

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2011

Václav Palata

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulární fylogeneze neotenních skupin
v čeledi Lycidae (Insecta: Coleoptera)**

Diplomová práce

Václav Palata

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: Prof. Ing. Ladislav Bocák, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval sám a že jsem v seznamu literatury uvedl všechny prameny, ze kterých jsem při psaní diplomové práce čerpal.

V Olomouci dne

Václav Palata

Poděkování

Děkuji vedoucímu práce za konzultace, poskytnutý materiál pro izolaci DNA a připomínky k rukopisu diplomové práce. Děkuji také Douglasu Chestersovi za poskytnutí skriptů v jazyce Pearl použitých při fylogenetických analýzách a rovněž děkuji ostatním kolegům za pomoc během práce v laboratoři molekulární systematiky.

Abstrakt

Neotenie je důležitý mechanismus produkující evoluční novinky. V případě studované skupiny, neotenní modifikace vyvolávají drastické změny fenotypu v blízké příbuzných skupinách. Mnohonásobný původ neotenie u čeledi Lycidae (Insecta: Coleoptera) je nedávno publikovaná hypotéza dosud podpořená omezeným datovým souborem. Ověřoval jsem postavení podčeledi XXXXXXXXX a studoval jsem vzájemné postavení skupin XXXXXXXXX, XXXXXXXXX, XXXXXXXXX a XXXXXXXXX na základě nového, několikanásobně většího datového souboru. Mimo to, jsem určil původ velkých trilobitních larev uvnitř této linie. Nově vyprodukovaná data byla zkombinována s dříve publikovanými datovými soubory. Fylogenetickým analýzám předcházelo vytvoření čtyř datových supermatic metodami alignmentu ClustalX, BlastAlign, Muscle a Tcoffee. Každý gen byl alignován zvlášť a poté byly geny spojeny a analyzovány přístupem total evidence. Fylogenetická hypotéza byla založena na parciálních sekvencích tří mitochondriálních genů *cox1*, *nad5* a *16S rDNA* a dvou jaderných genů *18S rDNA* a *28S rDNA*. Data byla analyzována třemi fylogenetickými metodami – maximální parsimonie v programu TNT, maximum likelihood v programu RAXML a Bayesiánská analýza v programu MrBayes. Výsledky podporují nedávno publikovanou re-definici XXXXXXXXX, mnohonásobný původ neotenie a původ velkých samic v koncových liniích XXXXXXXXX. Dále se ukázalo, že neotenní skupiny XXXXXXXXX, XXXXXXXXX a XXXXXXXXX mohou sdílet společného předka, což vypovídá o značném evolučním stáří. Výsledky fylogenetických analýz podporují vznik neotenních linií před rozpadem Gondwany. Všechny neotenní taxony se vyskytují v dlouhodobě stabilních ekosystémech a tento fakt podporuje předpokládanou neschopnost těchto linií reagovat na prudké klimatické změny. Několik morfologických znaků považovaných za unikátní synapomorfie se vyvinulo paralelně v nezávislých liniích v důsledku neotenních modifikací.

Abstract

Neoteny is an important mechanism producing evolutionary novelties. The neotenic despite close phylogenetic relationships may differ substantially in morphology. The recent hypothesis proposes multiple origins of neoteny in the beetle family Lycidae. I tested the relationships of XXXXXXXXX, XXXXXXXXX, XXXXXXXXX and XXXXXXXXX and the origin of large-bodied trilobite larvae within XXXXXXXXX. The phylogenetic hypotheses were inferred from three fragments of *cox1*, *nad5* and *16S rDNA* mtDNA and two nuclear genes *18S rDNA* and *28S rDNA*. The newly produced sequences were combined with previously published dataset. Phylogenetic analyses were preceded by the assembling of four supermatrices created by four alignment algorithms: ClustalX, BlastAlign, Muscle and Tcoffee. Each gene was aligned separately and then the partial matrices were combined and were analysed by total evidence approach. The phylogenetic hypotheses were inferred under several optimisation criteria – maximum parsimony applied in TNT, maximum likelihood in RAXML and Bayesian analysis in MrBayes. The results support the recently published re-definition of XXXXXXXXX, the multiple origin of neoteny and the origin of large-bodied females in the terminal lineages of XXXXXXXXX. Furthermore, preferred hypothesis suggests that neotenic lineages XXXXXXXXX, XXXXXXXXX and XXXXXXXXX may share a common ancestor, which indicates an ancient evolutionary origin of neoteny. The data support the origin of neotenic before the split of the Gondwanan continents. All taxa were collected in areas with long term presence of tropical rain forests and this fact supports the presumed inability of these lineages to respond to the rapid climatic changes and shift their ranges to favourite regions in case of deep disturbances. Several morphological traits previously considered to be unique synapomorphies evolved independently in distantly related lineages as a result of neotenic modifications.

Obsah

1 Úvod.....	1
1.1 Neotenie v čeledi Lycidae	1
1.2 Cíl práce	3
2 Metodika a materiál.....	4
2.1 Laboratorní práce: izolace DNA, PCR amplifikace, čištění PCR produktu, cycle sequencing, sekvenace.....	4
2.2 Analýza dat: editace sekvencí, alignment, fylogenetické analýzy.....	7
3 Výsledky.....	9
3.1 Shrnutí fylogenetických analýz.....	13
4 Diskuse a závěr.....	15
4.1 Několikanásobný nebo unikátní vznik neotenie.....	15
4.2 Význam neotenie v čeledi Lycidae.....	18
4.3 Paralelní vývoj morfologických znaků v neotenních liniích.....	20
5 Literatura.....	21

1 Úvod

Lycidae jsou elateroidní čeledí brouků (Coleoptera) a jejich nejbližšími příbuznými jsou světluškovití (Lampyridae), páteříčkovití (Cantharidae) a kovaříkovití (Elateridae) (Bocáková & kolektiv, 2007). Některé linie nadčeledi Elateroidea se vyznačují neotenním vývojem samic a celkově modifikovanou morfologií obou pohlaví v důsledku narušení ontogenetických procesů (Bocák & kolektiv, 2008; Kundrata & Bocák, v tisku). Studium ontogenetických procesů má dlouhou tradici pokud se jedná o obratlovce (Gould, 1977), avšak bezobratlí, včetně hmyzu, zůstávali dlouho mimo pozornost. Vyplývá to z toho, že fauna hmyzu je mnohem bohatší, a proto je taxonomicky podstatně méně prozkoumána. Jednou z linií živočichů s velmi pozměněnou ontogenezí jsou někteří Lycidae (Lawrence & Britton, 1991; Bocák & kolektiv, 2008). Z hlediska evoluce jsou tyto brouci velmi zajímavou skupinou. Samci čeledi Lycidae dokončují metamorfózu, podobně jako ostatní skupiny brouků: krovky a druhý pár křídel samců jsou plně vyvinuté, avšak tělo je slabě sklerotizované a abdomen si zachovává některé larvální znaky (např. exponované intersegmentální membrány). Sexuálně dospělé samice si zachovávají kompletní larvální morfologii. Takto významné modifikace ontogeneze silně ovlivňují schopnost šíření a způsob speciace (Malohlava & Bocák, 2010).

1.1 Neotenie v čeledi Lycidae

Převážná většina skupin čeledi Lycidae má samce i samice okřídlené a vzájemně podobné, nicméně několik rodů z podčeledí XXXXXXXX, Dilophotinae: Ateliini a Lycinae: Calopterini má neotenní larviformní samice. Dlouho zůstávaly znalosti o těchto skupinách velmi omezené a samci a samice byli považováni za samostatné taxony a někdy klasifikováni dokonce v různých čeledích: samci pod jménem XXXXXXXX Pic v čeledi Drilidae a samice označované jako XXXXXXXX Mjöberg v čeledi Lycidae (Wong, 1996; Bocák & Bocáková, 2008). Samičí neotenie byla definitivně prokázána až pozorováním kopulace samce a samice patřících do rodu XXXXXXXX, v deštném pralese jihovýchodní Asie (Mjöberg, 1925; Wong, 1996) a předpokládána na základě sběru samců a samic XXXXXXXX Waterhouse společně pod kusu dřeva (Gravely, 1915). Někteří samci a samice z rodu XXXXXXXX a *Macrolibnetis* Pic byli nedávno identifikováni pomocí molekulárních markerů (Levkaničová & Bocák, 2009).

Miller (1991) popsal larviformní samice druhu *XXXXXXXXX XXXXXXXX* Leng & Mutchler z Velkých Antil. V případě některých rodů, jejichž samci jsou uloženi v muzejních sbírkách ve velkých počtech a jejichž samice jsou neznámé, lze neotonii předpokládat (Bocák & Bocáková, 1990, 2008). Jedná se o rody *XXXXXXXXX* Waterhouse (*XXXXXXXXX*) z Afrotropické oblasti, *xxxxxx* Waterhouse a *xxxxxx* Waterhouse (*XXXXXXXXX*), *xxxxxx* Bocák, *xxxxxx* Bocáková a Bocák, *xxxxxxXXXXXXXXX* Pic a *xxxxxx* Bocáková a Bocák (*XXXXXXXXX*) z Orientální oblasti (Bocáková, 2006).

Znalosti o biologii neotenních skupin jsou velmi omezené, protože chov těchto skupin je velmi obtížný a pouze v přirozených podmínkách se podařilo sledování vývoje po delší časové období (Wong A. T. C., Singapore, osobní sdělení). Všechny známé samice rodů *XXXXXXXXX* a *XXXXXXXXX* zůstávaly larviformní a nevytvořily kuklu. Sexuální dospělost nastává po posledním svlékání bez jakékoliv metamorfózy, pouze se částečně mění struktura kutikuly a otevírá se kopulační otvor (Wong, 1996). Samice obou rodů jsou mimořádně velké a dosahují až patnáctinásobné délky těla ve srovnání se samci. Samice těchto skupin jsou pravidelně pozorovány v přírodě. Další druhy mají samice velmi pravděpodobně podobné velikosti jako samci a dosud nebyly sbírány.

Neotenie v čeledi Lycidae je unikátní tím, že neotenní skupiny prodělávají neotenní vývoj obligatorně a nemohou tuto trajektorii opustit v případě, že jsou vystaveny jiným podmínkám, ve kterých by bylo výhodnější prodělávat kompletní metamorfózu. Tím se podstatně liší od známých modelových skupin jako jsou mloci *Eurycea tynerensis* (Bonett & Chippindale, 2006), kteří za nepříznivých podmínek plně dospívají a tím získávají možnost snadnější disperse.

Obligátní neotenie se vyznačuje tím, že její exprese není řízena vlivy vnějšího prostředí, ale znak je fixován v průběhu evoluce (Bocák & kolektiv, 2008), přitom zůstává nejasné jaký je vliv neotenie na fitness jednotlivců a jak je ovlivněna evoluční úspěšnost neotenních linií. Zatímco fakultativní neotenie umožňuje reverzi k plné metamorfóze, obligátní neotenie je mnohem drastičtější zásahem do biologie skupiny (Bonnet & Chippindale, 2006). Obligátní neotenie je tedy evolučně mnohem významnější změnou ontogeneze a dosud nebyla zaznamenána možnost opuštění neotenního způsobu rozmnožování po jeho fixaci v linii. Všechny neotenní linie Elateroidea jsou velmi chudé na počet druhů a v přírodě se vyskytují pouze v malých populacích. Tato charakteristika ukazuje na jejich potenciální zranitelnost při velkých environmentálních disturbancích.

1.2 Cíl práce

Tato studie se soustředí na skupiny, ve kterých pouze samci dokončují metamorfózu a samice zůstávají larviformní neboli neotenní. Informace o neotenních liniích brouků byly velmi omezené a na základě sběrů z poslední expediční činnosti jsou nyní k dispozici pro izolaci DNA další skupiny pravděpodobně neotenních linií.

Dosud je známo pouze 24 druhů neotenního rodu *XXXXXXXX* (Bocák & Bocáková, 1989) a přibližně 10 druhů v rodu *XXXXXXXX* a *XXXXXXXX* (Pic, 1921). Teprve Bocák a Bocáková (1990) upozornili na možnost neotenního vývoje v dalších skupinách. Bocák a kolektiv (2008) publikovali fylogenezi čeledi Lycidae a sekvenovali 17 neotenních zástupců z tří samostatných linií - *XXXXXXXX*, Dilophotinae: *XXXXXXXX* a Lycinae: Calopterini. Při expediční činnosti v jihovýchodní Asii, Kamerunu, Portoriku, Bolívii a Panamě bylo získáno dalších 69 exemplářů samců a samic převážně neotenních skupin čeledi Lycidae (Tab. 1), jejichž vybrané fragmenty DNA byly sekvenovány a byl tak doplněn datový soubor, který byl publikován již dříve (Bocák & kolektiv, 2008) (Tab. 2). Díky dalšímu materiálu a dat zde získaných, bychom měli získat další informace o evoluci této skupiny a fylogenetických vztazích mezi jednotlivými neotenními liniemi. Tato data by měla pomoci při přesnějším objasnění vzniku neotenních linií a také potvrdit mnohonásobný vznik neotenie v této skupině.

Cílem práce je zodpovědět následující otázky:

- a) jaká je fylogenetická příbuznost afrotropických a neotropických skupin, které dříve nebyly k dispozici. Jedná se konkrétně o africkou skupinu *XXXXXXXX* a neotropický rod *XXXXXXXX*. Afričtí *XXXXXXXX* byli dříve popsáni jako samostatná čeleď (Kazantsev, 2003), ale Bocák a Bocáková (2008) tuto skupinu považovali za součást čeledi Lycidae. Podstatnou otázkou je, zda se jedná o samostatnou neotenní skupinu nebo o příbuzné orientálních *XXXXXXXX*, což by svědčilo o významném evolučním stáří těchto skupin.
- b) potvrdit nebo vyvrátit hypotézu mnohonásobného vzniku neotenie v čeledi Lycidae. Dosud potvrzený trojnásobný vznik neotenie (Bocák & kolektiv, 2008) ukazuje na tendenci tvorby neotenních linií v Lycidae. Faktory ovlivňující vznik neotenie zůstávají předmětem spekulací, protože mimo Elateroidea je vznik neotenie mimořádně výjimečný (Miller, 1991). Mapování vzniku neotenie je významné pro další studium tohoto jevu a jeho makroevolučních důsledků.

c) jsou podobnosti v morfologii neotenních skupin unikátními apomorfiemi nebo se jedná o paralelní vývoj v důsledku přechodu na neotenní trajektorii ontogeneze? Morfologické fylogenetické analýzy vedou k závěru, že neotenní skupiny představují monofyletickou skupinu (Kazantsev, 2003). Molekulární markery jako nezávislý zdroj informací umožňují testování tohoto předpokladu.

2 Metodika a materiál

2.1 Laboratorní práce: izolace DNA, PCR amplifikace, čištění PCR produktu, cycle sequencing, sekvenace

Pro extrakci DNA byly použity exempláře studované skupiny z jihovýchodní Asie (Filipíny, Indonésie, Malajsie, Bocák L. coll.), Kamerunu (Bocák L. coll.), Portorika (Ivie M. coll.), Bolívie (Grebenikov V. coll.) a Panamy (Windsor D. coll.) (Tab. 1). Materiál byl usmrcen v terénu vložení do 96% alkoholu a uložen při teplotě -20°C do doby izolace DNA. K extrakci DNA byla použita svalovina končetin, metathoraxu, případně celý meso-, metathorax a abdomen drobnějších exemplářů. Izolace DNA byla prováděna pomocí DNeasy blood & tissue kitu (QIAGEN). Koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometru nanodrop ND 1000.

PCR amplifikace mitochondriálních genů *cox1* a *nad5* byla provedena s použitím 10xPCR pufru, 50mM MgCl_2 , Platinum Taq DNA polymerasy 5U / μl (Invitrogen), 2mM každého dNTP (Fermentas), 10 μM primerů, destilované vody pro doplnění PCR reakce do 50 μl a 1 - 4 μl templátu (10 - 30 ng dvoušroubovice DNA). PCR amplifikace jaderných genů *28S rDNA*, *18S rDNA* a mitochondriálního genu *16S rDNA* byla provedena s použitím 10x NH_4 PCR pufru, 50mM MgCl_2 , 5x500 U BIOTAQ DNA polymerasy (Bioline), 2mM každého dNTP (Fermentas), 10 μM primerů, destilované vody pro doplnění výsledného roztoku do 50 μl a 1 - 4 μl templátu (10 - 30 ng). Pro amplifikaci jednotlivých genů byly použity protokoly uvedené v Tab. 4. Seznam primerů použitých v reakci je uveden v Tab. 3. Výsledek PCR byl zjištěn pomocí elektroforézy a barvení ethidium bromidem. PCR produkty byly vyčištěny na MultiScreen filtračních destičkách (MILLIPORE) a koncentrace DNA změřena na spektrofotometru nanodrop ND 1000.

Pro sekvenační reakci byl použit Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit v. 1.1, 1,6 μM primery a destilovaná voda. Sekvenační reakce proběhla za těchto podmínek: 1

min při 96°C, 10 s při 96°C, 5 s při 50°C, 4 min při 60°C a 1 hod při 4°C. Sekvenační produkt byl vyčištěn 80% UV ethanolem, 3M NaAc a produkt byl dvakrát promytý 70% etanolem. Sekvenační produkty byly rozpuštěny v Hi-Di formamidu (Applied Biosystems) a sekvenovány v automatickém sekvenátoru ABI 3130.

Tab. 1 Přehled studovaného materiálu

Tab. 1 Pokračování

Tab. 1 Pokračování

Tab. 2 Přehled dříve publikovaných sekvencí použitých pro mimoskupinové srovnání

název rodu	číslo vzorku	cox1	nad5	číslo GenBank			země výskytu
				28S rDNA	18S rDNA	16S rDNA	
<i>Plateros sp. A</i>	303	DQ181215	DQ181369	DQ181141	DQ181067	DQ180993	Indonesia
<i>Duliticola sp. A</i>	588	DQ181239	DQ181393	DQ181165	DQ181165	DQ181165	Indonesia
<i>Lyropaeus sp. A</i>	584	DQ181235	DQ181389	DQ181161	DQ181087	DQ181013	Indonesia
<i>Lyponia sp. A</i>	816	DQ181248	DQ181402	DQ181174	DQ181100	DQ181026	China
<i>Metacantharis sp.</i>	M14	DQ198608	DQ181417	DQ198768	DQ100526	DQ198685	Czech Republic
<i>Calochromus sp. A</i>	347	DQ181216	DQ181370	DQ181142	DQ181068	DQ180994	Malaysia
<i>Konoplatycis sp.</i>	575	DQ181226	DQ181380	DQ181152	DQ181078	DQ181004	Japan
<i>Benibotarus sp. A</i>	573	DQ181224	DQ181378	DQ181150	DQ181076	DQ181002	Japan
<i>Cautires sp. A</i>	L14	DQ181193	DQ181347	DQ181119	DQ181045	DQ180971	South Africa
<i>Dihammatus sp. A</i>	1009	DQ181254	DQ181408	DQ181180	DQ181106	DQ181032	Malaysia
<i>Calochromus sp. B</i>	033	DQ181208	DQ181362	DQ181134	DQ181060	DQ180986	Malaysia
<i>Duliticola sp. B</i>	L01	DQ181185	DQ181339	DQ181111	DQ181037	DQ180963	Malaysia
<i>Lycoprogenthes sp. A</i>	358	DQ181218	DQ181372	DQ181144	DQ181070	DQ180996	Indonesia
<i>Dembickyiella sp.</i>	542	DQ181219	DQ181373	DQ181145	DQ181071	DQ180997	Indonesia
<i>Libnetis sp. A</i>	1002	DQ181252	DQ181406	DQ181178	DQ181104	DQ181030	Indonesia
<i>Microtrichalus sp.</i>	L23	DQ181200	DQ181354	DQ181126	DQ181052	DQ180978	Malaysia
<i>Macrolycus sp. A</i>	L18	DQ181197	DQ181351	DQ181123	DQ181049	DQ180975	China
<i>Platerodrilus sp. A</i>	587	DQ181238	DQ181392	DQ181164	DQ181090	DQ181016	Indonesia
<i>Dictyoptera sp. A</i>	570	DQ181221	DQ181375	DQ181147	DQ181073	DQ180999	Japan
<i>Calochromus sp. C</i>	L16	DQ181195	DQ181349	DQ181121	DQ181047	DQ180973	China
<i>Libnetis sp. B</i>	1008	DQ181253	DQ181407	DQ181179	DQ181105	DQ181031	Malaysia
<i>Idiopteron sp.</i>	M44	DQ181205	DQ181359	DQ181131	DQ181057	DQ180983	Ecuador
<i>Scarelus sp. A</i>	582	DQ181233	DQ181387	DQ181159	DQ181085	DQ181011	Malaysia
<i>Platycis sp. A</i>	576	DQ181227	DQ181381	DQ181153	DQ181079	DQ181005	Japan
<i>Luciola sp.</i>	M03	DQ198595	DQ181415	DQ198762	DQ100514	DQ198672	Indonesia
<i>Eropterus sp. A</i>	580	DQ181231	DQ181385	DQ181157	DQ181083	DQ181009	USA
<i>Thonalmus sp. A</i>	594	DQ181241	DQ181395	DQ181167	DQ181093	DQ181019	Montserrat
<i>Plateros sp. B</i>	243	DQ181213	DQ181367	DQ181139	DQ181065	DQ180991	Malaysia
<i>Lyropaeus sp. B</i>	585	DQ181236	DQ181390	DQ181162	DQ181088	DQ181014	Malaysia
<i>Horakiella sp. A</i>	1043	DQ181258	DQ181412	DQ181184	DQ181110	DQ181036	Malaysia
<i>Lyropaeus sp. C</i>	L11	DQ181190	DQ181344	DQ181116	DQ181042	DQ180968	Malaysia
<i>Lycoprogenthes sp. B</i>	805	DQ181245	DQ181399	DQ181171	DQ181097	DQ181023	Indonesia
<i>Plateros sp. C</i>	1031	DQ181257	DQ181411	DQ181183	DQ181109	DQ181035	USA
<i>Libnetis sp. C</i>	1012	DQ181255	DQ181409	DQ181181	DQ181107	DQ181033	Japan
<i>Lycostomus sp.</i>	L27	DQ181203	DQ181357	DQ181129	DQ181055	DQ180981	China

Tab. 2 Pokračování

<i>Lycus sp.</i>	L03	DQ181187	DQ181341	DQ181113	DQ181039	DQ180965	South Africa
<i>Rhagophthalmus sp.</i>	155	DQ198587	DQ181413	DQ198756	DQ100508	DQ198665	India
<i>Platycis sp. B</i>	348	DQ181217	DQ181371	DQ181143	DQ181069	DQ180995	Czech Republic
<i>Benibotarus sp. B</i>	572	DQ181223	DQ181377	DQ181149	DQ181075	DQ181001	Japan
<i>Lyponia sp. B</i>	L17	DQ181196	DQ181350	DQ181122	DQ181048	DQ180974	China
<i>Pseudoceratoprion sp.</i>	592	DQ181240	DQ181394	DQ181166	DQ181092	DQ181018	Costa Rica
<i>Libnetis sp. D</i>	L02	DQ181186	DQ181340	DQ181112	DQ181038	DQ180964	Malaysia
<i>Lyponia sp. C</i>	817	DQ181249	DQ181403	DQ181175	DQ181101	DQ181027	South Korea
<i>Macrolibnetis sp.</i>	L21	DQ181198	DQ181352	DQ181124	DQ181050	DQ180976	Malaysia
<i>Lycoprogenthes sp. C</i>	801	DQ181243	DQ181397	DQ181169	DQ181095	DQ181021	Indonesia
<i>Platerodrilus sp. B</i>	586	DQ181237	DQ181391	DQ181163	DQ181089	DQ181015	Indonesia
<i>Calochromus sp. D</i>	124	DQ181209	DQ181363	DQ181135	DQ181061	DQ180987	Malaysia
<i>Macrolycus sp. B</i>	828	DQ181250	DQ181404	DQ181176	DQ181102	DQ181028	Thailand
<i>Thonalmus sp. B</i>	595	DQ181242	DQ181396	DQ181168	DQ181094	DQ181020	Montserrat
<i>Metriorrhynchus sp.</i>	L05	DQ181188	DQ181342	DQ181114	DQ181040	DQ180966	Malaysia
<i>Lycoprogenthes sp. D</i>	802	DQ181244	DQ181398	DQ181170	DQ181096	DQ181022	Indonesia
<i>Dictyoptera sp. B</i>	571	DQ181222	DQ181376	DQ181148	DQ181074	DQ181000	Japan
<i>Bicladon sp.</i>	M35	DQ198586	DQ181419	DQ198755	DQ100507	DQ198664	China
<i>Calopteron sp.</i>	L25	DQ181201	DQ181355	DQ181127	DQ181053	DQ180979	Ecuador
<i>Lyponia sp. D</i>	815	DQ181247	DQ181401	DQ181173	DQ181099	DQ181025	Japan
<i>Pendola sp. A</i>	M45	DQ181206	DQ181360	DQ181132	DQ181058	DQ180984	Indonesia
<i>Dihammatus sp. B</i>	L12	DQ181191	DQ181345	DQ181117	DQ181043	DQ180969	Malaysia
<i>Eurrhacus sp. A</i>	M43	DQ181204	DQ181358	DQ181130	DQ181056	DQ180982	Ecuador
<i>Plateros sp. D</i>	031	DQ181207	DQ181361	DQ181133	DQ181059	DQ180985	Malaysia
<i>Pyropterus sp.</i>	574	DQ181225	DQ181379	DQ181151	DQ181077	DQ181003	Japan
<i>Phengodes sp.</i>	M29	DQ198583	DQ181418	DQ198752	DQ100504	DQ198661	USA
<i>Ahyculus sp. A</i>	543	DQ181220	DQ181374	DQ181146	DQ181072	DQ180998	Indonesia
<i>Dilophotes sp.</i>	244	DQ181214	DQ181368	DQ181140	DQ181066	DQ180992	Malaysia
<i>Plateros sp. E</i>	L13	DQ181192	DQ181346	DQ181118	DQ181044	DQ180970	Malaysia
<i>Conderis sp. A</i>	581	DQ181232	DQ181386	DQ181158	DQ181084	DQ181010	Japan
<i>Taphes sp.</i>	812	DQ181246	DQ181400	DQ181172	DQ181098	DQ181024	Laos
<i>Conderis sp. B</i>	194	DQ181210	DQ181364	DQ181136	DQ181062	DQ180988	Malaysia
<i>Lopheros sp.</i>	577	DQ181228	DQ181382	DQ181154	DQ181080	DQ181006	Japan
<i>Flagrax sp.</i>	L26	DQ181202	DQ181356	DQ181128	DQ181054	DQ180980	South Africa
<i>Cautires sp. B</i>	L06	DQ181189	DQ181343	DQ181115	DQ181041	DQ180967	Malaysia
<i>Eropterus sp. B</i>	579	DQ181230	DQ181384	DQ181156	DQ181082	DQ181008	Japan
<i>Dihammatus sp. C</i>	1001	DQ181251	DQ181405	DQ181177	DQ181103	DQ181029	Indonesia
<i>Scarelus sp. B</i>	583	DQ181234	DQ181388	DQ181160	DQ181086	DQ181012	Malaysia
<i>Dihammatus sp. D</i>	1017	DQ181256	DQ181410	DQ181182	DQ181108	DQ181034	Indonesia

Tab. 3 Přehled primerů použitých ve studii

gen / mtDNA	primer / F – forward, R – reverse	autor
<i>cox1 (tRNA-Leu, cox2)</i>	JerryM 23F CAA CAY YTA TTT TGR TTY TTT GG	Osaka / Neoteny
	Marcy 27R TAR TTC RTA TGW RCA ATA YCA YTG RTG	Osaka / Neoteny
<i>nad5 (tRNAs*)</i>	OF1 28F CCT ACT CCT GTT TCT GCT TTA GTT CAT TC	Osaka / Fukui
	R6 29R GAA ACG AAA AAT CGT ATT TAA TTT CGA CT	Osaka
<i>16S rDNA</i>	16a 20F CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT	London / Osaka
	ND1A 27R GGT CCC TTA CGA ATT TGA ATA TAT CCT	Simon et al.,1994 Dirk
	ND1-2 24R ATC AAA AGG AGC TCG ATT AGT TTC	Osaka / Simon
gen / nDNA	primer / F – forward, R – reverse	autor
<i>28S rDNA</i>	ff 20F TTA CAC ACT CCT TAG CGG AT	London
	dd 19R GGG ACC CGT CTT GAA ACA C	London
<i>18S rDNA</i>	5' 24F GAC AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT	Tautz
	b5.0 19R TAA CCG CAA CAA CTT TAA T	Tautz
	a1.0 20F GGT GAA ATT CTT GGA CCG TC	Tautz
	bi 20R GAG TCT CGT TCG TTA TCG GA	Tautz
	a2.0 19F ATG GTT GCA AAG CTG AAA C	Tautz
	3'I 24R CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC GAC	Tautz

* - *tRNA-Phe, tRNA-Glu, tRNA-Ser*

Tab. 4 Podmínky PCR amplifikace pro jednotlivé geny

<i>cox1 (tRNA-Leu, cox2), nad5 (tRNAs*)</i>	<i>28S rDNA</i>
1. 94°C – 1 min	1. 94°C – 2 min
2. 94°C – 1 min	2. 94°C – 30 s
3. 45°C – 1 min	3. 50°C – 45 s
4. 72°C – 2 min	4. 72°C – 1, 45 min
5. 72°C – 10 min	5. 72°C – 10 min
6. 4°C – 1 h	6. 4°C – 1 h
<i>18S rDNA</i>	<i>16S rDNA</i>
1. 94°C – 2 min	1. 96°C – 2 min
2. 94°C – 30 s	2. 96°C – 30 s
3. 48°C – 30 s	3. 41°C – 30 s
4. 72°C – 1, 15 min	4. 72°C – 1, 45 / 2 min
5. 72°C – 10 min	5. 72°C – 10 min
6. 4°C – 1 h	6. 4°C – 1 h

* - *tRNA-Phe, tRNA-Glu, tRNA-Ser*

2.2 Analýza dat: editace sekvencí, alignment, fylogenetické analýzy

Sekvence byly editovány v programu Sequencher verze 4.7 (Gene Codes Corp.) a alignovány programem ClustalX verze 1.8 (Higgins & kolektiv, 1996) pro definici

homologických úseků a strukturální kontrolu proteiny kódujících úseků. Mitochondriální geny vykazovaly minimum inzercí a delecí, zatímco *rDNA* geny obsahovaly větší množství inzercí a delecí. Dlouhé úseky inzercí a delecí, které nevykazovaly homologii s žádným taxonem, byly před fylogenetickou analýzou odstraněny. Fragment *cox1* byl rozdělen na úseky *cox1* (proteiny kódující), *tRNA-Leu* a *cox2* (proteiny kódující). Fragment *nad5* byl rozdělen na úseky *nad5* (proteiny kódující), *tRNA-Phe*, *tRNA-Glu* a *tRNA-Ser* (*tRNAs*). Každý fragment (*cox1*, *tRNA-Leu*, *cox2*, *nad5*, *tRNAs*, *28S rDNA*, *18S rDNA*, a *16S rDNA*) byl alignován samostatně. Proteiny kódující fragmenty byly alignovány pouze v programu ClustaX. Fragmenty *tRNA* a *rDNA* byly alignovány čtyřmi metodami lišícími se použitým algoritmem (ClustalX, BlastAlign, Muscle, Tcoffee). Výsledné matice jednotlivých genů byly konkatenovány s použitím skriptu v jazyce Perl. Výsledkem byly čtyři supermatice obsahující délkově variabilní úseky alignované metodami ClustalX, BlastAlign, Muscle a Tcoffee a proteiny kódující úseky alignované programem ClustalX. Pro všechny alignmenty byly použity defaultní nastavení v příslušných programech. Metoda alignmentu BlastAlign eliminovala hypervariabilní regiony. Čtyři metody alignmentu byly použity vzhledem k nejistotě při definování homologii.

Každá supermatice byla analyzována třemi postupy: a) s použitím optimalizačního kritéria maximální parsimonie (MP) v programu TNT verze 1.1 (Goloboff & kolektiv, 2003), kde pro bootstrapovou analýzu bylo generováno 100 pseudoreplikací; b) s použitím optimalizačního kritéria maximum likelihood aplikovaného v programu RAXML verze 7.2.3 (Stamatakis, 2006a; Stamatakis & kolektiv, 2008). Datový soubor byl rozdělen na geny a kodóny v *mtDNA* protein kódujících fragmentech, pro každou partici byl optimalizován model zvlášť a bylo analyzováno 100 bootstrapových replikací podle GTRCAT substitučního modelu (Stamatakis, 2006b); c) postupem Bayesiánské analýzy v programu MrBayes verze 2.3, kompilace pro paralelní zpracování na multijádrových procesorech Intel Nehalem (Castillo & kolektiv, 2010). Bayesiánské analýzy byly počítány jako dvakrát čtyři řetězce, v každé skupině 1 studený řetězec a 3 horké řetězce po dobu 12×10^6 generací, Markovovou řetězcovou Monte Carlo metodou (MCMC). MCMC metoda byla nastavena pro nezávislou proměnlivost parametrů v individuálních proteiny kódujících a nekódujících genech podle GTR + I + G modelu. Hodnoty pravděpodobnosti byly vyhodnoceny v programu Tracer verze 1.4 (Rambaut & Drummond, 2004) a generace před dosažením stacionární fáze byly vyloučeny z dalších analýz. Výsledné 50% konsenzuální fylogenetické stromy byly vypočteny

v programu PAUP* verze 4.0b10 (Swofford, 2002).

3 Výsledky

Byly získány parciální nebo kompletní sekvence pro 69 jedinců reprezentujících 21 rodů a 48 druhů pro mitochondriální geny *cox1*, *tRNA-Leu*, *cox2*, *nad5*, *tRNAs* a *16S rDNA* a pro jaderné ribosomální geny *28S rDNA* a *18S rDNA* (Tab. 1). Tyto jsem pro další analýzu spojil do jednoho datového souboru s dříve publikovanými sekvencemi příbuzných druhů (Tab. 2). Průměrné zastoupení bazí v jednotlivých fragmentech bylo následující: v genu *cox1* byl adenin (A) zastoupen z 33,73 %, cytosin (C) z 19,39 %, guanin (G) z 15,13 % a thymin (T) z 31,74 %, v *tRNA-Leu* byl A zastoupen z 28,61 %, C z 22,21 %, G z 22,29 % a T z 26,88 %; v *cox2* byl A zastoupen z 29,22 %, C z 22,91 %, G z 20,64 % a T z 27,21 %; v *nad5* byl A zastoupen z 28,65 %, C z 9,50 %, G z 15,89 % a T z 45,95 %; v *tRNAs* byl A zastoupen z 38,01 %, C z 9,01 %, G z 13,39 % a T z 39,57 %; v *28S rDNA* byl A zastoupen z 25,48 %, C z 23,60 %, G z 30,44 % a T z 20,46 %; v *18S rDNA* byl A zastoupen z 24,37 %, C z 24,16 %, G z 27,76 % a T z 23,69 % a v *16S rDNA* byl A zastoupen z 31,35 %, C z 12,92 %, G z 18,13 % a T z 37,58 %. Průměrná délka fragmentu *cox1* byla 806.49 bp, *tRNA-Leu* 106.27 bp, *cox2* 207.74 bp, *nad5* 1013.55 bp, *tRNAs* 202.09 bp, *28S rDNA* 640.24 bp, *18S rDNA* 1868.18 bp a *16S rDNA* 805.09 bp (Tab. 5). Získané sekvence *rDNA* a *tRNA* genů byly alignovány s využitím čtyř algoritnů aplikovaných v programech ClustalX, BlastAlign, Muscle a Tcoffee. Studované *rDNA* a *tRNA* fragmenty sestavené do matice reprezentující homologické pozice vykazovaly v závislosti na použitém algoritmu alignmentu různou délku (Tab. 6). Při alignování metodou ClustalX byl fragment *tRNA-Leu* 110 bp, *tRNAs* 278 bp, *28S rDNA* 793 bp, *18S rDNA* 2054 bp a *16S rDNA* 839 bp. Celá supermatice vytvořená tímto typem alignmentu měla délku 6119 bp. Při alignování metodou BlastAlign byl fragment *tRNA-Leu* 97 bp, *tRNAs* 285 bp, *28S rDNA* 713 bp, *18S rDNA* 1977 bp a *16S rDNA* 635 bp. Celá supermatice vytvořená tímto typem alignmentu měla délku 5747 bp. Při alignování metodou Muscle byl fragment *tRNA-Leu* 153 bp, *tRNAs* 251 bp, *28S rDNA* 777 bp, *18S rDNA* 2029 bp a *16S rDNA* 842 bp. Celá supermatice vytvořená tímto typem alignmentu měla délku 6094 bp. Při alignování metodou Tcoffee byl fragment *tRNA-Leu* 185 bp, *tRNAs* 473 bp, *28S rDNA* 797 bp, *18S rDNA* 2066 bp a *16S rDNA* 865 bp. Celá supermatice vytvořená tímto typem alignmentu měla délku 6425 bp. Počet indelů v jednotlivých alignmentech vzniklých při

použití zmíněných algoritmů při tvorbě alignmentů byl různý. Při použití metody alignmentu ClustalX bylo vytvořeno 68791 indelů, při použití metody BlastAlign 61969 indelů, při použití metody Muscle 60250 indelů a při použití metody Tcoffee bylo vytvořeno 60308 indelů. To svědčí o délkové variabilitě studovaných fragmentů a z tohoto důvodu bylo také uplatněno více metod tvořících alignmenty.

Po konkatenci matic jednotlivých genů, vytvořených s použitím výše uvedených metod alignmentů vznikly čtyři supermatice a každá z nich byla použita pro tři metody fylogenetické analýzy.

a) *optimalizační kritérium MP aplikované programem TNT*

Výsledkem analýzy byly maximálně parsimonní (MP) stromy (Obr. 1), jejichž počet se odvíjel od použité metody alignmentu. Parsimonní analýza supermatice alignované programem BlastAlign poskytla 6 maximálně parsimonních stromů, matice ClustalX 1 strom, Muscle 2 stromy a Tcoffee 4 stromy. Topologie bazálních částí stromů byla nestabilní a jednotlivé kladogramy se lišily v postavení neotenních linií, když XXXXXXXX (XXXXXXXX, XXXXXXXX a příbuzné rody) byly v parafyletickém postavení v metodách alignmentů ClustalX, BlastAlign a Muscle a identifikovány jako monofyletická skupina v analýze alignmentu Tcoffee (Tab. 7). Rod XXXXXXXX a skupina XXXXXXXX (XXXXXXXX sp., XXXXXXXX gen. sp.) byly identifikovány jako monofyletické pouze v metodě alignmentu BlastAlign s tím, že XXXXXXXX tvořil klád pouze s jedním ze dvou taxonů tribu XXXXXXXX zařazených do analýzy (Tab. 7). Rod xxxxxxx tvořil parafyletický klád se skupinou Calopterini (*Calopteron*, *Idiopteron*, *Pseudoceratoprion*) pouze v metodě alignmentu Muscle. Kladogramy vyprodukované na základě ostatních metod alignmentu nenabízely parafýlii ani monofýlii této skupiny taxonů (Tab. 7). Rody XXXXXXXX a XXXXXXXX tvořily parafyletické skupiny v kladogramech vyprodukovaných na základě alignmentů Muscle a Tcoffee a ve zbylých dvou metodách nebyly přítomny v žádném z těchto dvou postavení (monofýlie, parafýlie) (Tab. 7). Rody xxxx xxxxx a XXXXXXXX tvořily ve všech metodách alignmentů monofyletické klády (Tab. 7). Rody xxxxxx, xxxxx a XXXXXXXX tvořily ve všech metodách alignmentů, kromě metody BlastAlign, monofyletické klády. V metodě BlastAlign nebyly přítomny v žádném z těchto postavení (Tab. 7). Bootstrapová analýza identifikovala významnější podporu pouze v terminálních větvích u všech metod

alignmentů (Obr. 1).

b) *optimalizační kritérium maximum likelihood v programu RAXML*

Na základě optimalizačního kritéria maximum likelihood byl vyprodukován maximálně pravděpodobný strom pro každý alignment (Obr. 3) a majoritní konsenzuální strom sumarizující výsledky analýz 100 pseudoreplikací datového souboru (Obr. 2). Na základě všech metod alignmentů byla zjištěna monofýlie skupiny XXXXXXXX (Tab. 7). Rod XXXXXXXX a skupina XXXXXXXX tvořily ve všech metodách alignmentů monofyletické klády. V metodách BlastAlign a Tcofee rod XXXXXXXX tvořil klád pouze s jedním ze dvou XXXXXXXX zařazených do analýzy (Tab. 7). Rod xxxxxx tvořil monofyletické klády se skupinou Calopterini pouze v metodách alignmentů BlastAlign a Tcofee s tím, že v obou případech chyběl v tomto kládu některý z druhů klasifikovaných ve skupině Calopterini. Analýzy matic založených na ostatních metodách alignmentu neidentifikovaly xxxxxx a ostatní Calopterini jako monofyletické nebo parafyletické skupiny (Tab. 7). Rody XXXXXXXX, XXXXXXXX, xxxxxx, xxxxx a XXXXXXXX byly ve všech metodách alignmentů identifikovány jako monofyletická skupina (Tab. 7). Rody xxxxxx, xxxxxx a XXXXXXXX tvořily ve všech metodách alignmentů parafyletické klády (Tab. 7). Podpora bazálních větví byla ve všech případech nízká (Obr. 2).

c) *Bayesiánská analýza v programu MrBayes*

Prestacionární fáze analýzy byla identifikována v programu Tracer a byla vyhodnocena dosažená úroveň zpětných pravděpodobností v jednotlivých analýzách. Fylogenetické stromy dosahující maximální hodnoty pravděpodobnosti ve stacionární fázi byly kombinovány do jednoho souboru a vypočteny majoritní konsenzuální stromy (Obr. 4). Podpora bazálních větví byla poměrně nízká (Obr. 4). Pro jednotlivé metody alignmentů byly v programu Tracer vypočítány hodnoty maximum likelihood s tím, že byly z analýzy odstraněny všechny stromy před dosažením stacionární fáze. Stromy nacházející se ve stacionární fázi byly ponechány a použity k analýze. Pro metodu BlastAlign byla zjištěná hodnota maximum likelihood -136132,2538 a bylo odstraněno 7,6 milionů stromů před dosažením stacionární fáze. Do analýzy bylo zahrnuto 4,4 milionů stromů. Pro metodu ClustalX byla zjištěná hodnota maximum likelihood -149820,9131 a bylo odstraněno 7 milionů stromů před dosažením stacionární fáze. Do analýzy bylo zahrnuto 5 milionů stromů. Pro metodu Muscle byla zjištěná hodnota maximum likelihood -145878,1536 a bylo odstraněno 5 milionů stromů před

dosažením stacionární fáze. Do analýzy bylo zahrnuto 7 milionů stromů. Pro metodu Tcofee byla zjištěná hodnota maximum likelihood -144916,2543 a bylo odstraněno 8,85 milionů stromů před dosažením stacionární fáze. Do analýzy bylo zahrnuto 3,15 milionů stromů. Postavení jednotlivých rodů a skupin ve fylogenetických stromech bylo následující. XXXXXXXXX byli shledáni jako monofyletičtí na základě všech metod alignmentů (Tab. 7). Rod XXXXXXXXX a skupina XXXXXXXXX tvořily monofyletické klády v metodách alignmentu BlastAlign, ClustalX a Tcofee, pouze v metodě BlastAlign rod XXXXXXXXX tvořil klád pouze s jedním taxonem ze dvou rodů tribu XXXXXXXXX (Tab. 7). Rod xxxxxx tvořil se skupinou Calopterini monofyletické klády ve všech metodách alignmentů. V metodách BlastAlign, Muscle a Tcofee chyběly ve větvi Calopterini některé klasifikované druhy (Tab. 7). Rody XXXXXXXXX a XXXXXXXXX vytvářely monofyletické klády v metodách alignmentů BlastAlign a Tcofee. V metodě ClustalX vytvářely tyto rody klád parafyletický (Tab. 7). Skupina rodů xxxxxx, xxxxxx a XXXXXXXXX tvořila monofyletickou skupinu v kladogramech vyprodukovaných na základě matic reprezentujících všechny metody alignmentu kromě metody alignmentu BlastAlign (Tab. 7).

Všechny analýzy podporují monofýlii čeledi Lycidae a majoritní fylogenetické stromy založené na všech alignmentech byly téměř plně dichotomické (Obr. 1, 2), pouze výsledek Bayesiánské analýzy alignmentu vyprodukovaného programem BlastAlign vykazoval nedostatečné rozlišení bazálních větví a výsledkem byla několikanásobná multifurkace v bazální části kladogramu (Obr. 4). Podpora terminálních linií byla všeobecně vyšší. XXXXXXXXX reprezentováni rody XXXXXXXXX a XXXXXXXXX získávali podporu 100% v analýzách supermatic ve všech metodách alignmentů (Obr. 1, 4). Většina analýz indikuje příbuznost rodů XXXXXXXXX a XXXXXXXXX, ovšem postavení tohoto kládu vůči XXXXXXXXX je variabilní a pouze alignment Tcofee přiřadil tuto skupinu do kládu s ostatními XXXXXXXXX (Obr. 2, 4).

Tab. 7 uvádí frekvenci výskytu vybraných kládů neotenních Lycidae dle metody alignmentu a metody fylogenetické analýzy. Základní otázkou bylo postavení neotenních linií. Metoda maximální parsimonie v programu TNT vykazala vysokou topologickou shodu v postavení skupin XXXXXXXXX a XXXXXXXXX, avšak postavení XXXXXXXXX, XXXXXXXXX a XXXXXXXXX bylo variabilní v jednotlivých analýzách založených na kritériu maximální parsimonie a všeobecně v konfliktu s výsledky maximum likelihood a Bayesiánské analýzy.

Tab. 5 Průměrná délka genů a zastoupení bazí [%]

gen	průměrné zastoupení bazí [%]				průměrná délka fragmentů [bp]
	A	C	G	T	
<i>cox1</i>	33,73	19,39	15,13	31,74	806.49
<i>tRNA-Leu</i>	28,61	22,21	22,29	26,88	106.27
<i>cox2</i>	29,22	22,91	20,64	27,21	207.74
<i>nad5</i>	28,65	9,5	15,89	45,95	1013.55
<i>tRNAs*</i>	38,01	9,01	13,39	39,57	202.09
<i>28S rDNA</i>	25,48	23,6	30,44	20,46	640.24
<i>18S rDNA</i>	24,37	24,16	27,76	23,69	1868.18
<i>16S rDNA</i>	31,35	12,92	18,13	37,58	805.09

* - *tRNA-Phe*, *tRNA-Glu*, *tRNA-Ser*

Tab. 6 Srovnání délek alignovaných genů v supermaticích dle metody alignmentu

typ alignmentu	geny / [bp]								celkem [bp]
	<i>cox1**</i>	<i>tRNA-Leu</i>	<i>cox2**</i>	<i>nad5**</i>	<i>tRNAs*</i>	<i>28S rDNA</i>	<i>18S rDNA</i>	<i>16S rDNA</i>	
ClustalX	809	110	208	1028	278	793	2054	839	6119
BlastAlign	808	97	208	1024	285	713	1977	635	5747
Muscle	809	153	208	1025	251	777	2029	842	6094
Tcoffee	808	185	208	1023	473	797	2066	865	6425

* - *tRNA-Phe*, *tRNA-Glu*, *tRNA-Ser*

** - Protein kódující geny byly alignovány pouze metodou ClustalX, ale do výsledných supermatic byly vloženy tak, jak byly vytvořeny touto metodou.

3.1 Shrnutí fylogenetických analýz

Výsledky fylogenetických analýz silně závisely na použité metodě alignmentu a optimalizačním kritériu pro výpočet fylogenetických stromů. Přesto je možno konstatovat, že dostupná data podporují:

a) monofýlii čeledi Lycidae (Obr. 1 - 4).

b) mnohonásobný vznik neotenních skupin v čeledi Lycidae (Obr. 1 - 4): rod *Scarelus* byl vždy součástí kládů s plně metamorfovanými samicemi, obvykle v příbuznosti s rody *Lyponia* a *Macrolycus* (Obr. 1 - 4). Rody xxxxxxxx a xxxxxx byly obvykle součástí kládu obsahujícího rody *Lycus*, *Calopteron*, *Idiopteron* a *Lycostomus* a tedy součástí Lycinae (Obr. 2, 3, 4). XXXXXXXXX představují další nezávislý vznik neotenie v čeledi Lycidae. Postavení XXXXXXXXX a XXXXXXXXX bylo nejisté a buď byli součástí jiných neotenních linií, obvykle XXXXXXXXX (Obr. 1 - 4) nebo představovali další nezávislý vznik neotenních forem.

- c) skupina rodů *xxxxxx*, *xxxxx*, *xxxxxx*, *xxxxxx*, *xxxxx* a *XXXXXXXX* tvořila klád a tento měl vysokou statistickou podporu ve většině analýz (Obr. 1, 4). Tento klád byl identifikován ve většině fylogenetických analýz napříč metodami alignmentu. Pouze rody *xxxxx*, *xxxx* a *XXXXXXXX* tvořily parafyletický klád ve fylogenetické analýze programu RAXML a to ve všech metodách alignmentů (Obr. 2, 3). A také u skupiny *XXXXXXXX* se vyskytovala parafýlie ve fylogenetické analýze programu TNT v metodách alignmentů BlastAlign, ClustalX a Muscle (Obr. 1).
- d) většina analýz ukazuje na příbuznost rodu *XXXXXXXX* z Indonésie a afrotropických rodů *XXXXXXXX* a *XXXXXXXX* gen. sp. Postavení tohoto kládu je vysoce nestabilní a pouze některé analýzy podporují jejich příbuznost s *XXXXXXXX* (Obr. 1 - 4). Fylogenetickou analýzou, ze které vyplývá příbuznost rodu *XXXXXXXX* se skupinou *XXXXXXXX* a to ve všech metodách alignmentů je RAXML (Obr. 2, 3). Alternativní postavení rodů *XXXXXXXX* a *XXXXXXXX* byla nekonzistentní a neposkytla konkurenční hypotézu podpořenou alespoň dvěma analýzami.
- e) většina analýz ukazuje na příbuznost rodu *XXXXXXXX* a *XXXXXXXX*. Ve fylogenetické analýze programem RAXML vytvářejí ve všech metodách alignmentů monofyletický klád (Obr. 2, 3). Ve fylogenetické analýze programu MrBayes pak vykazují monofýlii v metodách alignmentů BlastAlign a Tcoffee (Obr. 4). Ve fylogenetické analýze TNT a zbylých metodách alignmentů se jednalo buď o parafýlii nebo tento klád nebyl v preferovaném kladogramu přítomen.
- f) rody *xxxxx* a *xxxxx* tvoří ve většině případů klád se skupinou Calopterini, což svědčí o jejich vzájemné příbuznosti (Obr. 1 - 4).
- g) většina analýz umožnila pravidelnou a dobře podporovanou identifikaci jedné z neotenních larev s adultním exemplářem stejného druhu: adult *XXXXXXXX sp. F* (VP014) je konspecifický s larvou *XXXXXXXX sp. Q* (VP2316) (Obr. 2).
- h) rozšíření příbuzných neotenních skupin v Africe, Asii a střední Americe ukazuje na jejich gondwanský původ a minimální stáří okolo 120 milionů let, kdy byly tyto fauny v kontaktu.

Obr. 1 Majoritní konsenzuální strom získaný metodou maximální parsimonie na základě alignmentu Muscle

Obr. 2 Majoritní konsenzuální strom na základě 100 pseudoreplikací získaný metodou RAXML při použití alignmentu Tcoffee

Obr. 3 Maximálně pravděpodobný strom získaný metodou RAXML na základě alignmentu BlastAlign

Obr. 4 Majoritní konsenzuální strom sumarizující 8400 stromů ze stacionární fáze Bayesiánské analýzy na základě alignmentu Tcoffee

Tab. 7 Frekvence výskytu zvolených kládů neotenních Lycidae vybraných do analýzy

4 Diskuse a závěr

Neotenní linie čeledi Lycidae po dlouhou dobu představovaly záhadnou skupinu, která díky své vzácnosti a nemožnosti identifikace larválních stádií a konspicivních dospělců stála mimo zájem entomologů i evolučních biologů. Expediční činnost v posledních letech zajistila materiál, který bylo možno použít k izolaci DNA a navázat na první práce zabývající se touto skupinou (Bocáková & Bocák, 2007; Bocák & kolektiv, 2008; Malohlava & Bocák, 2010).

Ve zde prezentovaných analýzách byla čeleď Lycidae velmi dobře podporována jako monofyletická skupina všemi datovými soubory a vysokou statistickou podporu na úrovni 100% získala především v Bayesiánské analýze (Obr. 4). Tento výsledek je v souladu s předchozími molekulárními analýzami (Bocák & kolektiv, 2008; Bocák & Bocáková, 2008) a morfologickými studiemi (Bocák & Bocáková, 1991; Bocák & Matsuda, 2003). Jednoznačně je tímto odmítnuta hypotéza polyfyletického původu čeledi Lycidae v obvyklém pojetí jak navrhl Kazantsev (2003). Čeleď XXXXXXXX sensu Kazantsev (2003) nemá místo ve fylogenetické klasifikaci skupiny a tato skupina jako součást čeledi Lycidae musí mít nižší klasifikační úroveň.

4.1 Několikanásobný nebo unikátní vznik neotenie

Zde předložené analýzy jsou poprvé založeny na kompletním souboru neotenních linií včetně skupin ze střední Ameriky a subsaharské Afriky. Rovněž se podařilo podstatně zvýšit zastoupení taxonů z jihovýchodní Asie. Dřívější hypotézy preferovaly unikátní vznik

neotenních skupin v čeledi Lycidae a následnou reverzi zpět k okřídleným, plně metamorfovaným formám (Crowson, 1972; Kazantsev, 2003). Tato hypotéza vyžadovala popření Dollova zákona, který předpokládá nemožnost vzniku jednou ztracených struktur. Poslední práce (Bocáková & kolektiv, 2007; Bocák & kolektiv, 2008) naproti tomu predikují mnohonásobný vznik neotenních forem a jejich přežívání, ačkoliv v omezeném počtu druhů, malých populacích a v omezených areálech (Malohlava & Bocák, 2010). Všechny dosavadní studie se potýkaly s nedostatkem materiálu a nekompletním nebo nerovnoměrným pokrytím jednotlivých zoogeografických oblastí. Proto zůstávalo zcela nejisté postavení rodu XXXXXXXX a jeho případných příbuzných (klasifikováni jako podčeleď čeledi Lycidae pouze na základě morfologických dat, viz Bocák & Bocáková, 2008 nebo jako samostatná čeleď XXXXXXXX - viz Kazantsev, 2003). Dále panovala značná nejistota ohledně postavení rodu XXXXXXXX z oblasti Velkých Antil (typický rod podčeledi XXXXXXXX, Leng & Mutchler, 1922). XXXXXXXX byl s pochybnostmi klasifikován společně s neoteními skupinami xxxx, xxxx a příbuzní v rámci převážně metamorfované skupiny Calopterini (podčeleď Lycinae, viz Miller, 1991; Bocák & Bocáková, 2008).

Základní otázkou je tedy vznik neotenních skupin: zda se jedná o jednu monofyletickou linii nebo zda vznikly tyto skupiny několikanásobně. Bylo získáno dalších 69 exemplářů reprezentujících 21 rodů a 48 druhů neotenních, ale také neneotenních Lycidae a tím byl podstatně rozšířen datový soubor, který byl již dříve analyzován (17 neotenních taxonů a základní zastoupení plně metamorfovaných linií, Bocák & kolektiv, 2008). Veškeré výsledky jsou tedy založeny na kombinovaném souboru dat, který zahrnuje jak dříve publikované sekvence, tak nová data.

Ve všech analýzách byl zjištěn minimálně trojnásobný vznik neotenie v čeledi Lycidae (Obr. 1 - 4). Podčeleď XXXXXXXX byla nově definována jako jedna ze tří neotenních linií v čeledi Lycidae (Bocák & Bocáková, 2008). Výsledky současné analýzy nového kombinovaného datového souboru tuto definici podčeledi XXXXXXXX podporují a to napříč použitými metodami konstrukce fylogenetického stromu (Obr. 1 - 4). Žádná analýza nepodporuje možnost, že by Dilophotinae: Ateiliini a XXXXXXXX byly monofylem a XXXXXXXX jsou vždy samostatnou neotenní linií (Obr. 1 - 4). Mimo to, v samostatném postavení vůči XXXXXXXX zůstávají neotenní rody xxxxx a xxxxxx, které jsou v souladu s předchozími hypotézami považovány za součást tribu Calopterini (Obr. 2, 3, 4) (Miller, 1991;

Bocák & Bocáková, 2008).

Přes významné zvýšení počtu taxonů v analýze ani zde dosažené výsledky nejsou zcela jednoznačné a přes v zásadě souhlasný fylogenetický signál z jednotlivých analýz zůstává otevřený prostor ke spekulacím v jednotlivých dílčích otázkách.

Metoda maximální parsimonie v programu TNT vykazovala vysokou topologickou shodu v sesterském postavení rodů *XXXXXXXX* a *XXXXXXXX* a jejich příbuzných, avšak postavení *XXXXXXXX*, *XXXXXXXX* a *XXXXXXXX* bylo velmi variabilní v jednotlivých MP analýzách a všeobecně v konfliktu s výsledky maximum likelihood a Bayesiánské analýzy. Slabinou metody maximální parsimonie je nezohlednění pravděpodobnosti mutací mezi jednotlivými nukleotidy a v jednotlivých homologických pozicích. Proto se tato metoda v současnosti považuje za nespolehlivou a pravidelně jsou mimo kritéria parsimonie aplikovány kritéria maximální pravděpodobnosti a Bayesiánské analýzy.

Robustnější výsledky v identifikaci vybraných kládů definovaných na základě významné morfologické shody a výskytu v malých společných areálech (skupiny definované v Tab. 7), podávaly fylogenetické analýzy v programu RAXML (maximální pravděpodobnost) a MrBayes (Bayesiánská analýza). Analýzy na základě obou optimalizačních kritérií podporovaly blízkou příbuznost rodů *XXXXXXXX* a *XXXXXXXX* a jejich příbuzných (*xxxxx*, *xxxx*, *xxx*, *xxxx*, *xxxx*, *XXXXXXXX*, *xxxx*) (Obr. 2, 3, 4). Tyto linie tedy můžeme považovat za samostatnou skupinu a její limit přibližně odpovídá nedávnému pojetí (Bocák & Bocáková, 2008).

Afrotropická neotenní skupina *XXXXXXXX*, která byla dříve charakterizována jako samostatná čeleď (Kazantsev, 2003), vykazovala ve většině fylogenetických analýz (RAXML, MrBayes) příbuznost s neotenním rodem *XXXXXXXX* z jihovýchodní Asie (Obr. 2, 3, 4). Vzhledem k nutnosti testovat samostatné postavení tohoto rodu v Elateroidea byly do analýzy zařazeny i další čeledi (Lampyridae, Omalisidae, Cantharidae a Phengodidae) avšak žádná analýza neindikuje postavení *XXXXXXXX* mimo čeleď Lycidae. To znamená, že hypotéza o samostatném postavení *XXXXXXXX* (Kazantsev, 2003) je odmítnuta. Většina analýz ukazuje že skupiny *XXXXXXXX*, *XXXXXXXX* a *XXXXXXXX* sdílejí společného předka (Obr. 1 - 4). Vzhledem k tomu, že se jedná o skupiny s neotenními samičkami a tím extrémně limitovanou schopností disperse, tyto výsledky ukazují na značné evoluční stáří této neotenní

skupiny. Datování publikované Bocákem (Bocák & kolektiv, 2008) předpokládá stáří těchto linií ve svrchním mezozoiku. To znamená, že tyto skupiny vedle sebe existovaly už v době, kdy byly jižní kontinenty spojeny v Gondwanu. Stáří těchto dvou skupin také nasvědčují velmi dlouhé větve (Obr. 3), ale samotné datování nebylo v této studii analyzováno.

XXXXXXXX jako další neotenní linie byli vždy považováni za samostatnou linii a zde provedené analýzy ve všech případech tento předpoklad potvrdily (Obr. 1 - 4). Jedná se o malou, samostatnou linii vyskytující se výhradně v Orientální oblasti a pravděpodobně příbuznou plně metamorfovanými Lyponiini a Macrolycini. Morfologicky jsou tyto skupiny velmi odlišné a jediným společným znakem jsou široká pilovitá tykadla. Ovšem tvar tykadel je vzhledem k čichové funkci pro vyhledání sexuálního partnera považován za velmi plastický znak s nižší vypovídací hodnotou na vyšších úrovních klasifikace (Bocák a Bocáková, 2008).

Další skupinou neotenních Lycidae jsou rody xxx a xxxx, kteří byli klasifikováni na základě morfologické podobnosti ve skupině XXXXXXXX (Bocák & Bocáková, 1991, 2008; Kazantsev, 2003). Překvapivě, XXXXXXXX je převážně nacházen v příbuzenské pozici s XXXXXXXX a XXXXXXXX (Obr. 1 - 4), zatímco pouze xxxx a příbuzní zůstávají v sesterské pozici s Calopterini (Obr. 1 - 4). Tím XXXXXXXX musejí být klasifikováni samostatně a neotenní Calopterini představují další nezávislý vznik neotenie v čeledi Lycidae. Vzhledem k nejistotě jejich postavení v analýzách musíme tento výsledek považovat za předběžný a další data budou nutná k podpoře dosavadních výsledků.

4.2 Význam neotenie v čeledi Lycidae

Heterochronie je významným zdrojem evolučních novinek a saltačních změn (Gould, 1977). Jedná se o modifikaci ontogeneze, kdy vznik některých morfologických struktur vázaný na určitý časový úsek ontogenetického vývoje se přesouvá do jiné fáze ontogeneze. K samotnému fenoménu neotenie vedou poměrně malé genetické změny, v případě hmyzu pravděpodobně zasahující endokrinním systémem a vyvolávající významné změny ve fenotypu (Nijhout, 1994; Jablonski, 2000). Výsledky současných analýz znovu podporují několikanásobný vznik neotenie a avšak nepřinesly jednoznačnou podporu vícenásobnému vzniku unikátních neotenních samic v podčeledi XXXXXXXX (Obr. 1 - 4). Tyto samice jsou

zcela nepodobné larvám i dospělcům jiných linií čeledi Lycidae, jsou až 20krát těžší než samci a zcela jiného tvaru než ostatní larvy (neotenní trilobitní larvy, Mjöberg, 1925). Vyskytují se v rodech *XXXXXXXX*, *xxxxx* a *XXXXXXXX*. Tyto rody tvořily v některých analýzách monofylum (Obr. 1 - 4). V případě nekalkanásobného vzniku v příbuzných skupinách by se jednalo o paralelní vývoji unikátních morfologických struktur pod tlakem přírodního výběru modifikujícího společný genetický základ. V případě neotenních samic obligatorní neotenie stojí na počátku trendu k velkému tělu, které zajišťuje kladení mimořádně velkých vajíček a tím líhnutí životaschopnějších larev (Bocák & kolektiv, 2008). K definitivnímu objasnění vzniku velkých samic bude nutno analyzovat větší datový soubor.

Neotenie je podle všeho upřednostňována za podmínek pomalého růstu ve stabilním prostředí, které vylučuje potřebu adultních jedinců dispergovat do okolních ekosystémů a omezuje potřebu velké produkce potomků (Gould, 1977). Jak je již výše uvedeno, u mnohých mloků je neotenie reversibilní tzn., že podle tlaku vnějšího prostředí mohou zůstat buď neotenní nebo mohou prodělat kompletní metamorfózu a stát se tak plně vyvinutými, disperse schopnými jedinci. Tento jev, tzv. fakultativní neotenie, poskytuje únikovou strategii, která zabezpečuje přežití v nestabilních podmínkách (Bonnet & Chippindale, 2006). Naopak obligátní neotenie, týkající se právě některých rodů čeledi Lycidae, se vyznačuje vysokým rizikem vyhynutí při významnější změně vnějšího prostředí a tento typ neotenie je patrně evolučně mnohem riskantnější strategií než neotenie fakultativní. Všechny vzorky neotenních skupin pocházely právě z oblastí, ve kterých existuje již po velmi dlouhou dobu tropický deštný les. Je tedy možné předpokládat, že neotenie v dlouhodobém horizontu zvyšuje riziko vymření ovlivněných linií a je tedy z hlediska dlouhodobého působení přírodního výběru rysem spíše tolerovaným než preferovaným.

Ze získaných výsledků vyplývá potvrzení studie o mnohonásobném původu neotenie v čeledi Lycidae (Bocák & kolektiv, 2008). Přes poměrně vysoký stupeň nejistoty v postavení jednotlivých kládů, všechny analýzy ukazují na mnohonásobný původ neotenie a to napříč aplikovanými metodami alignmentu a fylogenetické analýzy. Dále se ukazuje, že neotenní skupiny jako *XXXXXXXX*, *XXXXXXXX* a *XXXXXXXX* mohou sdílet společného a tedy neotenního předka, což poukazuje na značné evoluční stáří těchto skupin sahající až do doby před přibližně 120 miliony let, kdy ještě existoval kontinent Gondwana. Disperse těchto skupin přes oceány je velmi nepravděpodobná vzhledem k tomu, že mořská voda tyto

organismy velmi rychle zabíjí. K podobným závěrům došla detailní studie neotenního tribu XXXXXXXXX, která prokázala vikarianční původ ostrovních neotenních skupin. V rámci jediného rodu byl na základě molekulárních dat předpokládán přenos neoteniků na kontinentálních fragmentech a odmítnuta možnost šíření přes vodní bariéry (Malohlava & Bocák, 2010). Tento závěr je v souladu s výsledky datování vzniku moderních čeledí řádu Coleoptera (Hunt & kolektiv, 2007). Tato studie klade vznik dnešních čeledí do doby před 170 až 120 miliony let.

4.3 Paralelní vývoj morfologických znaků v neotenních liniích

Mimo lépe podporované hypotézy o příbuznosti neotenních linií a jejich vzniku, tato data mohou poskytnout nový pohled na potenciálně paralelní vznik podobných struktur v liniích se stejnou ontogenetickou modifikací. Klasifikace skupin s výraznými morfologickými modifikace byla vždy ovlivněna problematickou interpretací znaků. První klasifikace Coleoptera pokoušející se o zohlednění příbuznosti jednotlivých linií obsahovaly skupinu Malacodermata, která sdružovala veškeré formy se slabou sklerotizací kutikuly (viz literární přehled publikovaný Lawrence & kolektiv, 1995). Takto byly v jedné skupině klasifikovány čeledi Dasytidae (dnes Cucujiformia: Cleroidea) a např. Lycidae a Lampyridae (dnes Elateriformia: Elateroidea). Ačkoliv vzdálená pozice těchto skupin byla navržena Crowsonem (1955) a následující klasifikace již tyto skupiny neobsahovaly (Lawrence & Newton, 1995), zůstaly v klasifikaci Coleoptera podobně problematické taxony na úrovni čeledí a podčeledí. Zvláště dlouho přetrvávala v zásadě typologická klasifikace nadčeledí a čeledí v sérii Elateriformia. Skupiny s měkkým tělem byly klasifikovány jako Cantharoidea (čeledi Lycidae, Phengodidae, Omalisidae, Drilidae, Lampyridae, Cantharidae, Telegeusidae, Omethidae) a silně sklerotizované skupiny jako nadčeď Elateroidea (Elateridae, Throscidae a Eucnemidae). Teprve poslední data přesvědčivě ukázala, že není možné akceptovat klasifikaci podčeledí Cantharoidea a Elateroidea: Lycidae, Cantharidae a Lampyridae jsou blízce příbuzní a tvoří monophylum, ovšem Phengodidae, a Omalisidae jsou sesterskou skupinou Elateridae. Drilidae jsou součástí Elateridae jako terminální linie v podčeledi Agrypninae a Omethidae a Telegeusidae jsou bazálními liniemi Elateroidea (Bocáková & Bocák, 2007; Kundrata & Bocák, v tisku). Takto razantní změny v klasifikaci založené na molekulárních datech nás vedou k podobné analýze na úrovni čeledi Lycidae.

Neotenní skupiny v čeledi Lycidae byly původně klasifikovány jako dvě samostatné linie - monophylum tvořené podčeleděmi XXXXXXXX, XXXXXXXX a XXXXXXXX a podčeď Ateliinae (rody xxxx a xxxx) (Bocák & Bocáková, 1991). Později Kazantsev (2003) osamostatnil XXXXXXXX jako sesterskou skupinu čeledi Lycidae, a ponechal ostatní neotenní skupiny v bazální pozici jako neotenní grade ve vývoji následovaný terminální skupinou obsahující všechny plně metamorfované linie čeledi Lycidae. Tyto klasifikace byly založeny výhradně na morfologických datech: neotenní samice (neotenie byla vesměs pouze předpokládána, protože samice nebylo možné identifikovat), ústní orgány redukované, uložené v hypognátní pozici - v důsledku toho cranium charakteristického tvaru s vystouplými antennálními hrboly, tykadla často zkrácená, někdy se sníženým počtem tykadlových článků, krovky bez zpevňujících žeber, samčí kopulační orgány vesměs s jednoduchým zašpičatělým phallem. Ačkoliv se jedná o poměrně velký počet dobře definovatelných unikátních znaků a morfologie hodnocená samostatně vede k závěru, že se jedná o unikátní synapomorfie definující skupinu neotenních linií v čeledi Lycidae, molekulární data ukázala, že se jedná o paralelní vývoj znaků vázaných na existenci neotenie samic a s tím souvisejícího ovlivnění morfologie samců.

Závěry této studie tedy ukazují, že na všech úrovních fylogenetických analýz založených na morfologických datech je nutné velmi obezřetně přistupovat k potenciálně korelovaným znakům a pokud možno jejich interpretaci potvrdit nebo vyvrátit na základě nezávislých informací, jako jsou molekulární markery. V současnosti používané markery jsou adaptivně neutrální vůči vzniku a evoluci neotenie a proto jsou velmi vhodným nástrojem k testování morfologických hypotéz týkajících se fylogeneze neotenních skupin.

5 Literatura

Bocák L. & Bocáková M. 1989. New tribe Lyropaeini, with a description of a new species of *Lyropaeus* (Coleoptera, Lycidae). *Polskie Pismo Entomologiczne*, 58: 717 - 723.

Bocák L. & Bocáková M. 1990. Revision of the supergeneric classification of the family Lycidae (Coleoptera). *Polskie Pismo Entomologiczne*, 59: 623 – 676.

- Bocák L. & Bocáková M. 1991. Notes on some Palaearctic and Oriental representatives of the tribe Erotini (Coleoptera, Lycidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca*, 88: 313 – 326.
- Bocák L. & Bocáková M. 2008. Phylogeny and classification of the family Lycidae (Insecta: Coleoptera). *Annales Zoologici*, 58: 695 – 720.
- Bocák L., Bocáková M., Hunt T. & Vogler A. P. 2008. Multiple ancient origins of neoteny in Lycidae (Coleoptera): consequences for ecology and macroevolution. *Proceedings of the Royal Society B*, 275: 2015 - 2023.
- Bocák L. & Matsuda K. 2003. Review of immature stages of the family Lycidae (Insecta: Coleoptera). *Journal of Natural History*, 37: 1463 - 1507.
- Bocáková M. 2006. Review of the tribe Lyropaeini (Coleoptera: Lycidae). *European Journal of Entomology*, 103: 127 - 136.
- Bocáková M., Bocák L., Hunt T., Teraväinen M., & Vogler A. P. 2007. Molecular phylogenetics of Elateriformia (Coleoptera): evolution of bioluminescence and neoteny. *Cladistics*, 23: 477 - 496 (doi:10.1111/j.1096-0031.2007.00164.x).
- Bonett R. M. & Chippindale P. T. 2006. Streambed microstructure predicts evolution of development and life history in the plethodontid salamander *Eurycea tynerensis*. *BMC Biology*, 4: 6 (doi:10.1186/1741-7007-4-6).
- Castillo S., Liu L., Pearl D. K. & Edwards S. V. 2010. Bayesian estimation of species trees: a practical guide to optimal sampling and analysis, in book „Estimating species trees“ (edited by Laura Kubatko and Lacey Knowles).
- Crowson R. A. 1955. The natural classification of the families of Coleoptera. Nathaniel Lloyd, London.

Crowson R. A. 1972. A review of the classification of Cantharoidea (Coleoptera), with the definition of two new families: Cneoglossidae and Omethidae. *Revista de la universidad de Madrid. Estudios de Entomologia*, 21: 35 – 71.

Goloboff P., Farris J. & Nixon K. 2003. T. N. T.: Tree analysis using new technology. Available at: <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny> (accessed on March 1, 2008).

Gould S. J. 1977. *Ontogeny and phylogeny*. Cambridge, MA: Harvard University Press.

Gravely F. H. 1915. The larvae and pupae of some beetles from Cochin. *Records of the Indian Museum*, 11: 353 - 366.

Higgins D. G., Thompson J. D. & Gibson T. J. 1996. Using Clustal for multiple sequence alignments. *Methods in Enzymology*, 266: 383 - 402.

Hunt T., Bergsten J., Levkaničová Z., Papadopoulou A., St-John O., Wild R., Hammond P. M., Ahrens D., Balke M., Caterino M. S., Gómez-Zurita J., Ribera I., Barraclough T. G., Bocáková M., Bocák L. & Vogler A. P. 2007. A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science*, 318: 1913 – 1916.

Jablonski D. 2000. Micro- and macroevolution: scale and hierarchy in evolutionary biology and paleobiology. *Paleobiology* 26(Suppl.), 15 - 22 (doi:10.1666/0094-8373(2000)26[15:MA MSAH]2.0.CO;2).

Kazantsev S. V. 2003. Morphology of Lycidae with some considerations on evolution of the Coleoptera. *Elytron*, 17: 49 - 226.

Lawrence J. F. & Britton E. B. 1991. Coleoptera. pp. 543 - 683. In: CSIRO (eds.) *The Insects of Australia*. Volume 2. Melbourne University Press, Carlton, Victoria.

Lawrence J. F. & Newton A. F. 1995. Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). In: Lawrence J. F., Pakaluk J., Slipiński S. A. (Eds.), biology, phylogeny and classification of Coleoptera. Museum i instytut zoologii PAN, Warszawa, pp. 779 – 1092.

Lawrence J. F., Slipiński S. A. & Pakaluk J. 1995. From Latreille to Crowson: a history of the higher-level classification of beetles. In: Lawrence J. F., Pakaluk J., Slipiński S. A. (Eds.), biology, phylogeny and classification of Coleoptera. Museum i instytut zoologii PAN, Warszawa, pp. 87 – 154.

Leng C. W. & Mutchler A. J. 1922. The Lycidae, Lampyridae and Cantharidae (Telephoridae) of the West Indies. Bulletin of the American Museum of Natural History, 46: 413 – 499.

Levkaničová Z. & Bocák L. 2009. Identification of net-winged beetle larvae (Coleoptera: Lycidae) using three mtDNA fragments: a comparison of their utility. Systematic Entomology, 34: 210 - 221.

Malohlava V. & Bocák L. 2010. Evidence of extreme habitat stability in a Southeast Asian biodiversity hotspot based on the evolutionary analysis of neotenic net-winged beetles. Molecular Ecology, 19: 4800 - 4811.

Miller R. S. 1991. A revision of the Leptolycinae (Coleoptera: Lycidae) with a discussion of paedomorphosis. PhD thesis. The Ohio State University, U. S. A.

Mjöberg E. 1925. The mystery of the so called „trilobite larvae“ or „Perty’s larvae“ definitely solved. Psyche, 32: 119 - 157.

Nijhout H. F. 1994. Insect hormones. Princeton, NJ: Princenton University Press.

Pic M. 1921. Contribution a l’étude des Lycides. L’Échange, 405: 5 – 8, hors – texte.

Rambaut A. & Drummond A. J. 2004. Tracer version 1.4. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer> (accessed on July 1, 2010).

Stamatakis A. 2006a. RAXML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22: 2688 – 2690.

Stamatakis A. 2006b. Phylogenetic models of rate heterogeneity: A high performance computing perspective. In: International parallel and distributed processing symposium, Proceedings 20th IEEE international parallel & distributed processing symposium, 2006, pp. 278.

Stamatakis A., Hoover P. & Rougemont J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAXML web-servers. *Systematic Biology*, 75: 758 - 771.

Swofford D. L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony. v. 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer.

Wong A. T. C. 1996. A new species of neotenus beetle, *Duliticola hoiseni* (Insecta: Coleoptera: Cantharoidea: Lycidae) from Peninsular Malaysia and Singapore. *Raffles Bulletin of Zoology*, 44: 173 - 187.