

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Análisis filogenético de luciérnagas de Guatemala
(Coleoptera:Lampyridae)**

Trabajo de investigación presentado por Jose Andres Gutiérrez Godoy
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala
2022

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



**Análisis filogenético de luciérnagas de Guatemala
(Coleoptera:Lampyridae)**

Trabajo de investigación presentado por Jose Andres Gutiérrez Godoy
para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala
2022



Vo. Bo. Asesor (f) _____

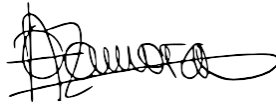
PhD Ana Gabriela Catalán Ramírez

Tribunal Examinador



Vo. Bo. Asesor (f) _____

PhD Ana Gabriela Catalán Ramírez



Vo. Bo. Asesor (f) _____

PhD Olga Alejandra Zamora Jerez



Vo. Bo. Asesor (f) _____

MSc Gabriela Alfaro Marroquín

Guatemala, 16 de junio de 2022

Agradecimientos a

Dra. Ana Catalán por el continuo apoyo durante el trabajo y la confianza para trabajar en este proyecto.

Dra. Alejandra Zamora por su asesoría y apoyo en el laboratorio de Biología molecular.

Dra. Viridiana Vega Badillo por el apoyo durante la identificación taxonómica de luciérnagas durante el proyecto.

Universidad Ludwig Maximilian University of Munich por los fondos utilizados en este proyecto.

Al departamento de Biología de la Universidad del Valle por el apoyo y recursos invertidos al proyecto.

Laboratorio de Entomología Sistemática por permitirme uso de su equipo e infraestructura.

Dr. Jiichiro Yoshimoto por el apoyo para utilizar el Laboratorio de Entomología Sistemática y su equipo.

Estudiantes de la Universidad de San Carlos de Guatemala y Universidad del Valle por facilitar colecta de individuos.

Índice

Agradecimientos a.....	v
Lista de cuadros	viii
Lista de figuras.....	ix
Sinopsis.....	xi
I. Introducción.....	1
II. Antecedentes.....	2
2.1 Características morfológicas de Lampyridae.....	2
2.2 Especie bandera	2
2.3 Ciclo de vida.....	2
2.4 Hábitat.....	3
2.5 Alimentación	4
2.6 Defensa química	4
2.7 Feromonas	5
2.8 Señales bioluminiscentes.....	5
2.9 Bioluminiscencia	6
2.10 Estudios filogenéticos de Lampyridae.....	7
2.11 Estudios en Guatemala	8
2.12 Especie bandera	8
2.13 Turismo sostenible	8
2.14 Amenazas	9
III. Objetivos.....	10
3.1 Objetivo general.....	10
3.2 Objetivos específicos	10
IV. Justificación	11

V. Metodología	12
5.1 Colecta de muestras	12
5.2 Trabajo de laboratorio	13
5.2.1 Identificación taxonómica	13
5.2.2 Extracción y cuantificación de ADN.....	15
5.2.3 PCR y secuenciación.....	15
5.3 Análisis bioinformático	16
5.3.1 Selección de modelo	16
5.3.2 Filogenia (Máxima versosimilitud e inferencia bayesiana).....	16
VI. Resultados	18
6.1 Resultados del trabajo de campo e identificación taxonómica.....	18
6.2 Extracción de ADN.....	26
6.3 PCR y secuenciación:.....	27
6.4 Alineamiento:	27
6.5 Análisis filogenético:	27
6.6 Loci 28s.....	28
6.7 Loci 18s.....	28
6.8 Loci COI.....	28
VII. Discusión.....	35
VIII. Conclusiones.....	38
IX. Bibliografía	39
X. Anexo	44

Lista de cuadros

CUADRO 1. Cebadores empleados en el estudio.....	15
CUADRO 2. Perfiles de amplificación de PCR.....	16
CUADRO 3. Identificación de especies Lampyridae de Guatemala.....	18
CUADRO 4. Mediciones taxonómicas utilizadas para la identificación de Lampyridae.....	26
CUADRO 5 . Extracción total y cuantificación ADN.....	26
CUADRO 6. Longitud individual y total de los alineamientos.	27
CUADRO 7. Selección de modelos evolutivos	27
CUADRO 8. Parámetros utilizados para análisis de Mr Bayes.....	28
CUADRO 9. Cuantificación de producto de PCR (18S) al finalizar limpieza.....	48
CUADRO 10. Cuantificación de producto de PCR(28S) al finalizar limpieza.....	49
CUADRO 11. Cuantificación de producto de PCR (COI) al finalizar limpieza.....	50
CUADRO 12. Secuencias generados para el loci 18s.....	51
CUADRO 13. Secuencias generados para el loci 28s.....	52
CUADRO 14. Secuencias generados para el loci COI.....	53
CUADRO 15. Taxones empleados y su número de accesoión de GenBank.....	54

Lista de figuras

FIGURA 1. Ciclo de vida de Lampyridae.	3
FIGURA 2. <i>Photuris</i> imitando patrón de luz para depredar luciérnagas.....	4
FIGURA 3. Estructura química de los principales componentes defensivos de <i>Photinus</i> y <i>Photuris</i>	5
FIGURA 4. Mapa con localidades de muestreo	13
FIGURA 5. Estructuras morfológicas de un adulto de Lampyridae.	14
FIGURA 6 Identificación morfológica de Lampyrinae.....	14
FIGURA 7. Fotografías de <i>Bycellonycha</i> sp2. (CL).....	20
FIGURA 8. Fotografías <i>Bycellonycha</i> sp 1. (2RH10)	20
FIGURA 9. Fotografías de <i>Photuris trivittata</i> (FC).....	21
FIGURA 10. Fotografías de <i>Photuris trivittata</i> (CD)	21
FIGURA 11. Fotografías de <i>Photuris</i> sp2.(LP)	22
FIGURA 12. Fotografías de <i>Photinus</i> sp1. (LA47).....	22
FIGURA 13. Fotografías de <i>Photinus pulchellus/ affinis</i> (RH7)	23
FIGURA 14. Fotografías de <i>Photinus picticollis</i> (VA).....	23
FIGURA 15. Fotografías de <i>Photinus cinctellus</i> (CC).....	24
FIGURA 16. Fotografías de <i>Photinus</i> sp4 (BP)	24
FIGURA 17. Fotografías de <i>Photinus</i> sp 5 (ER).....	25
FIGURA 18. Fotografías de <i>Aspisoma</i> sp1.	25
FIGURA 19. Árbol de máxima verosimilitud utilizando loci 28s.	29
FIGURA 20. Árbol de inferencia bayesiana utilizando Mr bayes (loci 28s).....	30
FIGURA 21. Árbol de máxima verosimilitud utilizando loci 18s.	31
FIGURA 22. Árbol de inferencia bayesiana utilizando Mr bayes (loci 18s).....	32
FIGURA 23. Árbol de máxima verosimilitud utilizando loci COI con clados colapsados.	33
FIGURA 24. Árbol de inferencia bayesiana utilizando Mr bayes (loci COI) con clados.....	34
FIGURA 25. Árbol de máxima verosimilitud utilizando loci COI	45

FIGURA 26. Árbol de inferencia bayesiana utilizando Mr bayes (loci COI).....46
FIGURA 27. Mapa con localidades de muestreo mostrando departamentos y municipios.47

Sinopsis

Las luciérnagas son uno de los grupos de insectos con mayor popularidad, principalmente por la presencia de señales bioluminiscentes a lo largo del proceso de cortejo. Su investigación en Latinoamérica es escasa y se enfoca en taxonomía tradicional basada en caracteres morfológicos. En la actualidad no se ha generado ningún tipo de información genética de luciérnagas guatemaltecas. Su identificación puede ser complicada y en múltiples ocasiones es necesario conocer el patrón de luz para identificar especies. Es necesario realizar investigaciones científicas que complementen los métodos de clasificación tradicional. El presente trabajo tiene como objetivo explorar la diversidad de luciérnagas en distintos departamentos de Guatemala, y realizar filogenias con genes mitocondriales y nucleares. Se recolectó especímenes de siete departamentos, los cuales fueron procesados para su identificación taxonómica, extracción de ADN, PCR y finalmente secuenciación bidireccional Sanger de los loci de interés. Posteriormente se generaron árboles filogenéticos empleando inferencia bayesiana y métodos de máxima verosimilitud. Se estarán posicionando las luciérnagas guatemaltecas dentro de la filogénia ya conocida para Lampyridae y así conocer sus relaciones filogenéticas. Lampyrinae y Photurinae se recuperaron como grupos no monofilético para los genes COI y 18s. Al contrario, para el gen 28s , ambos grupos se recuperaron como monofiléticos. Estos resultados indican que los genes 18s y COI pueden ser empleados para descifrar las relaciones filogenéticas de luciérnagas.

I. Introducción

Las luciérnagas (Coleoptera: Lampyridae) contribuyen a mantener estabilidad en la red trófica por su dinámica depredador-presa (Badruddin,2019). El estadio larval es un depredador feroz de invertebrados terrestres (caracoles, gusanos y babosas). Su preferencia hacia los caracoles es altamente beneficiosa para jardines y plantaciones agrícolas (Fallon *et al.*,2019). Asimismo, las luciérnagas son indicadores de buena salud ambiental de los sitios en donde se encuentran por su alta sensibilidad a contaminación lumínica y degradación de fuentes de agua (Zaragoza *et al.*, 2017).

Son reconocidas mundialmente por su llamativo comportamiento de cortejo, el cual consiste en múltiples patrones de luz coordinados entre hembras y machos. Asimismo, presentan especies diurnas y nocturnas que utilizan feromonas o patrones de luz específicos para la reproducción. Las especies diurnas no utilizan luz para la atracción de su pareja, en lugar, utilizan compuestos químicos y se encuentran activos durante el día. Las luciérnagas nocturnas emiten luces prolongadas o parpadeos de luz cortas como señales sexuales (Stanger-Hall *et al.*, 2018). Son un grupo cosmopolita con presencia en todo el mundo y cuentan con más de 2000 especies en 100 géneros (Lewis y Cratsley, 2008). Son un grupo con un ancestro común de aproximadamente 140 millones de años (Höhna *et al.*,2021). Las luciérnagas no son el único grupo que presenta luz ya que escarabajos de las familias Elateridae, Rhagophthalmidae y Phengodidae también son bioluminiscentes. Sin embargo los lampíridos es el grupo más estudiado (Fallon *et al.*, 2018).

El presente trabajo se enfocó en explorar la diversidad de luciérnagas en distintos departamentos de Guatemala, identificar taxonómicamente, generar secuencias genéticas y realizar filogenias con genes mitocondriales (COI) y nucleares (18s y 28s). Se recolectó especímenes de siete departamentos (Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Sololá, Zacapa, Chiquimula y Alta Verapaz), los cuales fueron procesados para su identificación taxonómica, extracción de ADN, PCR y finalmente secuenciación de los loci de interés. Se realizó secuenciación bidireccional Sanger de los productos de PCR generados (18s, 28s y COI) y posteriormente se generaron árboles filogenéticos empleando inferencia bayesiana y métodos de máxima verosimilitud. El principal objetivo de este estudio fue identificar las especies que se encuentran en Guatemala y comparar los resultados de filogenias realizadas en otras partes del mundo con las generadas en este estudio. Asimismo, se estarán posicionando las luciérnagas guatemaltecas dentro de la filogénia ya conocida para Lampyridae y así conocer sus relaciones filogenéticas. Lampyrinae y Photurinae se recuperaron como un grupo no monofilético para los genes COI y 18s. Al contrario, para el gen 28s, ambos grupos se recuperaron como monofiléticos. Estos resultados indican que los genes 18s y COI pueden ser empleados para descifrar las relaciones filogenéticas de luciérnagas.

II. Antecedentes

2.1 Características morfológicas de Lampyridae

La familia Lampyridae forma parte de la superfamilia Elateroidea. Presentan cuerpo blando, característica que comparten con Cantharidae, Lycidae, Phengodidae y Telegeusidae. Una de las características morfológicas más importantes es la presencia de órganos luminosos en la porción ventral del abdomen en estado larval y adulto. El pronoto es grande, aplanado, flexible y con bordes que cubren parcialmente la cabeza. Los ojos y cuello solamente se pueden observar cuando se movilizan. La forma del cuerpo es oval-alargada, pueden medir de 4 a 18mm de largo, color negro, café u olivo. Antenas generalmente formadas por 11 antenómeros, insertadas cerca de las mandíbulas. Palpos con cuatro segmentos que pueden estar modificados. El edeago es típicamente trilobulado y modificado a nivel de género o especie (Zaragoza *et al.*, 2017).

2.2 Especie bandera

Las especies banderas son especies con un alto reconocimiento mundial y atracción universal que aumentan la concientización ciudadana. Su conservación es fundamental para el manejo y control de hábitats grandes y para la protección de otras especies menos conocidas que tienen un papel importante en el ecosistema (Qian *et al.*, 2020). Las luciérnagas hacen un grupo bandera ideal por su encanto universal, belleza y valores espirituales y culturales. Al concientizar a la población de las luciérnagas y de sus requerimientos, es posible apoyar a la conservación de especies de fauna y flora que dependen de ecosistemas similares a los que se encuentran las luciérnagas. Asimismo, poder generar planes y estrategias de conservación de insectos que usualmente son grupos que se ignoran (Fallon *et al.*, 2019).

2.3 Ciclo de vida

Experimentan metamorfosis completa (huevo, larva, pupa y adulto) (**Figura 1**). Los huevostienen a ser redondos, blancos, cremas, amarillos o anaranjados dependiendo de la especie. Usualmente ponen sus huevos en un promedio de 30 por sitio. Los huevos presentan un tamaño diminuto (<1mm), que dificulta su observación sin ninguna herramienta de aumento (Faust, 2015). En algunas especies los huevos también son bioluminiscentes (Bessho-Uehara y Oba, 2017). En cuanto al estadio larval, este es el más largo. Normalmente, se pueden observar dos puntos bioluminiscentes al final del abdomen. La mayoría de larvas presentan hábitos subterráneos, terrestres o arbóreos dependiendo la especie (Faust, 2015). Por ejemplo, *Pyrausta nictitans* y *P. dispersa* tienen larvas semiacuáticas. En el continente asiático se pueden observar larvas completamente acuáticas como es el caso de *Luciola ficta* (Faust, 2015; Ho *et al.*, 2010). Este estadio es considerado el más activo ya que se alimentan de caracoles, gusanos y otras criaturas pequeñas que se encuentran en el suelo. La alimentación es fundamental para el desarrollo que puede variar dependiendo de los recursos disponibles (Fallon *et al.*, 2019; Lewis *et al.*, 2021).

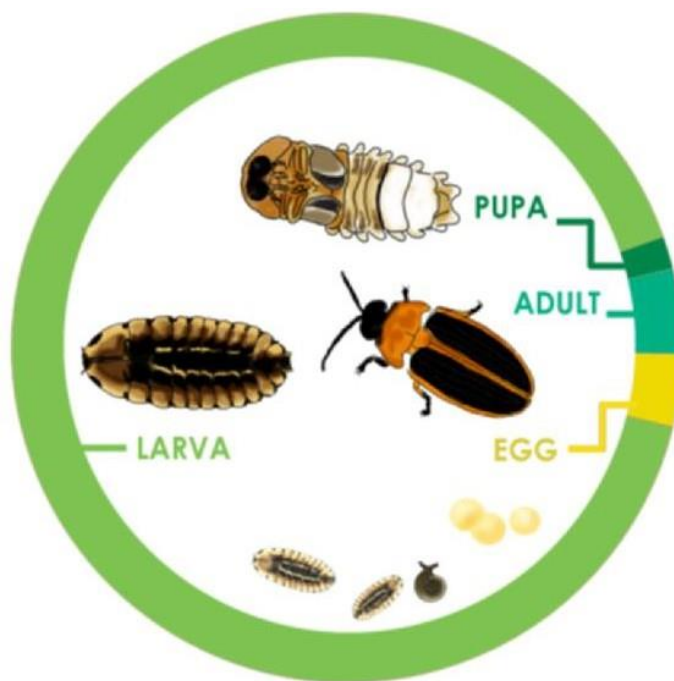


FIGURA 1. Ciclo de vida de Lampyridae.

Huevo (~3 semanas), larva (~1-2 años), pupa (~3 semanas) y adulto (~3-4 semanas) (Lewis *et al.*,2021).

2.4 Hábitat

La luciérnagas pueden ser localizadas en un amplio rango de hábitats: humedales, bosques, desiertos y depresiones de agua dulce. El mayor requerimiento es la presencia de humedad. La mayoría de especies son generalistas; sin embargo, hay excepciones como es el caso de *Pleotomodes* de Florida en el Sur de Estados Unidos. En esta especie, tanto las larvas como los adultos, se encuentran asociados a nidos de hormigas (Fallon *et al.*, 2019). Dependiendo del estadio en el que se encuentran, las luciérnagas requieren de microhábitats distintos. Huevos y larvas se pueden localizar en musgo, suelo, hojarasca o troncos podridos. Las pupas pueden ser encontradas en suelo, hojarasca, vegetación herbácea o troncos de árboles. En cuanto a las hembras neoténicas, las cuales generalmente no se movilizan de su sitio natal, utilizan ramas y hojas como refugio. Por el contrario, los adultos alados se pueden movilizar a través de la capa de dosel o vegetación emergente (Lewis *et al.*, 2020).

2.5 Alimentación

Las larvas son depredadores feroces y son el único estadio que se alimenta en la mayoría de especies. Las hembras del género *Photuris* y *Bicellychonia* son la excepción a esta regla, al ser depredadores especialistas de otras luciérnagas (**Figura 2**). Presentan la capacidad de imitar el patrón de luz de otras especies, principalmente de *Photinus* (Fallon *et al.*, 2019). Los ataques depredadores son realizados en el aire durante el vuelo, hacia machos receptores de la señal. Al alimentarse de otras luciérnagas, las hembras obtienen moléculas defensivas (lucibufaginas) que son empleadas para su protección y de los huevos. *Photuris* no produce estas moléculas por lo que necesita obtenerlas de sus presas (Stanger-Hall y Lloyd, 2015).



FIGURA 2. *Photuris* imitando patrón de luz para depredar luciérnagas. Ejemplares de *Photuris* hembras alimentándose de luciérnagas (Lewis *et al.*, 2021).

2.6 Defensa química

Múltiples taxones de Lampyridae son tóxicos y pueden presentar sabores desagradables para depredadores. Contienen sustancias que los protegen de vertebrados (lagartijas, mamíferos, aves, artrópodos y peces) (Eisner *et al.*, 2006). La molécula responsable de este fenómeno es denominada lucibufaginas, cuyo nombre es derivado por su estructura química similar al esteroide del veneno de los sapos chinos, bufalina (Eisner *et al.*, 1997). Adicionalmente, los patrones de coloración de Lampyridae, usualmente negro, rojo, amarillo y naranja, pueden ser señales aposemáticas para depredadores (Stanger-Hall y Lloyd, 2015).

En el caso de *Photuris versicolor*, esta contiene una sustancia defensiva que solamente se encuentra en esta especie, la cual es el N-Methylquinolinium 2-carboxylato (**Figura 3**). Esta molécula se encuentra en machos y larvas de *P. versicolor* también tiene la capacidad de transmitir las lucibufaginas capturadas del consumo de individuos de *Photinus* (González *et al.*, 1999).

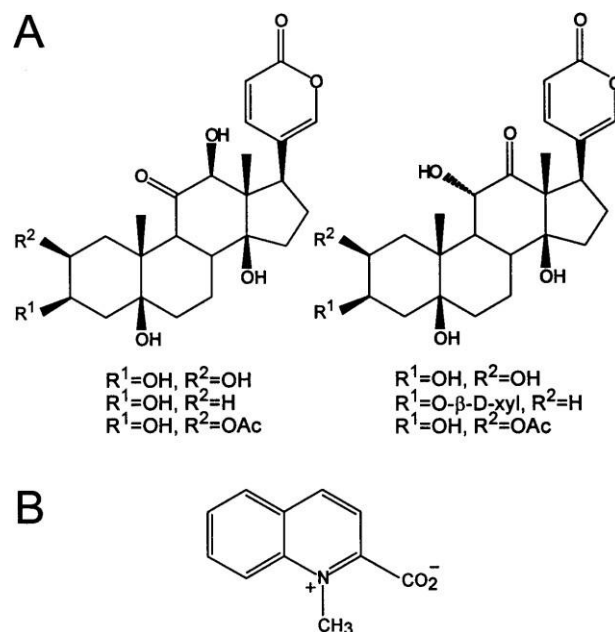


FIGURA 3. Estructura química de los principales componentes defensivos de *Photinus* y *Photuris*: A: Estructura química de lucibufaginas en las especies del género *Photinus*. B: Estructura química N-Methylquinolinium 2-carboxylato en *Photuris versicolor* (González *et al.*, 1999).

2.7 Feromonas

Las especies diurnas no son capaces de la producción biolumínica y dependen solamente de compuestos volátiles (feromonas) para atraer pareja. Existe evidencia del uso de feromonas por parte de especies diurnas (*Lucidota atra*, *Pyropyga nigricans*, *Photinus indictus*, *Phosphaenus hemipterus* y *Lucidina biplagiata*). Asimismo, las hembras de especies nocturnas utilizan una combinación de feromonas y bioluminiscencia (Lewis y Cratsley, 2008). Las feromonas son liberadas por parte de las hembras en sitios altos y abiertos o en el suelo como es el caso de *Lampyris* y *Lamprohiza* para la atracción de machos (Stanger-Hall *et al.*, 2018).

2.8 Señales bioluminiscentes

Los destellos de luz son utilizados como señal sexual por parte de la mayoría de luciérnagas nocturnas. Hembras y machos utilizan señales de luz específicas que identifican la especie y el sexo de su posible pareja (Stanger-Hall y Lloyd, 2015). En especies de los géneros *Microphotus*, *Lamprohiza* y *Lampyris* los machos son atraídos por los destellos continuos y modulados emitidos por hembras neoténicas. Por otro lado, *Photinus* y *Pyraetomena* tienden a emplear un sofisticado sistema de comunicación en donde existe intercambio de señales hasta que la copulación finaliza (Lewis y Cratsley, 2008).

2.9 Bioluminiscencia

La bioluminiscencia es un mecanismo utilizado por animales como señal sexual y aposemática. Dentro de Coleoptera solamente ocurre en: Elateridae, Rhagophthalmidae, Phengodidae, Lampyridae (Martin, 2014). La ruta química de bioluminiscencia, incluyendo la estructura de las luciferasas, es similar entre estas familias (Martin *et al.*, 2017). Todas las larvas de luciérnagas presentan luz y se hipotetiza que esta es usada como señal aposemática. En adultos la bioluminiscencia es adicionalmente utilizada durante el cortejo. Los lampíridos son capaces de producir luz por una reacción de dos pasos. La luciferasa cataliza la adenilación Mg-ATP dependiente del sustrato luciferina. Seguimiento de reacciones dependientes de oxígeno que resultan en emisión de luz. El color puede variar de amarillo (546 nm) a naranja (590 nm) a pesar que la estructura de luciferina es idéntica en todas las especies. Se hipotetiza que estos cambios de coloración se deben a modificaciones del sitio activo de la enzima luciferasa y al microambiente que se encuentran (Lewis y Cratsley, 2008; Fallon *et al.*, 2019).

La bioluminiscencia es generada por órganos fotogénicos, histológicamente similares a tejido adiposo. En larvas de *Phengodes*, el órgano fótico consiste en un fotocito individual de gran tamaño (Viviani, 2002). En el caso de *Photinus* y *Photuris* que presentan patrones de luces intermitentes, el órgano de luz consiste de miles de fotocitos dispuestos en rosetas impregnados por traqueolas y nervios. El oxígeno es suplementado por traqueolas y la bioluminiscencia es controlada neuralmente (Viviani, 2002). Análisis genéticos han mostrado la similitud de los genes de luciferasas con las secuencias genéticas que codifican proteínas que rompen grasa, sugiriendo que la luciferasa ancestral tuvo un posible origen por medio una duplicación en un gen metabólico (Fallon *et al.*, 2019).

El gasto energético de la producción de bioluminiscencia ha sido estudiado utilizando un respirómetro diferencial de flujo abierto. Sorprendentemente, el gasto metabólico no es alto y sugiere que el costo de mantener la capacidad bioluminiscente es mínima. En el ritual de cortejo el mayor gasto se da por el vuelo de los machos buscando pareja (Woods *et al.*, 2007).

La luciferasa ha sido empleado durante décadas en la investigación biomédica y biotecnológica para visualizar transmisión de VIH, detección de coágulos sanguíneos, monitorear crecimiento de tumores y otros usos en biología molecular (Fallon *et al.*, 2019). Recientemente, ha existido un alto interés de la industria de la biotecnología en utilizar la enzima de las luciérnagas para desarrollar una luciferasa con propiedades mejoradas que se adapten a múltiples aplicaciones. Específicamente se desea desarrollar luciferasas mutantes de luciérnagas que puedan ser estables a cambios de pH, temperatura y actividad proteolítica (Syed y Anderson, 2021).

2.10 Estudios filogenéticos de Lampyridae

Es la ciencia que se encarga de reconstruir la historia evolutiva de la vida en la tierra. Tradicionalmente, las filogenias se construían únicamente utilizando caracteres morfológicos. La introducción de las técnicas de PCR y secuenciación Sanger a final de la década de los 70s ha permitido la inclusión de información genética y de esta forma crear las primeras filogenias moleculares. La inclusión de datos genéticos ha desafiado hipótesis ampliamente aceptadas acerca de relaciones filogenéticas entre grupos de animales y plantas. El uso de genes nucleares específicamente la región del 28s y 18s ha sido útil para resolver relaciones de insectos (Miller *et al.* 2007; Lord *et al.* 2010). Sin embargo, las filogenias de loci limitados utilizando la tecnología Sanger presentan limitaciones como: posibles errores de muestreo y arboles filogenéticos con soporte bajo (Young y Gillung, 2020).

Actualmente, la filogenética depende de información extraída de material genético como ADN, ARN o secuencias de proteínas (Munjal, Hanmandlu y Srivastava, 2018). Este campo ha experimentado grandes cambios en las últimas dos décadas, especialmente por el desarrollo de técnicas de Secuenciación de Nueva Generación (SNG. Las técnicas de SNG han revolucionado la secuenciación de ADN) reduciendo dramáticamente los precios y aumentando la generación de información. Esto ha facilitado la generación de secuencias genéticas tanto de organismos modelos como de no modelos (Young y Gillung, 2020). Este desarrollo ha transformado el campo de filogenética molecular a filogenómica (Mardis, 2011).

Investigar las relaciones evolutivas de las luciérnagas ha sido un tema de gran interés. El primer estudio en realizar filogenias utilizando marcadores mitocondriales (16s), se realizó en Japón analizando 27 especies de lampíridos del área (Susuki,2007). Posteriormente, se generó la primera filogenia de Norte América utilizando 26 especies pertenecientes a 16 géneros. Los resultados de dicho estudio mostraron que las luciérnagas norte americanas no forman un grupo monofilético (Stranger-Hall *et al.*,2007).

Se reconstruyó la filogenia utilizando análisis morfológico con mayor número de muestras cubriendo al ~80% de géneros de Lampyridae. Jeng, reclasificó a la familia Lampyridae para incluir a nueve subfamilias. En su análisis 8 familias se recuperaron como monofiléticas a excepción de Otoretinae. Se sugirió su división en dos grupos: Otoretinae monofilético y pan-Ototretinae parafilético (Ototretinae no tradicionales y la subfamilia Ototretadrilinae) (Jeng, 2008).

En estudios más recientes, los cuales incorporaron datos genéticos y morfológicos, se determinó que todas las subfamilias en el análisis son monofiléticas a excepción de Lampyrinae (Martin , 2014 ;Martin *et al.*,2017). La filogenia de alto nivel utilizando 436 loci fue el primer análisis en utilizar datos genómicos para actualizar la clasificación de alto nivel de este grupo dentro de un marco filogenético. En este análisis, Lampyrinae se

recuperó como un grupo polifilético y Photurinae como parafilético por la inclusión de *Vesta* (Martin *et al.*,2019). Utilizando el set de datos de Martin (Martin *et al.*,2019) . Se generó un árbol calibrado en donde se estima la edad de Lampyridae. Se estima a 139.85 millones de años, resultado mayor a estudios previos en donde el número de muestras fue menor. Esta información generada es fundamental para realizar hipótesis acerca de la historia biogeográfica de Lampyridae (Höhna *et al.*,2021). Realizar filogenias de luciérnagas es importante para deducir su historia evolutiva, clasificar especies taxonómicamente y estudiar especializaciones ecológicas de este grupo (señales sexuales y bioluminiscencia).

2.11 Estudios en Guatemala

Biología Centrali-America es el primer manuscrito que describe la diversidad de Insecta en Guatemala, se han reportado al menos 14 géneros de Lampyridae (Gorham,1881). En Guatemalalas luciérnagas no han sido estudiadas profundamente. En la literatura primaria las publicaciones son limitadas. En un estudio se describió la fenología de distintas especies de Lampyridae en un sitio urbano de la ciudad de Guatemala. Las observaciones se realizaron durante ocho años y se describió el patrón de luz de once especies pertenecientes a cuatro géneros (*Ellychnia*, *Photuris*, *Photinus* y *Bicellonycha*) (Schuster,1997). En el resto de Centroamérica la situación es similar. Guatemala es un país megadiverso por su posición geográfica y debido al alto número de ecosistemas presentes (Cano *et al.*, 1999)por lo que es importante explorar y conservar la diversidad que ofrece el país. Este estudio generará información genética que puede ser útil para realizar esfuerzos de conservación basándose en investigación científica.

2.12 Especie bandera

Las especies banderas son especies con un alto reconocimiento mundial y atracción universal que aumentan la concientización ciudadana. Su conservación es fundamental para el manejo y control de hábitats grandes y para la protección de otras especies menos conocidas que tienen un papel importante en el ecosistema (Qian *et al.*, 2020). Las luciérnagas hacen un grupo bandera ideal por su encanto universal, belleza y valores espirituales y culturales. Al concientizar a la población de las luciérnagas y de sus requerimientos, es posible apoyar a la conservación de especies de fauna y flora que dependen de ecosistemas similares a los que se encuentran las luciérnagas. Asimismo, poder generar planes y estrategias de conservación de insectos que usualmente son grupos que se ignoran (Fallon *et al.*,2019).

2.13 Turismo sostenible

Las luciérnagas debido a su alto reconocimiento y belleza durante su cortejo han llamado la atención de millones de visitantes en todo el mundo. En Asia es una atracción que se ha realizado por múltiples años, recientemente se ha vuelto un fenómeno mundial (Fallon *et al.*,2019). El turismo de luciérnagas puede brindar beneficios económicos a múltiples poblaciones rurales. Se estima que 12 países que cuentan con turismo de luciérnagas anualmente atraen a más de un millón de visitantes. Mostrando que puede existir un posible mercado para esta actividad. Sin embargo, es necesario tomar en consideración ciertos aspectos como: la protección del hábitat, involucrar a las comunidades en las decisiones y brindar entrenamiento a los guías y turistas para realizar un proyecto de ecoturismo exitoso (Lewis *et al.*, 2021).

2.14 Amenazas

Historias verbales documentan el declive de las poblaciones de luciérnagas alrededor del mundo. Lastimosamente, no se han realizado suficientes esfuerzos para investigar el nivel de estos declives. Se tiene una idea de las principales causas del declive que incluyen: pérdida de hábitat, contaminación lumínica, uso excesivo de pesticidas, mala calidad de agua, cambio climático e introducción de especies invasivas (Fallon *et al.*, 2019). La pérdida, degradación y fragmentación de hábitat es la amenaza más grande de las luciérnagas (Lewis *et al.*, 2021). El desarrollo de todas las fases (huevo, pupa y larva) y la reproducción de adultos tienden a ocurrir a nivel de suelo. Cualquier actividad que afecte el suelo puede tener un efecto negativo en las poblaciones (Fallon *et al.*, 2019). La pérdida de hojarasca en sitios urbanos es una preocupación, debido a que son necesarios para el desarrollo de larvas. Asimismo, el 25% de las hembras a nivel mundial carecen de alas funcionales y no pueden volar. Estas especies corren mayor riesgo de sufrir aplastamientos (Lewis *et al.*, 2020).

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Determinar las relaciones filogenéticas de las diferentes especies de luciérnagas en Guatemala.

3.2 Objetivos específicos

- Ampliar el conocimiento de la diversidad de Lampyridae en Guatemala.
- Generar las primeras secuencias genéticas de Lampyridae en Guatemala.
- Generar árboles filogenéticos utilizando métodos bayesianos y de máxima verosimilitud empleando genes nucleares y mitocondriales.

IV. Justificación

El grupo de las luciérnagas presenta una historia evolutiva fascinante; no obstante, su investigación se ha visto limitada principalmente a Estados Unidos, Canadá, Asia y ciertas partes de Europa. Las investigaciones científicas de estos organismos en Latinoamérica, son prácticamente nulas y se han enfocado principalmente en taxonomía tradicional de caracteres morfológicos. En la actualidad, no existe ninguna investigación en la región que se enfoque en generar información genética. Tradicionalmente se utilizan caracteres morfológicos para la clasificación de especies, es necesario complementar con técnicas moleculares. Contribuir con la información genética de este grupo es una urgencia, principalmente en zonas de alta diversidad como Guatemala en donde las luciérnagas no han sido estudiadas extensamente. Asimismo, este grupo presenta importancia evolutiva, cultural, económica y ecológica.

Las luciérnagas son insectos icónicos con alto reconocimiento global por su bioluminiscencia, colocándolos como un posible grupo bandera para la conservación de insectos. Usualmente los invertebrados son ignorados en esfuerzos de conservación global por lo que es fundamental aumentar la conciencia ciudadana y simpatía política para generar planes de conservación efectivos.

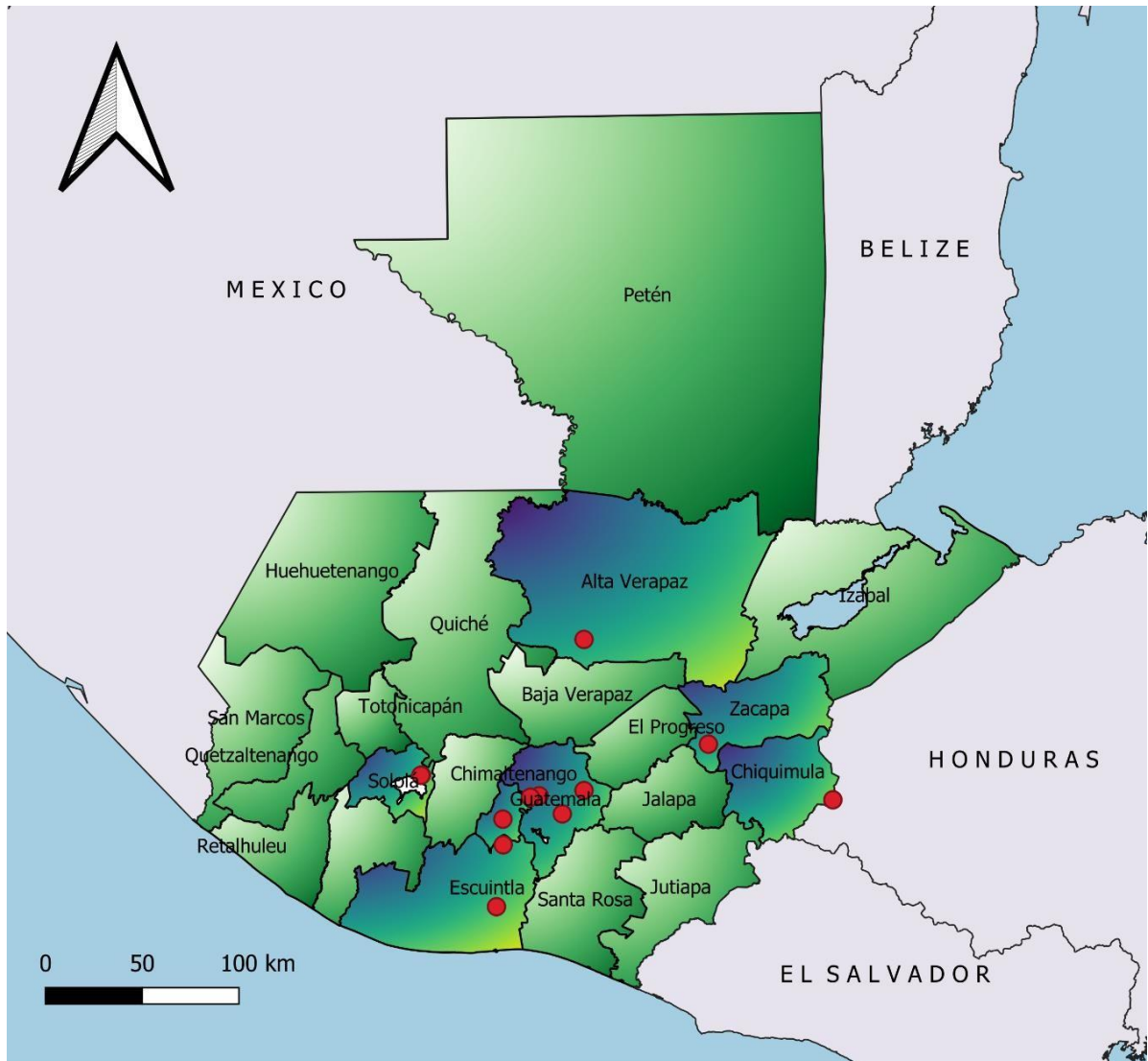
Existe una nueva tendencia de ecoturismo de observación de luciérnagas. Recientemente en México, se descubrieron grandes poblaciones de luciérnagas que han promovido un ecoturismo sostenible en esta región, abriendo la posibilidad de un mercado (de ecoturismo) para contemplar el show de cortejo de luciérnagas. En Guatemala se podría implementar esta medida de turismo de bajo impacto que pueda aumentar el flujo económico de comunidades rurales y de esta forma promover el desarrollo sostenible. De igual forma, las luciérnagas han sido de gran interés por la enzima luciferasa empleada en el campo de biomedicina, biotecnología y biología molecular.

Finalmente, las luciérnagas se han propuesto como un prometedor control biológico. Los caracoles terrestres en múltiples partes del mundo se consideran plagas que causan pérdidas monetarias considerables. Las larvas de luciérnagas se alimentan principalmente de caracoles terrestres que se reportan como plagas de cultivos (Fu y Meyer-Rochow, 2013). Realizar un mayor número de investigaciones es necesario para comprender a profundidad este grupo. Esta investigación es el primer intento que se ha realizado de estudiar las relaciones filogenéticas de las especies de luciérnagas en Guatemala, lo cual es importante para conocer su estatus taxonómico y su historia evolutiva.

V. Metodología

5.1 Colecta de muestras

Las colectas de luciérnagas se realizaron en múltiples sitios de Guatemala. Se recolectaron muestras de cuatro sitios urbanos en la periferia de la ciudad de Guatemala y siete sitios rurales en seis departamentos (Escuintla, Sacatepéquez, Sololá, Zacapa, Chiquimula y Alta Verapaz) (**Figura 4**). Las colectas se realizaron en un horario nocturno (18.00-20.00) utilizando redes entomológicas para la colecta de los individuos. Se registró el tiempo, temperatura y localidad. Los individuos se colocaron en tubos eppendorf de colecta (1.5mL) y al finalizar fueron transferidos a nuevos tubos de 1.5mL previamente esterilizados en autoclave, con 1mL de etanol 95% para conservar el ADN. Posteriormente las muestras se almacenaron a -20°C en un laboratorio del Departamento de Biología de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG).



● Puntos de muestreo

Departamentos

FIGURA 4. Mapa con localidades de muestreo.

Puntos rojos corresponden a sitios de colecta en los diferentes departamentos (Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Sololá, Zacapa, Chiquimula y Alta Verapaz).

5.2 Trabajo de laboratorio

5.2.1 Identificación taxonómica

Los individuos se identificaron utilizando distintas guías de Lampyridae (Buschman, 2016; Luk *et al.*, 2011; Zaragoza-Caballero *et al.*, 2020). Se observó la forma del pronoto (ojival, semicircular), partes bucales (clípeo, mandíbulas, palpos maxilares y labiales). Se midió el ancho: de la cabeza, del pronoto, la distancia interantenal, las fosas antenales, la distancia interocular, del ojo y de los élitros. Se midió: la longitud total del individuo, de los palpos

maxilares y las antenas (antennomeros). Asimismo, se midió el largo de la cabeza, del pronoto, del ojo, de los élitro y de los primeros seis esternitos (**Figura 5 y 6**).

Adicionalmente, se realizaron disecciones del órgano sexual (edeago)(**Figura 6**). Con el apoyo de una pinza entomológica y etanol, se diseccionó el pigidio en donde se encuentra el órgano sexual. El edeago se observó en estereoscopio y se realizaron fotografías laterales, ventrales y dorsales. Por último, la Dra. Viridiana Vega Badillo apoyo con la identificación.

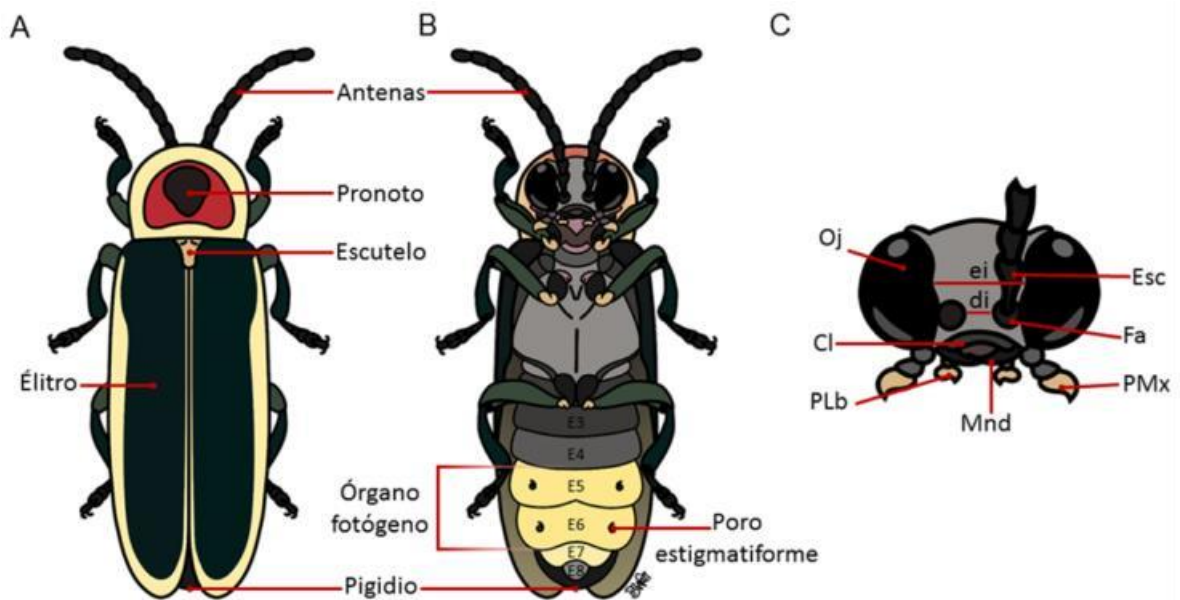


FIGURA 5. Estructuras morfológicas de un adulto de Lampyridae. Diagrama mostrando las estructuras morfológicas cruciales para la identificación taxonómica. A) Vista dorsal, B) vista ventral, C) cabeza; cl = clípeo, di = distancia interocular, ei = espacio interocular, Esc = escapo, Fa = fosita antenal, Mnd = mandíbulas, Oj = ojo, PLb = palpo labial y PMx = palpo maxilar. (Zaragoza-Caballero *etal.*,2020).

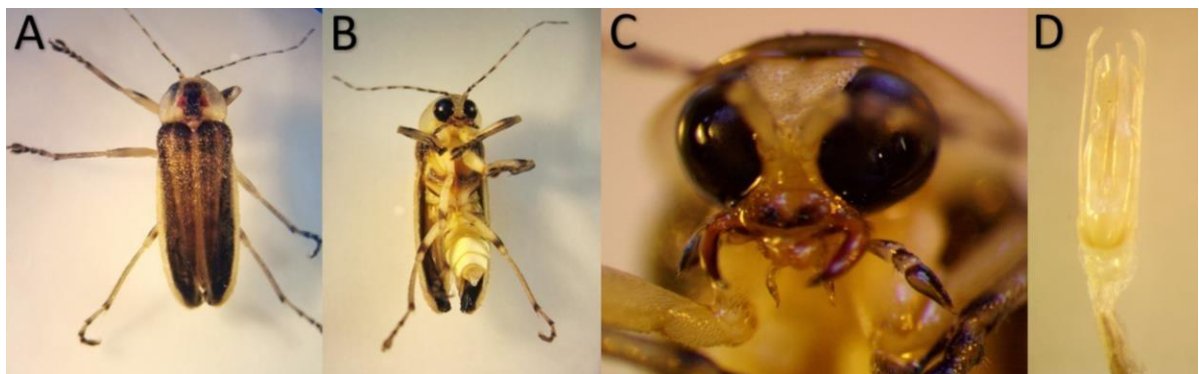


FIGURA 6 Identificación morfológica de Lampyrinae. Fotografías de *Photuris trivittata* (RC). A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral. C: corresponde a palpos maxiliares y labiales y D: corresponde a edeago en vista ventral.

5.2.2 Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit comercial Promega Wizard® Genomic DNA Purification de acuerdo a las instrucciones del fabricante utilizando la metodología sugerida para tejido animal. Para la extracción, se maceró el cuerpo completo de la luciérnaga utilizando micro pistilos previamente autoclaveados a excepción del órgano sexual que se utilizó para la identificación taxonómica. La cuantificación se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro de bajo volumen Nanodrop (Thermofisher). Se cargó 2.0 µL de muestra y se midió la concentración de ADN (ng/µL), absorbancia a A260A/280 y A260/A230. Finalmente, se realizó una electroforesis de ADN utilizando agarosa al 1% (60mL Buffer TBE, 0.6g agarosa y 1µL de Gelred) para comprobar la integridad del ADN.

5.2.3 PCR y secuenciación

Todas las muestras se diluyeron a una concentración estándar de 20ng/µL antes de comenzar con la reacción de PCR. La reacción de PCR se realizó con un volumen final de 60 µL (30µL GoTaq Hot Start Colorless Master Mix 2x(Promega), 25.6 µL H2O ultra pura, 1.2 µL cebador forward , 1.2 µL cebador reverse y 2 µL ADN). Los cebadores fueron seleccionados en base a investigaciones previas (**Cuadro 1**) (Baldwin *et al.*,1996; Stanger-Hall *et al.*, 2007; Whiting *et al.*, 1997).

CUADRO 1. Cebadores empleados en el estudio.

La investigación empleará 2 cebadores nucleares (18S* y 28S*) y un mitocondrial (COI) respectivamente.

	Cebador	Secuencia	Fuente
28S(*)	F2	AGAGAGAGAGTTCAAGAGTACGTG	Belshaw <i>et al.</i> (2001)
	3DR	TAGTTCACCATCTTTCGGGTC	Belshaw <i>et al.</i> (2001)
18S(*)	18S a0.7	ATTAAAGTTGTTGCGGTT	Whiting (2002)
	18S bi	GAGTCTCGTTCGTTATCGGA	Whiting (2002)
COI	LCO	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Baldwin <i>et al.</i> (1996)
	HCO	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATC A	Baldwin <i>et al.</i> (1996)

(Baldwin *et al.*,1996; Belshaw *et al.*,2001; Whiting. 2002).

CUADRO 2. Perfiles de amplificación de PCR

	Hot start	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Extensión final	Ciclos
28S	95°C(2min)	94°C(45s)	59°C(45s)	72°C(60s)	72°C(7min)	28
18S	95°C(2min)	95°C(45s)	55°C(45s)	72°C(60s)	72°C(15min)	28
COI	95°C(2min)	94°C(60s)	44°C(46s)	72°C(60s)	72°C(10min)	30

(Martin *et al.*,2017; Stanger-Hall *et al.*, 2007).

Se utilizaron dos cebadores nucleares y un cebador mitocondrial (**Cuadro 1**), empleando los perfiles de amplificación descritos en el **Cuadro 2**. Para comprobar los resultados del PCR, se realizó electroforesis utilizando geles de agarosa al 1%, corriendo el gel durante 45 minutos a 100 voltios. Se verificó la presencia de bandas en el gel utilizando un transluminador UV. Para la limpieza del amplicon se utilizó el kit comercial ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System según las instrucciones del fabricante. El producto de PCR, se cuantificó según la metodología descrita anteriormente. Finalmente, el producto de PCR se secuenció en Macrogen, Corea del Sur.

5.3 Análisis bioinformático

Los cromatogramas generados de la secuenciación Sanger fueron utilizados para formar secuencias consenso utilizando Geneious (**Cuadro 12, 13 y 14.**) (Kearse *et al.*,2012). Asimismo, se extrajeron secuencias de GenBank utilizando Biopython con la etiqueta del taxón de luciérnagas y el loci de interés (“Lampyridae AND 28s”; “Lampyridae AND 18s”, “Lampyridae AND COI”). Las secuencias generadas para las distintas especies de luciérnagas de Guatemala, fueron alineadas utilizando MAFFT (versión 7.487) (Katoh *et al.*, 2019). Posteriormente, se realizó un alineamiento manual empleando Aliview (Larsson, 2014).

5.3.1 Selección de modelo

El modelo apropiado de evolución fue determinado por JModelTest2 y Modelfinder implementado en IQTREE utilizando AIC y BIC como criterios de información para seleccionar el modelo que represente mejor los datos (**Cuadro 7**) (Posada, 2008). A diferencia de JModelTest2, Modelfinder incorpora un modelo de frecuencia de heterogeneidad a lo largo de los sitios (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017).

5.3.2 Filogenia (Máxima versosimilitud e inferencia bayesiana)

Se utilizaron las secuencias consenso y las secuencias publicadas anteriormente en Genbank (**Cuadro 15**) como ingroups. Existe un amplio debate en cuanto al grupo hermano de Lampyridae (Ge *et al.*,2022). Se seleccionaron tres taxones como outgroup: Cantharidae,

Lycidae y Phengodidae. Todos los set de datos fueron analizados utilizando el método de máxima verosimilitud implementado en IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2015), empleando el algoritmo de bootstap ultra rápido con 1,000 réplicas , utilizando el siguiente comando: `iqtree -s name_file -m TEST -bb 1000 -alrt 1000` en la terminal de Linux (Minh *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se utilizó Mr Bayes 3.2.7 para realizar inferencia bayesiana (BI) para comparar los resultados del árbol de máxima verosimilitud generado en IQTREE. El análisis se realizó según a los parámetros del **Cuadro 8** (Ronquist *et al.*, 2012).

VI. Resultados

6.1 Resultados del trabajo de campo e identificación taxonómica

Se colectaron e identificaron 32 especímenes perteneciendo a 4 géneros (*Photinus*, *Photuris*, *Bycellonycha* y *Aspisma*). Contando con el apoyo de la Dra. Viridiana Vega Vadilla se pudo identificar múltiples luciérnagas a nivel de especie. Sin embargo, es necesario mencionar que la identificación se realizó por medio electrónico (fotos y mediciones) por lo que la identificación se debe de tomar con cautela (**Cuadro 3**). Las mediciones taxonómicas mencionadas previamente en metodología, se pueden visualizar en el **Cuadro 4**.

Se completó exitosamente 32 extracciones de ADN con buena calidad para la mayoría de muestras (**Cuadro 5**). Se secuenció bidireccionalmente utilizando tecnología Sanger 71 secuencias en total para los tres loci utilizados (18s, 28s y COI) (**Cuadro 6**). Los análisis filogenéticos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana se completaron de acuerdo a los parámetros mencionados en los **Cuadros 7 y 8**. Se pueden visualizar en las **Figuras 16-21**.

CUADRO 3. Identificación de especies Lampyridae de Guatemala.

Código de identificación	Género	Especie	Pseudoespecie	Sitio de colecta	Fecha de colecta
LA5	<i>Photinus</i>	-	sp1	Lomas de Atitlán	26/06/2021
LA18	<i>Photinus</i>	-	sp1	Lomas de Atitlán	28/06/2021
LA30	<i>Photinus</i>	-	sp1	Lomas de Atitlán	30/06/2021
LA44	<i>Photinus</i>	-	sp1	Lomas de Atitlán	03/07/2021
CD1	<i>Photuris</i>	<i>trivittata</i>	-	Zona 15, Ciudad de Guatemala	08/05/2021
CD2	<i>Photuris</i>	<i>trivittata</i>	-	Zona 15, Ciudad de Guatemala	08/05/2021
FC6	<i>Photuris</i>	-	sp1	Finca Colombia Sacatepéquez	01/05/2021
FC7	<i>Photuris</i>	-	sp1	Finca Colombia Sacatepéquez	01/05/2021
FC8	<i>Photuris</i>	-	sp1	Finca Colombia Sacatepéquez	01/05/2021
RH8	<i>Photinus</i>	<i>pulchellus/affinis</i>	-	Reserva del Heloderma, Zacapa	23/07/2021
RH13	<i>Photinus</i>	<i>pulchellus/affinis</i>	-	Reserva del Heloderma, Zacapa	23/07/2021
RH24	<i>Photinus</i>	<i>pulchellus/affinis</i>	-	Reserva del Heloderma, Zacapa	24/07/2021
2RH8	<i>Bicellonycha</i>	-	sp1	Reserva del Heloderma, Zacapa	11/09/2021

Código de identificación	Género	Especie	Pseudoespecie	Sitio de colecta	Fecha de colecta
RH3	<i>Aspisoma</i>	-	sp1	Reserva del Heloderma , Zacapa	
2RH9	<i>Aspisoma</i>	-	sp1	Reserva del Heloderma , Zacapa	11/09/2021
RC1	<i>Photuris</i>	<i>trivittata</i>	-	Rubel Chaim ,Alta Verapaz	28/08/2021
RC2	<i>Photuris</i>	<i>trivittata</i>	-	Rubel Chaim ,Alta Verapaz	28/08/2021
CL2	<i>Bicellonycha</i>	-	sp2	Costa Linda, Escuintla	10/07/2021
LP08	<i>Photuris</i>	-	sp2	Las Pozas, Chiquimula	7/08/2021
LP17	<i>Photuris</i>	-	sp2	Las Pozas, Chiquimula	7/08/2021
VA06	<i>Photuris</i>	<i>picticollis</i>	-	Volcán de Agua	04/09/2021
VA07	<i>Photuris</i>	<i>picticollis</i>	-	Volcán de Agua	04/09/2021
VA08	<i>Photinus</i>	<i>picticollis</i>	-	Volcán de Agua	04/09/2021
VA10	<i>Photinus</i>	<i>picticollis</i>	-	Volcán de Agua	04/09/2021
BP14	<i>Photinus</i>	-	sp4	Bosque Palencia	13/05/2021
BP15	<i>Photinus</i>	-	sp4	Bosque Palencia	13/05/2021
ER02	<i>Photinus</i>	-	sp5	El Ronconal	15/05/2021
ER03	<i>Photinus</i>	-	sp5	El Ronconal	15/05/2021
CC02	<i>Photinus</i>	<i>cinctellus</i>	-	San Juan , Ciudadde Guatemala	23/05/2021
CC03	<i>Photinus</i>	<i>cinctellus</i>	-	San Juan , Ciudad de Guatemala	23/05/2021
CC26	<i>Photinus</i>	<i>cinctellus</i>	-	San Juan , Ciudadde Guatemala	23/05/2021
CC27	<i>Photinus</i>	<i>cinctellus</i>	-	San Juan , Ciudad de Guatemala	23/05/2021

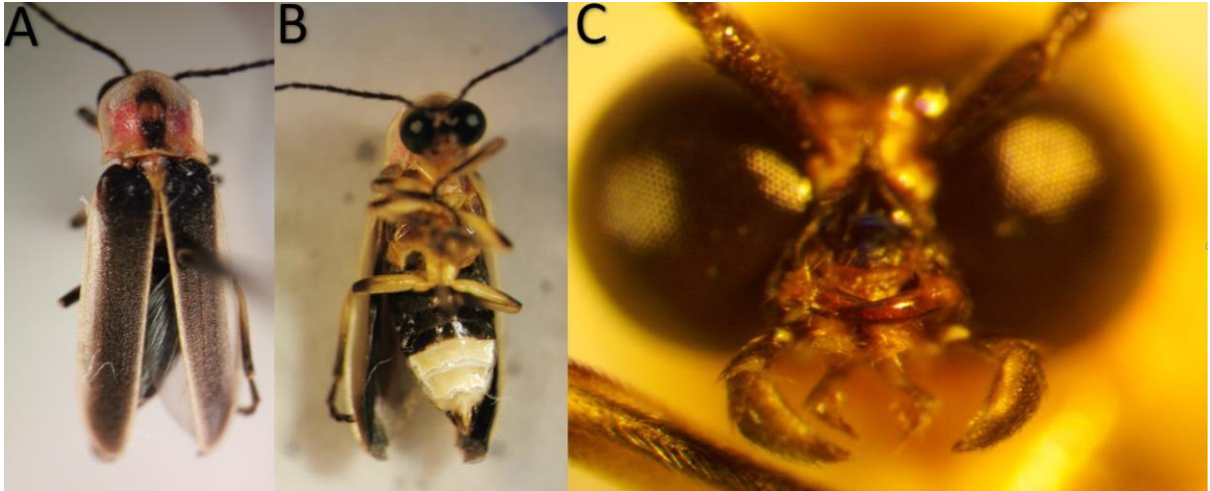


FIGURA 7. Fotografías de *Bycellonycha sp2.* (CL)
 A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral. C: corresponde a palpos maxiliares y labiales.

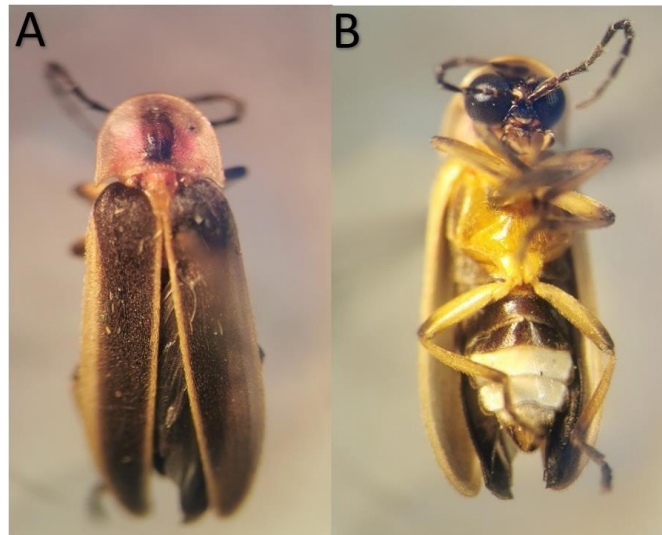


FIGURA 8. Fotografías *Bycellonycha sp 1.* (2RH10)
 A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral.



FIGURA 9. Fotografías de *Photuris trivittata* (FC)

A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral. C: corresponde a palpos maxiliares y labiales y D: corresponde a edeago en vista ventral.



FIGURA 10. Fotografías de *Photuris trivittata* (CD)

A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral. C: corresponde a palpos maxiliares y labiales y D: corresponde a edeago en vista ventral.

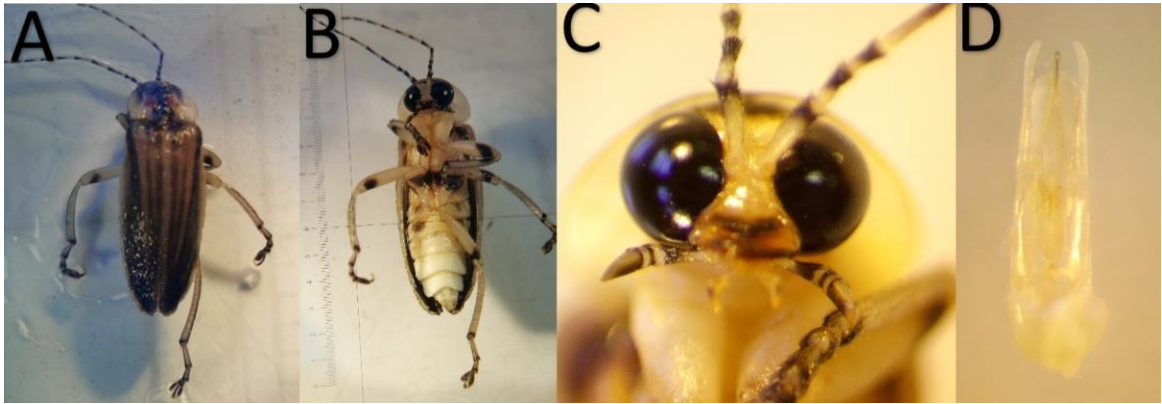


FIGURA 11. Fotografías de *Photuris* sp2.(LP)

A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral. C: corresponde a palpos maxiliares y labiales y D: corresponde a edeago en vista ventral.

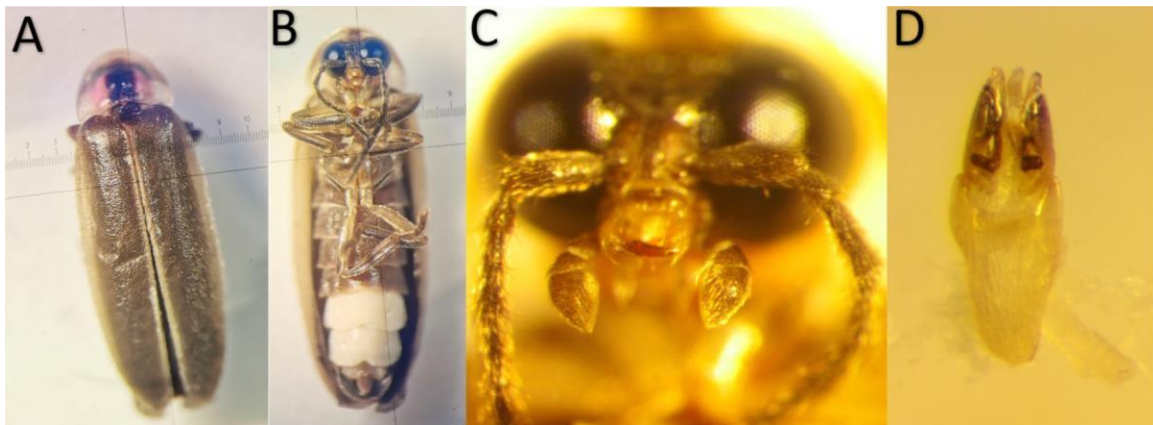


FIGURA 12. Fotografías de *Photinus* sp1. (LA47)

A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral. C: corresponde a palpos maxiliares y labiales y D: corresponde a edeago en vista ventral.

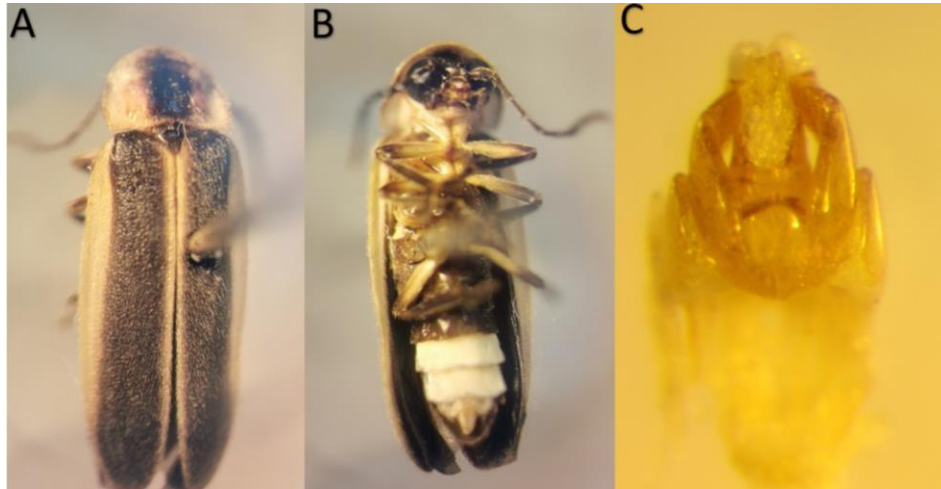


FIGURA 13. Fotografías de *Photinus pulchellus/affinis* (RH7)
A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral. C: corresponde a eedeago en vista ventral.



FIGURA 14. Fotografías de *Photinus picticollis* (VA)
A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral. C: corresponde a palpos maxiliares y labiales y D: corresponde a eedeago en vista ventral.

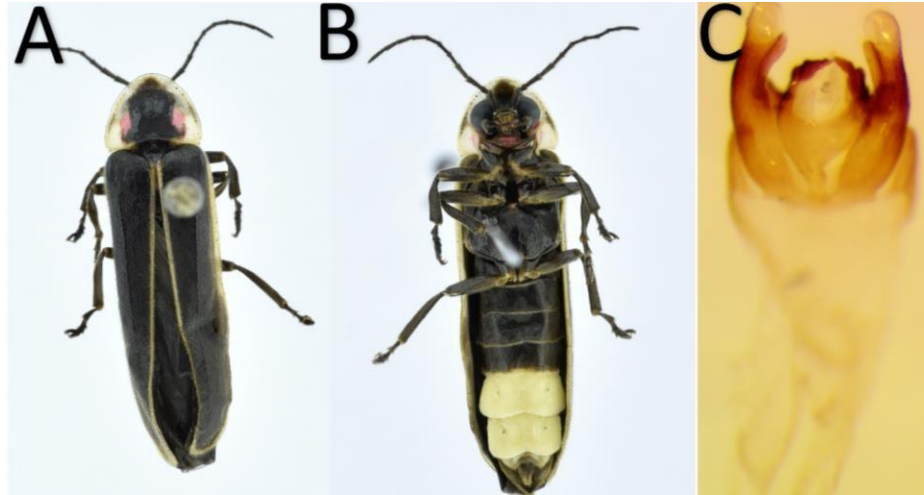


FIGURA 15. Fotografías de *Photinus cinctellus* (CC)
A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral. C: corresponde a edeago en vista ventral.

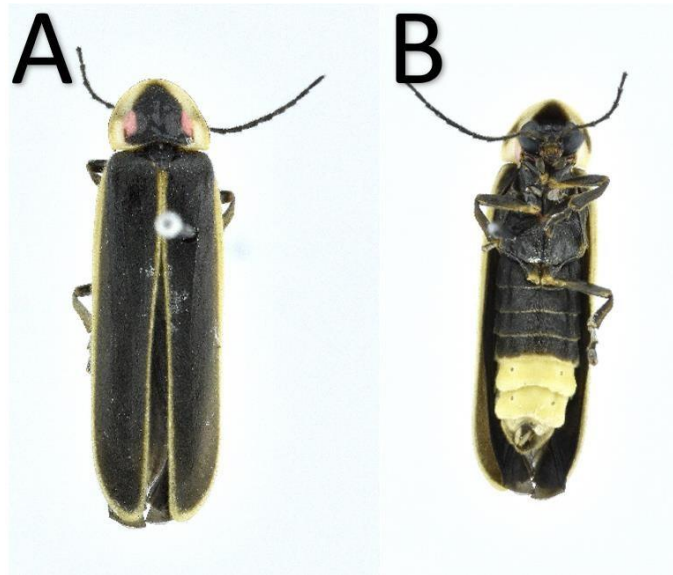


FIGURA 16. Fotografías de *Photinus sp4* (BP)
A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral.

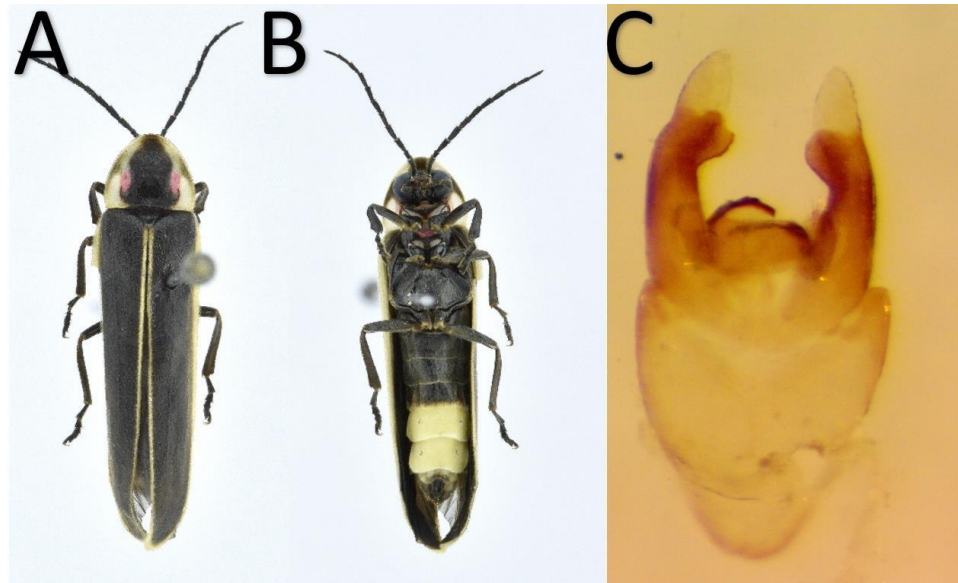


FIGURA 17. Fotografías de *Photinus sp 5* (ER)
A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral. C: corresponde a edeago en vista ventral.

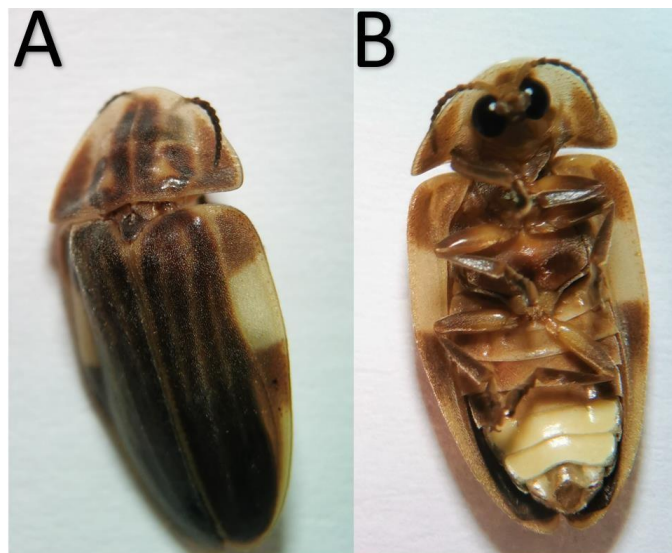


FIGURA 18. Fotografías de *Aspisoma sp1*.
A: corresponde a vista dorsal. B: corresponde a vista ventral.

CUADRO 4. Mediciones taxonómicas utilizadas para la identificación de Lampyridae.

	Longitud total	Ancho de la Cabeza	Largo de la Cabeza	Largo del pronoto	Ancho del pronoto	Ancho de la distancia interantenal	Longitud de las antenas	Ancho de la las fosas antenales	Ancho de la distancia interocular	Ancho de ojo	Largo del ojo	Longitud palpos maxilares	Largo de los élitros	Ancho de los élitros	Esternito
CD_1	8.6	5.9	2	1.3	2	0.7	11	1.2	3	1.6	1.6	0.9375	7.1	2.4	3.8
CD_2	7.3	3.4	2.2	1.3	1.3	0.5	14.2	1	2	1.7	1.7	1	6.1	2.2	NA
RC_1	8.8	4.4	3	1.6	1.8	0.4	13.6	1.1	2.2	2.7	2.5	1.3	7	3	NA
RC_2	9.6	4.7	3.1	1.5	2.4	0.7	12.9	1.2	2.6	2.7	2.3	1.375	7.1	2.9	3.6
RC_3	8	4	2.5	1.7	2.5	0.7	12.4	1.2	2.6	2.5	2.2	0.9625	6.5	2.7	NA
RC_4	9.5	5	3	1.7	2.9	1	16.1	1.4	3.5	2.7	2.5	1.475	7.6	3.3	NA
Lp_1	7.5	4.5	2.5	1.6	2.6	0.6	13.1	1.2	2.5	2.5	2.2	1.125	6.2	3	NA
Lp_2	7.6	4.5	2.5	1.6	2.5	0.5	12.1	1.2	2.8	2.6	2.3	1.5	6.6	2.6	NA
FC_1	8.6	4	3	2.7	2.5	1.4	10.2	1.3	3.2	2	1.9	1.375	8.2	3.2	3.55
FC_2	10.6	4	2.5	2.1	3	1.3	12	1.5	3.7	2	1.9	1.5	8	3	3.3
FC_3	9.3	4.3	3	1.6	2.7	0.6	13.4	1.1	4	2.4	2	1.375	8.5	3	NA
FC_4	8	4.2	3	1.6	2.2	0.5	10.9	1.3	3.8	2	2	1.5	6	3.6	NA
Cl_1	5.4	3.2	1.6	1.1	1.4	0.6	6.4	0.7	0.6	1.1	1.6	0.8	4	1.8	4.6
VA_09	5.1	2.5	1.4	0.9	1.5	1	11.8	0.7	1.7	1	1.5	0.9	4.4	1.6	NA
2RH10	5	2.9	1.3	1	1.4	0.8	8.9	0.8	1.6	1.4	1.6	0.875	5.1	1.7	2.5

Todas mediciones se muestran en milímetros(mm). NA en esternito corresponde a medición que no se pudo contemplar por falta de los últimos esternitos que fueron empleados para la extracción de edeago.

6.2 Extracción de ADN

Asimismo, se completó 32 extracciones de ADN para los individuos mencionados anteriormente. Se extrajo altas cantidades de ADN para todas las especies. Los valores de pureza de ADN (A260/A280) de todas las especies (excepto 2RH9) se encuentran cercanas a 1.8, indicando que el ADN extraído es puro. En cuanto al valor de “contaminación” (A260/A230), se encuentran por debajo del valor esperado (2-2.2) indicando posibles residuos de fenol de la extracción (**Cuadro 7**). Los valores de A260/A280 y A260/A230 son utilizados como indicadores de buena calidad de ADN; sin embargo, lo más importantes que los análisis posteriores se puedan realizar. En el caso de esta investigación, se secuenció tres loci utilizando el material genético mencionado anteriormente.

CUADRO 5 . Extracción total y cuantificación ADN.

Código de Identificación	Concentración ADN(ng/μL)	A260/A280	A260/A230
LA5	43.1	1.61	1.15
LA18	134.4	1.46	1.18
LA30	106.7	1.7	1.07
LA44	92.8	1.69	1.06
CD1	493.9	1.22	1.18
CD2	130.7	1.94	2.06
FC6	270.1	1.8	1.42
FC7	290.1	1.77	1.17
FC8	235.6	1.8	1.8
RH8	370.5	1.64	0.85
RH13	171.3	1.18	0.79
RH24	178.7	1.56	0.77
2RH8	221.4	1.89	1.5
RH3	57.8	1.79	0.97
2RH9	70.5	1.01	0.87
RC1	609.7	1.85	1.41
RC2	763.8	1.87	1.69
CL2	131.1	1.76	1.23
LP08	304.2	1.88	1.65
LP17	347.3	1.87	1.82
VA08	431.3	1.66	0.78
VA10	289.6	1.73	0.94
BP14	360.2	1.81	1.33
BP15	440.0	1.75	1.27
ER02	433.5	1.8	1.14
ER03	456.7	1.78	1.05
CC02	225.7	1.8	1.21
CC26	484.3	1.75	0.99

6.3 PCR y secuenciación:

Se generaron 25 (18s), 22 (28s) y 31 (COI) secuencias respectivamente, representando cuatro géneros de luciérnagas de Guatemala. El análisis filogenético se completó con un total de 1863 pares de bases (**Cuadro 3**).

6.4 Alineamiento:

CUADRO 6. Longitud individual y total de los alineamientos.

Loci	Número de secuencias generadas	Longitud(PB)
18s	25	733
28s	22	451
COI	31	679
Total	78	1863

6.5 Análisis filogenético:

Los modelos evolutivos utilizados para completar el análisis fueron los seleccionados por Modelfinder (**Cuadro 4**). En cuanto a los análisis de inferencia bayesiana, se optó por utilizar el modelo con mayor complejidad para los tres genes mencionados anteriormente (GTR +I +G). Es preferible la selección de un modelo que sobre estima; adicionalmente, el manual de Mr Bayes menciona que se debe de usar el siguiente modelo más complejo, en esta situación es GTR +I +G (**Cuadro 5**) (Ronquist *et al.*, 2012). Los valores de PSRF+ (potential scale reduction factor) YESSs (effective sample size) se observaron para indicar si el set de datos ha convergido lo necesario y si el tiempo de análisis es suficiente respectivamente.

CUADRO 7. Selección de modelos evolutivos

	JMODELTEST				Modelfinder			
	BIC		AIC		BIC		AIC	
	Modelo	Valor	Modelo	Valor	Modelo	Valor	Modelo	Valor
28s	HKY+G	10199.07	HKY+G	9409.52	TIM3e+G4	11042.15	TIM3e+G4	10470.26
			9409.5254					
18s	TIM2ef+I+G	11087.16	TIM2ef+I+G	9852.69	TNe+G4	9226.87	TNe+G4	8033.81
COI	HKY +I +G	20558.20	HKY +I +G	20558.20	GTR+I+G	GTR +I+G	GTR +I+G	GTR+I+G

Modelos evolutivos seleccionados según criterios de AIC Y BIC al utilizar JModelTest2 y Modelfinder.

CUADRO 8. Parámetros utilizados para análisis de Mr Bayes.

	28s	18s	COI
lset nst=	6	6	6
rate =	invgamma	invgamma	invgamma
Mcmc	10,000,000	10,000,000	10,000,000
printfreq	1,000	1,000	1,000
Samplefreq	1,000	1,000	1,000
nruns=	2	2	2
savbrlens	Yes	Yes	Yes

6.6 Loci 28s

Se generó 22 secuencias del loci 28s y se complementó con secuencias de Genbank. Lamentablemente en el caso del loci 28s, las secuencias en las bases de datos son escasas. Se pudieron recuperar 34 secuencias provenientes de Genbank, representando a dos subfamilias (Lampyrinae y Photurinae). El árbol de máxima verosimilitud muestra la separación de Lampyrinae y Photurinae como se esperaba. Lampyrinae se recupera como un grupo monofilético; resultado que no concuerda con las últimas filogenias realizadas. El resultado de Photurinae como grupo monofilético concuerda con las filogenias previas (**Figura 12**). El análisis de MrBayes nos proporciona un árbol con una topología similar que el de máxima verosimilitud (**Figura 13**).

6.7 Loci 18s

En cuanto al loci 18s, se incorporó secuencias que representan siete subfamilias de Lampyridae recuperadas de Genbank (Luciolinae, Cyphonocerinae, Pterotinae, Ototretinae, Lamprohizidae, Photurinae y Lampyrinae). El mayor número de secuencias recuperadas permitió realizar una filogenia que incluyera la mayoría de subfamilias. Se generaron 25 secuencias (14 Lampyrinae; 11 Photurinae). Las secuencias generadas se sitúan en Lampyrinae y Photurinae (**Figura 14 y 15**). Se puede contemplar una filogenia similar a la reclasificación de Lampyridae propuesta por Martin (Martin *et al.*, 2019).

6.8 Loci COI

Se generó 31 secuencias (21 Lampyrinae y 10 Photurinae). Para este marcador se recuperaron mayor número de secuencias de Genbank. La topología es similar a la generada por el loci 18s; sin embargo, en este caso Lucionalinae se muestra como clado más cercano a Photurinae. Asimismo, Lampyrinae y Photurinae se recuperan como grupos no monofilético (**Figura 16**). El análisis de MrBayes nos proporciona un árbol con una topología similar que el de máxima verosimilitud (**Figura 17**).

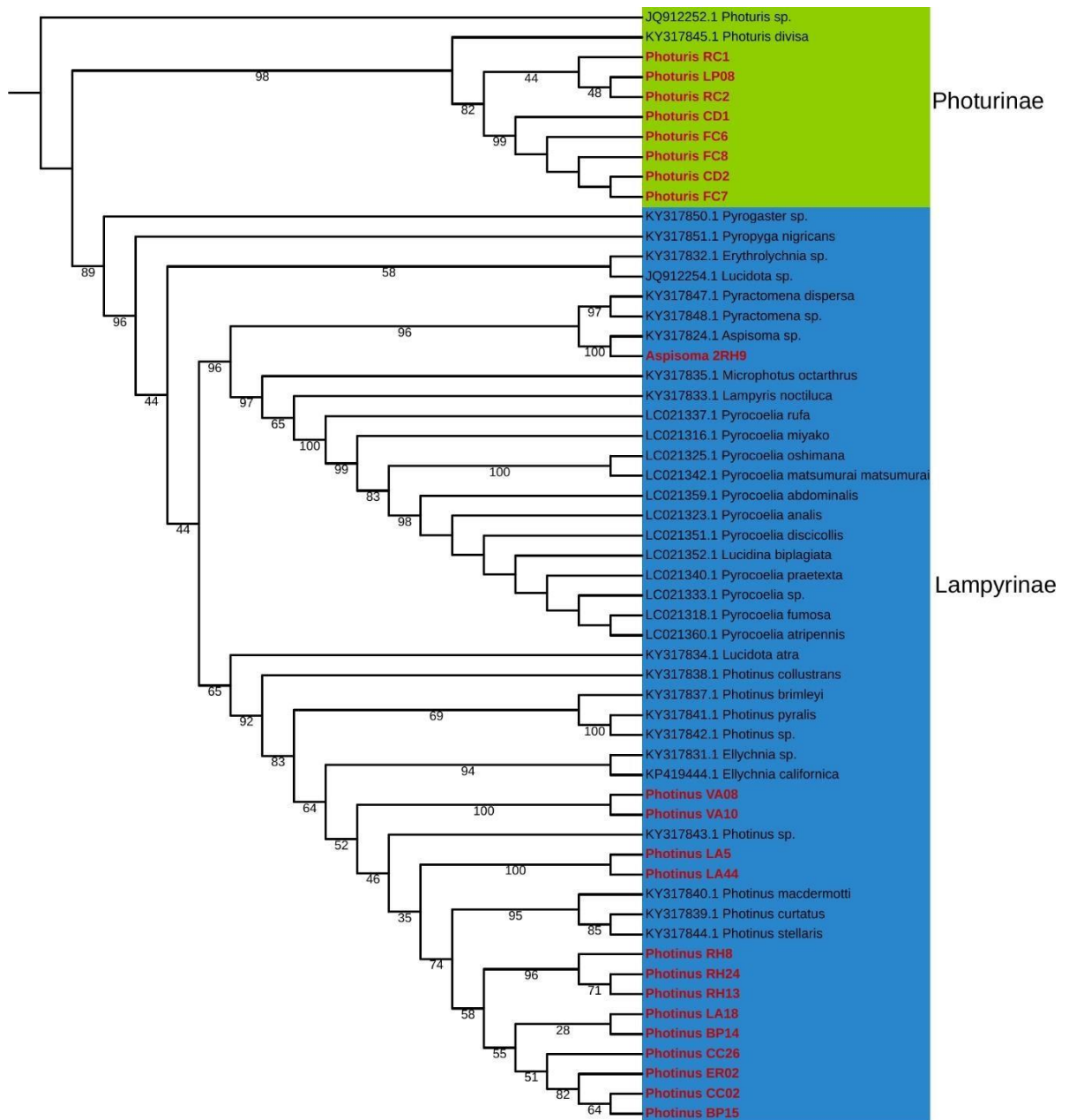


FIGURA 19. Árbol de máxima verosimilitud utilizando loci 28s. Los valores en las ramas y nodos pertenecen al valor de ultra fasta Bootstrap generado en IQTREE. Las secuencias resaltadas en rojo corresponden a las generadas en este estudio.

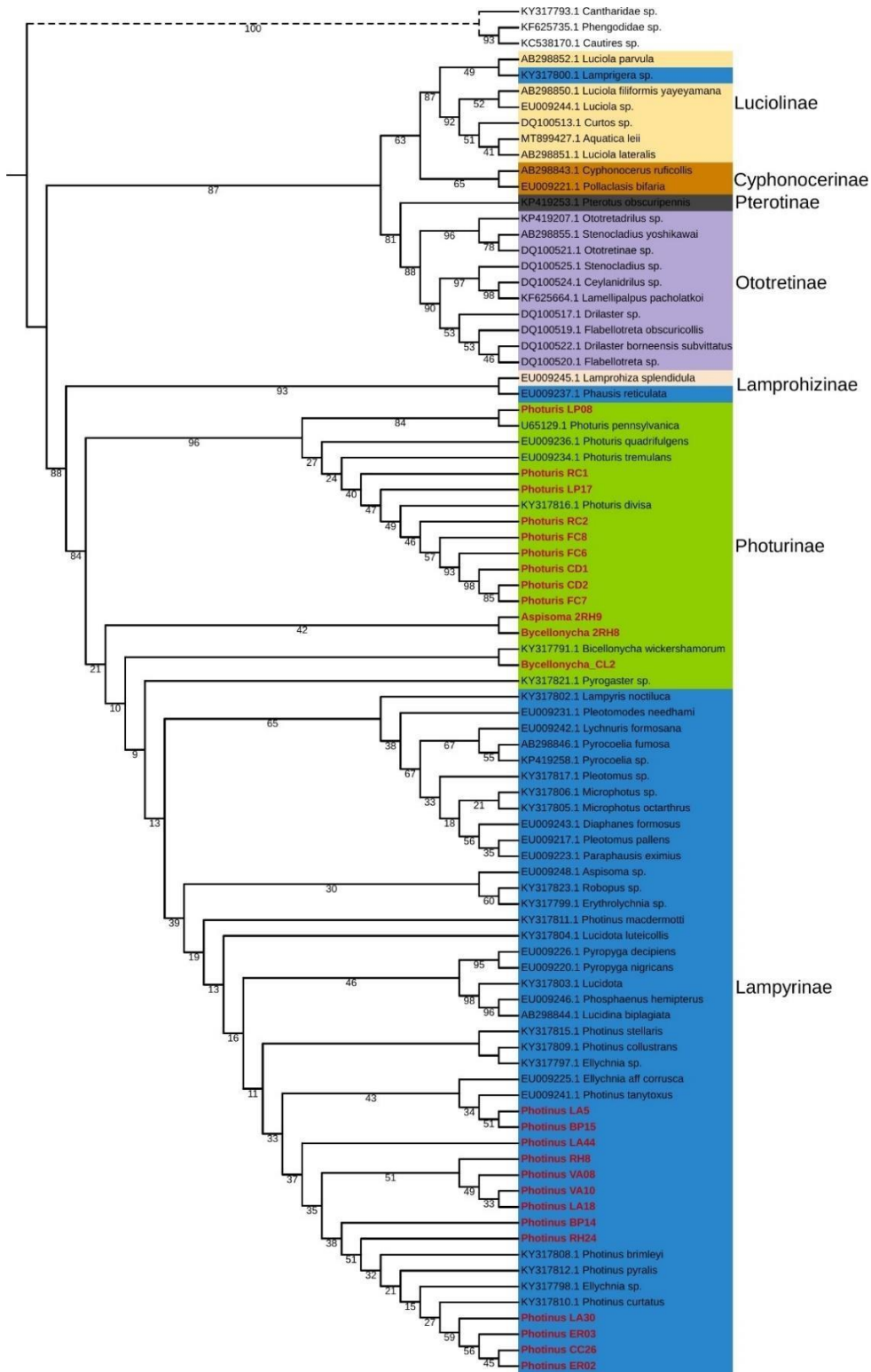


FIGURA 21. Árbol de máxima verosimilitud utilizando loci 18s. Los valores en las ramas y nodos pertenecen al valor de ultra fasta Bootstrap generado en IQTREE. Las secuencias resaltadas en rojo corresponden a las generadas en este estudio.

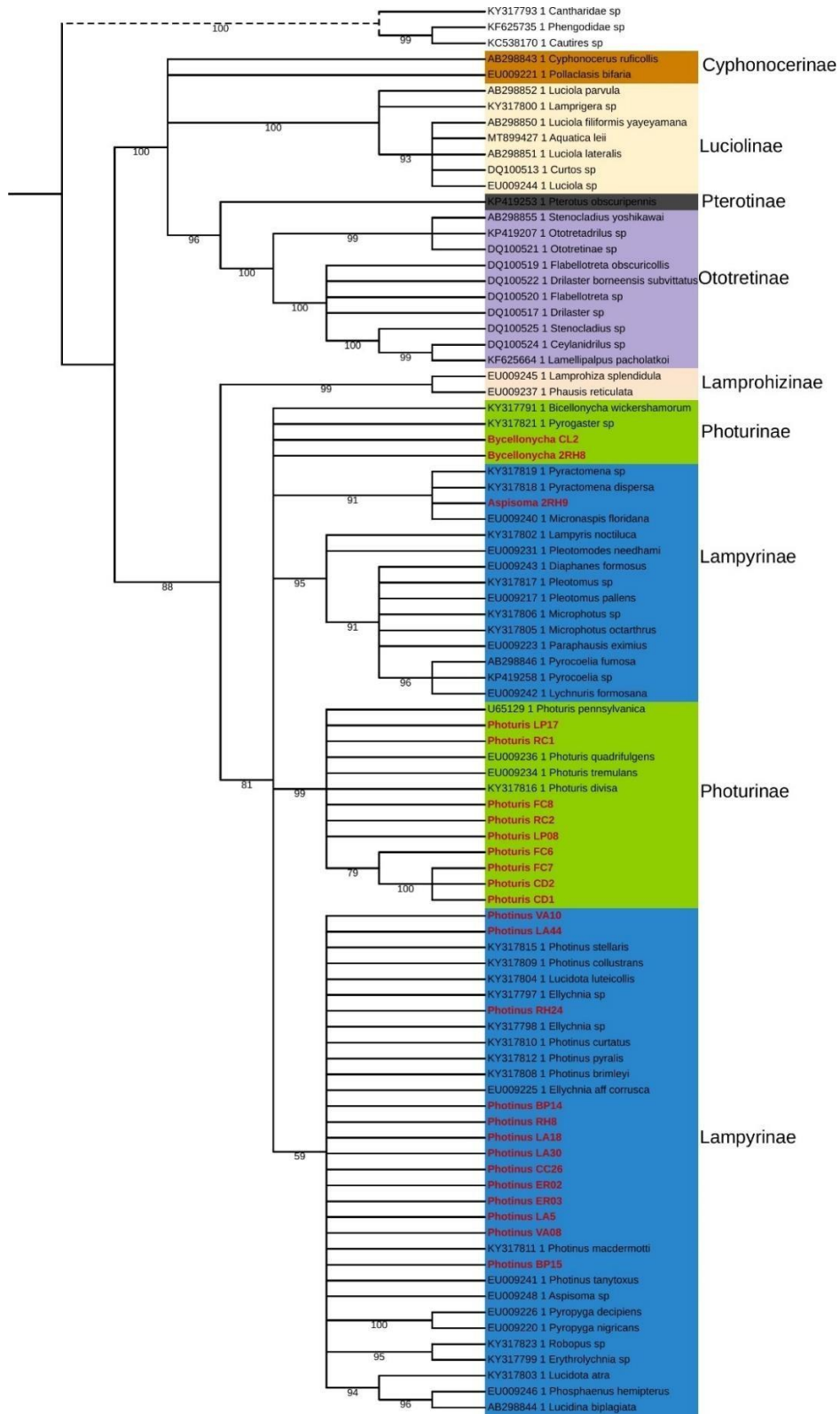


FIGURA 22. Árbol de inferencia bayesiana utilizando Mr bayes (loci 18s).
 Los valores en las ramas y nodos representan el soporte bayesiano. Las secuencias
 resaltadas en rojo corresponden a las generadas en este estudio.

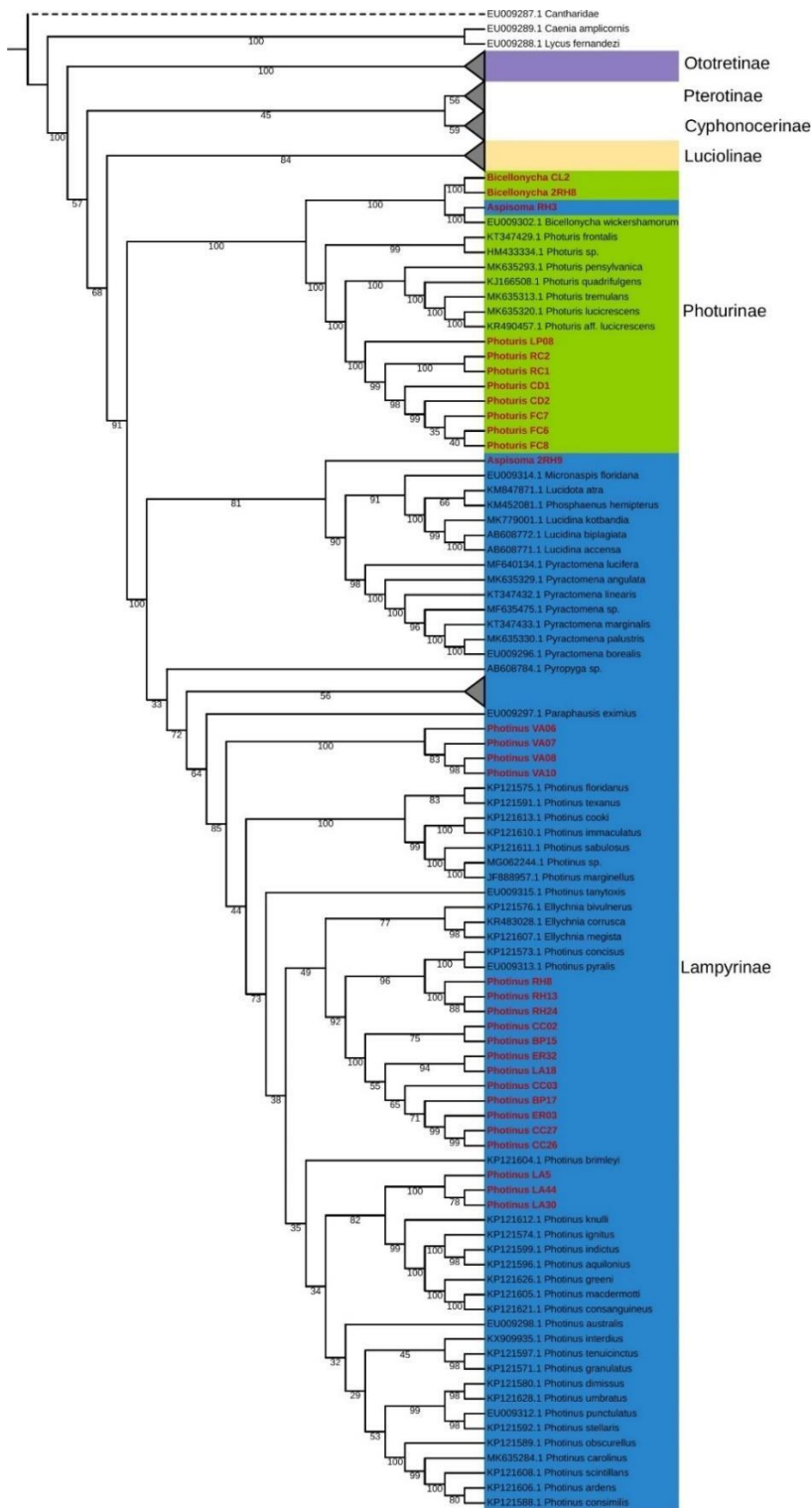


FIGURA 23. Árbol de máxima verosimilitud utilizando loci COI con clados colapsados. Los valores en las ramas y nodos pertenecen al valor de ultra fasta Bootstrap generado en IQTREE. Las secuencias resaltadas en rojo corresponden a las generadas en este estudio. Lafilogenia completa se puede observar en la **Figura 25** en la sección de Anexos.

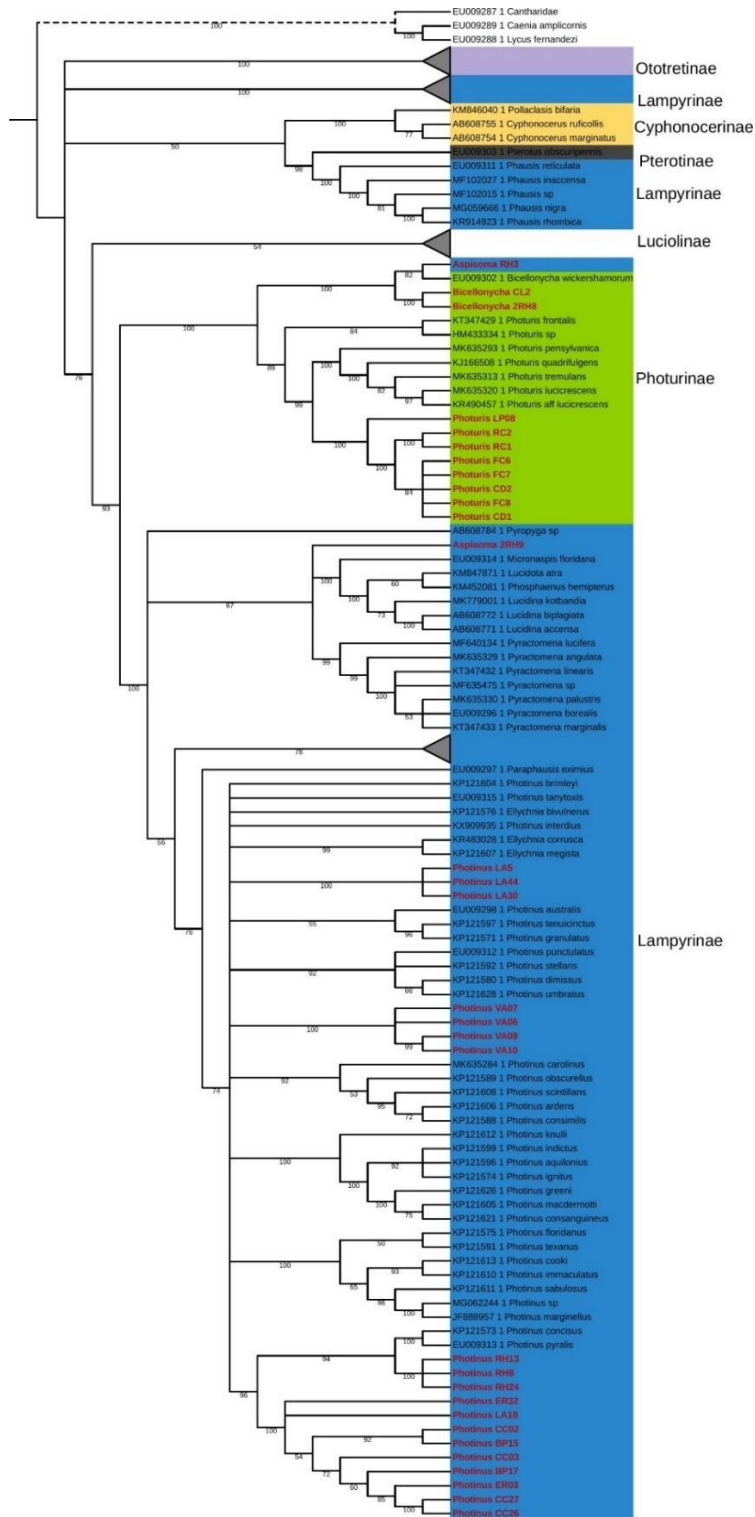


FIGURA 24. Árbol de inferencia bayesiana utilizando Mr bayes (loci COI) con clados colapsados.

Los valores en las ramas y nodos representan el soporte bayesiano. Las secuencias resaltadas en rojo corresponden a las generadas en este estudio. La filogenia completa se puede observar en la **Figura 26** en la sección de Anexos.

VII. Discusión

El objetivo principal de esta investigación fue generar las primeras secuencias genéticas de luciérnagas de Guatemala y posicionarlas en la filogenia existente de Lampyridae, para ellos se utilizaron técnicas de biología molecular y bioinformáticas. Este es el primer proyecto que genera esta información para las especies de Guatemala. En Guatemala se han reportado por lo menos 14 géneros, publicados en Biología Centrali Americana (Gorham,1881). Aunque este reporte sea antiguo, es el único existente. En este estudio se utilizaron 38 taxa representando a 7 subfamilias con el propósito de evaluar si la adición de las secuencias de luciérnagas Guatemaltecas causan cambios en el estatus de grupos monofiléticos.

Las mediciones realizadas(**Cuadro 4**) son fundamentales para la identificación taxonómica que se realizó para identificar las distintas especies de luciérnagas guatemaltecas. Complementar la información taxonómica con datos genéticos es fundamental para la identificación rápida de múltiples especies. Asimismo, puede brindar información novedosa acerca de clasificaciones previas (Gupta y Sharma, 2015).

En el caso del loci 28s (**Figura 19**), la poca información genética disponible evito generar una filogenia completa con todas las subfamilias. La información generada para este loci permitió posicionar a las diferentes especies de *Photinus* y *Aspisma* dentro de Lampyrinae. Este análisis recupera a Lampyrinae como grupo monofilético; sin embargo, hay que ser cautelosos con estos resultados ya que los valores de Bootstrap son relativamente bajos. Al incorporar las secuencias de *Photuris*, Photurinae se recupera como monofilético. La topología descrita anteriormente por el análisis de ML se puede apreciar en el árbol de inferencia bayesiana (**Figura 20**). El gen 28s ha sido utilizado anteriormente por ser útil para resolver relaciones de insectos (Miller *et al.* 2007; Lord *et al.* 2010); en este análisis el uso del 28s , proporcionó resolución para posicionar a las luciérnagas de Guatemala en la filogenia. Sin embargo, su uso para resolver relaciones entre Lampyridae no es recomendable por la escasa información genética disponible. En el estudio publicado por Martin *et al.* 2017, se han realizado esfuerzos de secuenciación del loci 28s (Martin *et al.*,2017); sin embargo, al agregar las secuencias de las luciérnagas guatemaltecas, no se logró un alineamiento homogéneo. Por lo consiguiente, los análisis filogenéticos no fueron los esperados. Se puede considerar la concatenación de los tres genes (28S,18S y COI) para un análisis con mayor robustez. Existe evidencia que la concatenación de genes presenta ventajas estadísticas considerables como: mayor precisión filogenética y elevado número de sitios (Gadagkar, Rosenberg y Kumar,2005).

Los análisis de 18s y COI, permiten visualizar una filogenia con mayor robustez por el mayor número de secuencias disponibles en las bases de datos. En las **Figuras 21,22,23 y 24** se pueden observar topologías similares de los árboles construidos con estos marcadores. Ambos locus recuperan a Lampyrinae como un grupo no monofilético por la compleja relación entre sus especies (*Lamprigera*, *Phausis*, *Pristolycus sangulatus*). Adicionalmente, Lampyrinae es un conjunto de géneros sin caracteres morfológicos estables, por lo que múltiples géneros han sido clasificados erróneamente en esta subfamilia (Martin *et al.*,2019).

La mayoría de secuencias generadas en este estudio pertenecen al género *Photinus*. En todos los análisis *Photinus* se recuperó como un grupo monofilético, resultado que concuerda con filogenias realizadas (Martin *et al.*,2017; Martin *et al.*,2019; Höhna *et al.*,2021). *Ellychnia* es un género que tradicionalmente se ha clasificado fuera de *Photinus*; mayor número de datos moleculares no apoyan este agrupamiento. Desde una perspectiva morfológica ambos grupos, comparten múltiples caracteres morfológicos que ha llevado a colocarlos dentro del mismo grupo (Zaragoza *et al.*,2020). La agrupación mencionada anteriormente, se puede observar en todos los análisis (**Figura 19-24**).

Asimismo Photurinae, fue recuperado como un grupo no monofilético con soporte alto en los análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. Existe un amplio debate acerca del posicionamiento de Photurinae como grupo monofilético, especialmente por la relación inconclusa de *Vesta*. Este género está formado por múltiples especies en el viejo y nuevo mundo (Martin *et al.*,2019). Inicialmente, se clasificó en la subfamilia Amydetinae (McDermott,1966), posteriormente *Vesta* se recuperó como parafilético con especies de Photurinae y Lampyrinae (Jeng,2008). La relación cercana de *Vesta* y Photurinae se encuentra apoyada por tres sinapomorfías: palpos maxilares fusiformes terminales, palpos labiales con forma de boomerang y abdomen con laterogitos esclerotizados (Bocakova *et al.*, 2022).

El árbol de máxima verosimilitud para el loci 18s (**Figura 21**) recuperó con alto soporte (UFboot 93) el grupo denominado Lamprohizinae formado por el clado *Lamprohiza* + *Phausis*. Esta agrupación fue propuesta por Martin por la alta similitud morfológica entre los dos géneros (Martin *et al.*,2019). De igual forma el árbol de inferencia bayesiana (**Figura 19**) recupera este grupo con soporte alto (99).

Se pudo observar incongruencias en ciertos posicionamientos de Lampyrinae, especialmente de *Aspisoma*. El espécimen 3RH (COI) es un *Aspisoma* recolectado en la Reserva del Heloderma Valle de Motagua y se encuentra posicionado en Photurinae en lugar de Lampyrinae. Una situación similar ocurre en la secuencia *Aspisoma* 2RH9 (18s), la cual no se alinea con la secuencia de *Aspisoma* sp. de referencia (**Figura 21 y 22**), indicando un posible error de identificación morfológico de este individuo, uso de ADN equivocado al realizar los PCRs o identificación errónea en la librería de Genbank (Pentinsaari *et al.*, 2020). Adicionalmente, el árbol de inferencia bayesiana del loci 18s (**Figura 18**), muestra múltiples incongruencias al posicionar a ciertos géneros de Lampyrinae (*Pyractomena*, *Micronaspis*, *Lampyris*, *Pleotomus*, *Microphotus*, *Paraphausis*, *Pyrocoelia* y *Lychnuris*) fuera de su posicionamiento regular.

Al comparar los análisis de máxima verosimilitud con los de inferencia bayesiana, se puede observar una topología con soportes similares para los genes utilizados (28s,18s y COI). Sin embargo, es necesario mencionar la gran diferencia entre estos dos análisis. En los tres árboles de inferencia bayesiana (**Figura 20,22,24**) se puede contemplar politomías. Esto se debe al funcionamiento de MrBayes. Las politomías se forman cuando las frecuencias son menores al 50%, indicando que ese clado no se pudo resolver (Ronquist *et al.*, 2012).

Este estudio muestra una filogenia con resultados similares a la propuesta por múltiples autores que emplearon cientos de loci (Höhna *et al.*,2021;Martin *et al.*,2019). Indicando que utilizar un número limitado de loci puede brindar información acertada acerca de las relaciones evolutivas de luciérnagas. Es una alternativa al uso de secuenciación de nueva generación en donde el manejo de datos es de mayor complejidad y su costo es elevado.

Es recomendable en futuras ocasiones emplear organismos que se hayan preservado en condiciones óptimas para realizar extracciones de ADN. En el caso de él espécimen RH3, fue obtenido del Laboratorio de Entomología Sistemática de la Universidad del Valle. Es recomendable emplear organismos recientes que hayan sido colectados y posteriormente almacenados en etanol a una concentración de 95%;mientras se depositan en un congelador a -20°C. La metodología descrita anteriormente es fundamental para obtener resultados exitosos. Asimismo, con el propósito de obtener resultados con mayor robustez, es recomendable utilizar Secuenciación de Nueva Generación(NGS) en lugar de Secuenciación Sanger. De esta forma se obtendrán cientos de genes que pueden ser útiles para descifrar las relaciones evolutivas de Lampyridae.

VIII. Conclusiones

- Al finalizar el estudio se cumplió el objetivo de explorar la diversidad de luciérnagas de Guatemala y colocar a las especies guatemaltecas dentro de la filogenia conocida de Lampyridae.
- Las secuencias genéticas se posicionaron de acuerdo a lo esperado por la identificación morfológica a excepción de las secuencias de *Aspisoma* 2RH9(18s) y 3RH (COI).
- El gen 28s recupera a Lampyrinae y Photurinae como grupos monofiléticos; sin embargo, el número limitado de secuencias influye directamente en los resultados.
- Se recuperó a Lampyrinae y Photurinae como grupos no monofiléticos al utilizar los genes COI(31 secuencias y 18s(25 secuencias).
- Los resultados indican que los loci (18s y COI) utilizados en este estudio pueden ser empleados en tratar de descifrar las relaciones filogenéticas de Lampyridae.

IX. Bibliografía

- Badrudin, N. (2019). *Firefly (Coleoptera: Lampyridae) Diversity and Distribution in Malaysia: Ecological Explanations and Conservation Requirements*. March. <http://etheses.whiterose.ac.uk/23234/>
- Baldwin, B. S., Black, M., Sanjur, O., Gustafson, R., Lutz, R. A., y Vrijenhoek, R. C. (1996). *A diagnostic molecular marker for zebra mussels (Dreissena polymorpha) and potentially co-occurring bivalves: mitochondrial COI*. *Molecular marine biology and biotechnology*, 5(1), 9–14
- Bessho-Uehara, M., y Oba, Y. (2017). *Identification and characterization of the Luc2-type luciferase in the Japanese firefly, Luciola parvula, involved in a dim luminescence in immobile stages*. *Luminescence*, 32(6), 924–931. <https://doi.org/10.1002/bio.3273>
- Bocakova, M., Campello-Gonçalves, L., y Da Silveira, L. F. L. (2022). *Phylogeny of the new subfamily Cladodinae: neotenic fireflies from the Neotropics (Coleoptera: Lampyridae)*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1–19. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlab091>
- Cano, E. B., Schuster, J. C., Areas, P., y Sketches, B. (n.d.). *Beetles As Indicators for Forest Conservation in M E s P l C E O – P l C E O –*. *Encyclopedia of Life Support Systems*, VI.
- Eisner, T., Wiemer, D. F., Haynes, L. W., y Meinwald, J. (2006). *Lucibufagins: Defensive steroids from the fireflies Photinus ignitus and P. marginellus (Coleoptera: Lampyridae)*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(2), 905–908. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.2.905>
- Eisner, Thomas, Goetz, M. A., Hill, D. E., Smedley, S. R., y Meinwald, J. (1997). *Firefly “femmes fatales” acquire defensive steroids (lucibufagins) from their firefly prey*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(18), 9723–9728. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9723>
- Fallon, C., Hoyle, S., Lewis, S., Owens, A., Black, S. H., y Jepsen, S. (2019). *Conserving the Jewels of the Night Guidelines for Protecting Fireflies in the United States and Canada*. *Xerces Society, October*.
- Fallon, T. R., Lower, S. E., Chang, C., Bessho-Uehara, M., Martin, G. J., Bewick, A. J., Behringer, M., Debat, H. J., Wong, I., Day, J. C., Suvorov, A., Silva, C. J., Stanger-Hall, K. F., Hall, D. W., Schmitz, R. J., Nelson, D. R., Lewis, S. M., Shigenobu, S., Bybee, S. M., ... Robert, J. (2018). *Firefly genomes illuminate the origin and evolution of bioluminescence*. *ELife*, 7, 1–146. <https://doi.org/10.7554/eLife.36495>
- Fu, X., y Benno Meyer-Rochow, V. (2013). *Larvae of the firefly Pyrocoelia pectoralis (Coleoptera: Lampyridae) as possible biological agents to control the land snail Bradybaena ravida*. *Biological Control*, 65(2), 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.02.005>
- Freyman, W. A. (2015). *SUMAC: Constructing phylogenetic supermatrices and assessing partially decisive taxon coverage*. *Evolutionary Bioinformatics*, 11(1), 263–266. <https://doi.org/10.4137/EBO.S35384>
- Gadagkar, S. R., Rosenberg, M. S., y Kumar, S. (2005). *Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*,

- 304B(1), 64–74. doi:10.1002/jez.b.21026
- Ge, X. Y., Liu, T., Kang, Y., Liu, H. Y., y Yang, Y. X. (2022). *First complete mitochondrial genomes of Otoretinae (Coleoptera, Lampyridae) with evolutionary insights into the gene rearrangement*. *Genomics*, 114(2), 110305. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2022.110305>
- Gorham, H. S. (1881). *Biologia Centrali-Americana: Insecta Coleoptera*. Vol. III. Part 2. Malacodermata (p. 408).
- González, A., Hare, J. F., y Eisner, T. (1999). *Chemical egg defense in Photuris firefly “femmes fatales.”* *Chemoecology*, 9(4), 177–185. [|https://doi.org/10.1007/s000490050051](https://doi.org/10.1007/s000490050051)
- Ho, J. Z., Chiang, P. H., Wu, C. H., y Yang, P. S. (2010). *Life cycle of the aquatic firefly Luciola ficta (Coleoptera: Lampyridae)*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13(3), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2010.03.007>
- Höhna, S., Lower, S., Duchen, P., Catalán, A. (2021). *A Time-calibrated Firefly (Coleoptera: Lampyridae) Phylogeny: Using Genomic Data for Divergence Time Estimation*. bioRxiv 2021.11.19.469195; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.11.19.469195>
- Jeng, M.L., 2008. *Comprehensive phylogenetics, systematics, and evolution of neoteny of Lampyridae* (Insecta: Coleoptera) Unpublished Ph.D. thesis. University of Kansas. 388 pp.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., y Jermin, L.S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Katoh, K., Rozewicki, J., y Yamada, K. D. (2019). *MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization*. 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., y Drummond, A. (2012). *Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data*. *Bioinformatics*(Oxford, England), 28(12), 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., y Stamatakis, A. (2019). *RAxML-NG:*

- A fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference.* *Bioinformatics*, 35(21), 4453–4455.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz305>
- Kusy, D., He, J. W., Bybee, S. M., Motyka, M., Bi, W. X., Podsiadlowski, L., Li, X. Y., y Bocak, L. (2020). *Phylogenomic relationships of bioluminescent elateroids define the ‘lampyroid’ clade with clicking Sinopyrophoridae as its earliest member.* *Systematic Entomology*. <https://doi.org/10.1111/syen.12451>
- Larsson, A. (2014). *AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets.* *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Lewis, S. M., y Cratsley, C. K. (2008). *Flash signal evolution, mate choice, and predation in fireflies.* *Annual Review of Entomology*, 53, 293–321.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093346>
- Lewis, S. M., Wong, C. H., Owens, A. C. S., Fallon, C., Jepsen, S., Thancharoen, A., Wu, C., De Cock, R., Novák, M., López-Palafox, T., Khoo, V., y Michael Reed, J. (2020). *A Global Perspective on Firefly Extinction Threats.* *BioScience*, 70(2), 157–167. <https://doi.org/10.1093/biosci/biz157>
- Lewis, S. M., Thancharoen, A., Wong, C. H., López-Palafox, T., Santos, P. V., Wu, C., Faust, L., De Cock, R., Owens, A. C. S., Lemelin, R. H., Gurung, H., Jusoh, W. F. A., Trujillo, D., Yiu, V., López, P. J., Jaikla, S., y Reed, J. M. (2021). *Firefly tourism: Advancing a global phenomenon toward a brighter future.* *Conservation Science and Practice*, 3(5). <https://doi.org/10.1111/csp2.391>
- Lower, S. E., Stanger-Hall, K. F., y Hall, D. W. (2018). *Molecular variation across populations of a widespread North American firefly, Photinus pyralis, reveals that coding changes do not underlie flash color variation or associated visual sensitivity.* *BMC Evolutionary Biology*, 18, 1–14.
- Luk, S., Marshall, S., y Branham, M. (2011). *The Fireflies of Ontario (Coleoptera: Lampyridae).* *Canadian Journal of Arthropod Identification*, 16(16), 1–105. <https://doi.org/10.3752/cjai.2011.16>
- Mardis, E. R. (2011). *A decade’s perspective on DNA sequencing technology.* *Nature*, 470(7333), 198–203. <https://doi.org/10.1038/nature09796>
- Martin, G. J. (2014). *A Molecular Phylogeny of Lampyridae with Insight into Visual and Bioluminescent Evolution.* <http://scholarsarchive.byu.edu/etd>
- Martin, G. J., Branham, M. A., Whiting, M. F., y Bybee, S. M. (2017). *Total evidence phylogeny and the evolution of adult bioluminescence in fireflies (Coleoptera: Lampyridae).* *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 564–575.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.12.017>
- Martin, G. J., Stanger-Hall, K. F., Branham, M. A., Silveira, L. F. L. Da, Lower, S. E., Hall, D. W., Li, X., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., y Bybee, S. M. (2019). *Higher-Level Phylogeny and Reclassification of Lampyridae (Coleoptera: Elateroidea).* *Insect Systematics and Diversity*, 3(6), 1–15.
<https://doi.org/10.1093/isd/ixz024>
- McDermott, F. A., y Steel, W. O. (1966). Pars. 9: *Lampyridae.* *Coleopterorum Catalogus Supplementa*. W. Junk, s’ Gravenhage. 149p.
- Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., y Von Haeseler, A. (2013). *Ultrafast approximation for*

- phylogenetic bootstrap*. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188–1195.
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
- Munjal, G., Hanmandlu, M., y Srivastava, S. (2018). *Phylogenetics Algorithms and Applications. Ambient Communications and Computer Systems: RACCCS-2018*, 904, 187–194. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5934-7_17
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., y Minh, B. Q. (2015). *IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies*. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Pentinsaari, M., Ratnasingham, S., Miller, S. E., y Hebert, P. D. N. (2020). BOLD and GenBank revisited - Do identification errors arise in the lab or in the sequence libraries? *PLoS ONE*, 15(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231814>
- Posada, D. (n.d.). *LETTERS jModelTest: Phylogenetic Model Averaging*.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Qian, J., Zhuang, H., Yang, W., Chen, Y., Chen, S., Qu, Y., Zhang, Y., Yang, Y., y Wang, Y. (2020). *Selecting flagship species to solve a biodiversity conservation conundrum*. *Plant Diversity*, 42(6), 488–491.
<https://doi.org/10.1016/j.pld.2021.01.004>
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Ohna, S. H. ., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., y Huelsenbeck, J. P. (2012). *Software for Systematics and Evolution MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space*. *Syst. Biol*, 61(3), 539–542.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Schuster, J. C. (1997). *Seasonal diversity of fireflies (Coleoptera:Lampyridae) in amontane area of Guatemala*. *Proceedings of the International Symposium on Biodiversity and Systematics in Tropical Ecosystems*, 281–284.
- Stanger-Hall, K. F., Sander Lower, S. E., Lindberg, L., Hopkins, A., Pallansch, J., y Hall, D. W. (2018). *The evolution of sexual signal modes and associated sensor morphology in fireflies (Lampyridae, Coleoptera)*. *Proceedings. Biological Sciences*, 285(1871), 20172384. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2384>
- Sander, S. E., y Hall, D. W. (2015). *Variation in opsin genes correlates with signalling ecology in North American fireflies*. *Molecular Ecology*, 24(18), 4679–4696.
<https://doi.org/10.1111/mec.13346>
- Stanger-Hall, K. F., y Lloyd, J. E. (2015). *Flash signal evolution in Photinus fireflies: Character displacement and signal exploitation in a visual communication system*. *Evolution*, 69(3), 666–682. <https://doi.org/10.1111/evo.12606>
- Stanger-Hall, K. F., Lloyd, J. E., y Hillis, D. M. (2007). *Phylogeny of North American fireflies (Coleoptera: Lampyridae): Implications for the evolution of light signals*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(1), 33–49.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.05.013>
- Suzuki, H. (1997). *Molecular phylogenetic studies of Japanese fireflies and their matingsystems (Coleoptera: Cantharoidea)*. *Tokyo Metropolitan University Bulletin of Natural ...*, 3, 1–54. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&ybtnG=Search>

- yq=intitle:Molecular+phylogenetic+studies+of+Japanese+fireflies+and+their+matin
g+systems+(Coleoptera:+Cantharoidea)#0
- Syed, A. J., Y Anderson, J. C. (2021). Applications of bioluminescence in biotechnology and beyond. *Chemical Society Reviews*, 50(9), 5668–5705. <https://doi.org/10.1039/d0cs01492c>
- Talavera, G., y Castresana, J. (2007). *Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. Systematic Biology*, 56(4), 564–577. <https://doi.org/10.1080/10635150701472164>
- Viviani, V. R. (2002). *The origin, diversity, and structure function relationships of insectluciferases. Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(11), 1833–1850. <https://doi.org/10.1007/PL00012509>
- Whiting, M. F., Carpenter, J. C., Wheeler, Q. D., y Ard, V. (1997). *THE STREPSIPTERA PROBLEM: PHYLOGENY OF THE HOLOMETABOLOUS INSECT ORDERS INFERRED FROM 18S AND 28S RIBOSOMAL DNA SEQUENCES AND MORPHOLOGY*. In *Syst. Biol* (Vol. 46).
- Woods, W. A., Hendrickson, H., Mason, J., y Lewis, S. M. (2007). *Energy and predation costs of firefly courtship signals. American Naturalist*, 170(5), 702–708. <https://doi.org/10.1086/521964>
- Young, A. D., y Gillung, J. P. (2020). *Phylogenomics — principles, opportunities and pitfalls of big-data phylogenetics. Systematic Entomology*, 45(2), 225–247. <https://doi.org/10.1111/syen.12406>
- Zaragoza-Caballero, S., López-Pérez, S., Vega-Badillo, V., Domínguez-León, D. E., Rodríguez-Mirón, G. M., González-Ramírez, M., Gutiérrez-Carranza, I. G., Cifuentes-Ruiz, P., y Zurita-García, M. L. (2020). *Luciérnagas del centro de México (Coleoptera: Lampyridae): descripción de 37 especies nuevas. Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91(0). <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.3104>
- Zaragoza, S., Campos, R., y Pérez, C. (2017). *Familia Lampyridae. Fundamentos de Entomología Forestal*, August 2017, 230–234.

X. Anexo

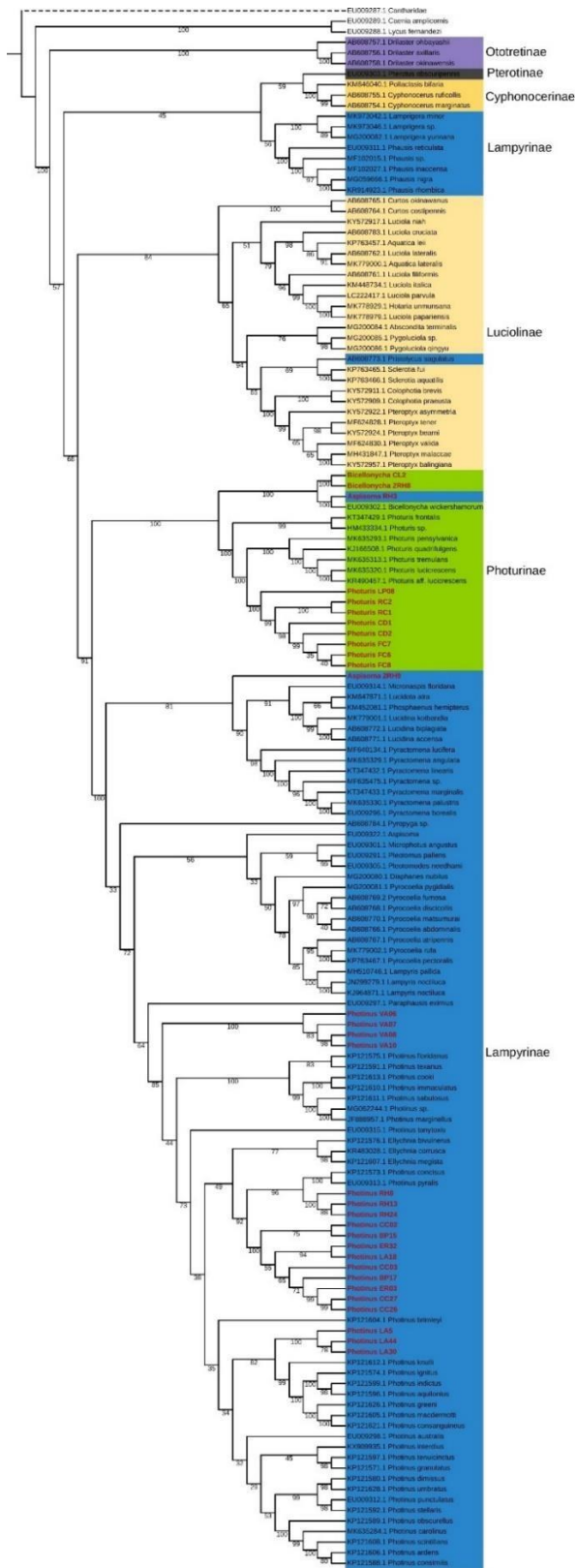


FIGURA 25. Árbol de máxima verosimilitud utilizando loci COI. Los valores en las ramas y nodos pertenecen al valor de ultra fasta Bootstrap generado en IQTREE. Las secuencias resaltadas en rojo corresponden a las generadas en este estudio.

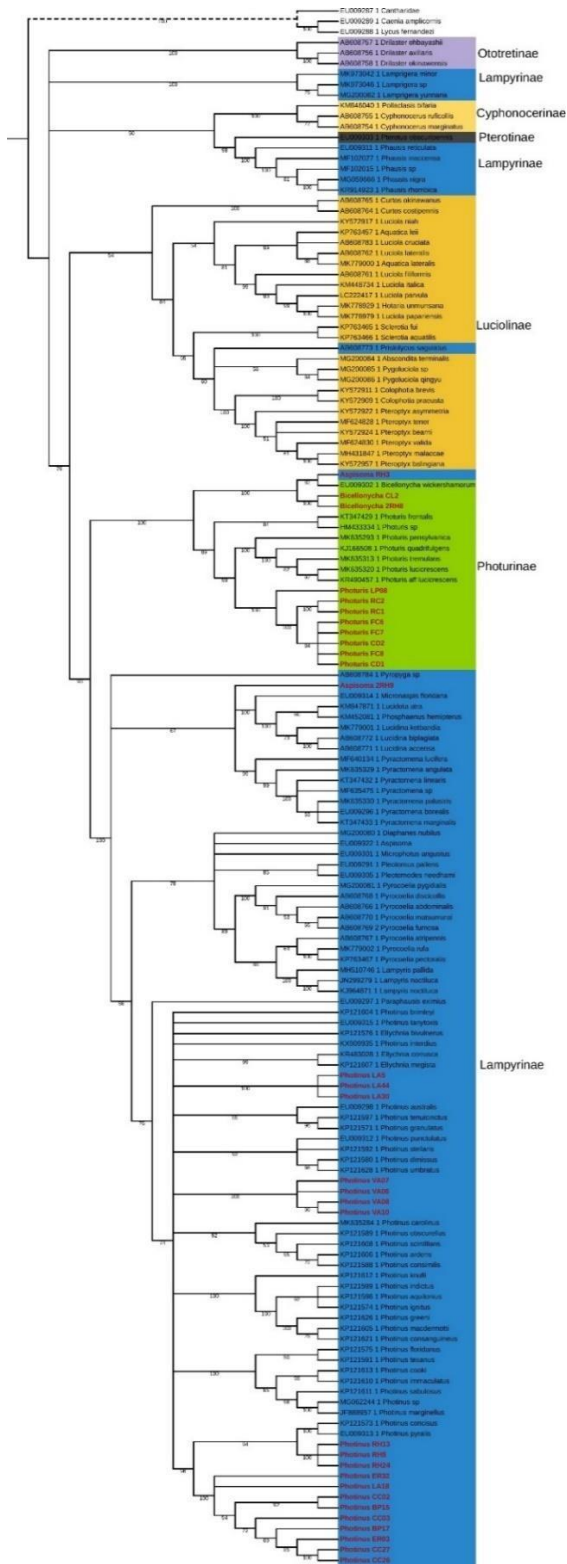


FIGURA 26. Árbol de inferencia bayesiana utilizando Mr bayes (loci COI). Los valores en las ramas y nodos representan el soporte bayesiano. Las secuencias resaltadas en rojo corresponden a las generadas en este estudio.



FIGURA 27. Mapa con localidades de muestreo mostrando departamentos y municipios. Puntos rojos corresponden a sitios de colecta en los diferentes departamentos (Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Sololá, Zacapa, Chiquimula y Alta Verapaz).

CUADRO 9. Cuantificación de producto de PCR (18S) al finalizar limpieza.

Código de Identificación	Concentración ADN(ng/μL)	A260/A280	A260/A230
LA5	37.8	1.84	1.97
LA18	46.1	1.88	2.43
LA30	102.3	1.67	0.43
LA44	66.8	1.55	0.63
CD1	43.9	1.88	2.02
CD2	52.7	1.87	2.44
FC6	38	1.7	0.92
FC7	60.1	1.86	1.58
FC8	44.7	1.85	2.21
RH8	49.4	1.85	0.97
RH13*	23.5	1.84	1.82
RH24	25.2	1.67	0.64
2RH8	55.7	1.78	1.19
RH3*	4.9	1.54	0.16
2RH9	33.6	1.86	2.3
RC1	20.5	1.82	2.08
RC2*	44.3	1.43	0.44
CL2	64.8	1.87	2.39
LP08*	12.6	1.9	1.33
LP17	33.3	1.75	0.6
VA08	49.7	1.79	1.08
VA10	30.8	1.82	2.31
BP14	48.4	1.82	1.12
BP15	45.7	1.81	1.06
ER02	54.1	1.89	2.8
ER03	53.6	1.8	1.63
CC02	N.A	N.A	N.A

Valores de cuantificación de producto de PCR posterior a realizar limpieza con kit comercial: ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System. * Corresponde a muestra que no se logró generar una secuencia de calidad.

CUADRO 10. Cuantificación de producto de PCR(28S) al finalizar limpieza.

Código de Identificación	Concentración ADN(ng/μL)	A260/A280	A260/A230
LA5	84.9	1.86	1.98
LA18	83.7	1.87	1.04
LA30	N.A	N.A	N.A
LA44	105.2	1.89	1.59
CD1	74.5	1.87	2.00
CD2	92.3	1.85	1.85
FC6	82.6	1.9	2.02
FC7	100.5	1.89	2.04
FC8	95.6	1.9	2.05
RH8	92.2	1.88	1.19
RH13	97.2	1.88	1.13
RH24	78.3	1.85	1.89
2RH8	N.A	N.A	N.A
RH3	N.A	N.A	N.A
2RH9	106.8	1.88	2.00
RC1	72.4	1.88	2.09
RC2	69.3	1.86	1.86
CL2*	7.5	1.73	0.2
LP08	83.7	1.87	1.04
LP17	N.A	N.A	N.A
VA08	53.3	1.82	1.35
VA10	57.6	1.89	1.99
BP14	75.3	1.91	2.15
BP15	76.1	1.77	1.38
ER02	73.2	1.9	2.14
ER03	N.A	N.A	N.A
CC02	82.6	1.83	1.5

Valores de cuantificación de producto de PCR posterior a realizar limpieza con kit comercial: ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System. * Corresponde a muestra que no se logró generar una secuencia de calidad. N.A corresponde a muestra que no se mandó a secuenciar.

CUADRO 11. Cuantificación de producto de PCR (COI) al finalizar limpieza.

Código de Identificación	Concentración ADN(ng/μL)	A260/A280	A260/A230
LA5	N.A	N.A	N.A
LA18	N.A	N.A	N.A
LA30	N.A	N.A	N.A
LA44	32.7	1.82	2.29
CD1	41.9	1.85	2.44
CD2	41.9	1.84	2.45
FC6	40.0	1.78	0.84
FC7	48.3	1.76	1.10
FC8	24.7	1.82	2.36
RH8	N.A	N.A	N.A
RH13	N.A	N.A	N.A
RH24	N.A	N.A	N.A
2RH8	36.3	1.87	2.35
RH3	4.5	1.62	1.38
2RH9	14.3	1.75	1.67
RC1	32.6	1.86	2.36
RC2	38.8	1.84	2.29
CL2	23.2	1.8	2.1
LP08	35.6	1.78	1.57
LP17	N.A	N.A	N.A
VA08	N.A	N.A	N.A
VA10	N.A	N.A	N.A
BP14	N.A	N.A	N.A
BP15	N.A	N.A	N.A
ER02	N.A	N.A	N.A
ER03	N.A	N.A	N.A
CC02	N.A	N.A	N.A

Valores de cuantificación de producto de PCR posterior a realizar limpieza con kit comercial: ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System. * Corresponde a muestra que no se logró generar una secuencia de calidad. N.A corresponde a muestras que la limpieza se realizó en Macrogen.

CUADRO 12. Secuencias generados para el loci 18s.

Nombre secuencia	%HQ	Longitud final	% Pairwise Identity	% Identidad
LA5_18S	97.0	732	95.8	95.8
LA18_18S	97.0	735	99.5	99.5
LA30_18S	97.8	733	99.8	99.8
LA44_18S	100	730	100	100
CD1_18S	92.7	737	99.7	99.7
CD2_18S	94.3	734	99.4	99.4
FC6_18S	91.2	660	93.0	93.0
FC7_18S	90.9	729	98.7	98.7
FC8_18S	95.8	690	100.0	100.0
RH8_18S	96.1	739	99.7	99.7
RH13_18S*	29.6	614	24.2	24.2
RH24_18S	100.0	729	99.8	99.8
2RH8_18S	95.9	655	75.8	75.8
RH3_18S*	0.4	791	56.2	56.2
2RH9_18S	98.2	729	95.1	95.1
RC1_18S	96.8	727	99.8	99.8
RC2_18S*	54.7	655	73.3	73.3
CL2_18S	99.9	732	98.8	98.8
LP08_18S*	51.0	716	91.3	91.3
LP17_18S	98.8	729	98.9	98.9
VA08_18S	93.7	743	99.2	99.2
VA10_18S	97.7	739	99.2	99.2
BP14_18S	95.1	718	99.8	99.8
BP15_18S	96.3	677	97.6	97.6
ER02_18S	98.2	738	99.1	99.1
ER03_18S				
CC026_18S	97.3	738	99.4	99.4

Secuencias generadas del loci 18s. Porcentaje HQ= Cónfigo consenso de alta calidad. Longitud final de la secuencia consenso. Porcentaje Pairwise Identity= porcentaje de residuos que son idénticos en el alineamiento. Porcentaje identidad= porcentaje de columnas en el alineamiento para cual todas las secuencias son idénticas.

CUADRO 13. Secuencias generados para el loci 28s.

Nombre secuencia	%HQ	Longitud final	% Pairwise Identity	% Identidad
LA5_28S	94.6	717	99.7	99.7
LA18_28S	99.0	691	98.7	98.7
LA30_28S	NA	NA	NA	NA
LA44_28S	95.2	706	99.2	99.2
CD1_28S	98.3	711	95.5	95.5
CD2_28S	99.4	694	100.0	100.0
FC6_28S	99.9	697	99.8	99.8
FC7_28S	98.7	699	93.7	93.7
FC8_28S	97.9	698	99.5	99.5
RH8_28S	99.4	694	99.7	99.7
RH13_28S	99.1	690	100.0	100.0
RH24_28S	98.7	691	98.9	98.9
2RH8_28S	N.A	N.A	N.A	N.A
RH3_28S	N.A	N.A	N.A	N.A
2RH9_28S	98.0	751	100.0	100.0
RC1_28S	99.9	697	95.7	95.7
RC2_28S	99.7	695	95.7	95.7
CL2_28S	52.4	733	67.7	67.7
LP08_28S	95.2	687	95.6	95.6
LP17_28S	N.A	N.A	N.A	N.A
VA08_28S	93.6	653	97.2	97.2
VA10_28S	94.2	687	96.8	96.8
BP14_28S	94.4	677	99.6	99.6
BP15_28S	91.3	682	98.7	98.7
ER02_28S	91.5	694	99.2	99.2
ER03_28S	N.A	N.A	N.A	N.A
CC02_28S	90.6	659	99.8	99.8
CC26_28S	95.9	611	89.6	89.6

Secuencias generadas del loci 28s. Porcentaje HQ= C ntigo consenso de alta calidad. Longitud final de la secuencia consenso. Porcentaje Pairwise Identity= porcentaje de residuos que son idénticos en el alineamiento. Porcentaje Identidad= porcentaje de columnas en el alineamiento para cual todas las secuencias son idénticas.

CUADRO 14. Secuencias generados para el loci COI.

Nombre secuencia	%HQ	Longitud final	% Pairwise Identity	% Identidad
LA5_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
LA18_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
LA30_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
LA44_COI	97.9	678	99.8	99.8
CD1_COI	99.1	680	99.7	99.7
CD2_COI	99.4	678	100.0	100.0
FC6_COI	99.6	676	99.7	99.7
FC7_COI	99.0	682	100.0	100.0
FC8_COI	96.1	699	100.0	100.0
RH8_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
RH13_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
RH24_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
2RH8_COI	98.7	683	100.0	100.0
RH3_COI	96.4	676	99.2	99.2
2RH9_COI	84.4	699	98.0	98.0
RC1_COI	99.6	678	100.0	100.0
RC2_COI	97.3	694	99.7	99.7
CL2_COI	98.1	680	100.0	100.0
LP08_COI	96.7	694	99.2	99.2
LP17_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
VA08_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
VA10_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
BP14_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
BP15_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
ER02_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
ER03_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
CC02_COI	N.A	N.A	N.A	N.A
CC26_COI	N.A	N.A	N.A	N.A

Secuencias generadas del loci COI. %HQ= Cónfigo consenso de alta calidad. Longitud final de la secuencia consenso. % Pairwise Identity= % de residuos que son idénticos en el alineamiento. % Identidad= % de columnas en el alineamiento para cual todas las secuencias son idénticas.

CUADRO 15. Taxones empleados y su número de acceso de GenBank

Familia	Sub familia	Especie	28s	18s	COI
Lampyridae	Luciolinae	<i>Abscondita_terminalis</i>	N.A	N.A	MG20008 4.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Aquatica_ficta</i>	N.A	N.A	KP76345 6.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Aquatica_lateralis</i>	N.A	N.A	MK77900 0.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Aquatica_leii</i>	N.A	MT89942 7.1	KP76345 7.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Aspisoma</i>	KY317824.1	EU00924 8.1	EU00932 2.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Aspisoma_2RH9</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Photurinae	<i>Bicellonycha_wickershamorum</i>	N.A	KY31779 1.1	EU00930 2.1
Lampyridae	Ototetinae	<i>Brachylampis_blaisdelli</i>	N.A	EU00923 0.1	EU00930 4.1
Lampyridae	Photurinae	<i>Bycellonycha_2RH8</i>	NO SALIO	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Photurinae	<i>Bycellonycha_CL2</i>	NO SALIO	Este estudio	Este estudio
Lycidae	Lycinae	<i>Caenia_amplicornis</i>	N.A	N.A	EU00928 9.1
Cantharidae	Cantharidae	<i>Cantharidae</i>	N.A	KY31779 3.1	EU00928 7.1
Lycidae	Metriorrhynchinae	<i>Cautires_sp.</i>	N.A	KC53817 0.1	N.A
Lampyridae	Ototetinae	<i>Ceylanidrilus sp.</i>	N.A	DQ10052 4.1	N.A
Lampyridae	Luciolinae	<i>Colophotia_brevis</i>	N.A	N.A	KY57291 1.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Colophotia_praeusta</i>	N.A	N.A	KY57290 9.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Consensus_RH3</i>	N.A	N.A	Este estudio
Lampyridae	Luciolinae	<i>Curtos_costipennis</i>	N.A	AB29884 8.1	AB60876 4.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Curtos_okinawanus</i>	N.A	AB29884 9.1	AB60876 5.1
Lampyridae	Cyphonocerinae	<i>Cyphonocerus marginatus</i>	N.A	N.A	AB60875 4.1
Lampyridae	Cyphonocerinae	<i>Cyphonocerus_ruficollis</i>	N.A	AB29884 3.1	AB60875 5.1

Familia	Sub familia	Especie	28s	18s	COI
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Diaphanes_formosus</i>	N.A	EU009243.1	EU009317.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Diaphanes_nubilus</i>	N.A	N.A	MG20008 0.1
Lampyridae	Ototetinae	<i>Drilaster_axillaris</i>	N.A	AB29885 3.1	AB60875 6.1
Lampyridae	Ototetinae	<i>Drilaster_ohbayashii</i>	N.A	AB298854.1	AB60875 7.1
Lampyridae	Ototetinae	<i>Drilaster_okinawensis</i>	N.A	N.A	AB608758.1
Lampyridae	Ototetinae	<i>Drilaster_sp.</i>	N.A	DQ100517.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Ellychnia_bivulnerus</i>	N.A	N.A	KP121576.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Ellychnia_corrusca</i>	N.A	EU00922 5.1	KR48302 8.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Ellychnia_megista</i>	N.A	N.A	KP12160 7.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Ellychnia_sp.</i>	KY317831.1	KY31779 7.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Erythrolychnia_sp.</i>	KY317832.1	KY31779 9.1	N.A
Lampyridae	Ototetinae	<i>Flabellotreta obscuricollis</i>	N.A	DQ10051 9.1	N.A
Lampyridae	Ototetinae	<i>Flabellotreta_sp.</i>	N.A	DQ10052 0.1	N.A
Lampyridae	Luciolinae	<i>Hotaria_unmunsana</i>	N.A	N.A	MK77892 9.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lamprigera_minor</i>	N.A	N.A	MK97304 2.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lamprigera_sp.</i>	N.A	KY31780 0.1	MK97304 6.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lamprigera_yunnana</i>	N.A	N.A	MG20008 2.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lamprocera_sp.</i>	N.A	KY31780 1.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lamprohiza splendidula</i>	N.A	EU00924 5.1	JF889652 .1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lampyris_noctiluca</i>	KY317833.1	KY31780 2.1	KJ964871 .1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lampyris_pallida</i>	N.A	N.A	MH51074 6.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lucidina_accensa</i>	N.A	N.A	AB60877 1.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lucidina_biplagiata</i>	LC021352.1	AB29884 4.1	AB60877 2.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lucidina_kotbandia</i>	N.A	N.A	MK77900 1.1

Familia	Sub familia	Especie	28s	18s	COI
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lucidota atra</i>	KY31783 4.1	KY31780 3.1	KM84787 1.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lucidota luteicollis</i>	N.A	KY31780 4.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lucidota sp</i>	JQ91225 4.1	N.A	N.A
Lampyridae	Luciolinae	<i>Luciola cruciata</i>	N.A	N.A	AB60878 3.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Luciola filiformis</i>	N.A	AB29885 0.1	AB60876 1.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Luciola italica</i>	N.A	N.A	KM4487 34.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Luciola niah</i>	N.A	N.A	KY57291 7.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Luciola papariensis</i>	N.A	N.A	MK77897 9.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Luciola parvula</i>	N.A	AB29885 2.1	LC22241 7.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Luciola sp.</i>	N.A	EU00924 4.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Lychnuris formosana</i>	N.A	EU00924 2.1	N.A
Lycidae	Lycinae	<i>Lycus fernandezii</i>	N.A	N.A	EU00928 8.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Micronaspis floridana</i>	N.A	EU00924 0.1	EU00931 4.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Microphotus angustus</i>	N.A	EU00922 7.1	EU00930 1.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Microphotus octarthus</i>	KY31783 5.1	KY31780 5.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Microphotus sp</i>	N.A	KY31780 6.1	N.A
Lampyridae	Ototetinae	<i>Mimophaeopterus sp.</i>	N.A	DQ10052 3.1	N.A
Lampyridae	Ototetinae	<i>Ototretadrilus sp.</i>	N.A	KP41920 7.1	N.A
Lampyridae	Ototetinae	<i>Ototretinae sp.</i>	N.A	DQ10052 1.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Paraphausis eximius</i>	N.A	EU00922 3.1	EU00929 7.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Phausis inaccensa</i>	N.A	N.A	MF10202 7.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Phausis nigra</i>	N.A	N.A	MG05966 6.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Phausis reticulata</i>	N.A	EU00923 7.1	EU00931 1.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Phausis rhombica</i>	N.A	N.A	KR91492 3.1

Familia	Sub familia	Especie	28s	18s	COI
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Phausis_sp.</i>	N.A	N.A	MF10201 5.1
Phengodidae	Phengodinae	<i>Phengodes_frontalis</i>	N.A	N.A	HM43357 0.1
Phengodidae	Phengodinae	<i>Phengodidae sp.</i>	N.A	KF62573 5.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Phosphaenus_hemipterus</i>	N.A	EU00924 6.1	KM45208 1.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_aquilonius</i>	N.A	N.A	KP12159 6.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_ardens</i>	N.A	N.A	KP12160 6.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_australis</i>	N.A	EU00922 4.1	EU00929 8.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_carolinus</i>	N.A	N.A	MK63528 4.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_collustrans</i>	KY31783 8.1	KY31780 9.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_conciscus</i>	N.A	N.A	KP12157 3.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_consanguineus</i>	N.A	N.A	KP12162 1.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_consimilis</i>	N.A	N.A	KP12158 8.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_cooki</i>	N.A	N.A	KP12161 3.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_curtatus</i>	KY31783 9.1	KY31781 0.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_dimissus</i>	N.A	N.A	KP12158 0.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_floridanus</i>	N.A	EU00923 2.1	KP12157 5.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_granulatus</i>	N.A	N.A	KP12157 1.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_greeni</i>	N.A	N.A	KP12162 6.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_ignitus</i>	N.A	N.A	KP12157 4.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_immaculatus</i>	N.A	N.A	KP12161 0.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_indictus</i>	N.A	N.A	KP12159 9.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_interdius</i>	N.A	N.A	KX90993 5.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_knulli</i>	N.A	N.A	KP12161 2.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_BP14</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio

Familia	Sub familia	Especie	28s	18s	COI
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_BP15</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_CC02</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_CC26</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_ER02</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_LA18</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_LA5</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_RH13</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_RH24</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_RH8</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_VA08</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_VA10</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_LA44</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_macdermotti</i>	KY31784 0.1	KY31781 1.1	KP12160 5.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_marginellus</i>	N.A	N.A	JF888957 .1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_punctulatus</i>	N.A	EU00923 8.1	EU00931 2.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_pyralis</i>	N.A	KY31781 2.1	EU00931 3.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_sabulosus</i>	N.A	N.A	KP12161 1.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_scintillans</i>	N.A	N.A	KP12160 8.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_sp.</i>	N.A	KY31781 4.1	MG06224 4.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_stellaris</i>	KY31784 4.1	KY31781 3.1	KP12159 2.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_tanytoxis</i>	N.A	EU00924 1.1	EU00931 5.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_tenuicinctus</i>	N.A	N.A	KP12159 7.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_texanus</i>	N.A	N.A	KP12159 1.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Photinus_umbratus</i>	N.A	N.A	KP12162 8.1

Familia	Sub familia	Especie	28s	18s	COI
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris</i> _aff. <i>lucicrescens</i>	N.A	EU00921 6.1	KR49045 7.1
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris_CD1</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris_CD2</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris_FC6</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris_FC7</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris_FC8</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris_frontalis</i>	N.A	N.A	KT347429.1
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris_LP08</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris lucicrescens</i>	N.A	N.A	MK635320.1
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris pensylvanica</i>	N.A	U65129.1	MK635293.1
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris quadrifulgens</i>	N.A	EU00923 6.1	KJ166508 .1
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris_RC1</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris_RC2</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
Lampyridae	Photurinae	<i>Photuris tremulans</i>	N.A	EU009234.1	MK635313.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pleotomodes needhami</i>	N.A	EU009231.1	EU009305.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pleotomus pallens</i>	N.A	EU009217.1	EU009291.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pleotomus</i> _sp.	N.A	KY317817.1	N.A
Lampyridae	Cyphonocerinae	<i>Pollaclasis bifaria</i>	N.A	EU009221.1	KM846040.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pristolycus sagulatus</i>	N.A	N.A	AB608773.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Pteroptyx asymmetria</i>	N.A	N.A	KY572922.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Pteroptyx balingiana</i>	N.A	N.A	KY572957.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Pteroptyx bearni</i>	N.A	N.A	KY572924.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Pteroptyx galbina</i>	N.A	N.A	KY572914.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Pteroptyx malaccae</i>	N.A	N.A	MH431847.1

Familia	Sub familia	Especie	28s	18s	COI
Lampyridae	Luciolinae	<i>Pteroptyx_tener</i>	N.A	N.A	MF62482 8.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Pteroptyx_testacea</i>	N.A	N.A	KY57291 9.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Pteroptyx_valida</i>	N.A	N.A	MF62483 0.1
Lampyridae	Pterotus	<i>Pterotus_obscuripennis</i>	N.A	KP419253.1	EU00930 3.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Pygoluciola_qingyu</i>	N.A	N.A	MG20008 6.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Pygoluciola_sp.</i>	N.A	N.A	MG20008 5.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyractomena_angulata</i>	N.A	EU00923 3.1	MK63532 9.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyractomena_borealis</i>	N.A	EU00922 2.1	EU009296.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyractomena_dispersa</i>	KY31784 7.1	KY31781 8.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyractomena_linearis</i>	N.A	N.A	KT34743 2.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyractomena_marginalis</i>	N.A	N.A	KT34743 3.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyractomena_palustris</i>	N.A	EU00923 5.1	MK63533 0.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyractomena_sp.</i>	KY31784 8.1	KY31781 9.1	MF63547 5.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia_abdominalis</i>	LC02135 9.1	N.A	AB60876 6.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia_analis</i>	LC02132 3.1	N.A	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia_atripennis</i>	LC02136 0.1	AB29884 5.1	AB60876 7.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia_discicollis</i>	LC02135 1.1	N.A	AB60876 8.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia_fumosa</i>	LC02131 8.1	AB29884 6.1	AB60876 9.2
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia_matsumurai</i>	LC02134 2.1	AB29884 7.1	AB60877 0.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia_miyako</i>	LC02131 6.1	N.A	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia_oshimana</i>	LC02132 5.1	N.A	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia_pectoralis</i>	N.A	N.A	KP76346 7.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia_praetexta</i>	LC02134 0.1	N.A	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia_pygidialis</i>	N.A	N.A	MG20008 1.1

Familia	Sub familia	Especie	28s	18s	COI
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia rufa</i>	LC02133 7.1	N.A	MK77900 2.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrocoelia sp.</i>	LC02133 3.1	KP41925 8.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyrogaster sp.</i>	KY31785 0.1	KY31782 1.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyropyga decipiens</i>	N.A	EU00922 6.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyropyga nigricans</i>	KY31785 1.1	EU00922 0.1	N.A
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Pyropyga_sp.</i>	N.A	N.A	AB60878 4.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Robopus_sp.</i>	N.A	KY31782 3.1	N.A
Rhagophthalmidae	Rhagophthalminae	<i>Rhagophthalmus ohbai</i>	N.A	N.A	AB60877 5.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Sclerotia aquatilis</i>	N.A	N.A	KP76346 6.1
Lampyridae	Luciolinae	<i>Sclerotia_fui</i>	N.A	N.A	KP76346 5.1
Lampyridae	Otrotetinae	<i>Stenocladus_sp.</i>	N.A	DQ10052 5.1	N.A
Lampyridae	Otrotetinae	<i>Stenocladus yoshikawai</i>	N.A	AB29885 5.1	AB60875 9.1
Lampyridae	Lampyrinae	<i>Vesta_sp.</i>	N.A	JN61923 7.1	N.A