

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ZOOLOGIE



**MOLEKULÁRNÍ FYLOGENEZE RODU AGRILUS:
SPECIACE A ŽIVNÉ ROSTLINY**

Bakalářská práce

Vypracovala: Ivana Kelnarová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Systematická biologie a ekologie

Forma studia: prezenční

Školitel: Prof. Ing. Ladislav Bocák, Ph. D.

Olomouc 2015

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením vedoucího Prof. Ing. Ladislava Bocáka Ph. D. a použila jsem pouze uvedené bibliografické zdroje.

V Olomouci dne 20. 4. 2015

.....

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala Prof. Ing. Ladislavu Bocákovi, Ph.D za odbornou konzultaci k této práci. Taktéž musí poděkovat Mgr. Renatě Bílkové za pomoc při práci v laboratoři. Za podporu velmi děkuji svému příteli, rodině a kamarádům.

XX XXXXXX. XXXXXX XXXX XXXXXXXXXXXX XX XXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXXXX
XX XXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX X XX XXXXX XXXXXXXXXXXXXXXX.
XXXXXXXXXX XXXXXXXX XXXXXXXX XX XXXXX XXXXXXXX XXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXX. XXXXX XXXXX XXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXX XXXXXXXX XX XXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXX X XXXXXXXXXXXXXXXX
XXX. XXXXX XXXXXXXXXXX, XX XXXXX XXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXX XXXXXXXX X XXXXX XXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXX. XXXXXXXX
XXXXXXXXXXXX XXXXXXXX XX XXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXX,
XXXXXXXXXX XX XXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXX X XXXXX X XXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX.

Klíčová slova: Agrilus, speciace, živné rostliny, molekulární fylogeneze, delimitace druhů

Počet stran: 34

Počet stran příloh: 18

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

First name and surname of the author: Ivana Kelnarová

Name of the thesis: Molecular phylogeny of the genus *Agrilus*: speciation and host plants

Type of thesis: Bachelor

Workplace: Department of Zoology, Faculty of Science, Olomouc

Supervisor: Prof. Ing. Ladislav Bocák Ph. D.

Year of defense: 2015

ABSTRACT:

This paper is focused on evaluating the influence of speciation process on diversification of the genus *Agrilus*. When focusing on the genus *Agrilus*, there are two possible variants of speciation - allopatric geographical speciation, which is confirmed if the species of the genus *Agrilus* share the same, possibly phylogenetically related, host plant and sympatric speciation, which would be likely if sister species specialized on different host plants. Furthermore, this work focuses on the delimitation of species based on morphology and delimitation based on molecular phylogeny. An assessment of morphologically delimited species groups is also included.

Samples were morphologically identified by E. Jendek (currently working with Canadian Food Agency, Ottawa). He is also responsible for the sequence of the genus *Agrilus* and the outgroup. Part has been sequenced from DNA, isolated in the Barcoding of Life project in the Natural History Museum, London. Only a part of these sequences' chromatograms were edited, I have been granted other primary data in order to finish editing chromatograms, to compile data matrices and to perform phylogenetic analyses. Laboratory procedures include DNA isolation, amplification, cycle sequencing and necessary purification of products.

XXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXX XXXX XXXXXXXXXXX XX
XXXXX X XXXXXXXXXXX XXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX. XXX XXX
XXXXXXXX XX XXXXXXX XXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXX X XXXXXXX XXXXX
X XXXXXXX XXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXX. XX XXXXX XXXXXXX XXX XXXXXXX

Obsah

1. ÚVOD	9
1.1. Brouci (<i>Coleoptera</i>) a <i>Buprestidae</i> jako modelová skupina.....	9
1.1.1. Morfologie čeledi <i>Buprestidae</i>	9
1.1.2. Biologie a rozšíření čeledi <i>Buprestidae</i>	10
1.2. Modelová skupina: <i>Agrilus</i> Curtis, 1825	10
2. SPECIACE	12
2.1. Přehled typů speciace.....	12
2.1.1. Alopatrická speciace.	12
2.1.2. Parapatrická speciace	13
2.1.3. Sympatrická speciace	13
3. CÍLE PRÁCE	17
4. METODIKA.....	18
4.1. Materiál.....	18
4.2. Laboratorní procedury	18
4.2.1. Izolace DNA.....	18
4.2.2. PCR amplifikace DNA.....	19
4.2.3. Elektroforéza	20
4.2.4. Sekvenační reakce	20
4.2.5. Čištění sekvenačního produktu	21
4.2.6. Sekvenování	21
4.3. Analýza DNA sekvencí	21
4.4. Fylogenetická analýza.....	22
4.5. Identifikace druhů	22
4.5.1. Určení druhů na základě genetické vzdálenosti	22
4.5.2. Určení druhů na základě tvaru fylogramu	23
5. VÝSLEDKY	24
5.1. Identifikace druhů	27
5.2. Použité zkratky	27
6. DISKUZE.....	28
7. CITOVANÁ LITERATURA	30
8. SEZNAM PŘÍLOH.....	34

1. ÚVOD

Poznání diverzity je nezbytným předpokladem pro její využití i ochranu. Součástí tohoto studia je nejen taxonomický popis rozmanitosti, ale i studium procesů, které vedou k jejímu vzniku. Tato práce je zaměřena na poznání fylogenetických vztahů uvnitř mimořádně diverzifikovaného rodu *Agrilus* (*Coleoptera: Buprestidae*).

1.1. Brouci (*Coleoptera*) a *Buprestidae* jako modelová skupina

Brouci představují skupinu živočichů s mimořádnou diverzitou. Na světě je popsáno téměř 400 000 druhů (Bocak et al. 2014) a přitom většina druhů dosud nebyla objevena a velké množství studií přináší každoročně stovky nových druhů (Riedel et al. 2013). Velký podíl na této rozmanitosti mají fytofágní brouci, kteří reprezentují přibližně 130 000 druhů a specializují se zejména na krytosemenné rostliny (Prado et al. 2012). Předpokládá se, že právě vznik krytosemenných rostlin je jedním ze zdrojů diverzifikace brouků (McKenna et al. 2009)

Tato studie se zabývá jednou z těchto velmi diverzifikovaných skupin čeledí – krascovití (*Buprestidae*). Krasci jsou ve většině pojetí jedinou čeledí nadčeledi *Buprestoidea* v sérii *Elateriformia*. Jejich fylogenetické postavení je dosud předmětem diskusí: buď jsou samostatnou linií v sesterské pozici s *Dryopoidea* nebo jsou součástí *Dryopoidea* (Bocakova et al. 2007, Bocak et al. 2014, Kunderata et al. 2014).

Zástupci čeledi *Buprestidae* obývají téměř všechny zoogeografické oblasti. Celkem bylo popsáno cca 8400 druhů (Bocak et al. 2014). Skupinou krasců vyskytujících se v palearktické oblasti je například podčeleď *Agrilinae*, která zahrnuje velké množství rodů, mezi které patří i rod *Agrilus* (Jendek & Polakova 2014).

1.1.1. Morfologie čeledi *Buprestidae*

Tato linie brouků se vyznačuje vesměs drobným tělem a nápadným metalickým zbarvením. Mimo typické zástupce lze na světě nalézt druhy velmi různé velikosti, tvaru a zbarvení, od tenkých a protáhlých druhů až po druhy zavalité a ploché, co se týče barvy druhy černé až jasně kovové. Například podčeleď *Polycestinae* se vyznačuje válcovitým tělem. Naopak jedinci z podčeledi *Trachyinae* jsou typičtí širšími, zavalitými, velmi malými těly trojúhelníkovitého tvaru (Bily 1982, Bily 1989). Variabilní zbarvení lze demonstrovat na druhu *Agrilus biguttatus*, který má černou hlavu a hnědozelené krovky s dvěma oválnými bílými tečkami na spodní části krovek (Brown et al. 2015). Naproti tomu např. druh *Anthaxia*

candens je velmi výrazný, na okrajích krovek oranžovočervený a na zbytku těla černý a zelenomodrý (Mertlik 2012).

Dospělci mají krátkou hlavu s vertikálně stavěným ústním kousacím ústrojím. Tykadla bývají obvykle středně dlouhá. Oči jsou oválného, eliptického nebo ledvinovitého tvaru. V některých případech mohou přesahovat přes okraj hlavy. Krovky má vyvinuto mnoho druhů po celém zadečku. Jejich struktura je rýhovaná nebo tečkovaná. U krasců je vyvinut pohlavní dimorfismus, někdy i velmi výrazný (Bily 1982).

Larva krasců je oligopodní, buprestoidní, dorzoventrálně zploštělá, s mohutnou hrudí, která nebývá pokryta srstí (Bily 1982, Schonherr 1974).

1.1.2. Biologie a rozšíření čeledi *Buprestidae*

Obecně je larvální stádium krasců dřevokazné, přesto existují linie, u kterých se vytvořila herbivorní larvální stádia živící se kořeny, popřípadě listy rostlin, například rod *Trachys*. Dospělci krasců se živí buď stejnou hostitelskou rostlinou jako larva, jinou rostlinou nebo se živí pylem a nektarem květů různých rostlin (Bellamy & Volkovitsh 2005).

Krasci jsou denní živočichové, dávají přednost prosluněným stanovištím. Většina druhů svůj životní cyklus prožije pouze na jediné rostlině nebo na ji příbuzných rostlinách. Zde také dochází k rozmnožování. Samice klade vajíčka jednotlivě nebo v malých skupinkách do záhybů kůry či do dřeva. Vajíčka jsou chráněna tuhnoucí sekrecí (Vodka et al. 2009).

1.2. Modelová skupina: *Agrilus* Curtis, 1825

Agrilus je nejpočetnější rod živočichů z hlediska počtu druhů – přibližně 2880 uznaných druhů (Pentinsaari et al. 2014). Odhadovaný počet je však až dvojnásobně vyšší. Tento rod je významný svým fytofágním způsobem života. U části druhů však dosud nebyly hostitelské rostliny zjištěny. Některé druhy jsou známy pouze výskytem dospělců, ti se však obvykle živí na stejné živné rostlině jako larva a využívají rostlinu za účelem rozmnožování a kladení vajíček. Alespoň jedna živná rostlina je známa pouze u 686 známých druhů rodu *Agrilus*. U většiny jedinců se jedná o druhy živných rostlin vyskytujících se v paleoarktické a nearktické oblasti (Jendek & Polakova 2014). V paleoarktické oblasti se například setkáváme s výskytem *A. olivicolor* v Německu, s *A. macroderus* v Rumunsku, s *A. fuscosericeus* v Rakousku, s *A. longicollis* v Thajsku a s *A. blatteicollis* v Severním Vietnamu (Jendek 2003) Z dalších oblastí světa lze uvést například druh *A. assimilis* nebo *A. echidna* vyskytující se v Austrálii (Curletti 2001). V Severní Americe se můžeme setkat s invazivním

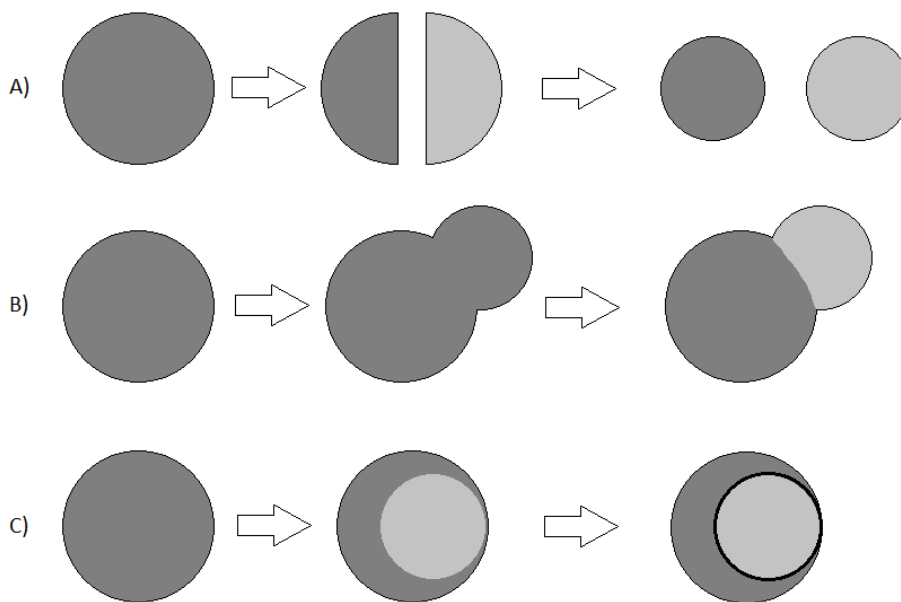
druhem *A. planipennis* (Herms & McCullough 2014, Wang et al. 2010). V africké fauně, konkrétně v Keni, lze nalézt kupříkladu druh *A. marietae* sp. n. (Curletti & Sakalian 2007).

Většina druhů je neškodná, nicméně existují druhy, které napáchaly na rozlehlých místech velké škody. Stadium larvy je v tomto ohledu daleko významnější než stadium dospělé. Larva totiž žije až tři roky, které představují převážnou část celého života jednoho jedince. Příkladem významného škůdce je druh *A. planipennis*, který pochází z jihovýchodní Asie. V Číně napadá převážně slabé stromy nebo stromy vyskytující se na okrajích lesů, přesto však byly zaznamenány případy napadení stromů zdánlivě zdravých. Tento brouk se dostal v roce 2002 do oblasti Velkých jezer v Severní Americe, kde způsoboval velké škody na jasanech (*Fraxinus excelsior*). Příčinou velkého rozsahu škod je obtížnost odhalení raného stádia napadení stromu tímto parazitem. Jedinou známkou výskytu jsou svislé rýhy, které zůstávají na hladké kůře. Problémem je absence jakékoliv obrany stromu proti napadení. Jiné druhy stromů reagují na zasažení fytofágy z rodu *Agrilus* produkcí mízy. Týká se to zejména stromů napadaných druhy *A. sorocinus*, *A. mali*, *A. zanthoxylumi*, *A. auriventris*, *A. ratundicollis*. V případě *A. planipennis* však zůstane ve stromu pouze vstupní otvor ve tvaru písmene D, který zde zanechal strom opouštějící dospělec v následujícím roce (Jendek & Polakova 2014, Muirhead et al. 2006, Wang et al. 2010). Dalším příkladem škůdce z rodu *Agrilus* je *A. bilineatus* vyskytující se na dubu (*Quercus* sp.) (Muzika et al. 2000).

2. SPECIACE

2.1. Přehled typů speciace

Speciace je jev, při kterém vzniká jeden nebo více nových druhů z druhu rodičovského. V současnosti je v literatuře rozlišováno několik typů speciace, jež jsou definovány mechanismy reprodukční izolace. Za velmi častý typ je považována speciace alopatická. Typ sympatrické speciace byl dlouho bouřlivě diskutován (např. Mayer 1969), ale dnes je dobře doložen na modelových případech. O mechanismech parapatické speciace se dosud vedou spory (Flegr 2005).



Obrázek 1. Graficky znázorněný průběh některých typů speciace:

- a) alopatická speciace – nové druhy jsou geograficky odděleny od jednoho předchůdce
- b) parapatická speciace – nový druh vzniká v těsném území druhu původního
- c) sympatrická speciace – nový druh vzniká uvnitř území druhu původního

2.1.1. Alopatická speciace

Termínem alopatrie se rozumí vznik druhů v geografické izolaci, tzn., že se jejich areály v době vzniku reprodukční izolace nepřekrývají (Mayr 1969). Což znamená, že tyto druhy musely být odděleny nějakou geografickou bariérou, která jim v první fázi vzniku dceřiných druhů zabránila ve vzájemném křížení a toku genů. V důsledku této izolace se poté oddělily na dva nové druhy. Pokud se však následně dostanou znova do styku a nebudou dosud

dostatečně diferencovány, může opět dojít k jejich splynutí. Při dostatečném rozrůznění vzniklých linií dochází ke koexistenci na stejném území a to často vede k adaptaci na odlišné niky, nebo může dojít k vytlačení jedné linie druhou (Losos et al. 1984, Flegr 2005).

2.1.2. Parapatrická speciace

V případě speciace parapatrické nedochází k izolaci geografické, ale ke vzniku primární hybridní zóny, kde vznikne nějaká odlišnost, která se poté u vznikajících dceřiných druhů zafixuje. Díky reprodukčně izolačním mechanismům, dochází ke vzniku nového druhu (Ridley 2004).

2.1.3. Sympatrická speciace

Vysvětlit pojem sympatrické speciace není zcela jednoduché, tak jako tomu bylo u předchozích pojmů, protože existuje mnoho definic, které jsou navíc komplikovány biogeografickým konceptem sympatrie a tak je vysvětlení pojmu sympatrické speciace ještě složitější (Bird et al. 2012). Pro svou těžkou prokazatelnost byl typ této speciace zpočátku zpochybňován. Podle dřívější evoluční syntézy (Huxley 1942) byla sympatrie považována za bezvýznamný proces, který nemá podstatný vliv na druhovou rozmanitost.

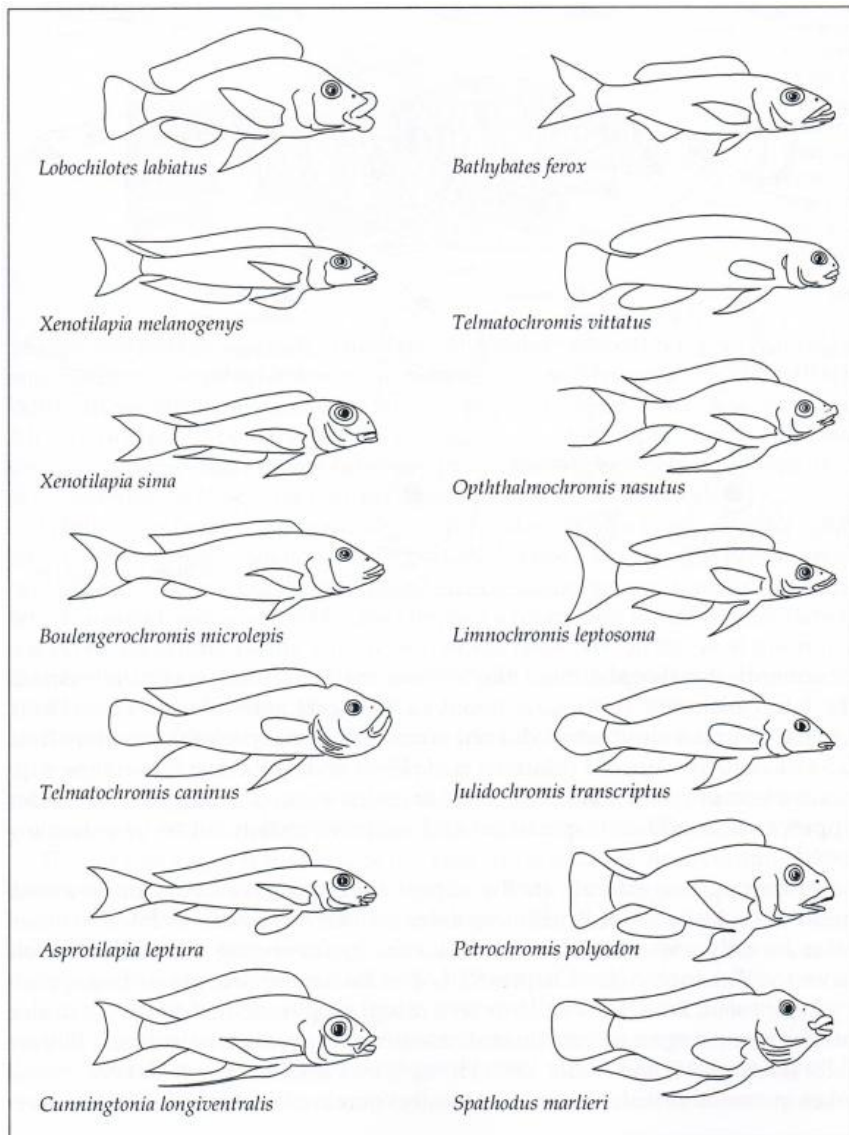
Obecně lze říci, že sympatrie je v podstatě opakem alopatrie. K rozrůznění druhu dochází na jednom území a populace jsou odděleny ekologicky či etologicky. Faktory, které způsobují tuto diverzifikaci, nazýváme izolační mechanismy. Izolačními mechanismy mohou v případě sympatrie spočívat v osídlení jiného specifického prostředí (např. jiná živná rostlina), odlišení ve vzorcích chování, časové faktory jako jiná doba páření nebo izolace v důsledku rozrůznění pohlavních orgánů, či chemická nekompatibilita pohlavních buněk – vajíček a spermií (Losos et al. 1984).

Důležitým prvkem v sympatrické speciaci je však to, že při celém procesu diferenciaci musí docházet k fyzickému kontaktu dvou vznikajících druhů na jednom území, jinak tuto speciaci nelze považovat v úzkém slova smyslu za sympatrickou. Jakmile dojde ke vzniku nějaké bariéry bránící ve styku druhů, které se dříve rozlišovaly sympatricky, hovoříme již o mikroalopatrii. Takovýmto příkladem je přenos parazita z jednoho hostitele na druhého, jež se vyskytuje na stejném území. Parazit na hostiteli původním a novém mají zdánlivě možnost se setkat, přesto však může dojít k tomu, že se znova již nepotkají, vzniká vnější bariéra a tyto dvě populace se mohou rozlišit v samostatné druhy (Flegr 2005).

Počáteční fází sympatrie je polymorfismus, který se neodvíjí od geografického rozmístění jedinců, ale závisí např. na specializaci na odlišnou živnou rostlinu. Pokud je páření

mezi těmito dvěma druhy nevýhodné, protože mají vznikající hybridy malou zdatnost, bude docházet k posílení rozrůznění daných linií (Ridley 2004). Příkladem počáteční fáze sympatrické speciace je diferenciace druhu *Rhagoletis pomonella*, patřící do čeledi *Tephritidae* (řád mouchy, čeleď vrtulovití). Jedná se o škůdce jabloní. Vajíčka jsou kladena do jablek a larvální stádia se pak samotným ovocem živí. V minulosti v Severní Americe se však tento jedinec vyskytoval na hlohu. Na jablkách byl spatřen teprve až v roce 1864. Od té doby se druh *Rhagoletis* šířil přes sady a začal napadat také jiné rostliny z čeledi *Rosaceae* (třešně, hrušky a růže). Dospělci dávají při rozmnožování přednost živné rostlině, na které vyrostli. Jedná se o asortativní páření, kdy se samec z jabloně páří se samicí pocházející z jabloně a samec pocházející s hlohu se samicí z hlohu. Tato situace již trvá přibližně 140 generací. Za tu dobu si obě skupiny, podle molekulárních dat, vyvinuli rozdílné enzymy. Rozdíly jsou také v genetice, dochází k rozrůznění doby larválních stádií. U linií vyvíjejících se na jabloních trvá vývoj asi 40 dnů, linie hostující na hlohu se vyvíjí o něco déle – 55–60 dnů, což ještě více podporuje reprodukční izolaci (Ridley 2004).

Dalším důkazem sympatrické speciace mohou být divergence a adaptivní radiace ryb v izolovaných jezerech. Ve Velkých afrických jezerech – Malawi, Tanganika a Viktoriino jezero, se vyskytují ryby, které se nazývají cichlidy. Ty byly desítky tisíc až milióny let izolovány. Z malého počtu základních linií cichlid se vyvinuly postupem času až stovky druhů. Tyto druhy mají velkou různorodost v morfologii, což v převážné většině případů souvisí s adaptací na přijímaný typ potravy a také ve zbarvení a rituály provázejícími jejich páření (Divisek & Culek 2013).



Obrázek 2. Rozmanitost cichlid (Divisek & Culek 2013).

Jiným příkladem izolovaných jezer je jezero v Yucatanském Lago Chichancanab, kde se vyskytují ryby rodu halančíkovec (*Cyprinodon*). Ty byly izolovány v malých jezerech jen několik tisíc let v důsledku změny hladiny moře od období pleistocénu. Lago Chichancanab obývá pět druhů halančíkovců, z nichž se každý specializuje na jiný druh potravy a díky tomu mají i různou stavbu těla a projevují určitý stupeň reprodukční izolace v chování a genetické stavbě. Podle studií zde ještě nedošlo k dokončení procesu speciace a u některých forem stále ještě dochází ke křížení (Divisek & Culek 2013).

V posledních letech vznikla studie zabývající se sympatrickou speciací podzemních slepců (*Spalax*) v Izraelské Galileji. Toto území je zajímavé svým geologickým podložím. Na jednom místě se zde potkává vyvěrlá čedičová hornina s křídovými usazeninami. To má za následek významné rozlišení dvou druhů prostředí s odlišnou strukturou půdy, flóry a jak

se podle této studie ukazuje, tak také fauny. Podzemí je zde totiž obýváno hlodavci rodu slepec (*Spalax*), konkrétně druhem *Spalax galili*, který se, jak se zdá, dělí na dvě skupiny. Každá skupina obývá odlišné prostředí a tyto skupiny se mezi sebou vzájemně nekříží. Molekulární data rozdílnost potvrdila. Zdá se tedy, že dochází k postupné izolaci obou skupin, která není nijak ovlivněna geografickou bariérou, a proto je možné hovořit o počátečním stadiu ekologicky ovlivněné sympatrické speciace (Hadid et al. 2013).

Ekologická speciace mšic je také velice zajímavá a mnozí výzkumníci se na tuto skupinu zaměřují, protože se jedná o fytofágní hmyz, jehož různé zaměření na živné rostliny by mohlo ukazovat na sympatrickou speciaci. U rodu *Cinara* je však speciace na živné rostliny, konkrétně jehličnany, kdy jsou některé druhy striktně monofágní a jiné zas vysoce polyfágní, pravděpodobně jen asi z poloviny činitelem jejich diferenciaci. Důležitou roli také sehrálo prostředí samo o sobě – geografické podmínky jako je klima, historie krajiny (ledovcové cykly) a druhová rozmanitost a vnitrodruhová variabilita živných rostlin v Evropě a v Americe (Jousselin et al. 2013).

3. CÍLE PRÁCE

Tato studie je zaměřena na fylogenezi a diverzifikaci rodu *Agrilus* a neklade si jako cíl taxonomickou revizi. V případě rodu *Agrilus* je možno uvažovat dva potenciální speciální mechanismy: speciaci geografickou, tedy vznik nových druhů v alopatrii a jejich následný kontakt ve společném areálu po dosažení reprodukční izolace nebo sympatrickou speciaci v důsledku kolonizace nových hostitelských rostlin a následném vzniku reprodukční izolace mechanismem posílení izolace v důsledku nižší fitness hybridů. Molekulární fylogeneze umožňuje sledování hostitelské specializace sesterských druhů a na základě fylogeneze je možné vyslovit hypotézu o mechanismech speciace vedoucích k jejich vzniku.

Specifickými úkoly je:

1. Sestavit na základě sekvencí DNA fylogenezi rodu *Agrilus* a porovnat delimitaci druhů na základě morfologie a delimitaci vyplývající z molekulární fylogeneze
2. Zhodnotit platnost morfologicky delimitovaných druhových skupin
3. Zjistit, jestli příbuzné druhy sdílejí stejnou, eventuálně fylogeneticky příbuznou hostitelskou rostlinu nebo jsou sesterské druhy specializované na různé hostitelské rostliny. První vzorec příbuznosti a hostitelských rostlin ukazuje na alopatriickou geografickou speciaci, kdežto druhý vzorec podporuje roli reprodukční izolace na základě volby odlišných hostitelských rostlin

4. METODIKA

4.1. Materiál

V laboratoři molekulární systematiky PřF UP byly v letech 2004–2013 shromážděny vzorky rodu *Agrilus* reprezentující 44 druhů rodu *Agrilus* z oblasti střední a západní Evropy (Slovensko, Maďarsko, Španělsko, Česká republika), USA a Kypru. Tyto druhy byly determinovány E. Jendekem a představují dosud největší soubor DNA dat pro rod *Agrilus*.

Jako outgroup (mimoskupina) byli do souboru vzorků pro izolaci DNA zařazeny druhy *Coraebus elatus*, *Nalanda fulgidicollis* a *Trachys minuta minuta*. Seznam sekvenovaných vzorků, jejich hostitelské rostliny a geografický původ se nachází v tabulce 5.

4.2. Laboratorní procedury

Sekvence rodu *Agrilus* a mimoskupiny připravil E. Jendek (nyní pracovník Canadian Food Agency, Ottawa) a část vzorků byla sekvenována z izolované DNA v rámci projektu Barcoding of Life v Přírodovědeckém muzeu v Londýně. Pouze část chromatogramů těchto sekvencí byla editována, ostatní primární data mi byla poskytnuta k dokončení editace chromatogramů, sestavení datových matic a provedení fylogenetické analýzy.

Laboratorní postupy zahrnovaly izolaci DNA, amplifikaci, cycle sequencing a potřebné purifikace produktů. Tyto procedury jsem použila při sekvenování omezeného počtu vzorků v rámci práce v laboratoři a stejné postupy byly použity pro získání sekvencí rodu *Agrilus*.

4.2.1. Izolace DNA

Z metatoraxu v lihu fixovaných dospělců, případně z celého toraxu larev byla izolována DNA pomocí DNeasy Blood & Tissue kit podle protokolu dodaného výrobcem (Qiagen, Inc.) Pro studium fylogenetických vztahů byly amplifikovány fragmenty mtDNA: *rrnL*, *cox1–5'* (barcode fragment) a *cox1–3'* (tzv. Pat–Jerry fragment). Fragmenty *rrnL* a *cox1–3'* jsou často používány ve fylogenetických studiích (např. Bocakova et al. 2007, Sklenarova et al. 2013, Masek & Bocak 2014), DNA barcode fragment byl navržen jako nástroj pro identifikaci neznámých vzorků organismů na základě sekvencí DNA (Hebert et al., 2003), a proto byl použit i v této studii.

Z vypreparované svaloviny metatoraxů, případně toraxů larev fixovaných v 96% etanolu se odpipetoval etanol a poté se nechala tkáň 20 minut vysoušet v koncentrátoru. Do jednotlivých vzorků se přidalo 180 µl ATL pufru a 20 µl proteinázy K a tkáň byla rozdrčena pomocí sterilní tyčinky.

Vzorky byly vloženy do termobloku, o teplotě 56 °C a lyzovány do rozpuštění tkáně. Ke každému vzorku se přidalo 200 µl AL pufru a po vortexování 200 µl 96% etanolu. Produkt, přenesený na kolonku se sběrnou mikrozkuvkou, se centrifugoval při 8000 rpm. Dále byla kolonka přesunuta na sterilní sběrnou mikrozkuvkou, přidáno 500 µl AW1 pufru a poté probíhala centrifugace vzorků při 8000 rpm po dobu 1 minuty. Krok s výměnou mikrozkuvky byl zopakován, ale tentokrát se přidalo 500 µl AW2 pufru a centrifugovalo se při 14 000 rpm po dobu 3 minut. K vzorkům přeneseným na novou sadu mikrozkuvek se přidalo 200 µl nuklease-free H₂O a nechaly se inkubovat na 1 minutu v pokojové teplotě. Poté se vzorky centrifugovaly po dobu minuty při 8000 rpm. Vznikla první eluce. Eluce se zopakovala s použitím 100 µl nuklease-free. Koncentrace DNA obou elucí se poté měřila na Nanodropu ND 1000 a pro přípravu templátu byly vzorky DNA zředěny na koncentraci nepřesahující ng/µl roztoku.

4.2.2. PCR amplifikace DNA

PCR amplifikace DNA probíhala za použití primerů uvedených v tabulce 1.

Tab. 1: Přehled primerů:

Název primeru	Délka primeru	Sekvence
16Sa	20–mer	5'– CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT – 3'
16Sb	22–mer	5'– CCG GTC TGA ACT CAG ATC ATG T – 3'
PAT	25–mer	5'– TCC ATT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A – 3'
JERRY	23–mer	5'– CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG – 3'

Typická PCR reakce obsahovala:

5 µl 10x PCR pufru

2 µl 50 mM MgCl₂

1 µl 10 µM primeru A (viz Tab. 1)

1 µl 10 µM primeru B (viz Tab. 1)

1,25 2mM dNTPS

0,2 µl Tag Invitrogen polymerázy

37,55 µl H₂O

2 µl DNA templátu (>30 ng/µl)

Do stripů se napipetovat příslušný objem templátu DNA. Do každé mikrozkušavky s DNA byl přidán mastermix pro PCR o objemu 48 μ l. Poté se stripy vortexovaly, stočily a přesunuly do termocycleru Thermo Cycler 2720 (Applied Biosystems). Zde proběhla amplifikace v následujících cyklech: 94 °C (2 minuty), 94 °C (30 sec), 50 °C (45 sec), 72 °C (120 sec) minut a na závěr 72 °C (10 min.), nakonec byla PCR reakce zchlazena na 4 °C. Úspěšnost amplifikace se vyhodnocuje pomocí elektroforézy.

4.2.3. Elektroforéza

Obsah roztoku pro elektroforézu:

0,45 g agarózy normal

45 ml 0,5x TAE

2 μ l Gel Red

1 μ l nanášecího pufru

4 μ l templátu z PCR

4 μ l HIND–III ladderu

V mikrovlnné troubě se v kádince uvařil roztok agarózy vzniklý smícháním agarózy normal s TAE. Pro přidání barviva Gel Red se vzniklý roztok musel nechat zchladit na cca 50 °C. Vysoká teplota by barvivo poškodila. Obsah kádinky se vylil do předem připravené misky rozdělující dvě vaničky přepážkou. Poté se přidaly hřebínky, které měly za úkol vytvořit jamky. Obsah misky se nechal na několik minut utuhnout. Po utužení se hřebínky vytáhly, jednotlivé vaničky se vložily do elektroforetické vany a přelily se 0,5x TAE na elektroforézu, tak aby byl vzniklý agarózový gel zcela ponořen. Do jamek od hřebínek byly nanášeny templáty s 1 μ l nanášecího pufru. Do jedné z jamek se napipetovaly 4 μ l HIND–III ladderu, aby bylo možné potvrdit proběhlou reakci. Elektroforéza probíhala 15 minut při 100 V. Poté bylo v transaminačním boxu pomocí UV pozorováno záření molekul DNA.

4.2.4. Sekvenční reakce

Z jednotlivých složek pro sekvenční reakci se vytvořila směs. Nejprve se vložila voda, poté primer, pufr a nakonec Big dye, která musí být na ledu a ve tmě. Poté se pipetovala DNA dle rozpisu. Výsledný roztok byl vložen do cycleru.

Roztok obsahoval:

1 μl Big Dye

2 μl 1,6 μM primeru

1 μl sekvenčního pufu

5 μl H_2O

1 μl DNA (PCR produkt)

4.2.5. Čistění sekvenačního produktu

Roztok obsahoval:

49,5 μl UV ETOH

1 μl 3M NaAc

9,5 μl nuclease-free H_2O

Vzniklá směs se napipetovala do jamek destičky, která byla poté zvortexována, překryta mléčnou matrací a ponechána ve tmě 15 minut na ledu. Následně se destička zcentrifugovala při 2500g, 15 °C, po dobu 30 minut. Obsah destičky byl poté vyklepán, destička překryta 3 savými papíry a opět zcentrifugována při 700 g po dobu minuty. Do jamek takto připravené destičky se nalilo 60 μl 80% UV alkoholu. Opět došlo k centrifugaci při 2500 g, 15 °C po dobu 10 minut. Krok s vyklepáním destičky, překrytím savým papírem a centrifugací byl 2 krát zopakován. Nakonec se destička vysoušela v zatemněném koncentrátoru po dobu 15 minut.

4.2.6. Sekvenování

Čistý sekvenační produkt se doplnil o 12 μl formamidu. Samotné sekvenování bylo prováděno na sekvenátoru ABI 3130 (Applied Biosystems)

4.3. Analýza DNA sekvencí

K analýze se využil program Sequencher (Gene Code, Inc). Výsledné sekvence DNA byly zapsány do formátu FASTA. Díky zařazení homologických úseků pod sebe, mohlo dojít ke srovnání jednotlivých sekvencí. Toto alignmentování bylo provedeno v programu ClustalX (Higgins & Sharp 1989), kde docházelo, podle výchozího nastavení programu, k porovnání poměru identických párů bází. Výchozí soubor byl vytvořen do formátu NEXUS a byl využit v následné fylogenetické analýze.

4.4. Fylogenetická analýza

Sekvence fragmentů DNA byla rozdělena na jednotlivé fragmenty genů a tyto byly samostatně alignovány. Délkově nevariabilní proteiny kódující fragmenty *cox1* se alignovaly v programu ClustalX (Higgins & Sharp 1989) a zkontrolovaly podle čtecích rámců. Dále byly použity programy BlastAlign, Mafft, Muscle pro vytvoření alignmentů fragmentu *rrnL*. Tyto byly kombinovány do jednoho datového souboru s délkově nevariabilními fragmenty. Genetické vzdálenosti pro jednotlivé fragmenty byly zjištěny v programu PAUP* 4.0 (Swofford & Sullivan 2009).

Vytvořené konkatenované datové soubory se analyzovaly metodou maximum likelihood v programu RAxML. Jednotlivé fragmenty genů a pozice proteinů kódujících fragmentů byly označeny jako partice a byly analyzovány samostatně s použitím GTR+I+G modelu. K zjištění podpory větví se použila metoda bootstrapping, která funguje na principu náhodného odstranění poloviny znaků a náhodného zkopírování znaků zbývajících tak, aby se nezměnila velikost souboru. Bylo vytvořeno 100 pseudoreplikací, které se následně analyzovaly a výsledky byly mapovány na strom s nejlepší hodnotou pravděpodobnosti.

Stejně partice a model se využily pro bayesiánskou analýzu s použitím algoritmu programu MrBayes 3.2. Analýza proběhla ve dvou bězích, každý obsahoval 3 řetězce, jeden chladný a dva horké. Bylo vytvořeno celkem 30 mil. generací a v programu Tracer 1.4 byla identifikována stacionární fáze a konvergence v obou bězích. Následně bylo odstraněno prvních 6 mil. generací a ze zbývajících generací byl vypočten konsenzuální strom se zpětnými pravděpodobnostmi.

4.5. Identifikace druhů

4.5.1. Určení druhů na základě genetické vzdálenosti

Jednotlivé sekvence byly označeny jmény na základě morfologické identifikace a jejich vzdálenost se hodnotila v programu Species Identifier 1.7 (Meier et al. 2006). Genetická vzdálenost byla určena jako nekorigovaná a jako mez pro akceptaci možného druhu byly použity hodnoty 2% a 3% (Hebert et al. 2003). Tento program hodnotí jako druh definovaný hodnotou genetickou vzdáleností 3% takový klastř terminálů, kde každý terminál má odlišnost od alespoň některých terminálů tohoto klastřu pod 3% i pokud vzdálenost k jiným terminálům daného klastřu tuto hodnotu přesahuje (Meier et al. 2006). Ačkoliv hodnota 3% je obecně považována za hranici oddělující obvykle intra- a extraspecifickou variabilitu, testovali jsme rovněž nižší hodnotu vzhledem k možné zrychlené speciaci na základě změny hostitele.

4.5.2. Určení druhů na základě tvaru fylogramu

Dále byl použit pro identifikaci potenciálních druhů Poisson Tree Probability model (Zhang et al. 2013). Tento postup vychází z fylogramu, kde délka větví představuje příslušný počet mutací (Miyamoto & Goodman 1986). Výpočet byl proveden online na serveru (<http://species.h-its.org/ptp/>).

5. VÝSLEDKY

6. DISKUZE

7. CITOVANÁ LITERATURA

Bellamy, C. L. & M. G. Volkovitsh. (2005) Chapter 17. Buprestoidea Crowson, 1955, pp. 461–468. In: R. G. Beutel & R. A. B. Leschen (Eds.). *Handbuch der Zoologie/Handbook of Zoology*, Volume IV, Arthropoda: Insecta, Part 38, Coleoptera, Beetles, Volume 1: Morphology and Systematics. *W. de Gruyter*, Berlin, New York, 567.

Bernhard, D., Fritsch, G., Glockner, P., & Wurst, C. (2005) Molecular insights into speciation in the *Agrilus viridis*-complex and the genus *Trachys* (Coleoptera : Buprestidae). *European Journal of Entomology*, **102**, 599–605.

Bily, S. (1982) The Buprestidae (Coleoptera) of Fennoscandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica*, **10**, 1–109.

Bily, S. (1989) *Krascovití (Buprestidae)*. *Academia Praha*, 120.

Bird, C.E., Fernandez-Silva, I., Skillings, D.J., & Toonen, R.J. (2012) Sympatric Speciation in the Post "Modern Synthesis" Era of Evolutionary Biology. *Evolutionary Biology*, **39**, 158–180.

Bocak, L., Barton, C., Crampton-Platt, A., Chesters, D., Ahrens, D., & Vogler, A.P. (2014) Building the Coleoptera tree-of-life for > 8000 species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. *Systematic Entomology*, **39**, 97–110.

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

Brown, N., Inward, D.J.G., Jeger, M., & Denman, S. (2015) A review of *Agrilus biguttatus* in UK forests and its relationship with acute oak decline. *Forestry*, **88**, 53–63.

Curletti, G. (2001) The genus *Agrilus* in Australia (Coleoptera, Buprestidae). *Jewel Beetles*, **9**, 1–45.

Curletti, G. & Sakalian, V. (2007) Two new species of *Agrilus* Curtis, 1825 from Kenya (Coleoptera, Buprestidae). *Deutsche Entomologische Zeitschrift*, **54**, 75–78.

Divíšek, J. & Culek M. (2013). Biogeografie – 2. vydání, *Masarykova univerzita*, Brno.

Flegr, J. (2005). *Evoluční biologie*. Academia, Praha, 560.

Hadid, Y., Tzur, S., Pavlicek, T., Sumbera, R., Skliba, J., Lovy, M., Fragman–Sapir, O., Beiles, A., Arieli, R., Raz, S., & Nevo, E. (2013) Possible incipient sympatric ecological speciation in blind mole rats (*Spalax*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 2587–2592.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., & DeWaard, J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B–Biological Sciences*, **270**, 313–321.

Hermes, D.A. & McCullough, D.G. (2014) Emerald Ash Borer Invasion of North America: History, Biology, Ecology, Impacts, and Management. *Annual Review of Entomology*, **59**, 13–30

Higgins, D.G. & Sharp, P.M. (1989) Clustal a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene (Amsterdam)*, **73**, 237–244.

Huxley, J. (1942) *Evolution: The Modern Synthesis*, Joh Wiley & Sons, Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA, 645.

Jendek, E. (2003) Studies in the Palaearctic and Oriental *Agilus* (Coleoptera, Buprestidae). III. *Biologia*, **58**, 179–190.

Jendek, E. & Polakova, J. (2014). *Host Plants of World Agilus (Coleoptera, Buprestidae): A Critical Review*. Springer International Publishing, Canada, 706.

Josef, M. (2012) The inventory of localities of jewel–beetle *Anthaxia candens* in Eastern Bohemia (Česká republika) – the second part. *Elateridarium*, **6**, 1–23.

Jousselin, E., Cruaud, A., Genson, G., Chevenet, F., Footitt, R.G., & d'acier, A.C. (2013) Is ecological speciation a major trend in aphids? Insights from a molecular phylogeny of the conifer–feeding genus *Cinara*. *Frontiers in Zoology*, **10**, 1–18.

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

- Losos et al. (1984) Ekologie živočichů, *Státní pedagogické nakladatelství*, Praha, 316.
- Masek, M. & Bocak, L. (2014) The taxonomy and diversity of Platerodrilus (Coleoptera, Lycidae) inferred from molecular data and morphology of adults and larvae. *ZooKeys*, **426**, 29–63.
- Mayr, E. (1969). Principles of Systematic Zoology. *McGraw – Hill*, New York, 434.
- McKenna, D.D. & Farrell, B.D. (2009). Beetles (Coleoptera). In The timetree of life. (ed. by S.B. Hedges & S. Kumar). *Oxford University Press*.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G., & Ng, P.K.L. (2006) DNA barcoding and taxonomy in diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, **55**, 715–728.
- Mertlik, J. (2012) Invertarizace lokalit krasce Anthaxia candens na území východních Čech (Česká republika) – druhý díl. *Elateridarium*, **6**, 1–23.
- Miyamoto, M.M. & Goodman, M. (1986) Biomolecular systematics of eutherian mammals – phylogenetic patterns and classification. *Systematic Zoology*, **35**, 230–240.
- Muirhead, J.R., Leung, B., van Overdijk, C., Kelly, D.W., Nandakumar, K., Marchant, K.R., & MacIsaac, H.J. (2006) Modelling local and long–distance dispersal of invasive emerald ash borer Agrilus planipennis (Coleoptera) in North America. *Diversity and Distributions*, **12**, 71–79.
- Muzika, R.M., Liebhold, A.M., & Twery, M.J. (2000) Dynamics of twolined chestnut borer Agrilus bilineatus as influenced by defoliation and selection thinning. *Agricultural and Forest Entomology*, **2**, 283–289.
- Pentinsaari, M., Mutanen, M., & Kaila, L. (2014) Cryptic diversity and signs of mitochondrial introgression in the Agrilus viridis species complex (Coleoptera: Buprestidae). *European Journal of Entomology*, **111**, 475–486.
- Prado, A., McKenna, D.D., & Windsor, D. (2012) Molecular evidence of cycad seed predation by immature Aulacoscelidinae (Coleoptera: Orsodacnidae). *Systematic Entomology*, **37**, 747–757.

Ridley, M. (2004). *Evolution* – 3rd ed. *Blackwell Publishing*, UK, 751.

Riedel, A., Sagata, K., Surbakti, S., Tanzler, R., & Balke, M. (2013) One hundred and one new species of Trigonopterus weevils from New Guinea. *Zookeys*, 1–150.

Schönherr, J. (1974). Buprestidae. Prachtkäfer, pp. 31–55. In: W.Schwenke. (Ed.). *Die Forstschädlinge Europas. Käfer. Vol. 2. Paul Parey*, Hamburg & Berlin, 500.

Sklenarova, K., Chesters, D., & Bocak, L. (2013) Phylogeography of Poorly Dispersing Net – Winged Beetles: A Role of Drifting India in the Origin of Afrotropical and Oriental Fauna. *Plos One*, **8**, 11.

Swofford, D.L. & Sullivan, J. (2009). Phylogeny inference based on parsimony and other methods using PAUP*. In *Phylogenetic Handbook: a Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing*, 2nd Edition (ed. by P. Lemey, M. Salemi & A.M. Vandamme). *Cambridge Univ Press*, Cambridge, 267–312.

Vodka, S., Konvicka, M., & Cizek, L. (2009) Habitat preferences of oak–feeding xylophagous beetles in a temperate woodland: implications for forest history and management. *Journal of Insect Conservation*, **13**, 553–562.

Wang, X.Y., Yang, Z.Q., Gould, J.R., Zhang, Y.N., Liu, G.J., & Liu, E.S. (2010) The biology and ecology of the emerald ash borer, *Agrilus planipennis*, in China. *Journal of Insect Science*, **10**, 23.

Zhang, J.J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013) A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, **29**, 2869– 2876.

8. SEZNAM PŘÍLOH

Tabulky

Tabulka 5. Seznam sekvenovaných vzorků, jejich geografický původ a hostitelské rostliny.

Tabulka 6. Přehled sekvenovaných fragmentů genů.

Tabulka 7. Přehled delimitačních metod a jejich výsledků.

Obrázky

Obrázek 3. Fylogenetické hypotézy o příbuznosti studovaných druhů rodu *Agrilus* založené na datovém souboru alignovaném v programu XXXXX (vlevo) a XXXXXX (vpravo) a metodě XXXXXXXX XXXXXXXXXXXX. Číselné údaje při jednotlivých větvích označují jejich podpory v % v pořadí XX - XXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXX analýza a XX - XXXXXXXXXXXXXXX analýza.

Obrázek 4. Fylogenetická hypotéza o příbuznosti studovaných druhů rodu *Agrilus* založená na datovém souboru alignovaném v programu XXXXX a konstrukci stromu s použitím metody XXXXXXXX XXXXXXXXXXXX. Pro každý terminál je uvedena hostitelská rostlina a její čeleď. Číselné údaje při jednotlivých větvích označují jejich podpory v % v pořadí XX - XXXXXXXX XXXXXXXXXXXX analýza a XX - XXXXXXXXXXXXXXX analýza. Čeledi jsou rozlišeny barevně.