

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Metody algoritmické delimitace druhů na základě  
mitochondriálních DNA sekvencí (Coleoptera:  
Lycidae)**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Jakub Riemel</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. Ing. Ladislav Bocak, Ph.D.</b>
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

.....

Jakub Riemel

## **Poděkování**

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu bakalářské práce prof. Ing. Ladislavu Bocakovi, Ph.D. za odborné konzultace a věnovaný čas v průběhu vypracování této bakalářské práce. Další velký dík patří všem v laboratoři molekulární systematiky, kteří mi vždy rádi pomohli s řešenou problematikou a mnohokrát přispěli užitečnou praktickou nebo odbornou radou.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jakub Riemel
Název práce	Metody algoritmické delimitace druhů na základě mitochondriálních DNA sekvencí (Coleoptera: Lycidae)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra zoologie a ornitologická laboratoř Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	prof. Ing. Ladislav Bocak, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Teoretická část této práce se zaměřuje na seznámení se s fenoménem mimikry. Jsou zde uvedeny základní charakteristiky této interakce včetně nejběžnějších typů mimikry. Dále jsou rozvedeny hypotézy zabývající se příčinou vzniku nedokonalé mimikry jako nejlepší adaptace v určitém prostředí. Závěrečná pasáž teoretické části je věnována odpovědi predátorů na vzájemnou podobnost organismů, modelové skupině této práce (Coleoptera: Lycidae) a mimetické antipredační ochraně u této čeledi. Praktická část se zabývá studiem mimikry u vybraného rodu *Cladophorus* čeledi Lycidae. Je zde využita fylogenetická analýza založená na mitochondriálním markeru *cox1*. Metodou maximum likelihood byl následně vytvořen fylogenetický strom tohoto rodu. Vyskytující se aposematické vzory u rodu *Cladophorus* jsou diskutovány na základě vzájemné příbuznosti a druhové diverzity v oblastech výskytu. Pro důkladnější prozkoumání vyskytujících se mimetických vzorů je nutné studovat všechny interagující skupiny podílející se na vývoji mimikry v daných geografických oblastech.

Klíčová slova	<i>cox1</i> , mimikry, aposematické vzory
Počet stran	46
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jakub Riemel
Title	The methods of mtDNA-based species delimitation in net-winged beetles (Coleoptera: Lycidae)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of zoology, Palacký University Olomouc
Supervisor	prof. Ing. Ladislav Bocak, Ph.D.
The year of presentation	2019

### Abstract

Theoretical part of this thesis focuses on mimicry phenomenon. Basic characteristics of this interaction are presented, including the most common types of mimicry. Furthermore, hypotheses reviewing the cause of imperfect mimicry as the best adaptation in a certain environment are discussed. The final part of the theoretical part deals with the predator's response to the similarity of organisms, the model group of this study (Coleoptera: Lycidae) and the mimetic antipredation strategy in this family. The practical part is focused on mimicry in selected Lycid genus *Cladophorus*. Phylogenetic hypothesis inferred in the study is based on mitochondrial marker *cox1*. Subsequently, the phylogenetic tree of this genus was created by the maximum likelihood method. Occurring aposematic patterns in the genus *Cladophorus* are discussed on the basis of mutual relation between species and species diversity in the areas of occurrence. In order to explore more closely the present protective coloration, it is necessary to study all interacting groups involved in the development of mimicry in the given geographical areas.

Keywords	<i>cox1</i> , mimicry, aposematic patterns
Number of pages	46
Number of appendices	0
Language	Czech

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>11</b>
2.1 Základní typy mimikry.....	11
2.2 Nedokonalé mimikry .....	13
2.2.1 Hypotéza pozorovatele.....	13
2.2.2 Hypotéza vývojových a genetických omezení.....	14
2.2.3 Hypotéza vzdalování (chase-away - model) .....	14
2.2.4 Hypotéza uvolněné selekce (Relaxed selection hypothesis).....	15
2.2.5 Hypotéza mimetického zhroucení.....	16
2.2.6 Hypotéza percepce .....	17
2.2.7 Hypotéza satirické mimikry .....	17
2.2.8 Hypotéza více modelů.....	17
2.2.9 Hypotéza více predátorů .....	18
2.2.10 Hypotéza selekce blízce příbuzných.....	18
2.2.11 Hypotéza posunu znaků .....	18
2.3 Predátoři .....	19
2.4 Modelová skupina - čeleď Lycidae.....	21
2.4.1 Mimikry a Lycidae.....	22
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>24</b>
3.1 Materiál .....	24
3.1.1 Biologický materiál.....	24
3.1.2 Použité chemikálie .....	24
3.1.3 Použité soupravy .....	24
3.1.4 Použité roztoky a jejich příprava .....	24
3.1.5 Použité přístroje a zařízení.....	25
3.2 Metody .....	25
3.2.1 Izolace DNA .....	25
3.2.2 PCR amplifikace DNA.....	26
3.2.3 Separace PCR produktu pomocí agarosové elektroforézy.....	28
3.2.4 Purifikace PCR produktů .....	29
3.2.5 Sekvenační reakce.....	29
3.2.6 Purifikace sekvenačního produktu .....	30
3.2.7 Příprava vzorků pro sekvenaci.....	30
3.2.8 Zpracování sekvenačních dat a fylogenetické analýzy.....	31
3.2.9 Pozorování detailů a mimetických vzorů.....	32
<b>4 VÝSLEDKY</b> .....	<b>33</b>

4.1 Datový soubor .....	33
4.2 Sestavení alignmentu a jeho konkatenace.....	33
4.3 Fylogeneze linií rodu <i>Cladophorus</i> .....	33
4.4 Barevné vzory .....	34
<b>5 DISKUZE.....</b>	<b>36</b>
5.1 Pozorované fenotypové projevy .....	37
5.2 Mimetické vzory u druhu <i>Cladophorus manokwarensis</i> .....	38
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>40</b>
<b>7 LITERATURA .....</b>	<b>42</b>

## CÍLE PRÁCE

V současné literatuře věnující se mimikry je poměrně málo používán fylogenetický přístup. Zde analyzuji příbuzenské vztahy uvnitř jednoho rodu čeledi Lycidae za účelem studia mimikry.

První otázkou je, zda fenotypická podobnost je výsledkem evoluce mimikry nebo jestli hraje roli i příbuznost. Potom by byla podobnost založena na jiných procesech, jako je morfologická stasis a nikoliv na purifikující selekci ze strany predátorů. Další otázkou je, zda sesterské druhy mají stejný mimetický vzor nebo se pravidelně ve vzorech liší. Odlišnost vzorů sesterských druhů je potenciálním důkazem role mimetických vzorů v procesu speciace. Ačkoliv studovaný materiál je omezený, další otázkou je, zda výraznější mimetické vzory jsou plesiomorfni nebo jestli se vyvinuly se zpožděním pouze v terminálních liniích. Jejich přítomnost v terminálních liniích by indikovala postupnou selekci mimetických vzorů od méně výrazných k velmi nápadným a tím by řešila jeden z paradoxů teorie mimikry, kterým jsou vysoké náklady v první fázi evoluce, kdy predátor snadno najde kořist a s vyšší četností ji napadá, protože nezná význam daného aposematického signálu.



# 1 ÚVOD

Tato práce se zabývá fylogenezí a na základě molekulární příbuznosti bude hodnocena evoluce mimetických vzorů. Proto na úvod je nutné popsat typy mimetických interakcí, modelovou skupinu a dřívější hypotézy o evoluci mimikry.

Termín mimikry označuje v evoluční biologii blízkou podobnost dvou a více organismů, které nejsou fylogeneticky blízce příbuzné a alespoň někteří jsou chráněni přítomností obraných látek (jedů nebo repelentů). Podstatou je přítomnost predátora, který vyvíjí selekční tlak na potenciální kořist, aby sdílela podobné fenotypické znaky. Vzájemná podobnost několika organismů poskytuje ochranu před predátory v přírodě, v podstatě se jedná o sdílení nákladů na informování predátora o tom, že potenciální kořist je chráněna. Mezi typické selekční faktory se řadí predátoři, vztah hostitele a parazita, který můžeme označit jako mimikry na molekulární úrovni (Mallet a Joron, 1999).

Mimikry se evolučně vyvíjejí v odpovědi na schopnost příjemce (např. predátora) rozeznat napodobitele od napodobovaného organismu (Batesiánské mimikry). Alternativně, jsou všichni jedinci chráněni a sdílejí signál přijímaný potenciálním predátorem (Muelleriánské mimikry). Daná změna fenotypických znaků proběhne tak, aby napodobiteli vždy poskytla selekční výhodu spočívající v odvrácení útoku predátora (Müller, 1879; Sherratt, 2008).

Mimikry mohou být také definovány jako identický signál (např. vnější fenotypická podobnost nebo produkovaná substance – feromonová nebo molekulární úroveň mimikry). Podstatou je, že signál je emitován dvěma rozdílnými, nepříbuznými organismy a signál má alespoň jednoho společného příjemce. Percepce tohoto signálu příjemcem ústí v obou případech ve stejnou odpověď, to je vzdání se útoku, jelikož je výhodné daným způsobem reagovat na podnět a vyhnout se nepříjemným důsledkům útoku (Endler, 1981; Malcolm, 1990; Mallet a Joron, 1999; Ruxton *et al.*, 2004; Grim, 2013).

V některých situacích je těžké od sebe odlišit, zda se u daného organismu jedná o mimikry nebo kamufláž. Například bylo pozorováno, že stejně zbarvení může být jedním predátorem vnímáno jako kamufláž a druhým jako aposematický signál (Fabricant a Herberstein, 2015). Tento rozdíl se dá dobře stanovit, je-li znám příjemce signálu společného pro oba organismy. Známe-li příjemce, je dále nutné pochopit, jaké behaviorální změny u něj způsobí přijímaný signál. Můžeme tedy říci, že pokud se jedná o mimikry, má vysílaný signál signifikantní význam pro příjemce i jeho odesílatele. Cílem takového signálu je rozpoznání příjemcem a vyvolání patričné odpovědi. Na rozdíl

od mimikry, efekt maskování neboli kamufláže, je vyhnutí se kontaktu s příjemcem, kterým je predátor. Kamufláž bývá obvykle omezena na napodobování okolního prostředí. O přítomnosti mimikry nemůžeme hovořit, nastane-li situace, kdy se jeden organismus přizpůsobí způsobu života druhého organismu, aniž by u nich existoval nějaký typ společného signálu a jeho příjemce.

Ve většině případů z vysoké míry podobnosti těžší napodobitel (Batesiánské mimikry), který kopíruje vnější vzhled druhého, vždy efektivně chráněného organismu. Mimetické vztahy nalezneme u organismů řadících se do stejné třídy, řádu dokonce i čeledi nebo druhu (Mallet a Joron, 1999). Existují však četné případy, kdy rostliny napodobují živočichy a naopak.

Fenomén mimikry není omezen pouze na napodobování vzhledu. Existují případy, kdy dochází k napodobování zvuku, chování, pachových stop, které dokáží odpudit nebo oklamat makrosmatické predátory či snaha o kopírování biochemických drah. Cílem prakticky všech mimetických vztahů je oklamání příjemce, kterým v ekologických interakcích může být například predátor, kořist napodobována mimetickým dravcem a někdy i jedno z pohlaví stejného druhu. U modelového organismu, který je negativně ovlivněn svým napodobitelem, může dojít ke změnám vnějšího vzhledu, produkce odlišných látek aj. v důsledku evolučního vývoje. Tyto nové vlastnosti mu následně umožní snížit nežádoucí dopad přítomnosti napodobitele na jeho populaci. Tato selekční výhoda bude trvat do doby než se na tyto změny napodobitel adaptuje. Mimetické interakce jsou tedy velmi komplikované a dynamické.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Základní typy mimikry

Henry Walter Bates v roce 1862 na základě pozorování amazonských motýlů navrhl hypotézu, že druhy, které jsou obvyklou kořistí predátorů se mohou chránit tak, že vzhledově připomínají nejedlé nebo jedovaté druhy. Svou hypotézu vyvodil konkrétně z pozorování dvou rodů motýlů. Rod *Heliconius*, který disponuje nápadnými barvami a nepříjemnou chutí je odmítán ptáky jako potrava, na druhou stranu některé rody z čeledi Pieridae obdobné vlastnosti nevykazují a jsou ptáky jako potrava přijímány. Později byl tento jev pojmenován jako Batesiánské mimikry. H. W. Bates si také během svých pozorování povšiml, že dochází ke kopírování vzezření jednoho nechutného druhu jiným, stejně odpudivým. Své zjištění interpretoval pouze jako „adaptaci na lokální přírodní podmínky“, která není spojena s predací (Mallet a Joron, 1999; Sherratt, 2008). Později tento jev popsal J. F. Müller (1878).

V posledních dekáдах s vysvětlením procesů spojených s Batesiánskou mimikry pomohly především matematické modely (Huheey, 1964; Emlen, 1968; Estabrook a Jespersen, 1974; Luedeman *et al.* 1981; Huheey, 1988). Problémem těchto modelů je ale to, že byly spíše většinou zaměřeny na aspekt stability vztahu napodobitele a napodobovaného organismu než na evoluční vývoj podobnosti mezi nimi. Za tuto skutečnost je nejspíše zodpovědná zdánlivá jednoduchost vývojového procesu tohoto typu mimikry. Dalším důvodem je také existence všeobecného názoru, který tvrdí, že na napodobitele je vyvíjen silný selekční tlak, který vede k tomu, že se mimici snaží co nejvěrohodněji připomínat své modely (Sherratt 2002).

V roce 1878 německý přírodovědec Johannes Friedrich Müller přišel s evolučním vysvětlením pro velmi blízkou podobnost mezi dvěma či více nebezpečnými nebo nejedlémi organismy. Dnes tento jev známe pod pojmem Mülleriánské mimikry. Müller i jeho současníci uplatňovali na tuto problematiku pohled raných darwinistů. Tento fenomén dle J. F. Müllera spočívá v tom, že se u dvou nebezpečných druhů v průběhu evoluce vyvinul podobný vzhled z důvodu, aby se jejich společní predátoři rychleji naučili rozeznávat jednotný signál obou organismů a tím byly sdíleny náklady na jejich informování. Predátoři se po určité době začnou těmto druhům vyhýbat a jejich mortalita se tak sníží. Výhoda, kterou tento typ mimikry přináší je ve zvýšení celkového počtu jedinců se stejnou vlastností a tím pokles pravděpodobnosti napadení jednotlivce. Svou hypotézu podpořil matematickým modelem, ve kterém predátoři útočí na fixní počet

jedinců (n) obou nebezpečných nebo nejedlých druhů v určitém časovém období, než se naučí tyto druhy odmítat jako běžnou kořist (Mallet a Joron, 1999; Sherratt 2008). Jedná se o první matematický model popsany v evoluční biologii.

Problémem raných darwinistů bylo to, že ještě plně neporozuměli stavům, ve kterých se krátkodobé individuální benefity mohou dostat do konfliktu s dlouhodobými populačními výhodami. Zaměříme-li se na selektivní evoluční vývoj mimikry, zjistíme, že se zde nachází několik vrcholů stability, které mohou nakonec bránit úplnému rozšíření výhodné vlastnosti. Z tohoto důvodu je nutné se zabývat evoluční dynamikou mimikry (Mallet a Joron, 1999).

Starší literatura odkazuje na to, že Mülleriánské mimikry jsou především doménou neotropických motýlů *Heliconius* (podčeď Heliconiinae čeledi Nymphaliidae, babočkovití), u nichž jsou přítomny charakteristické defenzivní vlastnosti. I když přítomnost Mülleriánské mimikry u těchto motýlů se dnes řadí k učebnicovým příkladům, tak se neomezuje pouze na ně (Turner, 1981; Sheppard *et al.*, 1985; Brower, 1996). Další zdokumentované příklady nalezneme u mūr rodu *Zygaenidae* (Sbordini *et al.*, 1979; Niehuis *et al.*, 2007), rodu *Bombus* (Plowright a Owen, 1980; Williams, 2007), řádu Heteroptera (Zrzavy a Nedved, 1999) a dále například u amazonských šípových žab (Symula *et al.*, 2001; Chiari *et al.*, 2004). Mülleriánské mimikry se však neobjevují pouze v živočišné říši. U rostlin najdeme také případy velmi podobného fenotypu napříč různými druhy, tedy jakousi „formu Mülleriánské mimikry“ (Chittka, 1997; Roy a Widmer, 1999; Benitez-Vieyra *et al.*, 2007).

S pojmem Mülleriánské mimikry je často spojována podobnost mezi dvěma druhy. Avšak je důležité zmínit fakt, že tento jev běžně zahrnuje širší okruh podobných druhů, který je v anglické literatuře označován jako „mimicry rings“ (Mallet a Gilbert, 1995). Vhodnou demonstrací větší skupiny podobně vyhlížejících druhů jsou komplexy brouků čeledi Lycidae sdílející odpudivou chuť (Linsley *et al.*, 1961; Eisner *et al.*, 2008). Jak dokládají četné příklady, Mülleriánské mimikry nejsou v přírodě neobvyklé a ukazují nám jedny z nejpozoruhodnějších typů adaptivní podobnosti, zahrnující mimikry rodu Carabidae a řádu Hymenoptera (Schultz, 2001) a také mimikry řádů Lepidoptera a Hymenoptera (Weller *et al.*, 2000).

Kořist, na kterou se predátorům nevyplatí útočit často sdílí téměř nerozeznatelné výrazné zbarvení a vzory (Beatty *et al.*, 2004). Toto výstražné zbarvení je stejně jako v případě Batesiánské mimikry podmíněno několika malými vzory-regulujícími lokusy s

majoritním efektem. Mnoho z těchto lokusů tvoří epistatické elementy, které jsou uspořádány těsně za sebou (Mallet a Joron, 1999).

Uvažuje se, že mezidruhové Mülleriánské mimikry vznikají následkem purifikující selekce vedoucí k manifestaci společného fenotypu. Získaný společný fenotyp umožní těmto druhům „ušetřit energii“ vynaloženou na to, aby se je predátor naučil rozpoznávat jako nevhodný zdroj potravy (Mallet a Joron, 1999).

## **2.2 Nedokonalé mimikry**

Pojmem mimikry označujeme, když se u jednoho druhu (napodobitele – Batesiánské mimikry nebo komimika – Mülleriánské mimikry) vyvine jistá fenotypová podobnost s jiným druhem (modelem, napodobovaným organismem). Napodobiteli (nebo komimikovi) tato nabytá vlastnost poskytuje selekční výhodu. Tento model je hojně využíván jako demonstrace síly přírodní selekce vytvářet četné adaptace. Nicméně mnoho domnělých napodobitelů nekopíruje modelový organismus dokonale a předpokládáme, že i predátor je schopen registrovat rozdíl a zvýšit četnost útoků v případě, kdy si není jistý, jestli je jedinec chráněný (Kikuchi a Pfennig, 2013).

V případě Batesiánské mimikry nalezneme velké množství případů, kdy podobnost mezi modelem a jeho mimikem je od ideálu poměrně vzdálená. Doposud bylo pro charakterizaci tohoto jevu navrženo jen malé množství kvantitativních modelů. Ve vědecké komunitě převládalo totiž přesvědčení, že vývoj Batesiánské mimikry s přesnou podobností druhů nastane, jestliže se fenotyp napodobitele začne vyvíjet vyšší rychlostí než fenotyp jeho modelového organismu (Fisher, 1930), což je požadavek, který bude téměř jistě splněn (Nur, 1970; Holmgren a Enquist, 1999). Tento názor je ale v rozporu s faktem, že se v přírodě nacházejí druhy vykazující potencionální Batesiánské mimikry s nepříliš vysokou mírou vzájemné podobnosti. Zmíněný typ podobnosti nalezneme u pestřenek mimikujících včely a vosy (Dittrich *et al.*, 1993; Edmunds, 2000). Do této kategorie spadají i někteří nejedovatí neotropičtí hadi napodobující prudce jedovaté korálovce (Savage a Slowinski, 1992). Existuje několik hypotéz snažících se objasnit nedokonalé mimikry (Kikuchi a Pfennig, 2013).

### **2.2.1 Hypotéza pozorovatele**

Tato hypotéza tvrdí, že některé nedokonalé mimikry ve skutečnosti nedokonalými mimikry vůbec nejsou. To je způsobeno tím, že lidské oko je schopno detekce

nedokonalostí, které přirozený příjemce signálu (predátor) není schopen rozeznat. Proto nedokonalé mimikry nepředstavují „výzvu“ pro přírodní selekci, jelikož tyto nedokonalosti jsou irelevantní pro zamýšlené příjemce signálu. Jedná se tedy o projevy fenotypu, které zaznamená pouze člověk nikoli ekologicky relevantní příjemce (Cuthill a Bennett, 1993; Dittrich *et al.*, 1993).

### **2.2.2 Hypotéza vývojových a genetických omezení**

Podle této hypotézy jsou nedokonalé mimikry způsobeny omezenou produkcí signálu, která alespoň dočasně zabraňuje selekci vedoucí k vývoji lepší mimikry. Nedokonalé mimikry tedy nejsou dle této teorie artefaktem lidského vnímání, ale reálně jsou takto vnímány i relevantním predátorem. Například populace nepřesných napodobitelů může postrádat genetickou variabilitu k vytvoření mnohem přesnější kopie fenotypu modelového organismu (v případě Batesiánské mimikry) nebo komimikry (v případě mimikry Mülleriánské). Je nutno zmínit, že většina studií předpokládá, že omezení mohou být pravděpodobně překonána po dostatečně dlouhé době a za přítomnosti silné selekce. Právě z tohoto důvodu genetická a vývojová omezení nenabízejí univerzální vysvětlení pro nedokonalé napodobování (Maynard Smith *et al.*, 1985).

### **2.2.3 Hypotéza vzdalování („chase-away“ model)**

Tato hypotéza podobně jako hypotéza vývojových a genetických omezení předpokládá, že nedokonalé Batesiánské mimikry odrážejí alespoň dočasnou neschopnost odpovědi na selekci vedoucí k vývoji dokonalé mimikry. Napodobitelé disponující nedokonalými Batesiánskými mimikry se mohou vyvíjet a stát se tak lepšími mimiky. Modelové organismy, které napodobují, však také podléhají selekci, zodpovědné za vývoj nového fenotypu. Tento fenotyp jim umožní se odlišit od svých napodobitelů a vyhnout se tak negativnímu ovlivnění fitness vlastní populace, jehož příčinou je existence „parazitického“ mimika. Výsledkem je, že napodobitel zaostává v evoluci fenotypu za svým modelovým organismem. To je dáno tím, že se nový fenotyp u napodobovaného organismu vyvine v momentě, kdy je mezi ním a napodobitelem již velmi malý vzhledový rozdíl. Jedná se tedy o jakýsi „závod ve zbrojení“ mezi mimikem a jeho modelem, ve kterém modelový organismus vítězí (alespoň dočasně). V takovýchto situacích je přítomnost nedokonalé mimikry následkem časových prodlev, ve kterých

napodobitel přizpůsobuje svůj vzhled novému fenotypu modelového organismu (McGuire *et al.*, 2006; Franks *et al.*, 2009).

Purifikující selekce, která je uplatňována na populaci mimika, je obvykle silnější než selekce v případě populace modelového organismu. Důvodem pro tak silnou selekci je, aby se napodobitel co nejvěrohodněji podobal svému modelu. Tato podobnost mu poté zajistí selekční výhodu (Ruxton *et al.*, 2004). Na druhou stranu vzácné mutace na straně modelového organismu nejsou až tak výhodné. Jedinci vykazující nový mutantní fenotyp se budou odlišovat od zbytku populace a mohou se stát snadnější kořistí predátorů (Nur, 1970).

#### **2.2.4 Hypotéza uvolněné selekce (Relaxed selection hypothesis)**

Tato hypotéza předpokládá, že výskyt nedokonalé mimikry je způsoben uvolněnou selekcí. Fitness populací některých nedokonalých napodobitelů je srovnatelná s fitness populací jejich modelů i přes jejich nedokonalou podobnost. Je to způsobeno tím, že predátoři nediskriminují ani jeden z druhů a nedokonalí mimetici přežívají. Model a mimik v tomto případě sdílí sice velmi podobný signál a predátor je tak od sebe neumí dokonale rozlišit, ale nejsou schopni dosáhnout dokonalé podobnosti, protože působení purifikující selekce se již zastavilo. K tomuto jevu dochází proto, že síla selekce, díky které se u napodobitele vytváří fenotyp modelového organismu je uvolněná (Duncan a Sheppard, 1965; Sherratt, 2001; Sherratt, 2002).

Mnoho matematických modelů aplikovaných na selekci u mimikry využilo teorii detekce signálů, aby se pokusilo objasnit tento fenomén (Oaten *et al.*, 1975; Getty, 1985; Sherratt, 2001; Sherratt, 2002). Systém je navržen tak, aby proces detekce signálu optimalizoval správné reakce na signál a minimalizoval chybovost. Výsledky ukazují, že příjemci signálu (predátoři) by měli zvolit určitý fenotypový práh, který je pro ně garancí alespoň průměrného zisku, akceptují-li všechny emitory signálu spadající do daného fenotypového prahu. Pozice tohoto prahu závisí na tom, za jakých okolností se predátorovi vyplatí akceptovat modelový organismus jako zdroj potravy, jaké výhody mu přinese pozření napodobitele a také na relativním výskytu obou druhů v daném prostředí (stejně tak na výskytu alternativních signálů emitovaných nemimetickými organismy (Dill, 1975; Sherratt a Beatty, 2003; Lindström *et al.*, 2004).

Nachází-li se v prostředí početná populace napodobovaného organismu bývá výskyt napodobitele vzácný. Může také nastat situace, kdy se fenotypový projev mimika a jeho modelu překrývá. V tomto případě bude predátory ohroženo menší procento

napodobitelovy populace a selekce vedoucí k evoluci lepší mimikry je tak oslabena. V konečném výsledku budou populace napodobitelů vykazovat velmi podobnou fitness jako je tomu u populací jejich modelů (Sherratt, 2002).

### **2.2.5 Hypotéza mimetického zhroucení**

Tato hypotéza vychází z předpokladu, že v určitých situacích mohou být nedokonalé mimikry lepší lokální adaptací než mimikry dokonalé. Nedokonalé mimikry tedy reflektují kompromis mezi genovým tokem na jedné straně a selekcí na straně druhé.

Klasické vysvětlení rozdílného vzhledu mimika a modelu je, že mimikry již nepřinášejí žádný benefit. Například, dříve dokonalé mimikry byly degradovány přírodním výběrem (Brower, 1960). Tato situace nastává v oblastech, kde se modelový organismus vyskytuje vzácně nebo vůbec. Teorie Batesiánské mimikry obecně tvrdí, že napodobitel by se měl nacházet pouze v oblastech, kde je přítomen jeho model ve větším množství než jeho napodobitel (Ruxton *et al.*, 2004). Ochrana před predátory, kterou mimikry poskytují by se tak měla vytrácet v lokalitách, kde se model přirozeně nevyskytuje nebo je extrémně vzácný. Tento předpoklad však přichází do rozporu s faktem, že nalezneme hojný počet napodobitelů i v oblastech s nulovým výskytem modelového organismu (Pfennig a Mullen, 2010).

Napodobitelé, kteří se vyskytují na stejném území jako jejich model (sympatrie) a zároveň v oblasti zcela bez přítomnosti modelu (alopatrie) by měli podléhat silné divergentní selekci. V případě sympatrického výskytu těchto druhů by mělo docházet k udržování mimikry, dokonce i k jejímu evolučnímu vylepšení. Na straně druhé při alopatrickém výskytu by měla selekce vést k postupnému zhroucení původní mimikry a přechodu na kryptické zbarvení nebo jiné alternativní antipredační strategie. Zhroucení mimikry nastává z důvodu, že napodobitel obvykle disponuje nápadným fenotypem, stejně jako jeho model (Ruxton *et al.*, 2004). Obecně díky takto výraznému fenotypu by měli alopatričtí napodobitelé pociťovat větší tlak ze strany predátorů, než je tomu u druhů s méně nápadným fenotypem. Je-li tato selekce ze strany predátorů silná, měl by se u alopatrických mimiků vyvinout méně nápadný vzhled (nemimetický fenotyp). Napodobitelé, kteří momentálně vykazují nedokonalou podobnost, tak mohou pouze procházet vývojem směřujícím k nemimetickému fenotypu. Tento přechodný fenotyp, který označujeme právě jako nedokonalé mimikry je do jisté míry udržován genovým tokem (Harper a Pfennig, 2008). Avšak může také dojít k zachování mimetického zbarvení z alternativních důvodů jako je zastrašení predátora nezvykle nápadným



zbarvením pro danou oblast nebo z důvodu sexuální selekce, u které barevnost přidává na atraktivitě jedince (Pough, 1976).

### **2.2.6 Hypotéza percepce**

Podle této hypotézy využívají napodobitelé vrozené schopnosti percepce signálu jeho zamýšlenými příjemci. Signál nedokonalého napodobitele má na příjemce (predátora) větší efekt než signál emitovaný dokonalým mimikem. Výsledná odpověď predátora tedy bude silnější v případě signálu nedokonalého mimika. V tomto případě jsou nedokonalé mimikry lepší adaptací (Vereecken a Schiestl, 2008).

### **2.2.7 Hypotéza satirické mimikry**

Tato hypotéza mimikry říká, že zatímco někteří napodobitelé profitují z dokonalé podobnosti se svými modely, jiní těží z exprese komponent aposematických signálů „v nevhodném kontextu.“ Jako příklad takového signálu mohou posloužit pruhy charakteristické pro vosy na těle mouchy. Exprese signálu tohoto typu pomůže nositeli zmást predátora na dobu, která je potřebná k útěku (Howse a Allen, 1994).

Tato teorie byla dále rozpracována a předpovídá, že „opačné vlastnosti mají tendenci být favorizovány přirozeným výběrem, aby bylo dosaženo vysokého stupně nejednoznačnosti.“ Jinými slovy, nedokonalí napodobitelé vykazující smíšený fenotyp modelového organismu a alternativní kořisti by měli mít vyšší fitness než přesnější napodobitelé, které však lze ale stále od modelu rozlišit (Howse a Allen, 1994).

### **2.2.8 Hypotéza více modelů**

Podle této hypotézy budou přirozeným výběrem upřednostněni jedinci, kteří nepřesně napodobují více modelů nacházejících se v široké geografické oblasti, před těmi, kteří napodobují velmi přesně pouze jeden modelový organismus (Edmunds, 2000). Za těchto okolností je populace „obecného“ napodobitele (napodobuje několik druhů zároveň) větší než populace mimika dokonale imitujícího jediný druh (Edmunds, 2000).

Existuje-li více sympatrických modelů, tak se u napodobitele vyvine intermediární fenotyp nebo fenotyp pouze jednoho z modelů. Výsledný vzhled závisí na vzájemné podobnosti modelů, která může či nemusí stačit ke zmatení predátorů. V případě alopatrických modelů se u mimika vyvine intermediární fenotyp, který se blíží

fenotypu méně chráněného modelu z této skupiny nebo je kombinací fenotypu několika modelů (Sherratt, 2002).

### **2.2.9 Hypotéza více predátorů**

Tato hypotéza předpokládá, že v případě Batesiánské mimikry, reagují někteří predátoři na napodobitele přesně tak jak to ve své teorii publikoval Henry Walter Bates (Bates, 1862). Následkem toho hrozí mimikům zvýšené nebezpečí ze strany predátorů, kteří se specializují na lov jejich modelového organismu. Z toho vyplývá, že optimální mimetický fenotyp je kompromisem mezi fenotypem, který umožní zmást většinu predátorů a fenotypem, který umožní únik před specializovanými predátory (Pekár *et al.*, 2011).

### **2.2.10 Hypotéza selekce blízkých příbuzných**

Dle této hypotézy musí v případě Batesiánské mimikry dojít ke ztrátě fitness populace napodobitele za účelem vývoje lepší mimikry. Dojde tedy ke zvýšení četnosti útoků vedených predátory na celou populaci napodobitele včetně blízkých příbuzných (Johnstone, 2002).

Když je model v dané lokalitě vzácný nebo slabě zastoupený, predátoři obvykle útočí na takovou kořist, která se mu nejvíce podobá. Tento typ kořisti si vybírají záměrně, protože je mnohem větší šance narazit na dokonalého napodobitele než na nebezpečný model (Oaten *et al.*, 1975).

Pro mimika je tedy výhodnější disponovat nedokonalou podobností v prostředí se vzácným výskytem modelového organismu. Právě díky nedokonalé Batesiánské mimikry dojde ke snížení procenta útoků predátory na jeho populaci. V takové lokalitě je tendencí predátorů útočit na co nejméně přesné napodobitele než na celou populaci. Z chování predátorů tak budou těžit napodobitelé s intermediárním fenotypem. Přesnější napodobitelé v této populaci budou podléhat individuální přímé selekci vedoucí k vývoji lepší mimikry. Budou-li však jedinci v populaci dostatečně příbuzní, projeví se na ni nepřímý negativní efekt zvýšené predace. Následkem tohoto efektu dojde ke snížení fitness populace a vývoji stabilní nedokonalé mimikry (Johnstone, 2002).

### **2.2.11 Hypotéza posunu znaků**

Podle této hypotézy nedokonalé mimikry reprezentují evoluční kompromis mezi selekcí řízenou predátory vedoucí k fenotypové konvergenci (dokonalé mimikry) a kompetitivně

řízenou selekcí vedoucí k fenotypové divergenci (nedokonalé mimikry) (Kikuchi a Pfennig, 2012). Jinak řečeno, nedokonalé mimikry jsou manifestací „posunu znaků“, evolučního vývoje, který nastává jako adaptivní odpověď na boj o životně důležité zdroje nebo škodlivé reprodukční interakce mezi druhy (Brown a Wilson, 1956; Grant, 1972; Schluter, 2000; Dayan a Simberloff, 2005; Grether *et al.*, 2009; Pfennig a Pfennig, 2009, 2012).

Abychom správně pochopili tuto hypotézu, považujme mimikry za účinnou ochranu před predátory. Napodobitelé a jejich modely (v případě Batesiánské mimikry) nebo komimici (v případě mimikry Mülleriánské) by si neměli být podobní pouze fenotypem, ale měli by se také vyskytovat společně v daném čase na stejné lokalitě (Beatty a Franks, 2012). Společně se vyskytující fenotypově podobné druhy často bojují mezi sebou o zdroje potravy, reprodukční úspěšnost nebo oboje. Tato kompetice odkazuje na přímé a nepřímé interakce mezi druhy nebo populacemi. Výsledkem takové interakce je snížení úspěšné reprodukce a zdrojů potravy zhruba ve stejné míře pro oba zúčastněné druhy (Pfennig a Pfennig, 2012). Adaptivní odpověď na škodlivou interakci tohoto typu spočívá v odlišení se od heterospecifických konkurentů (Schluter, 2000; Dayan a Simberloff, 2005; Pfennig a Pfennig 2009; Pfennig a Pfennig, 2012). Vzájemně interagující druhy se tak liší fenotypem v důsledku procesu známého jako posun znaků. Tyto vzhledové odlišnosti pak u Batesiánských i Mülleriánských mimiků vedou k vývoji nedokonalé mimikry (Kikuchi a Pfennig, 2012).

Důvodem vzniku nedokonalé mimikry může být posun znaků, který zapříčiněn ekologickými nebo reprodukčními podmínkami. Je-li tento posun znaků reprodukčního charakteru, bývají signály vysílané nedokonalými mimikry cíleny na potencionální predátory nebo partnery (Estrada a Jiggins, 2008).

### **2.3 Predátoři**

Müller (1878) si všiml skutečnosti, že se predátoři do určité míry vyhýbají kořisti nepříjemné chuti. Jedná se o určitý stupeň schopnosti rozeznat takový typ kořisti, který je získán učením. Kdyby byla tato vlastnost vrozená, neexistoval by důvod k postupnému učení (Sherratt, 2008).

Důkazy pro vrozenou schopnost se vyhýbat nebezpečné kořisti zahrnují především extrémně nebezpečnou kořist jako jsou jedovatí hadi (Caldwell a Rubinoff, 1983). Naivní dravci vykazují vyšší míru opatrnosti, přijdou-li do kontaktu s nápadně zbarvenou kořistí (Schuler a Roper, 1992).

Jeden z novějších experimentů prokazujících schopnost dravců se vyhýbat nechutné kořisti byl proveden Pinheirem v roce 2003 (Pinheiro, 2003). Tento pokus byl založen na pozorování vztahu ptačích predátorů a motýlů, kteří jsou jejich běžnou kořistí. Bylo zjištěno, že motýli nepříjemné chuti byli ptáky odmítáni jako zdroj potravy na základě jejich vzhledu. Pozorované chování bylo mnohem více patrné v habitatech, ve kterých se společně vyskytují dravci i nechutné druhy motýlů. Tento i jiné experimenty ukazují, že mnoho predátorů musí nechutnou nebo jinak nebezpečnou kořist nejprve ochutnat, než se jí dokáží lépe vyhýbat (Sherratt, 2008).

Narazí-li predátor na kořist s neznámým fenotypem, může na ni zareagovat dvěma způsoby. Buď se této kořisti ihned vyhne nebo riskuje útok, který má negativní výsledek. Odmítnutí nového fenotypu predátorem je založeno na jeho dosavadních zkušenostech, kdy se fenotyp kořisti jeví jako značně nechutný. Útok na takovou kořist může predátorovi přinést nový zdroj chutné potravy nebo zkušenost, že takovéto kořisti je lepší se vyhýbat (Aubier a Sherratt, 2015).

Jestliže je veškerá kořist sdílející daný fenotyp nechutná, tak počet jedinců, které musí predátor ochutnat před tím, než se naučí tento fenotyp bezpečně rozeznávat závisí na velikosti populace této kořisti. Příkladem může být populace kořisti, ve které je rozšířen pro predátora neznámý fenotyp. Narazí-li predátor během procesu ochutnávání na chutné individuum, tak by měl pokračovat v testování dalších jedinců této populace. Zároveň se od predátora očekává, že se bude vyhýbat jedincům s málo rozšířeným barevným vzorem. Měla by se tedy v tomto případě u predátora projevit určitá úroveň neofobie (např. následky způsobené pozřením toxické potravy) (Aubier a Sherratt, 2015). Optimální strategie predátora ochutnávajícího jedince populace kořisti je schopna vyvolat zcela odlišné selekční tlaky na tuto populaci od známé purifikační selekce přes selekci vzácných vzorů až po diverzifikaci apostatické selekce způsobené neofobií, které jsou závislé na základních podmínkách (Clarke, 1962). Právě neofobie je považována jako významný generátor polymorfismu u nápadně zbarvené kořisti (Sherratt *et al.*, 2004; Franks a Oxford, 2009).

Predace zodpovídá za vývoj četných obraných adaptací u kořisti. Mezi ty zvláště nápadné se řadí deimatické ukazování. Deimatické ukazování se může podobat nebo se dokonce vyskytovat spolu s aposematickými varovnými signály. Avšak hypotéza mu přiřazuje nezávislou roli v procesu učení predátorů. Experimentálně bylo prokázáno, že efektivita deimatického ukazování závisí na zkušenostech predátora. Je-li útočníkem naivní (obvykle alopatrický) predátor, tak je protektivní hodnota deimatického ukazování

poměrně vysoká. V tomto případě jej můžeme považovat za efektivní odstrašující prostředek. Šance na přežití takto chráněné kořisti však konzistentně klesá, přijde-li do kontaktu se zkušeným (obvykle sympatrickým) predátorem. Sympatrickí predátoři se tedy i přes komplexní obranu takové kořisti naučili, jak na ni útočit a konzumovat ji. Z toho vyplývá, že v případě deimatismu se může predátor naučit, v jaké chvíli dojde k odhalení deimatického vzoru, který může následně ignorovat a pozřít kořist (zkušený sympatrický predátor) nebo se jí vyhnout (naivní alopatrický predátor). Experiment byl proveden s horskými kobyčkami *Acripeza reticulata* (Umbers *et al.*, 2019).

## 2.4 Modelová skupina – čeleď Lycidae

Řád Coleoptera je nejvíce diverzifikovanou skupinou organismů. Do dnešní doby bylo charakterizováno zhruba 400 000 druhů spadajících do tohoto řádu (Bocak *et al.*, 2014). Modelovou skupinou v této práci je čeleď Lycidae (dlouhoústcovití). Tato čeleď je řazena do nadčeledi Elateroidea, série Elateriformia a podřádu Polyphaga (Crowson, 1955; Lawrence a Newton 1995; Bocakova *et al.*, 2007). Jedná se o jednu z nejvýznamějších čeledí v nadčeledi Elateroidea, čítající přes 4500 popsaných druhů (Bocak *et al.*, 2008; Bocak *et al.*, 2014).

Výskyt brouků čeledi Lycidae je kosmopolitní, přičemž největší druhovou pestrost nalezneme ve vlhkých lesích tropického pásu. Tyto stinné vlhké tropické lesy představují ideální místo pro vývoj larválního stádia těchto brouků. U larev nalezneme speciálně modifikované ústrojí pro příjem tekutin z hrabanky nebo rozkládajícího se dřeva (Bocak a Matsuda, 2003). Tekutina přijímaná larvami obsahuje organické látky a mikroorganismy obývající svrchní vrstvy lesní zeminy (Cicero, 1994; Bocak a Matsuda, 2003; Kazantsev, 2005).

Tělo dospělců je pouze slabě sklerotizováno, což má za následek pomalý a neobratný let i sklon k vysychání (Bocak a Bocaková, 2008). Dospělí jedinci na rozdíl od larev nepřijímají potravu vůbec, výjimečně se někteří zástupci mohou živit nektarem (Bocak a Matsuda, 2003). Délka života se pohybuje pouze okolo 2-3 týdnů (Motyka *et al.*, 2017). Pro larvy i dospělé je charakteristická nízká mobilita a jejich výskyt se obvykle omezuje na nejnižší stinná patra tropického deštného lesa (Bocak *et al.*, 2008). Pomalý a těžkopádný let, způsobený slabou sklerotizací těla brouků čeledi Lycidae, činí únikové reakce před predátory velmi obtížnými. Alternativní ochranu před predátory jim poskytuje vylučování bílé až růžové hemolymfy obsahující látky palčivé chuti. Tato chemická obrana je činí nepoživatelnými, avšak ne jedovatými. Složky hemolymfy silně

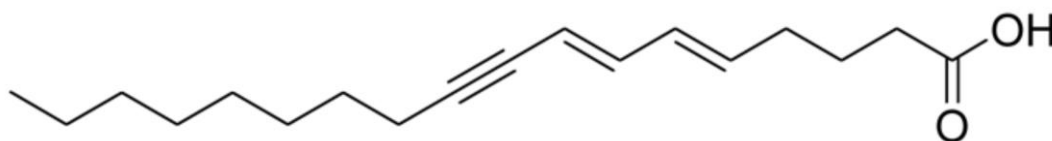
zapáchají a mají hořkou chuť (Bocak a Matsuda, 2003). Přítomnost chemické obrany je dána najevo aposematickými vzory a velký počet druhů je také mimetických (Bocak a Yagi, 2010).

### 2.4.1 Mimikry a Lycidae

Brouci čeledi Lycidae mohou být napodobováni nepříbuznými druhy stejné čeledi, které vykazují chemickou defenzivu podobného charakteru. V takové situaci se jedná o Mülleriánské mimikry (Müller, 1879; Mallet a Joron, 1999). Nebo mohou být součástí mimetických komplexů, kdy jsou napodobováni jinými druhy hmyzu, u nichž není obdobná antipredační strategie přítomna. V takovém případě hovoříme o Batesiánské mimikry (Mallet a Joron, 1999).

Chemická ochrana spojená s mimikry byla dobře prozkoumána u severoamerických rodů čeledi Lycidae. Konkrétně se jedná o rody *Calopteron* a *Lycus*. Tito brouci jsou odmítáni jako kořist svými přirozenými predátory, kterými jsou drozdi a pavouci dvou čeledí: slíďakovití (Lycosidae) a křížákovití (Araneidae). Za jejich nepříjemnou chuť zodpovídá acetylenová kyselina, která dostala název právě podle čeledi Lycidae kyselina lycidová (Obr. 1). Deterentní účinky této kyseliny na chování predátorů během krmení byly prokázány experimentálně. Chemické analýzy u čeledi *Lycidae* také prokázaly přítomnost pyrazinů. Tyto látky se řadí mezi silné těkavé odoranty, které odpuzují predátory (Eisner *et al.*, 2008).

Druhy rodu *Lycus* jsou typickými modely v mimetických vztazích. Mezi jejich napodobitele patří i brouk z čeledi tesaříkovití (Cerambycidae) rodu *Elytroleptus*, který využívá své značné podobnosti k lovu svého modelu. Přepokládalo se, že právě díky konzumaci brouků rodu *Lycus* může tento tesařík do svého těla inkorporovat lycidovou kyselinu a sám se tak stát nechutným pro predátory. Analytická data však tuto teorii vyvrátila (Eisner *et al.*, 2008).



Obr. 1 Struktura kyseliny lycidové (převzato a upraveno od Eisner *et al.*, 2008).

Brouci čeledi Lycidae žijící v tropických a subtropických oblastech sdílejí mnoho společných vlastností. Mezi jejich charakteristiky se řadí měkké, málo sklerotizované tělo, pomalý let, četná přítomnost aposematických vzorů a účast na mimetických interakcích (Carpenter a Ford, 1933).

Data získaná pozorováním ve volné přírodě i laboratorní testy s predátory dokazují, že brouci čeledi Lycidae disponují chemickou antipredační ochranou (Marshall a Poulton, 1902; Carpenter, 1921; Jones, 1932; Darlington, 1938; Linsley *et al.*, 1961).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Biologický materiál**

Analyzovaný soubor v této studii obsahoval 96 endemických exemplářů čeledi Lycidae pocházejících z Papui Nové Guineji. Sběr vzorků proběhl v roce 2017 v rámci projektu *Papuan Megadiversity*. Materiál byl fixován v terénu pomocí 96% ethanolu a označen unikátním registračním číslem. Vzorky byly zpracovány od izolace DNA až po zpracování chromatogramů a sestavení datové matice. Před sestavením datové matice byly k analyzovanému datasetu přidány další vzorky, které byly již dříve sekvencovány v laboratoři UPOL.

#### **3.1.2 Použité chemikálie**

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

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

dNTPs Mix, 2 mmol·l<sup>-1</sup> (Thermo Scientific, kat. č. R0242)

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

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

Chlorid hořečnatý 50 mmol·l<sup>-1</sup> (Invitrogen, kat. č. 10966–034)

Primery (generi biotech)

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

Standard molekulové hmotnosti Lambda DNA/HindIII Marker, 2, ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM0103)

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

Proteinase K (Promega Inc., V3021)

#### **3.1.3 Použité soupravy**

Wizard SV 96 Purification System (Promega Inc., A2371)

#### **3.1.4 Použité roztoky a jejich příprava**

50x TAE (pH 8,5): 242 g Tris bylo rozpuštěno za stálého míchání v 800 ml dH<sub>2</sub>O, následně bylo přidáno 100 ml 0,5M EDTA (pH 8) a 57,1 ml ledové kyseliny octové, objem doplněn do 1000 ml.



0,5M EDTA (pH 8): 9,3 g Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O bylo rozpuštěno v 50 ml dH<sub>2</sub>O, pH bylo upraveno přidáním NaOH (pH 8,0), objem byl doplněn do 100 ml a roztok následně sterilizován.

### **3.1.5 Použité přístroje a zařízení**

Analytické váhy ACBplus - 150 (aeAdam)

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

Centrifuga 5810 R (Eppendorf)

Centrifuga EPP 5424 (Eppendorf)

Koncentrátor 5301 (Eppendorf)

Minicentrifuga (Labnet)

Miska pro autoforézu Mupid - exU (ADVANCE)

Spektrofotometr Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop)

Stereomikroskop Olympus SZX16 (Olympus)

Systém Bio Imaging IN genius (Syngene)

Termoblok Thermomixer komfort (Eppendorf)

Termocykler GeneAmp PCR Systém 9700 (Applied Biosystems™)

Termocykler TGradient (Biometra)

Vakuová pumpa FB70155 (Fisherbrand)

Výrobník vločkového ledu F 125 Compact (Icematic)

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Izolace DNA**

Pro izolaci DNA byla použita metathorakální svalovina, která byla vypreparována za použití binokulární lupy. Vypreparovaná svalovina byla následně uložena do mikroskopavky Eppendorf s 96% ethanolem. Zbylé části preparovaného vzorku byly uloženy v referenční sbírce školitele pro pozorování morfologických znaků. Izolace DNA byla provedena kitem Wizard SV 96 Purificaton System (Promega Inc.)

Ethanol z mikroskopavek Eppendorf byl slit do odpadní nádoby a svalovina z metathoraxů byla následně vysoušena po dobu 15 min ve vakuovém koncentrátoru. Vzorky byly zpracovávány po 24. Pro každých 24 vzorků byl namíchán master mix o celkovém objemu 6,75 ml obsahující 5 ml Nuclei Lysis Solution, 1,25 ml 0,5M EDTA

(pH 0,8) pufru, 0,5 ml proteinasy K o zásobní koncentraci 20 mg/ml. Do každé mikrozkuhavky typu Eppendorf se svalovinou bylo přidáno 270 µl master mixu.

Metathoraxy byly rozdrčeny pomocí sterilní plastové homogenizační tyčinky. Homogenizovaná svalová tkáň byla vložena do termobloku na 30 min, 55°C a 400 rpm, aby mohla proběhnout lyze buněk. Vzorky, které nebyly dostatečně zlyzovány byly v termobloku ponechány delší dobu. Lyzované vzorky byly krátce stočeny při 2000 g a lyzáty přepipetovány do čistých mikrozkuhovek typu Eppendorf a opět umístěny do termobloku vyhřátého na 55 °C. Ke každému vzorku bylo poté přidáno 250 µl SV Lysis bufferu. Vzorky s přídatkem SV Lysis bufferu byly promíchány propipetováním a uloženy při -70°C v mrazáku do dalšího dne.

Po rozmrznutí byly lyzáty vloženy do termobloku a nahřáty na 55°C. Lyzované vzorky byly dle rozpisu přeneseny na Binding Plate, která byla nasazena na stojánek (Manifold Base) napojený na vakuovou pumpu. Na vzorky v Binding Plate bylo aplikováno vakuum o velikosti 15 mm sloupců rtuti, čímž byla DNA ukotvena na destičku a zbylý roztok byl jímán do odpadní nádoby, která je součástí aparatury. DNA zachycená na Binding Plate byla třikrát promyta 1 ml roztoku Wash Solution za aplikace vakua o velikosti 15 mm sloupců rtuti. Promývací roztok byl zachytáván do odpadní nádoby. Spodní strana destičky Binding Plate byla opatrně osušena pomocí papírových ubrousků a poslední zbytky promývacího roztoku byly odsávány pomocí vakuové pumpy po dobu 6 min. Binding Plate byla vysoušena v cycleru při 37°C po dobu 10 min.

Pro následnou eluci byly připraveny dvě sterilní 96 jamkové destičky o objemu 500 µl. Pro eluci DNA byla sestavena aparatura složená z Binding Plate, Manifold Collar napojeného na vakuovou pumpu, Elution Plate a Manifold Bed. Před první elucí byly vzorky inkubovány se 100 µl Nuclease-Free Water po dobu 2 min. Po uběhnutí inkubační doby bylo aplikováno vakuum o velikosti 15 mm sloupců rtuti. Destička s eluáty byla opatrně vyjmuta z aparatury zatavena fólií (Heatsealing Foil). Stejným způsobem byla provedena i druhá eluce, pouze s tím rozdílem, že inkubace vzorků proběhla s 200 µl Nuclease-Free Water. Koncentrace izolovaná DNA byla změřena pomocí přístroje Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

### **3.2.2 PCR amplifikace DNA**

Pro amplifikaci u všech 96 vzorků byl použit jeden fragment mitochondriální DNA tvořený geny (cca 1100 bp) *cox1* mtDNA (cytochrom c oxidáza 1 mtDNA, tRNA-Leu a

gen pro cytochrom c oxidázu 2 mtDNA). Pro tento fragment je dále používána zkratka *cox1* mtDNA.

Množství jednotlivých složek PCR mastermixu pro amplifikaci *cox1* mtDNA na jeden vzorek:

5 µl	10x PCR pufr
2 µl	50 mmol·l <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>
1 µl	10 µmol·l <sup>-1</sup> f primer
1 µl	10 µmol·l <sup>-1</sup> r primer
1,25 µl	dNTPs 2 mmol·l <sup>-1</sup>
0,2 µl	Platinum <i>Tag</i> DNA polymeráza 5U·µl <sup>-1</sup>
36,55 µl	H <sub>2</sub> O
3 µl	DNA - maximální koncentrace 10 ng·µl <sup>-1</sup>

Pro PCR amplifikaci byly použity primery JerryN a MarcyN. Úspěšnost amplifikace DNA byla ověřena pomocí agarozové elektroforézy. Vzorky, u kterých se PCR amplifikace nezdařila byly podrobeny opakované PCR amplifikaci za použití primerů Jerry M a Marcy. Přehled použitých primerů je uveden v (Tab. 1). Pro PCR amplifikaci *cox1* mtDNA byl použit program long 45, teploty použité při jednotlivých fázích a časový profil PCR reakce je uveden v (Tab. 2).

Tab. 1: Přehled použitých primerů k amplifikaci vzorků DNA.

GEN	Primer	Směr	Autor	Délka primeru	Sekvence
První amplifikace					
<i>cox1</i>	Jerry N	F	Bocak a kol.	23-mer	5'-CAAYTATTYTGATTYTTYGG-3'
	Marcy N	R	Bocak a kol.	24-mer	5'-TTCRTAWGTTTCARTATCATTGRTG-3'
Opakování amplifikace					
<i>cox1</i>	Jerry M	F	Bocak a kol.	23-mer	5'-CAACAYYATTT TTGRTTYTTTGG -3'
	Marcy	R	Bocak a kol.	27-mer	5'-TARTTCRTATGWR CAATAYCAYTGRTG -3'

Tab. 2: Teplotní podmínky jednotlivých fází a časový profil PCR reakce pro *coxI* mtDNA.

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

### 3.2.3 Separace PCR produktu pomocí agarosové elektroforézy

Výsledek PCR amplifikace byl ověřen pomocí horizontální elektroforézy. Pro elektroforetickou separaci byl použit 1% agarózový gel. Na přípravu jednoho gelu (1 vanička) bylo použito 0,45 g agarózy a 45 ml TAE (tris Acid EDTA). Obě složky gelu byly přidány do Erlenmayerovy baňky a promíchány krouživým pohybem. Směs v Erlenmayerově baňce byla poté vložena do mikrovlnné trouby a vařena do té doby, než se všechna agaróza rozpustila.

Získaný čirý roztok se nechal zchladnout na zhruba 50°C při laboratorní teplotě. Jakmile byl roztok ochlazen na požadovanou teplotu bylo napipetováno a následně rozmícháno 2,5 µl barviva GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain pro vizualizaci produktu PCR reakce. Gel obsahující všechny potřebné složky byl poté přelit do elektroforetické vaničky s hřebínky. Po utužení gelu byly opatrně vytaženy hřebínky, gel byl vložen do elektroforetické vany, kde byl převrstven 5x TAE pufrem.

Do první jamky gelu byly napipetovány 3 µl standardu molekulové hmotnosti (Lambda DNA/HindIII Marker, 2, Thermo scientific). Vzorky o objemu 4 µl s přídavkem 1 µl nanášecího pufu byly napipetovány do zbylých jamek. Čas elektroforetické separace činil 12 min při napětí 100 V. Po doběhnutí separace byl gel vytažen a PCR produkty zviditelněny v procházejícím UV záření, které je vytvářeno UV transluminátorem vyhodnocovacího přístroje Syngene. Snímky gelů byly pořízeny CCD kamerou a zpracovány v softwaru GeneSnap Version 7.02 (Syngene, Gel Documentation and Analysis System).

### 3.2.4 Purifikace PCR produktů

PCR produkty byly purifikovány pomocí destiček Millipore. K PCR produktu v destičce bylo přidáno 54  $\mu\text{l}$  TE pufru, tak aby celkový objem činil 100  $\mu\text{l}$ , následně byl tento roztok důkladně promíchán propipetováním a přenesen na destičku Millipore.

Produkt PCR reakce byl filtrován pomocí vakuové pumpy (FB70155, Fisherbrand) po dobu 7-15 min. Filtrace byla ukončena až po dokonalém vyprázdnění destičky, tak že po vyprázdnění poslední jamky pracovala aparatura ještě 1 min nasucho. Zároveň se dbalo na to, aby síla vakua nepřekročila hodnotu 20 mm sloupců rtuti.

Po ukončení filtrace bylo do každé jamky napipetováno 8  $\mu\text{l}$  nuclease free  $\text{H}_2\text{O}$  (78  $\mu\text{l}$  celá destička) a následně byla provedena druhá filtrace opět do úplného vyprázdnění. Po skončení druhé filtrace bylo do destičky napipetováno 20  $\mu\text{l}$  nuclease free  $\text{H}_2\text{O}$ . Destička byla poté přelepena fólií a umístěna na termoblok, kde byla třepána po dobu 10 min při 1100 rpm a laboratorní teplotě.

Purifikovaný PCR produkt byl následně napipetován do nové stříhací destičky a jeho koncentrace byla změřena pomocí spektrofotometru Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer. Koncentrace PCR produktů dosahovala požadované hodnoty 25–60  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , a proto již nebylo nutné provést ředění.

### 3.2.5 Sekvenační reakce

Sekvenační reakce byla provedena za použití kitu ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit.

Množství chemikálií použitých pro jeden vzorek:

1 $\mu\text{l}$	Big Dye
2 $\mu\text{l}$	Primery 1,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$
1 $\mu\text{l}$	sekvenační pufr
5 $\mu\text{l}$	$\text{H}_2\text{O}$
1 $\mu\text{l}$	DNA o koncentraci 25–60 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$

Vzorky, jejichž koncentrace byla nižší než 25  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  byly naředěny na výslednou koncentraci 10  $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Tyto vzorky byly aplikovány v objemu 4  $\mu\text{l}$  a  $\text{H}_2\text{O}$  v objemu 2  $\mu\text{l}$ . Pro sekvenační reakci byl na termocycleru zvolen program cycleabi. Celkové nastavení termocykleru je uvedeno v (Tab. 3).

Tab. 3: Teplotní podmínky jednotlivých fází sekvenační reakce a časový profil.

Jednotlivé fáze reakce PCR	Čas [s]	Teplota [°C]	Počet cyklů
Počáteční denaturace DNA	60	96	1
Denaturace DNA	10	96	
Annealing	5	50	25
Extenze	240	60	

### 3.2.6 Purifikace sekvenačního produktu

K čištění produktu sekvenační reakce jsou používány destičky ABI.

Chemikálie přidané k jednomu vzorku po sekvenační reakci:

49,5  $\mu$ l UV ethanol (96%)

1  $\mu$ l 3 mol·l<sup>-1</sup> NaAc

9,5  $\mu$ l nuclease free H<sub>2</sub>O

Po přidání 60  $\mu$ l mixu byl vzorek promíchán pomocí vortexu, poté byl překryt mléčnou matrací a inkubován na ledové lázni po dobu 15 min. Následně byl vzorek centrifugován po dobu 30 min, při 2500 g a 15°C. Po první centrifugaci byl supernatant opatrně vyklepán, tak aby usazený pelet zůstal zachován v destičce. Takto připravená destička byla opět centrifugována po dobu 1 min, při 700 g a 15°C. Do všech jamek destičky bylo napipetováno 60  $\mu$ l 80% UV ethanolu. Následovala centrifugace destičky po dobu 10 min, při 2 500 g a 15°C. Po poslední centrifugaci byly vzorky v destičce vysušeny v zatemněném koncentrátoru (concentrator 5301, Eppendorf) po dobu 15 min. Po vysušení byla destička se vzorky zakryta šedou matrací, aby nedocházelo k degradaci barviv účinky světelného záření. Překrytá destička byla vložena do igelitového sáčku a zamrazena pro další použití.

### 3.2.7 Příprava vzorků pro sekvenaci

Do všech jamek destičky bylo přidáno 12  $\mu$ l formamidu, poté byla destička zatemněna šedou matrací a krátce stočena. Po stočení byla destička umístěna na termoblok a třepána po dobu 15-30 min při 400 rpm a 24°C. Denaturace sekvenačního produktu byla provedena pomocí termocykleru (Biometra) při 95°C po dobu 3 min. Sekvenační produkt po denaturaci byl prudce zchlazen na ledové lázni. Před samotnou sekvenací bylo nutné vzorky krátce stočit. Pro sekvenaci byl použit přístroj 31390 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems™) a doba sekvenace činila 4400 s. Získaná data byla zpracována počítačovým softwarem.

### 3.2.8 Zpracování sekvenačních dat a fylogenetické analýzy

Získaná data byla editována a alignovaná pomocí počítačových softwarů Sequencher 4.9 (Gene Code, Inc), ClustalX 1.8 a Geneious 7.1, MAFFT Q-INS-i, FASconCAT 1.0., BLAST, IQ-TREE 1.6.1, FigTree 1.4.3. Prvním krokem byla kontrola správnosti čtení sekvence jednotlivých vzorků pomocí programu Sequencher 4.9. Nalezené chyby ve čtení byly ručně opraveny. Opravy spočívají především v odstranění úseků s nedostatečnou spolehlivostí čtení, jedná se zpravidla o začátky a konce sekvencí, delecí nelegitimních gapů a opravách překryvu peaků bází. Editovaná sekvenační data byla exportována ve FASTA formátu do programu ClustalX 1.8 (Thompson *et al.*, 1997). V tomto programu byl poprvé vytvořen alignment obsahující 94 vzorků. Software Clustal umožňuje pouze náhled alignmentu, ale nenabízí možnost jeho přímých úprav. Závažné chyby, které se v alignmentu objeví musí být opraveny v programu Sequencher 4.9.

Sekvence byly dále zpracovávány v programu Geneious 7.1, do kterého byly exportovány ve FASTA formátu. K původním 94 vzorkům byl dodán další dataset. Konečný počet vzorků činil 146. Sekvenační analýza těchto vzorků byla provedena v laboratoři UPOL. Pomocí programu Geneious 7.1 bylo provedeno finální dočištění sekvencí. Pro sestavení datové matice k fylogenetické analýze byl použit následující mitochondriální fragment obsahující následující podjednotky: *cox1* + tRNA-Leu + *cox2* (~1100 bází, pro snazší orientaci dále jen jako *cox1*). Nově sekvencovaná data byla sloučena s dříve publikovanými sekvencemi rodu *Cladophorus* a přidružené outgroup. Pro sestavení alignmentu mitochondriálních sekvencí *cox1* byl použit alignment MAFFT (Katoh a Standley, 2013), který je inkorporován v programu Geneious 7.1.7 (<http://www.geneious.com>). Jednotlivé podjednotky fragmentu *cox1* byly rozstříhány a individuálně alignovány a po jejich kontrole následně zřetězeny zpět pomocí skriptu FASconCAT (Kuck a Meusemann, 2010) psaného v jazyce perl.

K výpočtu fylogenetické hypotézy mnou zvoleného datového souboru byl použit program IQ-TREE 1.6.6 (Nguyen *et al.*, 2015). Pro statistické zhodnocení podpory jednotlivých větví byly metodou ultrafast bootstrap (UFboot) vypočteny hodnoty, které jsou vyobrazeny na větvích fylogenetického stromu.

Tab. 4: Vlastnosti alignovaných sekvencí společně s navrženými modely programem ModelFinder pro výpočet fylogenetického stromu.

Sekvencovaný fragment	Počet alignovaných sekvencí	Délka alignmentu	Počet unikátních znaků	Počet znaků informativních pro parsimonii	Počet konstantních znaků	Počet modelů
<i>cox1</i>	146	780	422	311	424	TIM2+F+I+G4
<i>tRNA-Leu</i>	138	59	14	7	49	TIM2+F+G4
<i>cox2</i>	135	246	166	128	100	TPM2u+F+I+G4

Konkrétní modely evoluce DNA byly pro jednotlivé podjednotky získány pomocí programu ModelFinder (Kalyaanamoorthy 2017, Tab. 4). Pro vizualizaci výsledného stromu byl použit program FigTree 1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), následně byl výsledný strom upraven v grafickém editoru.

### 3.2.9 Pozorování detailů a mimetických vzorů

K pozorování mimetických vzorů a případných detailů mezi jedinci byl použit mikroskop Olympus SZX-16.



## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Datový soubor

Nově sestavená výsledná matice čítala 140 vzorků pro mnou sekvencovaný fragment mitochondriální DNA *cox1* a 11 vzorků pro outgroup, která byla zvolena z dřívějších publikovaných dat jako fylogeneticky příbuzná skupina k rodu *Cladophorus* (konkrétně se jednalo o rody *Leptotrichalus*, *Eniclases*, *Diatrichalus*, *Microtrichalus* a *Flabellotrichalus* a jeden dosud nepopsaný rod z tribu Metriorrhynchini). Kompletnost datového souboru čítala 95,42 %, jelikož se téměř všechny vzorky podařilo v daném rozsahu kompletně amplifikovat. Podíl parsimonně informativních znaků v matici činil 41,11 %.

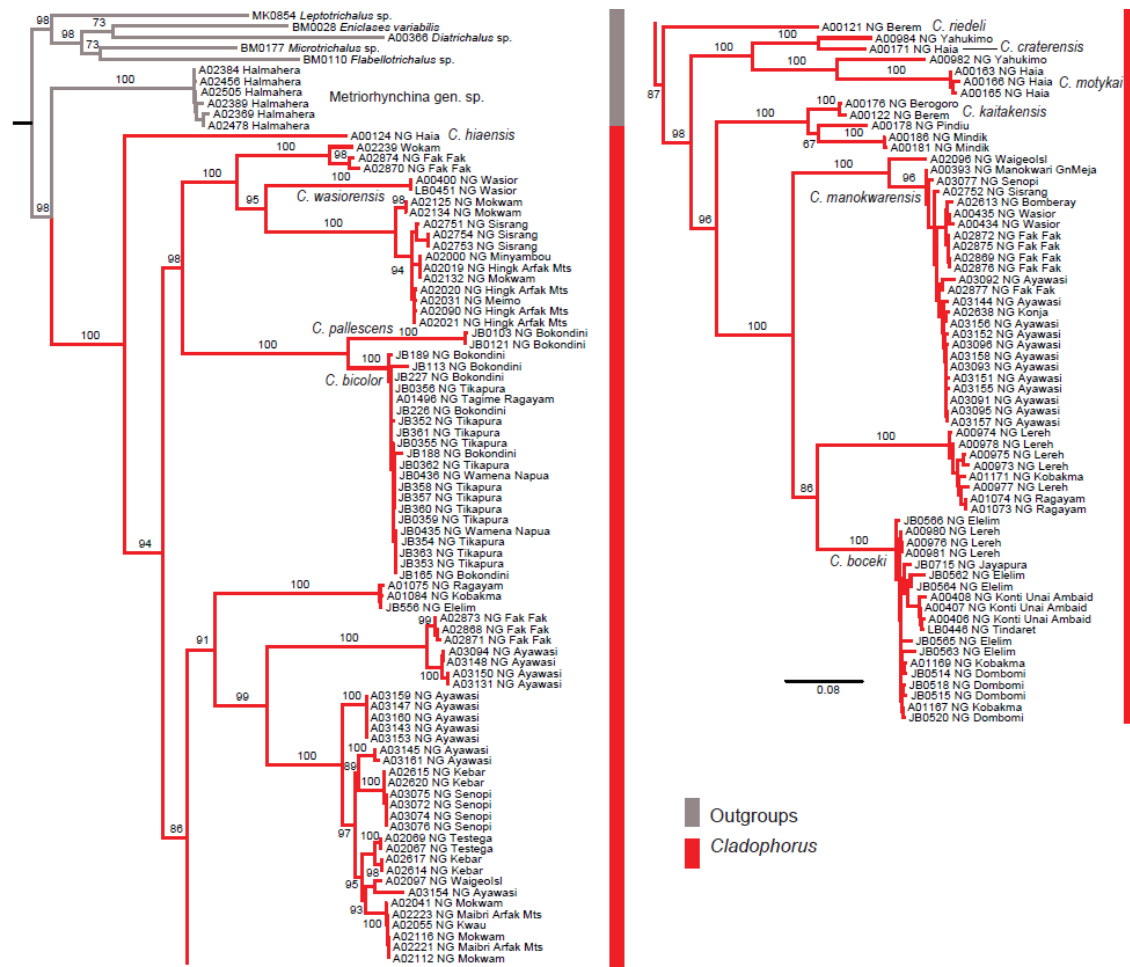
### 4.2 Sestavení alignmentu a jeho konkatenace

Po zkontrolování pravdivosti čtecích rámců v kódujících částech a následnému potvrzení absence stop kodonů na nepatřičných místech byl alignment rozstříhán na podjednotky (*cox1*, *tRNA-Leu* a *cox2*). Jednotlivé podjednotky obsahovaly 780 homologických pozic pro úsek *cox1*, 59 pozic pro úsek *tRNA-Leu* a 246 pozic pro *cox2*. Po zarovnání homologických bází byla délka celkového alignmentu 1085 pozic.

### 4.3 Fylogeneze linií rodu *Cladophorus*

Kompletovaný dataset sestavený z podjednotek fragmentu mitochondriálního genu *cox1* byl analyzován metodou maximum likelihood (ML), díky které jsem získal nejpravděpodobnější scénář evoluce pro danou molekulární matici. Statistická podpora a robustnost jednotlivých štěpení fylogenetického stromu byla vypočítána na základě ultrafast bootstrap (UFboot) hodnocení podpory větví (Obr. 2).

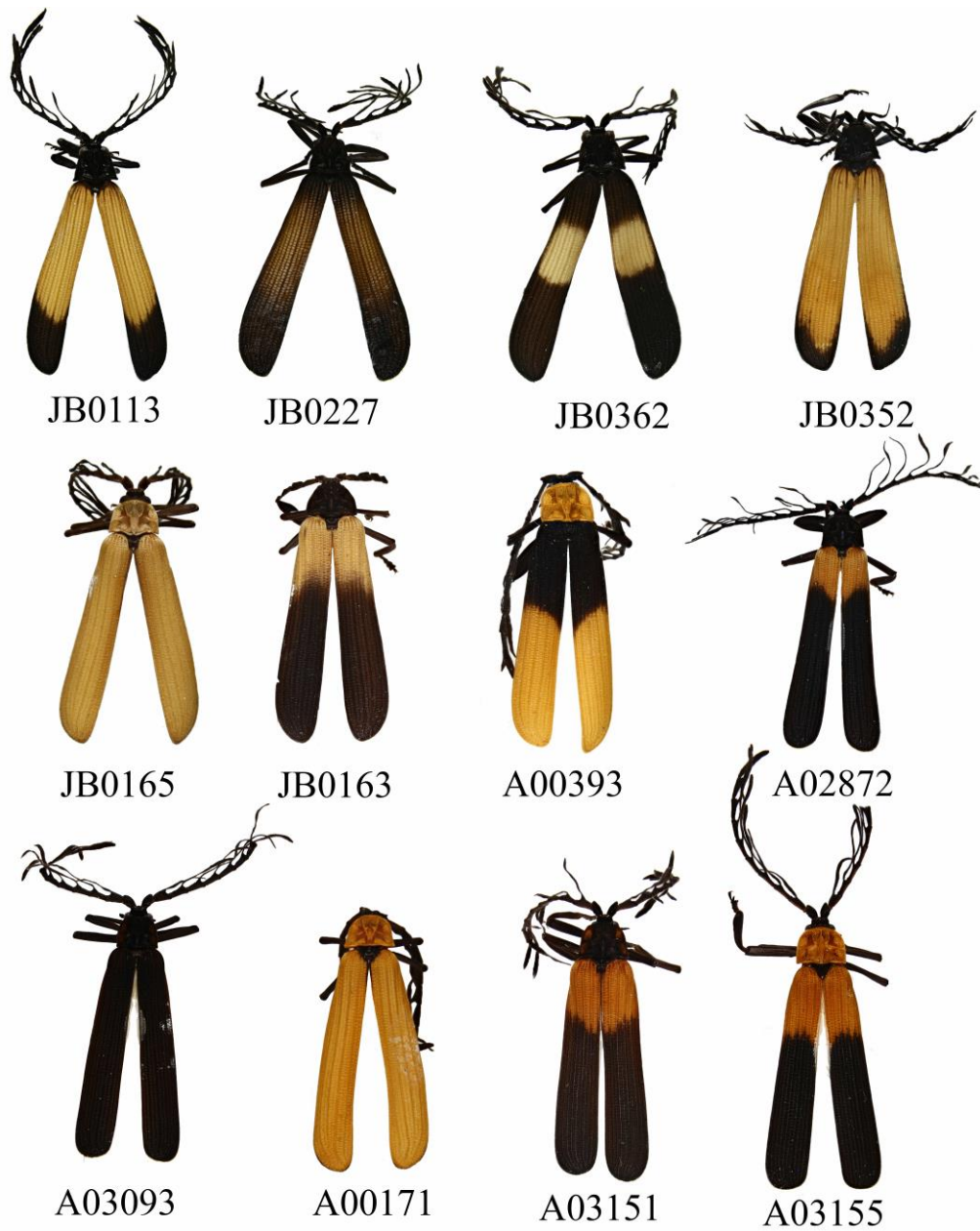
Monofýlie rodu *Cladophorus* je podpořena velmi robustně (UFboot = 100). Všechny zkoumané linie *Cladophorus* mají výskyt pouze na Papui Nové Gunei a jedná se tak o endemický rod. Většina hlubokých štěpení vykazovala vysokou UFboot podporu (86–100), což svědčí o robustnosti a velké stabilitě výsledné topologie. Velmi vysoká statistická podpora byla zjištěna mezi všemi mělkými štěpeními a sesterskými druhovými klastry. Vysoký počet štěpení v terminálních liniích podporuje předpoklad pro bohatou recentní druhovou radiaci uvnitř linií rodu *Cladophorus*.



Obr. 2 Molekulární fylogeneze papuánských linií rodu *Cladophorus*. Znáznorněný fylogram byl vytvořen metodou maximum likelihood a použitím metody ultrafast bootstrap byla statisticky zhodnocena podpora jednotlivých větví.

#### 4.4 Barevné vzory

Rod *Cladophorus* je znám svou diverzitou mimetických vzorů, a dokonce i polymorfismem, kdy mohou mít jedinci jediného druhu několik barevných variant (př. *C. bicolor* a *C. motykai*). Pohlavní dimorfismus mezi samcem a samicí nebyl z materiálu detekován, jelikož je valná většina exemplářů složená pouze ze samců. Na základě porovnání mitochondriálního markeru a zbarvení jednotlivých druhových klastřů bylo zjištěno, že jsou druhy zapojeny do mimetických komplexů společně s ostatními druhy odlišných rodů čeledi Lycidae ze stejných lokalit (Obr. 3).



Obr. 3 Výběr exemplářů rodu *Cladophorus* z různých lokalit Papui Nové Guinei pro pozorování mimetických vzorů.

## 5 DISKUZE

Současné vědecké publikace zabývající se mimikry postrádají ve většině případů fylogenetický přístup a spoléhají se spíše na matematické modely. Jedná se především o systémy zaměřující se na selekční tlak ze strany predátorů. Matematické modely tohoto typu bývají optimalizovány na správnost reakce ze strany predátora na určitý fenotyp (Oaten *et al.*, 1975; Getty, 1985; Sherratt, 2001; Sherratt, 2002). Modely tohoto typu předpokládají, že majoritní roli ve vývoji fenotypu mimetických druhů má purifikační selekce ze strany predátorů. Avšak se již příliš nezaobírají možnostmi podobností jedinců na základě blízké příbuznosti. Tato práce je zaměřena na aplikaci fylogenetické analýzy za účelem studia mimetických vztahů v rámci rodu *Cladophorus* čeledi Lycidae. Takový pohled by mohl přinést nové poznatky ohledně aposematického zbarvení a Mülleriánské mimikry u tohoto rodu na základě vzájemné příbuznosti a geografického rozšíření jednotlivých exemplářů.

Linie rodu *Cladophorus*, které byly studovány jsou svým výskytem omezeny pouze na ostrovy Papui Nové Guinei, takže se jedná o endemický rod. Tento rod je v oblasti svého výskytu součástí tzv. „mimicry rings“, tedy širšího okruhu vzájemně podobných druhů. Poměrně častý je i polymorfismus a přítomnost aposematických vzorů (Kalousova a Bocak, 2017). Právě z těchto důvodů je rod *Cladophorus* velmi vhodným kandidátem na analýzu mimikry. Pro tuto studii bylo použito 140 exemplářů pocházejících z různých lokalit Papui Nové Guinei. Konkrétní oblasti, které jsou od sebe dostatečně geograficky odděleny jsou uvedeny v (Obr. 2).

Vygenerovaný IQ-TREE ukazuje nejpravděpodobnější scénář evolučního vývoje pro studovanou molekulární matici, a tak mohou být diskutovány mimetické vztahy, polymorfismus a aposematické zbarvení nacházející se u druhů vyskytujících se v jedné oblasti i mezi vzdálenějšími lokalitami na základě jejich vzájemné příbuznosti.

Předchozí studie rodu *Cladophorus* byla cílena na popsání druhů založeném na použití a porovnání tree-based metod, metod genetické vzdálenosti a delimitace na základě morfologických znaků (Bocek a Bocak, 2016; Kusý *et al.*, 2017). Právě delimitace druhů na základě morfologických znaků je u tohoto rodu téměř nemožná, kvůli výskytu velkého počtu syntopicky se vyskytujících komimiků (Bocek a Bocak, 2016). V této práci bude diskutován fenotyp již dříve popsaných druhů.

## 5.1 Pozorované fenotypové projevy

Výsledná topologie vykazuje vysokou stabilitu na jejímž základě může být zhodnocena fenotypová diverzita Papuánských linií rodu *Cladophorus*. Obdobně vysoká podpora se nachází i mezi všemi mělkými štěpeními a sesterskými druhovými klastry (Obr. 2). Diverzita větví tohoto rodu je reprezentována exempláři pocházejícími z několika od sebe vzdálených papuánských lokalit.

Značnou proměnlivost v barevných vzorech najdeme u druhu *Cladophorus bicolor*. Zmíněnou fenotypovou diverzitu můžeme vidět u vzorků JB0113, JB0227, JB0362 a JB0352 (Obr. 3). Protonum exempláře JB0113 je zbarveno černě s jemným metalickým leskem, krovky jsou žluté s černým zbarvením v apikální části, které se táhne zhruba do jedné třetiny celkové délky elytronu směrem k jeho bázi. Vzorek pochází z lokality Bokondini. Porovnáme-li jej se vzorkem ze stejné oblasti, tak nalezneme značné odlišnosti ve fenotypu. U vzorku JB0227 je protonum černé barvy bez známek kovového lesku, krovky jsou převážně černé, pouze v jejich centrální části mírně prosvítá žlutá barva. Podobnou odlišnost ve zbarvení nalezneme i u zbylých dvou vzorků, které pocházejí z lokality Tikapura. Exemplář JB0362 má černé protonum s mírným kovovým leskem, elytra jsou zbarvená černě v oblasti ramen i apikální oblasti, pouze ve středu jejich plochy se nachází žluté zbarvení o velikosti necelé třetiny celkové plochy krovek. Fenotypem se nejvíce podobá vzorku JB0227, u kterého však žluté zbarvení ve středové oblasti krovek pouze prosvítá přes převažující černou. Vzorek JB0352 vykazuje jistou míru fenotypové shody se vzorkem JB0113. Protonum tohoto exempláře je zbarveno černě s jemným metalickým leskem, krovky jsou žluté, avšak mírně tmavšího odstínu, než je tomu u vzorku JB0113, apikální části krovek jsou černé.

Teorie Mülleriánské mimikry říká, že se u dvou podobně toxických nebo nechutných druhů v průběhu evoluce vyvinul velmi blízký fenotyp, z důvodu sdílení nákladů na informování společných predátorů o jejich nebezpečnosti. Dojde tak ke snížení procenta úmrtnosti u populací obou interagujících druhů (Mallet a Joron, 1999; Sherratt, 2008). Předpokládá se, že aby došlo k vývoji takto podobného fenotypu mezi komimiky je nezbytná silná purifikační selekce ze strany predátorů (Mallet a Joron, 1999). Dle této hypotézy by tedy mělo dojít k manifestaci fenotypu, který je nejužitečnější ochranou vůči predátorům u druhů žijících ve stejné lokalitě. Porovnáme-li klasickou teorii Mülleriánské mimikry se získanými výsledky, narazíme na značné odlišnosti oproti předpokladu. Jedinci druhu *Cladophorus bicolor* vyskytující se ve stejných oblastech disponují velkým množstvím barevných vzorů. Takové populace

můžeme označit anglickým termínem „multi-pattern communities“, který dává najevo, že se u takových populacích nachází četné barevné vzory. Nedošlo tedy u nich k ustanovení jednoho „nejlepšího“ fenotypu vlivem purifikační selekce ze strany predátorů. Pozorovaná vzájemná podobnost mezi jedinci napříč různými lokalitami může být vysvětlena na základě vzájemné příbuznosti. Tato podobnost nebo vzájemná odlišnost je taktéž závislá na výskytu jednotlivých společenstev, druhů a rodů v dané oblasti. Může také nastat situace, kdy u geneticky totožných jedinců z jiných lokalit nalezneme jiný fenotyp. Takovým příkladem je například *Eniclases variabilis* (Bocek a Bocak, 2016). Na základě těchto výsledků by druh *Cladophorus bicolor* lépe vystihoval binomický název *Cladophorus variabilis*, který podtrhuje barevnou proměnlivost tohoto druhu.

Polymorfismus nalezneme také u druhu *Cladophorus motykai* (Obr. 3, JB0165, JB0163). U tohoto druhu jsou jasně patrné barevné odlišnosti v rámci pohlaví. Exemplář JB0165 je samec, jehož protonum je zbarveno žlutě, stejně tak i krovky. Vzorek JB0163 je samice, která má černé protonum a černé zbarvení krovek se žlutými částmi v humerální oblasti. Oba exempláře pocházejí ze stejné lokality, Haia.

Jedinci *Cladophorus motykai* se žlutým zbarvením (samci) se mohou podobat rodu *Metriorrhynchus*. U tohoto druhu můžeme také nalézt podobnost mimetických vzorů s druhem *Cladophorus craterensis* (Kalousova a Bocak, 2017). Exemplář A00171 (Obr. 3) tohoto druhu má žlutě zbarvené protonum i elytra. Je tedy fenotypově podobný se samci druhu *Cladophorus motykai*. Liší se však tmavším odstínem žluté barvy. Pozorovaný polymorfismus může být výsledkem složitých ekologických interakcí mezi diverzifikovanými „multi-pattern“ populacemi žijícími na Papui Nové Guinei (Wilson, 2013).

## **5.2 Mimetické vzory u druhu *Cladophorus manokwarensis***

U tohoto druhu je možné detailněji rozebrat vyskytující se barevné vzory, porovnat je mezi sebou a charakterizovat výskyt zbarvení v závislosti na lokalitách původu vzorků. Exemplář A00393 (Obr. 3) pocházející z lokality Monokwari Gn. Meja má žlutě zbarvené protonum, prodlouženou černou humerální část krovek, zbylá část je žlutá. Vzorek A02872 (Obr. 3) původem z oblasti Fak Fak má černě zbarvené protonum, oranžovou humerální část krovek, zbylá část je černá. Exemplář A03093 (Obr. 3) má černě zbarvené protonum s tmavě červeným ohraničením, zbytek těla je celý černý, pochází z lokality Ayawasi. Ze stejné lokality pocházejí i poslední dva exempláře (Obr. 3). Vzorek A03151 má černé protonum s oranžovým ohraničením, oranžová je také humerální část krovek,

zbylá část je černá. Exemplář A03155 má oranžové protonum, stejné barvy je i humerální část krovek, zbytek krovek je černý.

Vzorky, které pocházejí z lokalit Manokwari Gn. Meja, Senopi a Sisirang vykazují velmi podobné zbarvení. Tito brouci mají žlutý štít, černá ramena krovek, zbytek krovek je žlutý. Z každé jmenované lokality byl dostupný pouze jeden exemplář, takže není možné vyloučit přítomnost jiného vzoru.

Brouci s černým štítem, žlutými rameny krovek a černou apikální částí se vyskytují v lokalitách Bomberay, Wasior, Fak Fak a Ayawasi. Celkově osm analyzovaných jedinců disponovalo tímto fenotypem. Nejvíce jedinců tohoto vzhledu bylo odchyceno v oblasti Fak Fak.

Největší vzorová pestrost druhu *Cladophorus manokwarensis* se nachází v lokalitě Ayawasi. Mimo výše zmíněného fenotypu se zde nacházejí i další tři typy zbarvení. Celkově bylo analyzováno dvanáct příslušníků tohoto druhu, kteří pocházeli z lokality Ayawasi. Pět jedinců z tohoto souboru mělo žlutý štít, žlutá ramena krovek a černou apikální část. Stejně zbarvení bylo pozorováno i u vzorku z lokality Konja. Čtyři jedinci vykazovali kompletně černý fenotyp s červeným ohraničením štítu. Dva jedinci měli černý štít a plochu krovek celou žlutou. Zbarvením vyskytujícím se v oblastech Bomberay, Wasior a Fak Fak disponoval pouze jeden analyzovaný jedinec.

Na příkladu *Cladophorus manokwarensis* tedy můžeme pozorovat dostatečně velkou vnitrodruhovou různorodost mimetických vzorů. Zaměříme-li se však na jednotlivé oblasti výskytu, tak ve většině případů převažuje jeden ustálený vzor. Takový jev by měl tedy podpořit klasickou Müllеровu hypotézu, kdy selekční tlak ze strany predátorů vede k vývoji dokonalé mimikry (Müller, 1879; Mallet a Joron, 1999). Abychom však mohli hovořit o dokonalé Mülleriánské mimikry v pravém slova smyslu, musel by fenotyp celého druhu směřovat k jednotnému modelu. Tomuto konceptu však značně odporuje oblast Ayawasi, kde se u druhu *Cladophorus manokwarensis* vyskytuje hned pět různých fenotypů pohromadě. Tato situace odkazuje na složité mimetické vztahy odehrávající se v jediné oblasti. Může zde docházet například k výskytu „obecných“ napodobitelů kopírujících několik modelů zároveň (Edmunds, 2000). Také může docházet k tvorbě zbarvení na základě genetické výbavy druhu (Maynard Smith *et al.*, 1985). V každém případě dochází v takovýchto lokalitách k velmi komplexním mimetickým interakcím, které jsou závislé jak na genetické výbavě, tlaku ze strany predátorů, tak přítomnosti ostatních druhů a rodů, které se zde vyskytují.

## 6 ZÁVĚR

Historický přístup studia mimikry vycházel pouze z pozorování vnějších charakteristik, jelikož se předpokládalo, že se jedná o jednoduchou mezidruhovou interakci. Tento přístup se s přicházejícími poznatky začal jevit jako nedostatečný, především pro analýzu mimikry u početných skupin hmyzu, jakou může být čeleď Lycidae. Začaly tak vznikat první matematické modely zaměřující se na reakce predátorů na mimetické druhy (Oaten *et al.*, 1975; Getty, 1985; Sherratt, 2001; Sherratt, 2002). Nevýhodou těchto metod je však to, že poskytují na evoluční vývoj mimikry pouze jednostranný pohled. Jinak řečeno, k vývoji lepší mimikry ať už se jedná o mimikry Batesiánské nebo Mülleriánské je nutná purifikační selekce ze strany predátorů.

Chceme-li studovat větší skupiny vzájemně se napodobujících druhů tzv. „mimicry rings“, rody nebo druhy s výskytem polymorfismu a komplexních mimetických interakcí, je vhodné kombinovat několik přístupů zároveň.

Za účelem studia mimikry v této práci byla použita fylogenetická analýza využívající molekulární markery a srovnání fenotypu na základě mikroskopického pozorování. Fylogenetická analýza poskytla informace o vzájemné příbuznosti nehledě na podobnost způsobenou přírodním výběrem. Takový typ informace hraje důležitou roli je-li studovaná skupina známa pro svou diverzitu mimitických vzorů nebo polymorfismu. Přesně takovou skupinou je rod *Cladophorus*. U vybraných druhů tohoto rodu byly popsány a porovnány vyskytující se barevné vzory na základě vzájemné příbuznosti a oblasti výskytu. Pro detailnější zmapování variability mimetických vzorů rodu *Cladophorus* by bylo vhodné vytvořit rozsáhlejší studii zahrnující větší počet exemplářů jednotlivých druhů.

V lokalitách, kde se vyskytují „multi-pattern“ populace je studium mimikry pouze na základě morfologie nedostatečné. Pro kvalitní analýzu mimetických vztahů je zde potřeba znalosti fylogeneze, abychom mohli na základě příbuznosti porovnávat přítomné vzory. Vývoj mimikry v takových oblastech je „evoluční chaos“, ve kterém je velmi obtížné striktně charakterizovat mimetické vztahy.

Tato práce je založena na poměrně omezeném materiálu jediného rodu, ale zřetelně ukazuje, že spektrum mechanismů vedoucích k mimetické podobnosti musí být velmi rozsáhlé a jejich působení rozsáhlých mimetických komplexech vede k vývoji polymorfismu, který je v přímém protikladu s modelem purifikující selekce. Pro hlubší poznání vývoje těchto mimetických komplexů bude nutné obsáhnout všechny skupiny



zapojené v oblasti do vývoje aposematických signálů a dále bude nutné studovat podrobně geografickou strukturu populací.

## 7 LITERATURA

- Aubier T. G., Sherratt T. N. (2015): Diversity in Müllerian mimicry: the optimal predator sampling strategy explains both local and regional polymorphism in prey. *Evolution* **69**, 2831–2845.
- Bates H. W. (1862): Contributions to an insect fauna of the Amazon valley (Lepidoptera: Heliconidae). *Transactions of the Linnean Society of London* **23**, 495–566.
- Beatty C. D., Beirincx K., Sherratt T. N. (2004): The evolution of Müllerian mimicry in multispecies communities. *Nature* **431**, 63–67.
- Beatty C. D., Franks D. W. (2012): Discriminative predation: simultaneous and sequential encounter experiments. *Current Zoology* **58**, 649–657.
- Benitez-Vieyra S., Hempel de Ibarra N., Wertlen A. M., Cocucci A. A. (2007): How to look like a mallow: evidence of floral mimicry between Turneraceae and Malvaceae. *Proceedings of the Royal Society B* **274**, 2239–2248.
- Bocak L., Bocakova M. (2008): Phylogeny and classification of the family Lycidae (Insecta: Coleoptera), *Annales Zoologici* **58**, 695–720.
- Bocak L., Bocakova M., Hunt T., Vogler A. P. (2008): Multiple ancient origins of neoteny in Lycidae (Coleoptera): consequences for ecology and macroevolution. *Proceedings of the Royal Society London, B* **275**, 2015–2023.
- 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 Southeast Asia. *Evolution: International Journal of Organic Evolution* **64**, 39–52.
- 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.
- Bocek M., Bocak L. (2016): Where are species limits in polymorphic mimetic beetles from New Guinean mountains: a case of *Eniclases* net-winged beetles (Lycidae: Metriorrhynchini). *ZooKeys* **593**, 15–35.
- Brower A. V. Z. (1996): Parallel race formation and the evolution of mimicry in *Heliconius* butterflies: a phylogenetic hypothesis from mitochondrial DNA sequences. *Evolution* **50**, 195–221.
- Brower J. V. (1960): Experimental studies of mimicry. IV. The reactions of starlings to different proportions of models and mimics. *American Naturalist* **94**, 271–282.
- Brown W. L. Jr., Wilson E. O. (1956): Character displacement. *Systematic Zoology* **5**, 49–64.
- Caldwell G. S., Rubinoff R. W. (1983) Avoidance of venomous sea snakes by naive herons and egrets. *The Auk* **100**, 195–198.
- Carpenter G. D. H. (1921): Experiments on the relative edibility of insects, with special reference to coloration. *Transactions of the Entomological Society of London* **1921**:1–105.
- Carpenter G. D. H., Ford E. B. (1933): Mimicry. London: *Methuen & Co. Ltd.*
- Cicero, J. M. (1994): Composite, haustellate mouthparts in netwinged beetle and firefly larvae (Coleoptera, Cantharoidea: Lycidae, Lampyridae). *Journal of Morphology* **219**, 183–192.
- Clarke, B. C. (1962): Balanced polymorphism and the diversity of sympatric species. Pp. 47–70 in D. Nichols, ed. *Taxonomy and geography*. *The Systematics Association*, Oxford, U.K.
- Crowson, R. A. (1955): *The natural classification of the families of Coleoptera*. N. Lloyd: London, UK.
- Cuthill I. C., Bennett A. T. D. (1993): Mimicry and the eye of the beholder. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **253**, 203–204.
- Darlington P. J. (1938): Experiments on mimicry in Cuba with suggestions for future study. *Transactions of the Entomological Society of London* **87**, 681–695.
- Dayan T., Simberloff D. (2005): Ecological and community wide character displacement: the next generation. *Ecology Letters* **8**, 875–894.
- Dill L. M. (1975): Calculated risk-taking by predators as a factor in Batesian mimicry. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **53**, 1614–1621.

- Dittrich W., Gilbert F., Green P., McGregor P., Grewcock D. (1993): Imperfect mimicry: a pigeon's perspective. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **251**, 195–200.
- Duncan C. J., Sheppard P. M. (1965): Sensory discrimination and its role in the evolution of Batesian mimicry. *Behaviour* **24**, 269–282.
- Edmunds M. (2000): Why are there good and poor mimics? *Biological Journal of the Linnean Society* **70**, 459–466.
- Eisner T., Schroeder F. C., Snyder N., Grant J. B., Aneshansley D. J., Utterback D., Meinwald J., Eisner M. (2008): Defensive chemistry of lycid beetles and of mimetic cerambycid beetles that feed on them. *Chemoecology* **18**, 109–119.
- Emlen J. M. (1968): Batesian mimicry: a preliminary theoretical investigation of quantitative aspects. *The American Naturalist* **102**, 235–241.
- Endler J. A. (1981): An overview of the relationships between mimicry and crypsis. *Biological Journal of the Linnean Society* **16**, 25–31.
- Estabrook G. F., Jespersen D.C. (1974): Strategy for a predator encountering a model-mimic system. *The American Naturalist* **108**, 443–457.
- Estrada C., Jiggins C. D. (2008): Interspecific sexual attraction because of convergence in warning colouration: is there a conflict between natural and sexual selection in mimetic species? *Journal of Evolutionary Biology* **21**, 749–760.
- Fabricant S. A., Herberstein M. E. (2015): Hidden in plain orange: aposematic coloration is cryptic to a colorblind insect predator. *Behavioral Ecology* **26**, 38–44.
- Fisher R. A. (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Clarendon.
- Franks D. W., Ruxton G. D., Sherratt T. N. (2009): Warning signals evolve to disengage Batesian mimics. *Evolution* **63**, 256–267.
- Franks, D. W., and G. S. Oxford. (2009): The evolution of exuberant visible polymorphisms. *Evolution* **63**, 2697–2706.
- Getty T. (1985): Discriminability and the sigmoid functional response: how optimal foragers could stabilize model-mimic complexes. *American Naturalist* **125**, 239–256.
- Grant P. R. (1972): Convergent and divergent character displacement. *Biological Journal of the Linnean Society* **4**, 39–68.
- Grether G. F., Losin N., Anderson C. N., Okamoto K. (2009): The role of interspecific interference competition in character displacement and the evolution of competitor recognition. *Biological Reviews* **84**, 617–635.
- Grim T. (2013) Perspectives and debates: mimicry, signalling and co-evolution (commentary on Wolfgang Wickler understanding mimicry with special reference to vocal mimicry). *Ethology* **119**, 270–277.
- Harper G. R. Jr., Pfennig D. W. (2008): Selection overrides gene flow to break down maladaptive mimicry. *Nature* **451**, 1103–1106.
- Holmgren N. M. A., Enquist M. (1999) Dynamics of mimicry evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*. **66**, 145–158.
- Howse P. E., Allen J. A. (1994): Satyric mimicry: the evolution of apparent imperfection. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **257**, 111–114.
- Huheey J. E. (1964): Studies of warning coloration and mimicry. IV. A mathematical model of model-mimic frequencies. *Ecology* **45**, 185–188.
- Huheey J. E. (1988): Mathematical models of mimicry. *The American Naturalist* **131**, 22–41.
- Chiari Y., Vences M., Vieites D. R., Rabemananjara F., Bora P., Ramiñijaona Ravoahangimalala O., Meyer A. (2004): New evidence for parallel evolution of colour patterns in Malagasy poison frogs (*Mantella*). *Molecular Ecology* **13**, 3763–3774.
- Chittka L. (1997): Bee color vision is optimal for coding flower colors, but flower colors are not optimal for being coded why? *Israel Journal of Plant Sciences* **45**, 115–127.
- Johnstone R. A. (2002): The evolution of inaccurate mimics. *Nature* **418**, 524–526.
- Jones F. M. (1932): Insect coloration and the relative acceptability of insects to birds. *Transactions of the Entomological Society of London* **80**, 345–386.
- Kalousova R., Bocak L. (2017): Species delimitation of colour polymorphic *Cladophorus* (Coleoptera: Lycidae) from New Guinea, *Zootaxa* **3**, 505–522.

- Kazantsev S. (2005): Morphology of Lycidae with some consideration on evolution of the Coleoptera. *Elytron* **17**, 73–248.
- Kikuchi D. W., Pfennig D. W. (2012): A Batesian mimic and its model share color production mechanisms. *Current Zoology* **58**, 658–667.
- Kikuchi D. W., Pfennig, D. W. (2013): Imperfect mimicry and the limits of natural selection. *The Quarterly Review of Biology* **88**, 297–315.
- Kundrata R., Bocakova M., Bocak L. (2014): The comprehensive phylogeny of the superfamily Elateroidea (Coleoptera: Elateriformia), *Molecular Phylogenetics and Evolution* **76**, 162–171.
- Kusy D., Sklenarova K., Bocak L. (2017): The effectiveness and failure of DNA-based delimitation in *Synchonnus* net-winged beetles (Coleoptera: Lycidae). *Australian Entomology* **57**, 1–117.
- Lawrence J. F., Newton A. F. (1995): Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). Pp. 779–1006. In: Pakaluk J. and Ślipiński S. A. (eds.): *Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa, Poland.
- Lindström L., Alatalo R. V., Lyytinen A., Mappes J. (2004): The effect of alternative prey on the dynamics of imperfect Batesian and Müllerian mimics. *Evolution* **58**, 1294–1302.
- Linsley E. G., Eisner T., Klots A. B. (1961): Mimetic assemblages of sibling species of lycid beetles. *Evolution* **15**, 15–29.
- Luedeman J. K., McMorris F. R., Warner D. D. (1981): Predators encountering a model-mimic system with alternative prey. *The American Naturalist* **117**, 1040–1048.
- Malcolm S. B. (1990): Mimicry: status of a classical evolutionary paradigm. *Trends in Ecology and Evolution* **5**, 57–62.
- Mallet J., Gilbert L. E. (1995): Why are there so many mimicry rings correlations between habitat, behavior and mimicry in *Heliconius* butterflies. *Biological Journal of the Linnean Society* **55**, 159–180.
- Mallet J., Joron M. (1999): Evolution of diversity in warning color and mimicry: polymorphisms, shifting balance, and speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **30**, 201–233.
- Marshall G. A. K., Poulton E. B. (1902): Five years' observation and experiments (1896–1901) on the bionomics of South African insects, chiefly directed to the investigation of mimicry and warning colours. *Transactions of the Entomological Society of London* **1902**:287–584.
- Maynard Smith J., Burian R., Kauffman S., Alberch P., Campbell J., Goodwin B., Lande R., Raup D., Wolpert L. (1985): Developmental constraints and evolution: a perspective from the Mountain Lake Conference on Development and Evolution. *Quarterly Review of Biology* **60**, 265–287.
- McGuire L., Van Gossum H., Beirincx K., Sherratt T. N. (2006): An empirical test of signal detection theory as it applies to Batesian mimicry. *Behavioural Processes* **73**, 299–307.
- Motyka M., Masek M., Bocak L. (2017): Congruence between morphology and molecular phylogeny: the reclassification of Calochromini (Coleoptera: Lycidae) and their dispersal history. *Zoological Journal of the Linnean Society* **180**, 47–65.
- Müller F. (1878): Über die vorteile der mimicry bei schmetterlingen: *Zoologischer Anzeiger* **1**, 54–55.
- Niehuis O., Hofmann A., Naumann C. M., Misof B. (2007): Evolutionary history of the burnet moth genus *Zygaena* Fabricius, 1775 (Lepidoptera: Zygaenidae) inferred from nuclear and mitochondrial sequence data: phylogeny, host-plant association, wing pattern evolution and historical biogeography. *Biological Journal of the Linnean Society* **92**, 501–520.
- Nur U. (1970): Evolutionary rates of models and mimics in Batesian mimicry. *American Naturalist* **104**, 477–486.
- Oaten A., Pearce C. E. M., Smyth M. E. B. (1975): Batesian mimicry and signal detection theory. *Bulletin of Mathematical Biology* **37**, 367–387.

- Pekár S., Jarab M., Fromhage L., Herberstein M. E. (2011): Is the evolution of inaccurate mimicry a result of selection by a suite of predators? A case study using myrmecomorphic spiders. *American Naturalist* **178**, 124–134.
- Pfennig D. W., Mullen S. P. (2010): Mimics without models: causes and consequences of allopatry in Batesian mimicry complexes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **277**, 2577–2585.
- Pfennig D. W., Pfennig K. S. (2012): *Evolution's Wedge: Competition and the Origins of Diversity*. Berkeley (California): *University of California Press*.
- Pfennig K. S., Pfennig D. W. (2009): Character displacement: ecological and reproductive responses to a common evolutionary problem. *Quarterly Review of Biology* **84**, 253–276.
- Pinheiro C. E. G. (2003): Does Müllerian mimicry work in nature? Experiments with butterflies and birds (Tyrannidae). *Biotropica* **35**, 356–364.
- Plowright R. C., Owen R. E. (1980): The evolutionary significance of bumble bee color patterns a mimetic interpretation. *Evolution* **34**, 622–637.
- Pough F. H. (1976): Multiple cryptic effects of cross-banded and ringed patterns of snakes. *Copeia* **1976**, 834–836.
- Roy B. A., Widmer A. (1999): Floral mimicry: a fascinating yet poorly understood phenomenon. *Trends in Plant Science* **4**, 325–330.
- Ruxton G. D., Sherratt T. N., Speed M. P. (2004): *Avoiding Attack: The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals, and Mimicry*. Oxford (United Kingdom): *Oxford University Press*.
- Savage J. M., Slowinski J. B. (1992): The colouration of the venomous coral snakes (family Elapidae) and their mimics (families Aniliidae and Colubridae). *Biological Journal of the Linnean Society* **45**, 235–254.
- Sbordoni V., Bullini L., Scarpelli G., Forestiero S., Rampini M. (1979): Mimicry in the burnet moth *Zygaena epilates*: population studies and evidence of a Batesian–Müllerian situation. *Ecological Entomology* **4**, 83–91.
- Sheppard P. M., Turner J. R. G., Brown K. S., Benson W. W., Singer M. C. (1985): Genetics and the evolution of Mullerian mimicry in *Heliconius* butterflies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **308**, 433–610.
- Sherratt T. N. (2001): The evolution of female-limited polymorphisms in damselflies: a signal detection model. *Ecology Letters* **4**, 22–29.
- Sherratt T. N. (2002): The evolution of imperfect mimicry. *Behavioral Ecology* **13**, 821–826.
- Sherratt T. N., Beatty C. D. (2003): The evolution of warning signals as reliable indicators of prey defense. *American Naturalist* **162**, 377–389.
- Sherratt, T. N. (2008): The evolution of Müllerian mimicry. *Naturwissenschaften* **95**, 681–695.
- Sherratt, T. N., M. P. Speed, and G. D. Ruxton. (2004): Natural selection on unpalatable species imposed by state-dependent foraging behaviour. *Journal of Theoretical Biology* **228**, 217–226.
- Schluter D. (2000): Ecological character displacement in adaptive radiation. *American Naturalist* **156**, S4–S16.
- Schuler W., Roper T. J. (1992): Responses to warning coloration in avian predators. *Advances in the Study of Behavior* **21**, 111–146.
- Schultz T. D. (2001): Tiger beetle defenses revisited: alternative defense strategies and colorations of two neotropical tiger beetles, *Odontocheila nicaraguensis* bates and *Pseudoxycheila tarsalis* bates (Carabidae: Cicindelinae). *The Coleopterists Bulletin* **55**, 153–163.
- Symula R., Schulte R., Summers K. (2001): Molecular phylogenetic evidence for a mimetic radiation in Peruvian poison frogs supports a Müllerian mimicry hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B* **268**, 2415–2421.
- Turner J. R. G. (1981): Adaptation and evolution in *Heliconius* a defense of neoDarwinism. *Annual Review of Ecology and Systematics* **12**, 99–121.
- Umbers K. D. L., White T. E., De Bona S., Haff T., Ryeland J., Drinkwater E., Mappes J. (2019): The protective value of a defensive display varies with the experience of wild predators. *Nature* **9**, 463.

- Vereecken N. J., Schiestl F. P. (2008): The evolution of imperfect floral mimicry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 7484–7488.
- Weller S. J., Simmons R. B., Boada R., Conner W. E. (2000): Abdominal modifications occurring in wasp mimics of the Ctenuchine– Euchromiine clade (Lepidoptera: Arctiidae). *Morph Hist Fine Struct* **93**, 920–928.
- Williams P. (2007): The distribution of bumblebee colour patterns worldwide: possible significance for thermoregulation, crypsis, and warning mimicry. *Biological Journal of the Linnean Society* **92**, 97–118.
- Wilson J. S., Jahner J. P., Williams K. A. & Forister M. L. (2013): Ecological and evolutionary processes drive the origin and maintenance of imperfect mimicry. *PLOS ONE* **8**, e61610.
- Zrzavy J., Nedved O. (1999): Evolution of mimicry in the New World *Dysdercus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 956–969.