

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

**Fylogeneze tribu *Calopterini* (Coleoptera: Lycidae)**

Diplomová práce

Bc. Romana Kalousová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie

Forma studia: prezenční

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

Olomouc 2018

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. Ing. Ladislava Bocáka, Ph.D. a použila jsem pouze uvedené bibliografické zdroje.

Olomouc, 13. 12. 2018

.....

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych velmi poděkovala prof. Ing. Ladislavu Bocákovi, Ph.D. za vedení této práce. Další o nic menší vděk patří všem mým kolegům z laboratoře molekulární systematiky za jejich ochotu a spolupráci.

## **BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE**

Jméno a příjmení autora: Bc. Romana Kalousová

Název práce: Fylogeneze tribu *Calopterini* (Coleoptera: Lycidae)

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

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

Rok obhajoby práce: 2018

## **ABSTRAKT**

Tribus *Calopterini* Green, 1949 (Coleoptera: Lycidae) je převážně neotropická skupina obsahující několik set druhů, z nichž část je potenciálně neotenních. Dřívější studie se potýkaly vzhledem k modifikované ontogenezi i některým chybějícím zástupcům s problémy při definování morfologických synapomorfii. Práce založená na morfologických znacích rozdělila tribus *Calopterini* do tří podtribů: *Eurrhacina*, *Acroleptina* a *Calopterina*. *Eurrhacina* byly později povýšeny na tribus. Molekulární fylogeneze této skupiny dosud nebyla studována. Předložená práce je tedy první molekulárně založenou fylogenetickou studií tribu *Calopterini* a předkládá podklady pro novou klasifikaci a hypotézu o evoluci neotenie. Tato studie je postavená na pěti genových fragmentech: jaderné markery zastoupeny sekvencemi ribozomálních genů 18S rRNA a 28S rRNA, mitochondriální markery zastoupeny fragmenty *rrnL*, *nad5* a *cox1* mtDNA. Výsledky fylogenetické analýzy podporují sesterské postavení *Eurrhacini* a *Calopterini*.

, což odráží nedostatečnou znalost této skupiny. Byl prokázán

Klíčová slova: Neotenie, Jižní Amerika, *Calopterini*, molekulární fylogeneze

Počet stran: 48

Počet příloh: 0

Jazyk: čeština

## **BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION**

First name and surname of the author: Romana Kalousova

Name of the thesis: Phylogeny of the tribe *Calopterini* (Coleoptera: Lycidae)

Type of thesis: Master thesis

Workplace: Department of Zoology, Faculty of Science, Palacký University Olomouc

Thesis supervisor: prof. Ing. Ladislav Bocák, Ph.D.

Year of defence: 2018

## **ABSTRACT**

The Calopterini Green, 1949 (Coleoptera: Lycidae) is a predominantly tropical lineage of net-winged beetles and contains several hundred described species. Some of them putatively have larviform females and are considered as neotenic. Earlier studies had to solve problems with character homologation owing to the considerably modified morphology of species with the neotenic development. Additionally, some species have not been available for the analysis. Morphology-based analysis defined three subtribes: Eurrhacina, Acroleptina a Calopterina. The first of them was later elevated to the tribal rank - Eurrhacini. The molecular phylogeny of this group have not yet been studied and this is the first trial to present a comprehensive molecular hypothesis for this lineage. Here, I present the basis for the new classification and a modified hypothesis on the evolution of ontogeny. The phylogenetic tree was recovered using five nuclear and mitochondrial DNA fragments: 18S rRNA, 28S rRNA, and *rrnL*, *nad5*, *cox1* mtDNA. The results support the sister relationships of Calopterini and Eurrhacini, but

These findings document our fragmentary knowledge on the tropical diversity.

Key words: Neoteny, South America, Calopterini, molecular phylogeny

Number of pages: 48

Number of supplements: 0

Language: Czech

# Obsah

Úvod .....	7
<i>Čeďed' Lycidae - modelová skupina</i> .....	10
<i>Biologie čeďedi Lycidae</i> .....	11
<i>Klasifikace čeďedi Lycidae</i> .....	12
<i>Postavení a klasifikace tribu Calopterini</i> .....	12
Cíle práce .....	16
Materiál a metodika .....	17
<i>Materiál</i> .....	17
<i>Izolace DNA, PCR amplifikace a sekvenování</i> .....	21
Izolace DNA .....	21
PCR amplifikace .....	22
Elektroforéza a čištění PCR produktu .....	23
Sekvenační reakce a čištění sekvenačního produktu .....	24
Sekvenování .....	25
Editace sekvencí a fylogenetické analýzy .....	25
Analýza datové matice .....	26
Výsledky .....	28
<i>Data</i> .....	28
<i>Alignment</i> .....	28
<i>Fylogenetická hypotéza</i> .....	29
Diskuze .....	32
<i>Datový soubor</i> .....	32
<i>Fylogenetická hypotéza</i> .....	32
Závěr .....	37
Literatura .....	38

## Úvod

Systematická biologie je základní biologický obor, který poskytuje všem vědcům slovní pojmenování organismů a fylogenetickou hypotézu o jejich příbuznosti (Hennig, 1965; Wiley a Lieberman, 2011). Popsání druhu zahrnuje klasifikaci do rodu, čímž umísťuje každý organismus do vyšších taxonomických jednotek a na základě toho pak do fylogenetického stromu života, a tím definuje jeho příbuzenské vztahy (Ride, 1999). Poznání fylogeneze je nezbytné nejen pro sestavení formální klasifikace, ale i pro pochopení evoluce jednotlivých znaků, vzniku adaptací a složitých interakcí ve společenstvech organismů a fungování ekosystémů na Zemi.

Obor systematická entomologie se zabývá, jak už je z názvu patrné, klasifikací hmyzu. Hmyz je mimořádně úspěšná skupina a na Zemi dominuje již po stovky miliónů let. Během této doby převyšuje ostatní skupiny nejen svou biomasou a počtem druhů, ale i množstvím adaptací a zejména pak svým ekologickým vlivem (Grimaldi a Engel, 2005; Samways, 2005). Právě kvůli vysoké diverzitě představuje velmi obtížnou skupinu z hlediska klasifikace, která je doposud neúplná (Brues a kol., 1954). Minimální odhady hovoří o trojnásobku druhů, než bylo doposud popsáno, ty extrémní až o desetinásobku druhů (Erwin, 1982; Gaston, 1991; Novotny a kol., 2006; Hamilton a kol., 2010). Výše zmíněné rysy znamenají, že hmyz má velký význam pro lidské ekonomické aktivity. Nejčastěji se hmyz dostává do konfliktu s lidskými zájmy v zemědělství (Essig, 1933; Zhang a kol., 2007) a lesnictví (Wood, 1982; Bashford, 2008), významní jsou škůdci skladovaných potravin (Freeman, 1948; Campbell, 2002) a přenašeči chorob (Purcell a Finlay, 1979; Ligon, 2005; Busvine, 2012). Dalšími často studovanými skupinami hmyzu jsou parazitické druhy jak hospodářky významných zvířat, tak lidí samotných (Marshall, 1981; Randolph a Storey, 1999). Na druhou stranu vnímáme mnoho hmyzích druhů pozitivně až nezbytně pro jejich interakce s rostlinami i jinými organismy, pro suroviny, které produkují, nebo pro jejich dekompoziční vlastnosti (Gullan a Cranston, 2014). Tlak lidské populace na zmenšení původních biotopů nastoluje také otázku vymezení chráněných území, která by při obhajitelných nákladech zachránila maximální podíl současné biodiverzity. Ačkoliv velká část ochrany přírody se primárně zaměřuje na obratlovce (Balmford a kol., 2002), hmyz je často velmi spolehlivým indikátorem oblastí s mimořádnou lokální diverzitou (Brown,

1991; McGeoch, 1998; Andersen a kol., 2002; Belore a kol., 2002; McGeoch a kol., 2002; Rainio, J. a Niemelä, J., 2003; Bocek a kol., 2018).

Systematická entomologie se zabývá nejrozsáhlejší skupinou živočichů na této planetě. Vezmeme-li v úvahu, že doposud bylo popsáno a pojmenováno téměř 2 miliony druhů živočichů (Costello a kol., 2011), tak hmyz s přibližně milionem druhů tvoří v současnosti ~50 % diverzity (McKenna a kol., 2015) a je zřejmé, že tato skupina sehrává klíčovou roli v mnoha ekosystémech z hlediska počtu jedinců i jejich celkové biomasy. Hmyz a hlavně brouci jsou považováni za neúspěšnější žijící skupinu dominující na Zemi již od osídlení souše prvními živočichy, respektive od permu v případě brouků (Grimaldi a Engel, 2005). Mimořádná diverzita je přitom výzvou z hlediska zaměření studia: mnoho skupin je endemických a vyskytují se v méně prostudovaných oblastech, takže unikají pozornosti a znalosti i takových skupin, jako jsou řády, takže studie jsou neúplné a dochází k překvapivým objevům (Klass a kol., 2002). Především tropická diverzita zůstává velmi slabě prozkoumaná. Jednotlivé skupiny hmyzu, typicky obsahující desítky tisíc druhů, jsou studovány uzavřenými komunitami systematických entomologů (Riedel a kol., 2013) a v mnoha případech nejsou předmětem trvalého intenzivního studia a pouze příležitostně jsou publikovány dílčí informace. Systematická entomologie proto v dohledné době není schopna vyprodukovat detailní strom života pro všechny hmyz a studium pokračuje dílčími revizemi založenými jak na morfologii, tak v současnosti na molekulárních mitochondriálních a genomických datech (Hansen, 1991; Miller, 1991; Howland a Hewitt, 1995; Misof a kol., 2014).

Řád brouci (Coleoptera) obsahuje největší počet popsáných druhů: 380 000–400 000 podle různých autorů (Hammond, 1992; Bocak a kol., 2014; McKenna a kol., 2015) a je rozdělen do čtyř podřádů: Archostemata, Myxophaga, Adephaga a Polyphaga. Poslední z nich je nejvíce diverzifikován, obsahuje přes 300 000 druhů a je členěn do sérií (ekvivalent infrařádů), nadčeledí a cca 170 čeledí (Bocak a kol., 2014). Morfologické studie Coleoptera mají dlouhou tradici a první kritické hodnocení morfologie celého řádu bylo publikováno Crowsonem (1955, 1960). Na něj navázala velká studie Lawrence a kol. (2011). Mimo to existuje velké množství studií věnovaných jednotlivým podčeledím nebo čeledím brouků, protože homologizace znaků napříč celým řádem je mimořádně obtížná. Jednotlivým skupinám se věnovali např. Beutel (1999), Branham a Wenzel (2003), Leys a kol. (2003) nebo Ulyshen a kol.



(2017). Molekulární studie mohou být založeny na fylogenomických analýzách (Misof, 2014; Peters a kol., 2014; Kusy a kol., 2018), na větších datových souborech reprezentujících desítky markerů a zástupce významných čeledí celého řádu (Timmermans a kol., 2010; McKenna a kol., 2015; Zhang a kol. 2017), studie věnované jednotlivým nadčeledím a obvykle limitované několika markery jako rRNA a mitochondriální DNA (O'Neill a kol., 1992; Ribera a kol., 2002; Kundera a kol., 2014). Mimo to jsou analyzovány jednotlivé čeledi nebo triby a tyto data mohou být použita k následným rozsáhlým meta-analýzám, které obsahují tisíce terminálů (Bocak a kol., 2014; Linard a kol., 2018).

V současné době je diverzita na naší planetě významně ohrožena a entomologické studie se zaměřují mimo základního taxonomického výzkumu i na obecněji formulované otázky (ne)rovnoměrnosti distribuce diverzity, definování oblastí s vysokou alfa-diverzitou a fylogenetickou diverzitou, identifikaci ancestrálních území a směrů disperse jednotlivých taxonů. Změny klimatu a jiných podmínek prostředí, jako jsou tektonické změny měnící pozici kontinentů, vyzdvižení pohoří, nebo zaplavení šelfů, vedou k dynamickým změnám v rozsahu přirozených areálů a tím pak k expanzi nebo zmenšování lokální diverzity (Sanmartin a kol., 2001; Sklenarova a kol., 2013; Clapham a kol., 2016). Mimo dlouhodobě působící tektonické a klimatické změny, dnes nejvíce ovlivňují diverzitu především lidské aktivity, které ohrožují lokality s nejvyšší koncentrací výskytu živočichů a rostlin a výskytem endemitů (Gardner a kol., 2009; Sodhi a kol., 2010). Takové 'hotspots' reprezentují na Zemi pouhých 2 % povrchu, ale na nich se vyskytuje polovina všech terestrických druhů živočichů (Myers a kol., 2000). Delimitace těchto oblastí je nutná pro jejich efektivní ochranu. Tradiční taxonomie je omezena historickým dědictvím: nedostupností typového materiálu, krátkými a neinformativními popisy, které neumožňují identifikaci a dědictvím typologické klasifikace, která nerespektuje požadavek monofyletičnosti všech taxonů vyšších než druh. Podstatná část literatury pro studium systematické entomologie je z dnešního pohledu archaická a často je, místo přirozené fylogenetické klasifikace, pouze bezobsažným jmenným seznamem postrádajícím přirozený základ. Jedním z možných řešení je molekulární fylogenetika, která je schopna poskytnout nezávislý zdroj informací pro klasifikaci.

### ***Čeďed' Lycidae - modelov skupina***

Studovanou skupinou v této práci je eďed' Lycidae (dlouhoustcovit), jež nalei do řádu Coleoptera, nadeďedi Elateroidea, série Elateriformia a podřádu Polyphaga (Crowson, 1955; Lawrence a Newton 1995; Bocakova a kol., 2007). Doposud bylo v této čeďedi popsáno více než 4200 druh a tato skupina se tak řad mezi nejvíce diversifikovan elateroidn linie (Kleine, 1933; Bocak a Bocakova 2008; Bocak a kol., 2014; Masek a kol., 2018). Tito brouci se vyskytují kosmopolitn, a nejvyši diverzity dosahují ve vlhkých tropických lesích, což patrn souvisí s vývojem uniktn modifikovanch ustnich orgánů larev, kter se iv pouze tekutinami (Bocak a Matsuda, 2003). Larvy se obvykle vyvíjejí ve vlhkých svrchních vrstvách půdy, rozkládající se drev, v půdě nebo ve větvích v korunách horských mlžných lesů. Obvykle vyhledvaj půdy bohat na organick látky, z nichž pomocí specifickch mandibulrnich stylet vysvaj vodu bohatou na mikrobiln život (Cicero, 1994; Bocak a Matsuda, 2003; Kazantsev, 2005).

Brouci z eďedi Lycidae se vyznačují slab sklerotizovanm tělům (Bocak a kol., 2018). Jedná se o mal a stredn velk hmyz, dosahující typicky velikosti těla od 2.5 do 25.0 mm. Tělo je dorzoventrln zplostel, hlava obvykle mal, astecn zataen do prothoraxu. Tykadla jsou velmi často pohlavn dimorfické, pilovit v připadá samic a hrebenit v připadá samců. Charakteristickým znakům naprost většiny druhů je pritomnost zpevnujcich kyl a podelnch a pricnch žeber na štítu a krovkách. Abdomen je obvykle vyrazn krati a ui než krovky a jeho okraje nejsou koadaptovny s krovkami. Charakteristick trilobtn elateroidn aedeagus je vyvinut pouze u nekterch skupin a velmi často dochází k redukci na phallus a phallobzi (Bocak a Bocakova 1990, 2008).

Dospělci vseobecn potravu nepřijímají, byt' se nekter zástupci mohou živit nektarem, a žijí krátkou dobu, obvykle 2-3 týdny (Motyka a kol., 2017). Slab sklerotizovan a mekk tělo má za následek vyi náchylnost k vysychání, rovněž chyb dobr podpora pro létací svaly a tak jsou disperzní schopnosti této skupiny znan omezen (Sklenarova a kol., 2013). Letj nepril obratn a na kratk vzdálenosti, vyhybj se přímému slunci a spíše je nalezneme let ve stínu, nebo sedět na spodní straně list (Bocak a Bocakova, 2008).

### ***Biologie čeledi Lycidae***

Vzhledem k omezené sklerotizaci nejsou Lycidae schopni rychlého letu a jiných unikových reakcí. Jako alternativní antipredační strategii používají chemickou ochranu (Lindsley, 1961; Eisner a kol., 2008). Tělo larev i dospělců obsahuje mírně jedovatou hemolymfu (Moore a Brown, 1981). Lycidae demonstrují svou chemickou ochranu aposematickým zbarvením a mnoho druhů je mimetických (Bocak a Yagi, 2010). Sdílejí podobný tvar, velikost a zbarvení těla s nepříbuznými druhy stejné čeledi (Mülleriánské mimikry; Müller, 1879) nebo jsou součástí komplexů, ve kterých jsou napodobování druhy hmyzu, který není proti predátorům chráněn (Batesiánské mimikry; Turner, 1987; Mallet a Joron, 1999). S vývojem mimikry je spojena omezená schopnost disperse mimo oblast výskytu aposematického vzoru, protože allochtonní druhy nejsou zapojeny do lokálních mimetických komplexů a jsou vystaveni zvýšené predaci (Kapan, 2001; Ihalainen a kol., 2008; Bocak a Yagi, 2010). Evoluce mimetických vzorů proto často předchází vývoji jiných reprodukčně izolačních mechanismů jako je odlišný tvar kopulačních orgánů (Bocak a Yagi, 2010). Mimikry rovněž představuje soubor složitých evolučních omezení, které mají vliv na fekunditu a možnost přesného kopírování mimetických vzorů. Takto se ukázalo, že v čeledi Lycidae dochází v Mülleriánském mimetickém komplexu k evoluci sexuálního dimorfismu a vývoji nedokonalých aposematických vzorů (Motyka a kol., 2018).

Dalším rysem některých skupin čeledi Lycidae je modifikace ontogeneze, přesněji jev zvaný neotenie, který sdílí s dalšími elateroidními čeleděmi jako jsou Lampyridae, Phengodidae, Rhagophthalmidae, Telegeusidae a některé skupiny Elateridae (Crowson, 1972; Branham a Wenzel, 2003; Bocakova a kol., 2007; Kusy a kol., 2018). Tento jev je charakteristický prodlužováním larvální fáze, následným vývojem pohlavních orgánů při zachování larvální morfologie a dosažením tak pohlavní dospělosti samic bez metamorfózy do imaginárního stádia. Vzhledem k modifikované morfologii těchto skupin byly entomology neotenické formy často chybně určovány a popisovány jako jiné druhy nebo samostatné čeledi (Kazantsev 2005; Bocak a kol., 2008; Kusy a kol., 2018). U neotenických druhů z čeledi Lycidae samice nedosahují stádia kukly ani dospělé a zachovávají si tak plně vzhled larvy (Wong 1996, 1998), některé další skupiny mají metamorfózu pouze nedokončenou. Podobně modifikovaná ontogeneze je známá i u jiných skupin organismů (Bonett a Chippindale, 2006).

### ***Klasifikace čeledi Lycidae***

V čeledi Lycidae v současnosti rozlišujeme 6 podčeledí: Libnetinae, Dictyopterinae, Ateliinae, Dexorinae, Lyropaeinae a Lycinae (Bocak a Bocakova, 2008). Klasifikace této čeledi je neustálená a ani poslední molekulární studie nepřinesla robustně podporovanou fylogenezi, která by umožnila stabilizaci klasifikace (Masek a kol. 2018). Alternativní klasifikace publikoval Kazantsev (2005, 2013), avšak tyto nebyly akceptovány (Bouchard a kol., 2011; Masek a kol. 2018).

### ***Postavení a klasifikace tribu Calopterini***

V této studii se zaměřuji na tribus Calopterini (Green, 1949) náležící do podčeledi Lycinae a blízce příbuzný tribu Lycini (Bocak a Bocakova 1990, 2008). Taxon Calopterini byl poprvé uveden ve světovém katalogu čeledi Lycidae (Kleine, 1933) a zpočátku zahrnoval 25 rodů, nicméně jméno nebylo použito v souladu s nomenklatorickými pravidly, protože navržené jméno ze skupiny čeledi nebylo po roce 1930 doprovázeno diagnózou (ICZN 1985). Proto Bocak (1998) navrhl, že prvním autorem, který splnil požadavky nomenklatorických pravidel je Green (1949) a tímto se stává autorem jména Calopterini.

Tribus Calopterini je s přibližně 400 popsány druhy nejhojnější skupinou této čeledi v neotropické oblasti a patří i v rámci čeledi mezi velmi diverzifikované linie (Masek a kol. 2018). Rod *Calopteron* Castelnau, 1838 patří k nejstarším popsáným taxonům v celé čeledi a po dlouho dobu sloužil jako sběrný taxon pro celou skupinu. Ještě do nedávna byl indonéský rod *Broxylus* Waterhouse, 1879 považován za součást tribu Calopterini a byl tak jediným neamerickým rodem, nicméně byl na základě studia kopulačních orgánů přesunut do tribu Metriorrhynchini (Bocakova, 2003). Nesprávná klasifikace tohoto rodu ukazuje na jeden ze základních problémů klasifikace čeledi Lycidae. Vzhledem k chemické ochraně mnoho druhů vytváří různé aposematické signály a na základě stejných struktur paralelně vznikají podobné modifikace využívané jako aposematický signál (Bocak a Yagi, 2010). Rozšíření krovek a vznik velkých konkávních políček na krovkách současně s eliminací zpevňujících kýlů na štítu a přítomností modrého kovového zbarvení vedly k nesprávné klasifikaci rodu *Broxylus* do tribu Calopterini. Správnost přeřazení tohoto rodu z Calopterini do Metriorrhynchini byla potvrzena i molekulární fylogenetickou analýzou (Sklenarova a kol., 2013).

V průběhu 19. století a v první polovině 20. století byly popisovány i další nově definované rody (Newman, 1838; Waterhouse, 1879; Gorham 1881, 1884; Bourgeois, 1905; Pic 1911, 1922, 1926, 1929). Jednalo se o taxony pocházející hlavně ze severní a

centrální Ameriky (Tab. 1). Poté bylo zařazeno do tribu Calopterini dalších 11 rodů Mauricem Picem (Pic 1911, 1922, 1926, 1929). Mnoho autorů bohužel uvádí jen malé množství exemplářů, nedostatečné definující znaky a další informace potřebné pro správné určení a delimitaci rodů. Některé druhy byly popsány pouze na základě samčích exemplářů, což v případě této skupiny brouků s výskytem neotenie doprovázené značnými morfologickými modifikacemi vyvolává otázku, zda se jedná o správně delimitované rody a jestli nejsou samice neotenické. Morfologickou revizi tribu Calopterini publikovala Bocakova (2003, 2005). Přes detailní analýzu, přesné postavení tribu ve fylogenezi čeledi i vnitřní struktura jsou doposud v některých částech slabě podporované kvůli problémům s homologizací morfologických znaků. Na základě této revize tribu Calopterini a delimitaci linií Eurrhacina a Acroleptina došlo k synonymizaci některých rodů, nebo jejich přesunutí do jiných tribů (Bocakova 2003, 2005; Miller, 2003). Na základě toho je v současnosti uznáváno 23 rodů (Tab. 1).

Bocakova (2003) publikovala podrobnou morfologickou revizi rodů tribu Calopterini. V této práci byla studována morfologie jednotlivých druhů a vzhledem k neinformativním popisům v historické literatuře byl každý rod znovu podrobně popsán na základě typového druhu. Pro mnoho rodů nebyly k dispozici žádné informace o sexuálním dimorfismu, variabilitě znaků uvnitř rodu a v mnoha případech nebyly studovány ani kopulační orgány samic. Všechny struktury podstatné pro klasifikaci byly v této práci popsány a vyobrazeny ve velkém množství ilustrací. Na základě morfologických dat byly synonymizovány rody *Callanganum* Pic, 1922 (= *Ceratopriomorphus* Pic, 1922) a *Pseudolinoptes* Pic, 1922 (= *Emplectus* Erichson, 1847). Rod *Broxylus* byl převeden do tribu Metriorrhynchini a tím došlo k omezení výskytu tribu Calopterini pouze na Neotropickou a Nearktickou oblast. Dále v této studii byly některé podrody povýšeny na statut rodu (*Falsocaenia* Pic, 1922 a *Lycomorphon* Pic, 1922). Vzhledem k nutnosti stabilizace nomenklatury a ztrátě historického typového materiálu, Bocakova (2003) designovala neotypy pro typové druhy rodů *Calopteron* Castelanu, 1838 (*Calopteron apicale* Guérin-Méneville, 1838) a *Idiopteron* (*Idiopteron biplagiatum* (Kirsch, 1884)). Dále, ze stejného důvodu pro zajištění stability klasifikace, byl fixován typový druh pro rod *Celetes* (*Celetes basalis* LeConte, 1847).

Na tuto práci navázala parsimonní fylogenetická analýza tribu Calopterini (Bocakova, 2005). V této studii byla analyzována morfologie 19 rodů; 4 rody nebyly k dispozici pro morfologickou analýzu. Jako mimoskupina byly do analýzy zařazeny rody

*Dictyoptera* (Dictyopterinae), *Lygistropterus* (Calochrominae), *Plateros* (Lycinae), *Conderis* (Lycinae). Rod *Lycus* (Lycinae) byl nejbližší předpokládanou sesterskou skupinou tribu Calopterini na základě larválních znaků (Bocak a Matsuda, 2003) a byl zahrnut do ingroup (Bocakova, 2005). Pro každý rod bylo kódováno celkem 33 morfologických znaků a byla vytvořena fylogenetická hypotéza, která definovala tři základní linie: (1) Eurrhacina obsahující rody *Haplobothris* Bourgeois, 1879; *Calocladon*, Gorham, 1888; *Lycoplateros*, Pic, 1922; *Linoptes*, Gorham, 1884; *Emplectus* Erichson, 1847 a *Eurrhacus* Waterhouse, 1879; (2) Calopterina obsahující rody *Metapteron*, Bourgeois, 1905; *Caenia* Newman, 1838; *Calopteron*, Castelnau, 1838; *Cartanonum*, Pic, 1922; *Leptoceletes* Green, 1952 a *Idiopteron* Bourgeois, 1905 a (3) Acroleptina obsahující rody s pravděpodobně larviformními samicemi, tj., *Lycomorphon* Pic, 1922; *Lycinella*, Gorham, 1884; *Ceratopriomorpha* Pic, 1922 a *Acroleptus* Bourgeois, 1886 a s nimi v jednom kládu *Cyrtopteron*, Bourgeois, 1905; *Mesopteron* Bourgeois, 1905 a *Falsocaenia* Pic, 1922. V této práci byly definovány morfologické znaky podporující příbuznost Calopterini, Lycini a Calochromini: příčné žilky na krovkách nejsou přítomny, samičí terminální abdominální sternum bez spiculum gastrale, 3 nebo 4 podélná žebra na krovkách, tj. sekundární žebernatina nepřítomná. Dále byly definovány znaky podporující monofylii tribu Calopterini jak byl definován M. Bocakovou (Bocakova, 2005): paramery samčích kopulačních orgánů ventro-bazálně spojeny, ventro-distální otvor phallu téměř tak dlouhý jako polovina jeho délky, valvifery kladélka bazálně srostlé, vnitřní okraj coxitů hluboce vykrojený ve střední části. Podpora pro monofylii jednotlivých linií v Calopterini byla již nižší. Eurrhacina jsou definováni dlouhým samčím terminálním sternem a přetočenou phallobází. Sesterská pozice Calopterini a Acroleptini je podpořena pouze jediným znakem - dorso-ventrálně zploštěnou terminální částí phallu. Acroleptina, pokud by jejich definice byla rozšířena o rody *Cyrtopteron*, *Mesopteron* a *Falsocaenia*, jsou definováni pouze silně zúženými coxity v apikální polovině jejich délky. Calopterina jsou definováni dvěma výběžky na phallu v oblasti, kde se napojují paramery.

**Tabulka 1.** Přehled rodů tribu Calopterini dle Bocakove (2003, 2005).

Subtribe	Rod	Autor, rok	Výskyt
Eurrhacina	<i>Haplobothris</i>	Bourgeois, 1879	Neotropická oblast
	<i>Calocladon</i>	Gorham, 1881	Neotropická oblast
	<i>Emplectus</i>	Erichson, 1847	Jižní Amerika
	<i>Eurrhacus</i>	Waterhouse, 1879	Centrální Amerika, Jižní Amerika
	<i>Linoptes</i>	Gorham, 1884	Centrální Amerika
	<i>Lycoplateros</i>	Pic, 1922	Jižní Amerika
	<i>Metapteron</i>	Bourgeois, 1905	Neotropická oblast
Calopterina	<i>Calopteron</i>	Castelnau, 1838	Neotropická oblast
	<i>Cartagonum</i>	Pic, 1922	Kolumbie
	<i>Caenia</i>	Newman, 1838	Neotropická oblast, Nearctická oblast
	<i>Idiopteron</i>	Bourgeois, 1905	Neotropická oblast
	<i>Leptoceletes</i>	Green, 1952	Nearctická oblast, Neotropická oblast
	<i>Cyrtopteron</i>	Bourgeois, 1905	Neotropická oblast
Acroleptina	<i>Mesopteron</i>	Bourgeois, 1905	Ekvádor
	<i>Falsocaenia</i>	Pic, 1922	Nearctická oblast
	<i>Lycomorphon</i>	Pic, 1922	Kolumbie, Peru
	<i>Lycinella</i>	Gorham, 1884	Centrální Amerika
	<i>Ceratopriomorphus</i>	Pic, 1922	Brazílie, Peru
	<i>Acroleptus</i>	Bourgeois, 1886	Brazílie
	<i>Broxylus</i> *	Waterhouse, 1879	Indonésie
	<i>Ceratoprion</i> *	Gorham, 1884	Panama
	<i>Pseudacroleptus</i> **	Pic, 1911	Jižní Amerika
	<i>Macrolycinella</i> **	Pic, 1922	Mexiko
	<i>Cephalolycus</i> **	Pic, 1926	Kolumbie
	<i>Flabellocaenia</i> **	Pic, 1929	Brazílie

\* Rod *Broxylus* přeřazen do Metriorrhynchinae, rod *Ceratoprion* přeřazen do Leptolycinae (Bocakova, 2003)

\*\* Rody *Pseudacroleptus*, *Macrolycinella*, *Cephalolycus* a *Flabellocaenia* nebyly k dispozici pro fylogenetickou analýzu (Bocakova, 2003)

## **Cíle práce**

Cílem této práce je shromáždit reprezentativní vzorek fylogeneticky a morfologicky různorodých taxonů ze skupiny rodu z celého tribu Calopterini, získání sekvencí pěti molekulárních markerů a jejich molekulárně fylogenetická analýza. Pro další studium je nutné potvrzení monofylie této skupiny a vytvoření fylogenetické molekulární hypotézy pro vnitřní příbuzenské vztahy v tribu Calopterini. Na základě fylogenetické analýzy budou definovány základní linie obsahující monofyletické skupiny rodů, případně bude diskutována monofylie jednotlivých rodů, jak byly dříve definovány. Bude zjištěno, jak velký podíl fylogenetické diverzity je již znám a tato bude srovnána s počtem dosud formálně definovaných taxonů ze skupiny rodu. Dále bude vyhodnocena příbuznost skupin, pro které je předpokládána samičí neotenie, bude zjištěno, zda se jedná o unikátní vznik této modifikace nebo jestli u skupin vznikaly v průběhu evoluce opakovaně.



## **Materiál a metodika**

### ***Materiál***

Exempláře ze studovaného materiálu byly odchyceny na lokalitách v Peru a Ekvádoru v rámci projektů katedry biologie Pedagogické fakulty University Palackého v Olomouci (2010, 2012) a v terénu byly fixovány v 96% etanolu pro nadcházející laboratorní analýzy. Analyzovaný soubor obsahuje 91 jedinců náležící do tribů Eurrhacini a Calopterini (Calopterina a Acroleptina) podčeleď Lycinae (Coleoptera). Každému exempláři bylo přiřazeno registrační číslo (čísla vzorků, Tab. 2) a po zpracování dat byly uloženy ve sbírce dokladových exemplářů na katedře biologie PdF UP. Tato čísla ve formátu UPOL+6-místný kód jsou použita pro identifikaci vzorků v GenBank.

Studie je pro vyšší stabilitu analýz postavena celkem na pěti fragmentech jaderných i mitochondriálních genů. Fragment 18S rRNA (~1880 párů bází, bp), 28S rRNA (~650 bp), *rrnL* mtDNA (~740 bp), *cox1* mtDNA (~1100 bp) a *nad5* mtDNA (~1220 bp). Tyto molekulární markery jsou tradičně používány pro studium fylogeneze Coleoptera a umožňují spojení nových a dříve získaných dat. Jako outgroup byli vybráni zástupci rodů: *Plateros*, *Lycus* a *Lycostomus* považovaní za fylogeneticky blízké skupiny (Bocak a Bocakova, 2008, Masek a kol., 2018).

M. Bocáková poskytla identifikaci vzorků a informace o tom, které linie jsou známy výhradně v samčím pohlaví a tím je u nich předpokládána neotenie samic. Neotenie v čeledi Lycidae je s jistotou prokázána pouze v několika skupinách (Mjöberg, 1925; Wong, 1996; Kazantsev, 2005; Bocak a kol., 2008; Masek a kol., 2018). V dalších skupinách je možno usuzovat na neotonii, pokud při větším množství získaných vzorků jsou k dispozici pouze samci a pokud jsou pozorovány u samců morfologické modifikace charakteristické pro neotenní linie, jako jsou redukovaný počet tykadlových článků, zakrnělé ústní ústrojí, miniaturizace, ztráta zpevňujících struktur na štítu a krovkách nebo zkrácené a zúžené krovky (*Lyropaeus*, *Leptolycus*, Bocak a Bocakova 1990; Kazantsev 2005; Masek a kol. 2013).

**Tabulka 2.** Seznam vzorků

Číslo vzorku	Jméno	Lokalita
J00001	████████	Ecuador, Zamora, 2010
J00002	████████	Ecuador, 10 km S of Loja, 2010
J00003	<i>Emplectus</i>	Peru, Pampa Hermosa 2012
J00004	████████	Peru, Tingo Maria 2012
J00005	████████	Ecuador, Misahuallí, 2010
J00006	████████	Ecuador, Misahuallí, 2010
J00007	████████	Ecuador, Cosanga, 2010
J00008	████████	Ecuador, San Isidro 2010
J00009	████████	Ecuador, San Francisco dela Pampas 2010
J00010	████████	Ecuador, Misahuallí, 2010
J00011	████████	Ecuador, Misahuallí, 2010
J00012	████████	Ecuador, San Francisco dela Pampas 2010
J00013	████████	Peru, Tingo Maria, 2012
J00014	████████	Peru, Tingo Maria, 2012
J00015	<i>Haplobothris</i>	Ecuador, Cosanga, 2010
J00016	<i>Haplobothris</i>	Ecuador, Shell 2010
J00017	████████	Ecuador, Jatun Sacha, 2010
J00018	████████	Ecuador, Misahuallí, 2010
J00019	████████	Ecuador, Cosanga, 2010
J00020	████████	Peru, Pampa Hermosa 2012
J00021	████████	Peru, Puerto Maldonado 2012
J00022	████████	Ecuador, Sumaco, 2010
J00023	████████	Peru, Pampa Hermosa 2012
J00024	████████	Peru, Puerto Maldonado 2012
J00025	████████	Ecuador, San Isidro 2010
J00026	████████	Ecuador, Misahuallí, 2010
J00027	<i>Lycoplateros</i>	Ecuador, Misahuallí, 2010
J00028	<i>Cartagonum</i>	Ecuador, San Isidro 2010
J00029	<i>Leptoceletes</i>	Peru, Tingo Maria, 2012
J00030	<i>Leptoceletes</i>	Peru, Pampa Hermosa 2012

Pokračování tabulky 2

J00031	██████████	Peru, Pampa Hermosa 2012
J00032	██████████	Ecuador, Zamora, 2010
J00033	██████████	Peru, Tingo Maria, 2012
J00034	██████████	Ecuador, Cosanga, 2010
J00035	██████████	Peru, Puerto Maldonado 2012
J00036	██████████	Peru, Puerto Maldonado 2012
J00037	██████████	Peru, Oxapampa, 2012
J00038	<i>Calopteron</i>	Peru, Puerto Maldonado 2012
J00039	<i>Lycomorphon</i>	Peru, Puerto Maldonado 2012
J00040	<i>Calopteron</i>	Peru, Tingo Maria, 2012
J00041	<i>Calopteron</i>	Peru, Puerto Maldonado 2012
J00042	<i>Calopteron</i>	Peru, Puerto Maldonado 2012
J00043	<i>Leptoceletes</i>	Ecuador, Cosanga, 2010
J00044	<i>Mesopteron</i>	Peru, Pampa Hermosa 2012
J00045	<i>Idiopteron</i>	Ecuador, Cosanga, 2010
J00046	██████████	Ecuador, Cosanga, 2010
J00047	██████████	Ecuador, Cosanga, 2010
J00048	██████████	Ecuador, Jatun Sacha, 2010
J00051	██████████	Ecuador, Loja 2010
J00052	██████████	Ecuador, Zamora, 2010
J00053	██████████	Ecuador, Zamora, 2010
J00055	██████████	Peru, Puerto Maldonado 2012
J00056	██████████	Ecuador, San Isidro, 2010
J00057	██████████	Ecuador, Jatun Sacha, 2010
J00058	██████████	Ecuador, San Francisco de la Pampas 2010
J00059	██████████	Ecuador, Misahuallí, 2010
J00060	<i>Leptoceletes</i>	Peru, Tingo Maria, 2012
J00061	<i>Leptoceletes</i>	Ecuador, San Isidro, 2010
J00062	<i>Colyobris</i>	Ecuador, Sumaco, 2010

Pokračování tabulky 2

J00063	<i>Colyobris</i>	Ecuador, Sumaco, 2010
J00064	<i>Colyobris</i>	Ecuador, Sumaco, 2010
J00065	<i>Leptoceletes</i>	Ecuador, San Isidro, 2010
J00066	██████████	Ecuador, San Isidro, 2010
J00067	██████████	Ecuador, Jatun Sacha, 2010
J00068	██████████	Ecuador, Jatun Sacha, 2010
J00069	██████████	Ecuador, Jatun Sacha, 2010
J00070	<i>Mesopteron</i>	Peru, Pampa Hermosa, 2012
J00071	<i>Mesopteron</i>	Peru, Tingo Maria, 2012
J00072	<i>Mesopteron</i>	Peru, Machu Picchu, 2012
J00073	<i>Mesopteron</i>	Ecuador, Misahuallí, 2010
J00074	<i>Mesopteron</i>	Ecuador, Cosanga, 2010
J00075	<i>Mesopteron</i>	Ecuador, Cosanga, 2010
J00076	<i>Leptoceletes</i>	Ecuador, Cosanga, 2010
J00077	<i>Falsocaenia</i>	Ecuador, Zamora, 2010
J00078	<i>Falsocaenia</i>	Ecuador, Misahuallí, 2010
J00079	██████████	Ecuador, San Isidro, 2010
J00080	██████████	Ecuador, Sumaco, 2010
J00081	██████████	Ecuador, San Francisco dela Pampas 2010
J00082	██████████	Peru, Puerto Maldonado 2012
J00083	██████████	Ecuador, San Francisco dela Pampas 2010
J00084	██████████	Ecuador, Zamora, 2010
J00085	██████████	Peru, Pampa Hermosa 2012
J00086	██████████	Ecuador, San Isidro, 2010
J00087	██████████	Peru, Puerto Maldonado 2012
J00088	██████████	Ecuador, Cosanga, 2010
J00089	██████████	Ecuador, Cosanga, 2010
J00090	██████████	Ecuador, Jatun Sacha, 2010
J00091	██████████	Ecuador, Jatun Sacha, 2010
J00092	██████████	Ecuador, Misahuallí, 2010
J00093	██████████	Ecuador, Misahuallí, 2010

Pokračování tabulky 2

J00094	<i>Colyobris</i>	Peru, Pilcopata, 2014
J00095	<i>Neolinoptes</i>	Peru, Pilcopata, 2014
J00096	Gen. nov. 9	Peru, Pilcopata, 2014

### ***Izolace DNA, PCR amplifikace a sekvenování***

#### **Izolace DNA**

Pro vzorky J00001–J00062 a J00094–J00099 byla k dispozici již dříve izolovaná DNA, deponovaná v DNA sbírce laboratoře molekulární systematiky, zbývající vzorky byly izolovány kitem DNeasy Blood&Tissue kit (Qiagen, Inc.) ze sbírky tkání uložené v 96% alkoholu v -20° C.

Z mikrozkušavek s thorakální svalovinou byl odstraněn veškerý etanol odpipetováním a odsáním zbytku přes papírovou utěrku a poté byl vzorek vysušen po 20 min v koncentrátoru. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 180 µl ATL pufru a 20 µl proteinázy K, vše se pak zhomogenizovalo sterilní plastovou tyčinkou a krátce stočilo. Vzorky byly dále vloženy do termobloku nastaveného na 56 °C/600 rpm a to po dobu 30 min. Následovalo přidání 200 µl AL pufru, zvortexování, přidání 200 µl 96% UV etanolu a další zvortexování. Obsah mikrozkušavek byl poté přepipetován na kolonku s novými sběrnými mikrozkušavkami a centrifugován při 8000 rpm/1 min. Kolonka byla znovu přepipetována s přidáním 500 µl AW1 pufru a centrifugována při 8000 rpm/1 min. Tento krok se opakoval, přičemž se pipetovalo 500 µl AW2 pufru a centrifugovalo se při 14 000 rpm/3 min. Po dalším přenesení kolonky následovalo centrifugování „na sucho“ při 14 000 rpm/1 min. Dále byly vzorky přeneseny do zkumavek se zámkem, napipetováno 100 µl nuclease-free H<sub>2</sub>O a po minutové inkubaci při pokojové teplotě proběhla centrifugace při 800 rpm/1 min. Poslední krok se zopakoval, místo 100 µl bylo připipetováno 50 µl nuclease-free H<sub>2</sub>O. Výsledný produkt, 1. eluce, byla poté vkládána do Nanodropu ND-1000, kde jsme zjistili koncentrace vyizolované DNA.

## PCR amplifikace

Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) byly syntetizovány fragmenty genů 18S, 28S, *rrnL*, *cox1* a *nad5*. Pro každý fragment byly použity odpovídající primery (Tab. 3) a při reakcích se využívaly dva typy Taq polymeráz (Bioline, Invitrogen).

Prvním krokem v této reakci je namíchání přesně daného množství mastermixu (dle počtu vzorků, níže uvedené množství pro jeden vzorek). Směs se připravuje na ledu, kde se do vaničky postupně přidává:

5  $\mu$ l 10x buffru;  
2  $\mu$ l 50mM MgCl<sub>2</sub>;  
1  $\mu$ l 10 $\mu$ M prvního primeru;  
1  $\mu$ l 10 $\mu$ M druhého primeru;  
1,25  $\mu$ l 2 mn dNTPs;  
x  $\mu$ l Taq polymerázy<sup>1</sup> (Bioline, Invitrogen);  
x  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sup>2</sup>  
x  $\mu$ l DNA templátu<sup>3</sup>

Do každého stripu s DNA byl přidán daný objem mastermixu a poté vše vortexováno a stočeno na Thermo Cycleru 9700 (Applied Biosystems) s programem LONG 45 v případě použití Invitrogen Tag polymerázy. PCR s Bioline Tag polymerázou probíhala v Thermo Cycleru 2720 (Applied Biosystems) s programem *rrnL* ND141. Úspěšnost PCR reakce byla zkontrolována pomocí elektroforézy.

<sup>1</sup> Pro amplifikaci fragmentů 28S a 18S bylo použito 0,12  $\mu$ l Tag polymerázy Bioline, pro amplifikaci fragmentů *rrnL*, *cox1* a *nad5* 0,2  $\mu$ l Taq polymerázy Invitrogen. Taq Polymeráza se přidává do amplifikační reakce jako poslední.

<sup>2</sup> Do směsi se přidává takové množství vody, aby se celkový objem dorovnal do 50  $\mu$ l, přičemž tato komponenta je pipetována jako první.

<sup>3</sup> Dle protokolu je k reakci potřeba 10-30 ng dsDNA, pro dodání templátu je rozhodující však to, jakou mají koncentraci naše vzorky.

**Tabulka 3.** Přehled použitých primerů pro amplifikaci vzorků.

Genový fragment	Primer	Sekvence (5'>> 3')	
18S	5'	GAC AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT	
	b2.5	TCT TTG GCA AAT GCT TTC GC	
	b5.0	TAACCGCAACAACCTTTAA T	
	bi	GAG TCT CGT TCG TTA TCG GA	
	a1.0	GGT GAA ATT CTT GGA CCG TC	
	ai	CCT GAG AAA CGG CTA CCA CAT C	
	a2.0	ATG GTT GCA AAG AAA C	
	3'I	CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC GAC	
	28S	ff	TTA CAC ACT CCT TAG CGG AT
		dd	GGG ACC CGT CTT GAA ACA C
rrnL	16a	CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT	
	ND1AMetN	GGR CCY TTW CGA ATY TGA ATA TAN CCM	
	ND1A	GGT CCC TTA CGA ATT TGA ATA TAT CCT	
cox1	JerryM	CAA CAY YTA TTT TGR TTY TTT GG	
	Marcy	TAR TTC RTA TGW RCA ATA YCA YTG RTG	
nad5	OF1	CCT ACT CCT GTT TCT GCT TTA GTT CAT TC	
	R6	GAA ACG AAA AAT CGT ATT TAA TTT CGA CT	
	R2M	AAT TGA ASC CAA AAA GAG GTA TAT CAC TG	

### Elektroforéza a čištění PCR produktu

Abychom zjistili, zda se podařilo amplifikovat naše vzorky, využili jsme elektroforézy, kde můžeme na základě různé pohyblivosti molekul v gelu separovat a

identifikovat námi zkoumané látky.

Pro tuto reakci je nutné připravit potřebné množství gelu smícháním 0,45 g normální agarózy a 45 ml 0,5x TAE pufru. Tento roztok byl zahříván v mikrovlnné troubě, dokud se všechna agaróza nerozpustila. Po zchladnutí na teplotu cca 50 °C bylo přidáno 2 µl barviva Gel Red. Tato směs byla poté nalita do předem složené vaničky, přičemž se snažíme, aby se vytvářelo minimum bublin. Po ztuhnutí v lednici byly opatrně vytáhnuty hřebínky, vanička s gelem přenesena do elektroforetické vany a přelita 0,5x TAE pufrem tak, aby byl gel ponořen. Do každé řady bylo pak napipetováno 4 µl HIND–III ladder, jakožto kontroly. Na parafilmu byly promíchány 4 µl DNA s 1 µl nanášecího pufru a poté přeneseny do jednotlivých jamek. Elektroforéza probíhala 15 min při 100 V. Výsledek byl zkontrolován pod UV světlem v transaminačním boxu a následně vyfotografován pro dokumentaci.

PCR produkt byl čištěn dle standardního protokolu na destičkách Millipore filtrováním pod vakuem, promýváním a následným rozpuštěním v nuclease free H<sub>2</sub>O. Množství PCR produktu bylo změřeno na Nanodropu ND-1000.

### **Sekvenační reakce a čištění sekvenačního produktu**

Při sekvenační reakci používáme PCR produkt jako templát pro amplifikaci. V reakční směsi je přítomen pouze jeden primer a dále fluorescenčně označené nukleotidy, kdy je každá barva reprezentována odlišnou barvou a na základě toho můžeme posléze zjistit jednotlivé sekvence.

Reakční směs se obsahovala:

1 µl Big Dye

2 µl 1,6µM primeru

1 µl sekvenčního pufru

5 (2)\* µl H<sub>2</sub>O

1 (4)\* µl DNA

Celý proces přípravy směsi i aplikace probíhali na ledu a barvivo bylo přidáno jako poslední. Dle připraveného rozpisu byl nepipetován mastermix a DNA do předem vyklávaných destičky. Ty se poté vkládaly buď do Applied Biosystems™ 2720 ThermalCycler (primer: ND1AMetN, ND1A, 16a, a2.0, OF1, R6, R2M, b5.0, ai,



Marcy, dd) nebo do druhého celeru Gene Amp® PCR System 9700 (primer: JerryM, FF, 5',b2.5, bi, a1.0, 3'I). Program používaný v cyclerech byl cycleabi 10 µl nastavený podle manuálu výrobce sekvenčního kitu.

Pro vyčištění sekvenačního produktu je potřeba namíchat na ledu vždy čerstvou směs, obsahující UV ETOH (49,5 µl), 3M NaAc (1 µl) a nuclease-free H<sub>2</sub>O (9,5 µl). Množství uvedené v závorkách je pro jeden vzorek. Produkt byl stočen a do každé jamky pipetováno 60 µl směsi, obsah byl vortexován a překrytí matricí. Po 15 min na ledu a v temnu byla destička centrifugována při 2500g, 15 °C, po dobu 30 min. Poté byl obsah destičky vyklepán a překryt savými papíry. Otočená destička i s papírky byla centrifugována při 700g 1 min. Dále se do každé jamky pipetovalo 60 µl 80% UV alkoholu. Destička se centrifugovala při 2500g, 15 °C, 10 min. Následovalo opakování posledních čtyř kroků. Nakonec byl obsah destičky vyklepán a po poslední centrifugaci při 700g, 1 min, byla destička vysušena v koncentrátoru, po 15 min vyndána, překryta šedou matricí, zabalena do igelitového sáčku a zmrazena.

\*při nízkých koncentracích bylo používáno větší množství PCR produktu a následně méně H<sub>2</sub>O.

### **Sekvenování**

Před samotnou sekvenací bylo do každé jamky napipetováno 12 µl fromamidu. Destička se překryla šedou matricí, krátce stočila a nechala 15-30 min na třepačce při 400 rpm, 24 °C. Poté došlo k denuraci na cycleru při 95 °C po 3 min a následnému zchlazení na ledu. K sekvenování byl použit sekvenátor ABI 3130 (Applied Biosystems).

### **Editace sekvencí a fylogenetické analýzy**

Chromatogramy sekvencí byly editovány v programu Sequencher 5.2.4 (Gene Code, Inc). Před další prací se sekvencemi je nutné spojit vlákna k sobě tak, aby se holomogické úseky překrývaly, a zkontrolovat jejich čtení a ručně opravit možné chyby. Zpravidla se odstraňují začátky a konce kvůli nízké spolehlivosti čtení, dále musí být odstraněny nelegitimní gapy a případně opraveny báze tam, kde se píky slučují. Takto upravené sekvence byly exportovány ve formátu FASTA do programu Geneious 7.1.7.

## Analýza datové matice

Datová matice se skládala z celkem 3 fragmentů mitochondriálního genomu a 2 fragmentů genomu jaderného. Jaderné markery byly zastoupeny kompletní sekvencí 18S rRNA (~1880 párů bází; bp) a sekvencí D2 smyčky 28S rRNA (~650 bp; fragmenty jaderného genomu). Ribozomální jaderné geny 18SrRNA a 28SrRNA mají relativně malou mutační rychlost a byly použity v dřívějších studiích i pro analýzu fylogeneze bazálních linií Metazoa. Sekundární struktura těchto genů je komplikovaná a pro alignment rychle se vyvíjejících úseků je nutno použít v mnoha případech strukturální modely. Vzhledem k blízké příbuznosti studovaných vzorků toto nebylo nutné.

Mitochondriální markery byly zastoupeny geny *rrnL* mtDNA (*rrnL*+tRNA-Leu+*nad1*; ~740 bp), *cox1-3'* konec mtDNA a následující geny (*cox1*+tRNA-Leu+*cox2*; ~1100 bp) a *nad5* a následující tRNA geny (*nad5*+tRNA-Phe+tRNA-Glu+tRNA-Ser; ~1220 bp). Většina genů je délkově nevariabilních a jejich alignment je jednoduchý a homologie byla zkontrolována překladem sekvence do aminokyselin a ověřením jejich homologie v alignmentu. Pouze *rrnL* a tRNA geny jsou délkově variabilní. Fragment *rrnL* však vykazoval v této analýze blízkce příbuzných druhů omezenou délkovou variabilitu a nebylo nutné provádět strukturální alignment. Délka kompletní tRNA je typicky 65 párů bází a při samostatném alignmentu jednotlivých genů je homologie robustní.

Každý z fragmentů byl individuálně alignován pomocí algoritmu G-INS-i v plug-inu MAFFT 7.017 pro Geneious 7.1.7 (GeneCodes Inc., New Jersey, USA). Všechny alignmenty jednotlivých fragmentů pro kódující úseky genů (konkrétně *nd1*, *cox1*, *cox2* a *nad5*) byly pak zkontrolovány pomocí translačních čtecích rámců na přítomnost chyb nebo stop kodonů na nelegitimních pozicích, které byly případně manuálně opraveny. Dále byly zkontrolované alignmenty konkatenovány do jedné supermatice, kterou jsem použila pro výpočet fylogenetického stromu a tím určení vzájemných vztahů uvnitř tribů Eurrhacini a Calopterini. Konkatenovanou supermatici jsem pak rozdělila podle pozic jednotlivých kodonů na partice, které slouží pro přesnější výpočet modelů evoluce jednotlivých úseků vybraných genů. Pro výpočet fylogenetické hypotézy byl použit program IQ-TREE 1.6.6 v příkazovém řádku linux, ve kterém je již inkorporován plug-in ModelFinder pro stanovení modelu evoluce jednotlivých fragmentů, jak je popsáno výše. ModelFinder identifikoval modely evoluce na základě Bayesianského informačního kritéria (BIC) a pro účely analýzy byly nastaveny modely

uvedené v Tab. 4.

Program IQ-TREE pracuje na principu výpočtu maximum likelihood (maximální pravděpodobnost) s ultrafast bootstrapovou podporou (UFboot, parametr *-bb*) pro jednotlivé větve na fylogenetickém stromu. UF boot byl nastaven na 5000 iterací, díky parametru *-spp* v programu IQ-TREE bylo povoleno každé genové partici datové supermatice mít své vlastní evoluční tempo. Výsledný fylogenetický strom byl zobrazen v programu FigTree 1.4.2 a následně graficky upraven v programech Adobe IllustratorCS6 a Adobe PhotoshopCS6.

**Tabulka 4.** Přehled vlastností alignovaných sekvencí ve finální matici bez outgroup a použité modely pro jednotlivé fragmenty.

Sekvenovaný fragment	Počet alignovaných sekvencí	Délka alignmentu	Počet unikátních znaků	Počet znaků informativních pro parsimonii	Počet konstantních znaku	Použité modely
<i>rrnL</i>	68	879				
18S	103	1997				
28S	91	713				
<i>coxI</i> tRNA	96	1119				
<i>nad5</i> tRNA	98	1386				
supermatrix	111	6094				

## Výsledky

### Data

S použitím uvedených primerů se podařilo amplifikovat naprostou většinu vzorků pro studované fragmenty. Z nově sekvenovaných 99 a 71 outgroup vzorků se podařilo amplifikovat a zařadit do analýzy 153 vzorků *coxI* mtDNA, 118 *rrnL* mtDNA a 149 *nad5* mtDNA fragmentů. Jaderné geny 18SrRNA a 28S rRNA byly amplifikovány vzhledem k nižší variabilitě a snaze snížit náklady studie pouze pro vybrané vzorky ingroup a tím bylo získáno včetně outgroup 119 sekvencí 18S rRNA a 109 sekvencí 28S rRNA. Po spojení s dříve sekvenovanými daty kompletní matice včetně outgroup obsahovala 170 vzorků. Kompletnost matice činila 66,69 %, podíl parsimonně informativních znaků činil 23,63 %. Do analýzy byly zařazeny všechny vzorky, pro které byl k dispozici alespoň jeden fragment.

Délka sekvenovaných fragmentů v Tab. 5. Celková délka alignované matice činila 6094 homologických znaků. Mitochondriální a ribozomální markery se lišily v zastoupení nukleotidů. Mitochondriální markery měly významně vyšší zastoupení A a T bázi. Ribozomální markery měly zastoupení nukleotidů přibližně vyrovnané (A, C, T, G).

**Tabulka 5.** Délka alignovaných fragmentů ve fylogenetické analýze.

Sekvenovaný fragment	Začátek	Konec	Délka
<i>coxI</i> tRNA	1	1119	879
<i>nad5</i> tRNA	4709	6094	1997
18S	2712	4708	713
<i>rrnL</i>	1120	1998	1119
28S	1999	2711	1386
supermatrix	1	6094	6094

### Alignment

Pro analýzu fylogeneze byla konkatenována pouze jedna matice obsahující všechny fragmenty a byla alignována v programu MAFFT. Vzhledem k malému počtu indelů (9,70 %) nebyl použitý strukturální alignment. Délka jednotlivých fragmentů je uvedena v Tab. 5. Počet variabilních znaků v jednotlivých fragmentech se lišil a

odpovídá mutačních rychlosti příslušného úseku DNA. Nejvyšší množství variabilních znaků bylo zjištěno ve fragmentu *cox1* mtDNA, nejnižší ve fragmentu 28S rRNA.

### ***Fylogenetická hypotéza***

Kompletní konkatenovaný dataset byl analyzován metodou maximální pravděpodobnosti a byl získán nejpravděpodobnější strom pro analyzované sekvence a model evoluce DNA. Hodnocení robustnosti jednotlivých částí fylogenetického stromu bylo provedeno na základě určení bootstrapové podpory (Obr. 1).

Triby Eurrhacini a Calopterini jsou oba monofyletické a jejich sesterské postavení je poměrně dobře podporováno (BS 89 %). Výsledný strom včetně bootstrapových podpor pro hluboká štěpení po úroveň podpory rodu je zobrazen na obr. 1. Bylo podpořeno, že tribus Calopterini je monofyletický s významnou bootstrapovou podporou 100 %. Podobně tribus Eurrhacini byl podpořen jako samostatná monofyletické skupina s bootstrapovou podporou 100 %. Menší podpora byla zjištěna pro příbuznost hlubokých větví v subtribech Acroleptina a Calopterina (BS 63–89 %). Vysoká podpora byla zjištěna pro naprostou většinu terminálních štěpení na úrovni druhových skupin a příbuznosti jednotlivých sesterských druhů. ██████████



1.a

nezveřejněno

1.b

nezveřejněno

**Obrázek 1a–b.** Fylogeneze tribů Calopterini a Eurrhacini vytvořené metodou maximální pravděpodobnosti. Bootstrapové podpory jsou uvedeny pouze pro hluboké štěpení podporující monofylii rodů a vyšší. Červeně jsou označeny neotenní linie.

## Diskuze

### *Datový soubor*

Délková variabilita *rrnL* fragmentu byla vzhledem k poměrně vysoké příbuznosti studovaných taxonů omezená. Délka indelů byla nízká a indely tvořily pouze 9.70 % znaků. Proteiny kódující fragmentu byly délkově nevariabilní. Vzhledem k této omezené délkové variabilitě nebyl při alignmentu jednotlivých fragmentů použit strukturální model a bylo aplikováno pouze defaultní nastavení v programu MAFFT. Bootstrapová podpora, kterou považujeme za významnou, by měla dosahovat alespoň 90 %. Vzhledem k omezenému počtu molekulárních markerů je nutné uvažovat také podporu již dříve uvažovanou na základě morfologie. Přes určité omezení vyplývající z dostupných markerů a absenci genomických proteiny kódujících genů v současné analýze, nyní získaná data umožňují významně pokročit v klasifikaci skupiny, identifikovat další samostatné linie v rámci tribu a navrhnout velmi dobře podporovanou hypotézu o evoluci neotenie v této skupině.

### *Fylogenetická hypotéza*

Předchozí práce povýšila podtribus Eurrhacina na úroveň tribu Eurrhacini (Bocak a Bocakova, 2008; Masek a kol., 2018) a v následujícím textu bude toto povýšení respektováno. Zjištěná sesterská pozice těchto linií odpovídá fylogenetické hypotéze vytvořené na základě analýzy morfologie a je podporována bootstrapovou podporou na úrovni 89 %, tj. na hranici akceptovatelné podpory. Vzhledem k tomu, že tato hypotéza je velmi dobře podpořena morfologicky přítomností čtyř synapomorfii, považujeme tuto topologii za velmi dobře podpořenou a poskytující dostatečný základ pro formální klasifikaci těchto skupin, tak jako byla prezentována v poslední studii (Masek a kol. 2018).

Přes omezený počet vzorků a relativně malou oblast odkud tyto vzorky pocházely se ukázalo, [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] označením jsou dále diskutovány v textu. Toto zjištění ukazuje na nedostatečně propracovanou klasifikaci skupiny, kdy [REDACTED] [REDACTED] nejsou součástí této studie.



Tribus Eurrhacini je velmi dobře podpořen (bootstrapová podpora 100 %) a obsahuje celkem sedm linií, [REDACTED] (Obr. 1). Sesterskou skupinou vůči všem ostatním rodům je, stejně jako v morfologické analýze, rod *Haplobothris*. Podpora jeho monofýlie je velmi vysoká, stejně jako podpora interních štěpení, přitom podpora této skupiny v morfologické analýze byla velmi omezená (Bocakova, 2005). Skupina dalších rodů byla podpořena třemi znaky v morfologické analýze (Bocakova, 2005) avšak molekulární data poskytují pro toto monofylum pouze limitovanou podporu (BS 82 %). Tento klád obsahuje rody *Eurrhacus*, *Emplectus*, *Neolinoptes*, *Lycoplateros*, *Calocladon* [REDACTED] [REDACTED] Podpora pro bazální štěpení v tomto kládu je omezená a pohybuje se na hodnotě BS těsně nad 80 % (Obr. 1). Navíc nesouhlasí zcela s topologií vytvořenou na základě morfologických dat. Například *Emplectus* a *Eurrhacus* netvoří v molekulární analýze monofylum, ale parafylum. Ani podpora morfologickými znaky není jednoznačná a další data budou nutná pro řešení fylogeneze uvnitř této skupiny.

Tribus Calopterini je velmi dobře podpořen (BS 100 %) avšak jeho vnitřní struktura neodpovídá předchozím studiím. Podtribus Calopterini není podpořen jako monofylum molekulárními daty a představuje v současné analýze [REDACTED]

[REDACTED] Morfologická podpora pro monofylii těchto dvou kládů byla založena na jediném morfologickém znaku v předchozí analýze (Bocakova, 2005), tj. na dvou výbězcích na phallu v oblasti, kde se napojují paramery. Phalli jsou velmi morfologicky plastické orgány, které podléhají sexuálnímu výběru a často dochází k tomu, že i velmi příbuzné skupiny mohou mít poměrně odlišné tvary kopulačních orgánů (Bocak a Yagi, 2010). Proto je možné, že došlo ke ztrátě těchto výběžků v terminální linii představované kládem Acroleptina (Obr. 1). [REDACTED]

[REDACTED] Takto definovány jsou tyto rody monofyletické a splňují podmínky akceptovatelnosti ve fylogenetické klasifikaci (Hennig, 1965). [REDACTED]

Sesterskou skupinou ke kládu A je redefinovaný klád představující většinu taxonů dříve morfologicky definovaného subtribu Acroleptina. Tento subtribus byl navržen pro skupinu neotenních linií s předpokládanou existencí larviformních samic.

Vztahy mezi těmito liniemi jsou relativně dobře podpořené (BS >90 %). Naproti tomu je velmi obtížné tyto skupiny definovat morfologicky, protože velká část z nich má pravděpodobně larviformní samice a proto i morfologicky modifikované samce. Paralelní modifikace samčí morfologie v liniích s prokázanou neotenií byla popsána pro více skupin, například Elateridae: Drilini, Elateridae: Omalisidae (Kundrata a Bocak 2011; Kundrata a kol. 2014; Bocak a kol. 2018; Kusy a kol. 2018). Samci neotenních linií mají velmi často významně redukované ústní ústrojí, redukovaná žebra na krovkách, zkrácené krovky, a celkově miniaturizované tělo (Kazantsev 2005; Bocak a Bocakova 2008; Masek a kol., 2018). Procesy redukce a miniaturizace morfologických struktur jsou známy nejen u členovců ale také u obratlovců a jedná se o všeobecný evoluční trend spojený se zmenšením těla (Conway a kol., 2017). Tyto paralelní modifikace jsou obtížně odhalovány při použití výhradně morfologické analýzy. Výhodou molekulárních dat je, že nejsou funkčně ovlivněna neotenií.

Vznik neotenie je omezen v rámci řádu Coleoptera pouze na několik skupin a nejčastější je v nadčeledi Elateroidea (McMahon a Hayward, 2016). Původní představa, že pouze nedávno vzniklé terminální linie mohou být neotenni, byla odmítnuta v první molekulární studii Elateroidea (Bocakova a kol., 2007).

(Bocakova a kol. 2007; Bocak a kol. 2008; Kundrata a Bocak, 2011; Kundrata a kol. 2014). Podstatná část neotenních skupin v čeledi Lycidae je ovšem velmi starých a práce, která tyto vztahy popsala současně zdůrazňuje, že neotenie může velmi dlouho přetrvávat v ekologicky a klimaticky stabilních oblastech s nepřerušovanou dlouhodobou existencí (Bocak a kol., 2008). Podobně dlouhodobé přežívání neotenních linií bylo prokázáno v podčeledi Omalisinae v mediteránní oblasti (Bocek a kol., 2018). Na rozdíl od ostatních linií, nedávný vznik neotenie byl předpokládán u jediného druhu rodu *Cautires* Waterhouse,

1878 známého z tektonicky starých pohoří v Tanzanii – *Cautires apterus* Bocak a kol., 2014.

Neotenní skupiny v tribu Calopterini jsou vzhledem ke své pozici v topologii považovány [REDACTED]

[REDACTED] Navržení hypotézy o vzniku neotenních forem je v tomto případě problematické. Získaná topologie nabízí dvě alternativy: [REDACTED]

Alternativně můžeme navrhnout, že neotenie vznikla [REDACTED]

[REDACTED] Situace v čeledi Lycidae umožňuje předpokládat, že dojde jen k zapnutí genů, protože samci těchto linií zůstávají okřídlení. [REDACTED]

bezkřídlych forem ve Phasmatodea. Rekonstrukce evoluce byla ovšem i v případě pakobylek velmi komplikovaná a hlavním problémem je naše neznalost molekulárních regulačních mechanismů zodpovědných za evoluci bezkřídlych samic a samičí neotenie. Whiting a kol. (2003) uvažovali parsimonní evoluci a hledali nejmenší počet kroků vysvětlujících evoluci křídel. [REDACTED]

[REDACTED] Tento postup byl kritizován [REDACTED]

[REDACTED] Alternativní

vysvětlení rozložení

Příromnost neotenních forem v tribu Calopterini má ovšem důsledky pro celkové chápání vzniku neotenních forem.

Evoluce neotenie v tomto tribu tak podporuje scénář v čeledi Lycidae a diferenciální přežívání neotenních forem v jednotlivých oblastech na základě stability ekologických podmínek. Oproti původním představám, vznik neotenie je tedy podstatně více různorodý. Nedávno prokázaný vznik neotenních forem přímo z dokonale sklerotizovaných forem v čeledi Elateridae (Kusy a kol., 2018) je nyní doplněn prokázanou postupnou evolucí neotenních forem v jednotlivých liniích.

Diverzita tribů Calopterini a Eurrhacini je nepochybně vyšší, než bylo dosud prokázáno. Současná studie je omezena pouze na oblast Ekvádoru a Peru vzhledem k nedostupnosti materiálu z Brazílie v důsledku striktní proprietární ochrany genetických zdrojů (Prathapan a kol., 2018) a vzhledem k omezeným možnostem získání tkání fixovaných pro molekulární analýzy z tak rozsáhlé oblasti jako je Severní a jižní Amerika. Do analýzy bylo i z tohoto omezeného území zařazeno cca 91 druhů, tedy ve srovnání s celkovou diverzitou skupiny asi 20 % popsáných druhů. Většina druhů v této analýze byla sbírána pouze v omezené oblasti, přesto, jak je obvyklé v čeledi Lycidae, v geografickém prostoru se velmi liší alfa-diverzita (Masek a kol., 2018). Dá se tedy předpokládat, že materiál z dalších oblastí nebude sdílet stejné druhy s dosud sekvenovanou faunou Ekvádoru a Peru.

Velmi bohatá je jak fauna Kolumbie a Venezuely, tak středoamerické horské oblasti Kostariky a deštné pralesy Panamy. Většina diverzity této skupiny tedy zůstává pravděpodobně nepoznaná. Oblast Ekvádoru a Peru, v tomto případě především východní svahy And, které zahrnují ekosystémy od nížinného amazonského pralesa po horské mlžné lesy v nadmořských výškách okolo 3500 m nad mořem je velmi bohatá a představuje centrum biodiverzity (Myers a kol., 2000). Identifikace většího počtu hluboko zakořeněných linií, které si v budoucnu zaslouží popsání, jako samostatné rody ukazuje, že tato oblast není bohatá pouze na druhové úrovni, ale je i centrem fylogenetické diverzity.

## Závěr

Tato studie přináší první rozsáhlou fylogenetickou molekulární analýzu s reprezentativním zastoupením rodů tribu Calopterini. Předchozí studie obsahovaly pouze několik vzorků (5 vzorků, Bocak a kol., 2008) nebo velmi slabé a nerovnoměrné zastoupení linií (Masek a kol., 2018). Při analýze tohoto datového souboru byla v mnoha případech potvrzena topologie navržená na základě morfologických dat, ale v některých částech fylogenetického stromu byly zjištěny nekompatibilní topologie. Při srovnání morfologického a molekulárního signálu se ukázalo, že výsledky se často doplňují, tj., stejná topologie může být silně podpořena morfologií a slabě molekulárními daty a naopak. Toto ukazuje na potřebnost integrovaného taxonomického přístupu v systematické entomologii.

Vysoká genetická diverzita a prokázání existence mnoha samostatných linií velkého stáří a zasluhujících stanovení taxonů v ranku rodu ukazuje na omezené znalosti tropické diverzity. Tato práce proto poskytuje základní klasifikační rámec pro další studie věnované obecným evolučním otázkám, např. řešení vzniku a diversifikace neotenních linií, pro studium diverzity, nebo identifikaci diversifikačních center. Neotenní skupiny se vyznačují mimořádně nízkou disperzní kapacitou a jejich výskyt definuje stabilní oblasti s nepřerušovanou evolucí, jsou tedy významnou bioindikační skupinou.

## Literatura

- Andersen, A. N., Hoffmann, B. D., Müller, W. J., Griffiths, A. D.** (2002). Using ants as bioindicators in land management: simplifying assessment of ant community responses. *Journal of Applied Ecology*, **39**, 8–17.
- Balmford, A., Bruner, A., Cooper, P., Costanza, R., Farber, S. a kol.** (2002). Economic reasons for conserving wild nature. *Science*, **297**, 950–953.
- Bashford, R.** (2008). The development of static trapping systems to monitor for wood-boring insects in forestry plantations. *Australian Forestry*, **71**, 236–241.
- Belore, M. L., Winter, J. G., Duthie, H. C.** (2002). Use of diatoms and macroinvertebrates as bioindicators of water quality in southern Ontario rivers. *Canadian Water Resources Journal*, **27**, 457–484.
- Beutel, R. G.** (1999). Morphology and evolution of the larval head of Hydrophiloidea and Histeroidea (Coleoptera: Staphyliniformia). *Tijdschrift voor Entomologie*, **142**, 9–30.
- Bocak, L.** (1998). Nomenclatural notes on taxa of the family Lycidae described by Guérin Méneville (Insecta: Coleoptera). *Annales Zoologici*, **48**, 245–251.
- Bocak, L., Barton, C., Crampton-Platt, A., Chesters, D., Ahrens, D. a kol.** (2014). Building the Coleoptera tree of life for > 8000 species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. *Systematic Entomology*, **39**, 97–110.
- Bocak, L., Bocakova M.** (1990). Revision of the supergeneric classification of the family Lycidae (Coleoptera). *Polskie Pismo Entomologiczne*, **59**, 623 – 676.
- Bocak L., Bocakova M.** (2008). Phylogeny and classification of the family Lycidae (Insecta: Coleoptera). *Annales Zoologici*, **58**, 695–720.
- Bocak, L., Bocakova, 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 of London B: Biological Sciences*, **275**, 2015–2023.
- Bocak, L., Grebennikov, V. V., Sklenarova, K.** (2014). *Cautires apterus*, a new species and the first record of wingless male Lycidae (Coleoptera) discovered in the North Pare Mountains, Tanzania. *Annales Zoologici*, **64**, 1–7.

- Bocak, L., Matsuda, K.** (2003). Review of the immature stages of the family Lycidae (Insecta: Coleoptera). *Journal of Natural History*, **37**, 1463–1507.
- Bocak, L., Motyka, M., Bocek, M., Bocakova, M.** (2018). Incomplete sclerotization and phylogeny: The phylogenetic classification of *Plastocerus* (Coleoptera: Elateroidea). *PloS one*, **13**, e0194026.
- Bocak, L., Yagi, T.** (2010). Evolution of mimicry patterns in *Metriorrhynchus* (Coleoptera: Lycidae): the history of dispersal and speciation in Southeast Asia. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, **64**, 39–52.
- Bocakova, M.** (2003). Revision of the tribe Calopterini (Coleoptera, Lycidae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **38**, 207–234.
- Bocakova, M.** (2005). Phylogeny and classification of the tribe Calopterini (Coleoptera, Lycidae). *Insect Systematics & Evolution*, **35**, 437–447.
- Bocakova M., Bocak L., Hunt T., Teravainen M., Vogler A. P.** (2007). Molecular phylogenetics of Elateriformia (Coleoptera): evolution of bioluminescence and neoteny. *Cladistics*, **23**, 477–496.
- Bocek, M., Fancello, L., Motyka, M., Bocakova, M., Bocak, L.** (2018). The molecular phylogeny of Omalisidae (Coleoptera) defines the family limits and demonstrates low dispersal propensity and ancient vicariance patterns. *Systematic Entomology*, **43**, 250–261.
- Bonett, R. M., Chippindale, P. T.** (2006). Streambed microstructure predicts evolution of development and life history mode in the plethodontid salamander *Eurycea tynnerensis*. *BMC Biology*, **4**, 6.
- Bouchard, P., Bousquet, Y., Davies, A. E., Alonso-Zarazaga, M. A., Lawrence a kol.** (2011). Family-group names in Coleoptera (Insecta). *ZooKeys*, **88**, 1.
- Bourgeois, J.** (1879). Lycides recueillis au Brésil par C. van Volxem. *Comptes Rendus de la Societe Entomologique de Belgique*, **22**, 15–19.
- Bourgeois, J.** (1905). Les Lycides du Muséum d’Histoire Naturelle de Paris. *Annales de la Société entomologique de France*. **74**, 109–126.
- Branham, M. A., Wenzel, J. W.** (2003). The origin of photic behavior and the evolution of sexual communication in fireflies (Coleoptera: Lampyridae). *Cladistics*, **19**, 1–22.
- Brown Jr, K. S.** (1991). Conservation of neotropical environments: insects as indicators. *The Conservation of Insects and Their Habitats*, **349**, 404.

- Brues, C. T., Melander, A. L., Carpenter, F. M.** (1954). *Classification of insects*. Cambridge University Press: Cambridge, USA.
- Busvine, J.** (2012). *Disease transmission by insects: its discovery and 90 years of effort to prevent it*. Springer Science & Business Media: Berlin, Germany.
- Campbell, J. F., Mullen, M. A., Dowdy, A. K.** (2002). Monitoring stored-product pests in food processing plants with pheromone trapping, contour mapping, and mark-recapture. *Journal of Economic Entomology*, **95**, 1089–1101.
- Cicero, J. M.** (1994). Composite, haustellate mouthparts in netwinged beetle and firefly larvae (Coleoptera, Cantharoidea: Lycidae, Lampyridae). *Journal of Morphology*, **219**, 183–192.
- Clapham, M. E., Karr, J. A., Nicholson, D. B., Ross, A. J., Mayhew, P. J.** (2016). Ancient origin of high taxonomic richness among insects. *Proceedings of the Royal Society B*, **283**, 20152476.
- Conway, K. W., Kubicek, K. M., Britz, R.** (2017). Morphological novelty and modest developmental truncation in Barbooides, Africa's smallest vertebrates (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Morphology*, **278**, 750–767.
- Costello, M. J., Wilson, S., Houlding, B.** (2011). Predicting total global species richness using rates of species description and estimates of taxonomic effort. *Systematic Biology*, **61**, 871–883.
- Crowson, R. A.** (1955). *The natural classification of the families of Coleoptera*. N. Lloyd: London, UK.
- Crowson, R. A.** (1960). The phylogeny of Coleoptera. *Annual Review of Entomology*, **5**, 111–134.
- 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*, **21**, 35–77.
- Dollo, L.** (1893). The laws of evolution. *Bulletin de la Société Belgique de Géologie de Paléontologie*, **7**, 164–166
- Eisner, T., Schroeder, F. C., Snyder, N., Grant, J. B., Aneshansley, D. J. a kol.** (2008). Defensive chemistry of lycid beetles and of mimetic cerambycid beetles that feed on them. *Chemoecology*, **18**, 109–119.
- Erichson, W.F.** (1847). Conspectus Insectorum Coleopterorum, quae Republica Peruana observata sunt. *Archiv für Naturgeschichte*, **13**, 67–185.



- Erwin, T. L.** (1982). Tropical forests: their richness in Coleoptera and other arthropod species. *The Coleopterists Bulletin*, **36**, 7–75.
- Essig, E. O.** (1933). Insects and Agriculture. *Journal of Economic Entomology*, **26**, 869–872.
- Freeman, J. A.** (1948). Stored-Products Pests: a Survey of the Principal Entomological Problems in the United Kingdom. *Annals of Applied Biology*, **35**, 294–301.
- Gardner, T. A., Barlow, J., Chazdon, R., Ewers, R. M., Harvey, C. A. a kol.** (2009). Prospects for tropical forest biodiversity in a human-modified world. *Ecology Letters*, **12**, 561–582.
- Gaston, K. J.** (1991). The magnitude of global insect species richness. *Conservation Biology*, **5**, 283–296.
- Gorham, H. S.** (1881): Malacodermata. Fam. Lycidae. *Biologia Centrali Americana, Coleoptera*, **3**, 25–29.
- Gorham, H. S.** (1884): Malacodermata. Supplement. Fam. Lycidae. *Biologia Centrali Americana, Coleoptera*, **3**, 225–272.
- Green J. W.** (1949): The Lycidae of the United States and Canada I. The tribe Lycini (Coleoptera). *Transactions of the American Entomological Society*, **75**, 53–70.
- Grimaldi, D., Engel, M. S.** (2005). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- Guérin Méneville, F.C.** (1838): Crustacés, arachnides et insectes. Pp. 349. In: Duperrey, LI (ed.), Voyage autour du monde...sur la Corvette de sa Majesté, La Coquille, pendant, les années 1822, 1823, 1824 et 1825...Zoologie, **2**, part 2: Bertrand, Paris.
- Gullan, P. J., Cranston, P. S.** (2014). *The insects: an outline of entomology*. John Wiley & Sons: New York, NY, USA.
- Hamilton, A. J., Basset, Y., Benke, K. K., Grimbacher, P. S., Miller, S. E. a kol.** (2010). Quantifying uncertainty in estimation of tropical arthropod species richness. *The American Naturalist*, **176**, 90–95.
- Hammond P. M.** (1992). *Species inventory. Global Biodiversity. Status of the Earth's Living Resources*. Pp. 17–39. A Report Compiled by the World Conservation Monitoring. Centre, ed. Groombridge, B. Chapman and Hall: London, UK.

- Hansen, M.** (1991). The hydrophiloid beetles: phylogeny, classification and a revision of the genera (Coleoptera, Hydrophiloidea). *Kongelige Danske Videnskabernes Selskab*, **40**, 1–40.
- Hennig, W.** (1965). Phylogenetic systematics. *Annual Review of Entomology*, **10**, 97–116.
- Howland, D. E. a Hewitt, G. M.** (1995). Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data. *Insect Molecular Biology*, **4**, 203–215.
- Ihalainen, E., Lindström, L., Mappes, J., Puolakkainen, S.** (2008). Can experienced birds select for Müllerian mimicry? *Behavioral Ecology*, **19**, 362–368.
- Kapan, D. D.** (2001). Three-butterfly system provides a field test of Müllerian mimicry. *Nature*, **409**, 338.
- Kazantsev, S.** (2005). Morphology of Lycidae with some consideration on evolution of the Coleoptera. *Elytron*, **17**, 73–248.
- Kirsch, T.** (1884): Neue südamerikanische Käfer. *Berliner Entomologische*, **28**, 43–54.
- Klass, K. D., Zompro, O., Kristensen, N. P., Adis, J.** (2002). Mantophasmatodea: a new insect order with extant members in the Afrotropics. *Science*, **296**, 1456–1459.
- Kleine, R.** 1933. *Coleopterorum Catalogus auspiciis et auxilio*. Ed. Junk, W., Schenkling, S., Part, **128**, W. Junk: Berlin, Germany.
- Kundrata, R., Bocak, L.** (2011). The phylogeny and limits of Elateridae (Insecta, Coleoptera): is there a common tendency of click beetles to soft-bodiedness and neoteny? *Zoologica Scripta*, **40**, 364–378.
- Kundrata, R., Bocakova, M., Bocak, L.** (2014). The comprehensive phylogeny of the superfamily Elateroidea (Coleoptera: Elateriformia). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **76**, 162–171.
- Kusy, D., Motyka, M., Andujar, C., Bocek, M., Masek, M. a kol.** (2018). Genome sequencing of *Rhinorhipus* Lawrence exposes an early branch of the Coleoptera. *Frontiers in Zoology*, **15**, 21.
- Kusy, D., Sklenarova, K., Bocak, L.** (2018). The effectiveness of DNA-based delimitation in *Synchonnus* net-winged beetles (Coleoptera: Lycidae) assessed, and description of 11 new species. *Austral Entomology*, **57**, 25–39.
- Lawrence J. F., Newton A. F.** (1995). Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). Pp. 779–

1006. In: Pakaluk J. and Ślipiński S. A. (eds.): *Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera: Papers Celebrating the 80th Birthday of Roy A. Crowson*. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa, Poland.
- Lawrence, J. F., Ślipiski, A., Seago, A. E., Thayer, M. K., Newton, A. F. a kol.** (2011). Phylogeny of the Coleoptera based on morphological characters of adults and larvae. *Annales Zoologici*, **61**, 1–217.
- LeConte, J.** (1847): Fragmenta entomologica. *Journal of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, **1**, 71–93.
- Leys, R., Watts, C. H., Cooper, S. J., Humphreys, W. F.** (2003). Evolution of subterranean diving beetles (Coleoptera: Dytiscidae Hydroporini, Bidessini) in the arid zone of Australia. *Evolution*, **57**, 2819–2834.
- Ligon, B. L.** (2005). Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history transmission treatment and prevention. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, **16**, 60–65.
- Linard, B., Crampton-Platt, A., Moriniere, J., Timmermans, M. J., Andujar, C. a kol.** (2018). The contribution of mitochondrial metagenomics to large-scale data mining and phylogenetic analysis of Coleoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **128**, 1–11.
- Linsley, E. G., Eisner, T., Klots, A. B.** (1961). Mimetic assemblages of sibling species of lycid beetles. *Evolution*, **15**, 15–29.
- Mallet, J., Joron, M.** (1999). Evolution of diversity in warning color and mimicry: polymorphisms, shifting balance, and speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **30**, 201–233.
- Marshall, A. G.** (1981). *The ecology of ectoparasitic insects*. Academic Press: New York, NY, USA.
- Masek, M., Motyka, M., Kusy, D., Bocek, M., Li, Y., Bocak, L.** (2018). Molecular Phylogeny, Diversity and Zoogeography of Net-Winged Beetles (Coleoptera: Lycidae). *Insects*, **9**, 154.
- McGeoch, M. A.** (1998). The selection, testing and application of terrestrial insects as bioindicators. *Biological Review*, **73**, 181–201.
- McGeoch, M. A., Van Rensburg, B. J., Botes, A.** (2002). The verification and application of bioindicators: a case study of dung beetles in a savanna ecosystem. *Journal of Applied Ecology*, **39**, 661–672.

- McKenna, D. D., Wild, A. L., Kanda, K., Bellamy, C. L., Beutel, R. G. a kol.** (2015). The beetle tree of life reveals that Coleoptera survived end-Permian mass extinction to diversify during the Cretaceous terrestrial revolution. *Systematic Entomology*, **40**, 835–880.
- McMahon, D. P., Hayward, A.** (2016). Why grow up? A perspective on insect strategies to avoid metamorphosis. *Ecological Entomology*, **41**, 505–515.
- Miller, R. S.** (1991). *A revision of the Leptolycini (Coleoptera: Lycidae) with a discussion of paedomorphosis*. Doctoral Thesis, The Ohio State University: Lawrence, OH, USA.
- Miller, R. S.** (2003): *Leptocetes* Green (1952) a replacement for *Celetes* Newman (1838) [not *Celetes* Schoenherr (1836)] (Coleoptera: Lycidae, Curculionidae). *The Coleopterist Bulletin*, **57**, 146–148.
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A. a kol.** (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, **346**, 763–767.
- Mjöberg, E.** (1925). The mystery of the so called “trilobite larvae” or “Perty's larvae” definitely solved. *Psyche: A Journal of Entomology*, **32**, 119–157.
- Moore, B. P., & Brown, W. V.** (1981). Identification of warning odour components, bitter principles and antifeedants in an aposematic beetle: *Metriorrhynchus rhipidius* (Coleoptera: Lycidae). *Insect Biochemistry*, **11**, 493–499.
- Motyka, M., Masek, M., Bocak, L.** (2017). Congruence between morphology and molecular phylogeny: the reclassification of Calochromini (Coleoptera: Lycidae) and their dispersal history. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **180**, 47–65.
- Motyka, M., Kampova, L., Bocak, L.** (2018). Phylogeny and evolution of Müllerian mimicry in aposematic Dilophotes: evidence for advergence and size-constraints in evolution of mimetic sexual dimorphism. *Scientific Reports*, **8**, 3744.
- Myers N., Mittermeier R., Mittermeier C., Fonseca G., Kent J.** (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853–858.
- Müller, F.** (1879). Ituna and Thyridia: a remarkable case of mimicry in butterflies. *Transactions of the Entomological Society of London*, **1879**, 20–29.
- Newman, E.** (1838). Entomological notes. *Entomological Magazine*, **5**, 372–402.

- Novotny, V., Drozd, P., Miller, S. E., Kulfan, M., Janda, M. a kol.** (2006). Why are there so many species of herbivorous insects in tropical rainforests? *Science*, **313**, 1115–1118.
- O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M., Karr, T. L., Robertson, H. M.** (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**, 2699–2702.
- Peters, R. S., Meusemann, K., Petersen, M., Mayer, C., Wilbrandt, J. a kol.** (2014). The evolutionary history of holometabolous insects inferred from transcriptome-based phylogeny and comprehensive morphological data. *BMC Evolutionary Biology*, **14**, 52.
- Pic, M.** (1911): Coleopteres exotiques nouveaux ou peu connus. *L'Echange*, **321**, 164–167.
- Pic, M.** (1922). Contribution a l'étude des Lycides. *L'Echange*. **407–410**, 13–28.
- Pic, M.** (1926). Malacodermes exotiques. *L'Echange*, **425**, 29–30.
- Pic, M.** (1929). Malacodermes exotiques. *L'Echange*, **438**, 73–76.
- Prathapan, K. D., Pethiyagoda, R., Bawa, K. S., Raven, P. H., Rajan, P. D.** (2018). When the cure kills—CBD limits biodiversity research. *Science*, **360**, 1405–1406.
- Purcell, A. H., Finlay, A. H.** (1979). Evidence for noncirculative transmission of Pierce's disease bacterium by sharpshooter leafhoppers. *Phytopathology*, **69**, 393–395.
- Rainio, J., Niemelä, J.** (2003). Ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as bioindicators. *Biodiversity & Conservation*, **12**, 487–506.
- Randolph, S. E., Storey, K.** (1999). Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. *Journal of Medical Entomology*, **36**, 741–748.
- Ribera, I., Beutel, R. G., Balke, M., Vogler, A. P.** (2002). Discovery of Aspidytidae, a new family of aquatic Coleoptera. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **269**, 2351–2356.
- Ride, W. D. J. L.** (1999). *International code of zoological nomenclature*. International Trust for Zoological Nomenclature: London, UK.

- Riedel, A., Sagata, K., Surbakti, S., Tänzler, R., Balke, M.** (2013). One hundred and one new species of *Trigonopterus* weevils from New Guinea. *ZooKeys*, **280**, 1–150.
- Samways, M. J.** (2005). *Insect diversity conservation*. Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- Sanmartin, I., Enghoff, H., Ronquist, F.** (2001). Patterns of animal dispersal, vicariance and diversification in the Holarctic. *Biological Journal of the Linnean Society*, **73**, 345–390.
- Sklenarova, K., Chesters, D., Bocak, L.** (2013). Phylogeography of poorly dispersing net-winged beetles: a role of drifting India in the origin of Afrotropical and Oriental fauna. *PLoS One*, **8**, e67957.
- Sodhi, N. S., Koh, L. P., Clements, R., Wanger, T. C., Hill, J. K. a kol.** (2010). Conserving Southeast Asian forest biodiversity in human-modified landscapes. *Biological Conservation*, **143**, 2375–2384.
- Stone G., French, V.** (2003). Evolution: have wings come, gone and come again? *Current Biology*, **13**, R436–R438.
- Timmermans, M. J., Dodsworth, S., Culverwell, C. L., Bocak, L., Ahrens, D. a kol.** (2010). Why barcode? High-throughput multiplex sequencing of mitochondrial genomes for molecular systematics. *Nucleic Acids Research*, **38**, e197–e197.
- Turner, J. R. G.** (1987). The evolutionary dynamics of Batesian and Muellierian mimicry: similarities and differences. *Ecological Entomology*. **12**, 81–95.
- Ulyshen, M. D., Zachos, L. G., Stireman III, J. O., Sheehan, T. N., Garrick, R. C.** (2017). Insights into the ecology, genetics and distribution of *Lucanus elaphus* Fabricius (Coleoptera: Lucanidae), North America's giant stag beetle. *Insect Conservation and Diversity*, **10**, 331–340.
- Waterhouse, C. O.** (1879). *Illustrations of typical specimens of Coleoptera in the collection of the British Museum*. British Museum: London, UK.
- Whiting, M. F., Bradler, S., Maxwell, T.** (2003). Loss and recovery of wings in stick insects. *Nature*, **421**, 264–267.
- Wiley, E. O., Lieberman, B. S.** (2011). *Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics*. John Wiley & Sons: New York, NY, USA.
- Wong, A. T. C.** (1996). A new species of neotenous beetle, *Duliticola hoiseni* (Insecta: Coleoptera: Cantharoidea: Lycidae) from Peninsular Malaysia and Singapore. *Raffles Bulletin of Zoology*, **44**, 173–187.

- Wong, A. T. C.** (1998). *A revision of the neotenus' trilobite larvae' of the genera Duliticola and Platerodrilus (Coleoptera: Cantharoidea: Lycidae)*. Master Thesis, National University of Singapore: Singapore.
- Wood, D. L.** (1982). The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Annual Review of Entomology*, **27**, 411–446.
- Zhang, W., Ricketts, T. H., Kremen, C., Carney, K., Swinton, S. M.** (2007). Ecosystem services and dis-services to agriculture. *Ecological Economics*, **64**, 253–260.
- Zhang, L., Zhou, X. M., Chen, D. K., Schuettpelz, E., Knapp, R. a kol.** (2017). A global phylogeny of the fern genus *Tectaria* (Tectariaceae: Polypodiales) based on plastid and nuclear markers identifies major evolutionary lineages and suggests repeated evolution of free venation from anastomosing venation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **114**, 295–333.