

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie



Bc. Dominik Vondráček

**Populační struktura zlatohlávka tmavého *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) a
fylogeneze rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842**

**Population structure of flower chafer *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) and
phylogeny of the genus *Oxythyrea* Mulsant, 1842**

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Petr Janšta

Praha 2012

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci „Populační struktura zlatohlávka tmavého *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) a fylogeneze rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842“ vypracoval samostatně s použitím citované literatury.

V Praze 27. 8. 2012

podpis:

Poděkování

Rád bych zde poděkoval mému školiteli Petru Šípkovi za vedení této práce. Vždy mi byl ochoten poradit a pomoci vyřešit různá úskalí, ve kterých jsem se s diplomovou prací ocitl. Také děkuji Petru Janštovi, jakožto konzultantovi této práce, který mě zaškolil v laboratorních metodách a následných analýzách získaných dat.

Rovněž chci poděkovat Lence Flaškové (PřF UK), která se mnou strávila bezmála tři měsíce při zkoušení metody AFLP. Od této metody jsme sice nakonec upustili a opět se vrátili k sekvenčním datům, avšak času, který se mnou v laboratoři strávila, si i tak velmi cením. S tím je spjato i poděkování Pavlu Munclingerovi (PřF UK). Právě on nás nakonec přesvědčil, že se dá pracovat se získanými sekvencemi a rozhodně nejsou k ničemu. Také mi dal několik cenných rad s možnou interpretací výsledků.

Dále děkuji všem, kteří mně, nebo Petrovi přinesli, či poslali třeba i jediného zlatohlávka, který byl předmětem výzkumu této práce. Nesmírně si toho vážím a omlouvám se, že Vás tu všechny nebudu jmenovat, jelikož je Vás opravdu hodně. Bez Vás by tato práce nemohla vzniknout.

Děkuji kolegům a přátelům, se kterými jsem se účastnil expedic za zlatohlávky a prožil s nimi úžasné chvíle v různých koutech Evropy. Jmenovitě Petru Šípkovi, Petru Janštovi, Daně Drožové, Anetě Fuchsové, Veronice Szalontayové a Adamu Peškovi (všichni PřF UK).

Taktéž děkuji Daně Drožové, Katce Jůzové, Janě Habermannové a Báře Křížkové (všichni PřF UK) za cenné rady ohledně metod v laboratoři a následné činnosti s analytickými programy.

V neposlední řadě patří velký dík mému tátovi, který mě neustále podporuje v mých studiích, stejně jako moje přítelkyně Zuzka Miklušová (PřF UK). Zuzce děkuji z celého srdce za veškerou oporu, kterou mi poskytuje. Za to, že je ochotná se mnou projet autem celou Ukrajinu, nebo mě pustí přes půl světa do Malajsie, jenom proto, abych si tam sbíral zlatohlávky a jinou „šestinohou havěť“. Děkuji jí tedy za to, že snáší moje nadšení pro hmyz, které asi často překračuje únosnou mez.

Práce vznikla za finanční podpory grantu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy MSM0021620828 a grantové agentury Karlovy Univerzity: grant č. 95410.

Obsah

Abstrakt	6
Abstract	7
1. Úvod a cíle práce	8
2. Literární přehled	10
2.1. Taxonomická pozice rodu <i>Oxythyrea</i> v rámci nadčeledi Scarabaeoidea	10
2.2. Taxonomie, morfologie rodu <i>Oxythyrea</i> a charakteristika jednotlivých druhů	10
2.3. Biologie rodu <i>Oxythyrea</i>	23
3. Materiál a metodika	25
3.1. Použitý materiál	25
3.2. Metodika	25
3.2.1. Seznam použitých zkratk	25
3.2.2. Získání sekvencí	26
3.2.2.1. Izolace DNA	26
3.2.2.2. Amplifikace DNA pomocí PCR	26
3.2.2.3. Kontrola správného průběhu PCR a přečištění produktů	28
3.2.2.4. Příprava na sekvenaci	28
3.2.3. Editace sekvencí	28
3.2.4. Analýza dat	29
3.2.4.1. Maximum parsimony	29
3.2.4.2. Maximum likelihood	30
3.2.4.3. Bayesiánská analýza	30
3.2.4.4. Haplotypové sítě	30
3.2.4.5. Molekulární datování	31
3.2.4.6. Haplotypová diverzita, nukleotidová diverzita, Tajima D test	31
4. Výsledky	32
4.1. Charakter vstupních dat	32
4.2. Haplotypové sítě a fylogenetické analýzy	36
4.2.1. Dataset genu COI	36
4.2.2. Dataset genu CytB	49
4.2.3. Dataset genu ITS1	60
4.2.4. Dataset konkatenátu genů COI a CytB	66
4.2.5. Dataset konkatenátu genů COI, CytB a ITS1	76
4.3. Molekulární datování	80

4.4. Haplotypová a nukleotidová diverzita, Tajima D test	82
5. Diskuze	84
5.1. Fylogenetické vztahy v rámci rodu <i>Oxythyrea</i>	84
5.1.1. Mitochondriální datasety.....	84
5.1.2. Jaderný gen ITS1	86
5.1.3. Konkaténát COI+CytB+ITS1	87
5.2. Vznik linie A u zlatohlávka tmavého	87
5.2.1. Migrace ze severní Afriky	88
5.2.2. Diferenciace linie A na území Evropy.....	89
5.3. Molekulární datování a hypotéza o příchodu zlatohlávka tmavého do Evropy.....	93
5.4. Expanzivní charakter linie B.....	94
5.4.1. Mitochondriální datasety.....	94
5.4.2. Jaderný gen ITS1	96
5.5. Hypotetické rozmístění refugiálních oblastí v glaciálních obdobích.....	96
6. Závěr	97
7. Přehled použité literatury	99
8. Přílohy	108

Abstrakt

V rámci rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842 (Coleoptera: Scarabaeidae) se dnes rozlišuje 11 druhů, které nejsou dále členěny na poddruhy. Diverzita rodu je soustředěna do oblasti Mediteránu, přičemž druh *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) obývá rozsáhlý areál v západním palearktu. V posledních dekadách byl u druhu *O. funesta* pozorován ústup ze střední Evropy na jih a poté zpětné rekolonizování této oblasti včetně osídlení severnějších regionů.

Diplomová práce se zaměřuje na řešení populační struktury druhu *O. funesta* a částečnou fylogenezi rodu *Oxythyrea* s pomocí molekulárně genetických metod. V analýzách se objevuje 145 jedinců druhu *O. funesta* a dále 15 jedinců pěti jiných druhů rodu *Oxythyrea*. U jedinců byly získány sekvence mitochondriálních genů cytochromoxydázy I (807 bp), cytochromu b (381 bp) a jaderného genu internal transcribed spacer 1 (946 bp).

Výsledky fylogenetických analýz potvrdily zatím jedinou existující interpretaci vztahů uvnitř rodu *Oxythyrea* založené na morfologických datech. Dále byly potvrzeny složité vztahy mezi druhy *O. funesta* a *O. pantherina*, které se objevují i v historickém vývoji jejich taxonomie. S pomocí fylogenetických stromů a haplotypových sítí byla odhalena odlišná genetická linie druhu *O. funesta* na Sicílii, v jižní Itálii a v Tunisku. Haplotypové sítě a tajimův D test poukazují na recentní demografickou expanzi zbylých jedinců druhu *O. funesta*.

Klíčová slova: *Oxythyrea funesta*, rod *Oxythyrea*, Cetoniinae, cytochromoxydáza I, cytochrom b, internal transcribed spacer 1, fylogeneze, populační struktura, expanze, Mediterán, západní palearkt.

Abstract

Eleven species are distinguished in the genus *Oxythyrea* Mulsant, 1842 (Coleoptera: Scarabaeidae) nowadays. They are not divided into subspecies. Diversity of the genus is concentrated in the Mediterranean and *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) inhabit a wide area in the western Palearctic Region. It was observed in last decades, that *O. funesta* retreated from central Europe to south and then recolonized it back including new areas in northern regions.

Master thesis is focused on resolving population structure of *O. funesta* and partial phylogeny of the genus *Oxythyrea* using molecular genetic methods. 145 individuals of *O. funesta* and 15 individuals of five other species of the genus *Oxythyrea* appear in analysis. We acquired sequences of mitochondrial genes cytochrome oxidase I (807 bp), cytochrome b (381 bp) and nuclear gene internal transcribed spacer 1 (946 bp) from these specimens.

The results of phylogenetic analysis confirmed so far the only one existing interpretation of relationships within the genus *Oxythyrea* based on morphological data. We also confirmed complicated relationships between *O. funesta* and *O. pantherina*, which also appear in the historical development of their taxonomy. We detected different genetic lineage in Sicily, southern Italy and Tunisia using phylogenetic trees and haplotype networks. Haplotype networks and Tajima D test point to recent demographic expansion of the remaining individuals of *O. funesta*.

Key words: *Oxythyrea funesta*, genus *Oxythyrea*, Cetoniinae, cytochrome oxidase I, cytochrome b, internal transcribed spacer 1, phylogeny, population structure, expansion, Mediterranean, western Palearkt Region.

1. Úvod a cíle práce

Zlatohlávek tmavý *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) je v současné době zcela běžným listorohým broukem (Coleoptera: Scarabaeidae) ve velké části Evropy a jiných přilehlých území (Smetana 2006). Pokud se však podíváme na historický vývoj areálu zlatohlávka *O. funesta*, zjistíme, že tomu tak nebylo vždy.

Podle dřívějších záznamů byl zlatohlávek tmavý v první polovině 20. století na evropském kontinentě včetně Československa poměrně častým (Horák et al. 2009). Avšak v druhé polovině století začíná být na ústupu a vyskytuje se převážně v teplejších oblastech. Například na území Čech je zpočátku pokládán za vzácného, na jižní Moravě je místy hojný (Balthasar 1956). Přesto, že některé zdroje ještě v šedesátých letech uvádí rozsáhlý výskyt až po jižní Švédsko, či jižní Ural (Medvedev 1964), došlo v dalších letech ke zmenšení areálu a ústupu do jižnějších poloh. V osmdesátých letech je v Polsku hodnocen jako stepní relikt (Burakowski et al. 1983) a v roce 1989 je na území Československa označen za pravděpodobně vyhynulého (Kráľ 1989). Přesněji to znamená, že v letech 1960-1989 nebyl v ČSSR doložen. Následně byl zlatohlávek tmavý podle vyhlášky 395/1992 Sb. označen jako ohrožený. V průběhu devadesátých let se téměř zapomenutý brouk opět začíná objevovat na Slovensku (Cunev & Majzlan 1998), v České republice (Vláčil 1995), či v Polsku (Pawłowski et al. 2002). V posledních letech je čím dál běžnější i v Pobaltí a v různých oblastech Ruska (Telnov 2004, Bukejs et al. 2006, Negrobov 2009).

Právě dynamika areálu zlatohlávka tmavého byla stěžejním důvodem, proč byl vybrán jako modelový druh pro tuto studii. Diplomová práce se za pomoci molekulárních přístupů snaží objasnit populační strukturu zlatohlávka tmavého, popsat fylogenetické vztahy v rámci rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842 a získané výsledky konfrontovat s dřívějšími morfologickými studiemi (Sabatinelli 1981, 1984).

Hlavní těžiště práce spočívá v modelovém druhu *O. funesta* a jeho populační struktuře. S ohledem na výsledky z pilotních analýz byla práce dále rozšířena o fylogenezi rodu *Oxythyrea*. Z časových důvodů nebylo možné získat všechny druhy tohoto rodu. V práci je tedy předkládána částečná fylogeneze rodu *Oxythyrea*. O její kompletní rekonstrukci se budu snažit v průběhu mého doktorského studia na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy.

Cíle práce:

Hlavním cílem práce je studovat populační strukturu zlatohlávka tmavého a fylogenezi rodu *Oxythyrea*. Za tímto účelem byly stanoveny následující postupné cíle.

- U druhu *Oxythyrea funesta* získat materiál z co nejvíce možných lokalit.
- Nashromáždit co nejvíce dalších druhů rodu *Oxythyrea*.
- U vzorků získat sekvence částí mitochondriálních genů cytochromoxydázy I, cytochromu b a část jaderného genu internal transcribed spacer 1.
- Zjistit populační strukturu u druhu *Oxythyrea funesta* a rekonstruovat fylogenezi rodu *Oxythyrea*.
- Získané údaje o populační struktuře druhu *Oxythyrea funesta* srovnat s geologickou situací západního palearktu s přihlédnutím ke geoklimatologickému vývoji oblasti v průběhu kvartéru.
- Výsledky fylogenetických analýz porovnat s existující představou o evoluci rodu.

2. Literární přehled

2.1. Taxonomická pozice rodu *Oxythyrea* v rámci nadčeledi Scarabaeoidea

Problematika systematického členění zlatohlávkovitých brouků dodnes není uspokojivě vyřešena. Například často citovaná a uznávaná práce Krikken (1984), ze které vychází i Krajčík (1998, 1999), považuje zlatohlávkovité za samostatnou čeleď Cetoniidae. Tu dále člení na tři podčeledi (Valginae, Trichiinae, Cetoniinae), 17 tribů a některé z nich i na subtriby. Naopak jiné práce klasifikují tyto brouky jako podčeleď Cetoniinae uvnitř čeledi Scarabaeidae (Janssens 1949), nebo je spolu s dalšími příbuznými (Melolonthinae, Dynastinae, Rutelinae) řadí do nově vytvořených provizorních taxonomických jednotek, jako je „Phytophagous Scarab clade“ (Smith et al. 2006). Náhledů na klasifikaci je celá řada, převážně jsou založené na morfologii, ale objevují se i práce využívající molekulární přístupy (např. již zmíněný Smith et al. 2006). Nicméně se zdá, že klasifikace zlatohlávků na úrovni samostatné čeledi je v současné době neudržitelná, převážně s ohledem na nejasné postavení ostatních skupin fytofágních listorohých (Micó et al. 2008., Šípek et al. 2009). Čtenář této práce může získat podrobnější informace o problematice zlatohlávkovitých a jejich různorodého pojetí v nadčeledi Scarabaeoidea ve velice podrobných review prací Kohlmann a Moróna (2003) a Šípka a Krále (2012).

Námi studovaný rod je při použití Krikkenova systému (1984) zařazen do podčeledi Cetoniinae a tribu Cetoniini. Do tohoto taxonu se řadí subtriby Cetoniina, Euphoriina a Leucocelina (Krajčík 1998). Do posledního jmenovaného dnes spadá 26 rodů včetně rodu *Oxythyrea* (Krajčík 1998). Hlavní centrum diverzity subtribu se nachází v afrotropické oblasti s celkem 23 rody. Z této oblasti zasahují na Madagaskar rody *Leucocelis* Burmeister, 1842 a *Mausoleopsis* Lansberge, 1882 a do palearktu *Homothyrea* Kolbe, 1895 a *Leucocelis*. Výhradně v palearktu se vyskytují rody *Oxythyrea*, *Paleira* Reiche, 1871 a *Pseudooxythyrea* Baraud, 1985 (Krajčík 1998, Smetana 2006).

2.2. Taxonomie, morfologie rodu *Oxythyrea* a charakteristika jednotlivých druhů

V této kapitole bude nastíněn celkový pohled na taxonomii rodu, včetně aktuálního seznamu druhů (tab. 1) a souhrnné morfologie těchto zlatohlávků. Následně budou představeny jednotlivé taxony včetně jejich rozšíření. Na tuto část navazují převzaté mapy s vyobrazeným výskytem některých druhů (mapa 1 a 2) a tabulka s výpisem států, kde se nacházejí (tab. 2).

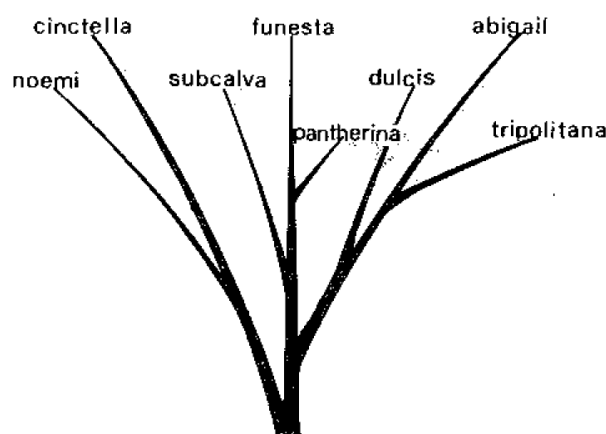
Taxonomie rodu *Oxythyrea*

Podle klasické představy se do rodu *Oxythyrea* řadily i druhy klasifikované dnes v jiných rodech subtribu Leucocelina. Jednalo se o afrotropické druhy (především z jižní Afriky) rodů *Cyrtothyrea* Kolbe, 1895; *Elassochiton* Kolbe, 1895; *Homothyrea*; *Leucocelis*; *Mausoleopsis* a *Trichothyrea* Kolbe, 1895. Tato koncepce byla vžitá v 19. století a začátkem století dvacátého (Krajčík 1998, Sakai & Nagai 1998). V duchu tohoto přístupu je později směřována ještě např. práce Scheineho (1960) spolu s nově popsáním druhem *Oxythyrea rudebecki* Schein, 1961, což je dnes synonymum pro *Cyrtothyrea marginalis* (Swartz, 1817), (Krajčík 1998) a práce Antoineho (1992). Ten popsal nový druh *Oxythyrea congoensis* Antoine, 1992 a poddruh *Oxythyrea triliturata basilewskyi* Antoine, 1992. Dnes jsou taxony klasifikovány jako *Leucocelis* (L.) *congoensis* (Antoine, 1992), respektive *Leucocelis* (L.) *triliturata basilewskyi* (Antoine, 1992), (Krajčík 1998).

V dnešním pojetí rodu *Oxythyrea* je řazeno celkem 11 druhů (tab. 1), které nejsou dále členěny na poddruhy. Sabatinelli v roce 1981 interpretuje možné příbuzenské vztahy rodu (obr. 1) na základě morfologických charakteristik dospělců. Do analýzy zahrnuje pouze mediteránní druhy.

Seznam druhů rodu <i>Oxythyrea</i>
<i>Oxythyrea abigail</i> Reiche, 1856
<i>Oxythyrea albopicta</i> (Motschulsky, 1854)
<i>Oxythyrea cinctella</i> (Schaum, 1841)
<i>Oxythyrea cinctelloides</i> (Reitter, 1898)
<i>Oxythyrea dulcis</i> Reitter, 1898
<i>Oxythyrea funesta</i> (Poda, 1761)
<i>Oxythyrea groenbechi</i> Petrovitz, 1955
<i>Oxythyrea noemi</i> Reiche & Saulcy, 1856
<i>Oxythyrea pantherina</i> (Gory & Percheron, 1833)
<i>Oxythyrea subcalva</i> Marseul, 1878
<i>Oxythyrea tripolitana</i> (Reitter, 1891)

Tabulka 1: Aktuální seznam druhů spadajících do rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842 (Krajčík 1998, Smetana 2006).



Obrázek 1: Příbuzenské vztahy osmi taxonů rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842 vyskytujících se v oblasti Mediteránu (převzato z Sabatinelli 1981).

Souhrnná morfologie rodu *Oxythyrea*

Zlatohlávci tohoto rodu patří mezi malé až velmi malé druhy (7-15 mm) černého, někdy hnědočerného zbarvení s různě intenzivním leskem. Ten může být i nazelenalý, nebo kovově měděný (např. *O. funesta*). Tělo je svrchu lehce ochlupené a ze spodu ochlupené hustěji. Povrch je se shora pokryt bílými až nažloutlými tomentovými skvrnami (obr. 2; Mikšić 1982). Samci mají na abdominálních sternitech laterálně umístěné a symetricky uspořádané bělošedivé skvrny. U většiny druhů mají samci ještě mediální řadu skvrn. Samičky mají většinou odlišné vzory a pouze

s laterálními skvrnami (Sabatinelli 1981, 1984, Baraud 1985, 1992). Právě tyto skvrny jsou velmi důležitým rozpoznávacím znakem jednotlivých druhů, stejně jako skvrnění a boční lemování štítu. Skvrny na štítě jsou pohlavně stálé (Sabatinelli 1981, 1984, Baraud 1985, 1992). Zadečkové články jsou u samic více konvexní. Samci mají na apexu metatibií protažený jeden ze tří zoubků (Baraud 1992). Larvy jsou typické ponravky dosahující velikosti až 30 mm (Balthasar 1956).



Obrázek 2: Ukázka celkového habitu zlatohlávka rodu *Oxythyrea*. Zde *O. funesta* (Poda, 1761), (převzato z www.zin.ru, autor: Kirill Vladimirovich Makarov).

Oxythyrea abigail Reiche, 1856

V rámci rodu *Oxythyrea* patří tento zlatohlávek s výrazným leskem (Baraud 1985) mezi větší a robustnější druhy s výrazně ochlupenou dorsální částí těla, včetně štítu (Rittner & Sabatinelli 2010). Velikost je udávána mezi 8-14 mm (Mikšić 1982, Baraud 1985). Pronotum se 4-6 bílými skvrnami uspořádaných ve dvou podélných řadách. Laterální okraje štítu po třech skvrnách (obr. 3, vlevo), u kterých může být naznačeno propojení. Krovky s menším počtem větších bílých skvrn (většinou nejsou propojeny mezi sebou). Samec s výraznou mediální bílou skvrnou na prvním sternitu a menší skvrnou na druhém a třetím. Dále laterálně umístěné protáhlé skvrny na prvním až pátém sternitu (obr. 3, uprostřed). Samice bez mediálních skvrn, laterální skvrny pouze na prvním až čtvrtém sternitu (obr. 3, vpravo; Rittner & Sabatinelli 2010).

Areál tohoto druhu zahrnuje pobřežní lokality ve východním Středomoří. V Africe obývá Libyi a Egypt, v oblasti Levanty pak Izrael, Libanon a Sýrii (oblast Asweida). Dále se vyskytuje na Kypru - pláže Pachyammos (Sabatinelli 1981, 2008, Baraud 1985, Smetana 2006, Rittner & Sabatinelli 2010).



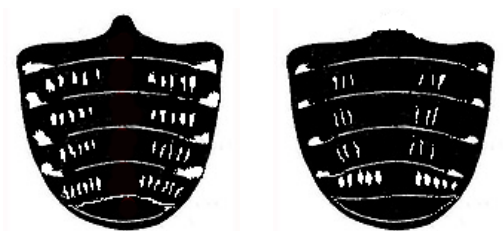
Obrázek 3: Schéma skvrnění štítu (vlevo) a abdominálních sternitů (samec - uprostřed, samice - vpravo) zlatohlávka *Oxythyrea abigail* Reiche, 1856 (převzato z Rittner & Sabatinelli 2010).

Oxythyrea albopicta (Motschulsky, 1854)

Relativně menší druh (9-11 mm) s přítomným leskem bez kovového nádechu a bez dorsálního ochlupení. Pronotum s často širokým bílým laterálním lemem a dvěma podélnými řadami třech bílých skvrn. Dvojice skvrn na bázi štítu bývá nejvýraznější, zbylé dva páry mohou být více či méně redukovány. Na krovkách větší počet bílých skvrn s typicky umístěnou dvojicí poblíž štítku. Samec s laterálně umístěnými skvrnami na prvním až čtvrtém sternitu a hustě přerušovanými bílými páskami směřujícími do centra na druhém až pátém sternitu (obr. 4, vlevo). Samice s méně zřetelným abdominálním skvrněním (obr. 4, vpravo; Mikšić 1982, Baraud 1985).

Zlatohlávek *O. albopicta* je rozšířen především ve východním Turecku, Sýrii (oblast Suweida, Djebel Druse, Bludan) a v kavkazských státech. Jeho areál dále pokračuje přes jižní Rusko do Kazachstánu, Uzbekistánu a Turkmenistánu (Mikšić 1982, Baraud 1992, Smetana 2006, Sabatinelli 2008). Mikšić (1982) uvádí výskyt i v Makedonii. Tuto informaci dokládá jím ověřeným materiálem

z provincie Štip nasbíraný Liebmannem dne 16. 5. 1937. Údaje přebírá i Smetana (2006). Poté jsou v roce 2009 (Rozner & Rozner) publikovány výsledky sběrů z Makedonie (rok 1997), které rovněž obsahují druh *O. albopicta* z provincie Štip a Veles. Autoři upozorňují, že zlatohlávek je přítomen na Balkáně pouze v Makedonii a jedná se o velice vzácné zvíře. Skutečná existence *O. albopicta* v Makedonii je ale diskutabilní. Druh se nevyskytuje např. v západním Turecku, Řecku a Bulharsku, anebo na Ukrajině, či v Rumunsku, pokud by byl areál propojen kolem severního pobřeží Černého moře. Takto výrazně disjunktivní areál rozšíření (nejbližší lokality jsou od sebe více jak 1200 km vzdálené) je u rodu *Oxythyrea* netypický. Musel by mít výrazně reliktní charakter, nebo by se jednalo o náhodné dálkové zavlečení druhu.



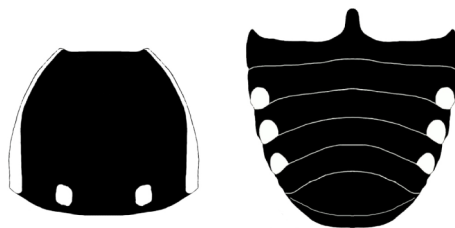
Obrázek 4: Schéma skvrnění abdominálních sternitů (samec - vlevo, samice - vpravo) zlatohlávka *Oxythyrea albopicta* (Motschulsky, 1854), (upraveno podle Sabatinelli 2008).

Oxythyrea cinctella (Schaum, 1841)

Další z menších druhů rodu dosahující velikosti 7-13 mm (Baraud 1992). Tělo je spíše užší, protažené a na rozdíl od *O. abigail* na dorsu téměř neochlupené (Rittner & Sabatinelli 2010). Zlatohlávci jsou většinou lesklí, ale bez metalických odstínů. U některých jedinců černá barva přechází do hnědočerné a skvrny mají nažloutlý odstín (Mikšić 1982). Štít s jedním párem výrazných skvrn na bázi skleritu a silným bočním lemováním (obr. 5, vlevo). Krovky s většími, často splývajícími skvrnami. Abdomen s laterálními skvrnami na druhém až čtvrtém sternitu (obr. 5, vpravo). Samec má toto skvrnění nápadnější, než samice (Rittner & Sabatinelli 2010). U některých jedinců chybí vzor na štítě a skvrny na abdomenu. V tomto případě se jedná o aberaci *O. cinctella* ab. *cinctelloides* (Reitter, 1898), (Baraud 1992).

V rámci rodu patří spolu s *O. funesta* mezi nejrozšířenější zlatohlávky. Jeho areál se rozkládá ve Střední Asii a na Blízkém východě (Afghánistán, Irák, Írán, Kazachstán, Kyrgyzstán, Pákistán, Tádžikistán, Turkmenistán, Uzbekistán). Na východ zasahuje do Číny (provincie Sin-ťiang) a na západ do jižního Ruska, Kavkazu, Turecka a Levanty (Izrael, Jordánsko, Libanon a Sýrie). V Evropě dále obývá část Balkánu. Zde se vyskytuje v evropské části Turecka, v Řecku (včetně ostrovů), Bulharsku, jižním Rumunsku, Makedonii, Albánii, Černé Hoře a v jihovýchodním Srbsku. V těchto místech se vyskytuje sympatricky s *O. funesta* (Sabatinelli 1981, 2008, Mikšić 1982, Baraud 1992, Smetana 2006, Rittner & Sabatinelli 2010). Nově je také dokládán výskyt na Krymu (Martynov

2010). Autor práce upozorňuje na existenci komentáře k tomuto taxonu a jeho výskytu na ukrajinském poloostrově. Bohužel tento komentář v publikaci nakonec vůbec není a podrobnější informace k výskytu na tomto území se nedozvíme.



Obrázek 5: Schéma skvrnění štítu (vlevo) a abdominálních sternitů samce i samice (vpravo) zlatohlávka *Oxythyrea cinctella* (Schaum, 1841), (převzato z Rittner & Sabatinelli 2010).

Oxythyrea cinctelloides (Reitter, 1898)

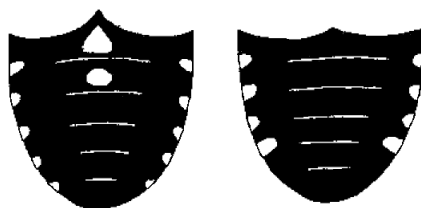
Podle Reittera (1898) dosahuje dospělec jedenácti milimetrů, přičemž lesk a ochlupení je velice podobné druhu *Leucocelis cinctella* Burmeister, 1842, což je dnes synonymum pro *O. cinctella* (Mikšić 1982, Krajčák 1998). Naopak jako rozdíl uvádí skvrnění, které zcela chybí na abdomenu, ale také může být silně redukováno na štítě a pygidiu (zde může také scházet úplně; Reitter 1898).

Podle Smetany (2006) se tento zlatohlávek vyskytuje ve dvou areálech. První je v ponto-mediteránní oblasti (Řecko, asijská část Turecka) a druhý se nachází na území Tádžikistánu a Uzbekistánu. Smetana (2006) odkazuje pouze na Reitterův popis (1898) a uvádí taxon, jako samostatný druh *O. cinctelloides*. Existence tohoto druhu je však velmi nejistá a v literatuře se objevují různé názory na klasifikaci tohoto taxonu (viz předchozí druh). Reitter (1898) zlatohlávka popsal a klasifikoval jako *Leucocelis cinctelloides* Reitter, 1898. V pozdějších publikacích je ovšem *L. cinctelloides* uváděn jako synonymum pro *O. cinctella* a autoři prací možnou existenci samostatného druhu *O. cinctelloides* zavrhuje (Dahlgren 1972, Mikšić 1982, Baraud 1992), nebo poukazují na nutnost dalšího prověření (Sabatinelli 1981). V těchto publikacích se setkáme s tímto taxonem klasifikovaným pouze jako aberace, anebo varieta druhu *O. cinctella* (Dahlgren 1972, Mikšić 1982, Baraud 1992). Morfologicky je taxon odlišitelný zmenšenými (v některých případech až úplně redukovanými) bílými skvrnami na štítě, krovkách, pygidiu a ventrální straně abdomenu (Mikšić 1982, Baraud 1992). Pokud by se opravdu jednalo o validní taxon, měl by jeho areál nápadně disjunktivní charakter (více než u zlatohlávka *O. albopicta*).

Oxythyrea dulcis Reitter, 1898

Tento druh patří mezi větší druhy (10-13 mm) s řídkým dorsálním ochlupením (Baraud 1992). Brouci mají slabý lesk bez kovového nádechu. Krovky mohou být nahnědlé (Mikšić 1982). Štít s úzkým bílým lemováním a šesti nenápadnými body uspořádaných ve dvou podélných řadách. Tyto skvrny mohou být zcela redukované. Oskvrnění krovek je nevýrazné a počet skvrn nízký (Baraud 1992). Samec s mediální skvrnou na prvním a druhém sternitu a s laterálními skvrnami na prvních pěti zadečkových člancích (obr. 6, vlevo). Samice bez mediálních skvrn a pouze s postranními skvrnami na prvním až čtvrtém sternitu (obr. 6, vpravo; Sabatinelli 1981). Populace v Černé Hoře mají odlišný vzor skvrnění. Boční lemování štítu je zkrácené, nebo několikrát přerušené. Krovky jsou hustěji pokryty většími skvrnami (Baraud 1992).

Tento zlatohlávek je vázán na pobřežní biotopy. Obývá východní pobřeží Řecka a některé jeho ostrovy (především Krétu), dále západní a jižní pobřeží Turecka (Sabatinelli 1981, 2008, Mikšić 1982, Baraud 1992). V roce 1977 Mikšić objevil na lokalitě „Velika Plaža“ poblíž města Ulcinj v Černé Hoře podle svého mínění *O. abigail*. Sám byl překvapen (rozšíření *O. abigail* je ve skutečnosti zcela odlišné) a nález tak poté přehodnotil na poddruh *O. dulcis abigailoides* Mikšić, 1978 (Mikšić 1978). Sabatinelli (1981) ve své práci informuje o této skutečnosti, ale podotýká, že neměl ještě možnost tuto záležitost prověřit. Baraud (1992) uvádí existenci dvou poddruhů, kdežto Smetana (2006) taxon popsáný Mikšićem v roce 1978 z Černé Hory uvádí v katalogu jako synonymum *O. dulcis*. Nikčević (2010) poukazuje na postupný ústup druhu z Černé Hory a taxon se dnes dá považovat pravděpodobně za nezvěstný. Autorka však v obrazové dokumentaci článku prezentuje údajnou fotografii *O. dulcis*, na které je ale vyobrazen zlatohlávek rodu *Tropinota* Mulsant, 1842, což činní její závěry poněkud nedůvěryhodné.



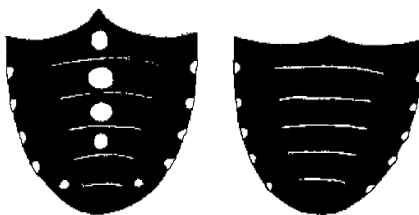
Obrázek 6: Schéma skvrnění abdominálních sternitů (samec - vlevo, samice - vpravo) zlatohlávka *Oxythyrea dulcis* Reitter, 1898 (upraveno podle Sabatinelli 1981).

Oxythyrea funesta (Poda, 1761)

Rozměry zlatohlávka tmavého jsou značně variabilní (8-15 mm; Baraud 1977, 1992, Mikšić 1982). Pro tohoto svrchu lehce ochlupeného brouka je typický kovový lesk, který může tvořit nazelenalé, měděné, nebo fialové odrazy (Baraud 1985, 1992). Pronotum s bílým lemováním a třemi páry podélně postavených skvrn. Krovky s různorodým počtem bílých skvrn (aberrace

deleta Mulsant, 1842 bez skvrnění krovek; Baraud 1992). Samec se čtyřmi mediálně umístěnými skvrnami na prvních čtyřech sternitech a pěti laterálními skvrnami na prvních pěti zadečkových člancích (obr. 7, vlevo). Samice bez mediálních skvrn a nepatrnými laterálními skvrnami (obr. 7, vpravo; Sabatinelli 1981).

Zlatohlávek tmavý obývá značnou část západního palearktu. Jeho areál zahrnuje v podstatě celou Evropu včetně mediteránních ostrovů. Jako jediný je přítomen i na Kanárských ostrovech (Smetana 2006) a Maltě (Sabatinelli 1990). Mikšić (1982) zmiňuje možnost výskytu v jižní Anglii, což však zatím nikdo nepotvrdil. V Evropě se tedy nevyskytuje na Britských ostrovech a v Norsku. Podle internetového portálu „Global Biodiversity Information Facility“ (<http://www.gbif.org/>) došlo v posledních letech k nálezům brouka na území jižního Švédska a především ve větším množství v jižním Finsku (GBIF data portal 2012). Tyto údaje potvrzují i práce Silfverberga (2004, 2010), který zlatohlávka tmavého potvrzuje v Litvě, Lotyšsku, Estonsku a Finsku. K těmto zemím dodává informaci, že se jedná o lokality přirozeného výskytu. Stejný autor uvádí i přítomnost druhu v Dánsku, ale tentokrát jako „pravděpodobně náhodné introdukce, které proběhly ve větší míře“. V Rusku obývá rozličná místa, jak v jižních oblastech, tak i v severních (Smetana 2006). Mezi doložená území patří například Voroněžská oblast (Negrobov 2009) na jihovýchodě evropské části Ruska, ale také severně položená Jaroslavská oblast a jižní část Vologdské oblasti (Vlasov 2003), či Leningradská oblast (Baturin 2003). Tento druh se také nachází v severní Africe (Maroko, Alžírsko, Tunisko, Libye), v části Turecka, na Kypru a v kavkazských státech (Mikšić 1982, Baraud 1985, Smetana 2006, Sabatinelli 2008).



Obrázek 7: Schéma skvrnění abdominálních sternitů (samec - vlevo, samice - vpravo) zlatohlávka *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761), (upraveno podle Sabatinelli 1981).

Oxythyrea groenbechi Petrovitz, 1955

Tento druh je celkovým tvarem a ochlupením velice podobný zlatohlávku *O. cinctella*. Černě zbarvení jedinci s nápadným leskem dorůstají velikosti 9 až 12 mm. Štít nese zvláštní vzor, který je tvořen silným bílým lemováním a jedním párem větších skvrn na bázi štítu. Dál od těchto skvrn se nachází pár podélných linií (obr. 8, vlevo). Krovky mají podobné skvrnění jako *O. cinctella*, ale u štítku jsou dva malé bílé body, stejně jako u zlatohlávka *O. albopicta*. Sexuální dimorfismus v oskvrnění na abdominálních sternitech chybí. Samci i samice s pěti laterálně umístěnými

protáhlými skvrnami na 1. až 5. článku (obr. 8 vpravo; Petrovitz 1955, Schein 1955, Sabatinelli 1984).

Jako u jediného druhu z rodu *Oxythyrea* se areál výskytu nachází zcela mimo západní palearkt. Druh je endemický pro Afghánistán, kde se vyskytuje zejména v nižších polohách (Mikšić 1982, Sabatinelli 1984, Smetana 2006). V roce 1955 byl taxon popsán současně dvěma autory jako *O. grünbechi* Petrovitz, 1955 a *O. mülleri* Schein, 1955 (Petrovitz 1955, Schein 1955). I když se v některých pracích objevuje *O. mülleri* jako akceptované jméno pro tento druh (Mikšić 1982), později byla potvrzena priorita Petrovitzova popisu *O. groenbechi* (Sabatinelli 1984, Krajčák 1998, Smetana 2006). Sabatinelli (1984) navazuje na svoji práci z roku 1981 (viz obr. 1) a řadí afghánský taxon do úzké příbuznosti s *O. noemi* Reiche & Saulcy, 1856.



Obrázek 8: Schéma skvrnění štítu (vlevo) a abdominálních sternitů samce i samice (vpravo) zlatohlávka *Oxythyrea groenbechi* Petrovitz, 1955 (upraveno podle Sabatinelli 1984).

Oxythyrea noemi Reiche & Saulcy, 1856

Poměrně malý zlatohlávek (8,5-12 mm) se silným nekovovým leskem a téměř lysým dorsem těla. Skvrnění může mít nažloutlou barvu (Mikšić 1982). Štít se 4-6 skvrnami ve dvou podélných řadách (obr. 9, vlevo). U některých jedinců může být viditelný pouze bazální pár. Dále je štít bočně lemován třemi skvrnami, které mohou být více, či méně propojené až zcela nepřerušené, nebo jsou vidět pouze skvrny v zadní části lemu. Rozmístění větších a často splývajících skvrn na krovkách je velmi variabilní. Samci se skvrnou na každé straně prvního až pátého sternitu (obr. 9, uprostřed). Samice se skvrnou na druhém až čtvrtém (obr. 9, vpravo; Rittner & Sabatinelli 2010).

Centrum tohoto taxonu je v oblasti Levanty v blízkosti Středozemního moře (Izrael, Jordánsko, Libanon, Sýrie), odkud okrajově zasahuje na sever do Turecka a směrem na jih do Egypta (Sinajský poloostrov). Běžně se vyskytuje na Kypru (Sabatinelli 1981, 2008, Smetana 2006, Rittner & Sabatinelli 2010).

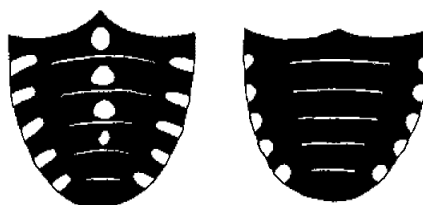


Obrázek 9: Schéma skvrnění štítu (vlevo) a abdominálních sternitů (samec - uprostřed, samice - vpravo) zlatohlávka *Oxythyrea noemi* Reiche & Saulcy, 1856 (převzato z Rittner & Sabatinelli 2010).

Oxythyrea pantherina (Gory & Percheron, 1833)

Dospělci tohoto velmi lesklého druhu s jemným měděným nádechem dosahují 8-14,5 mm (Mikšić 1982, Baraud 1985). Dorsální ochlupení je řídké. Pronotum se šesti bílými skvrnami ve dvou podélných řadách a většinou nepřerušovaným bočním lemováním (Baraud 1985). Skvrnění krovek je podobné druhu *O. funesta* (Mikšić 1982). Samec i samice mají identický vzor na sternitech jako zlatohlávek tmavý. U druhu *O. pantherina* jsou však tyto skvrny větší a protáhnuté, a tudíž celý vzor vypadá nápadněji (obr. 10; Sabatinelli 1981).

Tento druh se objevuje v několika oblastech severní Afriky (Maroko, Alžírsko, Tunisko, Libye), kde se může sympatricky vyskytovat s dalšími podobnými druhy (*O. funesta*, *O. subcalva* a *O. tripolitana*; Sabatinelli 1981, Mikšić 1982, Baraud 1985, Smetana 2006). V druhé polovině minulého staletí byl taxon klasifikován jako varieta, nebo poddruh *O. funesta pantherina* (Gory & Percheron, 1833), (Kocher 1958, Dahlgren 1972, Mikšić 1982). Pozdější autoři však opět dali přednost klasifikaci na úrovni druhu i přes komplikovanou situaci v oblasti severozápadní Afriky. Zde se totiž podle některých autorů vyskytují odlišné variety taxonů *O. funesta* a *O. pantherina*. Dále také upozorňují na možnou existenci přechodné formy těchto dvou druhů (Kocher 1958, Dahlgren 1972, Mikšić 1977, 1982, Sabatinelli 1981, Baraud 1985, 1992, Smetana 2006).



Obrázek 10: Schéma skvrnění abdominálních sternitů (samec - vlevo, samice - vpravo) zlatohlávka *Oxythyrea pantherina* (Gory & Percheron, 1833), (upraveno podle Sabatinelli 1981).

Oxythyrea subcalva Marseul, 1878

Zlatohlávek dorůstající 10-14,5 mm se silným leskem bez metalických odlesků a občas hnědočerným odstínem zbarvení (Mikšić 1982). Štít se třemi páry podélně umístěných skvrn. Skvrny na bázi skleritu nápadnější od zbylých, které jsou nepatrné. U některých jedinců není

patrný žádný vzor. Krovky s velmi nízkým počtem malých nepropojených skvrn (Mikšić 1982). Samec se čtyřmi mediálně umístěnými skvrnami na prvním až čtvrtém sternitu, samice bez skvrnění (obr. 11; Baraud 1985).

Stejně jako *O. pantherina*, i tento zlatohlávek obývá podobné lokality ve stejných státech severní Afriky (Maroko, Alžírsko, Tunisko, Libye; Sabatinelli 1981, Baraud 1985, Smetana 2006). Dahlgren (1972) ve své práci samostatný druh *O. subcalva* synonymizoval s aberací zlatohlávka tmavého (*O. funesta* ab. *deleta* Mulsant, 1842). Z této publikace vycházel později Mikšić (1982), který uvažoval o možném překlasifikování taxonu na poddruh *O. funesta subcalva* Marseul, 1878. Pozdější autoři klasifikují taxon opět jako samostatný druh *O. subcalva* (Sabatinelli 1981, Baraud 1985, Smetana 2006).

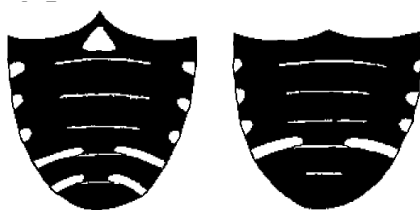


Obrázek 11: Schéma skvrnění abdominálních sternitů samce i samice zlatohlávka *Oxythyrea subcalva* Marseul, 1878 (upraveno podle Sabatinelli 1981).

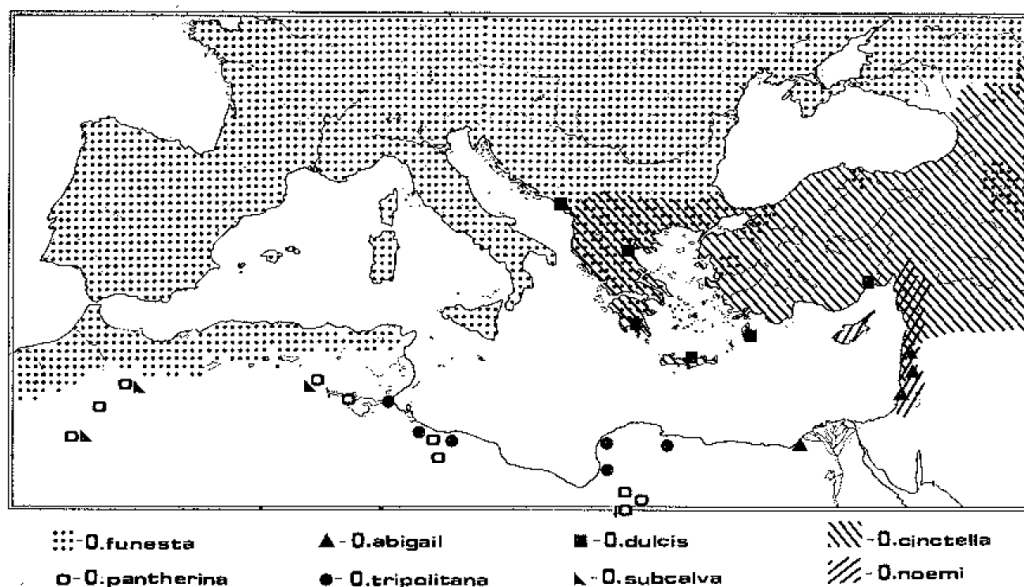
Oxythyrea tripolitana (Reitter, 1891)

Větší druh (8-14 mm) s čistě černým zbarvením, slabým leskem a poměrně hustě ochlupenou dorsální stranou těla. Ventrální strana je silně lesklá. Pronotum se šesti bílými skvrnami ve dvou podélných řadách. Boční lemování skleritu tvoří dvě až tři skvrny na každé straně. Krovky s podobným vzorem jako u druhu *O. abigail* (Mikšić 1982) stejně jako skvrnění abdomenu. Samec se liší pouze jednou mediální skvrnou na prvním sternitu, jinak je vzor identický (obr. 12, vlevo). Samice s totožným vzorem, i když méně nápadným (obr. 12, vpravo), jako *O. abigail* (Sabatinelli 1981, Baraud 1985).

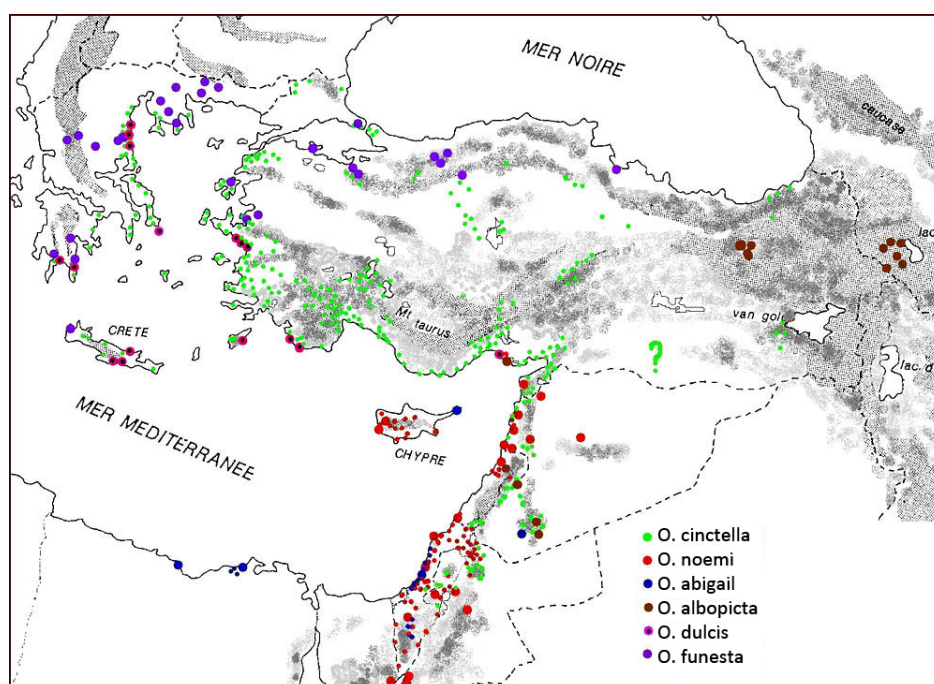
Zlatohlávek *O. tripolitana* se vyskytuje v Tunisku a Libyi. Na některých lokalitách se objevuje spolu s *O. pantherina*, ale v tomto případě se nachází blíž pobřeží (Sabatinelli 1981, Baraud 1985, Smetana 2006).



Obrázek 12: Schéma skvrnění abdominálních sternitů (samec - vlevo, samice - vpravo) zlatohlávka *Oxythyrea tripolitana* (Reitter, 1891), (upraveno podle Sabatinelli 1981).



Mapa 1: Rozšíření osmi zástupců rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842 v Mediteránu a přilehlých oblastí (převzato z Sabatinelli 1981).



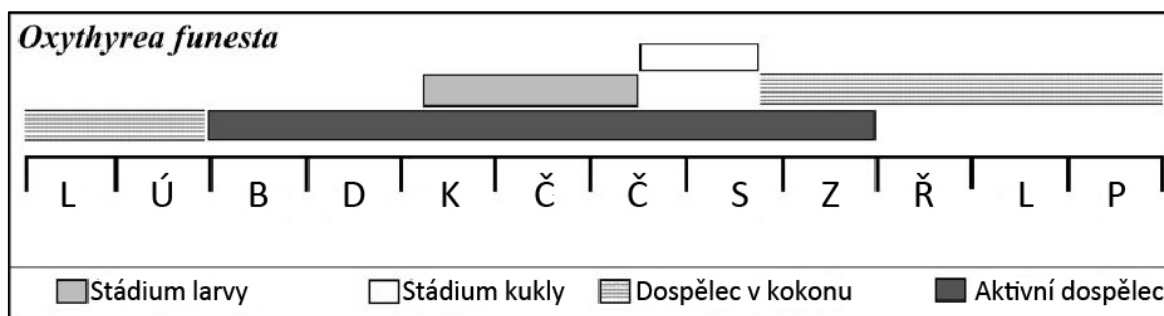
Mapa 2: Rozšíření šesti zástupců rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842 v oblasti východního Mediteránu a Kavkazu (upraveno podle Sabatinelli 2008).

Druh	Výskyt
<i>O. abigail</i>	CY EG IS LB LE SY
<i>O. albopicta</i>	AB AR GG KZ MC ST SY TM TR UZ
<i>O. cinctella</i>	AB AF AL AR BU GG GR IN IQ IS JO KI KZ LE MC PA RO ST SY TD TM TR UZ YU XIN
<i>O. cinctelloides</i>	GR TD TR UZ
<i>O. dulcis</i>	GR TR YU
<i>O. funesta</i>	AB AG AL AN AR AU BE BH BU BY CI CR CT CY CZ EN FI FR GE GG GR HU IT LA LB LS LT LU MA MC MD MO NL NT PL PT RO SK SL SP ST SV SZ TR TU UK YU
<i>O. groenbechi</i>	AF
<i>O. noemi</i>	CY IS JO LE SY TR
<i>O. pantherina</i>	AG LB MO TU
<i>O. subcalva</i>	AG LB MO TU
<i>O. tripolitana</i>	LB TU
Seznam zkratk států a území	
AB Ázerbájdžán	LA Lotyšsko
AF Afghánistán	LB Libye
AG Alžírsko	LE Libanon
AL Albánie	LS Lichtenštejnsko
AN Andorra	LT Litva
AR Arménie	LU Lucembursko
AU Rakousko	MA Malta
BE Belgie	MC Makedonie
BH Bosna a Hercegovina	MD Moldavsko
BU Bulharsko	MO Maroko
BY Bělorusko	NL Nizozemsko
CI Kanárské ostrovy	NT Rusko: Severní evropské teritorium
CR Chorvatsko	PA Pákistán
CT Rusko: Centrální evropské teritorium	PL Polsko
CY Kypr	PT Portugalsko
CZ Česká republika	RO Rumunsko
EG Egypt	SK Slovensko
EN Estonsko	SL Slovinsko
FI Finsko	SP Španělsko
FR Francie	ST Rusko: Jižní evropské teritorium
GE Německo	SV Švédsko
GG Gruzie	SY Sýrie
GR Řecko	SZ Švýcarsko
HU Maďarsko	TD Tádžikistán
IN Írán	TM Turkmenistán
IQ Irák	TR Turecko
IS Izrael	TU Tunisko
IT Itálie	UK Ukrajina
JO Jordánsko	UZ Uzbekistán
KI Kyrgyzstán	XIN Čína: Sin-ťiang
KZ Kazachstán	YU Jugoslávie (Srbsko, Černá Hora)

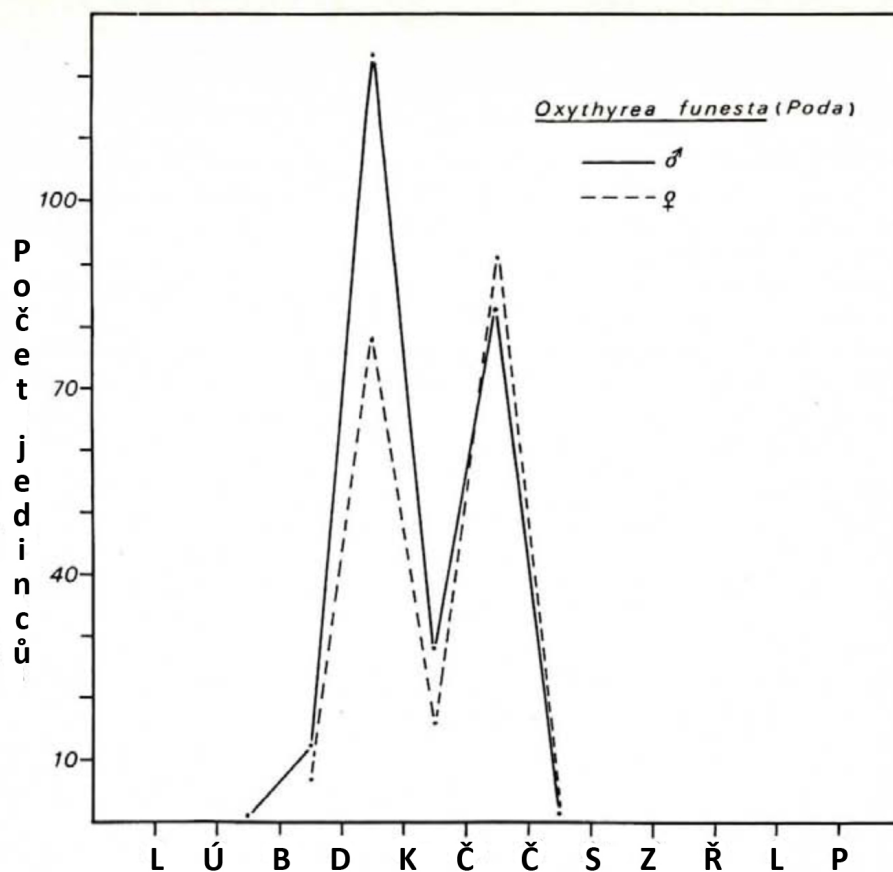
Tabulka 2: Seznam států a území, ve kterých se jednotlivé druhy rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842 vyskytují a zkratkový systém převzatý ze Smetany (2006). Data byla zkompletována za pomoci všech uvedených zdrojů v kapitole 2.2.

2.3. Biologie rodu *Oxythyrea*

Dospělci aktivují od konce května do začátku srpna (Balthasar 1956). V teplejších podmínkách, jako je např. Levanta mohou dospělci aktivovat dříve, zhruba od poloviny února (Rittner & Sabatinelli 2010). Brouci obývají široké spektrum biotopů, od intenzivně obhospodařovaných kvetoucích polí, přes sady, stepi a ruderalní stanoviště (Horák et al. 2009). V oblastech, jako je např. Turecko, Řecko, Levanta, severní Afrika atp., se některé druhy vyskytují na plážích a jiných psamofilních biotopech (Mikšić 1982, Baraud 1985, Sabatinelli 2008, Rittner & Sabatinelli 2010). Zlatohlávci se živí nektarem, samotnými květy a zralým ovocem (Balthasar 1956, Sabatinelli 2008, Rittner & Sabatinelli 2010). Nalézají se na květech okoličnatých (*Apiaceae* Lindley), hvězdnicovitých (*Asteraceae* Martinov), či brukvovitých rostlin (*Brassicaceae* Burnett), anebo na křovinách (Balthasar 1956, Sabatinelli 2008, Rittner & Sabatinelli 2010). Mnohdy se na jednom květu vyskytuje i více jak 10 jedinců (Vondráček pers. observ.). V některých oblastech mohou při vyšší abundanci zapříčinit lokální škody v sadech a vinicích (Sabatinelli 2008). Na květech také často dochází k páření (Vondráček pers. observ.). Samičky poté kladou vajíčka do substrátů vhodných pro další vývoj vylíhnutých larev. Ty se pravděpodobně vyvíjejí v trouchnivějícím dřevě, opadance, půdním substrátu, či hnoji (Micó et al. 2008, Šípek pers. observ.). Životní cyklus je doplněn diagramem z laboratorních podmínek (obr. 13; Micó & Galante 2003). Z dostupných studií je možné usuzovat, že některé druhy vykazují bivoltinní cyklus (obr. 14; Tomás-Biosca & Galante 1978, Pajač et al. 2010). Nicméně počet generací bude patrně vysoce závislý na klimatickém průběhu sezóny.



Obrázek 13: Diagram životního cyklu zlatohlávka *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) v laboratorních podmínkách (upraveno podle Micó & Galante 2003).



Obrázek 14: Vyobrazení počtu odchycených jedinců druhu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) na území španělské provincie Salamanca v průběhu jedné sezóny (upraveno podle Tomás-Biosca & Galante 1978).

3. Materiál a metodika

3.1. Použitý materiál

K molekulárním analýzám bylo použito 145 jedinců druhu *Oxythyrea funesta* ze 48 lokalit. Pro účely fylogenetické analýzy bylo zařazeno 15 jedinců dalších pěti druhů rodu *Oxythyrea* z devíti různých lokalit a jako „outgroups“ (příbuzné taxony) osm různých druhů zlatohlávků. Kompletní seznam použitých jedinců spolu s lokalitami je vypsán v příloze 1.

Exempláře byly odchyceny ve volné přírodě. Za tímto účelem byly naplánovány tři expedice. V roce 2009 jsme podnikli cestu na Sicílii (zároveň byl zčásti sbírán materiál i na pevninské Itálii). V roce 2011 jsme nashromáždili materiál z Francie a Krymu (částečně Polsko a vnitrozemí Ukrajiny). Zbylé vzorky byly odchyceny na soukromých cestách, nebo dalšími kolegy z PŘF UK a jiných institucí. Několik vzorků z Levanty se podařilo získat od Oze Rittnera (Department of Zoology, The George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University).

Všichni jedinci byli fixováni v 96% ethanolu a uskladněni v mrazicím boxu při teplotě -20°C. Malá část materiálu byla k dispozici ve formě suchých preparátů (sbírka Mgr. Petra Šípka, Ph.D. a jedinci získaní na entomologických burzách).

3.2. Metodika

3.2.1. Seznam použitých zkratk

COI = cytochromoxydáza I

CytB = cytochrom b

ITS1 = internal transcribed spacer 1

COI+CytB = konkatenát sekvencí genu COI a CytB

COI+CytB+ITS1 = konkatenát sekvencí genů COI, CytB a ITS1

MP = maximum parsimony

ML = maximum likelihood

BA = bayesiánská analýza

HB = hodnota bootstrapu

PP = posteriorní pravděpodobnost

Hd = haplotypová diverzita

Nd = nukleotidová diverzita

3.2.2. Získání sekvencí

3.2.2.1. Izolace DNA

DNA byla extrahována buď z končetiny, nebo hrudních lýtací svalů. Tkáně byly odebrány pomocí preparačních pinzet sterilizovaných ethanolem a plamenem před a po každém odběru. Každý vzorek byl umístěn do 1,5 ml mikrozkušavky. Ty se otevřené umístily do termobloku, kde byly cca 20 minut při teplotě 50°C, aby se odpařil zbytkový ethanol.

Poté bylo využito standartního protokolu (Purification of Total DNA from Animal Tissues; Spin-Column Protocol) izolačního kitu firmy Qiagen (Qiagen DNeasy® Tissue Kit). Pro účinnější lyzi tkání byly vzorky ponechány v termobloku při teplotě 56°C přes noc.

U získaných izolátů byla ověřena koncentrace a čistota výsledné DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop®ND-100 a poté byly uskladněny při teplotě -20°C.

3.2.2.2. Amplifikace DNA pomocí PCR

Za pomoci polymerázové řetězové reakce (PCR) byly namnoženy úseky dvou mitochondriálních genů COI a CytB a jednoho jaderného genu ITS1. K amplifikaci těchto úseků bylo využito tří dvojic primerů uvedených v tabulce 3.

Úsek genu	Název primeru	Orientace	Sekvence primeru	Zdroj
COI	C1-J-2183 (Jerry)	Forward	5' CAACATTTATTTTGATTTTGG 3'	Simon et al. 1994
	TL2-N-3014 (Pat)	Reverse	5' TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA 3'	Simon et al. 1994
CytB	CB3	Forward	5' GAGGAGCAACTGTAATTACTAA 3'	Barracough et al. 1999
	CB4	Reverse	5' AAAAGAAARTATCATTGAGTTGAAT 3'	Barracough et al. 1999
ITS1	ITS1F	Forward	5' GCGTTCGAARTGCGATGATCAA 3'	Vogler & DeSalle et al. 1994
	ITS1R	Reverse	5' GTAGGTGAACCTGCAGAAGG 3'	Vogler & DeSalle et al. 1994

Tabulka 3: Seznam použitých primerů pro amplifikaci potřebných úseků.

Reakční směs byla připravována do objemu 25 µl na vzorek s pomocí komerčně dodávaného PPP Master Mixu bez MgCl₂ od společnosti Top Bio, s.r.o., který obsahuje Taq polymerázu, dNTP, barviva a stabilizátory. Reakční pufr s MgCl₂ je přibalován zvlášť pro možnost optimalizování reakce. Dále je v balení obsažena též PCR H₂O. Přesné složení směsi včetně přidávaných primerů a vyzolované DNA je uvedeno v tabulce 4.

Chemikálie	Množství (μl)
PPP Master Mix	12,5
PCR H ₂ O	7
MgCl ₂ (25nM)	2,5
Forward (10pmol/ μl)	1
Reverse (10pmol/ μl)	1
DNA (5-10ng/ μl)	1

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR (vztaženo na jednu reakci).

Amplifikace zmiňovaných úseků DNA probíhala v termocykléru C1000TM Thermal Cycler (Biorad) a iCycler TM Thermal Cycler (Biorad). U všech tří párů primerů byla nejprve provedena gradientová PCR pro zjištění optimální teploty jejich nasedání. Kompletní programy včetně takto získaných teplot nasedání primerů jsou uvedeny v tabulce 5 a 6.

COI	Krok	Počet opakování	Teplota	Čas
1.	Počáteční denaturace	1x	95°C	5 min
2.	Denaturace		95°C	30 s
3.	Nasedání primerů	40x	50°C	40 s
4.	Polymerace		72°C	2 min
5.	Závěrečná polymerace	1x	72°C	10 min
6.	Chlazení	1x	4°C	∞
CytB	Krok	Počet opakování	Teplota	Čas
1.	Počáteční denaturace	1x	95°C	5 min
2.	Denaturace		94°C	1 min
3.	Nasedání primerů	40x	47°C	1 min
4.	Polymerace		72°C	1 min 30 s
5.	Závěrečná polymerace	1x	72°C	10 min
6.	Chlazení	1x	4°C	∞

Tabulka 5: PCR programy pro amplifikaci částí mitochondriálních genů COI a CytB.

ITS1	Krok	Počet opakování	Teplota	Čas
1.	Počáteční denaturace	1x	95°C	5 min
2.	Denaturace		95°C	30 s
3.	Nasedání primerů	40x	50°C	40 s
4.	Polymerace		72°C	2 min
5.	Závěrečná polymerace	1x	72°C	10 min
6.	Chlazení	1x	4°C	∞

Tabulka 6: PCR programy pro amplifikaci části jaderného genu ITS1.

3.2.2.3. Kontrola správného průběhu PCR a přečištění produktů

Pomocí elektroforézy byla kontrolována kvalita a přibližná délka namnoženého úseku DNA. Byl využíván 1% agarózový gel, který byl při přípravě smíchán s vhodným množstvím ethidium bromidu (podle objemu gelu). Na gel bylo nanášeno množství 4 µl PCR produktu od každého vzorku spolu s 2 µl délkového standardu DNA (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder) firmy Fermentas. Vlastní elektroforéza běžela cca 50-60 minut při hodnotách 400 mA a 100 V. Po ukončení elektroforézy byl gel překontrolován pod ultrafialovým světlem.

Úspěšně amplifikované vzorky byly přečištěny pomocí standartního protokolu (Quick-StartProtocol) kitu značky Qiagen (Qiaquick® PCR Purification Kit), nebo 5 Prime (PCRExtract Mini Kit; protokol: Purifying DNA from PCR samples using the PCRExtract Mini Kit). U vzorků s negativním výsledkem na elektroforéze byla PCR zopakována. V případě druhého neúspěšného pokusu byl vzorek vyřazen.

3.2.2.4. Příprava na sekvenaci

Kvalita a koncentrace přečištěné DNA byla ověřena pomocí spektrofotometru NanoDrop®ND-100. Následně byl každý vzorek převeden do dvou směsí, každá o celkovém objemu 14 µl, které se lišily přidaným primerem (jelikož sekvenace probíhala v obou směrech). Směs obsahovala primer (forward, nebo reverse), který byl použit v PCR reakci, v množství 0,32 µl. Dále DNA v množství 5-10ng/100pb celkové délky produktu a zbytek směsi tvořila PCR H₂O.

Takto připravené vzorky byly předány do sekvenační laboratoře na PŘF UK (sekvenátor 3130 Genetic Analyzer a 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Zde proběhly srážecí a sekvenační reakce (BigDye®Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems).

3.2.3. Editace sekvencí

U všech tří úseků genů byl získáván jak forward tak reverse směr. V programu BioEdit (Hall 1999) byly u obou směrů zkontrolovány chromatografy sekvencí. Následně byly pro kontrolu oba směry složeny dohromady. V případě jaderného genu (ITS1) byla u některých sekvencí patrná excitační maxima, u nichž nebylo možné jasně rozhodnout, o jakou ze dvou bází se jedná. Tyto „dvojité píky“ byly nahrazeny v sekvenci symbolem „N“ (možnost existence všech čtyř bází). Některé programy pro analýzu sekvenčních dat (např. PAUP* 4.0b10, MrBayes 3.2.1) jsou však schopny přečíst i symboly, které poukazují na možnost existence pouze dvou bází (odpovídající dvěma „píkům“ v chromatografu), např. „R“ = A (adenin), nebo G (guanin). V těchto případech byly symboly „N“ nahrazeny odpovídajícími písmeny. Sekvence byly poté editovány („alignovány“) v programu Clustal W (Thomson et al. 1994), který je součástí programu BioEdit. Vytvořený

alignment jaderného genu (ITS1) byl posléze překontrolován a ručně dopraven, jelikož program Clustal W není schopen zahrnout do svých výpočtů existující sekundární strukturu.

Pomocí nástrojového online balíku FaBox (<http://www.birc.au.dk/software/fabox>; Villesen 2007) byly alignmenty tří genů oříznuty tak, aby všechny sekvence začínaly a končily ve stejné pozici. Úseky mitochondriálních genů byly v programu MEGA 5 (Tamura et al. 2011) převedeny na aminokyseliny. Díky tomu mohly být alignmenty upraveny tak, aby byl zachován čtecí rámec a následně ověřeny, jestli neobsahují stop kodóny. Ve FaBoxu byly také vytvořeny konkatenáty jednotlivých genů (COI+CytB a COI+CytB+ITS1).

3.2.4. Analýza dat

V programu jModelTest 0.1.1 (Posada 2008) byly vypočítány modely evoluce pro jednotlivé datasety za použití Akaikova (AIC) i Bayseovského (BIC) kritéria, které jsou uvedeny v tabulce 7. Výsledné stromy z jednotlivých analýz byly vizualizovány pomocí programu TreeGraph 2.0.47-206 beta (Stöver & Müller 2010) a poté graficky upraveny v programu CorelDraw®X5 a Adobe Photoshop 12.0.4, stejně jako vytvořené haplotypové sítě. V programu MEGA 5 byly pro dataset COI vypočteny hodnoty nekorigovaných p-distancí.

Gen	AIC	BIC
COI	TPM3uf+I+G	HKY+I+G
CytB	TPM3uf+I+G	TPM3uf+I+G
ITS1	SYM+G	TVMef+G

Tabulka 7: Modely evoluce pro jednotlivé geny vypočtené programem jModelTest.

3.2.4.1. Maximum parsimony

Metoda maximální parsimonie vybírá ze všech možných stromů ten s minimální celkovou délkou, tedy s nejmenším počtem evolučních kroků. MP byla prováděna v programu PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) na serveru www.biportal.uio.no (Kumar et al. 2009). Tyto stromy byly hledány prostřednictvím heuristického vyhledávání s počtem 1000 náhodných replikátů. Prohledávání okolních stromů probíhalo s použitím náhodné změny polohy větví (příkaz: hsearch addseq=random nreps=1000 swap=TBR). Při nalezení vyššího počtu parsimonních stromů byl zkonstruován výsledný konsenzuální strom na základě většinového pravidla a tzv. „strict consensus“ (příkaz: contree all/majrule). Statistická podpora jednotlivých uzlů byla zjištěna pomocí bootstrapu s 1000 pseudoreplikáty (příkaz: bootstrap nrep=1000 search=heuristic keepall=yes).

3.2.4.2. Maximum likelihood

U metody maximální pravděpodobnosti dochází k posouzení, jak jednotlivé evoluční hypotézy vyhovují vstupním datům z hlediska probability. K těmto výpočtům byl použit program raxmlGUI 1.1 (Stamatakis 2006, Silvestro & Michalak 2010), kde byl pro každý dataset zvolen evoluční model general time-reversible s gamma distribucí (GTRGAMMA). V případě konkaténátů byl tento model zvolen zvlášť pro všechny vytvořené oddíly odpovídající jednotlivým genům v datasetech. Správnost topologie získaného stromu byla ověřena bootstrapem s 1000 replikacemi.

3.2.4.3. Bayesiánská analýza

V programu MrBayes 3.2.1 (Ronquist et al. 2011) byla počítána Bayesiánská analýza, která je založená na výpočtu posteriorních pravděpodobností. Analýzy byly opět spouštěny na serveru www.biportal.uio.no. Program používá simulační metodu markovových Monte Carlo řetězců (MCMC) k vyhledávání nejpříznivějších stromů. Pro gen COI a CytB byl zvolen model HKY+I+G (Iset nst=2 rates=invgamma), respektive GTR+I+G (Iset nst=6 rates=invgamma). Pro jaderný gen ITS1 byl zvolen model GTR+G (Iset nst=6 rates=gamma). U konkaténátů byly datasety opět rozděleny na jednotlivé oddíly odpovídající obsaženým genům a každému byl přidělen model, jaký byl použit při jeho samostatné analýze. Jinak bylo zachováno původní nastavení programu. Analýzy byly nastaveny na 10 milionů generací (dataset ITS1), 15 milionů generací (datasety COI a COI+CytB+ITS1) a 20 milionů generací (datasety CytB a COI+CytB), přičemž z každé sté byl uložen strom. Po ukončení jednotlivých běhů programu byly u každého odstraněny neustálené počáteční stromy (alespoň 25 % z konečného počtu stromů) a získány výsledné stromy s posteriorními pravděpodobnostmi jednotlivých větví.

3.2.4.4. Haplotypové sítě

V programu Network 4.610 (<http://www.fluxus-engineering.com/>) byly konstruovány haplotypové sítě, které vizualizují vztahy mezi jednotlivými sekvencemi. Sítě byly vytvořeny, jak pro jednotlivé geny, tak pro konkaténát dvou mitochondriálních genů COI a CytB. Každá síť byla vytvořena pomocí metody Median-joining (Bandelt et al. 1999). Následně byla vždy provedena MP kalkulace, která z předchozího výpočtu sítě vyřadí nepotřebné vektory a linky, čímž výslednou síť zjednoduší.

3.2.4.5. Molekulární datování

K odhadu doby divergence vybraných větví fylogenetického stromu MP vypočteného na základě datasetu COI byly využity průměrné hodnoty nekorigovaných p-distancí spočtené programem MEGA 5. Kalkulace byly prováděny s pomocí odhadnuté rychlosti evoluce genu COI u některých bezobratlých živočichů, která je přibližně 1,5-2,3 % za milion let (Brower 1994, Farrell 2001, Knopp et al. 2011).

3.2.4.6. Haplotypová diverzita, nukleotidová diverzita, Tajima D test

S pomocí programu DNAsp 5.10.01 (Librado & Rozas 2009) byly u vybraných skupin jedinců z konkaténátu COI+CytB vypočítány hodnoty dvou ukazatelů diverzity sekvencí. Haplotypová diverzita je definována jako pravděpodobnost, že dva náhodně vybrané haplotypy mezi vybranými vzorky jsou odlišné (Nei 1987). Naproti tomu nukleotidová diverzita je vymezena jako průměrný počet nukleotidových rozdílů na každé pozici mezi dvěma sekvencemi (Nei 1987).

Program DNAsp byl taktéž využit k výpočtu statistického testu neutrality „Tajima D“ (Tajima 1989), který testuje hypotézu, jestli jsou všechny mutace selektivně neutrální.

4. Výsledky

4.1. Charakter vstupních dat

S pomocí výše popsaných laboratorních postupů (kapitola 3.2.2.) byly získány různě dlouhé části sekvencí od tří odlišných genů. Jednotlivé sekvenční byly v datasetech označeny jedinečnou kombinací znaků, které se pro přehlednost objevují i ve výsledných stromech a dalších výstupech. Vysvětlujícím příkladem může být *O. funesta* z České republiky s označením 1OF047CZE. Na druhé a třetí pozici se nachází dvoupísmenná zkratka druhu, o který se jedná. V tomto případě tedy OF. Za touto zkratkou je tříciferné číslo, které definuje lokalitu odchyty (lokality jsou vypsány v příloze 1). Jednociferné číslo před zkratkou druhu rozlišuje jedince ze stejné lokality. Pro jednodušší orientaci ve stromech apod. je ještě na konci připojena třípísmenná mezinárodní zkratka státu, kde se daná lokalita nachází. Seznam těchto zkratk je vypsán v tabulce 8. Taxony zařazené jako „outgroups“ mají ve výsledcích kompletní rodové jméno. V laboratoři se podařilo osekvenovat celkem šest druhů rodu *Oxythyrea* (*O. abigail*, *O. cinctella*, *O. funesta*, *O. noemi*, *O. pantherina*, *O. tripolitana*). K dispozici byl též druh *O. dulcis* z řeckého Stomia. Materiál byl bohužel nevhodně uskladněn a sekvenční se nepodařilo získat.

Stát	Označení	Stát	Označení	Stát	Označení	Stát	Označení
Rakousko	AUT	Francie	FRA	Itálie	ITA	Slovensko	SVK
Bulharsko	BGR	Řecko	GRC	Maroko	MAR	Tunisko	TUN
Kypř	CYP	Chorvatsko	HRV	Makedonie	MKD	Turecko	TUR
Česká rep.	CZE	Maďarsko	HUN	Portugalsko	PRT	Ukrajina	UKR
Španělsko	ESP	Izrael	ISR	Polsko	POL		

Tabulka 8: Seznam mezinárodních zkratk použitých do databáze.

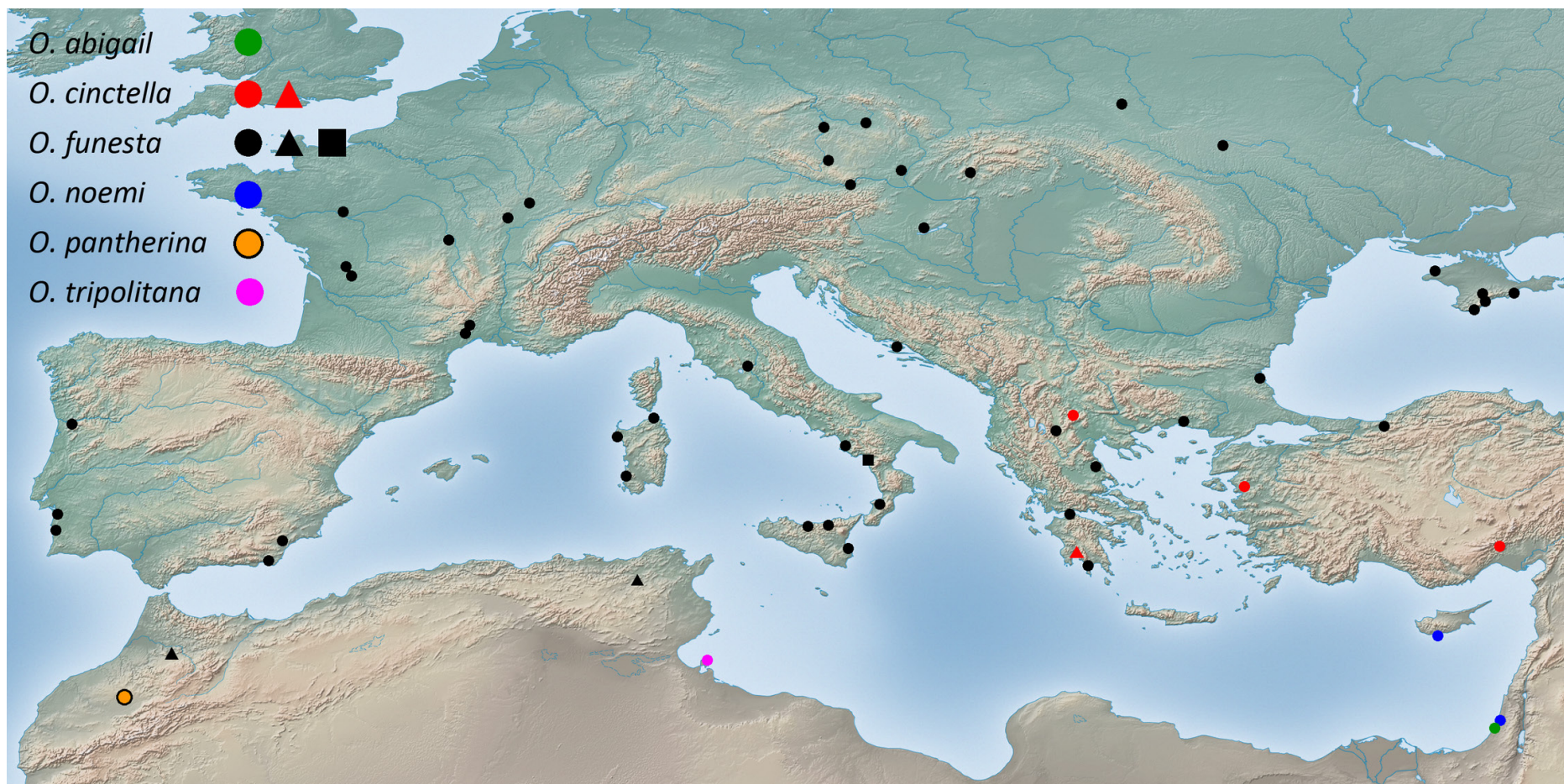
Mezi vstupními daty mitochondriálních genů COI a CytB je jen několik minoritních rozdílů. Prvním je konečná délka úseků. Sekvenční datasetu COI jsou dlouhé 807 bp a CytB 381 bp. U genu COI je navíc zařazen vzorek 3ON043CYP a 1OF010ITA (tato jihoitalská lokalita u genu CytB zcela chybí). Naopak v datasetu CytB se podařilo získat nadto sekvenční těchto vzorků: 2OC046GRC, 1OF0134TUN, 1OF136MAR (lokality se u sekvencí COI nevyskytují vůbec) a 1OT036TUN. Posledním rozdílem je sekvenční zlatohlávka *Homothyrea helenae* (Schaum, 1848), zařazená jako „outgroup“ u genu CytB. U genu COI se jí nepodařilo získat.

Dataset úseku jaderného genu ITS1 s konečnou délkou sekvencí 946 bp je o značnou část vzorků ochuzený. Důvodem byla velmi nízká variabilita v prvotně získaných sekvencích u druhu *O. funesta*. Druhým důvodem byla finanční náročnost osekvenování plného datasetu. Lokality byly vybrány s ohledem na jejich rozmístění, tak aby podávaly podobnou informaci jako u mitochondriálních genů. U ITS1 je oproti předchozím genům zařazen jedinec 1OF020SVK.

Bohužel se nepodařila získat jediná sekvence druhu *O. abigail* a v rámci „outgroups“ byla použitelná pouze sekvence zlatohlávka hladkého *Potosia cuprea metallica* (Herbst, 1782). Následuje tabulka 9, kde je přehled údajů o jednotlivých datasetech a mapy 3 a 4, kde je vyobrazeno rozmístění lokalit osekvenovaných jedinců.

COI 807 bp	Počet vzorků	Počet variabilních míst	Počet parsimoně informativních znaků
Kompletní dataset	163	270	227
Všechny druhy rodu <i>Oxythyrea</i>	156	164	138
Pouze <i>O. funesta</i>	142	55	40
Outgroup	7		
CytB 381 bp	Počet vzorků	Počet variabilních míst	Počet parsimoně informativních znaků
Kompletní dataset	166	138	110
Všechny druhy rodu <i>Oxythyrea</i>	158	92	78
Pouze <i>O. funesta</i>	143	38	22
Outgroup	8		
ITS1 946 bp	Počet vzorků	Počet variabilních míst	Počet parsimoně informativních znaků
Kompletní dataset	85	190	79
Všechny druhy rodu <i>Oxythyrea</i>	84	94	75
Pouze <i>O. funesta</i>	75	7	4
Outgroup	1		
COI+CytB 1188 bp	Počet vzorků	Počet variabilních míst	Počet parsimoně informativních znaků
Kompletní dataset	161	407	333
Všechny druhy rodu <i>Oxythyrea</i>	154	254	210
Pouze <i>O. funesta</i>	141	83	61
Outgroup	7		
COI+CytB+ITS1 2134 bp	Počet vzorků	Počet variabilních míst	Počet parsimoně informativních znaků
Kompletní dataset	81	483	249
Všechny druhy rodu <i>Oxythyrea</i>	80	325	236
Pouze <i>O. funesta</i>	72	77	50
Outgroup	1		

Tabulka 9: Základní informace o použitých datasetech a jejich podmnožinách.



Mapa 3: Mapa s rozmístěním lokalit osekvenovaných jedinců pro úseky mitochondriálních genů COI a CytB. Barevné označení jednotlivých druhů odpovídá barvám v haplotypových sítích, fylogenetických stromech a seznamu použitého materiálu. Použité symboly: ● = sekvenci se podařilo získat od obou genů (COI i CytB), ■ = sekvence pouze pro dataset COI, ▲ = sekvence pouze pro dataset CytB.



Mapa 4: Mapa s rozmístěním lokalit osekvenovaných jedinců pro úsek jaderného genu ITS1. Barevné označení jednotlivých druhů odpovídá barvám v haplotypových sítích, fylogenetických stromech a seznamu použitého materiálu.

4.2. Haplotypové sítě a fylogenetické analýzy

V následujících podkapitolách budou vyobrazeny dvě haplotypové sítě od základních datasetů. První z dvojice sítí prezentuje všechny druhy rodu *Oxythyrea*, kdežto druhá pouze druh *O. funesta*. Pro konkaténát COI+CytB bude zobrazena jenom jedna síť zahrnující výhradně zlatohlávka tmavého. Dále budou u datasetu COI vypsány nekorigované *p*-distance vybraných taxonů. A nakonec budou od každého datasetu znázorněny tři fylogenetické stromy (metoda MP, ML, BA). V případě MP a ML se jedná o kladogramy. U druhé jmenované metody byl tento typ stromu zvolen z důvodu jeho celkové topologie, která by ve fylogramu nebyla zřetelná. Původně zamýšlené fylogramy na základě ML jsou uloženy na přiloženém kompaktním disku. U poslední metody BA byl zvolen k vyobrazení fylogram. Obrázky stromů byly kvůli nadměrným velikostem rozděleny na dva oddíly „a“ a „b“ (dataset COI, CytB a COI+CytB). Obrázky stromů datasetů ITS1 a COI+CytB+ITS1 nebylo třeba rozdělovat. Například fylogenetický strom zkonstruovaný metodou MP na základě datasetu COI je znázorněn obrázkem 17a a 17b. Kompletní přehled nekorigovaných *p*-distancí všech jedinců datasetu COI a nerozdělené fylogenetické stromy jsou taktéž uloženy na připojeném kompaktním disku.

4.2.1. Dataset genu COI

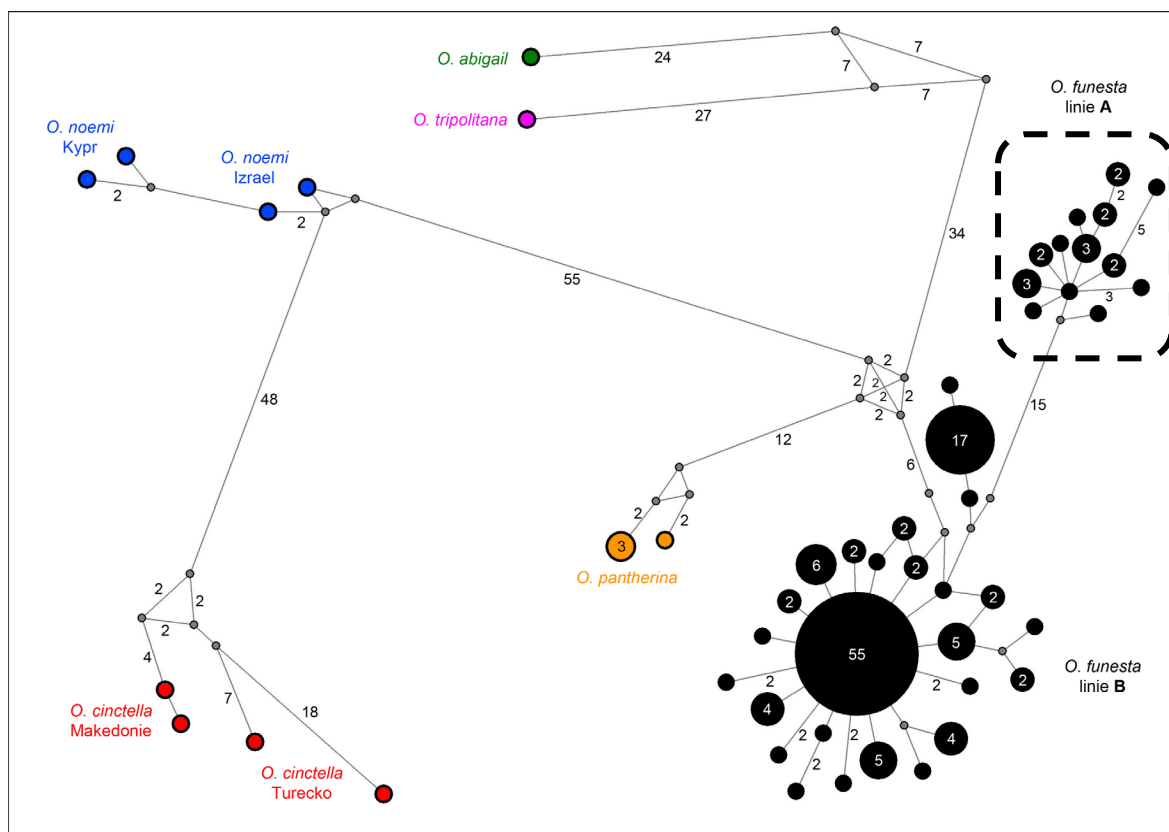
Haplotypové sítě

Celkem bylo v datasetu genu COI identifikováno 51 haplotypů v rámci 156 sekvencí příslušících jedincům rodu *Oxythyrea* (obr. 15). Jak je ze sítě patrné, všech šest druhů, které se podařilo osekvenovat, tvoří samostatné klastry. U zlatohlávků *O. noemi* můžeme rozlišit izraelskou a kyperskou populaci. Podobně i u druhu *O. cinctella*, kde se diferencuje makedonská a turecká populace. U druhu *O. funesta* je zřetelné hvězdovité rozložení („star pattern“; linie B), z něhož vystupuje samostatný klastr (linie A; čárkovaně označená). Mezi linií A a B je u nejbližší postavených haplotypů 18 mutací. Mezi linií B a druhem *O. pantherina* je to 25 mutací.

Podrobnější pohled nám poskytne druhá haplotypová síť (obr. 16) zahrnující pouze druh *O. funesta*. Zde bylo identifikováno 39 haplotypů ze 142 sekvencí (tabulka 10). Centrum tvoří haplotyp A4, který obsahuje 55 sekvencí z 25 různých lokalit. Z něj přímo vychází 10 různých samostatných haplotypů lišících se pouze 1-2 mutacemi. Dále je zde haplotyp A36 (jedinec ze západní Francie) a z něj vycházející haplotyp A31 (jihovýchodní Španělsko). Zvláštní je propojení haplotypů A22, A23 a A27, které obsahují zlatohlávka tmavého ze střední Itálie, Peloponésu a jižního Portugalska. Taktéž vazba mezi chorvatským haplotypem (A1) a sekvencí ze Sardinie (A39) vypadá neobvykle. Naopak spojení haplotypů A29, A30 (jihovýchodní Španělsko), A34, A35 (jihovýchodní Francie) a A37 (Sardinie) je z geografického rozmístění daných lokalit vcelku

přijatelné. Na poslední zmíněný se napojují postupně haplotypy A5, A2 a A28. Tyto haplotypy zahrnují sekvence některých jedinců ze střední Evropy, Ukrajiny a Balkánu.

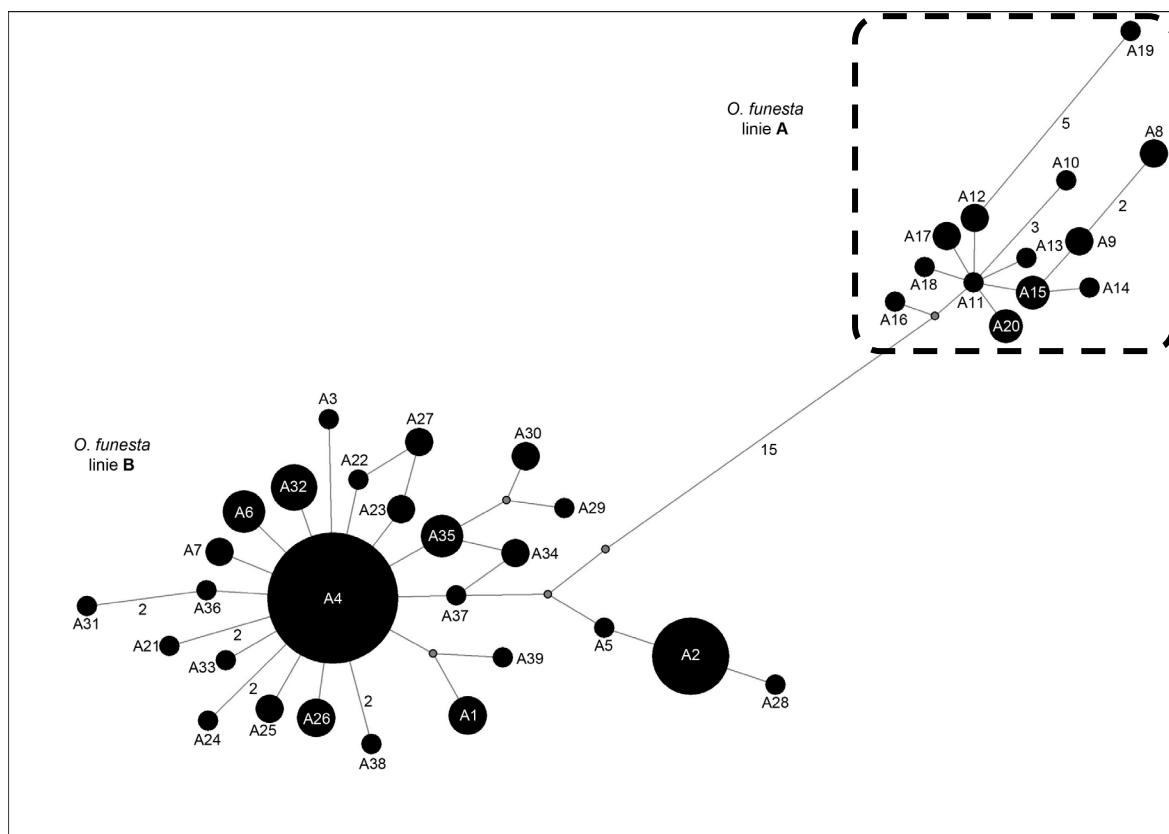
Mezi haplotypy A37 a A5 se napojuje klastř populací z jižní Itálie a Sicílie (linie A). U linie A celkem 21 jedinců tvoří 13 různých haplotypů, přičemž ty nejodvozenější odpovídají jižní Itálii. Lokality, které zahrnují jedince v linii A znázorňuje čárkovaným kruhem mapa 5. Stejně je vyznačena i ve fylogenetických stromech (obr. 17a, 18a, 19a).



Obrázek 15: Haplotypová síť typu „median joining“ zobrazující genealogické vztahy v rámci datasetu genu COI u zkoumaných taxonů rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842. Barevné označení jednotlivých druhů odpovídá barvám v mapách, fylogenetických stromech a seznamu použitého materiálu. Velikost kruhů odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem, uvnitř kruhů je tento počet zobrazen (vyznačeno pro $n > 1$). Čísla na spojnících označují počet mutací mezi uzly (vyznačeno pro $n > 1$).



Mapa 5: V čárkovaném kruhu se nalézají lokality, ze kterých pocházejí osekvenovaní jedinci druhu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) odpovídající linii A v haplotypových sítích (obr. 15 a 16) a fylogenetických stromech (obr. 17a, 18a, 19a). Symboly vyznačených lokalit se shodují s mapou 3.



Obrázek 16: Haplotypová síť typu „median joining“ zobrazující genealogické vztahy v rámci datasetu genu COI u zkoumaného taxonu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761). Velikost kruhů odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem. Uvnitř kruhů, nebo v jejich blízkosti je vyobrazeno identifikační číslo haplotypu odpovídající tabulce 10. Čísla na spojnicích označují počet mutací mezi uzly (vyznačeno pro $n > 1$).

Označení haplotypu	Počet sekvencí	Délka haplotypu	Sekvence haplotypu	Označení haplotypu	Počet sekvencí	Délka haplotypu	Sekvence haplotypu
A1	4	807	1OF001HRV 2OF001HRV 3OF001HRV 4OF001HRV	A4	55	807	4OF103GRC 1OF107ITA 2OF107ITA 3OF107ITA 4OF107ITA 1OF135TUR
A2	17	807	1OF002GRC 2OF002GRC 3OF002GRC 4OF002GRC 1OF045SVK 2OF045SVK 1OF047CZE 1OF062HUN 2OF062HUN 3OF062HUN 4OF062HUN 1OF071POL 3OF072UKR 2OF077UKR 1OF115CZE 2OF115CZE 3OF115CZE	A5	1	807	4OF003GRC
A3	1	807	1OF003GRC	A6	5	807	1OF005PRT 2OF005PRT 3OF005PRT 4OF005PRT 3OF070ESP
A4	55	807	2OF003GRC 3OF003GRC 1OF007CZE 2OF007CZE 1OF019ITA 2OF021PRT 2OF044BGR 4OF044BGR 3OF045SVK 4OF045SVK 1OF064AUT 1OF070ESP 2OF070ESP 1OF072UKR 1OF073UKR 1OF074UKR 2OF074UKR 4OF074UKR 1OF076UKR 1OF077UKR 3OF077UKR 6OF078UKR 1OF083FRA 2OF083FRA 3OF083FRA 4OF083FRA 1OF085FRA 2OF085FRA 3OF085FRA 1OF088FRA 2OF088FRA 3OF088FRA 4OF088FRA 1OF090FRA 2OF090FRA 3OF090FRA 4OF090FRA 2OF092FRA 3OF092FRA 4OF092FRA 1OF093FRA 2OF097ITA 3OF097ITA 4OF097ITA 2OF101ITA 4OF101ITA 1OF103GRC 2OF103GRC 3OF103GRC	A7	2	807	1OF006CZE 2OF006CZE
				A8	2	807	1OF009ITA 3OF009ITA
				A9	2	807	2OF009ITA 4OF009ITA
				A10	1	807	4OF010ITA
				A11	1	807	1OF014ITA
				A12	2	807	2OF014ITA 5OF014ITA
				A13	1	807	3OF014ITA
				A14	1	807	1OF015ITA
				A15	3	807	2OF015ITA 3OF015ITA 4OF015ITA
				A16	1	807	1OF016ITA
				A17	2	807	2OF016ITA 3OF016ITA
				A18	1	807	4OF016ITA
				A19	1	807	1OF018ITA
				A20	3	807	2OF018ITA 3OF018ITA 4OF018ITA
				A21	1	807	2OF019ITA
				A22	1	807	4OF019ITA
				A23	2	807	5OF019ITA 1OF109GRC
				A24	1	807	1OF021PRT
				A25	2	807	1OF044BGR 3OF044BGR
				A26	4	807	2OF047CZE 3OF047CZE 4OF047CZE 2OF087FRA
				A27	2	807	1OF063PRT 2OF063PRT
				A28	1	807	1OF066GRC
				A29	1	807	1OF069ESP
				A30	2	807	2OF069ESP 3OF069ESP
				A31	1	807	4OF070ESP
				A32	6	807	2OF073UKR 3OF073UKR 4OF073UKR 1OF078UKR 2OF078UKR 3OF078UKR
				A33	1	807	3OF074UKR
				A34	2	807	1OF082FRA 6OF082FRA
				A35	5	807	2OF082FRA 3OF082FRA 1OF087FRA 3OF087FRA 4OF087FRA
				A36	1	807	1OF092FRA
				A37	1	807	1OF097ITA
				A38	1	807	1OF101ITA
				A39	1	807	3OF101ITA

Tabulka 10: Seznam identifikovaných haplotypů u druhu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) v datasetu COI. Označení haplotypů odpovídá haplotypové síti (obr. 16).

Nekorigované p-distance a fylogenetické stromy

Fylogenetické stromy (obr. 17-19) konstruované na základě datasetu COI vykazují velice podobné topologie ve všech třech analýzách (MP, ML, BA) a podporují výsledky haplotypových sítí. Nekorigované p-distance vybraných jedinců jsou vypsány v tabulce 11.

U příbuzných zlatohlávků („outgroups“) je vidět vždy podobný vzor uspořádání jednotlivých zástupců různých rodů, přičemž taxon *Leucocelis* sp. pokaždé tvoří sesterskou větev všem druhům rodu *Oxythyrea* (HB: 46 (MP), 61 (ML); PP = 1.00; divergence 11 %).

Bazální větev rodu *Oxythyrea* je ve všech třech analýzách formována linií sesterských druhů *O. noemi* a *O. cinctella* s divergencí 7 % (HB: 99 (MP), 99 (ML); PP: 1.00). U zlatohlávka *O. noemi* můžeme sledovat rozdíl mezi kyperskou (ON043CYP) a izraelskou (ON138ISR) populací (divergence 1,5 %). Bázi kládu *O. cinctella* tvoří taxon 10C120TUR ze západního Turecka (oblast Izmir). Následuje taxon 10C123TUR z jižního Turecka (oblast Adana) a jako nejodvozenější skupina je zde dvojice zástupců z Makedonie (OC104MKD). Divergence mezi jednotlivými lokalitami se pohybuje od 1,7 do 3,2 procent.

Zbylé druhy rodu *Oxythyrea* tvoří k bazálnímu kládu *O. noemi* + *O. cinctella* sesterskou skupinu. Ve všech třech analýzách tyto druhy tvoří dvě sesterské linie (HB: 43 (MP), 48 (ML); PP = 0.80; divergence 8,8 %). První linie obsahuje dva taxony *O. tripolitana* a *O. abigail* (sesterské druhy; HB: 98 (MP), 97 (ML); PP = 1.00; divergence 7,2 %). Druhá větev zahrnuje druhy *O. funesta* a *O. pantherina*. Zde je však situace komplikovanější, jelikož zástupci druhu *O. funesta* ze Sicílie a části Itálie tvoří samostatný klád (linie A; výsledek odpovídá haplotypové síti, obr. 15, 16). Linie A je sesterská ke druhu *O. pantherina* a zbylým zástupcům druhu *O. funesta* (linie B). HB pro tento uzel je 99 (MP) a 77 (ML), PP = 1.00. Zlatohlávek *O. pantherina* a linie B druhu *O. funesta* se větví dichotomicky (HB: 66 (MP), 52 (ML); PP: 0.80; divergence 3,3 %). Hodnota nekorigovaných p-distancí mezi linií A a B je 2,6 % a mezi linií A a druhem *O. pantherina* pak 4,1 %.

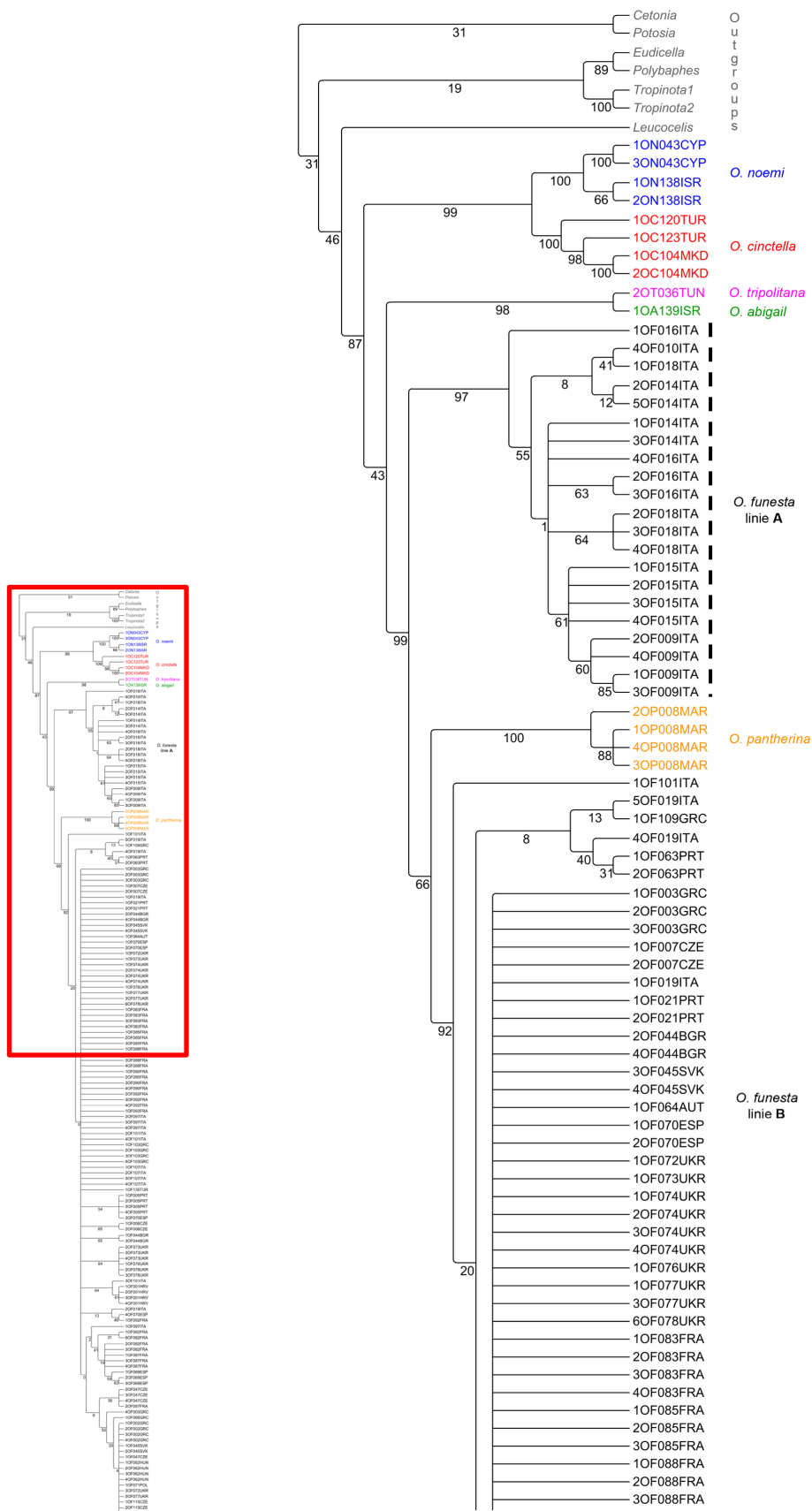
Linie A (21 jedinců; shodné s haplotypovou sítí, obr. 15, 16) je ve všech analýzách relativně více diverzifikovaná oproti linii B (121 jedinců), která obsahuje většinu jedinců druhu *O. funesta*. Na bázi linie A (MP a ML) je vidět vzorek ze Sicílie (1OF016ITA; HB: 97 (MP), 76 (ML); haplotyp A16). V Bayesiánské analýze tato sekvence polytomicky vychází z hlavního uzlu (PP = 0.98) stejně jako všechny ostatní. Některé z nich jsou však uspořádány do menších podskupin, které jsou více méně stabilní v rámci všech analýz. Přesto, že se jedinci ze stejných lokalit většinou vyskytují ve stromech pohromadě, populace z jižní Itálie a Sicílie nejsou oddělené.

V linii B (MP a BA) můžeme vidět většinu vzorků uspořádaných polytomicky v hlavním kládu (haplotyp A4, A24, A33). U metody ML se jedinci postupně rozvětvují, ale téměř u všech uzlů jsou velmi nízké, často až nulové hodnoty bootstrapu. Přesto je u linie B vidět několik zajímavých bodů.

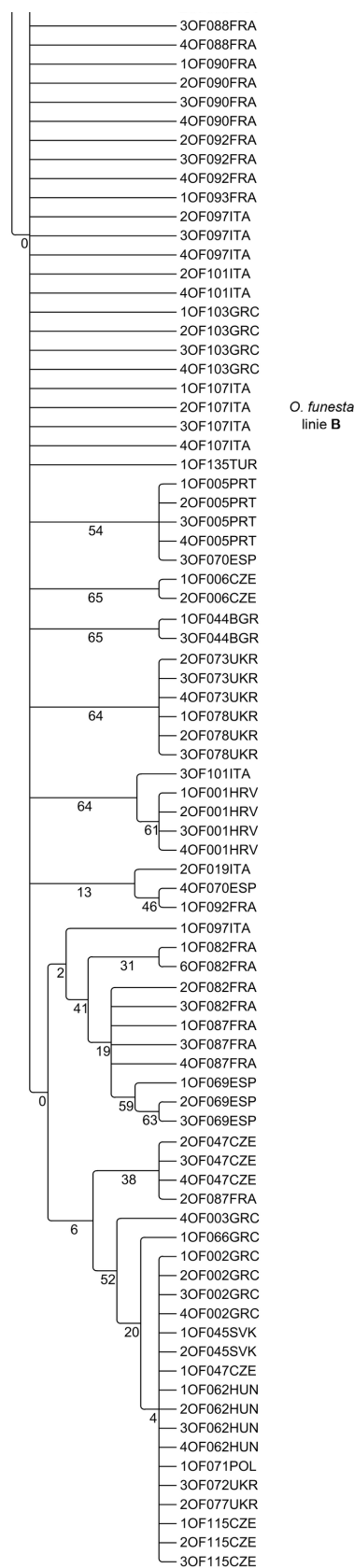
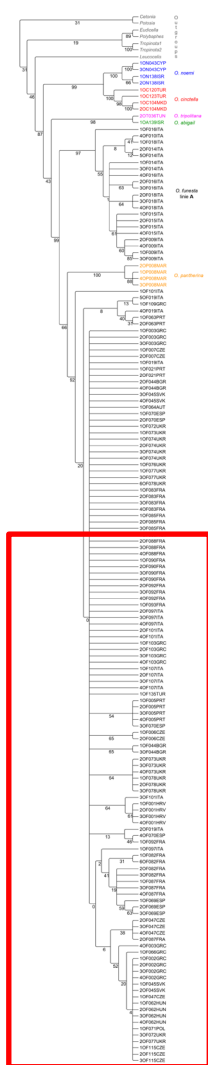
U ML a BA je na bázi linie B větev se všemi jedinci ze severního Portugalska (OF005PRT) a jedinec z jihovýchodního Španělska (3OF070ESP; haplotyp A6). Naproti tomu u MP je na bázi pouze jediný taxon ze Sardinie (1OF101ITA; haplotyp A38). Linie B (MP) se dále dichotomicky větví na dvě skupiny, první zahrnuje jedince ze střední Itálie (4OF019ITA, 5OF019ITA), Peloponésu (1OF109GRC) a jižního Portugalska (1OF063PRT, 2OF063PRT); (haplotypy A22, A23, A27). Druhá větev zahrnuje zbylé taxony, kde se valná část jedinců objevuje v polytomickém uspořádání, včetně několika podskupin zahrnující i zmíněnou bazální větev u ML a BA. Zajímavostí (v kontrastu s linií A) může být takovéto zařazení většiny jedinců ze Sardinie, Krymu, nebo severozápadního Turecka (1OF135TUR), viz podobně haplotyp A4. Nicméně můžeme ve všech třech stromech vidět několik kládů, které sdružují zlatohlávka tmavého ze stejných, nebo podobných lokalit (viz též haplotypová síť, obr. 16). Jejich umístění je polytomické v rámci hlavní větve (MP a BA). U metody ML se tyto klády také vyskytují, ale jejich umístění je složitější. Jedná se o větev některých jedinců z krymských lokalit OF073UKR a OF078UKR (haplotyp A32), jedince z ČR (haplotyp A7), dva jedince z Bulharska (haplotyp A25), nebo klád umístěný na konci fylogenetických stromů (MP, ML, BA), který sdružuje zástupce z lokalit střední Evropy, východní Evropy a Balkánu (začlenění do haplotypu A2). V případě stromu MP se však jedná o odvozenou skupinu, neboť dichotomicky vychází z uzlu na hlavní větví spolu s kládem zahrnující některé jedince z lokalit Sardinie, jihovýchodní Francie a jihovýchodního Španělska (haplotypy A29, A30, A34, A35, A37). Tento klád (bez jedince ze Sardinie 1OF097ITA) se vyskytuje i v analýze ML. V Bayesiánské analýze jsou v kládu pouze zvířata z jihošpanělské lokality (OF069ESP), zbytek je rozmístěn na hlavní větví. Naopak zvláštností může být větev (MP, ML, BA), která sdružuje tři jedince z okolí Prahy (OF047CZE) a jedince z jihovýchodní Francie (2OF087FRA); (haplotyp 26), nebo klád (MP, ML) obsahující zvíře ze Sardinie (3OF101ITA) a všechny jedince z Brače (OF001HRV). Ve fylogenetickém stromě BA tvoří zlatohlávci z Brače samostatný klád (haplotyp A1) a jedinec ze Sardinie je umístěn mimo něj (haplotyp A39).

	1OF001 HRV	1OF002 GRC	1OF005 PRT	1OF006 CZE	1OF009 ITA	1OF019 ITA	1OF044 BGR	1OF062 HUN	1OF069 ESP	1OF071 POL	1OF078 UKR	1OF087 FRA	1OF097 ITA	1OF135 TUR	1OA139 ISR	1OC104 MKD	1OC120 TUR	1ON043 CYP	1ON138 ISR	1OP008 MAR	2OT036 TUN
1OF002GRC	0,00496																				
1OF005PRT	0,00372	0,00372																			
1OF006CZE	0,00372	0,00372	0,00248																		
1OF009ITA	0,02974	0,02726	0,02602	0,02850																	
1OF019ITA	0,00248	0,00248	0,00124	0,00124	0,02726																
1OF044BGR	0,00372	0,00372	0,00248	0,00248	0,02850	0,00124															
1OF062HUN	0,00496	0,00000	0,00372	0,00372	0,02726	0,00248	0,00372														
1OF069ESP	0,00620	0,00620	0,00496	0,00496	0,03098	0,00372	0,00496	0,00620													
1OF071POL	0,00496	0,00000	0,00372	0,00372	0,02726	0,00248	0,00372	0,00000	0,00620												
1OF078UKR	0,00372	0,00372	0,00248	0,00248	0,02850	0,00124	0,00248	0,00372	0,00496	0,00372											
1OF087FRA	0,00372	0,00372	0,00248	0,00248	0,02850	0,00124	0,00248	0,00372	0,00248	0,00372	0,00248										
1OF097ITA	0,00372	0,00372	0,00248	0,00248	0,02602	0,00124	0,00248	0,00372	0,00496	0,00372	0,00248	0,00248									
1OF135TUR	0,00248	0,00248	0,00124	0,00124	0,02726	0,00000	0,00124	0,00248	0,00372	0,00248	0,00124	0,00124	0,00124								
1OA139ISR	0,08550	0,08426	0,08550	0,08674	0,09418	0,08550	0,08674	0,08426	0,08674	0,08426	0,08674	0,08674	0,08674	0,08550							
1OC104MKD	0,09418	0,09913	0,09665	0,09789	0,09294	0,09665	0,09789	0,09913	0,09913	0,09913	0,09789	0,09789	0,09542	0,09665	0,11276						
1OC120TUR	0,09542	0,09542	0,09542	0,09665	0,08922	0,09542	0,09665	0,09542	0,09789	0,09542	0,09665	0,09665	0,09418	0,09542	0,10657	0,03098					
1ON043CYP	0,08302	0,08550	0,08426	0,08550	0,08922	0,08426	0,08426	0,08550	0,08674	0,08550	0,08550	0,08550	0,08550	0,08426	0,10161	0,07063	0,07063				
1ON138ISR	0,08178	0,08178	0,08302	0,08426	0,08550	0,08302	0,08302	0,08178	0,08550	0,08178	0,08426	0,08426	0,08178	0,08302	0,10037	0,06815	0,06691	0,01611			
1OP008MAR	0,03470	0,03470	0,03222	0,03346	0,04461	0,03222	0,03346	0,03470	0,03346	0,03470	0,03346	0,03346	0,03098	0,03222	0,08922	0,09789	0,09542	0,09170	0,08674		
2OT036TUN	0,08798	0,08922	0,08674	0,08922	0,09170	0,08798	0,08922	0,08922	0,08798	0,08922	0,08922	0,08674	0,08674	0,08798	0,07187	0,11276	0,10161	0,10285	0,09789	0,09294	
Leucocelis	0,11152	0,10905	0,10905	0,11029	0,10781	0,10905	0,11029	0,10905	0,10905	0,10905	0,10781	0,10905	0,10781	0,10905	0,13011	0,12639	0,11524	0,12515	0,11772	0,11648	0,11772

Tabulka 11: Přehled nekorigovaných p-distancí vybraných taxonů z datasetu genu COI. Úplná data jsou uložena na připojeném kompaktním disku.



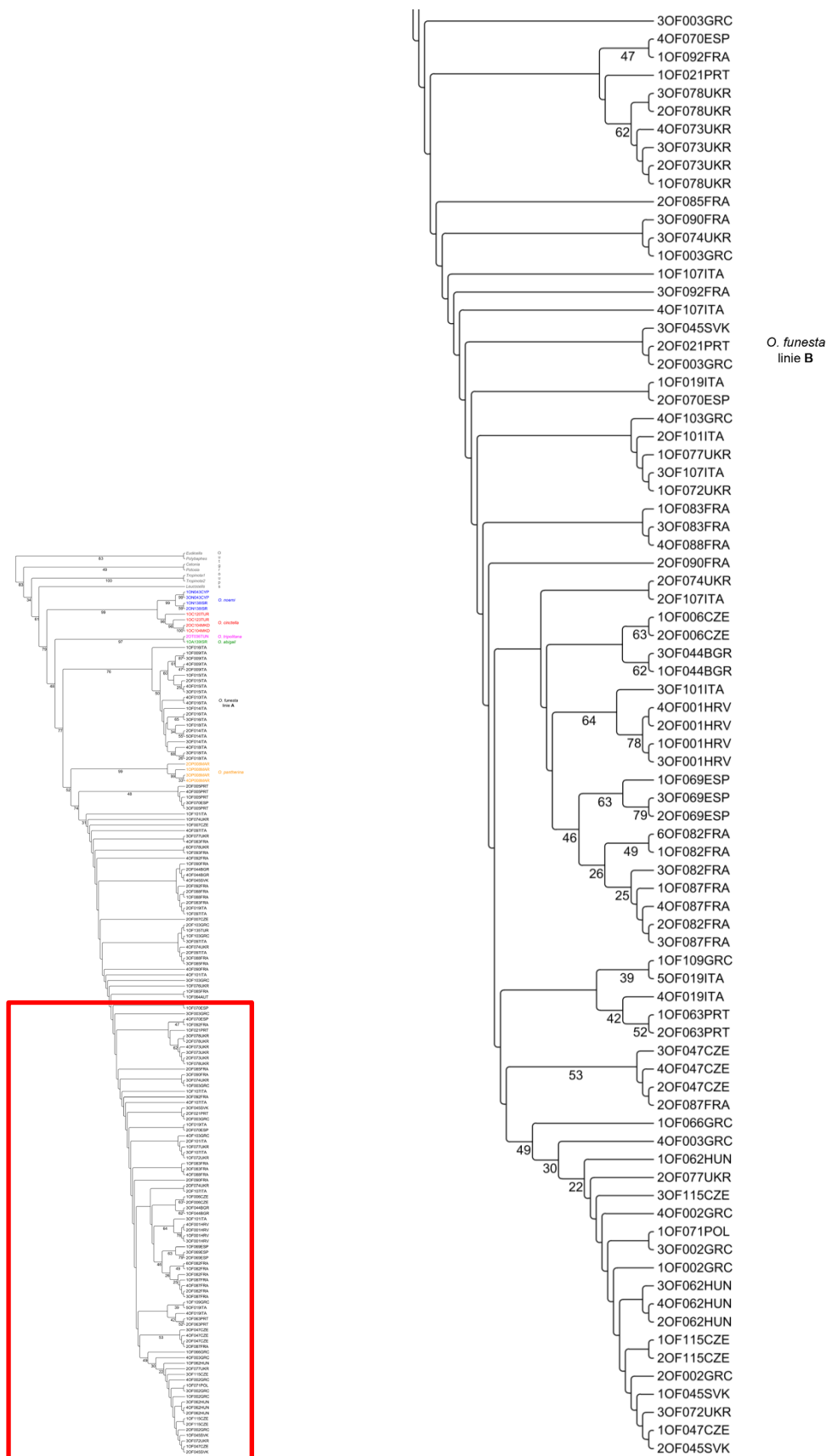
Obrázek 17a: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COI metodou maximální parsimonie. Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Ve všech uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu. Délka stromu je 780 kroků (CI = 0.4949, RI = 0.5051). Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



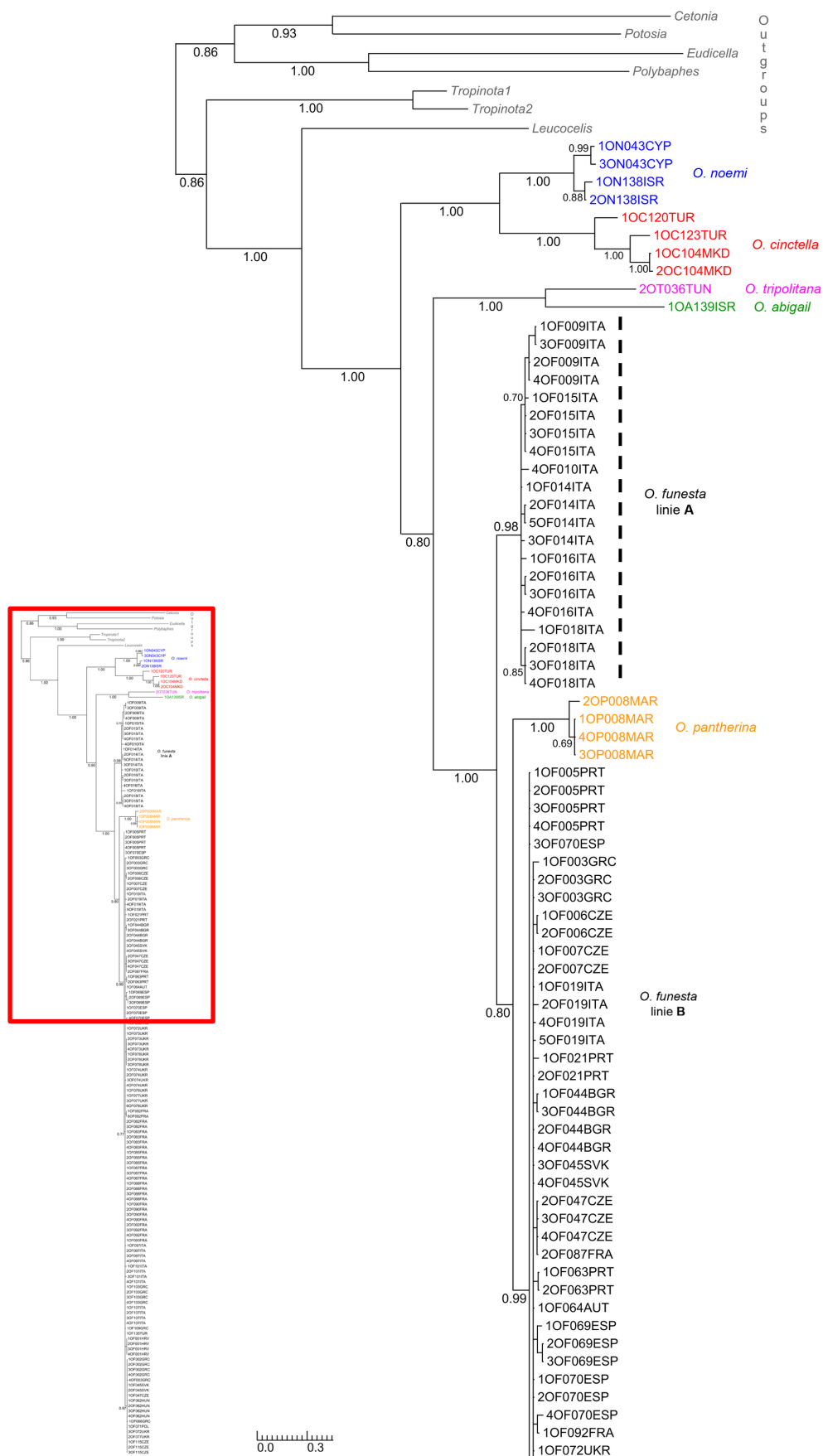
Obrázek 17b: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COI metodou maximální parsimonie. Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Ve všech uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu. Délka stromu je 780 kroků (CI = 0.4949, RI = 0.5051). Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



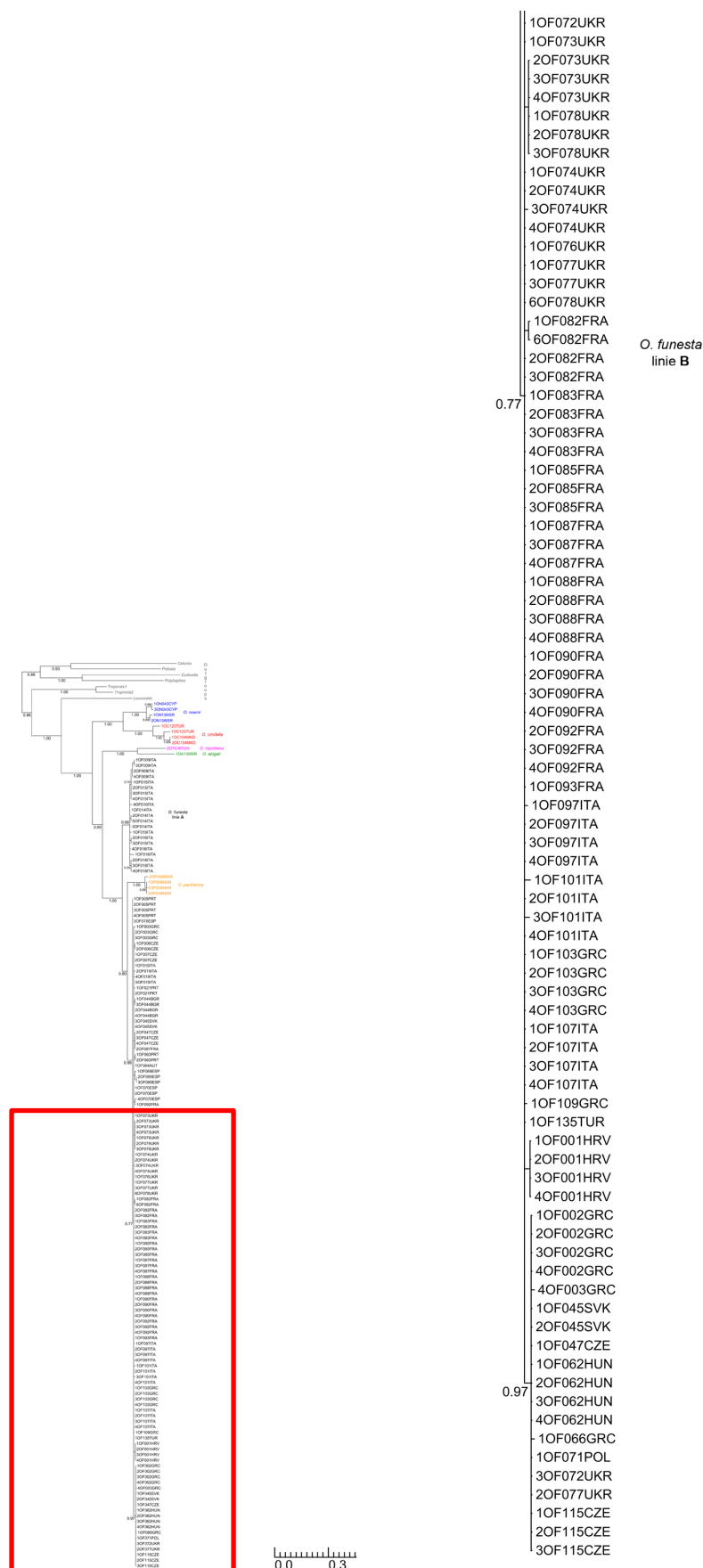
Obrázek 18a: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COI metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu >20%. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



Obrazek 18b: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COI metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu >20%. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



Obrázek 19a: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COI Bayesovskou analýzou (model HKY+I+G). Posteriorní pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech. Počet generací 15 milionů. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



Obrázek 19b: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COI Bayesovskou analýzou (model HKY+I+G). Posteriorní pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech. Počet generací 15 milionů. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.

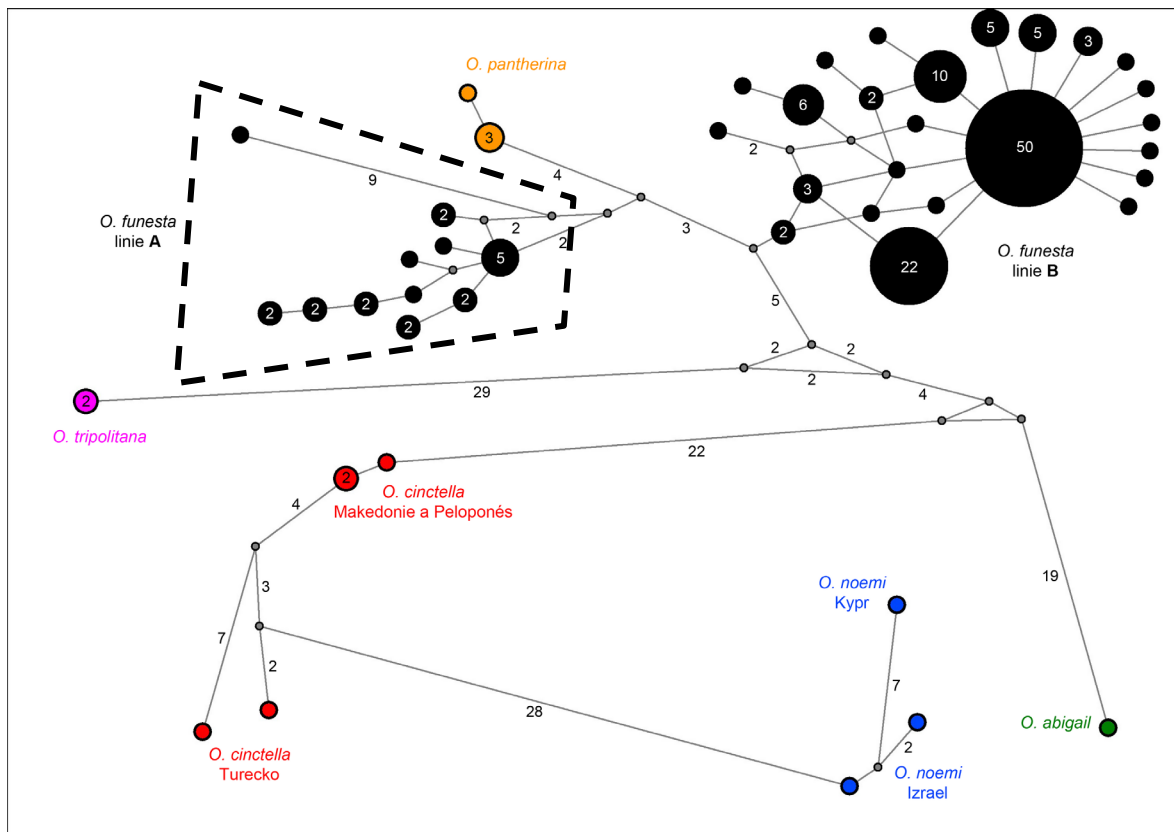
4.2.2. Dataset genu CytB

Haplotypové síť

V datasetu druhého mitochondriálního genu bylo mezi 158 sekvencemi zlatohlávků rodu *Oxythyrea* identifikováno 46 haplotypů (obr. 20). Přesto, že délka sekvencí je více jak o polovinu menší, než je tomu u předchozího genu, nabízí tento dataset relativně velkou variabilitu (viz tab. 9). Opět je tedy možné rozlišit všechny druhy zařazené do analýz. Podobně jsou vidět rozdíly mezi tureckou a balkánskou, respektive izraelskou a kyperskou populací druhů *O. cinctella* a *O. noemi*. Zlatohlávek *O. pantherina* opět vykazuje podobně blízký vztah ke druhu *O. funesta*, jako v předchozím datasetu. Tentokrát však poměrně blízkým vztahem k linii A (čárkovaně označená) zlatohlávka tmavého (7 mutací), jenž opět vytváří dva klastry (linie A a B). Mezi linií A a B je také sedm mutací.

U zlatohlávka tmavého bylo identifikováno 35 haplotypů (celkem 143 sekvencí; tab. 12). Hvězdovitý motiv linie B je zde mírně narušen (obr. 21). Více jak polovina haplotypu tvoří provázanou síť (jedinci z různých lokalit včetně vzorku z Maroka, haplotyp B35), která je napojena na centrální bod sítě (B2) obsahující 50 sekvencí převážně z východní a střední Evropy a Balkánu (nicméně jsou zde i sekvence z Portugalska, Španělska a Francie). Počet mutací v rámci centrálního haplotypu a touto sítí se pohybuje mezi jednou až pěti. Další dva haplotypy (B1 a B28) sdružují poměrně velké množství sekvencí a vykazují zajímavé složení. Haplotyp B1 obsahuje 22 sekvencí, z nichž 16 je od francouzských jedinců (jen jedna je z jihovýchodních lokalit), čtyři sekvence pochází z Brače a poslední dvě jsou z Rakouska (1OF064AUT) a východního Řecka (1OF003GRC). Druhý haplotyp (B28) zahrnuje devět z dvanácti jedinců osekvenovaných ze Sardinie (zbylé tvoří další haplotypy B31, B32) a pozoruhodně též jednoho zlatohlávka z Krymu (1OF077UKR). Stejně zvláštně je umístěna další sekvence ze západní Ukrajiny (1OF072UKR), která má stejný haplotyp (B4), jako zlatohlávci ze severu Portugalska (OF005PRT). Poslední zajímavostí je sekvence ze severozápadního Turecka, která tentokrát leží mimo centrální haplotyp (viz dataset COI) a je soustředěna se sekvencemi z České republiky a Řecka do haplotypu B21.

V linii A se nachází 11 haplotypů složených z 21 sekvencí s podobným rozložením, jako u datasetu COI. Spadá sem také sekvence z Tuniska (haplotyp B34), která je nápadně odlišná (12 mutací). Lokality, které zahrnují jedince v linii A znázorňuje čárkovaným oválem mapa 6. Dále je vyznačena i ve fylogenetických stromech (obr. 22a, 23a, 24a).



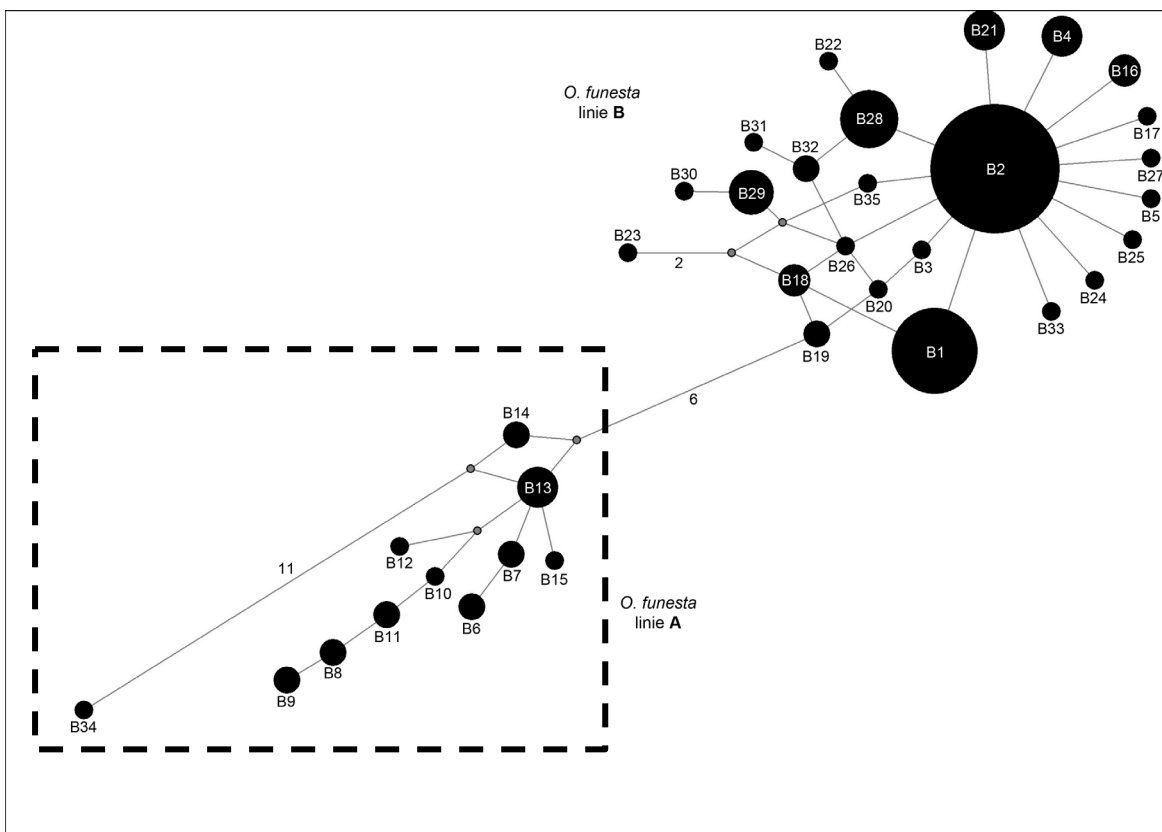
Obrázek 20: Haplotypová síť typu „median joining“ zobrazující genealogické vztahy v rámci datasetu genu CytB u zkoumaných taxonů rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842. Barevné označení jednotlivých druhů odpovídá barvám v mapách, fylogenetických stromech a seznamu použitého materiálu. Velikost kruhů odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem, uvnitř kruhů je tento počet zobrazen (vyznačeno pro $n > 1$). Čísla na spojnících označují počet mutací mezi uzly (vyznačeno pro $n > 1$).



Mapa 6: V čárkovaném oválu se nalézají lokality, ze kterých pocházejí osekvenovaní jedinci druhu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) odpovídající linii A v haplotypové síti (obr. 20 a 21) a fylogenetických stromech (obr. 22a, 23a, 24a). Symboly vyznačených lokalit se shodují s mapou 3.

Označení haplotypu	Počet sekvencí	Délka haplotypu	Sekvence haplotypu	Označení haplotypu	Počet sekvencí	Délka haplotypu	Sekvence haplotypu
B1	22	381	1OF001HRV	B3	1	381	4OF003GRC
			2OF001HRV	B4	5	381	1OF005PRT
			3OF001HRV				2OF005PRT
			4OF001HRV				3OF005PRT
			1OF003GRC	B5	1	381	4OF005PRT
			1OF064AUT				1OF072UKR
			2OF083FRA	B6	2	381	1OF006CZE
			3OF083FRA	B7	2	381	1OF009ITA
			1OF085FRA				2OF009ITA
			2OF087FRA	B8	2	381	3OF009ITA
			1OF088FRA				4OF009ITA
			2OF088FRA	B9	2	381	1OF014ITA
			3OF088FRA				3OF015ITA
B2	50	381	1OF090FRA	B10	1	381	2OF014ITA
			2OF090FRA	B11	2	381	5OF014ITA
			3OF090FRA				3OF014ITA
			4OF090FRA	B12	1	381	1OF015ITA
			1OF092FRA				2OF015ITA
			2OF092FRA	B13	5	381	4OF015ITA
			3OF092FRA				1OF016ITA
			4OF092FRA				1OF018ITA
			1OF093FRA				2OF018ITA
			1OF002GRC				3OF018ITA
			2OF002GRC	B14	2	381	4OF018ITA
			3OF002GRC				2OF016ITA
			4OF002GRC	B15	1	381	3OF016ITA
			2OF003GRC				4OF016ITA
			3OF003GRC	B16	3	381	1OF019ITA
			2OF006CZE				2OF019ITA
			1OF007CZE	B17	1	381	5OF019ITA
			2OF007CZE				4OF019ITA
			2OF021PRT	B18	3	381	1OF021PRT
			4OF044BGR				3OF070ESP
			1OF045SVK	B19	2	381	1OF083FRA
			2OF045SVK				1OF044BGR
			3OF045SVK	B20	1	381	3OF044BGR
			4OF045SVK				2OF044BGR
			1OF047CZE	B21	5	381	2OF047CZE
			1OF062HUN				3OF047CZE
			2OF062HUN				4OF047CZE
			3OF062HUN				1OF109GRC
			4OF062HUN				1OF135TUR
			1OF063PRT	B22	1	381	2OF063PRT
			1OF066GRC	B23	1	381	1OF069ESP
			2OF069ESP	B24	1	381	1OF070ESP
			3OF069ESP	B25	1	381	4OF070ESP
			2OF070ESP	B26	1	381	1OF073UKR
			1OF071POL	B27	1	381	3OF074UKR
			3OF072UKR	B28	10	381	1OF077UKR
			2OF073UKR				1OF097ITA
			3OF073UKR				2OF097ITA
			4OF073UKR				3OF097ITA
			1OF074UKR				4OF097ITA
			2OF074UKR				1OF101ITA
			4OF074UKR				3OF101ITA
			1OF076UKR				4OF101ITA
			2OF077UKR				1OF107ITA
			3OF077UKR				4OF107ITA
			1OF078UKR	B29	6	381	1OF082FRA
			2OF078UKR				2OF082FRA
			3OF078UKR				6OF082FRA
			6OF078UKR				1OF087FRA
			4OF083FRA				3OF087FRA
			2OF085FRA	B30	1	381	4OF087FRA
			3OF085FRA				3OF082FRA
			4OF088FRA	B31	1	381	2OF101ITA
			1OF103GRC	B32	2	381	2OF107ITA
			2OF103GRC				3OF107ITA
			3OF103GRC	B33	1	381	1OF115CZE
			4OF103GRC	B34	1	381	1OF134TUN
			2OF115CZE	B35	1	381	1OF136MAR
			3OF115CZE				

Tabulka 12: Seznam identifikovaných haplotypů u druhu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) v datasetu CytB. Označení haplotypů odpovídá haplotypové síti (obr. 21).



Obrázek 21: Haplotypová síť typu „median joining“ zobrazující genealogické vztahy v rámci datasetu genu CytB u zkoumaného taxonu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761). Velikost kruhů odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem. Uvnitř kruhů, nebo v jejich blízkosti je vyobrazeno identifikační číslo haplotypu odpovídající tabulce 12. Čísla na spojnicích označují počet mutací mezi uzly (vyznačeno pro $n > 1$).

Fylogenetické stromy

Fylogenetické stromy konstruované na základě druhého mitochondriálního datasetu (CytB) vykazují obdobné topologie ve všech třech analýzách (obr. 22-24). Zroveň se zde objevují srovnatelné mezidruhové jevy, jako u fylogenetických stromů prvního datasetu.

K příbuzným druhům („outgroups“) se podařilo získat navíc sekvenci druhu *Homothyrea helenae*. Spolu s taxonem *Leucocelis* sp. tvoří sesterský druh (HB: 70 (MP), 65 (ML); PP = 0.99). Tentokrát však jako sesterský taxon všem zlatohlávkům rodu *Oxythyrea* nevychází *Leucocelis* sp. a *H. helenae*. V případě BA jde o druh *Cetonia aurata aurata* (Linnaeus, 1761). U metody ML to je větev sesterských taxonů *C. aurata aurata* a *Polybaphes* sp. U MP je to skupina zlatohlávků mimo druhy zmíněné u metody ML. Pro tyto uzly je poměrně nízká hodnota bootstrapu i posteriorní pravděpodobnosti (HB: 43 (MP), 21 (ML); PP = 0.83).

Následuje podobná topologie mezi druhy rodu *Oxythyrea* napříč všemi analýzami, nejen tohoto datasetu, ale i datasetu předchozího. Bazální větev tohoto rodu tvoří druhy *O. noemi* a *O. cinctella*. Ke zlatohlávkům *O. cinctella* se podařilo získat sekvenci z peloponéské lokality

(2OC046GRC), která u metody BA polytomicky utváří klád spolu s jedinci z Makedonie (OC104MKD). Ve fylogenetickém stromě výpočetní metody MP a ML se jedná o sesterský taxon k makedonským broukům.

Zbylé druhy tvoří (MP a BA) k bazální větvi rodu *Oxythyrea* sesterskou skupinu, která se dělí na dvě větve (HB: 62 (MP); PP = 1.00). První z nich je tvořena sesterskými druhy *O. tripolitana* a *O. abigail* (HB 49 (MP); PP = 0.61). V druhé větvi se nachází *O. funesta* a *O. pantherina*. V rámci ML se objevuje rozdíl. Zde je samostatně umístěn zlatohlávek *O. tripolitana* a teprve k němu se vytváří dvě větve, které obsahují druh *O. abigail*, respektive *O. funesta* a *O. pantherina*. U těchto uzlů jsou však nízké hodnoty bootstrapu (HB: 41 a 23 (ML)).

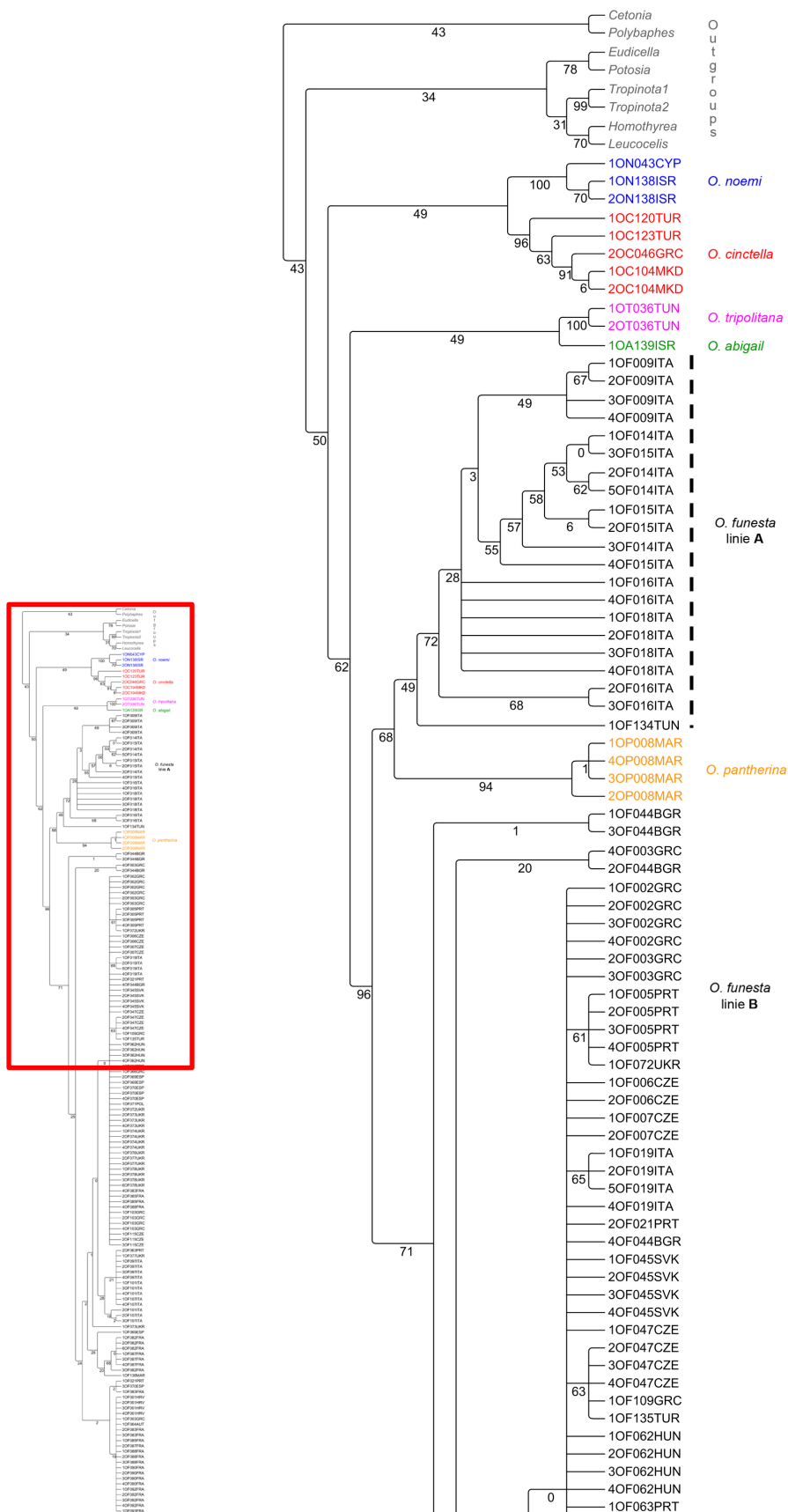
U kládu tvořeným zlatohlávkem tmavým a druhem *O. pantherina* můžeme vidět shodný vzor ve všech třech analýzách. Opět tu máme rozdělení druhu *O. funesta* na dvě dichotomicky se větvící linie (A, B), stejně jako u datasetu COI (HB: 96 (MP), 75 (ML); PP = 1.00). Pozice *O. pantherina* je ale odlišná. Severoafrický druh je tentokrát sesterskou skupinou k linii A, nikoliv k linii B (HB: 68 (MP), 47 (ML); PP = 0.75).

U linie A tvoří bázi kládu zlatohlávek tmavý z Tuniska (HB 49 (MP), 47 (ML); PP = 0.56). Zbylé sekvence linie A vytvářejí samostatnou větev sesterskou tuniskému taxonu s podobnou topologií ve všech třech stromech.

U linie B metody MP můžeme vidět bazální skupinu dvou jedinců z Bulharska, na kterou navazuje větev další se zbylými jedinci této lokality. Zbytek taxonů tak tvoří sesterskou skupinu, která se dichotomicky větví. Spodní klád obsahuje jedince haplotypu B18 a k němu sesterskou větev složenou ze sekvencí haplotypu B1. Na bázi vrchního kládu se nachází větev se zlatohlávkem z jihovýchodní Francie, Španělska a Maroka (haplotypy B23, B29, B30, B35). Následuje jedinec z Ukrajiny (1OF073UKR; haplotyp B26) a poté dva nejedvozenější klády. Jeden se skládá ze všech brouků pocházejících ze Sardínie a jednoho z Krymu a Portugalska (haplotypy B22, B28, B31, B32). Druhý obsahuje všechny zbylé vzorky v polytomickém uspořádání, přičemž jsou zde vidět tři malé podskupiny odpovídajícím haplotypům B4, B16, B21.

U stromu ML je situace odlišná. Opět se zde projevuje analogický trend, jako u předchozího datasetu a postupně se zde větví několik podobných skupin, jako v případě MP. Tyto klády relativně odpovídají některým haplotypům a zmíněným kládům ve stromě MP.

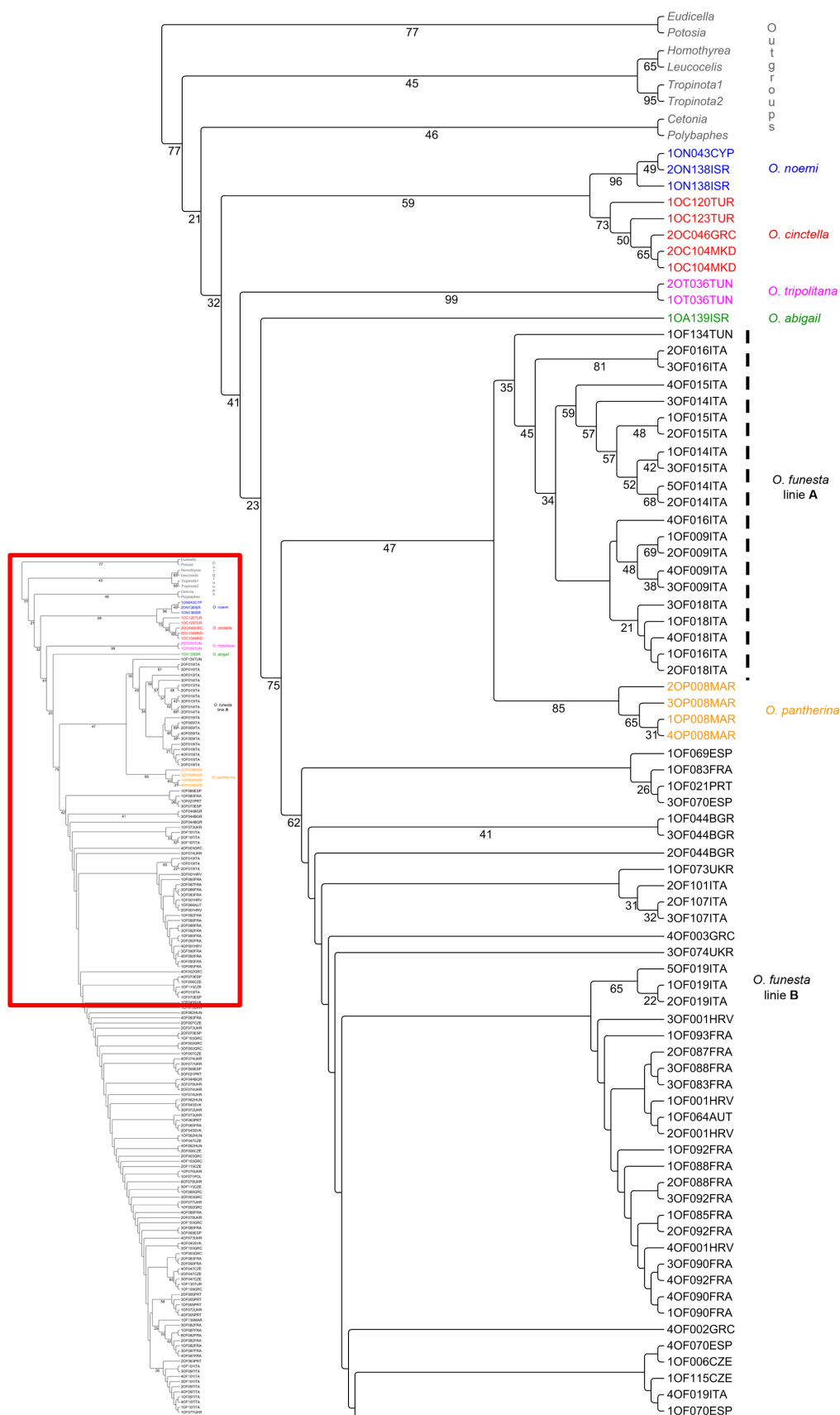
Linie B u fylogenetického stromu BA začíná shodně jako u MP, tedy bazální skupinou dvou jedinců z Bulharska. Následuje však větev zahrnující haplotypy B1, B18, B23. Po nich se už nachází hlavní klád se zbytkem jedinců, kde můžeme vidět polytomické větvení všech zlatohlávků včetně několika menších podskupin. Ty se obdobně objevují i v předešlých stromech.



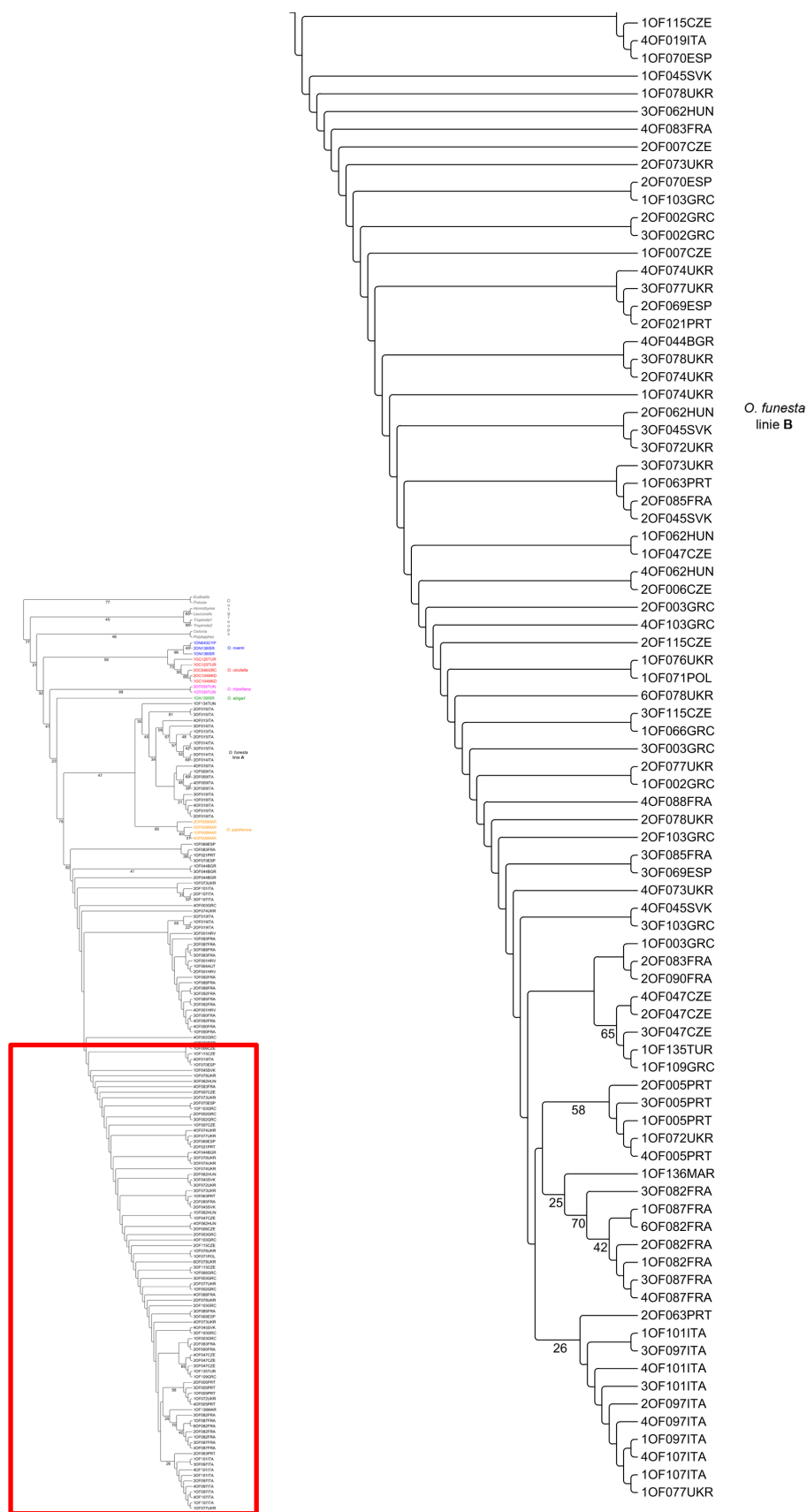
Obrázek 22a: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu CytB metodou maximální parsimonie. Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Ve všech uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu. Délka stromu je 436 kroků (CI = 0.4427, RI = 0.5573). Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



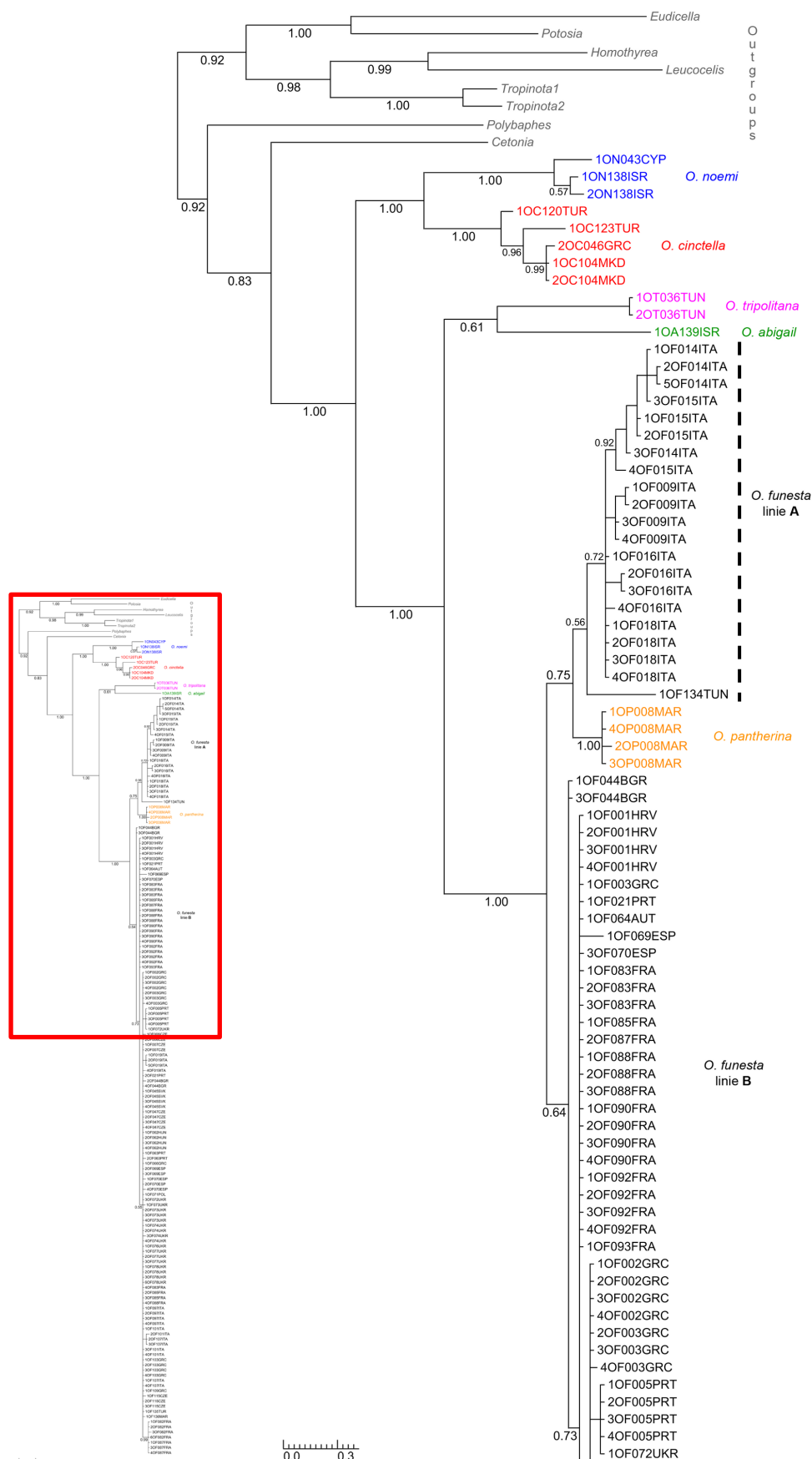
Obrázek 22b: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu CytB metodou maximální parsimonie. Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Ve všech uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu. Délka stromu je 436 kroků (CI = 0.4427, RI = 0.5573). Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



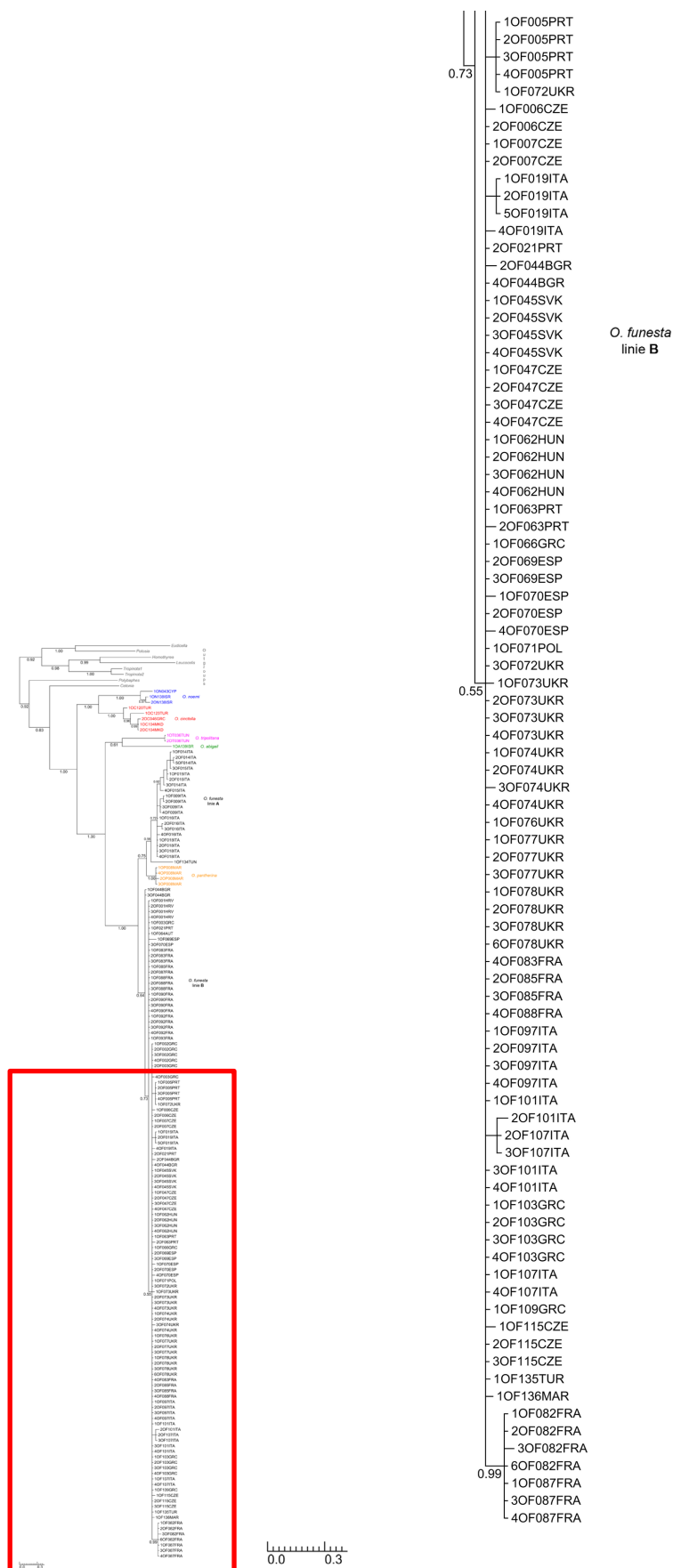
Obrázek 23a: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu CytB metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu >20%. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



Obrázek 23b: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu CytB metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu >20%. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálů.



Obrázek 24a: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu CytB Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). Posterioční pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech. Počet generací 20 milionů. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



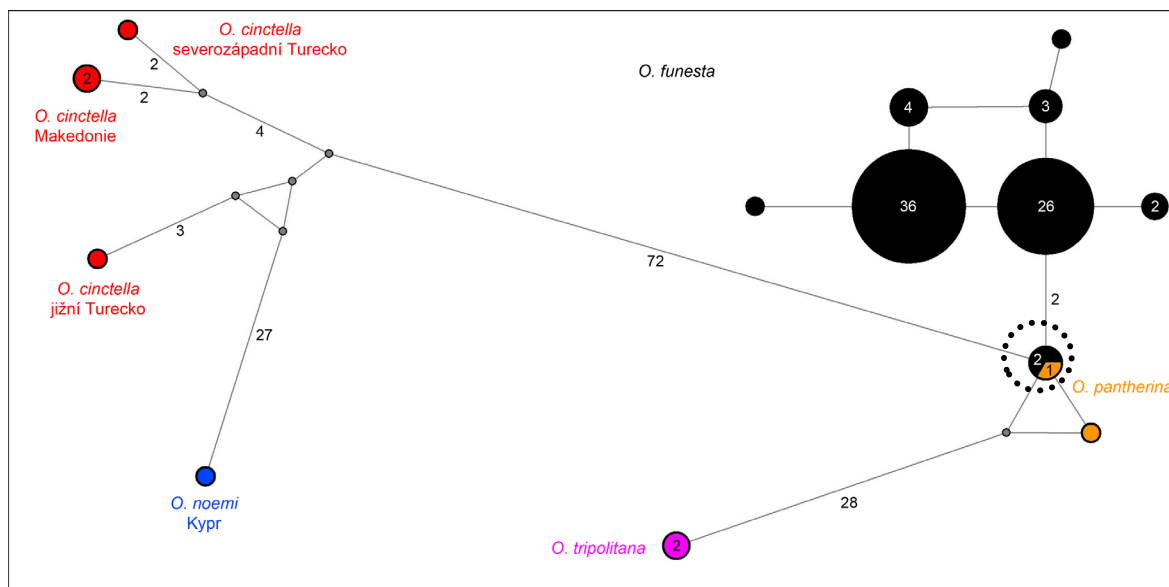
Obrázek 24b: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu CytB Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). Posterioční pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech. Počet generací 20 milionů. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.

4.2.3. Dataset genu ITS1

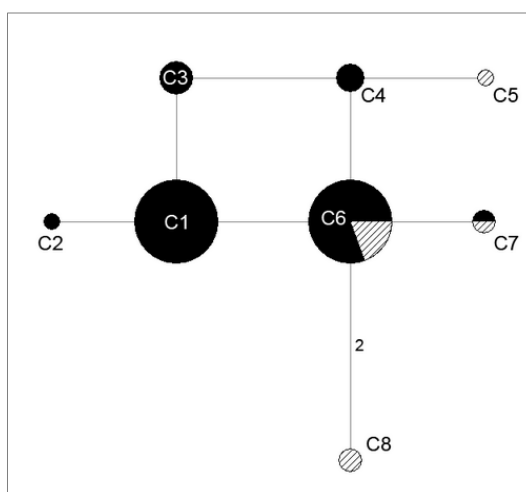
Haplotypové síť

U úseku jaderného genu ITS1 bylo identifikováno pouze 14 haplotypů na základě 84 sekvencí (obr. 25). Zlatohlávci *O. noemi*, *O. cinctella* a *O. tripolitana* vystupují jako samostatné druhy, avšak druh *O. pantherina* tvoří se zlatohlávkem tmavým společný klastr. Jedna ze získaných sekvencí (1OP008MAR) má shodný haplotyp (C8) jako dva jedinci ze Sicílie (1OF014ITA, 1OF016ITA; obr 25; tečkovaná linka). Dalším rozdílem oproti mitochondriálním datasetům je velmi jednoduchý vzor u zlatohlávka tmavého, který tentokrát netvoří dvě oddělené linie. Rozdíl mezi taxonem *O. tripolitana* a *O. pantherina* + *O. funesta* je 28 mutací. Sekvence *O. tripolitana* je však neúplná (chybí posledních 173 bází) a mutací je tedy pravděpodobně více.

U zlatohlávka tmavého bylo identifikováno osm různých haplotypů ze 75 sekvencí (tab. 13). Nejpočetnější haplotyp C1 zahrnuje 36 sekvencí, které náleží jedincům ze střední a východní Evropy, dále Balkánu a severozápadního Turecka. Na něj je napojen haplotyp C2 a C3, který obsahuje jednu sekvenci z Brače (2OFHRV001), respektive čtyři sekvence z Maďarska (OF062HUN). Do druhého největšího haplotypu (C6) spadá 26 sekvencí od jedinců z Pyrenejského a Apeninského poloostrova, Francie, Sardinie, Sicílie a také Maroka a Tuniska. V tomto haplotypu se nachází pět sekvencí, které v předchozích datasetech tvoří linii A. Z haplotypu C6 vychází haplotyp C4 (sekvence z jižního Portugalska a dvě sekvence z Francie) a na něj napojený haplotyp C5 se zlatohlávkem z jižní Itálie (4OF018ITA), který také tvoří linii A v datasetech COI a CytB. Poslední haplotypy C7 a C8 jsou napojeny na haplotyp C6 a obsahují sekvence ze Sicílie (v datasetu COI a CytB tvoří linii A) a střední Itálie. Spojnice se také nachází mezi haplotypy C1, C6 a C3, C4.



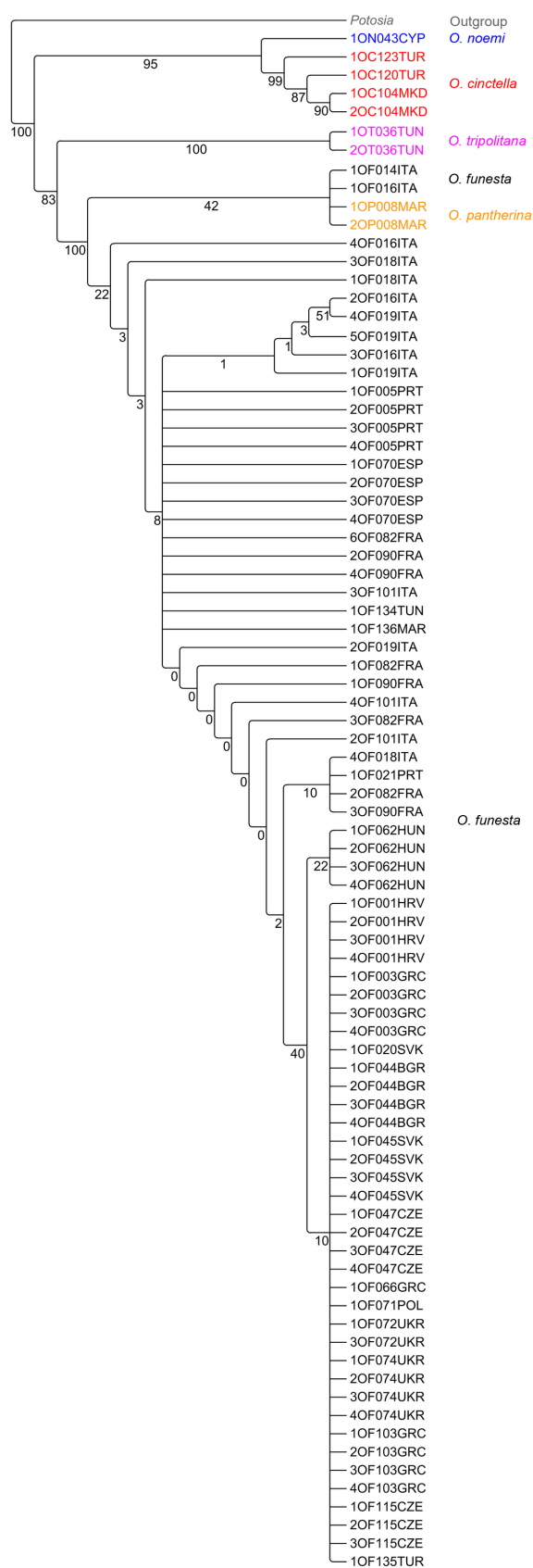
Obrázek 25: Haplotypová síť typu „median joining“ zobrazující genealogické vztahy v rámci datasetu genu ITS1 u zkoumaných taxonů rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842. Barevné označení jednotlivých druhů odpovídá barvám v mapách, fylogenetických stromech a seznamu použitého materiálu. Velikost kruhů odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem, uvnitř kruhů je tento počet zobrazen (vyznačeno pro $n > 1$). Čísla na spojnicích označují počet mutací mezi uzly (vyznačeno pro $n > 1$).



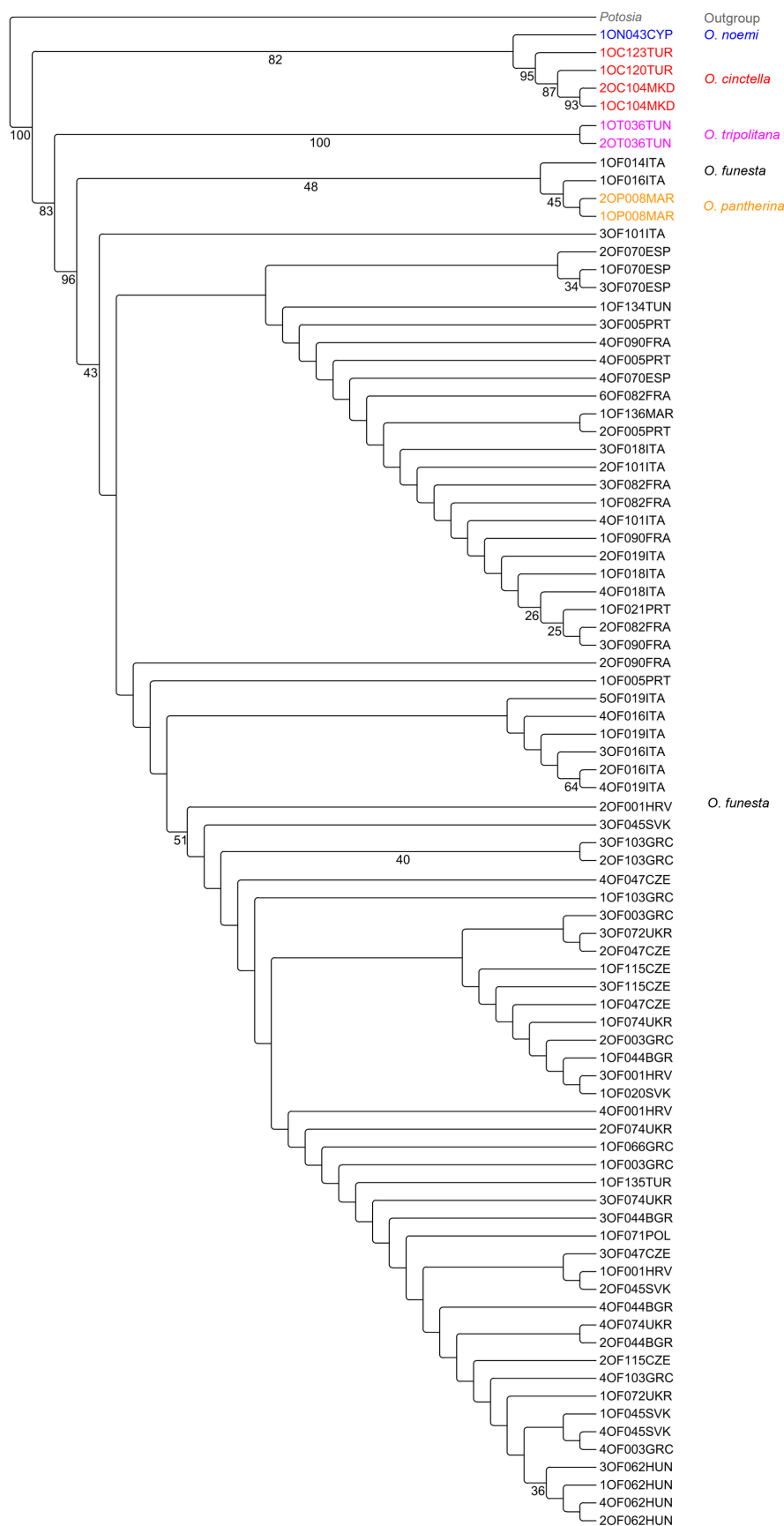
Obrázek 26: Haplotypová síť typu „median joining“ zobrazující genealogické vztahy v rámci datasetu genu ITS1 u zkoumaného taxonu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761). Čárkované výseče znázorňují odpovídající počet jedinců, kteří v předchozích datasetech spadali do linie A. Velikost kruhů odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem. Uvnitř kruhů, nebo v jejich blízkosti je vyobrazeno identifikační číslo haplotypu odpovídající tabulce 13. Čísla na spojnicích označují počet mutací mezi uzly (vyznačeno pro $n > 1$).

Označení haplotypu	Počet sekvencí	Délka haplotypu	Sekvence haplotypu	Označení haplotypu	Počet sekvencí	Délka haplotypu	Sekvence haplotypu
C1	36	866	1OF001HRV	C4	3	866	1OF021PRT
			3OF001HRV	C5	1	866	2OF082FRA
			4OF001HRV				3OF090FRA
			1OF003GRC	C6	26	866	4OF018ITA
			2OF003GRC				1OF005PRT
			3OF003GRC				2OF005PRT
			4OF003GRC				3OF005PRT
			1OF020SVK				4OF005PRT
			1OF044BGR				3OF016ITA
			2OF044BGR				4OF016ITA
			3OF044BGR				1OF018ITA
			4OF044BGR				3OF018ITA
			1OF045SVK				1OF019ITA
			2OF045SVK				2OF019ITA
			3OF045SVK				5OF019ITA
			4OF045SVK				1OF070ESP
			1OF047CZE				2OF070ESP
			2OF047CZE				3OF070ESP
			3OF047CZE				4OF070ESP
			4OF047CZE				1OF082FRA
			1OF066GRC				3OF082FRA
			1OF071POL				6OF082FRA
			1OF072UKR				1OF090FRA
			3OF072UKR				2OF090FRA
			1OF074UKR				4OF090FRA
			2OF074UKR				2OF101ITA
			3OF074UKR				3OF101ITA
			4OF074UKR				4OF101ITA
			1OF103GRC				1OF134TUN
			2OF103GRC				1OF136MAR
			3OF103GRC	C7	1	866	2OF016ITA
			4OF103GRC	C8	1	866	4OF019ITA
			1OF115CZE				1OF014ITA
			2OF115CZE				1OF016ITA
			3OF115CZE				
			1OF135TUR				
C2	1	866	2OF001HRV				
C3	4	866	1OF062HUN				
			2OF062HUN				
			3OF062HUN				
			4OF062HUN				

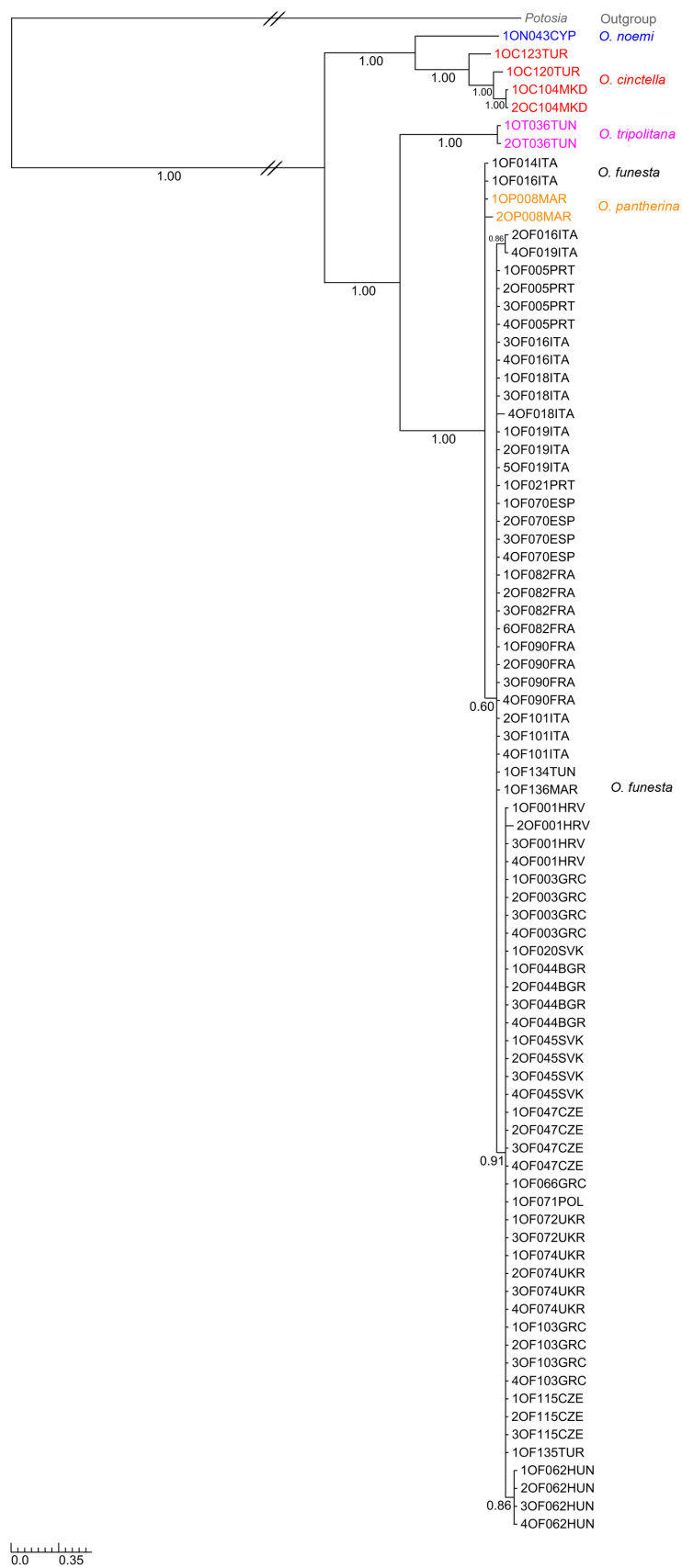
Tabulka 13: Seznam identifikovaných haplotypů u druhu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) v datasetu ITS1. Označení haplotypů odpovídá haplotypové síti (obr. 26).



Obrázek 27: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu ITS1 metódou maximální parsimonie. Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Ve všech uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu. Délka stromu je 227 kroků (CI = 0.9163, RI = 0.0837). Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



Obrázek 28: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu ITS1 metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu >20%. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálů.



Obrázek 29: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu ITS1 Bayesovskou analýzou (model GTR+G). Posteriorní pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech. Počet generací 10 milionů. Některé dlouhé větve byly uměle zkráceny – viz dvojité přeškrtnutí větve. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.

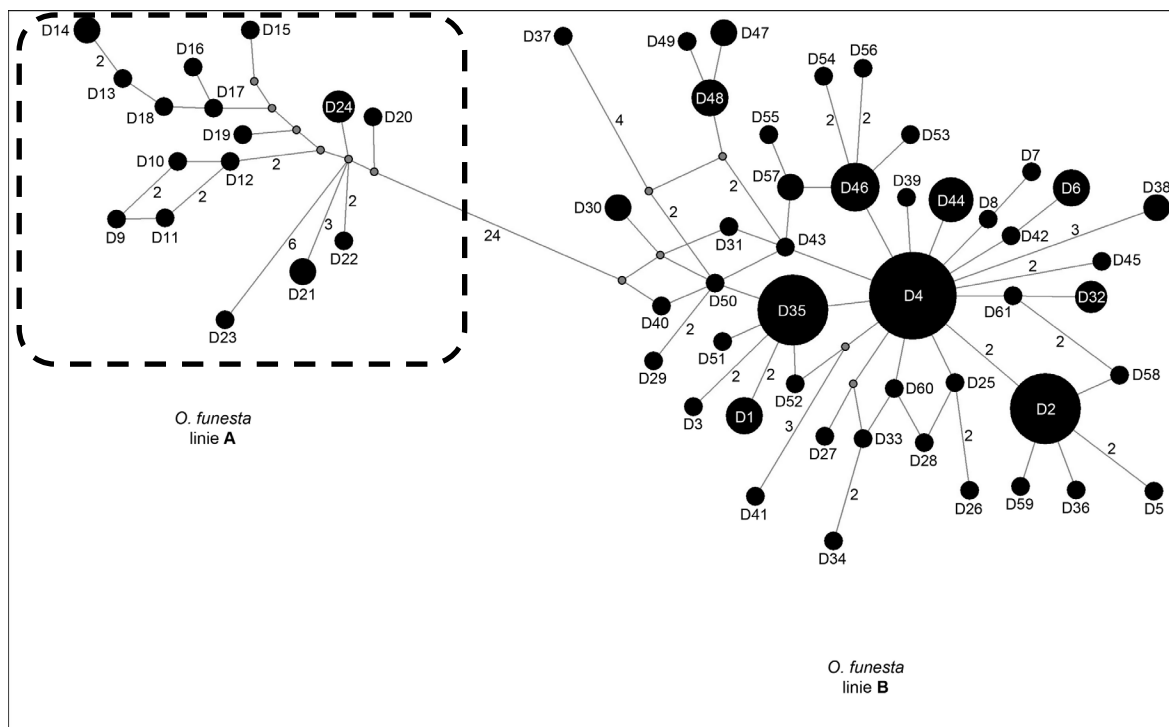
4.2.4. Dataset konkatenátu genů COI a CytB

Haplotypové sítě

U druhu *Oxythyrea funesta* se podařilo v rámci dvou spojených úseků mitochondriálních genů identifikovat 61 haplotypů zahrnujících celkem 141 sekvencí (tab. 14).

Haplotypová síť shodně zobrazuje rozdělení zlatohlávka tmavého na dva klastry (linie A a B; obr. 30), stejně jako samostatné mitochondriální datasety COI a CytB. Mezi linií A a B se nachází 26 mutací (haplotyp D40 a D20). Linie B obsahuje 45 haplotypů se 121 sekvencemi. Centrální haplotyp D4 je opoznáni chudší oproti samostatným genům COI a CytB, ale stále obsahuje sekvence (23) z různých lokalit Evropy. Na něj navazuje jen několik menších haplotypů (D6, D7, D8, D38, D39, D42, D44, D45), které tvoří menší sítě s dalšími. Jde o téměř všechny zbylé sekvence ukrajinských jedinců a dále také některých českých, španělských a portugalských brouků. Zbylé haplotypy linie B tvoří několik provázaných sítí. Vpravo dole je umístěn soubor haplotypů (D5, D32, D36, D58, D59, D61) s větším centrálním bodem D2. Všechny tyto haplotypy zahrnují sekvence z Balkánu, Turecka a střední i východní Evropy. Ve spodní části se nachází sedm haplotypů, každý pouze s jedinou sekvencí (D25, D26, D27, D28, D33, D34, D60). Zde najdeme sekvence ze střední Itálie a také jednu sekvenci z jižního Portugalska a Peloponésu. V levé části klastru (linie B) je umístěna poslední a největší síť napojená na centrální haplotyp D4. V hlavní části se nachází haplotyp D35 (sekvence z Francie a Rakouska; lokality z jihovýchodní Francie však chybí). Na něj navazuje vícero haplotypů obsahující sekvence z dalších lokalit Francie (D50, D51, D52), Španělska (D37, D40, D41), Bulharska (D30, D31), Řecka (D3), Chorvatska (D1), nebo Ukrajiny (D43). Dále na tento klaster navazuje menší seskupení haplotypů D47, D48, D49, které obsahují všechny sekvence jedinců z jihovýchodní Francie a také větší haplotyp D46 spolu s dalšími (D53, D54, D55, D56, D57), které zahrnují všechny jedince ze Sardinie a netypicky také jednu sekvenci z Krymu (1OF077UKR).

Linie A nejblíže navazuje na španělský haplotyp D40. Celkem obsahuje 20 sekvencí rozdělených do 16 haplotypů. Nejblíže k linii B jsou umístěni zlatohlávci z jihovýchodní Sicílie (D20, D21, D22) a Kalábrie (D23, D24). Dále se objevují brouci z Kampánie tvořící čtyři různé navzájem propojené haplotypy (D9-D12). Nejodvozenější se jeví brouci ze sicilského národního parku Madonie (D14-D19). Lokality jedinců nacházejících se v linii A jsou opět znázorněny čárkovanou linií v mapě 7 a ve fylogenetických stromech (obr 31a, 32a, 33a).



Obrázek 30: Haplotypová síť typu „median joining“ zobrazující genealogické vztahy v rámci konkatenátu genů COI a CytB u zkoumaného taxonu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761). Velikost kruhů odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem. Uvnitř kruhů, nebo v jejich blízkosti je vyobrazeno identifikační číslo haplotypu odpovídající tabulce 14. Čísla na spojnicích označují počet mutací mezi uzly (vyznačeno pro $n > 1$).



Mapa 7: V čárkovaném kruhu se nalézají lokality, ze kterých pocházejí osekvenovaní jedinci druhu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) odpovídající linii A v haplotypové síti (obr. 30) a fylogenetických stromech (obr. 31a, 32a, 33a). Symboly vyznačených lokalit se shodují s mapou 3.

Označení haplotypu	Počet sekvencí	Délka haplotypu	Sekvence haplotypu	Označení haplotypu	Počet sekvencí	Délka haplotypu	Sekvence haplotypu
D1	4	1188	10F001HRV	D26	1	1188	20F019ITA
			20F001HRV	D27	1	1188	40F019ITA
			30F001HRV	D28	1	1188	50F019ITA
			40F001HRV	D29	1	1188	10F021PRT
D2	15	1188	10F002GRC	D30	2	1188	10F044BGR
			20F002GRC	D31	1	1188	30F044BGR
			30F002GRC	D32	3	1188	20F047CZE
			40F002GRC				30F047CZE
			10F045SVK				40F047CZE
			20F045SVK	D33	1	1188	10F063PRT
			10F047CZE	D34	1	1188	20F063PRT
			10F062HUN	D35	15	1188	10F064AUT
			20F062HUN				20F083FRA
			30F062HUN				30F083FRA
			40F062HUN				10F085FRA
			10F071POL				10F088FRA
			30F072UKR				20F088FRA
			20F077UKR				30F088FRA
			30F115CZE				10F090FRA
D3	1	1188	10F003GRC				20F090FRA
D4	23	1188	20F003GRC				30F090FRA
			30F003GRC				40F090FRA
			10F007CZE				20F092FRA
			20F007CZE				30F092FRA
			20F021PRT				40F092FRA
			40F044BGR				10F093FRA
			30F045SVK	D36	1	1188	10F066GRC
			40F045SVK	D37	1	1188	10F069ESP
			20F070ESP	D38	2	1188	20F069ESP
			10F074UKR				30F069ESP
			20F074UKR				10F070ESP
			40F074UKR	D39	1	1188	30F070ESP
			10F076UKR	D40	1	1188	40F070ESP
			30F077UKR	D41	1	1188	10F072UKR
			60F078UKR	D42	1	1188	10F073UKR
			40F083FRA	D43	1	1188	20F073UKR
			20F085FRA	D44	6	1188	30F073UKR
			30F085FRA				40F073UKR
			40F088FRA				10F078UKR
			10F103GRC				20F078UKR
			20F103GRC				30F078UKR
			30F103GRC	D45	1	1188	30F074UKR
			40F103GRC	D46	7	1188	10F077UKR
D5	1	1188	40F003GRC				20F097ITA
D6	4	1188	10F005PRT				30F097ITA
			20F005PRT				40F097ITA
			30F005PRT				40F101ITA
			40F005PRT				10F107ITA
D7	1	1188	10F006CZE				40F107ITA
D8	1	1188	20F006CZE	D47	2	1188	10F082FRA
D9	1	1188	10F009ITA				60F082FRA
D10	1	1188	20F009ITA	D48	4	1188	20F082FRA
D11	1	1188	30F009ITA				10F087FRA
D12	1	1188	40F009ITA				30F087FRA
D13	1	1188	10F014ITA				40F087FRA
D14	2	1188	20F014ITA				30F082FRA
D15	1	1188	50F014ITA	D49	1	1188	10F083FRA
D16	1	1188	30F014ITA	D50	1	1188	20F087FRA
D17	1	1188	10F015ITA	D51	1	1188	10F092FRA
D18	1	1188	20F015ITA	D52	1	1188	10F097ITA
D19	1	1188	30F015ITA	D53	1	1188	10F101ITA
D20	1	1188	40F015ITA	D54	1	1188	20F101ITA
D21	2	1188	10F016ITA	D55	1	1188	30F101ITA
D22	1	1188	20F016ITA	D56	1	1188	20F107ITA
			30F016ITA	D57	2	1188	30F107ITA
D23	1	1188	40F016ITA	D58	1	1188	10F115CZE
D24	3	1188	10F018ITA	D59	1	1188	20F115CZE
			20F018ITA	D60	1	1188	10F109GRC
			30F018ITA	D61	1	1188	10F135TUR
D25	1	1188	40F018ITA				
			10F019ITA				

Tabulka 14: Seznam identifikovaných haplotypů u druhu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) konkatenátu genů COI a CytB. Označení haplotypů odpovídá haplotypové síti (obr. 30).

Vypočtené fylogenetické stromy na základě konkaténátu sekvencí částí mitochondriálních genů COI a CytB vykazují mezi sebou podobné topologie (obr. 31-33), ale zároveň také odráží obdobné výsledky, jaké jsou vidět u samostatných datasetů COI a CytB.

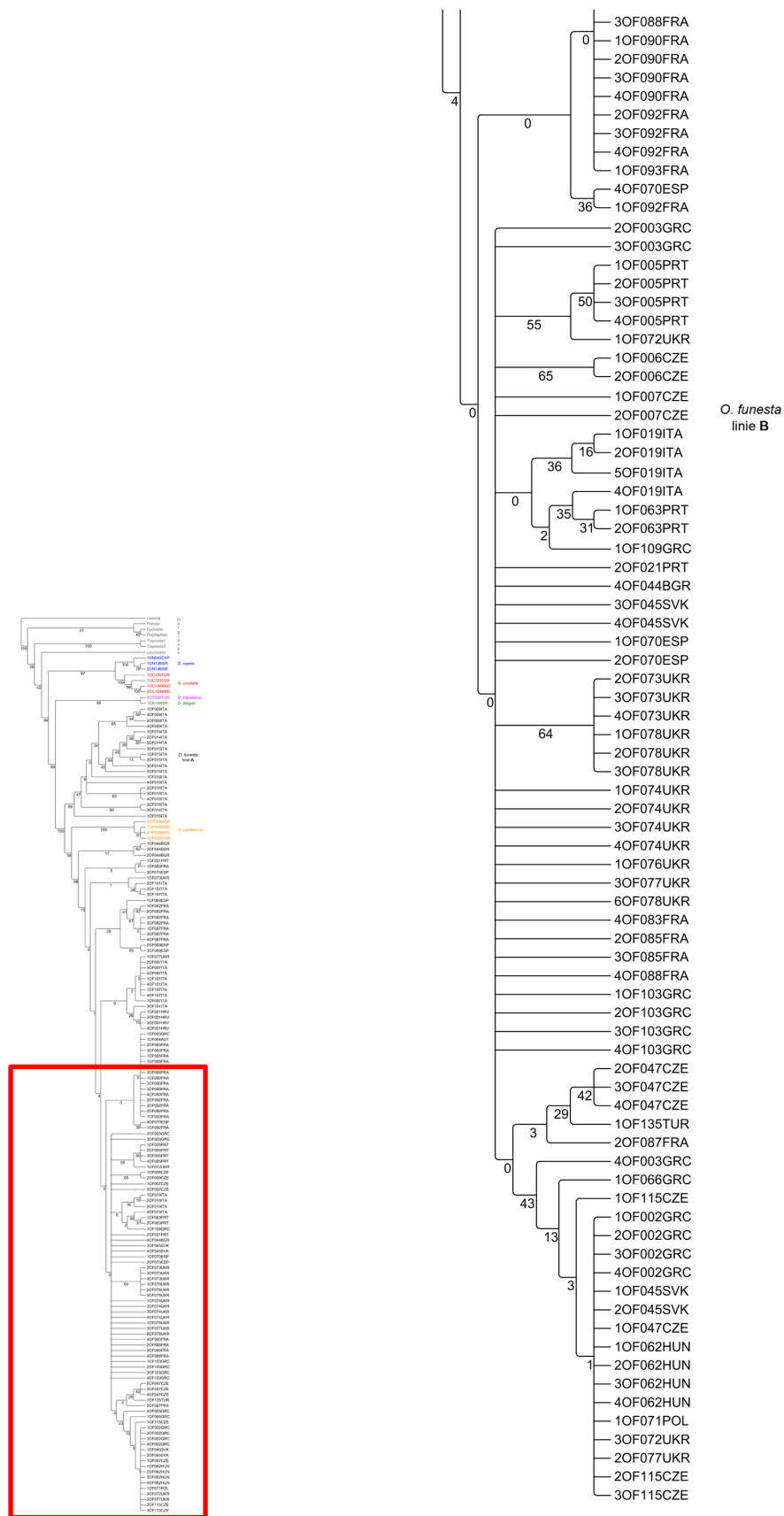
Podobně jako u datasetu COI, tak i zde můžeme vidět *Leucocelis* sp. jako sesterský taxon rodu *Oxythyrea* (HB: 42 (MP), 63 (ML); PP = 1.00). Dále se dichotomicky větví bazální klád (*O. noemi* + *O. cinctella*) a zbylé druhy rodu *Oxythyrea* (HB: 94 (MP), 85 (ML); PP = 1.00). Zlatohlávci *O. noemi* a *O. cinctella* tvoří sesterské taxony (HB: 97 (MP), 100 (ML); PP = 1.00). Příbuzenské vztahy uvnitř těchto druhů odpovídají datasetům COI i CytB. Podobné je i dichotomické větvení sesterského kládu k bazální větvi (HB: 89 (MP), 83 (ML); PP = 1.00). V prvním kládu se opět nachází taxony *O. tripolitana* a *O. abigail* (HB: 99 (MP), 98 (ML); PP = 1.00). V druhém se objevují poslední dva druhy *O. funesta* a *O. pantherina*. Jejich vzájemné postavení je však v rámci analýz různé. U metody ML tvoří *O. pantherina* samostatný klád, sesterský k druhu *O. funesta* (HB: 97 (ML), jenž tvoří dvě sesterské linie A a B s nízkou hodnotou bootstrapu (HB: 26 (ML)). U metod MP a BA se na bázi se objevuje linie A zlatohlávka tmavého a k němu sesterská linie B a *O. pantherina* (HB: 100 (MP); PP = 1.00). HB a PP pro linii B a *O. pantherina* je 38, respektive 0.74.

Linie A vykazuje podobné rozložení jako v datasetech COI a CytB, i když s menším počtem jedinců v polytomickém uspořádání. Mezi nejodvozenější jedince patří brouci z Madonie (OF014ITA, OF015ITA; haplotypy D14-D19) a Kalábrie (OF009ITA; haplotypy D9-D12).

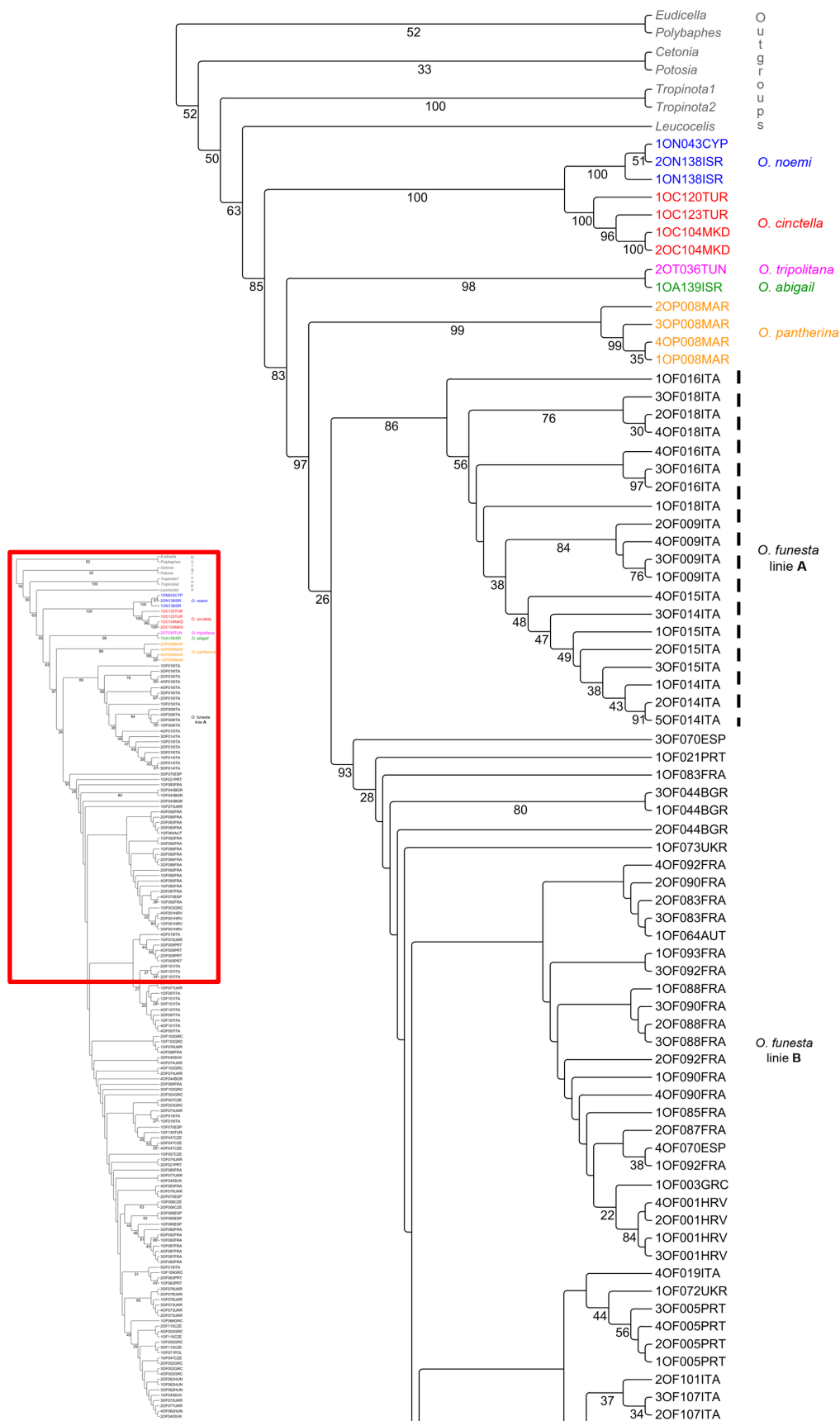
U linie B se ve stromech MP a ML postupně větví různé klády s podobnou skladbou, jako u datasetů COI a CytB. Ve většině případů však s velmi malými až nulovými hodnotami bootstrapu. U metody BA je vidět parafyletická bazální větev (PP = 1.00) zahrnující jedince ze severu Portugalska (OF005PRT; haplotyp D6) a na ně navazující jedinec ze západní Ukrajiny (1OF072UKR; haplotyp D42; PP = 0.62). Zbytek jedinců se nachází v monofyletické kládu (PP = 0.53) s polytomickým rozložením, včetně několika menších podskupin podobných základním datasetům COI a CytB. Jde o dva jedince z ČR (OF006CZE; haplotypy D7, D8; PP = 0.95), Bulharska (OF044BGR; haplotyp D30; PP = 1.00), jižního Portugalska (OF063PRT; haplotypy D33, D34; PP = 0.51) a jihovýchodního Španělska (OF069ESP; haplotyp D38; PP = 1.00). Dále brouci z ČR a Turecka (OF047CZE, OF135TUR; haplotypy D32, D61; PP = 0.73), z jihovýchodní Francie a Španělska (OF082FRA, OF087FRA, OF069ESP; haplotypy D37, D47, D48, D49; PP = 0.92) a z Brače (OF001HRV; haplotyp D1; PP = 1.00). Na konci stromu se objevuje klád (PP = 0.99) se směsí jedinců z Balkánu a střední i východní Evropy.



Obrázek 31a: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkatenátu genů COI a CytB metodou maximální parsimonie. Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Ve všech uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu. Délka stromu je 1206 kroků (CI = 0.4760, RI = 0.5240). Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



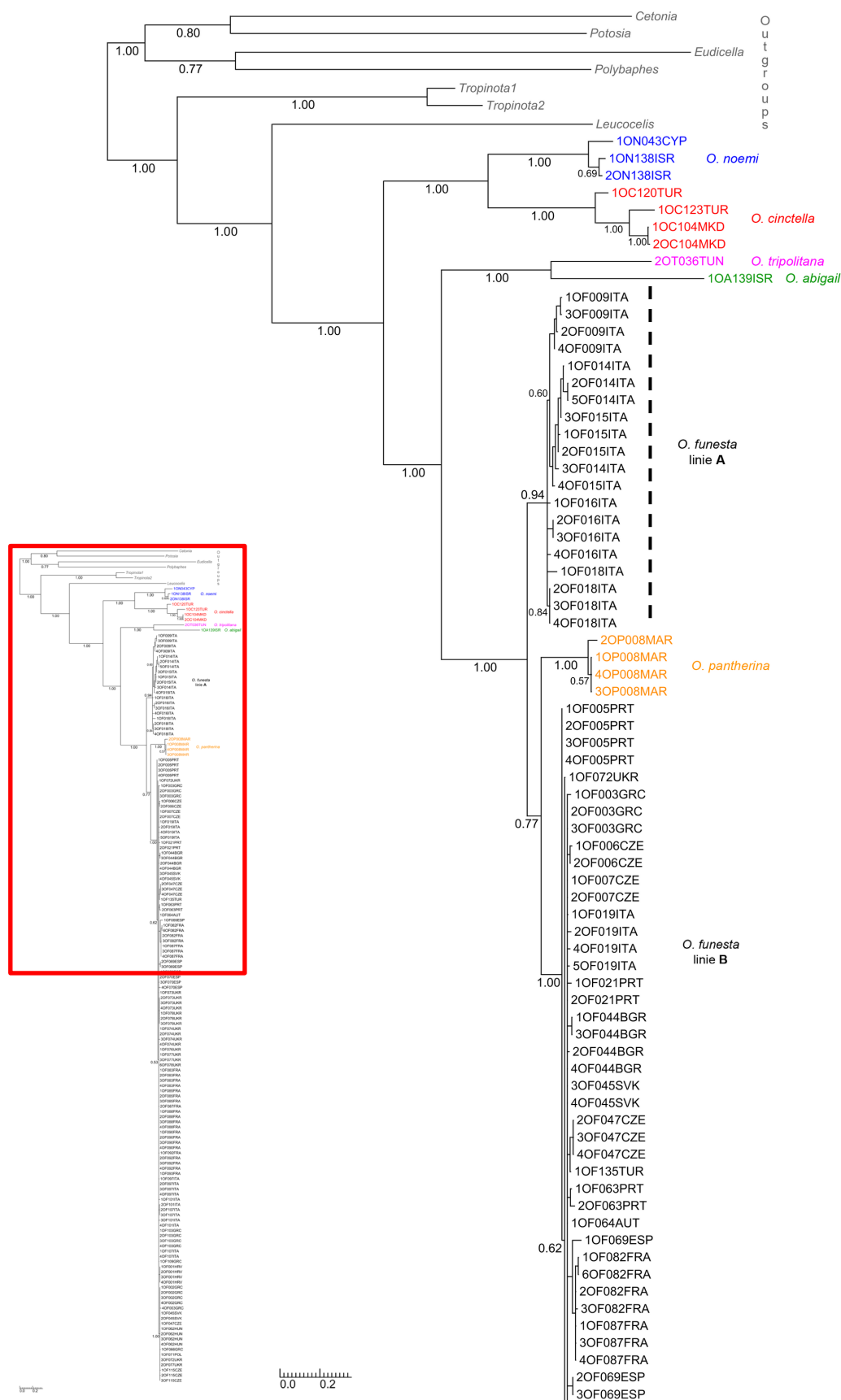
Obrázek 31b: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkatenátu genů COI a CytB metodou maximální parsimonie. Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Ve všech uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu. Délka stromu je 1206 kroků (CI = 0.4760, RI = 0.5240). Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



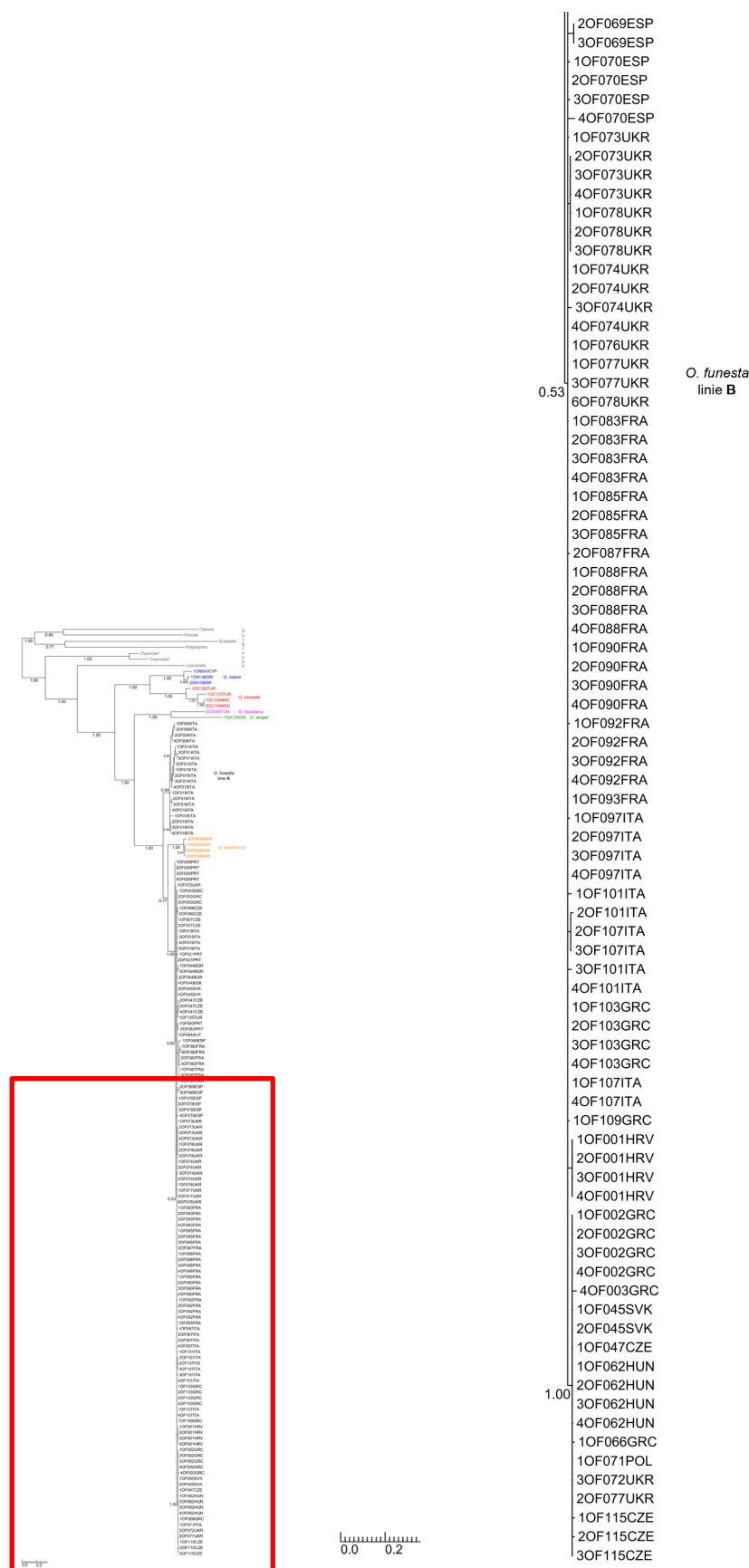
Obrázek 32a: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkatenátu genů COI a CytB metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu >20%. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



Obrázek 32b: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkatenátu genů COI a CytB metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu >20%. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



Obrázek 33a: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkatenátu genů COI a CytB Bayesovskou analýzou (model HKY+I+G a GTR+I+G). Posterioří pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech. Počet generací 20 milionů. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



Obrázek 33b: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkatenátu genů COI a CytB Bayesovskou analýzou (model HKY+I+G a GTR+I+G). Posteriošní pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech. Počet generací 20 milionů. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.

4.2.5. Dataset konkatenátu genu COI, CytB a ITS1

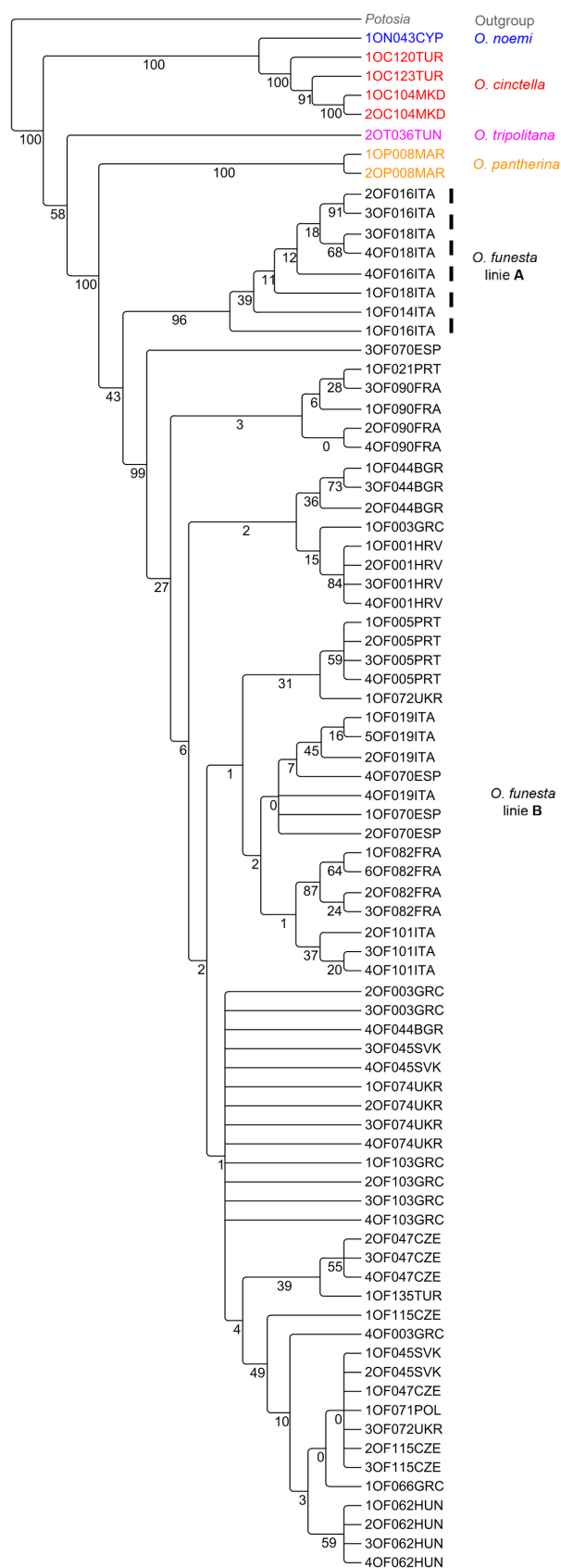
Fylogenetické stromy

U posledních třech stromů (MP, ML, BA) vypočtených na základě konkatenátu genů COI, CytB a ITS1 se taktéž setkáváme s obdobnou topologií (obr. 34-36).

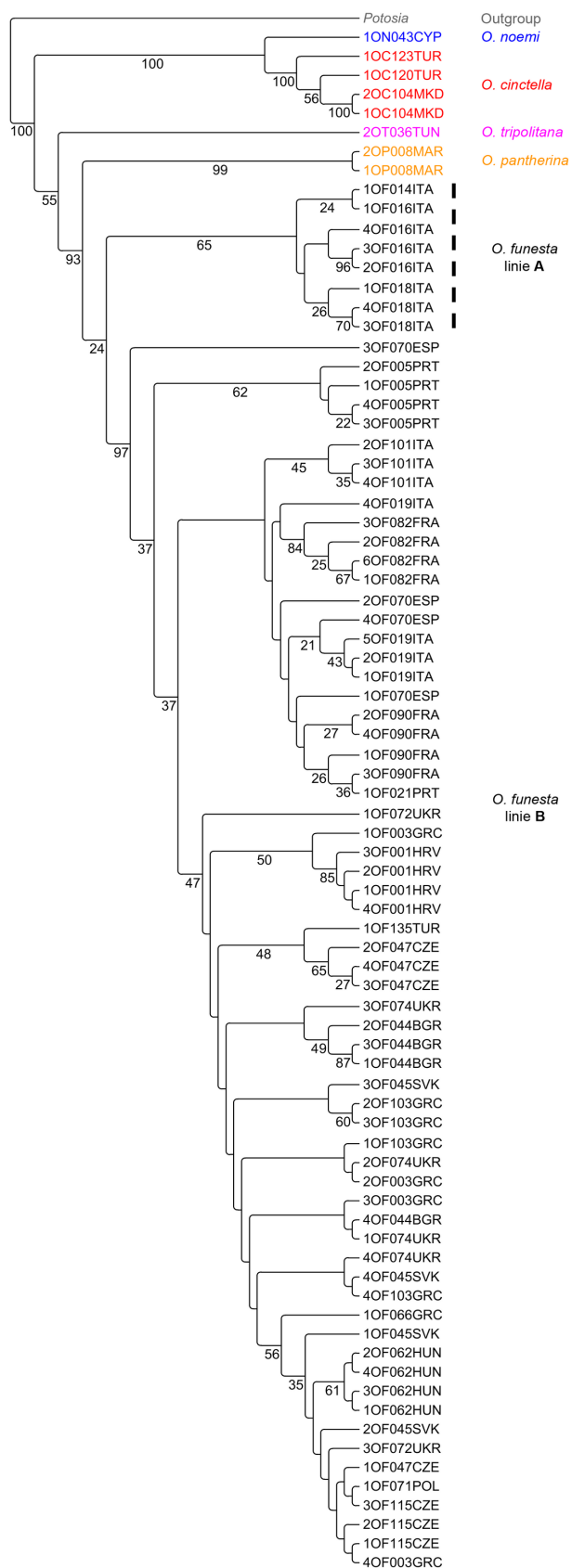
Rozdělení a příbuznost druhů koresponduje s předešlými daty. Druhy se dichotomicky větví (HB: 100 (MP), 100 (ML)) na bazální skupinu sesterských taxonů *O. noemi* a *O. cinctella* (HB: 100 (MP), 100 (ML)) a zbylé druhy. U metody BA je větev se zlatohlávkou *O. noemi* a *O. cinctella* zachována (PP = 1.00), avšak mezi ní a sesterskou větví se zbylými druhy je polytomicky zařazen druh *O. tripolitana*. U stromů MP a ML tvoří tento taxon bazální skupinu druhé větve (HB: 58 (MP), 55 (ML)). K němu sedají dichotomicky se větvící taxony *O. pantherina* a *O. funesta* (HB: 100 (MP), 93 (ML)). Zlatohlávek *O. pantherina* tvoří samostatný klád (MP, ML) a *O. funesta* tak tvoří monofylum, které se opět dichotomicky dělí na linie A a B (HB: 43 (MP), 24 (ML)). V bayesiánské analýze je situace mírně odlišná. Větev zahrnující poslední dva jmenované druhy se taktéž dichotomicky větví (PP = 0.98), ale linie A utváří samostatný klád a v druhém kládu se objevuje druh *O. pantherina* a k ní sesterská linie B (PP = 0.62).

Jedinci ze stejných lokalit v rámci linie A (HB: 96 (MP), 65 (ML); PP = 0.98) často vytváří samostatné klády uvnitř větve.

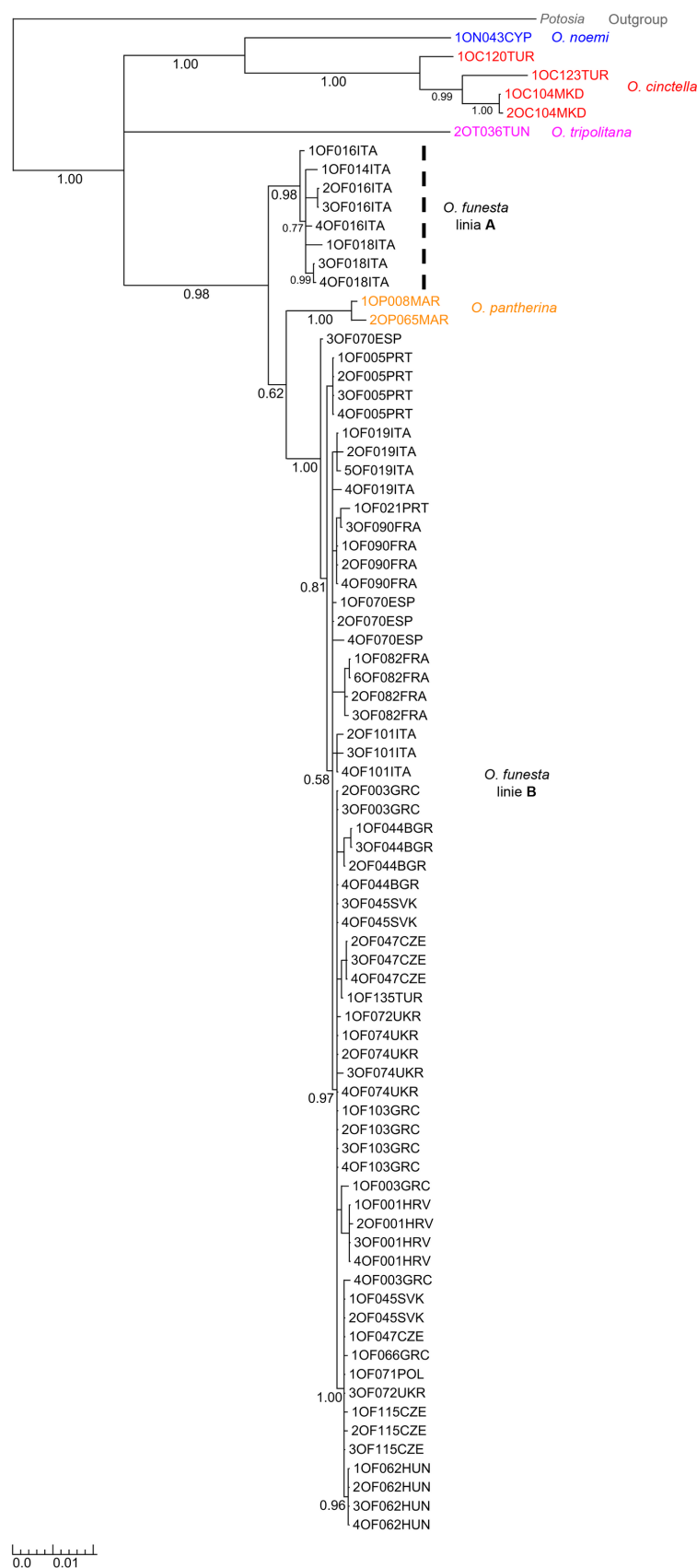
U linie B můžeme vidět podobný vzor ve fylogenetickém stromě ML a BA. Na bázi se objevuje jedinec ze Španělska (3OF070ESP; HB: 97; PP = 1.00). Následuje větev s portugalskými jedinci (OF005PRT; HB: 37; PP = 0.81). Poté (ML) se zbylí jedinci dichotomicky větví (HB: 37) na klád se vzorky ze západních lokalit a na klád s jedinci z východních lokalit. V prvním jmenovaném můžeme vidět samostatnou větev s brouky Sardinie, či větev zahrnující brouky jihovýchodní Francie a střední Itálie, nebo jedince z různých lokalit z jihozápadní a západní Evropy. V druhém kládu (tvořen jedinci z východních lokalit) se postupně odvětvují jednotlivé skupiny s různým složením. U metody BA se objevuje jeden velký klád, kde jedinci ze západních lokalit vytvářejí parafiletickou skupinu a brouci z východních lokalit tvoří monofyletickou skupinu připojenou polytomicky k hlavnímu kládu. V rámci celé větve se objevují podobné skupiny jako ve stromě ML. U metody MP je seskupení linie B trochu odlišné. Na bázi se opět objevuje jedinec ze Španělska a následuje větev s jedinci z Francie a Portugalska. Na místo dalších jedinců ze západních lokalit se dichotomicky větví dva klády, kde první zahrnuje jedince z Bulharska, Brače a jednoho brouka z Řecka. Druhý klád obsahuje dvě sesterské větve. První se zbylými jedinci západních lokalit a druhá se zbytkem sekvencí patřícím zlatohlávkům z lokalit východních.



Obrázek 34: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkatenátu genů COI, CytB a ITS1 metodou maximální parsimonie. Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Ve všech uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu. Délka stromu je 761 kroků (CI = 0.7530, RI = 0.2470). Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



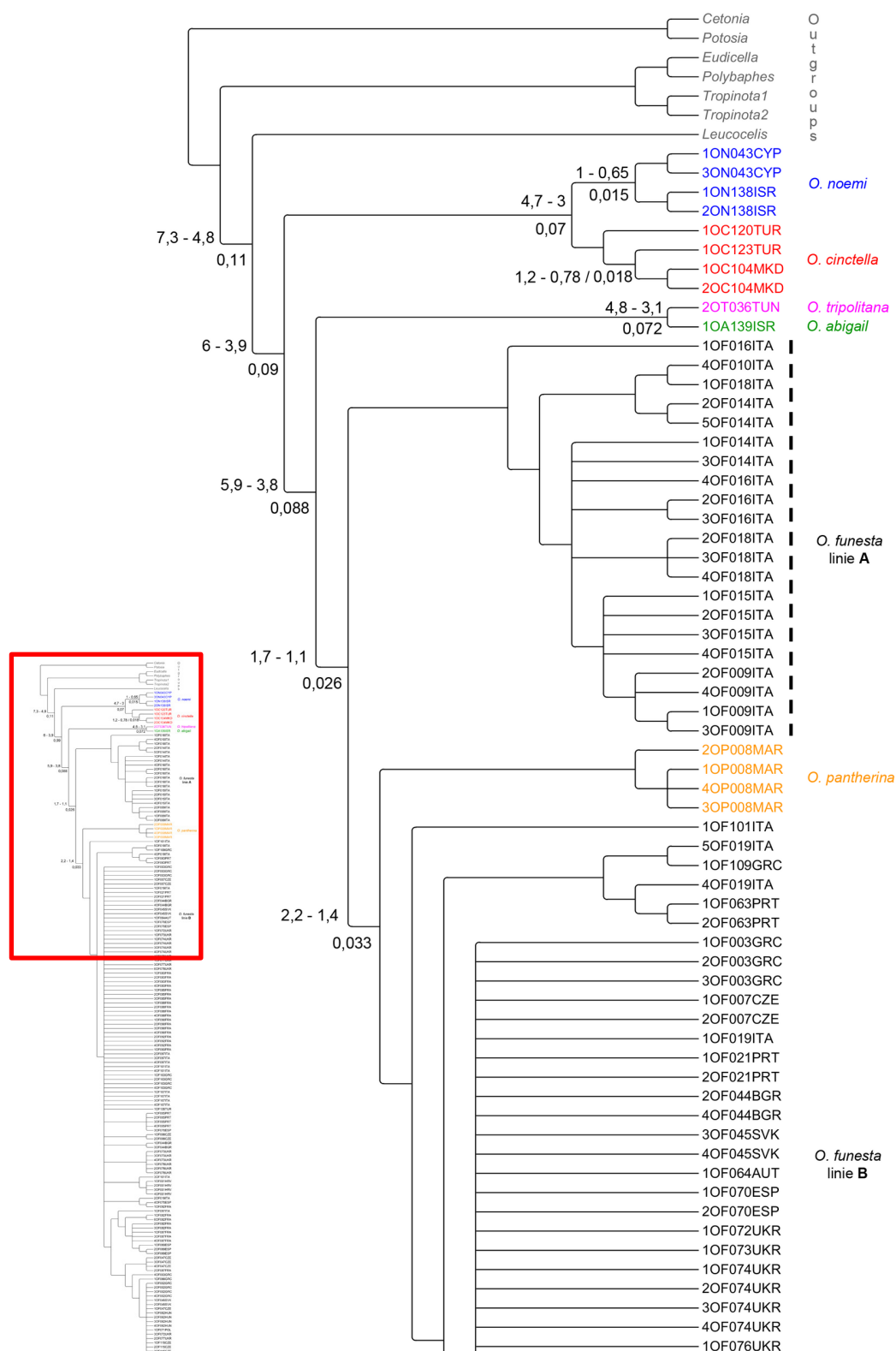
Obrázek 35: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkatenátu genů COI, CytB a ITS1 metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu >20%. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.



Obrázek 36: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkatenátu genů COI, CytB a ITS1 Bayesovskou analýzou (model HKY+I+G, GTR+I+G a GTR+G). Posteriorní pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech. Některé dlouhé větve byly uměle zkráceny – viz dvojité přeškrtnutí větve. Počet generací 15 milionů. Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.

4.3. Molekulární datování

Vypočítané průměry nekorigovaných p-distancí mezi zjištěnými hlavními klády na základě genu COI byly namapovány spolu s odhady času divergence na topologii fylogenetického stromu MP (obr. 37). Oddělení bazálního kládu *O. noemi* + *O. cinctella* od zbylých zahrnutých druhů rodu *Oxythyrea* pravděpodobně proběhlo před 6-3,9 miliony lety (divergence 9 %), tedy na přelomu svrchního miocénu a spodního pliocénu. K oddělení větve *O. tripolitana* + *O. abigail* od *O. pantherina* + *O. funesta* došlo ve velmi podobném období (divergence 8,8 %). K rozdělení *O. noemi* a *O. cinctella* i *O. tripolitana* a *O. abigail* zřejmě došlo ve stejné době, zhruba před 4,8-3 miliony lety. Poslední dva druhy zlatohlávků (*O. pantherina* + *O. funesta*) zřejmě vznikly až v pleistocénu. Další údaje mohou přiblížit oddělení izraelské a kyperské populace zlatohlávka *O. noemi*, stejně jako turecké a balkánské populace druhu *O. cinctella*. V obou případech k této události došlo patrně ve středním pleistocénu.



Obrázek 37: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COI metodou maximální parsimonie s namapovanými hodnotami p-distance (pod větví) a odhadem doby divergence v milionech let (nad větví, popřípadě vlevo od p-distance). Barvy taxonů odpovídají mapám, haplotypovým sítím a seznamu materiálu.

4.4. Haplotypová a nukleotidová diverzita, Tajima D test

Ukazatele diverzity byly spočteny na základě mitochondriálního konkaténátu pro skupiny jedinců druhu *O. funesta* z geograficky blízkých lokalit. Tedy aby bylo možné získané hodnoty porovnat např. mezi Pyrenejským poloostrovem a střední Evropou. Tabulka 15 předkládá výpis těchto oblastí a lokality, které zahrnují. Získané hodnoty pro takto vymezené oblasti jsou zaznamenány v tabulce 16.

S ohledem na získané výsledky haplotypových sítí a fylogenetických stromů byl Tajimův D test spočten pro linii A a linii B zlatohlávka tmavého. Hodnoty testu pro tyto linie jsou uvedeny v tabulce 17.

Název oblasti	Zahrnuté lokality
Apeninský poloostrov + Sardinie + Sicílie	OF009ITA, OF014ITA, OF015ITA, OF016ITA, OF018ITA, OF019ITA, OF097ITA, OF101ITA, OF107ITA
Sardinie + střední Itálie	OF019ITA, OF097ITA, OF101ITA, OF107ITA
Linie A (Sicílie a jižní Itálie)	OF009ITA, OF014ITA, OF015ITA, OF016ITA, OF018ITA
Pyrenejský poloostrov	OF005PRT, OF021PRT, OF063PRT, OF069ESP, OF070ESP
Pyrenejský poloostrov + jihovýchodní Francie	OF005PRT, OF021PRT, OF063PRT, OF069ESP, OF070ESP, OF082FRA, OF087FRA
Francie	OF082FRA, OF083FRA, OF085FRA, OF087FRA, OF088FRA, OF090FRA, OF092FRA, OF093FRA
Francie bez jihovýchodních lokalit	OF083FRA, OF085FRA, OF088FRA, OF090FRA, OF092FRA, OF093FRA
Balkánský poloostrov	OF002GRC, OF003GRC, OF044BGR, OF066GRC, OF103GRC, OF109GRC
Krym	OF073UKR, OF074UKR, OF076UKR, OF077UKR, OF078UKR
Střední Evropa	OF006CZE, OF007CZE, OF045SVK, OF047CZE, OF062HUN, OF064AUT, OF071POL, OF115CZE

Tabulka 15: Výpisy lokalit druhu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) pro vybrané oblasti, které byly použity k výpočtům ukazatelů diverzity.

Název oblasti	Počet sekvencí	Počet haplotypů	Hd	Nd
Apeninský poloostrov + Sardinie + Sicílie	36	26	0,967	0,01620
Sardinie + střední Itálie	16	10	0,867	0,00204
Linie A (Sicílie a jižní Itálie)	20	16	0,974	0,00491
Pyrenejský poloostrov	15	10	0,924	0,00399
Pyrenejský poloostrov + jihovýchodní Francie	23	14	0,941	0,00423
Francie	28	8	0,725	0,00205
Francie bez jihovýchodních lokalit	20	4	0,498	0,00045
Balkánský poloostrov	18	8	0,817	0,00224
Krym	16	6	0,75	0,00105
Střední Evropa	21	8	0,786	0,00176

Tabulka 16: Hodnoty haplotypových a nukleotidových diverzit ve vybraných oblastech druhu *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761).

	Tajima D test	Signifikance testu
Linie A (Sicílie a jižní Itálie)	-0,90705	NE P>0,1
Linie B (všichni ostatní jedinci)	-1,97938	ANO P<0,05

Tabulka 17: Hodnoty Tajimova D testu pro linii A a B zlatohlávka *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761).

Z hodnot uvedených v tabulce 16 můžeme vidět, že celkově nižší hodnoty jsou u jedinců ze střední Evropy, Krymu a také Francie. V případě vynechání sekvencí z jihovýchodních lokalit se dostaneme u francouzských vzorků k velmi nízké hodnotě, jelikož velkou část variability nesou právě jedinci z jihovýchodu. Naopak vyšší hodnoty byly získány u vzorků v oblastech vymezených na území tří hlavních jižních poloostrovů Evropy a ostrovů ve Středozemním moři.

Tajimův statistický D test vyšel u obou linií v záporných hodnotách, avšak pouze u linie B vyšel tento test průkazně.

5. Diskuze

Pro řešení problematiky populační struktury zlatohlávka tmavého (*O. funesta*) a fylogeneze rodu *Oxythyrea* založené na molekulárně genetických metodách byly zvoleny dva typy genů. První typ, pocházející z mitochondriálního genomu (mtDNA), je dnes zcela běžně užívaným markerem k řešení fylogenetických vztahů (Simon et al. 2006). Specifickými atributy mtDNA je vysoká variabilita způsobená vyšší mutační rychlostí, maternální dědičnost a kratší doba koalescence. Dále jde o vlastnosti jednotlivých genů (jsou velmi konzervativní, bez intronů, s velmi málo duplikacemi a s krátkými integrovanými oblastmi). Získaná data z mtDNA mohou tedy dávat signál o evoluční historii v krátkém časovém úseku i v rámci blízce příbuzných druhů, či populací druhu jediného (Simon et al. 2006, Galtier et al. 2009). V případě této práce se jedná o úseky genu COI a CytB.

Jako druhý typ genu, byl vybrán gen pocházející z jaderné DNA (ITS1), které se rovněž hojně užívá k fylogenetickým analýzám (Lin & Danforth 2004). V případě jaderné DNA se můžeme často setkat s naopak menší mutační rychlostí. Jaderná DNA se dědí po obou rodičích a dochází k její rekombinaci, z čehož plyne delší doba koalescence a možného oddělení linií („lineage sorting“). Analýza těchto markerů mnohdy poukazuje na hlubší historii zkoumaných organismů (Zhang et al. 2003). Jak je z výsledků patrné, u rodu *Oxythyrea* je mutační rychlost velice nízká.

5.1. Fylogenetické vztahy v rámci rodu *Oxythyrea*

V dnešní době se do rodu *Oxythyrea* řadí celkem jedenáct druhů (Krajčák 1998, Smetana 2006). Výsledky předkládají čtenáři pouze částečnou interpretaci fylogenetických vztahů tohoto rodu (zahrnuto bylo pouze šest druhů).

5.1.1. Mitochondriální datasety

U mitochondriálních datasetů a jejich konkatenátu se ve všech haplotypových sítích a fylogenetických analýzách stabilně objevuje obdobná mezidruhovná topologie. V haplotypových sítích tvoří jednotlivé druhy samostatné klastry. Fylogenetické stromy se v obou datasetech i v jejich konkatenátu shodují s prací Sabatinelliho (1981). Ten předkládá interpretaci fylogenetických vztahů uvnitř rodu mezi osmi mediteránními druhy vytvořenou na základě samčích paramer a skleritů endofalu (viz obr. 1).

U fylogenetických stromů vypočtených na základě sekvencí genu COI (obr. 17-19) a konkatenátu obou mitochondriálních genů (obr. 31-33) vytvářejí vzorky rodu *Oxythyrea* samostatný klád sesterský k taxonu *Leucocelis* sp., což je poměrně blízce příbuzný zlatohlávek ze stejného subtribu (*Leucocelina*) žijící v jižní Africe (Krajčák 1998). Ostatní zlatohlávci, kteří byli

zařazení, jako „outgroups“ jsou z odlišných subtribu i tribů (Krajčík 1988). U datasetu CytB (obr. 22-24) je situace odlišná, přestože se podařilo získat sekvenci dalšího úzce příbuzného zlatohlávka *Homothyrea helenae* ze subtribu Leucocelina (Krajčík 1998). Ten vytváří sesterský druh se zlatohlávkem rodu *Leucocelis*, ale celý tento klád netvoří sesterskou větev k rodu *Oxythyrea*. Tento jev patrně vznikl jako důsledek krátkého úseku genu CytB.

Bazální skupinu rodu *Oxythyrea* ve všech mitochondriálních datasetech tvoří dvojice sesterských druhů *O. cinctella* a *O. noemi*. Tuto větev umísťuje na bázi stromu i Sabatinelli (1981). Morfologicky se jedná o velmi podobné druhy (Sabatinelli 1981), což naznačuje i Dahlgren (1972) a Mikšić (1982). Následně se ve všech stromech odštěpuje linie sesterských druhů *O. tripolitana* a *O. abigail*. Sabatinelli (1981) taktéž řadí tyto zlatohlávky do samostatného kládu a upozorňuje na jejich silnou morfologickou podobnost. Bohužel nemůžeme potvrdit příbuznost zlatohlávka *O. dulcis*, jelikož se nepodařilo z dostupného materiálu získat jedinou sekvenci.

Jako odvozená skupina se ve fylogenetických stromech vytvořených na základě datasetu COI, CytB a COI+CytB objevují druhy *O. funesta* a *O. pantherina*. Jejich úzká příbuznost je vidět, nejen ve fylogenetických analýzách, ale i v haplotypových sítích (obr. 15, 20, 25). Potvrzuje se tak poslední klád v Sabatinelliho interpretaci (1981), ve kterém se nachází i druh *O. subcalva*, jenž bohužel v našem materiálu chybí. U posledních dvou zahrnutých druhů se však dostáváme k zajímavému výsledku. Situace je zde komplikovanější, jelikož zlatohlávek tmavý (*O. funesta*) stabilně utváří dvě oddělné linie A a B ve všech devíti stromech. Stejný trend je vidět i v haplotypových sítích, kde utvářejí dva oddělené klastry (obr. 16, 21, 30). Zlatohlávci linie A pocházejí ze Sicílie a jižní Itálie (v případě datasetu CytB i jeden jedinec z Tuniska; mapa 5, 6, 7). Linii B tvoří všichni ostatní jedinci tohoto druhu. Pozice druhu *O. pantherina* není ustálená. U datasetu COI tvoří sesterskou skupinu k linii B, u datasetu CytB naopak k linii A. U konkatenátu se pozice druhu *O. pantherina* mění mezi jednotlivými analýzami. U metody MP a BA je situace shodná, jako u datasetu COI, ale v případě ML tvoří tento taxon sesterský klád ke všem jedincům *O. funesta*, kteří se dichotomicky větví na linii A a B. Zlatohlávek tmavý tedy ve většině případů vytváří polyfylum a je otázkou, jestli jedince linie A nelze považovat za samostatný druh. Hranice nového druhu se u genu COI pohybuje mezi 2-3 % genetické vzdálenosti od druhu původního (Hebert et al. 2004). Mezi linií A a B je hodnota průměrné nekorigované distance 2,6 %. S přihlédnutím k této skutečnosti můžeme tedy jedince linie A považovat za samostatný druh. Alternativním řešením by mohlo být úplné zrušení taxonu *O. pantherina*, nebo snížení statutu na poddruh *O. funesta pantherina*, tak jak to učinili někteří dřívější autoři (Dahlgren 1972, Mikšić 1982).

U mitochondriálních datasetů můžeme za pomoci haplotypových sítí a fylogenetických stromů také rozlišit izraelskou a kyperskou populaci zlatohlávka *O. noemi*, respektive tureckou a balkánskou populaci druhu *O. cinctella*.

5.1.2. Jaderný gen ITS1

Výsledky datasetu genu ITS1 jsou trochu odlišné, což je zřejmě způsobeno velmi nízkou mutační rychlostí tohoto jaderného genu. V haplotypové síti (obr. 25) tvoří druhy *O. cinctella*, *O. noemi* a *O. tripolitana* samostatné klastry, kdežto u dvojice *O. pantherina* a *O. funesta* dosud pravděpodobně nedošlo k úplnému oddělení linií, čemuž nasvědčuje sdílení haplotypu některých marockých jedinců *O. pantherina* a sicilských jedinců zlatohlávka tmavého, stejně jako minimum haplotypů a mutací v jejich společném klastru. Zlatohlávek tmavý zde netvoří samostatný klastr odpovídající linii A, jejíž jedinci jsou rozmístěny převážně ve společných haplotypech s linií B (obr. 26).

Ve fylogenetických stromech datasetu ITS1 (obr. 27-29) však můžeme vidět některé obdobné prvky, jako u mitochondriálních datasetů. Bázi stromů opět tvoří taxony *O. cinctella* a *O. noemi*. Následuje zlatohlávek *O. tripolitana* figurující jako sesterská větev ke zbylým druhům *O. funesta* a *O. pantherina*. Sekvence ITS1 od druhu *O. abigail* se bohužel nepodařilo získat. Díky tomu není možné potvrdit, či vyvrátit příbuznost s taxonem *O. tripolitana* na základě tohoto datasetu.

Druh *O. pantherina* utváří v MP a ML spolu s dvěma jedinci ze Sicílie samostatný klád, a tudíž netvoří monofylum, tak jako u mitochondriálních datasetů. Tento klád je sesterský ke všem zbývajícím jedincům zlatohlávka tmavého včetně několika dalších brouků ze Sicílie a jižní Itálie, které v případě mitochondriálních datasetů spadají do linie A. U bayesiánské analýzy utvářejí vzorky druhu *O. pantherina* a zmínění dva sicilští jedinci polytomický klád, ke kterému se připojují i zbylí brouci tvořící samostatnou větev. Zlatohlávci *O. pantherina* a *O. funesta* netvoří na základě jaderného genu ITS1 v žádné analýze monofyletické taxony. Jak již bylo zmíněno výše, celková variabilita v tomto datasetu je velice nízká a v rámci druhů *O. pantherina* a *O. funesta* jde pouze o osm variabilních míst. Můžeme se tedy domnívat, že sekvence těchto dvou druhů zůstávají stále ve velmi podobné formě a zatím nedošlo k úplnému oddělení druhů.

Tuto skutečnost podporuje i poměrně složitý vývoj samotné taxonomie těchto zlatohlávků. Kocher (1958) popisuje situaci na území Maroka a zmiňuje zde druh *O. funesta* a jeho tři variety včetně rozšíření a obtížné determinace. První je *O. funesta* sensu stricto žijící především na severu Maroka. Druhá varieta *atlantis* se objevuje převážně v jižních polohách, včetně pohoří Velkého Atlasu. První zmínka o této varietě pravděpodobně pochází z práce Escalery (1914). Poslední je varieta *pantherina*, která se vyskytuje v jižních oblastech Atlasu a v pre-saharských i saharských

lokalitách. Tato varieta je synonymem dnešnímu druhu *O. pantherina*. Dahlgren (1972) se také drží obdobné klasifikace a popisuje zde poddruh *O. funesta pantherina* s centrem rozšíření ve středním a jižním Tunisku. Dále poukazuje na přechodné formy na jihovýchodním území Alžírsko. Mikšić (1982) později předkládá identickou koncepci, jako Dahlgren a k rozšíření poddruhu *O. funesta pantherina* uvádí Tunisko a Alžírsko. Naopak do areálu rozšíření zlatohlávka *O. funesta funesta* zahrnuje i Maroko a Alžírsko. Naproti tomu Sabatinelli (1981) se k problematice staví velice kriticky a podrobně zde rozebírá oba taxony, které staví na úroveň druhu. Zároveň upozorňuje na možnou přechodnou formu mezi těmito taxony na území Alžírsko a poukazuje na nutné prověření veškerého dokladového materiálu pocházejícího ze severní Afriky. Baraud (1985) pravděpodobně vychází ze Sabatinelliho (1981). Také uvádí oba taxony jako samostatné druhy a v krátkosti představuje dřívější koncepcce.

Na závěr je tedy dobré podotknout, že nejspíš nelze vyloučit ani možnost hybridizace těchto druhů (viz odstavec výše), což by mělo za následek podobný efekt, tedy existenci společného haplotypu mezi *O. pantherina* a *O. funesta*. Aktuální „sampling“ ale hovoří spíše o opaku, jelikož identický haplotyp byl objeven mezi sicilskými a marockými jedinci, naopak vzorek marockého a tuniského zlatohlávka tmavého má haplotyp odlišný.

5.1.3. Konkatenát COI+CytB+ITS1

U konkatenátu všech tří genů se opět vrací původní vzor (obr. 34-36), který je k vidění u mitochondriálních datasetů a všechny druhy utvářejí monofyletické klády (nebo dvě monofyletické linie u zlatohlávka tmavého). Tento jev bude dán silnějším signálem mtDNA, která obsahuje více variabilních míst. U metod MP a ML tvoří bazální skupinu *O. cinctella* a *O. noemi*, dále se objevuje *O. tripolitana* a následně *O. pantherina*. Zlatohlávek tmavý tvoří odvozenou skupinu, která se opět dichotomicky větví na linii A a B. V případě Bayesiánské analýzy (obr. 36) se zlatohlávek *O. tripolitana* polytomicky připojuje mezi větev *O. cinctella* + *O. noemi* a *O. funesta* + *O. pantherina*. Uspořádání posledních dvou jmenovaných druhů je v bayesiánské analýze obdobné např. samostatnému datasetu COI.

5.2. Vznik linie A u zlatohlávka tmavého

Existence odlišné linie zlatohlávka tmavého na území Sicílie a části jižní Itálie je z výsledku zcela jasná. Jedinci této linie v případě mitochondriálních datasetů vždy tvoří samostatný klast v haplotypových sítích, nebo oddělený monofyletický klád ve fylogenetických stromech. Ve fylogenetických stromech datasetu CytB se v linii A taktéž objevuje vzorek z Tuniska (OF134TUN). Ten tvoří bazální větev linie A (obr. 22-24). Rozdíly mezi populacemi samotné Sicílie a jižní Itálie nejsou z výsledků patrné. U jaderného genu tato linie není rozlišitelná.

5.2.1. Migrace ze severní Afriky

Nejednotné postavení základních větví utvářených druhy *O. funesta* a *O. pantherina* značně komplikuje možnou interpretaci výsledků. Převážně se ve stromech objevuje linie A jako sesterská skupina k linii B a druhu *O. pantherina*, popřípadě je druh *O. pantherina* sesterskou větví k linii A. Je tedy pravděpodobné, že linie A vznikla v Severní Africe ze společného předka jako linie B a druh *O. pantherina*. Zároveň někteří jedinci překonali Sicilský průliv a dostali se tak na Sicílii, kde vznikla slepá vývojová větev linie A, která se zde udržela až do současnosti a pod jiným speciálním tlakem se mírně odlišila od jedincu v Severní Africe. Tento jev je patrný jak ve fylogenetických stromech datasetu CytB, tak i v haplotypové síti (obr. 21), kde je mezi tuniským vzorkem a jedinci ze Sicílie a jižní Itálie 12 mutací. Linie B následně expandovala přes Gibraltarský průliv do celé Evropy, krom Sicílie, kde už se vyskytovala linie A.

Přesun zlatohlávka tmavého na Sicílii patrně proběhl v některém z období, kdy byl Sicilský průliv mnohem užší, než je tomu dnes. Momentálně je vzdálenost mezi Tuniskem a Sicílií téměř 150 km, což už je relativně velká distance i pro velmi mobilního zlatohlávka tmavého. Kratší vzdálenost mohla vzniknout poklesem hladiny Středozemního moře, což se stalo jednak při Messinské salinitní krizi a poté také v pleistocénu (před 2,4-0,01 mil. lety) při glaciálních obdobích.

Messinská salinitní krize je období datované před 5,96 až 5,33 miliony lety (konec miocénu), kdy došlo k uzavření Gibraltaru a postupnému vysychání Středozemního moře. Hladina několikrát opět stoupla a klesla, ale k plnému obnovení došlo až na samotném konci této etapy (Fauquette et al. 2006). V této době vznikl pevninský most mezi Sicílií a severním pobřežím Afriky (Rouchy & Caruso 2006). Podobný vzor šíření se nejspíš objevil i u skupiny listorohých brouků čeledi Pachydeminae (Sanmartín 2003). Právě Messinská salinitní krize zapříčinila osídlení Pyrenejského poloostrova a některých mediteránních ostrovů těmito brouky včetně inkriminované Sicílie (dále se jednalo o Sardinii a Baleáry). K podobnému závěru došli i autoři práce zabývající se ropuchou zelenou (*Bufo viridis* Laurenti, 1768), (Stöck et al. 2006). Později se ale objevila navazující publikace (Stöck et al. 2008), která na základě odlišné metodiky datování tuto možnost popírá a osídlení Sicílie autoři datují do období pleistocénu (viz další odstavec).

Díky střídání glaciálů a interglaciálů, které pleistocenní období provázelo (Coope 2004), docházelo ke kolísání hladiny Středozemního moře (Rabineau et al. 2006). Důvodem byly rozrůstající se ledovce, v nichž bylo vázáno více a více vody. Během interglaciálů se tato voda znovu vrátila zpět do systému a došlo k opětovnému zvednutí hladiny. Díky těmto procesům docházelo ke zkrácení vzdálenosti mezi Sicílií a Tuniskem přibližně na 50 km (Dapporto 2011). Habel et al. (2010) uvádí vzdálenost pouhých 11 km, přičemž organismy mohli využít ostrova Pantelleria jako „odpočinkovou stanici“ při migraci. K takovýmto přesunům zřejmě došlo

u modráška *Polyommatus celina* Austaut, 1879 (Dincă et al. 2011), nebo okáče bojínkového (*Melanargia galathea* Linnaeus, 1758), (Habel et al. 2011).

S přihlédnutím na molekulární dataci (obr. 37), která se ale bohužel týká pouze datasetu COI, můžeme odhadnout divergenci komplexu *O. funesta* (linie A i B) a *O. pantherina*. Ta se pravděpodobně odehrála před 2,2 až 1,1 miliony lety, tedy přibližně v průběhu spodního a středního pleistocénu. Patrně tak můžeme vyloučit migraci zlatohlávka tmavého v době Messinské salinitní krize, která se odehrála před 5,96 - 5,33 miliony lety, i když metodika použitá pro molekulární datování patří mezi ty nejjednodušší, a tudíž bychom měli být na pozoru při interpretaci získaných výsledků.

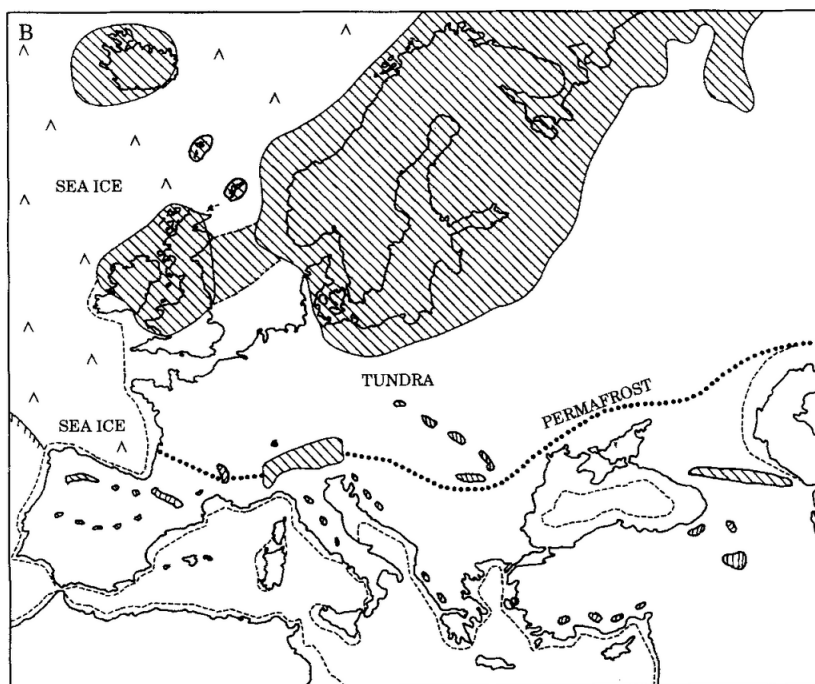
Na závěr této kapitoly se podívejme na zlatohlávkovité západního palearktu. Zjistíme, že to nemusí být jediný případ migrace zlatohlávka přes Sicilský průliv. Obdobným způsobem se na Sicílii mohl objevit druh *Aethiessa floralis* (Fabricius, 1787), který obývá státy severního pobřeží Afriky, dále Izrael, ale také jih Španělska, Maltu, Sicílii a Kalábrii (Baraud 1992, Krajčák 1998, Smetana 2006, Sabatinelli 2008). Ze současného areálu rozšíření tedy můžeme soudit, že tento druh nějakým způsobem překonal Sicilský průliv a následně osídlil Maltu, Sicílii a jižní část Apeninského poloostrova. Linie A se také vyskytuje v jižní Itálii, což může být zapříčiněno právě probíhající expanzí, nebo zde existovala již delší dobu.

5.2.2. Diferenciace linie A na území Evropy

Fylogenetický strom ML na základě konkatenátu COI+CytB (obr. 32) a stromy metody MP a ML vypočtené s pomocí datasetu COI+CytB+ITS1 (obr. 34, 35) vykazují odlišnou topologii. Zde je bazální skupinou druh *O. pantherina* a zlatohlávek tmavý utváří dva odvozené sesterské klády (linie A a B). Bohužel v těchto datasetech chybí jedinec z Tuniska.

V tomto případě by se dala formulovat odlišná hypotéza, i když spíše méně pravděpodobná. Zlatohlávek tmavý se dostal do Evropy přes Gibraltar a následný vznik linie A byl zapříčiněn klimatickými oscilacemi v pleistocénu (pokud bychom se drželi molekulární datace).

Západní palearkt je v pleistocénu charakterizován drastickými změnám klimatu, které se projevovaly nárůstem, či ústupem rozsahu pevninského ledovce a již zmíněným kolísáním hladiny Středozemního moře. Obrázek 38 poukazuje na poslední ledovcové maximum na konci poslední doby ledové (Hewitt 1999), které je datováno na 22-19 tisíc let před současností (Lambeck et al. 2000).

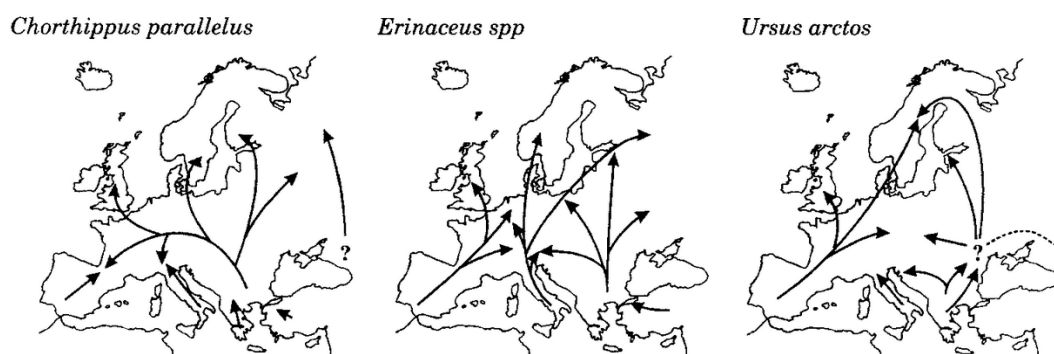


Obrázek 38: Evropa v období po posledním ledovcovém maximu před 18 tis. lety. Šrafované oblasti – kontinentální ledovec, čárkovaná linie – pokles hladiny moře, tečkovaná linie – hranice permafrostu (převzato z Hewitt 1999).

Tyto oscilace mezi glaciály a interglaciály vedly nejen u hmyzu k hromadným extinkcím a migracím druhů, stejně jako ke speciaci přeživších druhů v refugiiích a při jejich následné rekolonizaci původních areálů. Každý druh měl tedy tři možnosti: (i) vymřít, (ii) přizpůsobit se novým podmínkám, (iii) sledovat měnící se geografický rozsah svých přirozených podmínek do refugii (Coope 2004).

Mezi nejvýznamnější refugia, ze kterých v interglaciálech docházelo k rekolonizaci Evropy, patří oblasti v Pyrenejském, Apeninském a Balkánském ostrově (Hewitt 1999). Dále oblasti kolem Kavkazu a u Kaspického moře (Hewitt 1999), nebo jižního pobřeží Černého moře (Seddon et al. 2002). Další práce upozorňují na existenci refugii v západním Turecku (Dubey et al. 2006), na Krymu (Bilton et al. 1998), v jihovýchodní Francii (Sommer et al. 2008), ve východních Karpatech a Moldávii (Sommer & Benecke 2005), v panonské pánvi (Jankovská & Pokorný 2008), či v Maroku a Alžírsku (Petit et al. 2002). Významnou část refugii tvoří též ostrovy ve Středozemním moři – např. Sicílie, Sardinie (Petit et al. 2002), nebo Korsika a Baleáry (Dapporto et al. 2009).

Často se stávalo, že druh obsadil několik různých refugii a během glaciálu zde postupně došlo k odlišným speciálním procesům, a tedy i ke vzniku odlišných linií. Následná rekolonizace severnějších oblastí Evropy při oteplování a ústupu ledovce mohla proběhnout z různých míst různou rychlostí. Několik prací se snažilo tyto jevy uspořádat a poukázat na podobné trendy (obr. 39; Taberlet et al. 1998, Hewitt 1999).



Obrázek 39: Tři základní kolonizační trendy z hlavních refugií jižní Evropy (převzato z Hewitt 1999).

U zlatohlávka tmavého také s největší pravděpodobností docházelo v glaciálních obdobích k ústupům do jižních poloh, jelikož se jedná o poměrně teplomilné brouky, vyžadující specifické podmínky k životu (určitá teplota, vlhkost, listnaté lesy, kvetoucí bylinné a keřové plochy atd.). Postupem času se mohla na Sicílii fungující jako refugium odlišit linie, která přetrvávala až do dnešní doby. Následně se někteří jedinci dostali do Tuniska, kde se pod jiným speciálním tlakem odlišili, přičemž další migrace oběma směry mohla tyto rozdíly rozmělnit.

Samotný vznik takovéto populace na Sicílii není nikterak ojedinělý. Podobným způsobem vznikla na Sicílii oddělená linie u ježka západního (*Erinaceus europaeus* Linnaeus, 1758), (Seddon et al. 2001), plcha velkého (*Glis glis* Linnaeus, 1766), (Brutto et al. 2011), myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus* Linnaeus, 1758), (Michaux et al. 2003), či skokana krátkonohého (*Rana lessonae* Camerano, 1882), (Canestrelli & Nascetti 2008).

Práce z roku 2008 (Audisio et al.) týkající se zlatohlávkovitých brouků popisuje vznik odlišného páchníka (rod *Osmoderma* Lepeletier & Audinet-Serville, 1828) na území Sicílie, což by odpovídalo naší hypotéze. Podle autorů byl páchník v dobách ledových zatlačován do refugií v Apeninském a Balkánském poloostrově, kde docházelo ke speciaci a vzniku několika odlišných taxonů. Druhy *O. eremita* Scopoli, 1763 a *O. barnabita* Motschulsky, 1845 rekolonizovaly zpětně Evropu ze zmíněných poloostrovů. V průběhu kvartéru se ale zároveň odlišila populace v Řecku a evropské části Turecka v podobě druhu *O. lassallei* Baraud & Tausin, 1991 a populace na Sicílii, kde taktéž došlo ke vzniku samostatného ostrovního druhu *O. cristinae* Sparacio, 1994 (obr. 40). Autoři uvádějí dataci vzniku těchto dvou endemických druhů přibližně před dvěma miliony lety (rychlost evoluce genu COI je v jejich případě stanovena na 2 % za 1 milion let).



Obrázek 40: Aktuální rozšíření čtyř druhů páchníků (*Osmoderma* Lepeletier & Audinet-Serville, 1828) v Evropě (upraveno podle Audisio et al. 2008).

Zatím nejnovějším příspěvkem k této problematice u zlatohlávkovitých západního palearktu bude připravovaný článek zabývající se komplexem druhu *C. aurata* (Ahrens et al. pers. comm.). Podle autorů se na Apeninském poloostrově objevuje velice podobný haplotyp zahrnující taxony *C. aurata pisana* Heer, 1841 a *C. aurata sicula* Aliquo, 1983. Druhý zmíněný zlatohlávek je endemitem Sicílie a při bližším pohledu má mírně odlišný haplotyp od poddruhu *C. aurata pisana*.

Jmenovaný páchník a jeden z poddruhů zlatohlávka *C. aurata* nejsou jedinými endemity Sicílie v rámci zlatohlávkovitých brouků. Při pohledu na počty endemických druhů hlavních středomořských ostrovů zjistíme, že právě Sicílie je na tyto taxony nejbohatší (tab. 18). Celkově se zde objevuje osm endemitů z celkového počtu 20 taxonů. Přímo na Sicílii je soustředěn krom taxonů *Osmoderma cristinae* a *Cetonia aurata sicula* i *Gnorimus decempunctatus* Helfer, 1833. Do Kalábrie z tohoto ostrova zasahuje *Netocia squamosa* (Lefebvre, 1827) a *Potosia incerta* (Costa, 1852), (obdobně jako linie A zlatohlávka tmavého). Zbývající endemiti se vyskytují také na Sardinii a Korsice. Jsou to *Eupotosia affinis tyrrhenica* (Mikšic, 1957) a *Netocia sardea* (Gory & Percheron, 1833). K posledním dvoum taxonům je zařazen i druh *Cetonia carthami carthami* Gory & Percheron, 1833, ten se však pravděpodobně na Sicílii nevyskytuje, jelikož tuto informaci uvádí pouze Smetana (2006) v katalogu palearktických brouků a nikoliv většina dalších zdrojů (Vondráček 2010).

Název ostrova	Počet endemitů / Počet všech taxonů
Sicílie	8/20
Korsika	3/15
Sardinie	3/14
Kypr	3/12
Kréta	2/15

Tabulka 18: Druhové bohatství zlatohlávkovitých na hlavních ostrovech v Mediteránu, včetně počtů endemitů obývajících tato území (upraveno podle Vondráček 2010).

5.3. Molekulární datování a hypotéza o příchodu zlatohlávka tmavého do Evropy

Na začátek této kapitoly je dobré podotknout, že je tato hypotéza nadmíru spekulativní a celý proces se mohl odehrát různými, více či méně odlišnými způsoby. Použitá metoda k molekulárnímu datování slouží pouze k hrubému odhadování, nehledě na to, že použité rozpětí rychlosti evoluce genu COI nemusí odpovídat skutečnosti u taxonů rodu Oxythyrea.

Pokud se podíváme na výsledky fylogenetických analýz a aktuální distribuci druhů, můžeme spolu s hrubými odhady molekulární datace formulovat hypotézu o příchodu zlatohlávka tmavého do Evropy. Předek zástupců rodu *Oxythyrea* se objevil v západním palearktu patrně v oblasti severovýchodní Afriky a Levanty v pozdním Miocénu. Nejspíše jsem mohl dorazit z Afriky, kde je současné centrum diverzity pro celý subtribus Leucocelina (Krajčík 1998). Na konci miocénu a počátku pliocénu (před 6-3,9 mil. lety) došlo u tohoto předka na rozštěpení bazální linie *O. cinctella* + *O. noemi* a zbylých druhů. Bazální linie osídlila Levantu a Malou Asii, předek zbylých druhů začal osidlovat pobřeží Levanty a severní Afriky. Z datace se dá soudit, že osidlování těchto území proběhlo v průběhu Messinské salinitní krize, či spíše až po ní.

V přibližně stejné době středního pliocénu (před 4,7-3 / 4,8-3,1 mil. lety) se od sebe oddělily druhy *O. cinctella* a *O. noemi* v oblasti Turecka a Levanty a druhy *O. tripolitana* a *O. abigail* v oblasti Levanty a východní části severní Afriky. V tomto období už bylo Středozemní moře (stejně jako okolní biomy) plně obnovené (Favre et al. 2007). V západní části Afrického pobřeží se v průběhu pleistocénu (před 2,2-1,1 mil. lety) oddělili ze společného předka zlatohlávci *O. pantherina* a *O. funesta*. Zlatohlávek tmavý postupně pronikl do Evropy, kam se mohl dostat přes Gibraltar, či Sicilský průliv v případě linie A. Pro vysoce mobilní druh, jakým zlatohlávek tmavý je, patrně úzký Gibraltarský průliv nepředstavoval velkou bariérou.

Zajímavostí může být osídlení Kypru zlatohlávkem *O. noemi*. To se nejspíše odehrálo v období před 1-0,65 milionem let. Dnes víme, že Kypr byl minimálně posledních 5 milionů let izolovaným ostrovem (Davis 2003). Zlatohlávek tedy musel překonat určitou vzdálenost, která se aktuálně pohybuje mezi 80-110 km. V dobách ledových hladina Středozemního moře klesala pod

dnešní úroveň, jelikož voda byla vázaná v ledovcích. Právě tato období zajistila kratší vzdálenost mezi pevninou a Kyprem a mohlo dojít ke snazší kolonizaci ostrova zlatohlávkem *O. noemi*.

Jako poslední bych zde zmínil balkánskou a tureckou populaci druhu *O. cinctella*. Z fylogenetických stromů je patrné, že makedonské vzorky tvoří odvozenou skupinu. Navíc u datasetu CytB můžeme vidět, že těmto jedincům předchází vzorek z Peloponésu. S pomocí molekulárního datování můžeme říct, že se do oblasti Balkánu dostal zlatohlávek *O. cinctella* zřejmě ještě před zjištěnou dobou (před 1,2-0,78 mil. let) ve středním až svrchním pleistocénu.

5.4. Expanzivní charakter linie B

V počátcích tohoto projektu jsme očekávali, že narazíme na geneticky odlišné linie v rámci celé Evropy, podobně jako u páchníků. Zatím jedinou takovou linií jsou populace na Sicílii, v jižní Itálii a v Tunisku (viz předchozí kapitoly). Zbytek evropského kontinentu (a nejen jeho) vykazuje zcela odlišný výsledek. Z haplotypových sítí, fylogenetických stromů a tajimova D testu je patrný recentní expanzivní charakter linie B zlatohlávka tmavého.

5.4.1. Mitochondriální datasety

Nejprve se podívejme na mitochondriální datasety. U haplotypových sítí můžeme vidět, že linie B utváří tzv. „star pattern“ (hvězdovitý motiv), který nás informuje o aktuální prudké demografické expanzi jedinců (Avice 2000). Podobný motiv můžeme vidět u tiplíků (*Culicoides* Latreille, 1809) ve Španělsku (Calvo et al. 2009), nebo u sýkor laponských (*Parus cinctus* Boddaert, 1783), které rovněž rapidně expandovaly po posledním ledovcovém maximu (Uimaniemi et al. 2003). U samostatných genů je motiv velmi jednoduchý (obr. 16, 21). Centrální haplotyp by měl poukazovat na místo, odkud linie expandovala (Mirol et al. 2008). U úseků COI a CytB obsahuje tzv. ancestrální haplotyp směs různých vzorků napříč Evropou. Především jde o jedince z Balkánu, střední Evropy a Ukrajiny, ale objevuje se zde i menší počet sekvencí z Francie, Španělska, Portugalska, nebo střední Itálie a Sardinie. Takto široce rozšířený haplotyp bohužel nemůže podat věrohodnou informaci o geografickém počátku expanze. Podobný jev byl objeven po postglaciální expanzi octomilky *Drosophila virilis* Sturtevant, 1916, jejíž ancestrální haplotyp nepodává žádnou informaci o geografickém původu tohoto druhu (Mirol et al. 2008). Nutno podotknout, že v tomto případě jde v dnešní době o kosmopolitní druh.

U konkaténátu COI+CytB je situace sice o něco lepší, ale stále se v centrálním haplotypu (D4) objevuje podobné složení, jako u samostatných datasetů, leč s menším celkovým počtem sekvencí. Celý vzor sítě je dále rozčleněn na několik haplotypů se 6-15 sekvencemi a na ně různě napojené větší množství haplotypů s jednou až čtyřmi sekvencemi. Mezi ty početnější patří haplotypy zahrnující jedince z Balkánu, střední Evropy a Ukrajiny (D2), dále z Krymu (D44), Francie

a Rakouska (D35) a Sardinie (D46), kde je též neobvykle jedna sekvence z Krymského poloostrova. V případě haplotypu D35 chybí všichni jedinci z jihovýchodních lokalit Francie.

Takovýto výsledek je patrně zapříčiněn hned několika jevy. Prvně se dá očekávat, že v průběhu glaciálů se vždy tato linie stáhla do refugií v jižní Evropě a při následném oteplení mohl druh opět rapidně expandovat a populace se začaly promíchávat. Navíc se zdá, že zlatohlávek tmavý reaguje na opravdu malé klimatické výkyvy, jak je zjevné z jeho měnícího se areálu rozšíření v posledních padesáti letech. V tomto období zlatohlávek *O. funesta* pravděpodobně vymizel z celé střední Evropy a následně se během posledních dvaceti let vrátil zpět a osídlil i severnější oblasti v Pobaltí, Skandinávii a v Rusku (viz úvod práce). Tyto oscilace a vysoká mobilita samotného brouka mohla zapříčinit pozorovaný jev v haplotypové síti. Především tedy, že centrální haplotyp obsahuje sekvence z Pyrenejského, Apeninského a Balkánského poloostrova, ale i střední Evropy a Krymu. Z něho poměrně rychle obsadil další místa, kde převládá v lehce pozměněné formě (1-2 mutace). Jde o Sardinii, nebo další oblasti ve Francii, Řecku, ve střední Evropě, nebo na Krymu. Ze všech vyjmenovaných haplotypů se poté diverzifikovali menší počty jedinců, které v síti tvoří body zahrnující jednu až čtyři sekvence. K takovému jevu došlo v podstatě na všech lokalitách. Zlatohlávek patrně expandoval i mimo Evropu. Lze tak soudit z pozice tureckého vzorku (OF135TUR) v haplotypových sítích všech tří mitochondriálních datasetů. U datasetu CytB je podobně umístěna sekvence z Maroka. Zřejmě tedy dochází ke komunikaci mezi Pyrenejským poloostrovem a Marokem, jelikož je zde rozdíl jediné mutace. Dalo by se očekávat, že by zde byl větší rozdíl v počtu mutací, pokud by se jednalo o reliktní populaci, která zde přetrvala delší dobu. Jako poslední jev, který by mohl přispět k výsledné situaci, bych zmínil i lidský faktor. Člověk mohl nevědomky převézt na delší vzdálenosti, jak dospělce (např. s ovocem, na kterém by se živil), tak larvy (např. v nějakém půdním substrátu). Dejme tomu lodní doprava by mohla vysvětlit, proč jeden vzorek z Krymu sdílí identický haplotyp, jako většina jedinců ze Sardinie.

Ve fylogenetických stromech nemá uspořádání linie B velkou výpovědní hodnotu. Recentní expanzivní charakter je zde patrný z velké polytomie většiny jedinců. Odvozené haplotypy většinou utváří samostatné klády. Expanze se dá prokázat i tajimovým D testem, pokud vyjde průkazně v záporných hodnotách (Calvo et al. 2009, Jong et al. 2011). Pro linii B se tak skutečně stalo ($P < 0,05$; -1,97938) a tento výsledek tedy také podporuje hypotézu recentní expanze. U linie A vyšel test neprůkazně ($P > 0,1$), což nás informuje o opačném charakteru této populace. Zde mohla expanze proběhnout maximálně do jižní Itálie a i tam už mohli být jedinci ze Sicílie delší dobu.

5.4.2. Jaderný gen ITS1

Pokud se podíváme na samotného zlatohlávka tmavého, zjistíme, že tvoří pouze osm haplotypů (obr. 26), navíc jeden sdílí s taxonem *O. pantherina* (obr. 25). Jak již bylo řečeno, jedinci zde neutváří linii A na území Sicílie a jižní Itálie. Více nám tato síť zřejmě nenapoví. Pravdou je, že z haplotypové sítě (obr. 26) a fylogenetických stromů (obr. 27-29) by se mohlo zdát, že můžeme jedince rozdělit na ty ze západních lokalit a na ty z východních. Tento jev je však způsoben jedinou mutací v celé délce sekvence, a tudíž by takovýto závěr mohl být unáhlený a chybný.

Haplotypová síť na základě konkatenátu COI+CytB+ITS1 nebyla do práce vložena, jelikož má jaderný gen ITS1 zcela odlišnou evoluční historii oproti úsekům genu COI a CytB. Fylogenetické stromy (obr. 37-39) byly vytvořeny především pro interpretaci samotné fylogeneze rodu, a proto se zde také nebudu pouštět do interpretace problematiky zlatohlávka tmavého. Tady se totiž také projevuje inkriminovaná mutace v úseku genu ITS1, která dělí ve stromě jedince ze západních a východních lokalit (ať už se jedná o monofyletické, či parafyletické klády).

5.5. Hypotetické rozmístění refugiálních oblastí v glaciálních obdobích

Klasickým předpokladem pro refugiální oblast je vyšší genetická diverzita druhu na tomto území oproti nově rekolonizovaným oblastem po posledním ledovcovém maximu (Hewitt 1996). S pomocí haplotypové a nukleotidové diverzity vypočtené na základě konkatenátu COI+CytB se můžeme pokusit tyto refugia vypátrat. Ze samotné definice těchto dvou ukazatelů totiž plyne, že pro refugiální oblasti by měly být hodnoty Hd a Nd vyšší, než pro zpětně rekolonizovaná místa.

Nejvyšší Hd je spočtena pro jedince linie A (0,974), což bude dáno delším nenarušeným vývojem v tomto refugiu. Druhá nejvyšší hodnota Hd (0,967) a nejvyšší hodnota Nd (0,01620) byla vypočtena pro celý Apeninský poloostrov včetně Sardinie a Sicílie. Poměrně vysoké hodnoty jsou ale k vidění i pro jedince ze střední Itálie a Sardinie (tedy bez linie A). Další oblasti, kde jsme získali vysoké hodnoty, jsou na Pyrenejském a Balkánském poloostrově. Naopak nižší hodnoty byly spočteny pro střední Evropu a Krym. Nejnižší Hd byla spočtena pro jedince z Francie (0,725). Pokud z francouzských lokalit vyloučíme jedince z jihovýchodního území, hodnoty diverzit rapidně klesnou (Hd = 0,498; Nd = 0,00045).

Celkově tedy můžeme soudit, že Pyrenejský, Apeninský a Balkánský poloostrov, stejně jako Sardinie, vychází jako hypotetické refugium pro zlatohlávka tmavého. Jižní část Apeninského poloostrova a Sicílie se taktéž jeví jako refugium. Z výsledků však už víme, že z této oblasti nedocházelo k expanzi. Naopak střední Evropa, Krym, nebo Francie jako refugium zřejmě nesloužila. Zajímavým regionem je jihovýchodní Francie. Odtud máme pouze osm sekvencí, což byl důvod, proč nebyly hodnoty diverzity spočteny i samostatně pro tyto jedince. Je ale možné, že i zde byla refugiální oblast pro tento druh.

6. Závěr

- Na dostupných druzích rodu *Oxythyrea* (6 z 11) byla potvrzena Sabatinelliho (1981) fylogenetická interpretace vztahů uvnitř rodu, včetně příbuznosti jednotlivých druhů mezi sebou.
- S pomocí molekulárního datování můžeme odhadnout, že se rod *Oxythyrea* objevil v oblasti Mediteránu na přelomu miocénu a pliocénu. V průběhu pliocénu došlo k diverzifikaci rodu a nejodvozenější taxony (*O. pantherina* a *O. funesta*) vznikly pravděpodobně až v pleistocénu.
- Rozlišení druhů *O. pantherina* a *O. funesta* je komplikované. S pomocí mtDNA jsme schopni tyto druhy od sebe rozlišit, i když zlatohlávek tmavý ve většině případu tvoří polyfylum v podobě dvou oddělených linií. Naproti tomu u jaderného genu ITS1 nedošlo k úplnému oddělení druhů z důvodu nízké mutační rychlosti genu. Složitý historický vývoj taxonomické koncepce tohoto komplexu spolu s výsledky nabádá ke zpětnému snížení druhové statutu taxonu *O. pantherina*.
- Podle výsledků fylogenetických stromů i haplotypových sítí vytvořených na základě mtDNA existuje na Sicílii a jižní Itálii oddělená genetická linie (A) zlatohlávka tmavého (*O. funesta*). Divergence mezi touto linií a zbylými populacemi druhu (linie B) je 2,6 %. Z této hodnoty můžeme soudit, že se jedná o nový druh. Na základě jaderné DNA se nám nepodařilo tuto linii rozlišit. U datasetu CytB tvoří bázi linie A jedinec z Tuniska a teprve na něj navazují populace ze Sicílie a jižní Itálie.
- Ke vzniku linie A došlo pravděpodobně v období pleistocénu v oblasti severní Afriky, odkud poté její část migrovala přes Sicilský průliv na Sicílii. Můžeme předpokládat, že se tak stalo v průběhu některého z glaciálů, kdy byla vzdálenost pevniny a ostrova kratší, než je tomu dnes. Úplně nemůžeme vyloučit ani hypotézu o příchodu zlatohlávka tmavého do Evropy přes Gibraltar a následné oddělení linie A na Sicílii v průběhu pleistocénu, kam byl zlatohlávek tmavý díky klimatickým oscilacím zatlačován.
- Z haplotypových sítí a hodnoty tajimova D testu vykazují zbylé populace (tedy bez Sicílie a jižní Itálie) silnou recentní demografickou expanzi, která je zřejmě podpořena vysokou mobilitou zlatohlávka (eventuálně i lidským faktorem).
- Hodnoty haplotypových a nukleotidových diverzit vypočtené pro jedince z vybraných oblastí vypovídají o hypotetických refugiálních oblastech pro tento druh v posledním ledovcovém maximu. Mohlo jít o území Pyrenejského, Apeninského a Balkánského poloostrova. Dále o Sardinii a patrně i jihovýchodní Francii. Naopak střední Evropa, Krym a francouzské území (bez jihovýchodních lokalit) bylo vyloučeno.

- Pro kompletní náhled na fylogenezi rodu by bylo samozřejmě vhodné doplnit materiál o zbývající druhy, které v analýzách chyběly. Dále by bylo vhodné získat materiál od druhů *O. pantherina* a *O. funesta* z lokalit Maroka, Alžírsko, Tunisko a Libye, který by mohl pomoci rozřešit problematiku taxonomie těchto dvou druhů a zároveň potvrdit hypotézu migrace linie A z Tuniska na Sicílii. Kromě toho by se mohl rozšířit dataset druhu *O. funesta* o zcela nové lokality, např. severní oblasti Evropy, nebo Turecko, Kavkaz, či další ostrovy (Malta, Baleáry, Kréta, Kypr, Kanárské ostrovy).
- Dalším určitě důležitým navazujícím bodem by bylo rozšíření práce o morfologická data, nejen dospělců, ale též larválních stádií, která byla častokrát dochovávána. Morfologie larev by mohla být dalším přístupem jak uchopit problematiku fylogeneze rodu. Porovnání dospělců i larev mezi oddělenou linií A a některých odlišných populací linie B by také mohlo zajímavě přispět k této problematice.

7. Přehled použité literatury

(sekundární citace jsou označeny * před jménem prvního autora)

ANTOINE P. (1992): Quelques especes nouvelles ou peu connues de la famille des Cetoniidae III. *Bulletin de la Societe Sciences Nat Compiegne* 75-76: 6-20.

AUDISIO P., BRUSTEL H., CARPANETO G.M., COLETTI G., MANCINI E., TRIZZINO M., ANTONINI G., BIASE DE A. (2008): Data on molecular taxonomy and genetic diversification of the European Hermit beetles, a species complex of endangered insects (Coleoptera: Scarabaeidae, Cetoniinae, Osmoderma). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 47: 88-95.

AVISE J.C. (2000): *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, 447 pp.

BALTHASAR V. (1956): *Fauna ČSR, svazek 8: Brouci listoroží I*. Nakladatelství československé akademie, 286pp.

BANDELT H.J., FORSTER P., RÖHL A. (1999): Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

BARAUD J. (1977): Coléoptères Scarabaeoidea, Fauna de l'Europe occidentale: Belgique, France, Grande Bretagne, Italie, Péninsule Ibérique. *Nouvelle Revue d'Entomologie* 7: 1-352.

BARAUD J. (1985): *Coléoptères Scarabaeoidea, Fauna du Nord de l'Afrique, du Maroc au Sinaï*. Éditions Lechevalier, Paris, Encyclopédie Entomologique, 650 pp.

BARAUD J. (1992): Coléoptères Scarabaeoidea d'Europe. *Federation Francaise des Societes de Sciences Naturelles & Societe Linneenne de Lyon, Faune de France* 78: 1-856.

BARRACLOUGH T.G., HOGAN J.E., VOGLER A.P. (1999): Testing whether ecological factors promote cladogenesis in a group of tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266: 1061-1067.

*BATURIN P. (2003): Oral information in BUKEJS A., BARŠEVSKIS A., RUDĀNS E. (2006): Oxythyrea funesta (Poda, 1761) (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae) in the fauna of Latvia. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis* 6: 51-55.

BILTON D.T., MIROL P.M., MASCHERETTI S., FRED A., ZIMA J., SEARLE B. (1998): Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265: 1219-1226.

BROWER A.V.Z. (1994): Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly Heliconius erato inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 6491-6495.

BRUTTO S.L., SARÁ M., ARCULEO M. (2011): Italian Peninsula preserves an evolutionary lineage of the fat dormouse Glis glis L. (Rodentia: Gliridae). *Biological Journal of the Linnean Society* 102: 11-21.

BUKEJS A., BARŠEVSKIS A., RUDĀNS E. (2006): *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae) in the fauna of Latvia. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis* 6: 51-55.

*BURAKOWSKI B., MROCKOWSKI M., STEFAŃSKA J. (1983): *Chrzyszczce – Coleoptera. Scarabaeoidea, Dascilloidea, Byrrhoidea i Parnoidea. Katalog fauny Polski*. PWN, Warszawa, 194pp. in HORÁK J., CHOBOT K., JIRMUS T., AKSENĚNKO J. (2009): Zlatohlávek tmavý – chráněný živočich i potencionální škůdce? *Ochrana přírody* 1: 15-17.

CALVO J.H., CALVETE C., MARTINEZ-ROYO A., ESTRADA R., MIRANDA M.A., BORRAS D., SARTO I MONTEYS V., PAGES N., DELGADO J.A., COLLANTES F., LUCIENTES J. (2009): Variations in mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene indicate northward expanding populations of *Culicoides imicola* in Spain. *Bulletin of Entomological Research* 99: 583-591.

CANESTRELLI D., NASCETTI G. (2008): Phylogeography of the pool frog *Rana* (*Pelophylax*) *lessonae* in the Italian peninsula and Sicily: multiple refugia, glacial expansion and nuclear-mitochondrial discordance. *Journal of Biogeography* 35: 1923-1936.

COOPE G.R. (2004): Several million years of stability among insect species because of, or in spite of, Ice Age climatic instability? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359: 209-214.

CUNEV J., MAJZLAN O. (1998): Ekosozologické vyhodnotenie fauny chrobákov (Coleoptera) pr Veľký vrch v katastri Malé Kršteňany. *Folia faunistica Slovaca* 3: 81-96.

DAHLGREN G. (1972): Zur taxonomie der gattungen *Aethiessa*, *Oxythyrea*, *Tropinota* und *Musurgus* (Col. Scarabaeidae). *Entomologica scandinavica* 3(2): 161-168.

DAPPORTO L. (2009): Speciation in Mediterranean refugia and post-glacial expansion of *Zerynthia polyxena* (Lepidoptera, Papilionidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 48: 229-237.

DAPPORTO L., HABEL J.C., DENISS R.L.H., SCHMITT T. (2011): The biogeography of the western Mediterranean: elucidating contradictory distribution patterns of differentiation in *Maniola jurtina* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 571-577.

*DAVIS S.J.M. (2003): The zoo-archaeology of Khirakitia (Neolithic Cyprus), including a view from the mainland. *Bulletin de correspondance Hellénique* 43: 253-268 in MARRA A.C. (2004): Pleistocene mammals of Mediterranean islands. *Quaternary International* 129: 5-14.

DINCĂ V., DAPPORTO L., VILA R. (2011): A combined genetic-morphometric analysis unravels the complex biogeographical history of *Polyommatus icarus* and *Polyommatus celina* Common Blue butterflies. *Molecular Ecology* 20: 3921-3935.

DUBEY S., ZAITSEV M., COSSON J.-F., ABDUKAIDER A., VOGEL P. (2006): Pliocene and Pleistocene diversification and multiple refugia in a Eurasian shrew (*Crocidura suaveolens* group). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 635-647.

- ESCALERA M.M. (1914): Los Coleópteros de Marruecos. *Trabajos del Museo Nacional de Ciencias Naturales* 11: 1-553.
- FAUQUETTE S., SUC J.-P., BERTINI A., POPESCU S.-M., WARNY S., TAOUFIQ N.B., VILLA M.-J.P., CHIKHI H., FEDDI N., SUBALLY D., CLAUZON G., FERRIER J. (2006): How much did climate force the Messinian salinity crisis? Quantified climatic conditions from pollen records in the Mediterranean region. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 238: 281-301.
- FARELL B.D. (2001): Evolutionary assembly of the milkweed fauna: cytochrome oxidase I and the age of Tetraopes beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 18(3): 467–468.
- FAVRE E., FRANÇOIS L., FLUTEAU F., CHEDDADI R., THÉVENOD L., SUC J.-P. (2007): Messinian vegetation maps of the Mediterranean region using models and interpolated pollen data. *Geobios* 40: 433-443.
- GALTIER N., NABHOLZ B., GLÉMIN S., HURST G.D.D. (2009): Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18: 4541-4550.
- GBIF DATA PORTAL (2012): Biodiversity occurrence data published by: Finnish Museum of Natural History and ArtDatabanken [online]. Available at <http://data.gbif.org/>.
- HABEL J.C., RÖDDER D., STEFANO S., MEYER M., SCHMITT T. (2010): Strong genetic cohesiveness between Italy and North Africa in four butterfly species. *Biological Journal of the Linnean Society* 99: 818-830.
- HABEL J.C., LENS L., RÖDDER D., SCHMITT T. (2011): From Africa to Europe and back: refugia and range shifts cause high genetic differentiation in the Marbled White butterfly *Melanargia galathea*. *BMC Evolutionary Biology* 11: 215.
- HALL T.A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- HEBERT P.D.N., STOECKLE M.Y., ZEMLAK T.S., FRANCIS C.M. (2004): Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology* 2(10): e312.
- HEWITT G.M. (1996): Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- HEWITT G.M. (1999): Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112.
- HORÁK J., CHOBOT K., JIRMUS T., AKSENĚNKO J. (2009): Zlatohlávek tmavý – chráněný živočich i potencionální škůdce? *Ochrana přírody* 1: 15-17.
- JANKOVSKÁ V., POKORNÝ P. (2008): Forest vegetation of the last full-glacial period in the Western Carpathians (Slovakia and Czech Republic). *Preslia* 80: 307-324.
- JANSSENS A. (1949): Contribution a l'étude des coléoptères Lamellicornes, XIII. Table synoptique et essai de classification pratique des coléoptères scarabaeidae. *Bulletin Institut royal des Sciences naturelles de Belgique* 25(15): 1-30.

- JONG M.A. DE, WAHLBERG N., EIJK M. VAN, BRAKEFIELD P.M., ZWAAN B.J. (2011): Mitochondrial DNA Signature for Range-Wide Populations of *Bicyclus anynana* Suggest a Rapid Expansion from Recent Refugia. *PLoS ONE* 6(6): e21358.
- KNOPP T., RAHAGALALA P., MIINALA M., HANSKI I. (2011): Current geographical ranges of Malagasy dung beetles are not delimited by large rivers. *Journal of Biogeography* 38: 1098– 1108.
- KOCHER L. (1958): Catalogue commenté des coléoptères du Maroc. Fascicule VII: Lamellicornes. Travaux de l'Institut Scientifique Chérifien. *Série Zoologie* 16: 1-83.
- KOHLMANN B., MORÓN M.A. (2003): Análisis histórico de la clasificación de los Coleoptera Scarabaeoidea o Lamellicornia. *Acta Zoológica Mexicana* 90: 175-280.
- KRAJČÍK M. (1998): *Cetoniidae of the World. Catalogue - Part I. (Coleoptera: Cetoniidae)*. Typos Studio Most, Most, 132 pp.
- KRAJČÍK M. (1999): *Cetoniidae of the World. Catalogue - Part II. (Coleoptera: Cetoniidae)*. Typos Studio Most, Most, 95 pp.
- KRÁL D. (1989): Seznam československých listorohých brouků (Coleoptera, Scarabaeoidea). *Studie Okresního muzea Praha-Východ* 9: 15-30.
- KRIKKEN J. (1984): A new key to the suprageneric taxa in the beetle family Cetoniidae, with annotated lists of the known genera. *Zoologische Verhandelingen* 210: 1-75.
- KUMAR S., SKJÆVELAND A., ORR R.J.S., ENGER P., RUDEN T., MEVIK B.-H., BURKI F., BOTNEN A., SCHALCHIAN-TABRIZI K. (2009): AIR: A batch-oriented web program package for construction of supermatrices ready for phylogenomic analyses. *BMC Bioinformatics* 10: 357.
- LAMBECK K., YOKOYAMA Y., JOHNSTON P., PURCELL A. (2000): Global ice volumes at the Last Glacial Maximum and early Lateglacial. *Earth and Planetary Science Letters* 181: 513-527.
- LIBRADO P., ROSAZ J. (2009): DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- LIN CH.-P., DANFORTH B. (2004): How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 686-702.
- MARTYNOV V.V. (2010): Corrections and additions for the faunal list of lamellicorn beetles (Coleoptera: Scarabaeoidea) of the Crimea. *Caucasian Entomological Bulletin* 6(1): 95-206.
- MEDVEDEV S.I. (1964): *Fauna SSSR, Žestkokrylye, Plastinčatousye (Scarabaeidae), Podsem. Cetoniinae, Valginae*. Izdatelstvo Nauka, Moskva, Leningrad, 376 pp.
- MICHAUX J.R., MAGNANOU E., PARADIS E., NIEBERDING C., LIBOIS R. (2003): Mitochondrial phylogeography of the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Molecular Ecology* 12: 685-697.

- MICÓ E., GALANTE E. (2003): Biology and new larval descriptions for three cetoniine beetles (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae: Cetoniini: Cetoniina, Leucocelina). *Annals of the Entomological Society of America* 96(2): 95-106.
- MICÓ E., MORÓN M.A., ŠÍPEK P., GALANTE E. (2008): Larval morphology enhances phylogenetic reconstruction in Cetoniidae (Coleoptera: Scarabaeoidea) and allows the interpretation of the evolution of larval feeding habits. *Systematic Entomology* 33: 128-144.
- MIKŠIĆ R. (1977): *Oxythyrea abigail* Reiche - eine für Europa und Jugoslawien neue Cetoniinae-Art. *Acta Entomologica Jugoslavica* 13(1-2): 41-44.
- MIKŠIĆ R. (1978): Eine weiterer Beitrag zur Kenntnis der jugoslawischen *Oxythyrea*-Arten. *Acta Entomologica Jugoslavica* 14(1-2): 69-71.
- MIKŠIĆ R. (1982): *Monographie der Cetoniinae der Paläarktischen und Orientalischen Region (Coleoptera, Lamellicornia). Band 3.* Forstinstitut in Sarajevo, 530 pp.
- MIROL P.M., ROUTTU J., HOIKKALA A., BUTLIN R.K. (2008): Signals of demographic expansion in *Drosophila virilis*. *BMC Evolutionary Biology* 8: 59.
- NEGROBOV S.O. (2009): Seasonal dynamics of scarab beetles (Coleoptera, Lamellicornia) in Voronezh Province. *Entomological Review* 89(1): 113-115.
- NEI M. (1987): *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, 512 pp.
- NIKČEVIĆ J. (2010): Some ecological data of Coleoptera in a beach dune system of Long Ulcinj beach in Montenegro. *Natura Montenegrina* 10(1): 41-48.
- PAJAČ I., BARIĆ B., BOŽIČEVIĆ M., PILJEK D., PINTAR S. (2010): Vrste listorožaca (Coleoptera: Cetoniinae) u gradu Zagrebu. *Entomologica Croatica* 14(3-4): 33-44.
- PAWŁOWSKI J., KUBISZ D., MIECZYŚLAW M. (2002): *Coleoptera chrząszcze. Czerwona lista zwierząt ginących i zagrożonych w Polsce.* Kraków, Polska akademia nauk instytut ochrony przyrody, 25pp.
- PETIT R.J., BREWER S., BORDÁCS S., BURG K., CHEDDADI R., COART E., COTTRELL J., CSAIKL U.M., DAM VAN B., DEANS J.D., ESPINEL S., FINESCHI S., FINKELDEY R., GLAZ I., GOICOECHEA P.G., JENSEN J.S., KÖNIG A.O., LOWE A.J., MADSEN S.F., MÁTYÁS G., MUNRO R.C., POPESCU F., SLADE D., TABBENER H., VRIES DE S.G.M., ZIEGENHAGEN B., BEAULIEU DE J.-L., KREMER A. (2002): Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156: 49-74.
- PETROVITZ R. VON (1955): The 3rd Danish expedition to Central Asia. Zoological results 18. Scarabaeidae aus Afghanistan. *Videnskabelige Meddelelser fra dansk naturhistorisk Forening i Kjobenhaven* 117: 275-287.
- POSADA D. (2008): jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

- RABINEAU M., BERNÉ S., OLIVET J.-L., ASLANIAN D., GUILLOCHEAU F., JOSEPH P. (2006): Paleo sea levels reconsidered from direct observation of paleoshoreline position during Glacial Maxima (for the last 500,000 yr). *Earth and Planetary Science Letters* 252: 119-37.
- REITTER E. (1898): Neue Coleopteren aus Europa, den angrenzenden Landern. *Deutsche Entomologische Zeitschrift* 42(2): 337-360.
- RITTNER O., SABATINELLI G. (2010): The genus *Oxythyrea* Mulsant in Israel (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae, Cetoniini). *Israel Journal of Entomology* 40: 11-19.
- RONQUIST F., TESLENKO M., MARK P. VAN DER, AYRES D., DARLING A., HÖHNA S., LARGET B., LIU L., SUCHARD M.A., HUELSENBECK J.P. (2011): MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* IN PRESS.
- ROUCHY J.M., CARUSO A. (2006): The Messinian salinity crisis in the Mediterranean basin: a reassessment of the data and an integrated scenario. *Sedimentary Geology* 188-189: 35-67.
- ROZNER I., ROZNER G. (2009): Data to the Lamellicornia fauna of the Republic of Macedonia (Coleoptera: Lamellicornia). *Natura Somogyiensis* 15: 57-68.
- SABATINELLI G. (1981): Le *Oxythyrea* Muls. del Mediterraneo: studi morfologici sistematici (Coleoptera, Scarabaeidae). *Fragmenta Entomologica* 16 (1): 45-60.
- SABATINELLI G. (1984): Studi sul genere *Oxythyrea* Muls.: note sulle specie del gruppo cinctella (Schaum), (Scarabaeidae Cetoniinae). *Bollettino Società Entomologica Italiana* 116 (4-7): 102-104.
- SABATINELLI G. (1990): Gli scarabeidi floricoli delle Isole Maltesi (Coleoptera Scarabaeidae). *Bollettino Società Entomologica Italiana* 122(1): 31-36.
- SABATINELLI G. (2008): *The Scarabs of the Levant: Syria, Lebanon, Jordan, Palestine, Israel and Sinai* [online]. Available at: <http://www.glaphyridae.com/Cetoniinae/Oxythyrea.html>.
- SAKAI K., NAGAI S. (1998): *The Cetoniine Beetles of the World*. Shizawa Printing Co. Ltd.:Tokyo. Mushi-Sha's Iconographic Series of Insects, vol. 3, 421 pp., 144 plates.
- SANMARTÍN I. (2003): Dispersal vs. Vicariance in the Mediterranean: historical biogeography of the Palearctic Pachydeminae (Coleoptera, Scarabaeoidea). *Journal of Biogeography* 30: 1883-1897.
- SCHEIN H. (1955): Die Cetonidae (Coleoptera) der Forschungsreise J. Klapperichs nach Afghanistan 1952 und 1953. *Entomologische Blätter* 51: 14-20.
- SCHEIN H. (1960): Coleoptera (Scarabaeidae): Cetoniinae and Trichiinae. *South African Animal Life* 7: 83-112.
- SEDDON J.M., SANTUCCI F., REEVE N.J., HEWITT G.M. (2001): DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology* 10: 2187-2198.

- SEDDON J.M., SANTUCCI F., REEVE N., HEWITT G.M. (2002): Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor*. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 463-467.
- SILFVERBERG H. (2004): Enumeratio nova Coleopterorum Fennoscandiae, Daniae et Baltiae. *Sahlbergia* 9: 1-111.
- SILFVERBERG H. (2010): Enumeratio renovata Coleopterorum Fennoscandiae, Daniae et Baltiae. *Sahlbergia* 16(2): 1-144.
- SILVESTRO D., MICHALAK I. (2010): raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. Available at: <http://sourceforge.net/projects/raxmlgui/>.
- SIMON C., FRATI F., BECKENBACH A., CRESPI B., LIU H., FLOOK P. (1994): Evolution, weighting, phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved Polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651-701.
- SIMON C., BUCKLEY T.R., FRATI F., STEWART J.B., BECKENBACH A.T. (2006): Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics* 37: 545–79.
- SMETANA A. (2006): Subfamily Cetoniinae in LÖBL I., SMETANA A. (2006): *Catalogue of Palaearctic Coleoptera. Volume 3: Scarabaeoidea, Scirtoidea, Dascilloidea, Buprestoidea, Byrrhoidea*. Apollo Books, Stenstrup, Denmark, 690 pp.
- SMITH A.B.T., HAWKS D.C., HERATY J.M. (2006): An overview of the classification and evolution of the major scarab beetle clades (Coleoptera: Scarabaeoidea) based on preliminary molecular analyses. *Coleopterists Society Monograph* 5: 35–46.
- SOMMER R.S., BENECKE N. (2005): The recolonization of Europe by brown bears *Ursus arctos* Linnaeus, 1758 after the Last Glacial Maximum. *Mammal Review* 35: 156-164.
- SOMMER R.S., ZACHOS F.E., STREET M., JÖRIS O., SKOG A., BENECKE N. (2008): Late Quaternary distribution dynamics and phylogeography of the red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. *Quaternary Science Reviews* 27: 714-733.
- STAMATAKIS A. (2006): RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688 – 2690.
- STÖCK M., MORITZ C., HICKERSON M., FRYNTA D., DUJSEBAYEVA T., EREMCHENKO V., MACEY J.R., PAPENFUSS T.J., WAKE D.B. (2006): Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 663-689.
- STÖCK M., SICILIA A., BELFIORE N.M., BUCKLEY D., BRUTTO S.L., VALVO M.L., ARCULEO M. (2008): Post-Messinian evolutionary relationships across the Sicilian channel: Mitochondrial and nuclear markers link a new green toad from Sicily to African relatives. *BMC Evolutionary Biology* 8: 56.

STÖVER B.C., MÜLLER K.F. (2010): TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11: 7.

SWOFFORD D.L. (2002): PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

ŠÍPEK P., GILL B.D., GREBENNIKOV V.V. (2009): Afromontane *Coelocorynus* (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae): Larval descriptions, biological notes and phylogenetic placement. *European Journal of Entomology* 106: 95-106.

ŠÍPEK P., KRÁL D. (2012): Immature stages of the rose chafers (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae): a historical overview. *Zootaxa* 3323: 1-26.

TABERLET P., FUMAGALLI L., WUST-SAUCY A.-G., COSSON J.-F. (1998): Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.

TAJIMA F. (1989): Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., KUMAR S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

TELNOV D. (2004): *Compendium of Latvian Coleoptera: Volume 1. Check-list of Latvian Beetles (Insecta: Coleoptera): Second Edition*. Entomological society of Latvia, Riga, 115pp.

THOMSON J.D., HIGGINS D.G., GIBSON T.J. (1994): Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

TOMÁS-BIOSCA M.L., GALANTE E. (1978): Contribución al conocimiento de los Rutelidae y Cetoniidae (Col. Scarabaeoidea) de las Sierras de Béjar y La Alberca (Prov. De Salamanca). *Boletín de la Asociación Española de Entomología* 2: 129-141.

UIMANIEMI L., ORELL M., KVIST L., JOKIMÄKI J., LUMME J. (2003): Genetic variation of the Siberian tit *Parus cinctus* populations at regional level: a mitochondrial sequence analysis. *Ecography* 26: 98-106.

VILLESEN P. (2007): FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes* 7(6): 965-968.

VLÁČIL V. (1995): Příspěvek k faunistice zlatohlávka *Oxythyrea funesta* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Klapalekiana* 31: 63-64.

*VLASOV D.V. (2003): Poteplenie i migratsiya v prirode. *Ekologiya i zhizn'* 6: 60 in BUKEJS A., BARŠEVSKIS A., RUDĀNS E. (2006): *Oxythyrea funesta* (Poda, 1761) (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae) in the fauna of Latvia. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis* 6: 51-55.

VOGLER A.P., DESALLE R. (1994): Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis*. *Molecular Biology and Evolution* 11(3): 393-405.

VONDRÁČEK D. (2010): *Biogeografie a taxonomie evropských zlatohlávkovitých brouků (Coleoptera: Scarabaeoidea: Cetoniinae)*. Bc. Thesis, Charles University in Prague, Prague, 39 pp.

ZHANG D.-X., HEWITT G.M. (2003): Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563-584.

8. Přílohy

Příloha 1: Zde je předložen kompletní seznam použitého materiálu. V jednotlivých sloupcích jsou zobrazena databázová označení (použity i ve výsledcích), dále celý název taxonu. Poté je zde zmíněn stát odkud vzorek pochází a jeho přesná lokalita, většinou i s GPS souřadnicemi a datem sběru. V posledních třech sloupcích je číslem označeno, kolik zvířat z dané lokality se podařilo osekvenovat. Barevné označení jednotlivých druhů odpovídá barvám v mapách, haplotypových sítích a fylogenetických stromech.

Přehled použitých vzorků k molekulárním analýzám								
Označení	Taxon	Stát	Lokalita	GPS	Datum	COI	CytB	ITS1
<i>Eudicella</i>	<i>Eudicella schultzeorum pseudowoermanni</i>	Kamerun				1	1	0
<i>Polybaphes</i>	<i>Polybaphes sp.</i>	Tanzanie	Rutamba, 30km západně od Lindi		24.1.2011	1	1	0
<i>Cetonia</i>	<i>Cetonia aurata aurata</i>	Slovensko	Banskobystrický kraj, Polianky		6.7.2011	1	1	0
<i>Potosia</i>	<i>Potosia cuprea metallica</i>	Česká rep.	Jihočeský kraj, Vlkov nad Lužnicí		1.9.2011	1	1	1
<i>Tropinota1</i>	<i>Tropinota squalida squalida</i>	Francie	Languedoc-Rousillon, poblíž Rousses	N43.8854° E3,5673°	5.6.2011	1	1	0
<i>Tropinota2</i>	<i>Tropinota squalida canariensis</i>	Španělsko	Tenerife, Adeje, Barranco del Infierno, cca 400 m.n.m.		12.2.2011	1	1	0
<i>Leucocelis</i>	<i>Leucocelis sp.</i>	Tanzanie	Rutamba, 30km západně od Lindi		24.1.2011	1	1	0
<i>Homothyrea</i>	<i>Homothyrea helenae</i>	Jemen	Sana'a governorát, 5 km JZ od Al Badia, 1475 m.n.m.	N15°04.7' E43°46.7'	5.+19.11.2010	0	1	0
OA139ISR	<i>Oxythyrea abigail</i>	Israel	Centrální pobřežní pláň, písečné duny v Palmachin		24.3.2010	1	1	0
OC046GRC	<i>Oxythyrea cinctella</i>	Řecko	Peloponés, Kalamata, Kardamili	N37°01' E22°06'	1.-3.6.2003	0	1	0
OC104MKD	<i>Oxythyrea cinctella</i>	Makedonie	Demir Kapija (poblíž řeky Strumica)	N41°24'20" E22°16'00"	17.4.2011	2	2	2
OC120TUR	<i>Oxythyrea cinctella</i>	Turecko	Izmir, Bergama (Pergamon acropolis)	N39°08'02" E27°10'58"	27.6.2011	1	1	1
OC123TUR	<i>Oxythyrea cinctella</i>	Turecko	Adana, Pozanti	N37°24.022" E34°51.151"	29.6.2011	1	1	1
ON043CYP	<i>Oxythyrea noemi</i>	Kypr	Poloostrov Akrotiri		14.3.2010	2	1	1
ON138ISR	<i>Oxythyrea noemi</i>	Israel	Rishon LeZion		19.3.2010	2	2	0
OP008MAR	<i>Oxythyrea pantherina</i>	Maroko	12 km jižně od Agdz	30°41'N 6°25'W	2.4.2008	4	4	2
OT036TUN	<i>Oxythyrea tripolitana</i>	Tunisko	Jerba, Rass Rmel, písečné duny	N33°53' E10°56'	7.6.2006	1	2	2

OF001HRV	<i>Oxythyrea funesta</i>	Chorvatsko	Ostrov Brač		27.6.2009	4	4	4
OF002GRC	<i>Oxythyrea funesta</i>	Řecko	Thesálie, región Larissa, silnice mezi Dimitra a Neochori	N39°39.710' E22°39.393'	24.4.2009	4	4	0
OF003GRC	<i>Oxythyrea funesta</i>	Řecko	Východní Makedonie a Thrákie, región Rodopi, Komotini	N41°06.094' E25°24.570'	19.4.2009	4	4	4
OF005PRT	<i>Oxythyrea funesta</i>	Portugalsko	Vila Real		10.5.2009	4	4	4
OF006CZE	<i>Oxythyrea funesta</i>	Česká rep.	Jihomoravský kraj, hrad Děvičky	N48°52'33.65" E16°39'43.21"	26.6.2009	2	2	0
OF007CZE	<i>Oxythyrea funesta</i>	Česká rep.	Pardubický kraj, Lány na důlku	N50°04'07.7" E15°67'39.64"	28.6.2009	2	2	0
OF009ITA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Itálie	Italský poloostrov, Kampánie, Perito	N40°17'22.8" E15°07'19"	3.6.2009	4	4	0
OF010ITA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Itálie	Italský poloostrov, Basilikáta/Kalábrie, Práia a Mare	N39°56'10.14" E15°44'55"	4.6.2009	1	0	0
OF014ITA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Itálie	Sicílie, Madonie, Pianno Torre/Tore Montaspro	N37°54'39.16" E13°59'28.3"	5-9.6.2009	4	4	1
OF015ITA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Itálie	Sicílie, Muto/Casa Forestale	N37°55'50" E14°38'34"	7.6.2009	4	4	0
OF016ITA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Itálie	Sicílie, Brúcoli	N37°16'56" E15°12'80.7"	8.6.2010	4	4	4
OF018ITA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Itálie	Italský poloostrov, Kalábrie, Vazzano/San't Angelo	N38°37'48.31" E16°12'2.82"	11.6.2009	4	4	3
OF019ITA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Itálie	Italský poloostrov, Umbria, Collonetta	N42°44'59.25" E12°10'55.06"	11.6.2009	4	4	4
OF020SVK	<i>Oxythyrea funesta</i>	Slovensko	Banskobystrický kraj, Divín	N48°26'52.83" E19°31'58.86"	14.8.2009	0	0	1
OF021PRT	<i>Oxythyrea funesta</i>	Portugalsko	Beja, Vale Bejinha	N37°41'11.33" W08°41'01.43"	12.5.2009	2	2	1
OF044BGR	<i>Oxythyrea funesta</i>	Bulharsko	Burgaská oblast, Primorsko	N42°16'29.66" E27°44'32.54"	22.7.2010	4	4	4
OF045SVK	<i>Oxythyrea funesta</i>	Slovensko	Banskobystrický kraj, Detva	N48°32'50.52" E19°25'10.98"	13.7.2010	4	4	4
OF047CZE	<i>Oxythyrea funesta</i>	Česká rep.	Praha, Kunratický les	N50°01' E14°29'	25.5.2010	4	4	4
OF062HUN	<i>Oxythyrea funesta</i>	Maďarsko	Vesprémská župa, poblíž Tapolca	N46°53'002" E17°32'483"	26.6.2010	4	4	4
OF063PRT	<i>Oxythyrea funesta</i>	Portugalsko	Setubal, Albergaria (cca 20 km jižně od Alcacér do Sal)		11.5.2009	2	2	0
OF064AUT	<i>Oxythyrea funesta</i>	Rakousko	Horní Rakousy, Puchberg		3.7.2008	1	1	0
OF066GRC	<i>Oxythyrea funesta</i>	Řecko	Peloponés, Laconia, Oitylo, poblíž vodního rezervoáru	N36°42'25.53" E22°22'32.33"	26.2.2011	1	1	1

OF069ESP	<i>Oxythyrea funesta</i>	Španělsko	Murcia, 7 km jihojihovýchodně od Puerto Lumbreras	N37°29' W1°51'		3	3	0
OF070ESP	<i>Oxythyrea funesta</i>	Španělsko	Andalucía, 8 km východně od Almeria	N36°50' W2°20'	7.4.2010	4	4	4
OF071POL	<i>Oxythyrea funesta</i>	Polsko	Lublińské vojvodství, NP Roztocze, poblíž Sochy	N50°35'14.12" E22°57'30.01"	18.6.2011	1	1	1
OF072UKR	<i>Oxythyrea funesta</i>	Ukrajina	Chmelnycká oblast, silnice M12, poblíž odbočky do Nemychyntsi	N49°23'33.55" E26°44'20.91"	19.6.2011	2	2	2
OF073UKR	<i>Oxythyrea funesta</i>	Ukrajina	Krym, Mizhvodne	N45°33'57.08" E32°50'39.36"	20.6.2011	4	4	0
OF074UKR	<i>Oxythyrea funesta</i>	Ukrajina	Krym, Vlaštovčí hnízdo	N44°25'51.40" E34°07'41.61"	23.6.2011	4	4	4
OF076UKR	<i>Oxythyrea funesta</i>	Ukrajina	Krym, les poblíž Rozovyi	N44°41'39.92" E34°18'21.19"	24.6.2011	1	1	0
OF077UKR	<i>Oxythyrea funesta</i>	Ukrajina	Krym, silnice k Mramorové jeskyni, poblíž Mramorne	N44°49'11.35" E34°16'21.00"	24.6.2011	3	3	0
OF078UKR	<i>Oxythyrea funesta</i>	Ukrajina	Krym, mezi Shchebetovka a Koktebel	N44°57'22.87" E35°12'31.79"	25.6.2011	4	4	0
OF082FRA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Francie	Languedoc-Rousillon, poblíž Rousses	N44.2096° E3.5867°	5.6.2011	4	4	4
OF083FRA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Francie	Centre, poblíž Courcelles-de-Touraine	N47.4671° E0.0164°	31.5.2011	4	4	0
OF085FRA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Francie	Champagne-Ardenne, poblíž Auberive	N47.7965° E5.0332°	8.6.2011	3	3	0
OF087FRA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Francie	Languedoc-Rousillon, poblíž Avéze	N43.9774° E3.5890°	3.6.2011	4	4	0
OF088FRA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Francie	Auvergne, poblíž Bourbon l'Archambault	N46.6162° E3.0480°	7.6.2011	4	4	0
OF090FRA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Francie	Limousin, Champagnac-la-Riviere	N45.7127° E0.9147°	1.6.2011	4	4	4
OF092FRA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Francie	Limousin, Châlus	N45.6711° E0.9815°	1.6.2011	4	4	0
OF093FRA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Francie	Lorraine , Bleurville	N48.0697° E5.9603°	9.6.2011	1	1	0
OF097ITA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Itálie	Sardinie , Altura, Palau		VI. 2011	4	4	0
OF101ITA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Itálie	Sardinie, Grotte de su Mannau		VI. 2011	4	4	3
OF103GRC	<i>Oxythyrea funesta</i>	Řecko	Západní Makedonie, región Florina, Florina	N40°49'34" E21°46'04"	24.4.2011	4	4	4
OF107ITA	<i>Oxythyrea funesta</i>	Itálie	Sardinie, Grotte di Nettuno		VI. 2011	4	4	0
OF109GRC	<i>Oxythyrea funesta</i>	Řecko	Peloponés, Achaia, Neo Salmenikon	N38°16.92" E21°57.84"	8.-11.3.2011	1	1	0

OF115CZE	<i>Oxythyrea funesta</i>	Česká rep.	Jihočeský kraj, Vlkov nad Lužnicí		1.9.2011	3	3	3
OF134TUN	<i>Oxythyrea funesta</i>	Tunisko	Kef, El Kef		26.4.2004	0	1	1
OF135TUR	<i>Oxythyrea funesta</i>	Turecko	Bolu, poblíž Kaynasli, 316 m.n.m.	N40°47'14.6" E31°19'06.6"	16.5.2005	1	1	1
OF136MAR	<i>Oxythyrea funesta</i>	Maroko	Meknès-Tafilalet, Ifrane		IV. 1992	0	1	1