

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

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

Miroslava Sýkorová

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

České Budějovice
2008

Bakalářská práce

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

Annotation

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

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

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

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

V Českých Budějovicích, 7. ledna 2008

.....

Poděkování

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

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

OBSAH

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

1. ÚVOD

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

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

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

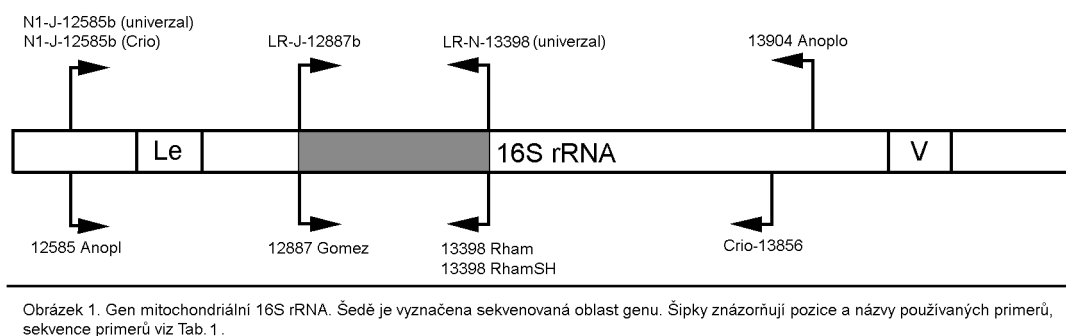
klasifikace jsou zatím nepočetné. Farrell (1998) a Farrell & Sequeira (2004) použili jadernou 18S rDNA; výběr druhů je v nich však poměrně omezený, protože jejich práce se přednostně zaměřují na mandelinky. Gillett (2006, nepublikovaná práce; jaderná 18S rDNA a mitochondriální COI) získal sekvence velkého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

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

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

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

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



2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo:

- 1) Získání co největšího počtu sekvencí z vybraných druhů podčeledí Spondylidinae a Lepturinae.
- 2) Fylogenetická analýza těchto sekvencí; zejména (a) monofylie Spondylidinae, (b) pozice Necydalinae vzhledem k Lepturinae, a (c) vnitřní uspořádání podčeledí Lepturinae.
- 3) Posouzení vhodnosti genu pro velkou podjednotku 16S rRNA pro molekulární taxonomii těchto dosud málo studovaných podčeledí.

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Materiál

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

3.2. Izolace DNA

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

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

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

3.2.1. Chelexová izolace:

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

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

Izolace DNA byla provedena dle návodu výrobce.

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

3.3. Primery

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

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

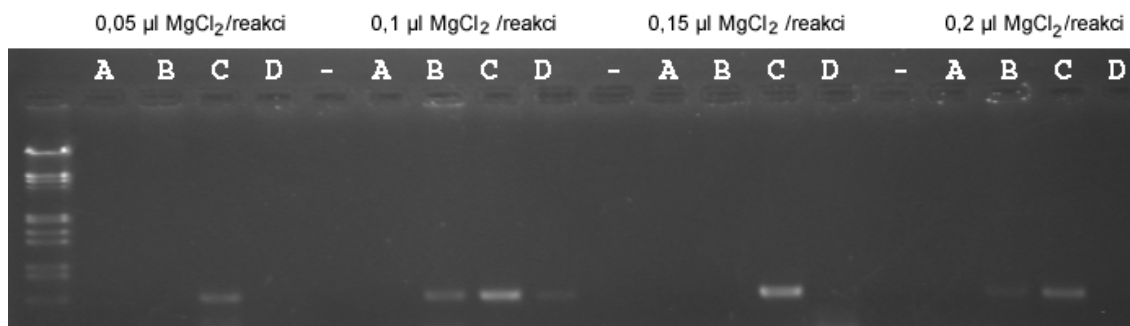
- 1- zkrácená verze primeru **N1-J-12585** (Simon,1994).
- 2- homolog primeru **N1-J-12585** (Simon,1994) modifikovaný podle mitochondriální sekvence *Crioceris duodecimpunctata* (Chrysomelidae).
- 3- homolog primeru **LR-J-12887** (Simon,1994) modifikovaný podle mitochondriální sekvence *Rhamnusium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

3.4. PCR

3.4.1. PCR reakční směs

Reakce pro jeden vzorek měla objem 11,05 µl a obsahovala tyto složky: 7,15 µl dd H₂O, 0,1 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 2,5 mM dNTP (TaKaRa), 1,25 µl 10x TaKaRa pufru, 0,75 µl 5µM forward primeru (Tab. 1), 0,75 µl 5µM reverse primeru (Tab. 1) a 0,05 µl Ex Taq TaKaRa polymerázy. K této směsi byl přidán 1 µl DNA templátu.

Pro zvýšení efektivity bylo vyzkoušeno přidání MgCl₂ do PCR reakce. Pro každý set vzorků, u kterých byla amplifikace neúspěšná, byla přidána jiná koncentrace MgCl₂ (viz Obr. 2). Jako nejúspěšnější se ukázalo přidání 0,1 µl MgCl₂/ PCR reakci (výsledná koncentrace MgCl₂ v reakci byla 2,28 mM).



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

3.4.2. PCR program

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

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

3.4.3. Agarózová elektroforéza

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

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

3.5. Purifikace PCR produktů

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

3.6. Sekvenování DNA

3.6.1. Sekvenační směs

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

Složení sekvenační reakce: 2 µl sekvenačního mixu, 3 µl 5x sekvenačního pufru, 1 µl 5 µM primeru (viz kapitola 3.3.) a 10–40 ng PCR produktu. Vše bylo doplněno dd H₂O do 20 µl.

3.6.2. Sekvenační program

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

3.6.3. Přečištění sekvenační reakce pomocí Sephadexu a aerosolových špiček

Hydratace Sephadexu: Pro přípravu 10 sloupečků bylo rozmícháno 0,5 g Sephadex G-50 v 7 ml dd H₂O. Směs byla ponechána minimálně 45 min. při 4°C.

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

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

3.7. Vyhodnocení sekvencí

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

3.8. Alignment

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

3.9. Použitý software

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

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

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

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

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

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

4. VÝSLEDKY

4.1. Počet získaných sekvencí

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

4.2. Statistika

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

4.3. Kladogramy

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

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

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

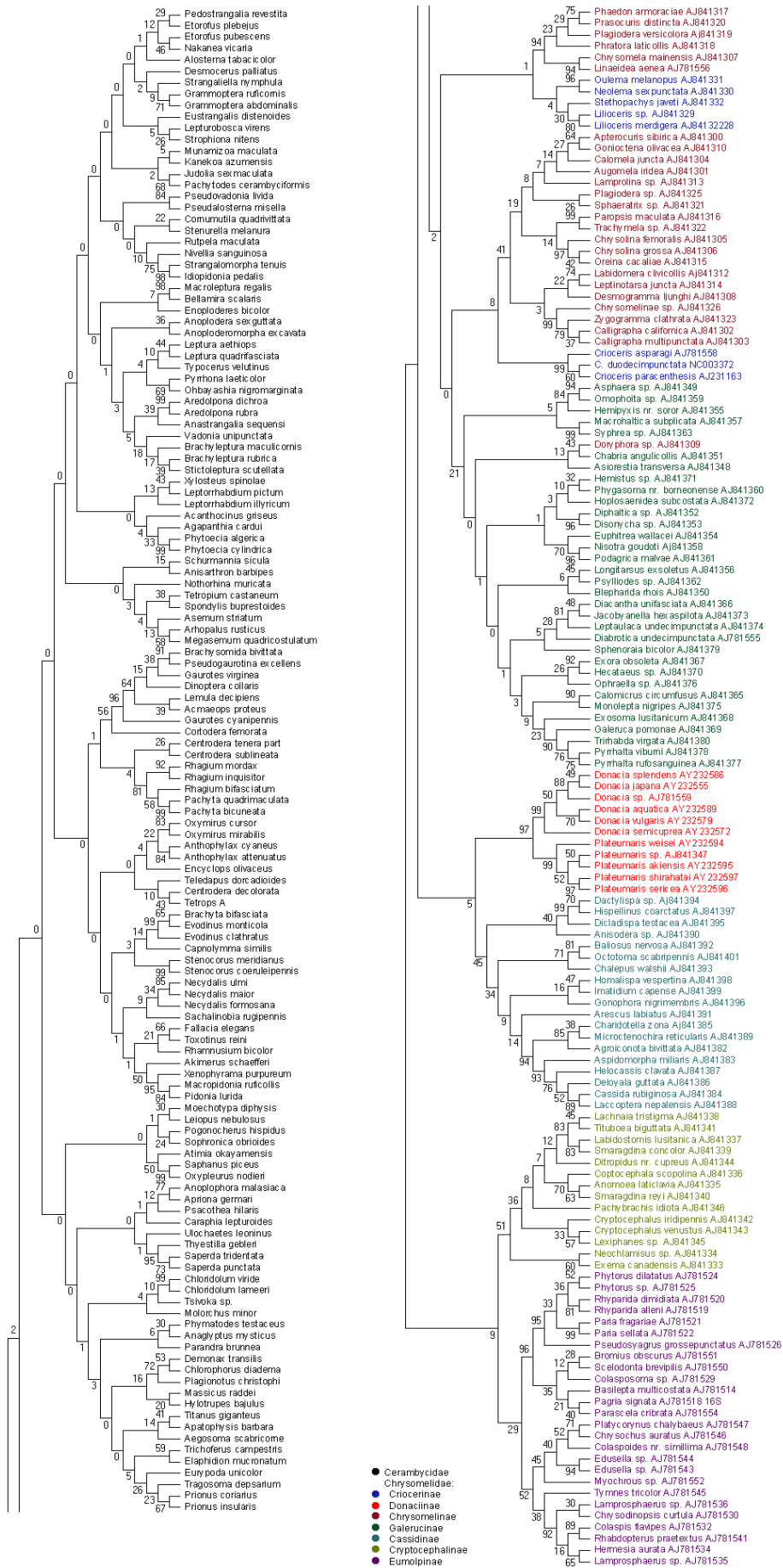
5. DISKUSE

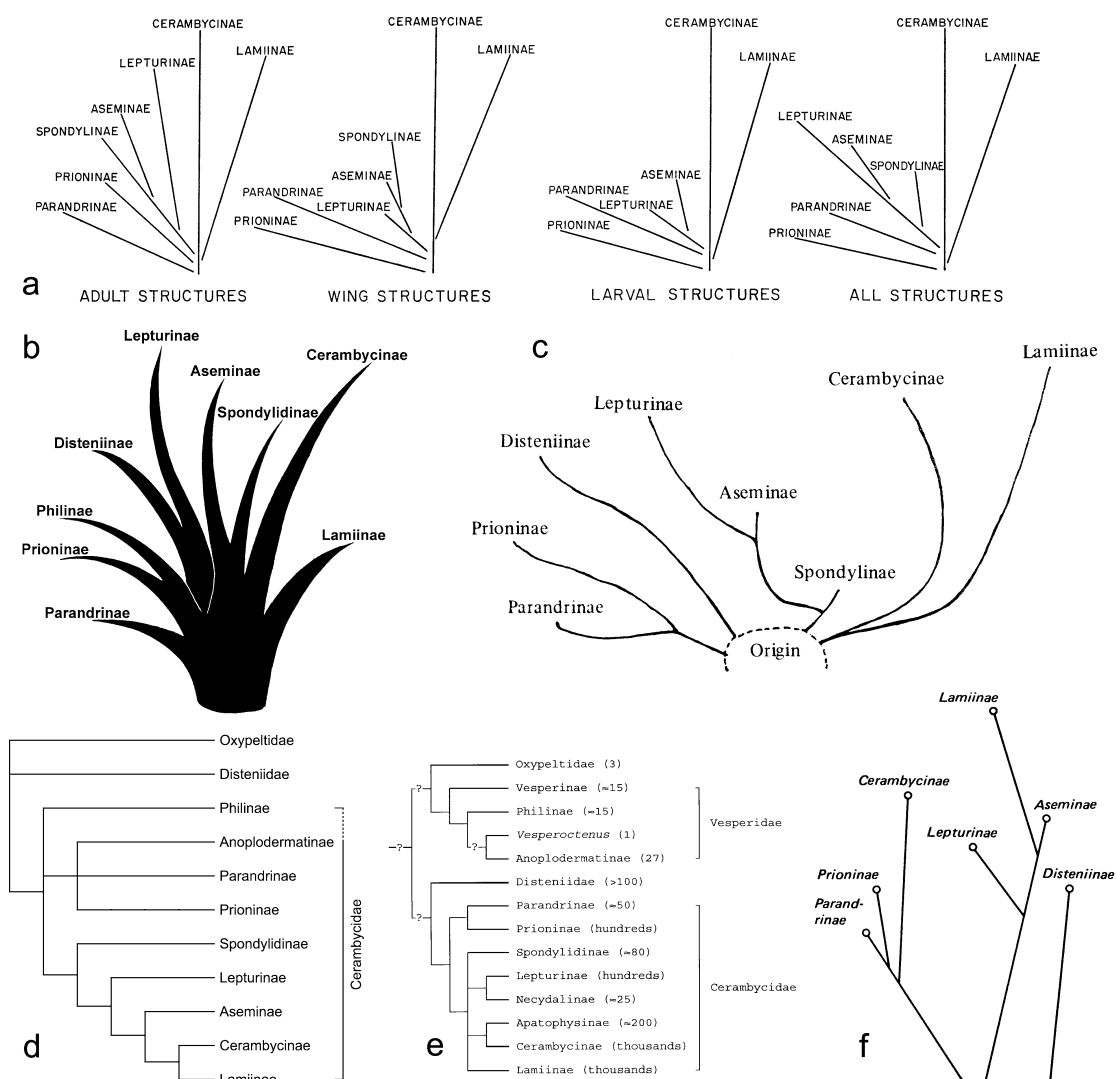
5.1. Cerambycidae: Monofylie a vyšší klasifikace

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

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

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

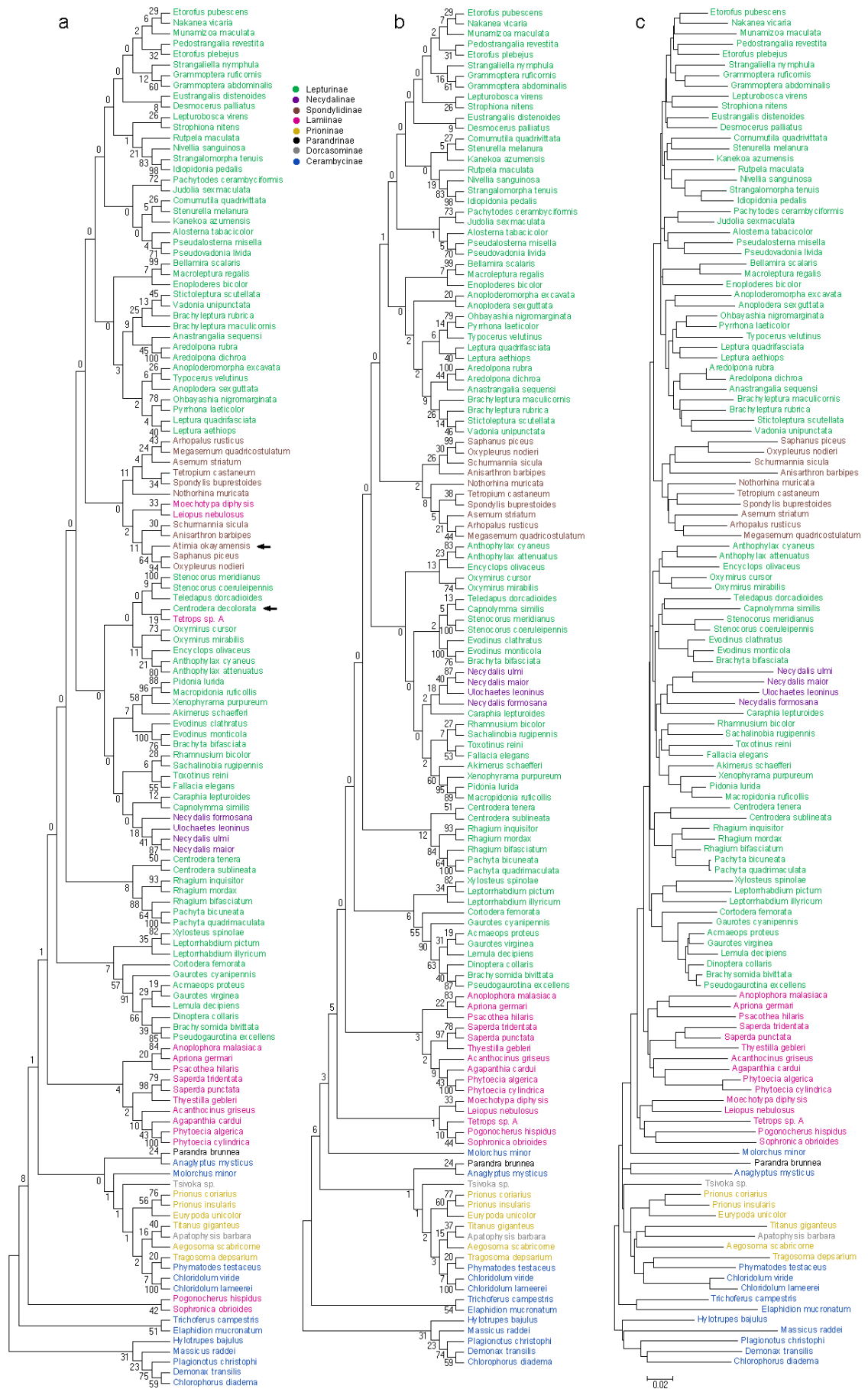


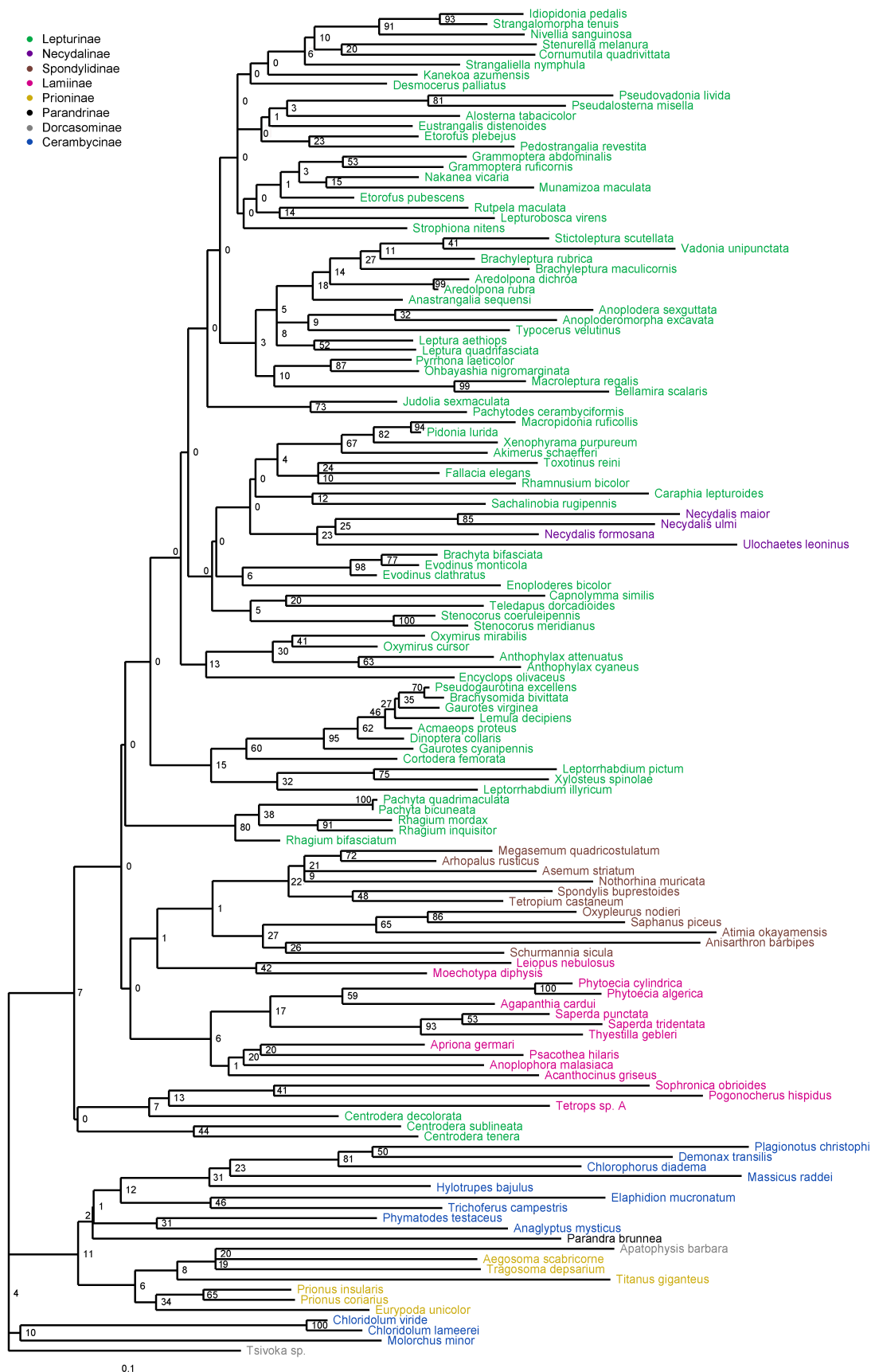


Obrázek 4. Názory některých autorů na vztahy uvnitř čeledi Cerambycidae: (a) Linsley, 1961; (b) Villiers, 1978; (c) Nakamura, 1981; (d) zrekonstruovaný názor Napp, 1994 (od Švácha & Lawrence, in prep.); (e) Švácha et al., 1997 (s přibližným počtem druhů); (f) Danilevsky, 1979a.

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

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





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



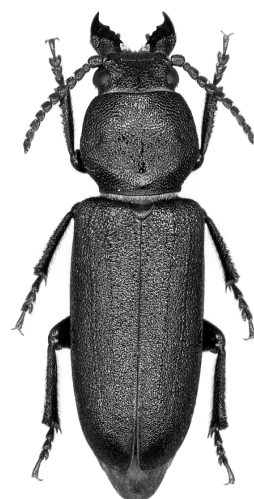
Obrázek 7. Kladogram (50% konsensus) vytvořený programem MrBayes, založen stejnou skupinou jako na Obr. 6. Model GTR s gamma-rozložením míry variace mezi pozicemi a s určitou nevariabilní částí. Posteriorní pravděpodobnost nad 0,5 je uvedena u jednotlivých uzlů. Strom byl vypočten ve 4 milionech generací.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

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

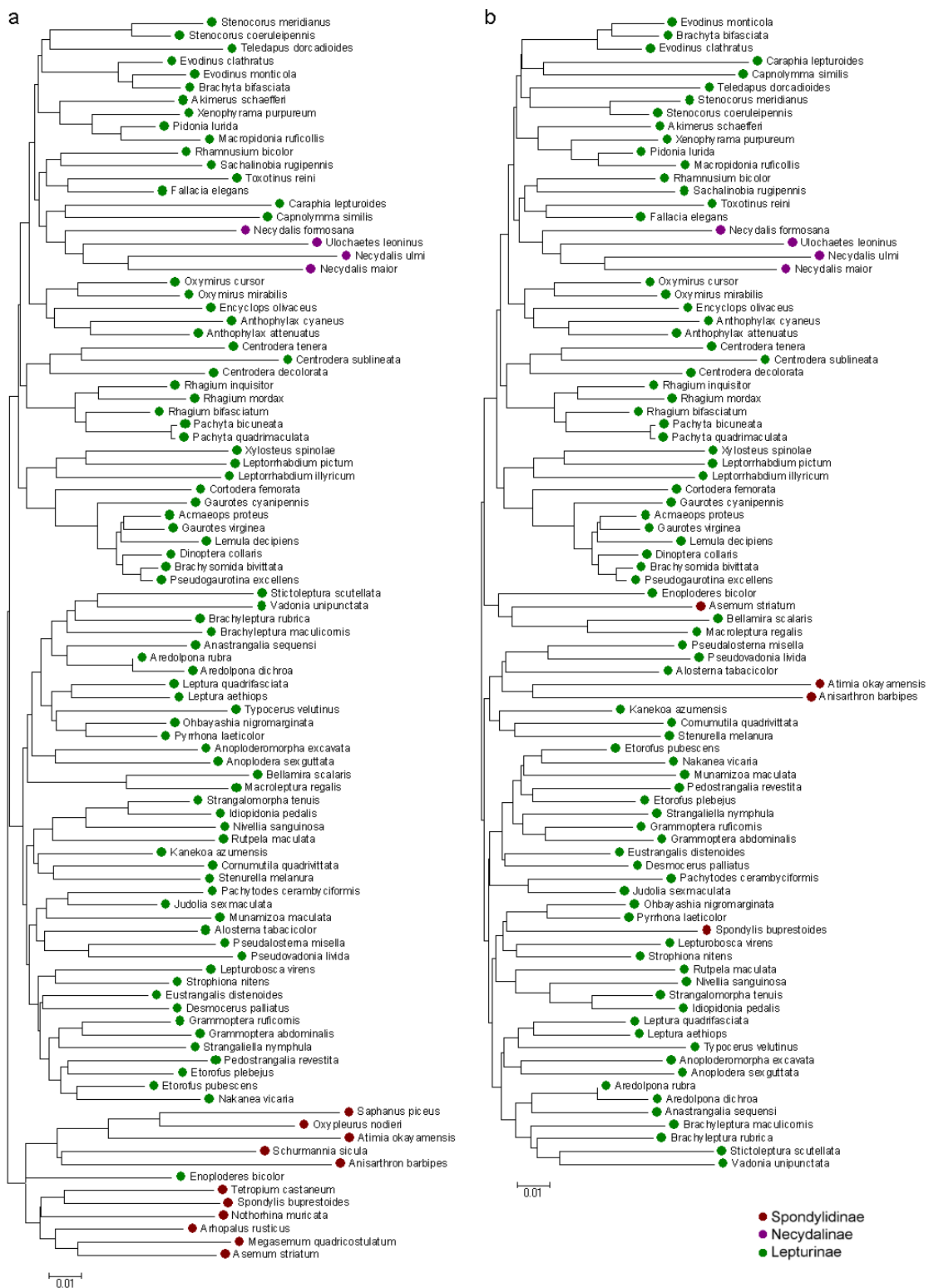
V naší práci jsme se soustředili na podčeledi Lepturinae (včetně Necydalinae, kterou někteří autoři považují pouze za tribus) a Spondylidinae, které jsou také jediné dobře zastoupeny materiálem. Všechny ostatní podčeledi jsou zastoupeny velmi slabě a nerovnoměrně a z této práce o nich nelze dělat žádné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

5.2. Spondylidinae

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



Spondylis buprestoides

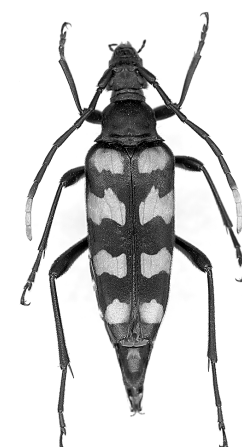


Obrázek 8. Optimální kladogram vytvořený metodou Minimum Evolution, model Log-Det, Pairwise deletion, midpoint rooting. (a) Všichni Spondylidinae, Necydalinae a Lepturinae. Necydalinae jsou vnitřní skupinou Lepturinae, monofylie Spondylidinae je narušena pouze izolovaným rodem *Enoplocleromorpha*, jehož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

5.3. Lepturinae

5.3.1. Monofylie a složení

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



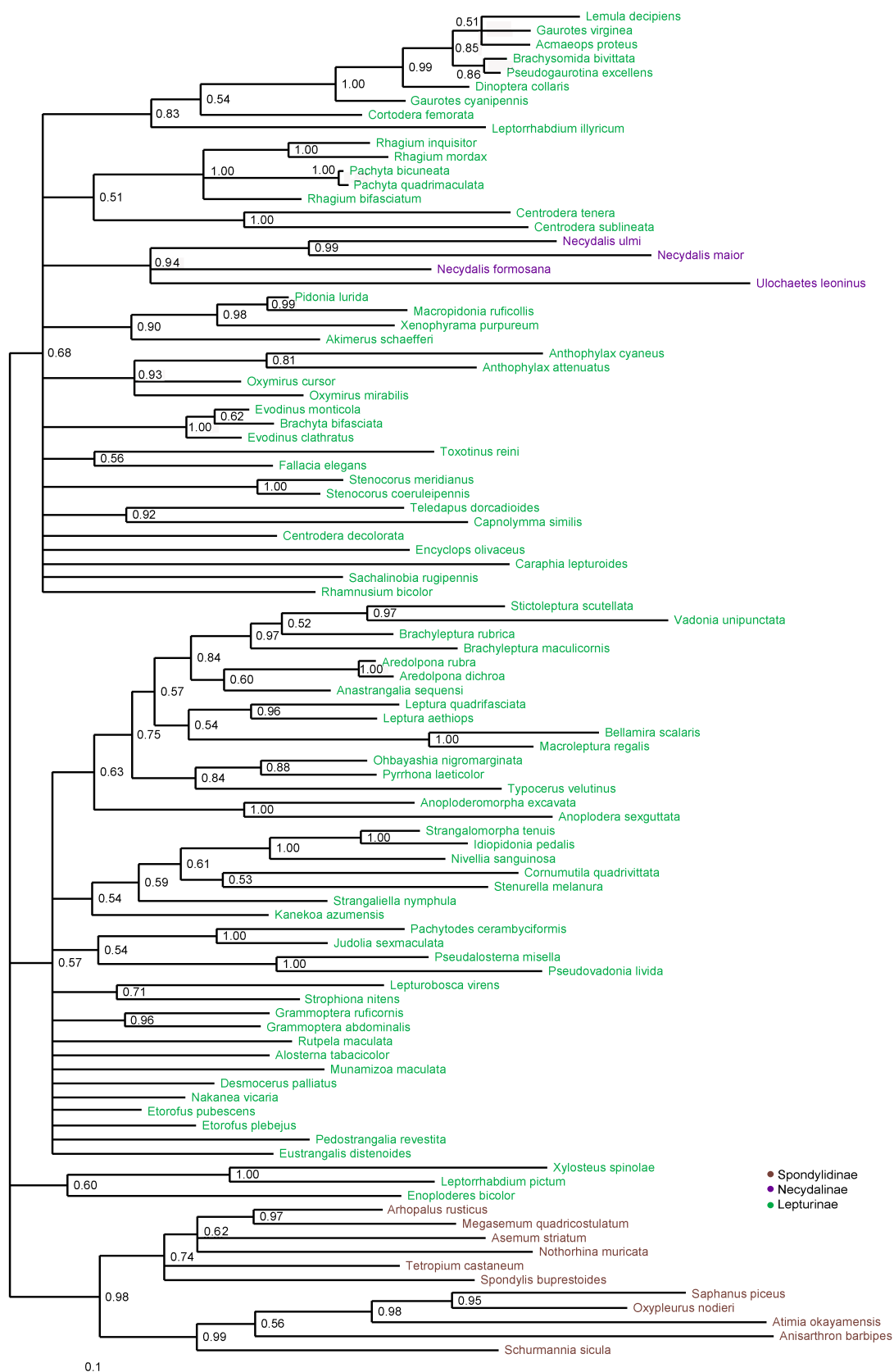
Leptura quadrifasciata

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

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

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

● Necydalinae ● Necydalini ● Lepturini ● Rhagilini ● Stenocorini ● Xylosteini ● Desmocerini ● Oxymirini ● Encyclopinini ● Nepojmenovaný ● Nepojmenovaný ● Nepojmenovaný



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

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

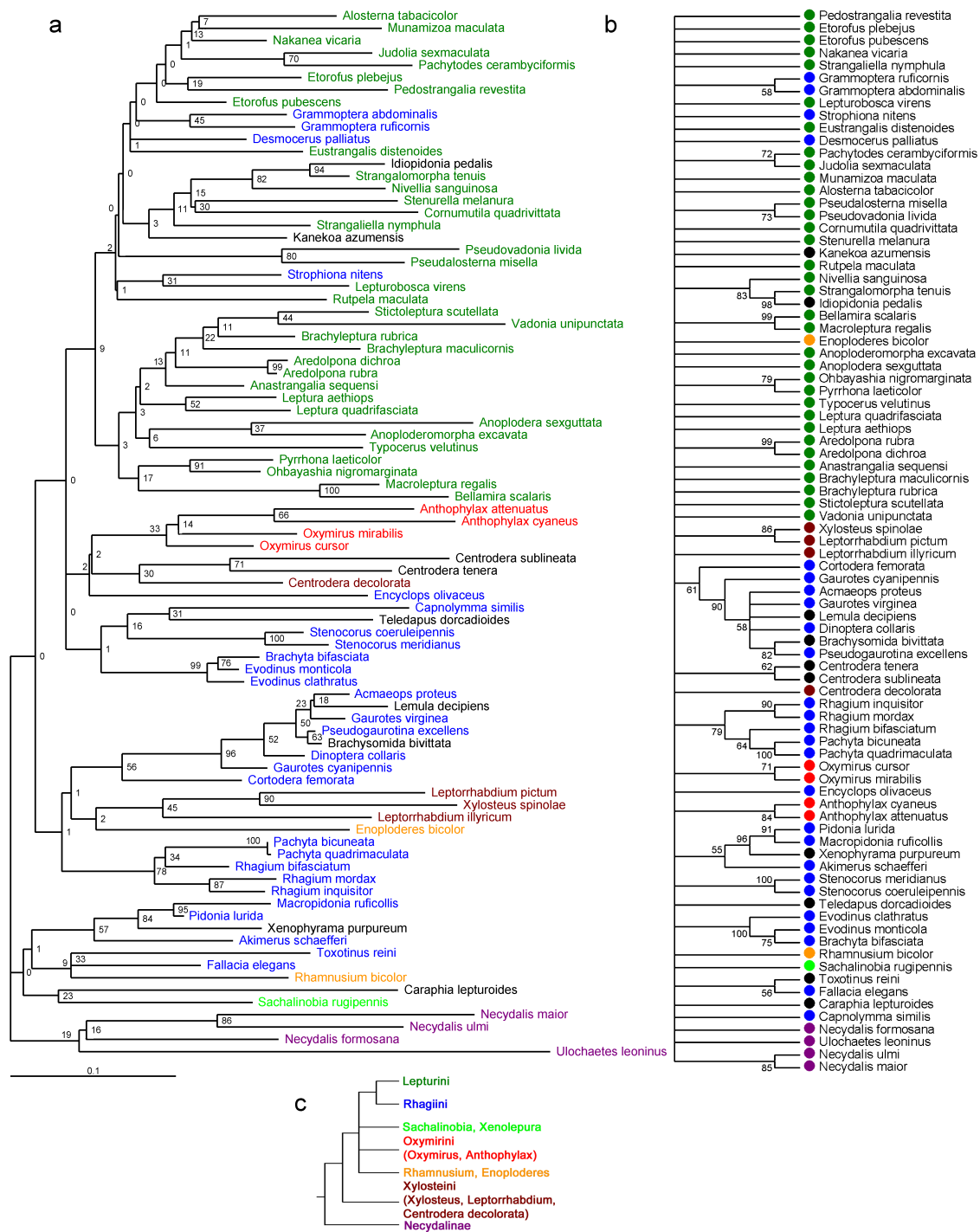
V některých kladogramech vychází podčeleď Spodylidinae uvnitř podčeledi Lepturinae s. l. (Obr. 5), ale zdá se, že je to způsobeno náhodnou afinitou určitých druhů. Pokud z analýzy vyřadíme triby Asemini a Spondylidini, zbylá část Spodylidinae většinou monofylii Lepturinae nenarušuje. Naše data nicméně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

5.3.2. Tribální klasifikace Lepturinae

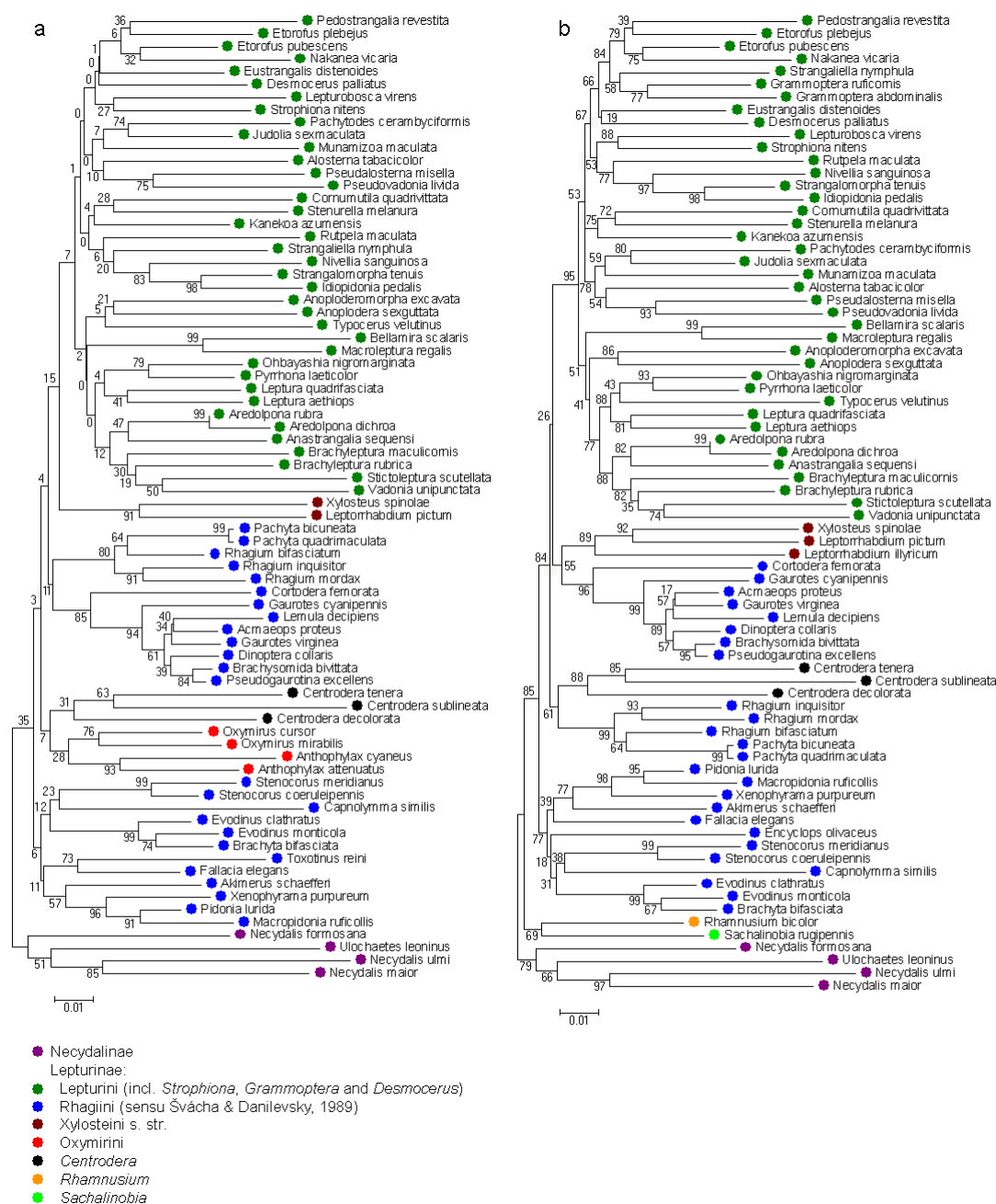
Rozdělení rodů do tribů je v podčeledi Lepturinae velmi neustálené (Tab. 2), ale jedinou prací, která se alespoň pokusila definovat triby larválními apomorfiemi je Švácha & Danilevsky, 1989. Obr. 10c ukazuje jimi navrženou příbuznost jednotlivých tribů (některé z nově vytvořených tribů nebyly pojmenovány,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

Z našich dat vyplývá:

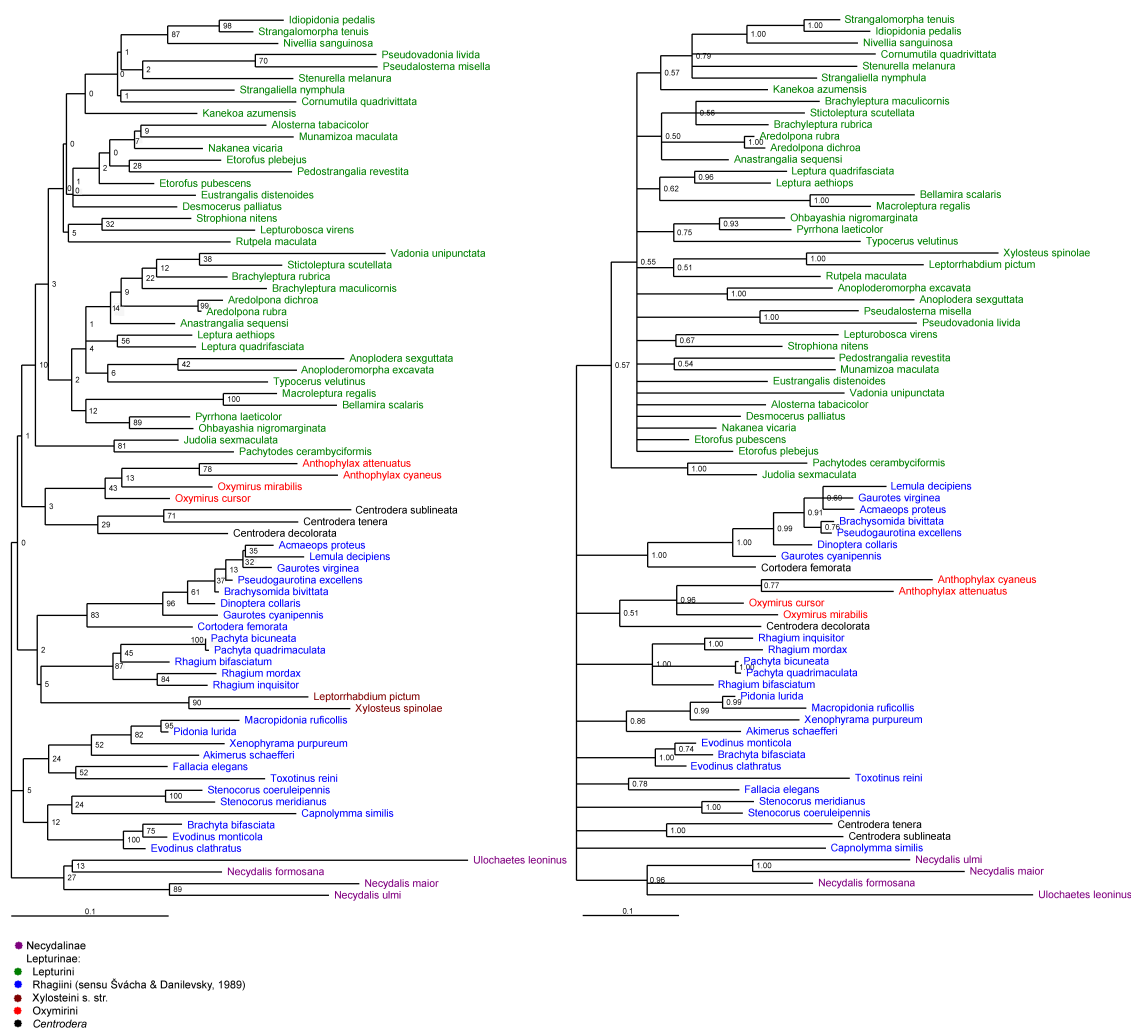
- 1) Tribus Lepturini často vychází monofyletický (s minimální hodnotou bootstrap, ale s poměrně vysokou hodnotou Interior Branch Index; Obr. 11). Tribus vždy obsahuje i rody *Desmocerus*, *Grammoptera* a *Strophiona*, které Švácha & Danilevsky umístili do tribu Rhagiini (Obr. 10). První z nich řadí američtí autoři do samostatného tribu Desmocerini (Linsley & Chemsak, 1972; Monné & Giesbert, 1995; rod *Desmocerus* se vyskytuje pouze v severní Americe), druhé dva pak většina autorů k rodům zde obsaženým v Lepturini, takže naše výsledky podporují jejich tradiční klasifikaci.
- 2) Tribus Rhagiini se nejčastěji rozpadá na nejméně dvě až tři oddělené skupiny (Obr. 11, 12), z nichž jedna je poměrně nestabilní (*Stenocorus* až *Macropidonia* v Obr. 11a, *Brachyta* až *Pidonia* v Obr. 11b, *Evodinus* až *Macropidonia* v Obr. 12a) a není monofyletická v Obr. 10a, který obsahuje všechny druhy podčeledi Lepturinae. Zbylé dvě jsou velmi silně podporovány (Obr. 10b) a jedna z nich obsahuje i rod *Cortodera*, který většina autorů řadí do tribu Lepturini a který Švácha & Danilevsky umístili do Rhagiini.
- 3) Rod *Centrodera* většinou neleží blízko tribu Xylosteini a tento tribus nevychází jako sesterský ostatním Lepturinae, pozice obou skupin je variabilní.



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



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



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

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

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

5.4. Spolehlivost kladogramů a vhodnost použité sekvence 16S rDNA

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

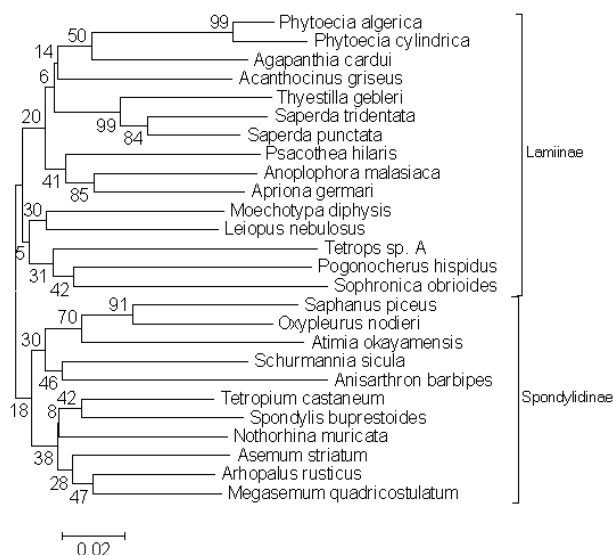
obr. 10a, což souhlasí s larvální morfologií – Švácha & Danilevsky, 1989, přeřadili druh *Oxymirus mirabilis* do rodu *Anthophylax*). Přesto některé skupiny s velmi nízkým bootstrapem vycházely ve většině kladogramů monofyletické, případně byla jejich monofylie narušena náhodnými afinitami jednotlivých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

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

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

5.5. Hodnocení metod použitých ke konstrukci kladogramu

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



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

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

6. ZÁVĚR

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

7. LITERATURA

- Althoff J., Danilevsky M. L., 1997:** *A Check-list of longicorn beetles (Coleoptera, Cerambycidae) of Europe*. Slovensko Entomološko Društvo Štefana Michielija, Ljubljana, 64 pp.
- Cherepanov A. I., 1979:** *Longhorn beetles of Northern Asia (Prioninae, Disteniinae, Lepturinae, Aseminae)*. Nauka, Novosibirsk, 471 pp.
- Danilevsky M. L., 1979a :** Morfo-adaptive ways of evolution of the larvae of longhorn beetles and phylogenetic relations of the basal groups of the family. In: *Insects - damaging wood and their entomophages*. Nauka, Moscow, pp. 24–43. [In Russian]
- Danilevsky M. L., 1979b:** Description of the female, pupa and larva Of *Apatophysis pavlovskii* Plav. and discussion of systematic position of the genus *Apatophysis* Chevr. (Coleoptera, Cerambycidae). *Ent. Obozr.* 58: 821–828. [In Russian]
- Farrell B. D., 1998:** „Inordinate fondness“ explained: Why are there so many beetles? *Science* 281: 555–559.
- Farrell B. D., Sequeria A.S., 2004:** Evolutionary rates in the adaptive radiation of beetles on plants. *Evolution* 58: 1984–2001.
- Gomez-Zurita J., Funk D. J., Vogler A. P., 2006:** The evolution of unisexuality in Calligrapha leaf beetles: Molecular and ecological insights on multiple origins via interspecific hybridization. *Evolution* 60: 328–347.
- Gomez-Zurita J., Hunt T., Kopliku F., Vogler A. P., 2007:** Recalibrated tree of leaf beetles (chrysomelidae) indicates independent diversification of angiosperms and their insect herbivores . *PLoS ONE* 2: E360.
- Gomez-Zurita J., Hunt T., Vogler A. P., 2007:** Multilocus ribosomal RNA phylogeny of the leaf beetles (Chrysomelidae). *Cladistics* 23: 1–17
- Guindon S., Gascuel O., 2003:** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696–704.
- Hoelzel A. R., 1998:** *Molecular Genetic Analysis of Population, Second editon*. Oxford University Press, New York, 445 pp.
- Jiang S., Li Ch., 2001:** Coleoptera, Cerambycidae, Lepturinae. In: *Fauna Sinica, Vol. 21*. Science Press, Beijing, 296 pp.
- Linsley E. G., 1961:** Cerambycidae of North America, Part I. Introduction. *Univ. Calif. Publ. Entomol.* Vol. 18, 135 pp.

- Linsley E. G., Chemsak J. A., 1972:** Cerambycidae of North America, Part VI, No. 1. Taxonomy and classification of the subfamily Lepturinae. *Univ. Calif. Publ. Entomol.* Vol. 69, 138 pp.
- Monné M. A., 2006:** Catalogue of the Cerambycidae (Coleoptera) of the Neotropical Region. Part III. Subfamilies Parandrinae, Prioninae, Anoplodermatinae, Aseminae, Spondylidinae, Lepturinae, Oxypeltinae, and addenda to the Cerambycinae and Lamiinae. *Zootaxa* 1212, 244 pp.
- Monné M. A., Giesbert E.F., 1995:** *Checklist of the Cerambycidae and Disteniidae (Coleoptera) of the Western Hemisphere*. Wolfsgarden Books, Burbank, CA, 419 pp.
- Nakamura S., 1981:** Morfological and taxonomic studies of the cerambycid pupae of Japan (Coleoptera: Cerambycidae). *Misc. Rep. Hiwa Mus. Nat. Hist.* 20: 1–159.
- Napp D. S., 1994:** Phylogenetic relationships among the subfamilies of Cerambycidae (Coleoptera–Chrisomeloidea). *Revista Bras. Entomol.* 38: 265–419.
- Nei M., Kumar S., 2000:** *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, 333 pp.
- Ohbayashi N., Sato M., Kojima K., 1992:** *An Illustrated Guide to Identification of Longicorn Beetles of Japan*. Tokai University Press, Tokyo, 697 pp.
- Saito S., Saito A., 2003a:** Molecular phylogeny analysis of the subfamily Lepturinae (Coleoptera, Cerambycidae). *Konchu to Shizen (Insects and Nature)* 38(11): 17–20. [In Japanese]
- Saito S., Saito A., 2003b:** An attempt at a phylogenetic analysis of Pidonia. *Proceedings of the Coleoptera DNA workshop at the 16th Symposium of the Japanese Society of Coleopterology*. Fukuoka, pp. 2–12. [In Japanese]
- Saito S., Saito A., Kim C.-G., Su Z.-H., Osawa S., 2002:** Phylogeny of the Leptura arcuata complex (Coleoptera, Cerambycidae) as deduced from mitochondrial ND5 gene sequences. *Spec. Bull. Jpn. Soc. Coleopterol.* 5: 381–391.
- Sama G., 1988:** Coleoptera Cerambycidae. Catalogo topologico e sinonimico. Fauna d'Italia Vol. XXVI. Calderini, Bologna, 216 pp.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P., 1994:** Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87(6): 651–701.
- Sitnikova T., Rzhetsky A., Nei M., 1995:** Interior-branch and bootstrap test of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 12(2): 319–333.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Internetové zdroje:

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

Danilevsky M. L.: Cerambycidae of the former USSR. A checklist.
<http://www.cerambycidae.narod.ru/ussr.htm>

8. PŘÍLOHA

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

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

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

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

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

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

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