

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ZOOLOGIE



Klasifikace druhové skupiny *Cautires pauper* (Coleoptera: Lycidae)

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Michal Mášek

N1501 – Geografie a biologie v ochraně životního prostředí

prezenční studium

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

Olomouc 2011

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury a pod vedením školitele.

V Olomouci dne 29. 4. 2011

Michal Mášek

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Michal Mášek

Název práce: Klasifikace druhové skupiny *Cautires pauper* (Coleoptera: Lycidae)

Typ práce: diplomová práce

Pracoviště: katedra zoologie

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

Rok obhajoby práce: 2011

Abstrakt: Rod *Cautires* se vyskytuje v Jihovýchodní Asii v několika desítkách druhů. Na základě sekvencí genů 18S rDNA, 28S rDNA, 16S rDNA, tRNA-Leu, ND1, COI, tRNA-Leu, COII, ND5, tRNA-Phe, tRNA-Glu, tRNA-Ser byla sestavena fylogenetická hypotéza o příbuznosti druhů. Pro konstrukci stromů byly použity metody maximální podobnosti, maximální pravděpodobnosti a bayesiánská metoda. Výsledky získané jednotlivými metodami podporují monofylii rodu *Cautires* Waterhouse, 1878. Molekulární delimitace druhů byla založena především na sekvencích mitochondriálních genů a srovnána s běžně používanými morfologickými diagnostickými znaky. Analýzou topologie získaných fylogenetických stromů a informací o morfologii a zbarvení studovaných druhů bylo potvrzeno, že podobně zbarvené druhy jsou si velmi často nepříbuzné a zbarvení je výsledkem koevoluce mimikry ve skupině. Dále byla potvrzena variabilita ve zbarvení v rámci druhů a populací. Stupeň morfologické odlišnosti pouze velmi volně koresponduje s genetickou odlišností a v některých případech ani na základě morfologických a molekulárních dat není možné s jistotou delimitovat biologické druhy. Pro delimitaci druhů ve sporných případech je nutný další materiál pro morfologické i genetické analýzy.

Abstract

The genus *Cautires* occurs in Southeast Asia in several dozens of species. The phylogenetic hypotheses were inferred from sequences of 18S rDNA, 28S rDNA, 16S rDNA, tRNA-Leu, ND1, COI, tRNA-Leu, COII, ND5, tRNA-Phe, tRNA-Glu, tRNA-Ser and three optimization criteria were employed for the construction of phylogenetic trees (maximum likelihood, maximum parsimony and bayesian approach). All datasets and partial analyses support monophyly of *Cautires* Waterhouse, 1878. The molecular delineation of species is mostly based on mitochondrial genes and was compared with regularly used morphological diagnostic characters. The well supported topology shows that species similar in colour patterns are often only distantly related and that their similarity is a result of the coevolution of mimicry patterns. The degree of morphological disparity does not closely correspond with their genetic divergence. In some cases, it is impossible

to delineate biological species using both molecular and morphological information. An access to further material for molecular and morphological analyses will be necessary for detailed studies on species limits in mimetic net-winged beetle lineages.

Počet stran: 38

Počet stran příloh: 10

Jazyk: český

Obsah

1. Úvod.....	6
1.1. Klasifikace a rozšíření rodu <i>Cautires</i> Waterhouse, 1878.....	6
1.2. Biologie čeledi Lycidae a evoluce neotenie a mimikry	7
1.3. Cíle práce	8
2. Materiál a metodika	9
2.1. Materiál	9
2.2. Laboratorní metody.....	12
2.3. Fylogenetická analýza.....	16
3. Výsledky	20
4. Diskuze	29
4.1. Fylogeneze druhových skupin rodu <i>Cautires</i>	29
4.2. Morfologie, mimetické vzory a delimitace druhů.....	29
5. Závěr	34
6. Poděkování.....	34
7. Seznam použité literatury	35
8. Přílohy.....	39

1. Úvod

Lycidae, česky někdy označováni jako dlouhoustcovití nebo zářivkovití, jsou jednou z druhově velmi bohatých skupin nadčeledi *Elateroidea*. Čeledi páteříčkovití (*Cantharidae*), světluškovití (*Lampyridae*), *Lycidae* a několik menších čeledí (*Omethidae*, *Rhagophthalmidae*, *Phengodidae*, *Drilidae*, *Omalisidae* a *Telegeusidae*) dříve tvořily samostatnou nadčeď *Cantharoidea*, která je však dnes součástí nadčeledi *Elateroidea* (Lawrence & Newton, 1995, Bocakova et al., 2007). *Lycidae* se vyskytují v tropech celého světa ve velkém počtu druhů a několik druhů se vyskytuje i v Evropě, včetně ČR. Současné taxonomické znalosti fauny čeledi *Lycidae* jsou omezené a rutinní determinace tropických skupin je nemožná vzhledem k absenci revizních studií, když většina informací je obsažena pouze v primárních popisech taxonů. Ačkoliv dosud bylo popsáno přes 4000 druhů čeledi *Lycidae* (Bocak et al., 2008), jedná se zřejmě pouze o zlomek skutečné diversity. Poslední taxonomické studie ukazují, že poměr mezi dosud popsanými a novými druhy dosahuje v některých oblastech až 1:24 (Dvorak & Bocak, 2007, 2009). Současná situace ukazuje, jak limitované jsou dnes informace o biodiverzitě tropických skupin hmyzu. Přitom poznání diverzity je jednou ze základních podmínek pro smysluplnou ochranu cenných ekosystémů a celkově organizaci ochrany přírody. Tato studie se tedy soustřeďuje primárně na získání fylogenetických podkladů pro další studium skupiny a jako nutného základu pro studium vzniku a diverzity fauny tropických deštných lesů Jihovýchodní Asie.

1.1. Klasifikace a rozšíření rodu *Cautires* Waterhouse, 1878

Rod *Cautires*, který je předmětem této studie, náleží do tribu *Metriorrhynchini*, podčeď *Lycinae* (Bocak et al., 2008). Tento tribus je druhově nejbohatší linií čeledi *Lycidae*. Kleine (1933) uvedl v posledním katalogu přes 1200 druhů v 41 rodech klasifikovaných v tomto tribu a dalších 300 druhů bylo popsáno později (Bocak, 2002). To reprezentuje přibližně 30 procent druhů čeledi *Lycidae*. Největší počet druhů tribu *Metriorrhynchini* pochází z kontinentální jihovýchodní Asie, Velkých Sund, Moluk, Nové Guinee a severní Austrálie. Další druhy se vyskytují v Subsaharské Africe, na Madagaskaru a na Ceylonu a v jižní Indii. *Cautires* náleží do skupiny rodů s centrem rozšíření v Orientální a Afrotropické oblasti a pouze několik druhů této skupiny se vyskytuje východně od Wallaceovy linie (Bocak, 2002, Kubecek et al., v tisku)

Metriorrhynchini jsou morfologicky definováni kruhovou phallobází, plochou nápadnou nepárovou vaginální žlázou, střední areolou kopinatého tvaru na štítu a většinou přítomností dalších žebér na štítu, které vytvářejí postranní areoly (Bocak, 2002). Jejich monofylie byla podpořena i molekulárními daty (Bocak et al., 2008). *Metriorrhynchini* jsou pravděpodobně blízce příbuzní ke skupině *Erotini*, se kterou sdílejí podobnou strukturu žeběr na štítu a na krovkách. Obě skupiny mají podobné samčí a samičí kopulační orgány a také larvální stádia (Bocak & Matsuda,

2003).

Cautires jsou velmi diverzifikovanou skupinou s centrem diverzity v Jihovýchodní Asii, především v oblasti Velkých Sund, Malajského poloostrova a Filipín. Mnohem méně běžní jsou v regionech s delším obdobím sucha, jako je střední Thajsko, Kambodža nebo východní Jáva. Druhová skupina *Cautires pauper* se liší od ostatních *Cautires* vyskytujících se v oblasti jedním středovým políčkem, areolou na štítu. Na krovkách všech druhů skupiny *C. pauper* se nachází devět podélných žeber, které jsou snadno rozpoznatelné (Dudkova & Bocak, 2010). Tyto druhy byly původně klasifikovány jako rod *Bulenides* Waterhouse, 1878 a v poslední revizi byl rod *Bulenides* synonymizován s rodem *Cautires* a druhy v něm klasifikované definovány jako dvě samostatné druhové skupiny: druhová skupina *Cautires pauper* a skupina *Cautires obsoletus* (Dudkova & Bocak, 2010).

1.2. Biologie čeledi Lycidae a evoluce neotenie a mimikry

Všechny druhy čeledi Lycidae jsou vázány na lesní nebo alespoň křovinné biotopy, protože larvy se vyvíjejí v hniјícím dřevě nebo v půdě s vysokým obsahem organického materiálu (Bocak & Matsuda, 2003). Ačkoliv některé druhy se vyskytují daleko na severu až na severní hranici výskytu dřevin, naprostá většina diverzity skupiny je vázána na tropické deštné lesy všech kontinentů (Bocak et al., 2008). Imaga rodu *Cautires*, podobně jako jiné skupiny z tribu Metriorrhynchini, se obvykle zdržují na zastíněných místech v nižších patrech tropického lesa. Vzhledem k slabě sklerotizovanému tělu létají pomalu a jen na krátké vzdálenosti. Předpokládá se, že modifikace související s neotenií jsou příčinou vzniku měkkého těla náchylného k vysušení a málo efektivního způsobu letu. Ve srovnání s mnoha skupinami hmyzu je tato skupina velmi neefektivní při osídlování nových areálů. Přirozené geografické bariéry, jako jsou mořské průlivy nebo sušší biotopy nevhodné pro larvální vývoj, jsou jinými skupinami snadno překročitelné a přitom pro Lycidae představují efektivní překážku šíření (Malohlava, Bocak, 2010). Dalším omezením pro šíření této skupiny je pozorovaná letová aktivita omezená na ranní hodiny a dobu krátce před západem sluncem (L. Bocák, osobní sdělení). Důsledkem toho se Lycidae zpravidla vyskytují v omezených areálech, obvykle vázaných na jednotlivý ostrov nebo horské pásmo (Dudková & Bocak, 2010).

Lycidae jsou zajímavou skupinou z několika evolučních pohledů. Vzhledem k modifikaci ontogeneze podstatně snižující jejich schopnost disperse je výskyt neotenních Lycidae schopen definovat oblasti s dlouhodobou nepřerušenou existencí tropického pralesa za období desítky milionů let (Malohlava, Bocak, 2010). Omezená schopnost šíření se týká i okřídlených linií čeledi Lycidae a srovnáním jejich kladogeneze a informací o tektonické evoluci jednotlivých oblastí je možné rekonstruovat procesy, které vedly ke vzniku lokální fauny (Bocak & Yagi, 2010).

Dalším častým fenoménem v čeledi Lycidae je evoluce aposematických vzorů napodobovaných uvnitř čeledi Lycidae ve vzájemně nepříbuzných liniích i v jiných čeledích brouků, případně motýlů, ploštic a pavouků. Všechny druhy čeledi *Lycidae* obsahují ve svém těle sloučeniny, které nepříjemně páchnou a jsou hořké (Moore & Brown, 1981). Pestré zbarvení těla u většiny druhů má s velkou pravděpodobností aposematickou funkci, protože podobně jako v jiných skupinách může sloužit jako signál pro predátory (Linsley et al., 1961, Bocak & Yagi, 2010).

1.3. Cíle práce

Ačkoliv Lycidae mohou být potenciálně využity jako modelová skupina pro studium mimikry nebo pro identifikaci směrů šíření a studium struktury fauny některých oblastí, jejich vhodnost je omezena nepřehlednou taxonomickou situací a omezenými znalostmi o příbuzenských vztazích jednotlivých skupin. Cílem této studie je:

- inventarizovat druhovou diversitu skupiny *Cautires pauper* s použitím molekulárních markerů na základě dostupného materiálu fixovaného pro izolaci DNA. Vzhledem k velmi nepřehledné taxonomické situaci není cílem zpracování klasické taxonomické revize, protože část typů je nedostupných a část je prezentována pouze samicemi a tím není možná jejich identifikace.

- srovnat delimitaci druhů na základě morfologických a molekulárních znaků. Druhová skupina *Cautires pauper* se vyznačuje aposematickým zbarvením a poslední studie rodu *Metriorrhynchus* Gemminger et Harold, 1869 prokázala, že variabilita zbarvení lokálních populací může být mimořádně vysoká. V důsledku toho docházelo dříve k popisu jasně definovaných barevných forem jako samostatných druhů a na druhou stranu skupiny stejně zbarvených druhů byly identifikovány jako jediný druh (Bocak, 2007, Bocak & Yagi, 2010). Cílem je zjistit, jestli se tato situace opakuje i v dalších skupinách a do jaké míry bude nutné revidovat dosavadní přístupy v klasifikaci rodu *Cautires*. Pro řešení této otázky budou použity molekulární markery jako nezávislý zdroj informací.

- vyhodnotit vznik barevných vzorů a jejich potenciální funkci jako mimetického signálu. Podstatnou podmínkou, aby pestré zbarvení mohlo být považováno za důsledek vývoje mimetického signálu je nejen chemická nebo jiná ochrana jejich nositelů, ale fakt, že se toto zbarvení vyvinulo nezávisle v nepříbuzných liniích (není zděděno od společného předka) a u druhů, které signalizují svou ochranu vůči stejnému predátorovi, tudíž se vyskytují ve stejné oblasti. Vzhledem k značné morfologické uniformitě budou použity molekulární markery k rekonstrukci fylogeneze.

2. Materiál a metodika

2.1. Materiál

Práce je založena na reprezentativním vzorku druhů skupin *Cautires pauper* a *Cautires obsoletus* z oblasti JV Asie (druhy dříve klasifikované jako *Bulenides*, viz Dudkova & Bocak, 2010). Do skupiny *Cautires obsoletus* patří druhy *Cautires corporaali* Pic, 1921; *Cautires imitator* Kleine, 1930; *Cautires indus* Kirsch, 1875; *Cautires johannesi* (in litt.), *Cautires pauperulus* Bourgeois, 1883; *Cautires rianganus* Pic, 1925; *Cautires tujuhensis* (in litt.) a *Cautires yunnanus* Dudkova et Bocak, 2010. Do skupiny *Cautires pauper* náleží druhy *Cautires interruptus* (in litt.); *Cautires maninjauensis* (in litt.) a *Cautires pauper* Waterhouse, 1878. Celkem bylo k dispozici 59 jedinců: 12 exemplářů z Laosu, 5 exemplářů z Malajsie a 42 exemplářů ze Sumatry (Tab. 1).

Jako outgroup pro určení kořene fylogenetických stromů byly použity sekvence homologických fragmentů genů dalších druhů rodu *Cautires* a vzdáleně příbuzných rodů z čeledi Lycidae: *Broxylus* Waterhouse, 1879; *Calochromus* Guerin-Meneville, 1833; *Dictyoptera* Latreille, 1829; *Leptotrichalus* Kleine, 1926; *Libnetis* Waterhouse, 1879; *Lyponia* Waterhouse, 1878; *Microtrichalus* Pic, 1921; *Metriorrhynchus* Gemminger et Harold, 1869; *Plateros* Bourgeois, 1879; *Sulabanus* Dvořák et Bocak, 2007; *Xylobanus* Waterhouse, 1879 a *Wakarumbia* Bocak, 1999. Tyto sekvence jsou uvedeny v databázi Genbank (GenBank Database NCBI, 2010).

Materiál byl shromážděn školitelem v letech 2000 - 2007 a přímo v terénu byl fixován v 96% alkoholu pro pozdější izolaci DNA. V laboratoři byl materiál následně odvodněn několikanásobnou výměnou alkoholu a uložen v -20°C. Před izolací byl materiál rozříděn na morfospecies a z každé takto definované skupiny bylo sekvenováno několik exemplářů. Definitivní identifikace druhů byla provedena na základě výsledků fylogenetické analýzy sekvencí a následného podrobného studia morfologie. Vzhledem k velmi nepřehledné taxonomické situaci ve skupině, nebylo možné v některých případech provést formální determinaci. Ze Sumatry je dosud známo 12 druhů a stejný počet je zařazen do této studie na základě sběrů z několika návštěv na 6 lokalitách v horských oblastech Sumatry (viz Přílohy, Tab. 9). Část sekvenovaných druhů proto není dosud formálně popsána a tyto druhy jsou provizorně označeny dosud neplatnými jmény. Tyto druhy jsou označeny "in litt." a použití daného jména v této práci nezakládá vstup tohoto jména do zoologické nomenklatury (ICZN, 2011).

Tab. 1. Přehled studovaného materiálu s uvedením čísla exempláře a lokálních údajů.

Druh

Číslo exempláře / Lokální údaje

Cautires corporaali

- MM054 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM057 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.

Cautires imitator

- MM009 Malaysia, W Pahang Cameron Highlands, 2004 Tanah Rata, 1500 - 1800m P. Pacholátka leg., 2. - 26. II.
MM038 West Sumatra Prov. Kerinci Seblat N. P. 24km NE Tapan Muara Sako E env., 2003 2°05' S 101°15'E; 400 - 500m L. Dembicky leg., 4 - 18. III

Cautires indus

- MM007 Malaysia W., Perak 40km SE of Ipoh, 800m Banjaran Titi Wangsa RINGLET, 29. III. - 15. IV. 2004 Čechovsky Petr lgt.

Cautires interruptus

- MM061 Sumatra Jambi prov. Kerinci Seblat N. P., 7km E Kayuaro Mt Tujuh, 25. 2. - 2. 3. 2003 1°45'S 101°25'E 1750±250m, L. Dembicky leg.

Cautires johanesi

- MM018 Sumatra Barat, Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan. 2005, Bolm lgt.
MM020 Sumatra Barat, Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan. 2005, Bolm lgt.
MM022 Sumatra Barat, Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan. 2005, Bolm lgt.
MM023 Sumatra Barat, Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan. 2005, Bolm lgt.
MM025 Sumatra Barat, Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan. 2005, Bolm lgt.
MM042 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM043 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM044 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM045 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM046 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM047 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM048 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM049 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM050 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM051 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM052 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.
MM053 Sumatra Utara, Brastagi, Gn Sibayak, 26 Jan. - 1. Feb. 2005 1600-2200m, Bolm lgt.

Cautires maninjauensis

- MM015 Sumatra Barat Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan 2005, Bolm lgt.

MM036 West Sumatra Prov. Kerinci Seblat N. P. 24km NE Tapan Muara Sako E env., 2003 2°05' S 101°15'E; 400 - 500m L. Dembicky leg., 4 - 18. III

Cautires pauper

MM006 Malaysia W., Perak 40km SE of IPOH, 800m Banjaran Titi Wangsa Ringlet, 29. III. - 15. IV. 2004 Čechovsky Petr lgt.

MM013 Sumatra Barat Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan 2005, Bolm lgt.

MM017 Sumatra Barat Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan 2005, Bolm lgt.

MM027 Sumatra Barat Pasaman, Gn. Talamau, 1000m, 14. - 15. jJan 2005, Bolm lgt.

MM039 West Sumatra Prov. Kerinci Seblat N. P. 24km NE Tapan Muara Sako E env., 2003 2°05' S 101°15'E; 400 - 500m L. Dembicky leg., 4 - 8. III

MM055 Sumatra Jambi Kersik Tua, Gn. Kerinci, 19. - 22. Jan 2005, 1600-2200m, Bolm lgt.

MM056 Sumatra Jambi Kersik Tua, Gn. Kerinci, 19. - 22. Jan 2005, 1600-2200m, Bolm lgt.

Cautires pauperulus

MM014 Sumatra Barat Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan. 2005 Bolm lgt.

MM019 Sumatra Barat Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan. 2005 Bolm lgt.

MM024 Sumatra Barat Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan. 2005 Bolm lgt.

MM026 Sumatra Barat Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan. 2005 Bolm lgt.

MM041 West Sumatra Prov. Kerinci Seblat N. P. 24km NE Tapan Muara Sako E env., 2003 2°05' S 101°15'E; 400 - 550m L. Dembicky leg., 4 - 18. III

Cautires rianganus

MM035 West Sumatra Prov. Kerinci Seblat N. P. 24km NE Tapan Muara Sako E env., 2003 2°05' S 101°15'E; 400 - 500m L. Dembicky leg., 4 - 18. III

MM037 West Sumatra Prov. Kerinci Seblat N. P. 24km NE Tapan Muara Sako E env., 2003 2°05' S 101°15'E; 400 - 500m L. Dembicky leg., 4 - 18. III

Cautires spp.

MM002 Laos Phongsaly Prov. 21°42'N 102°07'E, 18. V. 2003 P. Pacholátko Phongsaly env. 1500m

MM005 Malaysia W., Perak 40km SE of IPOH, 800m Banjaran Titi Wangsa Ringlet, 29. III. - 15. IV. 2004 Čechovsky Petr lgt.

MM012 LAO - N Phongsaly prov. 21°41'-2'N 102°06-8'E, 28. V. - 20. VI. 2003, Phongsaly env., ~1500m, Vít Kubaň leg.

MM016 Sumatra Barat Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan. 2005 Bolm lgt.

MM034 Malaysia, Pahang Tanah Rata, Cameron Highlands, 3. - 20. Feb 2005, 1600m P. Čechovský lgt.

MM040 West Sumatra Prov. Kerinci Seblat N. P. 24km NE Tapan Muara Sako E env., 2003 2°05' S 101°15'E; 400 - 500m L. Dembicky leg., 4 - 18. III

MM058 Sumatra Jambi prov. Kerinci Seblat N. P., 7km E Kayuaro Mt Tujuh, 25. 2. - 2. 3. 2003 1°45'S 101°25'E 1750±250m, L. Dembicky leg.

MM060 Sumatra Jambi prov. Kerinci Seblat N. P., 7km E Kayuaro Mt Tujuh, 25. 2. - 2. 3. 2003 1°45'S 101°25'E 1750±250m, L. Dembicky leg.

Cautires tujuhensis

MM059 Sumatra Jambi prov. Kerinci Seblat N. P., 7km E Kayuaro Mt Tujuh, 25. 2. - 2. 3. 2003
1°45'S 101°25E 1750±250m, L. Dembicky leg.

Cautires yunnanus

MM001 Laos Phongsaly Prov. 21°42'N 102°07'E, 28. V. 2003, P. Pacholátko Phongsaly env. 1500m

MM003 Laos Phongsaly Prov. 21°42'N 102°07'E, 28. V. 2003, P. Pacholátko Phongsaly env. 1500m

MM004 LAO - N Phongsaly prov. 21°41'-2'N 102°06-8'E, 28. V. - 20. VI. 2003, Phongsaly env.,
~1500m, Vít Kubaň leg.

MM008 Laos Phongsaly Prov. 21°41'N 102°06'E 1500m

MM010 LAO - N Phongsaly prov. 21°41'-2'N 102°06-8'E, 28. V. - 20. VI. 2003, Phongsaly env.,
~1500m, Vít Kubaň leg.

MM011 LAO - N Phongsaly prov. 21°41'-2'N 102°06-8'E, 28. V. - 20. VI. 2003, Phongsaly env.,
~1500m, Vít Kubaň leg.

MM030 LAO - N Phongsaly prov. 21°41'-2'N 102°06-8'E, 28. V. - 20. VI. 2003 Phongsaly env.

MM031 LAO - N Phongsaly prov. 21°41'-2'N 102°06-8'E, 28. V. - 20. VI. 2003 Phongsaly env.

MM032 LAO - N Phongsaly prov. 21°41'-2'N 102°06-8'E, 28. V. - 20. VI. 2003 Phongsaly env.

MM033 LAO - N Phongsaly prov. 21°41'-2'N 102°06-8'E, 28. V. - 20. VI. 2003 Phongsaly env.

Xylobanus sp.

MM021 Sumatra Barat Lake Maninjau, E coast 800m, 12. - 23. Jan 2005 Bolm lgt.

2.2. Laboratorní metody

Izolace DNA ze svalové tkáně

Pro izolaci DNA jsem použil metathorakální svalovinu a zadní pár nohou. Zbytek těla exempláře byl vypreparován a uložen v referenční sbírce laboratoře molekulární systematiky. Tkáň byla před izolací vysušena ve vakuovém koncentrátoru, poté byla homogenizována v 200 µl pufru s přidáním 20 µl 10% SDS a 10µl roztoku proteinázy K (10 mg/ml). Homogenizovaná tkáň byla inkubována v předehřátém bloku v 60 - 65°C do rozložení svaloviny.

Vzorek byl čištěn fenol-chloroformem-isoamylalkoholem a chloroformem-isoamylalkoholem s několikanásobným promícháváním a centrifugací (Vogler et al., 1993). Vyčištěný roztok DNA byl vysrážen přidáním 40µl 10M octanu sodného a dvěma díly 100% etanolu a inkubován na ledu minimálně 20 min. Pelet DNA byl stočen při 20300 g po dobu 15 minut a poté byl odpipetován supernatant. Purifikace DNA peletu byla provedena přidáním 800 µl 70% etanolu a vysušením ve vakuovém vysoušeči. DNA pelet byl znovu rozpuštěn ve 40 µl

čisté vody. Pelet byl uložen při pokojové teplotě přinejmenším jednu hodinu, čas od času protřepán v ruce a před další manipulací stočen.

Poté následovalo změření koncentrace DNA spektrofotometrem nanodrop ND-1000. Po změření koncentrace DNA byl roztok s DNA rozdělen na dvě části. První část byla umístěna do mrazáku při teplotě -80°C pro dlouhodobé uchování a s druhou částí bylo nadále pracováno.

PCR replikace

Typická PCR reakce obsahovala:

5 μl 10xPCR bufferu.

2 μl 50mM MgCl₂

1,25 μl dNTPS

1 μl 10 μmol z každého primeru

0,12 μl Taq polymerázy (BIOLINE)

1 - 4 μl vzorku

Destilovaná voda do objemu 50 μl .

Pro PCR amplifikace jednotlivých genů byly použity primery uvedené v Tab. 2.

Tab. 2: Použité primery pro jednotlivé amplifikační reakce.

Fragment	Primer	Délka	Sequence (5' >> 3')
18S rRNA	S5'	24	GACAACCTGGTTGATCCTGCCAGT
	b5.0	19	TAACCGCAACAACCTTTAA
	ai	22	CCTGAGAAACGGCTACCACATC
	b2.50	20	TCTTTGGCAAATGCTTTTCGC
	a1.0	20	GGTGAAATTCTTGGACCGTC
	bi	20	GAGTCTCGTTCGTTATCGGA
	a2.0	19	ATGGTTGCAAAGCTGAAAC
	S3'I	24	CACCTACGGAAACCTTGTTACGAC
28S rRNA	FF	20	TTACACACTCCTTAGCGGAT
	dd	19	GGGACCCGTCTTGAAACAC
16S rDNA	16a	20	CGCCTGTTTAACAAAAACAT
	ND1A	24	ATCAAAAGGAGCTCGATTAGTTTC
ND5 mtDNA	OF1	29	CCTACTCCTGTTTCTGCTTTAGTTCATTC
	R6	29	GAAACGAAAAATCGTATTTAATTTCTGACT
	R2M	29	AATTGAASCCAAAAAGAGGTATATCAGTG
COI mtDNA	JerryM	23	CAACAYYTATTTTGRTTYTTTGG
	Marcy	27	TARTTCRTATGWRCAATAYCAYTGRTG

Na termocykleru byl nastaven následující průběh teplot pro PCR amplifikaci: 96°C, po dobu 2 min., 40 x cyklus 96°C 1 min., 50°C 1 min., 72°C 2 min., následně 72°C 10 min. a schlazení na 4°C.

Po ukončení PCR replikace byla provedena elektroforéza pro kontrolu, zda PCR replikace proběhla úspěšně a zda byl amplifikován pouze cílový fragment.

PCR reakce pro amplifikaci některých fragmentů, především ND5 vykazovala nižší specifitu a bylo nutné separovat cílový fragment na agarózovém gelu. Po vyhodnocení výsledků PCR reakce, byla připravena další elektroforéza s použitím low - melting agarózy, z důvodu následného řezání jednotlivých vzorků z gelu. Po dokončení elektroforézy byly gely postupně přesouvány na UV destičku. Na UV destičce byly požadované části gelu obsahující cílový fragment vyřezány a přesunuty do předem připravených a označených mikrozkuvek.

Jednotlivé mikrozkuvky byly zváženy na digitální váze Mettler Toledo, byl do nich v příslušném poměru přidán jodid sodný a posléze byly přesunuty do termoblocku Eppendorf Thermomixer Comfort, kde byly protřepávány při teplotě 50°C po dobu 10 minut . Po protřepání byly mikrozkuvky připraveny na purifikaci PCR produktu.

Purifikace PCR produktu

PCR produkt byl přepipetován do označených mikrozkuvek. Do každé mikrozkuvky bylo přidáno 150µl NaI a 5µl glassmilk. Suspenze byla promíchávána po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Po opětovném stočení bylo potřeba odstranit supernatant. Po odstranění supernatantu bylo přidáno 400µl New Wash. Roztok byl pečlivě promíchán a stočen třikrát za sebou. Po odstranění New Wash byl pelet vysušen. Glassmilk byl znovu suspendován v 13µl destilované vody a inkubován po dobu 10 minut v předehřátém bloku při teplotě 60 - 65°C. Roztok byl promíchán a stočen na centrifuze, odstraněn supernatant a tento DNA roztok byl přemístěn do předem připravených mikrozkuvek.

Příprava sekvenační reakce

Templát DNA byl použitý pro následující sekvenační reakce, které byly připraveny podle protokolu ABI Applied Biosystems.

Složení typické sekvenační reakce:

2μl Big Dye

2μl 1,6 μmol primeru

1μl cycle sequencing bufferu

1 - 4μl vyčištěného PCR produktu

x μl destilované vody na ředění PCR produktu do 10μl (záleží na koncentraci PCR produktu)

Do mikrozkušavek byla nejprve dána voda o předem zjištěném objemu pro každý vzorek, poté master skládající se z primeru, bufferu a Big Dye. Nakonec byl přidán vyčištěný PCR produkt.

Purifikace Cycle Sequencing produktu

Do každé mikrozkušavky obsahující výsledný produkt Cycle sequencingu bylo přidáno 75μl 95% etanolu a 3μl 3M acetátu sodného, jemně promícháno a inkubováno 10 minut na ledu. Alkohol z mikrodestičky byl vyklepnut a destička byla posléze překryta savým papírem a vložena do centrifugy, aby byl při následném stočení odstraněn zbývající alkohol. Po odstranění 95% etanolu a 3M acetátu sodného bylo přidáno 100μl 70% etanolu. Mikrodestička byla stáčena 30 minut při teplotě 15°C. Po stočení byl odstraněn supernatant a destička byla vysušena v centrifuze mezi listy savého papíru. Celá procedura byla opakována třikrát. Mikrodestička byla nakonec vysušena ve vakuu.

Sekvenování

Vyčištěný sekvenační produkt byl rozpuštěn ve formamidu a analyzován na sekvenátoru ABI 3130.

Analýza chromatogramů, editace sekvencí, tvorba alignmentu, sestavení matice

Chromatogramy byly analyzovány programem Sequencing Analysis (ABI Applied Biosystems, Inc.). Editace sekvencí byla prováděna programem Sequencher 4.6 (Gene Code, Inc.), který umožňuje vytváření alignmentů chromatogramů a srovnávání velkého počtu sekvencí. Po editaci byly sekvence hromadně exportovány ve formátu FASTA. K nově vyprodukovaným sekvencím byla přidána mimoskupina pro určení kořene fylogenetického stromu. Outgroup byla získána z databáze GenBank. Jednalo se o sekvence dříve vyprodukované laboratoří školitele.

Editované sekvence včetně mimoskupiny byly uloženy do textového dokumentu ve formátu FASTA a alignovány programem ClustalX s defaultním nastavením programu (gap opening, gap extension). Vzhledem k malému podílu indelů v rDNA a strukturální kontrole cds mtDNA fragmentů nebylo nutné testování dalších parametrů alignmentu. Alignment byl exportován ve formátu NEXUS, který byl programem PAUP* (Swofford, 2002) převeden z kódování MS DOS na formát NEXUS kompatibilní s operačním systémem Mac OS X.

Dalším krokem bylo sestavení výsledné matice v programu Se-AL (Rambaut, 2010). V programu Se-AL byly nejprve jednotlivé geny upraveny. Úprava spočívala v omezení délky jednotlivých sekvencí na úsek, pro který byly k dispozici homologické části dostatečného počtu jedinců. Při samotné editaci na požadovanou délku byly odstraněny počáteční a koncové úseky, v kterých bylo větší zastoupení nejistých bází. Takto upravené sekvence byly exportovány ve formátu NEXUS. Výsledná matice byla sestavena v programu Se-AL. Jednotlivé homologické fragmenty byly sestaveny v pořadí: 18S, 28S, 16S, COI, ND5. Výsledná matice byla opět exportována ve formátu NEXUS s koncovou příponou .dat.

2.3. Fylogenetická analýza

K fylogenetické analýze byly použity následující optimalizační kritéria: metoda maximální parsimonie (program T.N.T., Goloboff et al., 2008), metoda maximální pravděpodobnosti (program RAxML, Stamatakis, 2006) a bayesiánská interference (program Mr. Bayes 3.2, Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

Analýza podle kritéria maximální parsimonie

Data byla analyzována programem T.N.T. v. 1.1. Z výsledné matice všech genů byly zapínány/vypínány specifické fragmenty pro jednotlivé parciální analýzy. Pro parciální analýzy byly vybrány vzorky jednotlivých druhů (viz Tab. 3). Celkem byly provedeny 3 parciální analýzy (viz Tab. 4). První analýza obsahovala geny rDNA a tRNA geny (18S, 28S, 16S, tRNA Leu 16S, tRNA Leu COI a tRNA Leu ND5) vyznačující se větší délkovou variabilitou. Druhá analýza obsahovala mitochondriální cds DNA, alignované podle struktury aminokyselin a tím neovlivněně metodou alignmentu: COI, COII, ND5 a ND1. Třetí parciální analýza byla složena z kompletní sestavy fragmentů mitochondriální DNA: 16S rDNA, tRNA-Leu, ND1 cds mtDNA, cds mtDNA COI, tRNA-Leu, cds mtDNA COII, cds mtDNA ND5, tRNA-Glu, tRNA-Ser. Výstupem programu T.N.T. byl soubor ve formátu NEXUS obsahující analyzovaný datový soubor a výsledné maximálně parsimonní stromy a sadu maximálně parsimonních stromů vzniklých analýzou

jednotlivých pseudoreplikací pro zjištění statistické podpory jednotlivých větví. Tento soubor byl importován do programu PAUP*, kde byl vygenerován v případě nalezení více maximálně parsimonních stromů jeden výsledný striktně konsenzuální kladogram, majoritní konsenzuální kladogram a dále byl vypočten konsenzuální kladogram z výsledků statistického hodnocení podpory větví metodou bootstrappingu.

Tab. 3: Druhy zařazené do parciálních analýz založených na pěti fragmentech DNA

druh	taxon
<i>Cautires pauper</i>	MM039
<i>Cautires pauper</i>	MM055
<i>Cautires pauperulus</i>	MM026
<i>Cautires pauperulus</i>	MM041
<i>Cautires sp.</i>	MM002
<i>Cautires corporaali</i>	MM057
<i>Cautires imitator</i>	MM038
<i>Cautires interruptus</i>	MM061
<i>Cautires johannesii</i>	MM018
<i>Cautires maninjauensis</i>	MM036
<i>Cautires sp.</i>	MM040
<i>Cautires sp.</i>	MM058
<i>Cautires rianganus</i>	MM035
<i>Cautires sp.</i>	MM060
<i>Cautires tujuhensis</i>	MM059
<i>Cautires yunnanus</i>	MM001
<i>Xylobanus sp.</i>	MM021

Tab. 4: Seznam jednotlivých genů zařazených do parciálních analýz metodou maximální parsimonie.

	18S	28S	16S	COI	COII	ND5	ND1	tRNA Leu - COI	tRNA Leu - ND5	tRNA Leu - 16S
1. part. analýza rDNA, tRNA	ano	ano	ano					ano	ano	ano
2. part. analýza cds mtDNA				ano	ano	ano	ano			
3. part. analýza mtDNA kompletní fragmenty			ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano	ano

Program TNT se využívá k analýzám velkých datasetů při použití metody maximální parsimonie. Využívá při tom algoritmus rychlého vyhledávání stromů Ratchet (Nixon, 1999). Princip maximální šetrnosti spočívá v hledání stromu či stromů s minimálním množstvím kroků. Preferuje nejmenší množství změn, tj. jednodušší hypotézy před složitějšími. Jednoduchostí se v tomto případě rozumí minimální počet kroků a sdílení společných znaků je vysvětlováno společným původem. Pokud vznikne konflikt mezi jednotlivými znaky, kdy znaky neposkytují stejný výsledek, tak je konflikt odůvodněn homoplazií (Hall, 2001).

Základním principem maximální parsimonie je vybrat strom (stromy) s minimální celkovou délkou, tj. počtem evolučních kroků, potřebných k vysvětlení vstupních dat. Ne všechny znaky jsou pro konstrukci stromu užitečné. Neměnné znaky, které se vyskytují u všech taxonů, jsou pro tvorbu stromu nepoužitelné a jsou danou metodou ignorovány. Podobně je tomu i u znaků, jejichž jednotlivé sekvence se vyskytují vždy jen u jednoho taxonu (Hall, 2001).

Analýza podle kritéria Maximum Likelihood (Felsenstein, 1981)

Data byla analyzována programem RAxML (Stamatakis, 2006). Program se spouštěl z příkazového řádku MS DOS. Programu byl pro výpočet zadán substituční model GTRGAMMA a model pro bootstrapovou podporu se 100 násobným opakováním. Výstupem programu byl fylogram s maximální pravděpodobností a fylogram obsahující podporu jednotlivých větví vypočtenou ze 100 bootstrapových replikací.

Kladogram maximální pravděpodobnosti byl dále konvertován do textového formátu a ten byl následně otevřen a upraven v programu Fig Tree v. 1.3.1 (Rambaut, 2010). Upravený fylogram byl exportován ve formátu vektorové grafiky s příponou .emf a dále byl zpracován a doplněn v grafickém vektorovém programu Corel Draw X5.

Fylogenetická data obsahující bootstrapové podpory byla importována do programu PAUP* a následně byl vypočítán konsenzuální strom.

Princip metody maximum likelihood spočívá ve výpočtu pravděpodobnosti, že námi navržený model evolučních změn dá vzniknout vstupní nukleotidové sekvenci, porovnání pravděpodobností pro jednotlivé fylogeneze a nalezení fylogeneze s nejvyšší pravděpodobností. Pro sestavení stromu metodou maximální pravděpodobnosti potřebujeme vstupní data ve formě sekvencí nebo aminokyselin a substituční model.

Program RAxML k sestrojení počátečního stromu používá program DNAPARS. V prvním kroku prohledává okolí počátečního stromu tak, že "usekne" jednu větev (jednoduchou i rozvětvenou) a přemístí ji do všech možných maximálně vzdálených míst i uzlů od původního umístění. Odhadne pravděpodobnost nově vzniklé topologie. Při tomto odhadu, optimalizuje délky

větví jen v části stromu, která byla dotčena změnou. U série stromů s nejvyšším odhadem pravděpodobnosti optimalizuje délky větví přesnějším algoritmem a vypočítá pravděpodobnost přesně. Nejlepší strom si uloží do paměti. Postupně provede první krok se všemi větvemi s tím, že pokaždé, když narazí na lepší topologii, přijme ji a následné změny provádí na ní. Program skončí, nenajde-li lepší strom.

Analýza dat bayesiánskou metodou (Berger, 1985)

K analýze byl použit program Mr. Bayes 3.2, který byl spuštěn na počítači Mac s operačním systémem Mac OS X 10.4.11 Tiger. Samotná analýza byla nastavena na 10 000 000 generací s dvěma paralelními běhy, každý se třemi chladnými a jedním horkým řetězcem. Oba výsledné datasety pravděpodobností byly nahrány a zpracovány v programu Tracer v. 1.5 (Rambaut, 2010) a na základě stabilizace pravděpodobností byla odstraněna prestacionární část analýzy. Závěrečná úprava výsledného datasetu stromů byla provedena v textovém editoru, kde se oba samostatné paralelní běhy sloučily. Výsledný textový soubor byl následně nahrán do programu PAUP*, kde byl vypočítán konsenzuální strom.

Bayesiánská metoda, která byla použita k rekonstrukci fylogenetických stromů je podobná metodě Maximum Likelihood v tom, že vychází z určitého evolučního modelu a snaží se nalézt takový strom, který je maximálně v souladu jak s tímto modelem, tak se vstupními daty. Samotná analýza začíná u náhodně vybraného nebo uživatelem předem specifikovaného stromu s kombinací délek větví a substitučních parametrů, které definují počáteční stav řetězce. Poté je úpravou délek větví nebo přemístěním jedné z větví navržen nový stav řetězce a vypočítána jeho pravděpodobnost. Jestliže je tato pravděpodobnost vyšší než původní, je tento nový stav akceptován, v opačném případě zůstává stav původní. Tímto způsobem celý proces pokračuje, až postupně dochází k souboru stromů, jejichž pravděpodobnosti jsou tak podobné, že akceptování/zamítnutí alternativních stromů je spíše otázkou náhody.

Rozdíl mezi metodou maximum likelihood a bayesiánskou analýzou je v tom, že metoda maximum likelihood hledá fylogenii maximalizující pravděpodobnost získání těchto dat, zatímco bayesovská analýza hledá fylogenii maximalizující pravděpodobnost tohoto stromu při daném modelu a datech. Zatímco maximum likelihood hledá jediný nejpravděpodobnější strom, bayesiánská analýza hledá nejlepší sestavu stromů. Proto výstupní informací programu není jeden strom, ale série stromů. Výsledky jsou získatelné na běžném počítači, protože zpětná pravděpodobnost daných větví v řadě stromů je získána přímo v průběhu výpočtu a není nutné provádět další hodnocení statistické podpory větví.

3. Výsledky

Celkem jsem získal sekvence alespoň jednoho fragmentu pro 59 jedinců. Všechny studované vzorky byly sekvenovány pro fragmenty COI a ND5. Na základě výsledků předběžných analýz byli pro sekvenování fragmentů 18S rDNA, 28S rDNA a 16S rDNA vybráni pouze zástupci jednotlivých druhů (Tab. 5), u kterých byla úspěšně provedena amplifikační reakce mitochondriálních genů a s kterými se nadále pracovalo.

Fragment genu ND5 byl amplifikován primery OF1 a R6. Celkem se podařilo získat sekvence genu reprezentující 49 jedinců. Zbývajících 10 taxonů bylo reamplifikováno pomocí primerů OF1 a R2M. Sekvence genu ND5 se nepodařilo získat pro vzorky: MM002, MM005, MM006, MM037, MM047, MM057 a MM060.

Sekvence fragmentu COI byly získány pro všechny taxony, kromě vzorku MM039. Výsledky amplifikací jsou uvedeny v tab. 5.

Tab. 5: Přehled studovaného materiálu s uvedením čísla exempláře a se seznamem jednotlivých genů.

<i>Cautires corporaali</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM054	ne	ne	ne	ano	ano
MM057	ano	ano	ne	ne	ano

<i>Cautires imitator</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM009	ne	ne	ne	ano	ano
MM038	ano	ano	ano	ano	ano

<i>Cautires indus</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM007	ne	ne	ne	ano	ano

<i>Cautires interruptus</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM061	ano	ano	ne	ano	ano

<i>Cautires johannesii</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM018	ano	ne	ano	ano	ano
MM020	ne	ne	ne	ano	ano
MM022	ne	ne	ne	ano	ano
MM023	ne	ne	ne	ano	ano
MM025	ne	ne	ne	ano	ano

MM042	ne	ne	ne	ano	ano
MM043	ne	ne	ne	ano	ano
MM044	ne	ne	ne	ano	ano
MM045	ne	ne	ne	ano	ano
MM046	ne	ne	ne	ano	ano
MM047	ne	ne	ne	ne	ano
MM048	ne	ne	ne	ano	ano
MM049	ne	ne	ne	ano	ano
MM050	ne	ne	ne	ano	ano
MM051	ne	ne	ne	ano	ano
MM052	ne	ne	ne	ano	ano
MM053	ne	ne	ne	ano	ano

<i>Cautires maninjauensis</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM015	ne	ne	ne	ano	ano
MM036	ano	ano	ano	ano	ano

<i>Cautires pauper</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM006	ne	ne	ano	ne	ano
MM013	ne	ne	ne	ano	ano
MM017	ne	ne	ne	ano	ano
MM027	ne	ne	ne	ano	ano
MM039	ano	ano	ano	ano	ne
MM055	ano	ano	ne	ano	ano
MM056	ne	ne	ne	ano	ano

<i>Cautires pauperulus</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM014	ne	ne	ne	ano	ano
MM019	ne	ne	ne	ano	ano
MM024	ne	ne	ne	ano	ano
MM026	ano	ano	ano	ano	ano
MM041	ano	ano	ano	ano	ano

<i>Cautires rianganus</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM035	ano	ano	ano	ano	ano
MM037	ano	ano	ano	ne	ano

<i>Cautires spp.</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM002	ano	ano	ano	ne	ano
MM005	ne	ne	ano	ne	ano
MM012	ne	ne	ano	ano	ano
MM016	ne	ne	ne	ano	ano
MM034	ano	ano	ano	ano	ano
MM040	ano	ano	ano	ano	ano
MM058	ano	ano	ano	ano	ano

MM060	ano	ano	ano	ne	ano
-------	-----	-----	-----	----	-----

<i>Cautires tujuhensis</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM059	ano	ano	ano	ano	ano

<i>Cautires yunnanus</i>	18S	28S	16S	ND5	COI
MM001	ano	ano	ano	ano	ano
MM003	ne	ne	ne	ano	ano
MM004	ne	ne	ne	ano	ano
MM008	ne	ne	ne	ano	ano
MM010	ne	ne	ne	ano	ano
MM011	ne	ne	ne	ano	ano
MM030	ne	ne	ne	ano	ano
MM031	ne	ne	ne	ano	ano
MM032	ne	ne	ne	ano	ano
MM033	ne	ne	ne	ano	ano

<i>Xylobanus</i> sp.	18S	28S	16S	ND5	COI
MM021	ano	ano	ne	ano	ano

Tab. 6: Přehled fragmentů genů, počtu bází a vyznačení délky v celkové matici

fragment genu	počet bází	pozice genu v celkové matici
18S	1868	1-1868
28S	632	1869-2500
16S	621	2501-3121
tRNA Leu (16S)	67	3122-3188
ND1	129	3189-3317
COI	787	3318-4104
tRNA Leu (COI)	60	4105-4164
COII	233	4165-4397
ND5	1049	4398-5446
tRNAs	185	5447-5631

Sekvence jedinců použitých jako outgroup se lišily od studovaného rodu *Cautires* v případě fragmentu ND5 od 11,846% do 31,331% a u fragmentu COI od 11,464% do 24,713%. Sekvence jednotlivých vzorků v rámci rodu *Cautires* se lišily u fragmentu ND5 od 0% do 28,996% a u fragmentu COI od 0% do 21,965%. Ribozomální geny vykazovaly obecně nižší odlišnost.

Délka sekvencí fragmentu COI se lišila minimálně s průměrným počtem bází 1079,11. Průměrná frekvence zastoupení jednotlivých nukleotidů byla následující: A = 36,156%; C =

17,653%; G = 11,927%; T = 34,263% (viz Přílohy, Tab. 7). Počet bází fragmentu ND5 u studovaných exemplářů nebyl tak konzervativní jako v případě fragmentu COI. Vyšší délková variabilita byla způsobena přítomností tRNA genů ve fragmentu. Průměrný počet bází u fragmentu ND5 byl 1207,95. Průměrné zastoupení nukleotidů u genu ND5: A = 31,120%; C = 9,501%; G = 15,268%; T = 44,111% (viz Přílohy, Tab. 6).

Srovnáme-li průměrné zastoupení nukleotidů u genů COI, COII, ND1 a ND5, tak zjistíme zvýšené zastoupení bází adeninu a thyminu, které je obvyklé v mitochondriálních proteiny kódujících genech (Simon et al., 1994). AT báze se vyskytovaly v sekvenci cds fragmentů od 27,358% do 48,313 %. Naproti tomu sekvence jaderných rDNA (18S a 28S) vykazovaly mnohem vyváženější zastoupení bází a AT báze se vyskytovaly v sekvenci jaderných rDNA fragmentů od 22,579% do 24,669 %.

Fylogenetické analýzy

Metodami maximální parsimonie, maximální pravděpodobnosti a bayesiánskou metodou jsem získal tři velmi podobné stromy, které byly plně rozlišené. Lišily se pouze uspořádáním terminálních větví uvnitř kládů odpovídajících jednotlivým druhům. Monofylie studované skupiny byla potvrzena všemi třemi topologiemi, kdy nejnižší hodnota bootstrapové podpory byla 98%.

Monofylie druhů vymezených na základě vnějších morfologických znaků molekulární data velmi dobře podporovala. Pokud byl druh reprezentován více než jedním exemplářem, podpora větve obsahující jedince stejného druhu v bootstrapové analýze téměř vždy dosahovala 100%. Pouze u fylogenetického stromu získaným metodou maximální parsimonie (Obr. 1) dosahovala podpora větve u druhu *Cautires imitator* 98%.

Podpora vzájemné příbuznosti druhů a jejich skupin byla pravidelně nižší a pohybovala se v rozmezí od 56% do 100%. Nejnižší bootstrapovou podporu (56%) měl klád získaný bayesiánskou metodou (Obr. 3), do kterého náležely jedinci *Cautires* spp. z Malajsie, Laosu a Sumatry.

Programem Mr. Bayes jsem získal 10 000 stromů. Z celkového počtu všech získaných stromů bylo z dalších analýz vyřazeno 500 stromů jako burn-in.

Fylogenetické stromy vyprodukované parciálními analýzami metodou maximální parsimonie byly plně strukturované a opět robustně podporovaly monofylii tribu Metriorrhynchini. Nejnižší bootstrapová hodnota tohoto kládu byla 75% u 2. parciální analýzy cds mtDNA (viz Přílohy, Obr. 7), nejvyšší hodnota dosáhla 93% u 1. parciální analýzy rDNA, tRNA (viz Přílohy,

Obr. 6). Bootstrapová podpora dosáhla u 3. parciální analýzy hodnoty 86% (viz Přílohy, Obr. 8).

Mezidruhové bootstrapové podpory jednotlivých větví byly velmi diferenciované a pohybovaly se u 1. parciální analýzy rDNA, tRNA v rozmezí od 63% do 100%. U 2. parciální analýzy cds mtDNA a 3. parciální analýzy mtDNA dosahovaly mezidruhové bootstrapové podpory podobných výsledků a pohybovaly se v rozmezí od 64% do 100%.

Postavení jedinců náležejících do skupiny *Cautires obsoletus* (*Cautires corporaali*, *Cautires imitator*, *Cautires indus*, *Cautires johannesi*, *Cautires pauperulus*, *Cautires rianganus*, *Cautires tujuhensis*, *Cautires yunnanus*) bylo u vytvořených fylogenetických stromů mírně rozdílné.

U fylogramu vytvořeném metodou maximální parsimonie (Obr. 1) byly větve druhů řazeny v sestupném pořadí: *Cautires pauperulus*, *Cautires imitator*, *Cautires tujuhensis*, *Cautires rianganus*, *Cautires yunnanus*, *Cautires indus*, *Cautires corporaali*, *Cautires johannesi*. Bootstrapové podpory dosahovaly u druhů *Cautires obsoletus* hodnot 100%, kromě druhu *Cautires imitator*, u kterého měl klád podporu 98%.

U fylogenetického stromu založeného na kritériu maximální pravděpodobnosti (Obr. 2) se postavení druhů skupiny *Cautires obsoletus* oproti stromu maximální parsimonie odlišovalo ve vloženém kládu *Cautires yunnanus* mezi druhy *Cautires pauperulus* a *Cautires imitator*. Ostatní druhy byly ve fylogramu lokalizovány obdobně jako u fylogenetického stromu metody maximální parsimonie. Hodnoty podpory větví dosahovaly u všech druhů skupiny *Cautires obsoletus* hodnot 100%.

Postavení druhů skupiny *Cautires obsoletus* u fylogramu vzniklým bayesiánskou metodou (Obr. 3) bylo stejné, jako u fylogramu vytvořeném metodou maximální parsimonie. Bootstrapové podpory větví dosahovaly u druhů *Cautires obsoletus* hodnot 100%.

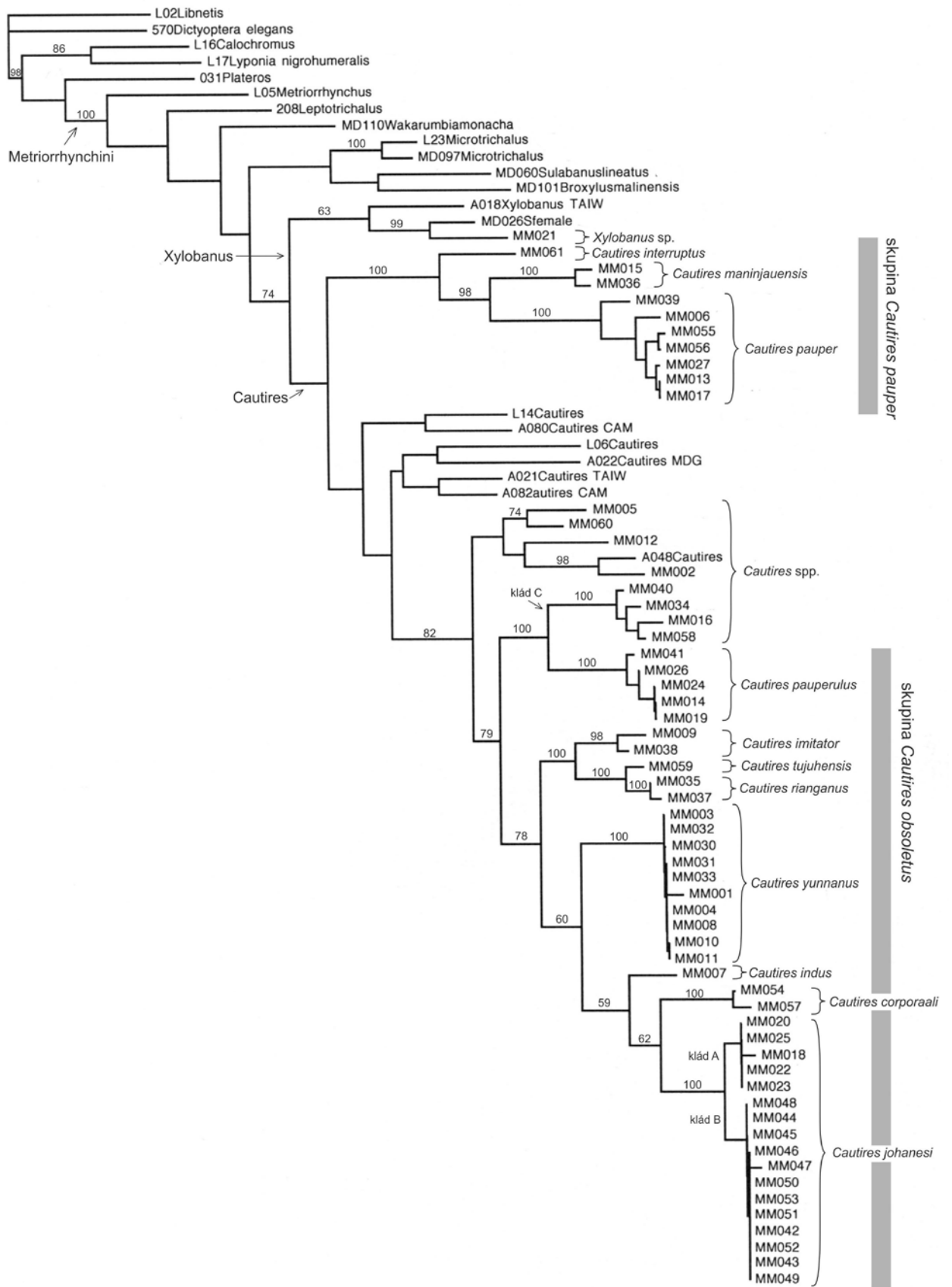
Při fylogenetických analýzách bylo zjištěno, že studovaní jedinci druhu *Cautires johannesi* pocházející ze Sumatry, byli rozděleni do dvou paralelních větví (Obr. 4). Jedinci kládu A, kteří reprezentují populaci z oblasti Lake Maninjau, se od sebe liší od 0% do 0,142% (Tab. 8). Jedinci kládu B, kteří pocházejí ze severní Sumatry (Gunung Sibayak), jsou navzájem od sebe odlišní v rozmezí od 0% do 0,413%. Obě dvě skupiny jsou od sebe geneticky vzdálené od 4,127% do 4,586%.

Jedinci s hnědou barvou štítu v obou skupinách se liší od 4,127% do 4,586%. Zkoumaní zástupci s černou barvou štítu, v rámci kládu B, se od sebe odlišují v rozmezí od 0% do 0,413%. Bootstrapová hodnota podpory druhu dosáhla u všech fylogenetických stromů hodnoty 100% (Obr. 1, Obr. 2, Obr. 3).

Tab. 7: Total evidence analýza

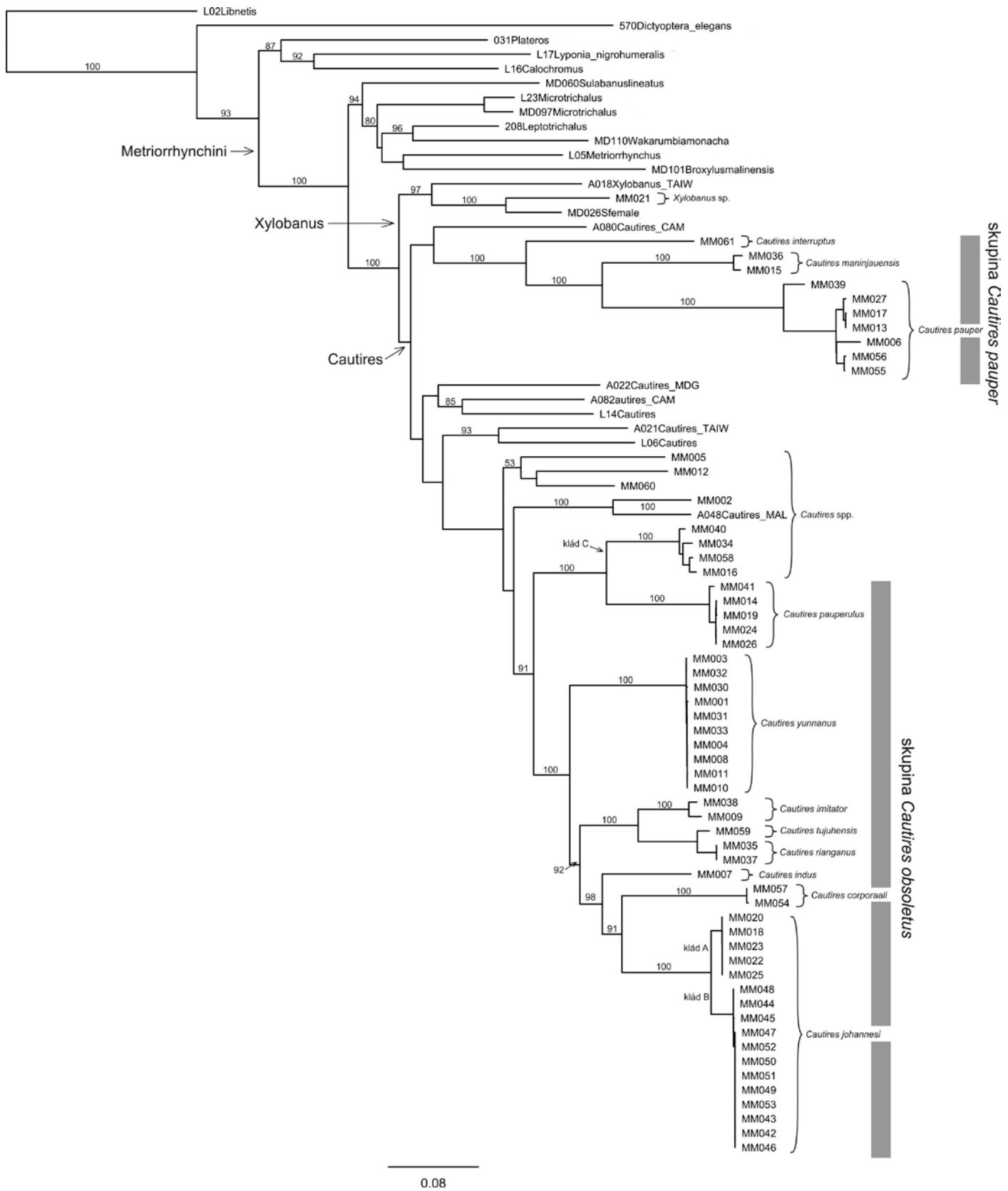
analytická metoda	fragment genu	velikost matice	počet stromů
Maximální parsimonie	18S, 28S, 16S, COI, COII, ND1, ND5, tRNA Leu - COI, tRNA Leu - ND5, tRNA Leu - 16S	5631 bp	1
Maximální pravděpodobnost	18S, 28S, 16S, COI, COII, ND1, ND5, tRNA Leu - COI, tRNA Leu - ND5, tRNA Leu - 16S	5631 bp	1
Bayesiánská metoda	18S, 28S, 16S, COI, COII, ND1, ND5, tRNA Leu - COI, tRNA Leu - ND5, tRNA Leu - 16S	5631 bp	190
1. part. analýza rDNA, tRNA	18S, 28S, 16S, tRNA Leu - COI, tRNA Leu - ND5, tRNA Leu - 16S	3433 bp	1
2. part. analýza cds mtDNA	COI, COII, ND1, ND5	2198 bp	3
3. part. analýza mtDNA kompletní fragmenty	16S, COI, COII, ND1, ND5, tRNA Leu - COI, tRNA Leu - ND5, tRNA Leu - 16S	3131 bp	1

Obr. 1: Fylogenetický strom č. 1 vytvořený metodou maximální parsimonie, doplněný hodnotami podpory větví a s vyznačením jednotlivých druhů



— 50 changes

Obr. 2: Fylogenetický strom č. 2 vytvořený metodou maximální pravděpodobnosti, doplněný hodnotami podpory větví a s vyznačením jednotlivých druhů



4. Diskuze

4.1. Fylogeneze druhových skupin rodu *Cautires*

V minulosti byly jednotlivé druhy určovány pouze na základě morfologických znaků. S použitím molekulárních metod studia fylogeneze bylo zjištěno, že morfologicky a barevně podobné druhy jsou si často geneticky velmi vzdálené a druhy, které jsou si morfologicky méně podobné, jsou si blíže příbuzné. K studiu morfologické a genetické diferenciaci v rodu *Cautires* byly použity molekulární markery a výsledná data byla srovnána s morfologií a barevnými vzory pronota a krovek u studovaných jedinců. Tímto způsobem je možné testovat neutrálními markery unikátní nebo paralelní vznik některých morfologických struktur.

Rod *Bulenides* byl definován na základě jediného odlišujícího znaku a to přítomností pouze jediné centrální areoly na pronotu (Waterhouse, 1878, Bocak & Matsuda, 2003). Teprve nedávno byl tento přístup odmítnut a rod *Bulenides* byl synonymizován s rodem *Cautires* a bylo předpokládáno, že druhy původně klasifikované v rodu *Bulenides* ve skutečnosti tvoří dvě nezávislé terminální skupiny v rámci rodu *Cautires* (Dudkova & Bocak, 2010). Tento přístup byl potvrzen zde provedenými fylogenetickými analýzami sekvencí mitochondriálních fragmentů 16S, COI a ND5 mtDNA. Všechny fylogenetické hypotézy bez ohledu na použité optimalizační kritérium potvrzují tento závěr. Tímto je prokázáno, že podobný tvar pronota s jedinou centrální areolou se vyvinul v rodu *Cautires* několikrát nezávisle a není možno tento znak použít jako apomorfii definující monofyletickou skupinu. Rod *Bulenides* je tedy nepřipustným taxonem ve fylogenetické klasifikaci a jeho synonymizace s rodem *Cautires* byla oprávněná. Ukazuje se, že vznik pronota s jedinou areolou je jednoduchou modifikací, která může vznikat nezávisle několikrát v rámci studované skupiny.

4.2. Morfologie, mimetické vzory a delimitace druhů

Pro vyhodnocení vzniku barevných vzorů a jejich potenciální funkci jako mimetického signálu jsem ve studovaném materiálu vyhledal velmi podobné jedince z hlediska zbarvení a z odlišných lokalit sběru a srovnal je s fylogenetickými daty. Pro vyhodnocení jsem vybral následující druhy: *Cautires pauper* (MM006, MM013, MM017, MM027, MM039, MM055, MM056) a *Cautires pauperulus* (MM014, MM019, MM024, MM026, MM041) široce rozšířené v různých oblastech Sumatry. Oba druhy si jsou navzájem velmi podobné velikostí, tvarem těla i zbarvením a přitom jsou nepříbuzné (genetická vzdálenost mezi jedinci těchto druhů dosahuje až

25,032%). Všichni zástupci mají hnědo - oranžovou barvu štítu a krovky po celé délce zbarveny černě.

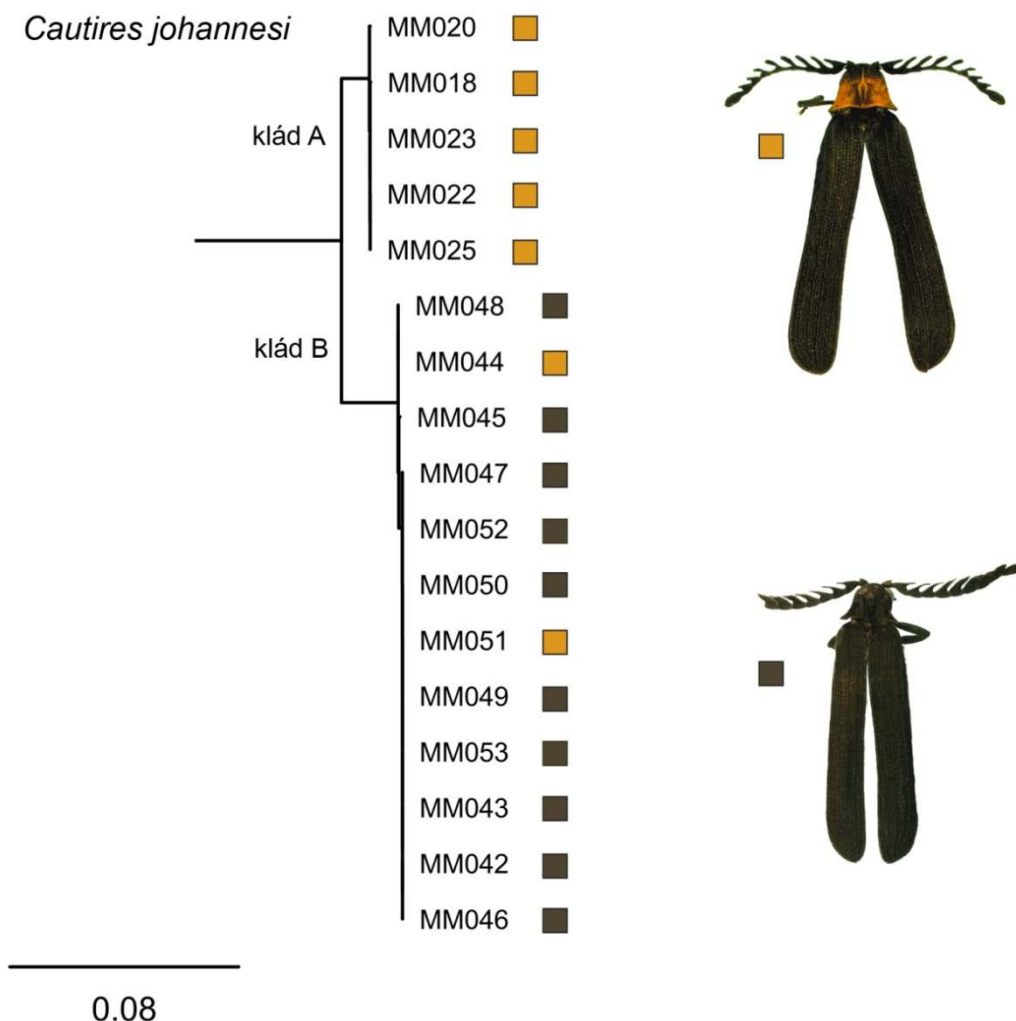
Podobný příklad bychom našli i druhů *Cautires imitator* a *Cautires rianganus*, kteří mají uniformní černé zbarvení štítu a krovek. Jedinec MM035 klasifikovaný v druhu *Cautires rianganus*, který pochází z horského masivu Kerinci Seblat (Sumatra), má identické zbarvení jako jedinec MM009 náležející do druhu *Cautires imitator*, vyskytující se v oblasti Malajsie, Pahang Cameron Highlands. Obě lokality sběru jsou od sebe vzdáleny přibližně 730 km. Uvedení zástupci jsou od sebe geneticky vzdáleni 11,658%. Tyto druhy patří do skupiny široce rozšířených druhů v oblasti Malajsie a Sumatry a podobně zbarvené jsou i skupiny druhů z rodů *Plateros*, *Microtrichalus* a *Leptotrichalus*, které se vyskytují společně s druhy rodu *Cautires* a připomínají je zbarvením, velikostí a tvarem těla. Přestože se nejedná o typické aposematické zbarvení, je možné, že slouží jako signál pro predátory, protože černě zbarvený jedinec je velmi nápadný proti světlu při obvyklé pozici na spodní straně listu. Podobné komplexy černě zbarvených druhů jsou známy z náhorní pločiny Cameron Highlands (Malajský poloostrov) a tamější komplexy zahrnují zástupce několika čeledí (Bocak & Yagi, 2010).

Více případů tedy ukazuje, že v rodu *Cautires* se pravidelně vyskytují shodné nebo velmi podobné barevné vzory u druhů, které nejsou blízce příbuzné. Tyto druhy se vyskytují na lokalitách, kde další druhy jsou podobně zbarvené, a je možné se domnívat, že výrazné vzory slouží jako aposematický signál.

Poslední studií rodu *Metriorrhynchus* bylo prokázáno, že variabilita zbarvení lokálních populací může být mimořádně vysoká (Bocak & Yagi, 2010). Vzhledem k tomu, že pestré kontrastní zbarvení se vyskytuje i v rodu *Cautires*, je možné předpokládat, že i v tomto případě se budou vyskytovat skupiny napodobující zbarvení jiných druhů vyskytujících se na stejné lokalitě. Jedním z příkladů barevného polymorfismu ve studovaném materiálu je druh *Cautires johannesi*, v kterém lze rozlišit dvě skupiny podle různé barevnosti pronota (Obr. 4). Jedinci tvořící klád A fylogenetického stromu mají všichni oranžově zbarvené pronota a reprezentují populaci z lokality Danau Maninjau (Tab. 1): MM018, MM020, MM022, MM023, MM025. Jedinci tvořící větev B fylogenetického stromu, byli sbíráni v oblasti horského masivu Gunung Sibayak na severní Sumatře: MM042, MM043, MM044, MM045, MM046, MM047, MM048, MM049, MM050, MM051, MM052 a MM053. V populaci z lokality Sumatra Danau Maninjau jsou zastoupené obě barevné varianty. Jedinci MM044 a MM051 mají oranžovou barvu pronota, ostatní mají barvu černou. Elytry jsou zbarveny u všech zástupců černě. Obě lokality sběru Sumatra Danau Maninjau a Sumatra Gunung Sibayak jsou od sebe vzdáleny vzdušnou čarou 586 km. Z porovnání výsledků získaných fylogenetickými analýzami dojdeme k závěru, že všichni jedinci v rámci své lokální populace jsou od sebe minimálně geneticky vzdáleni. Porovnáme-li obě subpopulace mezi sebou, zjistíme, že se od sebe geneticky odlišují maximální hodnotou 4,586%. Při srovnání jedinců

s oranžovým štítem v obou lokálních populacích zjistíme, že výsledek srovnání genetické vzdálenosti mezi oběma subpopulacemi je totožný a nabývá opět hodnoty 4,586%. Jedinci obou skupin sdílejících oranžovou barvu štítu nejsou tedy vzájemně příbuzní a podobné zbarvení se v obou populacích vyvinulo nezávisle. Vzhledem k výskytu podobně aposematically zbarvených druhů jiných rodů čeledi Lycidae na obou lokalitách, tyto data podporují scénář vzniku genetické odlišnosti primárně na základě geografické izolace a souběžně nebo následně vznikajících odlišných aposematických vzorů. V tomto případě se jedná a napodobování většího počtu druhů s pestře zbarveným pronotem a bazální části krovek z rodů *Cautires* a *Xylobanus*, kteří se vyskytují ve velkém počtu druhů na všech lokalitách. Jedinci obou kládů byli studováni i z hlediska morfologie (relativní velikost očí, tvar štítu a tvar samčích kopulačních orgánů). Morfologické znaky, s pominutím zbarvení, které se ukazuje jako velmi variabilní znak podléhající silně paralelně působícímu přírodnímu výběru, ukazují na příslušnost všech jedinců k druhu *Cautires johannesii*. Přitom genetická odlišnost na úrovni 4.586% je pravidelně považována za důkaz reprodukční izolace populací a vede k pojmenování samostatných druhů. Ačkoliv mechanistické spoléhání na genetickou odlišnost bez hlubších znalostí studované skupiny je všeobecně odmítáno, v tomto případě se skutečně může jednat o samostatné, morfologicky neodlišitelné druhy, protože v příbuzném rodu *Metriorrhynchus* byla genetická odlišnost v mitochondriálních genech COI a ND5 na úrovni pod 3% doprovázena velmi výraznou diferenciací samčích genitálií a takto odlišné populace byly považovány za samostatné druhy (Bocak & Yagi, 2010, Bocak, 2007). Klasifikace těchto skupin výhradně na základě morfologie bez možnosti použití molekulárních analýz, by velmi pravděpodobně preferovala na základě barevných odlišností nesprávnou typologickou definici druhů v rozporu s předpokládanou reprodukční izolovaností populací.

Obr 4: Fylogram druhu *Cautires johannesesi* s vyobrazenými barevnými vzory a fotografickým zobrazením barevných odlišností v rámci druhu

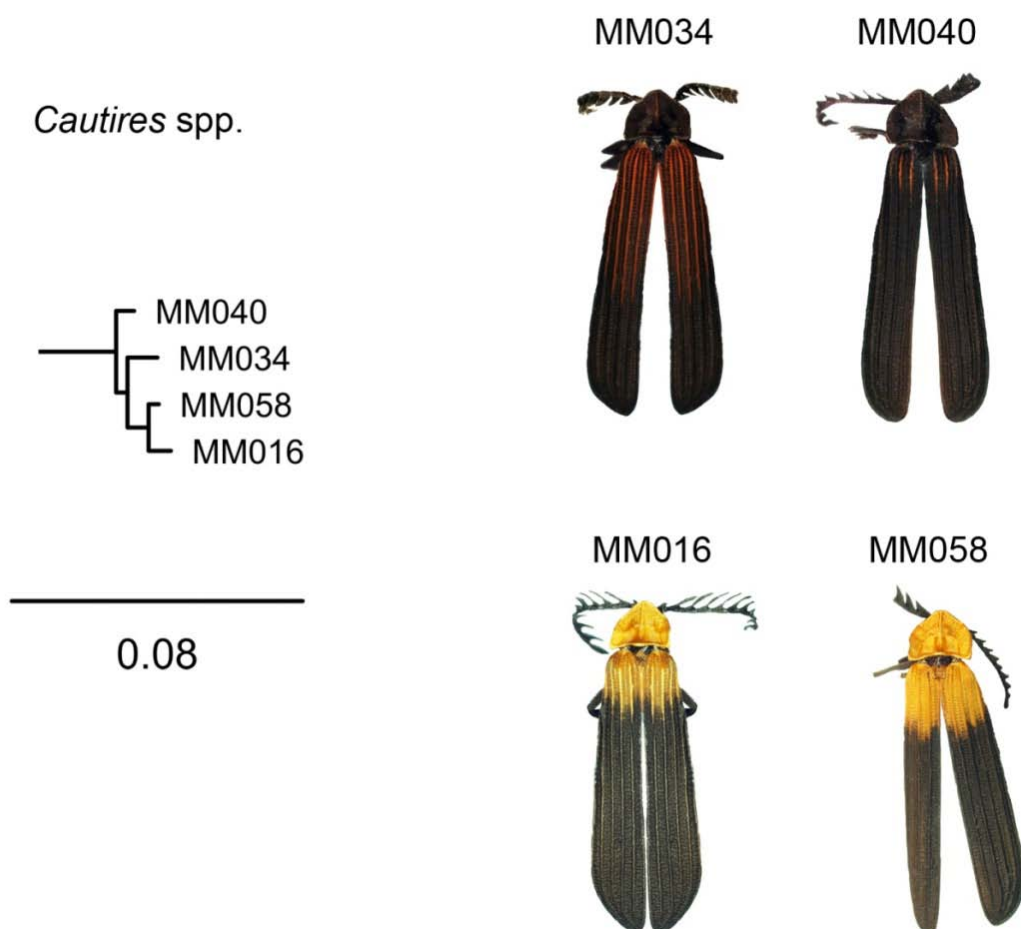


Vznik výrazných aposematických vzorů ve skupině blízké příbuzných jedinců byl pozorován dále v kládu C (Obr. 1, Obr. 2, Obr. 3) jedinců *Cautires* spp. (Obr. 5). Vzhledem k tomu, že jsou k dispozici pro analýzu DNA pouze 4 jedinci, celkem ze tří lokalit a tito jedinci jsou velmi blízcí geneticky, je obtížné definitivní vyhodnocení jejich statusu jako samostatných druhů nebo jako infraspecifických kategorií. Dva jedinci MM040 a MM058 pocházejí z masivu Kerinci na centrální Sumatře a byli sbíráni v odlišných nadmořských výškách: MM058 v nadmořské výšce cca 1750 m n. m. a MM040 v nadmořské výšce cca 450 m n. m. Pokud by se jednalo o stejný druh, měli by být na fylogenetickém stromu v sesterském postavení. Všechny fylogenetické stromy však konzistentně podporují sesterskou pozici jedinců MM058 a MM016 (z oblasti centrální Sumatry, Danau Maninjau) a v sesterském postavení k této skupině je jedinec MM034 z centrální oblasti Malajského poloostrova. Příbuznost těchto jedinců indikuje jejich reprodukční izolaci a vývoj velmi odlišných aposematických vzorů v jednotlivých populacích. Toto ukazuje na potenciální roli mimetických vzorů jako reprodukčně izolačního mechanismu. Dosavadní data ukazují na možnost

tvorby částečně izolovaných populací, na jejichž diferenciaci se podílejí jak geografická vzdálenost, v případě jedinců MM040 a MM058 založená na výskytu v ekosystémech v různých nadmořských výškách, tak odlišné mimetické vzory odpovídající převládajícím vzorům na jednotlivých lokalitách. Vzhledem k omezenému materiálu není možné vyslovit definitivní závěry.

S přihlédnutím k výše uvedeným faktům, je možné konstatovat, že neexistuje jasná hranice pro definování samostatných druhů na základě jak morfologie a zbarvení, tak na základě genetických dat. Skupiny jako *Cautires* jsou špatnými letci na delší vzdálenosti, a jejich omezená disperzní schopnost vede velmi snadno ke geografické fragmentaci populací. Jejich izolace je potenciálně posilována advercí k odlišným aposematickým vzorům. Lze předpokládat, že delší vývoj obou takto izolovaných populací vede ke vzniku samostatných biologických druhů. Tuto hypotézu podporují i výsledky provedených fylogenetických analýz. Pro definitivní závěry by bylo nutné získat další materiál pro analýzy a mít možnost testování reprodukční izolace v přírodních podmínkách.

Obr. 5: Fylogram skupiny *Cautires* spp. (klád C) s fotografickým zobrazením studovaného materiálu



5. Závěr

Srovnáním morfologických dat s fylogenetickými daty získanými molekulárními analýzami se mi podařilo většinu zkoumaných jedinců klasifikovat do jednotlivých druhů. Pomocí fylogenetických analýz se mi podařilo získat 6 plně rozlišených stromů: tři fylogenetické stromy analyzováním kompletního datového souboru (metodami maximální parsimonie, maximální pravděpodobnosti a bayesiánskou metodou) a tři fylogenetické stromy vytvořené parciálními analýzami s použitím kritéria maximální parsimonie. Všechny získané fylogramy plně potvrdily reciproční monofylii skupin *Cautires pauper* a *Cautires obsoletus* a jejich nezávislý vznik v rámci rodu *Cautires*. Bez možnosti použití molekulárních markerů by byla determinace jednotlivých druhů studovaného materiálu velice obtížná, protože jednotlivé druhy si jsou navzájem morfologicky podobné, liší se především zbarvením a často jedinci náležející jedinému druhu mohou být odlišně zbarvení. Porovnáním morfologických znaků s hypotézou o fylogenetické příbuznosti jedinců *Cautires johannes* založenou na sekvencích fragmentů mtDNA jsem došel k závěru, že v rámci rodu *Cautires* existuje diversita ve zbarvení jedinců v rámci jedné populace, jako v již dříve studovaném rodu *Metriorrhynchus* (Bocak & Yagi, 2010). Studované lokální populace jsou od sebe geograficky oddělené a molekulární analýzy ukazují na možnost jejich samostatného postavení jako reprodukčně izolovaných druhů. V tomto případě je nutné pro detailní studium získat další materiál z více lokalit na ostrově Sumatra.

6. Poděkování

Děkuji vedoucímu mé diplomové práce za poskytnutý čas a rady, které byly potřebné k provedení a sepsání mé diplomové práce, za poskytnutý laboratorní materiál a chemikálie. Dále děkuji všem kolegům, kteří poskytli materiál fixovaný v alkoholu pro izolaci DNA a přátelům, kteří mě svými radami a postřehy inspirovali při tvorbě samotné diplomové práce.

7. Seznam použité literatury

GenBank Database (2010-08-01) NCBI: The National Center for Biotechnology Information.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Berger, James O. (1985) *Statistical Decision Theory and Bayesian Analysis*. Berlin: Springer-Verlag

Bocak, L. (2002) Revision and phylogenetic analysis of Metriorrhynchinae. *European Journal of Entomology* 99: 315 -351

Bocak, L. (2007) A Revision of Metriorrhynchus (Coleoptera: Lycidae) from the Greater Sunda Islands and Continental Asia. *Raffles Bulletin of Zoology* 55: 253 –260.

Bocak, L. & Bocakova, M. (2009) Family Lycidae. In: Leschen R. A. B. and Beutel R. G. (Eds) *Handbook of Zoology. Part 38, Vol. 2. Morphology and Systematics (Elateroidea, Bostrichiformia, Cucujoidea)*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.

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

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

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

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

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

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

- Dudkova, P. & Bocak, L. (2010) A review of the *Cautires obsoletus* species group from Indo – Burma (Coleoptera: Lycidae). *Zootaxa* 2527: 28–48
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17: 368–376.
- Goloboff, P., Farris, J., & Nixon, K. (2008) TNT: a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786
- Hall, B. G. (2001) Phylogenetic trees made easy. A how-to manual for molecular biologists. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hillis, D. M., Moritz, C. and Mable, B. K. Eds (1996) Molecular Systematics. Sunderland: Sinauer Associates
- Huelsenbeck, F. J., Ronquist, F. (2001) MRBAEYS: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics Applications Note vol. 17: 754 – 755*
- ICZN (2011-04-20) International Commission on Zoological Nomenclature. Online: <http://iczn.org/>
- Kleine, R. (1933) Lycidae. Pars 128. In W. Junk & S. Schenkling (eds): *Coleopterorum Catalogus*. W. Junk, Berlin. Pp 1-145.
- Kubecek, V., Dvorak M. & Bocak L. (2011) The phylogenetic structure of Metriorrhynchini fauna of Sulawesi, (Coleoptera: Lycidae) with description of a new genus. *Zoological Studies*.
- Lawrence, J. F. & Newton Jr., A. F. (1995) Families and subfamilies of *Coleoptera*. In J. Pakaluk and S. A. Slipinski (eds), *Biology, Phylogeny and Classification of Coleoptera*. Warszawa: Muzeum i Institut Zoologii PAN. Pp. 779-1083.
- Levkanicova, Z. & Bocak, L. (2009) Identification of net - winged beetle larvae (Coleoptera: Lycidae) using three mtDNA fragments: a comparison of their utility. *Systematic Entomology* 34: 210 - 221.

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

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

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

Nixon, K. C. (1999) The Parsimony Ratchet, a New Method for Rapid Parsimony Analysis. *Cladistics Volume 15*: 407–414

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

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

Rambaut, A. (2010) Tracer. University Of Edinburg. Online:
<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>

Simon C., Fratti, F., Beckenbach, A., Crespi, B. Liu, H. & Flook, P. (1994) Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 951-701.

Swofford, D. L. (2002) *PAUP**; *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*. Version 4.0b 10. Sunderland: Sinauer Associates

Stamatakis, A. (2006) RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models, *Bioinformatics* 22 (21): 2688–2690

Vogler, A. P., De Salle, R., Assmann, T., Knisley, C. B. & Schultz, T. D. (1993) Molecular population genetics of the endangered tiger beetle, *Cicindela dorsalis* (Coleoptera: Cicindelidae). *Annales of the American Entomological Society* 86: 142-152.

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

8. Přílohy

Tab. 6: Délky sekvencí a relativní zastoupení nukleotidů v sekvencích u fragmentu genu ND5

Taxon	Druh	A	C	G	T	# sites
L06	<i>Cautires</i> sp.	0.34772	0.06390	0.11784	0.47054	1205
L14	<i>Cautires</i> sp.	0.33056	0.06894	0.12292	0.47757	1204
L05	<i>Metriorrhynchus lineatus</i>	0.31514	0.08354	0.13565	0.46567	1209
L23	<i>Microtrichalus</i> sp.	0.33471	0.07355	0.12893	0.46281	1210
208	<i>Leptotrichalus</i> sp.	0.33030	0.06871	0.12583	0.47517	1208
31	<i>Plateros</i> sp.	0.31260	0.07131	0.14511	0.47098	1206
L16	<i>Calochromus</i> sp.	0.31864	0.08735	0.13644	0.45757	1202
L17	<i>Lyponia nigrohumeralis</i>	0.28130	0.09599	0.16277	0.45993	1198
L02	<i>Libnetis</i> sp.	0.30616	0.07987	0.15308	0.46090	1202
570	<i>Dictyoptera elegans</i>	0.30968	0.07262	0.13606	0.48164	1198
A018	<i>Xylobanus</i> sp. (Taiwan)	0.33778	0.07673	0.13428	0.45121	1205
A021	<i>Cautires</i> sp. (Taiwan)	0.25000	0.25000	0.25000	0.25000	1234
A022	<i>Cautires</i> sp. (Madagaskar)	0.31697	0.07155	0.14725	0.46423	1205
A048	<i>Cautires</i> sp. (Malaysie)	0.32724	0.06645	0.12708	0.47924	1207
A080	<i>Cautires</i> sp. (Kamerun)	0.33888	0.06162	0.11740	0.48210	1204
A082	<i>Cautires</i> sp. (Kamerun)	0.25000	0.25000	0.25000	0.25000	1234
MD026	<i>Sulabanus</i> sp.	0.34412	0.07496	0.11329	0.46763	1206
MD060	<i>Sulabanus lineatus</i>	0.33532	0.06809	0.12681	0.46979	1207
MD097	<i>Microtrichalus</i> sp.	0.33333	0.07294	0.12807	0.46565	1211
MD101	<i>Broxylus malinensis</i>	0.30306	0.09932	0.16808	0.42954	1210
MD110	<i>Wakarumbia monacha</i>	0.33248	0.08078	0.12075	0.46599	1208
MM001	<i>Cautires yunnanus</i>	0.31483	0.06959	0.14167	0.47390	1207
MM002	<i>Cautires</i> sp.	0.25000	0.25000	0.25000	0.25000	1234
MM003	<i>Cautires yunnanus</i>	0.31483	0.07042	0.14085	0.47390	1207
MM004	<i>Cautires yunnanus</i>	0.31483	0.06959	0.14167	0.47390	1207
MM005	<i>Cautires</i> sp.	0.25000	0.25000	0.25000	0.25000	1234
MM006	<i>Cautires pauper</i>	0.25000	0.25000	0.25000	0.25000	1234
MM007	<i>Cautires indus</i>	0.33029	0.06888	0.13610	0.46473	1205
MM008	<i>Cautires yunnanus</i>	0.31483	0.06959	0.14167	0.47390	1207
MM009	<i>Cautires imitator</i>	0.33638	0.06063	0.11877	0.48422	1204
MM010	<i>Cautires yunnanus</i>	0.31739	0.06870	0.13826	0.47565	1211
MM011	<i>Cautires yunnanus</i>	0.31841	0.06926	0.13851	0.47382	1210
MM012	<i>Cautires</i> sp.	0.33997	0.06401	0.12197	0.47405	1209
MM013	<i>Cautires pauper</i>	0.29333	0.07833	0.16333	0.46500	1200
MM014	<i>Cautires pauperulus</i>	0.32090	0.07711	0.15008	0.45191	1206
MM015	<i>Cautires maninjauensis</i>	0.32086	0.06899	0.12968	0.48047	1203
MM016	<i>Cautires</i> sp.	0.30929	0.08292	0.15920	0.44859	1206
MM017	<i>Cautires pauper</i>	0.29274	0.07923	0.16347	0.46455	1199
MM018	<i>Cautires johannesii</i>	0.32668	0.07814	0.13383	0.46135	1203

MM019	<i>Cautires pauperulus</i>	0.32090	0.07629	0.15091	0.45191	1206
MM020	<i>Cautires johannesi</i>	0.32585	0.07814	0.13300	0.46301	1203
MM021	<i>Xylobanus</i> sp.	0.32969	0.07485	0.13457	0.46089	1206
MM022	<i>Cautires johannesi</i>	0.32668	0.07814	0.13383	0.46135	1203
MM023	<i>Cautires johannesi</i>	0.32668	0.07814	0.13383	0.46135	1203
MM024	<i>Cautires pauperulus</i>	0.32090	0.07794	0.15008	0.45108	1206
MM025	<i>Cautires johannesi</i>	0.32668	0.07814	0.13383	0.46135	1203
MM026	<i>Cautires pauperulus</i>	0.32090	0.07794	0.15008	0.45108	1206
MM027	<i>Cautires pauper</i>	0.29417	0.08000	0.16250	0.46333	1200
MM030	<i>Cautires yunnanus</i>	0.31483	0.07042	0.14085	0.47390	1207
MM031	<i>Cautires yunnanus</i>	0.31483	0.06959	0.14167	0.47390	1207
MM032	<i>Cautires yunnanus</i>	0.31483	0.07042	0.14085	0.47390	1207
MM033	<i>Cautires yunnanus</i>	0.31483	0.06959	0.14167	0.47390	1207
MM034	<i>Cautires</i> sp.	0.31095	0.07877	0.15837	0.45191	1206
MM035	<i>Cautires rianganus</i>	0.33810	0.05971	0.11690	0.48528	1205
MM036	<i>Cautires maninjauensis</i>	0.31421	0.06650	0.13466	0.48462	1203
MM037	<i>Cautires rianganus</i>	0.25000	0.25000	0.25000	0.25000	1234
MM038	<i>Cautires imitator</i>	0.33693	0.05809	0.12282	0.48216	1205
MM039	<i>Cautires pauper</i>	0.30175	0.06983	0.16126	0.46717	1204
MM040	<i>Cautires</i> sp.	0.31095	0.07794	0.15589	0.45522	1206
MM041	<i>Cautires pauperulus</i>	0.31675	0.07794	0.15340	0.45191	1206
MM042	<i>Cautires johannesi</i>	0.31505	0.07897	0.14214	0.46384	1203
MM043	<i>Cautires johannesi</i>	0.31505	0.07897	0.14214	0.46384	1203
MM044	<i>Cautires johannesi</i>	0.31671	0.07897	0.14048	0.46384	1203
MM045	<i>Cautires johannesi</i>	0.31505	0.07814	0.14214	0.46467	1203
MM046	<i>Cautires johannesi</i>	0.31505	0.07897	0.14214	0.46384	1203
MM047	<i>Cautires johannesi</i>	0.25000	0.25000	0.25000	0.25000	1234
MM048	<i>Cautires johannesi</i>	0.31671	0.07897	0.14048	0.46384	1203
MM049	<i>Cautires johannesi</i>	0.31505	0.07897	0.14214	0.46384	1203
MM050	<i>Cautires johannesi</i>	0.31505	0.07897	0.14214	0.46384	1203
MM051	<i>Cautires johannesi</i>	0.31505	0.07897	0.14214	0.46384	1203
MM052	<i>Cautires johannesi</i>	0.31505	0.07897	0.14214	0.46384	1203
MM053	<i>Cautires johannesi</i>	0.31505	0.07897	0.14214	0.46384	1203
MM054	<i>Cautires corporaali</i>	0.31338	0.08894	0.14630	0.45137	1203
MM055	<i>Cautires pauper</i>	0.29167	0.08083	0.16083	0.46667	1200
MM056	<i>Cautires pauper</i>	0.29250	0.08083	0.16000	0.46667	1200
MM057	<i>Cautires corporaali</i>	0.25000	0.25000	0.25000	0.25000	1234
MM058	<i>Cautires</i> sp.	0.31177	0.08209	0.15672	0.44942	1206
MM059	<i>Cautires tujuhensis</i>	0.34635	0.06561	0.11296	0.47508	1204
MM060	<i>Cautires</i> sp.	0.25000	0.25000	0.25000	0.25000	1234
MM061	<i>Cautires interruptus</i>	0.33110	0.06856	0.12876	0.47157	1196
Mean		0.31120	0.09501	0.15268	0.44111	1207.95

Tab. 7: Délky sekvencí a relativní zastoupení nukleotidů v sekvencích u fragmentu genu COI

Taxon	Druh	A	C	G	T	# sites
L06	<i>Cautires</i> sp.	0.36801	0.17035	0.13394	0.32770	1080
L14	<i>Cautires</i> sp.	0.33810	0.16125	0.12874	0.37191	1080
L05	<i>Metriorrhynchus lineatus</i>	0.34590	0.19116	0.13394	0.32900	1080
L23	<i>Microtrichalus</i> sp.	0.33680	0.19636	0.13914	0.32770	1080
208	<i>Leptotrichalus</i> sp.	0.34070	0.17685	0.13264	0.34980	1080
31	<i>Plateros</i> sp.	0.36541	0.18596	0.12874	0.31990	1080
L16	<i>Calochromus</i> sp.	0.34070	0.19116	0.13914	0.32900	1080
L17	<i>Lyponia nigrohumeralis</i>	0.34460	0.21326	0.14174	0.30039	1080
L02	<i>Libnetis</i> sp.	0.33550	0.18986	0.13134	0.34330	1080
570	<i>Dictyoptera elegans</i>	0.34590	0.17035	0.12614	0.35761	1080
A018	<i>Xylobanus</i> sp. (Taiwan)	0.35228	0.16775	0.11743	0.36253	1078
A021	<i>Cautires</i> sp. (Taiwan)	0.36499	0.16201	0.12011	0.35289	1079
A022	<i>Cautires</i> sp. (Madagaskar)	0.35661	0.19646	0.11918	0.32775	1079
A048	<i>Cautires</i> sp. (Malaysie)	0.37934	0.16244	0.11174	0.34648	1079
A080	<i>Cautires</i> sp. (Kamerun)	0.38977	0.16465	0.10791	0.33767	1080
A082	<i>Cautires</i> sp. (Kamerun)	0.35821	0.15205	0.12407	0.36567	1079
MD026	<i>Sulabanus</i> sp.	0.34600	0.15789	0.11209	0.38402	1079
MD060	<i>Sulabanus lineatus</i>	0.35088	0.17739	0.11793	0.35380	1079
MD097	<i>Microtrichalus</i> sp.	0.34795	0.16472	0.12573	0.36160	1079
MD101	<i>Broxylus malinensis</i>	0.34795	0.19981	0.12573	0.32651	1079
MD110	<i>Wakarumbia monacha</i>	0.37232	0.16472	0.12086	0.34211	1079
MM001	<i>Cautires yunnanus</i>	0.36515	0.17053	0.10936	0.35496	1079
MM002	<i>Cautires</i> sp.	0.36901	0.15587	0.11549	0.35962	1079
MM003	<i>Cautires yunnanus</i>	0.36515	0.16775	0.10936	0.35774	1079
MM004	<i>Cautires yunnanus</i>	0.36515	0.16960	0.10936	0.35589	1079
MM005	<i>Cautires</i> sp.	0.37164	0.17238	0.10936	0.34662	1079
MM006	<i>Cautires pauper</i>	0.37442	0.18906	0.12975	0.30677	1079
MM007	<i>Cautires indus</i>	0.37257	0.16497	0.10843	0.35403	1079
MM008	<i>Cautires yunnanus</i>	0.36515	0.16960	0.10936	0.35589	1079
MM009	<i>Cautires imitator</i>	0.38369	0.14365	0.10936	0.36330	1079
MM010	<i>Cautires yunnanus</i>	0.36515	0.16960	0.10936	0.35589	1079
MM011	<i>Cautires yunnanus</i>	0.36515	0.16960	0.10936	0.35589	1079
MM012	<i>Cautires</i> sp.	0.36178	0.16605	0.11039	0.36178	1078
MM013	<i>Cautires pauper</i>	0.38091	0.19555	0.12697	0.29657	1079
MM014	<i>Cautires pauperulus</i>	0.35774	0.19741	0.11770	0.32715	1079
MM015	<i>Cautires maninjauensis</i>	0.38184	0.16682	0.11863	0.33272	1079
MM016	<i>Cautires</i> sp.	0.35867	0.20019	0.11770	0.32345	1079
MM017	<i>Cautires pauper</i>	0.37998	0.19555	0.12697	0.29750	1079
MM018	<i>Cautires johannesi</i>	0.36793	0.16497	0.10936	0.35774	1079
MM019	<i>Cautires pauperulus</i>	0.35774	0.19648	0.11677	0.32901	1079
MM020	<i>Cautires johannesi</i>	0.36886	0.16497	0.10936	0.35681	1079

MM021	<i>Xylobanus</i> sp.	0.34569	0.17238	0.11677	0.36515	1079
MM022	<i>Cautires johannesi</i>	0.36886	0.16497	0.10936	0.35681	1079
MM023	<i>Cautires johannesi</i>	0.36886	0.16497	0.10936	0.35681	1079
MM024	<i>Cautires pauperulus</i>	0.35774	0.19741	0.11677	0.32808	1079
MM025	<i>Cautires johannesi</i>	0.36886	0.16497	0.10936	0.35681	1079
MM026	<i>Cautires pauperulus</i>	0.35867	0.19648	0.11677	0.32808	1079
MM027	<i>Cautires pauper</i>	0.38184	0.19833	0.12512	0.29472	1079
MM030	<i>Cautires yunnanus</i>	0.36515	0.16775	0.11029	0.35681	1079
MM031	<i>Cautires yunnanus</i>	0.36608	0.16960	0.10936	0.35496	1079
MM032	<i>Cautires yunnanus</i>	0.36608	0.16775	0.10936	0.35681	1079
MM033	<i>Cautires yunnanus</i>	0.36608	0.16960	0.10936	0.35496	1079
MM034	<i>Cautires</i> sp.	0.36330	0.19555	0.11307	0.32808	1079
MM035	<i>Cautires rianganus</i>	0.36052	0.17053	0.11307	0.35589	1079
MM036	<i>Cautires maninjauensis</i>	0.38091	0.16497	0.11770	0.33642	1079
MM037	<i>Cautires rianganus</i>	0.36052	0.17053	0.11307	0.35589	1079
MM038	<i>Cautires imitator</i>	0.38276	0.14921	0.10843	0.35959	1079
MM039	<i>Cautires pauper</i>	0.25000	0.25000	0.25000	0.25000	1080
MM040	<i>Cautires</i> sp.	0.36793	0.19184	0.11307	0.32715	1079
MM041	<i>Cautires pauperulus</i>	0.36052	0.19741	0.11399	0.32808	1079
MM042	<i>Cautires johannesi</i>	0.35959	0.16775	0.11770	0.35496	1079
MM043	<i>Cautires johannesi</i>	0.35959	0.16775	0.11770	0.35496	1079
MM044	<i>Cautires johannesi</i>	0.36237	0.16775	0.11585	0.35403	1079
MM045	<i>Cautires johannesi</i>	0.36237	0.16775	0.11585	0.35403	1079
MM046	<i>Cautires johannesi</i>	0.35959	0.16775	0.11770	0.35496	1079
MM047	<i>Cautires johannesi</i>	0.35959	0.16775	0.11770	0.35496	1079
MM048	<i>Cautires johannesi</i>	0.36237	0.16775	0.11585	0.35403	1079
MM049	<i>Cautires johannesi</i>	0.35959	0.16775	0.11770	0.35496	1079
MM050	<i>Cautires johannesi</i>	0.35959	0.16775	0.11770	0.35496	1079
MM051	<i>Cautires johannesi</i>	0.35959	0.16775	0.11770	0.35496	1079
MM052	<i>Cautires johannesi</i>	0.35959	0.16775	0.11770	0.35496	1079
MM053	<i>Cautires johannesi</i>	0.35959	0.16775	0.11770	0.35496	1079
MM054	<i>Cautires corporaali</i>	0.35959	0.17609	0.11770	0.34662	1079
MM055	<i>Cautires pauper</i>	0.38276	0.19370	0.12512	0.29842	1079
MM056	<i>Cautires pauper</i>	0.38276	0.19462	0.12512	0.29750	1079
MM057	<i>Cautires corporaali</i>	0.36145	0.17516	0.11677	0.34662	1079
MM058	<i>Cautires</i> sp.	0.36145	0.19926	0.11585	0.32345	1079
MM059	<i>Cautires tujuhensis</i>	0.36608	0.16126	0.11029	0.36237	1079
MM060	<i>Cautires</i> sp.	0.36456	0.19759	0.11410	0.32375	1078
MM061	<i>Cautires interruptus</i>	0.37720	0.18072	0.10473	0.33735	1079
Mean		0.36156	0.17653	0.11927	0.34263	1079.11

Tab. 8: Vzdálenost mezi jednotlivými vzorky studovaného druhu *Cautires johannesii*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1 MM018	-																	
2 MM020	0.00142	-																
3 MM022	0.00037	0.00088	-															
4 MM023	0.00037	0.00088	0.00000	-														
5 MM025	0.00037	0.00088	0.00000	0.00000	-													
6 MM042	0.04586	0.04426	0.04426	0.04426	0.04426	-												
7 MM043	0.04586	0.04426	0.04426	0.04426	0.04426	0.00000	-											
8 MM044	0.04354	0.04163	0.04163	0.04163	0.04163	0.00307	0.00307	-										
9 MM045	0.04490	0.04294	0.04294	0.04294	0.04294	0.00351	0.00351	0.00131	-									
10 MM046	0.04586	0.04426	0.04426	0.04426	0.04426	0.00000	0.00000	0.00307	0.00351	-								
11 MM047	0.04142	0.04127	0.04127	0.04127	0.04127	0.00000	0.00000	0.00413	0.00412	0.00000	-							
12 MM048	0.04354	0.04163	0.04163	0.04163	0.04163	0.00307	0.00307	0.00000	0.00131	0.00307	0.00413	-						
13 MM049	0.04586	0.04426	0.04426	0.04426	0.04426	0.00000	0.00000	0.00307	0.00351	0.00000	0.00000	0.00307	-					
14 MM050	0.04586	0.04426	0.04426	0.04426	0.04426	0.00000	0.00000	0.00307	0.00351	0.00000	0.00000	0.00307	0.00000	-				
15 MM051	0.04586	0.04426	0.04426	0.04426	0.04426	0.00000	0.00000	0.00307	0.00351	0.00000	0.00000	0.00307	0.00000	0.00000	-			
16 MM052	0.04586	0.04426	0.04426	0.04426	0.04426	0.00000	0.00000	0.00307	0.00351	0.00000	0.00000	0.00307	0.00000	0.00000	0.00000	-		
17 MM053	0.04586	0.04426	0.04426	0.04426	0.04426	0.00000	0.00000	0.00307	0.00351	0.00000	0.00000	0.00307	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-

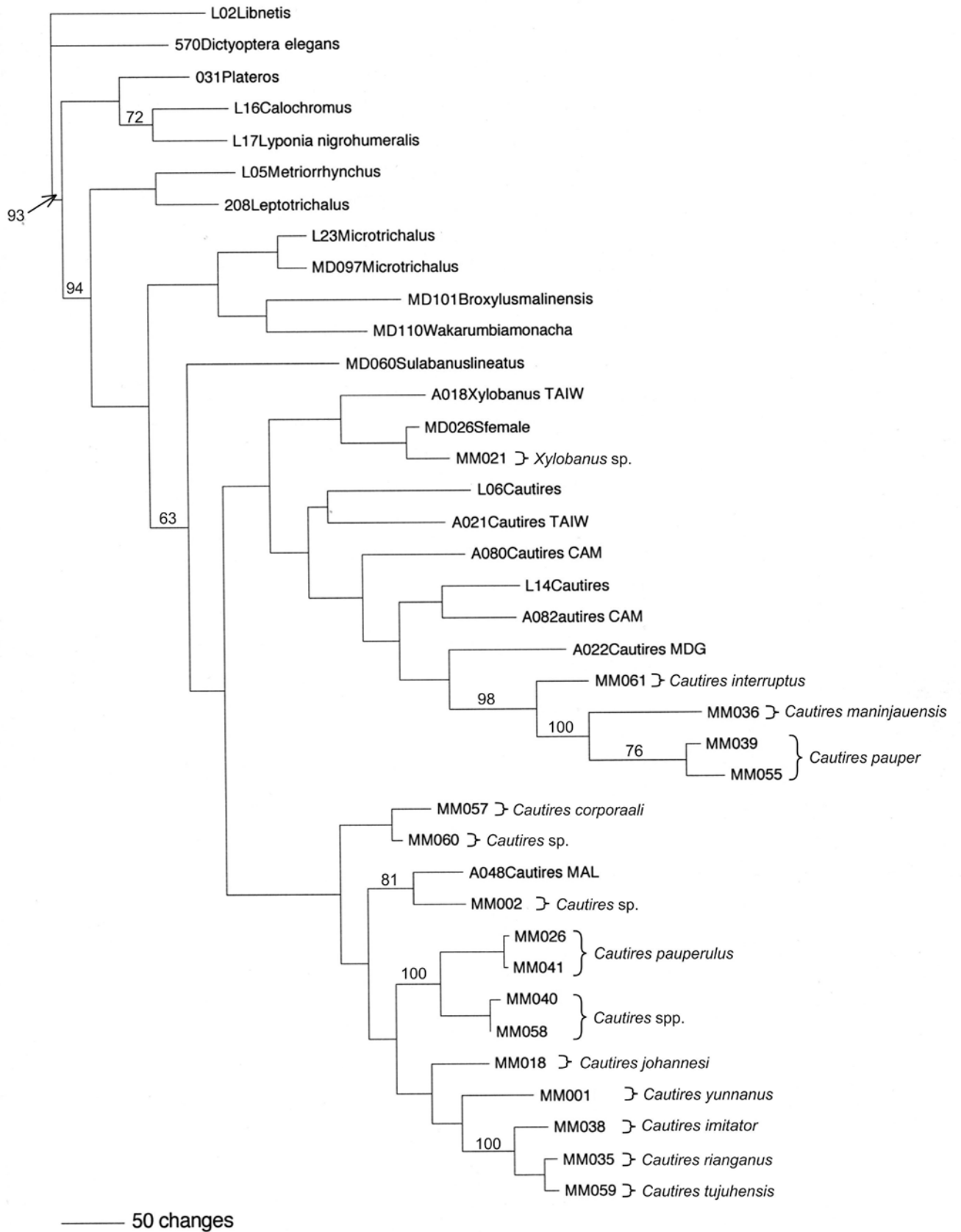
Tab. 9: Seznam popsanych druhů dříve klasifikovaných v rodu *Bulenides* Waterhouse, 1879

Bulenides Waterhouse 111. Typ. Spec. Col. 1, 1879, p. 34, Trans. Ent. Soc. Lond. 1878,1, p. 100 (gen. 21) - Kleine Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926. p. Type species: *Bulenides obsoletus* C. O. Waterhouse

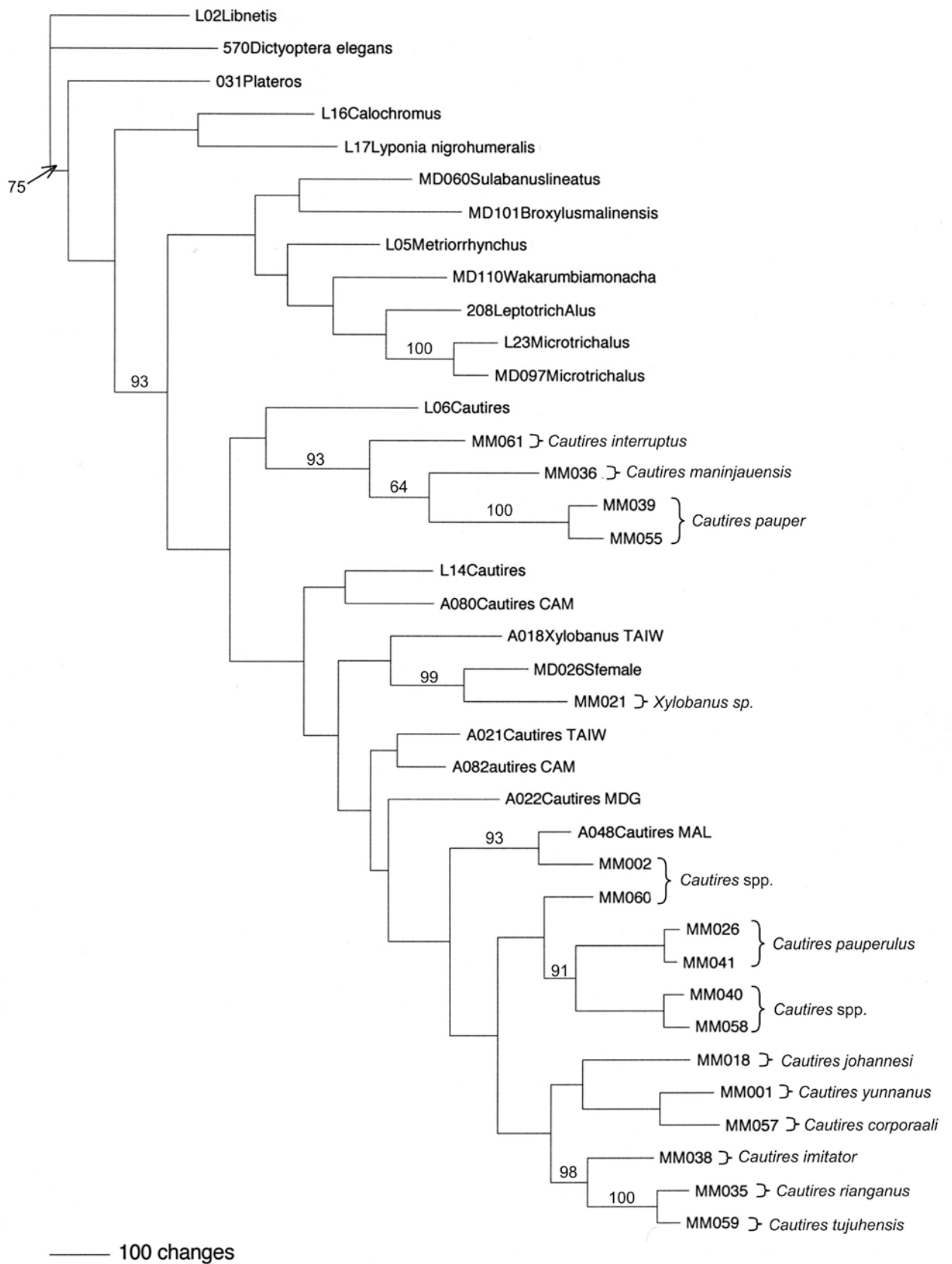
<i>adumbrates</i> Kleine, 1926	Philipp. Journ. Sc. XXXI, Nr. 1, 1926, p. 85, t. 3, f. 34, 35; Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 146, f. 1, 5, 6, 20, 35, 44, 45, 53, 54.	Philippines
<i>adventicius</i> Kleine, 1926	Philipp. Journ. XXXI, Nr. 1, 1926, p. 84, t. 3, f. 36; Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 148, f. 2, 5, 6, 24, 34, 39, 51.	Philippines
<i>arens</i> Kleine, 1926	Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 146, f. 16, 48.	Sarawak
<i>argillosus</i> Kleine, 1926	Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 152, f. 3, 15, 24, 38.	Sarawak
<i>aridus</i> Kleine, 1926	Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 152, f. 3, 10, 21, 36, 48.	Penang
<i>ater</i> Pic, 1921	Echange Nr. 405, 1921. hors texte, p. 8. -Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 142, f. 2, 14, 22, 49.	Sumatra
<i>aterrismus</i> Kleine, 1926	Philipp. Journ. XXXI, Nr. 1, 1926, p. 83, t. 3, f. 32, 33; Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 142. f. 2, 4, 21, 49.	Philippines
<i>atropunctatus</i> Pic, 1925	Bull. Soc. Ent. Fr. 1925, p. 36.	Palawan
<i>basalis</i> Pic, 1925	Echange Nr. 419, 1925, p. 7.	Sumatra
<i>basilanus</i> Pie, 1925	Mel. 35, 1925, p. 1.	Philippines
<i>bicoloratus</i> Kleine, 1930	Treubia XI, Nr. 3, 1930, p. 351, f. 7.	Sumatra
<i>coccineus</i> Kleine, 1930	Treubia XI, Nr. 3, 1930, p. 350 f. 3, 4.	Malakka
<i>cognatus</i> Bourgeois, 1883	Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. Genova XVIII, 1883, p. 637. -Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 145, f. 3, 5, 24, 32, 46,	Java, Borneo
<i>corporaali</i> Pic, 1921	Echange Nr. 405, 1921, hors texte, p. 8 - Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 148, f. 3, 8, 23, 31, 40, 41.	Sumatra
<i>apicalis</i> Pic, 1925	Echange Nr. 420 1925 p. 9.	Java, Sumatra
<i>discolor</i> Kleine, 1925	Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 149, f. 3, 18, 30, 40.	Nagasiraba
<i>dubius</i> C. O. Waterhouse, 1878	111. Typ. Spec. Col. I, 1879 35, t. 9, f. 5, 5a. -Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 152, f 13, 53.	Borneo
<i>duplicatus</i> Kleine, 1928	Stett. Ent. Zeit. LXXIX, 1928, p. 230, t. 2, f. 12, 14.	Borneo
<i>flavoreticulatus</i> Kleine, 1932	Journ. Fed. Malay Stat. Mus. XVII, Nr. 1, 1932, p. 155, f. 25-27.	Kina Balu
<i>imitator</i> Kleine, 1930	Stett. Ent. Zeit. XCI. 1930, p. 95, f. 7-10.	Perak
<i>inapicalis</i> Pic, 1929	Echange Nr. 437. 1929. p. 71.	Conchin
<i>indus</i> Kirsch, 1875	Mirth. Zool. Mus. Dresden I, 1875, p. 36 (<i>Caenia</i>). - Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 143, f. 2, 4, 19, 26, 48; Kleine, Journ. Fed. Malay Stat. Mus. XIII, Nr. 2/3, 1926, p. 186 - Kleine, Steit. Ent. Zeit. LXXXIX, 1928, p. 321. - Bourgeois, Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. Genova XVIII, 1883, p. 637. <i>brevelineatus</i> Pic, 1925. Echange Nr. 419, 1925, p. 7. <i>vicinus</i> Pic, 1925 Echange Nr. 420. 1925, p. 10. Malakka,	Borneo, Sumatra, Java
<i>inhumeralis</i> Pic, 1925	Echange Nr. 419, 1925, p. 7.	Bogor
<i>javanicus</i> Bourgeois, 1883	Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. Genova XVIII, 1883, p. 639. - Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 151, f. 8, 23, 52.	Java
<i>lineatus</i> Pic, 1921	Echange Nr. 405, 1921, p. 8.	Java
<i>longeareolatus</i> Kleine, 1936	Arb. Morph. Tax. Ent, 1936, 3: 132	Java
<i>longissimus</i> Pic, 1921	Echange Nr. 405, 1921, p. 8.	Sumatra
<i>lyciformis</i> Kleine, 1932	Journ. Fed. Malay Stat. Mus. XVII, Nr. 1, 1932, p. 54, f. 22-24.	Kina Balu
<i>malayensis</i> Kleine, 1930	Treubia XI. Nr. 3. 1930, p. 349, f. 1, 2.	Malakka
<i>nebulosus</i> Kleine, 1930	Treubia XI. Nr. 3. 1930, p. 350, f. 5, 6.	Penang

<i>nigricolor</i> Pic, 1925	Echange Nr. 419, 1925, p. 7.	Sumatra
<i>nigromaculatus</i> Pic, 1925	Echange Nr. 419, p. 7.	Java
<i>obsoletus</i> C. O. Waterhouse, 1878	Trans. Ent. Soc. Lond., 1878, p. 100,109; C. O. Waterhouse, 111. Typ. Spec. Col. 1, 1879, p. 34, t. 9, f. 1. -Bourgeois, Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. Genova XVIII, 1883, p. 636. - Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p 145, f. 2, 14. 48.	Sumatra, Borneo, Java
<i>papuanus</i> Kleine, 1935	Nova Guinea, 1935, 17: 311	New Guinea
<i>parvulus</i> Kleine, 1926	Philipp. Journ. XXXI, Nr. 1, 1926, . p. 84, t. 3, f. 37, 38; Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 150, f. 4, 39.	Philippines
<i>pauper</i> C. O. Waterhouse, 1878	111. Typ. Spec. Col. 1,1879p. 35, t. 9, f. 2, 2 a. -Bourgeois, Ann. Soc. Ent. Fr. LXXV, 1906, p. 186. -Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 147, f. 2, 7, 12, 22, 27, 42, 43:1. c. p. 280; Kleine, Journ. Fed. Malay Stat. Mus. XIII, Nr. 2-3, 1926, p. 185.	Malakka, Sumatra
<i>pauperulus</i> Bourgeois, 1883	Ann. Mus. Civ. Stor. Nat. Genova XVIII, 1883, p. 638. -Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 144, f. 3, 11, 25, 37, 48; 1. c. p. 280; Kleine, Journ. Fed. Malay Stat. Mus. XIII, Nr. 2-3, 1926, p. 185. - Blair, 1. c. VI, Nr. 3, 1928, p. 180. <i>Atricolis</i> Pic, 1921 Echange Nr. 405, 1921, hors texte p. 8. <i>Notaticollis</i> Pic, 1921 Echange Nr. 405, 1921, hors texte p. 8. <i>me danensis</i> Pic, 1921 Echange Nr. 419, 1925, p. 7.	Sunda-Inseln, Malakka
<i>philippinensis</i> Kleine, 1930	Treubia. XI, Nr. 3, 1930, p. 351, f. 9-11.	Philippines.
<i>pudicus</i> Kleine, 1931	Treubia XIII, Nr. 2, 1931. p. 257. f. 8.	Java
<i>purpureus</i> Pic, 1922	Ann. Soc. Linn. Lyon LXIX, 1922, p. 74. -Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 153. f. 55, 56; Kleine, Stett. Ent. Zeit. LXXXVII, 1926, p. 102: Kleine, Indien For. Rec. XIII, Nr. 6, 1929, p. 227.	Birma, Formosa.
<i>regalis</i> Kleine, 1929	Ind. Indien For. Rec. XIII, Nr. 6, 1929, p. 227, t. 1, f. 8, 9.	Indien
<i>reticulates</i> Kleine, 1930	Treubia XI, Nr. 3, 1930, p. 352, f. 12-15	Phillipines
<i>rianganus</i> Pic, 1925	ireuoid.AJ, ssi. J, lyju, p. JJZ, I. IZ-IV. Echange Nr. 419, 1925, p. 7.	Sumatra
<i>sijthoffi</i> Kleine, 1926	Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 149. f. 3. 9, 23. 28, 38; Kleine, Indien For. Rec. XIII Nr. 6, 1929, p. 227.	Java, Andamanen
<i>singularithorax</i> Pic, 1925	Echange Nr. 419. 1925, p. 7.	Java
<i>socius</i> Kleine, 1935	Nova Guinea 17:311	New Guinea
<i>testaceus</i> Pic, 1921	Echange Nr. 405, 1921. p. 8 -Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 153. f. 3, 17. 24, 29, 50: Kleine, Indien For. Rec. XIII, Nr. 6, 1929, p. 227.	Laos. Laos, Penang, Birma. Indien
<i>triangularis</i> Kleine, 1930	Treubia XL Nr. 3, 1930, p. 351, f. 8.	Sarawak
<i>turbidus</i> C. O. Waterhouse, 1878	111. Typ. Spec. Col. I, 1879, p. 35, t. 9, f. 4. - Kleine, Ent. Mitt. XV, Nr. 2, 1926, p. 146. f. 3. 11, 24, 33. 45. - Blair, 1. c. p. 180.	Sumatra

Obr. 6: Fylogram s doplněnými bootstrapovými podporami 1. parciální analýzy rDNA, tRNA, vytvořený metodou maximální parsimonie



Obr. 7: Fylogram s doplněnými bootstrapovými podporami 2. parciální analýzy cds mtDNA, vytvořený metodou maximální parsimonie



Obr. 8: Fylogram s doplněnými bootstrapovými podporami 3. parciální analýzy mtDNA, vytvořený metodou maximální parsimonie

