

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie



**Fylogeografie a vnitrodruhová variabilita zlatohlávka
Potosia cuprea (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae)**

**Phylogeography and intraspecific variability of the
flower beetle *Potosia Cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae:
Cetoniinae)**

Diplomová práce

Bc. Aneta Fuchsová

Vedoucí práce: Mgr. Petr Šípek, PhD.

Praha, 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Praze, 25. 8. 2012

Aneta Fuchsová

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala svému školiteli Petru Šípkovi za odborné vedení mé diplomové práce a za to, že mi ochotně a trpělivě pomáhal při řešení nelehkých úkolů s vyhodnocováním výsledků a sepisováním samotného textu diplomové práce. Bez něho by samotná práce nemohla vzniknout.

Dále bych také chtěla poděkovat Petru Janštovi, který mě zaškolil v laboratorních metodách a pomohl mi osvojit si práci s analytickými programy pro vyhodnocování molekulárních dat.

Také děkuji všem, se kterými jsem podnikla expedice za účelem sběru materiálu, jmenovitě Davidu Královi, Petru Šípkovi, Hance Šípkové, Petru Janštovi, Daně Drožové, Dominiku Vondráčkovi. Stejně tak děkuji všem, kteří mi poskytli materiál ze svých sbírek, který byl zahrnut do analýz.

Velký dík patří Daně Drožové a Dominiku Vondráčkovi za cenné rady a psychickou podporu v průběhu sepisování diplomové práce.

A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, Vojtěchu Fuchsovi, Barušce Fuchsové a rodičům, bez jejichž pomoci bych práci nikdy nedotáhla do této finální podoby.

Obsah:

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
1. ÚVOD	8
1.1 Zlatohlávek hladký <i>Potosia cuprea</i> (Fabricius, 1975).....	10
1.2 Systematické postavení taxonu <i>Potosia cuprea</i>	13
1.3 Druhový komplex <i>Potosia cuprea</i>	13
1.3.1 <i>Potosia cuprea bourgini</i> Ruter, 1967.....	16
1.3.2 <i>Potosia cuprea brancoi</i> Baraud, 1992.....	17
1.3.3 <i>Potosia cuprea cuprea</i> (Fabricius, 1775).....	18
1.3.4 <i>Potosia cuprina</i> (Motschulsky, 1849).....	19
1.3.5 <i>Potosia cuprea daurica</i> (Motschulsky, 1860).....	19
1.3.6 <i>Potosia hieroglyphica</i> (Ménétries, 1832).....	20
1.3.7 <i>Potosia cuprea ignicollis</i> (Gory-Percheron, 1833).....	21
1.3.8 <i>Potosia cuprea ikonomovi</i> Mikšić, 1958.....	21
1.3.9 <i>Potosia cuprea incerta</i> (Costa, 1852).....	22
1.3.10 <i>Potosia cuprea metallica</i> (Herbst, 1782).....	23
1.3.11 <i>Potosia nitididoris</i> (Fairmaire, 1889).....	25
1.3.12 <i>Potosia cuprea obscura</i> (Andersch, 1797).....	25
1.3.13 <i>Potosia olivacea</i> (Mulsant, 1842).....	26
1.3.14 <i>Potosia splendidula</i> (Faldermann, 1835).....	27
1.3.15 <i>Potosia angustata</i> (Germar, 1817).....	28
1.3.16 <i>Potosia fieberi</i> (Kraatz, 1880).....	28
1.3.17 <i>Potosia marginicollis</i> (Ballion, 1870).....	30
2. CÍLE PRÁCE	31
3. MATERIÁL A METODIKA	32
3.1 MOLEKULÁRNÍ ANALÝZA.....	32
3.1.1 Materiál.....	32
3.1.2 Izolace DNA.....	32
3.1.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	33
3.1.4 Kontrola správného průběhu.....	35
3.1.5 Sekvenování.....	36
3.1.6 Alignment.....	36
3.2 FYLOGENETICKÉ ANALÝZY.....	37
3.2.1 Bayesovská analýza.....	37
3.2.2 Maximum parsimony.....	37
3.2.3 Maximum likelihood.....	38
3.2.4 Haplotypové sítě.....	38
3.2.4 Nekorigované p distance.....	38
4. VÝSLEDKY	39
4.1 Profil vstupních dat.....	39
4.2 Dataset genu COI.....	40
4.2.1 Haplotypové sítě.....	40
4.2.2 Fylogenetické stromy a nekorigované p distance.....	44
4.3 Dataset genu CytB.....	49
4.3.1 Haplotypové sítě.....	49
4.3.2 Fylogenetické stromy.....	49

4.4 Dataset konkaténátu genu COI a CytB	53
4.4.1 Haplotypové sítě.....	53
4.4.2 Fylogenetické stromy	56
5. DISKUZE.....	60
5.1 Fylogenetické vztahy v rámci rodu <i>Potosia</i>	60
5.1.1 „Evropský klád“ <i>P. cuprea</i> : <i>P. cuprea</i> „sensu stricto“?.....	62
5.1.2 Západní větev: <i>Potosia cuprea cuprea</i> , <i>P. c. brancoi</i> , <i>P. c. bourgini</i>	62
5.1.3 <i>Potosia cuprea metallica</i>	62
5.1.4 <i>Potosia cuprea obscura</i>	63
5.1.5 <i>Potosia incerta</i>	63
5.1.6 <i>Potosia cuprea daurica</i>	64
5.1.7 <i>Potosia cuprina</i> , <i>P. hieroglyphica</i> , <i>P. cuprea ignicollis</i>	64
5.1.8 <i>Potosia marginicollis</i>	65
5.1.9 <i>Potosia fieberi</i> , <i>Potosia angustata</i>	65
6. ZÁVĚRY.....	66
7. LITERATURA.....	68
8. PŘÍLOHA.....	74

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá vnitrodruhovou variabilitou zlatohlávků druhového komplexu *Potosia cuprea* (Fabricius, 1795), který představuje komplex taxonů na druhové a poddruhové úrovni. Zlatohlávci tohoto druhového komplexu patří mezi nejvariabilnější palearktické zlatohlávky vůbec. Taxony spadající do tohoto komplexu vytváří řadu poddruhů, ras a chromatických variet, které byly, ale i stále jsou vnímány různými autory odlišným způsobem.

Taxony zahrnuté do analýz pocházejí především ze západopalearktické oblasti, přičemž hlavní důraz byl kladen na evropské druhy a poddruhy.

Cílem práce je s použitím molekulárně genetických metod ověřit opodstatnění jejich druhového či poddruhového statutu.

Celkem byly získány sekvence dvou mitochondriálních genů (cytochrom B a cytochromoxidáza I) u 14 taxonů druhového komplexu *Potosia cuprea* a tří příbuzných druhů *P. angustata* (Germar, 1817), *P. fieberi* (Kraatz, 1931) a *P. marginicollis* (Ballion, 1870).

Molekulární analýzy založené na datasetu COI a konkatenátu CytB a COI odhalily existenci „evropského“ kládu *P. cuprea*, který zahrnuje poddruhy *Potosia cuprea bourgini* (Ruter, 1967), *P. c. brancoi* (Baraud, 1992), *P. c. cuprea* (Fabricius, 1775), *P. c. metallica* (Herbst, 1790) a *P. c. obscura* (Mikšić, 1954), do kterého dále zapadají dva sibiřští zástupci ssp. *metallica* a *daurica*. Výjimku tvoří druh *P. incerta*, který podle našich výsledků do evropského kládu nezapadá a tvoří dobře diferenciovanou větev s divergencí 7,5%. Výsledky podpořily klasifikaci *P. incerta* jako samostatného druhu.

Asijské druhy *P. cuprina* (Motschulsky, 1849), *P. c. ignicollis* (Gory-Percheron, 1833) a *P. hieroglyphica* (Ménétries, 1832) se na základě našeho datasetu jeví jako polyfyletické taxony a pro detailnější studie fylogenetických vztahů je potřeba doplnit dataset o větší počet vzorků z dalších oblastí výskytu.

Klíčová slova: Fylogeografie, vnitrodruhová variabilita, zlatohlávkovití, západní palearkt, druhový komplex *Potosia Cuprea*, mtDNA.

Abstract

The presented thesis deals with the intraspecific variability of flower beetles species complex *Potosia cuprea* (Fabricius, 1795), which is a complex of taxa at the species and subspecies level. Flower beetles from species complex *Potosia cuprea* are among the most variable Palaearctic Cetoniinae at all. Taxa included in the complex produces chromatic range varieties which were, and still are, perceived differently by different authors.

Taxa included in the analyses come primarily from western Palaearctic region, with the main emphasis on European species and subspecies.

The aim of this work is the use of molecular genetics methods to verify the justification of their species or subspecies level.

At all, there were obtained sequences for two mitochondrial genes (cytochrome b and cytochrome oxidase I) from 14 taxa species complex *Potosia cuprea* and three related species *P. angustata* (Germar, 1817), *P. fieberi* (Kraatz, 1931) and *P. marginicollis* (Ballion, 1870).

Molecular analyzes based on COI dataset and concatenate of CytB and COI revealed the existence of a "European" clade *P. cuprea*, which includes subspecies: *Potosia cuprea bourgini* (Ruter, 1967), *P. c. brancoi* (Barraud, 1992), *P. c. cuprea* (Fabricius, 1775), *P. c. metallica* (Herbst, 1790) a *P. c. obscura* (Mikšić, 1954), to which also fit two Siberian representatives of ssp. *metallica* and *daurica* and one specimen of *P. cuprina* from Bulgaria. Exception is the specie *P. incerta*, which doesn't fit in the „European“ clade according to our results and forms a well-differentiated branch with divergence 7.5%. The results support the classification of *P. incerta* as separate specie.

Asian species *P. cuprina*, *P. c. ignicollis* and *P. hieroglyphica* appeared to be polyphyletic taxa on the basis of our dataset; however a detailed judgement about the species is impossible without a further enrichment of the dataset.

Key words: Phylogeography, intraspecific relationship, *Potosia cuprea* species komplex, mtDNA.

1. ÚVOD

Zlatohlávek hladký, *Potosia cuprea* (Fabricius, 1795) patří mezi typické zástupce listorohých brouků (nadčeleď Scarabaeoidea). Listorozi jsou vysoce diverzifikovanou, kosmopolitně rozšířenou skupinou brouků, která je se svými cca 35.000 popsány druhy považována za jednu z nejpočetnějších skupin brouků vůbec (Grebennikov et Scholtz 2004). Taxonomické zařazení zlatohlávka hladkého je znázorněno na schématu níže.

» říše *Animalia* - **živočichové**

» kmen *Arthropoda* - **členovci**

» třída *Insecta* - **hmyz**

» řád *Coleoptera* - **brouci**

» podřád *Polyphaga* – **všežraví**

» nadčeleď *Scarabaeoidea* - **listorozi**

» čeleď *Scarabaeidae* - **vrubounovití**

» podčeleď *Cetoniinae* – **zlatohlávkovití**

» tribus Cetoniini

» (pod)rod *Potosia* - **zlatohlávek**

Monofylie nadčeledi Scarabaeoidea je nesporná a opodstatněná. Skupina je definována řadou morfologických znaků (zvětšená předohruď, otrněné holeně prvního páru a velké kyčle, unikátní stavba tykadel se 3 - 7 článkovanou vějířkovitou či lamelární paličkou (Scholtz et Grebennikov 2005). Klasifikace nadčeledi je poměrně nejednotná, za posledních dvacet let došlo v rámci vnitřního členění Scarabaeoidea ke značným změnám. Tyto změny jsou výsledkem intenzivnějších studií jednotlivých čeledí za použití morfologických znaků v kombinaci se stále se rozvíjejícími molekulárními metodami. Doposud však vnitřní členění a hierarchický stupeň jednotlivých čeledí a podčeledí není ustálen a zůstává stále nevyřešen (Scholtz et Grebennikov 2005).

Ve své práci budu vycházet z klasifikace dle Scholtze a Grebennikova (2005). Podle těchto autorů v současnosti zahrnuje nadčeleď Scarabaeoidea 14 čeledí klasifikovaných do 31 podčeledí viz Tabulka č. 1.

01. čeleď LUCANIDAE Latreille, 1804	10. čeleď OCHODAEIDAE Mulsant & Rey, 1871
Aesalinae MacLeay, 1819	Ochodaeinae Mulsant & Rey, 1871
Nicaginae LeConte, 1861	Chaetocathinae Scholtz in Scholtz et al. 1988
Syndesinae MacLeay, 1819	11. čeleď CERATOCANTHIDAE Martínez, 1968
Lampriminae MacLeay, 1819	12. čeleď HYBOSORIDAE Erichson, 1847
Penichrolucaninae Arrow, 1950	13. čeleď GLAPHYRIDAE MacLeay, 1819
Lucaninae Latreille, 1804	Glaphyrinae MacLeay, 1819
02. čeleď PASSALIADAE Leach, 1815	Lichninae Chapin, 1938
Aulacocyclinae Kaup 1815	14. čeleď SCARABAEIDAE Latreille, 1802
Passalinae Leach, 1815	Aphodiinae Leach, 1815
03. čeleď TROGIDAE MacLeay, 1819	Scarabaeinae Latreille, 1802
04. čeleď GLARESIDAE Semenov-Tian-Shanskii & Medvedev, 1931	Pachypodinae Erichson, 1840
05. čeleď PLEOCOMIDAE LeConte, 1861	Orphninae Erichson, 1847
06. čeleď BOLOBOCERATIDAE Mulsant, 1842	Allidiostomatinae Arrow, 1940
Bolboceratinae Mulsant, 1842	Dynamopodinae Arrow, 1911
Athyreinae Howden & Martínez, 1963	Aclopininae Milne-Edwards, 1850
07. čeleď DIPHYLLOSTOMATIDAE Holloway, 1972	Euchirinae Hope, 1840
08. čeleď GEOTRUPIDAE Latreille, 1802	Phaenomeridinae Erichson, 1847
Geotrupinae Latreille, 1802	Melolonthinae MacLeay/Leach (in Samouelle 1819)
Lethrinae Mulsant & Rey, 1871	Rutelinae MacLeay, 1819
Taurocerastinae Germain, 1891	Dynastinae MacLeay, 1819
09. čeleď BELOHINIDAE Paulian, 1959	Cetoniinae Leach, 1815
	Valginae Mulsant, 1842

Tabulka č. 1: Klasifikace listorohých brouků (nadčeleď Scarabaeoidea) podle Scholtze a Grebennikova 2005.

Jak již bylo řečeno, jsou zlatohlávci (Cetoniinae) řazeni do čeledi Scarabaeidae (Latreille, 1802), s výjimkou Nového Zélandu a části Oceánie se zlatohlávci vyskytují téměř všude v teplejších částech světa (Krikken 1984). Vnitřní klasifikace a fylogeneze skupiny není doposud vyřešena (viz shrnutí v Šípek & Král 2012), proto budu ve své práci používat klasické členění podle Krikken (1984) viz Tabulka č. 2.

Cetoniinae		počet subtribů	počet rodů	počet endemických(neendemických) rodů							Celkový počet druhů
				Austr	Or	Pal	Afr	Mad	Nearct	Neotr	
Tribus	Cremastocheillini	16	31	0	4(7)	0(4)	30(4)	0	3(1)	5(1)	365
	Xiphoscelidini	-	16	1(0)	0	0	13(0)	2(0)	0	0	45
	Stenotarsini	10	49	0	0	0	0	49(0)	0	0	320
	Schizorhinini	2	42	40(0)	2(0)	0	0	0	0	0	370
	Goliathini	4	81	0	17(3)	6(4)	50(1)	1(0)	0	2(0)	390
	Cetoniini	2	107	0(2)	21(3)	6(8)	56(6)	0(3)	3(1)	1(1)	1045
	Gymnetini	2	29	0(1)	0(1)	0	3(1)	0	1(2)	22(2)	200
	Diplognathini	-	21	0	2(0)	0	19(0)	0	0	0	100
	Phaedimini	-	5	0	5(0)	0	0	0	0	0	30
	Taenioderini	2	29	0(1)	25(3)	0(2)	0	0	0	0	210

Tabulka č. 2: Přehled a počet taxonů v rámci podčeledi Cetoniinae (Krikken, 1984).

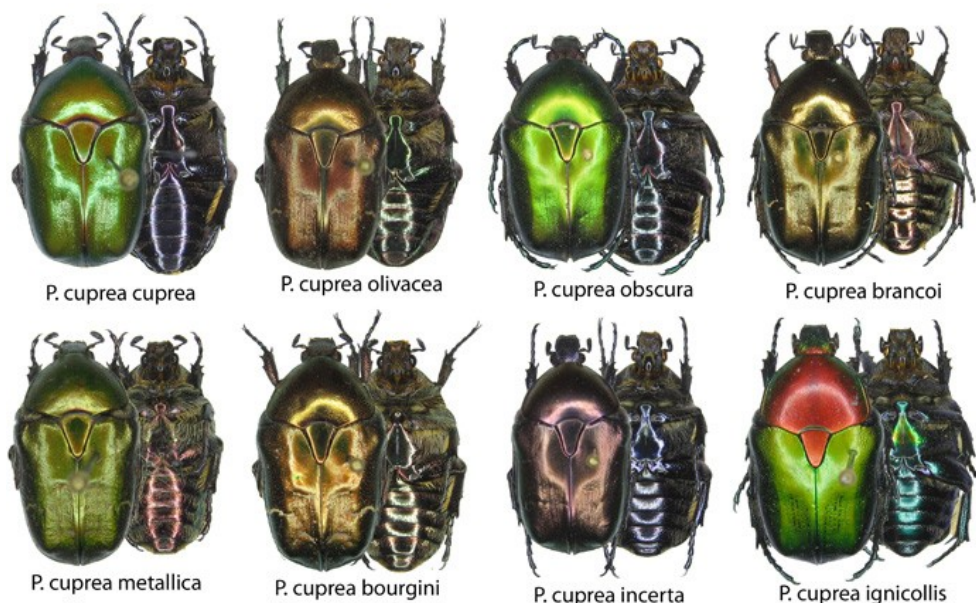
Ve své diplomové práci se zabývám vnitrodruhovou variabilitou zlatohlávků druhového komplexu zlatohlávka hladkého *Potosia cuprea* (Fabricius, 1795). Tito zlatohlávci patří mezi velice variabilní a zároveň sběratelsky atraktivní druhy. Právě entusiasmus řady sběratelů a amatérských entomologů paradoxně velmi zkomplikoval studium tohoto taxonu. Zlatohlávek hladký podobně jako řada ostatních příslušníků podčeledi vytváří řadu barevných forem a aberací, které byly a bohužel stále jsou často popisovány jako samostatné formy, druhy i poddruhy, většinou bez hlubší znalosti taxonomického kontextu skupiny. Moderní studie založené na komplexním morfologickém nebo molekulárním přístupu však chybí. Stále tedy zůstává nevyjasněna řada otázek, na které by nám tyto komplexní metody mohly pomoci odpovědět.

1.1. Zlatohlávek hladký, *Potosia cuprea* (Fabricius, 1795)

P. cuprea je vázán převážně na ekosystém dubových lesů, ale můžeme se s ním setkat i v zahradách či parcích na květech rozkvetlých stromů, keřů i bylin (např. jabloň (*Malvus*), hloh (*Crategus*), svída (*Cornus*), bez černý (*Sambucus nigra*), pcháč (*Cirsium*) atd.) od května do července (případně srpna až října) v závislosti na počasí. Imaga těchto brouků jsou přitahována mizou vytékající z kůry stromů, ale jsou také často nalézány na zralých plodech (hrušky, broskve, maliny, fíky a jiné ovoce), kde mohou působit i jako škůdci (Ražov et al. 2009). Na jihu Evropy můžeme tyto zlatohlávky vidět i na olivovnicích (Sabatinelli 2008).

Velikostí patří zlatohlávek hladký mezi středně velké zlatohlávky dosahující rozměrů 14-30 mm.

Zlatohlávek hladký je velice variabilní druh, nominotypická forma je jasně zeleně zbarvena bez přítomnosti bílých skvrnek na krovkách. Jednotlivé formy druhového komplexu se mohou značně odlišovat ve zbarvení a rozmístěním bílých skvrn. Barevné odstíny svrchní strany těla se pohybují od zlatozelené, přes čistě zelenou, červenou, fialovou až po modrou a černou (viz Obrázek č. 1). Většinou je přítomný různě silný kovový lesk, který je u nominotypické formy spíše hedvábný. Mezi poddruhy nacházíme i barevné formy s různým zbarvením štítu, štítku a krovek (např. *P. cuprea ignicollis* (Gory-Percheron 1833). Ze spodu je tělo jemně ochlupené (Mikšić 1987) a tmavě modro fialově či olivově zbarvené.



Obrázek č. 1: Ukázka variability zbarvení v rámci druhového komplexu *Potosia cuprea* (převzato z http://www.insectnet.com/cgi/dforum/dcboard.cgi?az=read_count&om=123&forum=DCForumID26)

Samice kladou vajíčka do trouchnivějšího dřeva listnatých stromů, především dubů, starých pařezů apod. Vývoj larev tak probíhá v trouchu listnatých stromů. Může probíhat i v půdě bohaté na organický materiál nebo v kompostech. Larvy těchto zlatohlávek můžeme také nalézt v mraveništích mravence rodu *Formica* (Linnaeus 1758) a vzácně i u mravence rodu *Camponotus* (Mayr 1861), kde se živí materiálem hnízda a dřevním odpadem (Balthasar 1956).

Zlatohlávci mají typické scarabaeiformní larvy tvaru „C“, nazývané též ponravy. V poslední růstové fázi dosahují až 50 mm (Balthasar 1956, Mikšić 1987, Rataj 1996, Hůrka 2005). Vývoj je zpravidla jednoletý, délka vývoje závisí na okolní teplotě. Byly ovšem zaznamenány i případy dvou po sobě jdoucích generací během jednoho roku (Mikšić 1987). Nižší teploty (např. v severních oblastech výskytu) mohou vést k pomalejšímu tempu růstu a vývoj může být dvouletý či víceletý (Mikšić 1987, Tauzin 2007).

Areál rozšíření *P. cuprea* zahrnuje téměř celou Evropu, dále zasahuje přes černomořské pobřeží Kavkazu (Abcházie, Gruzie, Arménie) až do Malé Asie a na Blízký východ (Turecko až Izrael) a do severního Egypta; na východ dosahuje až k východnímu pobřeží Ruska (Nikolajev et Puntsagdulam 1985, Nikolajev 1987, Rataj 1996, Baraud 1992, Sakai et Nagai 1998).

1.2. Systematické postavení taxonu *Potosia cuprea*

Taxonomie a klasifikace rodu *Potosia* Mulsant et Rey, 1871 patří k nejkomplicovanějším v rámci všech zlatohlávkovitých. V rámci podrodu *Potosia* bylo dle zbarvení, morfologie a geografického rozšíření popsáno celkem 30 druhů (Krajčík 1998).

Taxon *Potosia* byl původně ustaven autory Mulsantem a Reyem roku 1871 jako podrod rodu *Cetonia* Fabricius, 1775. Od té doby se přístup ke klasifikaci v pojetí různých autorů měnil a doposud nedošlo k ustálení klasifikace. Jelikož je problematika (pod)rodové klasifikace velice komplikovaná a složitá (navíc bez studia typového materiálu v podstatě nevyřešitelná) není v silách autorky podat vyčerpávající výklad jednotlivých přístupů. Omezíme se zde pouze na výčet základních přístupů, jakými jednotliví autoři přistupují ke klasifikaci taxonu:

- 1) Klasifikace *Potosia* jako podrod rodu *Protaetia* Burmeister, 1842 (Krikken 1984, Mikšić 1987, Krajčík 1998, Löbl et Smetana 2006).
- 2) Zařazení taxonů v rámci samostatného rodu *Potosia* dle Baraud (1992).
- 3) Priorita rodu *Netocia* (Costa, 1852) před *Potosia* (1971) dle autorů Shokhin (2007), Krajčík (2009).

1.3. Druhový komplex *Potosia cuprea*

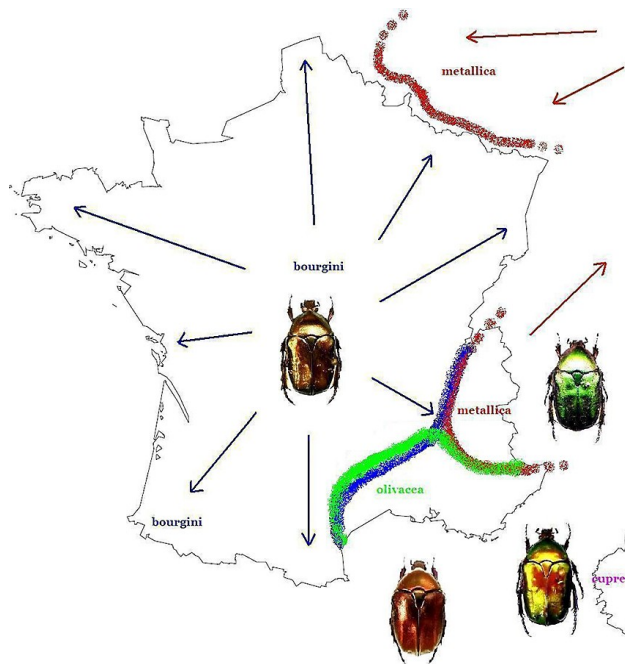
Potosia cuprea Fabricius, 1795 představuje komplex taxonů na druhové a poddruhové úrovni, jejichž přesný status není dosud uspokojivě objasněn. Situaci komplikuje již zmíněná existence řady chromatických variet, které jsou různými autory vnímány odlišným způsobem. Podle některých autorů (Medvedev 1964, Rataj 1996) patří taxon mezi nejvariabilnější komplexy palearktických zlatohlávků.

V předkládané práci se zabývám zejména taxony¹ druhového komplexu *P. cuprea* ze západopalearktické oblasti: *Potosia cuprea bourgini* Ruter, 1967, *P. c. brancoi* Baraud, 1992, *P. c. cuprea* (Fabricius, 1775), *P. cuprina* (Motschulsky, 1849), *P. c. daurica* (Motschulsky, 1860), *P. hieroglyphica* (Ménétries, 1832), *P. c. ignicollis* (Gory-Percheron, 1833), *P. c. ikonovoi* Mikšić, 1958, *P. incerta* (Costa, 1958), *P. c. metallica* (Herbst, 1790), *P. nitidioris* (Fairmaire, 1889), *P. c. obscura* (Mikšić, 1954), *P. c. olivacea* (Mulsant, 1842), *P. c. splendidula* (Faldermann, 1835). Dále byly pro potřeby analýz do

¹ názvosloví taxonů dle Krajčíka 1998, abecední řazení podle klasifikace Mikšiće (1987) viz Tabulka č. 3

práce zahrnuty taxony *Cetonia aurata* (Kraatz, 1931), *P. angustata* (Germar, 1817), *P. fieberi* (Kraatz, 1931) a *P. marginicollis* (Ballion, 1870).

Někteří autoři (Mikšić 1987, Rataj 1996, Décobert et Stéfani 2011) poukazují na případné nálezy hybridních exemplářů, které mohou vznikat křížením taxonů na styčných územích jejich areálů, kde pak vznikají přechodové formy se smíšenými znaky komplexu *Potosia cuprea*, jež mohou být těžko determinovatelné. Tyto přechodové formy byly často popisovány jako samostatné taxony (Panin 1957, Medvedev 1964, Mikšić 1987, Baraud 1992, Rataj 1996, Krajčák 1998).



Obrázek č. 2: Rozšíření jednotlivých populací komplexu: *P. cuprea bourgini*, *P. cuprea metallica*, *P. cuprea olivacea* a *P. cuprea cuprea* na území Francie (Décobert et Stéfani 2011). Na styčných místech nacházíme často přechodové exempláře.

Pro ozřejmění problematiky taxonomie druhového komplexu *P. cuprea* přikládám orientační srovnávací tabulku taxonomických názorů nejvýznamnějších autorů zabývajících se problematikou druhového komplexu (Mikšić 1987, Baraud 1992, Krajčák 1998, Smetana 2006) viz Tabulka č. 3. Dále ve své práci budu vycházet z klasifikace dle Krajčáka (1998).

			Mikšić	Krajčák	Löbl&Smetana	Baraud
	sp.	ssp.	1987	1998	2006	1992
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>bourgini</i> Ruter, 1967	ano	ano	<i>P. metallica bourgini</i>	ano
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>brancoi</i> Baraud, 1992	ne	ano	<i>P. metallica brancoi</i>	ano
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>caucasica</i> (Kolenati, 1845)	ano	<i>P. caucasica</i>	<i>P. caucasica</i>	<i>P. caucasica</i>
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>cuprea</i> (Fabricius, 1775)	ano	ano	ano	ano
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>cuprina</i> (Motschulsky, 1849)	ano	<i>P. cuprina</i>	<i>P. cuprina</i>	<i>P. cuprina</i>
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>daurica</i> (Motschulsky, 1860)	ano	ano	ano	ne
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>hieroglyphica</i> (Ménétries, 1832)	ano	<i>P. hieroglyphica</i>	<i>P. hieroglyphica</i>	<i>P. hieroglyphica</i>
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>ignicolis</i> (Gory-Percheron, 1833)	ano	ano	ano	ne
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>ikonomovi</i> Mikšić, 1958	ano	<i>P. ikonomovi</i>	<i>P. ikonomovi</i>	ne
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>incerta</i> (Costa, 1852)	ano	<i>P. incerta</i>	<i>P. incerta</i>	ano
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>indica</i> Mikšić, 1965	ano	<i>P. indica</i>	<i>P. indica</i>	ne
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>levantina</i> (Schytzmayr, 1936)	ne	ano	ano	ne
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>mandli</i> (Balthasar, 1930)	ne	ano	ano	ne
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>metallica</i> (Herbst, 1782)	ano	ano	<i>P. metallica</i>	ano
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>nitidorsis</i> (Fairmaire, 1889)	ano	<i>P. nitidorsis</i>	<i>P. nitidorsis</i>	ne
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>obscura</i> (Andersch, 1797)	ano	ano	ano	ano
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>olivacea</i> (Mulsant, 1842)	ano	ano	ano	ano
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>phoebe</i> (Reitter, 1899)	ano	ne	ano	ne
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>splendidula</i> (Faldermann, 1835)	ano	<i>P. splendidula</i>	<i>P. splendidula</i>	<i>P. splendidula</i>
<i>Potosia</i>	<i>cuprea</i>	<i>volhyniensis</i> (Gory-Percheron, 1833)	ne	ano	ano	ne

Tabulka č. 3: Náhledy na taxonomii komplexu druhů *Potosia cuprea*. Výčet poddruhů je převzat z práce Mikšiće (1987), v dalších sloupcích jsou uvedeny práce ostatních autorů a v příslušných kolonkách je zaznamenáno, zda je poddruh do komplexu zařazen ve stejném tvaru (**ano**), pokud ne, tak je vypsána konkrétní klasifikace. V případě, že autor se ve své práci daným taxonem nezabývá, tak je to v příslušném políčku heslovitě naznačeno (**ne**).

1.3.1. *Potosia cuprea bourgini* Ruter, 1967

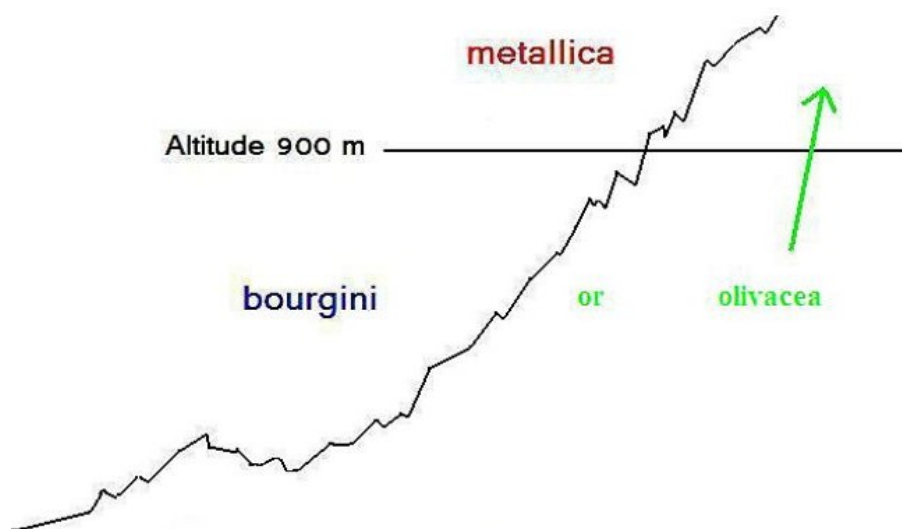
Potosia cuprea bourgini je nejrozšířenější poddruh z druhového komplexu ve Francii (Obrázek č. 5). Dlouhou dobu nebyla známa severní hranice jeho rozšíření a převládal názor, že v Severní Francii se tento poddruh nenachází. Autoři Décobert et Stéfani (2011) dokládají výskyt tohoto taxonu v blízkosti hranice s Belgií u města Arras, což představuje doposud nejsevernější doloženou lokalitu výskytu.

Povrch těla je většinou zbarven do měděno hnědé, ale někdy najdeme odstíny trochu nazelenalé nebo až načervenalé. Obvykle bývají přítomny bílé skvrny na krovkách (Baraud 1992).



Obrázek č. 3: *P. cuprea bourgini* (Décobert et Stéfani 2011).

Ve Francouzských Alpách se vyskytuje *P. cuprea bourgini* jen v údolích do nadmořské výšky 700 až 800 m n. m., zatímco v horských habitatech nad nadmořskou výškou 900 m se už nachází *Potosia cuprea metallica*. Mezi těmito poddruhy zde nenacházíme hybridy. Podle těchto poznatků se zdá, že populace *P. cuprea bourgini* a *P. cuprea metallica* nejsou sympatrické a jednotlivé populace jsou odděleny nadmořskou výškou výskytu (Obrázek č. 4; Décobert et Stéfani 2011).



Obrázek č. 4: *Potosia c. bourgini* a *Potosia c. metallica* na hranicích francouzských Alp rozmístění podle nadmořské výšky (Décobert et Stéfani 2011).

1.3.2. *Potosia cuprea brancoi* Baraud, 1992

Areál rozšíření *Potosia cuprea brancoi* zahrnuje Iberský poloostrov a Baleáry (Obrázek č. 5). Ekologie je identická jako u poddruhu *P. cuprea bourgini*, který také patří mezi francouzské poddruhy (viz výše). Tyto dva poddruhy jsou od sebe odděleny Pyrenejemi, které zde tvoří geografickou hranici jejich výskytu (Alexis et Delpont 2000).

Velikostí dosahuje 17-20 mm. Povrch těla je zbarven do bronzově zelených nebo bronzově měděných odstínů s kovovým leskem. Spodní část je většinou stejné barvy jako povrch, ale obvykle trochu tmavší, ale nikdy není zbarvena do červena nebo fialově měděné (Baraud 1992).

Potosia cuprea brancoi byl popsán poměrně nedávno, do té doby byl autory považován za poddruh *P. c. olivacea*.



Obrázek č. 5: Oblasti rozšíření: 1. *P. cuprea metallica*, 2. *P. cuprea bourgini*, 3. *P. cuprea brancoi*, 4. *P. cuprea cuprea*, 5. *P. cuprea obscura*, 6. *P. incerta*, 7. *P. cuprea olivacea* (Alexis et Delpont 2000).

1.3.3. *Potosia cuprea cuprea* (Fabricius, 1775)

Rozšíření tohoto poddruhu je omezeno na ostrovy Korsika, Sardinie, Sicílie, jižní část Francie a Švýcarska, dále se nachází v Itálii (Mikšić 1987, Baraud 1992, Rataj 1996).

Tento zlatohlávek má silný skelně lesklý² vzhled, který nenacházíme u ostatních poddruhů. Jsou známy mimořádně živé a výrazně zbarvené chromatické formy. Zbarvení krovek a štítu je trávově až olivově zelené někdy s červenavým leskem, rub těla je tmavě fialový, zřídka purpurové barvy. Dorsální i ventrální část těla bez bílé kresby. Skulptura dorsa jemná až středně hrubá (Mikšić 1987, Rataj 1996, Décobert et Stéfani 2011; Obrázek č. 6).

² někdy je lesk tohoto taxonu označován jako mastně nebo hedvábně lesklý.



Obrázek č. 6: Barevné varianty *P. cuprea cuprea* – dorzální pohled (obrázek vlevo - Itálie, vpravo - Korsika; Décobert 2009).

1.3.4. *Potosia cuprina* (Motschulsky, 1849)

Potosia cuprina má povrch těla typicky měděno červenohnědý s voskovým leskem. Oblast rozšíření se táhne od Bulharska, Rumunska, Ukrajina (Krym) až po evropskou část Turecka do Malé Asie a částečně i Egejské ostrovy (Mikšić 1987).

Ve východní části balkánského poloostrova se podle Mikšiče (1987) mísí s poddruhem *P. cuprea obscura* a jedince, které nalézáme v okolí Černého moře a v oblasti Madra v Bulharsku vykazují znaky přechodové formy mezi *P. cuprina* a *P. c. obscura*.

Povrch těla je nejčastěji měděno červený. Na pronotu jsou někdy patrné bílé okraje, ale můžou i chybět. Stejně tak bílé znaky na krovkách mohou být početné a viditelné nebo mohou zcela chybět. Spodní část těla je měděno červená nebo bronzově zelená. U končetin konec tibií a tarsi převážně vždy zbarveny do zelena.

1.3.5. *Potosia cuprea daurica* (Motschulsky, 1860)

Potosia cuprea daurica se zpravidla podobá *P. cuprea metallica*. Jde však o poddruh, který není vázán na ekosystém dubových lesů. Areál zahrnuje střední část východní Asie. V Rusku se vyskytuje od Moskvy až k Severnímu ledovému oceánu, dále na východ přes Sibiř až do ruské Přímořské oblasti a odtud až do severní Číny a Mongolska (Mikšić 1987, Rataj 1996).

Vývoj larev probíhá v břízách a u mravenců. Imaga jsou nalézána na květech okoličnatých rostlin (Mikšić 1987, Krajčik, 1998).

1.3.6. *Potosia hieroglyphica* (Ménétries, 1832)

Potosia hieroglyphica je nezaměnitelný druh bezlesých stepí Turkmenistánu, Ázerbájdžánu a severní části Iránu.

Základní barva je tmavě bronzově hnědá. Vzácněji je tělo tmavozelené. Krovky jsou na celé ploše hustě a hrubě tečkované, navíc podélně a svisle zvrásněné. Také štít je hustě a hrubě tečkovaný, ojediněle na okraji s náznakem bílého tomentového lemování (Baraud 1992).

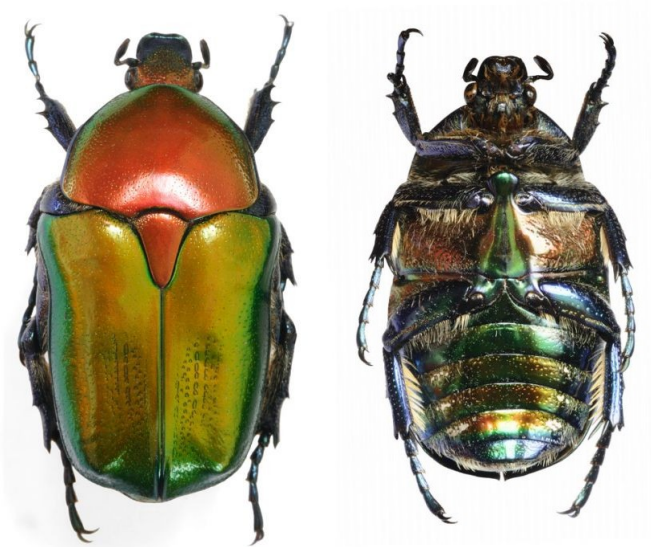


Obrázek č. 7: *Potosia hieroglyphica* – dorzální pohled (převzato z <http://www.zin.ru/animalia/coleoptera/rus/potcupkm.htm>).

1.3.7. *Potosia cuprea ignicollis* (Gory and Percheron, 1833)

Poddruh *Potosia cuprea ignicollis* je ve své typické formě snadno rozpoznatelný. Rozšířen je od jižní Sýrie přes Libanon, Izrael a Palestinu, dále zasahuje až do severní části Egypta.

Jedná se většinou o formy s dvoubarevnou dorzální stranou těla. Hlava, štít a štítek jsou purpurově červené a krovky jasně zelené. Rub těla je temně fialový. Může se také vyskytovat ve formě jednobarevné a to buď zelené, někdy může mít až zlatavý lesk. Existují také formy, které jsou svrchu zlatě nebo jasně zelené, na rubu modré; nebo jsou zelené se zlatě lemovanými krovkami, ramenními hrbolky a zlatavýma nohama (Mikšić 1987, Rataj 1996).



Obrázek č. 8: *P. c. ignicollis* – nejčastěji se vyskytující forma, dorzální a ventrální pohled (převzato z http://kharkov.naturalist.su/gallery/show_image.php?imageid=16058&lang=0).

1.3.8. *Potosia ikonovoi* Mikšić, 1958

Areál rozšíření *P. ikonovoi* je omezen na ostrov Kypr. Podle Mikšiće (1987) by mohl být blízce příbuzný *P. cuprina*.

Povrch těla nahnědlý až hnědo červený, objevují se i mosazně-červené nebo nazelenalé odstíny vždy se silným kovovým leskem. Spodní část těla a končetiny jsou

zbarveny do čistě červených až mosazně-měděných odstínů, zřídka s nádechem do zelena. Častá je přítomnost tomentových skvrn na krovkách a bílého lemování pronota.



Obrázek č. 9: *Potosia ikonovici* (převzato z <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id108005/>).

1.3.9. *Potosia incerta* (Costa, 1852)

P. incerta je endemitem Sicílie a Kalábrie, Mikšić (1987) uvádí i výskyt ze severní Itálie, což ale ostatní autoři nepotvrzují (Baraud 1992, Rataj 1996).

Od typické *P. cuprea cuprea* se liší zcela odlišným zbarvením a na první pohled působí jako zcela odlišný druh (zelení jedinci se prakticky u tohoto poddruhu nevyskytují). Povrch těla je silně kovově lesklý, barevně variabilní. Jsou známy odstíny od měděno-olivově zelené, jasně bronzové se zeleným odleskem až po měděné, nachové a fialové odstíny nebo intenzivní červeno měděnou barvu, která je i nejčastěji vyskytující se formou *P. incerta* (viz Obrázek č. 10). Na krovkách často nacházíme hrubší skulpturu a bílé skvrny (Mikšić 1987; Baraud 1992).

Ve srovnání s *P. cuprea cuprea* působí jako zcela odlišný druh. Přechodové formy v barvách typických pro *P. cuprea cuprea* nejsou známy, ale nejsou žádné morfologické rysy, které by oddělení těchto druhů umožnily (Mikšić 1987).

Správné systematické zařazení nebylo doposud definitivně vyřešeno. Autoři Mikšić (1987) a Baraud (1992) klasifikují *P. incerta* jako poddruh *P. cuprea*, ale například autoři

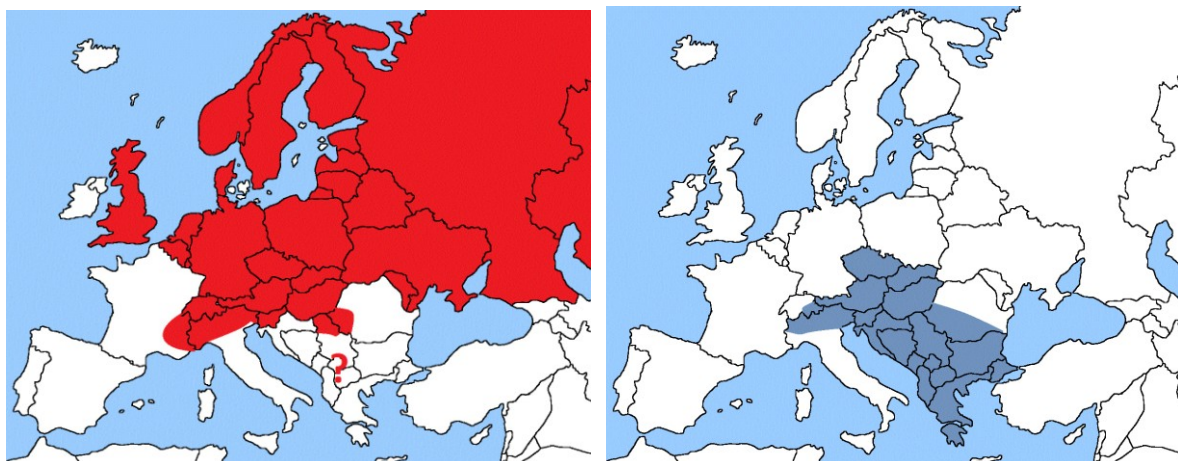
Löbl a Smetana (2006) a Krajčák (1998) ji ve svých pracích uvádějí jako samostatný druh. Velmi pravděpodobná je i možnost záměny *P. incerta* s jihoevropskými populacemi druhu *P. fieberi*. V některých starších pracích autorů Leoniho (1910) a Porty (1932) se údaje o výskytu *P. incerta* ze střední Itálie, týkají druhu *P. fieberi* (Mikšić 1987).



Obrázek č. 10: *Potosia incerta* – nejběžněji se vyskytující barevná forma (převzato z <http://www.flower-beetles.com/foto/incerta.jpg>).

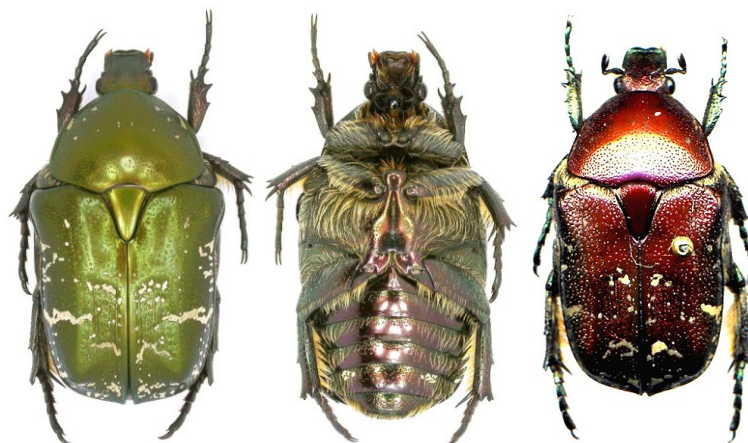
1.3.10. *Potosia cuprea metallica* (Herbst, 1782)

P. cuprea metallica je nejběžnějším a geograficky nejrozšířenějším poddruhem studovaného komplexu. Obývá rozsáhlé oblasti mírného pásma Euroasie (střední, západní a severní Evropa, zasahuje i do Itálie, a dále k jezeru Bajkal až na východ do Ruska, kde východní hranici areálu tvoří Povolží a na jihu pásmo dubových lesů na východním pobřeží Černého moře; Mikšić 1987, Décobert et Stéfani 2011; Obrázek č. 11). Zasahuje i do severních oblastí až k Bílému moři, poloostrovu Kola a od Severního mysu až do Skotska (Mikšić 1987). Ve Francii je výskyt omezen na oblast francouzských Alp (oblasti Savoie, Isère, Hautes-Alpes, Alpes-Martimes a Drôme). V jižní části areálu Evropy (Itálie, Švýcarsko, Rakousko, Slovinsko) se vyskytuje především v podhůří a horách v rozmezí nadmořské výšky 900 - 2000 m n. m. (Mikšić 1987), možný je i výskyt v horských oblastech balkánského poloostrova (D. Král. pers. com.). Ve střední Evropě se populace mísí s poddruhem *P. cuprea obscura* (Andersch, 1797), který sem zasahuje z ponticko-mediterránní oblasti a mohou zde vznikat přechodové formy (Mikšić 1987, Rataj 1996). Někteří autoři taxon klasifikují na úrovni samostatného druhu *P. metallica* (Medvedev 1964).



Obrázek č. 11: Orientační mapa areálu *P. cuprea metallica* (červený otazník značí možný výskyt tohoto poddruhu na Balkánském poloostrově) a *P. cuprea obscura*.

Velikostí je menší, klenutější s menším mesosternálním výběžkem, na povrchu těla s výraznější, hrubší a hustší skulpturou oproti ostatním poddruhům. Povrch těla je nejčastěji tmavě voskově zelený s bílými znaky na krovkách (většina jedinců oblasti střední Evropy), bílé znaky mohou vzácně chybět. Vzácně můžeme najít i jedince s měděno-červeným povrchem (Décobert 2009); Obrázek č. 12). Rub těla je nejčastěji purpurově fialový s bíle lemovanými sternity nebo temně zelený (Mikšić 1987, Rataj 1996). Někteří jedinci z oblastí italských a švýcarských Alp mohou mít horní část těla mastně lesklou, často s výrazným hedvábným leskem, což pravděpodobně naznačuje vliv možného křížení s taxonem *P. cuprea cuprea*, s nímž jinak jedinci poddruhu *P. cuprea metallica* nevykazují žádné podobnosti (Mikšić 1987).



Obrázek č. 12: *Potosia cuprea metallica* - běžná zelená forma – dorzální pohled; *P. cuprea metallica* - běžná zelená forma – ventrální pohled (foto D. Prunier; <http://daniel.prunier.pagesperso-orange.fr/aeruginosa.htm>); *P. cuprea metallica* - neobvyklá červená forma – dorzální pohled (Décobert 2009).

1.3.11. *Potosia nitidioris* (Fairmaire, 1889)

Potosia nitidioris je zlatohlávek z dálného východu Ruska, dále byl zaznamenán výskyt v Číně v provinciích Peking, Kweichow a Heilungkiang. Podle Rataje (1996) se v Číně vyskytuje i v provincii Kwangsi.

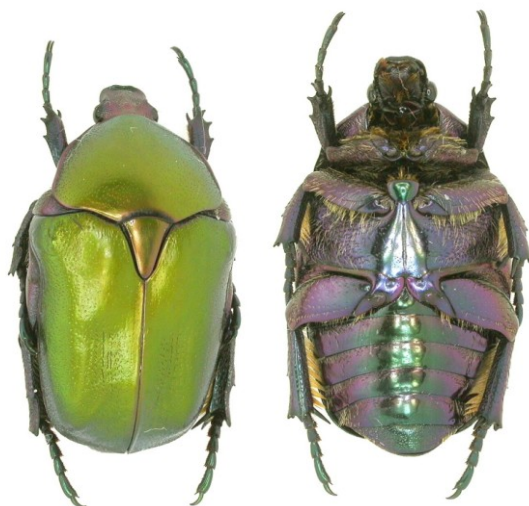
Zbarvení je jasně zelené bez zlatavého lesku. Krovky jsou zcela hladké a lesklé. Někdy bývají svisle rýhované. Bílé znaky na krovkách jsou výrazné (Mikšić 1987, Rataj 1996).

1.3.12. *Potosia cuprea obscura* (Mikšić, 1954)

Těžištěm rozšíření poddruhu *P. cuprea obscura* je Balkánský poloostrov (Řecko, Bulharsko, Albánie). Ojedinele nebo ve formě přechodových forem ho nacházíme v Maďarsku, Rakousku, České republice – v oblasti jižní Moravy, na Slovensku, v Rumunsku, dále zasahuje až na sever Itálie a do jižního Švýcarska viz Obrázek č. 11 – mapa areálu rozšíření *P. c. obscura* (jedinci ze severu Itálie a Tyrolska mají masně lesklý povrch typický pro *P. cuprea cuprea*). Nejhojněji se nachází v přímořských oblastech i ve vnitrozemí bývalé Jugoslávie (Mikšić 1987, Rataj 1996). Podobně jako jedinci Alp vykazují i brouci z Jónských ostrovů některé charakteristiky italské *P. cuprea cuprea* (Mikšić 1987).

Rozšíření *P. cuprea obscura* se na hranicích areálu částečně překrývá s rozšířením *P. cuprea metallica*. Tam se mohou vyskytovat přechodové formy, které byly také popsány jako *Potosia cuprea levantina* (Schatzmayer, 1936).

Horní strana těla je hladká s voskově olivově tmavě zeleným povrchem, ojedinele až fialově-nachové nebo jasně červené zbarvení (Baraud 1992). Rub těla je tmavě fialový (Mikšić 1987, Rataj 1996; Obrázek č. 13).



Obrázek č. 13: *Potosia cuprea obscura* - 22 mm; Řecko (foto D.Prunier; <http://www.insecte.org/forum/viewtopic.php?f=1&t=44810>); dorzální a ventrální pohled.

1.3.13. *Potosia cuprea olivacea* (Mulsant, 1842)

Poddruh *Potosia cuprea olivacea* patří mezi francouzské zlatohlávky a je přizpůsobený na teplejší a sušší klima. Rozšíření tohoto poddruhu je omezeno na jižní Francii viz Obrázek č. 5.

Typickou vlastností *P. cuprea olivacea* je její barevná stálost. Povrch těla je červenozlatý až olivově černý s voskovým leskem. Rub těla je tmavě modrofialový. Kolena bez bílých teček. Bez přesné lokality by tento poddruh nebyl prakticky rozlišitelný od extrémně zbarvených forem poddruhu *Potosia cuprea obscura* (Décobert et Stéfani 2011).

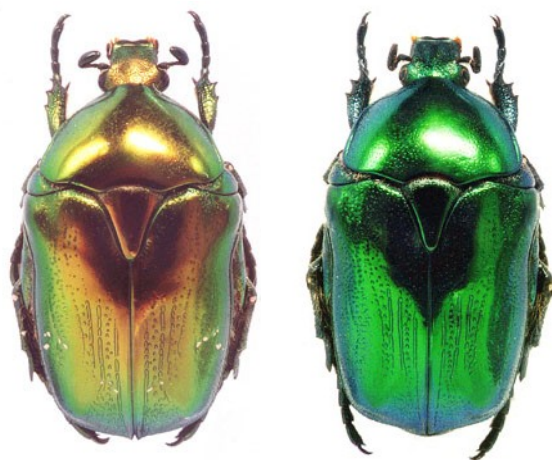


Obrázek č. 14: *P. cuprea olivacea*- dorsální pohled (Décobert et Stéfani 2011).

1.3.14. *Potosia cuprea splendidula* (Faldermann, 1835)

Poddruh *Potosia cuprea splendidula* obývá východní část Turecka, severní Irák, Irán, Kurdistan, Arménii až Ázerbájdžán. Tento taxon se nevyskytuje v ekosystému dubových lesů, žije na bezlesých stepích a vývoj larev probíhá na kořenech dvouletých rostlin (Baraud 1992, Rataj 1996).

Zbarvení těla je na rubu i líci zelené, vzácněji z obou stran zlatě lesklé až bronzově hnědé. Okraje sternitů mohou být bíle lemované (Mikšić 1987, Rataj 1996).



Obrázek č. 15: *P. splendidula* – dorsální pohled: vlevo zlatavá forma; vpravo zelenavá forma (převzato z <http://jalpanseque.free.fr/splendidula.htm>).

1.3.15. *Potosia angustata* (Germar, 1817)

Potosia angustata je 17-27 mm velký zlatohlávek s širokou škálou chromatických zbarvení od uniformní zelené s kovovým leskem až po úplně černé exempláře. Nicméně jedinci s purpurově červenými a tmavě modrými odstíny se u tohoto druhu nevyskytují.

Areál rozšíření je široký, táhne se od západu Evropy (Švýcarsko, SV Itálie) až do Anatólie. Je přítomen i na ostrovech v Egejském moři, Rhodu a na Krétě. Tento zlatohlávek je často vídán na zralém ovoci (hrušky, meruňky), ale můžeme se s ním potkat i na květech bodláků (*Onopordon*, *Carduus*), dále také na květech olivovníků a divoké vinné révy. Larvy se vyvíjí kromě dutin listnatých stromů také v kompostech a u kořenů řady rostlin (Alexis et Delpont 1996).



Obrázek č. 16: *P. angustata* (převzato z <http://www.insecte.org/forum/viewtopic.php?f=1&t=81254>).

1.3.16. *Potosia fieberi* (Kraatz, 1880)

Zlatohlávek *Potosia fieberi* je vzhledem velmi podobný studovanému komplexu zlatohlávků *P. cuprea*, od kterých je odlišitelný hlavně lesklou měděno-červenou barvou ventrální části těla tykadel a končetin a absencí bílých skvrn na kolenech končetin a tvarem paramer. Dorsální část je bronzově hnědozelená. Krovky mají jemné bílé skvrny (Baraud, 1992, Rataj, 1996).

Areál rozšíření se táhne od severozápadu Španělska přes téměř celou Francii, jižní část Německa, Švýcarsko, sever Itálie, Slovinsko a Rakousko. Ve střední Evropě obývá Českou republiku (hlavně teplejší oblasti Čech – okolí Praha a jižní Moravu, dále je nalézán na Slovensku a dosahuje k jižní části Polska (Slezko) a na Ukrajinu (Kyjev). Podle Mikšiče (1987) je rozšířen i na balkánském poloostrově, kdy byl zaznamenán výskyt na území bývalé Jugoslávie, severu Albánie a v Řecku. Autor S. Panin (1957) v jeho Fauně Rumunska uvádí jediný výskyt na území Rumunska v regionu Timisoara. Dokonce dle práce Tazulina (2007) byl zaznamenán výskyt na jihovýchodě evropské části Turecka.

Ekologie *P. fieberi* je podobná *P. cuprea*. Larvy žijí v trouchnivém dřevě, v dutinách ve větvích a kmenech listnatých stromů, především dubu a ovocných dřevin.



Obrázek č. 17: *P. fieberi* - dorsální a ventrální pohled (převzato z <http://daniel.prunier.pagespersoorange.fr/aeruginosa.htm>)

1.3.17. *Potosia marginicollis* (Gory and Percheron, 1833)

Potosia marginicollis je středoasijský druh s těžištěm rozšíření v Kazachstánu, Uzbekistánu a dále na jih do Tádžikistánu.

Tělo je ploché a široké s hladkým a kovově lesklým povrchem. Štít je řídce tečkován a jeho okraje mohou být bíle lemovány. Krovky taktéž tečkovány, někdy bílé skvrny splývají v široké klikaté čáry. Pygidium je hustě bíle skvrnité. Dorsální i ventrální část těla jasně zelená bez zlatého lesku.

Taxon byl původně klasifikován jako poddruh *Potosia cuprea*, nicméně Medvedev (1964) a Mikšić (1987) jej povýšily na úroveň samostatného druhu.



Obrázek č. 18: *P. marginicollis* – dorsální pohled (převzato z <http://www.flower-beetles.com/foto/marginicollis.jpg>).

2. CÍLE

1. Získat genetické informace co nejbohatšího materiálu druhového komplexu *Potosia cuprea* ze širokého areálu výskytu se zaměřením na evropské druhy a poddruhy.
2. U jednotlivých poddruhů či populací osekvenovat část dvou mitochondriálních genů cytochromu b a cytochromoxydázy I.
3. Fylogenetickými analýzami posoudit míru divergence mezi jednotlivými populacemi.
4. Získané sekvence analyzovat fylogenetickými programy a navrhnout fylogenezi zkoumaných taxonů.
5. Na základě získaných výsledků získat základní představu o substruktuře v rámci druhového komplexu a diskutovat současný charakter jednotlivých taxonů. Ověřit opodstatnění jejich druhového či poddruhového statutu.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Molekulární analýza

3.1.1. Materiál

Materiál pro studium genetické struktury druhového komplexu *Potosia cuprea* byl získán především během studijních cest do mediteránní oblasti (Řecko, Itálie, Portugalsko), které jsem spolu se školitelem a spolupracovníky z PřF UK uskutečnila v roce 2009. Další materiál pochází z lihových sbírkových exemplářů školitele a Dr. Davida Krále (PřF UK), Dirka Ahrense (Zoologisches forschungsmuseum Alexander Koenig). Značnou část materiálu jsem získala od kolegů, kteří mi přivezli některé cenné exempláře ze studijních i soukromých výjezdů.

Pokud to počet odchycených zvířat z lokality umožňoval, část jedinců byla ponechána živých za účelem odchovu larev, jinak byli brouci smrceni 96% etanolem nebo zmrazením. Zbývající část imaturního materiálu byla získána od soukromých sběratelů na entomologických burzách.

Kompletní přehled vzorků studovaných taxonů použitých pro molekulární analýzy, příslušných lokalit a autorů sběru dokládám v příložené tabulce (Příloha č. 1).

3.1.2. Izolace DNA

Materiál pro izolaci DNA byl odebrán z usmrcených jedinců uchovávaných v 96% etanolu skladovaných v mrazícím boxu při teplotě -20°C . Z důvodu rozšíření počtu i diverzity vzorků byly pro studii použity i suché sbírkové exempláře.

K odběru vzorku DNA byla použita jedna z končetin jedince, která byla odebrána pomocí preparačních pinzet sterilizovaných lihovým roztokem a plamenem po každém odběru. Po odpaření etanolu (u vzorků uchovávaných v 96% etanolu) byla tkáň z končetiny jedince rozlámána na menší kousky pomocí sterilních preparačních pinzet a umístěna do 1,5 – 2 ml mikrozkušavek. Zkušavka se poté nechala otevřená, aby se odpařil veškerý zbývající etanol v tkáni. Následně byla extrahována DNA dle postupu komerčně dodávané soupravy pro izolaci DNA - Qiagen DNAeasy® Tissue Kit, dle protokolu dodávaného s izolační sadou. Pro efektivnější lyzi tvrdších částí končetiny jedince byly vzorky ponechány v topném bloku při teplotě 56°C do následujícího dne.

Po izolaci byla ověřena koncentrace a čistota izolované DNA pomocí spektrofotometru NanoDrop®ND-100.

DNA získaná izolací byla označena příslušným kódem vzorku (viz tabulka Příloha č. 1) a uchovávána v mrazicím boxu při teplotě -20°C pro další použití.

3.1.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Sledované úseky DNA byly pro cytochrom B (cytB) a cytochrom c oxidázu I (COI) amplifikovány pomocí primerů uvedených v Tabulce č. 4. Sekvence primerů pro CytB byly převzaty z práce Balke (2004). Primery pro COI byly nejprve převzaty z práce Simon et al. (1994). Protože při amplifikaci docházelo k namnožení dvou úseků DNA pro gen COI (Obrázek č. 19), použili jsme modifikované sekvence primerů pro tento gen převzaté Ahrens pers. com. Přibližná délka amplifikovaných úseků je u cytB 400 bp a u COI 800 bp.

Gen	Označení primeru	F/R	Sekvence primeru	Zdroj
Cytochrom b	CytB3F	F	5' GAGGAGCAACTGTAATTACTAA3'	Balke (2004)
	CytB4R	R	5' AAAAGAAA(AG)TATCATTGAGTTGAAT 3'	Balke (2004)
Cytochrom c oxidáza I	C1-J-2183 (alias Jerry)	F	5' CAACATTTATTTTGATTTTTTGG 3'	Simon et al. (1994)
	L2-N-33014 (alias Pat)	R	5' TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA 3'	Simon et al. (1994)
Cytochrom c oxidáza I	SJerryF	F	5' CAACATYTATTYTGATTYTTTG 3'	Ahrens pers. com.
	SPatR	R	5' GCACTAWTCTGCCATATTAG 3'	Ahrens pers. com.

Tabulka č. 4: Sekvence primerů použitých pro amplifikaci studovaných genů.

Reakční směs byla připravována vždy do celkového objemu 25µl na vzorek (přesné složení reakční směsi včetně přidaných primerů uvádím v Tabulce č. 5). Pro reakční směs byla použita komerční směs PPP Master Mix od společnosti Top-Bio, s.r.o, která s výjimkou primerů obsahuje veškeré komponenty pro provedení PCR reakce (DTP, Taq polymeráza, reakční pufr s MgCl₂, barviva a stabilizátory). Spolu s PPP Master Mix je společností Top-Bio, s.r.o, dodávána i zkumavka se 1,5 ml PCR H₂O, která byla používána při přípravě reakční směsi.

Směs se předem připravovala pro větší množství vzorků a následně se rozpipetovávala v ekvivalentním množství do připravených stripů. Do takto připravené

reakční směsi bylo standardně přidáváno 2 μl DNA daného vzorku (Tabulka č. 5 varianta A). V případech, kdy koncentrace výsledného produktu PCR byla nedostačující, reakce se opakovala s tím, že se navýšil objem přidávané DNA daného vzorku na dvojnásobek a o to snížil objem přidávané vody, tak aby celkový objem reakční směsi s DNA činil 25 μl na vzorek (Tabulka č. 5 varianta B).

	A	B
Chemikálie	Množství (μl)	Množství (μl)
PPP Master Mix	12,5	12,5
Forward (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)	1	1
Reverse (10 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$)	1	1
PCR H ₂ O	8,5	6,5
DNA	2	4
celkem	25	25

Tabulka č. 5: Složení reakční směsi pro PCR (vztaženo na jednu reakci).

Amplifikace probíhala v termocykleru C1000TM Thermal Cycler (BioRad). V Tabulce č. 6 a č. 7 uvádím jednotlivé programy použité pro PCR reakce.

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

Tabulka č. 6: PCR program pro amplifikaci genů cytB.

COI	Krok	Počet opakování	Teplota	Čas
1.	Počáteční denaturace	1x	95°C	5 min
2.	Denaturace	35x	95°C	30 s
3.	Nasedání primerů		50°C	40 s
4.	Polymerace		72°C	2 min
5.	Závěrečná polymerace	1x	72°C	10 min
6.	Chlazení	1x	4°C	

Tabulka. č. 7: PCR program pro amplifikaci genu COI.

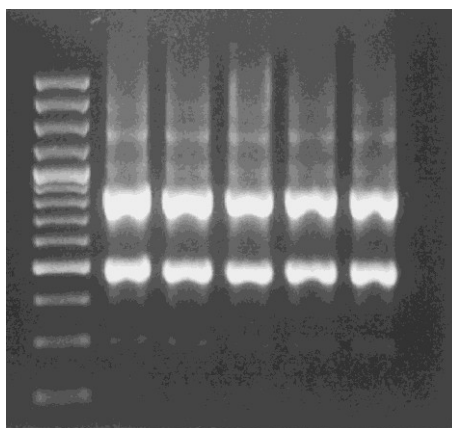
3.1.4. Kontrola správného průběhu PCR

Kontrola kvality a přibližné koncentrace DNA byla prováděna pomocí elektroforézy. Na 1% agarózový gel, který byl při přípravě smíchán s 1 μ l roztoku ethidium bromidu, se nanoslo 5 μ l PCR produktu od každého vzorku společně s délkovým standardem označujícím délku získaného fragmentu DNA (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas). Elektroforéza běžela přibližně po dobu 30 min nastavená na hodnoty 400mA a 100V. Po doběhnutí elektroforézy byla provedena kontrola pod UV osvětlením.

Vzorky, u kterých byla amplifikace úspěšná, byly následně přečištěny pomocí komerční soupravy Qiaquick® PCR Purification Kit (Qiagen) dle protokolu dodávaného výrobcem.

Protože při použití primerů pro amplifikaci genu pro COI dle práce Simon et al. (1994) docházelo k namnožení dvou různých úseků DNA (Obrázek č.19), vzorky byly nanoseny na 2% agarózový gel v celém objemu 25 μ l. Po doběhnutí elektroforézy byly vzorky vizualizovány pod UV zářením a následně byla vyřezána jen požadovaná část produktu o známé délce cca 800 pb pomocí sterilního skalpelu. Části vyřezaného gelu s požadovaným úsekem DNA byly vkládány do 1,5 ml mikrozkušavek a poté byla provedena purifikace pomocí komerční soupravy Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo research) dle protokolu dodávaného výrobcem. Pro eliminaci tohoto kroku jsme přistoupili k použití modifikovaných primerů převzatých od Ahrens pers. com.

Koncentrace a kvalita PCR produktu po purifikaci byla ověřena pomocí spektrofotometru NanoDrop®ND-100.



Obrázek č. 19: Kontrola správného průběhu PCR pomocí elektroforézy u amplifikace COI při použití primeru Pat a Jerry dle práce Simon et al. (1994).

3.1.5. Sekvenování

Podle zjištěné koncentrace DNA přečištěného produktu byla připravována směs pro sekvenaci. Pro přípravu sekvenační směsi byly použity stejné primery jako pro PCR. Složení sekvenační směsi bylo připravováno dle požadavků laboratoře sekvenace. Celkový objem reakční směsi činil 14 μ l, přičemž množství DNA a ddH₂O bylo stanoveno dle výsledků měření koncentrace (Tabulka č. 8).

koncentrace DNA (ng/ μ l)	DNA (μ l)	ddH ₂ O (μ l)	primer (μ l)
70 <	1	12,68	0,32
50-60	2	11,68	0,32
30-40	3	10,68	0,32
20-30	4	9,68	0,32
< 20			

Tabulka č.8: Složení sekvenační směsi dle koncentrace DNA přečištěného produktu.

Takto připravené produkty byly následně předávány do laboratoře sekvenace PřF UK (sekvenátor 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), kde byly provedeny i srážecí a sekvenační reakce (kit BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems).

3.1.6. Alignment

Úsek amplifikované DNA byl sekvenován z obou konců, tak aby se sekvence uprostřed překryly. Analýza obdržených chromatogramů a kontrola sekvencí byla provedena pomocí programu Bioedit 7.0.9.0 (Hall 1999). V stejném programu byl proveden alignment pomocí Clustal W (Thomson et al. 1994) a další úpravy sekvencí. Protože použitelná délka sekvencí se u jednotlivých vzorků lišila, byly všechny sekvence upraveny tak, aby začínaly a končily ve stejné pozici. Následně byla ověřena nepřítomnost stop kodonu překladem upravených a srovnaných nukleotidových sekvencí do sekvence aminokyselin pomocí programu MEGA version 4 (Tamura et al. 2007).

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

Alignment všech datasetů přikládám ve formátu FASTA na příloženém CD.

3.2. Fylogenetické analýzy

V programu jModelTest 0.1 (Posada 2008) byl nejprve zjištěn model evoluce za použití Akaikova informačního kritéria (AIC) a Bayesovského informačního kritéria (BIC). Pro sekvenční genu COI byl zvolen model evoluce HKY+I+G a pro cytB model TVM+I+G.

Dále byly pro všechny datové soubory vyhledány fylogenetické stromy za použití metod Bayesovské analýzy (BA), Maximum Parsimony (MP) a Maximum Likelihood (ML).

Získané fylogenetické stromy byly prohlíženy programem Tree View 1.6.6 (Page 1996) a TreeGraph 2.0.47-206 beta (Stöver et Müller 2010). Editaci a úprava stromů byla prováděna programem Photoshop 7.0, stejně jako vytvořené haplotypové sítě.

Vzhledem k velkému nároku na výpočetní výkon, byly výpočty analýzy BA a MP prováděny na volně dostupném webovém portálu norské univerzity v Oslu (Kumar et al. 2009; <http://www.biportal.uio.no/about.php>).

3.2.1. Bayesovská analýza (BA)

Bayesovská metoda byla počítána programem MrBayes 3.1 (Ronquist et Huelsenbeck 2003). Tato metoda je založena na vyhledávání nejlepších stromů pomocí Markov chain Monte Carlo algoritmu (Larget et Simon 1999). Model byl vybrán programem jModelTest a nastaven pro výpočet. Počet generací byl nastaven na 10000000, přičemž z každé sté generace byl ukládán strom (příkazy: set autoclose=yes nowarn=yes; lset nst=6 rates=gamma; unlink shape=(all) Statefreq=(all) tratio=(all) revmat=(all) pinvar=(all); mcmc ngen= 10000000 nruns=2 printfreq=100 samplefreq=1000 nchains=4 savebrlens=yes; mcmc;).

Po kontrole ustálené frekvence stromů došlo k odstranění části uložených stromů. Zpravidla bylo odstraněno 2500 z 10000 uložených stromů. Poté došlo k vytvoření konsenzuálního stromu, který u jednotlivých větví obsahoval hodnoty posteriorních pravděpodobností, značících frekvenci výskytu jednotlivých nodů ukládaných stromů.

3.2.2. Maximum Parsimony (MP)

Podstatou metody maximální úspornosti (Maximum parsimony) je, že vybere ze všech možných stromů ten, který má minimální celkovou délku – tj. strom s minimálním

počtem evolučních kroků, které jsou potřebné pro objasnění vstupních dat. Sdílení společných znaků je zároveň vysvětlováno jejich společným původem. K výpočtu byl použit program PAUP* version 4.0 (Swofford 2002). Stromy byly hledány pomocí heuristického vyhledávání s počtem 1000 opakování náhodného přidávání sekvencí a prohledávání okolních stromů pomocí náhodného přehazování větví – Tree bisection reconnection (TBR; příkaz: hsearch addseq=random nrep=100 swap=TBR).

3.2.3. Maximum likelihood (ML)

Metody maximální pravděpodobnosti (Maximum likelihood) jsou založeny na porovnávání jednotlivých hypotéz, jak dobře vysvětlují vstupní data. Výsledkem je strom s největší pravděpodobností. (Harrison et al. 2005).

Model pro výpočet byl taktéž vybrán programem jModelTest a použit pro nastavené programu raxmlGUI (Silvestro et Michalak 2010).

ML byla vypočítána v programu raxmlGUI 0.95 (Stamatakis 2006, Silvestro et Michalak 2010). Pro ML byl zvolen model general time-reversible (GTR) s gamma distribucí. Správnost topologie získaného stromu byla ověřena bootstrapem s 1000 replikacemi.

3.2.4. Haplotypové sítě

Pro vizualizaci vztahů mezi sekvencemi v rámci datasetu genu COI byl použit program Network 4.600 (<http://www.fluxus-engineering.com>). Haplotypová síť byla vytvořena metodou Median-joining (Bandelt et al. 1999). Následně byla provedena MP kalkulace, která z předchozího výpočtu sítě vyřadí nepotřebné vektory a linky a tím výslednou síť zjednoduší.

3.2.5. Nekorigované p - distance

K výpočtu nekorigovaných p-distancí na základě datasetu sekvencí parciálních částí genu COI byl použit program MEGA 4. 1 (Kumar et al. 2008). Kompletní soubor všech nekorigovaných p-distancí přikládám v tabulce na příloženém CD.

4. VÝSLEDKY

4.1. Profil vstupních dat

Amplifikací vybraného úseku DNA byly s pomocí výše popsaných laboratorních postupů (kapitola 3.1) získány sekvence dvou mitochondriálních genů (cytochrom B a cytochromoxidáza I) celkem u 14 taxonů druhového komplexu *P. cuprea*: *Potosia cuprea bourgini* Ruter, 1967, *P. c. brancoi* Baraud, 1992, *P. c. cuprea* (Fabricius, 1775), *P. cuprina* (Motschulsky, 1849), *P. c. daurica* (Motschulsky, 1860), *P. hieroglyphica* (Ménétries, 1832), *P. c. ignicollis* (Gory-Percheron, 1833), *P. ikonovovi* Mikšić, 1958, *P. incerta* (Costa, 1852), *P. c. metallica* (Herbst, 1782), *P. nitidioris* (Fairmaire, 1889), *P. c. obscura* (Andersch, 1797), *P. splendidula* (Faldermann, 1835). Dále byly získány výše zmiňované sekvence od druhů *Cetonia aurata* (Linné, 1758), *P. angustata* (Germar, 1817), *P. fieberi* (Kraatz, 1880) a *P. marginicollis* (Ballion, 1870).

Pro cytochromoxydázou I (COI) byly získány sekvence u 68 jedinců zkoumaných taxonů včetně outgroups, jednotlivé sekvence po úpravě a sjednocení obsahovaly 779 bp. Podrobnější charakteristika vybraných datasetů je uvedena v Tabulce č. 9.

Sekvence pro gen cytochrom B (CytB) byly získány ze 78 jedinců zkoumaných taxonů včetně outgroups. Po úpravě a sjednocení délky úseku v programu BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999), činila výsledná délka alignmentu 382 bp.

Datový soubor	Počet vzorků	Počet znaků		
		celkový	variabilních	parsimonně informativních
CytB	78	382	25	135
COI	68	779	64	217
CytB+COI	64	1161	88	347

Tabulka č. 9: Základní informace o analyzovaných datových souborech.

4.2. Dataset genu COI

4.2.1. Haplotypové sítě

Genealogické vztahy mezi haplotypy znázorňuje haplotypová síť (Obrázek č. 20), získaná metodou Median-joining. Celkem bylo u 68 jedinců v datasetu genu COI identifikováno 60 haplotypů.

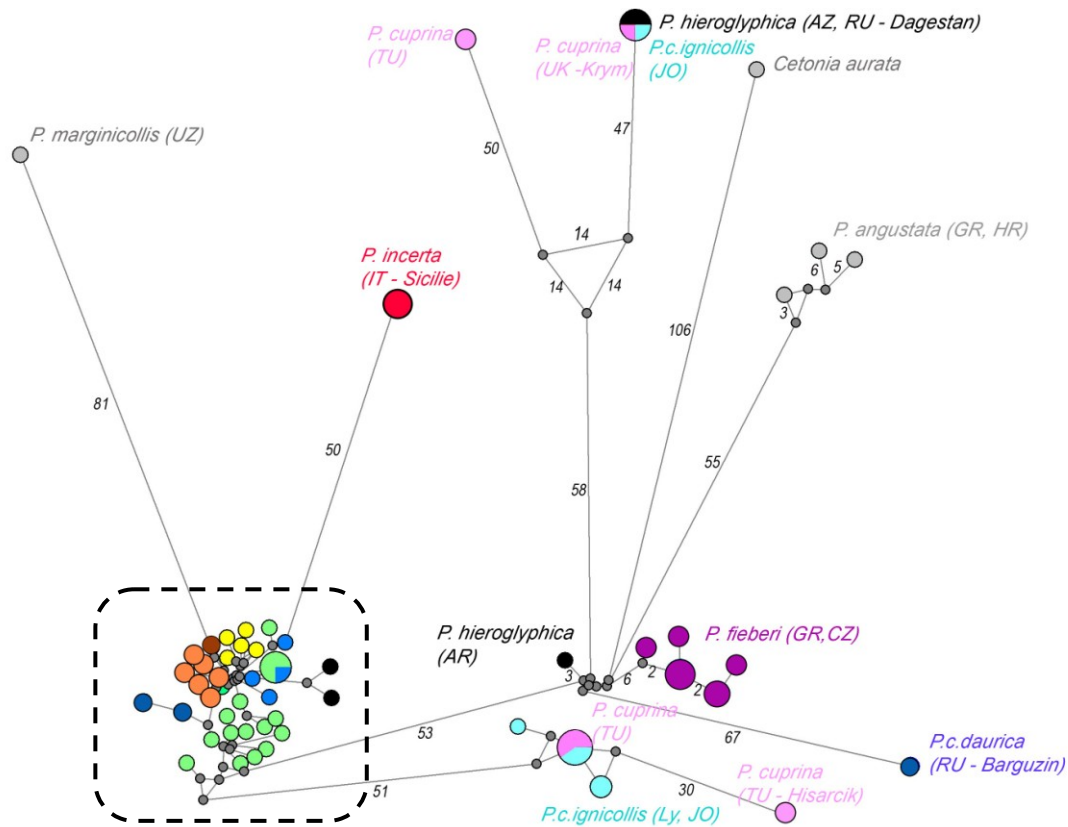
Haplotypová síť obsahuje hlavní skupinu reprezentovanou klastrem evropských taxonů komplexu *P. cuprea* ssp. (doplňenou o dvě geograficky vzdálené skupiny z asijské části Ruska: *P. c. metallica* (*daurica*?) a *P. hieroglyphica* (viz mapa Obrázek č. 22). Z tohoto „evropského“ klastru vystupuje samostatný a hodně vzdálený klastř *P. incerta*. Pro detailnější náhled na tuto „evropskou“ skupinu haplotypů byla vytvořena samostatná haplotypová síť, která je vyobrazena na Obrázku č. 23 a komentována níže.

Další klastery taxonů, pocházející především z Malé Asie, dělí od hlavní „evropské“ skupiny 52 – 122 mutací. Každý z taxonů *P. cuprina*, *P. hieroglyphica* a *P. c. ignicollis* vytvářejí dva (tři) zcela nepříbuzné klastery haplotypů, bez jasného geografického vzoru, přičemž jedinci *P. cuprina* a *P. c. ignicollis* v rámci těchto klastrů vytvářejí dvě společné skupiny.

Detailnější pohled na „evropský“ klastř naznačuje blízkost taxonů *P. c. bourgini*, *P. c. brancoi* a *P. c. cuprea*. Porovnání s jejich geografickým rozšířením zjistíme, že se jedná o západoevropskou větev komplexu *P. cuprea*. Nejvíce odvozený jedinec skupiny pochází ze španělského ostrova Mallorca (jedná se o příslušníka poddruhu *P. c. brancoi*). Tento jedinec je od španělských nebo portugalských *P. c. brancoi* vzdálen 7-9 mutací. Dále zde došlo k zařazení jednoho jedince pocházejícího z Portugalska (a tudíž řazeného k poddruhu *P. c. brancoi*) do skupiny *P. c. cuprea*.

Zlatohlávek *P. c. obscura* vytváří v rámci „evropského klastru“ nezávislé čtyři skupiny. Dvě skupiny pocházejících především z oblasti střední a jihovýchodní Evropy, klastrují dohromady s jedinci poddruhu *P. c. metallica*. Další dvě skupiny řeckých *P. c. obscura* tvoří samostatné klastery, přičemž skupina jedinců pocházejících z oblasti z řecké Thrákie (lokality „Avantas“ a „Lavara“ poblíž hranic s Bulharskem a Tureckem) tvoří samostatný klastř vzdálený od ostatních řeckých *P. c. obscura*. Zlatohlávek *P. c. metallica* z Maďarska tvoří samostatný klastř.

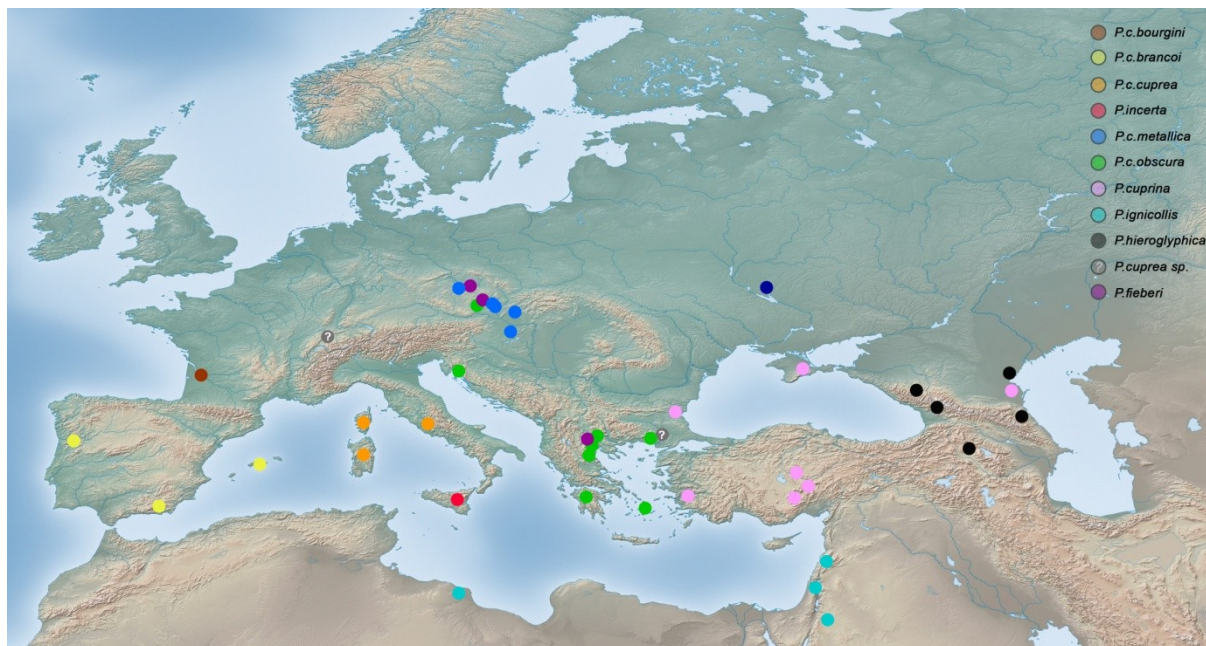
Taxony *Cetonia aurata*, *P. fieberi*, *P. marginicollis* a *P. angustata*, které byly v analýzách brány jako doplňkové skupiny a outgroups, byly do haplotypové sítě zahrnuty z důvodu porovnání vzájemné distance mezi klastery komplexu *P. cuprea*.



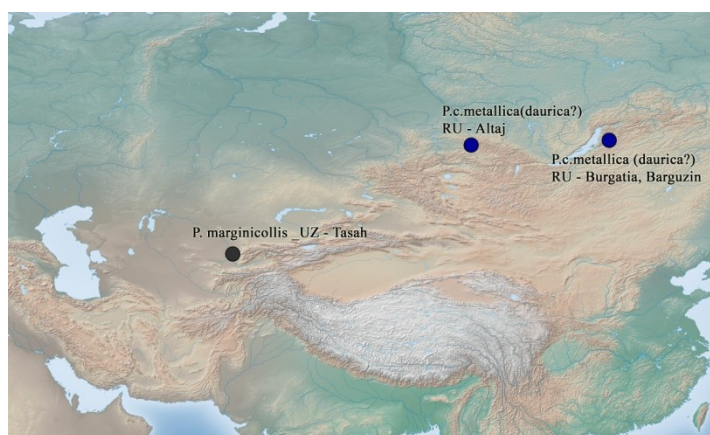
Obrázek č. 20: Median joining network zobrazující genealogické vztahy mezi haplotypy genu COI zkoumaných taxonů druhového komplexu *Potosia cuprea* a příbuzných druhů. Haplotypy jsou znázorněny barevnými kruhy. Velikost kruhů odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem. Číslo na spojnicích označuje počet mutací mezi haplotypy (vztaženo pro $n > 1$). Přerušovanou čarou je naznačen výřez. Detail a popis výřezu je uveden na Obr. č. 23. Zkratky států zahrnutých v haplotypové síti jsou uvedeny v Tabulce č. 10.

Seznam zkratk států a území			
AZ	Ázerbájdžán	IT	Itálie
AR	Arménie	JO	Jordánsko
BU	Bulharsko	LY	Libye
HR	Chorvatsko	PT	Portugalsko
CZ	Česká republika	SK	Slovensko
FR	Francie	ES	Španělsko
GE	Německo	SW	Švýcarsko
GR	Řecko	TR	Turecko
HU	Maďarsko	UK	Ukrajina
		UZ	Uzbekistán

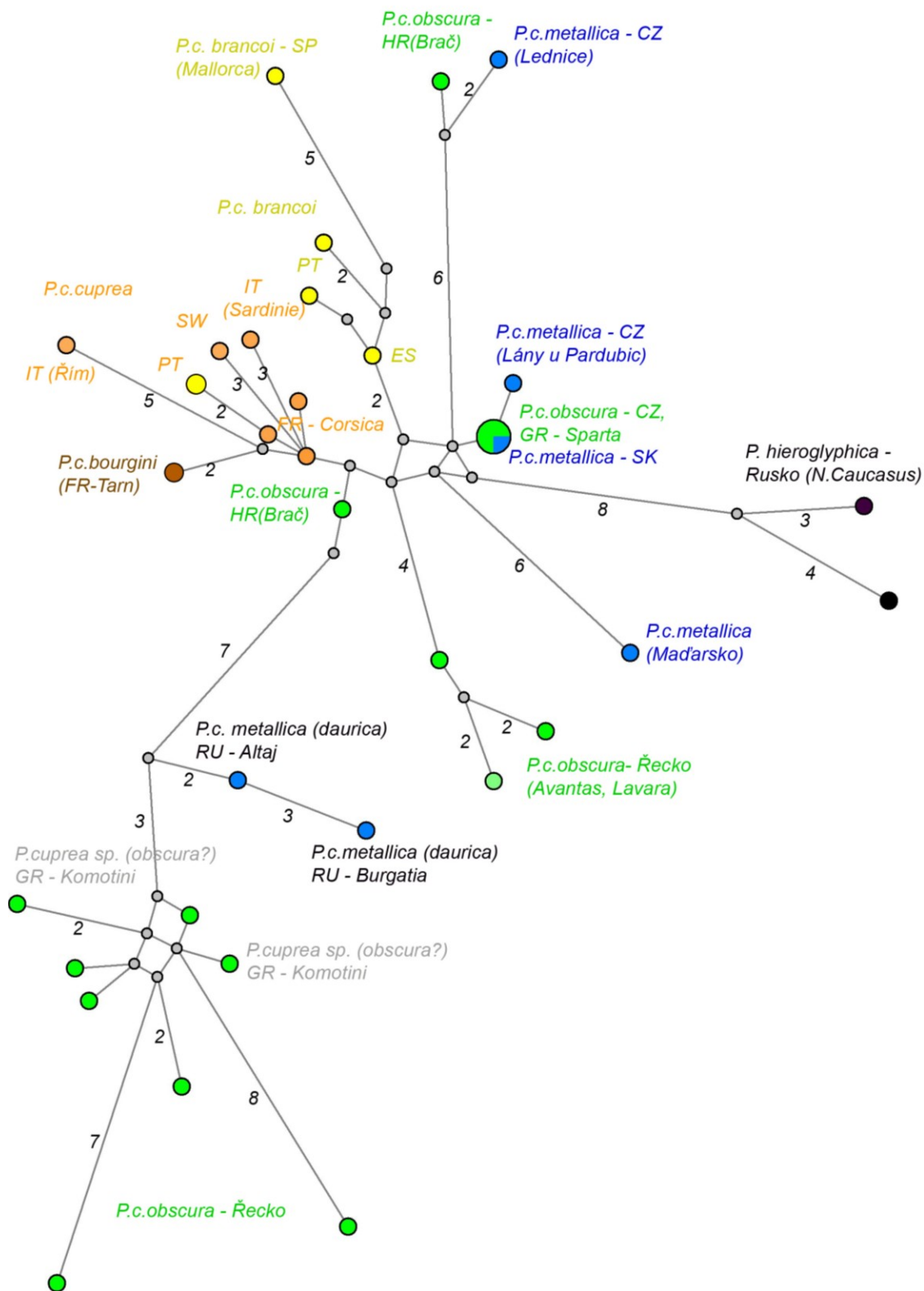
Tabulka č. 10: Seznam použitých zkratk států.



Obrázek č. 21: Mapa vzorkování *Potosia* ssp. Barvy odpovídají barvám v haplotypové síti. Barevné body představují místa sběru.



Obrázek č. 22: Mapa vzorkování v Uzbekistánu a Rusku - Sibiř. Taxony *Potosia cuprea metallica* a *Potosia marginicollis*. Barvy odpovídají barvám v haplotypové síti. Barevné body představují místa sběru.



Obrázek č. 23: Median joining network zobrazující genealogické vztahy mezi haplotypy genu COI - výřez z Obr. č. 20 – vnitřní komplex *Potosia cuprea* ssp. Haplotypy jsou znázorněny barevnými kruhy. Velikost kruhů odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem. Čísla na spojnicích označují počet mutací mezi haplotypy (vyznačeno pro $n > 1$). Zkratky států zahrnutých v síti jsou uvedeny v Tabulce č. 10.

4.2.2. Fylogenetické stromy a nekorigované p-distance

Fylogenetické stromy pro dataset genu COI byly konstruovány metodami Bayesovské analýzy (BA), maximální parsimonie (MP) a maximální věrohodnosti (ML). V tomto pořadí budou i jednotlivě vyobrazeny (Obrázky č. 24-26).

I když fylogenetické stromy ve všech třech analýzách (BA, MP, ML) nevykazují shodné topologie, jejich základní výsledky se shodují a podporují výsledky haplotypových sítí.

Bazální větev je v BA a ML analýzách tvořena taxonem *P. marginicollis*, který tvoří sesterskou skupinu všem ostatním zkoumaným druhům. Výjimku tvoří analýza MP, kde byla, jako nejbazálnější klád, identifikována skupina jedinců *P. cuprina*, *P. c. ignicollis* a *P. hieroglyphica*. Bazální pozice *P. marginicollis* je však zachována i v této analýze, neboť se od ostatních taxonů odděluje hned v následujícím uzlu.

Taxon *P. fieberi* vytváří v bayesovských analýzách dobře diferencovanou větev s vysokou hodnotou bootstrapu (BH) 0,98 a divergencí 12,7 %, obdobně jako taxon *P. angustata* s BH 0,68 a divergencí 10%. Sesterské skupiny a umístění těchto taxonů ve výsledném kladogramu se však v jednotlivých analýzách lišily.

Dalším stabilním jevem ve všech třech analýzách byla existence „evropské skupiny“ taxonů spadající do komplexu *P. cuprea* ssp. (bez jasné vnitřní diferenciaci) doplněná o jedince ze Sibiře (taxony *P. c. metallica* (*daurica*?)). Sesterskou linii k této skupině tvořila dvojice *P. hieroglyphica* z Kavkazu (s BH 1 a divergencí 10 %). Vzorek s označením *P. cuprina* 72_BU z Bulharska je usazen uvnitř evropské větve *P. cuprea* ssp.

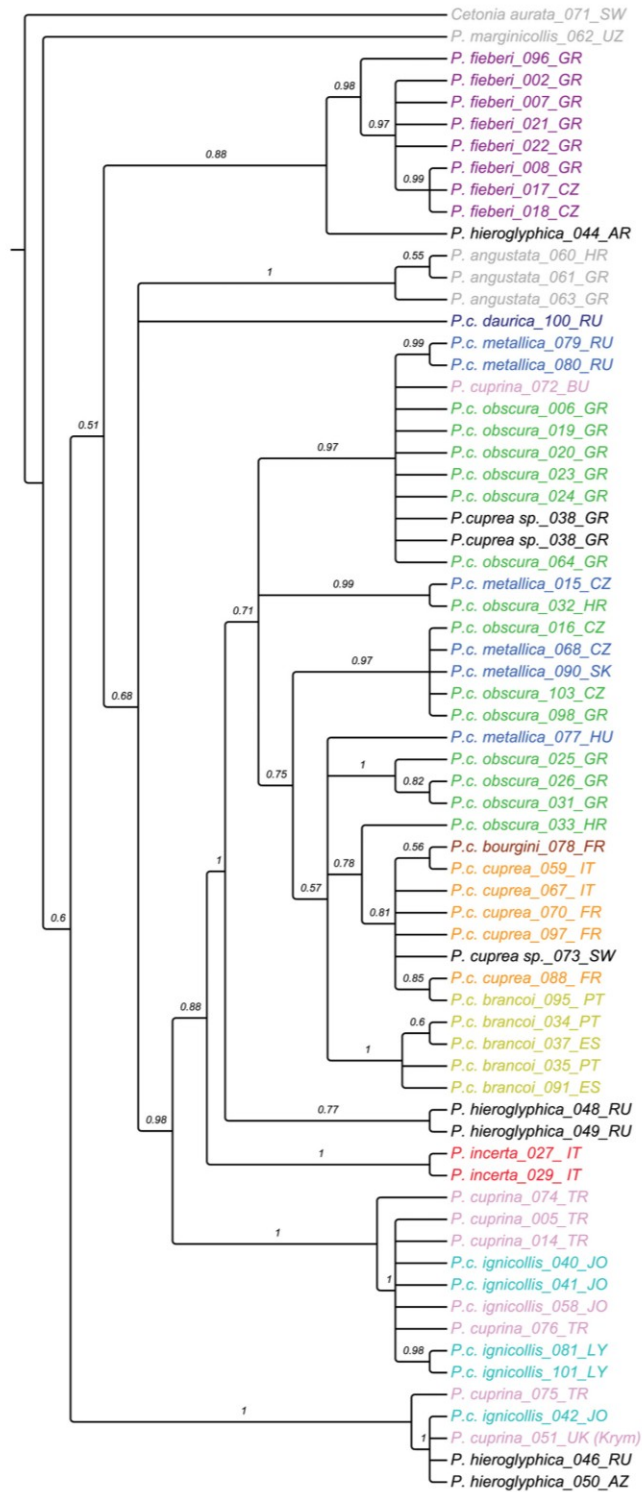
Jasnější geografický vzor v rámci „evropské skupiny“ nacházíme u pouze jedinců poddruhů *P. cuprea* pocházejících ze západní Evropy a Itálie (vyjma taxonu *P. incerta*), které v analýzách mají tendence vytvářet společné větve. Taxony *P. c. obscura* a *P. c. metallica* naopak vykazují polytomické členění a divergence mezi nimi činí 1,5%.

Potosia incerta ze Sicílie tvořila další dobře diferencovanou větev s BH 0,88 a divergencí 7,5 %. Tento taxon byl ve všech analýzách sesterský ke kládu tvořeným „evropskou“ linií *P. cuprea* a kavkazskými *P. hieroglyphica*. Jak v haplotypových sítích, tak ve fylogenetických stromech je od ostatních evropských taxonů jasně vzdálen a nevykazuje s nimi žádné podobnosti, pravděpodobně půjde o samostatný druh (viz Tabulka č. 11).

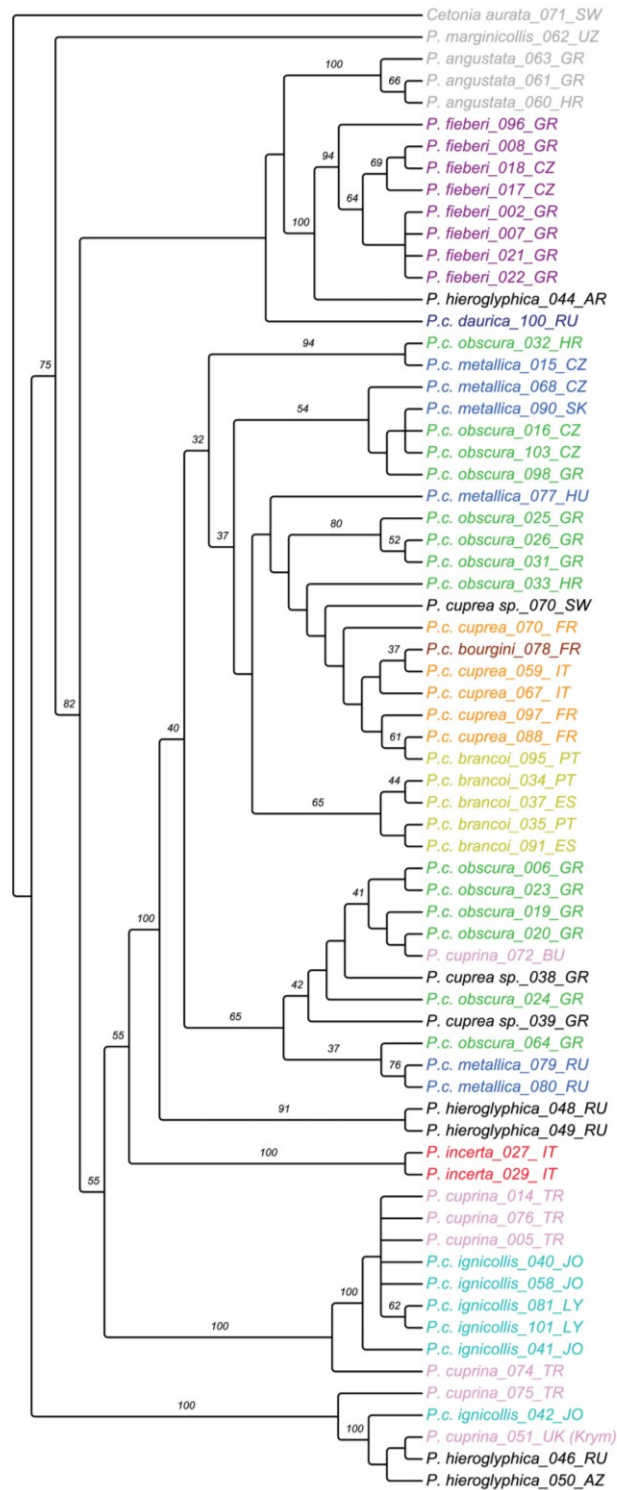
Asijské druhy *P. cuprina*, *P. c. ignicollis* a *P. hieroglyphica* se polytomicky slučují do dvou větví a nevykazují žádný geografický pattern. Divergence uvnitř skupin: *P. cuprina* činí 9,3 %; *P. c. ignicollis* 6,9 % a *P. hieroglyphica* 12,7. Jinými slovy všechny tři taxony se na základě tohoto datasetu jeví jako polyfyletické taxony.

	<i>P. incerta</i>	<i>P.c.obscura</i>	<i>P.c.metallica</i>	<i>P.c. brancoi</i>	<i>P.c. cuprea</i>
<i>P. incerta</i>					
<i>P. c. obscura</i>	0.076				
<i>P.c.metallica</i>	0.074	0.015			
<i>P.c. brancoi</i>	0.078	0.016	0.012		
<i>P.c. cuprea</i>	0.073	0.017	0.013	0.011	
<i>P.c. bourgini</i>	0.072	0.018	0.014	0.011	0.006

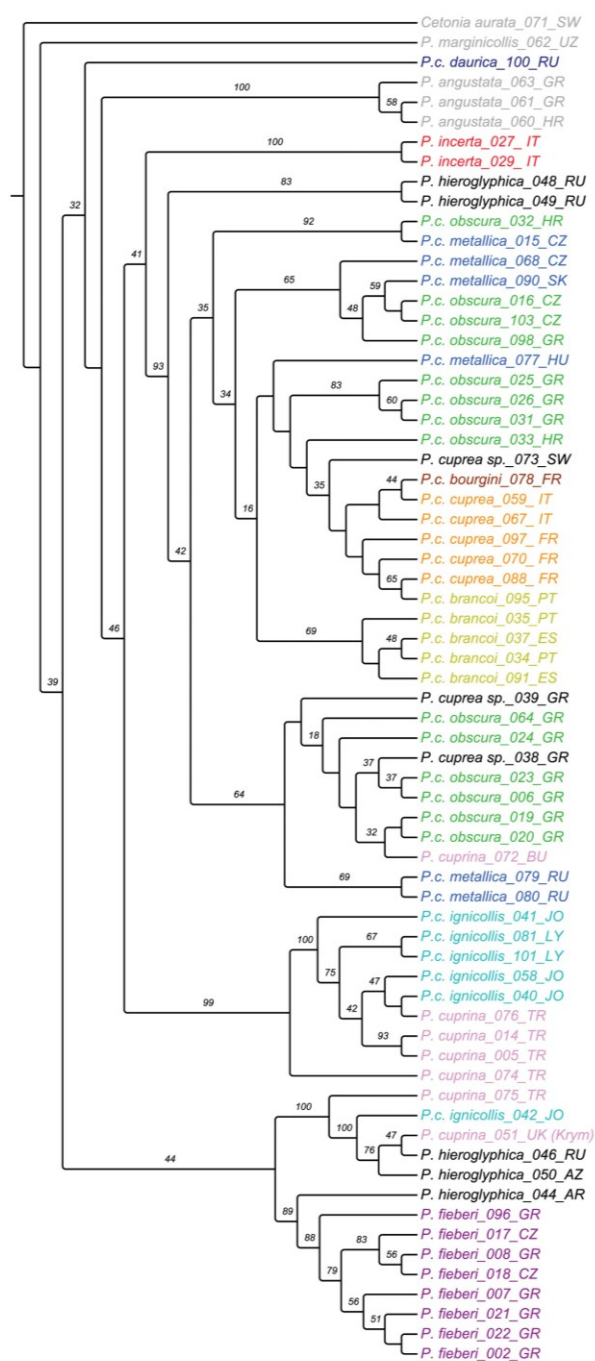
Tabulka č. 11: Tabulka nekorigovaných průměrných p-distancí na základě datasetů genu COI mezi zkoumanými skupinami taxonů: *P. incerta*, *P. c. obscura*, *P. c. metallica*, *P. c. brancoi*, *P. c. cuprea* a *P. c. bourgini*.



Obrázek č. 24: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COI Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). Posteriorní pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech pro hodnoty $n > 0,3$. Počet generací 10 000 000. Barvy v kládech označující druhy odpovídají barvám v mapkách a haplotypové síti.



Obrázek č. 25: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COI metodou Maximum parsimony. Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu >30%. Délka stromu je 686 (CI = 0.5583, RI = 0.8663). Barvy v kládech označující druhy odpovídají barvám v mapkách a haplotypové síti.



Obrázek č. 26: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu COI metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Posteriorní pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech pro hodnoty $n > 30\%$. Barvy v kládech označující druhy odpovídají barvám v mapkách a haplotypové síti.

4.3. Dataset genu CytB

4.3.1. Haplotypové sítě

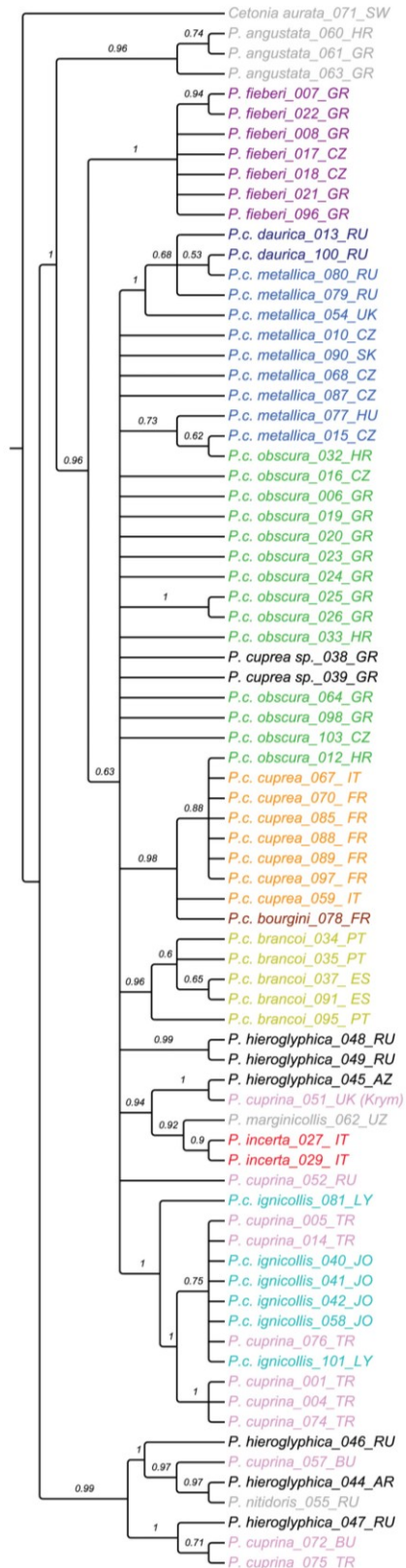
V rámci datasetu genu CytB bylo ze 78 jedinců identifikováno 65 haplotypů. Délka získané sekvence je však více jak o polovinu kratší (382 bp) než u genu COI a nevykazuje příliš velkou variabilitu. Z toho důvodu, nebudu do této podkapitoly uvádět popis a vyobrazení haplotypové sítě, neboť její informační hodnota není příliš vysoká.

4.3.2. Fylogenetické stromy

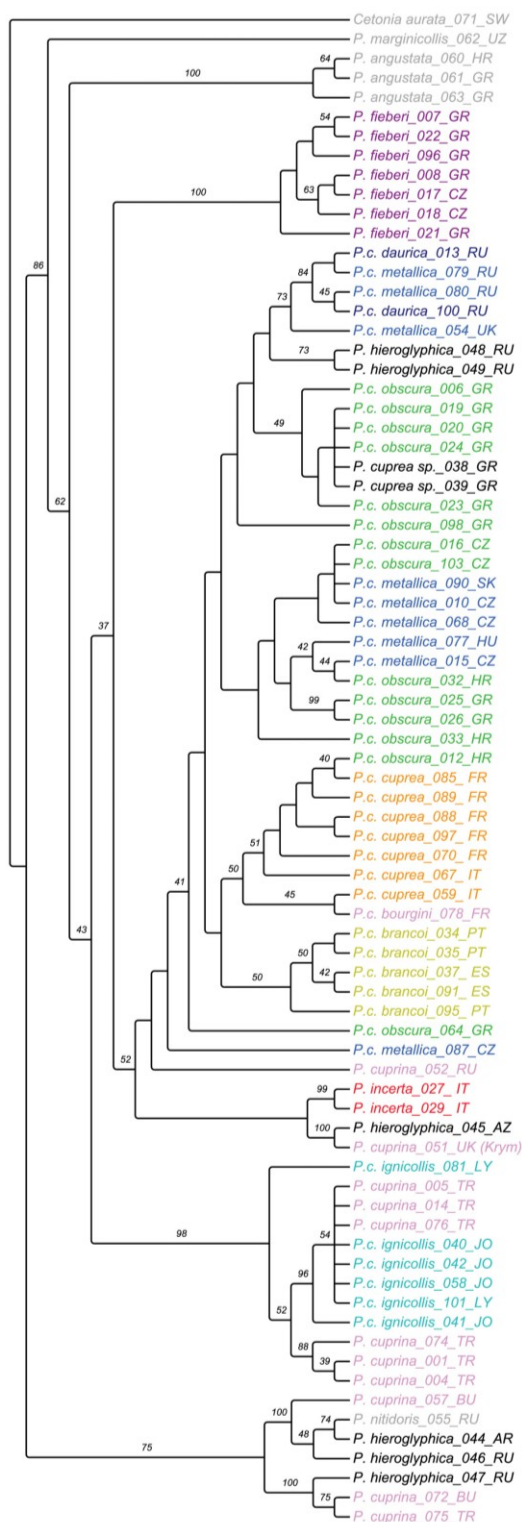
Na Obrázku č. 27 – 29 jsou uvedeny výsledné stromy v pořadí analýz BA, MP, ML pro dataset genu CytB. Získané topologie se na první pohled značně liší. Jednotlivé taxony mají v rámci jednotlivých analýz často velmi proměnlivou pozici. Bayesiánská analýza vyústila v kladogram s výrazně polytomickou strukturou, ostatní vykazovaly velmi nízkou podporou většiny větví. Přesto existuje několik základních trendů, které stojí za to na tomto místě komentovat.

Na rozdíl od analýz založených na datasetu genu COI metodami ML a BA nebyl druh *P. marginicollis* identifikován jako bazální větev, tu tvořila ve všech analýzách skupina tvořená částí zástupců *P. cuprina* a *P. hieroglyphica*. Oba taxony, také obdobně jako u předchozího vykazují polyfyletický charakter. U všech analýz byly identifikovány jasně odlišitelné klády druhů *P. angustata*, *P. fieberi*. Nicméně zatímco *P. angustata* vykazovala poměrně stabilní pozici u báze kladogramu ve všech třech analýzách, byla pozice *P. fieberi* značně variabilní, v případě analýzy ML tvořila dokonce vnitřní skupinu větve tvořené výhradně evropskými jedinci druhu *P. cuprea*.

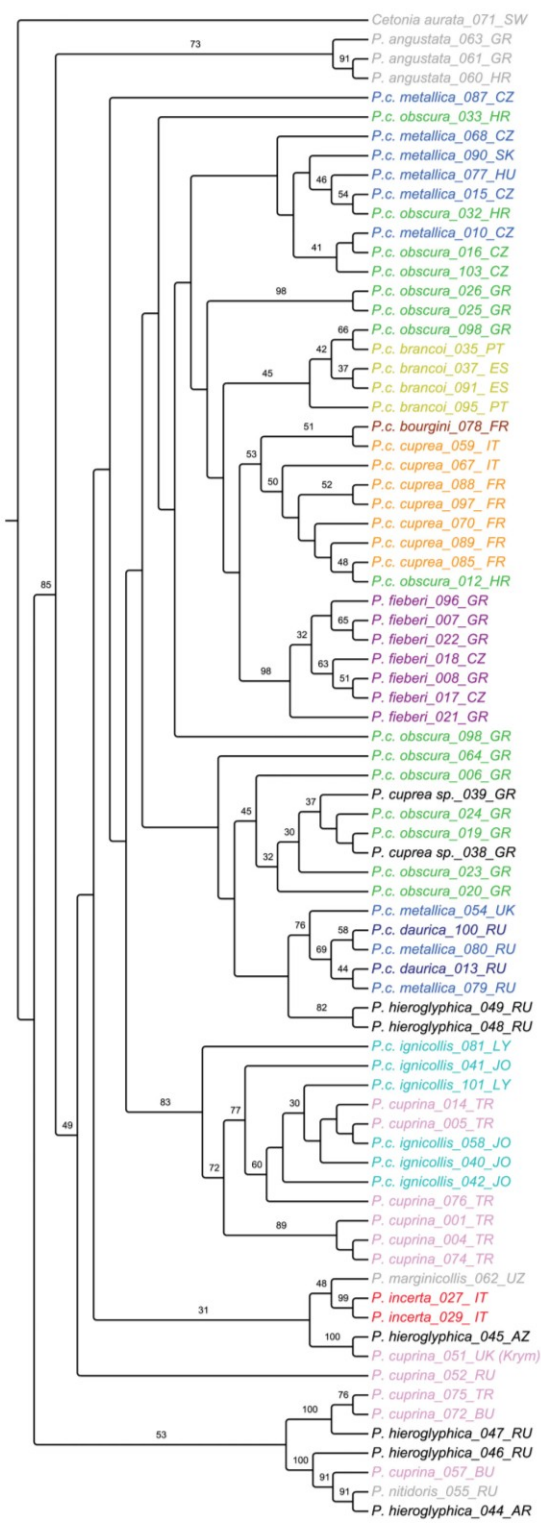
P. incerta ve všech analýzách tvoří klád společně s jedincem druhu *P. cuprina* 051 z Krymu a *P. hieroglyphica* 045 z Ázerbájdžánu. Výsledky BA a ML analýz dokonce do této skupiny řadí i *P. marginicollis*. Nicméně žádná z analýz nenaznačila blízký vztah mezi *P. incerta* a evropskými poddruhy *P. cuprea*.



Obrázek č. 27: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu CytB Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). Posteriorní pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech pro hodnoty $n > 0,3$. Počet generací 10 000 000. Barvy v kládech označující druhy odpovídají barvám v mapkách a haplotypové síti.



Obrázek č. 28: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu CytB metodou Maximum parsimony. Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu >30%. Délka stromu je 385 (CI = 0.561, RI = 0.8657). Barvy v kládech označující druhy odpovídají barvám v mapkách a haplotypové síti.



Obrázek č. 29: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě genu CytB metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Posteriorní pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech pro hodnoty $n > 30\%$. Barvy v kládech označující druhy odpovídají barvám v mapkách a haplotypové síti.

4.4. Dataset konkatenátu genu COI a CytB

4.4.1. Haplotypové sítě

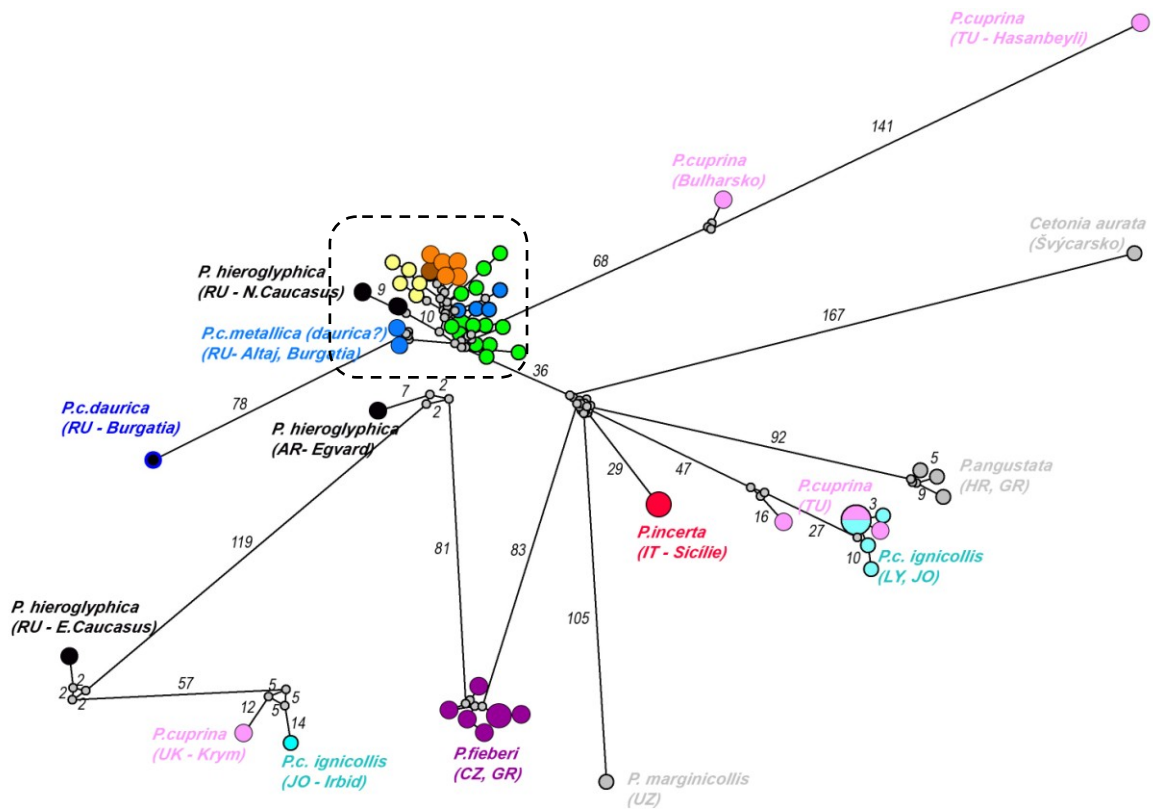
V rámci konkatenátu úseků genů COI a CytB bylo identifikováno celkem z 64 sekvencí 61 haplotypů. Na haplotypové síti (Obrázek č. 30) je patrné shodné rozdělení do klastrů jako u sítě pro gen COI. Analogicky tedy haplotypová síť obsahuje hlavní skupinu tvořenou klastry „evropských“ taxonů *P. cuprea* ssp. (detailnější pohled na výřezu: Obrázek č. 31), ze které vystupují vzdálenější klastry *P. hieroglyphica* (Rusko – Kavkaz) a *P. c. metallica (daurica?)*; Rusko – Altaj, Burgatia). Z této hlavní skupiny dále vystupuje skupina hodně distantních klastrů pocházejících především z Malé Asie, mezi kterými jsou distribuovány taxony *P. cuprina*, *P. hieroglyphica* a *P. c. ignicollis* bez jasného geografického vzoru.

Dále je zde identifikován klastř *P. fieberi*, který bez ohledu na lokalitu vykazuje velkou podobnost haplotypů, stejně tak *P. angustata*.

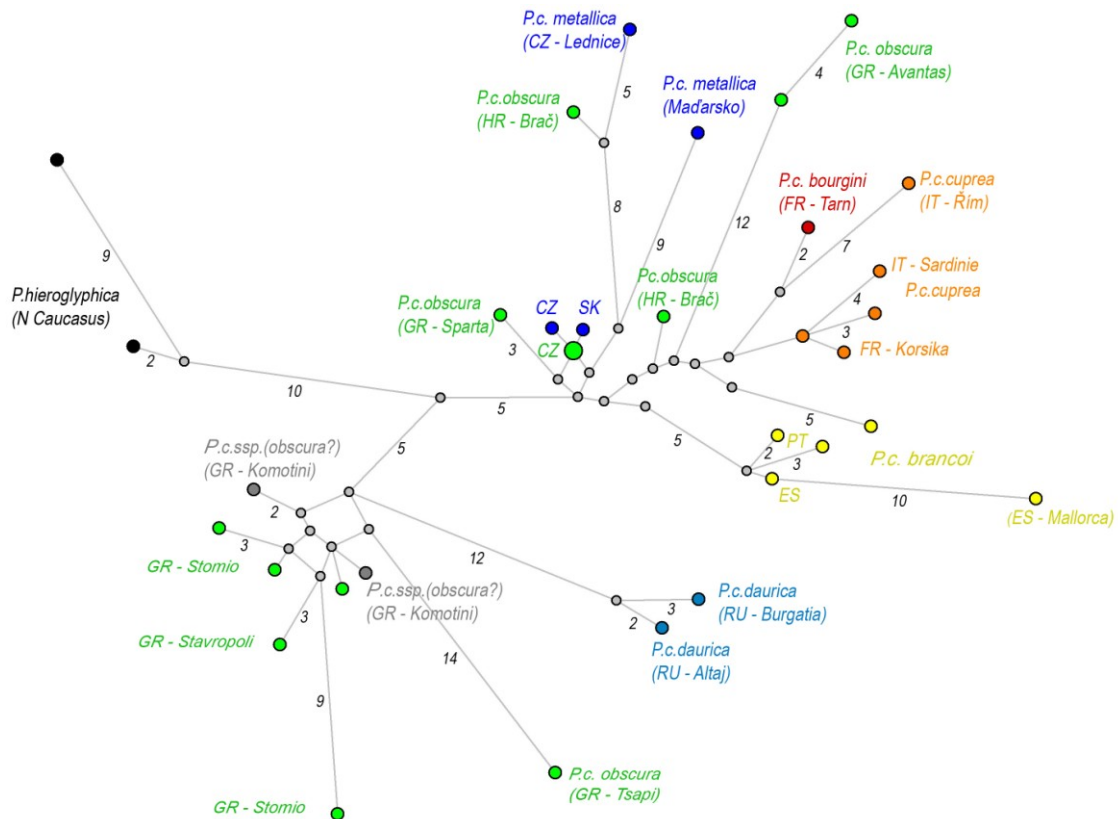
Taxon *P. incerta* je vzdálen od evropských taxonů *P. cuprea* ssp. o 65 mutací a tvoří samostatný jasně distinktní klastř.

Stejně tak jako u sítě pro dataset samostatného genu COI, byly zahrnuty a ponechány taxony *Cetonia aurata*, *P. fieberi*, *P. marginicollis* a *P. angustata* z důvodu srovnání vzájemné distance mezi vzdálenými klastry potenciálně příbuzných druhů.

U detailnějšího pohledu na „evropskou“ skupinu klastrů najdeme stejný vzor uspořádání pro jednotlivé vzorky jako u sítě datasetů COI (viz popis kapitola 4.2.1.).



Obrázek č. 30: Median joining network zobrazující genealogické vztahy mezi haplotypy konkaténátu genu COI a cytB u zkoumaných taxonů druhového komplexu *Potosia cuprea* a příbuzných taxonů. Haplotypy jsou znázorněny barevnými kruhy. Velikost kruhů odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem. Čísla na spojnicích označují počet mutací mezi haplotypy (vyznačeno pro $n > 1$). Přerušovanou čarou je naznačen výřez. Detail a popis výřezu je uveden na Obr. č. 31. Zkratky států zahrnutých v síti jsou uvedeny v Tabulce č.10.



Obrázek č. 31: Median joining network zobrazující genealogické vztahy mezi haplotypy konkatenátu genu COI a CytB - výřez z Obr. č. 30 – vnitřní komplex „evropských“ *Potosia cuprea* ssp., dále jsou zde zahrnuty asijské *P. hieroglyphica* a *P. c. daurica*. Haplotypy jsou znázorněny barevnými kruhy. Velikost kruhů odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem. Čísla na spojnicích označují počet mutací mezi haplotypy (vyznačeno pro $n > 1$). Zkratky států zahrnutých v síti jsou uvedeny v Tabulce č.10.

4.4.2. Fylogenetické stromy

Na obrázku č. 32-34 jsou fylogenetické stromy pro konkatenát genu COI a CytB, jejichž základní topologie je podobná topologii stromů datasetu COI, opět platí, že topologie stromu je značně závislá na použité analytické metodě.

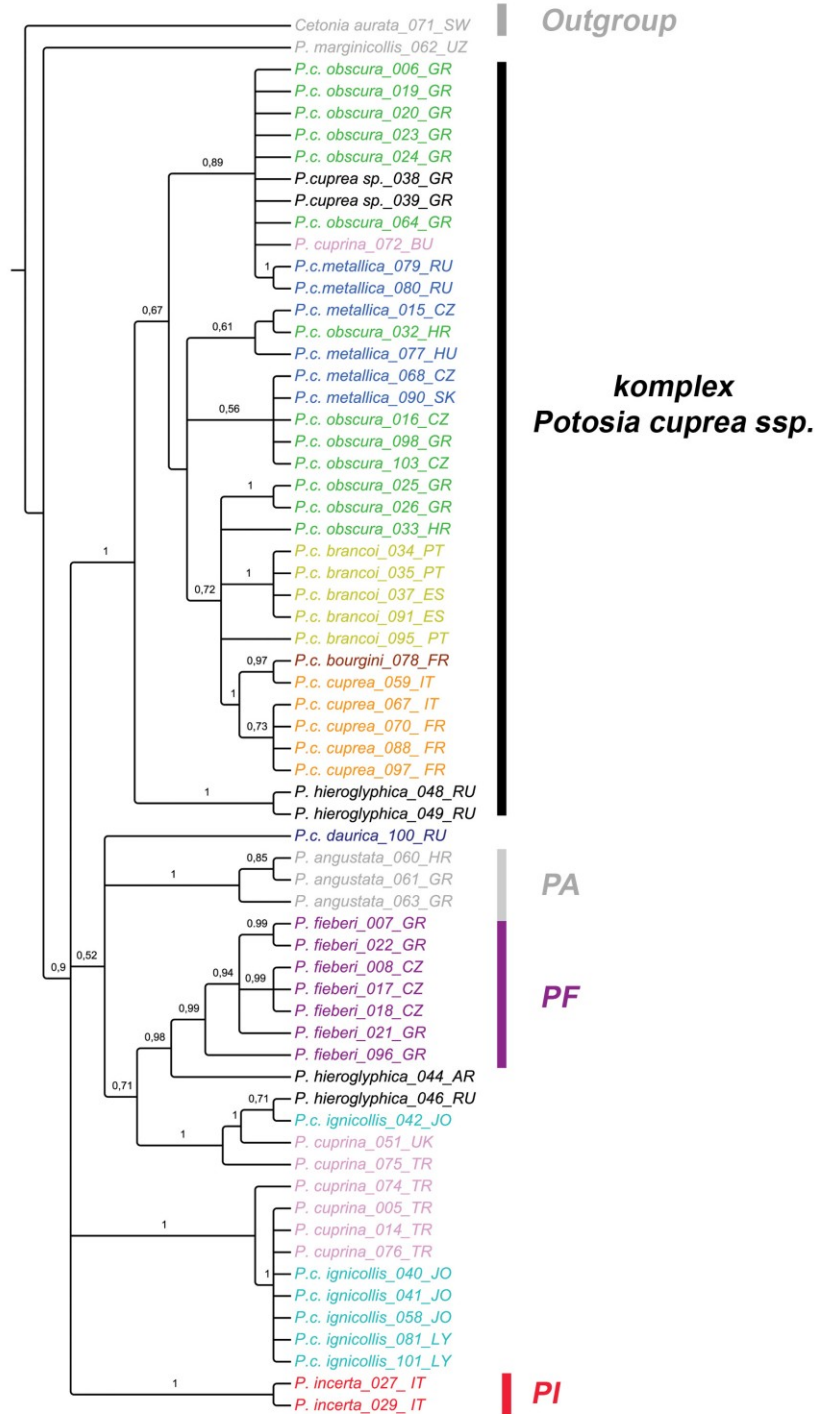
Na rozdíl od datasetu genu CytB se *P. marginicollis* jeví jako sesterská skupina všech studovaných taxonů ve všech třech analýzách.

Taxony *P. fieberi* a *P. angustata*, tvoří opět monofyletické větve, nicméně jejich pozice v rámci jednotlivých stromů je značně variabilní.

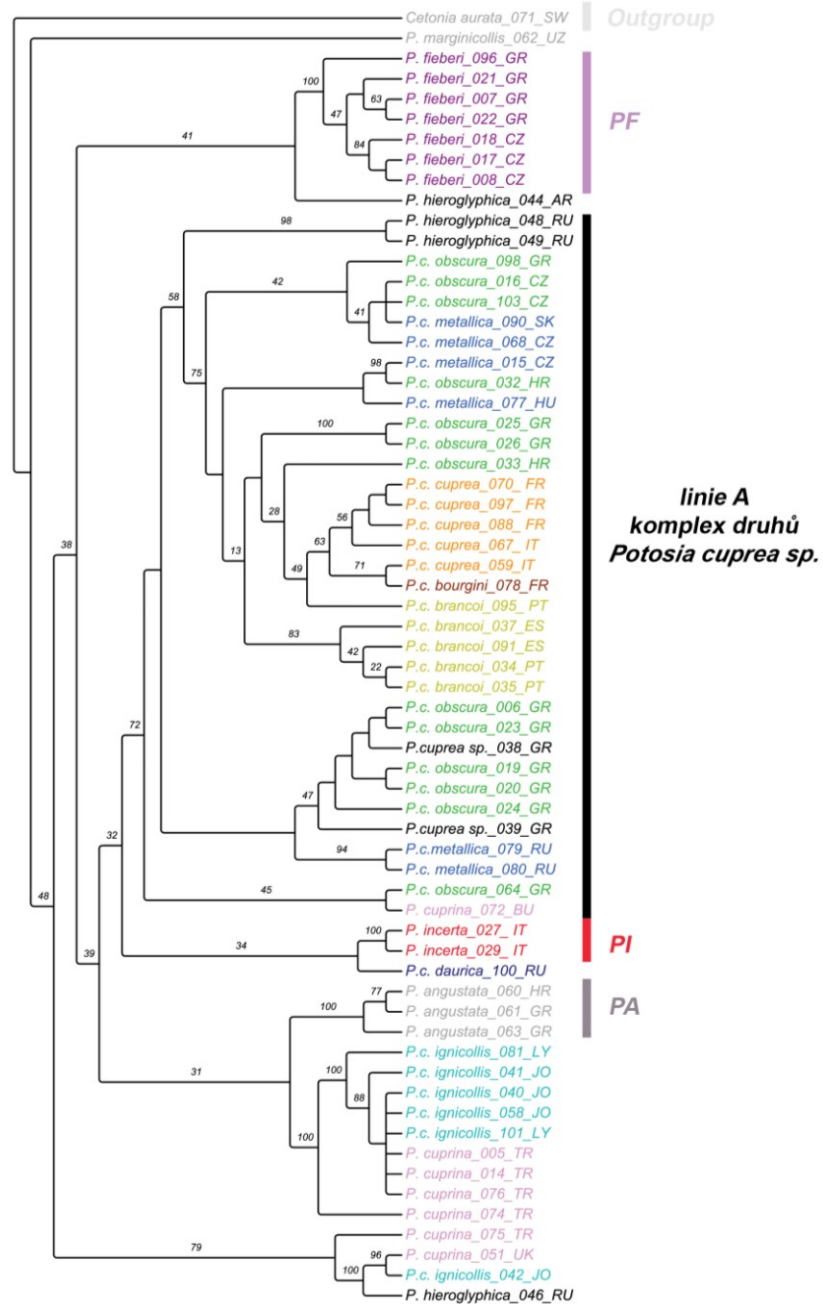
Dataset konkatenátu rovněž odhalil „evropský klád“ tj. větev tvořenou převážně evropskými poddruhy *P. cuprea* doplněnou o sibiřské zástupce řazené k *P. c. metallica* (*daurica*?) a *P. hieroglyphica* (Rusko- Kavkaz). Příbuzenské vztahy uvnitř těchto větví jsou v rámci jednotlivých analýz různé, ale v zásadě kopírují výsledky haplotypových sítí. Taxony *P. c. obscura* a *P. c. metallica* netvoří jasně diferencované větve, ani skupiny identifikovatelné podle nějakého geografického vzoru, oproti tomu jedinci portugalské a španělské *P. c. brancoi* se shlukují do jedné větve a jsou sesterské k *P. c. cuprea* pocházejících z Francie a Itálie a francouzské *P. c. bourgini*.

Taxony *P. cuprina*, *P. c. ignicollis* a *P. hieroglyphica* pocházející z Malé Asie a Krymu jsou rozděleny do dvou kládů a příbuzenské vztahy uvnitř druhů odpovídají datasetu COI. Vzorek *P. cuprina* 72 BU je usazen uvnitř evropské větve *P. cuprea* ssp.

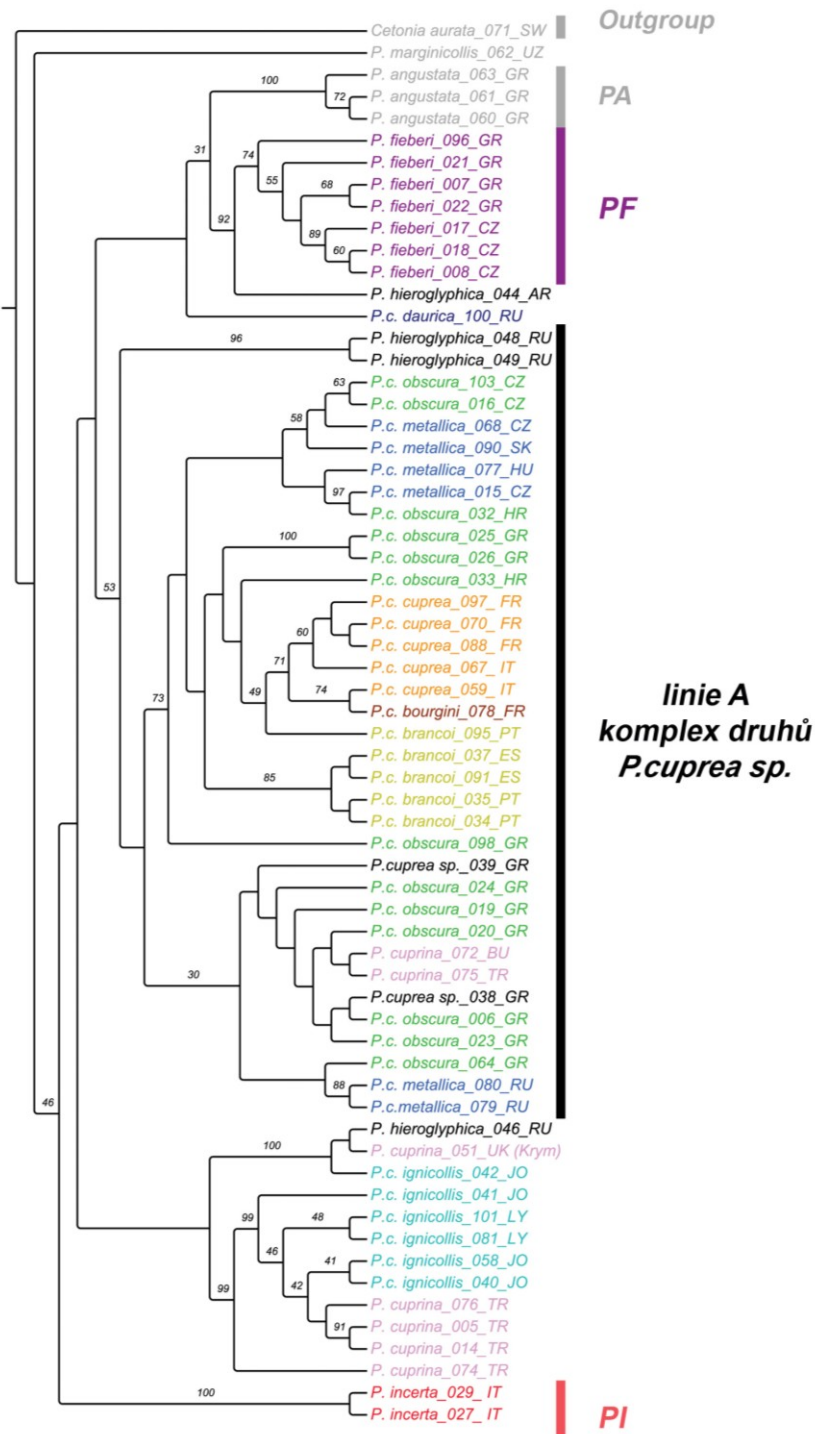
Podobně jako u datasetů COI i zde tvoří *P. incerta* samostatnou větev. V analýzách BA (BH 0,9) zůstává její pozice nerozřešená v rámci bazální polytomie, v ML analýzách je sesterská ke všem ostatní studovaným taxonům s výjimkou *P. marginicollis*, zatímco u MP (BH 32%) je sesterskou skupinou k „evropskému“ druhovému komplexu.



Obrázek č. 32: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkaténátu genu CytB a COI Bayesovskou analýzou (model GTR+I+G). Posterioerní pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech pro hodnoty $n > 0,3$. Počet generací 10 000 000. Barvy v kládech označující druhy odpovídají barvám v mapkách a haplotypové síti.



Obrázek č. 33: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkaténátu genu CytB a COI metodou Maximum parsimony. Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. V uzlech uvedeny hodnoty bootstrapu >30%. Délka stromu je 1245 (CI = 0.4747, RI = 0.7812). Barvy v kládech označující druhy odpovídají barvám v mapkách a haplotypové síti.



Obrázek č. 34: Konsenzuální fylogenetický strom vypočtený na základě konkatenátu genu CytB a COI metodou maximální věrohodnosti (model GTRGAMMA). Bylo konstruováno 1000 bootstrapových replikátů. Posterioří pravděpodobnosti uvedeny v hlavních uzlech pro hodnoty $n > 30\%$. Barvy v kládech označující druhy odpovídají barvám v mapkách a haplotypové síti.

5. DISKUZE

Mitochondriální DNA (mtDNA) představuje jen velmi malou část genomu celého organismu, a přesto se stala nejpůvodnějším markerem studií molekulární diversity a fylogenetiky posledních třiceti let (Galtier et al. 2009). Jedním z hlavních důvodů jejího širokého uplatnění je vysoká mutační rychlost a s tím spojená schopnost odhalit i jemné divergence mezi druhy či populacemi jednoho druhu. Dalšími výhodami jejího uplatnění je maternální dědičnost a snadná amplifikovatelnost, protože v jedné buňce je přítomno více kopií, také neobsahuje introny a obsahuje velice málo duplikací a intergenových oblastí. Prakticky všechny molekulární studie v oblasti živočišných druhů se v určité fázi zabývají studii haplotypů v rámci mitochondriálních genů (Galtier et al. 2009). Porovnáním těchto haplotypů můžeme získat přehled o populační struktuře a demografii a popsat tak probíhající mikroevoluční procesy.

S rozvojem molekulárních metod stále přibývá studií zabývajících se fylogenezí a fylogeografií listorohých brouků, kde díky své variabilitě jako nejčastěji využívaný gen figuruje mitochondriální COI (Sole 2005, Audisio et al. 2007, Kubota et al. 2011, Ptaszyńska et al. 2011, Giannoulis et al. 2012), případně CytB nebo kombinace těchto dvou genů (Muraji et al. 2008).

5.1. Fylogenetické vztahy v rámci rodu *Potosia*

V současnosti je v rámci podrodu *Potosia* popsáno přibližně 30 druhů (Krajčák 1998). Do diplomové práce bylo zahrnuto 14 taxonů z tohoto komplexu (viz kapitola 4.1. Profil vstupních dat), u kterých byla snaha získat sekvence genů CytB a COI z co nejširšího areálu výskytu. U některých vzorků nebyly získány sekvence v požadované kvalitě ani po opětovné amplifikaci. To mohlo být z důvodů špatného skladování vzorků, nebo z důvodu jejich stáří (hlavně u suchých sbírkových položek). U takových vzorků může snáze dojít v průběhu amplifikace k jejich kontaminaci. Podezřelé vzorky musely být proto z analýz vyřazeny. V datasetu byla nicméně ponechána řada sekvencí získaných ze suchého materiálu, ačkoliv tyto sekvence častojevily vysokou míru poškození, v datasetu byly ponechány pro svou taxonomickou informační hodnotu (jednalo se o těžko získatelné a vzdálené taxony).

Jak je patrné z mapy (Obrázek č. 21), kde jsou zaznamenány lokality odchytu jedinců, do diplomové práce nebyl (a z technických a finančních důvodů ani nemohl být) zahrnut vyčerpávající vzorek lokalit výskytu zkoumaných taxonů. I když mé výsledky nepředstavují vyčerpávající přehled evoluce druhového komplexu *P. cuprea* a příbuzných druhů, mohou leccos naznačit o jeho taxonomii a fylogenezi na území Evropy.

Jak již bylo řečeno, byla snaha pro analýzy získat části dvou mitochondriálních genů, přičemž lepší vhled do problematiky přinesly informace obsažené v datasetu genu COI nebo kombinace genu CytB a COI. Dataset genu CytB nevykazoval příliš velkou variabilitu a jako samostatný neměl pro analýzy velkou vypovídající hodnotu, proto se v diskusi budu zabývat výsledky COI a konkatenátu CytB a COI.

Pro gen COI byly získány sekvence u 68 jedinců, pro konkatenát genu CytB a COI u 64 jedinců. Nepodařilo se získat sekvence genu COI u jediného exempláře zastupujícího druh *P. nitidioris*, tudíž je tento taxon zahrnut do analýz datasetu pro CytB. Dále se nepodařilo získat použitelné sekvence u jediných exemplářů taxonů *P. ikonovi* a *P. splendidula* a do analýz nebyly vůbec zahrnuty.

Topologie stromů a haplotypové sítě odhalují obdobnou vnitrodruhovou a mezidruhovou topologii.

V následující části se budu vyjadřovat k jednotlivým taxonům ze zkoumaného komplexu druhů. Jak již bylo několikrát naznačeno je problematika klasifikace komplexu druhů okolo *P. cuprea* velmi složitá. Proto pro zopakování připomenu základní koncepty klasifikace u Medvedeva (1964) a Mikšiče (1987), neboť právě vzájemná nekompatibilita obou klasifikací je jednou z příčin současného zmatku.

V roce 1964 ve své práci zabývající se faunou Sovětského svazu, povyšuje Medvedev (1964) devět dosavadních poddruhů komplexu *P. cuprea* na druhovou úroveň. Vznikly tak samostatné taxony: *Potosia cuprea*, *P. splendidula*, *P. fausti*, *P. metallica*, *P. bessarabica*, *P. cuprina*, *P. hieroglyphica*, *P. caucasica* a *P. marginicollis*. Mikšić (1987) toto dělení zavrhuje, a všechny druhy s výjimkou *P. marginicollis* klasifikuje opět jako poddruhy *P. cuprea*. V jeho podání obsahuje komplex *P. cuprea* 16 taxonů na poddruhové úrovni (viz kapitola 1.3. Druhový komplex *Potosia cuprea*).

5.1.1. „Evropský klád“ *P. cuprea*: *P. cuprea* „sensu stricto“?

Analýzy založené na COI a konkaténátu CytB a COI konsistentně odhalovali existenci „evropského kládu“ *P. cuprea* zahrnující poddruhy *Potosia cuprea cuprea*, *P. c. brancoi*, *P. c. bourgini*, *P. c. obscura* a *P. metallica* (včetně dvou sibiřských zástupců vykazujících přechody mezi ssp. *metallica* a *daurica*). Jednotlivé taxony z této skupiny vykazovaly podobně jako jejich sesterská větev tvořená dvěma kavkazskými zástupci *P. hieroglyphica* poměrně nízkou variabilitu a ani jejich vzájemné nekorigované p-distance nenaznačují hlubší divergenci v rámci větve.

5.1.2. Západní větev: *Potosia cuprea cuprea*, *P. c. brancoi*, *P. c. bourgini*

Analyzované vzorky těchto poddruhů reprezentativně pokrývají oblasti rozšíření. Ve všech fylogenetických stromech mají jedinci *P. c. cuprea* tendenci vytvářet společné větve s taxony *P. c. bourgini* a *P. c. brancoi*. Stejně tak v haplotypové síti (Obr. č. 23, 31) vytváří dva společné klastry, ze kterých je patrný geografický pattern, přičemž blíže *P. c. cuprea* je taxonu *P. c. bourgini*. Divergence *P. c. cuprea* od *P. c. bourgini* je 0,6 %. Podle genetické vzdálenosti, u které je pro COI stanovena hranice 2-3% (Hebert 2004), by se tyto dva taxony nerozlišovaly na druhy. Stejně je to pro genetickou vzdálenost *P. c. cuprea* a *P. c. brancoi*, která je 1,1 %. Výsledky provedených analýz potvrdili dosavadní klasifikaci těchto západoevropských taxonů jako poddruhy *P. cuprea* (Baraud 1992, Krajčík 1998) a vyvrací tak pojetí Löbla a Smetany (2006) které taxony *bourgini* a *brancoi* klasifikují jako poddruhy *P. metallica*.

V rámci analýz byl zahrnut jedinec pocházející z lokality Simplon Pass ve Švýcarsku s označením *P. cuprea* ssp. 073_SW, který nevykazoval jasně determinovatelné znaky v této lokalitě zastoupených poddruhů. Dle výsledků analýzy podle haplotypové sítě zapadá do klastru a kládů *P. c. cuprea* a *P. c. bourgini*. Vzhledem k tomu, že daná lokalita leží v nadmořské výšce 2005 m n. m., tak vylučuji taxon *P. c. bourgini* (Décobert et Stéfani 2011) a jelikož také postrádá typicky skelně lesklý vzhled tak by nemělo jít ani o jedince *P. c. cuprea*. Mohlo by tedy jít o nějakou další přechodovou formu, nicméně pro přesnější tvrzení je potřeba lepší vzorkování dané oblasti a další analýzy.

5.1.3. *Potosia cuprea metallica*

V rámci evropských skupin taxonů nevykazoval tento poddruh ani v haplotypové síti, ani ve fylogenetických stromech samostatnou pozici. Vytváří společný klád i klastr

s jedinci poddruhu *P. c. obscura* z České republiky, Slovenska i Maďarska. Divergence mezi těmito dvěma taxony je 1,5% což není hodnota, která by byla signifikantní a podporovala zařazení v rámci samostatného druhu. Výsledky provedených analýz vyvrací oprávněnost klasifikace Medvedeva (1964), kterou také ve své práci zpochybnil již Mikšić (1987) a ponechávají tento taxon na poddruhové úrovni. Stejně tak byla i vyvrácena klasifikace autorů Löbla a Smetany (2006), kteří taxony *bourgini* a *brancoi* klasifikují jako poddruhy *P. metallica*.

5.1.4. *Potosia cuprea obscura*

Zlatohlávek *P. c. obscura* patří mezi další evropské poddruhy spadající do komplexu *P. cuprea* „sensu stricto“, což potvrdili i výsledky analýz. Haplotypová síť identifikovala mezi studovanými vzorky čtyři nezávislé skupiny. Dvě skupiny jedinců z České republiky, Chorvatska, Řecka (okolí Sparty – Peloponés) klastrují dohromady s jedinci determinovanými jako *P. c. metallica* pocházejících z České republiky a Slovenska. Tato skutečnost by mohla být ukázkou jevu, který popisují autoři Mikšić (1987) a Rataj (1996), a to že taxony *P. c. metallica* a *P. c. obscura* se ve střední Evropě mohou křížit a vznikají zde přechodové formy.

Dále je zajímavý samostatný klastr jedinců z řecké Thrákie (Avantas, Lavara), což jsou lokality ležící u řeckých hranic s Tureckem. Tyto jedinci se vyznačují odlišným zbarvením než ostatní řecké *P. c. obscura* a mohlo by jít také o přechodovou formu. Divergence mezi jedinci pocházejícími z řeckých oblastí Stomio, Stavroupoli, Larissa a jedinci z Avantasu a Lavary činí 2 %.

Poslední klastr zahrnuje řecké *P. c. obscura*, mezi které zapadají i dva vzorky z oblasti Komotini, které vykazovaly také neobvyklé znaky *P. c. obscura* (bronzové zbarvení krovek a štítu). V analýzách byly označeny jako *P. cuprea* ssp. 38 GR a *P. cuprea* ssp. 38 GR. Dle jasného zařazení v řeckém klastru i kládu *P. c. obscura* analýzy potvrzují, že jde o tento poddruh.

5.1.5. *Potosia incerta*

Sicilský zlatohlávek *P. incerta* je jediný čistě evropský taxon, původně řazený do komplexu *P. cuprea*, který podle výsledku analýz nezapadá do komplexu *P. cuprea*. Jak v haplotypových sítích, tak ve fylogenetických stromech tvoří jasně diferencovanou větev s nejvyšší podporou v BA pro konkatenát CytB a COI (BH) 0,9 a divergencí 7,5 %. Od

ostatních evropských taxonů je jasně vzdálen a nevykazuje s nimi žádné podobnosti. Výsledky analýz podpořili klasifikaci Krajčíka (1998) a Löbla a Smetany (2006), kteří tento taxon berou jako samostatný druh.

5.1.6. *Potosia cuprea daurica*

Taxon *P. c. daurica* byl v analýzách reprezentován třemi vzorky z odlehlých lokalit Sibíře. U fylogenetických stromů spadaly vzorky s označením *P. cuprea metallica* (*daurica?*) 079_RU (Altaj) a *P. c. daurica* 080_RU (Burgatia) do „evropské“ skupiny taxonů a v haplotypové síti vytvářely samostatný klastř v rámci „evropské“ skupiny. Výjimku tvořil vzorek s označením *P. c. daurica* 100_RU (Burgatia), který tvořil samostatný klád s variabilní pozicí v rámci ostatních studovaných taxonů. U haplotypové sítě pro dataset COI tvořil samostatný klastř vzdálený od evropské skupiny, zatímco u sítě pro dataset CytB a COI tvořil společný klastř, ale od jedince *P. c. daurica* 080_RU ze stejné lokality byl vzdálený o 78 mutací. Tato skutečnost mohla být způsobena kontaminací nebo nekvalitní sekvencí získanou ze suchého materiálu. Nicméně pro ozřejmění problematiky vnitřního postavení *P. c. daurica* v rámci studovaných taxonů by bylo zapotřebí větší počet vzorků zahrnující reprezentativně oblasti rozšíření a další analýzy.

5.1.7. *Potosia cuprina*, *P. hieroglyphica*, *P. cuprea ignicollis*

Asijské druhy *P. cuprina*, *P. hieroglyphica* a *P. c. ignicollis* (areál *P. cuprina* zasahuje i do JV a V Evropy) se v rámci konstruovaných fylogenetických stromů polytomicky slučovaly v rámci dvou až tří větví bez jasného geografického vzoru. Stejně tak v haplotypových sítích vytvářely tyto taxony velmi nejasné a vzdálené skupiny klastřů. Můžeme říct, že na základě našich datasetů sejevily jako polyfyletické.

Taxon *P. cuprina* reprezentovaly vzorky z několika oblastí Turecka, Bulharska a Ukrajiny (Krym). Vzorek s označením *P. cuprina* 072_BU pocházející z Bulharska jako jediný taxon *P. cuprina* zapadal do „evropského“ kládu, patrně půjde o poddruh *P. c. obscura* se znaky *P. cuprina*. Divergence uvnitř této skupiny determinované jako *P. cuprina* dosahuje vysokých hodnot: 9,3%. Stejně tak uvnitř skupiny jedinců z lokalit Jordánska a Libye u *P. c. ignicollis* 6,9% a *P. hieroglyphica* (lokality: Rusko, Arménie, Ázerbájdžán) 12,7%. To může naznačovat možné chybné zařazení taxonů do jednotlivých skupin nebo chybné pojetí těchto druhů jako takové. Ze získaných výsledků ale vyplývá,

že taxon (y) označované jako *P. cuprina* nevykazují bližší příbuznost k jedincům skupiny *P. cuprea* „sensu stricto“. To se ale nadá s určitostí tvrdit o jedincích *P. hieroglyphica*, neboť jedinci z Kavkazu tvořily sesterskou linii ke zmiňované skupině, zatímco ostatní nevykazovali s *P. cuprea* „sensu stricto“ bližší příbuzenské vazby. V případě *P. cuprina* se tedy Medvedevovo (1964) vyčlenění druhu z komplexu *P. cuprea* jeví jako opodstatněné.

Situace v rámci vnitřního členění těchto maloasijských taxonů je složitá, což uvádí i Sabatinelli (2008), poukazující na množství chromatických forem zlatohlávka *P. c. ignicollis* v oblasti Levantu (Sýrie, Libanon, Jordánsko, Palestina, Izrael a Sinaj).

Pro ozřejmění této problematiky by bylo zapotřebí větší počet vzorků z areálů výskytů a dalších analýz.

5.1.8. *Potosia marginicollis*

Fylogenetické stromy vypočtené na základě genu COI a konkatenátu genu CytB a COI ukazují jako bazální klad tvořený *P. marginicollis*. U tohoto druhu byla potvrzena oprávněnost povýšení na druhovou úroveň Medvedevem (1964).

5.1.9. *Potosia fieberi*, *Potosia angustata*

U všech fylogenetických stromů dobře diferencuje samostatný klad *P. fieberi*, který je i morfologicky dobře odlišitelný od ostatních druhů v analýzách. *Potosia fieberi* byla až do poloviny minulého století považována rovněž za příslušníka komplexu *cuprea* ssp. Nicméně již Mikšić (1987) považuje tento názor za velmi zastaralý.

Zajímavá je možnost záměny *P. incerta* a *P. fieberi*. Jelikož je *P. fieberi* často považována za striktně středoevropský taxon, byli například jedinci ze střední Itálie mylně považováni za *P. incerta*, proto je nutno přistupovat k nálezům *P. incerta* ze střední Itálie s velkou obezřetností (Krajčák 2009).

Dalším samostatným a jasně diferencovaným kladem je větev jedinců *P. angustata* pocházejících z Chorvatska a Řecka. Samostatná pozice obou taxonů není překvapení, i když výsledky analýz neodhalily původně očekávanou bazální pozici obou taxonů v rámci studované skupiny.

6. ZÁVĚRY

- Byly získány sekvence pro mitochondriální geny COI (od 68 jedinců; 779 bp) a CytB (od 78 jedinců; 382 bp) ze 14 taxonů rodu *Potosia*.
- Na základě studovaného vzorku taxonů byla identifikována skupina pracovníě nazývaná *P. cuprea* „sensu stricto“ nebo také „evropský klád“ *P. cuprea*. Do této skupiny na základě našich výsledků patří tyto evropské poddruhy: *P. c. cuprea*, *P. c. brancoi*, *P. c. bourgini*, *P. c. obscura* a *P. c. metallica* a dva zástupci ze Sibíře, kteří vykazují přechody mezi ssp. *metallica* a *daurica*. Jednotlivé taxony v rámci komplexu vykazovaly poměrně nízkou variabilitu a ani jejich vzájemné nekorigované p distance nevykazují hlubší divergenci v rámci větve.
- *P. c. metallica* nelze podle našich výsledků pokládat za samostatný druh.
- *P. c. obscura* spadá do evropského komplexu *P. cuprea* sensu stricto a zároveň byla potvrzena možná hybridizace s *P. c. metallica* na styčných územích areálu výskytu.
- Nezařazení jedinci *Potosia cuprea* ssp. 038 a 039 z řeckého Komotini byli určeni jako *P. c. obscura*.
- *P. incerta* nezapadá do komplexu *P. cuprea*. Podle výsledků molekulárních analýz tvoří jasně diferenciovanou větev. Rozdílnost mezi *P. incerta* a evropskými poddruhy *P. cuprea* ukazuje genetická vzdálenost, která činí 7,5 %. Výsledky podpořili klasifikaci taxonu jako samostatného druhu.
- Molekulární analýzy potvrzují oprávněnost povýšení *P. marginicollis* na druhovou úroveň. Zároveň výsledky odhalily bazální pozici *P. marginicollis* v rámci studovaného komplexu.

- *P. cuprina*, *P. hieroglyphica* a *P. c. ignicollis* se podle našich výsledků jeví jako polyfyletické taxony. Pro detailnější studie fylogenetických vztahů je potřeba doplnit dataset o větší počet vzorků z dalších oblastí výskytu. *P. cuprina* nevykazuje bližší příbuznost k druhu *P. cuprea*.
- Na základě našich analýz je zřejmé, že ani Mikšičovo (1987) ani Medvedevovo (1964) pojetí komplexu *P. cuprea* pravděpodobně neodpovídá skutečným fylogenetickým vztahům v rámci skupiny. Naopak klasifikace užívaná Krajčíkem (1998) nejlépe postihuje získané výsledky.

7. LITERATURA

Alexis, R. et Delpont M., 1996: Contribution a l'étude du genre *Potosia* Mulsant, 1871. Description de *Potosia besucheti* nov.sp. et de *Potosia angustata orientalis* nov.ssp. (Coleoptera, Scarabaeoidea, Cetoniidae). *Lambillionea*, XCVI, 3.

Alexis, R. et Delpont, M., 2000: Première contribution au démembrement du groupe *Potosia cuprea* Fabricius. *Cetoniimania*. Vol. 1, No. 1, IX, 2000.

Audisio, P., Brustel, H., Carpaneto, G. M., Coletti, G., Mancini, E., Piattella, E., Trizzino, M., Dutto, M., Antonini, G., De Biase, A. 2007: Updating the taxonomy and distribution of the European *Osmoderma*, and strategies for their conservation (Coleoptera, Scarabaeidae, Cetoniinae). *Fragmenta entomologica, Roma*, 39 (2): pp.273-290.

Balke, M., Ribera, I. et Vogler, A. P., 2004: MtDNA phylogeny and biogeography of Copelatinae, a highly diverse group of tropical diving beetles (Dytiscidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 866–880.

Balthasar, V., 1956: Brouci listoroží I. - Lamellicornia I – Pleurosticti, Fauna ČSR, sv. 8, Praha, 288 pp.

Bandelt, H. J., Forster, P. et Rohl, A., 1999: Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

Baraud, J., 1977: Coléoptères Scarabaeoidea. Faune de l'Europe occidentale. Nouvelle Revue d'Entomologie, Toulouse, 352 pp.

Baraud, J., 1992: Coléoptères Scarabaeoidea d'Europe. Faune de France. France et régions limitotrophes n° 78. Fédération française des sociétés de sciences naturelles. Société Linnéenne de Lyon. Pp. 850.

Décobert, O., 2009: An interesting form of *Protaetia cuprea metallica*. *Scarabs* 37:1-2.

- Décobert, O. et Stefani, P., 2011:** The *Protaetia cuprea* komplex in France and surrounding countries (Coleoptera Cetoniidae). *Scarabs* 61: 1-6.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glemin, S., Hurst, G. D. D., 2009:** Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18: 4541-4550.
- Giannoulis, T., Dutrillaux, A.-M., Dutrillaux, B., Stamatis, C. et Mamuris, Z., 2012:** *Cyclocephala* evolution in Lesser West Indies indicates a Northward colonization by *C.tridentata*. *Bulletin of Entomological Research* 102:325-332.
- Grebennikov, V. V. et Scholtz, C. H., 2004:** The basal phylogeny of Scarabaeoidea (Insecta : Coleoptera) inferred from larval morphology. *Invertebrate Systematics* 18: 321-248.
- 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.
- Harrison, C. J., Corley, S. B., Moylan, E. C., Alexander, D. L., Scotland, R. W. et Langdale, J. A., 2005:** Independent recruitment of a conserved developmental mechanism during leaf evolution. *Nature*, 434, 509–514.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemplak, T. S., Francis C. M., 2004:** Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol* 2: e312.
- Hůrka, K., 2005:** Brouci České a Slovenské republiky, Nakladatelství Kabourek, Zlín.
- Krajčík, M., 1998:** Cetoniidae of the World: Catalogue - Part I. (Coleoptera: Cetoniidae). Typos Studio Most, Czech Republic.
- Krajčík, M., 2009:** Checklist of the subgenus *Netocia* Costa 1852. *Animma.X Supplement* 1:1-44.

Krikken, J., 1984: A new key to the suprageneric taxa in the beetle family Cetoniidae, with annotated lists of the known genera. *Zoologische Verhandelingen* No. 210: 1-75.

Kubota, K., Nagahata, Y., Ikeda H., Kubota, N., Otebe, H. et Umetsu, K., 2011: Diversification process of stag beetles belonging to the genus *Platycerus* Geoffroy (Coleoptera: Lucanidae) in Japan based on nuclear and mitochondrial genes. *Entomological Science* 14, 411–427.

Kumar, S., Skjæveland, Å., Russell, J. S., Enger, P., Ruden, T., Mevik, B. H., Burki, F., Botnen, A. et Tabrizi, K.S., 2009: AIR: A batch-oriented web program package for construction of supermatrices ready for phylogenomic analyses. *BMC Bioinformatics* 2009, 10:357.

Larget, B. et Simon, D., 1999: Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 16:750-759.

Löbl, I. et Smetana, A. (eds.), 2006: Catalogue of Palaearctic Coleoptera, Volume 3. Stenstrup, Apollo Books, 690 pp.

Medvedev, S. I., 1964: Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae, Valginae. Fauna SSSR. 376 pp. (in Russian).

Mikšić, R., 1987: Monographie der Cetoniinae der Paläarktischen und Orientalischen region. Coleoptera : Lamellicornia-Band 4. Graficki zavod Hrvatske :608p.

Nikolajev, G. V. et Puntsagdulam, 1985: Lamellicorns (Coleoptera, Scarabaeoidea) of the Mongolian People's Republic. pp.294.(in Russian).

Nikolajev G. V., 1987: Platinchatousye zhuki (Coleoptera: Scarabaeoidea) Kazakhstana i Srednei Azii [Scyrybaeidea (Coleoptera) of Kazakhstan and Middle Asia]. Izd. Nauka KazzSSR, Alma-Ata, 232 pp (in Russian).

Page, R. D. M., 1996: TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357–358.

Panin, S., 1957: Fauna Republicii Populare Romine. Coleoptera. Scarabaeidae. 315 p., 36 pls, cloth. (in Rumanian).

Posada, D., 2008: jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

Ptaszyńska, A. A., Łętowski, J., Gnat, S. et Małek, W., 2011: Application of COI sequences in studies of phylogenetic relationships among 40 Apionidae species. *Journal of Insect Science*: Vol. 12. 16.

Rataj, K., 1996: Zlatohlávkovití (Cetoniidae) V. Cetoniini druhy palearktické oblasti. 175 pp., illustr. (in Czech, with description of new species in English).

Ražov, J., Barić, B., Dutto, M., 2009: Fauna of the Cetoniid beetles (Coleoptera, Cetoniidae) and their damage on peach fruits in orchards of Northern Dalmatia, Croatia. *Entomologica Croatica*, Vol. 13, No.2: 7-20.

Ronquist, F. et Huelsenbeck, J. P., 2003: MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.

Sabatinelli, G., 2008: The Scarabs of the Levant: Syria, Lebanon, Jordan, Palestine, Israel and Sinai [online]. Dostupné z WWW: <http://www.glaphyridae.com/Cetoniinae/Cetoniinae.html>

Sakai, K. et Nagai, S., 1998: *The Cetoniine Beetles of the World*. Mushi-Sha, Tokyo. 421 pp., 144 plates.

Shokhin, I. V., 2007: Contribution to the fauna of lamellicorn beetles of southern Russia, with some nomenclatural changes in the family Scarabaeidae. *Caucasian Entomological Bulletin* 3(2):105-185.

Schenkling, S., 1921: Scarabaeidae: Cetoniinae. *Coleopterorum Catalogus* 72: 1-431.

Scholz, C. H. et Grebennikov, V. V., 2005: 12. Scarabaeiformia Crowson, 1960, pp. 345–425. In: Beutel R. G. et Leschen R. A. B. (eds): Handbook of Zoology. A Natural History of the Phyla of the Animal Kingdom. Vol. 4 Arthropoda: Insecta, Part 38. Coleoptera, Beetles Vol. 1: Morphology and Systematics (Archostemata, Adephaga, Myxophaga, Polyhaga partim. Walter de Gruyter, Berlin – New York.

Silvestro, D. et Michalak, I., 2010: raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. available from: <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.

Smetana, A. et Smith, A. B. T., 2006: Type species designations and other nomenclatural notes on Palaearctic Melolonthinae and Cetoniinae (Coleoptera: Scarabaeoidea: Scarabaeidae). *Zootaxa*,1220:45-53.

Sole, C. L., Scholtz, C. H., Bastos, A. D. S., 2005: Phylogeography of the Namib Desert dung beetles *Scarabeus (Pachysoma) MacLeay* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Biogeography* 32: 75-84.

Stamakis, A., 2006: RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688 – 2690.

Stöver, B.C. et 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. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Šípek P. et Král D., 2012: Immature stages of the rose chafers (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae): a historical overview. *Zootaxa* 3323: 1–26.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24 (8): 1596-1599.

Tauzin P., 2007: Chorologie et éco-éthologie de *Protaetia* (*Potosia*) *fieberi* Kraatz 1880 en France (Coleoptera, Cetoniinae, Cetoniini). *Cetoniimania*, volume N° 3 et.

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.

8. PŘÍLOHY

Příloha č. 1

Zde přikládám kompletní seznam použitého materiálu. Jednotlivé vzorky byly označeny kódem s číslem vzorku a zkratkou taxonu a státu, ze kterého taxon pochází. Ve druhém sloupci je uveden celý název taxonu, dále stát a lokalita odchyty, GPS souřadnice lokality (není u všech jedinců), datum sběru a způsob skladování. Poslední dva sloupce vyjadřují, zda byla k danému genu získána sekvence (1), pokud ne (0). Barva kódu vzorku odpovídá barvám v mapkách, haplotypových sítích a fylogenetických stromech.

Kód	Taxon	Stát	Lokalita	GPS	Datum	Způsob skladování	COI	CytB
001Cu_TR	<i>Potosia cuprina</i>	Turecko	NW TR, Ayvacik env.	N 39°35'21.080", E 26°24'14.405"	26. 9. 2006	96%EtOH	0	1
002PF_CZ	<i>Potosia fieberi</i>	Česká rep.	Bohemia centr., Velký Osek	N 49°23'53.469", E 13°40'1.303"	06/2008	96%EtOH	1	0
004Cu_TR	<i>Potosia cuprina</i>	Turecko	TR central, Kayseri env.	N 38°43'49.106", E 35°23'17.064"	07/2007	96%EtOH	0	1
005Cu_TR	<i>Potosia cuprina</i>	Turecko	Erdemli env.	N 36°38'23.128", E 34°18'14.819"	2002	96%EtOH	1	1
006PO_GR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Řecko	Thessaly, Mt.Ossa, Stomio	N 39°52.779', E 22°43.191'	06/2007	96%EtOH	1	1
007PF_GR	<i>Potosia fieberi</i>	Řecko	Thessaly, Mt.Ossa, Stomio	N 39°52.779', E 22°43.191'	06/2007	96%EtOH	1	1
008PF_CZ	<i>Potosia fieberi</i>	Česká rep.	Moravia mer., Lednice, kemp Apollo env.	N 48°47'8.491", E 16°49'35.490"	27. 5. 2007	96%EtOH	1	1
010CM_CZ	<i>Potosia cuprea metallica</i>	Česká rep.	Moravia mer., Podyjí NP	N 48°51'52.593", E 15°52'3.068"	8. 7. 2003	96%EtOH	0	1
012PO_HR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Chorvatsko	Brač, Selca env.	N 43°18'40.932", E 16°49'58.369"	3. 9. 2002	suchý	0	1
013Da_RU	<i>Potosia cuprea daurica</i>	Rusko	Siberia, near Irkutsk, Vidrino env.		5 - 8.7. 2002	suchý	0	1
014Cu_TR	<i>Potosia cuprina</i>	Turecko	Aslamli, Erdemli env.	N 36°34'34.117", E 34°13'52.617"	2003	suchý	1	1
015CM_CZ	<i>Potosia cuprea metallica</i>	Česká rep.	Moravia mer., Lednice, kemp Apollo env.	N 48°47'8.491", E 16°49'35.490"	29. 5. 2009	96%EtOH	1	1

016PO_CZ	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Česká rep.	Moravia mer., Lednice, kemp Apollo env.	N 48°47'8.491", E 16°49'35.490"	29. 5. 2009	96%EtOH	1	1
017PF_CZ	<i>Potosia fieberi</i>	Česká rep.	Moravia mer., Lednice, kemp Apollo env.	N 48°47'8.491", E 16°49'35.490"	29. 5. 2009	96%EtOH	1	1
018PF_CZ	<i>Potosia fieberi</i>	Česká rep.	Moravia mer., Lednice, kemp Apollo env.	N 48°47'8.491", E 16°49'35.490"	29. 5. 2009	96%EtOH	1	1
019PO_GR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Řecko	Thessaly, Larisa dist., Stomio	N 39°52.779', E 22°43.191'	16.4 2009	96%EtOH	1	1
020PO_GR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Řecko	Thessaly, Larisa dist., Stomio	N 39°52.779', E 22°43.191'	16.4 2009	96%EtOH	1	1
021PF_GR	<i>Potosia fieberi</i>	Řecko	Thessaly, Larisa dist., Stomio	N 39°52.779', E 22°43.191'	14.-25.4 2009	96%EtOH	1	1
022PF_GR	<i>Potosia fieberi</i>	Řecko	Thessaly, Larisa dist., Stomio	N 39°52.779', E 22°43.191'	14.-25.4 2009	96%EtOH	1	1
023PO_GR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Řecko	Stavropoli (Stavroúpoli)	N 41°07.969', E 24°53.207'	20. 4. 2009	96%EtOH	1	1
024PO_GR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Řecko	Stavropoli (Stavroúpoli)	N 41°07.969', E 24°53.207'	20. 4. 2009	96%EtOH	1	1
025PO_GR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Řecko	Avantas (Avas)	N 40°55.462', E 25°54.268'	17. 4. 2009	96%EtOH	1	1
026PO_GR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Řecko	Avantas (Avas)	N 40°55.462', E 25°54.268'	17. 4. 2009	96%EtOH	1	1
027PI_IT	<i>Potosia incerta</i>	Italy	Sicily, Parc de la Madonia	N 37°59'44.697", E 15°2'11.204"	2. -10.6.2009	96%EtOH	1	1
029PI_IT	<i>Potosia incerta</i>	Italy	Sicily, Parc de la Madonia	N 37°59'44.697", E 15°2'11.204"	2. -10. 6. 2009	suchý	1	1
031PO_GR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Řecko	Lavara	N 41°16.227', E 26°22.631'	18. 4. 2009	96%EtOH	1	0
032PO_HR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Chorvatsko	Brač, Selca env.	N 43°18'40.932", E 16°49'58.369"		96%EtOH	1	1
033PO_HR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Chorvatsko	Brač, Selca env.	N 43°18'40.932", E 16°49'58.369"		96%EtOH	1	1
034Br_PT	<i>Potosia cuprea brancoi</i>	Portugal	Valle Bejinia	N 40°47'5.901", W8°26'49.186"	12. 5. 2009	96%EtOH	1	1
035Br_PT	<i>Potosia cuprea brancoi</i>	Portugal	Albergaria	N 40°47'5.901", W8°26'49.186"	12. 5. 2009	96%EtOH	1	1
037Br_ES	<i>Potosia cuprea brancoi</i>	Spain	Mallorca, Baleares, Puerto d'Aleudia	N 39°51'39.722", E3°9'19.254"	19. 6. 2009	96%EtOH	1	1

038Sp_GR	<i>Potosia cuprea</i> ssp. (obscura?)	Řecko	Komotini	N 41°06.094', E 25°24.570'	19. 4. 2009	96%EtOH	1	1
039Sp_GR	<i>Potosia cuprea</i> ssp. (obscura?)	Řecko	Komotini	N 41°06.094', E 25°24.570'	19. 4. 2009	96%EtOH	1	1
040IG_JO	<i>Potosia cuprea ignicollis</i>	Jordánsko	Irbid region, Sahm will., 400 m		19. 4. 2003	suchý	1	1
041IG_JO	<i>Potosia cuprea ignicollis</i>	Jordánsko	Irbid region, Sahm will., 400 m		19. 4. 2003	suchý	1	1
042IG_JO	<i>Potosia cuprea ignicollis</i>	Jordánsko	Irbid region, Sahm will., 400 m		19. 4. 2003	suchý	1	1
044HI_AR	<i>Potosia hieroglyphica</i>	Armenie	Egvard, Arailer Mt.		19. 7. 2001	suchý	1	1
045HI_AZ	<i>Potosia hieroglyphica</i>	Azerbajdžan	Ismailly vill. 4 km west, 700 m		9. 7. 2008	suchý	0	1
046HI_RU	<i>Potosia hieroglyphica</i>	Rusko	E.Caucasus, Dagestan, Rutul		07/1994	suchý	1	1
047HI_RU	<i>Potosia hieroglyphica</i>	Rusko	E.Caucasus, Dagestan, Rutul		07/1994	suchý	0	1
048HI_RU	<i>Potosia hieroglyphica</i>	Rusko	N. Caucasus, Kabardino - Balkaria, Tyrnyauz circ., 1400 m		3. 8. 2002	suchý	1	1
049HI_RU	<i>Potosia hieroglyphica</i>	Rusko	N. Caucasus, Kabardino - Balkaria, Tyrnyauz circ., 1400 m		3. 8. 2002	suchý	1	1
050HI_AZ	<i>Potosia hieroglyphica</i>	Azerbajdžan	Talysh, Zuvand, Kavkaz vill. Circ., 1600 m		21. 6. 2008	suchý	1	0
051Cu_UK	<i>Potosia cuprina</i>	Ukrajina	Crimae, Feodosia distr., Kara Dag	N 45°1'57.864", E 35°21'27.020"	30.6.2006	suchý	1	1
052Cu_RU	<i>Potosia cuprina</i>	Rusko	E.Caucasus, Dagestan, Rutul		07/1994	suchý	0	1
054CM_UK	<i>Potosia cuprea metallica</i>	Ukrajina	Rovno region, Belsk vill.		21. 5. 2005	suchý	0	1
055PN_RU	<i>Potosia nitidioris</i>	Rusko	Primorsky reg. , Novočugujevka, near Ussuri river		07/1990	suchý	0	1
057Cu_BU	<i>Potosia cuprina</i>	Bulharsko	Lozenec		06/1975	suchý	0	1
058IG_JO	<i>Potosia cuprea ignicollis</i>	Jordánsko	Izbid prov., Malka, Wadi de Kurasi	N 35°42'56", E 32°40'50"	27. 5. 2009	suchý	1	1
059PC_IT	<i>Potosia cuprea cuprea</i>	Itálie	Lazio, Roma, Lariano env.	N 12°48'38,8", E 41°42'57,2"	2. -7. 6. 2006	96%EtOH	1	1
060PA_HR	<i>Potosia angustata</i>	Chorvatsko	Krk, NW Stará Baška	N 44°57'55.870", E14°41'9.730"	07/2007	96%EtOH	1	1
061PA_GR	<i>Potosia angustata</i>	Řecko	Kerkini	N 41°12'44.840", E 23°4'4.062"	7. -13.7.2008	96%EtOH	1	1
062MG_UZ	<i>Potosia marginicollis</i>	Uzbekistán	Tasah Rimt prov., Burchmulla, Yakka-tul		07/2006	96%EtOH	1	1
063PA_GR	<i>Potosia angustata</i>	Řecko	Pelopones, Mt. Helenos	N 37°53'42.635", E 22°5'20.728"	13. 7. 2005	96%EtOH	1	1

064PO GR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Řecko	Pelopones, Tsapi	N 36°46'31.073", E 21°51'57.606"	1. -3. 7. 2005	96%EtOH	1	1
067PC IT	<i>Potosia cuprea cuprea</i>	Italy	Sardinia isl.		07/2007	96%EtOH	1	1
068CM CZ	<i>Potosia cuprea metallica</i>	Česká rep.	Bohemia, Lány near Pardubice	N 50°2'45.051", E 15°52'34.394"	07/2010	96%EtOH	1	1
070PC FR	<i>Potosia cuprea cuprea</i>	Francie	Corse, Piana	N 42°14'15.620", E 8°36'49.618"	06/2010	96%EtOH	1	1
071CA SW	<i>Cetonia aurata</i>	Švýcarsko	Eggen	N 47°18'45.523", E 7°45'33.669"	2010	96%EtOH	1	1
072Cu BU	<i>Potosia cuprina</i>	Bulharsko	Natur reservation Ropotamo	N 42°17'39.62", E 27°45'12.93"	25. 7. 2010	96%EtOH	1	1
073Sp SW	<i>Potosia cuprea ssp.</i>	Švýcarsko	Simplon Pass	N 46°16'50.978", E 8°1'21.547"	2010	96%EtOH	1	0
074Cu TU	<i>Potosia cuprina</i>	Turecko	Hisarcik 1 km S, Kayseri vill. (10 km S)	N 38°41'18.497", E 35°22'48.093"	19. 7. 2003	suchý	1	1
075Cu TU	<i>Potosia cuprina</i>	Turecko	Hasanbeyli		4. 7. 1993	suchý	1	1
076Cu TU	<i>Potosia cuprina</i>	Turecko	?		?	suchý	1	1
077CM HU	<i>Potosia cuprea metallica</i>	Maďarsko	Hungary centr., NP Kiskunsagi, between Bosca and Orgovány	N 46°25'55.671", E 19°17'22.221"	2. - 3. 5. 2002	suchý	1	1
078Bo FR	<i>Potosia cuprea bourgini</i>	Francie	Tarn, Ft de la Grésigne, Penne	N 44°55', E 01°45'	06-07/2005	suchý	1	1
079CM RU	<i>Potosia cuprea daurica</i>	Rusko	Altaj, Mt. Kuraisky, Aktash vill., source of Yarly amry river		29.6. - 4. 7. 2005	suchý	1	1
080Da RU	<i>Potosia cuprea daurica</i>	Rusko	Burgatia, Barguzin, Reserve, Valley of Davske river		2.7.2007	suchý	1	1
081IG LY	<i>Potosia cuprea ignicollis</i>	Libye	Libanon, Kaza Koura, Aufeh, 15 km S Tripoli		20. 6. 2009	suchý	1	1
085PC FR	<i>Potosia cuprea cuprea</i>	Francie	Corse, Ajaccio, 10 km env. By road, Porticcio	N 41°57'36.784", E 8°49'47.999"	30. 6. 2002	suchý	0	1
087CM CZ	<i>Potosia cuprea metallica</i>	Slovensko	Látky-Polianky	N 19°41'44.92", E 48°36'22.79"	10. 6. 2010	96%EtOH	0	1
088PC FR	<i>Potosia cuprea cuprea</i>	Francie	Corse	N 41°58'4.884", E 8°49'30.688"	2007	96%EtOH	1	1
089PC FR	<i>Potosia cuprea cuprea</i>	Francie	Corse	N 41°58'4.884", E 8°49'30.688"	2007	96%EtOH	0	1
090CM SK	<i>Potosia cuprea metallica</i>	Slovensko	Kamenica nad Hronom	N 47°49'52.869", E 18°43'37.389"		96%EtOH	1	1

091Br ES	<i>Potosia cuprea brancoi</i>	Španělsko	Rodalquilar, Andalucia, Almeria prov.	N 36°50'37.602", W 2°3'25.713"	23. -24. 4. 2008	96%EtOH	1	1
095OL PT	<i>Potosia cuprea brancoi</i>	Portugalsko	Albergaria	N 40°47'5.901", W 8°26'49.186"	12. 5. 2009	96%EtOH	1	1
096PF GR	<i>Potosia fieberi</i>	Řecko	Thessaly, Mt.Ossa, Stomio	N 39°52.779', E 22°43.191'	7. -11. 6. 2003	suchý	1	1
097PC FR	<i>Potosia cuprea cuprea</i>	Francie	Corse, Ajaccio, 10 km env. By road, Porticcio	N 41°57'36.784", E 8°49'47.999"	30. 6. 2002	suchý	1	1
098PO GR	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Řecko	Sparta		12. 7. 1990	suchý	1	1
100Da RU	<i>Potosia cuprea daurica</i>	Rusko	Burgatia, Barguzin, Reserve, Valley of Davske river		2. 7. 2007	suchý	1	1
101IG LY	<i>Potosia cuprea ignicollis</i>	Libye	Libanon, Kaza Koura, Aufeh, 15 km S Tripoli		20.6 2009	suchý	1	1
103PO CZ	<i>Potosia cuprea obscura</i>	Česká rep.	Moravský Krumlov env., Vedrovice (obora)	N 49°1'2.541", E 16°21'19.558"	3. 5. 2007	suchý	1	1