Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

Molekulární fylogeneze podčeledí Spondylidinae a Lepturinae (Coleoptera: Cerambycidae) pomocí mitochondriální 16S rDNA

Miroslava Sýkorová

Školitel: **PaedDr. Martina Žurovcová, PhD**
Školitel specialista: **RNDr. Petr Švácha, CSc.**

České Budějovice
2008

Bakalářská práce

Sýkorová, M., 2008. Molekulární fylogeneze podčeledí Spondylidinae a Lepturinae (Coleoptera: Cerambycidae) pomocí mitochondriální 16S rDNA [Molecular phylogeny of subfamilies Spondylidinae and Lepturinae based on mitochondrial 16S rDNA, Bc. Thesis, in Czech]. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. 34 pp.

Annotation

This study uses cca. 510 bp of mitochondrial 16S rDNA gene for phylogeny of the beetle family Cerambycidae particularly the subfamilies Spondylidinae and Lepturinae using methods of Minimum Evolutin, Maximum Likelihood and Bayesian Analysis. Two included representatives of Dorcasominae cluster with species of the subfamilies Prioninae and Cerambycinae, confirming lack of relations to Lepturinae where still classified by some authors. The subfamily Spondylidinae, lacking reliable morfological apomorphies, is supported as monophyletic, with *Spondylis* as an ingroup. Our data is inconclusive as to whether Necydalinae should be better clasified as a separate subfamily or as a tribe within Lepturinae. Of the lepturine tribes, Lepturini (including the genera *Desmocerus*, *Grammoptera* and *Strophiona*) and Oxymirini are reasonably supported, whereas Xylosteini does not come out monophyletic in MrBayes. Rhagiini is not retrieved as monophyletic. Position of some isolated genera such as *Rhamnusium*, *Sachalinobia*, *Caraphia*, *Centrodera*, *Teledapus*, or *Enoploderes*, as well as interrelations of higher taxa within Lepturinae, remain uncertain.

Tato práce byla financována z projektu studentské grantové agentury
SGA 2007/009 a záměru Entomologického ústavu Z 50070508.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetové stránce.

V Českých Budějovicích, 7. ledna 2008 ……..

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Martině Žurovcové za odborný dohled, vedení a za řadu cenných informací poskytnutých v průběhu mojí práce. Ráda bych poděkovala Petru Šváchovi, bez jehož odborných znalostí dané taxonomické problematiky by tato práce nemohla vzniknout, dále za možnost využití jeho počítačové techniky, za vydatnou podporu a nadšení z každého výsledku. Dále chci poděkovat Lucii Kučerové a Vašku Brožovi za jejich trpělivost a ochotu poradit při mých laboratorních začátcích. Velké díky patří také celému kolektivu Laboratoře populační a evoluční genetiky, kde jsem měla možnost pracovat.

Tato práce by nevznikla bez pomoci mnoha entomologů, kteří dodali použitelný materiál různých (často kriticky důležitých) taxonů: J. Batelka (Praha, CZ), J. Bořucký (Vizovice, CZ), H. Brustel (Ecole Supérieure d'Agriculture de Purpan, Toulouse, Francie), D. Heffern (Houston, TX), D. Kasatkin (Rostov na Donu, Rusko), E. Kučera (Soběslav, CZ), S. Laplante (Agriculture Canada, Ottawa), S. Lingafelter (Smithsonian Institution, Washington, DC), K. Murakami (Tokushima, Japonsko), N. Ohbayashi (Ehime University, Matsuyama, Japonsko) T. Ramey (Fountain Valley, CA), P. Rapuzzi (Prepotto, Itálie), G. Sama (Cesena, Itálie).

OBSAH

1. ÚVOD....1
2. CÍL PRÁCE....3
3. MATERIÁL A METODIKA....3
3.1. Materiál....3
3.2. Izolace DNA....4
3.2.1. Chelexová izolace....4
3.2.2. Izolace pomocí ZR Genomic DNA II Kit™ (ZYMO) RESARCH....4
3.3. Primery....4
3.4. PCR....4
3.4.1. PCR reakční směs....4
3.4.2. PCR program....6
3.4.3. Agarózová elektroforéza....6
3.5. Purifikace PCR produktů....7
3.6. Sekvenování DNA....7
3.6.1. Sekvenační směs....7
3.6.2. Sekvenační program....7
3.6.3. Přečištění sekvenační reakce pomocí Sephadexu a aerosolových špiček....7
3.7. Vyhodnocení sekvencí....8
3.8. Alignment....8
3.9. Použitý software....8
4. VÝSLEDKY....9
4.1. Počet získaných sekvencí....9
4.2. Statistika....9
4.3. Kladogramy....9
5. DISKUSE....10
5.1. Cerambycidae: Monofylie a vyšší klasifikace....10
5.2. Spondylidinae....16
5.3. Lepturinae....18
5.3.1. Monofylie a složení....18
5.3.2. Tribální klasifikace Lepturinae....20
5.4. Spolehlivost kladogramů a vhodnost použité sekvence 16S rDNA....23
5.5. Hodnocení metod použitých ke konstrukci kladogramů....24
6. ZÁVĚR....26
7. LITERATURA....27
8. PŘÍLOHA....30

1. ÚVOD

Molekulární znaky, zejména sekvence bází v DNA, se s dostupností metod pro jejich získávání používají stále více nejen pro evolučně-fylogenetické studie na úrovni molekulární, ale i na úrovni organismů. Pro účely fylogenetické systematiky představují vítaný a do značné míry nezávislý test výsledků získaných na znacích klasických, zejména morfologických. Výhodou molekulárních znaků je především bezproblémová definice (ta je u klasických morfologických znaků často velmi subjektivní a autoři se v definování a kódování znaků mohou významně lišit). Díky tomu je sběr základních dat nezávislý na specialistovi.

Tesaříci patří spolu s mandelinkami do nadčeledi Chrysomeloidea. Obě skupiny jsou fytofágní, larvy většiny tesaříků jsou xylofágní (živí se dřevem), zatímco způsob života dospělců je různý. U primitivních tesaříků byla imága pravděpodobně noční a afágní (nepřijímající potravu). Mnoho moderních skupin přešlo k denní aktivitě a/nebo se specializovali na různé typy potravy (pyl, plodnice hub, kůra, listy atd.); obojí značně přispělo k diverzifikaci dospělců (mimetismus, modifikace ústních orgánů atd.).

Klasifikace nadčeledi prošla v poslední době značnými změnami a z obou hlavních čeledí (Cerambycidae a Chrysomelidae) bylo vyčleněno několik malých čeledí. Tato práce je zaměřena na čeleď Cerambycidae v úzkém slova smyslu (u které se předpokládá monofylie: Švácha et al., 1997), zejména na její podčeledi Spondylidinae a Lepturinae. Čeleď Cerambycidae je jedna z velkých čeledí brouků (kolem 30 000 popsaných druhů) a vykazuje největší diversitu v tropech, odkud je často obtížné získat jakýkoliv materiál, zvláště vzorky použitelé pro studium DNA. Podčeledi Spondylidinae (cca. 90 druhů) a Lepturinae (necelých 1 000 druhů) jsou daleko menší a největší diversitu vykazují na severní polokouli, především v Holarktické a částečně Orientální oblasti, které lze ve spolupráci se zahraničními pracovníky lépe pokrýt materiálem (výběr a získání materiálu zajistil školitel specialista). Ačkoliv je tato skupina sběratelsky velmi populární a často taxonomicky studovaná, metodicky konsistentní fylogenetické práce o ní jsou vzácné i na úrovni podčeledí (Napp, 1994) a uvnitř nich téměř neexistují – tribální klasifikace je většinou typologická, založená na přítomnosti či absenci náhodně zvoleného znaku. Nadějnější pro vyšší klasifikaci se zdají být znaky larev (Švácha et al., 1997) díky jejich poměrně uniformnímu způsobu života a v průměru menší diversifikaci. I molekulární studie nějak se dotýkající vyšší

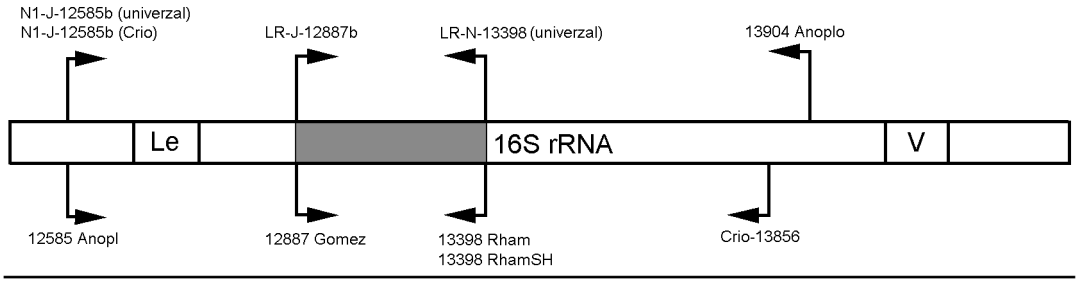
klasifikace jsou zatím nepočetné. Farrell (1998) a Farrell & Sequeira (2004) použili jadernou 18S rDNA; výběr druhů je v nich však poměrně omezený, protože jejich práce se přednostně zaměřují na mandelinky. Gillett (2006, nepublikovaná práce; jaderná 18S rDNA a mitochondriální COI) získal sekvence velkého počtu druhů, ale podčeledi většinou nevycházejí monofyletické a všeobecně z této práce nelze vyvodit žádné spolehlivé závěry o fylogenezi Cerambycidae. Dvě práce vyšlé v japonštině (Saito & Saito, 2003a, b) nejsou zachyceny v databázích včetně Zoological Record a použité ND5 sekvence (910 bp) nejsou v databázi GenBank až na malou odděleně publikovanou práci o jednom vybraném rodu (Saito et al., 2002). Tyto dvě studie se týkají podčeledi Lepturinae a byly získány až v průběhu práce na tomto projektu v létě 2006; v publikovaném kladogramu vycházejí skupiny na nižší úrovni velmi dobře (a například téměř úplně souhlasí s larválními závěry: Švácha & Danilevsky, 1989), ale již vyšší klasifikace uvnitř podčeledi je problematická, skupina nevychází monofyletická a vztahy s ostatními podčeleděmi (zastoupenými jen jedním či dvěma náhodně vybranými druhy) jsou pak zcela nepravděpodobné.

Tato práce je dalším pokusem srovnat výsledky molekulárních dat s velmi neúplnými a konfliktními představami taxonomů a morfologů o fylogenezi a vyšší klasifikaci uvnitř podčeledi Lepturinae (Linsley & Chemsak, 1972; Cherepanov, 1979; Švácha & Danilevsky, 1989; Ohbayashi et al., 1992; Monné & Giesbert, 1995; Althoff & Danilevsky, 1997; Vives, 2000; Jiang & Li, 2001; viz kapitola 5.3.). Rovněž jsme se pokusili pokrýt co nejlépe počeleď Spondylidinae, u které není ani jisté, zda je monofyletická.

Při daných časových a finančních možnostech byla ze dvou alternativ (jedna kratší sekvence z velkého a representativního počtu druhů versus delší/početnější sekvence z menšího počtu vzorků) zvolena možnost první, už proto, že mnoho autorů volí přístup opačný a často pracují s velmi omezeným a náhodným vzorkem druhů, který by v klasické fylogenetické systematice práci v podstatě diskvalifikoval.

Po screeningu sekvencí Cerambycidae dostupných v databázi GenBank byla zvolena cca. 510 bází dlouhá část mitochondriálního 16S RNA genu (Obr. 1) především proto, že se jedná o gen poměrně konzervovaný, tudíž je (jak se předpokládalo) vhodný pro vyšší klasifikaci. Jeho výhodou je, že se jedná o gen mitochondriální, hemizygotní, a tudíž odpadá nutnost klonování. Krátká sekvence dovoluje relativně snadnou

amplifikaci a následné sekvenování. Nevýhodou sekvence nekódující protein je poměrně obtížný alignment způsobený častými insercemi a delecemi. Stejná sekvence byla také nedávno použita spolu se dvěmi dalšími při studiu fylogeneze mandelinek (Gomez-Zurita et al., 2007a, b).



Obrázek 1. Gen mitochondriální 16S rRNA. Šedě je vyznačena sekvenovaná oblast genu. Šipky znázorňují pozice a názvy používaných primerů, sekvence primerů viz Tab. 1 .

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

1) Získání co největšího počtu sekvencí z vybraných druhů podčeledí Spondylidinae a Lepturinae.

2) Fylogenetická analýza těchto sekvencí; zejména (a) monofylie Spondylidinae, (b) pozice Necydalinae vzhledem k Lepturinae, a (c) vnitřní uspořádání podčeledi Lepturinae.

3) Posouzení vhodnosti genu pro velkou podjednotku 16S rRNA pro molekulární taxonomii těchto dosud málo studovaných podčeledí.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Materiál

Výběr potřebných druhů byl proveden školitelem (P. Švácha), který rovněž dodal materiál (viz Příloha 1). Dalších 28 sekvencí jsme použili z databáze GenBank (Příloha 2). Druhy byly vybrány tak, aby co nejlépe pokrývaly diversitu obou podčeledí, zejména u potenciálně primitivních taxonů. Některé důležité taxony se bohužel nepodařilo získat v použitelném stavu (zejména rody *Peithona* a *Xenoleptura* a druh *Centrodera spurca* z podčeledi Lepturinae).

3.2. Izolace DNA

Tkáň pro izolaci DNA byla získána ze zamražených vzorků (–80 °C), dále ze vzorků čerstvě usušených nebo uchovávaných ve ± 98 % etanolu. Pro analýzu byly použity jak larvy, tak imaga. U některých důležitých taxonů, u kterých nebyl k dispozici čerstvý materiál, jsme se pokusili získat DNA ze suchých sbírkových jedinců.

Veškeré dále uvedené laboratorní metody byly prováděny s aerosolovými špičkami (špičky s filtrem), aby bylo zabráněno nežádoucí kontaminaci mezi vzorky.

DNA byla extrahována podle potřeby pomocí jedné z dále uvedených metod.

3.2.1. Chelexová izolace:

Vzorek tkáně byl přenesen do 500 μl 5% Chelexu (BioRad)(Hoelzel A. R., 1998), rozdrcen pomocí sterilního homogenizátoru a inkubován 60 min. při teplotě 56°C. Po této době byl vzorek promíchán a inkubován 10 min. při 95-100°C.

3.2.2. Izolace pomocí ZR Genomic DNA II Kit™ (ZYMO RESEARCH) :

Izolace DNA byla provedena dle návodu výrobce.

DNA získaná z obou izolací byla uskladněna při teplotě –20°C.

3.3. Primery

Pro amplifikaci a sekvenování jsme nejprve použili univerzální primery (viz Tab. 1), jimiž byl získán primer LR-J-12887b z tesaříků *Rhamnusium bicolor* a *Phytoecia cylindrica*. 13398 Rham byl získán stejným způsobem primery LR-J-12887b a Crio-13856 (viz vysvětlivka 10 k Tab. 1). Později se v databázi GenBank objevila kompletní mitochondriální sekvence tesaříka *Anoplophora glabripennis*, což přípravu dalších primerů velmi zjednodušilo – na sekvenci byly nalezeny homology primerů z práce Simon et al., 1994. Primery 13904 Anoplo a Crio-13856 byly navrženy jako konzervované úseky mitochondriální DNA několika druhů brouků (viz vysvětlivky 9 a 10 k Tab. 1) a jsou zde pravděpodobně použity poprvé. Číslování nových primerů odpovídá mitochondriální DNA *Drosophila yakuba.* Pro amplifikaci a sekvenování byly používány většinou primery LR-J-12887 a LR-N-13398 (universal)/13398 Rham, případě neúspěchu byli použity jiné primery z Tab. 1.

Tabulka 1. Použité primery		
Název	**Sekvence**	**Typ**
N1-J-12585b (univerzal)[1]	5' - CCC TTA CGA ATT TGA ATA TAT CC-3'	F
N1-J-12585b (Crio)[2]	5' - GGA CCC TTA CGA AAT TGA ACA TAA CCT -3'	F
LR-J-12887b[3]	5' - CCG GTT TAA ACT CAG ATC ATG T -3'	F
12585 Anopl[4]	5' - GGA CCT TTA CGA ATT TGA ATA TAA CCT -3'	F
12887 Gomez[5]	5' - CAC CGG TTT AAA CTC AGA TCA -3'	F
LR-N-13398 (univerzal)[6]	5' - CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT - 3'	R
13398 Rham[7]	5' - CAC CTG TTT ATT AAA AAC AT - 3'	R
13398 RhamSH[8]	5' - CCT GTT TAT TAA AAA CAT -3'	R
13904 Anoplo[9]	5' - GTA CCT TGT GTA TCA GGG TT -3'	R
Crio-13856[10]	5' - CTC GAA TTT AAA AGA GCT AA -3'	R

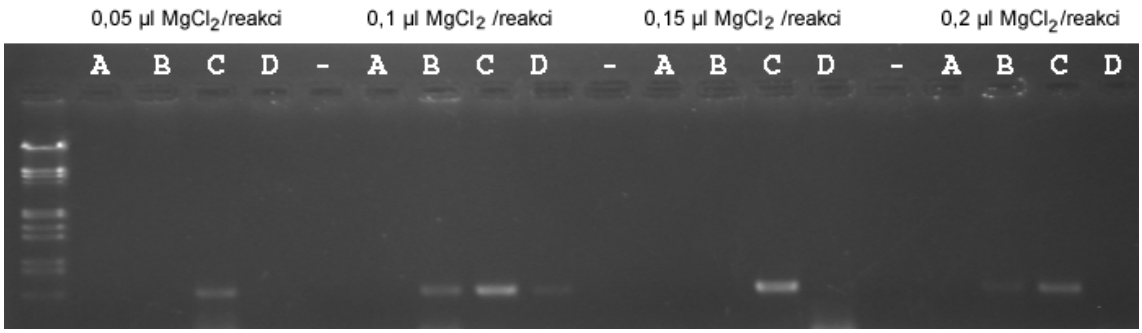
1- zkrácená verse primeru **N1-J-12585** (Simon,1994).
2- homolog primeru **N1-J-12585** (Simon,1994) modifikovaný podle mitochondriální sekvence *Crioceris duodecimpunctata* (Chrysomelidae).
3- homolog primeru **LR-J-12887** (Simon,1994) modifikovaný podle mitochondriální sekvence *Rhamnusium bicolor*.
4- homolog primeru **N1-J-12585** (Simon,1994) modifikovaný podle mitochondriální sekvence *Anoplophora glabripennis*.
5- posunutý homolog primeru **LR-J-12887** (Gomez-Zurita et al., 2006) modifikovaný podle mitochondriální sekvence *Rhamnusium bicolor*.
6- univerzální primer **LR-N-13398** (Simon, 1994).
7- homolog primeru **LR-N-13398** (Simon,1994) modifikovaný podle mitochondriální sekvence *Rhamnusium bicolor*.
8- dtto, zkrácený o 2 base na 5' konci.
9- nový primer získaný srovnáním mitochondriální DNA *Pyrocoelia rufa* (Lampyridae), *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae), *Crioceris duodecimpunctata* (Chrysomelidae) a *Anoplophora glabripennis*, a výběrem konzervované části sekvence z posledního uvedeného druhu.
10- nový primer získaný srovnáním mitochondriální DNA *Pyrocoelia rufa* (Lampyridae), *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae) a *Crioceris duodecimpunctata* (Chrysomelidae), a výběrem konzervované části sekvence z posledního uvedeného druhu.

3.4. PCR

3.4.1. PCR reakční směs

Reakce pro jeden vzorek měla objem 11,05 µl a obsahovala tyto složky: 7,15 µl dd H_2O, 0,1 µl 25 mM $MgCl_2$, 1 µl 2,5 mM dNTP (TaKaRa), 1,25 µl 10x TaKaRa pufru, 0,75 µl 5µM forward primeru (Tab. 1), 0,75 µl 5µM reverse primeru (Tab. 1) a 0,05 µl Ex Taq TaKaRa polymerázy. K této směsi byl přidán 1 µl DNA templátu.

Pro zvýšení efektivity bylo vyzkoušeno přidání $MgCl_2$ do PCR reakce. Pro každý set vzorků, u kterých byla amplifikace neúspěšná, byla přidána jiná koncentrace $MgCl_2$ (viz Obr. 2). Jako nejúspěšnější se ukázalo přidání 0,1 µl $MgCl_2$/ PCR reakci (výsledná koncentrace $MgCl_2$ v reakci byla 2,28 mM).



Obr. 2. Sada vzorků o různých koncentracích $MgCl_2$/reakci. Největší úspěšnost vykazuje koncentrace 0,1µl $MgCl_2$ na jednu PCR reakci. Písmeny jsou označeny druhy: A- *Saphanus piceus*, B- *Spondylis buprestoides*, C-*Centrodera sublineata*, D- *Anisarthron barbipes. Saphanus piceus* z této izolace nevyšel vůbec. Použitý velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII. Velikost (v bp)–12 fragmentů (shora dolů): 21226, 5148+ 4973, 4268, 3530,2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564.

3.4.2. PCR program

Standardní PCR reakce probíhala v termocycleru (Eppendorf Master cycler) následovně : 30 cyklů při teplotách 94°C 15 s, 49–50°C (podle potřeby) 20 s, 68°C 1–2 min. (v závislosti na používaných primerech), 72°C 10 min.; s úvodní denaturací 94°C 1 min.

Vzhledem k tomu, že u některých dvojic primerů byla vypočtená teplota nasedání primeru na templát čili „annealingu“ (Hoelzel, 1998) velmi rozdílná, byl použit program „step-up“. Tento se lišil od standardního amplifikačního profilu tím, že proběhlo 20 cyklů při teplotě annealingu 41–46°C a 25 cyklů při teplotě annealingu 52–53°C. Byly testovány i jiné kombinace počtu cyklů (9:20; 17:17; 15:30), ale ty nevykazovaly tolik pozitivních výsledků.

3.4.3. Agarózová elektroforéza

Kontrola úspěšnosti izolace DNA a kontrola velikosti fragmentů DNA po PCR amplifikaci byla provedena elektroforézou na 1,5 % agarózovém gelu. Gel byl připraven rozpuštěním 1,5 g agarózy (SeaKem LE Agarose) v 98,5 ml 1x TAE pufru (50x TAE pufr: 242 g TRIS, 57,1 ml kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA, 1000 ml H_2O, pH = 8,0) a rozehřátím v mikrovlnné troubě. Po ochlazení na cca 50 °C byl roztok nalit do připravené formy s hřebínkem a ponechán asi 30 min tuhnout. Na takto připravený gel se nanášelo 5 µl PCR produktu pro kontrolu amplifikovaných fragmentů. Porovnávání velikosti a množství produktu se provádělo pomocí velikostního markeru Lambda DNA/Eco RI + HindIII (Fermentas).

Elektroforéza probíhala při pokojové teplotě při napětí 120 V po dobu 35–45 minut. DNA byla barvena 25 min. v lázni 100 ml 1x TAE a 5 ml ethidium bromidu (0,5 μg/ml) a poté vizualizována na transiluminátoru (UVP).

3.5. Purifikace PCR produktů

Produkty PCR byly přečištěny pomocí komerčního kitu DNA Clean & Concentrator™-5 (ZYMO RESEARCH) dle návodu výrobce. Výsledek purifikace byl ověřen elektroforeticky a výsledná koncentrace přečištěného fragmentu byla vizuálně odečtena porovnáním s velikostním markerem Lambda DNA/Eco RI + HindIII (Fermentas).

3.6. Sekvenování DNA

3.6.1. Sekvenační směs

Pro sekvenování byl použit BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Složení sekvenační reakce: 2 μl sekvenačního mixu, 3 μl 5x sekvenačního pufru, 1 μl 5 μM primeru (viz kapitola 3.3.) a 10–40 ng PCR produktu. Vše bylo doplněno dd H_2O do 20 μl.

3.6.2. Sekvenační program

Sekvenační reakce, při které byl použit jako templát PCR produkt, proběhla v 25 cyklech při teplotách 96ºC 15 s, 50ºC 20 s, 60ºC 4 min.; s úvodní denaturací 96ºC 1 min. (Eppendorf Master cycler).

3.6.3. Přečištění sekvenační reakce pomocí Sephadexu a aerosolových špiček

Hydratace Sephadexu: Pro přípravu 10 sloupečků bylo rozmícháno 0,5 g Sephadex G-50 v 7 ml dd H_2O. Směs byla ponechána minimálně 45 min. při 4ºC.

Příprava sloupečku: 1 ml aerosolová špička byla uříznuta cca 5 mm pod filtrem a umístěna do 1,5 ml mikrozkumavky. Roztok Sephadexu byl důkladně promíchán. Na každý sloupeček bylo naneseno 400 μl roztoku Sephadexu a pomocí pipetovacího dudlíku byla protlačena přebytečná voda. Poté bylo přidáno dalších 400 μl a centrifugováno 2 min. při 1 000 g. Sloupečky byly umístěny do nových 1,5 ml mikrozkumavek. Takto připravený sloupek se musí ihned použít.

Čištění sekvenační reakce: Sekvenační směs byla nanesena na sloupek Sephadexu. Sloupečky byly umístěny v centrifuze ve stejné orientaci a centrifugovány 2 min. při 1 000 g. Přečištěná DNA byla vysušena ve vakuové sušičce (Speed-Vac) cca 30 min. při pokojové teplotě.

3.7. Vyhodnocení sekvencí

K analýze vzorků byl použit automatický sekvenátor AB1 Prism 310 od firmy Perkin Elmer (Applied Biosystem), Biologické centrum AV ČR, ENTÚ a sekvenátor ABl Prism 3130xl (Applied Biosystem), Biologické centrum AV ČR, ÚMBR Laboratoř genomiky.

3.8. Alignment

Orientační alignment v ClustalW (implemetovaném v programu MEGA 4) vykazoval vzájemná posunutí zjevně homologických úseků i při různých nastaveních parametrů. Proto jsme použili manuální alignment, při kterém jsme se snažili zohlednit skupiny druhů, které jsou považovány za příbuzné v existujících klasifikacích a zároveň tvořily skupiny druhů v kladogramu s použitím orientačního alignmentu programem ClustalW. Použitý alignment je k dispozici od autorky nebo školitele (P. Švácha) na požádání.

3.9. Použitý software

- MEGA 4 (Tamura et al., 2007) (statistika sekvencí, manuální alignment, Minimum Evolution a Maximum Parsimony)
- ClustalW (implementován v programu MEGA 4) (alignment)
- PHYML verse 2.4.4 (Guindon & Gascuel, 2003) (Maximum Likelihood).
- MrBayes verse 3.1.2 (http://mrbayes.csit.fsu.edu/) (Bayesianská analýza)

Kontrolní analýza sekvencí byla provedena pomocí internetové databáze BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Metoda Minimum Evolution v programu MEGA 4 byla používána s následujícími parametry nastavení, které dávaly nejuspokojivější výsledky: Gaps/Missing Data: Pairwise deletion (mezery a chybějící data eliminována až v párovém srovnání podle skutečné potřeby, nikoliv předem u všech taxonů); Model: modifikovaný LogDet (Tamura & Kumar, 2002), který by se měl vyrovnat jak s různou

rychlostí substitucí v různých taxonech, tak s různými poměry zastoupení bází v sekvenci.

Metoda Maximum Likelihood v programu PHYML byla používána s nastavením, které poskytuje programu značnou volnost pro aproximaci jednotlivých parametrů: Model: GTR (General Time Reversible); Base Frequency Estimates: ML (Maximum Likelihood); Proportion of invariable sites: estimated; Number of substitution rate categories: 6; Gamma distribution parameter: estimated (zbylé parametry jsme ponechali na původním nastavení programu).

V programu MrBayes jsme použili nastavení lset nst=6 rates=invgamma (GTR model s gamma-rozložením míry variace mezi pozicemi a s určitou nevariabilní částí). První čtvrtina z minimálně 1 000 uložených kladogramů byla eliminována jako burn-in.

4. VÝSLEDKY

4.1. Počet získaných sekvencí

Celkem jsme získali 103 sekvencí z následujících podčeledí: Prioninae (4 sekvence), Parandrinae (1), Dorcasominae (2), Cerambycinae (3), Lamiinae (6), Spondylidinae (10), Necydalinae (3), Lepturinae (75) (viz Příloha 1). Většina sekvencí byla bezchybně čitelná, pouze u sekvencí *Aredolpona rubra*, *Centrodera tenera*, *Dinoptera collaris*, *Spondylis buprestoides*, *Ulochaetes leoninus* a *Bellamira scalaris* zůstalo několik (max. 10 u posledního druhu) nerozlišených bází.

4.2. Statistika

Statistické informace o použité sekvenci (viz Příloha 3) jsme získali z programu MEGA 4. Délka sekvence je od 503 do 514 bp, průměrná délka je 507,9 bp. Poměr AT/CG je větší u podčeledí Lepturinae, Necydalinae, Spondylidinae a Lamiinae (průměr 76/24), menší u podčeledí Prioninae, Parandrinae, Dorcasominae a Cerambycinae (71/29).

4.3. Kladogramy

Ačkoliv je zvolená sekvence poměrně krátká a není ji možno považovat za dostačující pro rekonstrukci fylogeneze na úrovni čeledí, zhotovili jsme orientačně manuální alignment obsahující všechny tesaříky a ty podčeledi mandelinek, od kterých jsou v databázi GenBank k disposici sekvence 16S rDNA alespoň pěti druhů, protože izolovaní zástupci vyšších taxonů byli při předběžných analýzách často zdrojem potíží.

Navíc byly vynechány 3 druhy Eumolpinae s velmi dlouhými větvemi a extrémně nestabilní polohou: *Colaspis* gr. *flavicornis* (AJ781531), *Eupales ulema* (AJ781511) a *Pachnephorus impressus* (AJ781553). Přístupová čísla sekvencí Chrysomelidae jsou v Obr. 3, publikované sekvence pocházejí z následujících prací: Gomez-Zurita et al., 2007a, b (velká většina sekvencí); Stewart & Beckenbach, 2003.

Pro všechny ostatní kladogramy jsme použili jeden manuální alignment obsahující pouze Cerambycidae, u některých kladogramů byly selektivně vypnuty určité druhy nebo skupiny (specifikovány u jednotlivých obrázků). Celková délka alignmentu byla 542 znaků. Cerambycidae: 320 variabilních znaků, 279 informativních pro parsimonii. Lepturinae + Necydalinae: 281 variabilních, 230 informativních pro parsimonii. Spondylidinae: 191 variabilních, 117 informativních pro parsimonii. V práci jsme nepoužili metodu Maximum Parsimony, protože předběžné výsledky v programu MEGA 4 obsahovaly podle školitele (P. Švácha) příliš mnoho zjevně nesprávných asociací. Možným důvodem je nižší počet znaků informativních pro parsimonii v alignmentu.

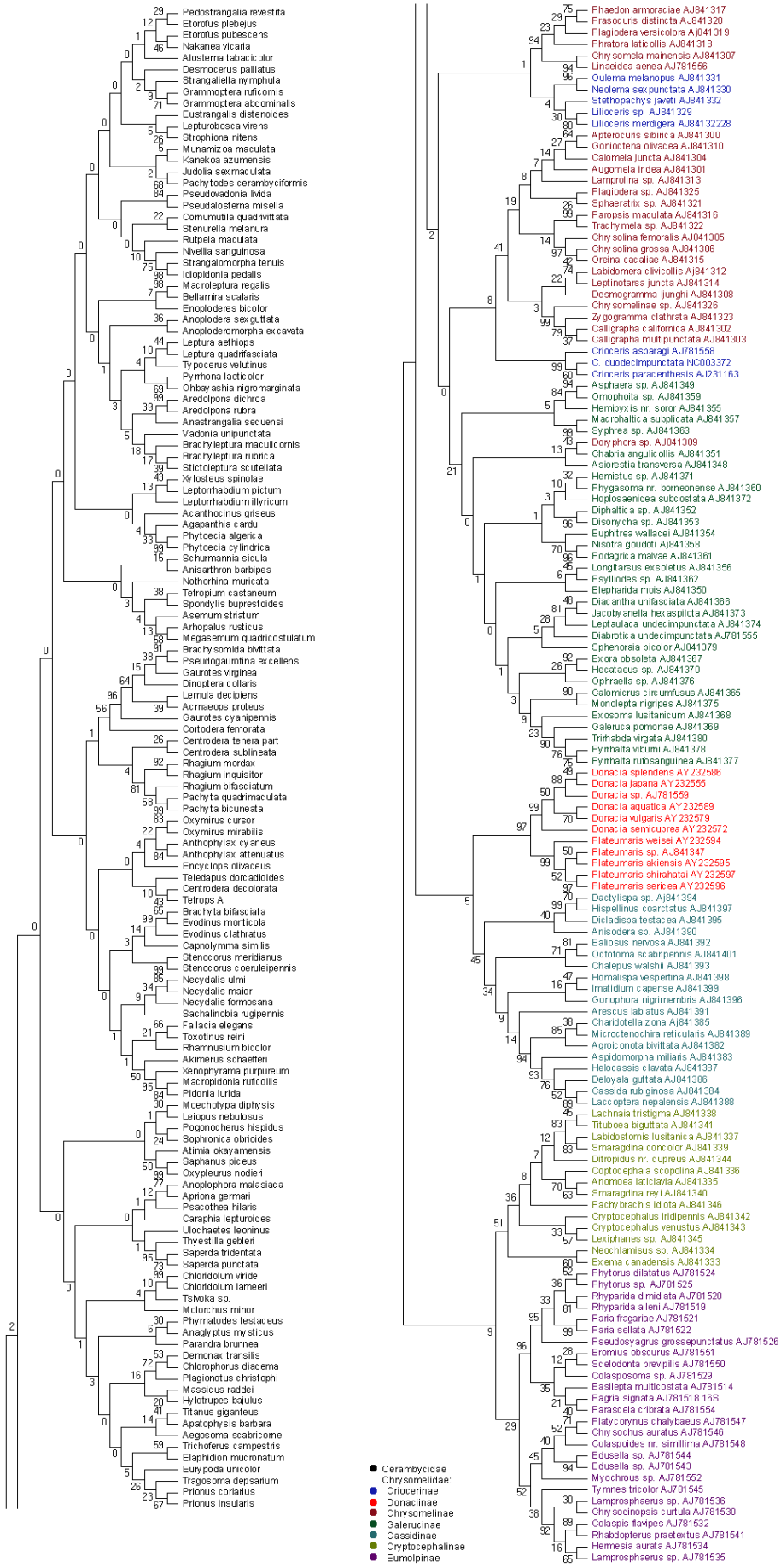
5. DISKUSE

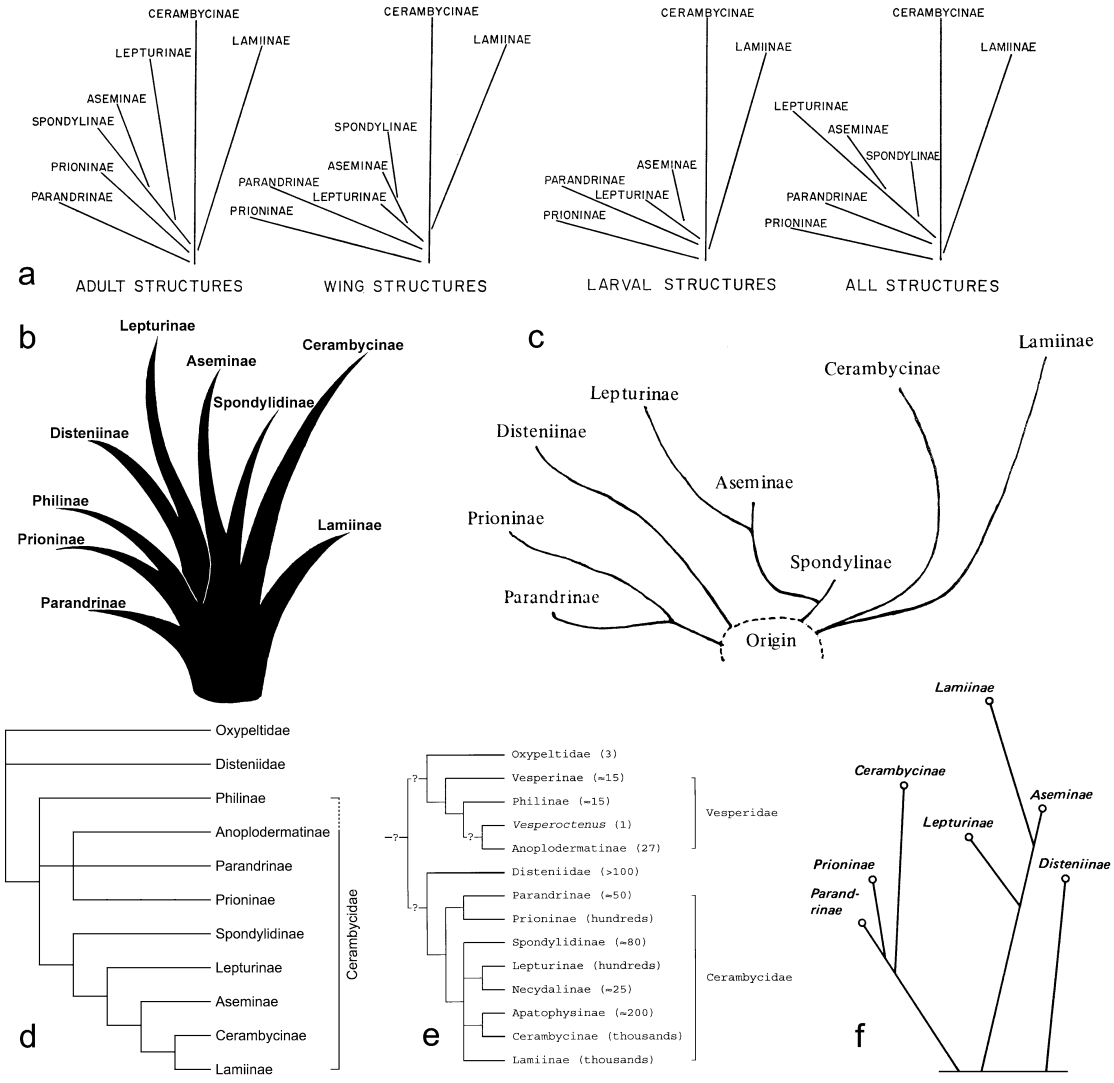
5.1. Cerambycidae: Monofylie a vyšší klasifikace

Kladogram tesaříků a mandelinek vytvořený programem MEGA 4 metodou Minimum Evolution (Obr. 3) podporuje monofylii čeledi Cerambycidae a části podčeledí Chrysomelidae, což ukazuje, že i na takto vysoké taxonomické úrovni má použitá sekvence určitou vypovídací hodnotu, ačkoliv je kladogram poměrně citlivý na přidávání i ubírání druhů. Některé vyšší taxony mandelinek mají hodnoty bootstrapu kolem 50 (97 u Donaciinae zastoupené pouze dvěma rody), zatímco všechny podčeledi Cerambycidae zastoupené více než jedním druhem nejsou monofyletické.

Kompletní kladogramy čeledi Cerambycidae mají značnou tendenci seskupovat dohromady podčeledi Priononae, Parandrinae, Dorcasominae a Cerambycinae. V kladogramu obsahujícím Chrysomelidae (Obr. 3) je tato skupina monofyletická – rody *Prionus* až *Chloridolum*, ve většině ostatních (Obr. 5b–c, 6, 7) vychází tak, že (by)

Obrázek 3. Optimální kladogram Cerambycidae a Chrysomelidae vytvořený metodou Minimum Evolution, model Log-Det s nastavením Pairwise deletion, bootstrap 500x, midpoint rooting. Čeleď Cerambycidae je monofyletická se zanedbatelnou podporou, podčeledi nejsou monofyletické; některé skupiny Crysomelidae jsou více či méně dobře podporovány (obě větve Eumolpinae, Cryptocephalinae, Donaciinae, méně pak Cassidinae). ►

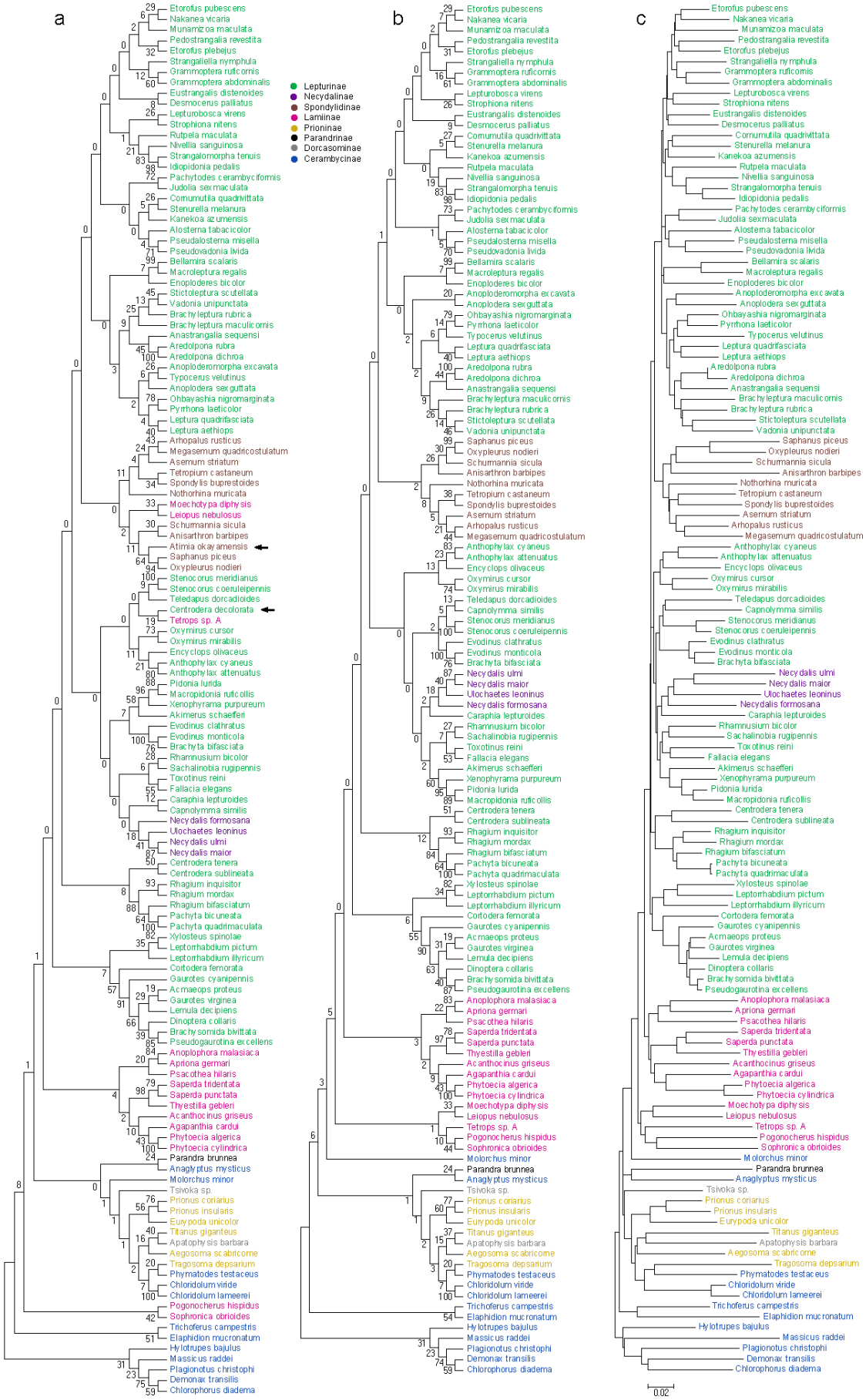

Pedostrangalia revestita
Etorofus plebejus
Etorofus pubescens
Nakanea vicaria
Alosterna tabacicolor
Desmocerus palliatus
Strangaliella nymphula
Grammoptera ruficornis
Grammoptera abdominalis
Eustrangalis distenoides
Lepturobosca virens
Strophiona nitens
Munamizoa maculata
Kanekoa azumensis
Judolia sexmaculata
Pachytodes cerambyciformis
Pseudovadonia livida
Pseudalosterna micella
Comumutila quadrivittata
Stenurella melanura
Rutpela maculata
Nivellia sanguinosa
Strangalomorpha tenuis
Idiopidonia pedalis
Macroleptura regalis
Bellamira scalaris
Enoploderes bicolor
Anoplodera sexguttata
Anoploderomorpha excavata
Leptura aethiops
Leptura quadrifasciata
Typocerus velutinus
Pyrrhona laeticolor
Ohbayashia nigromarginata
Aredolpona dichroa
Aredolpona rubra
Anastrangalia sequensi
Vadonia unipunctata
Brachyleptura maculicornis
Brachyleptura rubrica
Stictoleptura scutellata
Xylosteus spinolae
Leptorrhabdium pictum
Leptorrhabdium illyricum
Acanthocinus griseus
Agapanthia cardui
Phytoecia algerica
Phytoecia cylindrica
Schurmannia sicula
Anisarthron barbipes
Nothorhina muricata
Tetropium castaneum
Spondylis buprestoides
Asemum striatum
Arhopalus rusticus
Megasemum quadricostulatum
Brachysomida bivittata
Pseudogaurotina excellens
Gaurotes virginea
Dinoptera collaris
Lemula decipiens
Acmaeops proteus
Gaurotes cyanipennis
Cortodera femorata
Centrodera tenera part
Centrodera sublineata
Rhagium mordax
Rhagium inquisitor
Rhagium bifasciatum
Pachyta quadrimaculata
Pachyta bicuneata
Oxymirus cursor
Oxymirus mirabilis
Anthophylax cyaneus
Anthophylax attenuatus
Encyclops olivaceus
Teledapus dorcadioides
Centrodera decolorata
Tetrops A
Brachyta bifasciata
Evodinus monticola
Evodinus clathratus
Capnolymma similis
Stenocorus meridianus
Stenocorus coeruleipennis
Necydalis ulmi
Necydalis maior
Necydalis formosana
Sachalinobia rugipennis
Fallacia elegans
Toxotinus reini
Rhamnusium bicolor
Akimerus schaefferi
Xenophyrama purpureum
Macropidonia ruficollis
Pidonia lurida
Moechotypa diphysis
Leiopus nebulosus
Pogonocherus hispidus
Sophronica obrioides
Atimia okayamensis
Saphanus piceus
Oxypleurus nodieri
Anoplophora malasiaca
Apriona germari
Psacothea hilaris
Caraphia lepturoides
Ulochaetes leoninus
Thyestilla gebleri
Saperda tridentata
Saperda punctata
Chloridolum viride
Chloridolum lameeri
Tsivoka sp.
Molochus minor
Phymatodes testaceus
Anaglyptus mysticus
Parandra brunnea
Demonax transilis
Chlorophorus diadema
Plagionotus christophi
Massicus raddei
Hylotrupes bajulus
Titanus giganteus
Apatophysis barbara
Aegosoma scabricorne
Trichoferus campestris
Elaphidion mucronatum
Eurypoda unicolor
Tragosoma depsarium
Prionus coriarius
Prionus insularis
Phaedon armoraciae AJ841317
Prasocuris distincta AJ841320
Plagiodera versicolora AJ841319
Phratora laticollis AJ841318
Chrysomela mainensis AJ841307
Linaeidea aenea AJ781556
Oulema melanopus AJ841331
Neolema sexpunctata AJ841330
Stethopachys javeti AJ841332
Lilioceris sp. AJ841329
Lilioceris merdigera AJ84132228
Apterocurtis sibirica AJ841300
Gonioctena olivacea AJ841310
Calomela juncta AJ841304
Augomela iridea AJ841301
Lamprolina sp. AJ841313
Plagiodera sp. AJ841325
Sphaeratrix sp. AJ841321
Paropsis maculata AJ841316
Trachymela sp. AJ841322
Chrysolina femoralis AJ841305
Chrysolina grossa AJ841306
Oreina cacaliae AJ841315
Labidomera clivicollis AJ841312
Leptinotarsa juncta AJ841314
Desmogramma ljunghi AJ841308
Chrysomelinae sp. AJ841326
Zygogramma clathrata AJ841323
Calligrapha californica AJ841302
Calligrapha multipunctata AJ841303
Crioceris asparagi AJ781558
C. duodecimpunctata NC003372
Crioceris paracenthesis AJ231163
Asphaera sp. AJ841349
Omophoita sp. AJ841359
Hemipyxis nr. soror AJ841355
Macrohaltica subplicata AJ841357
Syphrea sp. AJ841363
Doryphora sp. AJ841309
Chabria angulicollis AJ841351
Asiorestia transversa AJ841348
Hemistus sp. AJ841371
Phygasoma nr. borneoense AJ841360
Haplosaenidea subcostata AJ841372
Diphaltica sp. AJ841352
Disonycha sp. AJ841353
Euphitrea wallacei AJ841354
Nisotra gouldii AJ841358
Podagrica malvae AJ841361
Longitarsus exsoletus AJ841356
Psylliodes sp. AJ841362
Blepharida rhois AJ841350
Diacantha unifasciata AJ841366
Jacobyanella hexaspilota AJ841373
Leptaulaca undecimpunctata AJ841374
Diabrotica undecimpunctata AJ781555
Sphenoraia bicolor AJ841379
Exora obsoleta AJ841367
Hecataeus sp. AJ841370
Ophraella sp. AJ841376
Calomicrus circumfusus AJ841365
Monolepta nigripes AJ841375
Exosoma lusitanicum AJ841368
Galeruca pomonae AJ841369
Trirhabda virgata AJ841380
Pyrrhalta viburni AJ841378
Pyrrhalta rufosanguinea AJ841377
Donacia splendens AY232586
Donacia japana AY232555
Donacia sp. AJ781559
Donacia aquatica AY232589
Donacia vulgaris AY232579
Donacia semicuprea AY232572
Plateumaris weisei AY232594
Plateumaris sp. AJ841347
Plateumaris akiensis AY232595
Plateumaris shirahatai AY232597
Plateumaris sericea AY232596
Dactylispa sp. AJ841394
Hispellinus coarctatus AJ841397
Dicladispa testacea AJ841395
Anisodera sp. AJ841390
Baliosus nervosa AJ841392
Octotoma scabripennis AJ841401
Chalepus walshii AJ841393
Homalispa vespertina AJ841398
Imatidium capense AJ841399
Gonophora nigrimembris AJ841396
Arescus labiatus AJ841391
Charidotella zona AJ841385
Microctenochira reticularis AJ841389
Agroiconota bivittata AJ841382
Aspidomorpha miliaris AJ841383
Helocassis clavata AJ841387
Deloyala guttata AJ841386
Cassida rubiginosa AJ841384
Laccoptera nepalensis AJ841388
Lachnaia tristigma AJ841338
Tituboea biguttata AJ841341
Labidostomis lusitanica AJ841337
Smaragdina concolor AJ841339
Ditropidus nr. cupreus AJ841344
Coptocephala scopolina AJ841336
Anomoea laticlavia AJ841335
Smaragdina rey i AJ841340
Pachybrachis idiota AJ841346
Cryptocephalus iridipennis AJ841342
Cryptocephalus venustus AJ841343
Lexiphanes sp. AJ841345
Neochlamisus sp. AJ841334
Exema canadensis AJ841333
Phytorus dilatatus AJ781524
Phytorus sp. AJ781525
Rhyparida dimidiata AJ781520
Rhyparida alleni AJ781519
Paria fragariae AJ781521
Paria sellata AJ781522
Pseudosyagrus grossepunctatus AJ781526
Bromius obscurus AJ781551
Scelodonta brevipilis AJ781550
Colasposoma sp. AJ781529
Basilepta multicostata AJ781514
Pagria signata AJ781518 16S
Parascela cribrata AJ781554
Platycorynus chalybaeus AJ781547
Chrysochus auratus AJ781546
Colaspoides nr. simillima AJ781548
Edusella sp. AJ781544
Edusella sp. AJ781543
Myochrous sp. AJ781552
Tymnes tricolor AJ781545
Lamprosphaerus sp. AJ781536
Chrysodinopsis curtula AJ781530
Colaspis flavipes AJ781532
Rhabdopterus praetextus AJ781541
Hermesia aurata AJ781534
Lamprosphaerus sp. AJ781535
Cerambycidae
Chrysomelidae:
Criocerinae
Donaciinae
Chrysomelinae
Galerucinae
Cassidinae
Cryptocephalinae
Eumolpinae

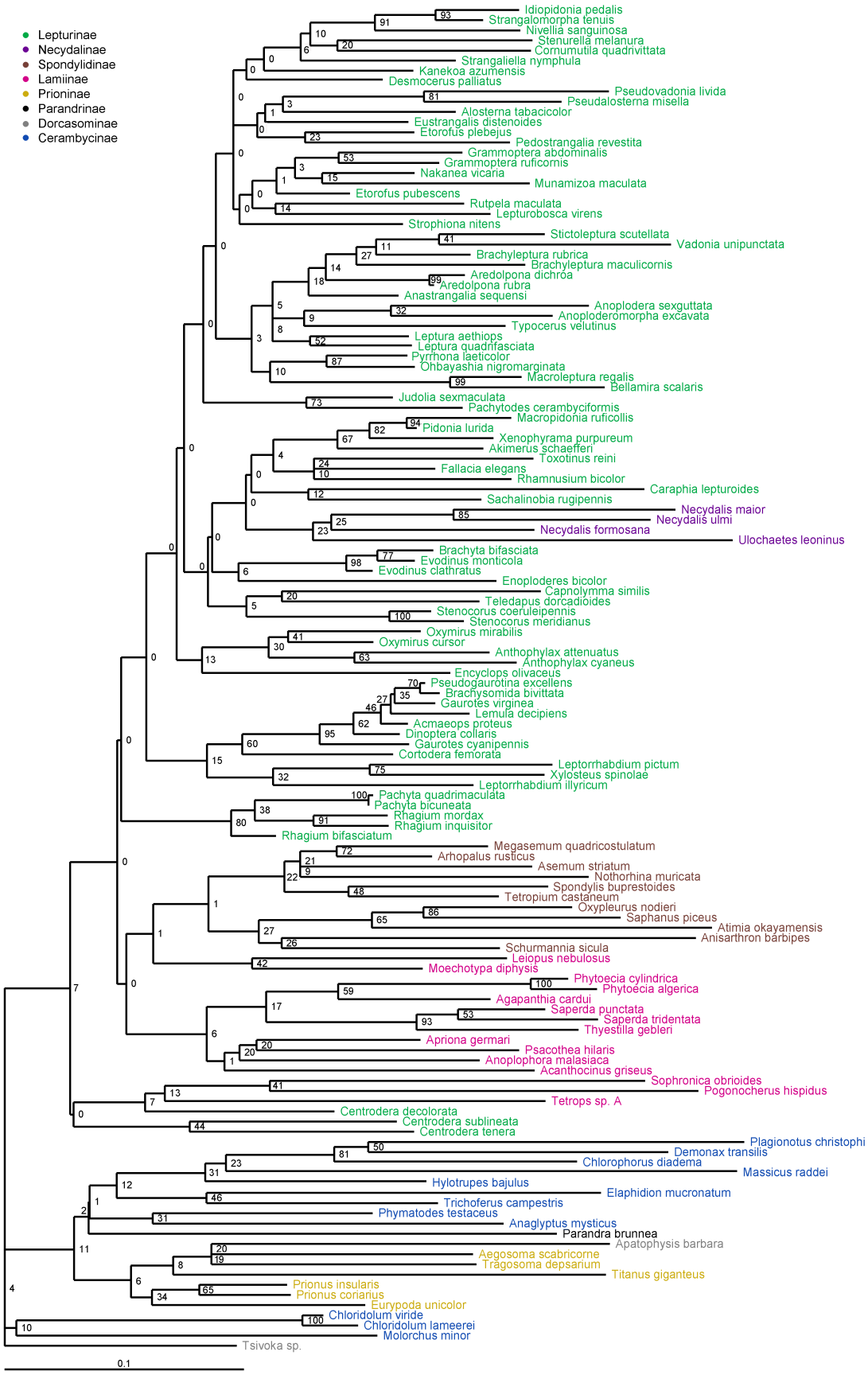


Obrázek 4. Názory některých autorů na vztahy uvnitř čeledi Cerambycidae: (a) Linsley, 1961; (b) Villiers, 1978; (c) Nakamura, 1981; (d) zrekonstruovaný názor Napp, 1994 (od Švácha & Lawrence, in prep.); (e) Švácha et al., 1997 (s přibližným počtem druhů); (f) Danilevsky, 1979a.

bylo možno jí kladogram zakořenit (pouze v Obr. 5a pronikla dovnitř dvojice rodů z podčeledi Lamiinae). To není v souladu s většinou taxonomických prací, které považují podčeledi Prioninae a Parandrinae za bazální (Obr. 4a–e) a podčeledi Cerambycinae a Dorcasominae (=Apatophyseinae, je-li v dané práci akceptována) za příbuznější zbylé skupině podčeledí. Výjimku tvoří např. práce Danilevského (1979a; Obr. 4f). Podobný výsledek jako naše 16S r DNA však dávají i sekvence jaderné 18S

Obrázek 5. Optimální kladogram vytvořený metodou Minimum Evolution, model Log-Det, Pairwise deletion, midpoint rooting, bootstrap 1000x. (a) Všichni Cerambycidae. (b) *Centrodera decolorata* (přitahující rod *Tetrops*) a *Atimia* (která je hlavně odpovědná za asociaci s rody *Moechotypa* a *Leiopus*) byly z analýzy odstraněny; oba tyto taxony jsou vyznačeny šipkou v Obr. (a). Všichni Lamiinae vytvořili jednu skupinu, i když parafyletickou. (c) Stejný fylogenetický strom jako (b) , ale se zachovanou délkou větví.►


a
b
c
Lepturinae
Necydalinae
Spondylidinae
Lamiinae
Prioninae
Parandrinae
Dorcasominae
Cerambycinae
Etorofus pubescens
Nakanea vicaria
Munamizoa maculata
Pedostrangalia revestita
Etorofus plebejus
Strangaliella nymphula
Grammoptera ruficornis
Grammoptera abdominalis
Eustrangalis distenoides
Desmocerus palliatus
Lepturobosca virens
Strophiona nitens
Rutpela maculata
Nivellia sanguinosa
Strangalomorpha tenuis
Idiopidonia pedalis
Pachytodes cerambyciformis
Judolia sexmaculata
Comumutila quadrivittata
Stenurella melanura
Kanekoa azumensis
Alosterna tabacicolor
Pseudalosterna misella
Pseudovadonia livida
Bellamira scalaris
Macroleptura regalis
Enoploderes bicolor
Stictoleptura scutellata
Vadonia unipunctata
Brachyleptura rubrica
Brachyleptura maculicornis
Anastrangalia sequensi
Aredolpona rubra
Aredolpona dichroa
Anoploderomorpha excavata
Typocerus velutinus
Anoplodera sexguttata
Ohbayashia nigromarginata
Pyrrhona laeticolor
Leptura quadrifasciata
Leptura aethiops
Arhopalus rusticus
Megasemum quadricostulatum
Asemum striatum
Tetropium castaneum
Spondylis buprestoides
Nothorhina muricata
Moechotypa diphysis
Leiopus nebulosus
Schurmannia sicula
Anisarthron barbipes
Atimia okayamensis
Saphanus piceus
Oxypleurus nodieri
Stenocorus meridianus
Stenocorus coeruleipennis
Teledapus dorcadioides
Centrodera decolorata
Tetrops sp. A
Oxymirus cursor
Oxymirus mirabilis
Encyclops olivaceus
Anthophylax cyaneus
Anthophylax attenuatus
Pidonia lurida
Macropidonia ruficollis
Xenophyrama purpureum
Akimerus schaefferi
Evodinus clathratus
Evodinus monticola
Brachyta bifasciata
Rhamnusium bicolor
Sachalinobia rugipennis
Toxotinus reini
Fallacia elegans
Caraphia lepturoides
Capnolymma similis
Necydalis formosana
Ulochaetes leoninus
Necydalis ulmi
Necydalis maior
Centrodera tenera
Centrodera sublineata
Rhagium inquisitor
Rhagium mordax
Rhagium bifasciatum
Pachyta bicuneata
Pachyta quadrimaculata
Xylosteus spinolae
Leptorrhabdium pictum
Leptorrhabdium illyricum
Cortodera femorata
Gaurotes cyanipennis
Acmaeops proteus
Gaurotes virginea
Lemula decipiens
Dinoptera collaris
Brachysomida bivittata
Pseudogaurotina excellens
Anoplophora malasiaca
Apriona germari
Psacothea hilaris
Saperda tridentata
Saperda punctata
Thyestilla gebleri
Acanthocinus griseus
Agapanthia cardui
Phytoecia algerica
Phytoecia cylindrica
Parandra brunnea
Anaglyptus mysticus
Molorchus minor
Tsivoka sp.
Prionus coriarius
Prionus insularis
Eurypoda unicolor
Titanus giganteus
Apatophysis barbara
Aegosoma scabricorne
Tragosoma depsarium
Phymatodes testaceus
Chloridolum viride
Chloridolum lameerei
Pogonocherus hispidus
Sophronica obrioides
Trichoferus campestris
Elaphidion mucronatum
Hylotrupes bajulus
Massicus raddei
Plagionotus christophi
Demonax transilis
Chlorophorus diadema
0.02



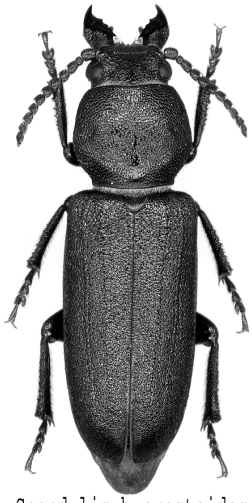
Obrázek 6. Optimální strom všech Cerambycidae sestavený metodou Maximum Likelihood, model GTR, bootstrap 100x, zakořeněný skupinou Prioninae + Parandrinae + Dorcasominae + Cerambycinae. Podobné asociace rodů *Tetrops*, *Moechotypa* a *Leiopus* jako na Obr. 3, avšak podčeleď Spondylidinae zde zůstává monofyletická.

Obrázek 7. Kladogram (50% konsensus) vytvořený programem MrBayes, zakořeněn stejnou skupinou jako na Obr. 6. Model GTR s gamma-rozložením míry variace mezi pozicemi a s určitou nevariabilní částí. Posteriorní pravděpodobnost nad 0,5 je uvedena u jednotlivých uzlů. Strom byl vypočten ve 4 milionech generací. *Tetrops* se opět seskupuje s *Centrodera decolorata*, *Leptorrhabdium illyricum* se skupinou *Cortodera–Lemula.* Spondylidinae jsou monofyletičtí, Lepturini (*Eustrangalis* až *Leptura*) jsou monofyletičtí s vyjímkou *Judolia* a *Pachytodes*, kteří jsou z nich vyčleněni.

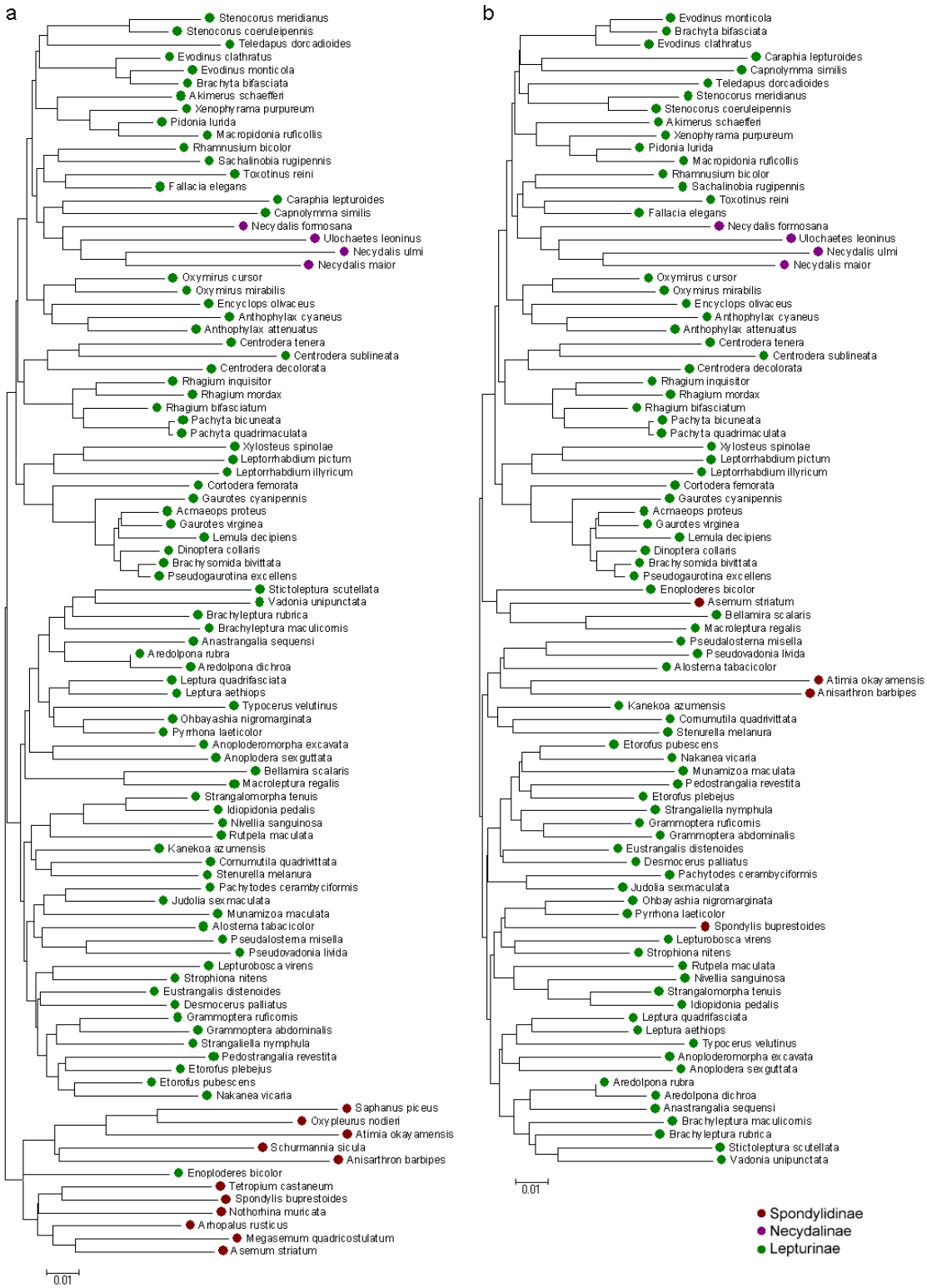
rDNA, které jsou k dispozici v databázi GenBank (P. Švácha, osobní sdělení). Tato skupina podčeledí má i výrazně nižší poměr AT/GC (viz kapitola 4.2. a Příloha 3).

V naší práci jsme se soustředili na podčeledi Lepturinae (včetně Necydalinae, kterou někteří autoři považují pouze za tribus) a Spondylidinae, které jsou také jediné dobře zastoupeny materiálem. Všechny ostatní podčeledi jsou zastoupeny velmi slabě a nerovnoměrně a z této práce o nich nelze dělat žádné významnější závěry.

5.2. Spondylidinae


Spondylis buprestoides

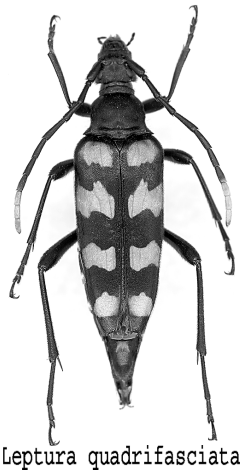
Podčeleď Spodylindinae je jednou z taxonomicky nejproblematičtějších skupin v čeledi Cerambycidae. Některé skupiny této podčeledi byly klasifikovány v Cerambycinae nebo naopak některé druhy Cerambycinae byly spojovány se Spondylidinae, zejména s tribem Saphanini (Švácha & Lawrence, in prep.). Definice podčeledi na larválních znacích je sice jasná, ale ani pak není skupina vymezena nepochybnými apomorfiemi (Švácha et al., 1997) a její monofylie proto není jistá. V našich kladogramech, které poprvé zahrnují větší počet taxonů této podčeledi (11 rodů, v dosavadních publikacích nejvýše tři), vychází skupina buď monofyletická (Obr. 5b, 6, 7, 9 a 13), nebo je její monofylie v některých kladogramech připravených metodou Minimum Evolution narušena afinitou k jednotlivým taxonů jiných podčeledí (např. *Moechotypa* a *Leiopus* z Lamiinae v Obr. 5a, *Enoploderes* z Lepturinae v Obr. 8a). Výsledky je tudíž možno interpretovat jako podporu monofylie podčeledi Spondylidinae. Podčeleď byla často rozdělována na dvě (Spodylindinae s rodem *Spondylis* a dvěma příbuznými severoamerickými rody, a Aseminae obsahující ostatní rody; např. Monné, 2006). Taková klasifikace je v rozporu s larválními znaky (Švácha & Danilevsky, 1987) i s našimi výsledky, kde *Spondylis* vychází v rozlišených kladogramech jako vnitřní rod tribu Asemini (v našem materiálu rody *Asemum*, *Arhopalus*, *Megasemum*, *Tetropium* a *Nothorhina*) sesterský rodu *Tetropium.* Druhou větev tvoří triby Anisarthronini (*Anisarthron*, *Schurmannia*), Atimiini (*Atimia*) a Saphanini (*Saphanus*, *Oxypleurus*).



Obrázek 8. Optimální kladogram vytvořený metodou Minimum Evolution, model Log-Det, Pairwise deletion, midpoint rooting. (a) Všichni Spondylidinae, Necydalinae a Lepturinae. Necydalinae jsou vnitřní skupinou Lepturinae, monofylie Spondylidinae je narušena pouze izolovaným rodem *Enoploderes,* jehož pozice je v kladogramech velmi variabilní. (b) Všichni Spondylidinae mají poměrně dlouhé větve a když jsme ponechali pouze 4 náhodně vybrané rody, podčeleď se úplně rozpadla a monofylie tribu Lepturini uvnitř Lepturinae byla porušena.

5.3. Lepturinae

5.3.1. Monofylie a složení


Leptura quadrifasciata

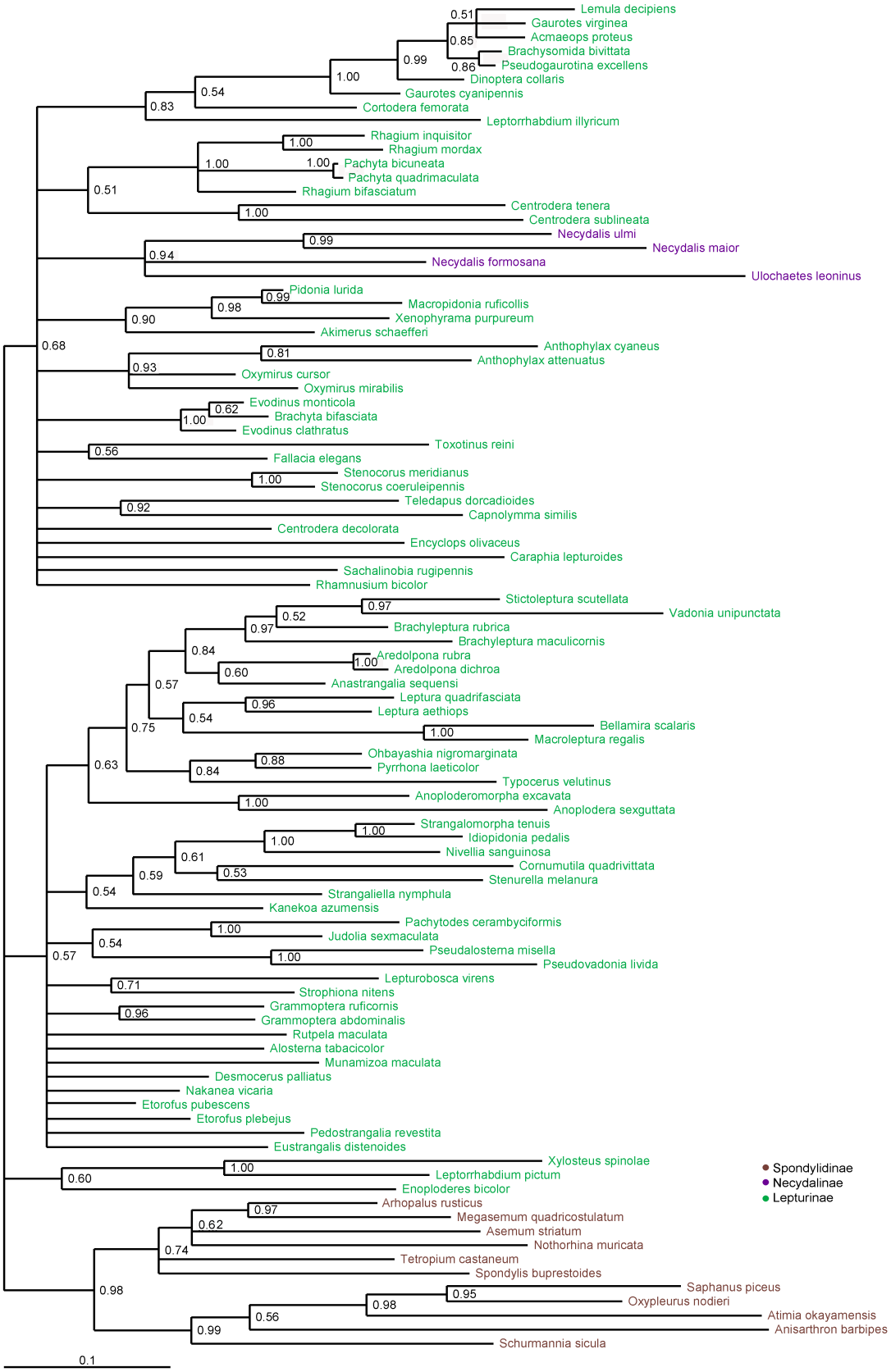
Většina starších autorů řadila do podčeledi Lepturinae i dnešní podčeleď Dorcasominae (= Apatophyseinae; Švácha & Lawrence, in prep.), kterou po objevení larvy osamostatnil Danilevsky (1979b), ale která ani recentně nebyla mnoha autory akceptována. Dva rody v našem kladogramu (*Apatophysis* a *Tsivoka*) jsou první známé sekvence této podčeledi a vycházejí do skupiny podčeledí Prioninae, Parandrinae a Cerambycinae (viz výše) (Obr. 3, 5–7), což je v souladu s larválními znaky. Všechny čtyři podčeledi této skupiny jsou bohužel velmi špatně zastoupeny; Parandrinae jen jedním druhem a zbylé tři nevycházejí monofyletické.

Zejména američtí autoři (např. Linsley & Chemsak, 1972; Monné, 2006) obvykle řadí Necydalini jako tribus podčeledi Lepturinae, zatímco mnozí jiní autoři uznávají v poslední době samostatnou podčeleď Necydalinae (např. Vives, 2000, a mnoho jiných; viz Tab. 2). Pokud jsou v našich kladogramech i jiné podčeledi než Necydalinae a Lepturinae, vychází první z nich jako vnitřní skupina druhé (Obr. 5, 6, 8, 9), ale do různých pozic. V kladogramu sestaveném jen ze zástupců těchto dvou

Tabulka 2. Tribální klasifikace vybraných rodů podčeledi Lepturinae podle různých autorů (nepříbuzné taxony chybně umístěné v Lepturinae jsou vynechány).

Rod	Linsley & Chemsak 1972	Cherepanov 1979	Sama 1988	Švácha & Danilevsky 1989	Ohbayashi et al. 1992	Monne & Giesbert 1995	Althoff & Danilevsky 1997	Vives 2000	Jiang & Li 2001	Danilevsky současná (www)
Necydalis										
Xylosteus										
Leptorrhabdium										
Centrod. decol.										
Oxymirus										
Anthophylax										
Rhamnusium										
Enoploderes										
Sachalinobia										
Xenoleptura										
Centrod. spurca										
Rhagium										
Stenocorus										
Pachyta										
Evodinus										
Gaurotes etc.										
Acmaeops etc.										
Desmocerus										
Encyclops										
Pidonia etc.										
Cortodera										
Grammoptera										
Caraphia										
Pedostrangalia										
Etorofus										
Lepturobosca etc										
Anastrangalia										
Stictoleptura etc.										
Leptura										
Alosterna										
Strangalia										

●Necydalinae ●Necydalini ●Lepturini ●Rhagiini ●Stenocorini ●Xylosteini ●Desmocerini ●Oxymirini ●Encyclopini ●Nepojmenovaný ●Nepojmenovaný ●Nepojmenovaný



Obrázek 9. Kladogram (50% konsensus) vytvořený programem MrBayes. Model GTR s gamma-rozložením míry variace mezi pozicemi a s určitou nevariabilní částí. Posteriorní pravděpodobnost nad 0,5 je uvedena u jednotlivých uzlů. Strom byl vypočten ve 3 milionech generací. Strom zahrnuje podčeledi Necydalinae a Lepturinae a je zakořeněný celou podčeledí Spondylidinae. Návrat *Judolia* a *Pachytodes* do tribu Lepturini způsobil monofylii tohoto tribu (*Eustrangalis–Stictoleptura*), Necydalinae je vnitřní skupina Lepturinae, *Leptorrhabdium illyricum* se spojilo se skupinou *Cortodera–Lemula* a je velmi daleko od zbylých dvou druhů Xylosteini (*Xylosteus* a *L. pictum*).

podčeledí metodou Minimum Evolution v programu MEGA 4 však automatický "midpoint rooting" staví Necydalinae jako sesterskou skupinu k Lepturinae (Obr. 11). Naše data tedy k řešení tohoto problému nemohou významně přispět.

V některých kladogramech vychází podčeleď Spodylidinae uvnitř podčeledi Lepturinae s. l. (Obr. 5), ale zdá se, že je to způsobeno náhodnou afinitou určitých druhů. Pokud z analýzy vyřadíme triby Asemini a Spondylidini, zbylá část Spodylindinae většinou monofylii Lepturinae nenarušuje. Naše data nicméně nemohou být použita jako významná podpora monofylie Lepturinae + Necydalinae.

5.3.2. Tribální klasifikace Lepturinae

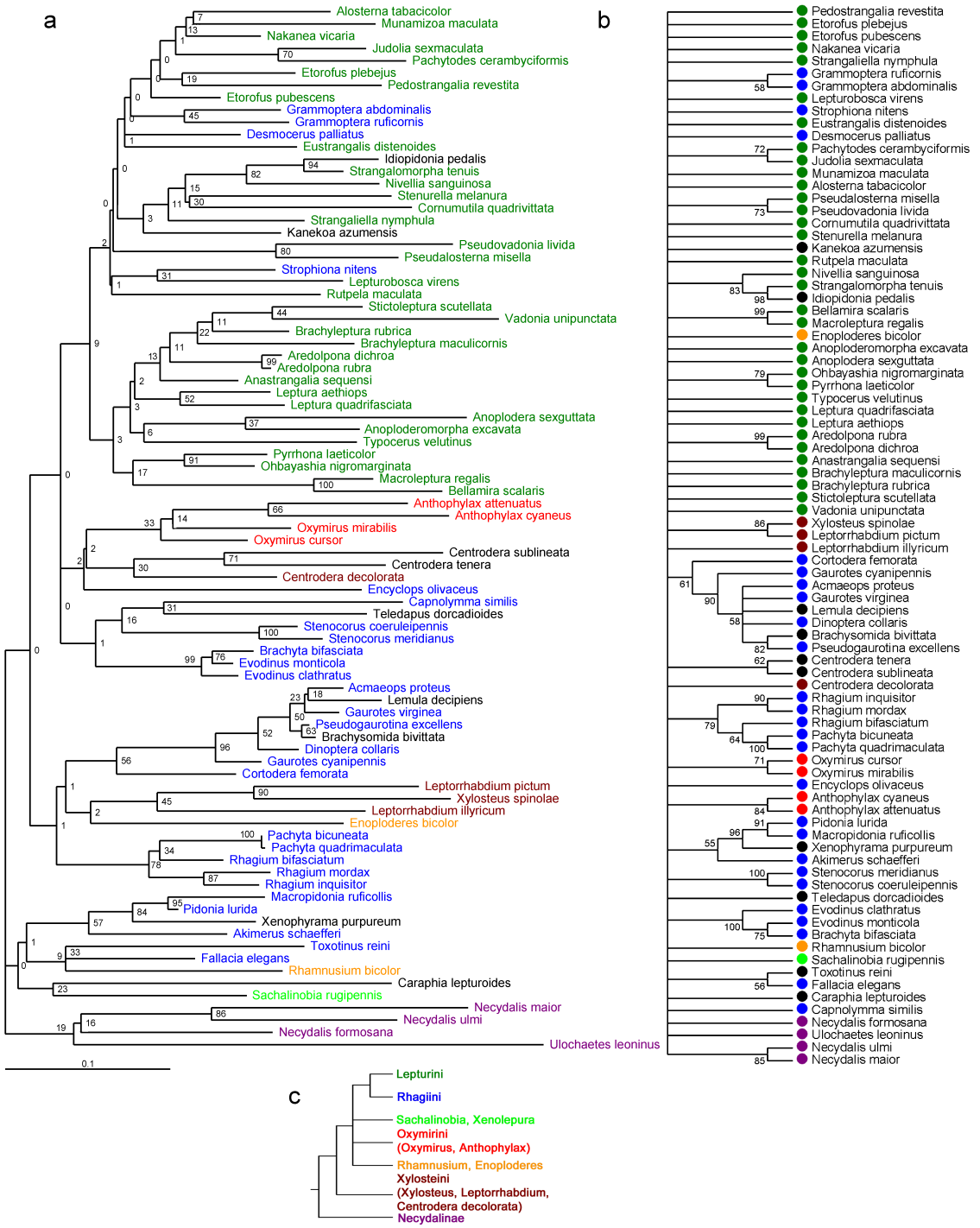
Rozdělení rodů do tribů je v podčeledi Lepturinae velmi neustálené (Tab. 2), ale jedinou prací, která se alespoň pokusila definovat triby larválními apomorfiemi je Švácha & Danilevsky, 1989. Obr. 10c ukazuje jimi navrženou příbuznost jednotlivých tribů (některé z nově vytvořených tribů nebyly pojmenovány, tribus obsahující rody *Oxymirus* a *Anthophylax* byl později pojmenován Oxymirini: Althoff & Danilevsky, 1997).

Z našich dat vyplývá:

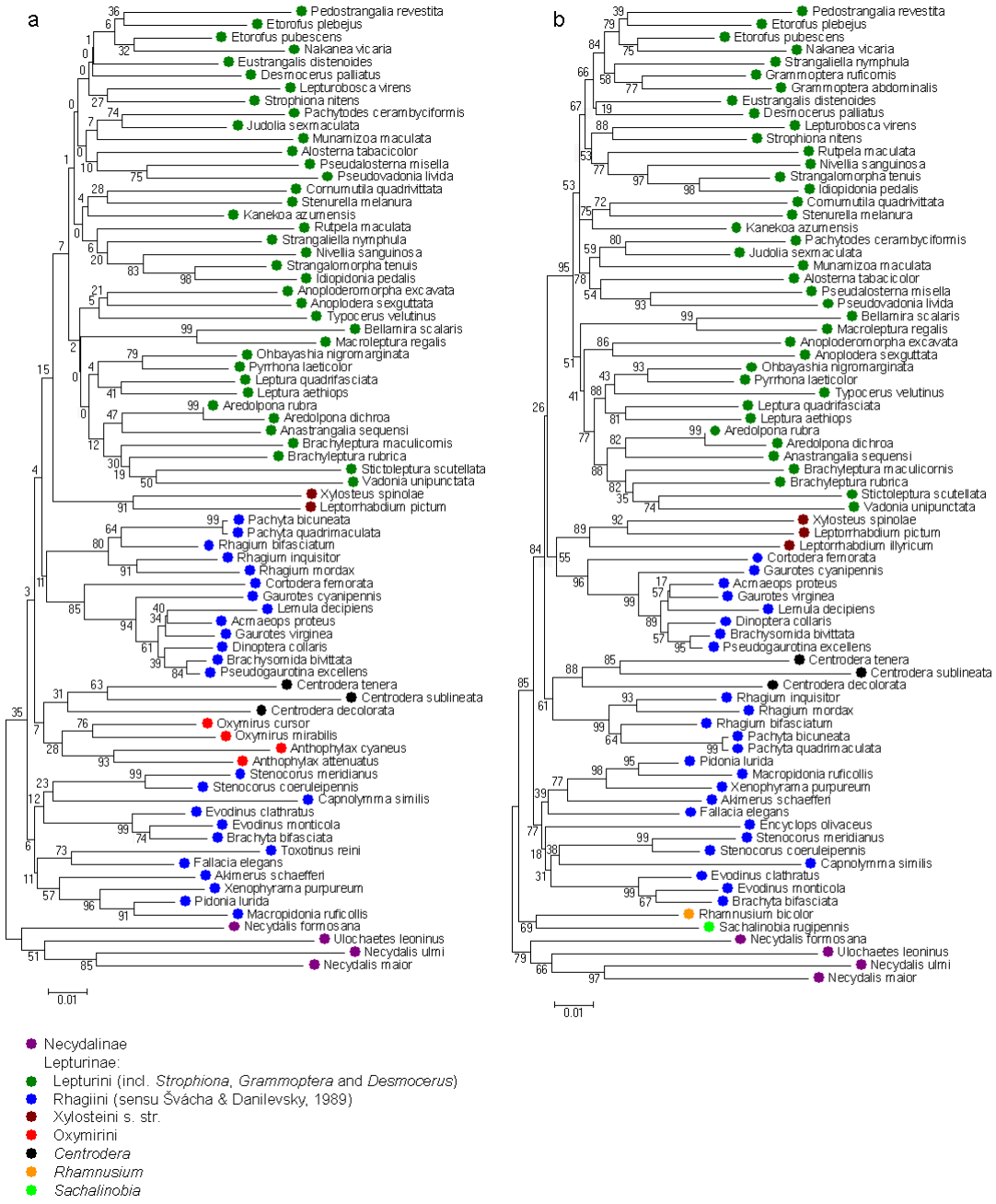
1) Tribus Lepturini často vychází monofyletický (s minimální hodnotou bootstrap, ale s poměrně vysokou hodnotou Interior Branch Index; Obr. 11). Tribus vždy obsahuje i rody *Desmocerus*, *Grammoptera* a *Strophiona*, které Švácha & Danilevsky umístili do tribu Rhagiini (Obr. 10). První z nich řadí američtí autoři do samostatného tribu Desmocerini (Linsley & Chemsak, 1972; Monné & Giesbert, 1995; rod *Desmocerus* se vyskytuje pouze v severní Americe), druhé dva pak většina autorů k rodům zde obsaženým v Lepturini, takže naše výsledky podporují jejich tradiční klasifikaci.

2) Tribus Rhagiini se nejčastěji rozpadá na nejméně dvě až tři oddělené skupiny (Obr. 11, 12), z nichž jedna je poměrně nestabilní (*Stenocorus* až *Macropidonia* v Obr. 11a, *Brachyta* až *Pidonia* v Obr. 11b, *Evodinus* až *Macropidonia* v Obr. 12a) a není monofyletická v Obr. 10a, který obsahuje všechny druhy podčeledi Lepturinae. Zbylé dvě jsou velmi silně podporovány (Obr. 10b) a jedna z nich obsahuje i rod *Cortodera*, který většina autorů řadí do tribu Lepturini a který Švácha & Danilevsky umístili do Rhagiini.

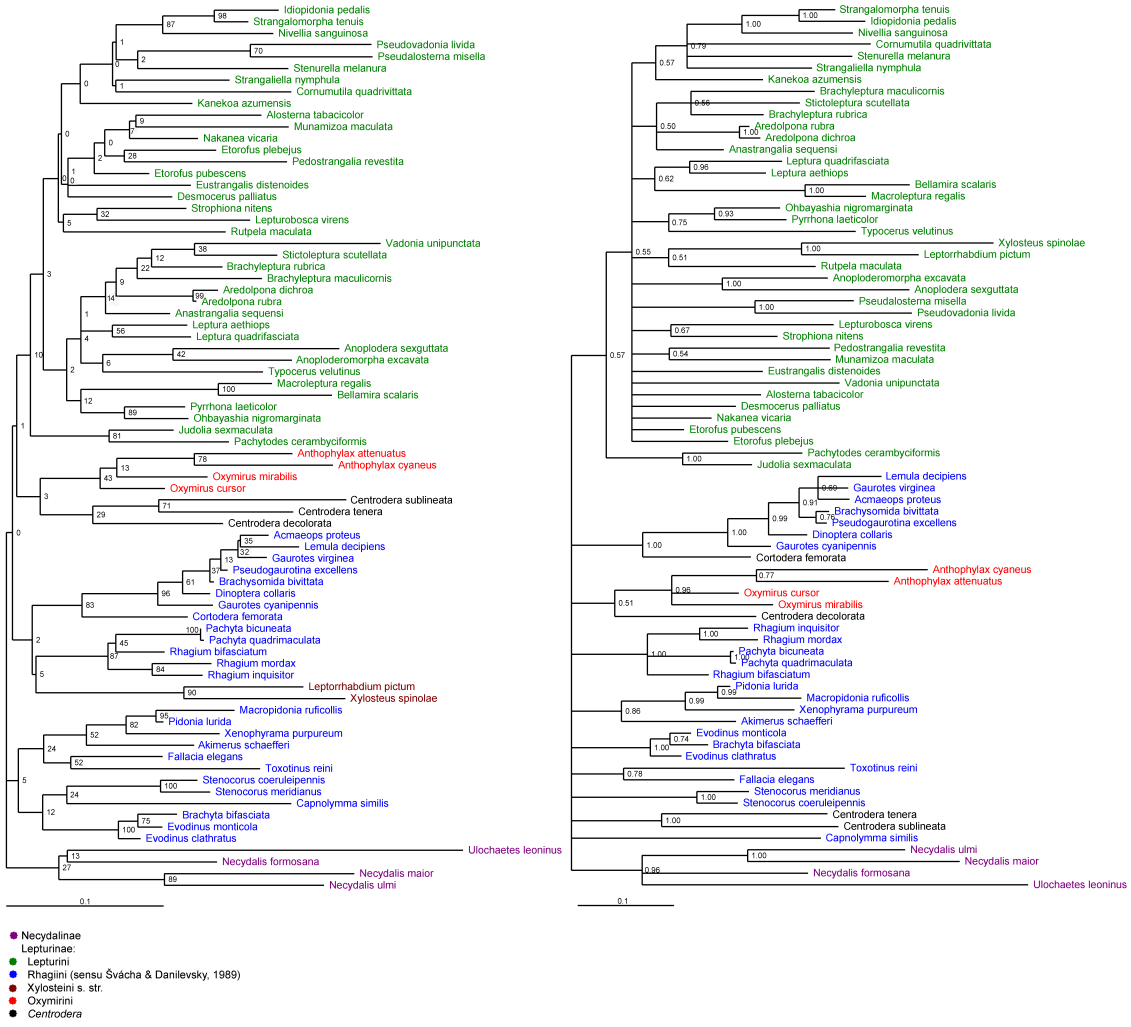
3) Rod *Centrodera* většinou neleží blízko tribu Xylosteini a tento tribus nevychází jako sesterský ostatním Lepturinae, pozice obou skupin je variabilní.



Obrázek 10. Všichni Necydalinae a Leptruinae. Barvy jsou použity podle předběžného návrhu tribální klasifikace (c) v práci Švácha & Danilevsky, 1989, včetně pravděpodobně nesprávného umístění *Grammoptera*, *Strophiona* a *Desmocerus* v Rhagiini; černě obarvené druhy nebyly zahrnuty do analýzy výše uvedenými autory, *Xenoleptura* není zařazena do naší analýzy. (a) Optimální strom metodou Maximum Likelihood, model GTR, bootstrap 100x. Necydalinae jsou použiti jako kořen (i když jsou možná vnitřní skupinou) pro porovnání s kladogramy z Obr. 11. (b) Minimum Evolution, model Log-Det s nastavením Pairwise deletion, bootstrap 1000x, kondenzovaný strom pro bootstrap >50; tyto skupiny jsou přítomny prakticky ve všech analýzách s malými výjimkami (např. *Oxymirus*).



Obrázek 11. Optimální strom Minimum Evolution, model Log-Det, nastavení Pairwise deletion, midpoint rooting. Necydalinae a vybraní Lepturinae, rody *Caraphia*, *Enoploderes* a *Teledapus*, vykazující velmi variabilní umístění v různých analýzách, jsou vynechány v obou datových souborech. Rhagiini podle práce Švácha & Danilevsky (1989) až na rody *Desmocerus*, *Strophiona* a *Grammoptera* zde již označené zeleně (Lepturini) v souladu s tím, jak vycházejí v našich analýzách. (a) Vyřazen rod *Grammoptera* (přitahující *Strangaliella*), *Rhamnusium* a *Sachalinobia* (zvláště první je silně přitahován rodem *Toxotinus*), *Encyclops* (přitahován Oxymirini, zvláště *Anthophylax*), a *Leptorrhabdium illyricum* (přitahované *Cortodera* atd.); bootstrap 1000x. (b) Vyřazen tribus Oxymirini (aby bylo možno začlenit *Encyclops*) a *Toxotinus* (pro začlenění *Rhamnusium*); bootstrap interior branch index pro 1000 replikací. Významné rozdíly mezi podporou týchž skupin oběma indexy (např. Lepturini 7 versus 95, interior branch index 95 a více je považován za dobrou podporu větve). Tento rozdíl je pravidelný a není způsoben drobnými odlišnostmi datového souboru.



Obrázek 12. Fylogenetický strom znázorňující stejný datový soubor jako na Obr. 11a. Kladogramy jsou zakořeněny Necydalinae pro porovnání s Obr. 11. (a) Optimální strom Maximum Likelihood, model GTR, bootstrap 100x. (b) MrBayes, model GTR s gamma-rozložením míry variace mezi pozicemi a s určitou nevariabilní částí, 50% konsensus; 6 millionů generací, nepříliš uspokojivý kladogram s Xylosteini jako sesterskou skupinou *Rutpela* uvnitř Lepturini.

4) Spojení rodů *Oxymirus* Starého světa a *Anthophylax* Nového světa do jednoho tribu Oxymirini je podpořeno v několika kladogramech (Obr. 3, 6, 7, 9, 10a, 11a, 12).

5) Příbuznost rodů *Rhamnusium* a *Enoploderes* se nepotvrdila, pozice obou je značně nestálá. Umístění rodu *Sachalinobia* je v našich kladogramech rovněž variabilní.

5.4. Spolehlivost kladogramů a vhodnost použité sekvence 16S rDNA

Bootstrap většiny bazálních nodů našich kladogramů je velmi nízký. Dobře podporované skupiny jsou na Obr. 10b (výjimkou je rod *Oxymirus*, který je nedostatečně podporovaný v bayesiánských kladogramech a dokonce parafyletický na

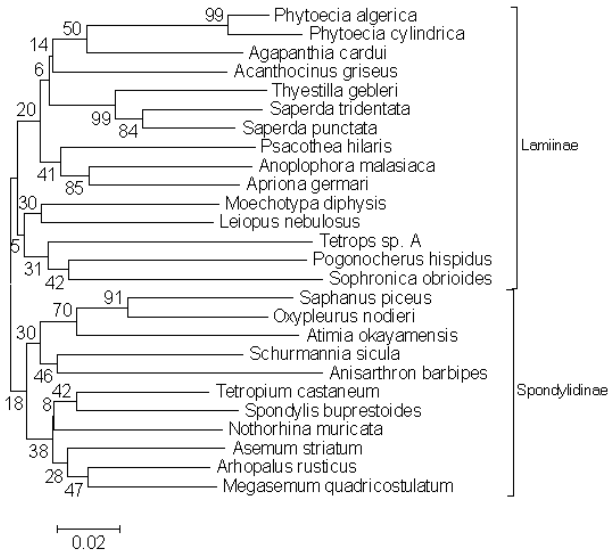
obr. 10a, což souhlasí s larvální morfologií – Švácha & Danilevsky, 1989, přeřadili druh *Oxymirus mirabilis* do rodu *Anthophylax*). Přesto některé skupiny s velmi nízkým bootstrapem vycházely ve většině kladogramů monofyletické, případně byla jejich monofylie narušena náhodnými afinitami jednotlivých druhů (typicky tribus Lepturini podčeledi Lepturinae). Sitnikova et al. (1995) ukazují situace, kdy bootstrap je zřejmě příliš konzervativní hodnocení spolehlivosti kladogramu, a navrhují Interior Branch Test jako možnou alternativu pro distanční metody. Bootstrap Interior Branch Test (Nei & Kumar, 2000: 170), který metodou bootstrapu testuje kladnou nenulovou délku vnitřních větví optimálního stromu vzniklého z kompletních dat, je implemetován v programu MEGA 4 a skutečně u našich Minimum Evolution kladogramů poskytuje značně vyšší hodnoty (srovnej Obr. 11a a 11b). Rovněž "Bayesian Posterior Probabilities" jsou u stejných skupin (často výrazně) vyšší než klasický bootstrap (srovnej Obr. 6 a 7 nebo 12a a 12b).

Z předkládané práce plyne, že použitá sekvence obsahuje významné množství fylogenetické informace. Získané kladogramy z velké části podporují současné představy o vyšší klasifikaci včetně některých dosud ne všeobecně akceptovaných novinek – např. nepříbuznost podčeledí Lepturinae a Dorcasominae. V některých případech jasně podporují jednu ze dvou alternativních hypotéz (rody *Strophiona* a *Grammoptera* v tribu Lepturini a nikoliv Rhagiini) nebo dokonce předkládají hypotézu novou (apomorfní rod *Desmocerus* nebyl nikdy klasifikován v tribu Lepturini s. str., kam vždy vychází v této práci).

Přesto je jasné, že kladogramy založené na jedné krátké sekvenci nebudou příliš spolehlivé, především při velkém počtu velmi odlišných druhů. Pokud snížíme počet vyšších taxonů v analýze, výsledky včetně statistické podpory větví se zlepší (Obr. 13). Dobré pokrytí skupin materiálem je ale velmi důležité – "ředění" druhů uvnitř vyšších taxonů může vést k rozpadu skupiny náhodnými afinitami (Obr. 8; podobně dopadne analýza metodou Maximum Likelihood a nejde tedy o artefakt distanční metody).

5.5. Hodnocení metod použitých ke konstrukci kladogramu

Základní analýza byla prováděna distanční metodou Minimum Evolution pro její rychlost a pro uživatelskou přívětivost programu MEGA 4. Metoda Maximum Likelihood dává v mnohém podobné výsledky (srovnej např. Obr. 11a a 12a), včetně některých náhodných afinit, které narušují homogenitu podčeledí (např. Obr. 5a,b a 6,



Obrázek 13. Ačkoliv se Lamiinae a Spondylidinae mísí v kladogramu všech Cerambycidae připraveném metodou Minimum Evolution (Obr. 5a), tatáž metoda je dokáže rozlišit, pokud jsou tyto dvě podčeledi analyzovány samostatně, i když podčeleď Lamiinae je velmi špatně pokryta materiálem a některé vnitřní asociace jsou pochybné. Bootstrap 1000x.

ale monofylie Spondylidinae je i v kladogramu všech Cerambycidae, Obr. 6, zachována). Pro časovou náročnost bylo v programu MrBayes provedeno jen několik analýz a nebylo možno experimentovat s různými nastaveními. Výsledky jsou v mnohých rysech shodné s předchozími včetně některých náhodných afinit (Obr. 7, 9, 12b). Konsensuální kladogramy mají malé rozlišení (odpovídá malé podpoře zejména bazálních větví v kladogramech připravených ostatními metodami). V provedených analýzách ani po několika milionech generací neklesla "standard deviation of split frequencies" pod doporučených 0.01. (odpovídá malé podpoře zejména bazálních větví v kladogramech připravených ostatními metodami). V některých případech obsahují kladogramy asociace, které jsou podle školitele nepochybně nesprávné, např. úplné vyčlenění rodů *Pachytodes* a *Judolia* z tribu Lepturini (rody *Eustrangalis* až *Leptura*) v Obr. 7, rozpad tribu Xylosteini (rody *Xylosteus* a *Leptorrhabdium*) v Obr. 7 a 9, nebo umístění dvou ponechaných druhů tohoto tribu uprostřed Lepturini jako sesterské skupiny rodu *Rutpela* v Obr. 12b. Tyto asociace se nikdy v takové míře nevyskytly v kladogramech připravených zbylými dvěma metodami, ačkoliv podobné tendence existují (viz např. účinek návratu *Leptorrhabdium illyricum* do kladogramu 11b, srovnej s 11a).

6. ZÁVĚR

Práce používá cca. 510 bází dlouhou část mitochondriální 16S rDNA ke studiu fylogeneze brouků čeledi Cerambycidae zejména podčeledí Spondylidinae a Lepturinae. Získali jsme sekvence 103 druhů, dalších 28 druhů bylo získáno z databáze GenBank. K vytvoření kladogramů byly použity metody Minimum Evolution, Maximum Likelihood a Bayesiánská analýza. Výsledky podporují nepříbuznost podčeledí Lepturinae a Dorcasominae (druhá je některými autory stále klasifikována uvnitř první). Podčeleď Spondylidinae, pro kterou nejsou uspokojivé morfologické apomorfie, je monofyletická ve většině kladogramů výjimkou některých připravených metodou Minimum Evolution. Rod *Spondylis*, který někteří autoři umísťují do samostatné podčeledi, vychází v rozlišených kladogramech jako vnitřní skupina tribu Asemini. Naše výsledky nemohou dát jasnou odpověď na otázku, zda mají být Necydalinae (jejichž monofylie je podpořena) klasifikováni jako samostatná podčeleď nebo tribus podčeledi Lepturinae, což jsou dvě v současnosti používané alternativy. V rámci podčeledi Lepturinae s. str. jsou většinou monofyletické triby Lepturini v modifikovaném rozsahu (včetně rodů *Desmocerus*, *Grammoptera* a *Strophiona*) a Oxymirini. Xylosteini s. str. (bez rodu *Centrodera*) nevychází jako monofyletická skupina v kladogramech vytvořených programem MrBayes. Monofylie tribu Rhagiini není podpořena. Použitá krátká sekvence není dostačující pro zhodnocení pozice některých izolovaných, pravděpodobně bazálních rodů (např. *Rhamnusium*, *Sachalinobia*, *Caraphia*, *Centrodera*, *Teledapus*, *Enoploderes*) a pro určení vzájemých vztahů vyšších taxonů uvnitř podčeledi Lepturinae.

7. LITERATURA

Althoff J., Danilevsky M. L., 1997: *A Check-list of longicorn beetles (Coleoptera, Cerambycidae) of Europe*. Slovensko Entomološko Društvo Štefana Michielija, Ljubljana, 64 pp.

Cherepanov A. I., 1979: *Longhorn beetles of Northern Asia (Prioninae, Disteniinae, Lepturinae, Aseminae).* Nauka, Novosibirsk, 471 pp.

Danilevsky M. L., 1979a : Morfo-adaptive ways of evolution of the larvae of longhorn beetles and phylogenetic relations of the basical groups of the family. In: *Insects - damaging wood and their entomophages*. Nauka, Moscow, pp. 24–43. [In Russian]

Danilevsky M. L., 1979b: Description of the female, pupa and larva Of Apatophysis pavlovskii Plav. and discussion of systematicposition of the genus Apatophysis Chevr. (Coleoptera, Cerambycidae). *Ent. Obozr*. 58: 821–828. [In Russian]

Farrell B. D., 1998: „Inordinate fondness“ explained: Why are there so many beetles? *Science* 281: 555–559.

Farrell B. D., Sequeria A.S., 2004: Evolutionary rates in the adaptive radiation of beetles on plants. *Evolution* 58: 1984–2001.

Gomez-Zurita J., Funk D. J., Vogler A. P., 2006: The evolution of unisexuality in Calligrapha leaf beetles: Molecular and ecological insights on multiple origins via interspecific hybridization. *Evolution* 60: 328–347.

Gomez-Zurita J., Hunt T., Kopliku F., Vogler A. P., 2007: Recalibrated tree of leaf beetles (chrysomelidae) indicates independent diversification of angiosperms and their insect herbivores . *PLoS ONE* 2: E360.

Gomez-Zurita J., Hunt T., Vogler A. P., 2007: Multilocus ribosomal RNA phylogeny of the leaf beeles (Chrysomelidae). *Cladistics* 23: 1–17

Guindon S., Gascuel O., 2003: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol*. 52: 696–704.

Hoelzel A. R., 1998: *Molecular Genetic Analysis of Population*, *Second editon*. Oxford University Press, New York, 445 pp.

Jiang S., Li Ch., 2001: Coleoptera, Cerambycidae, Lepturinae. In: *Fauna Sinica, Vol. 21*. Science Press, Beijing, 296 pp.

Linsley E. G., 1961: Cerambycidae of North America, Part I. Introduction. *Univ. Calif. Publ. Entomol.* Vol. 18, 135 pp.

Linsley E. G., Chemsak J. A., 1972: Cerambycidae of North America, Part VI, No. 1. Taxonomy and classification of the subfamily Lepturinae. *Univ. Calif. Publ. Entomol.* Vol. 69, 138 pp.

Monné M. A., 2006: Catalogue of the Cerambycidae (Coleoptera) of the Neotropical Region. Part III. Subfamilies Parandrinae, Prioninae, Anoplodermatinae, Aseminae, Spondylidinae, Lepturinae, Oxypeltinae, and addenda to the Cerambycinae and Lamiinae. *Zootaxa* 1212, 244 pp.

Monné M. A., Giesbert E.F., 1995: *Checklist of the Cerambycidae and Disteniidae (Coleoptera) of the Western Hemisphere*. Wolfsgarden Books, Burbank, CA, 419 pp.

Nakamura S., 1981: Morfological and taxonomic studies of the cerambycid pupae of Japan (Coleoptera: Cerambycidae). *Misc. Rep. Hiwa Mus. Nat. Hist*. 20: 1–159.

Napp D. S., 1994: Phylogenetic relationships among the subfamilies of Cerambycidae (Coleoptera–Chrisomeloidea). *Revista Bras. Entomol.* 38: 265–419.

Nei M., Kumar S., 2000: *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, 333 pp.

Ohbayashi N., Sato M., Kojima K., 1992: *An Illustrated Guide to Identification of Longicorn Beetles of Japan.* Tokai University Press, Tokyo, 697 pp.

Saito S., Saito A., 2003a: Molecular phylogeny analysis of the subfamily Lepturinae (Coleoptera, Cerambycidae). *Konchu to Shizen (Insects and Nature)* 38(11): 17–20. [In Japanese]

Saito S., Saito A., 2003b: An attempt at a phylogenetic analysis of Pidonia. *Proceedings of the Coleoptera DNA workshop at the 16th Symposium of the Japanese Society of Coleopterology*. Fukuoka, pp. 2–12. [In Japanese]

Saito S., Saito A., Kim C.-G., Su Z-H., Osawa S., 2002: Phylogeny of the Leptura arcuata complex (Coleoptera, Cerambycidae) as deduced from mitochondrial ND5 gene sequences. *Spec. Bull. Jpn. Soc. Coleopterol.* 5: 381–391.

Sama G., 1988: Coleoptera Cerambycidae. Catalogo topologico e sinonimoco. Fauna d'Italia Vol. XXVI. Calderini, Bologna, 216 pp.

Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P., 1994: Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Consetved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann. Entoml. Soc. Am*. 87(6): 651–701.

Sitnikova T., Rzhetsky A., Nei M., 1995: Interior-branch and bootstrap test of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 12(2): 319–333.

Stewart, J. B., Beckenbach, A. T., 2003: Phylogenetic and genomic analysis of the complete mitochondrial DNA sequence of the spotted asparagus beetle Crioceris duodecimpunctata. *Mol. Phylogenet. Evol*. 26: 513–526.

Švácha P., Danilevsky M. L., 1987: Cerambycoid larvae of Europe and Soviet Union (Coleoptera, Cerambycoidea). Part I. *Acta Univ. Carol. (Biol.)* 30[1986](1–2): 1–205.

Švácha P., Danilevsky M. L., 1989: Cerambycoid larvae of Europe and Soviet Union (Coleoptera, Cerambycoidea). Part III. *Acta Univ. Carol. (Biol.)* 32[1988]: 1–176.

Švácha P., Lawrence J. F., in prep.: Cerambycidae. In: Beutel G., Leschen R.A.B. (eds): Coleoptera, Beetles. Vol. 3. Handbook of Zoology Vol. IV Part 38. Walter de Gruyter, Berlin, New York.

Švácha P., Wang J.-J., Chen S.-C., 1997: Larval morphology and biology of Philus antennatus and Heterophilus punctulatus, and systematic position of the Philinae (Coleoptera: Cerambycidae and Vesperidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* 33: 323–369.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007: MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol*. 24: 1596–1599.

Tamura K., Kumar S., 2002: Evolutionary distance estmation under heterogenous substitution pattern among lineages. *Mol. Biol. Evol.* 19:1727–1736.

Villiers A., 1978: Cerambycidae. *Faune de coléoptereres de France I (Encyclopédie entomologique XLII)*. P. Lechevalier, Paris, 636 pp.

Vives E., 2000: Coleopera, Cerambycidae. *Fauna Iberica, Vol. 12.* Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, 716 pp.

Internetové zdroje:

National Center for Biotechnology Information (BLAST, GenBank): http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Danilevsky M. L.: **C**erambycidae of the former USSR. A checklist. http://www.cerambycidae.narod.ru/ussr.htm

8. PŘÍLOHA

Příloha 1. Seznam studovaných druhů a lokalit jejich sběru		
Druhy	Podčeleď	Lokalita
Aegosoma scabricorne	Prioninae	SK, Štúrovo
Eurypoda unicolor		Japonsko, Kochi Pref, Cape Ashizuri
Prionus coriarius		CZ, Hluboká n/Vlt.
Tragosoma depsarium		CZ, Šumava, Jelení Vrchy
Parandra brunnea	Parandrinae	Kanada Quebec, Oka
Apatophysis barbara	Dorcasominae	S. Tunis, Blidet
Tsivoka sp.		Madagaskar, Moramanga
Anaglyptus mysticus	Cerambycinae	CZ, Hluboká n/Vlt.
Molorchus minor		CZ, Č. Budějovice
Phymatodes testaceus		CZ, Hluboká n/Vlt.
Acanthocinus griseus	Lamiinae	CZ,Č. Budějovice
Leiopus nebulosus		CZ, Hluboká n/Vlt.
Phytoecia cylindrica		SK, Štúrovo, Hegyfarok
Pogonocherus hispidus		CZ, Č. Budějovice
Saperda punctata		SK, Štúrovo, Bajtava
Tetrops sp. A		SK, Štúrovo, Chlaba
Anisarthron barbipes	Spondylidinae	CZ, Hluboká n/Vlt.
Arhopalus rusticus		CZ, Hluboká n/Vlt.
Asemum striatum		CZ, Šumava, Lenora
Atimia okayamensis		Japonsko, Tokushima Pref., Itano-gun, Donari-cho
Megasemum quadricostulatum		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Tsurugi
Nothorhina muricata		CZ, Třeboň
Oxypleurus nodieri		Italie, Sicilie, Mt. Etna: Pineta di Linguaglossa
Saphanus piceus		CZ, Č. Krumlov
Schurmannia sicula		Italie, Sicilie, Piano Zucchi
Spondylis buprestoides		CZ, Hluboká n/Vlt.
Necydalis formosana	Necydalinae	Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Ohtaki
Necydalis maior		CZ, Hluboká n/Vlt.
Ulochaetes leoninus		USA, Kern Co., Mt. Pinos Summit
Acmaeops proteus	Lepturinae	Kanada, Quebec, Oka
Akimerus schaefferi		SK, Štúrovo, Kováčov
Alosterna tabacicolor		CZ, Broumy
Anoplodera sexguttata		CZ, Hluboká n/Vlt.
Anoploderomorpha excavata		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Takashiro
Anthophylax attenuatus		USA, Essex Co., Whiteface Mt.
Anthophylax cyaneus		Kanada, Quebec, Charlesbourg
Aredolpona rubra		CZ, Hluboká n/Vlt
Bellamira scalaris		Kanada, Quebec, Eardley
Brachysomida bivittata		Kanada, Quebec, St-Lambert-de-Levis
Brachyta bifasciata		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Tsurugi
Capnolymma similis		Thajsko, Prachuap Khiri Khan Prov., Hua Hin, Khao Hin Lek Phai
Caraphia lepturoides		Japonsko Tokushima MtBizan
Centrodera decolorata		Kanada, Quebec, Oka
Centrodera sublineata		USA, Ohio, Ross County, Scioto Trail State Park
Centrodera tenera		USA, California, San Diego co.
Cornumutila quadrivittata		CZ, Jeseníky, Červenohorské sedlo
Cortodera femorata		CZ,Veselí n/L. (Ruda)
Desmocerus palliatus		Kanada, Quebec, Lac St-Charles

Dinoptera collaris	Lepturinae	SK, Šumava, Staré Hory
Encyclops olivaceus		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Mimine
Enoploderes bicolor		Japonsko, Tokushima Pref., Kaminaka-cho, Kaikawa
Etorofus plebejus		Kanada, Quebec, Ste-Agathe-des-Monts
Eustrangalis distenoides		Japonsko Tokushima MtTohgu, Kalopanax
Evodinus clathratus		SK, Donovaly
Evodinus monticola		Kanada, Quebec, St-Lambert-de-Levis
Fallacia elegans		Abchazie, Mamdzyshkha Mt.
Gaurotes cyanipennis		Kanada, Quebec: Oka
Gaurotes virginea thalassina		CZ,Veselí n/L. (Ruda)
Grammoptera abdominalis		SK, Štúrovo, Hegyfarok
Grammoptera ruficornis		CZ, Broumy
Idiopidonia pedalis		Kanada, Quebec, Lévis
Judolia sexmaculata		CZ, Šumava, Lenora
Kanekoa azumensis		Japonsko, Tokushima Pref., Shousanji Temple
Lemula decipiens		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Tsurugi
Leptura quadrifasciata		CZ, Česke Budějovice
Lepturobosca virens		SK, Donovaly
Leptorrhabdium illyricum		Řecko, Florina
Leptorrhabdium pictum		USA, NC, Haywood Co., GSMNP, Purchase Knob
Macroleptura regalis		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Tsurugi
Macropidonia ruficollis		Japonsko, Nagano Pref., Kawakami-mura, Mt.Azusa
Munamizoa maculata		Japonsko, Tokushima Mt Tsurugi, Tsuga
Nakanea vicaria		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Takashiro
Nivellia sanguinosa		CZ, Broumy
Ohbayashia nigromarginata		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Kumoso
Oxymirus cursor		CZ, Hluboká n/Vlt
Oxymirus mirabilis		Rusko, Krasnodar Reg., Shchetka Mt.
Pachyta quadrimaculata		SK, Šumava, Staré Hory
Pachytodes cerambyciformis		CZ, Broumy
Pedostrangalia pubescens		SK, Velká Fatra, Valentová
Pedostrangalia revestita		CZ, Veselí n/L. (Ruda)
Pidonia lurida		CZ, Broumy
Pseudalosterna misella		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Takashiro
Pseudogaurotina excellens		SK, Kralovany, Bystrička
Pseudovadonia livida		CZ, Č. Budějovice
Pyrrhona laeticolor		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Ohtaki
Rhagium bifasciatum		CZ, Č. Budějovice
Rhagium inquisitor		CZ, Veselí n/L. (Ruda)
Rhagium mordax		CZ, Hluboká n/Vlt.
Rhamnusium bicolor		CZ, Č. Budějovice
Rutpela maculata		CZ, Hluboká n/Vlt.
Sachalinobia rugipennis		Kanada, Quebec, Berthierville
Stenocorus coeruleipennis		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Takashiro
Stenocorus meridianus		SK, Velká Fatra, Staré Hory
Stenurella melanura		CZ, Hluboká n/Vlt.
Stictoleptura scutellata		CZ, Hluboká n/Vlt.
Strangaliella nymphula		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Takashiro
Strangalomorpha tenuis		Japonsko, Tokushima Pref., Mt. Takashiro
Strophiona nitens		Kanada, Quebec: Notre-Dame-de-l'Ile-Perrot
Teledapus dorcadioides		S. Indie, Uttarpradesh, Mandoli-Lohajang
Toxotinus reini		Japonsko, Kyushu, Oita Pref., Kokonoe-machi, Teratoko
Vadonia unipunctata		SK, Kamenín (Pavlová)
Xenophyrama purpureum		Japonsko, Honshu, Hyogo Pref., Yabu-shi, Mt. Hyonosen
Xylosteus spinolae		Itálie, Mt Mataiur

Příloha 2. Druhy použité z databáze GenBank			
Druh	Podčeleď	Acc. No.	Reference
Prionus insularis	Prioninae	AJ841409	Bae et al., nepublikováno
Titanus giganteus		AJ841414	Gomez-Zurita et al., 2007a
Chloridolum lameeri	Cerambycinae	DQ471298	Kim. et al., nepublikováno
Chloridolum viride		DQ471299	Kim et al., nepublikováno
Chlorophorus diadema		AF332934	Bae et al., nepublikováno
Demonax transilis		AF332933	Bae et al., nepublikováno
Elaphidion mucronatum		AJ841404	Gomez-Zurita et al., 2007a
Hylotrupes bajulus		DQ861333	An et al., nepublikováno
Massicus raddei		AF332935	Bae et al., nepublikováno
Plagionotus christophi		AF332932	Bae et al., nepublikováno
Trichoferus campestris		Q861332	An et al., nepublikováno
Agapanthia cardui	Lamiinae	AJ841405	Gomez-Zurita et al., 2007a
Anoplophora malasiaca		AF332929	Bae et al., nepublikováno
Apriona germari		DQ861330	An et al., nepublikováno
Moechotypa diphysis		AF332926	Bae et al., nepublikováno
Phytoecia algerica		AJ841407	Gomez-Zurita et al, 2007a
Psacothea hilaris		AF332928	Bae et al., nepublikováno
Saperda tridentata		AJ841408	Gomez-Zurita et al., 2007a
Sophronica obrioides		AF332924	Bae et al., nepublikováno
Thyestilla gebleri		AF332925	Bae et al., nepublikováno
Tetropium castaneum	Spondylidinae	DQ861331	An et al., nepublikováno
Necydalis ulmi	Necydalinae	AJ841412	Gomez-Zurita et al., 2007a
Anastrangalia sequensi	Lepturinae	AF332923	Bae et al., nepublikováno
Aredolpona dichroa*		AF332922	Bae et al., nepublikováno
Brachyleptura rubrica		AJ841409	Gomez-Zurita et al., 2007a
Leptura aethiops		AF332921	Bae et al., nepublikováno
Pachyta bicuneata		DQ861334	An et al., nepublikováno
Typocerus velutinus		AJ841410	Gomez-Zurita et al., 2007a

* V databázi GenBank pod názvem Corymbia rubra – tento druh se v Koreji nevyskytuje.

Příloha 3. Délka sekvence a poměr bází jednotlivých druhů (*Bellamira scalaris* a oba druhy rodu *Chloridolum* nebyly zahrnuty, protože sekvence jsou o několik bází kratší.

		T	C	A	G	Total
Lepturinae	Nivellia sanguinosa	38.6	9.2	36.5	15.7	510
	Kanekoa azumensis	40.0	8.5	36.2	15.4	508
	Cornumutila quadrivittata	39.7	9.0	37.1	14.1	509
	Strangalomorpha tenuis	39.8	8.7	36.2	15.2	505
	Idiopidonia pedalis	39.0	8.3	37.4	15.2	505
	Strangaliella nymphula	38.7	8.8	38.1	14.5	512
	Rutpela maculata	38.6	9.0	35.9	16.6	513
	Stenurella melanura	40.3	8.4	35.4	15.9	511
	Eustrangalis distenoides	40.7	8.6	35.6	15.1	509
	Pedostrangalia revestita	40.7	8.4	35.6	15.3	509
	Etorofus plebejus	37.5	8.7	37.7	16.2	507
	Etorofus pubescens	38.9	8.9	36.3	16.0	507
	Nakanea vicaria	40.8	8.9	33.7	16.6	507
	Desmocerus palliatus	39.6	9.1	35.2	16.1	508
	Grammoptera ruficornis	41.2	8.7	34.9	15.2	507
	Grammoptera abdominalis	39.7	8.8	35.6	15.9	509
	Munamizoa maculata	40.2	8.6	35.9	15.3	510
	Pachytodes cerambyciformis	39.6	9.1	35.5	15.8	507
	Judolia sexmaculata	40.0	8.5	36.6	14.9	505
	Lepturobosca virens	40.0	8.3	36.0	15.7	508
	Strophiona nitens	39.3	8.7	36.0	16.0	506
	Pseudalosterna misella	41.2	8.5	34.9	15.4	507
	Pseudovadonia livida	39.4	8.7	36.6	15.4	508
	Alosterna tabacicolor	42.1	8.5	34.4	15.0	508
	Anastrangalia sequensi	38.4	9.0	37.1	15.5	510
	Aredolpona rubra	40.2	8.3	36.8	14.7	505
	Aredolpona dichroa	40.4	8.4	35.7	15.5	510
	Brachyleptura maculicornis	40.8	8.6	35.4	15.2	512
	Brachyleptura rubrica	40.0	8.6	35.5	15.9	510
	Stictoleptura scutellata	39.7	8.6	36.0	15.7	509
	Vadonia unipunctata	40.5	8.2	37.2	14.2	514
	Anoploderomorpha excavata	39.5	8.5	36.2	15.8	506
	Anoplodera sexguttata	39.4	8.9	37.2	14.6	508
	Ohbayashia nigromarginata	41.1	8.5	35.4	15.0	508
	Pyrrhona laeticolor	40.7	8.4	36.6	14.3	511
	Leptura quadrifasciata	39.3	8.4	38.1	14.3	512
	Typocerus velutinus	37.8	8.4	38.0	15.7	510
	Leptura aethiops	38.8	8.6	37.6	14.9	510
	Macroleptura regalis	38.4	9.0	36.6	16.0	511
	Xylosteus spinolae	39.1	8.8	38.1	13.9	509
	Leptorrhabdium pictum	40.0	8.7	35.3	16.0	507
	Leptorrhabdium illyricum	40.9	9.0	35.4	14.7	511
	Centrodera tenera	40.9	8.2	36.4	14.6	514
	Centrodera decolorata	38.9	8.7	35.7	16.8	507
	Centrodera sublineata	40.5	8.4	34.5	16.6	513
	Teledapus dorcadioides	40.5	8.6	36.1	14.7	509
	Oxymirus cursor	40.4	8.5	36.0	15.2	508
	Oxymirus mirabilis	39.1	9.2	37.1	14.5	509
	Anthophylax cyaneus	39.9	8.6	37.3	14.1	509
	Anthophylax attenuatus	39.9	8.6	37.9	13.6	509
	Enoploderes bicolor	39.3	8.5	37.2	15.0	506
	Rhamnusium bicolor	38.0	8.4	39.7	13.9	511
	Sachalinobia rugipennis	39.3	8.4	37.7	14.5	509
	Caraphia lepturoides	39.6	9.2	36.1	15.0	512
	Stenocorus meridianus	37.9	8.3	38.3	15.5	509
	Stenocorus coeruleipennis	39.1	8.3	38.1	14.5	509
	Akimerus schaefferi	38.9	9.0	36.9	15.1	509
	Evodinus clathratus	40.1	8.6	35.4	15.9	511
	Evodinus monticola	39.8	8.6	34.1	17.5	510
	Brachyta bifasciata	40.6	8.6	34.5	16.3	510
	Capnolymma similis	40.1	8.6	35.4	15.9	511
	Pidonia lurida	41.1	8.7	36.0	14.2	508
	Macropidonia ruficollis	41.0	8.7	36.1	14.2	507
	Xenophyrama purpureum	38.9	8.7	38.5	14.0	507
	Toxotinus reini	39.4	8.9	37.6	14.2	508
	Fallacia elegans	40.2	8.7	36.6	14.6	508
	Encyclops olivaceus	41.4	9.3	35.0	14.3	505
	Rhagium inquisitor	40.4	8.7	35.2	15.7	508
	Rhagium mordax	40.2	8.7	35.6	15.6	508
	Rhagium bifasciatum	40.4	9.1	35.3	15.2	507
	Pachyta bicuneata	40.4	8.9	34.8	15.9	508
	Pachyta quadrimaculata	40.6	8.7	34.8	15.9	508
	Cortodera femorata	39.9	8.7	35.1	16.3	504
	Lemula decipiens	39.1	8.5	37.9	14.5	504
	Acmaeops proteus	38.8	8.7	38.2	14.3	505
	Dinoptera collaris	39.0	8.7	38.0	14.3	505
	Gaurotes cyanipennis	39.0	8.9	35.4	16.7	503

Lepturinae	Gaurotes virginea	39.5	8.7	37.3	14.5	504
	Brachysomida bivittata	38.9	8.7	37.9	14.5	504
	Pseudogaurotina excellens	38.9	8.7	38.5	13.9	504
Necydalinae	Necydalis formosana	39.3	7.7	37.9	15.0	506
	Necydalis ulmi	38.1	8.1	37.9	16.0	507
	Necydalis maior	38.9	8.5	38.7	14.0	507
	Ulochaetes leoninus	40.5	8.1	37.0	14.4	506
Spondylidinae	Tetropium castaneum	41.3	8.9	35.0	14.8	508
	Arhopalus rusticus	40.3	8.6	36.7	14.3	509
	Megasemum quadricostulatum	40.0	8.5	36.8	14.8	508
	Spondylis buprestoides	42.1	8.5	34.4	15.0	508
	Asemum striatum	40.1	8.6	36.3	14.9	509
	Nothorhina muricata	41.0	8.9	35.1	15.0	507
	Saphanus piceus	41.1	9.4	32.9	16.5	508
	Oxypleurus nodieri	40.6	9.0	33.9	16.5	510
	Atimia okayamensis	42.3	8.9	31.3	17.5	508
	Schurmannia sicula	41.1	8.5	35.2	15.2	508
	Anisarthron barbipes	41.3	8.1	35.3	15.3	504
Lamiinae	Moechotypa diphysis	39.2	8.9	35.6	16.3	508
	Leiopus nebulosus	42.5	9.1	33.0	15.4	506
	Acanthocinus griseus	40.2	8.3	35.8	15.7	503
	Anoplophora malasiaca	39.4	8.7	35.0	16.9	508
	Apriona germari	40.2	9.1	33.5	17.2	507
	Psacothea hilaris	40.0	9.1	33.5	17.4	507
	Pogonocherus hispidus	40.4	9.3	33.1	17.2	505
	Sophronica obrioides	40.6	9.3	33.3	16.8	505
	Tetrops sp. A	39.2	8.7	37.0	15.1	503
	Agapanthia cardui	38.5	9.3	34.9	17.4	507
	Saperda tridentata	38.6	9.1	33.7	18.7	508
	Saperda punctata	38.5	8.7	33.9	18.9	507
	Thyestilla gebleri	37.9	9.5	34.5	18.1	507
	Phytoecia algerica	39.3	8.7	36.9	15.2	507
	Phytoecia cylindrica	39.4	9.1	35.1	16.4	507
Prioninae	Tragosoma depsarium	37.5	12.4	31.0	19.1	507
	Eurypoda unicolor	39.0	10.3	32.5	18.2	505
	Prionus coriarius	39.3	10.3	32.8	17.6	506
	Prionus insularis	38.6	10.9	33.3	17.2	505
	Aegosoma scabricorne	38.1	10.7	34.1	17.2	507
	Titanus giganteus	39.6	11.1	27.5	21.8	513
Parandrinae	Parandra brunnea	38.0	10.6	32.7	18.6	510
Dorcasominae	Apatophysis barbara	36.6	11.2	33.5	18.8	511
	Tsivoka sp.	40.8	9.6	31.2	18.4	510
Cerambycinae	Massicus raddei	36.5	11.6	31.4	20.6	510
	Molorchus minor	41.3	9.5	31.4	17.8	506
	Plagionotus christophi	39.6	9.7	32.9	17.8	507
	Demonax transilis	39.8	9.8	32.9	17.5	510
	Chlorophorus diadema	40.3	9.9	30.6	19.2	504
	Anaglyptus mysticus	42.1	9.6	30.3	18.0	511
	Phymatodes testaceus	38.8	10.5	32.4	18.3	503
	Hylotrupes bajulus	40.4	9.1	33.7	16.9	508
	Trichoferus campestris	41.1	10.0	31.4	17.5	509
	Elaphidion mucronatum	39.4	11.5	29.1	20.0	505
	Avg.	39.8	9.0	35.4	15.9	507.9