

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ZOOLOGIE



**Ontogeneze excesivních struktur u vrubounovitých brouků
(Coleoptera: Scarabaeinae)**

Ontogeny of exaggerated structures in dung beetles (Coleoptera: Scarabaeinae)

Bakalářská práce

Radim Žídek

vedoucí práce: Mgr. Petr Šípek

Praha 2010

Abstrakt

Rohy vrubounovitých brouků jsou sekundárním pohlavním znakem vyskytujícím se většinou u samců, kterým slouží jako zbraně v soubojích o přístup k samicím. U mnoha druhů se vyskytují dvě diskrétní formy samců, s rohy a bez rohů, které využívají rozdílné reprodukční strategie. Velikost těla dospělého i morfologie rohů jsou určeny nutričními podmínkami, za nichž probíhá vývoj larev. Přepínání mezi alternativními vývojovými drahami je zajištěno hladinou juvenilního hormonu (JH), která odráží velikost těla, a k němu geneticky určenou prahovou hodnotou citlivosti. Při překročení kritické velikosti těla dochází k vývoji rohů, pokud překročena není, puls ekdysonu reprogramuje vývoj a vzniká dospělec s bezrohou morfologií. Reprogramování vývoje zahrnuje modifikace dráhy insulinového receptoru a domén exprese genů specifických proximodistální osu vznikajícího rohu. Vývoj rohů se morfologicky podobá vývoji ostatních hmyzích přívěsků, s nimiž sdílí expresi genů tvořících regulační kaskádu vedoucí ke vzniku výrůstku kutikuly. Některé z nich jsou exprimovány v rozsáhlých oblastech epidermis a ke vzniku funkční kaskády a nového výrůstku v těchto částech těla chybí pouze exprese genu *Distal-less*. Rovněž exprese genů *wingless* a *decapentaplegic*, které zahajují celou potřebnou autonomní kaskádu molekulárních signálů, je dostatečná pro vznik rohu. Oba tyto mechanismy mohou vysvětlovat tendenci k častému vzniku rohů u skupiny Scarabaeoidea. Po růstu ve stádiu larvy je dalším důležitým procesem určujícím míru pohlavního a samčího dimorfismu resorpce tkáně rohu u kukly prostřednictvím programované buněčné smrti. Vznik rohů u společného předka všech vrubounovitých brouků, jejich rozrůznění a následný častý zánik s využitím tohoto mechanismu nabízí další možné vysvětlení původu diverzity rohů u nadčeledě Scarabaeoidea.

Klíčová slova: excesivní struktury, rohy brouků, brouci listoroží, pohlavní dimorfismus, polyfenismus, alometrie, hormonální regulace ontogeneze, juvenilní hormon, ekdyson, morfogeneze

English abstract

Horns of scarab beetles represent a secondary sexual characters present mostly in males, to whom they serve as weapons in combats over the acces to females. In many species, two discrete male forms occur, „horned“ and „hornless“, which employ different reproductive strategies. Adult body size and horn morphology are determined by nutritional conditions encountered by larvae during their development. Switching between developmental pathways is accomplished by circulating levels of juvenile hormone (JH) which reflect body size, and genetically determined threshold of sensitivity to it. When body size is larger then threshold, horn growth occur, whereas if it's not, a brief pulse of ecdysone reprogramme the development and hornless adult emerge. Reprogramming the development encompass modifications of the insulin receptor pathway as well as changes in exact domains of genes expression involved in specifying the proximodistal axis of the developing horn. Development of horns is morphologically reminiscent that of other insect appendages, with which it shares the expression of genes *wingless*, *decapentaplegic*, *Distal-less*, *dachshund*, *homothorax*, *aristaless* and *EGFR*, parts of gene regulatory network ensuring origin of the outgrowth of the cuticle. Some of them are expressed through broad areas of epidermis and only expression of the gene *Distal-less* is necessary for completing functional cascade and origin of the new outgrowth. Similarly, the expression of *wingless* and *decapentaplegic*, which start the whole autonomous cascade of molecular signals, is sufficient for the origin of horn. Both of these mechanisms could explain the tendency to frequent origin of horns in Scarabaeoidea. After growth phase, there is another process important in determining the degree of sexual and male dimorphism – the resorption of pupal horn tissue mediated by programmed cell death. The origin of horn in common ancestor of all scarabs, later diversification, and subsequent frequent loss of horns through this mechanism offer another possible explanation for the origin of horn diversity in Scarabaeoidea superfamily.

Keywords: exaggerated structures, beetle horns, scarab beetles, sexual dimorphism, polyphenism, allometry, hormonal regulation of ontogeny, juvenile hormone, ecdysone, morphogenesis

Obsah

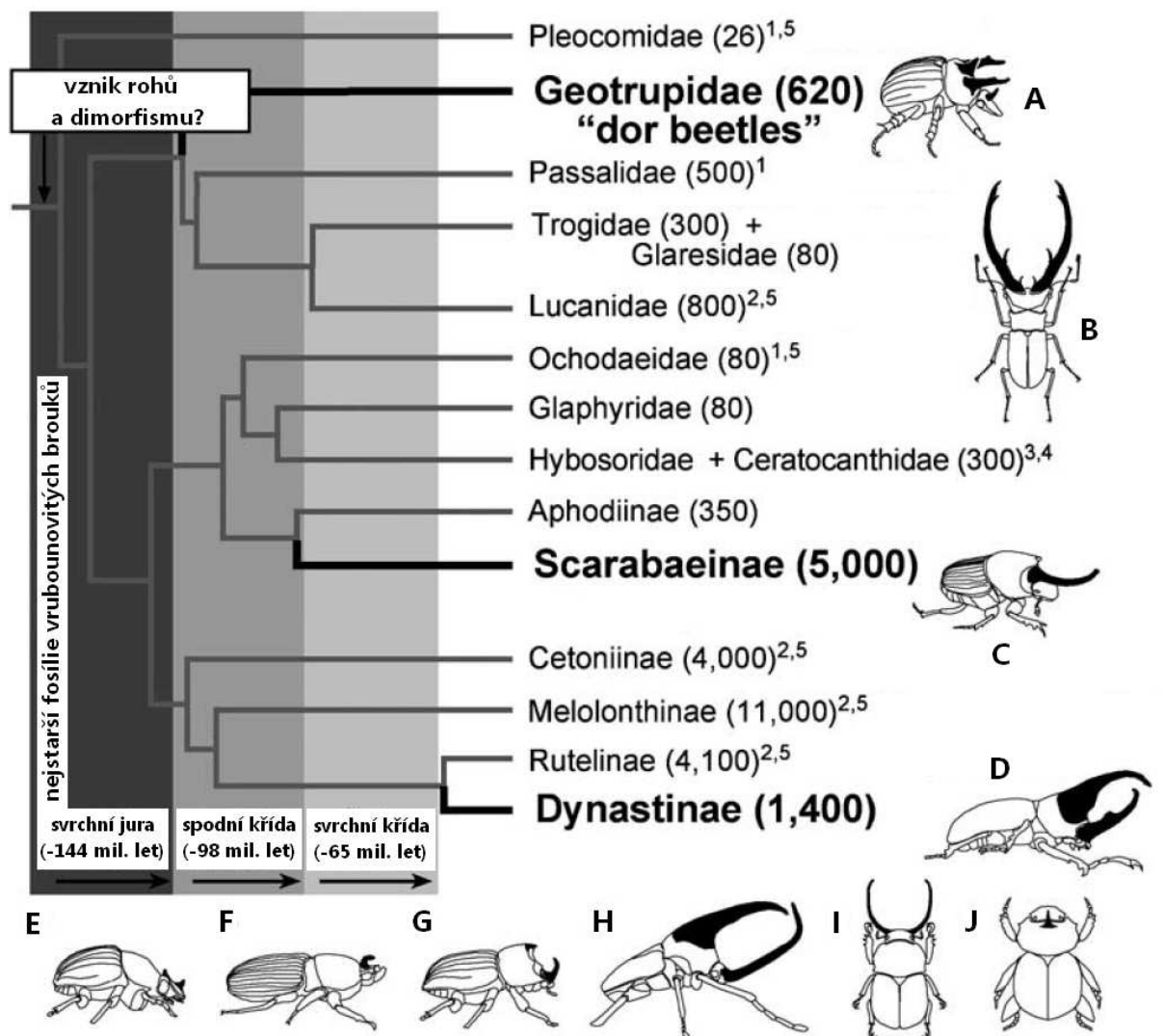
1. Úvod – Excesivní struktury u brouků (Coleoptera).....	5
1.1 Hypotézy o funkčním významu rohů.....	7
2. Zákonitosti růstu excesivních struktur v závislosti na velikosti těla (alometrie).....	8
2.1 Polymorfismus a polyfenismus.....	8
2.1.1 Bifenismus samců u vrubounovitých brouků.....	9
2.1.2 Trifenismus (trimorfismus).....	11
2.1.3 Pohlavní dimorfismus.....	12
2.2 Evoluce a plasticita alometrických závislosti.....	13
2.3 Kompetice mezi excesivními strukturami a ostatními částmi těla (kompenzační růst).....	14
2.3.1 Trade-off mezi alokací zdrojů do tvorby excesivních struktur a investicí do pohlavních orgánů.....	15
3. Životní strategie vrubounů rodu <i>Ontophagus</i> Latreille, 1802 (Scarabaeinae: Ontophagini).....	16
3.1 Životní cyklus.....	16
3.2 Alternativní reprodukční strategie samců.....	16
3.3 Diskriminace samic mezi morfami samců.....	17
3.4 Kompetice spermií.....	17
4. Regulace exprese rohů.....	18
4.1 Mechanismy závislé na podmínkách vývoje larvy....	18
4.1.1 Ekdyson a juvenilní hormon (JH) – role v ontogenezi a metamorfóze.....	19
4.1.1.1 Dvě periody sensitivity rohů k juvenilnímu hormonu.....	20
4.1.1.1. a Juvenilní hormon – pozdní sensitivní perioda.....	21
4.1.1.1. b Juvenilní hormon – časná sensitivní perioda.....	21
4.1.1.2 Role ekdysonu v regulaci exprese rohů.....	22
4.1.1.3 Model regulace exprese rohů pomocí juvenilního hormonu a ekdysonu.....	22
4.1.2 Ovlivnění exprese rohů nutričními podmínkami prostřednictvím dráhy insulinového receptoru.....	24
4.2 Mechanismy nezávislé na podmínkách vývoje larvy.....	26
4.2.1 Morfogeneze rohů.....	26
4.2.2 Genetické naprogramování vývoje rohů.....	28
4.2.2.1 Embryogeneze končetiny u modelového zástupce hmyzu (<i>Drosophila melanogaster</i>).....	29
4.2.2.2 Vývojová genetika rohů brouků rodu <i>Ontophagus</i>	30
4.2.3 Remodelace rohu ve stádiu kukly - role apoptózy v morfogenezi rohů.....	33
5. Diskuse a závěr.....	36
6. Literatura.....	38

1. Úvod – Excesivní struktury u brouků (Coleoptera)

Excesivními strukturami se rozumí struktury v porovnání s příbuznými druhy nadměrně vyvinuté, které na první pohled nemohou sloužit žádnému praktickému účelu (ARROW 1951). U brouků sem můžeme počítat prodloužené nebo ztlustlé nohy, např. u Cerambycidae (EMLEN & NIJHOUT 2000, JENIŠ 2008), Chrysomelidae (EMLEN & NIJHOUT 2000), z čeledi Scarabaeidae u Euchirinae (BEUTEL & LESCHEN 2005, MIZUNUMA 1999), Rutelinae (JAMESON 1997) a dalších, zvětšená tykadla u Cerambycidae (HEYROVSKÝ 1955), Anthribidae (ARROW 1951), Curculionidae (ARROW 1951) nebo Rutelinae (JAMESON 1997). Snad ještě častější jsou zvětšené mandibuly, především u čeledí Lucanidae (MIZUNUMA & NAGAI 1994, ROWLAND & EMLLEN 2009), ale také Cerambycidae (JENIŠ 2008), Prostomidae (LAWRENCE & BRITTON 1991), Geotrupidae (BEUTEL & LESCHEN 2005, ARROW 1951), Ochodaeidae (BEUTEL & LESCHEN 2005), v rámci Scarabaeidae u Rutelinae (JAMESON 1997). Nejzajímavější ze všech jsou však rohy, tj. výrůstky na přední straně těla – hlavy či pronota (ARROW 1951), neboť jde o zcela nové struktury, nikoliv pouze modifikace již dříve přítomných tělních přívěsků – jedná se o evoluční novinky (MOCZEK 2008).

Minoritně jsou druhy nesoucí rohy zastoupeny v čeledích Tenebrionidae (ARROW 1951, BROWN & SIEGFRIED 1983, YAMAZAKI 2009), Staphylinidae (DARWIN 1871), Chrysomelidae (EBERHARD 1981), Curculionidae (EBERHARD & GARCIA 2000, EBERHARD ET AL. 2000, ROWLAND & EMLLEN 2009), Anthicidae (HŮRKA 2005), Ciidae (LAWRENCE & BRITTON 1991), Elmidae (LAWRENCE & BRITTON 1991) a další. Naprostá většina brouků vybavených rohy je však soustředěna do velké nadčeledě Scarabaeoidea (dříve známí též jako brouci listoroží - Lamellicornia), a to především do čeledí Geotrupidae a Scarabeidae (v ní zejména podčeledě Scarabaeinae a Dynastinae, ARROW 1951, MIZUNUMA 1999, KAWAI ET AL. 2005). Přehled o výskytu rohů v jednotlivých fylogenetických liniích Scarabaeoidea podává Obr. 1. Nesouvislá distribuce skupin s velkým množstvím zástupců nesoucích rohy a ohromující diverzita jejich tvarů a umístění na těle brouka vedla většinu autorů k automatickému závěru, že rohy vznikaly během evoluce nadčeledě Scarabaeoidea opakovaně. Hovořili potom o jakési speciální tendenci této skupiny k tvorbě rohů (viz. např. ARROW 1951).

Jako modelové organismy pro studie zabývající se rohy u brouků slouží nejčastěji druhy početného rodu *Ontophagus* (Scarabaeidae: Scarabaeinae: Ontophagini), které lze



Obr. 1: Fylogeneze nadčeledi Scarabaeoidea a výskyt rohů u jednotlivých skupin. Většina druhů vrubounovitých brouků (Scarabaeoidea) nesoucích rohy patří do tří vzdáleně příbuzných skupin – Geotrupidae, Scarabaeidae: Scarabaeinae a Scarabaeidae: Dynastinae. Brouci s rohy se však vyskytují i v dalších čeledích a podčeledích Scarabaeoidea (v závorkách jsou uvedeny přibližné počty popsanych druhů v každé skupině): indexy označují skupiny **1** – se zástupci nesoucími rudimentární rohy, **2** – s alespoň několika rody nebo druhy s plně vyvinutými rohy, **3** – s rohy přítomnými u kukel (kap. 4. 3. 3), **4** – bezrohé, ale s výskytem mutantních jedinců exprimujících rohy, **5** – s prahovými mechanismy pro expresi rohů (kap. 2. 1 a 4. 1. 1). Příklady zástupců s rohy z jednotlivých skupin: **A**) *Typhoeus typhoeus* (Linnaeus, 1758) (Geotrupidae), **B**) *Cyclommatus* sp. (Lucanidae) – u této čeledi jsou dominantním sekundárním pohlavním znakem zvětšené mandibuly, které zastávají stejnou úlohu jako rohy u ostatních vrubounovitých brouků **C**) *Ontophagus nigriventris* d'Orbigny, 1902 (Scarabaeidae: Scarabaeinae: Ontophagini) **D**) *Xylotrupes gideon* (Linnaeus, 1767) (Scarabaeidae: Dynastinae) **E**) *Pleocomma marquai* Hovore, 1972 (Pleocomidae) **F**) *Odontotaenius disjunctus* (Illiger, 1800) (Passalidae) **G**) *Sinodendron cylindricum* (Linnaeus, 1758) (Lucanidae) **H**) *Theodosia viridiaurata* Bates, 1889 (Scarabaeidae: Cetoniinae) **I**) *Fruhstorferia sexmaculata* Kraatz, 1900 (Scarabaeidae: Rutelinae) – excesivními strukturami jsou u tohoto druhu zvětšené mandibuly, nikoliv rohy; jiné druhy Rutelinae však pravými rohy disponují (JAMESON 1997) **J**) *Pterorthochaetes armatus* Paulian, 1945 (Ceratocanthidae) – mutantní jedinec s rohem, který se občas objeví v populaci jinak bezrohého druhu i čeledi. Převzato a upraveno z EMLÉN ET AL. 2006

množit za kontrolovaných laboratorních podmínek, dosahují malých velikostí a jejich vývoj proto trvá pouze několik týdnů. V posledním desetiletí se okruh bádání kolem evolučního původu a funkce rohů rozšířil o fyziologické a genetické regulace, které jsou spojeny s jejich vznikem v ontogenezi. Cílem této práce je pokusit se shrnout současné poznatky o ontogenetickém vývoji rohů i selekčním prostředí, v němž dochází k jejich evoluci. Na základě těchto znalostí přináší možná vysvětlení oné zvláštní schopnosti listorohých brouků produkovat plejádu nejrůznějších výrůstků, díky níž mezi nimi nacházíme jedny z nejfantastičtějších tvarů v živočišné říši.

1. 1 Hypotézy o funkčním významu rohů

Přes svou morfologickou různorodost vykazují excesivní struktury (nejen mezi hmyzem, ale i mezi hmyzem a obratlovci) řadu společných charakteristik. Jednou z nich je, že se často vyskytují pouze u jednoho pohlaví (zpravidla samců) – jsou pohlavně dimorfní (DARWIN 1871, ARROW 1951, MOCZEK 2006B, SHELBY ET AL. 2007). Charles Darwin navrhl jako vysvětlení jejich původu a funkce mechanismus pohlavního výběru. Excesivní struktury mají v tomto případě plnit roli ornamentů, podle nichž si samice vybírá nejkvalitnější samce (DARWIN 1871) Toto vysvětlení není u brouků nadčeledi Scarabaeoidea kvůli jejich relativně špatnému zraku příliš pravděpodobné (ARROW 1951). Další ze starších autorů považovali rohy za nástroje při hloubení podzemních tunelů, obranu proti predaci, nebo pouze za vedlejší produkt selekce na větší velikost těla (blíže i s citacemi v ARROW 1951).

Jak ukazují studie z posledních let, slouží rohy ve všech případech samcům jako zbraně ve vnitrodruhových soubojích o samice, resp. příležitost k rozmnožování, nebo jiné lokalizované zdroje (BEEBE 1944, EBERHARD 1978, 1981, 1987, PALMER 1978, BROWN & SIEGFRIED 1983, SIVA-JOTHY 1987, OTRONEN 1988, RASMUSSEN 1994, EMLÉN 1997A, EBERHARD & GARCIA 2000, MOCZEK & EMLÉN 2000, YAMAZAKI 2009).

MOCZEK ET AL. (2006) ve své práci poukazují na funkci hrudních rohů ve svlékání larvální hlavové kapsule během metamorfické ekdyse (více v kap. 4. 2. 3.). Rohy dospělců by pak mohly být exaptací z původních rohů kukel. Další způsoby využití rohů, jako např. zraňování kůry a tvorba mízotoků u rodu *Goliathus* (Scarabaeidae: Cetoniinae), jsou zjevně sekundárně získané (podrobněji i s citacemi v ARROW 1955).

2. Zákonitosti růstu excesivních struktur v závislosti na velikosti těla (alometrie)

Některé struktury rostou jinou rychlostí než ostatní části těla, takže jejich relativní velikost se s rostoucí velikostí jedinců mění, tj. rostou disproportcionálně. Tento jev je nazýván alometrie. Struktury mohou být izometrické, pozitivně nebo negativně alometrické, tj. rostou stejnou, větší, resp. menší rychlostí než zbytek těla (HUXLEY & TEISSIER 1936).

U holometabolního hmyzu, jehož imaga již dále nerostou, hovoříme o tzv. statické alometrii, tj. vztahu velikosti struktury k velikosti těla u různých jedinců z populace a nikoliv různých stádií vývoje téhož jedince. Výsledkem vynesení velikosti daného znaku proti velikosti těla (reprezentované např. šířkou pronota) je alometrická křivka (Obr. 2, 3). U statické alometrie její sklon ukazuje stupeň závislosti celkové intenzity růstu (tedy nikoliv jeho rychlosti) dané struktury na celkové velikosti těla (např. EMLEN 1994, EMLEN & ALLEN 2004, SIMMONS & EMLEN 2006).

Podrobněji se alometrií rohů u vrubounovitých brouků zabývala bakalářská práce nedávno obhájená na Katedře zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze (VENDL 2008).

2.1 Polymorfismus a polyfenismus

Polymorfní znaky jsou ty, které se v populaci vyskytují v několika odlišných formách. Takových znaků je většina a o nositelích jejich specifických kombinací potom uvažujeme jako o jednotlivých formách nebo morfách. Polymorfismus (nebo – sledujeme-li celý fenotyp jedince, ne pouze jeden znak – též polyfenismus, tj. fakultativní vznik různých fenotypů z jednoho genotypu) lze rozdělit podle faktorů ovlivňujících vznik té které formy na alelicky determinovaný (genetický) polymorfismus a prostředím determinovaný (environmentální) polymorfismus (EMLEN 1994).

U alelického polymorfismu je vznikuvší forma pevně dána alelami genetických přepínačů, jež určují, která sada genů, odpovídající určité formě, se bude exprimovat (EMLEN 1994). U rohů brouků bývá zpravidla geneticky určen sexuální dimorfismus (SHELBY ET AL. 2007).

Princip environmentálního polymorfismu je v podstatě stejný (alternativní sady genů odpovídající jednotlivým formám), ale přepínač je v tomto případě řízen vnějšími

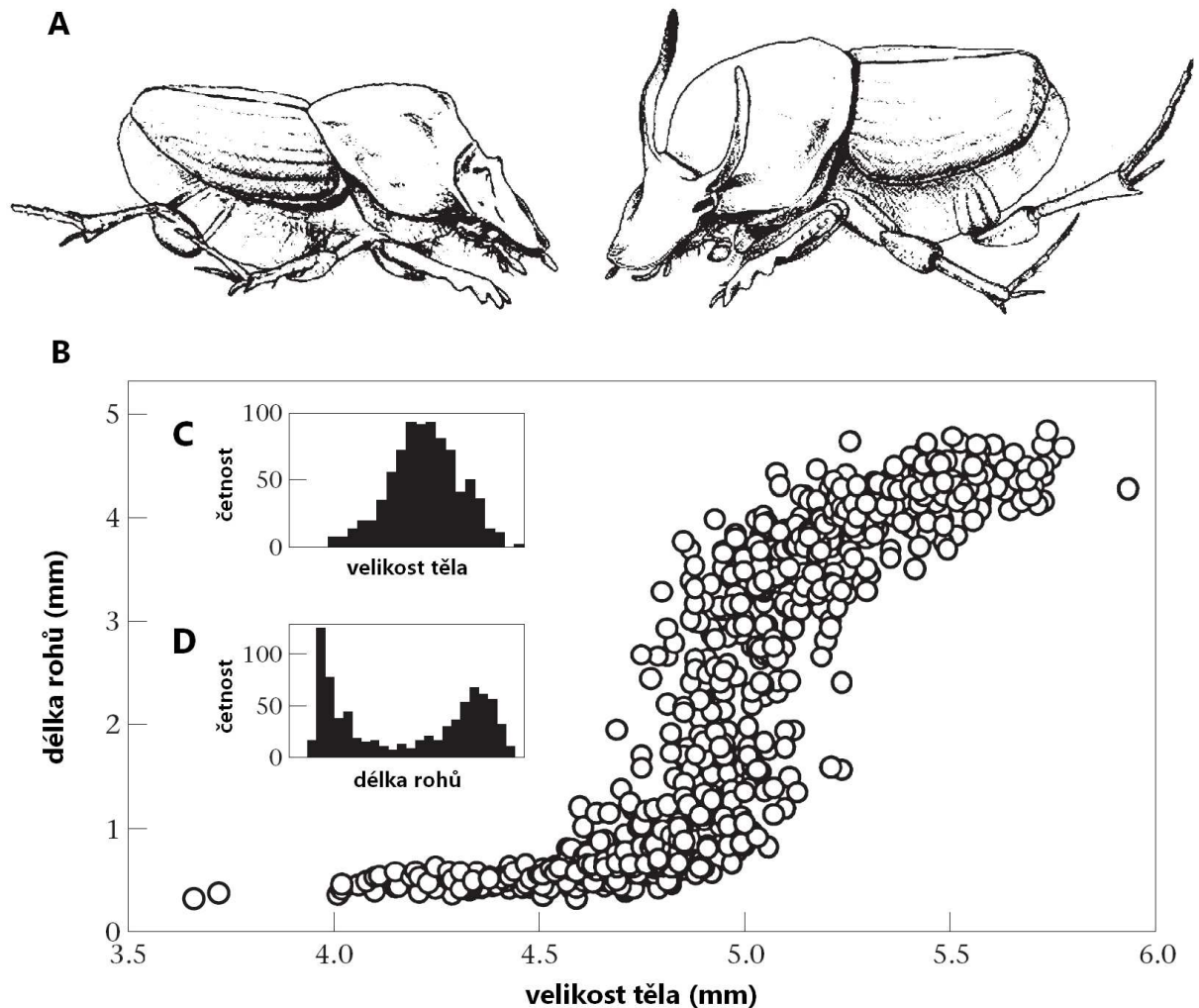
podmínkami spojenými s určitou selekční situací (EMLEN 1994). Na základě znalosti těchto podmínek je možné s určitou pravděpodobností předpovědět, která forma vznikne (EMLEN & NIJHOUT 2001).

2. 1. 1 Bifenismus samců u vrubounovitých brouků

U mnoha druhů brouků nadčeledi Scarabaeoidea se vyskytují dvě alternativní formy samců lišících se od sebe velikostí rohů (BATESON & BRINDLEY 1892, EBERHARD 1982, 1987, SIVA-JOTHY 1987, EMLLEN 1994, 1997A,B, RASMUSSEN 1994, KAWANO 1995, MOCZEK & EMLLEN 2000) nebo v případě roháčů velikostí a tvarem kusadel (ARROW 1951, ROWLAND & EMLLEN 2009). Samci dosahující alespoň určité kritické prahové velikosti nesou plně vyvinuté rohy, zatímco samci menší mají rohy pouze rudimentární nebo vůbec žádné, takže svou morfologií připomínají samice, které jsou nejčastěji bezrohé (ARROW 1951, EMLLEN & NIJHOUT 1999). Výsledkem této bimodální distribuce morfologií rohů je sigmoidní tvar alometrické křivky (EMLEN 1994, 1997B, Obr. 2). Dosažená velikost těla a tedy morfologie rohů závisí na nutričních podmínkách, za nichž probíhá vývoj larvy, nikoliv na konkrétním genotypu (EMLEN 1994, 1997B).

Existence dvou diskrétních fenotypů samců je vysvětlována jako výsledek disruptivního působení disruptivního výběru favorizujícího životní strategie vyžadující buď dlouhé rohy u velkých samců, nebo velmi krátké rohy (až absenci rohů) u malých samců. Výhody plynoucí pro velké samce z vlastnictví dlouhých rohů jsou zřejmé – v souboji dvou samců přibližně stejné velikosti vítězí častěji ten s vyvinutějšími rohy (EMLEN 1997A, MOCZEK & EMLLEN 2000). Jakou výhodu však přináší potlačení tvorby rohů malým samcům? Bylo experimentálně zjištěno, že vývoj rohů prodlužuje larvální vývoj, zvyšuje riziko parazitace (zejména zemními Nematoda) a mortality larev (HUNT & SIMMONS 1997). Během ontogeneze kompetují rohy o limitované množství zdrojů s ostatními vyvíjejícími se orgány (viz. kap. 2. 3). Rohy také zhoršují manévrovací schopnosti a pohyblivost samců v podzemních tunelech, která je zvláště důležitá pro alternativní reprodukční strategii používanou právě malými samci (viz. kap. 3. 2, MOCZEK & EMLLEN 2000, MADEWELL & MOCZEK 2006). Zvětšením povrchu těla a vyzařováním nebo pohlcováním tepla jimi cirkulující hemolymfou rohy zhoršují termoregulační schopnosti svého nositele (SHEPHERD ET AL. 2007). Z výše uvedených argumentů vyplývá, že existuje silný selekční tlak na vytvoření mechanismů potlačujících tvorbu rohů u malých samců a schopných přepínat

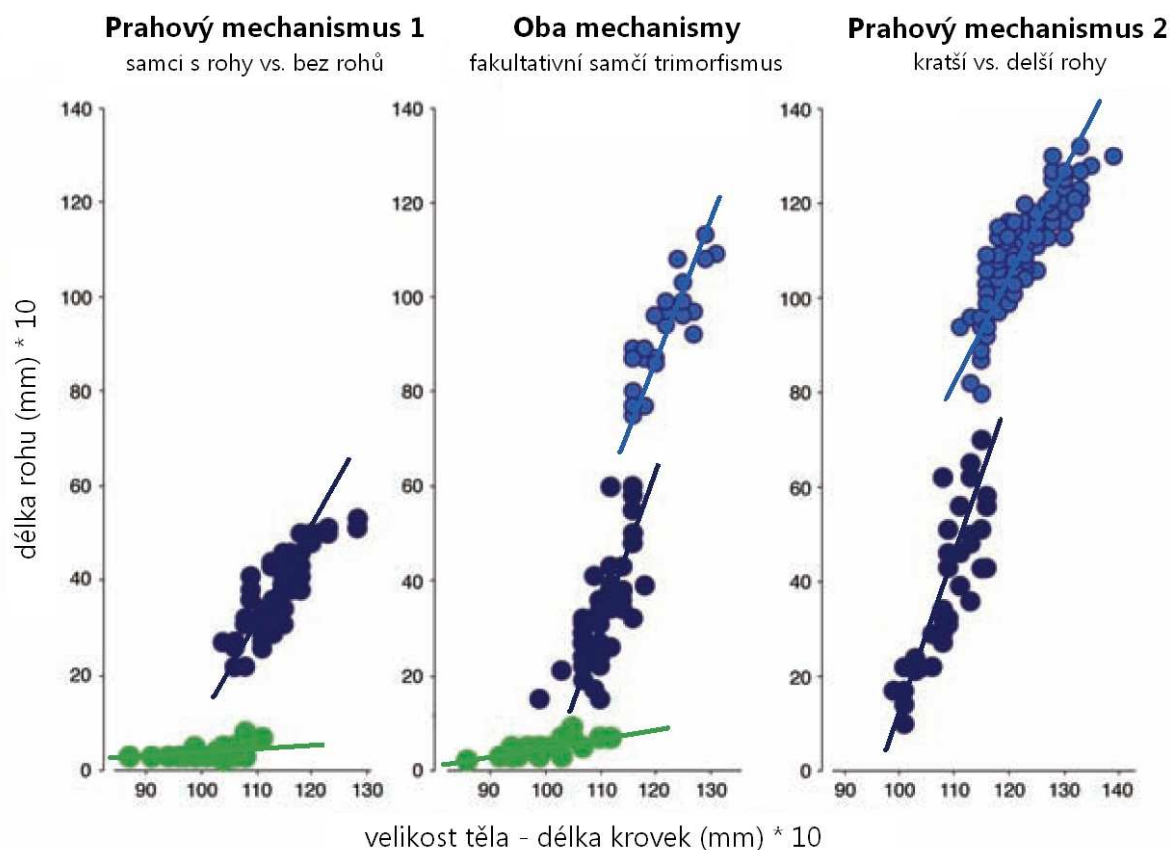
mezi alternativními samčými fenotypy podle podmínek během larválního vývoje. K přepnutí by mělo dojít přibližně při takové velikosti těla (kritické, prahové velikosti), kdy fitness plynoucí ze strategie používané samci s malými rohy právě vyváží fitness plynoucí z potencionálního vlastnictví rohů (MOCZEK 2003).



Obr. 2: Dimorfismus v morfologii rohů u *Ontophagus taurus* (Schreber, 1759). A) Typická bezrohá morfologie a morfologie s plně vyvinutými rohy u dvou alternativních samčích fenotypů. B) Statická alometrie rohů v závislosti na velikosti těla získaná z údajů od 810 samců *O. taurus*. C) Četnostní diagram znázorňující variabilitu ve velikosti těla v populaci *O. taurus*. D) Četnostní diagram ukazující bimodální distribuci délek rohů. Samci s velmi malými, rudimentárními rohy i samci s plně vyvinutými rohy tvoří dvě poměrně dobře oddělené třídy s jen vzácně se vyskytujícími přechodnými fenotypy. Podle MOCZEK & EMLEN 2000.

2. 1. 2 Trifenismus (trimorfismus)

Polymorfismus určený prostředím může být řízen dvěma odlišnými mechanismy, které určují charakter změny alometrické závislosti kolem prahové velikosti těla pro produkci rohů (odtud prahové mechanismy): (1) plným potlačením růstu rohu ve stádiu prepupy (kap. 4. 1. 2) či jeho kompletní reabsorbci u kukly (kap. 4. 2. 3) nebo (2) regulací intenzity růstu primordií (kap. 4. 1. 1) (ROWLAND & EMLÉN 2009).



Obr. 3: Prahové mechanismy a trimorfismus u brouků rodu *Phanaeus* (Scarabaeidae: Coprinae). (A) prahový mechanismus 1 spočívá v náhlé změně sklonu alometrické křivky (*P. igneus* MacLeay, 1819). (C) prahový mechanismus 2 v posunu alometrické závislosti bez změny jejího sklonu po ose y (*P. vindex* MacLeay, 1819). (B) Při společném výskytu obou mechanismů u jednoho druhu jsou výsledkem dvě kritické prahové velikosti těla, při kterých dochází ke změně alometrie rohů a fakultativnímu (exprimovaný fenotyp závisí na podmínkách prostředí) trimorfismu (*P. triangularis* Say, 1823).

Legenda:

- — **alfa samci** – nesou plně vyvinuté rohy
- — **beta samci** – jejich rohy jsou menšími verzemi rohů alfa samců
- — **gama samci** – bezrozí nebo s rudimenty rohů, morfologií připomínají samice

Podle ROWLAND & EMLÉN 2009 s orientačně proloženými přímkami alometrických vztahů pro jednotlivé morfy samců.

První prahový mechanismus (1) způsobuje změnu sklonu alometrické závislosti – malí samci všech velikostí až po kritickou prahovou velikost pro produkci rohů nenesou žádný roh nebo jen jeho rudiment, velcí samci nesou disproporcionálně větší roh, jehož délka je většinou navíc pozitivně korelována s velikostí těla (Obr. 3.a).

Druhý prahový mechanismus (2) se projevuje posunem alometrické křivky po ose y, ale bez změny ve sklonu alometrie. Rohy u obou forem samců jsou tedy korelovány stejně pozitivně s velikostí těla, ale rohy velkých samců jsou relativně větší. Rohy malých samců jsou tedy miniaturami rohů velkých samců (Obr. 3.c).

Podle ROWLANDA a EMLENA (2009) se mohou prahové mechanismy vyvíjet nezávisle na sobě a u druhů, které vykazují oba tyto mechanismy, jsou přítomny dvě kritické velikosti těla, každá odpovídající jednomu z nich. Samce potom lze podle morfologie rohů rozdělit do tříd alfa, beta a gama. Gama samci jsou bezrozí nebo jen s rudimenty rohů, beta samci exprimují rohy, které jsou zmenšeninou rohů alfa samců, ale v poměru k velikosti těla jsou relativně menší než rohy alfa samců, které jsou plně vyvinuté. Prahový mechanismus 1 odděluje bezrohé gama samce od beta samců exprimujících rohy, mechanismus 2 beta samce od alfa samců nesoucích disproporcionálně větší rohy (Obr. 3.b) Reprodukční taktiky odpovídající jednotlivým samčím fenotypům autoři označují jako „*guard*“ (alfa samci), „*sneak*“ (beta) (obě strategie viz. kap. 3. 2) a „*female-mimicry*“ tedy napodobování samice (gama). Pojmenování poslední taktiky vychází z toho, že nejmenší samci jsou často morfologicky podobní samicím (ARROW 1951, ROWLAND & EMLEN 2009).

2. 1. 3 Pohlavní dimorfismus

Již bylo zmíněno, že rohy brouků patří mezi sekundární pohlavní znaky, jsou pohlavně dimorfní (ARROW 1951, MOCZEK 2006B, SHELBY ET AL. 2007). Nejčastěji jsou rohy vybaveni pouze samci, samice většinou nemají rohy vůbec žádné a na jejich místě jsou pouze příčné lišty a hrbolky nebo nesou jen rudimentární rohy (ARROW 1951, MIZUNUMA 1999, KAWAI ET AL. 2005, SAKAI & NAGAI 1998, MOCZEK 2006B). Rozdíly v expresi rohů mezi pohlavími jsou určeny převážně genetickými odlišnostmi mezi nimi (MOCZEK 2006B). Následné mechanismy, které u samic brání vývoji rohů mohou být totožné nebo podobné těm, které zajišťují vznik bezrohé morfologie u malých samců, kde je bifenismus determinován nutričními podmínkami vývoje (EMLEN & NIJHOUT 1999). Je-li tomu skutečně tak, měly by se evoluční změny v expresi rohů u samic stejným způsobem promítnout i do exprese rohů

u malých samců a naopak. Ve fylogenezi opravdu můžeme vyzorovat shodné trendy v evoluci rohů samic i malých samců (EMLEN ET AL. 2005A).

Vzácně se vyskytují případy druhů s obráceným pohlavním dimorfismem, u nichž samice disponují lépe vyvinutými rohy, které navíc mohou být jiného charakteru, než u samců. Tak je tomu např. u *Ontophagus sagittarius* (Fabricius, 1781), jehož samice nesou roh na pronotu a mediální roh na hlavě, zatímco samci mají malé růžky po stranách hlavy (SHELBY ET AL. 2007, WATSON & SIMMONS 2010). Ještě zajímavější je situace u hlavových rohů *Ontophagus sloanei* Blackburn, 1903 – všechny samice nesou rohy prodlužující se s rostoucí velikostí těla. Rohy malých samců sledují stejnou alometrickou závislost jako rohy samic, velcí samci jsou však od určité prahové velikosti těla bezrozí. Kromě obráceného pohlavního dimorfismu je zde tedy přítomen i převrácený dimorfismus mezi samci (EMLEN ET AL. 2005A). U jiných druhů, jako např. *Coprophanaeus ensifer* Germar, 1821 (ARROW 1951, OTRONEN 1988), *C. lancifer* Linnaeus, 1767 (DARWIN 1871) a dalších, jsou obě pohlaví vybavena velmi dobře vyvinutými rohy, které se jen nepatrně liší svými alometrickými závislostmi (EMLEN ET AL. 2005A).

2. 2 Evoluce a plasticita alometrických závislostí

Modifikace každého z regulačních mechanismů vývoje rohů může způsobit změny v charakteristikách alometrické křivky. Děje se tak prostřednictvím změn intenzity proliferace imaginálních buněk (tj. buněk, které dají vznik strukturám dospělého) nebo délky časové periody, po kterou proliferace probíhá (EMLEN & ALLEN 2004). V evoluci se mění strmota alometrické křivky (tj. pozitivita alometrie), může docházet ke změnám v relativní velikosti rohů příslušející určité velikosti těla (posunu alometrické křivky podél osy y) nebo ke změnám v kritické velikosti těla (posunu zalomení v sigmoidní alometrické křivce po ose x) (EMLEN & ALLEN 2004, EMLLEN ET AL. 2005A).

Vývojová plasticita rovněž rovněž zaručuje, že alometrická závislost je schopna se v určitých mezích měnit v odpovědi na sezónní kolísání podmínek prostředí (EMLEN 1997B). Velikostní hranice oddělující samce s rohy a bez rohů se posouvá tak, aby co nejlépe odpovídala velikostní hranici oddělující dominantní samce od samců, pro něž je výhodnější používat alternativní reprodukční strategii (viz. kap. 3. 2), Výsledná morfologie tak odpovídá používané reprodukční taktice. V příznivých podmínkách, kde brouci dorůstají větších velikostí, proto začínají samci produkovat rohy až při větší velikosti těla než samci v chudších

podmínkách, kde dorůstají menších velikostí a *vice versa*. Vývojová plasticita zajistí, že v konkrétních podmínkách má plně vyvinuté rohy vždy určitá frakce v rámci populace největších samců, kterým se vyplatí taktika střežení samice (EMLEN 1997B). Vývoj rohů reaguje plasticky na kvalitu potravy, která poskytuje nejlepší odhad velikosti ostatních samců v populaci – množství potravy, které mají k dispozici jednotlivé larvy, je variabilní, její kvalita bývá méně proměnlivá a tedy pro všechny larvy přibližně stejná (EMLEN 1997B).

2. 3 Kompetice mezi excesivními strukturami a ostatními částmi těla (kompenzační růst)

Růst okrsků imaginálních buněk holometabolního hmyzu je omezen do krátkého období explozivní proliferace ve stádiu prepupy předcházejícím samotné kuklení. V této době již larva nepřijímá potravu a z hlediska zdrojů pro vyvíjející se tkáň tak představuje uzavřený systém (NIJHOUT & EMLEN 1998). Rostoucí orgány čerpají ze společných zásob zdrojů vytvořených larvou v období, kdy ještě přijímala potravu. Imaginální buňky přirozeně kompetují o tyto zdroje – zdroj spotřebovaný jednou rostoucí strukturou nemůže být využit strukturou jinou. Intenzivní růst jedné struktury tak omezuje růst struktury jiné, která s ní sdílí nějaký limitující zdroj (NIJHOUT & EMLEN 1998). Limitujícím zdrojem mohou být živiny, hormony, růstové faktory nebo jiné mezibuněčné signály (EMLEN 2001, MOCZEK & NIJHOUT 2004). Nejčastěji se taková závislost dá očekávat u struktur navzájem topologicky blízkých (NIJHOUT & EMLEN 1998). Struktury kompetující o stejný limitující zdroj jeho prostřednictvím vzájemně omezují svůj růst, takže zdroj slouží jako signální mechanismus kontrolující relativní růst těchto částí těla (NIJHOUT & EMLEN 1998). Tzv. trade-off v alokaci zdrojů alokaci do růstu jednotlivých orgánů vede ke kompenzačnímu růstu – zvětšení jednoho orgánu je kompenzováno zmenšením jiného, kterému se již nedostává limitujícího zdroje. Např. samci druhu *Ontophagus acuminatus* Harold, 1880 s relativně delšími rohy mají zároveň relativní menší plochu očí a naopak (NIJHOUT & EMLEN 1998). Analogická je situace u hrudních rohů brouků. Zde jsou topologicky blízkou strukturou, která vykazuje negativní korelaci s velikostí rohů, blanitá křídla (KAWANO 1995).

Alokační trade-off představuje vývojové a evoluční omezení (constraint), neboť vzniká omezené množství kombinací jednotlivých stavů znaků a tím se snižuje variabilita, s níž může pracovat selekce (NIJHOUT & EMLEN 1998).

Je-li růst určitého okrsku imaginálních buněk omezen, takže se odpovídající struktura nebo orgán vůbec nevyvinou nebo je jejich velikost redukována, je uvolněné množství limitujícího zdroje k dispozici ostatním částem těla. Přesto pouze některé reagují zvýšeným růstem. NIJHOUT a EMLEN 1998 nabízejí tři možná vysvětlení: uvolněný zdroj je spotřebován (1) nejbližší nebo (2) nejdříve rostoucí strukturou, která jej zcela spotřebuje. Je také možné, že (3) pouze rychle rostoucí tkáně jsou limitovány zdroji a reagují na jeho měnící se množství.

Kompetují-li o zdroje především struktury, které se během vývoje nachází ve fyzické blízkosti (EMLEN 2001), potom je zřejmé, že rohy s rozdílnou lokalizací budou představovat vývojové omezení pro odlišné struktury. Rohy v přední části a středu hlavy jsou produkovány na úkor tykadel (EMLEN 2001), rohy čnicí z báze hlavy na úkor očí (NIJHOUT & EMLEN 1998, EMLEN 2001) a rohy na pronotu na účet křídel (KAWANO 1995, EMLEN 2001). Podle relativní důležitosti zraku, čichu nebo dobrého letu, která vyplývá z ekologie daného druhu, lze očekávat, že některé rohy budou produkovány méně často. Např. mezi nočními druhy rodu *Ontophagus* (pro něž jsou obzvláště důležité oči) nalezneme rohy vyrůstající z báze hlavy méně často než u denních druhů. Mechanismus trade-off tak nabízí jedno z vysvětlení lokalizace rohů na těle brouka (EMLEN 2001). Ta sama o sobě nemůže být výsledkem větší výhody té které morfologie v pohlavním výběru, neboť rohy s jakoukoliv lokalizací slouží ke stejnému účelu (EMLEN 1997A).

2. 3. 1 Trade-off mezi alokací zdrojů do tvorby excesivních struktur a investicí do pohlavních orgánů

Kompeticí o hormony, které v hemolymfě cirkulují celým tělem hmyzu, se mohou vzájemně ovlivňovat i topologicky vzdálené struktury, bylo např. zjištěno alokační trade-off mezi rohy a pohlavními orgány (MOCZEK & NIJHOUT 2004, SIMMONS & EMLEN 2006). Malí samci nemusí investovat zdroje do růstu rohů a mohou je namísto toho vložit do vývoje větších pohlavních orgánů (kap. 3. 4). Experimentální odstranění základu budoucího rohu vede ke vzniku jedinců s větší relativní hmotností testes (SIMMONS & EMLEN 2006). Uvolnění limitujícího zdroje ablací genitálních disků u *O. taurus* způsobilo [podobně jako zvýšená hladina juvenilního hormonu (JH) během pozdní sensitivní periody (kap. 4. 1. 1. 1.a)] posun kritické velikosti těla pro produkci rohů k menším velikostem (MOCZEK & NIJHOUT 2004). Proto představuje JH vhodného kandidáta na limitující zdroj zprostředkující kompetici mezi rohy a pohlavními orgány.

3. Životní strategie vrubounů rodu *Ontophagus Latreille, 1802 (Scarabaeinae: Ontophagini)**

3.1 Životní cyklus

Samice druhů rodu *Ontophagus* pod čerstvým trusem hloubí systém podzemních tunelů. Do něj zatahují části trusu, který v postranních chodbách upěchují do tzv. potravních koulí (ARROW 1951, EMLEN 1994). Do každé z oválných komůrek s trusem naklade samice jedno vajíčko (EMLEN 1994, EMLEN&NIJHOUT 1999, 2001), z něž se líhne larva prvního instaru. Materiál potravní koule představuje veškeré a tedy pevně dané množství potravy, které má larva k dispozici pro vývoj a určuje velikost budoucích imag (EMLEN 1994, 1997B, HUNT & SIMMONS 1997). Po jejím spotřebování (SHAFIEI ET AL. 2001) larva posledního, 3. instaru vytvoří z trusu a vlastního análního exudátu kukelní komůrku, v níž se zakuklí (EMLEN & NIJHOUT 1999).

3.2 Alternativní reprodukční strategie samců

Samci listorohých brouků svádějí souboje o samice. V nich je určujícím faktorem velikost těla (RASMUSSEN 1994, EMLEN 1997B, MOCZEK & EMLEN 2000). Teprve když je velikost obou soupeřů srovnatelná, rozhoduje o výsledku souboje velikost rohů nebo jiných excesivních struktur (EMLEN 1997B, MOCZEK & EMLEN 2000). Velikost imag je variabilní a malí samci nemají šanci vyhrát dostatek soubojů, aby si tímto způsobem zajistili možnost reprodukce. Jsou proto nuceni uchýlit se k alternativní taktice získání přístupu k samicím.

U brouků rodu *Ontophagus* velcí samci s rohy hlídají vchod do podzemních tunelů (angl. „*guarding*“), které vyhloubily samice a v nichž tvoří postranní chodby, potravní koule, kladou vajíčka a v nichž převážně dochází i ke kopulaci se samci. Neomezený přístup do tunelu se samicí tedy znamená jistotu kopulace. Odehrávají se tu také prakticky všechny souboje samců (EMLEN 1997A, MOCZEK & EMLEN 2000). Malí samci bez šance na vybojování a udržení si vlastního tunelu používají pro přístup k samicím jinou taktiku – proklouznutí kolem hlídajícího samce („*sneaking*“). Mohou toho dosáhnout několika způsoby: (1) Nepozorovaně proniknou tunelem pod hlídajícího samce, zatímco ten je

* česky lejnožrout

zaneprázdněn soubojem s jiným samcem (EMLEN 1997A), (2) vniknou do tunelu v době, kdy jej hlídající samec na chvíli opustí, aby se obrátil a mohl provést další kontrolní cestu tunelem, či aby pomohl samici s dopravou trusu do tunelu (MOCZEK & EMLLEN 2000) nebo (3) hloubí postranní tunely, které protínají hlavní tunel (často i několik) se samicemi pod úrovní hlídajícího samce (EMLEN 1997A)

I malí bezrozí samci, pokud naleznou nehlídaný tunel se samicí, střeží jeho vchod a bojují s ostatními samci. Jsou-li poraženi, zůstávají v blízkosti tunelu a za použití neagresivní taktiky se jedním z výše popsaných způsobů opakovaně pokouší proniknout kolem hlídajícího samce. Naopak poražení velcí samci bojiště opouští (EMLEN 1997A, MOCZEK & EMLLEN 2000). Pokud je malý samec po úspěšném proklouznutí a kopulaci se samicí přistižen hlídajícím samcem, jak opouští tunel, páří se velký samec po krátkém souboji okamžitě se samicí (MOCZEK & EMLLEN 2000).

3. 3 Diskriminace samic mezi morfami samců

Velcí, ale nikoliv malí, bezrozí samci *O. binodis* Thunberg, 1818 (COOK 1990), *O. taurus* (HUNT & SIMMONS 1998) a *O. sagittarius* (WATSON & SIMMONS 2010) pomáhají samici se shromažďováním potravy pro potomstvo, u *Phanaeus difformis* LeConte, 1847 se na zaopatření potomstva podílejí samci obou morfologií (RASMUSSEN 1994). Alespoň u některých druhů je tak teoreticky přítomen selekční tlak na to, aby si samice vybíraly samce s delšími rohy a tím zvýšily svou fitness (COOK 1990, HUNT & SIMMONS 1998) a rohy by potom mohly vzniknout jako ornamenty preferencí samců s delšími rohy samicemi. Takové preference byly pozorovány u druhu *O. sagittarius*, kde si však samice vybíraly samce podle velikosti těla a preference podle morfologie rohů (u tohoto druhu u všech samců nevýrazných) nebyla zjišťována (WATSON & SIMMONS 2010). U jiných druhů samice kopulují se všemi samci bez rozdílu morfologie rohů (EMLEN 1997A).

3. 4 Kompetice spermií

Pokud samice kopuluje s více samci, pokračuje soutěž mezi nimi ve formě kompetice spermií o oplození vajíčka. Kvůli jejich reprodukční taktice musí spermie malých samců vždy podstupovat kompetici se spermii většími samci. Tento selekční tlak vedl k tomu, že malí samci mají větší testes, delší spermie a větší objemy ejakulátu než velcí samci s plně

vyvinutými rohy (SIMMONS ET AL. 1999, 2007). Pravděpodobnost, že kompetici spermií budou vystaveni i velcí dominantní samci hlídající samice, závisí na frekvenci bezrohých samců v populaci. Čím je vyšší, tím více musí velcí samci investovat do produkce spermií a rozdíly mezi nimi a malými samci ve velikosti testes se stírají (SIMMONS ET AL. 1999, SIMMONS ET AL. 2007). Druhy nebo populace jediného druhu s vysokou frekvencí samců používajících alternativní reprodukční taktiku („*sneaking*“) jsou vystaveny intenzivnější kompetici spermií a v důsledku toho mají větší testes (SIMMONS ET AL. 2007).

4. Regulace exprese rohů

4.1 Mechanismy závislé na podmínkách vývoje larvy

Aby bylo možné regulovat růst struktur (včetně rohů) s ohledem na vnější podmínky, které u koprofágních brouků určují dosaženou velikost těla (EMLEN 1994, HUNT & SIMMONS 1997, MOCZEK 1998), je nutné, aby byla informace o vnějších podmínkách nějak přeložena do signálů ve vnitřním prostředí těla. Tuto roli (nejen) u hmyzu zastávají hormony, které jsou syntetizovány nebo odbourávány v závislosti na nutričních podmínkách nebo stádiu vývoje a regulují podle nich intenzitu, resp. dobu trvání buněčné proliferace vyvíjejících se struktur (EMLEN & ALLEN 2004).

Prostředí a nutriční podmínky vývoje ovlivňují expresi rohů dvěma způsoby:

- 1) určují velikost těla a tím odpovídající velikost rohu (EMLEN 1994, MOCZEK 1998). Mechanismům, které zprostředkují expresi rohů odpovídající dosažené velikosti těla, se věnují následující kapitoly.
- 2) způsobují posun alometrické závislosti - na jejich základě se mění kritická prahová velikost pro produkci rohů tak, aby se lépe překrývala s velikostí těla, při které se v dané populaci vyrovnávají zisky z obou strategií pro přístup k samicím („*guarding*“ a „*sneaking*“) – viz. kap. 2.2.

4. 1. 1 Ekdyson a juvenilní hormon (JH) – role v ontogenezi a metamorfóze

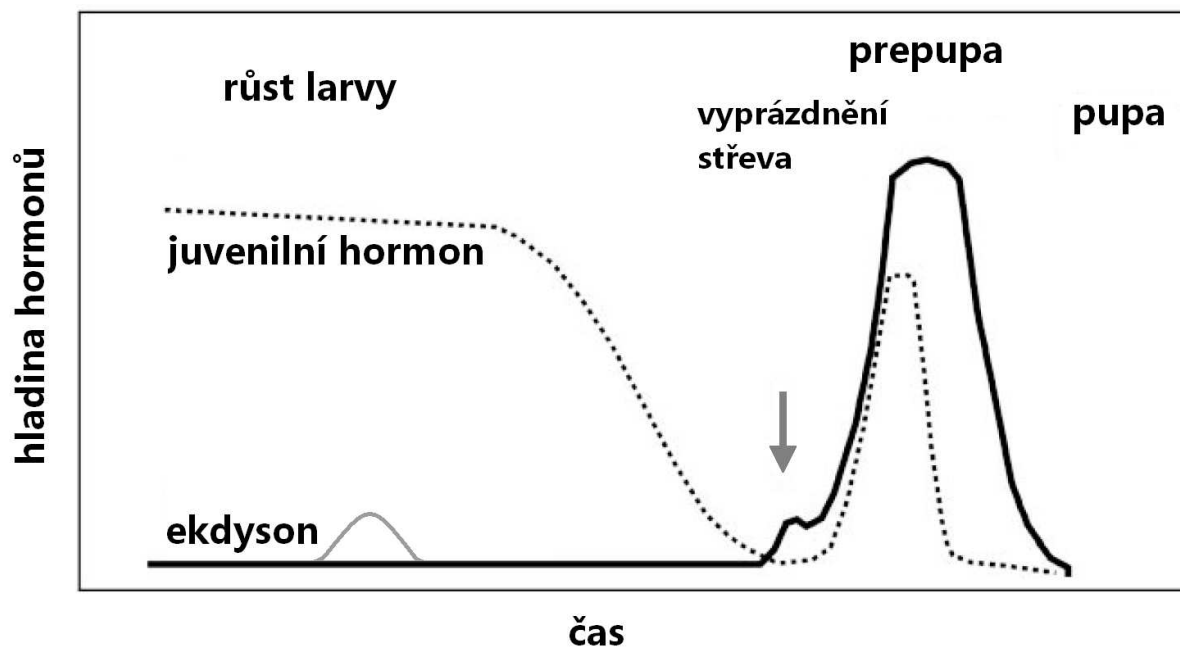
Důležitými hmyzími hormony regulujícími proliferaci buněk imaginálních disků (a tedy vhodnými kandidáty na stejnou funkci u primordií rohů) jsou juvenilní hormon (JH) a ekdyson, které mimo jiné řídí rovněž svlékání mezi larválními instary a metamorfózu. Během období, kdy larva přijímá potravu, je v jejím těle udržována vysoká hladina JH a nízká hladina ekdysonu. JH v nepřítomnosti ekdysonu inhibuje proliferaci imaginálních buněk (EMLEN & ALLEN 2004).

Ekdyson je steroidní hormon, který působí prostřednictvím aktivace transkripce specifické cílové skupiny genů. Rozdílné tkáně se mohou lišit množstvím a typem exprimovaných receptorů pro ekdyson a tím reagovat různě na jeho hladinu cirkulující v hemolymfě (EMLEN & ALLEN 2004). Puls zvýšené koncentrace ekdysonu je mimo jiné signálem zahajujícím svlékání mezi jednotlivými instary vývoje hmyzu (EMLEN & ALLEN 2004).

Juvenilní hormon je po chemické stránce seskviterpen odvozený od farnesylové kyseliny a sekretovaný párovými tělísky corpora allata. Hladina juvenilního hormonu cirkulující v dané chvíli v hemolymfě ovlivňuje výběr konkrétní sady genů aktivované ekdysonem, např. larvální, pupální, apod. a určuje tak identitu následujícího instaru. Množství uvolňovaného JH je určeno m.j. množstvím a kvalitou přijímané potravy. JH hormon tak slouží jako prostředník pro adekvátní regulaci růstu, diferenciaci a fyziologických pochodů v odpovědi na podmínky vnějšího prostředí (EMLEN & ALLEN 2004).

Po celou dobu růstu larvy je udržována vysoká hladina juvenilního hormonu a nízká hladina ekdysonu (Obr. 4, EMLEN & ALLEN 2004). Na konci každého larválního instaru se objeví náhlý puls vysoké koncentrace ekdysonu, který indukuje tvorbu nové kutikuly a svlékání. V přítomnosti velkého množství juvenilního hormonu (přesahujícího prahovou koncentraci) je následujícím stádiem opět larva. Na konci třetího (posledního) larválního instaru, bezprostředně před tím, než larva začne vyprazdňovat své střevo, nastane prudký pokles hladiny JH pod kritickou hodnotu. Puls vysoké koncentrace ekdysonu v nepřítomnosti nadprahové koncentrace JH má za následek změnu identity následujícího stádia z larvy na kuklu, dochází k přerušení příjmu potravy larvou, vyprázdnění jejího střeva a metamorfickému svlékání. Nadprahová hladina JH inhibuje sekreci ekdysteroidů a kuklení

se zpožďuje. Jakmile však jednou produkce ekdysteroidů započne, nemá již případné zvýšení množství přítomného JH tento efekt a metamorfóza je ireversibilní (EMLEN & ALLEN 2004). Toto období se časově shoduje s prudkým nárůstem titru ekdysonu v hemolymfě larev (Obr. 4).



Obr. 4: Kolísání hladin juvenilního hormonu (JH) a ekdysonu v hemolymfě během vývoje 3. larválního instaru. Šipka označuje malý puls ekdysteroidu, který zahajuje proces metamorfózy, vlevo dole je znázorněn puls ekdysteroidu typický pro bezrohou morfologii (tj. malé samce a samice, viz. kap. 4. 1. 1. 2). Ostatní vysvětlivky v textu. Upraveno podle EMLEN & ALLEN 2004.

4. 1. 1. 1 Dvě periody sensitivity rohů k juvenilnímu hormonu

EMLEN & NIJHOUT (1999, 2001) odhalili dvě období v larválním vývoji, během nichž experimentální zvýšení hladiny JH v hemolymfě larev mění výslednou morfologii rohů dospělců. Nejprve byla objevena pozdní a následně časná sensitivní perioda. V obou obdobích má aplikace methoprenu (analogu JH) na morfologii rohů opačný efekt.

Pro potřeby experimentů zjišťujících roli JH a ekdysonu v ontogenezi rohů EMLEN a NIJHOUT (1999) na základě morfologických a behaviorálních charakteristik identifikovali pět stádií, na něž lze rozčlenit třetí (poslední) larvální instar. Během prvních tří stádií larva přijímá potravu a roste. Ve čtvrtém stádiu se larva začíná připravovat na kuklení a vyprazdňuje své střevo. Posledním stádiem je období prepupy. V raném V. stádiu stahuje larva často abdomen, v pozdním stádiu prepupy je larva již téměř nepohyblivá. Časná perioda

sensitivita k JH probíhá ve II. a III. stádiu, tj. u rodu *Ontophagus* od 10 do 6 dnů před kuklením. Je oddělena čtyřmi dny od začátku druhého sensitivního období, tj. okamžiku, kdy larva začne vyprazdňovat své střevo. Obě sensitivní periody jsou navzájem odděleny zahájením metamorfózy: (EMLEN & NIJHOUT 2001).

4. 1. 1. 1. a Juvenilní hormon – pozdní sensitivní perioda

Experimentálně bylo zjištěno, že aplikace analogu JH během první poloviny IV. stádia larvy 3. instaru (tj. v období, kdy již byla nevratně započata kaskáda dějů vedoucí k metamorfóze a larva vyprazdňuje své střevo) u *Ontophagus taurus* způsobí, že larvy, které by se za normálních okolností vyvinuly v malé bezrohé samce, dají vznik samcům s normálně vyvinutými rohy (EMLEN & NIJHOUT 1999).

EMLEN a NIJHOUT (1999) nabídli dvě interpretace vysvětlující pozorovaný účinek methoprenu v pozdní sensitivní periodě:

- a. Velcí a malí samci se liší v hladině JH v hemolymfě. Koncentrace JH slouží jako proměnná závislá na velikosti larvy a tím na nutričních podmínkách jejího vývoje a odpovídající budoucí velikosti těla (SHELBY ET AL. 2007). Pouze u velkých samců je koncentrace JH dostatečná k překročení prahové hodnoty potřebné k expresi rohů.
- b. Larvy samců všech velikostí vykazují podobné hladiny JH, ale liší se v prahové hladině JH, jejíž překročení je nutné pro zahájení morfogeneze rohů. Prahová hodnota je u malých samců vyšší než přítomná hladina JH, takže nedojde k jejímu překročení a expresi rohů. U velkých samců je prahová hodnota nižší a stejná koncentrace JH v hemolymfě je dostatečná k jejímu překročení.

4. 1. 1. 1. b Juvenilní hormon – časná sensitivní perioda

Aplikace methoprenu (analogu JH) ve stádiích II a III způsobuje posun prahové velikosti pro produkci rohů k vyšším hodnotám. Výsledkem je, že plně vyvinuté rohy jsou přítomny až u samců větších velikostí. Zároveň samci ze středu velikostního spektra nesou relativně menší rohy než kontrolní jedinci, pouze extrémy zůstávají neovlivněny (EMLEN & NIJHOUT 2001).

Vedlejším efektem aplikace methoprenu v tomto larválním stádiu, který značně ztěžuje interpretaci pozorovaných změn v expresi rohů, je 30% zpoždění v kuklení larev. Methopren může navíc v hemolymfě přetrvávat delší dobu a pozorovaný vliv na expresi rohů by tak mohl být výsledkem jediné sensitivní periody později v ontogenezi (EMLEN & NIJHOUT 2001). Povaha účinku na expresi rohů je však při aplikaci methoprenu v obou sensitivních obdobích opačná, v prvním (časném) sensitivním období tlumí expresi rohů, zatímco při aplikaci v druhém (pozdním) sensitivním období má za následek expresi rohů i u samců, kteří by za normálních okolností nenesli žádné nebo jen rudimentární rohy. Navíc před iniciací metamorfózy a následném vyprázdněním střeva musí být JH odstraněn z hemolymfy (viz. Obr. 4).

4. 1. 1. 2 Role ekdysonu v regulaci exprese rohů

Ze srovnání titrů ekdysonu různých stádií 3. larválního instaru jedinců druhu *Ontophagus taurus* (EMLEN & NIJHOUT 1999) vyplývá, že u samic i malých samců s bezrohým fenotypem je během II. stádia posledního larválního instaru (tzn. ještě v době, kdy larva přijímá potravu) přítomen malý puls zvýšené koncentrace ekdysonu. Časově se shoduje s časnou sensitivní periodou k JH (EMLEN & NIJHOUT 2001). Tento puls ekdysteroidů je tedy specifický pro bezrohou morfologii a není přítomen u larev, které později dají vznik velkým samcům s plně vyvinutými rohy. Objevuje se v období, kdy začínají být patrné rozdíly mezi růstovými křivkami (závislost hmotnosti larvy na jejím fyziologickém věku) budoucích bezrohých samců a samců s plně vyvinutými rohy (EMLEN & NIJHOUT 1999).

4. 1. 1. 3 Model regulace exprese rohů pomocí juvenilního hormonu a ekdysonu

Podle modelu, který ve své práci prezentovali EMLLEN a NIJHOUT (2001) je v prvním (časném) sensitivním období určena jedna ze dvou trajektorií, po níž se bude ubírat další vývoj, tj. „s rohy“ a „bez rohů“. Autoři se zaměřili na tři parametry růstových křivek, strmost exponenciální fáze růstové křivky, absolutní maximální dosažená hmotnost a maximální hmotnost udržená larvou v posledních čtyřech dnech období, kdy přijímá potravu (tj. hmotnost, pod níž hmotnost larvy v tomto období neklesla), která se ukázala jako nejlépe

vysvětlující variabilitu v expresi rohů. Aby došlo k produkci rohů, nesmí v tomto období hmotnost larvy klesnout pod určitou kritickou hodnotu, tzv. prahovou velikost těla. U larev, které během tohoto prvního sensitivního období neudrží velikost těla nad kritickou hranicí dojde k pulsu zvýšené koncentrace ekdysonu, který přeprogramuje vývoj tak, že zvýší prahovou hodnotu JH potřebnou k produkci rohů (EMLEN & NIJHOUT 2001).

Ve druhém (pozdním) sensitivním období je potom podle hladiny JH doladěna celková intenzita růstu rohu tak, aby jeho velikost odpovídala velikosti těla. Výsledkem je velikost rohu korespondující s velikostí těla podle jedné z alometrických závislostí (alternativních morfologií) stanovené v časně sensitivní periodě (EMLEN & NIJHOUT 2001).

Tento model však není schopen vysvětlit účinek methoprenu v časně sensitivní periodě. Slouží-li JH jako prostředník informující larvu o velikosti jejího vlastního těla a je-li jeho koncentrace pozitivně úměrná velikosti těla (EMLEN & NIJHOUT 1999, 2001), mělo by experimentální zvýšení jeho hladiny cirkulující v hemolymfě imitovat větší velikost těla než je velikost skutečná. Očekávali bychom proto, že i menší samci budou schopni produkovat rohy, tedy že kritická velikost těla pro produkci rohů se posune k nižším hodnotám, podobně jako je tomu u pozdní sensitivní periody. Pozorovaný účinek aplikace methoprenu je však přesně opačný.

MOCZEK (2006A) se domnívá, že výsledek působení methoprenu v časně sensitivní periodě je zapříčiněn spíše prodloužením vývoje než jeho reprogramováním. Neovlivní tedy přímo expresi rohů, ale prodlouží období růstu poté, co je o morfologii rohů již rozhodnuto. Samci se sníženou sensitivitou k JH v pozdní periodě (nacházející se na vývojové trajektorii k bezrohé morfologii) tak mohou dorůstat větší velikosti, produkují však v poměru k velikosti těla menší rohy než stejně velcí samci vyvíjející se normálně. Vývojová omezení pro minimální i maximální velikost těla i rohů způsobí, že se extrémní obou kategorií (normální populace i populace ošetřené methoprenem v časně sensitivní periodě) překrývají.

Přítomnost malého impulsu zvýšené koncentrace ekdysonu u larev samic a bezrohých samců, ale nikoliv u larev velkých samců, naznačuje, že bezrohého fenotypu malých samců i samic by mohlo být dosaženo za pomoci stejných regulačních mechanismů (EMLEN & NIJHOUT 1999).

Proti této hypotéze však hovoří výsledky pozdější studie (SHELBY ET AL. 2007) zaměřené na vliv JH na expresi rohů u samic. Přestože se o samicích zpravidla hovoří jako o bezrohých, nesou (podobně jako „bezrohá“ forma samčího pohlaví) často rudimenty rohů nebo různé příčné lišty v místech, kde se u plně vyvinutých samců nachází roh. Vzácně se vyskytují druhy, pro něž je typický obrácený sexuální dimorfismus nebo jsou obě pohlaví

vybavena podobně vyvinutými rohy (kap. 2. 1. 3). Ukázalo se, že zatímco u samic druhů *O. nigriventris* a *O. binodis* má aplikace methoprenu během pozdní sensitive periody na expresi pronotálních rohů spíše feminizující efekt (rudimenty rohů nebo příčné lišty jsou ještě méně výrazné než u kontrolních jedinců), u samic *O. sagittarius* nemá hladina JH na expresi pronotálního rohu vliv, způsobuje však výraznější expresi mediálního hlavového rohu. U *O. binodis* se k feminizujícímu efektu přidružuje maskulinizující efekt na tvar pronotálního rohu – u rohu samic se objevuje zářez, který je za normálních okolností přítomen pouze u samců (SHELBY ET AL. 2007).

Hladina JH přítomná v různých fázích vývoje larvy tedy ovlivňuje jak velikost, tak i tvar budoucích rohů, a to v závislosti na druhu, pohlaví i diskretním morfologickém typu (morfě) a regulace exprese rohů pomocí JH se liší i mezi fylogeneticky nepříliš vzdálenými druhy (SHELBY ET AL. 2007).

4. 1. 2 Ovlivnění exprese rohů nutričními podmínkami prostřednictvím dráhy insulinového receptoru

JH a ecdyson reprogramují vývoj rohů podle environmentálních (dimorfismus samců) nebo genetických (pohlavní dimorfismus) faktorů, nepůsobí však na růst rohu přímo, ale prostřednictvím dalších regulačních drah. Jednou z nich je dráha insulinového receptoru (InR, Obr. 5). Specializované buňky v mozku sekretují insulinu podobné peptidy a tuková tělíska, do nichž hmyz ukládá energetické přebytky z potravy, produkují další růstové faktory. Všechny tyto látky se váží na insulinové receptory, a proto je v dalším textu budeme shrnovat pod název insulin (In). Kvalita a množství potravy pozitivně reguluje absolutní i relativní velikost a množství tukových tělísek, které předávají informaci o nutričním stavu jedince dalším orgánům, včetně mozkových buněk produkujících In. Výsledkem je, že větší jedinci s přístupem k většímu množství kvalitní potravy vykazují vyšší hladinu cirkulujícího In než malí jedinci vyvíjející se za méně příznivých nutričních podmínek (EMLEN ET AL. 2007).

Vazba ligandů na insulinový receptor (InR) sensitive buněk (např. buněk imaginálních disků nebo okrsku epidermálních buněk, které později dají vznik rohu) spouští signální kaskádu, jejímž výsledkem je zvýšená hladina proteosyntézy nutná pro buněčnou proliferaci a růst struktury. Sensitive buňky a struktury reagují na stejnou hladinu In kolujícího v hemolymfě rychlejším a intenzivnějším růstem. Dráha In receptoru tak představuje nejvhodnější kandidáta na mechanismus vzniku alometrických závislostí

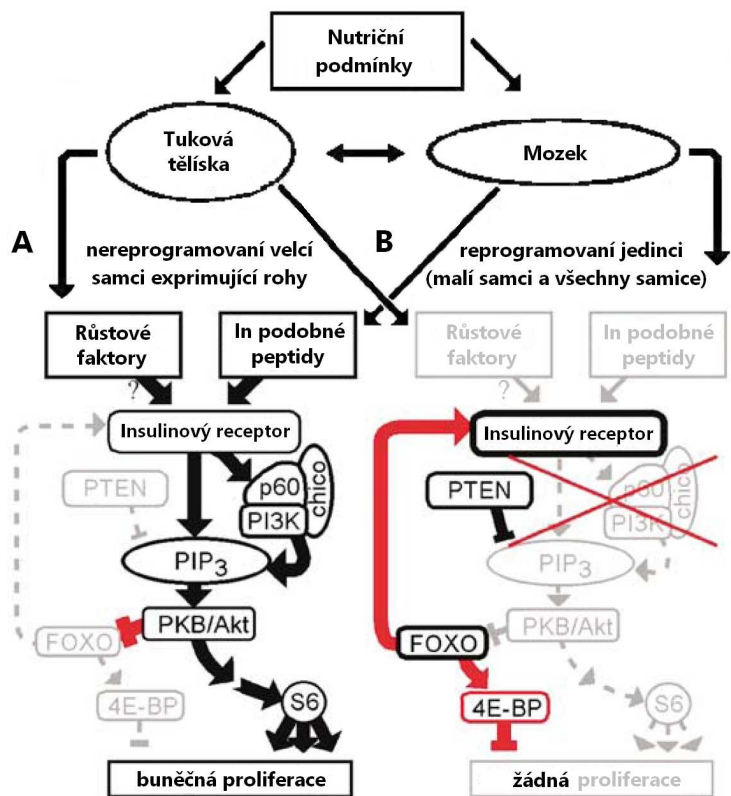
(kap. 3). Míra citlivosti k insulinu může být dána množstvím exprimovaného InR nebo naopak aktivitou následující signální kaskády. Ta negativní zpětnou vazbou reguluje množství InR vystaveného na povrchu buněk, takže sensitivnější buňky nesou méně InR (Obr. 5, EMLEN ET AL. 2006).

Jelikož vzájemné odlišnosti v citlivosti k In jsou zodpovědné za rozdíly v rychlostech růstu jednotlivých struktur a orgánů těla, představuje dráha InR mechanismus zajišťující alometrický růst a její modifikace mohou stát v pozadí evolučních změn alometrických závislostí (EMLEN ET AL. 2006). K hladině In nesensitivní orgány (např. pohlavní orgány) nevykazují závislost na velikosti těla a mají plochou alometrickou křivku. Kanalizace vývoje prostřednictvím insensitivity k In může hrát roli v ochraně primárních pohlavních orgánů (testes) před alokačním trade-off u druhů, kde je nejsilnější selekční tlak ze strany pohlavního výběru na velkou alokaci zdrojů do rohů. Např. druhy rodu *Ontophagus* s plastičtějším vývojem rohů (strmější alometrickou křivkou) mají více kanalizovaný vývoj testes (plošší alometrickou křivku) a naopak. (SIMMONS & EMLEN 2006). Rohy, křídla i končetiny vykazují pozitivní alometrickou závislost, což značí, že jsou citlivé na množství potravy a cirkulující hladinu insulinu (EMLEN ET AL. 2007).

Obr. 5: Dráha insulinového receptoru (InR) a její regulační vliv na expresi rohů.

A) Dráha je aktivní a stimuluje proteosyntézu u jedinců, u nichž nedochází k reprogramování pulsem ekdysteroidů v časně sensitivní periodě (budoucích velkých samců s plně vyvinutými rohy); PKB/Akt inhibuje aktivitu transkripčního faktoru FOXO, takže buňky nesou méně InR. **B)** Dráha InR je v primordiích rohů reprogramovaných jedinců přerušena, takže neaktivuje proteosyntézu, buněčnou proliferaci a růst struktury. TF FOXO je uvolněn z inhibice PKB/Akt, výsledkem čehož je zvýšené množství InR na povrchu buněk. Ostatních buněk jedince (mimo primordia rohů) se reprogramování netýká a odpovídají na In normálně.

Zkratky: PTEN, protein tyrosinfosfatáza; PI3K, fosfatidylinositol-3-OH-kináza; PIP₃, fosfatidylinositol-(3,4,5)-trifosfát; PKB (=Akt), protein kináza B; FOXO, transkripční faktor příbuzný proteinu forkhead; 4E-BP, 4E vazebný protein; S6, S6 kináza. Podle EMLEN ET AL. 2006



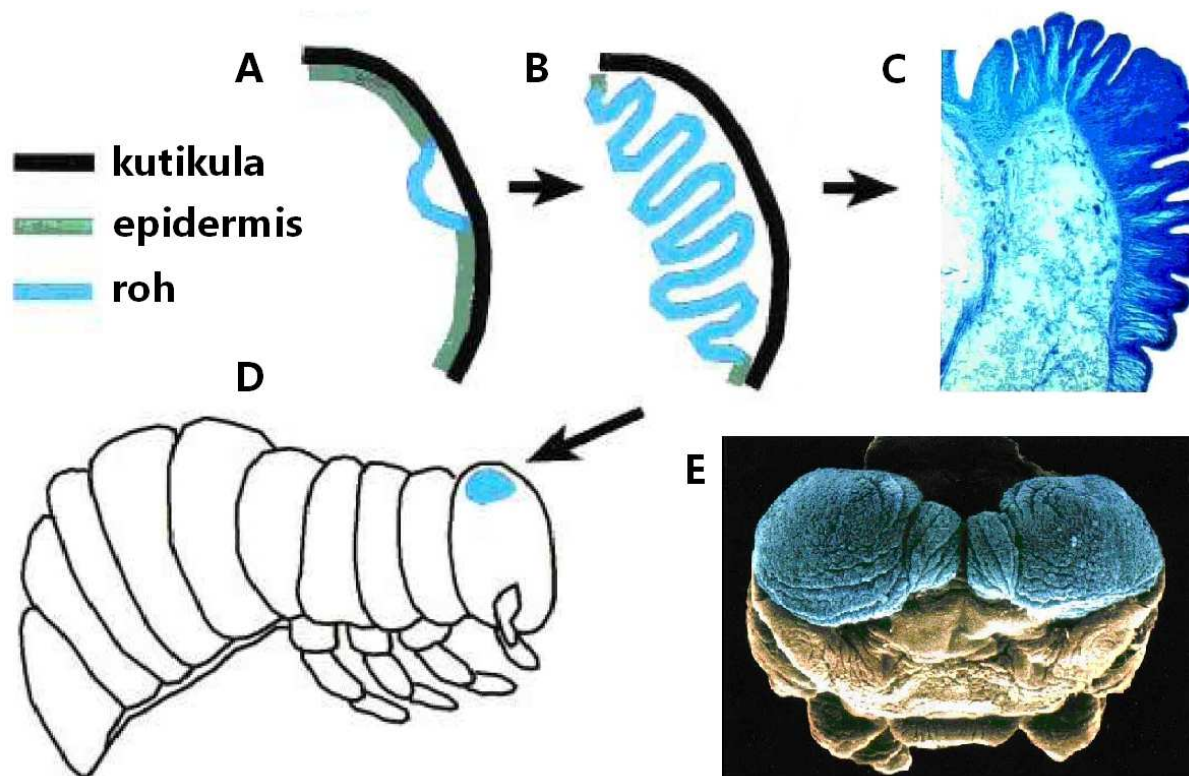
4.2 Mechanismy nezávislé na podmínkách vývoje larvy

4.2.1 Morfogeneze rohů

Rohy brouků nevykazují zjevnou homologii s žádnými jinými hmyzími strukturami a mohou tedy být označeny za evoluční novinky (MOCZEK 2005, 2008, MOCZEK & ROSE 2009). Jedná se o duté výběžky kutikuly vyplněné hemolymfou. Příkladně u rodu *Ontophagus* se neskládají ze segmentů, nemají kloubní spojení a neobsahují svalovou ani nervovou tkáň (MOCZEK & NAGY 2005, MOCZEK 2006, 2008, MADEWELL & MOCZEK 2006), ačkoliv u jiných skupin mohou být rohy porostlé jemnými chloupky (viz. např. EBERHARD 1978), na jejichž dotyk brouci reagují. To naznačuje možnou sensorickou funkci a přítomnost nervové tkáně (ŠÍPEK – pers. comm.).

Přesto tyto odlišnosti rohy sdílí mnoho společných vývojových charakteristik s tradičními přívěsky (sensu MOCZEK 2005), které nacházíme u hmyzu, např. končetinami, křídly, tykadly nebo částmi ústního ústrojí. Specifikace a proliferace buněk v okrcích epidermis, které dají vznik rohům i základům tělních přívěskům u mnoha hmyzích řádů, včetně většiny brouků, probíhá ve stadiu prepupy, tj. ke konci posledního larválního instaru, kdy larva přestává přijímat potravu. Primordia rohů podstupují apolýzi (tj. uvolnění epidermis od larvální kutikuly) a u larev, které dají vzniknout velkým samcům s plně vyvinutými rohy, explozivní růst během asi 24-48 hodin dlouhé periody v období druhé poloviny IV. stádia, kdy larva vyprazdňuje své střevo (viz. kap. 4. 1. 1). Vzniklý prostor je vyplněn tekutinou. Proliferující tkáň rohu expanduje do volného prostoru pod kutikulou, kde se zřasí a vytvoří kompaktní útvar složený ze záhybů epidermis (Obr. 6, EMLEN & NIJHOUT 1999, EMLEN 2000). Po svléknutí larvální kutikuly může základ rohu, do té doby zřasený do záhybů, expandovat v tekutinou naplněnou trubici (MOCZEK & ROSE 2009) připomínající už většinou tvarem strukturu přítomnou u imaga, stejně jako je tomu u tradičních přívěsků.

Právě popsany sled událostí je tzv. klasickým vývojem tělních přívěsků hmyzu, který platí i pro rohy a nacházíme jej u většiny hmyzích řádů. S ním kontrastuje vývoj z imaginálních disků (terčků) tělních přívěsků vyšších much, křídel motýlů a některých brouků (KOJIMA 2004). Ke specifikaci imaginálních disků a jejich rozčlenění na budoucí segmenty dochází již během embryonálního vývoje, tedy ve stadiu, kdy je celá tkáň dvojrozměrným útvarem. Vchlipují se pod povrch těla embrya, kde rostou jako invaginované



Obr. 6: Morfogeneze párových hlavových rohů u samce *Ontophagus taurus*. **A)** Apolýza (lokální odpojení epidermis od larvální kutikuly) v místě budoucího rohu. **B)** Výsledkem intenzivní proliferace buněk primordia rohu je explozivní růst epidermis, která se ve formě kompaktních záhybů skládá do volného prostoru pod kutikulou. **C)** Příčný řez vyvíjejícím se rohem; kutikula je odstraněna, což připomíná situaci během ekdyse, kdy je odhozena larvální kutikula, do základu rohu je napumpována hemolymfa, roh expanduje a nabývá podoby tekutinou vyplněné trubice (není zobrazeno) **D)** Umístění primordia rohu na těle prepupy (larvy pozdního třetího instaru). **(E)** Čelní pohled na primordia rohů u prepupy po odstranění hlavové kapsuly larvy. Podle EMLÉN 2000.

Tab. 1: Srovnání vývoje tělních přívěsků hmyzu klasickou cestou a vývojem z imaginálních disků. „patterning“ = rozčlenění primordia/disku kaskádou molekulárních signálů na řadu domén, které odpovídají určitým částem budoucí struktury spolu se specifikací jejich os. (podle informací z KOJIMA 2004)

	klasický vývoj	vývoj z imaginálních disků
vztah k epidermis	evaginace (vychlípenina)	invaginace
období, v němž probíhá „patterning“	na konci posledního larválního instaru	během embryonálního vývoje
charakter struktury, u níž probíhá „patterning“	trojrozměrná	dvojrzměrná
vztah „patterningu“ k okolním tkáním	z velké části autonomní	z velké části autonomní
růst	explozivní, na konci posledního larválního instaru	postupný, během růstu larvy, nejintenzivněji však před kuklením
genetické mechanismy regulace vývoje	méně prostudované, ale zatím vždy podobné jako u imaginálních disků	dobře prostudované

váčky po celou dobu života larvy, nejintenzivněji však v době před kuklením (KOJIMA 2004). Imaginální disk lze chápat šířeji jako jakýkoliv okresek buněk, který dá vzniknout struktuře těla dospělého a jeho vývoj probíhá víceméně nezávisle na okolní tkáni (pak tento pojem zahrnuje i výše uvedený klasický vývoj). Toto pojetí lépe odráží konzervovanost genových regulačních sítí uplatňujících se v obou způsobech vývoje tělních přívěsků hmyzu (EMLEN ET AL. 2006). Bližší informace o vývoji imaginálních disků viz. kap. 4. 2. 2. 1, porovnání s klasickým vývojem nabízí Tab. 1.

Variabilita v expresi rohů mezi druhy, pohlavími i morfami samců jediného druhu je výslednicí dvou procesů, intenzity proliferace buněk budoucího rohu během stádia prepupy a resorpce jeho tkáně ve stádiu kukly (viz. kap. 4. 2. 3, MOCZEK & NAGY 2005, MOCZEK 2006B, 2007).

4. 2. 2 Genetické naprogramování vývoje rohů

Morfogeneze rohů je velmi podobná morfogenezi končetin a ostatních přívěsků klasickou cestou (MOCZEK 2005, 2006A). Nejdokonalejší znalosti o genových regulacích vývoje tělních přívěsků hmyzu však máme k dispozici u modelového organismu, octomilky *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830. Všechny tělní přívěsky tzv. vyšších much (kam patří i *D. melanogaster*) se vyvíjejí evolučně odvozeným způsobem z imaginálních disků (terčků, EMLÉN & ALLEN 2004, KOJIMA 2004). Přes popsané morfologické rozdíly mezi vývojem přívěsků z imaginálních disků a klasickým vývojem je genetický podklad obou procesů velmi podobný (KOJIMA 2004). Proto můžeme za vhodné kandidátské geny pro vývoj rohů považovat členy genové regulační sítě účastníci se ontogeneze končetiny u *Drosophila melanogaster* (MOCZEK & NAGY 2005, EMLÉN ET AL. 2006) .

Ontogeneze končetiny hmyzu může být rozdělena do čtyř hierarchicky uspořádaných a relativně dobře od sebe oddělitelných kroků, z nichž každý je tvořen samostatným modulem, sítí molekulárních signálů a interakcí (EMLEN ET AL. 2007). Jsou to:

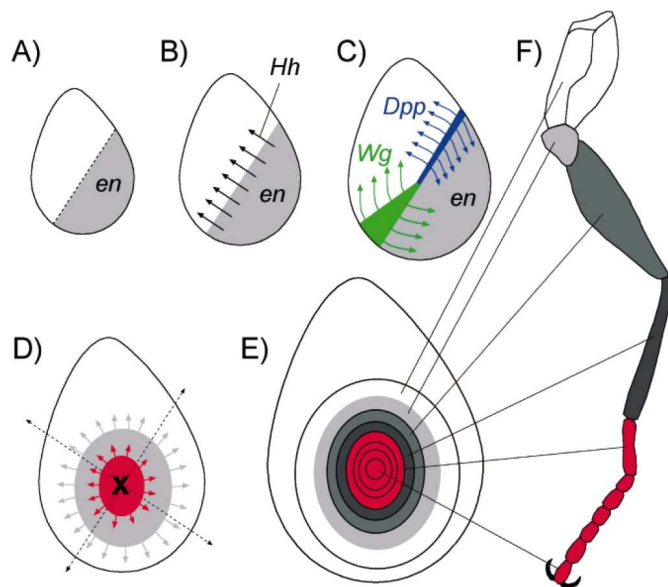
- 1) určení identity přívěsku
- 2) specifikace proximodistální osy růstu
- 3) rozdělení na segmenty
- 4) lokalizace a růst senzorických brv, sít,...

Rohy brouků nevykazují seriální homologii s jinými strukturami (ad. 1), ani se neskládají ze segmentů (ad. 3) a neobsahují nervovou nebo svalovou tkáň (ad. 4). Přesto existuje mnoho morfologických podobností mezi vývojem rohů a klasických přívěsků (viz. kap. 4. 2. 1). Z těchto důvodů je z výše uvedených vývojových modulů pro vznik rohu důležité především určení proximodistální osy růstu (ad. 2), tzv. růstový („*outgrowth*“) modul. Geny a genové produkty tohoto růstového modulu jsou tedy nejvhodnějšími kandidáty pro zajištění stejných procesů v ontogenezi rohů (EMLEN ET AL. 2006, 2007).

4. 2. 2. 1 Embryogeneze končetiny u modelového zástupce hmyzu (*Drosophila melanogaster*)

Růst i specifikace budoucích segmentů končetiny jsou řízeny stejnou hierarchickou kaskádou exprese místně specifických molekulárních signálů (Obr. 7, KOJIMA 2004, EMLEN & ALLEN 2004) a jsou jí tedy neoddělitelně propojeny. Genová regulační síť růstového modulu určuje intenzitu růstu jednotlivých částí imaginálního disku a tím tvar vznikající struktury. Specifikuje také přibližnou velikost budoucího orgánu, která je doladěna dalšími regulačními mechanismy podle podmínek prostředí (EMLEN ET AL. 2006).

Expresi genů *engrailed* (*en*) a *hedgehog* (*hh*) rozdělí imaginální disk na anteriorní a posteriorní polovinu (Obr. 7.a,b). Buňky na rozhraní obou domén v prostředí s Hh, ale nikoliv En, sekretují difuzibilní morfogeny *wingless* (*wg*) a *decapentaplegic* (*Dpp*), které určují dorsoventrální osu budoucí končetiny. V tomto okamžiku je imaginální disk rozdělen do čtyř oblastí s unikátní kombinací molekulárních signálů (Obr. 7.c). Buňky ve středu imaginálního disku, v průsečíku všech čtyř expresních domén, jsou vystaveny poměrně vysokým koncentracím Wg i Dpp. To v nich indukuje expresi dalších genů (Obr. 7.d), které společným působením rozdělí imaginální disk na přibližně koncentrické kruhové domény exprese dalších transkripčních faktorů (TF) – *homothorax* (*hth*), *dachshund* (*dac*) a *Distal-less* (*Dll*), které jsou hlavními geny specifikujícími proximodistální (p-d) osu budoucí končetiny (Obr. 7.e). *Dll* je exprimován uprostřed imaginálního disku. Po růstu, vychlípění a zformování imaginálního terčku do podoby končetiny dá oblast exprese *Dll* vznik distální části končetiny. Vně od centrální domény imaginálního disku se nachází koncentrická kruhová doména exprese TF *dac*, nejvíce periferně je lokalizována exprese *hth*. Tyto okrsky buněk dají vzniknout mediální, resp. proximální části končetiny (Obr. 7.f, KOJIMA 2004, EMLEN & ALLEN 2004).



Obr. 7: Vývoj končetiny z imaginálního disku u *Drosophila melanogaster*. (A) buňky posteriovní poloviny imaginálního disku exprimují gen *engrailed* (*en*), (B) jehož produkt ve stejných buňkách indukuje tvorbu a sekreci morfogenu Hedgehog (Hh), který difunduje k anteriorním buňkám. (C) Ventrální anteriorní buňky sekretují produkt difuzibilní morfogen Wingless (Wg), dorsální anteriorní buňky morfogen Decapentaplegic (Dpp), čímž dojde k rozdělení disku na čtyři domény s unikátními kombinacemi molekulárních signálů. (D) Buňky na průřezu všech čtyř domén, které se nachází v oblasti vysoké koncentrace Wg i Dpp, exprimují gen

optimotor-blind (*omb*), jehož produkt spolu s Wg a Dpp indukuje v těchto centrálních buňkách disku expresi *Distal-less* (*Dll*), *arista-less* (*al*) a *epidermal growth factor* (*EGF*). (E) Jejich překrývající se koncentrické gradienty vytvoří poziční informaci, která instruuje buňky v různých vzdálenostech od centra disku k expresi ostatních transkripčních faktorů specifických segmenty budoucí končetiny (F). Podle Emlen & Allen 2004.

4. 2. 2. 2 Vývojová genetika rohů brouků rodu *Ontophagus*

Studie zabývající se vývojovou genetikou rohů vrubounovitých brouků z rodu *Ontophagus* (MOCZEK & NAGY 2005, MOCZEK ET AL. 2006, MOCZEK & ROSE 2009) odhalily expresi všech tří genů odpovědných za určení proximodistální (p/d) osy končetin hmyzu – *dachshund* (*dac*), *homothorax* (*hth*) a *Distal-less* (*Dll*) – ve vyvíjejících se rozích (Obr. 8). Zatímco *hth* a *Dll* jsou exprimovány v doménách primordií rohů odpovídajících oblastem exprese v základech končetin, *dac* je exprimován v celém základu rohu, což naznačuje, že v morfogenezi rohů ztratil původní funkci nebo tato funkce byla během evoluce rohů pozměněna (MOCZEK & ROSE 2009). Produkt genu *homothorax* (*hth*), protein HTH byl prokázán především v anteriorní a posteriovní oblasti u báze pronotálních rohů a v malém množství často také ve zbylé distální části rohu. Protein nuclear extradenticle (n-EXD), produkt genu *extradenticle* (*exd*), je u *Ontophagus nigriventris* a *O. binodis* podobně jako DAC u každého jedince bez ohledu na pohlaví a velikost přítomen v celém vyvíjejícím se rohu a v menší míře také v rozsáhlejších oblastech pronotální epidermis v okolí rohu. To u *O. taurus* vykazuje n-EXD vzorec exprese podobný HTH – je přítomen především v anteriorní a posteriovní části báze hrudního rohu a často v menší koncentraci také ve zbylé části pronotálního výrůstku pupy. Všechny geny, jejichž exprese ve vyvíjející se tkáni rohu

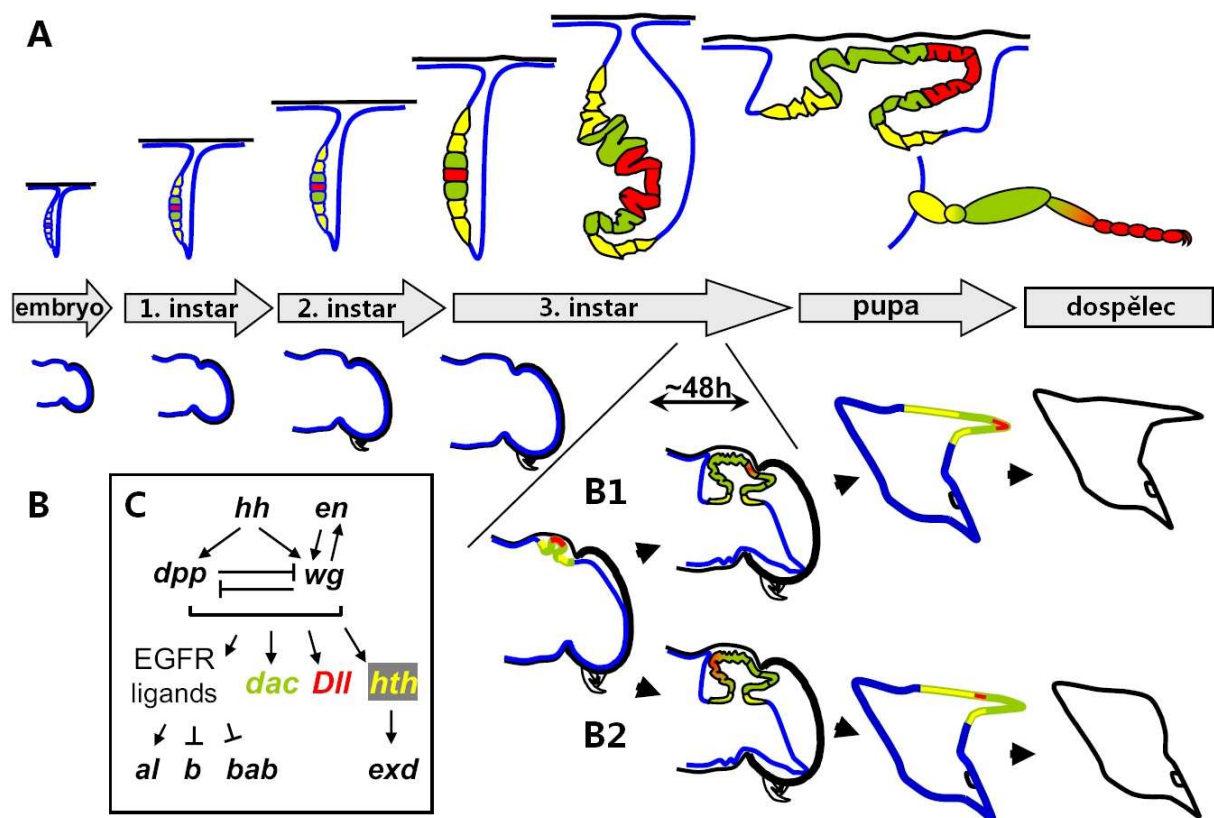
byla právě popsána, však nevykazují diferenciální expresi v závislosti na pohlaví nebo velikosti jedince (budoucího samce) a nevysvětlují tedy vznik pohlavního dimorfismu, resp. polyfenismu. Kandidátem, který splňuje tato kritéria, je poslední z genů určujících proximodistální osu končetin – *Distal-less (Dll)*.

U *O. taurus* je protein DLL (produkt genu *Dll*) přítomen v primordiích hlavových rohů všech samců, ale nikoliv samic, u nichž se rohy nikdy ani náznakem nevyvíjí. Zdrojem sexuálního dimorfismu je u *O. taurus* tedy přítomnost/absence tohoto morfogenu (MOCZEK & NAGY 2005). Transientní (dočasné) pronotální rohy *O. taurus*, které jsou ve stadiu pupy kompletně resorbovány (kap. 4. 2. 3), nevykazovaly podle prvních studií žádnou expresi *Dll* (Moczek & Nagy 2005), později byla objevena malá (asi 60 µm) doména exprese v posteriorní bazální části rohů (MOCZEK ET AL. 2006).

Naproti tomu u pronotálních rohů *O. nigriventris* je *Dll* exprimován u obou pohlaví. Kukly obou pohlaví nesou roh, u samic je podobné velikosti jako u středně velkých a malých samců, oblast exprese *Dll* je však u nich posunuta více proximálně. Doména exprese *Dll* odpovídá distální části rohu dospělého a část rohu kukly distálně od oblasti exprese *Dll* je resorbována. Výsledkem je vznik malého zašpičatělého výběžku na pronotu malých samců a pouze mírně vystouplé lišty u samic. Velcí samci nesou dlouhý roh, během jehož vývoje se protein DLL nachází v distální části rohu kukly, takže roh není resorbován. Pohlavní dimorfismus je tedy generován spíše diferenciální oblastí exprese *Dll* než jeho přítomností/nepřítomností (MOCZEK & NAGY 2005).

Všechny zmiňované genové produkty si zachovaly i svou dřívější funkci v ontogenezi tradičních přívesků, fenotyp jedinců knock-outovaných v těchto genech metodou RNA-interference totiž vykazuje stejné vývojové deformity, jaké byly v analogických pokusech s knock-outem stejných genů pozorovány u jiných hmyzích druhů (MOCZEK & ROSE 2009). Kromě toho se však DAC a EXD u studovaných druhů také nacházejí v malé míře ubikvitně v epitelech prepupy a HTH je přítomen v epidermis celé oblasti pronota a hlavy. Je tak možné, že hlava a pronotum alespoň u rodu *Ontophagus* (a snad i u celé nadčeledi *Scarabaeoidea*) jsou preadaptovány pro vývoj rohů, neboť v celé dorsální epidermis těchto tagmat jsou exprimovány geny signální kaskády formující proximodistální osu epidermálních výrůstků. Jediná komponenta, která chybí k vytvoření minimální funkční sítě potřebné pro vznik rohu, je exprese transkripčního faktoru *Distal-less* (MOCZEK ET AL. 2006).

Jedním z dalších genů účastnících se ontogeneze končetin exprimovaným ve vyvíjejících se rozích je *aristaless (al)*. Přítomnost jeho produktu, proteinu AL, byla zjištěna v primordiích hrudních rohů *O. taurus* i *O. nigriventris* u obou pohlaví i morf



Obr. 8: Vývoj končetiny u *Drosophila melanogaster* (A) a paralelní stádia ontogenetického vývoje pronotálního rohu u brouků rodu *Ontophagus* (B) se schematicky znázorněnými oblastmi exprese genů určujících proximodistální (p-d) osu vznikající struktury: homothorax (*hth*, žlutě), dachshund (*dac*, zeleně), Distal-less (*Dll*, červeně). Znázorněny jsou také kutikula (černá čára) a epidermis (modrá čára). Končetiny *D. melanogaster* se vyvíjejí z imaginálních disků – invaginované oblasti epidermis rostoucí průběžně po celý larvální vývoj. Ke specifikaci p-d osy imaginálního disku dochází již během embryonálního vývoje, kdy je budoucí končetina planárním útvarem. Rohy brouků vznikají během období asi 48 hodin explozivního růstu na konci posledního, 3. larválního instaru ve stádiu prepupy. Od počátku se jedná o trojrozměrné útvary. Přes tyto odlišnosti sdílejí obě struktury (končetiny i rohy) genovou regulační síť (C), která určuje jejich proximodistální osu. Resorbována je část rohu nacházející se distálně od oblasti exprese transkripčního faktoru *Dll* (kap. 4. 2. 3). Větší doména exprese *Dll* v apikální části rohu (B1) znamená, že roh pupy bude zachován i u imaga. Naopak posteriorně a proximálně posunutá, menší oblast exprese *Dll* (B2) způsobí, že apikální část rohu distálně od této domény bude resorbována.

(*hh*, hedgehog, *en*, engrailed, *dpp*, decapentaplegic, *wg*, wingless, *EGFR*, epidermal growth factor receptor, *al*, arista-less, *b*, bar, *bab*, bric a brac, *exd*, extradenticle)

Podle MOCZEK & ROSE 2009, upraveno.

samců, a to v distální části rohu pupy v doméně svou velikostí přesahující oblast exprese *Dll* (MOCZEK & NAGY 2005). To je v kontrastu s jeho expresí ve vývoji končetin, kde se vyskytuje v nejzazší apikální oblasti formující se končetiny a určuje identitu budoucího

tarsu (KOJIMA 2004). V hlavových rozích *O. taurus* nebyla přítomnost AL zjištěna (MOCZEK & NAGY 2005). Gen *aristalless* je jedním z cílů působení signální kaskády vedoucí od receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR = *epidermal growth factor receptor*) (MOCZEK ET AL. 2006, MOCZEK & NAGY 2009). Pozice domény exprese *Distal-less* a *aristalless* vzhledem k rohu pupy a imaga naznačuje, že p/d osy pupálního rohu a rohu imaga nejsou identické a formují se alespoň zčásti odděleně a nezávisle – *al* charakterizuje nejzazší distální část rohu kukly, zatímco *Dll* je typický pro distální oblast budoucího pronota dospělého (MOCZEK ET AL. 2006).

Samotný EGFR je také exprimován v primordiích rohů během jejich růstu (EMLEN ET AL. 2006) s gradientem koncentrace klesajícím od špičky rohu k jeho bázi (MOCZEK 2006A). Vazba ligandů na EGFR v imaginálním disku *D. melanogaster* zahajuje expresi dalších genů, které se při vývoji končetiny podílí na specifikaci segmentů distální části končetiny (KOJIMA 2004).

Byla zjištěna i přítomnost produktů genů *decapentaplegic* a *wingless* (EMLEN ET AL. 2006), hlavních organizátorů vývoje imaginálních disků (EMLEN & ALLEN 2004, KOJIMA 2004). Oblast jejich společné exprese určuje budoucí distální konec končetiny (kap. 4. 2. 2. 1) a zahajuje kaskádu dějů vedoucí k tvorbě kutikulárního výrůstku („*outgrowth*“ modul, kap. 4. 2. 2).

4. 2. 3 Remodelace rohu ve stádiu kukly - role apoptózy v morfogenezi rohů

Po růstové fázi ve stadiu prepupy nadchází další významná etapa ve vývoji rohů během stadia kukly (pupy). Zatímco v první fázi tvorby rohů byla nejvýznamnějším procesem buněčná proliferace, dochází ve stadiu pupy k různě intenzivní resorpci tkáně rohu. Výsledkem je mnohdy výrazné zmenšení až úplné vymizení rohu, doladění detailní struktury rohů, jejich skulptury a tvaru (EMLEN ET AL. 2007), a to především programovanou buněčnou smrtí – apoptózou (KIJIMOTO ET AL. unpubl. v MOCZEK 2006B, 2007). Tímto způsobem se zvyrazňují vyhloubení mezi jednotlivými rohy nebo jejich výběžky, upravuje se zakřivení rohu, vytváří jemné ozubení a jemné chloupky (EMLEN ET AL. 2007). Makroskopicky pozorovatelným důsledkem apoptózy je retrakce epidermis, která se v první polovině života pupy v procesu apolýzy odpojuje od její kutikuly (MOCZEK & NAGY 2005).

Pokud u jednoho z pohlaví dochází k výraznější resorpci tkáně rohu pupy apoptózou, představuje tento mechanismus jednu z možností vzniku, zvýraznění nebo zvrácení pohlavního dimorfismu v expresi rohů (MOCZEK 2006B).

Ve většině případů je intenzivnější resorpcí tkáně pupálního rohu u samic zvýrazněn dimorfismus přítomný již u kukly v důsledku pohlavně specifického prepupálního růstu. Např. u druhu *Ontophagus nigriventris* pohlavně dimorfní růst produkuje u velkých samců dlouhý pupální roh. Růst rohu je ale u samců závislý na velikosti jedince a kukly malých samců proto nesou podobně velký výrůstek na pronotu jako samice všech velikostí. U samců je retrakce epidermis od kutikuly kukly jen nevýrazná, zato u samic resultuje v úplnou absenci rohu, takže na pronotu je přítomna pouze příčná lišta, kdežto všichni samci nesou roh (MOCZEK&NAGY 2005, MOCZEK 2006B).

Resorpce rohu může být jediným mechanismem zodpovědným za vznik pohlavního dimorfismu, jako je tomu např. v případě druhu *O. binodis*. Růst primordií rohů ve stádiu prepupy není pohlavně specifický, což dá vzniknout kuklám monomorfním v expresi hrudního rohu (MOCZEK 2006B, SHELBY ET AL. 2007). Následná retrakce epidermis ve stádiu kukly je intenzivnější u samic než u samců, což má za následek vznik pohlavně dimorfních dospělců (MOCZEK 2006B).

Remodelace rohu kukly apoptózou je schopna prostřednictvím výraznější resorpce tkáně rohu u samčích kukel zvrátit výsledek původního pohlavně dimorfního růstu rohů (u samců výraznějšího), takže imaga samců nesou mnohem menší rohy, než samice. Tak je tomu ve vzácných případech obráceného sexuálního dimorfismu (jako u *O. sagittarius*) (MOCZEK 2006B).

Extrémním případem resorpce rohu je situace u druhu *O. taurus*, u něž dochází ke kompletnímu vstřebání pupálního hrudního rohu obou pohlaví (MOCZEK & NAGY 2005, MOCZEK 2006B, MOCZEK ET AL. 2006, MOCZEK & ROSE 2009). Růstem ve stádiu prepupy vznikají pupy *O. taurus* u obou pohlaví s dobře vyvinutými, ale u samců relativně většími, hrudními rohy. Následná resorpce ve stádiu pupy dá vzniknout imagům zcela bez hrudních rohů. Retrakce epidermis je u samic méně výrazná než u samců, čímž vymizí původně přítomný pohlavní dimorfismus a obě pohlaví se v dospělosti v morfologii pronota liší jen nepatrně (MOCZEK 2006B). Odlišná je situace u hlavových rohů, kde jsou veškeré rozdíly v expresi dány proliferací primordií rohů ve stádiu prepupy, ke které dochází pouze u samců, ale nikoliv u samic, které tak nikdy (ani ve stádiu pupy) nenesou ani náznak hlavových rohů (MOCZEK & NAGY 2005).

Zdá se, že hrudní rohy jsou u rodu *Ontophagus* přítomny velmi často u kukel obou pohlaví, u samic však bývají resorbovány. MOCZEK ET AL. (2006) navrhuje jako možné vysvětlení významu takových rohů u rodu *Ontophagus* jejich roli při svlékání tvrdé, sklerotizované hlavové kapsule. Během svého růstu se vyvíjející roh vkládá mezi epidermis a hlavovou kapsuli. Při metamorfické ecdysi se plní hemolymfou, expanduje a odtlačí tak kapsuli z hlavy kukly. Larvy, kterým bylo zabráněno v produkci rohu nebyly při kuklení schopné odhodit hlavovou kapsuli a dokončit vývoj. Mohlo by se také jednat o „vývojovou fosílii“ pozůstatek po původní situaci, kdy hrudní roh u předka rodu *Ontophagus* nesla obě pohlaví. Vznik pohlavního dimorfismu by tak nebyl spojen s potlačením růstu rohů u samic, ale s přidáním dalšího ontogenetického procesu – resorpce rohu (MOCZEK 2006B). Podobné rohy resorbované ve stádiu pupy byly pozorovány i u jiných druhů listorohých brouků, například samic nosorožníka *Xylotrupes gideon* (Linnaeus, 1767) (Scarabaeidae: Dynastinae) a u *Propomacrus bimucronatus* (Pallas, 1781) (Scarabaeidae: Euchirinae – oba údaje ŠÍPEK – pers. comm.).

Resorpce hraje roli i při vzniku diskrétních samčích fenotypů (MOCZEK 2007). Výraznější resorpce pupálních rohů u malých a středně velkých samců zvětšuje rozdíly, které vznikly intenzivnějším růstem rohů v prepupálním stádiu u velkých samců, a odstraňuje tak přechodné fenotypy mezi oběma samčími morfami, jako je tomu v případě hrudních rohů *O. nigriventris* a v menší míře i hlavových rohů *O. taurus*. Resorpční mechanismy jsou navíc zodpovědné za ostřejší přechod od bezrohé morfologie k samcům s plně vyvinutými rohy (MOCZEK 2007).

Mechanismus určující, jaká část rohu má být resorbována, byl již zčásti diskutován v předchozí kapitole. Expres TF *Distal-less* značí distální konec budoucího rohu imaga. Pokud má být roh zachován v plné délce, je tato oblast shodná s distálním koncem rohu pupy. U jedinců, kde má být část rohu resorbována, je oblast exprese *Dll* posunuta více proximálně, zatímco oblasti exprese ostatních genů zůstávají nezměněny. Resorbována je potom část rohu pupy ležící distálně od oblasti exprese *Dll*. (MOCZEK & NAGY 2005, MOCZEK ET AL. 2006, MOCZEK & ROSE 2009). Velcí samci *O. nigriventris* vykazují větší doménu s výskytem *DLL*, než menší samci, u nichž je větší část rohu resorbována. Nejmenší doména exprese *Dll* ze studovaných druhů je přítomna u *O. taurus*, u nějž všichni jedinci kompletně resorbují své hrudní rohy ve stádiu kukly. Proto se zdá, že míra resorpce hrudního rohu je určena především umístěním a velikostí domény exprese *Dll*.

5. Diskuse a závěr

V této práci jsem se pokusil shrnout poznatky o vývoji rohů, excesivních struktur, které nalézáme u vrubounovitých brouků. Především na příkladech z rodu *Ontophagus* jsem se pokusil nastínit, jak tyto vývojové procesy dávají vzniknout výsledné morfologii, jakým evolučním omezením a jak je ontogeneze rohů regulována. K tomu je nutné pochopit také ekologické podmínky a selekční prostředí, v němž probíhá jejich evoluce. Díky rostoucímu porozumění ontogenetickému vývoji rohů a jeho fyziologickým regulacím získáváme poprvé v historii možnost uspokojivě vysvětlit evoluční původ a diversifikaci rohů, zejména onu pozoruhodnou tendenci k tvorbě rohů u nadčeledi Scarabaeoidea, nad kterou se pozastavovaly celé generace badatelů.

Nejdůležitější z tohoto pohledu jsou zjištění, že mechanismy nutné pro produkci rohu nebo jiného kutikulárního výrůstku byly již od počátku přítomny u všech zástupců hmyzu, kde zastávaly podobnou funkci ve vývoji tradičních tělních přívěsků. Proč potom nepozorujeme podobnou hojnost a diversitu rohů i u zástupců jiných čeledí brouků nebo dokonce hmyzích řádů?

Vývojové studie ukazují, že u vrubounovitých brouků je část genů regulační sítě potřebné pro vznik rohu exprimována v rozsáhlých oblastech těla, mj. právě hlavy a pronota, které nesou rohy. Jedinou chybějící komponentou ke vzniku funkční regulační kaskády a vznik rohu je potom transkripční faktor *Distal-less*, který oblastí své exprese určí distální konec budoucího výrůstku kutikuly. Je tato ubikvitní exprese některých morfogenů preadaptací pro vznik rohů nebo naopak pozůstatkem po přítomnosti rohů u společného předka dnešních Scarabaeoidea?

Také společná exprese morfogenů *Wingless* a *Decapentaplegic* sama o sobě je schopna zahájit celý mechanismus vedoucí k vývoji rohu. Podle EMLENA ET AL. (2007) jsou z tohoto důvodu změny v expresních doménách *Wg* a *Dpp* vhodnými kandidáty zprostředkujícími evoluci umístění rohů na těle, rozpad jednoho rohu na dva a rozvětvení jednoduchého rohu, neboť kdekoliv, kde se stýkají domény exprese těchto dvou genů, vznikne nový kutikulární výrůstek.

Častý výskyt pupálních rohů a jejich následná resorpce, výskyt druhů nesoucích rohy téměř ve všech skupinách Scarabaeoidea i existence mutantních jedinců s rohy v jinak naprosto bezrohých liniích (Obr. 1) nabízí třetí možnost, která je v rozporu s tradiční představou mnohonásobného vzniku rohů během evoluce vrubounovitých brouků. Rohy

i mechanismus k potlačení jejich vývoje (původně za účelem vytváření pohlavního dimorfismu) podle ní vznikly již u společného předka celé nadčeledě a současný vzorec jejich výskytu je dán častou ztrátou rohů aktivací tohoto mechanismu u obou pohlaví. Deaktivací těchto represorových mechanismů se v dané fylogenetické linii mohou rohy znovu objevit (EMLEN ET AL. 2007).

Přestože ne dosud plně pochopené, nabízejí endokrinní mechanismy regulace vývoje rohů možnosti, kterými může docházet k evoluci prahových mechanismů pro produkci rohů. Jsou jimi např. změny v kritické koncentraci JH, po jejímž překročení dojde k expresi rohů, nebo relativní posun v načasování sensitivní periody k JH vzhledem ke kolísání jeho hladiny v hemolymfě (MOCZEK & NIJHOUT 2002). Ke správné interpretaci experimentů manipulujících hladiny hormonů během vývoje by snad mohly přispět expresní profily pro receptory těchto hormonů a proteinů následných signálních drah v odlišných ontogenetických stádiích a u různých jedinců, podobně jako se tomu již děje v případě insulinového receptoru.

V poslední době se objevují studie snažící se o komplexní pohled ať už na fylogenezi rohů (EMLEN ET AL. 2005A, 2005B) nebo jejich vývoj (KIJIMOTO ET AL. 2009, MOCZEK & ROSE 2009). Srovnáním expresních profilů EST cDNA rohů a tradičních přívěšků (KIJIMOTO ET AL. 2009) byly nalezeny nové kandidátské geny na účast v morfogenezi rohů. Hlavové a pronotální rohy podle této studie nejsou seriálními homology a vznikly nezávisle. Potvrzuje se také, že v ontogenezi rohů je využito části genové regulační sítě vypůjčené z vývoje tradičních přívěšků. To je v souladu s dřívější zkušeností, že v evoluci dochází ke vzniku novinek především díky existujícím vývojovým procesům, které jsou použity v novém kontextu.

Studium rohů představuje klasický případ propojení teoretické, evoluční a vývojové biologie, ekologie, behaviorálních studií a morfometrie, jehož výsledkem je celkový pohled na evoluci a biologii nejen rohů u brouků, ale do jisté míry i všech ostatních excesivních struktur a sekundárních pohlavních znaků v živočichů.

6. Literatura

- ARROW, G. J., 1951. Horned beetles: a study of the fantastic in nature. *Dr. W. Junk Publishers – The Hague*
- BATESON, W., BRINDLEY, H. H., 1892. On some cases of variation in secondary sexual characters, statistically examined. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 585-594 ex ARROW, G. J., 1951. Horned beetles: a study of the fantastic in nature. *Dr. W. Junk Publishers – The Hague*
- BEEBE, W., 1944. The function of secondary sexual characters in two species of Dynastinae (Coleoptera). *Zoologica*, 29: 53–58 ex ARROW, G. J., 1951. Horned beetles: a study of the fantastic in nature. *Dr. W. Junk Publishers – The Hague*
- BROWN, L. & SIEGFRIED, B. D., 1983. Effects of male horn size on courtship activity in the forked fungus beetle, *Bolitotherus cornutus* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 78: 253-255
- BEUTEL R. G., LESCHEN R. A. B., 2005. Coleoptera, Vol. 1: Morphology and Systematics. in: Handbook of Zoology Vol. IV – Arthropoda: Insecta, Part 38, Berlin, NY, De Gruyter
- COOK, D. F., 1990. Differences in courtship, mating and postcopulatory behaviour between male morphs of the dung beetle, *Ontophagus binodis* Thunberg (Coleoptera: Scarabaeidae). *Animal Behaviour*, 40: 428-436
- DARWIN, C. R., 1871. Descent of man and selection in relation to sex. český překlad Komárek S., Marsault-Rejková, H., 2005: O pohlavním výběru. pp. 114-123, 154. *Academia, Praha*
- EBERHARD, W. G., 1978. Fighting behavior of male *Golofa porteri* beetles (Scarabaeidae: Dynastinae). *Psyche*, 83: 292-298
- EBERHARD, W. G., 1981. The natural history of *Doryphora* sp. (Coleoptera: Chrysomelidae) and the function of its sternal horn. *Annals of the Entomological Society of America*, 74: 445-448
- EBERHARD, W. G., 1982. Beetle horn dimorphism: making the best of a bad lot. *The American Naturalist*, 119: 420-426
- EBERHARD, W. G., 1987. Use of horns in fights by the dimorphic males of *Ageopsis nigicollis* (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 60: 504-509
- EBERHARD, W.D., GARCIA-C., J. M., 2000. Ritual jousting by horned *Parisoschoenus expositus* weevils (Coleoptera, Curculionidae, Baridinae) . *Psyche*, 103: 55-84
- EBERHARD, W.D., GARCIA-C., J. M., LOBO, J., 2000. Size specific defensive structures in a horned weevil confirm a classic battle plan: avoid fights with larger opponents. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 267: 1129-1134
- EMLÉN, D.J., 1994. Environmental control of horn length dimorphism in the beetle *Ontophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 256: 131-136
- EMLÉN, D.J., 1997A. Alternative reproductive tactics and male horn dimorphism in the horned beetle *Ontophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41: 335-341
- EMLÉN, D.J., 1997B. Diet alters male horn allometry in the beetle *Ontophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 264: 567-574
- EMLÉN, D. J., 2000. Integrating development with evolution – a case study with beetle horns. *BioScience*, 50: 403-418
- EMLÉN, D. J., 2001. Costs and diversification structures of exaggerated animal structures. *Science*. 291: 1534-1536
- EMLÉN, D. J., ALLEN, C. E., 2004. Genotype to phenotype: physiological control of trait size and scaling in insects. *Integrative and Comparative Biology*, 43: 617-634
- EMLÉN, D.J., HUNT, J., SIMMONS, L. W., 2005A. Evolution of sexual dimorphism and male dimorphism in the expression of beetle horns: Phylogenetic evidence for modularity, evolutionary lability, and constraint. *The American Naturalist*, 166: S42-S68
- EMLÉN, D.J., MARANGELO, J., BALL, B., CUNNINGHAM, C. W., 2005B. Diversity in the weapons of sexual selection: Horn evolution in the beetle genus *Ontophagus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Evolution*, 59: 1060-1084
- EMLÉN, D.J., NIJHOUT, H.F., 1999. Hormonal control of male horn dimorphism in the dung beetle *Ontophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Insect Physiology*, 45: 45-53

- EMLÉN, D. J., NIJHOUT, H. F., 2001.** Hormonal control of male horn dimorphism in *Ontophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae): a second critical period of sensitivity to juvenile hormone. *Journal of Insect Physiology*, 47: 1045-1054
- EMLÉN, D. J., SZAFRAN Q., CORLEY, L. S., DWORKIN, I., 2006.** Insulin signalling and limb-patterning: candidate pathways for the origin and evolutionary diversification of beetle horns. *Heredity*, 97: 179-191
- EMLÉN, D. J., LAVINE, L. C., EWEN-CAMPEN, B., 2007.** On the origin and diversification of beetle horns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, suppl. 1: 8661-8668
- HEYROVSKÝ, L., 1955:** Tesáříkovití (Coleoptera: Cerambycidae) [Longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae)]. pp. 270-272. reedice *nakladatelství Kabourek, Zlín*, 1992
- HUNT J., SIMMONS, L. W., 1997.** Patterns of fluctuating asymmetry in beetle horns: an experimental examination of the honest signalling hypothesis. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 41: 109-114
- HUNT J., SIMMONS, L. W., 1998.** Patterns of parental provisioning covary with male morphology in a horned beetle *Ontophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 42: 447-451
- HŮRKA, K., 2005.** Brouci České a Slovenské republiky [Beetles of the Czech and Slovak Republics]. pp. 336-337. *nakladatelství Kabourek, Zlín*
- HUXLEY, J. S., TEISSIER, G., 1936.** Terminology of relative growth. *Nature*, 137: 780-781
- JAMESON M. L., 1997.** Phylogenetic Analysis of the Subtribe Rutelina and Revision of the *Rutela* Generic Groups (Coleoptera: Scarabaeidae: Rutelinae: Rutelini). *University of Nebraska State Museum*
- JENÍŠ I., 2008.** The Prionids of the World I: Illustrated Catalogue of the Beetles. *Kulturní Dědictví o. s.*
- KAWAI, S. HORI, S., KAWAHARA, M., INAGAKI, M., 2005.** Atlas of Japanese Scarabaeoidea, Vol. 1 Coprophagous group. *Roppon-Ashi Entomological Books, Tokyo*
- KAWANO, K., 1995.** Horn and wing allometry and male dimorphism in giant rhinoceros beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) of tropical Asia and America. *Annals of the Entomological Society of America*. 88: 92-99
- KIJIMOTO, T., COSTELLO, J., TANG., Z., MOCZEK, A. P., ANDREWS, J., 2009.** EST and microarray analysis of horn development in *Ontophagus* beetles. *BMC Genomics*. 10: 504
- KOJIMA, T., 2004.** The mechanism of *Drosophila* leg development along the proximodistal axis. *Development, Growth and Differentiation*, 46: 115-129
- LAWRENCE J. F. , BRITTON E. B., 1991:** Coleoptera (beetles), pp. 543-683 v CSIRO: Division of entomology (ed.) *The Insect of Australia*, 2nd ed., Vol. 2, Cornell University Press, Ithaca, N. Y.
- MADEWELL, R., MOCZEK, A. P., 2006.** Horn possession reduces maneuverability in the horn-dimorphic beetle, *Ontophagus nigriventris*. *Journal of Insect Science*, 6: 21
- MIZUNUMA, T., 1999.** Giant beetles (Euchirinae, Dynastinae). Endless Collection Series 3, *ESI Publ., Tokyo*
- MIZUNUMA, T., NAGAI, S., 1994.** The Lucanid Beetles of the World. *Mushi-Sha's Iconographic Series of Insects 1*, Fujita, H. ed., *Tokyo*
- MOCZEK, A. P., 1998.** Horn polyphenism in the beetle *Ontophagus taurus*: larval diet quality and parental investment determine adult body size and male horn morphology. *Behavioral Ecology*, 9: 636-641
- MOCZEK, A. P., EMLÉN, D. J., 2000.** Horn dimorphism in the scarab beetle, *Ontophagus taurus*: do alternative reproductive tactics favour alternative phenotypes? *Animal Behaviour*, 59: 459-466
- MOCZEK, A. P., 2003.** The behavioral ecology of threshold evolution in a polyphenic beetle. *Behavioral Ecology*, 14: 841-854
- MOCZEK, A. P., 2005.** The evolution and development of novel traits, or how beetles got their horns. *BioScience*, 55: 937-951
- MOCZEK, A. P., 2006A.** Integrating micro- and macroevolution of development through the study of horned beetles. *Heredity*, 97: 168-178
- MOCZEK, A. P., 2006B.** Pupal remodeling and the development and evolution of sexual dimorphism in horned beetles. *The American Naturalist*, 168: 711-729
- MOCZEK, A. P., 2007.** Pupal remodeling and the evolution and development of alternative male morphologies in horned beetles. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 151

- MOCZEK, A. P., CRUICKSHANK, T. E., SHELBY, A., 2006.** When ontogeny reveals what phylogeny hides: gain and loss of horns during development and evolution of horned beetles. *Evolution*, 60: 2329-2341
- MOCZEK, A. P., NAGY, L. M., 2005.** Diverse developmental mechanisms contribute to different levels of diversity in horned beetles. *Evolution & Development*, 7: 175-185
- MOCZEK, A. P., NIJHOUT, H. F., 2002.** Developmental mechanisms of threshold evolution in a polyphenic beetle. *Evolution & Development*.4: 252-264
- MOCZEK, A. P., NIJHOUT, H. F., 2004.** Trade-offs during the development of primary and secondary sexual traits in a horned beetle. *The American Naturalist*.163: 184-191
- MOCZEK, A. P., ROSE, D. J., 2009.** Differential recruitment of limb patterning genes during development and diversification of beetle horns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 8992-8997
- MOCZEK, A. P., ROSE, D. J., SEWELL, W., KESSELRING, B. R., 2006.** Conservation, innovation, and the evolution of horned beetle diversity. *Developmental Genes Evolution*, 216: 655-665
- NIJHOUT, H. F., EMLEN, D. J., 1998.** Competition among body parts in the development and evolution of insect morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 3685-3689
- OTRONEN, M., 1988.** Intra- and intersexual interactions at breeding burrows in the horned beetle, *Coprophaneus ensifer*. *Animal Behaviour*, 36: 741-748
- PALMER, T. J., 1978.** A horned beetle which fights. *Nature*, 274: 583-584
- RASMUSSEN, J.L., 1994.** The influence of horn and body size on the reproductive behavior of the horned rainbow scarab beetle *Phanaeus difformis* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Journal of Insect Behaviour*, 7: 67-82.
- ROWLAND, J.M., EMLEN, D. J., 2009.** Two thresholds, three male forms result in facultative male trimorphism in beetles. *Science*, 323: 773-776
- SHAFIEI M., MOCZEK, A. P., NIJHOUT, H. F., 2001.** Food availability controls the onset of metamorphosis in the dung beetle *Ontophagus taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Physiological Entomology*, 26: 173-180
- SHELBY A. J., MADEWELL, R., MOCZEK, A. P., 2007.** Juvenile hormone mediates sexual dimorphism in horned beetles. *Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)*, 308B: 417-427
- SHEPHERD B. L., PRANGE, H.D., MOCZEK, A. P., 2007.** Some like it hot: Body and weapon size affect thermoregulation in horned beetles. *Journal of Insect Physiology*, 54: 604-611
- SAKAI, K., NAGAI, S., 1998.** The Cetoniine Beetles of the World. *Mushi-Sha's Iconographic Series of Insects 3*, Fujita, H. ed., Tokyo
- SIMMONS, L. W., EMLEN, D. J., 2006.** Evolutionary trade-off between weapons and testes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103: 16346-16351
- SIMMONS, L. W., EMLEN, D. J., TOMKINS, J. L., 2007.** Sperm competition games between sneaks and guards: A comparative analysis using dimorphic male beetles. *Evolution*. 61: 2684-2692
- SIMMONS, L. W., TOMKINS, J. L., HUNT, J., 1999.** Sperm competition games played by dimorphic male beetles. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 266: 145-150
- SIVA-JOTHY, M. T., 1987.** Mate securing tactics and the costs of fighting in the Japanese horned beetle, *Allomyrina dichotoma* L. (Scarabaeidae). *Journal of Ethology*, 5: 165-172
- VENDL, T. , 2008.** Alometrie sekundárních pohlavních znaků u listorohých brouků (Coleoptera: Scarabaeoidea). nepubl. bakalářská práce, Katedra zoologie Karlovy univerzity v Praze
- WATSON, N. L., SIMMONS, L. W., 2010.** Mate choice in the dung beetle *Ontophagus sagittarius*: are female horns ornaments?. *Behavioral Ecology*, 21: 424-430
- YAMAZAKI, K., 2009.** Intraspecific behavioral interactions in *Toxicum funginum* Lewis, 1894 (Coleoptera: Tenebrionidae): dueling males and resident females. *The Coleopterists Bulletin*, 63: 509-512