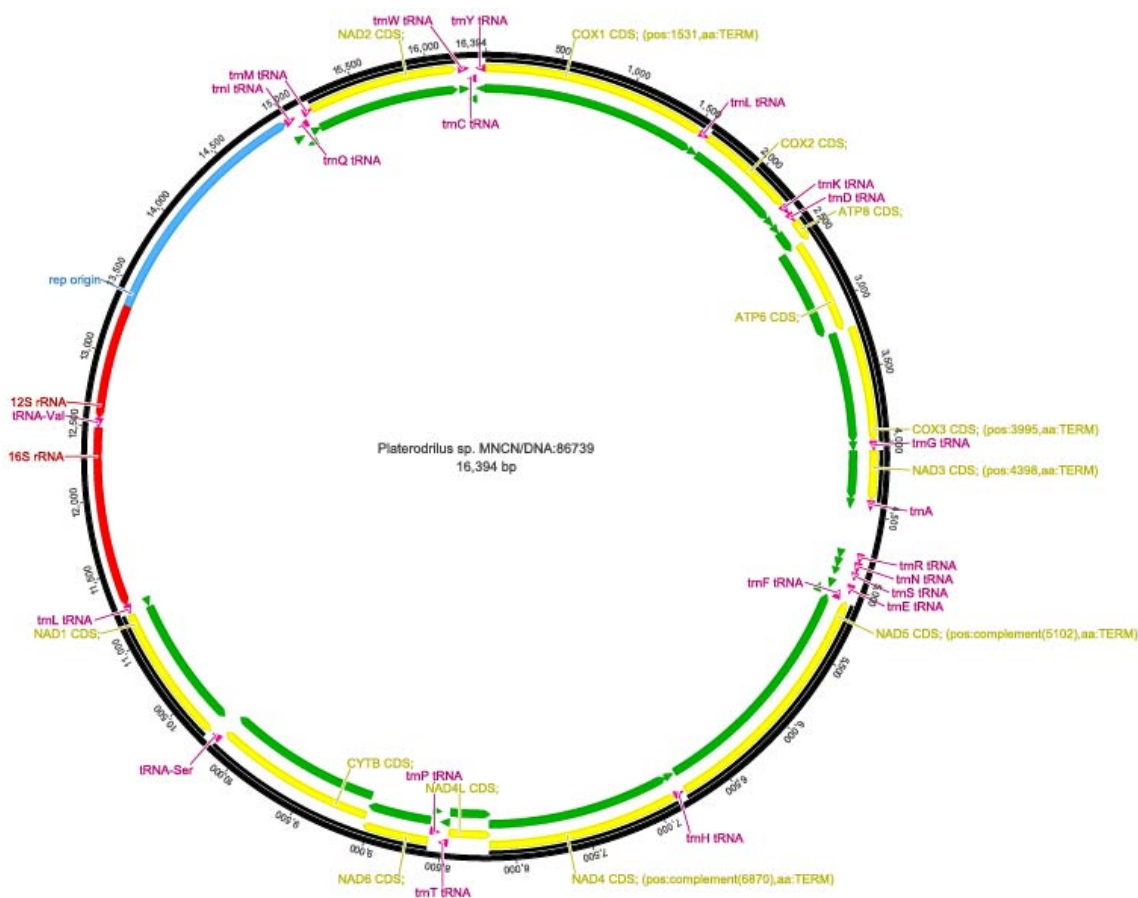
Pro zpřesnění analýz se začalo kombinovat větší množství fragmentů, zpočátku například *LSU* rRNA (28S) – velká ribozomální podjednotka, nebo mitochondriální geny pro cytochrom oxidázu (*cox*) (Liu a Beckenbach 1992). Nejlepší výsledky jsou získány kombinací co největšího množství genů (Kjer 2016).

Při Sangerově sekvenování se nejčastěji sekvenují mitochondriální geny *rrnL* rRNA (16S), *rrnS* rRNA (12S), *coxI* mtDNA (*coi*). Jelikož v mitochondriálním genomu dochází k více přestavbám, než v jaderných genech, je problematické jejich využití u vzdáleně příbuzných skupin organismů. Zároveň použití rDNA je problematické pro stanovení blízkce příbuzných skupin (Simon a kol. 1994, Mallet a Willmont 2003). Byla snaha o nalezení vhodnějších úseků pro analýzu, nejlépe v rámci jaderné DNA a také o sjednocení sekvenovaných úseků k vytvoření větší a konzistentnější databáze (Caterino a kol. 2000). Pro fylogenetické porovnávání všech organismů v programu „Barcoding of life“ byl jako nejvíce vypovídající určen gen *coxI* mtDNA (Hebert 2003).

Sekvenování nové generace umožnilo kromě efektivnějšího sekvenování mitochondriálních genů (Liu 2016) i celogenomové sekvenování a sekvenování transkriptomů. Studium celého genomu (Niehuis a kol. 2012) a transkriptomů (Misof a kol. 2014) například podalo konečné důkazy o sporu kolem řádu Strepsiptera a určilo ho jako sesterský k řádu Coleoptera.

Obecným problémem metod genového sekvenování je nutnost získání kvalitního materiálu pro izolaci DNA. I když by bylo nejlepší v minulosti pouze morfologicky definované druhy zpětně zařadit i na základě genetické analýzy, vyvstává v tomto ohledu mnoho problémů. Většina z v minulosti klasifikovaných druhů byla nasbírána v nížinách rovníkových oblastí, kde aktuálně dochází k výrazné deforestaci (Sayer 1991). Použití molekulárních metod dále závisí na množství a kvalitě získané DNA, kdy při zhoršených podmínkách sběru a špatných skladovacích podmínkách dochází k její degradaci. Tuto práci také komplikuje vysoká fragmentace DNA u ethyl acetátem usmrcených a následně vzduchem sušených exemplářů (Dillon a kol. 1996) a u exemplářů ze starších sbírek, kde může docházet k napadení plísněmi (Townson a kol. 2002).

V této práci byly pro analýzu použity fragmenty DNA, které obsahovaly tři níže popsané geny: *rrnL* rDNA (16S) je vysoce konzervativní úsek používaný nejčastěji k fylogenezi bakterií (Case a kol. 2007), zároveň dobře prozkoumaný i jako součást mitochondriálního genomu eukaryot (Caterino a kol. 2000). Tento gen kóduje malou ribozomální podjednotku. *Nad5* mtDNA (ND5) je oblast mitochondriálního genomu, která kóduje geny pro NADH dehydrogenázu 5, protein patřící do většího enzymatického komplexu 1, který je aktivní během oxidativní fosforylace (Wolstenholme 1992). Dále byla sekvenována část obsahující podjednotku I cytochrom c oxidázy (*coxI*). Tato část mitochondriálního genomu kóduje protein dýchacího řetězce (Clary a Wolstenholme 1985) a je katalytickou jednotkou enzymu. Kde se tyto geny nachází v mitogenomu, konkrétně u rodu *Platerodrilus*, který má stejné pořadí genů jako rod *Plateros*, je popsáno na obrázku 1. S použitím fragmentů jsou následně prováděny fylogenetické analýzy, jejichž výsledkem je vytvoření evoluční hypotézy, neboli fylogenetického stromu.



Obrázek 1: Mapa mitochondriálního genomu *Platerodrilus* sp. (převzato z Uribe a Gutiérrez-Rodríguez 2016)

3.5 Fylogenetické hypotézy

Tvorba fylogenetické hypotézy je vizualizovaná jako fylogenetický strom, který sumarizuje evoluční vztahy mezi organismy. Jedná se tedy o grafické vyjádření fylogeneze. Stromy jsou necyklické grafy spojující jednotlivé uzly. Uzly se dělí na vnitřní, nebo také hypotetické taxonomické jednotky a terminální, které mohou být pojmenovány (Wiley 1985). V tom případě se strom bere jako označený. Uzly jsou spojeny takzvanými větvemi, které buď končí terminálním uzlem, v tom případě se nazývají periferní, nebo spojují dva vnitřní uzly a jedná se tím pádem o větve vnitřní. Centrální větev spojuje více větví vnitřních. Strom může a nemusí mít kořen, který představuje společného předka všech taxonů fylogenetického stromu. Kořen lze získat pomocí přidání vnější skupiny (outgroup). Tato nesmí být výrazně fylogeneticky vzdálená od taxonu vnitřních skupin, aby nedošlo k nesprávnému určení společného předka (Kjer 2016). Větvím stromu jsou

často přiřazovány určité hodnoty – délka, které nejčastěji udávají čas, počet změn, nebo jejich pravděpodobnost. Také je možné hodnotit robustnost linií na základě Monte Carlo statistických neparametrických metod jako je například bootstrap (Felsenstein 1985).

Cílem dnešních systematiků je sestavení takzvaného stromu života. Tento fylogenetický strom má shrnovat všechny organismy žijící na zemi a rozdělit je dle jejich evolučního původu (Hinchliff a kol. 2015). Ukazuje, jak se organismy postupně vyvíjely z jednoho společného předka. Z tohoto rozdělení je možno vycházet při studiu složitějších organismů studiem jejich primitivnějších předků.

3.6 Metody konstrukce fylogenetických stromů

Při výběru metody fylogenetické rekonstrukce je důležité porovnat, jaká z dostupných metod je nejvhodnější pro práci s naším datovým souborem. Je třeba zohlednit například velikost a komplikovanost dat. V této práci byly využity dvě metody umožňující fylogenetickou rekonstrukci. Zaprvé metoda maximum likelihood, která je obecnou statistickou metodou pro stanovení pravděpodobnosti hypotéz. Zadruhé metoda Bayesiánské fylogenetické analýzy s použitím Monte Carlo Markovových řetězců.

3.6.1 Metoda maximum likelihood (ML)

Metoda maximum likelihood využívá hodnoty pravděpodobnosti pro každý jeden prvek v celkovém souboru dat. Výsledný fylogenetický strom je tak tím nejpravděpodobnějším s ohledem na pravděpodobnost všech zahrnutých oblastí. Jinými slovy, je to nejvyšší podmíněná pravděpodobnost, že uvedená data budeme pozorovat při uvedené hypotéze. V kontextu fylogenetické analýzy DNA sekvencí se jedná o pravděpodobnost, že s použitím konkrétního substitučního modelu pro konkrétní strom se vyvinuly dané konkrétní sekvence.

Při využití metody ML ve fylogenetické analýze zohledňujeme i délku jednotlivých větví stromu. To je hlavní důvod, proč je tato metoda v tomto případě vhodnější, než například metoda maximální parsimonie, která nepočítá s pravděpodobností individuálních změn (Felsenstein 1981). S rostoucí délkou větví se zvyšuje i pravděpodobnost vícenásobných substitucí v dané pozici a to je zohledněno při vytváření celkové pravděpodobnosti evolučního scénáře.

Pro správné určení pravdivosti hypotézy metodou maximum likelihood je nutné předem definovat parametry evolučního modelu. Nejvhodnější model pro danou sekvenci je vyhodnocen pomocí konkrétních počítačových programů (např: IQ-TREE: Nguyen a kol. 2015). Rozdílné modely berou v potaz odlišné doplňující parametry. Jedná se například o různou pravděpodobnost tranzicí a transverzí, nebo zastoupení purinových a pyrimidinových bází. Také pravděpodobnost substitucí u genů kódujících proteiny není rovnoměrná, častěji se záměny objevují na třetí pozici v kodonu, kdy dochází pouze k tiché mutaci, které souvisí s degenerací genetického kódu (jedna aminokyselina je kódována více tripletami) (Källersjö 1999). Ale stejně jako evoluce sama i tvorba evolučních fylogenetických stromů metodou ML je ovlivněna počátečním souborem dat, neboli vloženým alignmentem. Algoritmus postupuje vždy od stromů s nižší pravděpodobností ke stromům s pravděpodobností vyšší. Z toho důvodu se může zastavit na lokálním vrcholu vlastní programové adaptivní krajiny.

3.6.2 Bayesiánská analýza s využitím Monte Carlo Markovových řetězců

Tato metoda pro sestavení fylogenetického stromu využívající místo takzvané frekventistické statistiky, která přiřazuje určitému jevu pravděpodobnost na základě pozorování daného jevu v rámci pokusů, statistiku Bayesiánskou. Tato chápe pojem pravděpodobnost odlišně. Umožňuje přiřadit pravděpodobnost jevu bez předchozího pozorování, pouze na základě subjektivního předpokladu a vychází z práce Thomase Bayese z roku 1764 - An Essay towards solving a Problem in the Doctrine of Chances (Esej o řešení problému v doktríně o možnostech). Který definoval takzvanou Bayesovu větu.

$$P(H, D) = \frac{P(D, H)P(H)}{P(D)}$$

P – Pravděpodobnost, H – Hypotéza (strom), D – Vlastní data (alignment)

Apriorní pravděpodobnost $P(H, D)$ udává pravděpodobnost s jakou je námi vytvořená hypotéza pravdivá. Tato pravděpodobnost se vytváří na základě již proběhlých analýz předchozích fylogenetických hypotéz. Tato proměnná má díky své subjektivitě vysokou náchylnost k statistickým nepřesnostem. Věrohodnost $P(H)$ udává, s jakou pravděpodobností se podaří získat data, která potvrdí námi stanovenou hypotézu. Jmenovatel vzorce tvoří pravděpodobnost vlastního souboru získaných dat $P(D)$, neboli

pravděpodobnost s jakou jsou námi získaná data tvořící fylogenetický strom správná. Aposteriorní pravděpodobnost $P(H,D)$ udává, s jakou pravděpodobností je hypotéza týkající se našeho fylogenetického stromu platná na základě získaných dat.

3.6.3 Monte Carlo Markovovy řetězce (MCMC)

MCMC jsou klíčovým krokem v Bayesiánské analýze pro možnost počítat velké modely, pracující až s tisíci neznámých parametrů. Na rozdíl od metody maximální pravděpodobnosti umožňuje překonat i údolí v krajině stromů a tím získat strom s nejvyšší globální pravděpodobností (Larget a Simon 1999). Jedná se o situaci, kdy přechod z jednoho do druhého stavu závisí pouze na současném stavu a nikoli na stavech předchozích. Toto rozdělení má pak na základě výše zmiňovaných podmínek rovnovážnou distribuci.

Princip této metody je založen na určení topologie počátečního stromu s odpovídajícím substitučním modelem (H_a) a vypočtena jeho pravděpodobnost. Poté je vzorkována krajina stromů a to v několika krocích. Nejprve je strom a model pozměněn v rámci apriorních předpokladů (H_b) a je vypočtena pravděpodobnost nového stromu. Na základě těchto dat se pomocí níže uvedeného vzorce vypočtena akceptance (R).

$$R = \frac{P(D, H_b)P(H_b)}{P(D, H_a)P(H_a)}$$

P – Pravděpodobnost, H_b – Hypotéza pozměněná v rámci apriorních předpokladů, H_a – Počáteční hypotéza s odpovídajícím substitučním modelem, D – Vlastní data, R – Akceptace

Pokud je akceptance větší nebo rovna jedné, strom je akceptován. Pokud je nižší než jedna, vygeneruje se náhodná hodnota a pokud je ta nižší, než R , strom je také akceptován. Pokud je tato nová hodnota vyšší, strom je zamítnut a pokračuje se s původním stromem. Nakonec se ustálí v oblasti stromů s vysokou pravděpodobností a ty pak vzorkuje v mnoha generacích, tento proces se nazývá konvergence (Rannal a Yang 1996).

U pravděpodobnostních rozdělení s využitím Markovových řetězců se zvažují všechny možné kombinace shod, neshod i mezer při řazení sekvencí. Následně je hodnocena pravděpodobnost výskytu konkrétního znaku a pravděpodobnost změny konkrétního znaku na jiný. Pracují i s pravděpodobností, že vedle jednoho konkrétního znaku v sekvenci se vyskytuje konkrétní znak další. Zohledňují tak nejen pravděpodobnost

výskytu znaku mezi sekvencemi, ale i v jedné samostatné sekvenci. Může se buď stát, že se znaky mezi pozicemi neovlivňují, nebo že sekvence znaků ovlivňuje výskyt znaků následujících. Při práci se sekvencemi DNA se minimálně zvažuje řetězec šesti znaků, neboť jednotlivé aminokyseliny se v sekvenci nevyskytují náhodně. Konkrétní znaky se objevují s konkrétní četností. Zároveň existuje různá pravděpodobnost výskytu sousedních aminokyselin podle typu zkoumané sekvence.

3.7 Modelová skupina

Coleoptera jsou nejdiverzifikovanější skupinou organismů a v současnosti je popsáno téměř 400 000 druhů (Bocák a kol. 2014). Jako modelová skupina je použita čeleď Lycidae, která je jednou z nejvýznamnějších čeledí nadčeledi Elateroidea, zahrnující na 160 popsaných rodů a přes 4500 druhů (Bocák a kol. 2008). V současnosti je tato čeleď klasifikována v nadčeledi Elateroidea. V dřívějších klasifikacích však tvořili samostatnou nadčeleď Cantharoidea společně s Cantharidae (páteříčkovití), Lampyridae (světluškovití), Drilidae, Omalisidae, Phengodidae, Rhagophthalmidae, Brachypsectridae a Telegeusidae, jež spojovala podobná morfologie dospělců (Lawrence a Newton 1982).

Zástupci čeledě Lycidae jsou kosmopolitně rozšíření. Nevyskytují se pouze v polárních oblastech a na územích bez dřevinné vegetace. Žijí především v zastíněných a vlhkých lesích. Pro Lycidae je typický těžkopádný a pomalý let daný nízkou sklerotizací jejich těla (Bocák a Bocáková 2008). Larvy Lycidae se živí fermentovanými tekutinami hniјícího dřeva a dospělí jedinci potravu nepřijímají vůbec, eventuálně někteří v suchých oblastech vyhledávají nektar (Bocák a Matsuda 2003). Silná vazba larev na hniјící dřevo, citlivost na vysychání a malá pohyblivost má negativní vliv na vagilitu těchto organismů. Omezený pohyb je typický i u dospělců, kteří se celý svůj život pohybují jen v nejnižších patrech tropického deštného lesa. Z toho také vyplývá, že největší druhová diverzita této čeledi je v rovníkových oblastech a druhy se často vyskytují v malých areálech. Směrem k pólům se diverzita postupně snižuje (Bocák a kol. 2008).

Před predátory se brouci čeledi Lycidae brání vypouštěním silně zapáchající hemolymfy na okrajích krovek, mezi články končetin a na tykadlech. Nejsou jedovatí, ale zapáchající a hořcí (Bocák a Matsuda 2003). Také je pro tuto čeleď typické aposematické zbarvení (Lindsley a kol. 1961, Bocák 2003, Eisner a kol. 2008).

3.7.1 Tribus Platerodini (podčeled' Lycinae)

Do tribu Platerodini je v dnešní době zahrnuto přes 900 formálně popsáných druhů. Řadí se tak na druhou příčku v počtu druhů po Metriorrhynchini (Miller 1997, Bocáková 2001, Bocák a Bocáková 2008). Poprvé byl supergenerický taxon, dnes chápaný jako tribus Platerodini, stanoven Kleinem (1928), jako podčeled' Platerodinae. Byly zde zařazeny rody *Plateros*, *Ditoneces*, *Lyponia*, *Dihammatus* a *Melampyrus*. Koncept této skupiny Kleine (1933) více osvětlil ve svém katalogu druhů čeledi Lycidae. Tomuto taxonu snížil status na úroveň tribu a zařadil sem celkem 30 taxonů skupiny rodu (27 rodů, 3 nenominotypické podrody – viz Tabulka 1). Většina rodů, převážně těch, jež byly popsány francouzským autorem M. Picem, nebyla po svém popisu nikdy použita jinými autory. Z výše uvedených třiceti taxonů skupiny rodu řazených do tribu Platerodini bylo M. Picem popsáno 15, přičemž 11 z nich bylo monotypických. Toto vyústilo ve značnou fragmentaci skupiny. Takto chápaný tribus Platerodini akceptovali Bocák a Bocáková (1989) a rozlišili zde dva nové podtriby Libnetinina a Lyponiina, avšak klasifikace uvnitř podtribů stále zůstávala nejasná.

Bocáková (2001) publikovala dosud nejpodrobnější a jedinou moderně pojatou fylogenetickou studii tribu Platerodini. V této práci také zvýšila status tribu na úroveň podčeledi Platerodini. Zpracování analýzy bylo doprovázeno rodovou revizí, kdy 12 taxonů skupiny rodu bylo synonymizováno k rodu *Plateros* a další dva k rodům *Falsocalleros* a *Cavoplateros* (viz Příloha 4). Po této revizi zůstávalo v tribu Platerodini 7 platných rodů. Nedávno byl synonymizován rod *Sculptocalleros* (Nascimento a Bocáková 2012). Dále byly popsány rody *Neoplateros*, *Plateromimus* a *Ultroplateros* (Kazantsev 2006). Tribus Platerodini má tak v současnosti 9 platných rodů (viz Příloha 4).

Ke studiu příbuzenských vztahů dále Bocáková (2001) zpracovala matici morfologických znaků. Fylogenetická analýza s využitím kritéria maximální parsimonie ukázala rod *Lyponia* jako nejbazálnější větev Platerodini. Od hypotetického společného předka skupiny se tedy oddělil tento rod jako první. Mezi další bazálně se odštěpující větve patřily středoamerické rody *Calolyrus* a *Microlycus* tvořící nerozřešenou trifurkaci s celým zbytkem skupiny, který představovaly větve Platerodini s. str. a Libnetini v sesterské pozici. V rámci větve Platerodini s. str. analýza ukázala bazální postavení dvou neotropních rodů *Teroplas* a *Falsocalleros*. Kopulační orgány samců těchto rodů mají vyvinuty paramery, ačkoliv v tomto případě jsou již redukovány. Další neotropický rod *Cavoplateros* a celosvětově nejrozšířenější rod *Plateros* tvořily sesterské terminální větve.

Jejich synapomorfii je úplná absence paramer na kopulačních orgánech samců. V rámci tribu Libnetini fylogenetická analýza (Bocáková 2001) ukázala bazální postavení rodu *Dihammatus*, který vykazoval sesterskou pozici ke korunové větvi *Libnetis* + *Libnetisia*.

První molekulární analýzy čeledi Lycidae (Bocák a kol. 2008) představovaly zásadní změnu v chápání této skupiny. Rod *Libnetis* byl do té doby považován za blízký tribu Platerodini. Ukázal se však být buď nejbazálnější odštěpující větví celé čeledi v sesterské pozici ke zbytku Lycidae (Bocák a kol. 2008), nebo sesterský k větvi Lycinae + Dictyopterinae + Ateliinae (Kundrata a kol. 2014). Avšak obě tyto analýzy ukázaly triby Libnetini, Lyponiini a Platerodini s. str. roztroušené na stromu čeledi Lycidae. Tím prokázaly, že podčeleď Platerodinae v původním pojetí určená Kleinem (1928) byla polyfyletická (Kleine 1933, Bocák a Bocáková 1989, Bocáková 2001). Velká řada z charakteristických znaků této skupiny patřila k externím morfologickým znakům. U těchto znaků je vysoký výskyt konvergentně vyvinutých znaků, což má negativní důsledky pro klasifikaci na jejich základě. Obě výše uvedené molekulární analýzy ukázaly blízkou příbuznost rodů *Plateros* a *Eurrhacus*, který byl dříve řazen do tribu Calopterini (Bocák a Bocáková 1989, Bocáková 2003). První molekulární analýza čeledi Lycidae (Bocák a kol. 2008) ukázala rod *Plateros* jako sesterskou skupinu větve *Eurrhacus* + *Conderis*. Druhá z uvedených molekulárních analýz (Kundrata a kol. 2014), která se zabývala příbuzenskými vztahy celé nadčeledi Elateroidea, ukázala rody *Plateros* a *Eurrhacus* přímo jako sesterské větve. Blízká příbuznost rodů *Plateros* a *Eurrhacus* je podporována předpokládaným synapomorfním znakem, a to absencí paramer u samčích kopulačních orgánů.



Obrázek 2: Vybraní zástupci tribu Platerodini, rod *Plateros*. Zleva vzorky MR0057 z Bornea, MR0055 z Papuy a MR0064 z Panamy.

4. Metody

4.1. Biologický materiál

Předmětem studie je tribus Platerodini. Podle poslední klasifikace tento tribus obsahuje 9 rodů, z toho však pouze jeden, *Plateros*, který tvoří většinu druhů v tribu, byl k dispozici pro tuto molekulární analýzu. Materiál pro práci byl shromážděn v laboratoři molekulární systematiky PřF UPOL, v laboratoři Prof. M. Bocákové z Pedagogické fakulty UP a dalšími sběrateli v letech 2001–2016. Původem je materiál převážně z východní a jihovýchodní Asie, subsaharské Afriky a jižní Ameriky s několika vzorky ze Severní Ameriky. Vzorky byly uloženy v 96% ethanolu a uchovávány v -20°C do doby izolace DNA, která byla izolovaná z celkem 104 jedinců s označením MR0001 – MR0104. 18 jedinců z Peru, 22 z ostrova Borneo, 6 z ostrova Halamhera, 7 ze Sulawesi a 12 z Papuy, 14 vzorků z Ecuadoru, 12 z Filipín, 4 z Etiopie, dva vzorky z Laosu, tři z USA jak je uvedeno v tabulce studovaného materiálu (viz Příloha 1). Dále byla ke vzorkům přidána data již v minulosti získána laboratoří v rámci jiných studií. Jednalo se o 59 vzorků. Tyto vzorky pocházeli z různých částí světa: 8 jedinců pocházelo z Kamerunu, 7 z Malajsie, 6 z Ekvádoru, 4 z Japonska, 4 z Laosu, po třech jedincích z Taiwanu, Indie a Bornea. Po dvou jedincích bylo nalezeno ve Vietnamu, v Nikaragui, v USA, Kanadě, Zambii, Argentině a Kostarice. Dále bylo zařazeno do analýzy po jednom vzorku ze Sumatry, Keni, Thajska, Panamy, Jižní Afriky a Francouzské Guyany (viz Příloha 2).

Jako outgroup, pro určení kořene stromu, byl do souboru vzorků zařazen jedinec rodu *Lycostomus* s číslem UPOL 0370, původem z Indie. Tato data byla brána již z dříve zveřejněných studií a jsou veřejně přístupná v databázi GenBank pod přístupovými kódy KF806858.1 (*rrnL*), KF806785.1 (*coxI*), KF806821.1 (*nad5*).

4.2. Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

Agaróza (Invitrogen, kat. č. 15510–027)

BIOTAQ[®] DNA Polymeráza (Bioline, kat. č. BIO–21042)

dNTPs Mix, 2 mmol.l⁻¹ každý (Thermo Scientific, kat. č. R0242)

Gel Red[™] Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, kat. č. 41003)

Glycerol bezvodý (kat. č. 30270)

Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, kat. č. 4311320)

Chlorid hořečnatý 50mmol.l⁻¹ (Invitrogen, kat. č. 10966–034)

Chlorid hořečnatý 50mmol.l⁻¹ (Bioline, kat. č. BIO–21042)

Platinum® Taq DNA Polymeráza (Invitrogen, kat. č. 10966–034)

Primery (generi biotech)

Pufr PCR 10x (Invitrogen, kat. č. 10966–034)

Pufr NH₄ 10x (Bioline, kat. č. BIO–21042)

Standard molekulové hmotnosti Lambda DNA/HindIII Marker (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM0102)

UV ethanol 99,8% (Lach-Ner, kat. č. 20025–U99)

4.2.2 Použité soupravy

DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, kat. č. 69506)

ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, kat. č. 4336776)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

50x TAE (pH 8,5): bylo rozpuzpuštěno 242 g Tris za stálého míchání v 800 ml dH₂O, přidáno 100 ml 0,5M EDTA (pH 8) a 57,1 ml ledové kyseliny octové, objem doplněn do 1000 ml.

0,5M EDTA (pH 8): bylo rozpuštěno 9,3 g Na₂EDTA·2H₂O v 50 ml dH₂O, přidáním NaOH upraveno pH na hodnotu 8,0, doplněno do 100 ml a následně sterilizováno.

Pufr nanásečí: bylo smícháno 10 mg bromfenolové modři a 3 ml glycerolu, směs byla doplněna do 10 ml vodou.

4.3. Seznam použitých přístrojů a zařízení

Analytické váhy ACB*plus* - 150 (aeAdam)

Analyzátor genetický ABI, 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)

Centrifuga 5810 R (eppendorf)
Centrifuga EPP 5424 (eppendorf)
Koncentrátor 5301 (eppendorf)
Minicentrifuga (Labnet)
Miska pro autoforézu Mupid – exU (ADVANCE)
Spektrofotometr Nano Drop ND-1000 (NanoDrop)
Stereomikroskop Olympus SZX16 (Olympus)
Systém Bio Imaging IN genius (Syngene)
Termoblok Thermomixer komfort (eppendorf)
Termocykler GeneAmp PCR Systém 9700 (Applied Biosystems™)
Termocykler TGradient (Biometra)
Vakuová pumpa FB70155 (Fisherbrand)
Výrobník vločkového ledu F 125 Compact (Icematic)

4.4. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Izolace DNA

DNA byla izolovaná ze svaloviny metatoraxu, která byla pod binokulární lupou vypreparována a poté přenesena do mikrozkuřavky. Zbytek vzorku byl vypreparován a uložen v referenční sbírce školitele pro morfologické porovnání. Izolace DNA byla prováděna pomocí kitu DNeasy Blood and Tissue kit od výrobce QIAGEN.

Vypreparovaná svalovina byla 5 minut sušena ve vakuovém koncentrátoru. Do každé mikrozkuřavky bylo přidáno 180 μ l ATL pufru a 20 μ l proteinasy K. Tkáň byla homogenizována pomocí sterilní tyčinky. Vzorky byly vloženy do termobloku na 30 minut, 56 °C a 400 rpm, kde probíhala buněčná lyze. Při větší koncentraci nezlyzovaných částí se vzorky přepipetovaly do nových mikrozkuřavek. Ke každému vzorku bylo přidáno 200 μ l AL pufru, vzorky byly protřepány a dále bylo přidáno 200 μ l 96% UV ethanolu a opět byly vzorky s použitím vortexu protřepány. Vzorky byly přeneseny na kolony se sběrnou mikrozkuřavkou a centrifugovány 1 min při 8 000 rpm. Poté byla kolona přenesena na novou sběrnou mikrozkuřavku, přidáno 500 μ l AW1 pufru

a centrifugováno při 14 000 rpm 1 minutu. Kolona byla opět přenesena, přidáno 500 μl AW2 pufru a centrifugováno 3 minuty při 14 000 rpm. Poté se kolony naposledy centrifigovaly nasucho jednu minutu při 14 000 rpm. Kolony byly přeneseny na první sadu mikrozkumavek se zámekem a bylo přidáno 100 μl nuklease free H_2O . Inkubace ve zkumavkách probíhala 1 minutu při pokojové teplotě. Poté se vzorky centrifigovaly po dobu jedné minuty při 8 000 rpm. Byla izolována první eluce. Postup byl zopakován s použitím 50 μl nuklease free H_2O . Koncentrace DNA v obou elucích byla změřena na Nanodropu ND-1000 a pro další práci byl vzorek ředěn na koncentraci nepřesahující 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

4.4.2 PCR amplifikace DNA

Byly amplifikovány a sekvenovány tři DNA fragmenty skládající se z následujících genů nebo jejich částí: 800 bp *rrnL* rDNA (velká podjednotka ribozomální DNA, t-RNA-Leu a krátký fragment genu *nad1* mtDNA), 1100 bp *cox1* mtDNA (cytochrom c oxidáza 1 mtDNA, t-RNA-Leu a gen pro cytochrom c oxidázu 2 mtDNA) a 1180 bp *nad5* mtDNA (gen pro podjednotku NADH dehydrogenázy 5 mtDNA a t-RNA-Phe, t-RNA-Glu a t-RNA-Ser). Fragmenty jsou dále zkráceně označovány jako *rrnL* rDNA, *cox1* mtDNA a *nad5* mtDNA.

PCR reakce pro amplifikaci *cox1* mtDNA a *nad5* mtDNA obsahovala na jeden vzorek:

5 μl	10x PCR pufru
2 μl	50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2
1 μl	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ f primer
1 μl	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ r primer
1,25 μl	dNTPs 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$
0,2 μl	Platinum <i>Tag</i> DNA polymeráza 5U $\cdot\mu\text{l}^{-1}$
36,55 μl	H_2O
3 μl	DNA o koncentraci maximálně 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$

PCR reakce pro amplifikaci *rrnL* rDNA obsahovala na jeden vzorek:

5 μl	10x NH_4 pufru
2 μl	50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2

1 µl	10 µmol.l ⁻¹ f primer
1 µl	10 µmol.l ⁻¹ r primer
1,25 µl	dNTPs 2mmol.l ⁻¹
0,2 µl	BIOTAG DNA polymeráza 5U.µl ⁻¹
34,55 µl	H ₂ O
5 µl	DNA o koncentraci maximálně 10 ng.µl ⁻¹

Pro PCR amplifikaci byly použity primery uvedeny v Tabulce 1. Po neúspěšné amplifikaci některých vzorků ověřované pomocí elektroforetické separace byla amplifikace prováděna znovu s jinými primery, které jsou v této tabulce také zahrnuty.

Tabulka 1 : Přehled primerů použitých k amplifikaci vzorků DNA

GEN	Primer	Směr	Autor	Délka primeru	Sekvence
První amplifikace					
<i>nadh5</i> mtDNA	OF0	F	Bocák a kol.	29-mer	5'- CCTACTCCTGTTTC TGCTTTAGTTCATTC -3'
	R5	R	Bocák a kol.	29-mer	5'- GAAACGAAAAATCG TATTTAATTTTCGACT -3'
<i>cox1</i> mtDNA	Jerry M	F	Bocák a kol.	23-mer	5'- CAACAYYATTT TTGRTTYTTTGG -3'
	Marcy	R	Bocák a kol.	27-mer	5'- TARTTCRTATGWR CAATAYCAYTGRTG -3'
<i>rrnL</i> rDNA	16a	F	Simon a kol.	20-mer	5'- CGCCTGTTTA ACAAAAACAT -3'
	ND1AMetN	R	Simon a kol.	26-mer	5'- GGRCCYTTWCGA ATYTGAATATAVCC -3'
Opakování amplifikace					
<i>nadh5</i> mtDNA	OF0	F	Bocák a kol.	29-mer	5'- CCTACTCCTGTTTC TGCTTTAGTTCATTC -3'
	R2M	R	Bocák a kol.	29-mer	5'- AATTGAASCCAAAA AGAGGTATATCACTG -3'
<i>cox1</i> mtDNA	Jerry N	F	Bocák a kol.	23-mer	5'- CAAYTATTYT GATTYTTYGG -3'
	MarcyN	R	Bocák a kol.	24-mer	5'- TTCRTAWGTTC ARTATCATTGRTG -3'
<i>rrnL</i> rDNA	16a	F	Simona kol.	20-mer	5'- CGCCTGTTTA ACAAAAACAT -3'
	ND1-2	R	Simon a kol. Bocák a kol.	24-mer	5'- ATCAAAAGGAG CTCGATTAGTTTC -3'

Nastavení teplot termocykleru pro amplifikaci *cox1* mtDNA a *nad5* mtDNA shrnuje Tabulka 2 a pro *rrnL* rDNA Tabulka 3.

Tabulka 2: Teplotní podmínky a časový profil PCR reakce pro *cox1* mtDNA a *nad5* mtDNA

Fáze PCR reakce	Čas	Teplota [°C]	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	1 min	94	1
Denaturace DNA	1 min	94	
Annealing	1 min	45	40
Extenze	2 min	72	
Finální extenze	10 min	72	1

Tabulka 3: Teplotní podmínky a časový profil PCR reakce pro *rrnL* rDNA

Fáze PCR reakce	Čas	Teplota [°C]	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	2 min	96	1
Denaturace DNA	30 s	96	
Annealing	30 s	41	40
Extenze	1:45 min	72	
Finální extenze	10 min	72	1

4.4.3 Elektroforetická separace PCR produktu

Po dokončení amplifikace bylo nutné zkontrolovat její výsledek pomocí horizontální elektroforézy v 1% agarózovém gelu. Gely s výsledky elektroforézy byly hodnoceny v UV dokumentačním systému s CCD kamerou a zpracovány v počítačovém programu GeneSnap Version 7.02 (Syngene).

Pro jednu vaničku bylo rozvařeno v mikrovlné troubě 0,45 g agarózy v 45 ml 0,5x TAE (tris Acid EDTA) pufu. Po zchlazení na přibližně 50 °C bylo do směsi přidáno a rozmícháno 2,5 µl barviva GelRedTM Nucleic Acid Gel Stain pro zviditelnění PCR produktu. Poté byl gel přelit do připravené vaničky s hřebínky. Po ztuhnutí (cca 30 minut) byly hřebínky vyjmuty, vanička přenesena do elektroforetické komůrky a převrstvena 5x TAE pufrem. Do první jamky byl napipetován standart molekulové hmotnosti (Lambda DNA/HindIII Marker, 2, Thermo scientific). Do dalších jamek byly pipetovány vzorky v objemu 4 µl spolu s 1 µl nanášecího pufu. Elektroforetická separace probíhala 12 minut při 100 V. Po ukončení separace byl gel vyjmut a PCR produkty vizualizovány v procházejícím UV pomocí dokumentačního zařízení Syngene.

4.4.4 Purifikace PCR produktů

Purifikace probíhala pomocí destiček Millipore. Objem PCR produktu v destičce byl doplněn na 100 μl přidáním 54 μl TE pufru, důkladně propipetován a přenesen na destičku Millipore. Produkt byl filtrován pomocí vakuové pumpy (FB70155, Fisherbrand) 7-15 minut do úplného vyprázdnění destičky. Do přefiltrované destičky bylo pipetováno 78 μl nuklease free H_2O (8 μl na jamku) a destička byla opět filtrována do úplného vyprázdnění. Do jamek dvakrát filtrované destičky bylo následně napipetováno 20 μl nuklease free H_2O . Destička byla přelepena fólií a třepána deset minut při pokojové teplotě při 1 100 rpm. Dále byl purifikovaný produkt přepipetován do nové stříhací destičky, byl změřen obsah PCR produktu pomocí spektrofotometru ND-1000 a naředěn na koncentraci 25–60 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

4.4.5 Sekvenační reakce

Pro sekvenční reakci byl použit ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit.

Množství chemikálii pro sekvenační reakce na jeden vzorek:

1 μl	Big Dye
2 μl	Primery 1,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
1 μl	sekvenační pufr
5 μl	H_2O
1 μl	DNA o koncentraci v rozmezí 25–60 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$

Při nižší koncentraci vzorku než 25 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ byly vzorky ředěny na koncentraci 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ a přidávány v objemu 4 μl a voda v objemu 2 μl . Nastavení teplot termocyklieru je shrnuto v Tabulce 4. Byly použity stejné primery jako pro PCR reakci shrnutý v Tabulce 1.

Tabulka 4 : Teplotní podmínky a časový profil sekvenační reakce

Fáze sekvenační reakce	Čas	Teplota [$^{\circ}\text{C}$]	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	1 min	96	1
Denaturace DNA	10 sec	96	
Annealing	5 sec	50	25
Extenze	4 min	60	

4.4.6 Purifikace sekvenačního produktu

Purifikace sekvenačního produktu se provádí v ABI destičkách. K objemu vzorku po sekvenační reakci bylo přidáno:

49,5 μ l UV ethanol (96%)

1 μ l 3mol.l⁻¹ NaAc

9,5 μ l nuklease free H₂O

Poté byl sekvenační produkt protřepán na vortexu a nechán na ledu 15 minut zatemněný mléčnou matrací. Byl centrifugován 30 minut při 15 °C a 2 500 g. Obsah destičky byl vyklepnut a destička opět centrifugována při 700 g a 15 °C 1 minutu. Dále bylo do každé jamky destičky přidáno 60 μ l 80% UV ethanolu a destička byla centrifugována při 2 500g, 10 minut v 15 °C. Obsah destičky byl opět vyklepnut a destička opět centrifugována při 700 g a 15 °C 1 minutu. Dále bylo do každé jamky destičky přidáno 60 μ l 80% UV ethanolu a destička byla centrifugována při 2 500g, 10 minut v 15 °C. Nakonec byla destička sušena v zatemněném koncentrátoru (concentrator 5301, Eppendorf) 15 minut. Destička byla překryta šedou matrací, aby nedocházelo světlem k degradaci barviv a zamrazena pro další použití.

4.4.7 Příprava vzorků pro sekvenaci

Do každé jamky destičky bylo napipetováno 12 μ l formamidu, destička byla překryta šedou matrací a krátce stočena. Byla třepána na třepačce 15–30 minut (dle délky sekvencí) při 400 rpm a 24 °C. Dále se sekvenční produkt denaturoval na termocycleru (Biometra) při 95 °C po dobu tří minut. Denaturovaný sekvenční produkt byl dále prudce zchlazen na ledu. Před sekvenací byly vzorky krátce stočeny. Sekvence byla prováděna po dobu 4400 s v přístroji 31390 Genetic Analyzer (Applied BiosystemsTM). Výsledná data byla dále editována v počítači.

4.5 Zpracování dat a metody fylogenetické analýzy

Editace dat a alignment byly prováděny pomocí programů Sequencher 4.9 (Gene Codes Corp.), ClustalX 1.8 a Geneious 7.1, MAFFT Q-INS-i, FASconCAT 1.0., BLAST, IQ-TREE 1.6.1, FiqTree 1.4.3. Nejprve byly opraveny chyby ve čtení sevenovaného vzorku v programu Sequencher 4.9 a vyloučeny špatně osekvenované vzorky. S těmi se následně prováděla druhá amplifikace s použitím jiných primerů. V programu ClustalX 1.8.

(Thompson a kol. 1997) byl vytvořen první mnohočetný alignment, ale protože Clustal neumožňuje přímé opravy alignmentu, byly opraveny jen nejhrubší chyby a sekvence hodnoceny v programu Sequencher 4.9. Dále byl vytvořen trans alignment v programu Geneious 7.1. (Kearse a kol., 2012). Sekvence byly dočištěny, a byla přidána další skupina 58 vzorků osekvenovaných v laboratoři UPOL a jako outgroup jedinec rodu *Lycostomus* (UPOL 000L27). Sekvence byly rozstříhány na jednotlivé fragmenty *cox2*, *nad1*, *nad5* tRNA, *cox1* tRNA, *cox1*, *nad5*, *rrnL*, *rrnL* tRNA. Pro fragmenty genů kódujících proteiny byl použit alignment z programu Geneious a byl kontrolován pomocí převedení na kodony aminokyselin. Pro geny nekódující byl vytvořen strukturální alignment v programu MAFFT-Q-INS-i (Katoh a Standley 2013), který je určen přímo pro alignování RNA sekvencí a bere v potaz i sekundární struktury molekuly. Fragmenty byly poté poskládány do finální supermatice pomocí programu FASconCAT 1.0. (Kück a Meusemann 2010) Tato matice byla použita pro vytvoření fylogenetické hypotézy v programu IQ-TREE (Nguyen a kol. 2015) a byly vypočteny i bootstrap podpory metodou UFBoot (Hoang a kol. 2017). Na základě analýzy maximum likelihood stanovil program ModelFinder (Kalyaanamoorthy 2017) pro jednotlivé segmenty konkrétní modely popsané v Tabulkách 5 a 6. Finální strom byl vizualizován a převeden do formátu pdf v programu FigTree v1.4.3 (FigTree, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Dále byla supermatice použita pro stanovení hypotézy na základě Byasiánské analýzy v programu MrBayes 3.2.6 (Ronguist a Huelsenbeck 2003) s použitím MCMC (Altekar a kol. 2004) na portálu CIPRES (Miller 2010). Výsledný strom byl sestaven v programu TreeAnnotator v rámci balíčku BEAST 1.8.1. (Drummond a kol 2012).

5. Výsledky

5.1. Alignovaný dataset

Ze vzorků MR0001 – MR0104 se podařilo u 94 jedinců amplifikovat fragment genu *nad5* mtDNA o průměrné délce 1267 bází. Fragment *cox1* mtDNA se podařilo amplifikovat pro 99 jedinců a jeho průměrná délka byla 1133 bází. Největší úspěšnosti amplifikace bylo dosaženo u fragmentu genu *rrnL* rRNA s průměrnou délkou 852 bází a to u 102 ze 104 jedinců. Do analýzy byly zařazeny vzorky, u kterých byl získán alespoň jeden fragment (viz Příloha 3).

Jako outgroup bylo vyčleněno 8 sekvenovaných vzorků reprezentujících jiné triby čeledi Lycidae: MR0075 *Wakarambia petri*, MR0077 *Sulabanus* sp., MR0077 *Microtrichalus* sp., MR0015 a MR0020 *Lycostomus* sp., MR0094 *Lygistropterus* sp., MR0062 *Libnetis* sp. a MR0060 *Platycis* sp. Dále byl jako outgroup zařazen ještě jeden jedinec rodu *Lycostomus* sp., vzorek 000370, jehož sekvence jsou veřejně dostupné v databázi GenBank. Do výsledné matice bylo navíc přidáno 58 vzorků sekvenovaných v předchozích analýzách a popsanych i s přístupovým číslem v GenBank v Příloze 2.

Byly sestaveny dvě matice. První neobsahovala outgroup a její celková délka byla 3274 pozic. Druhá matice obsahovala outgroup a její celková délka byla 3252 pozic. Cílem bylo testovat vliv alignmentu na topologii.

Jednotlivé fragmenty v matici bez outgroup byly seřazeny v pořadí: *cox1* tRNA, *cox2*, *nad5*, *nad1*, *cox1*, *nad5* tRNAs, *rrnL* tRNA a *rrnL*. *cox1* tRNA má délku 60 pozic, *cox2* 264 pozic, *nad5* je nejdelší a dosahuje délky 1017 pozic. *nad1* má 142 pozic, *cox1* délku 789 pozic, *nad5* tRNA 309 pozic, *rrnL* tRNA 67 pozic a *rrnL* 648 pozic. Pro jednotlivé fragmenty byly zvoleny modely popsané v Tabulce 5.

Tabulka 5: Přehled vlastností alignovaných sekvencí ve finální matici bez outgroup a použité modely pro jednotlivé fragmenty

Sekvenovaný Fragment	Počet alignovaných sekvencí	Délka alignmentu	Počet unikátních znaků	Počet znaků informativních pro parsimonii	Počet konstantních znaku	Použité modely
<i>cox1</i> tRNA	144	60	35	18	37	TIM2+F+G4
<i>cox2</i>	137	264	204	163	73	SYM+I+G4
<i>nad5</i>	139	1017	814	655	262	GTR+F+I+G4
<i>nad1</i>	142	120	113	67	36	TIM+F+I+G4
<i>cox1</i>	148	789	457	393	359	GTR+F+I+G4
<i>nad5</i> tRNA	135	309	243	127	125	TPM3u+F+I+G4
<i>rrnL</i> tRNA	144	67	43	22	34	TPM2u+F+I+G4
<i>rrnL</i>	156	648	357	251	346	GTR+F+I+G4

Jednotlivé fragmenty v matici s outgroup byly seřazeny v pořadí (viz Tabulka 6): *cox2*, *nad5* tRNA, *cox1*, *nad5*, *nad1*, *cox1* tRNA, *rrnL* tRNA a *rrnL*. Fragment *cox2* má délku 264 pozic, *nad5* tRNA 286 pozic, *cox1* 789 pozic. *nad5* je nejdelší a dosahuje délky 1018 pozic, *nad1* délky 120 pozic, *cox1* tRNA 60 pozic, *rrnL* tRNA 71 pozic a *rrnL* 644 pozic. Obecně platí, že délka alignmentu s outgroup je stejná nebo větší, než alignmentu bez outgroup. Pro jednotlivé fragmenty byly zvoleny modely, které jsou popsány v Tabulce 6.

Tabulka 6: Přehled vlastností alignovaných sekvencí ve finální matici s outgroup a použité modely pro jednotlivé fragmenty

Sekvenovaný Fragment	Počet alignovaných sekvencí	Délka alignmentu	Počet unikátních znaků	Počet znaků informativních pro parsimonii	Počet konstantních znaku	Použité modely
<i>cox2</i>	145	264	213	172	64	TIM+F+I+G4
<i>nad5</i> tRNA	144	286	246	130	98	TIM3+F+I+G4
<i>cox1</i>	156	789	472	402	342	GTR+F+I+G4
<i>nad5</i>	148	1018	841	673	241	GTR+F+I+G4
<i>nad1</i>	151	120	115	71	33	TIM+F+I+G4
<i>cox1</i> tRNA	152	60	38	19	33	TIM2+F+G4
<i>rrnL</i> tRNA	153	71	49	26	32	GTR+F+I+G4
<i>rrnL</i>	165	644	361	263	334	GTR+F+I+G4

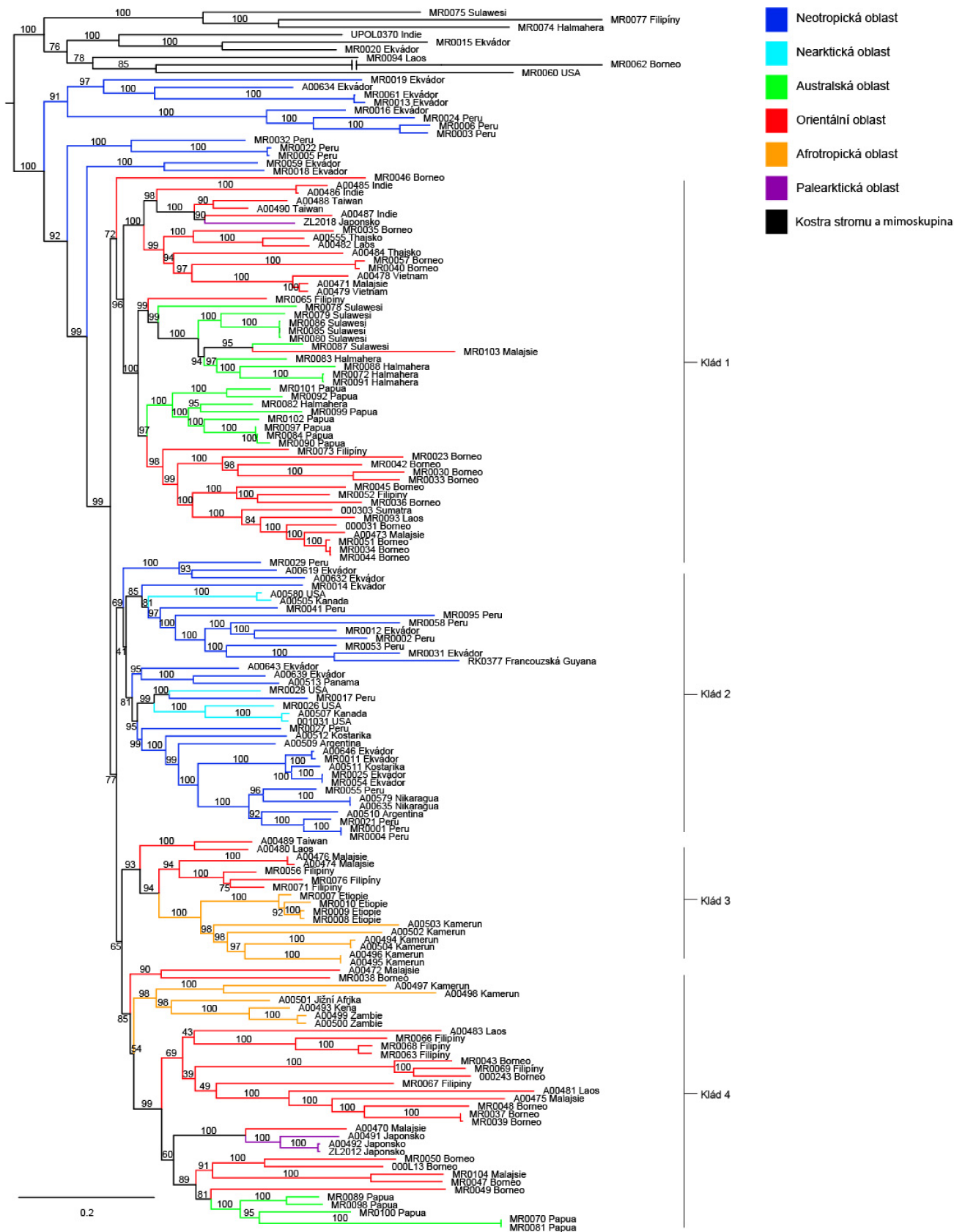
5.2. Výsledky fylogenetické analýzy

5.2.1 IQ-TREE

Finální konkatenovaná matice byla analyzována nejprve metodou maximální pravděpodobnosti a byl získán nejpravděpodobnější strom pro daný soubor dat a model evoluce DNA. U jednotlivých větví byla určena bootstrapová podpora. Bootstrapová podpora, kterou považujeme za významnou, by měla dosahovat alespoň 70 %. Výsledný fylogenetický strom identifikoval rod *Plateros* jako monofyletickou skupinu s bootstrapovou podporou 100 %. Především mělká štěpení byla velmi dobře podporována a bootstrapová podpora dosahovala typicky <95 %. Většina fylogenetických vztahů byla dobře podporována, pouze v některých případech byla nízká podpora zjištěna pro příbuzenské vztahy mezi klády obvykle pocházejícími z odlišných kontinentů (bootstrapová podpora 41–90 %). Pro testování možnosti negativního vlivu alignmentu vzdálených sekvencí v outgroup, byla dále analyzována samostatně pouze ingroup. Topologie vytvořená na základě tohoto alignmentu byla podobná a rovněž v tomto případě byla zjištěna nižší podpora pro některá hluboká větvení. Fylogenetické stromy vyprodukované z těchto dvou analýz jsou zobrazeny v Obrázku 3 a 4.

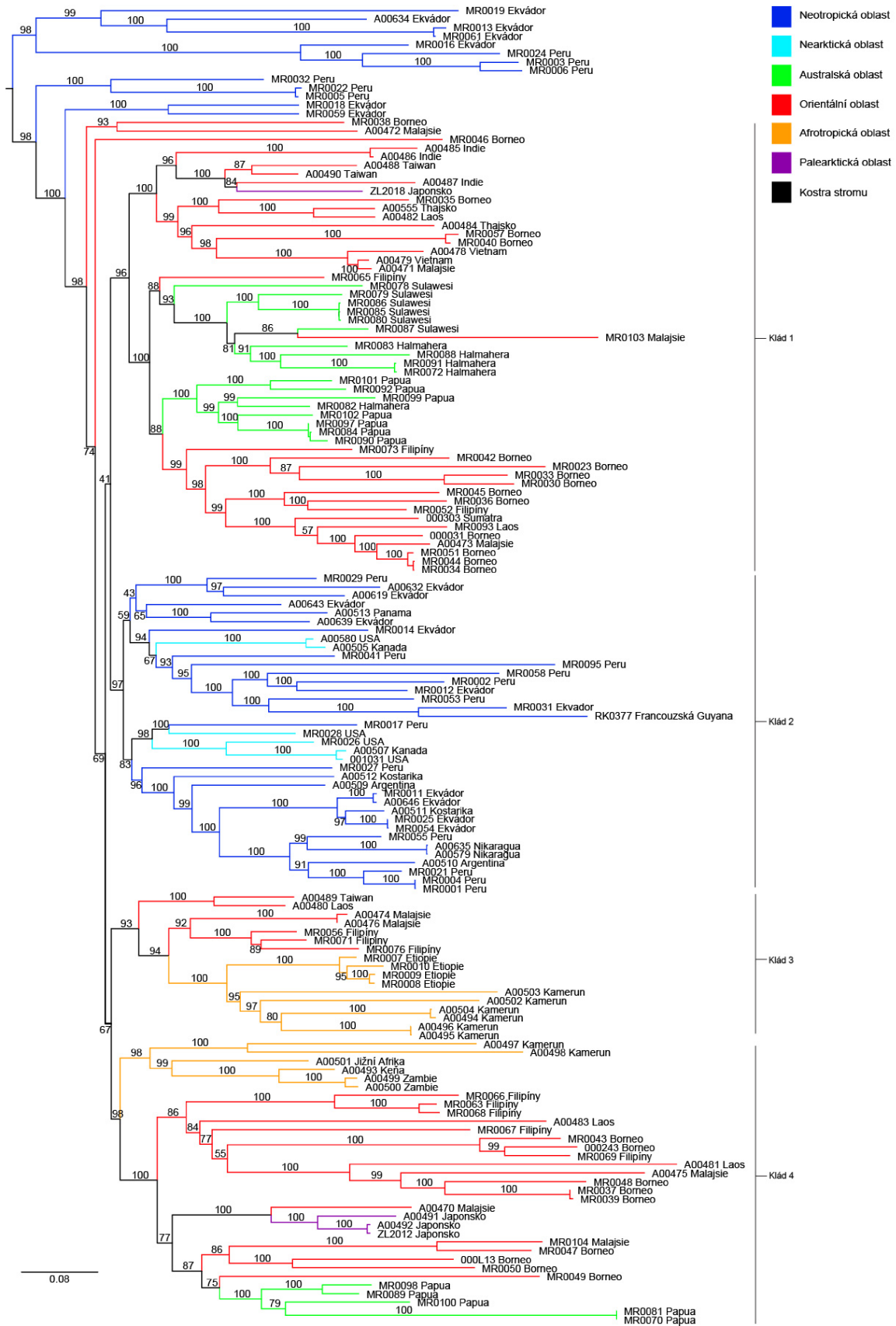
5.2.2 MrBayes

Finální konkatenovaná matice byla dále analyzována v programu MrBayes, pro lepší ověření hypotézy z programu IQ-TREE. S použitím Bayesiánské analýzy byl získán nejpravděpodobnější strom pro daný soubor dat a model evoluce. V tomto případě by podpora, kterou považujeme za významnou, měla dosahovat alespoň 0,95. Byla opět prováděna analýza s outgroup a bez ní (viz Obrázek 5). Výsledné fylogenetické stromy identifikovaly rod *Plateros* jako monofyletickou skupinu. Mělká štěpení byla dobře podporována, ovšem u hlubších štěpení byla zjištěna i velmi nízká podpora (až 0,19). Porovnání vztahů jednotlivých kládů v analýzách je zobrazeno na Obrázku 5.

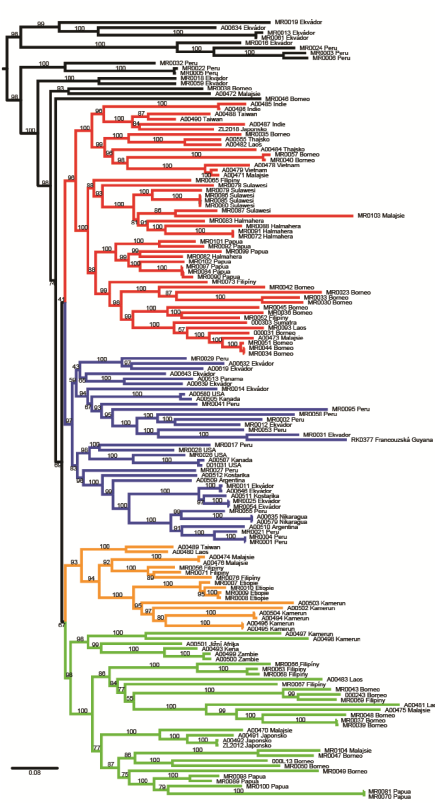


Obrázek 3: Fylogram rodu *Plateros* s vloženou outgroup vytvořený pomocí IQ-TREE

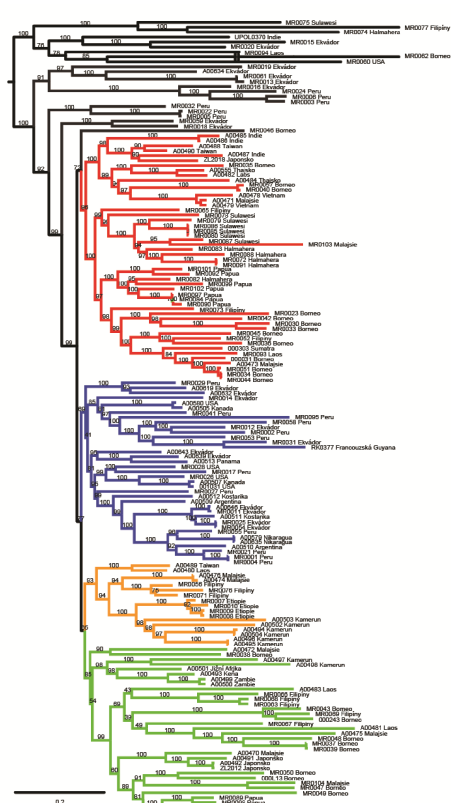
Numerické hodnoty na větvích stromu udávají bootstrapové podpory. Barevně jsou vyznačeny jednotlivé zoogeografické oblasti.



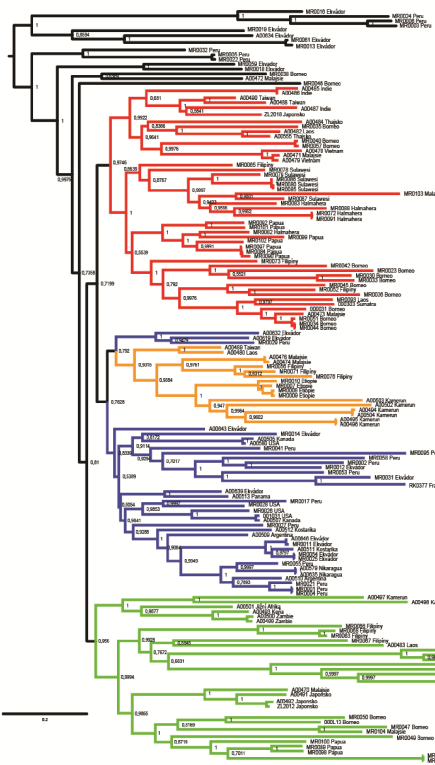
Obrázek 4: Fylogram rodu *Plateros* bez outgroup vytvořený pomocí IQ-TREE. Numerické hodnoty na větvích stromu udávají bootstrapové podpory. Barevně jsou vyznačeny jednotlivé zoogeografické oblasti.



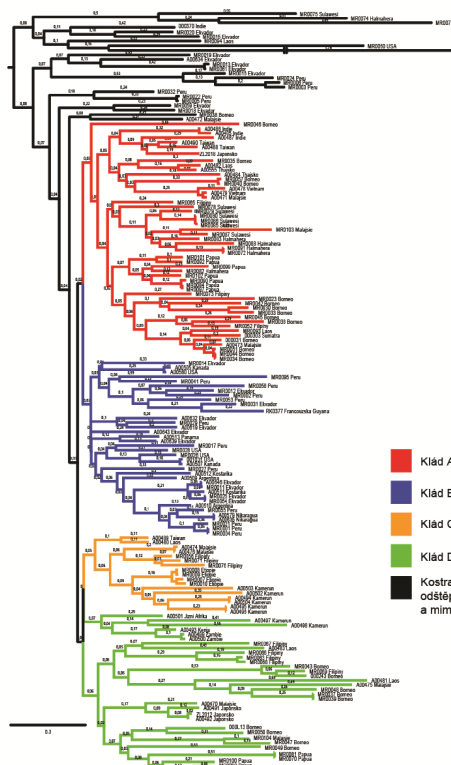
1



2



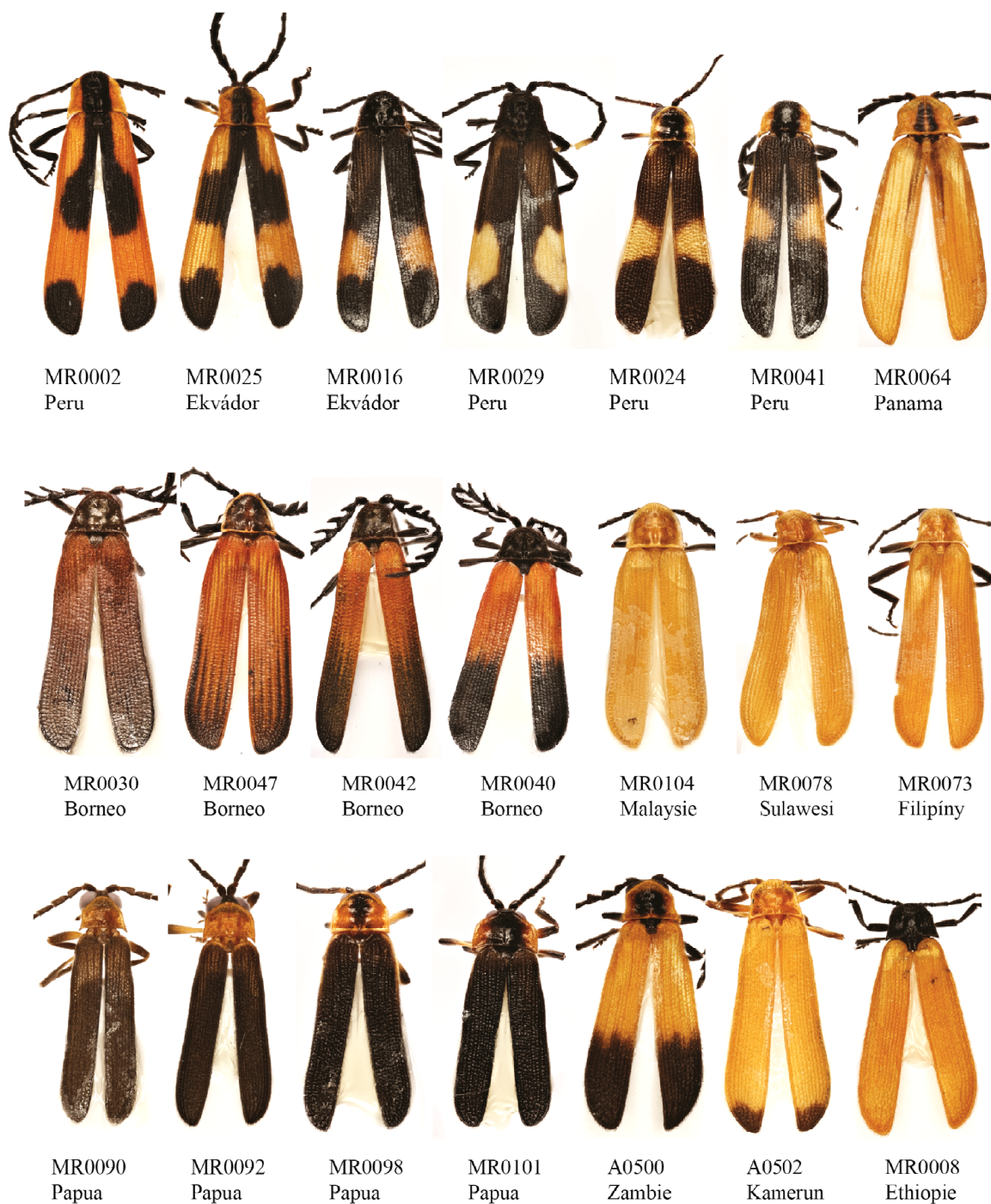
3



4

■ Klád A
■ Klád B
■ Klád C
■ Klád D
■ Kostra stromu, nejdříve odštěpené klády a mimoskupina

Obrázek 5: Porovnání fylogramů vytvořených s použitím IQ-TREE a MrBayes
 1 – fylogram vytvořený pomocí metody maximum likelihood neobsahující outgroup, 2 – fylogram vytvořený pomocí metody maximum likelihood obsahující outgroup, 3 – fylogram vytvořený pomocí Bayesiánské analýzy a neobsahující outgroup, 4 – fylogram vytvořený pomocí Bayesiánské analýzy a obsahující outgroup



Obrázek 6: Výběr jedinců rodu *Plateros* z různých lokalit pro morfologické porovnání

6. Diskuze

Současná diverzita má za sebou desítky až stovky milionů let dlouhý vývoj a pouze fylogeneze osvětluje procesy, které vedly k jejímu současnému rozložení. Tato studie analyzuje rozložení diverzity podstatné části tribu Platerodini, zde reprezentovanou rodem *Plateros*, jakožto rodu s největším počtem popsáných druhů v tribu Platerodini. Vzhledem k nejasné historické klasifikaci byly v minulosti popsány rody bez robustní podpory monofylie shrnuty do jediného taxonu rodu *Plateros* (Bocáková 2001). Vzácnější rody tribu Platerodini nezahrnuté do analýzy se vyskytují v jižní Americe, kde byla zjištěna největší morfologická diverzita. Dá se předpokládat, že budou reprezentovat bazální linie této skupiny, jak indikuje předchozí morfologická analýza (Bocáková 2001).

Diverzita rodu *Plateros* byla reprezentována ~120 druhy. Jedná se tedy asi o 13 % celosvětové diverzity daného tribu (Kleine 1933, Bocáková 2001, Databáze Zoological Records 1934–2015). Díky dlouhodobému shromažďování materiálu byly velmi rovnoměrně zastoupeny jednotlivé zoogeografické oblasti, přibližně úměrně rozsahu diverzity. Nejvíce byly zastoupeny fauny Orientální a Neotropické oblasti a to 75 % druhů. Jedná se o regiony s celkově největší diverzitou, jak čeledi Lycidae, tak i rodu *Plateros*, vzhledem k velmi rozsáhlým biotopům tropických deštných lesů. Afrotropická oblast má odlišné klima charakteristické sezónními obdobími sucha (podle www.worldclimate.com). Proto je v této oblasti čeleď Lycidae mnohem méně zastoupena a tomu odpovídá i zastoupení pouze 10 % druhů v předložené analýze.

Tato analýza je založená na třech mitochondriálních fragmentech. Mitochondriální DNA se velmi rychle vyvíjí a počet mutací dosahuje v řádu Coleoptera přibližně 0,0025–0,0115 mutací na pozici za milión let (Brower 1994, Pons a kol. 2006, Papadopoulos a kol. 2010). Z toho důvodu je rekonstrukce hlubokých fylogenetických vztahů problematická s použitím těchto molekulárních markerů. Ukázalo se to i v současné analýze, kdy byla například zjištěna nestabilní pozice kládu dvou druhů (vzorky A00472 a MR0038 z Malajsie a Bornea, viz Obrázek 4) a podobně jednoho druhu reprezentovaného vzorkem MR0046 z Bornea. V obou případech jde o velmi brzy odštěpené linie s velkou délkou větví, takže možným důvodem jejich nestability je atrakce dlouhých větví (Felsenstein 1978, Sanderson 2000, Bergsten 2005).

6.1 IQ-TREE

Vztahy mezi základními klády se v některých případech lišily v analýze pomocí maximum likelihood s outgroup (viz Obrázek 3) a bez ní (viz Obrázek 4). Společným znakem obou analýz je však přítomnost tří nejhlubších štěpení oddělujících linie z Neotropické oblasti. Celkem jsou linie reprezentovány 7, 2 a 2 druhy. Dále je rod *Plateros* složen ze tří větších kládů, jejichž vzájemná příbuznost je slabě podpořena a liší se v jednotlivých analýzách. V analýze pomocí IQ-TREE byla méně podpořená hypotéza bez začleněné outgroup, kdy je klád A udáván jako sesterský kládu B. Lépe podpořená hypotéza v analýze s outgroup udává klád B jako sesterský ke kládu C. Naproti tomu byla zjištěna vysoká stabilita kládů rozšířených v jednotlivých zoogeografických oblastech. Fylogenetická analýza ukázala, že k oddělení fauny jednotlivých oblastí došlo velmi brzy v evoluci rodu *Plateros*.

6.2 MrBayes

Pro získání další hypotézy pro srovnání byla provedena Baysiánská analýza pomocí programu MrBayes. Porovnání všech analýz je zobrazeno na Obrázku 5. Kvůli malým podporám došlo v Bayesiánské analýze k přeskupení jednotlivých velkých kládů rodu *Plateros*. Analýza s outgroup byla nejméně podpořena, nejspíše kvůli vyšší taxonomické vzdálenosti přidané outgroup. Všechny 4 klády byly jasně rozděleny, stejně jako u analýzy IQ-TREE, ale klád A byl určen jako sesterský kládu B a klád C, jako sesterský kládu D. V analýze bez outgroup byl klád A určen jako sesterský kládu B. Klád C byl včleněn do kládu B. Tím došlo k oddělení tří druhů kládu B, a to vzorků A00632 Ekvádor, A00619 Ekvádor a MR029 Peru, které byly v předchozích analýzách určeny jako nejhlubší štěpení kládu B. Byly zařazeny jako sesterská skupina kládu C.

Analýza Bayesiánská i IQ-TREE potvrdily výraznou konzistentnost kládu A. Dále ukázaly dvojnásobný přechod rodu *Plateros* do Australské oblasti, konkrétně na ostrov Papua. Vzorky z tohoto ostrova se vyskytují v kládu A a D. Také byl analýzami potvrzen dvojitý průnik druhů do oblasti Afrotropické. Analýzy naznačují, že k dvojitmu rozšíření došlo i do Palearktické oblasti (Japonsko), neboť vzorky z ní se řadí do kládu A a D. K potvrzení této hypotézy by však bylo třeba získat více vzorků z této oblasti.

6.3 Geografické rozšíření jednotlivých kládů

K dalšímu popisu diverzity jednotlivých oblastí byla použita nejlépe podpořená analýza z programu IQ-TREE s vloženou outgroup. Klád A zahrnuje ~25 druhů z Orientální oblasti, převážně z pevninské části a ostrova Borneo a 13 druhů z oblasti Australské konkrétně z ostrovů Papua, Halmahera a Sulawesi. Také se v prvním kládu vyskytuje jeden druh z oblasti Paleartické.

Klád B shrnuje 27 druhů z Neotropické oblasti, převážně z Peru a Ekvádoru a 4 druhy z oblasti Nearktické, z USA a Kanady. Druhy z USA (4) a Argentiny (1) můžeme určit jako terminální. Do USA se rod šířil pravděpodobně přes Panamskou šíji. Klád C obsahuje 6 druhů z Orientální oblasti především z pevninské části a Filipín. Dále pak ~7 druhů z Afrotropické oblasti. Klád D zahrnuje ~13 druhů z Orientální oblasti, 5 druhů z oblasti Afrotropické, 2 druhy z oblasti Paleartické a 4 druhy z oblasti Australské, konkrétně z ostrova Papua.

6.4 Fylogenetická diverzita jednotlivých oblastí, význam pro ochranu diverzity

Největší diverzita tohoto rodu je v oblasti Orientální, kde se vyskytuje až 50 % celkového množství druhů. Přibližně 25 % druhů a nejstarší odštěpené druhy se vyskytují v oblasti Neotropické. Tyto staré klády s vysokým stupněm genetické diverzifikace jsou důležité pro zachování celkové diverzity rodu. V Nearktické a Paleartické oblasti se vyskytuje pouze několik málo druhů s terminálním postavením ve fylogenetickém stromu (~5 % celkového množství druhů). Pro zachování diverzity je proto nutné chránit převážně druhy v prvních dvou zmíněných oblastech. Jde o oblasti tropických deštných lesů, u kterých je ochrana dlouhodobě problematická vzhledem k rozsáhlé přeměně území na plantáže.

6.5 Další cíle pro studium fylogeneze

Pro další poznání diverzity by bylo třeba rozšířit analýzu o další rody tribu Platerodini. Ovšem mnoho ze vzácných rodů tohoto tribu bylo popsáno pouze v jediném exempláři. Je tedy nutné shromáždit další materiál pro výzkum.

Pro zpřesnění analýz a zvýšení podpory jednotlivých hypotéz by bylo třeba sekvenovat více fragmentů DNA jednotlivých vzorků. Nejlepší by bylo do analýzy zahrnout některé z fragmentů jaderného genomu, které nepodléhají tak rychlému vývoji, jako markery mitochondriální. Použití těchto markerů by pravděpodobně umožnilo

i přesné datování fylogenetického stromu. Čím větší množství fragmentů je složeno do výsledné matice, tím větší je pravděpodobnost správného určení hypotézy a podchycení všech rozhodujících znaků (Kjer 2016).

6.6 Mimetické vzory

Největší morfologická diverzita je pozorovatelná u druhů z Neotropické oblasti (viz Obrázek 6), i když počet zjištěných druhů je v porovnání s Orientální oblastí nižší. Mimetické znaky se v těchto oblastech vyvíjely nezávisle a v Orientální oblasti jsou zapojeny do mimetických komplexů s rody endemického tribu Calopterini a v Orientální oblasti s rody tribu Metriorrhynchini (Bocák a kol. 2008).

I přes příslušnost druhů z Australské oblasti k velmi vzdáleným skupinám, se tato jejich genetická odlišnost neprojevuje v morfologii jedinců, jak vidíme na Obrázku 6. Vzorky MR0092 a MR0098 oba z Papuy a příbuzní jen velmi vzdáleně, jsou podobní tvarem a velikostí těla a téměř totožně zbarvení a mají stejnou strukturu krovek. Toto zbarvení se odvíjí od přizpůsobení podmínkám dané oblasti, v tomto případě napodobení drobných druhů rodu *Metriorrhynchus* Gemminger a Harold, 1869. Celá čeleď Lycidae se vyznačuje aposematickým zbarvením. Jedná se pravděpodobně o takzvané Mülleriánské mimikry (Müller 1879), které se vyvíjejí u nepříbuzných, proti predátorům chráněných organismů, působením přírodního výběru. Organismy konvergují ke stejným mimetickým znakům, neboť jsou pod vlivem stejného vnějšího vlivu. Podobné aposematické zbarvení tím pádem není důsledkem sdílení společného předka.

7. Závěr

Velké skupiny hmyzu jsou často morfologicky málo diversifikované a navíc, velký počet znaků je vystaven stejnému působení selekce a tím je možná evoluce paralelismů a konvergencí. Proto v některých případech nelze skupiny klasifikovat pouze na základě povrchní morfologické podobnosti a v této studii byla tedy klasifikace prováděna na základě molekulárních markerů. U těch se předpokládá, že poskytují informaci o příbuznosti jednotlivých skupin nezávislou na přírodním výběru. Byly provedeny čtyři fylogenetické analýzy, a to dvě metodou maximum likelihood a dvě Bayesiánskou analýzou. Metody shodně ukazují monofylii rodu *Plateros* a tím je splněn základní požadavek pro jeho akceptaci ve fylogenetické klasifikaci, která je založena na fylogenetické příbuznosti (Hennig 1955, 1966). Dále pak analýzy ukázaly na původ fauny v jednotlivých oblastech: bazální linie se odštěpily v Neotropické oblasti a fauna ostatních oblastí je odvozená z ancestrální Neotropické fauny. Byly zjištěny dvě kolonizace rodu *Plateros* do oblastí Afrotropické a Australské. Obě metody fylogenetické analýzy definovaly základní geograficky delimitované klády, avšak nepotvrdily definitivně jejich příbuznost mezi sebou. Podpora hlubokých štěpení byla nízká a obě metody stanovení se v určitých ohledech rozcházely. Tento nesoulad byl pravděpodobně způsoben použitím mitochondriálních markerů pro tuto studii. Mitochondriální genom mutuje rychleji než genom jaderný. Proto bylo zjištěno, že použití těchto markerů u skupiny tak staré, jako rod *Plateros*, není nejvhodnější volbou a bude nutné rozšířit analýzu v dalších studiích o fragmenty jaderného genomu. Hodnocení fenetické podobnosti ukázalo na velmi silný vliv přírodního výběru na externí morfologii skupiny. *Plateros* je součástí aposematicky zbarvených mimetických komplexů a proto jsou si nepříbuzné skupiny často velmi morfologicky podobné.

8. Literatura

Altekar G., Dwarkadas S., Huelsenbeck J. P., Ronquist F. (2004): Parallel Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. *Bioinformatics* 20: 407–415

Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402

Bayes, T. (1764): An Essay toward solving a Problem in the Doctrine of Chances. In *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 53: 370–418

Bergsten J. (2005): A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21: 163–193

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. (1989): Revision of the supergeneric classification of the family Lycidae (Coleoptera). *Polish Journal of Entomology* 59 (4): 623–676

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 London, B* 275: 2015–2023

Bocák L., Motyka M., Bocek M., Bocáková M. (2018): Incomplete sclerotization and phylogeny: The phylogenetic classification of *Plastocerus* (Coleoptera: Elateroidea). *PLoS ONE* 13(3): e019402

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

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

- Bocáková M. (2003): Revision of the tribe Calopterini (Coleoptera, Lycidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 38(3): 207–234
- Bocáková M. (2006): Review of the tribe Lyropaeini (Coleoptera: Lycidae). *European Journal of Entomology* 103: 127–136
- Brook B. W., Alroy J. (2017): Pattern, process, inference and prediction in extinction biology. *Biology Letters* 13: 20160828
- Brower A. V. (1994): Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *PNAS* 91: 6491–6495
- Carmean D, Kimsey L. S., Berbee M.L. (1992): 18S rDNA sequences and the holometabolous insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 270–278
- Case R. J., Boucher Y., Dahllöf I., Holmström C., Doolittle W. F., Kjelleberg S. (2007): Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 278–288
- Caterino M. S., Cho S., Sperling F. A. (2000): The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 45: 1–54
- Clary D. O, Wolstenholme D. R. (1985): The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide sequence, gene organization, and genetic code. *Nature* 22: 252–271
- Dillon N., Austin A. D., Bartowsky E. (1996): Comparison of preservativ techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. *Insect Molecular Biology* 5: 21–24
- Drummond A. J., Suchard M. A., Dong Xie, Rambaut A. (2012): Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969–1973
- 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. (1978): Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology* 27: 401–410

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

Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791

Field, K., Olsen G., Lane D., Giovannoni S., Ghiselin M., Raff E., Pace N. a Raff R. (1988): Molecular phylogeny of the animal kingdom. *Science* 239: 748–753.

Field R., Hawkins B. A., Cornell H. W., Currie D. J., Diniz-Filho J. A. F., Guégan J. – F. , Kaufman D. M., Kerr J. T., Mittelbach G. G., Oberdorff T., O’Brien E. M., Turner G. R. G. (2009): Spatial species-richness gradients across scales: a meta-analysis. *Journal of Biogeography* 36: 132–147

FigTree [online] [navštíveno 1. 4. 18] dostupné z: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Freyman W. A., Höhna S. (2017): Cladogenetic and Anagenetic Models of Chromosome Number Evolution: A Bayesian Model Averaging Approach. *Systematic Biology* 67: 195–215

Hebert P. D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R. (2003): Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences* 270: 96–99

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

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

Heywood V. H., Watson R. T. (1995): *Global biodiversity assessment: summary for policy-makers*, Cambridge University Press, New York, NY, USA

Hinchliff C. E., Smith S. A., Allman J. F., Burleigh J. G., Chaudhary R., Coghill L. M., Crandall K. A., Deng J., Drew B. T., Gazis R., Gude K., Hibbett D. S., Katz L. A., Laughinghouse H. D., McTavish E. J., Midford P. E., Owen Ch. L., Ree R. H., Rees J. A., Soltis D. E., Williams T., Cranston K. A. (2015): Synthesis of phylogeny and taxonomy into a comprehensive tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 12764–12769

- Ho S. Y. W., Phillips M. J., Cooper A., Drummond A. J. (2005): Time Dependency of Molecular Rate Estimates and Systematic Overestimation of Recent Divergence Times. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1561–1568
- Hoang D. T., Chernomor O., von Haeseler A., Minh B. Q., Vinh L. S. (2018): UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution* 35: 518–522
- Christin P.-A., Besnard G., Edwards E. J., Salamin N. (2012): Effect of genetic convergence on phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 921 – 927
- Nguyen L.-T., Heiko A. Schmidt, 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: 268–274
- Kalersjo M., Albert V. A., Farris J. S. (1999): Homoplasy Increases Phylogenetic Structure. *Cladistics* 15: 91–93
- Kazantsev S. V. (2006): A review and phylogenetic analysis of Afrotropical Dictyopterini (Coleoptera, Lycidae). *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin, Deutsche Entomologische Zeitschrift* 53: 43–64
- Kalyaanamoorthy S., Minh B. Q., Wong T. K. F., von Haeseler A., Jermiin L. S. (2017): ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14: 587–589
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649
- Kjer K. M., Simon Ch., Yavorskaya M., Beutel R. G. (2016): Progress, pitfalls and parallel universes: a history of insect phylogenetics. *Journal of The Royal Society Interface* 13
- Kleine, R. (1928): NeueIndische Lycidae nebst faunistischen Bemerkungen. *Indian Forest Records*, 13: 221–268

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

Kück P., Meusemann K. (2010): FASconCAT: Convenient handling of data matrices. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 1115–1118

Kundrata R., Bocákova M, Bocák L. (2014): The comprehensive phylogeny of the superfamily Elateroidea (Coleoptera: Elateriformia), *Molecular Phylogenetics and Evolution* 76: 162–171

Larget B., Simon D. L. (1999): Markov Chain Monte Carlo Algorithms for the Bayesian Analysis of Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution* 16: 750–759

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

Liu H, Beckenbach A. T. (1992): Evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene among 10 orders of insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 41–52

Liu S., Wang X., Xie L., Tan M., Li Z., Su X., Zhang H., Misof B., Kjer K. M., Tang M., Niehuis O., Jiang H., Zhou X. (2016): Mitochondrial capture enriches mito-DNA 100 fold, enabling PCR-free mitogenomics biodiversity analysis. *Molecular Ecology Resources* 16: 470–479

Mayr E. (1970): *Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution.* 7. Dr. Cambridge, Mass.; London: Belknap Press of Harvard University Press.

Miller R. S. (1997): Immature stages of *Plateros floralis* (Melsheimer) and discussion of phylogenetic relationships (Coleoptera: Lycidae). *Coleopterologists Bulletin* 51: 1–12

Misof B., Liu S., Meusemann K., Peters R. S., Donath A., Mayer C., Frandsen P. B., Ware J., Flouri T., Beutel R. G., Niehuis O., Petersen M., Izquierdo-Carrasco F., Wappler T., Rust J., Aberer A. J., Aspöck U., Aspöck H., Bartel D., Blanke A., Berger S., Böhm A., Buckley T. R., Calcott B., Chen J., Friedrich F., Fukui M., Fujita M., Greve C., Grobe P., Gu S., Huang Y., Jermiin L. S., Kawahara A. Y., Krogmann L., Kubiak M., Lanfear R., Letsch H., Li Y., Li Z., Li J., Lu H., Machida R., Mashimo Y., Kapli P., McKenna D. D., Meng G., Nakagaki Y., Navarrete-Heredia J. L., Ott M., Ou Y., Pass G., Podsiadlowski L.,

Pohl H., von Reumont B. M., Schütte K., Sekiya K., Shimizu S., Slipinski A., Stamatakis A., Song W., Su X., Szucsich N. U., Tan M., Tan X., Tang M., Tang J., Timelthaler G., Tomizuka S., Trautwein M., Tong X., Uchifune T., Walz M. G., Wiegmann B. M., Wilbrandt J., Wipfler B., Wong T. K. F., Wu Q., Wu G., Xie Y., Yang S., Yang Q., Yeates D. K., Yoshizawa K., Zhang Q., Zhang R., Zhang W., Zhang Y., Zhao J., Zhou C., Zhou Ziesmann M. T., Zou S., Xu X., Yang H., Wang J., Kjer K. M., Zhou X. (2014): Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346: 763–767

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

Katoh K., Standley D. M. (2013): MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 772–780

Myers M. D., Avison D. E. (2002): *Qualitative research in information systems: a reader*. 6. Thousand Oaks, Calif.: SAGE.

Nascimento E. A., Bocákova M. (2012): Nomenclatural changes and redescriptions in *Plateros* Bourgeois, 1879 (Coleoptera: Lycidae) from Neotropical region. *Zootaxa* 3487: 77–84

Nazari V., Zakharov E. V., Sperling F. A. H. (2007): Phylogeny, historical biogeography, and taxonomic ranking of Parnassiinae (Lepidoptera, Papilionidae) based on morphology and seven genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 131–156

Niehuis O., Hartig G., Grath S., Pohl H., Lehmann J., Tafer H., Donath A., Krauss V., Eisenhardt C., Hertel J., Petersen M., Mayer Ch., Meusemann K., Peters R. S., Stadler P. F., Beutel R. G., Bornberg-Bauer E., McKenna D. D., Misof B. (2012): Genomic and Morphological Evidence Converge to Resolve the Enigma of Strepsiptera. *Current Biology* 22: 1309–1313

Olson D. M., Dinerstein E., Wikramanayake E. D., Burgess N. D., Powell G. V. N., Underwood E. C., D'amico J. A., Itoua I., Strand H. E., Morrison J. C., Loucks C. J., Allnutt T. F., Ricketts T. H., Kura Y., Lamoreux J. F., Wettengel W. W., Hedao P., Kassem K. R. (2001): *Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth*. *BioScience* 15: 933–938

- Papadopoulou A. L., Anastasiou I. P., Vogler A. P. (2010): Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. *Molecular biology and evolution* 27: 1659–1672
- Pons J., Barraclough T., Gomez-Zurita J., Cardoso A., Duran D., Hazell S., Kamoun S., Sumlin W., Vogler A. (2006): Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology* 55: 595–610
- Rabosky D. L., Santini F., Eastman J., Smith S. A., Sidlauskas B., Chang J., Alfaro M. E. (2013): Rates of speciation and morphological evolution are correlated across the largest vertebrate radiation. *Nature Communications* 4: 1958
- Rannala B., Yang Z. (1996): Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*. 43: 304–311
- Raup D. M. (1986): Biological extinction in earth history. *Science* 231: 1528–1533
- Reed D. H., Frankham R. (2003): Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17: 230–237
- Ross H. H. (1972): The Origin of Species Diversity in Ecological Communities. *Taxon* 21: 253–259
- Ronquist F, Huelsenbeck J. P. (2003): MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463–5467
- Sanderson M. J., Wojciechowski M. F., Hu J. M., Khan T. S., Brady S. G. (2000): Error, bias, and long-branch attraction in data for two chloroplast photosystem genes in seed plants. *Molecular Biology and Evolution* 17: 782–797
- Scotland R. W. (2011): What is parallelism? *Evolution and Development* 13: 214–227
- Simon C., Frati F., Beckenbach A. T., Crespi B., Liu H., Flook P. K. (1994): Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of

conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651–701

Sodhi N. S., Koh L. P., Brook B. W., Ng P. K. L. (2004): Southeast Asian biodiversity: an impending disaster. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 654–660.

Sayer J.A., Whitmore T. C. (1991): Tropical moist forests: Destruction and species extinction. *Biological Conservation* 55: 199–213

Townson H., Harbach R. E., Callan T. A. (2002): DNA identification of museum specimen of the *Anopheles gambiae* complex: an evaluation of PCR as a tool for resolving the formal taxonomy of sibling species complexes. *Systematic Entomology* 24: 95–100

Turbeville J. M., Pfeifer D. M., Field K. G., Raff R. A. (1991): The phylogenetic status of arthropods, as inferred from 18S rRNA sequences. *Molecular Biology and Evolution* 8: 669–686

Uribe J. E., Gutiérrez-Rodríguez J. (2016): The complete mitogenome of the trilobite beetle, *Platerodrilus* sp. (Elateroidea: Lycidae). *Mitochondrial DNA Part B* 1, 658–659

Wiens J. J. (2004): The Role of Morphological Data in Phylogeny Reconstruction. *Systematic Biology* 53: 653–661

Wolstenholme D. R. (1992): Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution. *International Review of Cytology* 1992;141:173–216

Worldwide climat [online] [navštíveno 3. 4. 18] dostupné z: <http://www.worldclimate.com>

Zhang J., Chiodini R., Badr A., Zhang G. (2011): The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics* 38: 95–109

9. Přílohy

Příloha 1: Přehled studovaného materiálu, který byl nově sekvenován

Číslo vzorku	Lokalita, datum sběru a sběratel
MR0001	PERU, 25 km NE Villa Rica, Bocaz, 1300 m, 30. 11. – 5. 12. 2013, KJMB lgt.
MR0002	PERU, 25 km NE Villa Rica, Bocaz, 1300 m, 30. 11. – 5. 12. 2013, KJMB lgt.
MR0003	PERU, 25 km NE Villa Rica, Bocaz, 1300 m, 30. 11. – 5. 12. 2013, KJMB lgt.
MR0004	PERU, 25 km NE Villa Rica, Bocaz, 1300 m, 30. 11. – 5. 12. 2013, KJMB lgt.
MR0005	PERU, 10 km NW San Juan de Cacazu, Madre Nino, 724 m, 01. 12. – 6. 12. 2013, KJMB lgt.
MR0006	PERU, Parc Nat. Manu, San Pedro, Manu, 1300 m, 25. 11. 2013, KJMB lgt.
MR0007	ETHIOPIA, Arsi Prov., Wondo Genet env., 1900 m, 26. 6. 2009, Bolm lgt.
MR0008	ETHIOPIA, Arsi Prov., Wondo Genet env., 1900 m, 26. 6. 2009, Bolm lgt.
MR0009	ETHIOPIA, Welega Prov., 6 km W Nekemte, 2300 m, 5. 6. – 6. 6. 2009, Bolm lgt.
MR0010	ETHIOPIA (S), 2300 m 10 km N Kibre Mengist, 23. 6. 2009, Bolm lgt.
MR0011	ECUADOR, 50 km SW of Quito, San Francisco de las Pampas, Otonga res., 1500 m, 5. 12. – 6. 12. 2010, Bolm lgt.
MR0012	ECUADOR, Napo prov., Cosanga, 1900 – 2000 m, 12. 12. – 16. 12. 2010, Bolm lgt.
MR0013	ECUADOR, San Isidro, 10 km NW Macas, 1100 m, 20. 12. 2010, Bolm lgt.
MR0014	ECUADOR, 50 km SW of Quito, San Francisco de las Pampas, Otonga res., 1500 m, 5. 12. – 6. 12. 2010, Bolm lgt.
MR0015	ECUADOR, Napo prov., Cosanga, 1900 – 2000 m, 12. 12. – 16. 12. 2010, Bolm lgt.
MR0016	ECUADOR, 6 km W of Zamora, 900 m, 24. 12. – 25. 12. 2010, Bolm lgt.
MR0017	PERU, 37 km SW Puerto Maldonado, 250 m, 8. 12. – 10. 12. 2012, KJMB lgt.
MR0018	ECUADOR, San Isidro, 10 km NW Macas, 1100 m, 20. 12. 2010, Bolm lgt.
MR0019	ECUADOR, 50 km SW of Quito, San Francisco de las Pampas, Otonga res., 1500 m, 5. 12. – 6. 12. 2010, Bolm lgt.
MR0020	ECUADOR, 10 km S Loja Padocarpus NP, 2000 m, 23. 12. 2010, Bolm lgt.
MR0021	PERU, 6 km S of Tingo María, 700 – 1000 m, 17. 11. 2012, KJMB lgt.
MR0022	PERU, 37 km SW Puerto Maldonado, 250 m, 8. 12. – 10. 12. 2012, KJMB lgt.
MR0023	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0024	PERU, Parc Nat. Manu, Attalya, 540 m, 19. 11. – 24. 11. 2013, KJMB lgt.
MR0025	ECUADOR, Napo prov., 12 km E of Tena, Misahuallí, 400 m, 8. 12. – 10. 12. 2013, Bolm lgt.
MR0026	USA: WI : Sauk Co., Baxter's Hollow SNA, 19. 7. 2003, Jeffrey P. Gruber
MR0027	PERU, 6 km S of Tingo María, 700 – 1000 m, 17. 11. 2012, KJMB lgt.
MR0028	USA: WI : Grant Co. Cassville Bluffs SNA, 18. 7. 2003, Jeffrey P. Gruber
MR0029	PERU, Parc Nat. Manu, San Pedro, Manu, 1300 m, 25. 11. 2013, KJMB lgt.
MR0030	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0031	ECUADOR, Napo prov., 12 km E of Tena, Misahuallí, 400 m, 8. 12. – 10. 12. 2013, Bolm lgt.
MR0032	PERU, 37 km SW Puerto Maldonado, 250 m, 8. 12. – 10. 12. 2012, KJMB lgt.
MR0033	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0034	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0035	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0036	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0037	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.

Pokračování Přílohy 1: Přehled studovaného materiálu, který byl nově sekvenován

Číslo vzorku	Lokalita, datum sběru a sběratel
MR0038	MALAYSIA, Borneo, Sarawak, Limbang Distr. Pandarwan river valley, 1. 2. – 27. 2. 2007, nat. Coll.
MR0039	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0040	BORNEO, Qu. Emas, 2013
MR0041	PERU, 6 km S of Tingo Mária, 700 – 1000 m, 5 km W of the road, 17. 12. 2012, KJMB lgt.
MR0042	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0043	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0044	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0045	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0046	MALAYSIA, Borneo, Sarawak, Limbang Distr. Pandarwan river valley, 1. 2. – 27. 2. 2007, nat. Coll.
MR0047	MALAYSIA, Borneo, Sarawak, Limbang Distr. Pandarwan river valley, 1. 2. – 27. 2. 2007, nat. Coll.
MR0048	BORNEO, Sabah, 6 km N Kundasang, Nat. Park HQ, 1700 m, 3. 12. 2013, SBB leg.
MR0049	BRUNEJ, Kuala Belalong, 10. 1., J. Ševčík
MR0050	MALAYSIA, Borneo, Sarawak, Limbang Distr. Pandarwan river valley, 1. 2. – 27. 2. 2007, nat. Coll.
MR0051	MALAYSIA, SABAH, Danum Valley (Lembah Danum), 150 – 250m, 25. 7. – 29. 7. 2012
MR0052	PHILIPPINES, Mindanao, Mt. Malindang, 800 – 1300 m, 10. 1. – 13. 1. 2007, Bolm lgt.
MR0053	PERU, 20 km NW San Ramon, Pampa Hermosa, 1250 m, 22. 11. 2012, KJMB lgt.
MR0054	ECUADOR, Napo prov., 12 km E of Tena, Misahuallí, 400 m, 8. 12. – 10. 12. 2013, Bolm lgt.
MR0055	PERU, 60 km N Oxapampa, Yuritunqui, 1000 m, 27. 11. – 28. 11. 2012, KJMB lgt.
MR0056	PHILIPPINES, Mindanno, Bagongsilang, 1650 m, 17. 1. – 20. 1. 2007, Bolm lgt.
MR0057	BORNEO, Sabah, Poring, 550 m, 19. 11. – 17. 11. 2013, SBB leg.
MR0058	PERU, 37 km SW Puerto Maldonado, 250 m, 8. 12. – 10. 12. 2012, KJMB lgt.
MR0059	EVUADOR, Sumaco Forest, Reserve. Gua Gua, 1500 m, 16. 12. 2010, Bolm lgt.
MR0060	USA: WI : Grant Co. Cassville Bluffs SNA, 18. 7. 2003, Jeffrey P. Gruber
MR0061	ECUADOR, Sumaco Forest, Reserve. Gua Gua, 1500 m, 16. 12. 2010, Bolm lgt.
MR0062	BORNEO Sabah, Gu Emas, 1600 m, 31. 5. 2001, F. Ciampor
MR0063	PHILIPPINES, Mindanao, Mt. Kitanglad, 1800 m, 14. 1. – 15. 1. 2007, Bolm lgt.
MR0064	PANAMA, Panama prov., SE edge of Chagres NP., CERRO JEFE, 700 – 900 m, 28. 4. 2002, D. Hauck a L. Cizek leg.
MR0065	PHILIPPINES, Mindanno, Bagongsilang, 1650 m, 17. 1. – 20. 1. 2007, Bolm lgt.
MR0066	PHILIPPINES, Mindanno, Bagongsilang, 1650 m, 17. 1. – 20. 1. 2007, Bolm lgt.
MR0067	PHILIPPINES, Mindanao, Mt. Apo, L. Agec, 1400 m, 21. 1. – 22. 1. 2007, Bolm lgt.
MR0068	PHILIPPINES, Mindanno, Bagongsilang, 1650 m, 17. 1. – 20. 1. 2007, Bolm lgt.
MR0069	PHILIPPINES, Mindanao, Mt. Kitanglad, 1800 m, 14. 1. – 15. 1. 2007, Bolm lgt.
MR0070	INDONESIA, Papua, 5 km S of Kobakma, 1220 m, 5. 12. 2015, Bolm lgt.
MR0071	PHILIPPINES, Mindanao, Mt. Apo, L. Agec, 1400 m, 21. 1. – 22. 1. 2007, Bolm lgt.
MR0072	INDONESIA, Halmahera, SE slope og 6n Jailolo, 450 m, 15. 12. 2016, Bolm lgt.
MR0073	PHILIPPINES, Mindanao, Mt. Apo, L. Agec, 1400 m, 21. 1. – 22. 1. 2007, Bolm lgt.
MR0074	INDONESIA, Halmahera, NE of telaga Paca, 220 m, 11. 12. 2016, Bolm lgt.
MR0075	INDONESIA, S Sulawesi, Malino Gn. Lompobatang, 1800 m, 13. 7. – 14. 7. 2001 , Bolm lgt.
MR0076	PHILIPPINES, Mindanao, Mt. Kitanglad, 1800 m, 14. 1. – 15. 1. 2007, Bolm lgt.
MR0077	PHILIPPINES, Mindanao, Mt. Apo, L. Agec, 1400 m, 21. 1. – 22. 1. 2007, Bolm lgt.

Pokračování Přílohy 1: Přehled studovaného materiálu, který byl nově sekvenován

Číslo vzorku	Lokalita, datum sběru a sběratel
MR0078	INDONESIA, S Sulawesi, Malino Gn. Lompobatang, 1800 m, 13. 7. – 14. 7. 2001 , Bolm lgt.
MR0079	INDONESIA, S Sulawesi, Malino Gn. Lompobatang, 1800 m, 13. 7. – 14. 7. 2001 , Bolm lgt.
MR0080	INDONESIA, S Sulawesi, Malino Gn. Lompobatang, 1800 m, 13. 7. – 14. 7. 2001 , Bolm lgt.
MR0081	INDONESIA, Papua, 5 km S of Kobakma, 1220 m, 5. 12. 2015, Bolm lgt.
MR0082	INDONESIA, Halmahera, 5 km E of Tobelo, 130 m, 10. 12. 2016, Bolm lgt.
MR0083	INDONESIA, Halmahera, 5 km E of Tobelo, 130 m, 10. 12. 2016, Bolm lgt.
MR0084	INDONESIA, Papua, Depapre 21 km NW Sentani, 100 m, 16. 12. 2012, Bolm lgt.
MR0085	INDONESIA, S Sulawesi, Malino Gn. Lompobatang, 1800 m, 13. 7. – 14. 7. 2001, Bolm lgt.
MR0086	INDONESIA, S Sulawesi, Malino Gn. Lompobatang, 1800 m, 13. 7. – 14. 7. 2001, Bolm lgt.
MR0087	INDONESIA, Sulawesi Utara, Ambang East Slope, 1500 m, 25. 11. 2016, Bolm lgt.
MR0088	INDONESIA, Halmahera, SE slope og 6n Jailolo, 450 m, 15. 12. 2016, Bolm lgt.
MR0089	INDONESIA, Papua, Yahukimo, 18 km N of Dekai, 250 m, 25. 11. 2016, Bolm lgt.
MR0090	INDONESIA, Papua, Lereh env, 275 m, 15. 12. 2015, Bolm lgt.
MR0091	INDONESIA, Halmahera, 5 km E of Tobelo, 130 m, 10. 12. 2016, Bolm lgt.
MR0092	INDONESIA, Papua, Depapre 21 km NW Sentani, 100 m, 16. 12. 2012, Bolm lgt.
MR0093	LAOS – NE, Hona Phan prov., 1480 – 1900 m, PHOW PANE Mt., 22. 4. – 14. 5. 2008, C. a G. Holzchuh leg.
MR0094	LAOS – NE, Hona Phan prov., 1480 – 1900 m, PHOW PANE Mt., 22. 4. – 14. 5. 2008, C. a G. Holzchuh leg.
MR0095	PERU, 10 km NW San Juan de Cacazu, Madre Nino, 724 m, 01. 12. – 6. 12. 2013, KJMB lgt.
MR0096	IVORY COAST, Mt. Tonkoui Peak, 1171 m, 12. 7. – 18. 7. 2015, General collection Aristophanous M., Moretto P., Ruzzier E., leg.
MR0097	INDONESIA, Papua, Depapre 21 km NW Sentani, 100 m, 16. 12. 2012, Bolm lgt.
MR0098	INDONESIA, Papua, Depapre 21 km NW Sentani, 100 m, 16. 12. 2012, Bolm lgt.
MR0099	INDONESIA, Papua, Lereh env, 275 m, 15. 12. 2015, Bolm lgt.
MR0100	INDONESIA, Papua, Lereh env, 275 m, 15. 12. 2015, Bolm lgt.
MR0101	INDONESIA, Papua, Yahukimo, 18 km N of Dekai, 250 m, 25. 11. 2016, Bolm lgt.
MR0102	INDONESIA, Papua, Yahukimo, 18 km N of Dekai, 250 m, 25. 11. 2016, Bolm lgt.
MR0103	MALAYSIA, Perak, 50 km NE Gerik Titiwangsa 1100 m, 30. 3. – 13. 4. 2015
MR0104	MALAYSIA, Perak, W slope of Gn. Bintang, 350 m, 25. 3. 2016, M3B

Příloha 2: Přehled studovaného materiálu přidaného z již dříve osekvenovaných exemplářů

Číslo vzorku	Přístupové kódy v databázi GenBank			Původ
	<i>rrnL</i>	<i>coxI</i>	<i>nad5</i>	
UPOL A00470	KT751980	KT751663	KT751825	Malaysia
UPOL A00471	KT751981	KT751664	KT751826	Malaysia
UPOL A00472	KT751982	KT751665	–	Malaysia
UPOL A00473	KT751983	KT751666	KT751827	Malaysia
UPOL A00474	KT751984	KT751667	–	Malaysia
UPOL A00475	KT751985	–	KT751828	Malaysia
UPOL A00476	KT751986	KT751668	–	Malaysia
UPOL A00478	KT751988	KT751670	KT751830	Vietnam
UPOL A00479	KT751989	KT751671	KT751831	Vietnam
UPOL A00480	KT751990	KT751672	KT751832	Laos
UPOL A00481	KT751991	–	KT751833	Laos
UPOL A00482	KT751992	KT751673	KT751834	Laos
UPOL A00483	KT751993	KT751674	KT751835	Laos
UPOL A00484	KT751994	KT751675	KT751836	Thailand
UPOL A00485	KT751995	KT751676	KT751837	India
UPOL A00486	KT751996	KT751677	KT751838	India
UPOL A00487	KT751997	KT751678	KT751839	India
UPOL A00488	KT751998	KT751679	KT751840	Taiwan
UPOL A00489	KT751999	KT751680	KT751841	Taiwan
UPOL A00490	KT752000	KT751681	KT751842	Taiwan
UPOL A00491	KT752001	KT751682	KT751843	Japan
UPOL A00492	KT752002	KT751683	KT751844	Japan
UPOL A00493	KT752003	KT751684	KT751845	Kenya
UPOL A00494	KT752004	KT751685	KT751846	Cameroon
UPOL A00495	KT752005	KT751686	KT751847	Cameroon
UPOL A00496	KT752006	KT751687	–	Cameroon
UPOL A00497	KT752007	KT751688	–	Cameroon
UPOL A00498	KT752008	KT751689	KT751848	Cameroon
UPOL A00499	KT752009	KT751690	KT751849	Zambia
UPOL A00500	KT752010	KT751691	KT751850	Zambia
UPOL A00501	KT752011	KT751692	KT751851	RSA
UPOL A00502	KT752012	KT751693	KT751852	Cameroon
UPOL A00503	KT752013	KT751694	KT751853	Cameroon
UPOL A00504	KT752014	KT751695	KT751854	Cameroon
UPOL A00505	KT752015	KT751696	KT751855	Canada
UPOL A00507	KT752016	KT751697	KT751856	Canada
UPOL A00509	KT752017	KT751698	KT751857	Argentina
UPOL A00510	KT752018	KT751699	KT751858	Argentina
UPOL A00511	KT752019	KT751700	KT751859	Costa Rica
UPOL A00512	KT752020	KT751701	KT751860	Costa Rica
UPOL A00513	KT752021	KT751702	KT751861	Panama
UPOL A00555	KT752053	KT751732	KT751890	Thailand

Pokračování Přílohy 2: Přehled studovaného materiálu přidaného z již dříve osekvenovaných exemplářů

Číslo vzorku	Přístupové kódy v databázi GenBank			Původ
	<i>rrnL</i>	<i>cox1</i>	<i>nad5</i>	
UPOL A00579	KT752077	KT751754	KT751911	Nicaragua
UPOL A00580	KT752078	KT751755	KT751912	USA
UPOL A00619	KT752117	KT751791	KT751950	Ecuador
UPOL A00632	–	KT751802	KT751961	Ecuador
UPOL A00634	KT752130	KT751804	KT751963	Ecuador
UPOL A00635	KT752131	KT751805	KT751964	Nicaragua
UPOL A00639	KT752135	KT751808	KT751966	Ecuador
UPOL A00643	KT752138	KT751811	KT751969	Ecuador
UPOL A00646	KT752140	KT751813	KT751971	Ecuador
UPOL ZL2012	EF143222	EF143237	EF143251	Japan
UPOL ZL2018	EF143227	EF143241	EF143255	Japan
UPOL 000031	DQ180985	DQ181207	DQ181361	Borneo
UPOL 000243	DQ180991	DQ181213	DQ181367	Borneo
UPOL 000303	DQ180993	DQ181215	DQ181369	Sumatra
UPOL 000L13	DQ180970	DQ181192	DQ181346	Borneo
UPOL 001031	DQ181035	DQ181257	DQ181411	USA
UPOL K0377	KF625975	KF625384	–	French Guyana

Příloha 3: Přehled výsledků amplifikace jednotlivých fragmentů u testovaných vzorků

Vzorek	<i>rrnL</i>	<i>cox1</i>	<i>nad5</i>	Vzorek	<i>rrnL</i>	<i>cox1</i>	<i>nad5</i>	Vzorek	<i>rrnL</i>	<i>cox1</i>	<i>nad5</i>
MR0001	+	+	+	MR0036	+	+	+	MR0071	+	+	+
MR0002	+	+	+	MR0037	+	+	+	MR0072	+	+	+
MR0003	+	+	-	MR0038	+	+	+	MR0073	+	+	+
MR0004	+	+	+	MR0039	+	+	+	MR0074	+	-	+
MR0005	+	+	+	MR0040	+	+	+	MR0075	+	+	+
MR0006	+	+	+	MR0041	+	+	-	MR0076	+	+	+
MR0007	+	+	+	MR0042	+	+	+	MR0077	+	+	+
MR0008	+	+	+	MR0043	+	+	+	MR0078	+	+	+
MR0009	+	+	+	MR0044	+	+	+	MR0079	+	+	+
MR0010	+	+	+	MR0045	+	+	+	MR0080	+	+	+
MR0011	+	+	+	MR0046	+	+	+	MR0081	+	+	+
MR0012	+	+	+	MR0047	+	+	-	MR0082	+	+	+
MR0013	+	+	+	MR0048	+	+	+	MR0083	+	+	+
MR0014	+	+	+	MR0049	+	+	+	MR0084	+	+	+
MR0015	+	+	+	MR0050	+	+	+	MR0085	+	+	+
MR0016	+	+	+	MR0051	+	+	+	MR0086	+	+	+
MR0017	+	+	+	MR0052	+	+	+	MR0087	+	+	+
MR0018	+	+	+	MR0053	+	+	+	MR0088	+	+	+
MR0019	+	+	-	MR0054	+	+	+	MR0089	+	-	+
MR0020	+	+	+	MR0055	+	+	+	MR0090	+	+	+
MR0021	+	+	+	MR0056	+	+	+	MR0091	+	+	+
MR0022	+	+	+	MR0057	+	+	+	MR0092	+	+	+
MR0023	+	+	+	MR0058	+	+	+	MR0093	+	+	+
MR0024	+	+	+	MR0059	+	+	+	MR0094	+	+	+
MR0025	+	+	+	MR0060	+	+	+	MR0095	+	+	+
MR0026	+	+	+	MR0061	+	+	+	MR0096	-	-	-
MR0027	+	+	+	MR0062	+	+	+	MR0097	+	+	+
MR0028	+	+	+	MR0063	+	+	-	MR0098	+	-	+
MR0029	+	+	+	MR0064	-	-	-	MR0099	+	+	+
MR0030	+	+	+	MR0065	+	+	+	MR0100	+	+	+
MR0031	+	+	+	MR0066	+	+	+	MR0101	+	+	+
MR0032	+	+	+	MR0067	+	+	-	MR0102	+	+	+
MR0033	+	+	+	MR0068	+	+	+	MR0103	+	+	-
MR0034	+	+	+	MR0069	+	+	+	MR0104	+	+	-
MR0035	+	+	+	MR0070	+	+	+				

+ úspěšná amplifikace, - neúspěšná amplifikace

Příloha 4: Srovnání klasifikace tribu Platerodini

Kleine, 1933	Bocák a Bocáková, 1989	Bocáková, 2001	Bocák a Bocáková, 2008	Tato studie
<p>Lycinae: Platerodini <i>Plateros</i> Bourgeois, 1879 Sg. <i>Mimolycynella</i> Pic, 1925 <i>Planeteros</i> Gorham, 1883 <i>Melaneros</i> Fairmaire, 1877 <i>Calleros</i> Gorham, 1881 <i>Falsocalleros</i> Pic, 1933 <i>Teroplas</i> Gorham, 1884 <i>Calloplateros</i> Pic, 1923 <i>Cavoplateros</i> Pic, 1913 Sg. <i>Pseudeuplectus</i> Pic, 1922 <i>Graciloplateros</i> Pic, 1921 <i>Calolycus</i> Gorham, 1881 <i>Microlycus</i> Pic, 1922 <i>Tolianus</i> Pic, 1921 <i>Samoaneros</i> <i>Ditoneces</i> Waterhouse, 1879 Sg. <i>Cautirodes</i> Pic, 1921 <i>Microditoneces</i> Pic, 1921 <i>Microplateros</i> Pic, 1921 <i>Dihammatus</i> Waterhouse, 1879 <i>Microlyropaeus</i> Pic, 1929 <i>Subdihammatus</i> Kleine, 1926 <i>Libnetis</i> Waterhouse, 1878 <i>Libnetisia</i> Pic, 1921 <i>Libnetomorphus</i> Pic, 1921 <i>Libnetomimus</i> Kleine, 1927 <i>Fernandum</i> Pic, 1924 <i>Melampyrus</i> Waterhouse, 1879 <i>Ponyalis</i> Fairmaire, 1899 <i>Lyponia</i> Waterhouse, 1878</p>	<p>Lycinae: Platerodini: Platerodinina <i>Calleros</i> <i>Calolycus</i> <i>Calloplateros</i> <i>Cavoplateros</i> Sg. <i>Pseudeuplectus</i> <i>Dihammatus</i> <i>Ditoneces</i> Sg. <i>Cautirodes</i> <i>Eropterus</i> Green, 1951 <i>Falsocalleros</i> <i>Fernandum</i> <i>Graciloplateros</i> <i>Lopheros</i> <i>Melampyrus</i> <i>Melaneros</i> <i>Microlycus</i> <i>Microplateros</i> <i>Microlyropaeus</i> <i>Planeteros</i> <i>Plateros</i> Sg. <i>Mimolycynella</i> <i>Pseudoplateros</i> Green, 1951 <i>Samoaneros</i> <i>Sculptocalleros</i> Pic, 1949 <i>Subdihammatus</i> <i>Teroplas</i> <i>Tolianus</i> Lycinae: Platerodini: Libnetinina <i>Libnetomimus</i> <i>Libnetomorphus</i> <i>Libnetis</i> <i>Libnetisia</i> <i>Macrolibnetis</i> Pic, 1938 Lycinae: Platerodini: Lyponyina <i>Lyponia</i></p>	<p>Platerodinae incertae sedis <i>Calolycus</i> Gorham, 1881 <i>Microlycus</i> Pic, 1922 Platerodinae: Platerodini s. str. <i>Cavoplateros</i> Pic, 1913 syn. <i>Pseudeuplectus</i> Pic, 1922 <i>Falsocalleros</i> Pic, 1933 syn. <i>Pseudoplateros</i> Green, 1951 <i>Plateros</i> Bourgeois, 1879 syn. <i>Melaneros</i> Fairmaire, 1877: B & B, 1992 syn. <i>Calleros</i> Gorham, 1881 syn. <i>Calloplateros</i> Pic, 1923 syn. <i>Costatoplateros</i> Pic, 1949 syn. <i>Ditoneces</i> Waterhouse, 1879 syn. <i>Cautirodes</i> Pic, 1921 syn. <i>Graciloplateros</i> Pic, 1921 syn. <i>Libnetomorphus</i> Pic, 1921 syn. <i>Microplateros</i> Pic, 1921 syn. <i>Planeteros</i> Gorham, 1883 syn. <i>Tolianus</i> Pic, 1921 syn. <i>Melampyrus</i> Waterhouse, 1879 syn. <i>Falsotrichalus</i> Pic, 1921 sg. <i>Mimolycynella</i> Pic, 1925 <i>Sculptocalleros</i> Pic, 1949 <i>Teroplas</i> Gorham, 1884 Platerodinae: Libnetini <i>Dihammatus</i> Waterhouse, 1879 <i>Libnetis</i> Waterhouse, 1878 syn. <i>Libnetomimus</i> Kleine, 1927 <i>Libnetisia</i> Pic, 1921 <i>Microlyropaeus</i> Pic, 1929 Platerodinae: Lyponiini <i>Lyponia</i> Waterhouse, 1878 syn. <i>Ponyalis</i> Fairmaire, 1899 Leptolycinae <i>Fernandum</i> Pic, 1924 <i>Subdihammatus</i> Kleine, 1926 Lycidae incertae sedis <i>Melaneros</i> Fairmaire, 1877 <i>Platerodrilus</i> Pic, 1921 syn. <i>Macrolibnetis</i> Pic, 1938</p>	<p>Libnetinae <i>Libnetis</i> Waterhouse, 1878 <i>Libnetisia</i> Pic, 1921 <i>Prolibnetis</i> Bocáková, 2004 Lycinae: Platerodini s. str. <i>Calolycus</i> Gorham, 1881 <i>Cavoplateros</i> Pic, 1913 <i>Falsocalleros</i> Pic, 1933 <i>Microlycus</i> Pic, 1922 <i>Neoplateros</i> Kazantsev, 2006 <i>Plateromimus</i> Kazantsev, 2006 <i>Plateros</i> Bourgeois, 1879 <i>Sculptocalleros</i> Pic, 1949 <i>Teroplas</i> Gorham, 1884 <i>Ultraplateros</i> Kazantsev, 2006 Lycinae: Lyponiini <i>Lyponia</i> Waterhouse, 1878 syn. <i>Ponyalis</i> Fairmaire, 1899</p>	<p>Lycinae: Platerodini <i>Calolycus</i> Gorham, 1881 <i>Cavoplateros</i> Pic, 1913 <i>Falsocalleros</i> Pic, 1933 <i>Microlycus</i> Pic, 1922 <i>Neoplateros</i> Kazantsev, 2006 <i>Plateromimus</i> Kazantsev, 2006 <i>Plateros</i> Bourgeois, 1879 <i>Teroplas</i> Gorham, 1884 <i>Ultraplateros</i> Kazantsev, 2006</p>