

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Charakteristika mitochondriálního genomu paličníka fialového
Necrobia violacea (Coleoptera: Cleridae)**

Bakalářská práce

Hana Velanová

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

Školitel specialista: plk. Ing. Hana Šuláková, Ph.D.

České Budějovice 2018

Bakalářská práce

Velanová, H., 2018: Charakteristika mitochondriálního genomu paličníka fialového *Necrobia violacea* (Coleoptera: Cleridae). [Characteristics of the mitochondrial genome of Blacklegged Ham Beetle *Necrobia violacea* (Coleoptera: Cleridae). Bc. Thesis, in Czech.] - 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The nearly complete sequence of mitochondrial DNA from the beetle *Necrobia violacea* was acquired and characterized. The obtained sequence contained standard series of 37 genes of which 13 were protein-coding genes, 22 were tRNAs and 2 were rRNAs. Due to high AT content a certain part of control region could not be sequenced. Gene order matched the ancestral state of all insects. Mitogenome was compared with 10 species within the infraorder Cucujiformia using all protein-coding genes. Presumed taxonomical position of *N. violacea* was confirmed.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 13. 4. 2018

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení, poskytnutí cenných rad a literatury a za velice vstřícný přístup. Také bych chtěla poděkovat Haně Šulákové za poskytnutí zkoumaného materiálu a velký dík patří též kolektivu laboratoře, kam jsem si vždy mohla přijít pro radu.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Mitochondrie.....	1
1.1.1	Mitochondrie jako molekulární marker.....	2
1.2	Forenzní entomologie.....	3
1.3	Cleridae.....	6
1.3.1	Pestrokrovečník <i>Necrobia violacea</i>	8
2	Cíle práce.....	10
3	Materiál a metody.....	11
3.1	Materiál.....	11
3.2	Izolace DNA.....	11
3.3	PCR amplifikace.....	11
3.3.1	Reakční směs.....	11
3.3.2	Primery.....	12
3.3.3	PCR profily pro amplifikaci jednotlivých fragmentů.....	14
3.4	Gelová elektroforéza.....	16
3.5	Přečištění PCR produktu.....	17
3.6	Sekvenace.....	17
3.7	Zpracování dat a anotace mitogenomu.....	17
3.7.1	Zpracování dat.....	17
3.7.2	Anotace mitogenomu.....	17
4	Výsledky.....	19
4.1	Výběr cílového druhu.....	19
4.2	Mitochondriální genom <i>Necrobia violacea</i>	19
4.2.1	Zastoupení bází v mitogenomu.....	20
4.2.2	Geny kódující proteiny.....	21
4.2.3	tRNA.....	22
4.2.4	rRNA.....	25
4.2.5	Nekódující oblasti.....	25
4.3	Mezidruhové porovnání vybraných mitochondriálních genomů.....	27
4.3.1	Pořadí genů.....	27
4.3.2	Fylogenetická rekonstrukce.....	27
5	Diskuze.....	30
5.1	Mitochondriální genom <i>Necrobia violacea</i>	31
5.1.1	Zastoupení bází v mitogenomu.....	31

5.1.2	Geny kódující proteiny	32
5.1.3	RNA.....	32
5.1.4	Nekódující oblasti.....	32
5.2	Srovnání mitogenomů.....	33
5.2.1	Pořadí genů.....	33
5.2.2	Fylogenetická rekonstrukce.....	33
6	Závěr.....	35
7	Literatura.....	36

1 Úvod

Řád brouci (Coleoptera), s více než 380 000 popsányými zástupci (Ślipiński et al., 2011), se vyznačují obrovskou diverzitou na morfologické, ekologické i behaviorální úrovni.

Pro porozumění fylogeneze a evoluce tohoto extrémně diverzního řádu je třeba sáhnout po molekulárních metodách. Nejpoužívanějším zdrojem molekulárních dat se, během posledních desetiletí, stal mitochondriální genom (mitogenom), který oplývá mnohými výhodami a prozatím zůstává nejefektivnějším nástrojem právě pro fylogenezi, dále pro fylogeografii, populační genetiku, molekulární evoluci (Cameron, 2014a) a mimo jiné má své uplatnění i ve forenzní praxi.

1.1 Mitochondrie

Mitochondrie je fundamentální organelou všech eukaryotních buněk, která zajišťuje především produkci energie formou oxidativní fosforylace, tedy tvorbu ATP aerobním rozkladem organických molekul. Tato organela se také podílí na dalších funkcích v buňce, jako je například apoptóza nebo buněčné stárnutí (Cameron, 2014a). Každá mitochondrie má dvě membrány, vnitřní a vnější, které vytvářejí dva mitochondriální oddíly, matrix a mezimembránový prostor. Ve vnitřní membráně je zanořena většina proteinů, které společně tvoří elektrontransportní řetězec potřebný právě pro oxidativní fosforylaci (Alberts, 1998).

Obecně přijímaným faktem je, že mitochondrie vznikla endosymbiózou, tedy pohlcením a integrací volně žijící bakterie hostitelskou buňkou, před více než 1,5 miliardami let (Smith, 2016). Tato bakterie má nejpravděpodobněji své kořeny ve třídě α -Proteobakterií a za jejího nejbližšího příbuzného je považována parazitická bakterie rodu *Rickettsia*, u které se ukázalo, že má podstatně redukovaný bakteriální genom a podobá se mitochondrii svou závislostí na hostitelské buňce (Andersson et al., 1998). Zatímco o předku mitochondrie existuje docela jasná představa, otázkou zůstává, jak vypadala pradávna hostitelská buňka. Kooninem (2010) byly představeny dvě teorie. První říká, že hostitelem byla hypotetická, primitivní eukaryotní buňka, zatímco druhá předpokládá, že pozření α -Proteobakterie buňkou z domény *Archea* vedlo ke vzniku mitochondrie a zároveň k evoluci jádra a kompartmentalizaci eukaryotické buňky. Která však opravdu ke vzniku mitochondrie vedla, jisté není (Koonin, 2010). Co však víme je, že mitochondrie v evoluci vznikla pouze jednou (Gray et al., 1999; Lang et al., 2004).

Mitochondrie během své evoluce, v porovnání se svými bakteriálními předky, musely ztratit značnou část svého genomu. Množství genů, které jsou kódovány mitochondrií, je mezi eukaryotními organismy velice variabilní, například bičíkatý prvok *Reclinomonas americana*, obsahuje ve své mitochondrii rekordních 67 genů kódujících proteiny. Na opačném pólu můžeme najít příkladem parazitického prvoka *Plasmodium falciparum*, původce malárie, který má mitochondriální geny pouze tři (Gray et al., 1999). Různý obsah genů v mitochondriální DNA (mtDNA) je připisován především přesunům genů z mitochondrie do jádra a je to proces, který stále pokračuje (Lang et al., 2004; Gray et al., 1999). Mitochondriální geny kódují především komponenty, které jsou funkční v rámci oxidativní fosforylace, syntézy a transportu proteinů, zpracovávání RNA a výjimečně transkripce (Lang et al., 2004).

Mitochondriální DNA živočichů je kruhová molekula, výjimku tvoří pouze 3 třídy žahavců, u kterých je lineární (Bridge et al., 1992). Obecně se jedná o relativně krátkou molekulu, nejčastěji mezi 15 a 20 kb, obsahující 37 genů. Typický živočišný mitochondriální genom kóduje 13 proteinových podjednotek enzymů oxidativní fosforylace, 2 rRNA mitochondriálního ribozomu a 22 tRNA potřebných k translaci proteinů kódovaných v mtDNA. Jedná se o následující geny kódující proteiny: ATP syntáza, podjednotky 6 a 8 (*ATP6*, *ATP8*), cytochrom oxidáza b (*CytB*), cytochrom oxidáza c, podjednotky 1 – 3 (*COX1* - *COX3*) a NADH dehydrogenáza, podjednotky 1 – 6 a 4L (*ND1* – *ND6*, *ND4L*). Tato sada 37 genů je v rámci trojlistých (Bilateria) vysoce konzervovaná (Boore, 1999). Kromě genů se zde nachází různé nekódující oblasti, největší z nich se nazývá kontrolní region (nebo také AT oblast). Tyto nekódující oblasti slouží jako vazebná místa proteinů, které se podílejí na genomové replikaci a transkripci (Cameron, 2014b). Pořadí genů zůstává v evolučním čase často neměnné, i když je známo, že mitochondriální DNA se vyvíjí relativně rychle. Téměř vždy je pořadí genů velice stabilní uvnitř hlavních skupin, ale variabilní mezi nimi, a proto má jejich porovnávání velký potenciál k poznání živočišné fylogeneze (Boore, 1999).

1.1.1 Mitochondrie jako molekulární marker

MtDNA je v současnosti nejvíce sekvenovaným typem eukaryotického chromozomu (Smith a Keeling, 2015). Celé to začalo v roce 1981, kdy byly osekvenovány první dvě mtDNA, a to myší a lidská, které byly také prvními osekvenovanými neviróvými genomy vůbec (Anderson et al., 1981; Bibb et al., 1981) a k 10. 3. 2018 bylo už v databázi GenBank uloženo více než 8800 kompletních mitochondriálních genomů. Tato data měla vliv na široké spektrum vědeckých disciplín a v podstatě na jejich základě bylo formováno pochopení eukaryotického života, jeho původu, diverzity a komplexity (Gray, 2012).

Mitochondriální DNA se ukázala být velice užitečným nástrojem k poznávání fylogenetických vztahů zejména u živočichů. Její předností je především malá velikost, maternální dědičnost, fakt, že u ní téměř nedochází k rekombinaci a vysoká evoluční rychlost. Navíc je u eukaryot univerzálně přítomná, snadno izolovatelná, má jednoduchou genetickou strukturu bez komplikovaných rysů, jako repetitivní DNA, mobilní elementy nebo introny, a v buňce se vyskytuje ve více kopiích (Avisé et al., 1987). Výše uvedené vlastnosti dělají z mtDNA jeden z nejlepších molekulárních markerů. Pro určení fylogenetických vztahů na různých taxonomických úrovních se využívá různý počet a kombinace mitochondriálních genů (Hunt et al. 2007; Bocak et al. 2014), stejně jako celé mitogenomy (Li et al., 2016; Youan et al., 2016). Nevyužívá se jí však pouze ve fylogenezi, ale také ve studiích zabývajících se fylogeografií, populační genetikou a molekulární evolucí (Cameron, 2014a). V neposlední řadě se mtDNA využívá také ve forenzní entomologii.

1.2 Forenzní entomologie

Forenzní entomologie je analýzou hmyzích důkazů pro forenzní a právní účely (Amendt et al., 2007). Můžeme ji rozdělit do třech základních kategorií, kterými jsou problematika potravinářských škůdců, oblast parazitů lidí a zvířat a stanovení doby smrti u nalezených lidských těl (Šuláková, 2014). Zdaleka nejdůležitější a nejčastější je stanovení minimální doby, která uplynula od smrti jedince, která se také nazývá post mortem interval (PMI) (Catts a Goff, 1992). Soudně lékařské metody jsou limitovány přibližně na prvních 72 hodin od smrti (Campobasso, 2001) a v tuto chvíli se entomologické metody stávají jedny z nejpřesnějších. Díky pachové atrakci bývá hmyz jedním z prvních konzumentů, které na mrtvolách najdeme (Šuláková, 2006). V závislosti na přístupnosti a podmínkách prostředí nekrosaprofágní hmyz pohotově kolonizuje čerstvou mrtvolu a aktivně se podílí na jejím rozkladu. Mezi úmrtím a první kolonizací hmyzem však může vzniknout určitá prodleva, která může zkomplikovat stanovení PMI, protože forenzní entomolog je schopen stanovit jediné dobu, která uplynula od počátku kolonizace (Šuláková, 2014). V případě, že je mrtvola volně exponovaná, nastávají zpravidla tři případy. Když jsou přítomna krvácivá poranění, hmyz je aromatem krve nalákán téměř okamžitě. V případě, že jedná o intaktní tělo, hmyz je přitahován později, uvolňovanými plyny, a časová prodleva mezi úmrtím a kolonizací může být delší. Posledním případem je, že kolonizace nastává ještě před úmrtím (Šuláková, 2014). Z taxonomického hlediska převládají ve společnosti kolonizátorů brouci (asi 50%), následují mouchy (asi 35%), které jsou zároveň dominantní v rámci počtu nalézáných jedinců, a zbytek připadá z největší části na motýly, blanokřídlé, cizopasně vosy a mravence (Šuláková, 2006).

Hlavním principem forenzní entomologie v kriminalistice je sukcese, to znamená, že se jednotlivé druhy hmyzu na těle nevyskytují současně nýbrž postupně, ve vlnách. Průběh sukcese se může lišit v závislosti na vnějších podmínkách a podle jejího průběhu se rozlišuje různý počet fází (Šuláková, 2006, 2014; Straus et al., 2017). V oblastech mírného pásu se používá stupnice o 6 stádiích (Payne a Crossley, 1966). Jednotlivá stadia včetně kolonizátorů byla, specificky pro ČR, popsána H. Šulákovou (2006, 2014) a jsou následující:

1. vlna: čerstvé tělo. Probíhá bezprostředně po smrti člověka, typickými kolonizátory jsou vosy a mravenci z řádu blanokřídých (Hymenoptera), ale ti nemají z hlediska stanovení PMI téměř žádný význam. Skutečně kriminalisticky významná je však čeleď bzučivkovití (Calliphoridae), která vyhledává mrtvolu za účelem kladení, a proto je časová prodleva mezi úmrtím a nakladením prvních vajíček minimální.
2. vlna: nadmuté tělo. V trávicím traktu vznikají plynné látky, díky mikrobiálnímu rozkladu, na něž reagují opět bzučivkovití a dále masařkovití (Sarcophagidae) a moučovití (Muscidae). Z brouků osidlují v této fázi tělo mrchožroutovití (Silphidae). Brouci jsou méně přesným indikátorem PMI, protože kolonizují tělo s větší prodlevou od úmrtí a navíc mohou setrvávat delší dobu, než nakladou vajíčka.
3. vlna: biochemicky aktivní. Tuto můžeme rozdělit ještě na dvě subfáze, kde při první dochází ke zmydelnění tuků a je typická pro mouchy rodu *Hydrotaea* a brouky z čeledi drabčíkovití (Staphylinidae), mršníkovití (Histeridae) a lesknáčovití (Nitidulidae). Při druhé subfázi dochází k fermentaci proteinů, a ta přitahuje mouchy z čeledi sýrohlodkovití (Piophilidae), kmitalkovití (Sepsidae) a slunilkovití (Fanniidae), zatímco z brouků můžeme nalézt kožojedy (Dermestidae) a pestrokrvečníky (Cleridae).
4. vlna: pokročilý rozklad. Dochází zde k čpavkové fermentaci zbytků měkkých tkání, kromě toho, že se zde vyskytuje většina hmyzu z předchozí vlny, najdeme také mušky z čeledi hrbilkovité (Phoridae).
5. vlna: vysychání zbytků měkkých tkání. Tělo dále rozkládají larvy sýrohlodek a hrbilek, kožojedy a pestrokrvečníci, nově se vyskytují hlodáčovití (Trogidae).
6. vlna: kosterní zbytky: většina měkkých tkání byla rozložena a na rozkladu ostatních zbytků se podílejí roztoči (Acari) a červotočovití (Anobiidae).

Pro správné určení doby kolonizace je naprosto zásadní přesná identifikace nalezeného druhu, rekonstrukce teploty na místě činu po dobu výskytu těla a modelování rychlosti vývoje nedospělých jedinců na základě znalosti jejich vývojových cyklů (Amendt et al., 2011).

Morfologická identifikace dospělců je velice komplexní procedura, vzhledem k tomu, že jsou si některé příbuzné druhy velice podobné a vyžaduje experty v oboru taxonomie. U nedospělých jedinců je identifikace prakticky nemožná, vzhledem k tomu, že anatomické rozdíly nejsou pro mnohé druhy známy (Wells a Stevens, 2008; Amendt et al., 2011). Jednou možností je domácí odchování larev na mase, které je však zdlouhavé (Šuláková, osobní komunikace).

Alternativou je identifikace druhu pomocí molekulárních technik. Prvním vědcem, který navrhnul použití DNA pro tyto účely, byl Sperling et al. v roce 1994. Ten použil 2300 párů bází dlouhou oblast v rámci mitochondriálních genů *COX1*, *COX2* a tRNA leucinu k identifikaci 3 druhů much čeledi bzučivkovití (Calliphoridae), jednalo se o druhy *Phormia regina*, *Lucilia sericata* (jako *Phaenicia sericata*) a *Lucilia illustris*. Stejně jako práce Sperlinga et al. (1994), se většina prací zabývá identifikací druhu pomocí mitochondriální DNA, a to hlavně pomocí genu kódujícího podjednotku 1 a 2 cytochrom oxidázy (*COX1*, *COX2*). Tyto byly vybrány hlavně proto, že obsahují sekvence jak variabilní tak vysoce konzervované (Morlais a Severson, 2002). Referenční sekvence genů *COX1* a *COX2* mnoha druhů můžeme najít v databázi GenBank (Sperling et al., 1994; Wallman a Dolleman, 2001; Wells a Sperling, 2001; Amendt et al., 2011).

Běžným způsobem jak analyzovat sekvence je procedura, která zahrnuje tři kroky: extrakci DNA, amplifikaci genu, který nás zajímá a sekvenaci. Následně se získaná sekvence porovná s referenční sekvencí, která je uložena v určité databázi (např. GenBank). Pro toto porovnání je však potřeba mít kompletní databázi příbuzných druhů, jinak by mohlo snadno dojít k záměně druhu, která by mohla být ve forenzním kontextu fatální (Amendt et al., 2011). Ačkoli je identifikace druhu na základě genů *COX1* (případně *COX2* nebo dalších) většinou postačující, vyskytly se případy, kdy se, například díky nedostatečné variabilitě mezi druhy, identifikace nepodařila (Wallman a Donnellan, 2001; Wells et al., 2007), v takovém případě se ukázalo být vhodné použití celého mitogenomu. Kompletní sekvence se využívá zejména pro výběr vhodných markerů pro identifikaci a také pro studium fylogenetických vztahů, kde dochází k výraznému zlepšení výsledků (Nelson et al., 2012).

V množství kompletně osekvenovaných mitogenomů forenzně významného hmyzu výrazně převažují zástupci řádu doukřídli (Diptera). Zatímco dvoukřídli mají v databázi GenBank 27 zástupců ze 3 čeledí (Calliphoridae, Muscidae a Phoridae), z brouků (Coleoptera)

v této databázi můžeme najít pouze 3 zástupce ze 2 čeledí (Staphylinidae a Silphidae), z nichž ani jeden se běžně v našich podmínkách nevyskytuje.

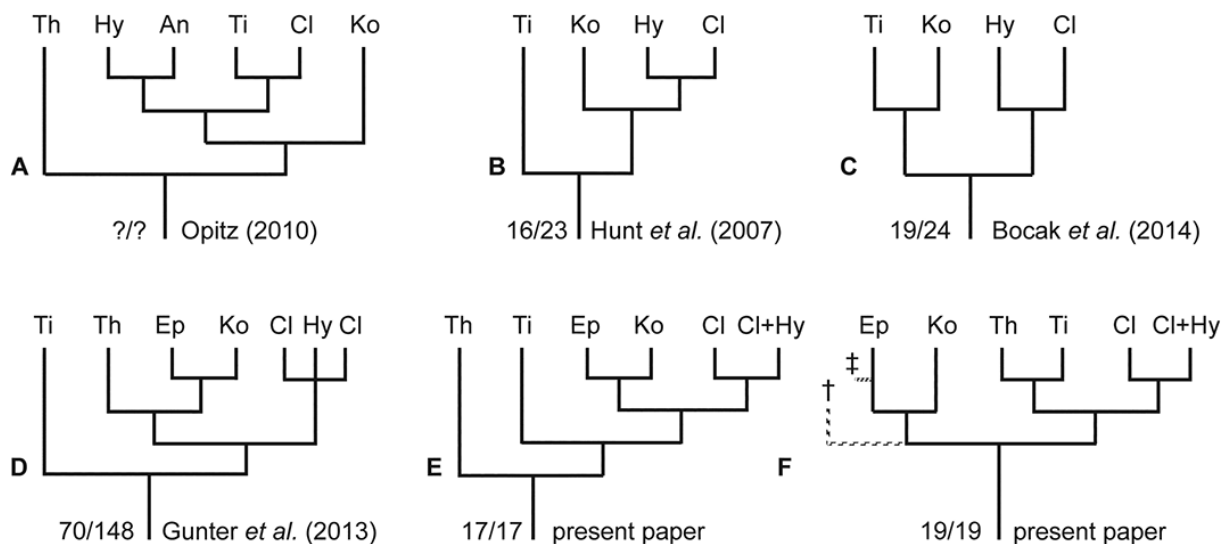
Na území ČR patří k nejběžnějším forenzně významným druhům brouků zástupci z 5 čeledí: *Necrodes littoralis* a rod *Thanatophilus* z čeledi Silphidae, *Creophilus maxillosus* a rody *Ontholestes*, *Philonthus* a *Aleochara* z čeledi Staphylinidae, *Margarinotus brunneus* a *Saprimus semistratus* z čeledi Histeridae, *Omosita discoidea* a *Glischrochilus quadrisignatus* z čeledi Nitidulidae, *Dermestes frischii*, *D. undulatus* a *D. murinus* z čeledi Dermestidae, *Necrobia violacea*, *N. rufipes* a výjimečně *N. ruficollis* z čeledi Cleridae a *Trox scaber* a *T. sabulosus* z čeledi Trogidae (Šuláková, 2014).

1.3 Cleridae

Čeď Cleridae, česky pestrokrovečnickovití, tvoří monofyletickou větev v řádu brouci (Coleoptera), podřádu Polyphaga a infrařádu Cucujiformia. V posledním katalogu je uvedeno, že existuje 3366 druhů brouků spadajících do čeledi Cleridae (Corporaal, 1950), je však víc než jisté, že je toto číslo zastaralé, o něco novější odhady hovoří přibližně o 4000 druzích (Gerstmeier et al., 1999; Opitz, 2002). Jejich výskyt je kosmopolitní, ale většina zástupců se vyskytuje v tropech (Kolibáč, 2010), v ČR můžeme najít asi 21 druhů (Vrba, 2018). Tělo pestrokrovečnicků je protáhlé, oválného tvaru a je asi 2 až 24 mm dlouhé, téměř vždy pokryté chloupky (Opitz, 2002). Často jsou pestře zbarvení, převážně do žluta nebo do červena a tvoří různé obrazce, což jim například v češtině vysloužilo název pestrokrovečnickovití nebo v angličtině „the checkered beetles“ (pestrí brouci). Tmavé nebo černé druhy však také nejsou výjimkou (Burke a Chaboo, 2015). Hlava je z pravidla o něco širší nebo stejně široká jako předohruď, ale zadohruď s krovkami je širší než obě části. Tykadla se skládají z 9 až 11 článků a jsou velice variabilní, většinou paličkovitá (Opitz, 2002). Vzhledem k jejich kosmopolitnímu rozšíření, můžeme brouky z čeledi Cleridae najít ve velkém množství habitatů. Většina zástupců jsou predátoři, jak v larválním stadiu, tak dospělci, a živí se hlavně jinými druhy hmyzu. Jsou většinou vázaní na dřevo, kde je můžeme najít pod kůrou, ve dřevě, na šiškách nebo na mrtvých částech stromů. Má se za to, že některé druhy přirozeně kontrolují populace kůrovce (Scolytidae) v jehličnatých lesích (Opitz, 2002). Vyskytují se také jako škůdci na skladovaných masných výrobcích nebo na mrtvolách, kde se živí buď tkáněmi, nebo loví jiný hmyz, což se týká rodu *Necrobia* (Burke a Chaboo, 2015). Kromě predátorů můžeme najít také dospělé živící se pylem, například rod *Trichodes* (Opitz, 2002).

Fylogenetické vztahy v rámci čeledi Cleridae i na vyšší taxonomické úrovni, tedy mezi jednotlivými nadčeledmi infrařádu Cucujiformia, jsou zatím do jisté míry nejasné. Do dneška bylo publikováno mnoho fylogenetických studií založených jak na morfologických znacích (Kolibáč, 1997; Opitz, 2010), tak na mitochondriální (Gunter et al., 2013; Kolibáč a Huang, 2016; Timmermans et al., 2015; Li et al., 2016; Yuan et al. 2016) nebo jaderné DNA (Zhang et al., 2018).

V prvních studiích byli Cleridae rozděleni do osmi podčeledí (Schenkling, 1903; Crowson, 1964), ty byly později redukovány pouze na 4 (Kolibáč, 1992, 1997, 2010) a nedávno znovu klasifikovány na 12 (Opitz, 2010). Všechny tyto studie se zabývaly klasifikací na základě morfologických znaků. Dvě nejnovější studie (Gunter et al., 2013; Kolibáč a Huang, 2016) se zabývaly klasifikací Cleridae na základě mtDNA a docílily vzájemně velice podobných výsledků. Srovnání dosavadních poznatků je shrnuto na Obr. 1.



Obr. 1: Porovnání fylogeneze Cleridae. (A) systém Opitze je zjednodušen, v Korynetinae je zahrnuto 6 podčeledí a v Thaneroclerinae dvě (dle výsledků Gunter et al., 2013). Stroměčky A, E, F jsou založeny na morfologii, zatímco B, C, D jsou molekulární. Zkratky: An, Anthicoclerinae, Cl, Clerinae, Ep, Epiclininae, Hy, Hydnocerinae, Ko, Korynetinae, Th, Thaneroclerinae, Ti, Tillinae. Čísla na bázi fylogenetických stromů znamenají množství rodů/druhů použitých pro určitou studii. Převzato z Kolibáč a Huang (2016).

Cucujiformia je mimořádně diverzní skupina, která čítá více než 173 tisíc druhů. Tato skupina je tradičně dělena na 6 nadčeledí: Lymexyloidea, Tenebrinoidea, Cleroidea, Cucujoidea, Chrysomeloidea a Curculionoidea (Hunt et al., 2007; Lawrence et al., 2011). Problém je zejména s nadčeledí Cucujoidea, která je bez pochyby polyfyletická (Hunt et al.,

2007; Lawrence et al., 2011; Timmermans et al., 2015; Yuan et al., 2016; Li et al., 2016; Zhang et al., 2018). V roce 2015 byla Robertsonem et al. provedena rozsáhlá studie této nadčeledi a na základě toho byla rozdělena na dvě: Coccinelloidea a Cucujoidea. Téměř ve všech studiích vychází, že Crysomeloidea a Curculionoidea jsou sesterské skupiny a k nim je sesterskou skupinou nová Cucujoidea (pro zjednodušení označme A) a dále, že Lymexyloidea a Tenebrionoidea jsou sesterské skupiny (označení B) (Yuan et al., 2016; Li et al., 2016; Timmermans et al., 2015; Zhang et al., 2018). Problémem však je jejich vzájemné postavení a hlavně pak postavení skupin Cleroidea a Coccinelloidea. Yuan et al. (2016) navrhuje dvě verze, na základě různých analýz, první z nich říká, že Cleroidea je sesterskou skupinou všech ostatních a fylogenetický strom tedy vypadá takto: (Cleroidea+(Coccinelloidea + (B)+(A))), zatímco druhá verze tvrdí, že Cleroidea a Coccinelloidea jsou spolu sesterské skupiny ke všem ostatním: ((Cleroidea+Coccinelloidea)+(A+B)). Timmermans (2015) potvrzuje, že Coccinelloidea je sesterskou skupinou B, ale na rozdíl od Yuana (2016) postavil Cleroidea jako sesterskou skupinu Coccinelloidea a B, tedy: ((Cleroidea+(Coccinelloidea+(B)))+(A)). Zatímco předchozí dvě práce, jako většina publikovaných, analyzovaly mitochondriální genomy, následující, nejnovější práce byla založena na genech jaderných. Zhang et al. (2018) postavil Coccinellidae jako sesterskou všech ostatních a Cleroidea jako sesterskou skupinu skupiny B. Jeho fylogenetický strom vypadal následovně: (Coccinelloidea+((A)+(Cleroidea+(B)))). Z dříve popsánoho můžeme vidět, že postavení podčeledi Cleroidea v rámci Cucujiformia je zatím nejisté a je třeba dalších studií pro jeho zpřesnění, k čemuž by mohla jistým dílem přispět i tato práce.

1.3.1 Pestrokrovečník *Necrobia violacea*

Paličník fialový *Necrobia violacea* (Linnaeus, 1758) je brouk z čeledi Cleridae, podčeledi Korynetinae. Tento druh je kratší (asi 3 až 5 mm), kulatější než typický zástupce Cleridae, a má metalicky zelené až modré zbarvení. Na rozdíl ostatních brouků tohoto rodu (*N. ruficollis* a *N. rufipes*) nemá žádné části těla zbarvené červeně (Evans a Hogue, 2006), viz Obr. 2. Všechny tři druhy se vyskytují kosmopolitně a nejčastěji je jako nekrosaprofágy najdeme na mrtvolách, kde se živí a rozmnožují, také se považují za škůdce na skladovaných, především masných, výrobcích (Rees, 2004; Burke a Chaboo, 2015), ale výjimkou není ani osídlení jiných potravin jako sýr, kopra, sušené žloutky nebo fiky (Ebeling, 2002).

N. violacea se nepodílí pouze na dekompozici kadaverů, ale živí se také larvami nebo kuklami ostatního hmyzu, byly také pozorovány případy, kdy se larva prokousala do muší larvy, živila se jejím obsahem a uvnitř se zakuklila (Mallakh, 1978). Životní cyklus tohoto

druhu není příliš prozkoumaný, hlavně z důvodu jeho velice malého významu při znehodnocování uskladněných potravin ve srovnání s jeho, v této oblasti, o mnoho aktivnějším příbuzným *N. rufipes* (Rees, 2004). Jejich cykly by však měly být více méně podobné, a proto zde bude popsán cyklus *N. rufipes*. Ten klade hladká, průsvitná, 1 mm dlouhá vajíčka na povrch mrtvolky nebo nějakého potravinového výrobku, většinou jsou kladena ve shlucích a může jich být až 2100. V teplém počasí se z nich za 4 až 5 dní líhnou larvy, dorostlé jsou až 10 mm dlouhé a mají barvu do fialova. Vývin probíhá přes 3 až 4 larvální instary a celý cyklus trvá 36 až 150 dní v závislosti na typu potravy a na teplotě (Ebeling, 2002; Simmons a Ellington, 1925). Zatímco dospělci se živí na povrchu, larvy se zavrtávají hluboko do materiálu a zanechávají uvnitř stopy jako svlečky a kukly (Rees, 2004).

Vzhledem ke své vazbě na mrtvé, se brouků rodu *Necrobium* využívá ve forenzní entomologii, zejména při určování PMI. Brouci, kteří kolonizují tělo až v pozdější fázi (3. fáze: fermentace proteinů), sice nejsou tak přesným indikátorem jako některé mouchy kolonizující tělo mezi prvními, ale stejně jsou pro utvoření celkové představy o případu velice užiteční (Šuláková, 2014).



Obr. 2: *Necrobium violaceum* (autor: Milan Kudlička; dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id314444/?taxonid=10017>).

2 Cíle práce

- Získání kompletní sekvence mitochondriálního genomu pestrokrovečníka *Necrobia violacea*.
- Porovnáním získané sekvence s údaji v adekvátních databázích objasnit její postavení a fylogenetické vztahy s příbuznými druhy v rámci infrařádu Cucujiformia.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Vzorky forenzně významných brouků byly dodány plk. Ing. Hanou Šulákovou, Ph.D., z Kriminálního ústavu PČR Praha. Jednalo se o 7 druhů ze 3 čeledí (viz Tab. 1). Brouci pocházeli z dlouhodobého experimentu simulujícího rozklad lidského těla na praseti domácím. Vzorky byly uchovány ve 100% etanolu při -20°C.

Tab. 1: Druhy forenzně významných brouků pro analýzu.

Druh	Čeď
<i>Creophilus maxillosus</i>	Staphylinidae
<i>Ontholestes murinus</i>	
<i>Dermestes murinus</i>	Dermestidae
<i>D. haemorrhoidalis</i>	
<i>Necrobia violacea</i>	Cleridae
<i>N. ruficollis</i>	
<i>N. rufipes</i>	

3.2 Izolace DNA

Pro izolaci mtDNA byl použit extrakční kit ExgeneTM Tissue (plus) SV mini, 250p (GenAll Biotechnology Co. Ltd.). Bylo postupováno podle přiloženého manuálu, konkrétně dle protokolu D, pro hmyz nebo červy. Pro první sérii pokusů byly použity hlavičky jednotlivých brouků, po vybrání cílového druhu pak končetiny a nakonec zbytek těla. Před samotnou extrakcí byly vybrané části nejdříve ponechány chvíli na vzduchu, aby se odpařil etanol. Pro získání koncentrovanější mtDNA bylo v posledním kroku, při první eluci, přidáno místo 200 µl pouze 100 µl AE pufru a druhá eluce byla provedena 50 µl AE pufru.

3.3 PCR amplifikace

Fragmenty mtDNA byly amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), pro jejíž provedení byl používán termocykler TProfessional TRIO (Biometra GmbH). Roztok pro PCR reakci byl vždy připravován na ledu do 200 µl zkumavek pro PCR.

3.3.1 Reakční směs

Pro každou PCR reakci bylo použito následujících chemikálií: ddH₂O (ultra čistá voda), 10x pufr, 2,5 mM dNTPs (směs nukleotidů), 5µM primery (viz následující kapitola), templátová DNA a polymeráza, jejich množství je uvedeno v Tab. 2. Standardně bylo

využíváno Taq DNA Unis (Top-Bio s. r. o.) polymerázy (5 U/ μ l). Pro úseky, které se jejím použitím nepodařilo amplifikovat, nebo byl výtěžek příliš nízký, bylo použito polymerázy TaKaRa ExTaq (Takara Bio, Inc.; 5 U/ μ l). Pokud se ani touto cestou nepodařilo získat uspokojivý PCR produkt, bylo využito ještě o něco citlivější PrimeSTAR GXL DNA Polymerázy (Takara Bio, Inc.; 1,25 U/ μ l). Množství jednotlivých komponent s ohledem na zvolenou polymerázu je uvedeno v Tab. 2.

Tab. 2: Množství komponent na 1 PCR reakci v závislosti na druhu polymerázy.

	Unis [μ l]	ExTaq [μ l]	GXL [μ l]
ddH ₂ O	7,25	7,75	6,25
Pufr	1,25	1,25	2,5
dNTPs	1	1	1
Primery	0,75/0,75	0,75/0,75	0,75/0,75
Polymeráza	0,1	0,05	0,5
DNA	1	1	1

3.3.2 Primery

Pro amplifikaci jednotlivých úseků mtDNA byly použity jednak univerzální primery, převzaté z prací Simon et al. (1994, 2006) a Folmer et al. (1994), a na základě již získaných úseků mtDNA byly navrženy specifické primery pro oblasti, které se pomocí univerzálních primerů nepodařilo amplifikovat. Tato metoda se nazývá „primer walking“ (Sterky a Lundeberg, 2000). Seznam primerů, které vedly k úspěšné amplifikaci jednotlivých úseků, je uveden v Tab. 3.

Tab. 3: Seznam primerů, které vedly k úspěšné amplifikaci.

Primer	Sekvence 5' → 3'	Směr
TM-J-210b ¹	AATTAAGCTACTGGGTTTCATACCC	F
LCO-1490 ²	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	F
C1-J-1718 ³	GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC	F
C1-J-2756 ¹	ACATTCTTTCCTCAACATTT	F
TK-J-3790 ¹	CATTAGATGACTGAAAGCAAGTA	F
NecATP6-4570for ⁴	ATTACTAGGAAACACTGGCC	F
N3-J-5747 ¹	CCATTTGAATGTGGRTTTGAYCC	F
NecND5-6320for ⁴	TAAACTCTAACATATAAGCTAC	F
N5-J-7572 ¹	ACWAAAAGAGCTCAAATTCCTTTT	F
Nec7860for ⁵	TCTCCTAATATATATTCATCTC	F
N4L-J-9648 ¹	ACCTAAAGCTCCCTCACAWAC	F
CB-J-10933 ¹	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC	F
NecND1-14440for ⁴	ATTGCATCTCCAAAAGGCTG	F
NecrRNA(lsu)-13650for ⁴	TTAATTCCTCAGTGGGCAG	F
SR-J-14233 ³	AAGAGCGACGGGCGATGTGT	F
Nec14430for ⁵	TATCAATTACAGGACAGGTTCC	F
Nec323rev ⁵	AAAGGAATTACTGAAATGAGG	R
NecCOX1-1570rev ⁴	ATTACCAATTAATGTTTCCTGG	R
HCO-2198 ²	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	R
L2-N-3014 ³	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	R
A8-N-4061 ¹	GAGAATAAGTTWGTTATCATTTCATCA	R
C3-N-4908 ¹	CGAGTTAYATCTCGTCATCATTG	R
C3-N-5460 ¹	TCAACAAAGTGTCAGTATCA	R
NectRNA-5920rev ⁴	CTCCTTGATTTTCATTCATGG	R
N5-N-7211 ¹	TTAAGGCTTTAYTATTTATRTGYGC	R
N5-N-7793 ¹	TTAGGTTGRGATGGNYTAGG	R
N4-N-8487 ¹	TATCAGSTAATATRGCWGCTCC	R
Nec9750for ⁵	GGTTCATTAAGATTTACAGTTAAACG	R
CB-N-11010 ¹	TATCTACAGCRAATCCYCCYCA	R
N1-N-12595 ¹	GTAGCATTTTTAACTTTATTAGAACG	R
LR-N-13398 ³	CGCCTGTTTAAACAAAACAT	R
NecrRNA(ssu)-14600rev ⁴	TATGAATAAGGAGAGATGGG	R
SE-N-14745b ¹	CCAGCAGYYGCGGTTATAC	R

Pozn.: 1, 2, 3: univerzální primery (popořadě: Simon et al., 2004; Folmer et al., 1994; Simon et al., 1994), 4, 5 specifické primery (H. Velanová, M. Žurovcová); F (forward): nasedá na + vlákno, R (reverse): nasedá na - vlákno.

3.3.3 PCR profily pro amplifikaci jednotlivých fragmentů

Amplifikace byla provedena s použitím standardního PCR profilu, který obsahoval následující kroky: predenaturace (94°C, 2 min), 35 tříkrokových cyklů zahrnujících denaturaci (94°, 10s), nasedání primerů („annealing“; 49 až 60°C, 30s) a elongaci (72/68 °C, 35s až 120s), nakonec probíhala finální elongace (72°C, 2 min) a další ochlazení na 16°C, dokud nebyl vzorek odebrán.

Nastavení, která vedla k úspěšné amplifikaci, jsou uvedena v Tab. 4.

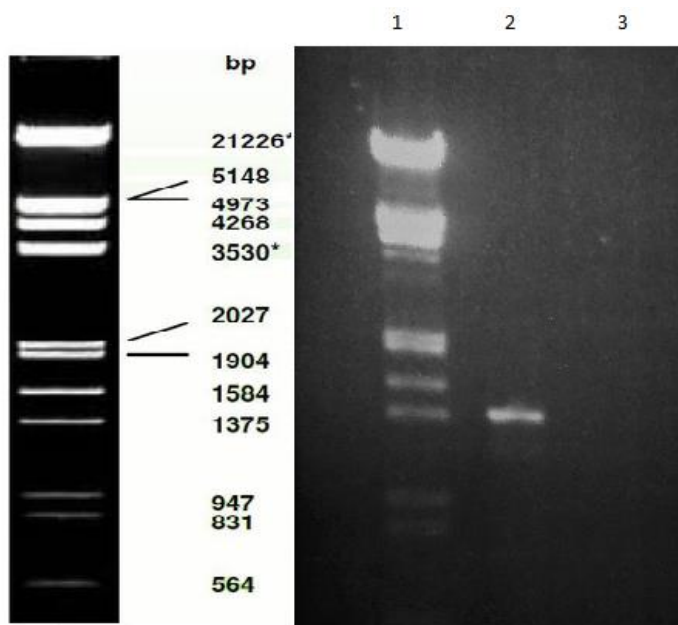
Tab. 4: PCR profily.

Úsek	Primery	Annealing		Elongace		Polymeráza
		t [s]	T [°C]	t [s]	T [°C]	
R4	TM-J-210b	30	53	85	72	ExTaq
	NecCOX1-1570rev					
NV	LCO-1490	30	49	50	72	Unis
	HCO-2198					
B	C1-J-1718	30	60	75	72	Unis
	L2-N-3014					
A	C1-J-2756	30	50	75	72	Unis
	A8-N-4061					
M1	TK-J-3790	30	55	70	72	ExTaq
	C3-N-4908					
P2	TK-J-3790	30	52	100	72	ExTaq
	C3-N-5460					
Q7	NecATP6-4570for	30	57	85	72	Unis
	NectRNA-5920rev					
N5F	N3-J-5747	30	60	90	72	ExTaq
	N5-N-7211					
S6	NecND5-6320for	30	55	90	72	ExTaq
	N5-N-7793					
A1F	N5-J-7572	30	56	60	72	ExTaq
	N4-N-8487					
Q4	Nec7860for	30	55	120	72	ExTaq
	Nec9750rev					
M8	N4L-J-9648	30	52	90	72	ExTaq
	CB-N-11010					
C	CB-J-10933	30	60	100	72	Unis
	N1-N-12595					
C2	NecND1-12440for	30	51	60	72	ExTaq
	LR-N-13398					
L7	NecrRNA(lsu)-13650for	30	61	60	72	ExTaq
	NecrRNA(ssu)-14600rev					
K4F	SR-J-14233	30	60	35	72	ExTaq
	SE-N-14745b					
T7	Nec14430for	30	57	120	68	GXL
	Nec323rev					

3.4 Gelová elektroforéza

Po PCR následovala gelová elektroforéza, která měla za úkol ověřit úspěšnost amplifikace a určit přibližnou velikost fragmentu. Pro elektroforézu byl použit 1,5% gel, který byl připravován rozpuštěním 3g agarózy (SERVA Electrophoresis GmbH) ve 200ml 1x TAE pufru (ten byl připraven zředěním zásobního roztoku 50x TAE: 121g TRIS; 28,55 ml kyseliny octové; 50 ml 0,5M EDTA, pH 8 a 421,45 ml vody) v mikrovlnné troubě po dobu cca 2 minut. Tento roztok byl poté chlazen pod tekoucí vodou, dokud nenabýval teploty cca 50°C. Před tím, než byl nalit do speciální formy, bylo do roztoku přidáno 15 μ l EtBr (ethidium bromid; 0,5 μ g/ml). Po nalití roztoku do formy byly vloženy plastové hřebínky, které po ztuhnutí a vyjmutí vytvořily jamky pro jednotlivé vzorky. Gel tuhnul přibližně po dobu 30 minut bez přístupu světla, aby se zamezilo degradaci EtBr.

Před nanesením PCR produktu na gel byly 3 ml produktu smíchány s 2 μ l nanášecího pufru (700 μ l ddH₂O; 300 μ l glycerolu a 0,5g bromfenolové modři) a směs byla nanesena do jamky. Pro určení velikosti fragmentu byly do stejného gelu naneseny 4 μ l Lambda DNA/EcoRI+HindIII (Fermentas) velikostního markeru (ty byly opět nejdříve smíchány se 2 μ l nanášecího pufru). Elektroforéza běžela při 125 V a pokojové teplotě po dobu 45 minut. Rozdělení fragmentů podle velikosti bylo vizualizováno pod UV transiluminátorem. Příklad výsledku gelové elektroforézy je uveden na Obr. 3.



Obr. 3: Příklad úspěšně naamplifikovaného úseku (N5F), 1: velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII (Fermentas), 2: vzorek N5F, 3: negativní kontrola.

3.5 Přečištění PCR produktu

V případě, že gelová elektroforéza ukázala, že se jedná o vhodný PCR produkt, bylo přistoupeno k jeho přečištění (např. od volných nukleotidů). Toho bylo docíleno použitím dvou enzymů: Exo (Exonukleáza I; 20 U/μl; Thermo Scientific) a FastAP (Alkaline Phosphatase, 1U/μl, Thermo Scientific). Ke každému PCR produktu byla přidána směs enzymů (0,5 μl ddH₂O; 0,5 μl Exo a 1 μl Fast AP) a poté byl vzorek vložen do termocycleru s následujícím profilem: 37°C, 30 min a 80°C, 15min.

3.6 Sekvenace

Sekvenační reakce byla vytvořena smícháním 5 μl přečištěného vzorku s 5 μl příslušného primeru (5 μM) v 1,5 ml zkumavce. Zatímco pro PCR produkty delší než 1000 pb byl použit každý z primerů za účelem prosekvenování co nejdelšího úseku (byly tedy připraveny 2 sekvenační reakce), pro úseky kratší stačil jeden z primerů. Poté byly vzorky označeny a poslány do společnosti GATC Biotech AG pro další zpracování.

3.7 Zpracování dat a anotace mitogenomu

3.7.1 Zpracování dat

Kvalita sekvencí byla zkontrolována pomocí programu BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999; dostupné z: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), kde bylo třeba, aby chromatogram ukazoval zřetelné „peaky“ reprezentující jednotlivé báze. Poté byla sekvence vložena do programu BLAST (Basic Local Alignment Tool; dostupné z: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), kde byla potvrzena příslušnost k nadčeledi Cleroidea. Z jednotlivých fragmentů byla vytvořena kontinuální sekvence srovnáním s referenční sekvencí (*Trichodes sinae*; dostupná v databázi GenBank pod číslem NC_033340), pomocí programu SeqMan Pro v8.2.2 (DNASTAR, Inc.), ve kterém byly také provedeny nezbytné úpravy sekvencí.

3.7.2 Anotace mitogenomu

Základní anotace byla provedena pomocí programu MITOS Webserver (Berndt et al., 2013; dostupné z: <http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>). Následovala manuální anotace genů kódujících proteiny na základě srovnání s již osekvenovanými mitogenomy jedinců nadčeledi Cleroidea a další verifikace pomocí modulu ORFfinder (Open Reading Frame Finder; dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>). Pozice a struktury tRNA byly identifikovány pomocí programu tRNAscan-SE v2.0 (Lowe a Chan, 2016; dostupné z: <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>). Složení bází bylo analyzováno v programu MEGA

7.0.26 (Tamura et al., 2018; dostupné z: <https://www.megasoftware.net/>). Grafický model reprezentující mitogenom byl vytvořen pomocí programu GenomeVx (Conant a Wolfe, 2007; dostupné z: <http://wolfe.ucd.ie/GenomeVx/>).

Pořadí genů bylo srovnáno s dalšími pěti brouky z nadčeledi Cleroidea: *Clanoptilus assimilis*, *Chaetosoma scaritides*, *Phloiophilus edwardsi*, *Phycosecis limbata*, *Trichodes sinae* a dále po jednom zástupci s následujícími nadčeledi: Lymexyloidea: *Hylecoetus dermestoides*, Tenebrionoidea: *Tribolium castaneum* a Coccinelloidea: *Anatis ocellata*. Tito zástupci byli také použiti pro fylogenetickou rekonstrukci společně s *Necrophila americana* z infrařádu Staphyliniformia jako „outgroup“ (kořen fylogenetického stromu). Přehled těchto druhů je uveden v Tab. 5.

Tab. 5: Seznam druhů použitých pro fylogenetickou analýzu.

Nadčeleď	Čeleď	Druh	Číslo v databázi Genbank
Cleroidea	Cleridae	<i>Necrobia violacea</i>	dosud nepublikováno
		<i>Trichodes sinae</i>	NC_033340
	Chaetosomatidae	<i>Chaetosoma scaritides</i>	NC_011324
	Phycosecidae	<i>Phycosecis limbata</i>	JX412820
	Melyridae	<i>Clanoptilus assimilis</i>	JX412833
	Phloiophilidae	<i>Phloiophilus edwardsi</i>	JX412815
Lymexyloidea	Lymexylidae	<i>Hylecoetus dermestoides</i>	HQ232820
Tenebrionoidea	Tenebrionidae	<i>Tribolium castaneum</i>	NC_018352
Coccinelloidea	Coccinellidae	<i>Anatis ocellata</i>	NC_036272
Staphylinioidea	Silphidae	<i>Necrophila americana</i>	NC_018352

Fylogenetická rekonstrukce byla provedena v programu MEGA 7.0.26 (Tamura et al., 2018) s použitím sekvencí genů kódujících proteiny zařazených těsně za sebou na základě jejich čtecích rámců (ORF). Nejdříve byly vybrány v modulu „Model“ nejvhodnější modely výpočtu genetické vzdálenosti (na základě BIC a AIC kritérií), které pak byly aplikovány při tvorbě fylogenetických stromů, a to metodami Neighbor-Joining (NJ), Maximum Likelihood (ML) a Maximum Parsimony (MP). Pro všechny stromy byla zvolena statistická verifikace metodou „bootstrap“ o 1000 replikacích.

4 Výsledky

V této práci se podařilo získat téměř kompletní mitogenom *N. violacea*, který byl anotován a porovnán s mitogenomy dalších zástupců z nadčeledi Cleroidea (5 druhů), Lymexiloidea (1 druh), Tenebrionoidea (1 druh) a Coccinelloidea (1 druh). Pro fylogenetickou analýzu byl navíc vybrán také forenzně významný druh *Necrophila americana* z čeledi Silphidae jako outgroup.

4.1 Výběr cílového druhu

DNA ze všech sedmi druhů byla úspěšně vyextrahována. Sérií několika prvních PCR reakcí, s použitím různých primerů (A, B, C a NV; dle Tab. 4), byl pro další analýzu vybrán druh s nejvíce úspěšně naamplifikovanými fragmenty, což byl druh *Necrobium violaceum*. Z první extrakce se podařily, kromě již zmíněných, naamplifikovat fragmenty: M1, N5F, P2, Q7, R4 a S6. Druhá extrakce byla provedena z nohou *N. violaceum* a vedla k amplifikaci fragmentů A1F, C2, K4F, L7 a poslední extrakce byla provedena ze zbytku těla a vedla k amplifikaci fragmentů M8, Q4 a T7 (vše dle Tab. 4).

4.2 Mitochondriální genom *Necrobium violaceum*

Sekvence mitochondriálního genomu byla získána PCR amplifikací a metodou “primer walking“. Jednotlivé fragmenty byly spojeny v kontinuální sekvenci programem SeqMan Pro 8.2.2 (DNASTAR, Inc.), kde byl jako referenční sekvence použit kompletní mitogenom *Trichodes sinensis*. Podle stejné sekvence byla také stanovena předpokládaná délka mitogenomu na 16 000 pb. Z délky získané sekvence (15 285 pb) pak vyplývá, že k jeho ucelení chybí méně než 750 pb. Přesto se podařilo identifikovat všech 37 genů, z nichž 13 kóduje proteiny, 22 tRNA a 2 kódují rRNA.

Na následujícím obrázku (Obr. 4) je graficky vyobrazena získaná kruhová molekula mtDNA. Na něm lze vidět, kromě pozic jednotlivých genů, také oblast, kterou se nepodařilo osekvenovat (zobrazeno černou barvou na vnitřním kruhu). Jedna z nich, asi 650 pb dlouhá, se nachází v AT oblasti a druhá cca 100 pb dlouhá se nachází uvnitř genu *ND4*.



Obr. 4: Kruhová molekula mtDNA *Necrobia violacea*; světle fialovou jsou znázorněny geny kódující proteiny, tmavě fialovou tRNA, světle modrou rRNA a šedou AT oblast. Černou barvou na vnitřním kruhu jsou znázorněny úseky, které se nepodařilo osekvenovat.

4.2.1 Zastoupení bází v mitogenomu

Zastoupení bází bylo analyzováno v programu MEGA 7.0.26 (Tamura et al., 2018; dostupné z: <https://www.megasoftware.net/>). Bylo zjištěno složení jak celého mitogenomu, tak zvlášť části, které kódují proteiny a AT oblast. Celý mitogenom obsahoval 78,3 % A+T a 21,7 % G+C, geny kódující proteiny obsahovaly 77,2 % A+T a 22,8% G+C a AT oblast obsahovala 83,2 % A+T a 16,8 G+C.

4.2.2 Geny kódující proteiny

Všech 13 genů kódujících proteiny bylo detekováno programem MITOS Webserver (Berndt et al., 2013; dostupné z: <http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>) a zároveň ověřeno jednak pomocí modulu ORFfinder (Open Reading Frame Finder; dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), a jednak porovnáním se sekvencemi příbuzných druhů. Gen pro ND4 se nacházel v oblasti, ve které chybělo oněch 100 pb.

V daných genech byly detekovány 4 druhy iniciačních kodonů (ATG (5), ATT (5), ATA (2), ACG(1)). Geny *ATP6*, *COX3*, *ND4*, *ND4L* a *CytB* začínaly kodonem ATG, geny *ATP8*, *COX1*, *ND1*, *ND2*, *ND6* začínaly kodonem ATT, geny *ND3* a *ND5* začínaly kodonem ATA a konečně gen *COX2* začínal neobvyklým ACG kodonem.

Terminační kodony byly nalezeny pouze tři (TAA (7), TAG (3), T (3)). Nejvíce zastoupený kodon TAA měly následující geny: *ATP8*, *ATP6*, *COX1*, *COX3*, *ND2*, *ND4L* a *ND6*. Další dva kodony měly stejné zastoupení, kodon TAG se vyskytoval u genů *ND1*, *ND3* a *CytB* zatímco parciální terminační kodon T se vyskytoval u *COX2*, *ND4* a *ND5*.

Pozice, délky a kodony jednotlivých genů v rámci mitogenomu jsou vyobrazeny v následující tabulce (Tab. 6).

Tab. 6: Geny kódující proteiny: pozice, délky a kodony.

Gen	začátek	konec	vlákno	délka	iniciační kodon	terminační kodon
<i>ND2</i>	214	1224	+	1011	ATT	TAA
<i>COX1</i>	1412	2977	+	1566	ATT	TAA
<i>COX2</i>	3039	3720	+	682	ACG	T
<i>ATP8</i>	3857	4012	+	156	ATT	TAA
<i>ATP6</i>	4000	4686	+	687	ATG	TAA
<i>COX3</i>	4676	5461	+	786	ATG	TAA
<i>ND3</i>	5527	5883	+	357	ATA	TAG
<i>ND5</i>	6288	7986	-	1699	ATA	T
<i>ND4</i>	8048	9434	-	1387	ATG	T
<i>ND4L</i>	9428	9712	-	285	ATG	TAA
<i>ND6</i>	9849	10352	+	504	ATT	TAA
<i>CytB</i>	10352	11491	+	1140	ATG	TAG
<i>ND1</i>	11527	12525	-	999	ATT	TAG

4.2.3 tRNA

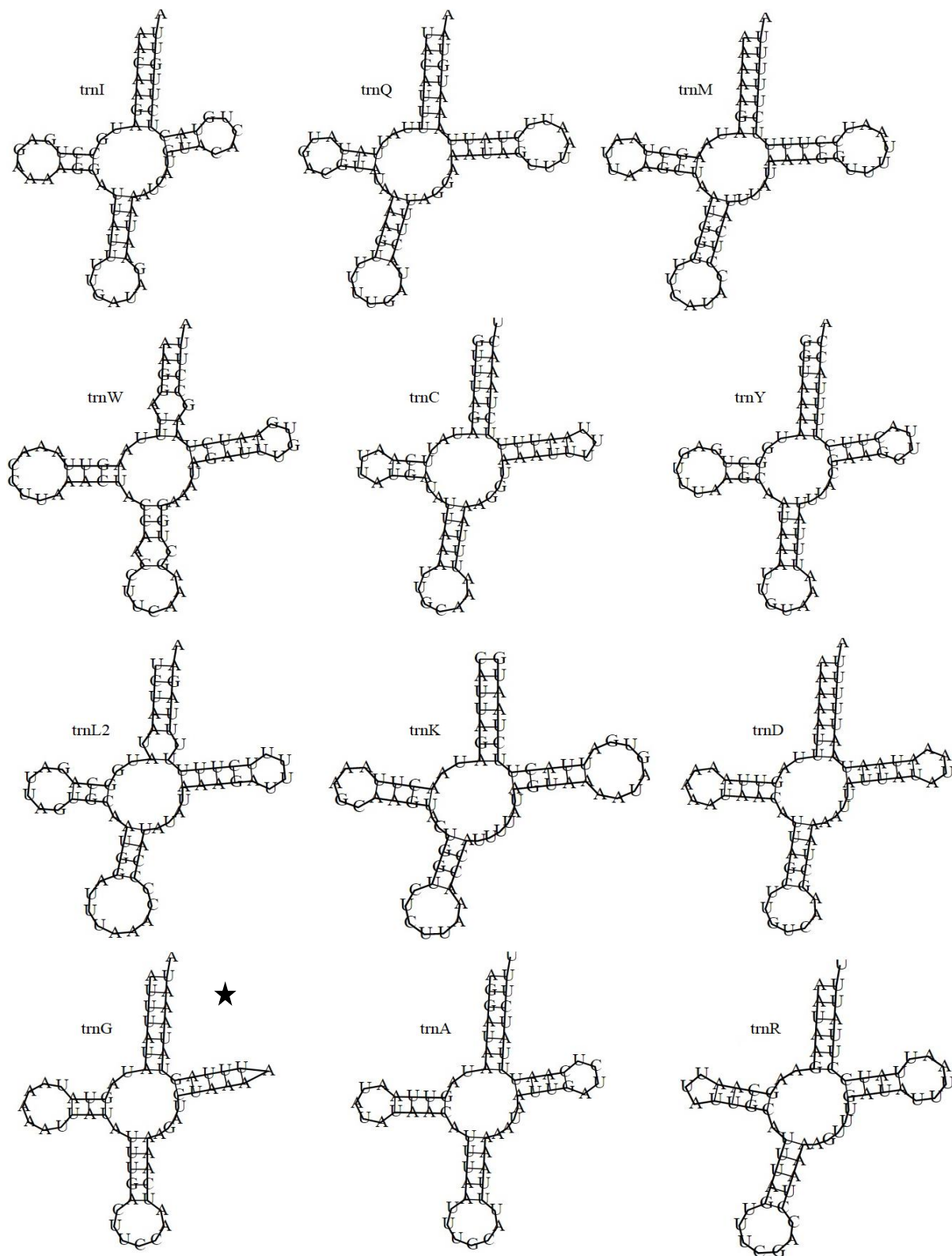
Všech 22 tRNA bylo detekováno programem MITOS Webserver (Berndt et al., 2013; dostupné z: <http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>), zároveň byl pro jejich identifikaci použit také program tRNAscan-SE 2.0 (Lowe a Chan 2016; dostupné z: <http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>), ten však i po změnách parametrů byl schopen detekovat maximálně 21 z 22 tRNA (chyběla trnE – Glu). Oba programy však dávaly stejné nebo velice podobné výsledky, proto byly pro anotaci a grafické znázornění využity výstupy z programu MITOS. Délky tRNA se pohybovaly mezi 62 a 70 pb a měly typické antikodony. V následující tabulce (Tab. 7) jsou uvedeny pozice, délky a antikodony jednotlivých tRNA v rámci celého mitogenomu.

Tab. 7: tRNA: pozice, délky a antikodony.

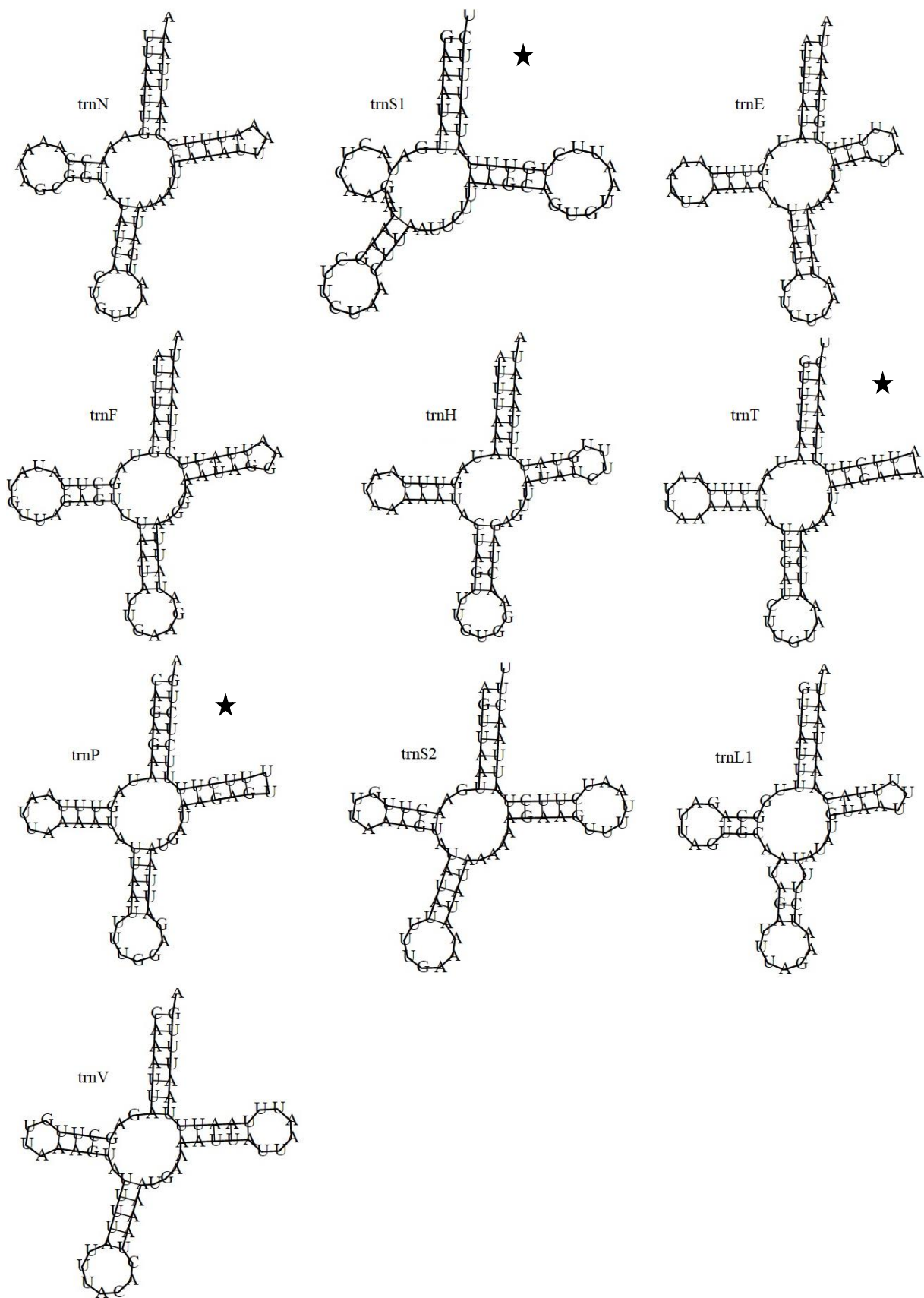
tRNA	začátek	konec	vlákno	délka	antikodon
trnI - Ile	1	63	+	63	GAT
trnQ - Gln	77	145	-	69	TTG
trnM - Met	145	213	+	69	CAT
trnW - Trp	1223	1291	+	69	TCA
trnC - Cys	1312	1375	-	64	GCA
trnY - Tyr	1377	1440	-	64	GTA
trnL2 - Leu	2973	3037	+	65	TAA
trnK - Lys	3721	3790	+	70	CTT
trnD - Asp	3791	3856	+	66	GTC
trnG - Gly	5467	5529	+	63	TCC
trnA - Ala	5882	5945	+	64	TGC
trnR - Arg	5946	6008	+	63	TCG
trnN - Asn	6008	6073	+	66	GTT
trnS1 - Ser	6074	6140	+	67	TCT
trnE - Glu	6141	6203	+	63	TTC
trnF - Phe	6202	6269	-	68	GAA
trnH - His	7984	8047	-	64	GTG
trnT - Thr	9719	9783	+	65	TGT
trnP - Pro	9784	9847	-	64	TGG
trnS2 - Ser	11490	11557	+	68	TGA
trnL1 - Leu	12527	12588	-	62	TAG
trnV - Val	13875	13941	-	67	TAC

Sekundární struktura tRNA měla většinou typickou trojlístkovou podobu. U trnS1 chybělo D – rameno a D smyčka tedy přímo navazovala na centrální kruh. Dalšími neobvyklostmi se vyznačovaly trnG, trnT a trnP, kterým chyběla T smyčka na konci odpovídajícího ramene.

Struktury všech tRNA vytvořené programem MITOS jsou znázorněny na následujícím obrázku (Obr. 5).



Obr. 5: Trojlístková struktura jednotlivých tRNA, netypické tRNA jsou označeny hvězdičkou.



Obr. 5: Trojlístková struktura jednotlivých tRNA, netypické tRNA jsou označeny hvězdičkou.

4.2.4 rRNA

Programem MITOS Webserver (Berndt et al., 2013; dostupné z: <http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>) byly detekovány obě rRNA a také byly srovnány s rRNA příbuzných druhů. Velká podjednotka (rrnL) se vyskytuje na pozici 12 589 až 13 874, je tedy 1 286 pb dlouhá a malá podjednotka (rrnS) se vyskytuje na pozici 13 942 až 14 716 a je tedy 775 pb dlouhá.

4.2.5 Nekódující oblasti

Největší nekódující oblastí je bezesporu AT oblast, která se vyskytuje mezi geny rrnS a trnI. V této práci se podařilo osekvenovat 681 bází této oblasti. Právě díky vysokému obsahu bází A a T se jak při amplifikaci tak při sekvenaci vyskytují problémy. Kromě této velké nekódující oblasti se i přes snahu mít geny jeden vedle druhého vyskytuje několik menších mezigenových prostor. Největší z nich se vyskytuje mezi trnW a trnC (20pb) a hned za ní je svou velikostí oblast mezi trnS2 a *ND1* (17 pb). Častěji než nekódující oblasti se však vyskytují překrývající se sekvence, největší z nich mezi trnF a *ND5* (20 pb). Přehled nekódujících oblastí a překrývajících se úseků je uveden v následující tabulce (Tab. 8).

Tab. 8: Přehled mezigenových prostorů a překrývajících se úseků v mitogenomu.

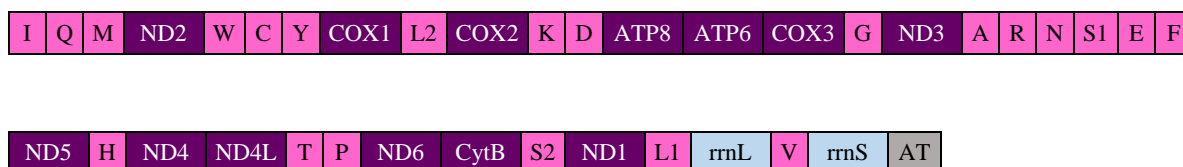
Gen	začátek	konec	MGP
trnI	1	63	13
trnQ	77	145	-1
trnM	145	213	0
<i>ND2</i>	214	1224	-2
trnW	1223	1291	20
trnC	1312	1375	1
trnY	1377	1440	11
<i>COX1</i>	1412	2977	-5
trnL2	2973	3037	1
<i>COX2</i>	3039	3720	0
trnK	3721	3790	0
trnD	3791	3856	0
<i>ATP8</i>	3857	4012	-13
<i>ATP6</i>	4000	4686	-11
<i>COX3</i>	4676	5461	5
trnG	5467	5529	-3
<i>ND3</i>	5527	5883	-2
trnA	5882	5945	0
trnR	5946	6008	-1
trnN	6008	6073	0
trnS1	6074	6140	0
trnE	6141	6203	-2
trnF	6202	6269	-20
<i>ND5</i>	6288	7986	-3
trnH	7984	8047	0
<i>ND4</i>	8048	9434	-7
<i>ND4L</i>	9428	9712	6
trnT	9719	9783	0
trnP	9784	9847	1
<i>ND6</i>	9849	10352	-1
<i>CytB</i>	10352	11491	-2
trnS2	11490	11557	17
<i>ND1</i>	11575	12525	1
L1	12527	12588	0
rrnL	12589	13874	0
trnV	13875	13941	0
rrnS	13942	14716	>681

4.3 Mezidruhové porovnání vybraných mitochondriálních genomů

Pro porovnání velikosti mitogenomů byly relevantní pouze 4 druhy, které měly kompletní sekvenci, *Trichodes sinae*, *Chaetosoma scaritides*, *Tribolium castaneum* a *Anatis ocellata*. Největší mitogenom měl pravděpodobně nejvzdálenější příbuzný *A. ocellata*, 17 092 pb hned po něm následoval naopak nejpříbuznější *T. sinae* s 160 47 pb, za ním byl *T. castaneum* s 15 881 pb a nejmenší mitogenom měl taky velmi příbuzný druh *Ch. scaritides*, 15 511 pb.

4.3.1 Pořadí genů

Pořadí genů v mitogenomu *N. violacea* a dalších tří druhů (*Trichodes sinae*, *Chaetosoma scaritides* a *Phloiophilus edwardsi*) odpovídá ancestrálnímu pořadí genů hmyzu (Boore et al., 1998) a je zobrazeno na následujícím obrázku (Obr. 6).



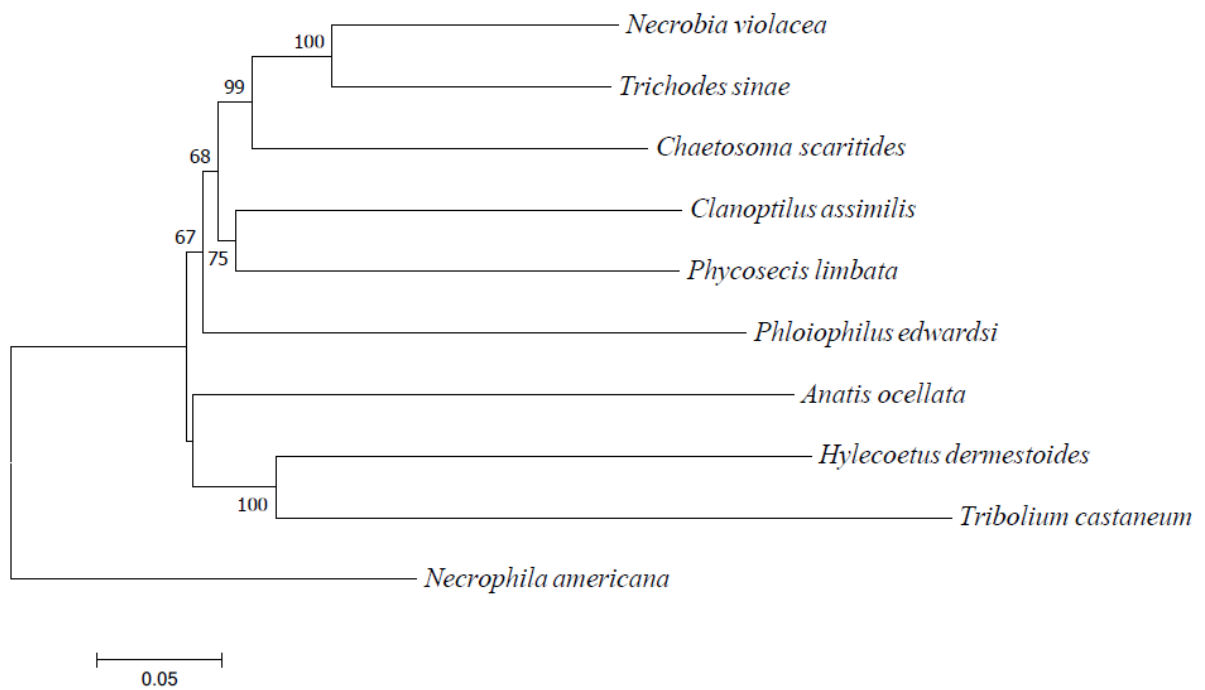
Obr. 6: Ancestrální pořadí genů hmyzu; použitý barevný kód je stejný jako na zobrazení kruhové molekuly (viz Obr. 4).

4.3.2 Fylogenetická rekonstrukce

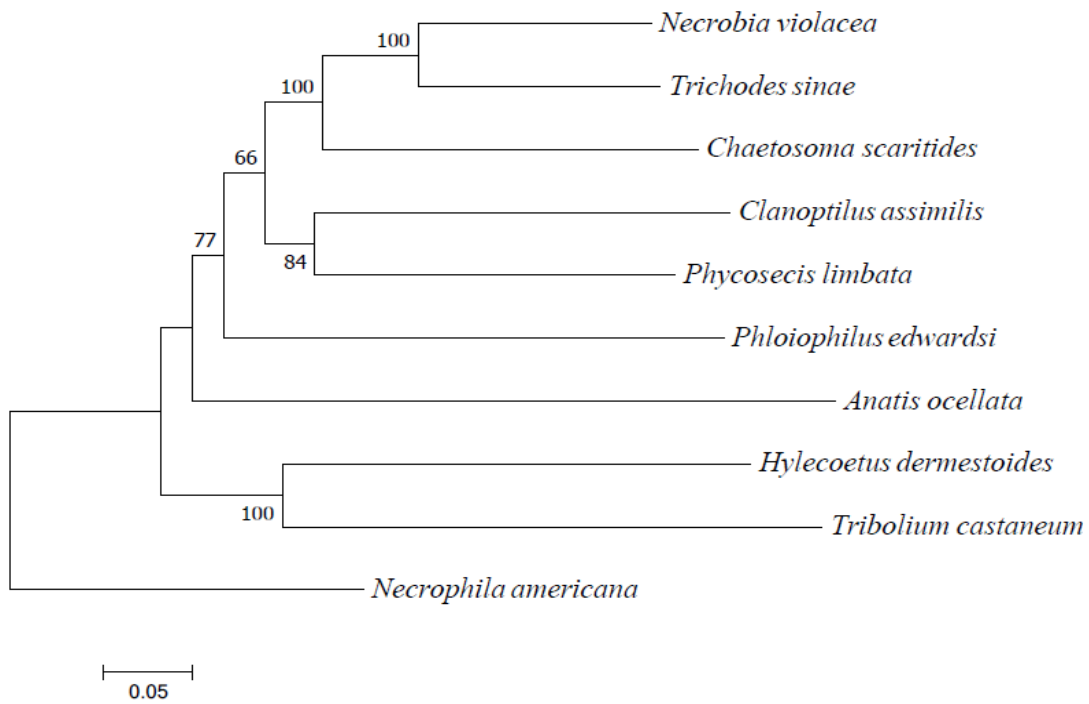
Fylogenetická rekonstrukce byla provedena s použitím všech genů kódujících proteiny deseti zástupců příbuzných druhů (*N. violacea*, *C. assimilis*, *P. limbata*, *T. castaneum*, *A. ocellata*, *T. sinae*, *Ch. scaritides*, *P. edwardsi*, *H. dermestoides* a *N. americana*). Vzhledem k tomu, že měly všechny druhy stejné pořadí genů, byly geny kódující proteiny seřazeny za sebou tak, jak je můžeme najít v mitogenomech. Dvěma ze zmíněných chyběly některé geny, *H. dermestoides* chyběl celý gen *ND2* a část genu *COX1*, u *P. limbata* chyběl jak gen *ND2* tak *COX1*, proto byly nahrazeny adekvátní sekvencí „NNNNN“.

Samotná analýza byla provedena v programu MEGA 7.0.26 (Tamura et al., 2018; dostupné z: <https://www.megasoftware.net/>). V programu MEGA byl nejdříve proveden výběr vhodného modelu genetické vzdálenosti, který byl následně použit pro fylogenetickou rekonstrukci. Byly vytvořeny tři typy fylogenetických stromů, Neighbor-Joining (NJ) s modelem Tamura-Nei, Gamma distributed, Maximum Likelihood (ML) s modelem

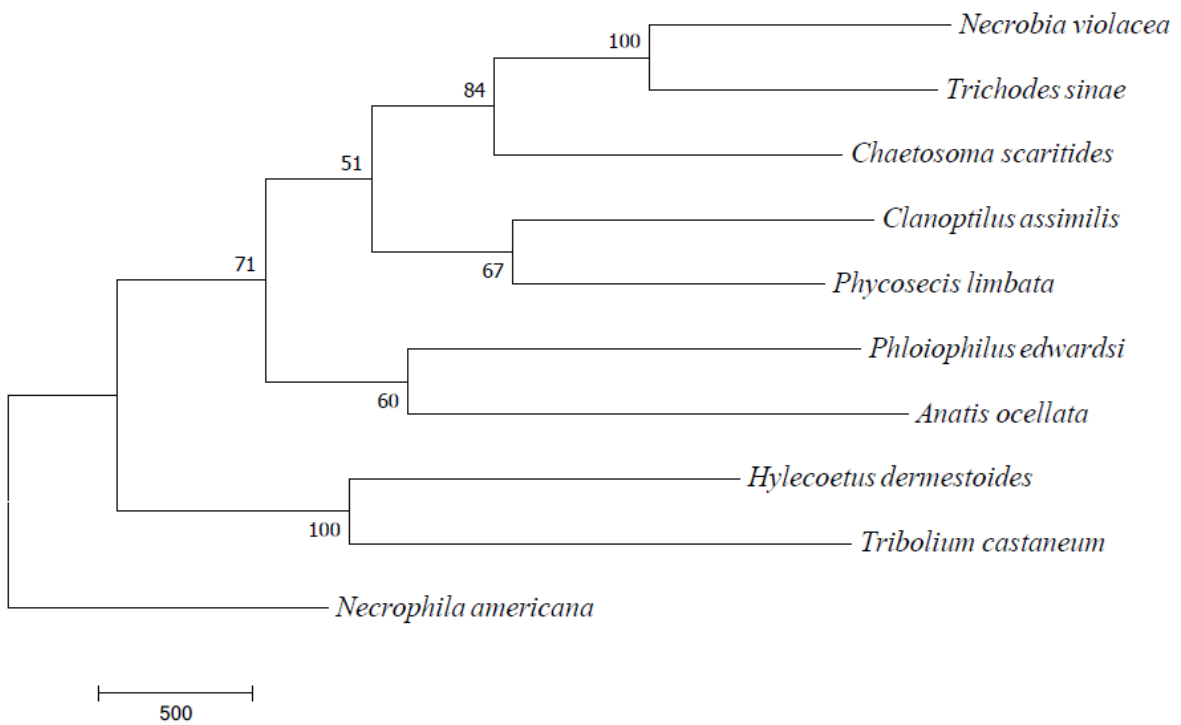
Tamura-Nei, Gamma distributed with Invariant sites (G + I) a Maximum Parsimony (MP) metodou SPR. Pro všechny fylogenetické stromy byl použit bootstrapping o 1000 replikacích a stromy byly zakořeněny druhem *N. americana*. Vzhledem k tomu, že se topologie jednotlivých stromů mírně liší, jsou zde zobrazeny všechny (NJ – Obr. 7, ML – Obr. 8, MP – Obr. 9). Rozdíly jsou v postavení *A. ocellata*, který se řadí buď jako sesterská skupina klastru Lymexyloidea+Tenebrinoidea nebo jako sesterská skupina Cleroidea.



Obr. 7: Fylogenetický strom Neighbor-Joining; Tamura-Nei model, Gamma distribution, Bootstrap 1000x, Pairwise deletion; bootstrapové hodnoty pod 50% nejsou zobrazeny.



Obr. 8: Fylogenetický strom Maximum Likelihood; Tamura-Nei model, Gamma distribution with Invariant sites (G+I), Partial deletion, NNI, Bootstrap 1000x; bootstrapové hodnoty pod 50% nejsou zobrazeny.



Obr. 9: Fylogenetický strom Maximum Parsimony; SPR, Use all sites, Bootstrap 1000x.

5 Diskuze

Mitochondriální genomy jako takové, a především pak hmyzí, se vyznačují výraznou odchylkou v kompozici bází ($A+T > G+C$). Není neobvyklé, že tato vlastnost komplikuje získávání kompletních mitogenomů, ať už na úrovni PCR amplifikace nebo sekvenace. Sekvenace AT oblasti je často nemožná kvůli nedostatku G a C nukleotidů, které jsou potřeba k vytvoření funkčních primerů. Navíc tvoření polyA nebo polyT řetězků a tandemových repetitiv čast často vede ke sklouzávání sekvenázy, případně se mohou tvořit sekundární struktury, které mohou vést předčasnému ukončení amplifikace (Cameron et al., 2012). Díky těmto problémům se také v databázi GenBank nachází velké množství téměř kompletních mitogenomů, u kterých bylo sice dosaženo sekvenace všech kódujících genů i tRNA, ale AT oblast chybí (Cameron, 2014b). Toto se týká i případu *N. violacea* v této práci a dalších jedinců použitých pro srovnávací analýzu (*C. assimilis*, *H. dermestoides*, *P. edwardsi*, *P. limbata*, u těchto však většinou kromě AT oblasti chyběly i některé geny).

Existuje několik způsobů, jak se vyhnout, respektive omezit, problémy spojené s vysokým obsahem A/T bází. V první řadě jde o snížení teploty nasedání primerů, přidávání stabilizátorů k PCR reakci nebo používání různých polymeráz. Teplota nasedání je definována složením bází jednotlivých primerů, ale díky vysokému obsahu A/T nukleotidů u hmyzích mitogenomů bývá často vhodné teplotu oproti vypočítané optimální teplotě snížit až o 4°C (Cameron, 2014b). Obdobně je vhodné upravit i teplotu elongace, neboť hůře navázaný primer (zejména pokud k nasedání primerů dochází při nízké teplotě) se může při zvýšení teploty na standardních 72°C uvolnit, proto se používá snížená teplota elongace na 68°C. Daný přístup se ukázal být užitečným i v této práci, kdy snížení teploty nasedání primerů většinou vedlo k lepším výsledkům. Při neúspěšné amplifikaci nebo nedostatečné velikosti fragmentů bylo ze začátku přidáváno k reakcím BSA (Bovine Serum Albumin) pro stabilizaci reakce, to však nemělo žádný prokazatelný efekt na výsledný produkt, a proto bylo od jeho používání upuštěno. Co se však ukázalo být velice užitečným, bylo použití různých polymeráz. Celkem byly vyzkoušeny tři typy: Taq DNA p. Unis (Top-Bio s. r. o.), TaKaRa ExTaq (Takara Bio Inc.) a PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (Takara Bio Inc.). Taq DNA polymeráza Unis, která byla používána standardně, nemá “proof-reading“ aktivitu a bylo s její pomocí možno uspokojivě amplifikovat menší procento fragmentů, konkrétně 5 (NV, A, B, C a Q7; dle Tab. 4). Použití polymerázy ExTaq s “proof-reading“ aktivitou vedlo k prokazatelně lepším výsledkům, jelikož se s ní podařilo úspěšně amplifikovat většinu fragmentů (A1F, C2, K4F, L7, M1, M8, N5F, P2, Q4, R4 a S6; dle Tab. 4). Jediným úsekem, který se nepodařilo

amplifikovat ani jednou z výše zmíněných polymeráz byl právě úsek v AT oblasti (T7, dle Tab. 4), na ten byla použita GXL polymeráza, která je schopná překonat polyA úseky a minimalizuje optimalizační nároky reakce, byla proto pro tento úsek řešením.

5.1 Mitochondriální genom *Necrobia violacea*

V této práci se podařilo získat téměř kompletní mitogenom *N. violacea*. Jednalo se o 15 285 pb, které tvoří, v závislosti na skutečné délce AT oblasti, více než 95% mitogenomu (ve srovnání s délkou mitogenomu *T. sineae*). V případě, že by se délka porovnávala s druhým nejpříbuznějším jedincem *Ch. scaritides* (na základě naší fylogenetické analýzy, viz Obr. 7, 8 a 9), bylo by závěrem, že získaná sekvence tvoří více než 98% mitogenomu. K ucelení mitogenomu zbývá prosekvenovat dvě oblasti. Menší z nich (100 bp) se nachází uvnitř genu *ND4*, i přes použití specifických primerů a všech tří různých polymeráz se nepodařilo amplifikovat dostatečný produkt na to, aby mohl být celý řádně prosekvenován. K řešení by mohly vést další změny profilů, přidání většího množství templátu nebo klonování. Větší z neprosekvenovaných úseků se nachází v problematické AT oblasti, zde se podařilo získat velmi silný PCR produkt, proto se předpokládá, že k problému došlo na úrovni sekvenace, tady by k pročtení sekvence mohlo opět vést klonování. Pro oba fragmenty by také mohlo pomoci navrhnout nové specifické primery.

5.1.1 Zastoupení bází v mitogenomu

Sheffield et al. (2009) tvrdí, že mitogenomy brouků obsahují 65% až 78% A+T bází. Téměř úplně osekvenovaný mitogenom *N. violacea* obsahoval 78,3% A+T a 21,7% G+C bází, což samo o sobě vypovídá o tom, že je vysoce bohatý na nukleotidy A a T. Ve srovnání s výše uvedenou prací lze vidět, že se mitogenom *N. violacea* pohybuje nad horní hranicí tohoto rozpětí. Navíc lze očekávat, že procento A+T ještě poroste, z důvodu neosekvenování celé AT oblasti, která nejvýrazněji přispívá k celkové procentuální hodnotě A+T bází. Průměr obsahu bází v celém mitogenomu přes všechny druhy analyzované v této práci je 77,6% A+T a 22,5% G+T z čehož vyplývá, že mitogenom *N. violacea* je opět nadprůměrný co se týče obsahu A+T, což se zjevně odrazilo v řadě nesnází při získávání sekvencí.

Očekávané výsledky přineslo srovnání nukleotidového složení genů kódujících proteiny a AT oblasti. Geny kódující proteiny měly nižší obsah A+T (77,2%) než AT oblast (83,2%). Ze srovnání s ostatními druhy vyplynulo, že zatímco geny kódující proteiny *N. violacea* jsou opět obsahem A+T spíše nadprůměrné (77,2% vs 75,6%), AT oblast je naopak podprůměrná (83,2% vs 85,5%).

5.1.2 Geny kódující proteiny

Podařilo se získat všech 13 genů kódujících proteiny. Jediným problémem byla přibližně 100 pb dlouhá oblast uvnitř genu *ND4*, kterou se zatím nepodařilo prosekvenovat ačkoli bylo využito všech polymeráz a různých PCR profilů. Tato oblast byla tedy na základě sekvence *T. sinae* odhadnuta na 112 bází a nahrazena odpovídajícím počtem „N“. Většina genů začínala typickým ATN iniciačním kodonem s jedinou výjimkou, gen *COX2* začínal kodonem ACG. Kdyby se tento kodon nacházel u genu *COX1* pak by se nejednalo o nic neobvyklého, jelikož pro tento gen byla zaznamenána celá škála iniciačních kodonů, včetně ACG (Li et al., 2016), ale to, že se tento kodon vyskytuje u genu *COX2* pravděpodobně reprezentuje jedinečný případ. Samozřejmě, že se může také jednat o chybu v sekvenování, ale touto oblastí procházejí dvě, dá se říct ukázkové, dobře čitelné sekvence, proto je to spíše nepravděpodobné. U terminačních kodonů se žádné neobvyklosti nevyskytovaly, většina genů končila kompletními kodony TAA/TAG a tři geny končily parciálními kodony T, které jsou pro mitochondriální geny také typické (Cameron, 2014b).

5.1.3 RNA

Bylo detekováno všech 22 tRNA, z nichž většina z nich měla typické antikodony i složení do trojlístkových sekundárních struktur. Jedna z tRNA, trnS1 (serin), měla odvozený antikodon TCT, který je pravděpodobně konzervovaný u všech brouků podřádu Polyphaga (Sheffield et al., 2008) a redukované D rameno, které se u živočichů vyskytuje běžně (Doucet-Beaupré et al., 2010). Anomálií byla chybějící T smyčka u trnG (glycine), trnT (threonine) a trnP (prolin). V literatuře však nebyly nalezeny žádné podobné případy, může se tedy jednat buď o mutaci, nebo o chybu v sekvenci. Proto by bylo vhodné dané oblasti znovu prosekvenovat, aby se případná chyba dala vyloučit.

Obě jednotky rRNA byly nalezeny na předpokládaném místě, viz Tab. 8. Velká podjednotka, detekovaná programem MITOS, nebyla kompletní, proto bylo její finální anotace docíleno srovnáním s příbuznými druhy.

5.1.4 Nekódující oblasti

V mitogenu *N. violacea* se vyskytují jak různě dlouhé nekódující oblasti tak genové překryvy. Největší nekódující oblastí je tzv. AT oblast, dlouhá 681 pb toto však určitě není finální číslo. Nejedná se o mezidruhově příliš konzervovanou oblast, proto se její délka může výrazně lišit, očekává se, že se bude pohybovat někde mezi současným stavem a jeho dvojnásobkem. Ačkoli většina ostatních mezigenových prostor bývá specifická pro jednotlivé

druhy, tak mezi geny *trnS2* a *ND1* se vyskytuje malý prostor o délce 17 až 22 nukleotidů (v tomto případě 17), který je v rámci hmyzu konzervovaný (Sheffield et al., 2008, Cameron, 2014b). Tento úsek bývá identifikován jako vazebné místo mtTERM (transkripční terminační peptid) (Cameron, 2014b). Na hranici dvou genů kódujících proteiny většinou dochází k překryvům a jinak tomu ani nebylo v této práci. Cameron (2014b) tvrdí, že geny *ATP6/COX3* a *ND6/CytB* se často překrývají jedinou bází a v případě *ND6/CytB* tomu tak bylo i v této práci, a geny *ATP8/ATP6* a *ND4/ND4L* se nejčastěji překrývají 7 bázemi a opět tomu tak bylo i v této práci u jednoho z nich, a to *ND4/ND4L*. Z prací zabývajících se mitogenomy však vyplývá, že se na rozhraní genů často vyskytují překryvy různého rozsahu (Sheffield et al., 2008; Cameron, 2014b; Li et al., 2016).

5.2 Srovnání mitogenomů

5.2.1 Pořadí genů

Cameron (2014a) na základě sumarizace dosavadních poznatků uvádí, že změny pořadí genů jsou spíše výjimečné, a to se potvrdilo i v této práci. *N. violacea* společně s *T. sinae*, *Ch. scaritides* a *P. edwardsi* měli ancestrální pořadí genů (viz Obr. 6). U ostatních druhů v této analýze došlo k přeskoku jediné tRNA, celkem se jednalo o 4 různé tRNA u pěti různých brouků.

5.2.2 Fylogenetická rekonstrukce

Bylo potvrzeno postavení *N. violacea* v rámci nadčeledi Cleroidea, kde společně s *T. sinae* tvoří čeleď Cleridae. Zbytek uspořádání nadčeledi Cleroidea (*Ch. scaritides*, *C. assimilis*, *P. limbata*, *P. edwardsi*), při použití metod NJ a ML, přesně odpovídalo práci Timmermanse et al. (2015), odkud byly tyto druhy také převzaty. V MP došlo k zařazení *P. edwardsi* mimo nadčeleď Cleroidea, jako sesterskou skupinu *A. ocellata*, zástupce Coccinelloidea, ale to bude nejspíš statistická chyba, která může souviset s nejasným postavením této nadčeledi, resp. výběrem reprezentativních zástupců. Lymexyloidea (*H. dermestoides*) a Tenebrinoidea (*T. castaneum*) vychází stejně jako v ostatních publikacích jako sesterské skupiny (Timmermans et al. 2015; Li et al., 2016; Yuan et al., 2016; Zhang et al., 2018). Problém je však s dříve zmíněnou nadčeledí Coccinelloidea, která měla i v předešlých studiích pokaždé jiné postavení (Timmermans et al. 2015; Yuan et al., 2016; Zhang et al., 2018). S pomocí metody NJ byla Coccinelloidea postavena jako sesterská skupina Lymexyloidea a Tenebrinoidea, což by také odpovídalo práci Timmermanse et al. (2015) a jedné z verzí Yuana et al. (2016). Další dvě metody (ML a MP) postavily

Coccineloidea jako sesterskou skupinu Cleroidea, což vyšlo ve druhé z verzí Yuana et al. (2016).

Tato práce si však nekladla za cíl objasnit fylogenetické vztahy infrařádu Cucujiformia, kam všechny zahrnuté nadčeledi patří. O to se snažily jiné práce s mnohem větší škálou zástupců a složitějšími fylogenetickými metodami (např. Timmermans et al. 2015; Li et al., 2016; Yuan et al., 2016; Zhang et al., 2018). Zde šlo především o zařazení *N. violacea* do kontextu ostatních skupin, a to se bezpochyby podařilo.

6 Závěr

Podářilo se osekvenovat 15 285 pb mitogenomu brouka *Necrobia violacea*, a přestože sekvence nebyla zcela kompletní, byly identifikovány všechny standardní geny: 13 genů kódujících proteiny, 22 tRNA, obě podjednotky rRNA a navíc i část AT oblasti. Pořadí všech genů odpovídalo ancestrálnímu pořadí genů hmyzu. Některé tRNA vykazovaly nesrovnalosti v sekundární struktuře, proto by bylo potřeba dalšího zkoumání.

Fylogenetická analýza potvrdila nejbližší příbuznost *N. violacea* k *Trichodes sinae* a ukázala jejich postavení v rámci nadčeledi Cleroidea. Navíc byla nadčeď Cleroidea postavena do kontextu dalších 3 nadčeledí (Coccinelloidea, Lymexiloidea, Tenebrinoidea) s následujícím výsledkem. Lymexiloidea a Tenebrinoidea jsou sesterské skupiny a dohromady tvoří sesterskou skupinu k nadčeledi Cleroidea, postavení Coccinelloidea mezi nimi je však nejisté.

7 Literatura

Alberts, B., 1998. Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky. Přeložil Arnošt Kotryk. Ústí nad Labem: Espero publishing xxvi, Pr. 630, 411 - 413 p., ISBN: 8090290604.

Amendt, J., Campobasso, C. P., Gaudry, E., Reiter, C., LeBlanc, H. N., Hall, M. J. R., 2007. Best practice in forensic entomology-standards and guidelines. *International Journal of Legal Medicine* 121: 90 – 104.

Amendt, J., Richards, C. S., Campobasso, C. P., Zehner, R., Hall, M. J. R., 2011. Forensic entomology: applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* 7: 379 – 392.

Anderson, S., Bankier, T., Barrell, B. G., De Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., Young, G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.

Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C., Podowski, R. M., Näslund, A. K., Eriksson, A. S., Winkler, H. H., Kurland. C. G., 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396: 133 – 140.

Avise J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., Saunders, N. C., 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489 – 522.

Bibb, M. J., Van Etten, R. A., Wright, C. T., Walberg, M. W., Clayton, D. A., 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26: 167 – 180.

Bocak, L., Barton, C., Crampton-Platt, A., Chesters, D., Ahrens, D., Vogler, A. P., 2014. Building the coleoptera tree-of-life for >8000 species: Composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. *Systematic Entomology* 39: 97 – 110.

Boore, J. L., Lavrov, D. V., Brown, W. M., 1998. Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* 392: 667 – 668.

Boore, J. L., 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27: 1767 – 1780.

Bridge D., Cunningham C. W., Schierwater B., Desalle R., Buss L. W., 1992. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: Evidence from mitochondrial genome structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76: 1967 – 1971.

Burke, A., Chaboo, C. S., 2015. Beetles (Coleoptera) of Peru: A survey of the Families. Cleridae Latreille, 1802. *Journal of the Kansas Entomological Society* 88: 260 – 266.

Cameron, S. L., Lo, N., Bourguignon, T., Svenson, G. J., Evans, T. A., 2012. A mitochondrial genome phylogeny of termites (Blattodea: Termitoidae): Robust support for interfamilial relationships and molecular synapomorphies define major clades. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 162 – 173.

Cameron, S. L., 2014a. Insect mitochondrial genomics: implications for evolution and phylogeny. *Annual Review of Entomology* 59: 95 – 117.

Cameron, S. L., 2014b. How to sequence and annotate insect mitochondrial genomes for systematic and comparative genomics research. *Systematic entomology* 39: 400 – 411.

Campobasso, C. P., Di Vella, G., Introna, F., 2001. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Science International* 120: 18 – 27.

Catts, E. P., Goff, M. L., 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology* 37: 253 – 272.

Corporaal, J. B. 1950. Cleridae v Hincks, W. D. Coleopterum Catalogus Supplementa. Pars 23 (edito secunda). Junk, W. – Gravenhage, 373p.

Crowson, R. A., 1964. A review of the classification of Cleroidea (Coleoptera), with descriptions of two genera of Peltidae and of several new larval types. *Transactions of the Royal Entomological Society of London* 116, 275 – 327.

Doucet-Beaupré, H., Breton, S., Chapman, E. G., Blier, P. U., Bogan, A. E., Stewart, D. T., Hoeh, W. R., 2010. Mitochondrial phylogenomics of the Bivalvia (Mollusca): searching for the origin and mitogenomic correlates of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *BMC Evolutionary Biology* 10: 50.

Ebeling, W., 2002. Urban entomology, kapitola 7. University of California. (Dostupné z: <http://www.entomology.ucr.edu/ebeling/>).

El-Mallakh, R., 1978. A food source for *Necrobia violacea* (Coleoptera: Cleridae). *Entomological News* 89: 178.

Evans, A. E., Hogue, J. N., 2006. Field guide to beetles of California. University of California Press, Ltd. London, England, 362p.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294 – 299.

Gerstmeier, R., Halperin, J., Chekatunov, V., 1999. An annotated list of Cleridae and Thanerocleridae (Coleoptera) of Israel. *Phytoparasitica* 27: 27 – 33.

Gray, M. W., Burger, G., Lang, B. F., 1999. Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476 – 1481.

Gray, M. W., 2012. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a011403.

- Gunter, N., Leavengood, J., Bartlett, J., Chapman, E., Cameron, S. L., 2013.** A molecular phylogeny of the checkered beetles and a description of Epiclininae a new subfamily (Coleoptera: Cleroidea: Cleridae). *Systematic entomology* 38: 626 – 636.
- Hunt, T., Bergsten, J., Levkanicova, Z., Papadopoulou, A., St. John, O., Wild, R., Hammond, P. M., Ahrens, D., Balke, M., Caterino, M. S., Gómez-Zurita, J., Ribera, I., Barraclough, T. G., Bocakova, M., Bocak, L., Vogler, A. P., 2007.** A comprehensive phylogeny of beetles reveals evolutionary origins of a superradiation. *Science* 318: 1913 – 1916.
- Kolibáč, J. 1992.** Revision of Thanerocleridae n. stat. (Coleoptera, Cleroidea). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 65: 303 – 159.
- Kolibáč, J., 1997.** Classification of the subfamilies of Cleridae (Coleoptera: Cleroidea). *Acta Musei Moraviae Scientiae Naturales* 81: 307 – 361.
- Kolibáč, J. 2010.** Cleridae Latreille, 1802. Handbook of Zoology, Coleoptera, Beetles, Vol. 2: Morphology and Systematics (Elateriidea, Bostrichiformia, Cucujiformia partim). De Gruyter, New York, 257 – 261.
- Kolibáč, J., Huang, D., 2016.** The oldest known clerid fossils from the Middle Jurassic of China, with a review of Cleridae systematics (Coleoptera). *Systematic entomology* 41: 808 – 823.
- Koonin, E. V., 2010.** The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics. *Genome Biology* 11: 209.
- Lang, B. F., Lavrov, D. V., Burger, G., 2004.** Mitochondrial genome, evolution. *Encyklopedia of Biological Chemistry* 2: 703 – 708.
- Lawrence, J. F., Ślipiński, A., Seago, A. E., Thayer, M. K., Newton, A. F., Marvaldi A. E., 2011.** Phylogeny of the Coleoptera based on morphological characters of adults and larvae. *Annales Zoologici* 61: 1 – 217.

- Li, X., Ou, J., Wei, Z., Li, Y., Tian, Y., 2016.** The mitogenomes of three beetles (Coleoptera: Polyphaga: Cucujiformia): New gene rearrangement and phylogeny. *Biochemical Systematics and Ecology* 69: 101 – 107.
- Payne, J. A., Crossley, A. J., 1966.** Animal species associated with pig carrion. Oak Ridge. TN: Oak Ridge National Laboratory.
- Morlais I., Severson, D. W., 2002.** Complete mitochondrial DNA sequence and amino acid analysis of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) from *Aedes aegypti*. *DNA Sequence* 13: 123 – 127.
- Nelson, L. A., Lambkin, C. L., Batterham, P., Wallman, J. F., Downton, M., Whiting, M. F., Yeates, D. K., Cameron, S. L., 2012.** Beyond barcoding: A mitochondrial genomics approach to molecular phylogenetics and diagnostics of blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Gene* 511: 131 – 142.
- Opitz, W., 2002.** Family 73. Cleridae. p. 267 – 281. v Arnett, R. H., Thomas, M. C., Skelley, P. E., Frank, J., H. American Beetles, vol. 2, CRC Press; Boca Raton, F. L., 861 p.
- Opitz, W., 2010.** Classification, natural history, phylogeny, and subfamily composition of the Cleridae and generic content of the subfamilies. *Entomologica Basiliensia et Collections Frey* 32: 31 – 128.
- Rees, D., 2004.** Insects of stored products. CSIRO Publishing, Collingwood Victoria, Australia, 190p. ISBN 0-643-06903-8.
- Robertson, J., Ślipiński, A., Moulton, M., Schockley, F. W., Giorgi, A., Lord, N. P., McKenna, D. D., Tomaszewska, W., Forrester, J., Miller, K. B., Whiting, M. F., McHugh, J. V., 2015.** Phylogeny and classification of Cucujoidea and the recognition of a new superfamily Coccinelloidea (Coleoptera: Cucujiformia). *Systematic Entomology* 40: 745 – 778.
- Schenkling, S., 1903.** Zur systematik der Cleriden, *Deutsche Entomologische Zeitschrift* 13: 9 – 16.

Sheffield, N. C., Song, H., Cameron, S. L., Whiting, M. F., 2008. A comparative analysis of mitochondrial genomes in Coleoptera (Arthropoda: Insecta) and genome descriptions of six new beetles. *Molecular Biology and Evolution* 25: 2499 – 2509.

Sheffield, N. C., Song, H., Cameron, S. L., Whiting, M. F., 2009. Nonstationary evolution and compositional heterogeneity in beetle mitochondrial phylogenomics. *Systematic Biology* 58: 381 – 394.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651 – 701.

Simon, C., Buckley, T. R., Frati, F., Stewart, J. B., Beckenbach, A. T., 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA, *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 37: 545 – 579.

Simmons, P., Ellington, G. W., 1925. The ham beetle, *Necrobia rufipes*. *Journal of Agricultural Research* 30: 845 – 863.

Smith, D. R., Keeling, P. J., 2015. Mitochondrial and plastid genome architecture: Reoccurring themes but significant differences at the extremes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 112: 10177 – 10184.

Smith, D. R., 2016. The past, present and future of mitochondrial genomics: have we sequenced enough mtDNAs?. *Briefings in Functional Genomics* 15: 47 – 54.

Sperling, F. A., Anderson, G. S., Hickey, D. A., 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *Journal of Forensic Sciences* 39: 418 – 427.

Sterky, F., Lundeberg, J., 2000. Sequence analysis of genes and genomes. *Journal of Biotechnology* 76: 1 – 31.

Straus, J., Porada, V., at al., 2017. Teorie, metody a metodologie kriminalistiky. Plzeň: Aleš Čeněk, 417p, 292 – 316. ISBN 978-7380-666-8.

Ślipiński, S. A., Leschen, R. A. B., Lawrence, J. F., 2011. An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Animal biodiversity* 3148: 203 - 208.

Šuláková, H., 2006. Speciální biologie: využití hmyzu při stanovení post mortem intervalu. *Kriminalistický sborník* 3: 36 – 37.

Šuláková, H., 2014. Forezní entomologie – když smrt je začátek. *Živa* 5: 250 – 256.

Timmermans, M. J. T. N., Barton, C., Haran, J., Ahrens, D., Culverwel, C. L., Ollikainen, A., Dodsworth, S., Foster, P. G., Bocak, L., Vogler, A. P., 2015. Family-level sampling of mitochondrial genomes in Coleoptera: Compositional heterogeneity and phylogenetics. *Genome Biology and Evolution* 8: 161 – 175.

Vrba, V., 2018. Seznam druhů brouků čeledi Cleridae vyskytující se v ČR. (dostupné z: http://www.biblioteka.cz/Pages/Systematika/DruhyCeled.aspx?ID_TabCelediF=58).

Wallman, J. F., Donnellan, S. C., 2001. The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. *Forensic Science International* 120: 60 – 67.

Wells, J. D., Sperling, F. A. H., 2001. DNA-based identification of forensically important Chrysomyidae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International* 120: 110 – 115.

Wells, J. D., Stevens, J. R., 2008. Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annual Review of Entomology* 53: 103 – 120.

Wells, J. D., Wall, R., Stevens, J. R., 2007. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *International Journal of Legal Medicine* 121: 229 – 233.

Yuan, M. L., Zhang, Q. L., Zhang, L., Guo, Z. L., Liu, Y. J., Shen, Y. Y., Shao, R., 2016. High-level phylogeny of the Coleoptera inferred with mitochondrial genome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 104: 99 – 111.

Zhang, S. Q., Che, L. H., Li, Y., Liang, D., Pang, H., Ślipiński, A., Zhang, P., 2018. Evolutionary history of Coleoptera revealed by extensive sampling of genes and species. *Nature Communications* 9: 205.

Internetové zdroje:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>

<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>

<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>

<http://wolfe.ucd.ie/GenomeVx>

<https://www.megasoftware.net/>

<https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id314444/?taxonid=10017>