

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie**

**Charles University, Faculty of Science
Department of Zoology**

Doktorský studijní program: Zoologie
Doctoral study programme: Zoology

Autoreferát disertační práce
Summary of the Doctoral thesis



Larvální morfologie, fylogeografie a automatická identifikace vybraných
zlatohlávkovitých brouků (Scarabaeidae: Cetoniinae)

Larval morphology, phylogeography and automatic identification of chosen
flower chafer beetles (Scarabaeidae: Cetoniinae)

Mgr. Dominik Vondráček

Školitel/Supervisor: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

Praha, 2022

ABSTRAKT

V současné době je popsáno přes 4300 druhů zlatohlávkovitých brouků (Scarabaeidae: Cetoniinae) ve více jak 485 rodech, přičemž počet rodů, druhů a poddruhů přibývá každým rokem o desítky nových taxonů. Především v minulosti se však objevovaly i poměrně vágní a strohé popisy operující jen se zbarvením brouků, případně s extrémně jemnými rozdíly na samčích genitáliích bez podpory dalších dat a analýz. V disertační práci jsem se zaměřil na využití různých dat a metodických přístupů, které mohou pomoci pochopit evoluční procesy uvnitř této skupiny a její komplikovanou taxonomii i systematiku. Ta je i na vyšších taxonomických úrovních dosud značně neustálená.

Ve dvou pracích jsme studovali morfologii nedospělých stadií zlatohlávků a jejich bionomii. V případě tribu Taenioderini, jehož imaturní stadia nebyla do té doby známá, jsme u osmi druhů objevili překvapivě výraznou morfologickou variabilitu, která je u larev zlatohlávků neobvyklá. Ve druhé práci jsme se věnovali rodu *Oxythyrea*. Popsali jsme larvy devíti z deseti aktuálně známých druhů a konfrontovali získané údaje s již existujícími popisy larev zlatohlávků subtribu Leucocelina, kam studovaný rod patří.

Následovaly dvě fylogeografické studie, ve kterých jsme využili molekulární data k porovnání s morfologií dospělců. První práce se týkala tvarově uniformního, avšak barevně variabilního druhového komplexu *Proatetia (Potosia) cuprea*, který je díky chybějícím komparativním studiím zatížen extrémně vysokým množstvím taxonů. Zjistili jsme, že právě barevná nestálost do značné míry zapříčinila nadhodnocení skutečné diverzity uvnitř tohoto druhového komplexu a zbarvení brouků téměř vůbec nekoreluje s fylogenezí skupiny. V dalším článku jsme se zabývali izolovanými a hojně zpochybňovanými populacemi vzácných druhů rodu *Oxythyrea* na území Evropy. Nejen, že jsme potvrdili jejich existenci, ale díky molekulárním analýzám i jejich reliktní status. Zaměřili jsme se i na ochránářský potenciál vzácných biotopů, kde se tyto brouci vyskytují.

V poslední části disertační práce jsme se věnovali poměrně inovativním metodickým přístupům, které by mohly být v budoucnu výrazně nápomocným prvkem v rámci systematiky a taxonomie nejen zlatohlávkovitých, ale i dalších skupin hmyzu. Jde o využití konvolučních neuronových sítí k determinaci jedinců z fotografií. Ve dvou publikovaných pracích jsme dosáhli velmi vysokých úspěšností identifikace překonávající i experty z řad entomologů. Do budoucna by tak mohlo jít o široce vyhledávané metody, které urychlí a zjednoduší entomologickou práci a zároveň by mohly například pomoci při objevování nových taxonů.

ABSTRACT

Currently, over 4.300 species of flower chafer beetles (Scarabaeidae: Cetoniinae) are described in more than 485 genera, with the number of genera, species and subspecies increasing by dozens of new taxa each year. Especially in the past, some of the species descriptions were relatively vague and short operating only with the coloration of beetles, or with extremely subtle differences on the male genitalia without any support of other data and analyses. In this dissertation, I focused on the use of various data and methodological approaches that can help understand the evolutionary processes within this group and its complicated taxonomy and systematics, which is also still very unstable even at higher taxonomic ranks.

In two works we studied the morphology of immature stages of flower chafers and their bionomy. In the case of the Taenioderini tribe, whose immature stages were not known until then, we found surprisingly significant morphological variability in the eight described species, which is unusual in larval stages of flower chafers. In the second work, we focused on the genus *Oxythyrea*. We described the larvae of nine of the ten currently known species and confronted the obtained data with the already existing descriptions of the larvae of the Leucocelina subtribe, to which the studied genus belongs.

Two phylogeographic studies followed, in which we used molecular data in comparison with the morphology of adults. The first work concerned the morphologically uniform, but colour variable species complex *Proatetia* (*Potosia*) *cuprea*, which is burdened by an extremely high number of taxa due to the lack of comparative studies. We found that it was the colour variability that largely caused an overestimation of the true diversity within this species complex, and the coloration of the beetles hardly correlates with the group's phylogeny. In the next article, we dealt with isolated and often questioned populations of rare species of the genus *Oxythyrea* in Europe. We confirm their existence, but thanks to molecular analyses their relict status as well. We also focused on the conservation potential of the rare habitats, where these beetles occur.

In the last part of the dissertation, we focused on relatively innovative methodological approaches, which could be a significantly helpful element in the future in the systematics and taxonomy not only of flower chafers, but also other groups of insects. It is the use of convolutional neural networks to determine individuals from photographs. In two published works, we have achieved very high identification success rates, surpassing even those of entomologists. In the future, these could be sought-after methods that will speed up and simplify entomological work and at the same time help for example in the discovery of new taxa.

Úvod

Dle recentních katalogů a checklistů existuje přibližně 4300 popsanych druhů zlatohlávkovitých brouků (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae), řazených do více jak 485 rodů (Krajčík 2012; Bezděk 2016). Díky extrémnímu zájmu entomologické komunity spojeného s relativně snadným chovem spousty druhů jsou i v současné době stále popisovány nové taxony zlatohlávků.

Kromě jednoduchých prací obsahujících jen velmi stručný popis a fotografii zvířete (např. Krajčík 2002), jsou v současné době publikovány i obsáhlejší práce (např. Perissinotto et al. 2019). Některé z nich jsou doplněné i o ekologická a biologická data (De Palma & Malec 2020) včetně popisu nedospělých stadií (např. Král et al. 2019). Publikovány jsou i studie revizního charakteru (např. Ratcliffe 2014) a vzácně jsou popisy nových taxonů opřeny o genetická data (Seidel 2016). Sporadické využití molekulárních dat ve fylogenetických a fylogeografických studiích bylo shrnuto v práci Mitchella a kol. (2020).

V našem výzkumu jsme se zaměřili na studium několika skupin zlatohlávkovitých brouků různorodými metodickými přístupy včetně jejich alespoň částečné kombinace. Jde o studium larvální i adultní morfologie, bionomie a dále fylogeografie a fylogeneze za využití molekulárních dat. Navíc díky dlouhodobému studiu rodu *Oxythyrea* Mulsant, 1842 čítajícího sběr a chov stovek až tisíců exemplářů napříč druhovým spektrem jsme mohli využít nashromážděný materiál k poměrně odlišnému, přesto velmi inovativnímu metodickému přístupu. Jde o využití konvolučních neuronových sítí, počítačového vidění nebo tzv. transfer learningu v rámci automatické identifikace jedinců z fotografií. Tyto přístupy jsou v posledních letech relativně běžné (např. Martineau et al. 2017), ale v rámci našeho výzkumu jde o první implementaci těchto metod ve studiu zlatohlávkovitých brouků.

CÍLE PRÁCE

1. Studium morfologie nedospělých stadií a bionomie zlatohlávkovitých brouků. Využití těchto dat v rámci fylogeneze a systematiky studovaných skupin.
2. Studium populační struktury skrze fylogeografické a fylogenetické přístupy využívajících molekulární data v konfrontaci s morfologií dospělců.
3. Testování a maximalizace výkonu inovativních metodických přístupů na poli identifikace a taxonomie různých skupin hmyzu včetně zlatohlávků za pomoci konvolučních neuronových sítí.

MATERIÁL A METODIKA

Studovaný materiál byl získáván od amatérských i profesionálních entomologů z tuzemských a zahraničních institucí. Zároveň byly podniknuty vlastní expedice do těchto krajín: Albánie, Bulharsko, Černá Hora, Francie, Itálie, Maďarsko, Makedonie, Malajsie, Maroko, Polsko, Řecko, Srbsko, Tunisko, Ukrajina. Pro potřeby několika publikací bylo nutné chovat vybrané druhy studovaných brouků za účelem získání dospělých a/nebo larválních stadií. Pro tyto účely bylo využito chovů bezobratlých katedry zoologie PřF UK s přihlédnutím na potřeby jednotlivých druhů.

V případě larválních popisů byly jedinci pozorováni a fotografováni standardními přístupy za použití běžného stereomikroskopu a dále fotografického zařízení složeného z fotoaparátu Canon a makro objektivu Canon MP-E 65 mm/f2.8. Ke sledování jemnějších detailů byl využit skenovací elektronový mikroskop biologické sekce PřF UK.

V rámci získávání molekulárních dat, přesněji DNA sekvencí, byly využity standardně vybavené molekulárně genetické laboratoře katedry zoologie PřF UK a Národního muzea. Izolace DNA probíhala za použití běžně dostupných kitů (Qiagen a Geneaid). Pro namnožení genetických markerů (*cox1*, *cytb*, *its1*) byl využit PCR master mix firmy Top-Bio a následné přečišťování PCR produktů bylo zajištěno kity (Qiagen), ethanolovou precipitací, nebo enzymatickou reakcí. Vlastní sekvenování bylo zajištěno sekční laboratoří PřF UK, nebo externí firmou Macrogen.

K analýze molekulárních dat bylo využito rozličných metodických přístupů i softwaru. Sekvence DNA byly editovány a kompletovány v programu Geneious (Kearse et al. 2012) a fylogenetické stromy byly rekonstruovány za pomoci metody maximální věrohodnosti v programu raxmlGUI (Silvestro et al. 2012) i bayesiánské inference v programu MrBayes (Ronquist et al. 2012). Genetické distance a další ukazatele byly počítány s pomocí softwaru MEGA (Kumar et al. 2016) a DnaSP (Rozas et al. 2017). Využito bylo i nástrojů TCS (Clement et al. 2000) a PopART (Leigh & Bryant 2015) pro tvorbu haplotypových sítí a také delimitačních analýz ABGD (Puillandre et al. 2012) a PTP (Zhang et al. 2013). Pro potřeby jedné studie bylo zahrnuto i molekulární datování z programu BEAST (Bouckaert et al. 2014).

Morfologie dospělců byla studována podobně jako u larev a dále analyzována za využití programu Mesquite (Maddison & Maddison 2016), ve kterém byly mapovány jednotlivé znaky z morfologických matic na rekonstruované fylogenetické stromy. Pro potřeby analýzy tvarů neboli geometrické morfometrie byla využita celá řada programů, např. TPSUtil (Rohlf 2009), TpsRelw (Rohlf 2010). Vizualizace získaných

výsledků (transformační mřížky) a statistické vyhodnocení (PCA, non-metric multidimensional scaling) bylo realizováno v softwaru PAST (Hammer et al. 2001).

Studium automatické identifikace hmyzu se opíralo o několik základních prvků tzv. umělé inteligence. V našich pracích bylo využito počítačového vidění (Huang 1996) a konvolučních neuronových sítí spolu s hlubokým učáním (Schmidhuber 2015; LeCun et al. 2015). Dále byl použit tzv. transfer learning, tedy převzetí jiné již předučené sítě pro naše potřeby (Bengio 2011). V našem případě šlo o síť VGG 16 (Simonyan & Zisserman 2015). Jako vstupní data byla využita celá řada volně dostupných fotografií z různých internetových databází, stejně jako již publikované datasey. V určitých případech byly datasey vytvořeny z vlastních obrázků za pomoci již uvedeného fotografického zařízení, nebo mobilního telefonu s makro předsádkou. Veškeré analýzy probíhaly ve vysokoúrovňovém programovacím jazyku Python (Rossum & Drake 1995) s pomocí dalších softwarových prvků. Pro vizualizaci specifických regionů důležitých při určování jedinců konvoluční neuronovou sítí do kategorií (např. druhů) bylo využito metody tzv. klasifikačních aktivačních map (Zhou et al. 2016).

VÝSLEDKY A DISKUSE

V průběhu studia jsme popsali imaturní stadia osmi druhů zlatohlávků tribu Taenioderini, jejichž larvy nebyly do té doby známy. Objevíli jsme překvapující variabilitu u běžně studovaných struktur a jejich znaků, což je nejen pro zlatohlávky poměrně neobvyklé zjištění. Zmíněná variabilita nám však neumožnila definovat synapomorfii tribu. Bionomie námi studovaných druhů ale nebyla příliš rozmanitá a většinu jedinců jsme našli ve shodném prostředí, tedy v kompaktním hnijícím dřevě častokrát prostoupeném bílými plísněmi.

V druhé práci jsme se zaměřili na larvální stadia rodu *Oxythyrea*, do kterého dnes patří 10 druhů. Nám se podařilo popsat larvy od šesti druhů a u dalších tří druhů jsme provedli detailní redeskripci. Pozorovaná variabilita nebyla tak značná, jako v případě tribu Taenioderini, ale i tak se nám podařilo najít sérii specifických znaků. Díky nim jsme schopni rozdělit jednotlivé druhy do tří skupin, které odpovídají fylogenetické hypotéze na základě adultní morfologie (Sabatinelli 1981, 1984) i molekulárních dat (Vondráček et al. unpubl.). Detailní bionomická pozorování víceméně korespondují s navrhovanou fylogenezí.

Molekulární analýze jsme podrobili západopalearktické zástupce druhového komplexu *Protaetia (Potosia) cuprea* (Fabricius, 1775). Tento komplex patří z historického

pohledu mezi jedny z nejstudovanějších skupin zlatohlávků Evropy, s čímž je však spjato extrémní taxonomické zatížení spoustou druhových a poddruhových jmen jejichž validita není příliš jednoznačná (Bezděk 2016). Morfologie dospělců je totiž výrazně uniformní, oproti tomu zbarvení je značně nestálé a vysoce variabilní. Na základě dvou mitochondriálních markerů (*cox1*, *cytb*), morfologické matice znaků a analýzy tvaru vybraných struktur jsme se pokusili objasnit fylogeografické pozadí a evoluční historii této skupiny brouků. Podařilo se nám uvnitř komplexu identifikovat tři hlavní genetické linie, které odpovídají spíše geografickému rozmístění studovaných jedinců, než jejich morfologii a aktuální taxonomii.

V další práci jsme se věnovali dvěma druhům rodu *Oxythyrea*, u kterých jsme studovali jejich fylogeografii napříč výrazně disjunktivními areály výskytu včetně zpochybňovaných lokalit. Jde o stepní druh *O. albopicta* (Motschulsky, 1845), který se v Evropě vyskytuje pouze na jediné lokalitě v Severní Makedonii a poté se roztroušeně nalézá v Malé Asii, na Blízkém Východě a ve Střední Asii (Bezděk 2016). Druhým studovaným taxonem je psamofilní zlatohlávek *O. dulcis* Reitter, 1899, který vzácně obývá některé písčité pláže Egejského moře (Bezděk 2016). U tohoto druhu byl publikovaný nález i v Černé Hoře, tedy na jediné lokalitě pobřeží Jaderského moře (Mikšić 1978). Během našich expedic se podařilo potvrdit a řádně zdokumentovat výskyt obou druhů na zpochybňovaných lokalitách v Severní Makedonii, respektive v Černé Hoře. Zároveň jsme s pomocí dvou genetických markerů (*cox1*, *its1*) poukázali na reliktní status těchto populací a jejich dlouhodobou izolaci bez zjevného genetického toku. Výsledky molekulárních analýz a aktuální stav biotopů, kde se dané populace vyskytují, nás přivedl i k ochrannému pojetí naší studie.

Automatická identifikace hmyzu z fotografií je dnes již běžnou záležitostí, která je součástí nejen různých výzkumů (Høye et al. 2021), ale i spousty běžně dostupných mobilních aplikací sloužících k určování organismů (např. iNaturalist). V našich publikacích jsme se zaměřili na vzorky z muzejních sbírek a snažili jsme se posunout hranice úspěšnosti těchto metod. Přesněji jde o různé prvky tzv. umělé inteligence, tedy počítačového vidění, konvolučních neuronových sítí a dále hlubokého a přenosového učení. Pro tyto účely jsme v první studii analyzovali čtyři různé datasety a postupně optimalizovali různé faktory. Dosáhli jsme tak excelentních výsledků (94,5 až 99,7 %) a zároveň jsme vylepšili úspěšnost určování u již publikovaných datasetů z jiných studií. Z optimalizovaných faktorů byla z praktického hlediska zajímavá například vstupní velikost fotografií. Zde se ukázalo, že optimum pro naše analýzy je rozlišení 412x412 pixelů, což je řádově méně, než je rozlišení standardně pořizovaných fotografií pro publikační a jiné účely.

V druhé publikaci jsme pro naše analýzy opět využili zlatohlávků rodu *Oxythyrea*. Tentokrát jsme porovnávali úspěšnost našich metod při použití různých úhlů a různých kvalit snímků. Z výsledků je patrné, že dorsální pohled je více informativní pro neuronové sítě (94 až 100 %), než pohled ventrální (80 až 100 %) a kombinace obou pohledů nepřináší výrazné zlepšení. Dále jsme zjistili, že fotografie pořízené obyčejným mobilním telefonem s levnou makropředsádkou podávají velmi podobné výsledky (92 až 100 %) jako skládané makrofotografie pořízené cenově nákladnějším fotoaparátem. Taktéž jsme se pokusili s pomocí neuronových sítí klasifikovat jedince nejen do druhu, ale i pohlaví. Umělá inteligence podala dobrou výkonnost, která v určitých ohledech opět předčila experty z řad entomologů. Na závěr jsme blíže zkoumali výsledky tzv. klasifikačních aktivačních map. Jde o určitou formu teplotních map, které poukazují na důležité oblasti, které bere neuronová síť v potaz při určování. Zvýrazněné oblasti u studovaných jedinců poukazují na struktury, které využívají k určování i entomologové.

ZÁVĚRY

Z našich studií je patrné, že právě kombinace různých zdrojů dat a jejich metodického zpracování v podobě tzv. integrativní taxonomie může přinést důležité výsledky ve studiu taxonomie, systematiky či fylogeografie a fylogeneze zlatohlávkovitých brouků. Do budoucna by takovýto přístup mohl pomoci objasnit nejen evoluční historii problematických skupin zatížených řadou diskutabilních taxonů, ale i fylogenezi zlatohlávkovitých brouků jako takových. Ta je i dnes stále nedořešená. I nadále je patrné, že studium imaturních stadií může přinést zajímavá a pro různé účely využitelná data. Během zkoumání zlatohlávků jsme pak využili inovativních metod konvolučních neuronových sítí v rámci automatické identifikace jedinců z fotografií a poukázali jsme na jejich rozsáhlé schopnosti. Tyto přístupy by se do budoucna daly využít celou řadou způsobů a výrazně tím tak urychlit a usnadnit práci entomologů.

POUŽITÁ LITERATURA

- Bengio Y. (2012): Deep learning of representations for unsupervised and transfer learning. *JMLR Workshop and Conference Proceedings* **27**, 17–37.
- Bezděk A. (2016): Subfamily Cetoniinae, pp. 367–412. In: Löbl I. & Löbl D. (Eds.): *Catalogue of Palaearctic Coleoptera. Vol. 3. Scarabaeoidea–Scirtoidea–Dasciloidea–Buprestoidea–Byrrhoidea. Revised and Updated Edition*. E. J. Brill, Leiden.
- Bouckaert R., Heled J., Kühnert D., Vaughan T., Wu C. H., Xie D., Suchard M. A., Rambaut A. & Drummond A. J. (2014): BEAST 2: A software platform for bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology* **10(4)**, 24722319.
- De Palma M. & Malec P. (2020): *Pachytephraea attenboroughi* n. gen., n. sp., an atypical small Cetoniine from Tanzania (Scarabaeidae, Cetoniinae). *Entomologia Africana* **25(2)**, 1–6.
- Hammer Ø., Harper D. A. T. & Ryan P. D. (2001): PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**, 1–9.
- Høye T. T., Ärje J., Bjerger K., Hansen O. L. P., Iosifidis A., Leese F., Mann H. M. R., Meissner K., Melvad C. & Raitoharju J. (2021): Deep learning and computer vision will transform entomology. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **118(2)**, e2002545117.
- Huang T. S. (1996): Computer vision: evolution and promise, pp. 21–25. In: Vandoni C. E. (Ed): *1996 Cern School of Computing*. CERN, Geneva.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P. & Drummond A. (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647–1649.
- Krajčák M. (2002): A new species of the genus *Pachnoda* from Oman. *Cetoniimania* **2(1)**, 16–18.
- Krajčák M. (2012): Checklist of the world Scarabaeoidea. *Animma X5*, 1–278.
- Král D., Hrůzová L., Šípek P., Awale A. I., Hurre A. A. & Sommer D. (2019): *Pachnoda iskuulka* (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae), a new species from Somaliland, including description of its mature larva. *Zootaxa* **4604(3)**, 482–496.
- LeCun Y., Bengio Y. & Hinton G. (2015): Deep learning. *Nature* **521**, 436–444.

- Kumar S., Stecher G. & Tamura K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870–1874.
- Leigh J. W. & Bryant D. (2015): PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* **6**, 1110–1116.
- Martineau M., Conte D., Raveaux R., Arnault I., Munier D. & Venturini G. (2017): A survey on image-based insects classification. *Pattern Recognition* **65**, 273–284.
- Mikšić R. (1978): Eine weiterer Beitrag zur Kenntnis der jugoslawischen *Oxythyrea*-Arten. *Acta Entomologica Jugoslavica* **14(1–2)**, 69–71.
- Mitchell A., Moeseneder C. H. & Hutchinson P. M. (2020): Hiding in plain sight: DNA barcoding suggests cryptic species in all 'well-known' Australian flower beetles (Scarabaeidae: Cetoniinae). *PeerJ* **8**, e9348.
- Perissinotto R., Clennell L. & Beinhundner (2019): *Lophorrhinides muelleriae* (Coleoptera, Scarabaeidae, Cetoniinae): a new genus and species from southern Tanzania. *ZooKeys* **833**, 75–84.
- Puillandre N., Lambert A., Brouillet S. & Achaz G. (2012): ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* **21**, 1864–1877.
- Ratcliffe B. C. (2014): A Review of the Neotropical Genera *Badelina* Thomson, 1880, *Balsameda* Thomson, 1880, *Guatemalica* Neervoort van de Poll, 1886, and *Heterocotinis* Martínez, 1948 (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae: Gymnetini). *The Coleopterists Bulletin* **68(2)**, 241–262.
- Rohlf F. J. (2009): tpsUTIL. file utility program. Version 1.44. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. Dostupné z: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rohlf F. J. (2010): tpsRELW. Version 1.49. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. Dostupné z: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Ronquist F., Teslenko M., Mark van der M., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M. A. & Huelsenbeck J. P. (2012): MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Systematic Biology* **61**, 539–542.
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E. & Sánchez-Gracia A. (2017): DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* **34**, 3299–3302.
- Sabatinelli G. (1981): Le *Oxythyrea* Muls. del Mediterraneo: studi morfologici sistematici (Coleoptera, Scarabaeoidea). *Fragmenta Entomologica* **16**, 45–60.

- Sabatinelli, G. (1984): Studi sul genere *Oxythyrea*: note sulle specie del gruppo *Cinctella*. *Bollettino della Societa Entomologica Italiana* **116(4-7)**, 102–104.
- Schmidhuber J. (2015): Deep learning in neural networks: An overview. *Neural Networks* **61**, 85–117.
- Seidel M. (2016): Morphology and DNA barcoding reveal a new species of *Eudicella* from East Africa (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae). *Zootaxa* **4137(4)**, 435–544.
- Silvestro D. & Michalak I. (2012): raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* **12**, 335–337.
- Simonyan K. & Zisserman A. (2015): Very deep convolutional networks for large-scale image recognition. Přístupné z: arXiv:1409.1556.
- Van Rossum G. & Drake Jr F. L. (1995): *Python reference manual*. Centrum voor Wiskunde en Informatica, Amsterdam.
- Zhang J., Kapli P., Pavlidis P. & Stamatakis A. (2013): A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* **29**, 2869–2876.
- Zhou B., Khosla A., Lapedriza A., Oliva A. & Torralba, A. (2016): Learning deep features for discriminative localization. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 2921–2929.

INTRODUCTION

According to recent catalogues and checklists, there are approximately 4.300 described species of flower chafers (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae), classified in more than 485 genera (Krajčák 2012; Bezděk 2016). Due to the extreme interest of the entomological community associated with the relatively easy breeding of many species, new taxa of flower chafers are still being described.

In addition to simple works containing only a very brief description and photograph of the specimen (e.g. Krajčák 2002), more extensive works are currently published (e.g. Perissinotto et al. 2019). Some of them are supplemented by ecological and biological data (e.g. De Palma & Malec 2020), including a description of immature stages (e.g. Král et al. 2019). Revisions have also been published (e.g. Ratcliffe 2014) and descriptions of new taxa are rarely based on genetic data (Seidel 2016). The sporadic use of molecular data in phylogenetic and phylogeographical studies has been summarized in the work of Mitchell et al. (2020).

In our research, we focused on the study of several groups of flower chafers using various methodological approaches, including at least a partial combination. It is a study of larval and adult morphology, bionomy, as well as phylogeography and phylogeny using molecular data. In addition, thanks to a long-term study of the genus *Oxythyrea* Mulsant, 1842, which counts the collection and breeding of hundreds to thousands of specimens across the species spectrum, we were able to use the collected material for a relatively different, yet very innovative methodological approach. It involves the use of convolutional neural networks, computer vision or transfer learning in the automatic identification of individuals from photographs. These approaches have been relatively common in recent years (e.g. Martineau et al. 2017), but our research is the first implementation of these methods in the study of flower chafers.

AIMS OF THE STUDY

1. Study of morphology of immature stages and bionomy of flower chafers. The use of these data in the phylogeny and systematics of the studied groups.
2. Study of population structure through phylogeographic and phylogenetic approaches using molecular data in confrontation with adult morphology.
3. Testing and maximizing the performance of innovative methodological approaches in the field of identification and taxonomy of various groups of insects, including flower chafers, using convolutional neural networks.

MATERIAL AND METHODS

The studied material was obtained from amateur and professional entomologists from local and foreign institutions. At the same time, own expeditions were undertaken to the following countries: Albania, Bulgaria, France, Greece, Hungary, Italy, Macedonia, Malaysia, Montenegro, Morocco, Poland, Serbia, Tunisia, and Ukraine. For the purposes of several publications, it was necessary to breed selected species of studied beetles in order to obtain adults and/or larval stages. For these purposes, invertebrate breeding room of the Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University was used considering the needs of individual species.

In the case of larval descriptions, individuals were observed and photographed using standard approaches with a conventional stereomicroscope and a photographic device consisting of a Canon camera and a Canon MP-E 65 mm / f2.8 macro lens. A scanning electron microscope of the biological section (Faculty of Science of Charles University) was used to display significantly small details.

As part of the acquisition of molecular data, more precisely DNA sequences, standardly equipped molecular genetic laboratories of the Department of Zoology (Charles University) and the National Museum were used. DNA extractions were performed using commonly available kits (Qiagen and Geneaid). A PCR master mix from Top-Bio was used to amplify the genetic markers (*cox1*, *cytb*, *its1*) and subsequent purification of PCR products was done by kits (Qiagen), ethanol precipitation, or enzymatic reaction. The sequencing itself was provided by the section laboratory of the Faculty of Science, Charles University, or by an external company, Macrogen.

Various methodological approaches and software were used to analyse the molecular data. DNA sequences were edited and assembled in Geneious (Kearse et al. 2012) and phylogenetic trees were reconstructed using the maximum likelihood method in raxmlGUI (Silvestro et al. 2012) and Bayesian inference method in MrBayes (Ronquist et al. 2012). Genetic distances and other indicators were calculated using MEGA software (Kumar et al. 2016) and DnaSP (Rozas et al. 2017). TCS (Clement et al. 2000) and PopART (Leigh & Bryant 2015) tools were also used to create haplotype networks, as well as ABGD (Puillandre et al. 2012) and PTP (Zhang et al. 2013) delimitation analyses. Molecular dating in the BEAST program was also calculated for the needs of one study (Bouckaert et al. 2014).

The morphology of adults was studied similarly to larvae and further analysed using the Mesquite program (Maddison & Maddison 2016), in which individual characters from morphological matrices were mapped onto reconstructed phylogenetic trees.

A number of programs have been used for the analysis of shapes (geometric morphometry), e.g. TPSUtil (Rohlf 2009), TpsRelw (Rohlf 2010). Visualization of the obtained results (transformation grids) and statistical evaluation (PCA, non-metric multidimensional scaling) were performed in PAST software (Hammer et al. 2001).

The study of automatic insect identification was based on several basic elements of the so-called artificial intelligence. In our work, computer vision (Huang 1996) and convolutional neural networks were used along with deep learning (Schmidhuber 2015; LeCun et al. 2015). Furthermore, the transfer learning was used, i.e. the takeover of another already trained network for our needs (Bengio 2011). In our case, it was the VGG 16 network (Simonyan & Zisserman 2015). A series of freely available photographs from various online databases, as well as already published datasets, were used as input data. In some cases, the datasets were created from ours images with the help of the already mentioned photographic device or a mobile phone with a macro lens. All analyses were performed in the high-level programming language Python (Rossum & Drake 1995) with the help of other software elements. The method of so-called classification activation maps (Zhou et al. 2016) was used to visualize specific regions important in identifying individuals by convolutional neural network into categories (e.g. species).

RESULTS AND DISCUSSION

During our research, we described the immature stages of eight species of flower chafers of the Taenioderini tribe, whose larvae were not known until then. We found surprising variability in commonly studied structures and their characters, which is a relatively unusual finding for larvae of flower chafers. However, the mentioned variability did not allow us to define the synapomorphies of the tribe. On the other hand, the bionomy of the species we studied was not very diverse and we found most of the individuals in the same environment, i.e. in compact rotting wood often infused with white mould.

In the second work, we focused on the larval stages of the genus *Oxythyrea*, which includes 10 species up to date. We managed to describe larvae from six species, and we performed a detailed redescription for other three species. The observed variability was not as significant as in the case of the Taenioderini tribe, but we still managed to find a series of specific characters. Thanks to them, we were able to divide individual species into three groups that correspond to the phylogenetic hypothesis

based on adult morphology (Sabatinelli 1981, 1984) and molecular data (Vondráček et al. unpubl.). Detailed bionomic observations correspond to the proposed phylogeny.

We exposed the western Palearctic representatives of the species complex *Protaetia* (*Potosia*) *cuprea* (Fabricius, 1775) to molecular analysis. Historically, this complex is one of the most studied groups of flower chafers in Europe, but this is associated with an extreme taxonomic burden of many species and subspecies taxa whose validity is often not very clear (Bezděk 2016). The morphology of adults is significantly uniform, while the coloration is highly variable. Based on two mitochondrial markers, morphological matrix of characters and analysis of the shape of selected structures, we tried to clarify the phylogeographical background and evolutionary history of this group of beetles. We were able to identify three main genetic lines within the complex that correspond to the geographical distribution of the studied individuals rather than their morphology and current taxonomy.

In the next work, we focused on two species of the genus *Oxythyrea*, in which we studied their phylogeography across significantly disjunctive distribution areas, including the doubtful localities. It is a steppe species *O. albopicta* (Motschulsky, 1845), which occurs in Europe in only one locality in North Macedonia and is then scattered in Asia Minor, the Middle East, and Central Asia (Bezděk 2016). The second studied taxon is the psamphilous *O. dulcis* Reitter, 1899, which rarely inhabits some sandy beaches of the Aegean Sea. A discovery of this species in Montenegro was also published (Mikšić 1978), i.e. the only locality on the Adriatic coast. During our expeditions, we managed to confirm and properly document the occurrence of both species in the disputed localities in North Macedonia and Montenegro, respectively. At the same time, with the help of two genetic markers (*cox1*, *its1*), we pointed out the relict status of these populations and their long-term isolation without an obvious genetic flow. The results of molecular analyses and the current state of habitats where the populations occur led us to the conservation concept of our study as well.

Automatic identification of insects from photographs is now a common practice, which is part of not only various research (Høye et al. 2021), but also many commonly available mobile applications used to identify organisms (e.g. iNaturalist). In our publications, we focused on samples from museum collections and tried to push the limits of successful rates of these methods. More precisely, these are various elements of the so-called artificial intelligence, i.e. computer vision, convolutional neural networks and deep and transfer learning. For this purpose, we analysed four different datasets and gradually optimized different factors in the first study. We achieved excellent results (94.5 to 99.7%) and at the same time we improved the determination

success rates on already published datasets from other studies. From the optimized factors, the input size of photos, for example, was interesting from a practical point of view. Here it turned out that the optimum for our analyses is a resolution of 412x412 pixels, which is extremely less than the resolution of standard photos taken for publishing and other purposes.

In the second publication, we again used flower chafers of the genus *Oxythyrea* for our analyses. This time we compared the success rates of our methods using different angles and different image qualities. The results show that the dorsal view is more informative for neural networks (94 to 100%) than the ventral view (80 to 100%) and the combination of both views does not bring significant improvement. We also found that photos taken with an ordinary mobile phone with a cheap macro adapter give very similar results (92 to 100%) as stacked macro photos taken with a more expensive camera. We also tried to classify individuals not only to species but also to male or female with the help of neural networks. Artificial intelligence has performed well, again surpassing entomologists in some respects. In the end, we examined the results of the so-called classification activation maps. It is a form of heat maps that point to important areas in the photographs that the neural network uses during determining. The highlighted areas in the studied individuals point to the structures that entomologists use for identification as well.

CONCLUSIONS

It is clear from our studies that the combination of various data sources and their methodological processing in the form of so-called integrative taxonomy can bring important results in the study of taxonomy, systematics or phylogeography and phylogeny of flower chafers. In the future, such an approach could help clarify not only the evolutionary history of problematic groups burdened by a number of debatable taxa, but also the whole phylogenetical hypothesis of flower chafers, which is still unresolved. It is clear that the study of immature stages can provide interesting data that can be used for various purposes as well. During the study of flower chafers, we then used innovative methods of convolutional neural networks in the automatic identification of individuals from photographs and pointed out their extensive abilities. These approaches could be used in a plenty of ways in the future, significantly speeding up and facilitating the work of entomologists.

REFERENCES

- Bengio Y. (2012): Deep learning of representations for unsupervised and transfer learning. *JMLR Workshop and Conference Proceedings* **27**, 17–37.
- Bezděk A. (2016): Subfamily Cetoniinae, pp. 367–412. In: Löbl I. & Löbl D. (Eds.): *Catalogue of Palaearctic Coleoptera. Vol. 3. Scarabaeoidea–Scirtoidea–Dasciloidea–Buprestoidea–Byrrhoidea. Revised and Updated Edition*. E. J. Brill, Leiden.
- Bouckaert R., Heled J., Kühnert D., Vaughan T., Wu C. H., Xie D., Suchard M. A., Rambaut A. & Drummond A. J. (2014): BEAST 2: A software platform for bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology* **10(4)**, 24722319.
- De Palma M. & Malec P. (2020): *Pachytephraea attenboroughi* n. gen., n. sp., an atypical small Cetoniine from Tanzania (Scarabaeidae, Cetoniinae). *Entomologia Africana* **25(2)**, 1–6.
- Hammer Ø., Harper D. A. T. & Ryan P. D. (2001): PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* **4**, 1–9.
- Høye T. T., Ärje J., Bjerger K., Hansen O. L. P., Iosifidis A., Leese F., Mann H. M. R., Meissner K., Melvad C. & Raitoharju J. (2021): Deep learning and computer vision will transform entomology. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **118(2)**, e2002545117.
- Huang T. S. (1996): Computer vision: evolution and promise, pp. 21–25. In: Vandoni C. E. (Ed): *1996 Cern School of Computing*. CERN, Geneva.
- Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P. & Drummond A. (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647–1649.
- Krajčák M. (2002): A new species of the genus *Pachnoda* from Oman. *Cetoniimania* **2(1)**, 16–18.
- Krajčák M. (2012): Checklist of the world Scarabaeoidea. *Animma X5*, 1–278.
- Král D., Hružová L., Šípek P., Awale A. I., Hurre A. A. & Sommer D. (2019): *Pachnoda iskuulka* (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae), a new species from Somaliland, including description of its mature larva. *Zootaxa* **4604(3)**, 482–496.
- LeCun Y., Bengio Y. & Hinton G. (2015): Deep learning. *Nature* **521**, 436–444.

- Kumar S., Stecher G. & Tamura K. (2016): MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**, 1870–1874.
- Leigh J. W. & Bryant D. (2015): PopART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* **6**, 1110–1116.
- Martineau M., Conte D., Raveaux R., Arnault I., Munier D. & Venturini G. (2017): A survey on image-based insects classification. *Pattern Recognition* **65**, 273–284.
- Mikšić R. (1978): Eine weiterer Beitrag zur Kenntnis der jugoslawischen *Oxythyrea*-Arten. *Acta Entomologica Jugoslavica* **14(1–2)**, 69–71.
- Mitchell A., Moeseneder C. H. & Hutchinson P. M. (2020): Hiding in plain sight: DNA barcoding suggests cryptic species in all 'well-known' Australian flower beetles (Scarabaeidae: Cetoniinae). *PeerJ* **8**, e9348.
- Perissinotto R., Clennell L. & Beinhundner (2019): *Lophorrhinides muellerae* (Coleoptera, Scarabaeidae, Cetoniinae): a new genus and species from southern Tanzania. *ZooKeys* **833**, 75–84.
- Puillandre N., Lambert A., Brouillet S. & Achaz G. (2012): ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology* **21**, 1864–1877.
- Ratcliffe B. C. (2014): A Review of the Neotropical Genera *Badelina* Thomson, 1880, *Balsameda* Thomson, 1880, *Guatemalica* Neervoort van de Poll, 1886, and *Heterocotinis* Martínez, 1948 (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae: Gymnetini). *The Coleopterists Bulletin* **68(2)**, 241–262.
- Rohlf F. J. (2009): tpsUTIL. file utility program. Version 1.44. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. Available from: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Rohlf F. J. (2010): tpsRELW. Version 1.49. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook. Available from: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Ronquist F., Teslenko M., Mark van der M., Ayres D. L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M. A. & Huelsenbeck J. P. (2012): MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Systematic Biology* **61**, 539–542.
- Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J. C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S. E. & Sánchez-Gracia A. (2017): DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* **34**, 3299–3302.
- Sabatinelli G. (1981): Le *Oxythyrea* Muls. del Mediterraneo: studi morfologici sistematici (Coleoptera, Scarabaeoidea). *Fragmenta Entomologica* **16**, 45–60.

- Sabatinelli, G. (1984): Studi sul genere *Oxythyrea*: note sulle specie del gruppo *Cinctella*. *Bollettino della Societa Entomologica Italiana* **116(4-7)**, 102–104.
- Schmidhuber J. (2015): Deep learning in neural networks: An overview. *Neural Networks* **61**, 85–117.
- Seidel M. (2016): Morphology and DNA barcoding reveal a new species of *Eudicella* from East Africa (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae). *Zootaxa* **4137(4)**, 435–544.
- Silvestro D. & Michalak I. (2012): raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution* **12**, 335–337.
- Simonyan K. & Zisserman A. (2015): Very deep convolutional networks for large-scale image recognition. Přístupné z: arXiv:1409.1556.
- Van Rossum G. & Drake Jr F. L. (1995): *Python reference manual*. Centrum voor Wiskunde en Informatica, Amsterdam.
- Zhang J., Kapli P., Pavlidis P. & Stamatakis A. (2013): A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics* **29**, 2869–2876.
- Zhou B., Khosla A., Lapedriza A., Oliva A. & Torralba, A. (2016): Learning deep features for discriminative localization. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 2921–2929.

CURICULUM VITAE

EDUCATION

since 2012

PhD studies in study programme Zoology (Entomology), Faculty of Science, Charles University in Prague. Topic of the dissertation thesis: *Larval morphology, phylogeography and automatic identification of chosen flower chafer beetles (Scarabaeidae: Cetoniinae)*.

Supervisor: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

2010 – 2012

Master's degree in study programme Zoology, Faculty of Science, Charles University in Prague. Master's thesis: *Population structure of flower chafer Oxythyrea funesta (Poda, 1761) and phylogeny of the genus Oxythyrea Mulsant, 1842*.

Supervisor: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

2007 – 2010

Bachelor's degree in study programme Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague. Bachelor's thesis: *Biogeography and taxonomy of European flower chafer beetles (Coleoptera: Scarabaeoidea: Cetoniinae)*.

Supervisor: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

PROFESSION

since 2016

National Museum in Prague – Department of Entomology.

Position: scientist and researcher in a molecular biology laboratory.

2012 – 2014

Faculty of Science, Charles University in Prague – Department of Zoology.

Position: technician in molecular biology laboratory.

2010

National Museum in Prague – Department of Entomology.

Position: technician.

PEDAGOGICAL ACTIVITIES

2011 – 2016	MB170P79	Course of Entomology – practices
2011 – 2016	MB170P09I	Invertebrate zoology – practices
2011 – 2016	MB120P05	Terrestrial ecosystems – excursions
2011 – 2016	MB170T23	Advanced field course in zoology – excursions
2011 – 2016, 2021	MB170T24	Field course in zoology – excursions

PROJECTS AND GRANTS

2021 – 2022

Internal Grant of National Museum (No. P21/011G-VO):

Is there really an endemic subspecies of the European rhinoceros beetle *Oryctes nasicornis* in the Czech Republic?

Position: main applicant

Project guarantor: Mgr. Jiří Hájek, Ph.D.

2016 – 2019

Program of applied research and development of national and cultural identity (NAKI No. DG16P02B038):

Determination methods in Zoology based on DNA analyses and management and evidence of tissue zoological collection.

Position: scientist and researcher in a molecular biology laboratory

Main applicant: RNDr. Petr Dolejš, Ph.D.

2016

Synthesys grant (No. FR-TAF-5869):

Unveiling the speciation processes in rose chafers: Integrative taxonomy and biogeography of the genus *Oxythyrea* and possible description of new species.

Two weeks visit of the Muséum national d'histoire naturelle in Paris (MNHM).

2012 – 2016

Project STARS (Supporting TAleented PhD Research):

Evolution processes in basal groups of Polyphagous beetles.

Supervisor: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

2012 – 2014

The Grant Agency of Czech Republic (GAČR No. P506/12/P096):

Ancient habitat shifts from water to dry land: phylogeny and biogeography of the Gondwanan Sphaeridiinae (Coleoptera: Hydrophilidae).

Position: technician in a molecular laboratory

Main applicant: Mgr. Martin Fikáček, Ph.D.

2010 – 2012

The internal Grant Agency of Charles University (GAUK No. 95410):

Phylogeny of the Rose Chafers (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae): a molecular approach.

Position: main applicant (2011 – 2012)

Supervisor: Mgr. Petr Šípek, Ph.D.

PUBLICATIONS

Fikáček M., Minoshima Y., **Vondráček D.**, Gunter N. & Leschen R. A. B. (2013): Morphology of adults and larvae and integrative taxonomy of Gondwanan genera *Tormus* and *Afrotormus* (Coleoptera: Hydrophilidae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* **53**, 75–126.

Fikáček M., Maruyama M., **Vondráček D.** & Short A. E. Z. (2013): *Chimaerocyon* gen. nov., a morphologically aberrant myrmecophilous genus of water scavenger beetle (Coleoptera: Hydrophilidae: Sphaeridiinae). *Zootaxa* **3716(2)**, 289–300.

Vendl T., **Vondráček D.**, Kubáň V. & Šípek P. (2014): Immature stages of Taenioderini (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae): a report of hidden morphological diversity. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* **54(2)**, 571–604.

Fikáček M. & **Vondráček D.** (2014): A review of *Pseudorygmodus* (Coleoptera: Hydrophilidae), with notes on the classification of the Anacaenini and on distribution of genera endemic to southern South America. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* **54(2)**, 497–514.

Fikáček M., Maruyama M., Komatsu T., Beeren von C., **Vondráček D.** & Short A. E. Z. (2015): Protosternini (Coleoptera: Hydrophilidae) corroborated as monophyletic and its larva described for the first time: a review of the myrmecophilous genus *Sphaerocetum*. *Invertebrate Systematics* **29**, 23–36.

Angus R. B., Jia F., Chen Z., Zhang Y., **Vondráček D.** & Fikáček M. (2016): Taxonomy, larval morphology and cytogenetics of *Lihelophorus*, the Tibetan

- endemic subgenus of *Helophorus* (Coleoptera: Hydrophiloidea). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* **56(1)**, 109–148.
- Seidel M., Arriaga-Varela E. & **Vondráček D.** (2017): Abstracts of the Immature Beetles Meeting 2017 October 5-6, Prague, Czech Republic. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* **57(2)**, 835–859.
- Hlaváč P., **Vondráček D.** & Mohagan A. B. (2018): A new species of the genus *Colilodion* Besuchet, 1991 (Coleoptera: Staphylinidae: Pselaphinae) from Mindanao, the Philippines. *Zootaxa* **4370(5)**, 562–568.
- Vondráček D.**, Fuchsová A., Ahrens D., Král D. & Šípek P. (2018): Phylogeography and DNA-based species delimitation provide insight into the taxonomy of the polymorphic rose chafer *Protaetia (Potosia) cuprea* species complex (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae) in the Western Palearctic. *PLoS ONE* **13(2)**, e0192349.
- Szczepanski W. T., **Vondráček D.**, Seidel M., Wardhaugh C. & Fikáček M. (2018): High diversity of *Cetiocyon* beetles (Coleoptera: Hydrophilidae) along an elevational gradient on Mt. Wilhelm, New Guinea, with new records from the Bird's Head Peninsula. *Arthropod Systematics & Phylogeny* **76(2)**, 323–347.
- Vondráček D.**, Hadjiconstantis M. & Šípek P. (2018): Immature stages of the genus *Oxythyrea* (Coleoptera: Scarabaeidae: Cetoniinae) with a key to third instar larvae, and notes on the biology of the genus. *Zootaxa* **4486(4)**, 401–434.
- Fikáček M., Liang W. R., Hsiao Y., Jia F. & **Vondráček D.** (2018): Biology and morphology of immature stages of banana-associated *Protosternum* beetles, with comments on the status of Taiwanese endemic *P. abnormale* (Coleoptera: Hydrophilidae). *Zoologischer Anzeiger* **277**, 85–100.
- Vondráček D.**, Tkoč M. & Fikáček M. (2018): Is repeated cypermethrin fumigation dangerous for the mitochondrial DNA in dry insect samples? *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* **58(2)**, 609–614.
- Valan M., Makonyi K., Maki A., **Vondráček D.** & Ronquist F. (2019): Automated taxonomic identification of insects with expert-level accuracy using effective feature transfer from convolutional networks. *Systematic Biology* **68(6)**, 876–895.
- Kundrata R., Prosvirov A., **Vondráček D.** & Sormova E. (2019): Congruence between molecular data and morphology: phylogenetic position of *Senodoniini* (Coleoptera: Elateridae). *Insects* **10(8)**, 1–17.
- Hájek J., Alarie Y., Šťastný J. & **Vondráček D.** (2019): The first hydropetric *Platynectes* and its larva from eastern China (Coleoptera: Dytiscidae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* **59(1)**, 217–228.

- Kundrata R., Blank S., Prosvirov A., Sormova E., Gimmel M., **Vondráček D.** & Kramp K. (2019): One less mystery in Coleoptera systematics: the position of Cydistinae (Elateriformia *incertae sedis*) resolved by multigene phylogenetic analysis. *Zoological Journal of the Linnean Society* **187**(4), 1259–1277.
- Aghová T., Benda P., Brejcha J., Dolejš P., Kyrálová E., Mlíkovský J., Moravec J., Šanda R., Štundl J., Tkoč M. & **Vondráček D.** (2019): *Metodika správy a evidence tkáňové zoologické sbírky a determinace zoologického sbírkového materiálu na základě analýzy DNA*. Národní muzeum, Praha, 111 pp.
- Vondráček D.**, Aghová T., Benda P., Brejcha J., Fikáček M., Moravec J., Šanda R. & Štundl J. (2019): *Molekulárně fylogenetický výzkum v Národním muzeu*. Národní muzeum, Praha, 104 pp.
- Vondráček D.** & Aghová T. (2019): Doba genová – výstava Národního muzea (nejen) o genetice. *Journal of the National Museum (Prague), Natural History Series* **188**, 157–162.
- Šípek P., **Vondráček D.**, Sommer D., & Hružová L. (2020): Velká výstava bezobratlých proběhla on-line. *Živa* **6**, CLXX.
- Andrle M. & **Vondráček D.** (2020): Výstava bezobratlých online. *Vesmír* **99**, 542.
- Šťastný J., **Vondráček D.**, Arriaga-Varela E. & Hájek J. (2020): The genus *Platynectes* (Coleoptera: Dytiscidae: Agabinae) in Central America, with the discovery of the northernmost Neotropical species in Oaxaca, Mexico, and nomenclatural notes on the subgenus *Agametrus*. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **91**, e913394.
- Hájek J., Reiter A. & **Vondráček D.** (2021): Molecular analysis and morphological variability confirm *Hydaticus dhofarensis* Pederzani, 2003 as the westernmost population of the Indomalayan *H. bipunctatus* Wehncke, 1876 (Coleoptera: Dytiscidae). *Zoology in the Middle East* **67**(2), 1–8.
- Valan M., **Vondráček D.** & Ronquist F. (2021): Awakening a taxonomist's third eye: exploring the utility of computer vision and deep learning in insect systematics. *Systematic Entomology* **46**(4), 757–766.
- Šípek P., **Vondráček D.** & Sommer D. (2021): Velká výstava bezobratlých 2021. *Živa* **4**, CXXXIX.
- Vondráček D.**, Král D. & Šípek P. (2022): Cryptic diversity of *Oxythyrea* flower chafers and its implication for conservation of non-forest biotopes in the Balkans. Manuscript prepared for the submission in *Insect Conservation and Diversity*.