Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Evoluce imunitních proteinů z rodiny IDGF u čeledi slunéčkovití (Coleoptera: Coccinellidae)

Bakalářská práce

Lucie Hodíková

Školitelka: Mgr. Lucie Kučerová, Ph.D.
Garant z PřF: prof. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

České Budějovice 2022

Bibliografický údaj

Hodíková, L., 2022: Evoluce imunitních proteinů z rodiny IDGF u čeledi slunéčkovití (Coleoptera: Coccinellidae). [The evolution of immune proteins from IDGF family at lady beetles family (Coleoptera: Coccinellidae). Bc. Thesis, in Czech.] – 78 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

IDGF proteins are chitinase-like proteins participating in many biological processes in insects. These proteins are well studied in the model organism *Drosophila melanogaster*, however little is known about IDGF in other organisms. This thesis is focused on examining the evolution of IDGF proteins in the beetle family Coccinellidae. In addition, the effects of nematode infection on IDGF exprssion in *Harmonia axyridis* are presented.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 7.12.2022

…….

Lucie Hodíková

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat pracovníkům České zemědělské univerzity za materiál k mé práci. Konkrétně děkuji za sběr a určení slunéček Michalu Knappovi a Michalu Řeřichovi a za izolaci DNA Karolíně Mahlerové. Dále bych chtěla poděkovat všem spolupracovníkům v laboratoři molekulární genetiky v Entomologickém ústavu Biologického centra AV ČR za veškerou jejich pomoc v případě potřeby. Jmenovitě se jedná o spolupracovníky: Mgr. Václav Brož, Ph.D., Ing. Peter Kmeť, Růžena Kuklová, MSc. Houda Ouns Maaroufi, Ph.D., Laura Mačejková, Mgr. Lenka Rouhová, MSc. Wu Bulah Chia-Hsiang a RNDr. Anna Žaloudíková. Ráda bych poděkovala také vedoucímu laboratoře a zároveň mému garantu z PřF prof. RNDr. Michalu Žurovcovi, CSc. za podporu při řešení mého projektu. Největší dík patří bezpochyby školitelce Mgr. Lucii Kučerové, Ph.D. za naučení veškerých metod potřebných k řešení projektu, za odborné vedení práce a za ochotu mi vždy poradit a pomoci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také mé rodině za veškerou podporu při studiu a při řešení bakalářské práce.

OBSAH

1 Úvod 1
2 Teoretická část 2
2.1 Čeleď slunéčkovití 2
2.2 Hlístovka *Steinernema carpocapsae* 7
2.3 Chitinázám podobné proteiny 8
2.4 Proteiny Imaginal Disc Growth Factors (IDGF) 8
2.4.1 Původ 8
2.4.2 Struktura 9
2.4.3 Funkce 11
2.4.4 Evoluce 14
3 Cíle práce 15
4 Metodika 16
4.1 Seznam druhů použitých při výzkumu 16
4.2 Navržení primerů 17
4.2.1 Pro expresní analýzu *Idgf* 17
4.2.2 Pro evoluci *Idgf* 17
4.3 Infekce *Harmonia axyridis* hlístovkami 19
4.4 Izolace RNA 19
4.5 Reverzní transkripce 21
4.6 Kvantitativní PCR 21
4.7 Izolace DNA 22
4.7.1 Rychlá izolace z malého vzorku (Single Fly Genomic DNA Prep) 22
4.7.2 Purifikace DNA pomocí standartního kitu 22
4.8 PCR 23
4.8.1 PCR s Dream Taq polymerázou 23
4.8.2 PCR s TaKaRa Ex Taq polymerázou 23
4.9 Elektroforéza 24
4.10 Přečištění PCR produktů pomocí ExoSAP 25
4.11 Sekvenování 25
4.12 Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu 25
4.13 Klonování PCR produktu do bakteriálního plazmidu 26
4.13.1 Příprava média 26
4.13.2 Ligace PCR produktu do bakteriálního plazmidu 26
4.13.3 Transformace bakterií *Escherichia coli* 26
4.14 Izolace plazmidové DNA z *Escherichia coli* 27
4.15 Vytváření fylogenetických stromů 28

4.16 Změření exprese *Idgf* po hlístovkové infekci 28
5 Výsledky 30
5.1 Exprese *Idgf* po hlístovkové infekci 30
5.1.1 *Idgf2* 30
5.1.2 *Idgf4* 31
5.2 Evoluce *Idgf* 32
5.2.1 Ověření kvality DNA 32
5.2.2 Získávání sekvencí 35
5.2.3 Fylogenetické stromy 38
6 Diskuze 49
7 Závěr 52
8 Seznam použitých zkratek 53
9 Seznam literatury 55
10 Přílohy 60

1 ÚVOD

„Imaginal disc growth factors“ neboli zkráceně IDGF jsou chitinázám podobné růstové faktory objevené u hmyzu. Po jejich objevení u modelového organismu *Drosophila melanogaster* (Kirkpatrick a spol., 1995) se pokračovalo v odhalování jejich funkcí právě na tomto druhu. Bylo zjištěno, že proteiny IDGF jsou přítomné v hemolymfě a hrají klíčovou roli při srážení hemolymfy po zranění (Kučerová a spol., 2016). Dále se odhalila jejich důležitá podpůrná funkce při tvorbě extracelulární matrix nutné při správném svlékání vývojových stádií (Pesch a spol., 2016). V neposlední řadě jsou IDGF součástí imunitní reakce na hlístovkovou infekci (Arefin a spol., 2014)

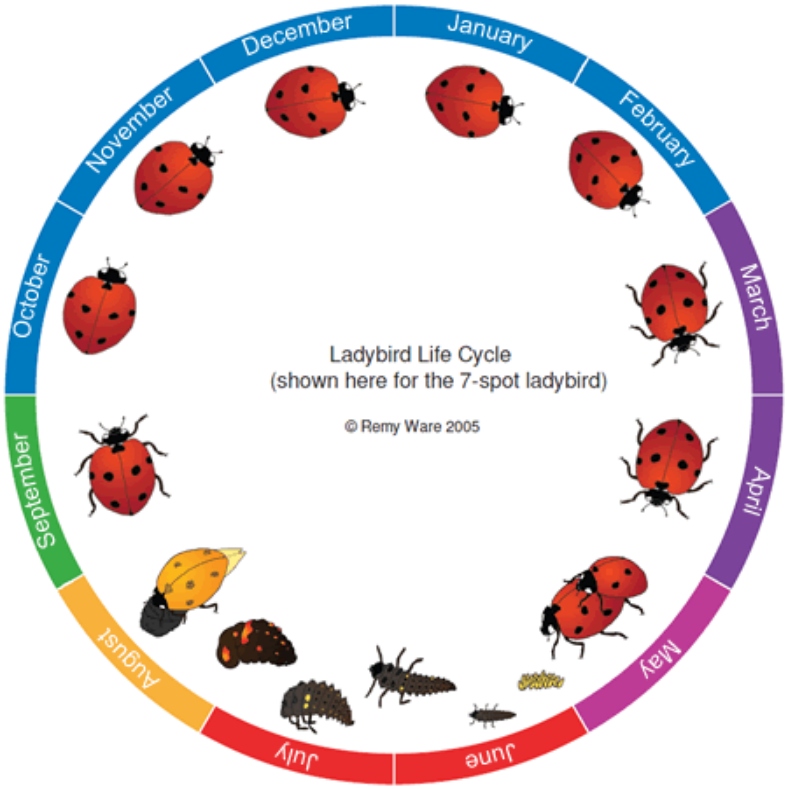
Ačkoliv jsou proteiny IDGF známé od roku 1995, o jejich funkci v jiných zástupcích hmyzu není mnoho známo. Cílem práce bylo tedy zjistit, zda podobně jako u *Drosophila melanogaster,* tak i u jiných druhů hmyzu jsou IDGF proteiny spojené s imunitní reakcí. Pokusným organismem byl vybrán brouk *Harmonia axyridis* z čeledi slunéčkovití (Coccinellidae), jelikož pokusy na tomto organismu nijak neohrozí stav populace v přírodě, a navíc se dá chovat v laboratorních podmínkách. Zmíněný druh byl vystaven infekci půdními hlístovkami běžně se vyskytujícími v naší přírodě, konkrétně *Steinernema carpocapsae* a *Steinernema feltiae.* Předešlé výzkumy na slunéčkách navíc odhalily, že hlístovka *Steinernema carpocapsae* je více účinná v souvislosti s biologickou kontrolou než jiné zkoumané druhy hlístovek (Ebeid a spol., 2014 a Metwally a spol., 2016). Proto byl zejména druh *Steinernema carpocapsae* vhodný pro tento pokus. Dřívější studie od vědců D. I. Shapiro-Ilan a T. E.Cottrell v roce 2005 zjistila rozdílnou náchylnost na hlístovkovou infekci mezi invazními a původními americkými druhy brouků čeledi slunéčkovití. Podobné výsledky dokazují i výzkumy s našimi původními druhy slunéčkovitých brouků (Kučerová, Řeřicha, nepublikováno). Z toho důvodu bylo dalším záměrem práce objasnit evoluci proteinu IDGF právě na broucích čeledi slunéčkovití.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Čeleď slunéčkovití

Čeleď brouků slunéčkovití (Coccinellidae) není největší čeledí v rámci hmyzu. Je známo asi 6 000 druhů (Che a spol., 2021), avšak tento počet je přibližně stejný jako počet všech druhů savců na světě. Většina lidí si vybaví klasická pestrobarevná slunéčka, avšak všechny druhy této skupiny nejsou pestrobarevné, nýbrž velký počet druhů má podobu malých hnědých chlupatých brouků.

Tato skupina hmyzu má proměnu dokonalou. Životní cyklus (Obrázek č. 1) začíná vajíčkem. Větší druhy kladou vajíčka žlutá až oranžová do shluků po 20 až 50, menší druhy je kladou jednotlivě nebo do menších shluků. Larvě, která se z vajíček po několika dnech vylíhne, trvá přibližně měsíc, než povyroste, a poté se zakuklí. Kukla u slunéček je trochu zvláštní, protože je vždy přichycená k rostlině a vypadá napůl jako larva a napůl jako dospělec. Vylíhlý dospělý jedinec je měkký a světle žlutý. Zanedlouho jeho tělo ztvrdne a pomalu v částech těla hromadí pigmenty, jako jsou pteriny a karoteny zodpovědné za oranžovou až červenou barvu, dále melanin způsobující hnědé až černé zbarvení. Dospělí jedinci se páří asi dvě hodiny, a i vícekrát denně s několika partnery. Spermie se v samicích ukládají a ve stejné snůšce můžou mít noví jedinci jiné otce (Nedvěd, Djurić, 2022).



Obrázek č. 1: Ukázka schématu životního cyklu slunéčka sedmitečného (*Coccinella septempunctata*) v souvislosti s roční dobou (Ware, 2005)

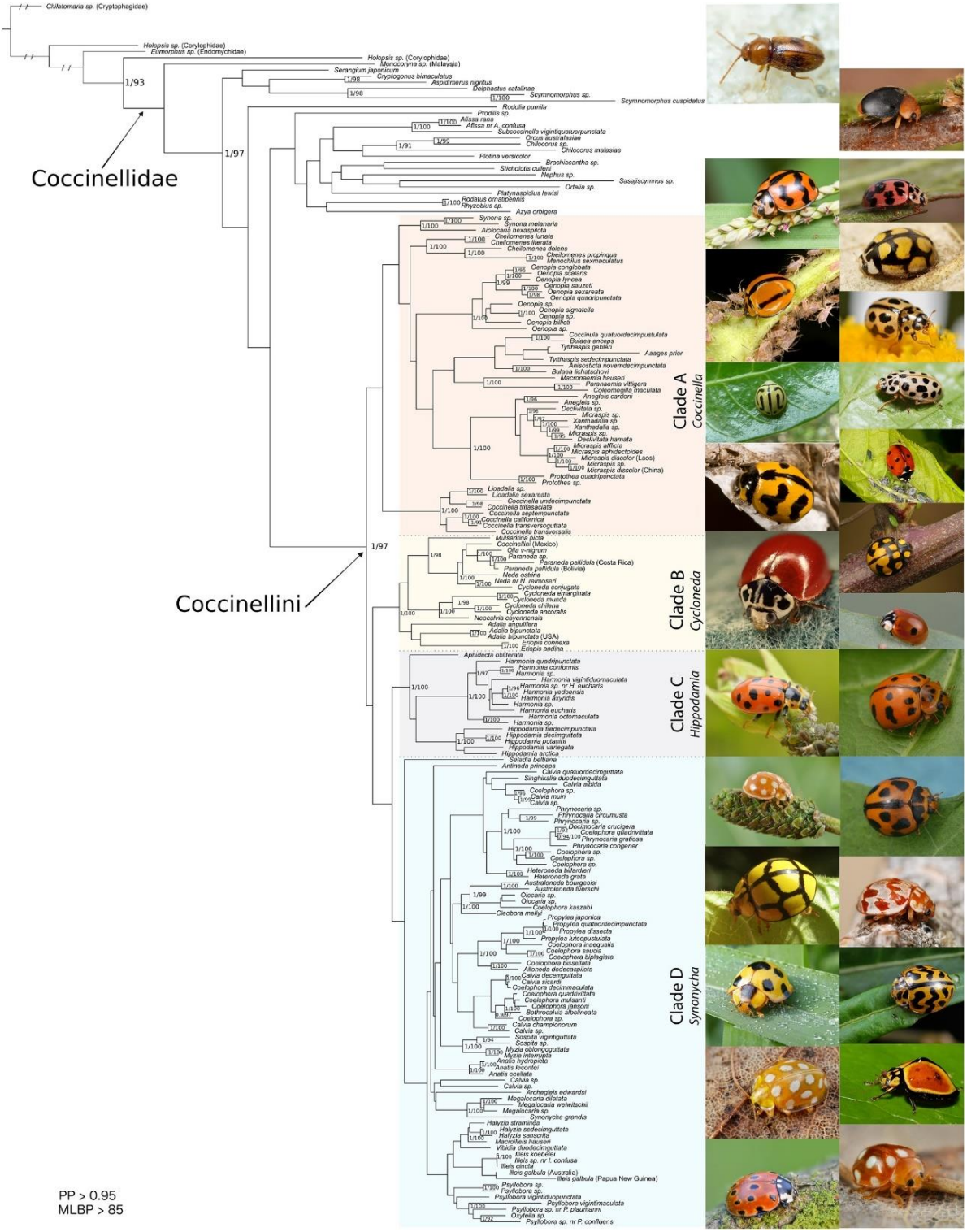
Barva sluněček se může v průběhu života trochu pozměnit, nicméně počet a tvar skvrn je geneticky daný a nijak se u daného jedince nemění (Gautier a spol., 2018). Charakteristickým pestrobarevným zbarvením dávají potenciálním predátorům jasně najevo, že jsou jedovatí. Obsahují alkaloidy, které jsou toxické pro ptáky a jiný dravý hmyz. Ačkoliv jiný hmyz červenou barvu nevidí, slunéčka je na svou jedovatost upozorňují i vypouštěním methoxypyrazinu z kolenních kloubů nohou. Všechny slunéčka jsou více či méně jedovatá, jejich podobná zbarvení jsou tedy příkladem Mülerovských mimiker (Nedvěd, Djurić, 2022).

Coccinellidae jsou považovány za užitečný hmyz, neboť většina z nich se živí rostlinnými škůdci. Mezi jejich oblíbené druhy potravy patří například mšice či červci. Slunéčka s takto preferovanou potravou si nevybírají druh daného organismu, ale spíše rostlinu, kterou se daný škůdce živí. Lze najít slunéčka, která vyhledávají mšice na jehličnanech, na listnatých stromech nebo na bylinách. Několik velmi malých sluněček se živí molicemi a sviluškami. Ovšem ne všechny druhy sluněček jsou dravé, v této skupině můžeme najít specialisty živící se padlím. Mezi preferenty padlí patří rody *Vibidia, Halyzia* a *Psyllobora* (Nattier a spol. 2021). Díky užitečnosti sluněček v boji s rostlinnými škůdci byla v minulosti slunéčka vypouštěna na nová stanoviště jako prostředek biologické ochrany. Některé druhy se na novém místě rychle zvykly a nyní se považují za invazní druhy. Typickým příkladem je *Harmonia axyridis* (Nedvěd, Djurić, 2022).

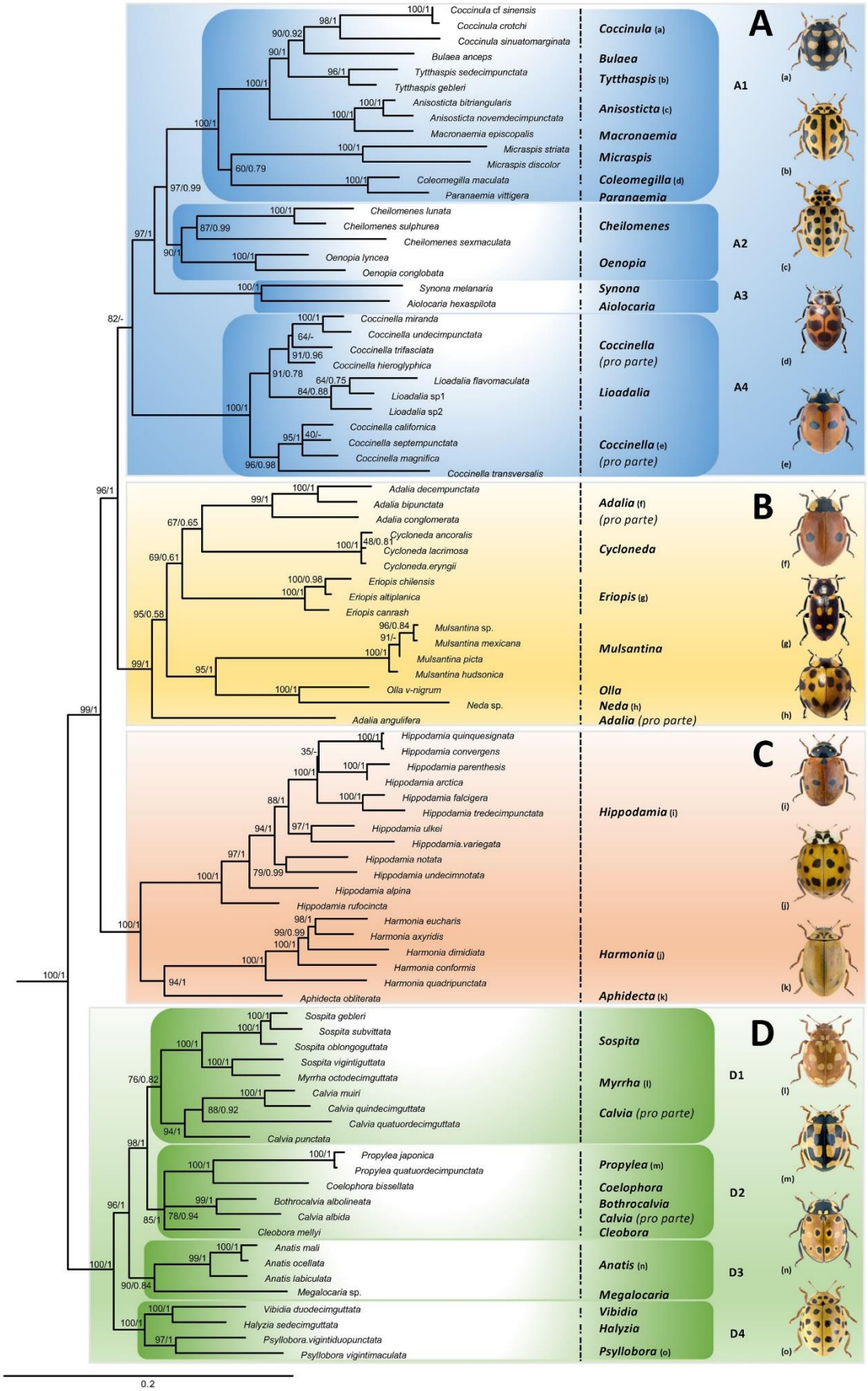
Co se týče jejich habitatu, není snadné zobecnit stanoviště pro celou skupinu – některé druhy jsou stenotopní a jiné eurytopní. Habitat je u této skupiny vázán hlavně na druh potravy. Co se týče stenotopních druhů, patří mezi ně například *Adalia conglomerata* vázaná na jehličnaté lesy, *Synharmonia conglobata* zaměřená na listnaté stromy, *Coccinula sinuatomarginata* vyhledávající stepi a suché louky nebo *Anisosticta novemdecimpunctata* spojená s vlhčími biotopy. U eurytopních druhů lze alespoň určit preferenci rostlinného patra. Velice známé druhy jako například *Coccinella septempunctata* či *Propylea quatuordecimpunctata* vyhledávají pro rozmnožování zejména bylinnou vrstvu porostu. Na druhé straně druhy jako třeba *Adalia bipunctata* a *Anatis ocellata* preferují stromové pásmo. Zmíněné stromové druhy se navíc specializovaly pro tento styl života tím, že larvy mají adhezivní orgán na břišním segmentu, aby ze stromu snadno nespadly (Hodek, Honěk, 1996).

Fylogeneze celé čeledi Coccinellidae s více jak 200 druhy byla v roce 2021 zkoumána vědeckou skupinou Che a spol. Tato studie byla udělána na základě 94 nukleárních genů. Bohužel se tato studie nevěnovala podrobně podčeledi Coccinelinae, proto bylo potřeba vyhledat fylogenezi specializovanou na tuto skupinu. Fylogeneze právě této užší skupiny

čeledi slunéčkovití byla nejlépe vysvětlena hned ve dvou studií ze stejného roku. Studie vedená vědkyní W. Tomaszewska (2021) používala šest různých úseků DNA, a to pět nukleárních a jeden mitochondriální. Konkrétně se jednalo o nukleární geny dvou sekcí karbamoylfosfát syntetázy (CADMC, CADXM), gen pro topoisomerázu I (TOPO), gen *wingless* (WGL) a 3059fin (arginin methyltransferázu). Použitý mitochondriální gen byl gen pro cytochrom oxidázu I (COI). Naproti tomu fylogeneze od R. Nattier a spol. (2021) používala jiné úseky DNA, a to pět nukleárních a tři mitochondriální. Těmito úseky byly fragmenty DNA kódující 18S ribozomální DNA, úsek kódující D1–D3 doménu 28S ribozomální DNA, dále gen pro histonovou podjednotku 3 (H3), *winless* gen (WGL) a gen pro kabamoylfosfát syntetázu (CAD). Použitými mitochondriálními úseky byly fragmenty kódující ribozomální 12S RNA, fragmenty pro ribozomální 16S RNA a gen pro cytochrom oxidázu I (COI). Výsledky obou výzkumů (Obrázek č. 2 a 3) byly porovnány, zda se liší.



Obrázek č. 2: Fylogeneze podčeledi Coccinellinae podle Tomaszewska a spol. (2021)



Obrázek č. 3: Fylogeneze podčeledi Coccinellinae podle Nattier a spol. (2021)

Srovnáním obou fylogenezí lze zjistit, že skladba jednotlivých monofyletických skupin zůstala zachována. V obou případech jsou tyto skupiny vyznačeny barevně, avšak oba výzkumy použily pro skupiny jiné barvy. Fylogenetické studie se lišily pouze v rozdílnosti vztahů mezi skupinami.

2.2 Hlístovka *Steinernema carpocapsae*

Druh této hlístovky je znám tím, že má celou řadu hostitelů napříč hmyzími řády. Do svého hostitele se dostanou některým z jeho otvorů, nejčastěji ústním otvorem s potravou. Ačkoliv se invazní larvy hlístovek aktivně pohybují, proniknutí do hostitele přes kutikulu je velice vzácné. Po proniknutí hlístovek *Steinernema carpocapsae* do tělní dutiny hostitele uvolní hlístovky symbiotické bakterie rodu *Xenorhabdus* ze svého střeva (Šedrlová, 2006). Právě tyto bakterie jsou zodpovědné za smrt hostitele (Shapiro-Ilan, Cottrell, 2005). Ta nastává podle teploty v rozmezí dvou až čtyř dnů. Hlístovky jsou závislé na bakteriích také tím, že jim bakterie vytvářejí vhodné prostředí pro jejich vývoj. Podílejí se zejména na rozkladu hostitelské tkáně na živiny sloužící jako zdroj potravy pro hlístovky, a zároveň produkují antibiotika chránící před ostatními mikroorganismy (Kaya, Gaugler, 1993). Po počátku funkce bakterií se larvy hlístovek vyvíjejí dál v dospělce, kteří se později rozmnoží. Nová generace se v již mrtvém hostiteli vyvine do dospělců, kteří dají vznik třetí generace. Larvy třetí generace zastaví svůj vývoj ve třetím instaru. Tyto larvy následně opouští prvotního hostitele a v půdě vyčkávají na nového hostitele (Šedrlová, 2006).

Výzkum hlístovek je velice užitečný, neboť hlístovky se dají použít jako biologická kontrola různých škůdců. Velmi významný pokus vykonali američtí vědci D.I. Shapiro-Ilan a T. E. Cottrell v roce 2005. Tehdy zkoumali vliv dvou druhů hlístovek, konkrétně *Heterorhabditis bacteriophora* a *S. carpocapsae* na dva americké původní druhy a dva invazní druhy slunéček. Původními druhy amerických slunéček byly *Coleomegilla maculata* a *Olla v-nigrum* a invazními druhy byly *Harmonia axyridis* a *Coccinella septempunctata*. Pokus odhalil, že u invazních druhů byla mortalita po jednom až dvou dnech výrazně nižší než u původních druhů. Studie tedy potvrdila domněnku, že invazní druhy jsou úspěšné v novém prostředí i díky menší náchylnosti k patogenům.

Později se i další studie věnovaly vlivu entomopatogenních hlístovek na brouky z čeledi slunéčkovití. Tyto studie se spíše zaměřovaly na to, které druhy hlístovek jsou nejúčinnější jako biologická kontrola. Egyptská studie od Ebeid a spol. (2014) zkoumala vliv třech druhů hlístovek právě jako biologickou kontrolu brouka *Epilachna chrysomelina* z čeledi slunéčkovití. Ze zkoumaných hlístovek byl nejúčinnější druh *S. carpocapsae*

proti dospělým broukům z čeledi slunéčkovití. Nicméně další dva druhy hlístovek, jmenovitě *Heterorhabditis bacteriphora* a *Heterorhabditis indica*, byly efektivnější u larev brouka *Epilachna chrysomelina*.

Pozdější výzkum se věnoval účinnosti hned deseti druhů entomopatogenních hlístovek na třech zkoumaných druzích hmyzu z různých čeledí. Těmi byly druhy: zlatoočka obecná (*Chrysoperla carnea*), slunéčko sedmitečné (*Coccinella septempunctata*) a ploštice *Orius albidipennis*. Mimo mnoho dalšího bylo zjištěno, že nejúčinnějším druhem vůči všem třem zkoumaným organismům byla opět hlístovka *S. carpocapsae* (Metwally a spol., 2016).

2.3 Chitinázám podobné proteiny

Chitinázám podobné proteiny (CLP) evolucí ztratily schopnost štěpit chitin kvůli záměně klíčových aminokyselin v katalytickém centru. Přesto si zachovaly schopnost vázat oligosacharidové řetězce, čímž se dokážou přichytit i na složky extracelulární matrix jako jsou hyaluronan, proteoglykany a glykosaminoglykany. Bylo zjištěno, že CLP se tímto podílejí na remodelaci tkáně anebo zánětu. Aktivita chitinázám podobných proteinů byla objevena i při imunitní reakci na řadu neurologických poruch a onemocnění způsobené plísněmi či roztoči. I přes to, že není známá přesná role CLP v imunitní odpovědi na tato onemocnění, právě CLP byly navrženy jako diagnostické a prognostické biomarkery a potencionální léčební cíle (Pinteac, 2020).

2.4 Proteiny Imaginal Disc Growth Factors (IDGF)

2.4.1 Původ

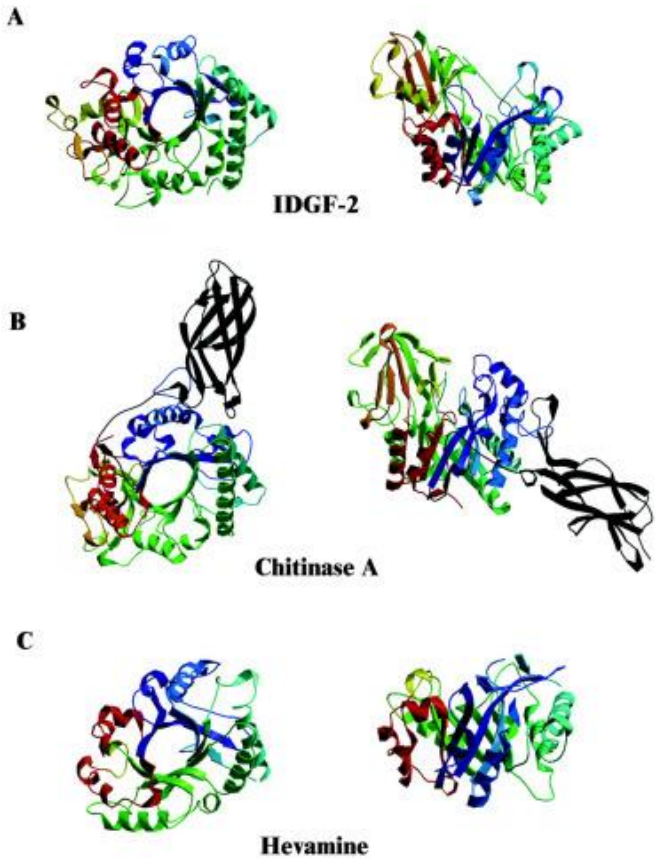
IDGF byly poprvé objeveny u mušky *Drosophila melanogaster* v roce 1995 (Kirkpatrick a spol., 1995). Tehdy byl tento protein pojmenován DS47. Pojmenování znamenalo D jako *Drosophila melanogaster*, S jako sekretovaný glykoprotein z S2 linie a 47 byla velikost proteinu v kDa. V této studii byla zkoumána exprese mRNA nebo přítomnost proteinu IDGF v jednotlivých orgánech ve vývojových stádiích *D. melanogaster*. Bylo odhaleno, že DS47 lze zařadit mezi chitinázám podobné proteiny. Kirkpatrick a spol. přirovnali DS47 k chitináze podobnému proteinu HC gp-39 u lidí, který se vyskytuje v artritických kloubech. DS47 se produkuje během celého životního cyklu *D. melanogaster*. Další příbuzné proteiny byly objeveny v roce 1999 v buněčných kulturách imaginálních disků z *D. melanogaster*. Tyto proteiny se strukturou podobají chitinázám, avšak ztratili katalytickou funkci díky aminokyselinové změně v aktivním centru. Proto je řadíme mezi chitinázám podobné

proteiny. Díky jejich funkci v nanomolárním rozsahu je skupina Kawamura a spol. označila za růstové faktory a podle buněčné linie je nazvali Imaginal Disc Growth Factors (IDGF). Geny *Idgf* jsou nejvíce exprimovány v buňkách embryonálního žloutku, dále v tukovém tělese embrya a následně larvy (Kawamura a spol., 1999).

2.4.2 Struktura

Struktura IDGF byla objasněna na proteinu IDGF2 u *D. melanogaster*. Proteiny IDGF se řadí mezi rodinu 18 glykosidových hydroláz, které jsou vždy tvořeny (αβ)8 barelem, neboli TIM (triose-phosphate isomerase) barelem. Po porovnání IDGF s dalšími proteiny ze stejné rodiny chitinázám podobných proteinů byla nalezena velice konzervovaná doména glykosidových hydroláz (Obrázek č. 4). Mezi tato vysoce konzervovaná místa patří dvě cis peptidové vazby (Gly-39-Tyr-40 a Phe-394-Asp-395), které jsou zřejmě nezbytné pro správné složení barelu. V těchto cis vazbách hrají důležitou roli aromatické zbytky, které se účastní vazby substrátu ve všech glykosidových hydrolázách s TIM barelem. Právě díky možnosti vazby na substrát může zřejmě IDGF-2 zastávat své funkce, a to interakcí s povrchovými glykoproteiny.

Od ostatních proteinů z rodiny 18 glykosidových hydroláz se IDGF liší zejména vloženou smyčkou mezi β4 listem a α4 helixem, kde se také nachází druhá (Pro-295–Val-296) ze tří cis vazeb v IDGF. Proteiny IDGF jsou unikátní také zapojením Cys zbytků do disulfidických můstků. Ovšem nejdůležitější rozdíl mezi IDGF a chitinázami je substituce aminokyselin v katalytické sekvenci chitináz. Vzniklé méně nabité prostředí neumožní hydrolýzu chitinu. Klíčové je také nahrazení skupiny Glu za Gln v pozici 132, které ruší enzymatickou aktivitu. Jelikož IDGF proteiny ztratily možnost štěpení chitinu, řadíme je mezi „chitinázám podobné proteiny“ z rodiny 18 glykosyl hydroláz (Varela a spol., 2002).



Obrázek č. 4: Rozdíl ve struktuře IDGF2 v porovnání se živočišnou Chitinázou A a rostlinnou chitinázou Hevaminem (Varela a spol., 2002)

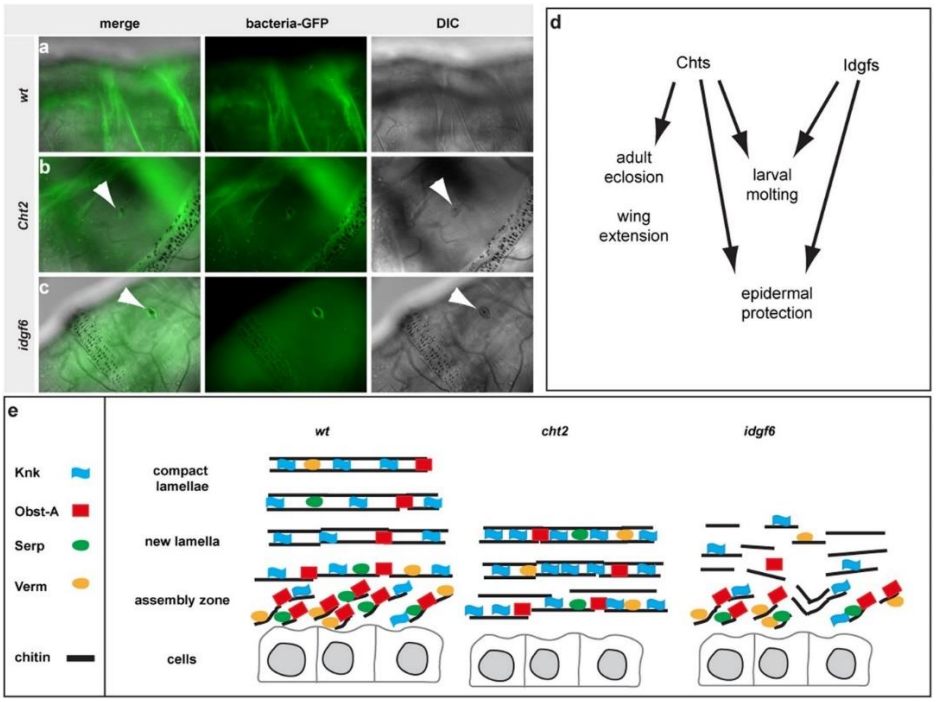
O něco později výzkum vedený Z. Huang (2006) věnoval pozornost sekvenční struktuře proteinu IDGF izolovaného z brouka *Diaprepes abbreviatus* (Curcolionidae). Protein z tohoto organismu byl pojmenován IDGF-DRW. Výzkum zjistil podobnost s IDGF-DRW s IDGF od jiných zástupců hmyzu, a to s 43% až 51% podobností se všemi geny *Idgf* u *D. melanogaster* a dále s 51% podobností *Idgf* motýlů *Pieris rapae* a *Bombyx mori*. Při detailnějším pozorování IDGF izolovaného z *Diaprepes abbreviatus* byly nalezeny znaky charakteristické pro zmíněné proteiny. Mezi tyto znaky patří záměna Glu za Gln (u brouků na pozici 159 v aktivním centru) a zapojení Cys zbytků do dvou disulfidových můstků. Na rozdíl od IDGF2 *D. melanogaster* byla identifikována pozměněná skladba aminokyselinových zbytků ve vazebném místě proteinu. Tyto zbytky nejsou nutně konzervovány u všech proteinů z rodiny IDGF, nicméně sekvence broučího proteinu obsahovala čtyři z deseti zbytků známých z IDGF2 *D. melanogaster*. Zbylých šest zbytků bylo nahrazeno aminokyselinami ze stejné nebo podobné skupiny (Huang a spol., 2006).

O dva roky později bylo na druhu *Tribolium castaneum* zjištěno, že u brouků se vyskytují dvě kopie genu *Idgf*. Tehdy byly geny pojmenovány jako *Idgf2* a *Idgf4* na základě sekvenční podobnosti s geny *Idgf2* a *Idgf4* u *D. melanogaster* (Zhu a spol., 2008).

2.4.3 Funkce

2.4.3.1 *Drosophila melanogaster*

Proteiny IDGF byly poprvé zkoumány v *D. melanogaster* a také, většina experimentů popisujících jejich funkci byla provedena právě na tomto organismu. Například byla na *D. melanogaster* zkoumána apikální extracelulární matrix, která pokrývá orgány jako je epidemis, vzdušnice či střevo. Extracelulární matrix má i několik dalších zásadních funkcí mezi které patří tvorba orgánů, hojení ran, buněčná signalizace, tvorba obranné bariéry před škůdci a v neposlední řadě vývoj a strukturální udržování organismů. Bylo zjištěno, že na tvorbě extracelulární matrix se podílí kutikulové proteiny a chitin, přičemž důležitou roli hrají i chitinázy. Ty totiž hydrolyzují chitinové polymery, a tím pomáhají reorganizovat chitin. Důležité se zdají být i proteiny IDGF, které zaujímají funkci strukturálních proteinů chránících skelet extracelulární matrix před chitinolytickou degradací. Z toho vyplývá také to, že chitinázy a proteiny IDGF hrají klíčovou roli při správném vývoji hmyzu, zejména při svlékání jednotlivých vývojových stádiích. Vyřazení genů pro tyto proteiny pomocí RNAi vedlo k časté letalitě jedinců kvůli deformaci kutikuly (Obrázek č. 5) či zeslabení ochrany před potencionálním poranění a infekcí (Pesch a spol., 2016).



Obrázek č. 5: Detail na rozdílnou strukturu kutikuly v závislosti na činnosti jednotlivých genů (Pesch a spol., 2016)

Na obrázku je patrné, že za normálního stavu (a) nemůže parazit *Pseudomonas entomophila* proniknout skrze správně vytvořenou kutikulu. Zatímco po vyřazení genu pro chitinázu (b) či pro *Idgf* (c) se kutikula stává snadno zdolatelnou pro patogeny. Obrázek

(d) vyjadřuje schématické znázornění funkce obou zkoumaných genů. Dolní obrázek (e) znázorňuje rozdíly ve struktuře kutikuly u divokého typu v porovnání s mutanty (Pesch a spol., 2016).

2.4.3.2 *Bombyx mori*

Dalším významným organismem, na kterém byl studován protein IDGF, je bourec morušový (*Bombyx mori*). IDGF u tohoto motýla se často označuje jako BmIDGF a bylo zjištěno, že k cílovým orgánům se tento růstový faktor dostává skrze hemolymfu. Shledána byla i závislost exprese *BmIdgf* na výživě larev. Jelikož je tento gen exprimován hlavně v tukovém tělese u larev, došlo k potlačení jeho exprese, pokud larvy hladověly (Wang a spol., 2009).

U *Bombyx mori* byl IDGF pozorován také v epidermis, v mozku a v reprodukčních orgánech u obou pohlaví. Podrobnějšímu zkoumání se tomuto proteinu dostalo teprve v nedávné době, kdy se po vyřazení jeho funkce doložila jeho důležitost v několika oblastech. U vzniklých mutantů bez exprimovaného genu *Idgf* byl pozorován defekt kutikuly a co více, i ztráta pigmentace u larev. Vyřazení genu *Idgf* korelovalo i s potlačením genů pro syntézu melaninu, čímž bylo dokázáno, že IDGF řídí tvorbu skvrn u larev *Bombyx mori*. Mimo hlavní směr zájmu bylo také zjištěno, že IDGF se výrazně podílí i v drahách fenylalaninu, beta-alaninu, purinu a tyrosinu (Gao a spol., 2020).

2.4.3.3 IDGF a imunita

Důkaz, že IDGF se podílí na imunitní reakci lze najít například na pokusu na *D. melanogaster* Zvláštní pozornosti se dostalo konkrétně proteinu IDGF3, který se ukázal jako nejdůležitější pro vrozenou imunitu. Mutanti, kteří neměli exprimovaný gen *Idgf3* byli velice zranitelní vůči napadení zástupcem skupiny nematoda. Expresní analýzou byla odhalena důležitá role IDGF3 v regeneračních procesech regulovaných signalizací Wingless (u much Wnt či Wg), Hedgehog a Jak/STAT. Stejná studie přinesla velice důležitý poznatek ohledně *Idgf3*, a to, že je tento gen zodpovědný za srážení hemolymfy a zacelování ran. Velikost sraženiny hemolymfy závisela na míře exprese *Idgf3*. Larvy *D. melanogaster*, které měly úplně utlumený gen *Idgf3*, nedokázaly vytvořit sraženinu hemolymfy. Avšak tato schopnost se jim plně vrátila i po exprimování *Idgf3* v hemocytech. Tímto bylo také dokázáno, že se růstové faktory neexprimují pouze v tukovém tělese. Po vizualizaci IDGF3 pomocí označení GFP byl zachycen viditelný důkaz, že sraženina obsahuje právě IDGF3. A co více, tento transkripční

faktor byl pozorován i přímo v místě zranění, což dokládá o tom, že tento protein napomáhá při hojení ran po infekci háďátky (Kučerová a spol., 2016).

Pozdější studie podobného charakteru byla provedena i o pár let později. Výzkum spočíval v tom, že jedinci *D. melanogaster* byly infikovány háďátkem *S. carpocapsae* a sledovala se jejich imunitní odpověď. Zjistilo se, že po infekci se zvýšila exprese genů *Idgf2* a *Idgf3* u larev. Zajímavé bylo odhalení, že tyto geny neovlivňují činnost stejných metabolických drah, ale naopak se jejich vliv trochu různí. Z toho důvodu je důležitá činnost obou genů v imunitní reakci proti infekci jedinců skupiny nematoda (Yadav, Eleftherianos, 2018).

Co se týče genu *Idgf2* u *D. melanogaster*, bylo zjištěno, že je součástí imunitní odpovědi a také imunitní odpověď částečně reaguje. Výzkum V. Brož a spol. (2017) mimo jiné popsal indukci IDGF2 při infekčním a neinfekčním zranění larev *D. melanogaster* po 6 hodinách. Výsledky ukázaly, že IDGF2 se skutečně podílí na imunitní reakci po zranění. Dále se zjistilo, že tento protein indukuje expresi řady genů související s obranyschopností. Protein IDGF2 se sám podílí spíše na hojení ran, jelikož jeho exprese byla větší po neinfekčním poranění.

Souvislost IDGF s imunitní reakcí nebyla zkoumána jen na *D. melanogaster*. Byly provedeny výzkumy parazitace na motýlu *Pieris rapae*, které nepotvrdily účast IDGF při imunitní reakci. Larvy tohoto motýla byly napadeny blanokřídlým parazitoidem *Cotesia rubecula*, a poté byly analyzovány výsledky. Očekávalo se zvýšení hladiny IDGF po napadení parazitoidem, avšak výsledky neukázaly žádnou změnu oproti stavu bez parazitace (Asgari, Schmidt, 2004). Obdobný pokus na *Pieris rapae* byl proveden i později, kde byl použit blanokřídlý endoparasitoid *Pteromalus puparum*. Ani zde se však hladina IDGF po parazitaci nijak nezměnila (Zhu a spol., 2011).

Kromě již zmíněných funkcí IDGF byly všechny doposud známé vlivy tohoto proteinu shrnuty (Tabulka č. 1) v nedávné studii (Žurovcová a spol., 2019).

Tabulka č. 1: Tabulka znázorňující známé funkce IDGF u *D. melanogaster* a dalších druhů hmyzu (Žurovcová a spol., 2019), upraveno.

Druh	Efekt
Nilparvata lugens	*NiIdgf* utlumení nemá efekt na morfologii a přežívání
Phenacoccus solenopsis	*PsIdgf* utlumení nemá efekt na morfologii a přežívání
Bombyx mori	BmIDGF odpovídá na živné podmínky
Bombyx mori	BmIDGF je indukován apoptózou nebo ekdyzonem
Pieris rapae	IDGF není ovlivněn parazitací ani infekcí polyDNA viry
Mamestra brassicae	MbIDGF podporuje růst dvou motýlích buněčných linií
Manduca sexta	za přítomnosti HAIP (Hemocyte aggregation inhibitor protein) buňky v kultuře neformují agegáty
Tribolium castaneum	*TcIdgf4* je zapojen do procesů svlékání
Tribolium castaneum	*TcIdgf2* utlumení nemá fenotypický efekt
Anopheles gambiae	AgBR1 a 2 mají imunitní odpověď na bakterie
Aedes aegypti	AgBR1 ovlivňuje imunitní odpověď savčího hostitele
Bactrocera dorsalis	*Idgf4* utlumení snižuje přežívání larev při vyšších teplotách
Drosophila melanogaster	Idgf6 utlumení způsobuje několik kutikulárních defektů
Drosophila melanogaster	IDGF1, 3, 5 a 6 jsou potřebné pro formování extracelulární matrix
Drosophila melanogaster	IDGF2 je indukován zraněním, podporuje růst bakteriálních kultur Cl.8 in vitro
Drosophila melanogaster	IDGF3 je potřebný při srážení hemolymfy
Drosophila melanogaster	IDGF1 a 3 jsou zapojené do odpovědi na infekční zranění

2.4.4 Evoluce

Evoluční studie zaměřená na IDGF odhalila, že tyto specifické proteiny se u hmyzu vyvinuly ze společného předka předcházející rozdělení skupin Polyneoptera, Condylognatha a Holometabola. Původně byl jeden gen *Idgf* na jeden hmyzí druh, což u některých skupin zůstalo zachováno. Tímto příkladem jsou zástupci hemimetabolního hmyzu, z holometabolního jen skupiny Hymenoptera, Lepidoptera a někteří primitivní zástupci řádu Diptera. Později se u některých skupin pozitivním selekčním tlakem tento gen duplikoval. Například u Coleoptera došlo k duplikaci pouze jednou (geny *Idgf2*, *Idgf4*), zatímco u odvozených Diptera k duplikaci došlo hned několikrát. Ovšem jedná se o nezávislé duplikace. Dnes známe šest kopií *Idgf* u *D. melanogaster*. Studie odhalila pozitivní selekční změny hlavně na proteinech IDGF1 a IDGF4 u *D. melanogaster*. Výsledkem pozitivního selekčního tlaku na IDGF byla duplikace genu, která vedla k zisku nových funkcí tohoto proteinu. Naopak IDGF u Lepidoptera vykázal více než 80 % míst negativní selekce, proto u této skupiny k duplikaci nedošlo. Co se týče skladby exonů, u Diptera najdeme pouze dva až tři exony v každém genu, zatímco Lepidoptera mají exonů nejvíce, a to až devět v jedné kopii. Dále Coleoptera mají 5 až 8 exonů. Často bývají nejkonzervovanější první dva exony a zbylé se různí (Žurovcová a spol., 2019).

3 CÍLE PRÁCE

1) Ověření úlohy proteinů IDGF při imunitní reakci na hlístovkovou infekci u *Harmonia axyridis*

2) Amplifikovat a následně osekvenovat kódující sekvenci pro proteiny IDGF u různých druhů slunéčkovitých

3) Porovnat genovou evoluci s evolucí druhů a provést základní fylogenetickou analýzu

4 METODIKA

4.1 Seznam druhů použitých při výzkumu

Při výzkumu, zda je *Idgf* součástí imunitní reakce po hlístovkové infekci byly použity následující organismy:

Harmonia axyridis

Steinernema carpocapsae 1343

Steinernema feltiae Jakub

Od pracovníků ČZU v Praze byla získána DNA celkem 20 druhů sluněček. Dále byly pro porovnatelnější výsledky přidány čtyři druhy získané rovněž od pracovníků ČZU. Seznam všech druhů byl následně sepsán do tabulky (Tabulka č. 2) s přehledem jejich umístění v systému. Pro snazší manipulaci se vzorky i s výsledky byla všem druhům přiřazena čísla.

Tabulka č. 2: Seznam všech použitých druhů opatřených číslem a zařazených do užšího systému čeledi slunéčkovití. *Ceratomegilla* je starší označení pro dané druhy rod *Hippodamia*, proto je starší označení uvedeno v závorce

Číslo	Druh	Zařazení (podčeleď - Tribus)
1.	*Harmonia quadripunctata*	Coccinellinae - Coccinellini
2.	*Hippodamia variegata*	Coccinellinae - Coccinellini
3.	*Tytthaspis sedecimpunctata*	Coccinellinae - Tytthaspidini
4.	*Psyllobora vigintiduopunctata*	Coccinellinae - Halyziini
5.	*Chilocorus bipustulatus*	Chilocorinae - Chilocorini
6.	*Subcoccinella vigintiquatuorpunctata*	Epilachninae - Epilachnini
7.	*Coccinula quatuordecimpustulata*	Coccinellinae - Coccinellini
8.	*Exochomus quadripustulatus*	Chilocorinae - Chilocorini
9.	*Coleomegilla maculata*	Coccinellinae - Coccinellini
10.	*Calvia quatuordecimguttata*	Coccinellinae - Coccinellini
11.	*Propylea quatuordecimpunctata*	Coccinellinae - Coccinellini
12.	*Anatis ocellata*	Coccinellinae - Coccinellini
13.	*Hippodamia convergens*	Coccinellinae - Coccinellini
14.	*Hippodamia (Ceratomegilla) notata*	Coccinellinae - Coccinellini
15.	*Sospita vigintiguttata*	Coccinellinae - Coccinellini
16.	*Coccinella quinquepunctata*	Coccinellinae - Coccinellini
17.	*Cynegetis impuctata*	Coccinellinae - Cynegetini
18.	*Hippodamia (Ceratomegilla) undecimnotata*	Coccinellinae - Coccinellini
19.	*Coccinella magnifica*	Coccinellinae - Coccinellini
20.	*Myrrha octodecimguttata*	Coccinellinae - Coccinellini
21.	*Adalia bipunctata*	Coccinellinae - Coccinellini
22.	*Adalia decempunctata*	Coccinellinae - Coccinellini
23.	*Calvia decemguttata*	Coccinellinae - Coccinellini
24.	*Halyzia sedecimguttata*	Coccinellinae - Halyziini

4.2 Navržení primerů

4.2.1 Pro expresní analýzu *Idgf*

Pro Real-Time kvantitativní PCR byly navrženy primery o stejné „annealing“ teplotě 60 °C (Tabulka č. 3). Jako referenční geny byly použity ribozomální proteiny L18 a S4. Dále byl použit gen ARF1. Byly zvoleny právě tyto geny, jelikož se osvědčily dříve jako referenční geny při qPCR na mandelince bramborové (Shi a spol., 2013).

Tabulka č. 3: Přehled primerů navržených pro RT-qPCR

Primer	Sekvence (5´-3´)
L18Fw	ACTGTGGTCAAAATAGTTCCCTCT
L18Rev	GGTTCGGTCCTTCGAACCTT
ARF1Fw	GTTGGTTTGGATGCTGCTGG
ARF1Rev	AGGCCCTGTGTGTTTTGGAA
S4Fw	AGGAATTTGGGACGTGTTGGT
S4Rev	CCTGGTGGCGAAGGTATGAC
Idgf2Fw	GCCTTGGTGAGGGAACTGAA
Idgf2Rev	CAGGATTACGCTCAGGGGTG
Idgf4Fw	TGTTGGAGGAGGAAAAGACGG
Idgf2Rev	CCCAACTGAGATCCAAGCCA

4.2.2 Pro evoluci *Idgf*

Laboratorní část práce byla zahájena navržením degenerovaných primerů pro jednotlivé exony genu *Idgf2* a *Idgf4* (Tabulka č. 4 a 5). Z čeledi Coccinellidae byly nalezeny celogenomové sekvence pouze čtyř druhů, podle kterých byly primery navrženy (Příloha č. 2). Porovnáním celogenomové sekvence s kódující sekvencí byly nalezeny jednotlivé exony genu. U slunéčkovitých brouků bylo pozorováno 7 nebo 6 exonů z každé kopie *Idgf*. Jelikož první exon u dvou ze čtyř druhů nemá známou sekvenci, nebyl použit do výzkumu. Všechna použitá evidenční čísla sekvencí jsou předložena v příloze (Příloha č. 1).

Tabulka č. 4 a 4: Přehled navržených degenerovaných primerů pro jednotlivé exony genů *Idgf2* a *Idgf4*

Idgf2	
Primer	Sekvence (5´-3´)
2ExFw	CARGCDAARTTYACHCTTG
2ExIRev	CTCACCAARTCYCTRTAYTG
3ExFw	TCHKCMGCHCTYCGWACAAC
3ExRev	ACCWATYTTYGAWCGRATYTT
4ExFw	HTTCTTCCAYARHWTRAAAAC
5ExIRev	TACCARTAATTDACTTGRAAATC
6ExIFw	AGGACWAGAAAYGGHGCKCC
6ExFw (2)	ATYGTVCTDGGMRTHCCMAC
6ExIFw (3)	CMACHTTYGSAAGARCTTGG
6ExIRev	CTCTYCTKMKRCTRGTRTC
7ExFw	RGGYDYHTGGATYTCCT
7ExRev	AAKWGGRTAYYTYTCRTAWGAACA
7ExTRARev	TTYAGTADGGDYTMGYYAA

Idgf4	
Primer	Sekvence (5´-3´)
2ExFw	CAGGYCAAGGAAARTTYGA
2ExRev	TYBARATATTTVKCVACTTTTCT
3ExFw	YTVGAATCDBCDGAYAAWCG
3ExRev	TTTCCDCGDWTWWYYTTYGGTTT
4ExIFwHC	TAGGYGGATGGTTCAAYA
4ExIFwO	TGGTTGGTTCAAYWMAYTGAA
4ExRev	ACATTTGGMARBAYWGAYAATG
5ExFw	YAGTHTAYTWYGAYCCHACAAT
5ExIRev	ACCARWATCTRACTTGATARTCDGC
6ExIFw	CAYGGHACWCCWARAAACAA
6ExIRev	CTTACCGTGTCKRCCAGT
7ExIFw	TTTCAGGDGTCTWBGCYTA
7ExRev	AAYTTRAGTCTTGCKGCTCT

Pro ověření kvality DNA izolovaných brouků byly použity „obecné“ primery (Tabulka č. 6) navržené pro bezobratlé Folmerem a spol. (1994). Primery byly navrženy ve velice konzervovaném úseku kódujícím cytochrom oxidázu I napříč celou skupinou bezobratlých.

Tabulka č. 5: Sekvence „obecných“ primerů podle Folmer a spol. (1994)

Primer	Sekvence (5´-3´)
LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

Později bylo potřeba navrhnout specifické primery přímo na slunéčka (Tabulka č. 7). Ty byly navržené v sekvenci kódující cytochrom oxidázu I.

Tabulka č. 6: Sekvence primerů navržených v úseku pro Cytochrom oxidázu I

Primer	Sekvence (5´-3´)
HA1145Fw	CWDTAAATTTGCAATTTAHWATCA
HA1987Rev	GGDARAATTARAATRTAWACTTC

Pro sekvenování úseku zaklonovaného do plazmidu byly použity primery doporučené v protokolu pro Qiagen PCR Cloning kit (Tabulka č. 8).

Tabulka č. 7: Sekvence primerů pro plazmidovou DNA na základě doporučení v protokolu PCR Cloning kitu (Qiagen)

Primer	Sekvence (5´-3´)
M13Fw (-20)	GTAAAACGACGGCCAGT
M13Rev	GAAAACAGCTATGACCATG

4.3 Infekce *Harmonia axyridis* hlístovkami

Byla provedena infekce sluněček *Harmonia axyridis* zástupci skupiny nematoda, konkrétně druhy *Steinernema carpocapsae* a *Steinernema feltiae*. Slunéčka byla využita z přírodních zdrojů, nejednalo se tedy o organismy z chovu. Každé slunéčko bylo umístěno ve své 1,5 ml mikrozkumavce s dírkou ve víčku. U každého jedince byl filtrační papír navlhčený 50 µl vody. Na tento navlhčený papír byly dále přidány infekční larvy hlístovek o výsledné koncentraci 250 infekčních larev na jednotlivce. Zároveň byli vytvořeni brouci kontrolní inkubovaní při teplotě 25 °C jako ostatní vzorky. Ke kontrolním vzorkům nebyly přidány hlístovky, v mikrozkumavce byly pouze s navlhčeným filtračním papírem. Jednotliví brouci byli sbíráni živí ve třech časových intervalech po infekci, a to po 6, 24 a 48 hodinách. Kontrolní brouci byli sebrány po 48 hodinách. Všechny exempláře byly pro další využití umisťovány do teploty -80 °C. Pro změření míry exprese genů *Idgf* byly následně použity metody: izolace RNA, reverzní transkripce a kvantitativní PCR, které jsou podrobněji popsané níže. Pro tento výzkum byly provedeny čtyři izolace brouků jednotlivých typů vzorků, přičemž z každého vyizolovaného exempláře byly provedeny tři repetice stejné reakce RT qPCR.

4.4 Izolace RNA

Izolace totální RNA byla izolována z organismů zamražených v teplotě -80 °C pomocí protokolu pro TRIzol Reagent (ThermoFisher). Tato metoda byla provedena v rukavicích s pomůckami výhradně určenými pro práci s RNA s použitím špiček s filtrem. Kroky od homogenizace buněk až po precipitaci RNA včetně byly provedeny v digestoři. Co se týče centrifugace, probíhala v Centrifuze 5424 R (Eppendorf) či v Centrifuze 5415 R (Eppendorf).

Homogenizace buněk

Hluboce mražený organismus byl se 100 µl Trizolu homogenizován tloučkem v 1,5 µl mikrozkumavce. Poté bylo ke vzorku napipetováno 900 µl Trizolu, což bylo poté promícháno na vortexu (FVL-2400N Combi-Spin, Biosan). Dále byl vzorek inkubován 10 minut v pokojové teplotě.

Homogenizace byla provedena i způsobem pomocí tekutého dusíku, a to tak, že do vysterilizovaných třecích misek s tloučkem bylo nalito trochu tekutého dusíku. Po zchlazení misky dusíkem byl přidán organismus a 400 µl Trizolu. Pomocí tekutého dusíku bylo vše zhomogenizováno, a poté bylo vše přesunuto do mikrozkumavky. Následně bylo přidáno 600 µl Trizolu a po promíchání byl vzorek inkubován 10 minut za pokojové teploty.

Fázová separace

Ke vzorku bylo přidáno 200 µl choroformu. Následně byla mikrozkumavka silně protřepána a inkubována 3 minuty za pokojové teploty. Poté byl vzorek centrifugován na 12 000 g při teplotě 4 °C na 15 minut.

Precipitace RNA

Ze vzorku rozděleného na tři fáze (organickou fázi dole, interfázi uprostřed a vodní fázi nahoře) byla odebrána vodní fáze. Do nové mikrozkumavky s odebranou vodní fází bylo přidáno 0,5 ml isopropanolu. Následně byla mikrozkumavka protřepána, inkubována 10 minut při teplotě 4 °C a dále centrifugována při teplotě 4 °C a 12 000 g po dobu 10 minut.

Promytí RNA

Tekutina vzorku byla odebrána tak, aby v mikrozkumavce zbyl jen usazený sediment na dně. K získanému sedimentu byl přidán 1 ml 75% etanolu a dále byl vzorek krátce zamíchán. Tento vzorek byl centrifugován při teplotě 4 °C na 7 500 g po dobu 5 minut.

Rozpuštění RNA

Všechna tekutina vzorku byla znovu odebrána tak, aby byl získán usazený sediment. Ten byl dál sušen v otevřené mikrozkumavce (ne déle než 10 minut). Dále bylo přidáno 100 µl DEPC vody a vše bylo promícháno.

Ošetření RNA pomocí kitu „NuCleo spin RNA“ (Macherey-Nagel)

Do mikrozkumavky s roztokem RNA se 100 µl vzorku bylo přidáno 600 µl předem připravené směsi (300 µl pufru RA1 + 300 µl 100% etanolu). Výsledná tekutina byla přesunuta do přiložené mikrozkumavky se silikonovou membránou (NucleoSpin RNA Column). Vzorek byl dále centrifugován 30 sekund při 11 000 g za pokojové teploty. Po stočení byla mikrozkumavka dána do nové sběrné zkumavky. Pro odstranění soli ze silikonové membrány bylo následně přidáno 350 µl pufru MDB a dále byl vzorek centrifugován 1 minutu při 11 000 g za pokojové teploty. Sběrná zkumavka byla vyprázdněna a vrácena zpět. Dále byla připravena směs složená z 10 µl rDNázy a 90 µl reakčního pufru pro rDNázu. Z připravené směsi bylo ke vzorku napipetováno 95 µl tekutiny. Následně byl vzorek inkubován 15 minut v pokojové teplotě. K inaktivaci rDNázy bylo přidáno 200 µl pufru RAW2, a poté byl vzorek centrifugován 30 sekund při 11 000 g za pokojové teploty. Po stočení byla mikrozkumavka dána do nové sběrné zkumavky. K promytí vzorku bylo nejdříve použito 600 µl pufru RA3. Po centrifugaci na 30 sekund při 11 000 g za pokojové teploty byla opět dána nová sběrná zkumavka. K dalšímu promytí vzorku bylo napipetováno 250 µl pufru RA3. Následně byl vzorek důkladně centrifugován 2 minuty při 11 000 g za pokojové teploty. Vzorek byl umístěn do sterilní 1,5ml mikrozkumavky. Na závěr bylo

napipetováno 40 µl sterilní vody bez obsahu RNA, což bylo ponecháno inkubovat 1 minutu za pokojové teploty. Dále byl vzorek centrifugován 1 minutu při 11 000 g za pokojové teploty. Pro větší výtěžek byla výsledná tekutina napipetována zpět do mikrozkumavky se silikonovou membránou. Vzorek byl znovu inkubován a centrifugován. Výsledný výtěžek byl ověřen spektrofotometrem „NanoDrop 2000“ (Thermo Scietific) při 260 nm. Poté byl uchován při teplotě -80 °C.

4.5 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce byla následně vykonána podle protokolu: RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific). Ze zjištěné koncentrace RNA ve vzorkách bylo vypočteno množství potřebné templátové RNA k reverzní transkripci o hodnotě 1000 ng/µl. K danému množství RNA byl přidán 1 µl oligo $(dT)_{18}$ primer. Výsledný objem reakce 12 µl byl lehce promíchán a stočen na stolní centrifuze. Po inkubování reakce při teplotě 65 °C po dobu 5 minut v termocykleru Gene Pro Thermal Cycler (BIOER) byly vzorky dány na led a stočeny v stolní centrifuze. Ke vzorku byly dále přidány složky o výsledné koncentraci: 1× reakční pufr, 1 U/µl „RiboLock RNase Inhibitor“, 1 mM dNTP, 10 U/µl „RevertAid H Minus M-MulV 3´ Transcriptase“. Reakce o celkovém objemu 20 µl byla lehce promíchána, stočena na stolní centrifuze a dále inkubována při teplotě 42 °C na dobu 60 minut a dále při teplotě 70 °C po dobu 5 minut. Výsledná reakce byla uložena v teplotě -20 °C.

4.6 Kvantitativní PCR

Pro tuto metodu byly použity sterilní špičky s filtrem a automatické pipety pro co nejpřesnější výsledky. Reakce byla namíchána ze složek následující koncentrace v 20µl reakci: 1× „SolisBiodyne“ Mix, 5´ a 3´ primer 0,25 µM, templát v podobě 5 µl ddH_2O jako beztemplátová kontrola, nebo výtěžek z reverzní transkripce 25× ředěný. Reakce byla promíchána a stočena na stolní centrifuze. Následně byla reakce dána do termocykleru Rotor-Gene Q (QIAGEN) na program:

Predenaturace (Inicializace Hs Taq): 95 °C na 15 minut

Denaturace: 95 °C na 15 sekund
„Annealing“: 60 °C (nastavena podle primerů) na 30 sekund } 45 cyklů
Elongace: 72 °C na 20 sekund

Výsledek dat byl analyzován dále (kapitola 4.16).

4.7 Izolace DNA

4.7.1 Rychlá izolace z malého vzorku (Single Fly Genomic DNA Prep)

Protokol použit od G. Dietzl (2002). Nejdříve bylo namícháno 100 µl izolačního (Squishing) pufru podle rozpisu. Koncentrace jednotlivých složek byla následující: 10 mM Tris–HCl pH=8; 1 mM EDTA pH=8; 25 mM NaCl a 200 g/ml Proteinázy K (Geneaid). Následně byl roztok promíchán a stočen v stolní centrifuze. Ze vzniklého roztoku bylo odpipetováno pístovou pipetou 50 µl izolačního (Squishing) pufru do 1,5 µl mikrozkumavky, a poté byl přidán vzorek daného organismu. Tkáně organismu byly zhomogenizovány ručním tloučkem. Dále byl vzorek inkubován při teplotě 37 °C v termobloku (Elite EL-02) po dobu 30 minut a pro inaktivaci Proteinázy K byl vzorek zahřát při teplotě 95 °C po dobu 3 minut. Poté byl vzorek stočen centrifugou po dobu 5 minut při teplotě 4 °C na 16 100 g. Tekutina vzorku bez pevných částic byla odpipetována do sterilní mikrozkumavky a vzorek byl uchován při teplotě 4 °C.

4.7.2 Purifikace DNA pomocí standartního kitu

Byl použit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). K izolaci byly použity vzorky uchované v teplotě -80 °C nebo uchované ve 100% etanolu. Vzorky z etanolu byly nejdříve usušeny, poté dvakrát promyty pufrem 1×PBS, než bylo pokračováno dále. K organismu v mikrozkumavce bylo přidáno 180 µl pufru ATL a následně byl vzorek ručním tloučkem zhomogenizován. Následně bylo přidáno 20 µl Protenázy K. Po zamíchání byl vzorek dán do vodní lázně o teplotě 56 °C na 6–8 hodin. Poté bylo přidáno 4 µl RNázy A (100 mg/ml), a po smíchání byl vzorek inkubován 2 minuty za pokojové teploty. Po inkubaci byl obsah promíchán 15 sekund. Byla připravena směs obsahující 200 µl pufru AL a 200 µl etanolu (96 až 100%). Z připravené směsi bylo napipetováno 400 µl do daného vzorku a následovalo promíchání. Dále byl veškerý obsah vzorku přemístěn do přiložené mikrozkumavky se silikonovou membránou (DNeasy Mini spin Column) a stočen na centrifuze při 6 000 g po dobu 1 minuty za pokojové teploty. Po centrifugaci byla použita nová sběrná zkumavka. Bylo přidáno 500 µl pufru AW1a dále byl vzorek centrifugován při 6 000 g po 1 minutu za pokojové teploty. Následně byla opět vzata nová sběrná zkumavka. Po přidání 500 µl pufru AW2 se vzorek centrifugoval při 20 000 g 3 minuty za pokojové teploty. Dále byla mikrozkumavka se silikonovou membránou vložena do 1,5ml mikrozkumavky. Následně bylo napipetováno 150 µl pufru AE. Tento vzorek byl ponechán inkubovat 1 minutu v pokojové teplotě a následně byl centrifugován při 6 000 g po dobu 1 minuty za pokojové teploty.

Pro maximální výtěžek DNA byl poslední krok zopakován. Následný zisk 150 µl ve dvou mikrozkumavkách byl smíchán. Výsledek byl ověřen spektrofotometrem „NanoDrop 2000“ (Thermo Scietific) při 260 nm. Následně byl tento výsledek uložen při teplotě -80 °C a část při 4 °C pro pozdější použití.

4.8 PCR

4.8.1 PCR s Dream Taq polymerázou

Potřebné chemikálie pro polymerázovou řetězovou reakci byly nejdříve rozmraženy, lehce promíchány a stočeny ve stolní centrifuze. Reakce byla namíchána z jednotlivých složek s následující koncentrací v 10 µl vzorku: 1× DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific), 0,5 až 1 µM 5´/3´ primer. Ve vzorku byl také přidán 1 µl templátové DNA. Poté byl vzorek promíchán, stočen ve stolní centrifuze a dán do termocykleru Gene Pro Thermal Cycler (BIOER). Pro zjištění případné kontaminutace byl u každé reakce namíchán kontrolní vzorek, kde byla přidána sterilizovaná destilovaná voda namísto templátové DNA.

Program PCR pro termocykler byl následující:

Předenaturace: 95 °C na 3 minuty

Denaturace: 95 °C na 30 sekund
„Annealing“: teplota podle primerů na 30 sekund
Elongace: 72 °C na 1 minutu pro vzorky menší než 1 000bp
} 35 cyklů

Postelongace: 72 °C na 5 minut

Uchování vzorků: 16 °C

Po PCR byly výsledné vzorky ověřeny na elektroforéze a pro případné další použití byly uchovány při 4 °C.

4.8.2 PCR s TaKaRa Ex Taq polymerázou

Potřebné chemikálie na polymerázovou řetězovou reakci byly rozmraženy, lehce promíchány a stočeny ve stolní centrifuze. Reakce byla namíchána ze složek o koncentraci 1× pufru Ex Taq, 0,2 mM dNTP Mix, 0,8 µM 5´/3´ primeru, 0,025 U/µl enzymu (TaKaRa Ex Taq). K připravené směsi byl přidán 1 µl templátové DNA. Pro zjištění případné kontaminace byl u každé reakce namíchán kontrolní vzorek přidáním ddH_2O namísto templátové DNA. Vzorek byl promíchán, stočen na stolní centrifuze a vložen do termocykleru Gene Pro Thermal Cycler (BIOER).

Program PCR pro termocykler:

Denaturace: 94 °C na 30 sekund

„Annealing“: teplota podle primerů na 30 sekund

Elongace: 72 °C na 1 minutu pro vzorky menší než 1 000bp

} 35 cyklů

Postelongace: 72 °C na 5 minut

Uchování vzorků: 16 °C

Vzniklý výsledek byl ověřen elektroforézou a dále uchován při 4 °C pro případné pozdější využití.

4.9 Elektroforéza

Pro gelovou elektroforézu byl připraven 1,5% agarózový gel rozpuštěním potřebného množství agarózy (Lonza) v daném objemu 1x TAE pufru. TAE pufr byl složen ze složek o výsledné koncentraci 0,04M Tris, 0,01M EDTA a 0,02M kyseliny octové. Množství pufru se odvíjelo od velikosti elektroforetické vaničky. Agaróza byla rozpuštěna zahřátím tekutiny v mikrovlnné troubě za občasného míchání. Poté byla tekutina zchlazena na 50–60 °C a do ní byl přimíchán ethidium bromid v určitém poměru (ke 100 ml gelu přimíchány 3 µl ethidium bromidu). Výsledná tekutina byla nalita do připraveného rámečku s hřebenem a 15 až 20 minut byla ponechána tuhnout na vodorovné podložce. Po ztuhnutí gelu a opatrném odejmutí hřebenu byl agarózový gel dán do vaničky na horizontální elektroforézu. Gel byl ponořen do 1x TAE pufru tak, aby hladina pufru byla asi 5 mm nad gelem. Poté byly do jamek gelu aplikovány vzorky. Před aplikací na gel byly vzorky obarveny kapkovou metodou: na parafilm byly naneseny kapičky nanášecího pufru, které byly promíchány s určitým množství vzorku. Množství „Loading Dye“ a množství vzorku se odvíjelo od koncentrace nanášecího pufru (6× TriTrack Loading Dye od Thermo Scientific nebo Gel Loading Dye Purple (6×) od New England BioLabs). Například pro 6× nanášecího pufru: 1 µl nanášecího pufru + 5 µl PCR produktu. K určení velikosti fragmentů DNA byl do jedné jamky dán velikostní standart „GeneRuler“ 100 bp (Thermo Scientific). Po nanesení vzorků byly k elektroforetické vaničce připojeny kabely s elektrickým napětím se zdrojem (PowerPac Basic Power Supply BIO RAD). Míra napětí se odvíjela od velikosti dané elektroforetické vaničky (5–8 V na 1 cm délky). Výsledek elektroforézy byl ověřen pomocí UV světla v transiluminátoru SMART5 (VWR).

4.10 Přečištění PCR produktů pomocí ExoSAP

Metoda proběhla podle protokolu Werle a spol., 1994. K přečištění PCR produktu byla namíchána reakce s koncentrací složek 0,154 U/µl Shrimp Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific), 1,538 U/µl Exonuclease I (Thermo Scientific) s 5 µl PCR produktu. Tato reakce byla následně promíchána a stočena na stolní centrifuze. Vzorky byly následně dány do termocykleru (BIOER) s použitím programu:

37 °C na 15 minut
85 °C na 15 minut
16 °C pro uchování vzorků

Výsledek byl přímo použit do sekvenační reakce nebo uchován při 4 °C.

4.11 Sekvenování

Reakční směs pro sekvenování byla připravena s následující koncentrací složek 5 µM 5′/3′ primeru a 20–80 ng/µl přečištěného PCR produktu. Takto připravená reakce byla po promíchání a stočení na stolní centrifuze odeslána na sekvenování, které provedla firma Biogen Sangerovou metodou.

4.12 Izolace DNA fragmentu z agarózového gelu

Metoda byla vykonána podle postupu v protokolu MinutElute Gel Extraction Kit (QIAGEN). Všechny centrifugační kroky byly provedeny při 10 000 g za pokojové teploty. Nejdříve byl zvážen daný agarózový gel. Ke gelu byl přidán pufr QG o objemu trojnásobku objem gelu (ke 100 mg gelu by bylo přidáno 300 µl pufru). Pro rozpuštění gelu byl vzorek inkubován při 50 °C po dobu 10 minut. V průběhu inkubace byl vzorek několikrát promíchán. Následně byl přidán isopropanol o stejném objemu jako byl objemu gelu. Po promíchání otočením dnem vzhůru byl obsah přemístěn do mikrozkumavky se silikonovou membránou (MinElute column), a poté byl centrifugován 1 minutu. Sběrná zkumavka byla vyprázdněna a vrácena zpět. Dále bylo přidáno 500 µl pufru QG s následným centrifugováním po dobu 1 minutu. Sběrná zkumavka byla opět vyprázdněna a vrácena zpět. Na promytí bylo přidáno 750 µl pufru PE. Po inkubaci po dobu 5 min byl vzorek centrifugován 1 minutu. Sběrná zkumavka byla do třetice vyprázdněna a vrácena zpět. Pro důkladné odstranění tekutiny bylo znovu centrifugováno 1 minutu. Mikrozkumavka se silikonovou membránou byla poté umístěna do 1,5 ml mikrozkumavky. Následně bylo napipetováno 10 µl pufru EB těsně nad střed silikonové membrány. Vzorek byl ponechán stát 1 minutu, a poté byl centrifugován 1 minutu. Pro větší zisk byla výsledná tekutina napipetována zpět do mikrozkumavky se silikonovou

membránou. Vzorek byl znovu inkubován a centrifugován. Výsledný výtěžek byl ověřen spektrofotometrem „NanoDrop 2000“ (Thermo Scietific) při 260 nm. Výtěžky byly uloženy při teplotě 4 °C.

4.13 Klonování PCR produktu do bakteriálního plazmidu

4.13.1 Příprava média

Pro růst bakterií bylo připraveno Tuhé LB médium s Ampicilinem do plastových Petriho misek se složkami o následující koncentraci 1% Trypton, 0,5% Yeast extract, 1% NaCl a 1,5% Agar. Chemikálie byly podle rozpisu naváženy a rozpuštěny v deionizované vodě. Po upravení pH na pH = 7,0 byl roztok přelit do odměrného válce a doplněn po požadovanou rysku. Poté bylo médium sterilizováno při teplotě 121 °C po dobu 20 minut. Po ochlazení média na 55 °C byl přidán ampicilin o výsledné koncentraci ve vzorku 0,1 mg/ml. Následně bylo médium nalito do Petriho misek. Po ztuhnutí média byly misky skladovány při teplotě 4 °C dnem vzhůru pro pozdější použití v nejbližších dnech.

Tekuté LB médium bylo připraveno shodným způsobem jako tuhé LB médiu, pouze do roztoku nebyl přimíchán agar. Po sterilizaci média bylo dále uchováno zavřené v pokojové teplotě.

4.13.2 Ligace PCR produktu do bakteriálního plazmidu

Bylo postupováno dle protokolu PCR Cloning kitu (Qiagen). Před ligací se na spektrofotometru změřila koncentrace požadovaného PCR produktu ve vzorku a bylo vypočítáno množství vzorku pro použití na ligační reakci. Samotná reakce byla připravena s výslednou koncentrací složek: 5 ng/µl klonovacího vektoru, PCR produkt, 1× legačního směsi. Koncentrace PCR produktu se odvíjela od velikosti daného úseku, např. pro úsek 200 bp bylo použito mezi 13 a 26 ng PCR produktu. Po namíchání reakce do celkového objemu 10 µl byla inkubována při teplotě 4 °C po dobu 30 minut. Poté byl výsledek použit do transformace bakterií, nebo dále uchován v teplotě -20 °C.

4.13.3 Transformace bakterií *Escherichia coli*

Pro transformaci bylo použito 100 µl kompetentních buněk *Escherichia coli* TH5α ve 1,5 ml mikrozkumavce, do které bylo přidáno 5 µl z ligační reakce. Po opatrném promíchání kroužením byly vzorky ponechány 15 min na ledu. Poté byly vzorky dány na 45 sekund do vodní lázně o teplotě 42 °C a dále byly vzorky umístěné zpátky na led. Po přidání 0,5 ml

sterilního tekutého LB média byly vzorky míchány při teplotě 37 °C po dobu 45–50 min. Na misky s tuhým LB médiem bylo sterilně rozetřeno 50 µl X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galaktozid, 20 mg/ml od Carl Roth) a 10 µl IPTG (Izopropyl-thio-D-galaktozid, 100 mM od Fisher Scienntific). Následně bylo sterilně naneseno 200 µl transformovaných buněk *Escherichia coli* na připravené misky s médiem. Misky byly při teplotě 37 °C ponechány dnem vzhůru růst 15–18 hodin. Kolonie byly vybírány po dvoufázové selekci. To znamená, že mohly vyrůst jen ty kolonie, které přijaly plazmid a jsou proto rezistentní vůči antibiotiku na misce. Modré kolonie přijaly sice plazmid, ale není v něm požadovaný insert, zatímco bílé kolonie obsahují vložený insert. Bílé kolonie byly přeneseny na novou sterilní misku s tuhým LB médiem, a byly ponechány 15–18 hodin růst, a část jednotlivých kolonií byla přenesena do 10 µl sterilní vody. Vzorky kolonií přenesené do vody byly vloženy do teploty 98 °C po dobu 2 minut. Poté byly přeneseny na led a promíchány pro uvolnění DNA. Pro ověření, zda dané kolonie obsahovaly plazmid se žádaným insertem, byla použita metoda PCR (viz kapitola 4.6.1) se specifickými primery a následně elektroforéza (viz kapitola 4.10).

4.14 Izolace plazmidové DNA z *Escherichia coli*

Izolace byla provedena protokolem „NucleoSpin Plasmid“ (Macherey-Nagel). Před izolací byla do 3 ml tekutého LB média přenesena požadovaná kolonie *Escherichia coli* a ponechána růst 15–18 h při teplotě 37 °C. Celý vzniklý obsah byl postupně centrifugován na 11 000 g po dobu 30 sekund za pokojové teploty. Tekutina byla vždy odsáta, aby v mikrozkumavce zbyl pouze sediment. Pro lýzi buněk bylo k sedimentu přidáno 500 µl pufru A1. Po důkladném míchání bylo přidáno 500 µl pufru A2. Poté byl vzorek jemně promíchán obrácením dna vzhůru, a to s opakováním šestkrát až osmkrát. Následně byl vzorek inkubován 5 minut za pokojové teploty. Poté bylo přidáno 600 µl pufru A3, načež byl vzorek opět jemně promíchán obrácením dna vzhůru, dokud neztratil barvu. Pro očištění vzniklé tekutiny byl vzorek centrifugován při 11 000 g na 10 minut za pokojové teploty. Získaný supernatant byl přepipetován do mikrozkumavky se silikonovou membránou (NucleoSpin Plasmid Column) a následně centrifugován při 11 000 g na 1 minutu za pokojové teploty. Sběrná zkumavka byla vyprázdněna a vrácena zpět. Pro omytí silika membrány bylo přidáno 600 µl pufru A4. Dále byl vzorek centrifugován při 11 000 g na 1 minutu za pokojové teploty. Sběrná zkumavka byla vyprázdněna a vrácena zpět. Pro úplné odstranění nežádoucí tekutiny byl vzorek centrifugován při 11 000 g na 2 minuty za pokojové teploty. Na závěr byla mikrozkumavka se silikonovou membránou umístěna do 1,5ml mikrozkumavky. Poté bylo napipetováno 50 µl pufru AE.

Vzorek byl inkubován 2 minuty při teplotě 70 °C, a dále byl centrifugován při 11 000 g 1 minutu za pokojové teploty. Pro zvýšení kvality výsledku byla získaná tekutina napipetována zpět do mikrozkumavky se silikonovou membránou. Poté byl vzorek znovu inkubován a centrifugován. Výsledek byl ověřen spektrofotometrem při 260 nm a následně uložen při teplotě 4 °C.

4.15 Vytváření fylogenetických stromů

Po získání nukleotidových sekvencí byly sekvence zkontrolovány podle BLAST (Altschul a spol., 1990) zda se jedná o požadovaný úsek, a zda nepatří jinému druhu organismu. Poté byly sekvence uspořádány v programu Mega 6 (Tamura a spol., 2013). Pro transformaci do požadovaného formátu byl použit program BioEdit 7.2 (Hall, 1999). Následně byl tento formát použit k vytvoření fylogenetických stromů algoritmem PhyML 3.0 (Guindon a spol., 2010) maximum-likelihood metodou s použitím „aBayes branch support test“. Tato metoda byla použita proto, že porovnává pouze sekvence, které jsou pro dané místo dostupné. Tudíž pokud nějaký druh neměl osekvenovaný určitý exon, výsledek to nijak neovlivnilo. Pro jednotlivé stromy byl nalezen model s nejmenší hodnotou „Bayesian information criterion“ (BIC) a „Akaike information criterion“ (AIC) podle SMS, „smart model selection“ (Lefort a spol., 2017). Výsledné stromy byly zobrazeny v programu Mega 6.

Byly vytvořeny fylogenetické stromy shrnující všechny získané sekvence, pak také stromy zvlášť pro sekvence *Idgf2* a *Idgf4*. Vždy byly vytvořeny stromy podle nukleotidové a aminokyselinové sekvence. Pro lepší porozumění dosažených změn ve finálních stromech byly vytvořeny fylogenetické stromy pro každý exon zvlášť.

4.16 Změření exprese *Idgf* po hlístovkové infekci

Z dat získaných Real-Time kvantitativní PCR byla zkontrolována míra kvality vzorků podle variace vzorků a čistota reakce odečtená z negativní kontroly. Z výsledků byly použity hodnoty průměru Ct tří repetic daného vzorku. Pro každou hodnotu daného organismu byla vypočtena ΔCt pro určitý referenční gen a *Idgf2* nebo *Idgf4* podle následujícího vzorce:

$$\Delta Ct = \frac{2^{Ct\ referenčního\ genu}}{2^{Ct\ Idgf2\ nebo\ Idgf4}}$$

Jelikož se hodnoty u kontrolních organismů lišily, byla z dosažených hodnot vypočtena průměrná ΔCt, a to pro určitou kombinaci kontrolního genu a příslušného genu *Idgf*. Různost hodnot pro kontrolní vzorek nastala kvůli použití organismů z volné přírody. Mohli totiž

bojovat s nějakým poraněním nebo s nemocí z přírody, a tak ovlivnit výsledky. Pomocí vypočtené průměrné hodnoty ΔCt pro kontrolní vzorek byla vypočtena ΔΔCt podle následujícího vzorce:

$$\Delta\Delta Ct = \frac{\Delta Ct\ (x)}{\Delta Ct\ (C)}$$

ΔCt (x)……. hodnota pro ΔCt vypočtenou pro daný vzorek (C, Sc6, Sc24, Sc48…)

ΔCt (C)…… průměrná hodnota pro ΔCt vypočtenou na kontrolním organismu pro určitou kombinaci genů

ΔΔCt…… realativní míra exprese oproti kontrole

Ze získaných hodnot ΔΔCt byla statisticky vyhodnocena míra signifikance výsledků v programu R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

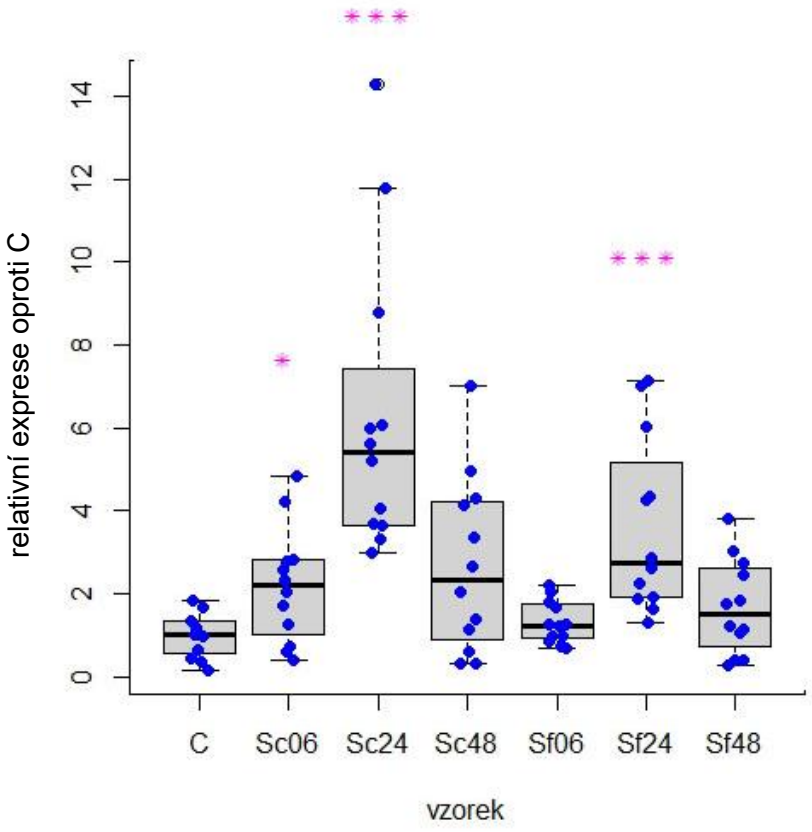
5 VÝSLEDKY

5.1 Exprese *Idqf* po hlístovkové infekci

Vypočtené hodnoty ΔΔCt (Příloha č. 3 a 4) byly použity do statistického vyhodnocení hodnot zvlášť pro *Idgf2* a pro *Idgf4*. Použitými hodnotami byly vypočtené výsledky pro všechny referenční geny určitého vzorku.

5.1.1 *Idgf2*

Z dříve vypočtených hodnot byla provedena statistická analýza. Nejdříve byla ověřena homogenita variancí Barlettovým testem. Po provedení Barlettova testu na homogenitu variancí vyšla hodnota testové statistiky 56,096 a hladina signifikance $2{,}783\times10^{-10}$ při šesti stupních volnosti. Z hodnoty hladiny signifikance vyvozujeme, že lze zamítnout nulovou hypotézu o homogenitě variancí všech skupin na 5% hladině významnosti. Při nesplnění předpokladu pro jednocestnou ANOVu byla použita neparametrická obdoba této operace, a to Kruskal-Wallisův test. Pro Kruskal-Wallisův test vyšla hodnota testové statistiky 37,73 a hladina signifikance $1{,}268\times10^{-6}$ při šesti stupních volnosti. Z výsledných hodnot lze usoudit, že lze zamítnout nulovou hypotézu, že infekce slunéček nemá vliv na míru exprese *Idgf2*. Pro zjištění signifikantních rozdílů mezi jednotlivými skupinami byl vypočten Wilcoxonův test. V porovnání s kontrolou se prokázaly být signifikantní vzorky Sc06 s 0,0205 hladinou signifikance, Sc24 s $7{,}4\times10^{-7}$ hladinou signifikance a Sf24 s $1{,}4\times10^{-5}$ hladinou signifikance. Nutno dodat, že vzorek Sc48 se neprokázal signifikantní velice těsně. Jeho hladina signifikance byla 0,0519. Výsledky byly zobrazeny také do následujícího grafu (Obrázek č. 6).



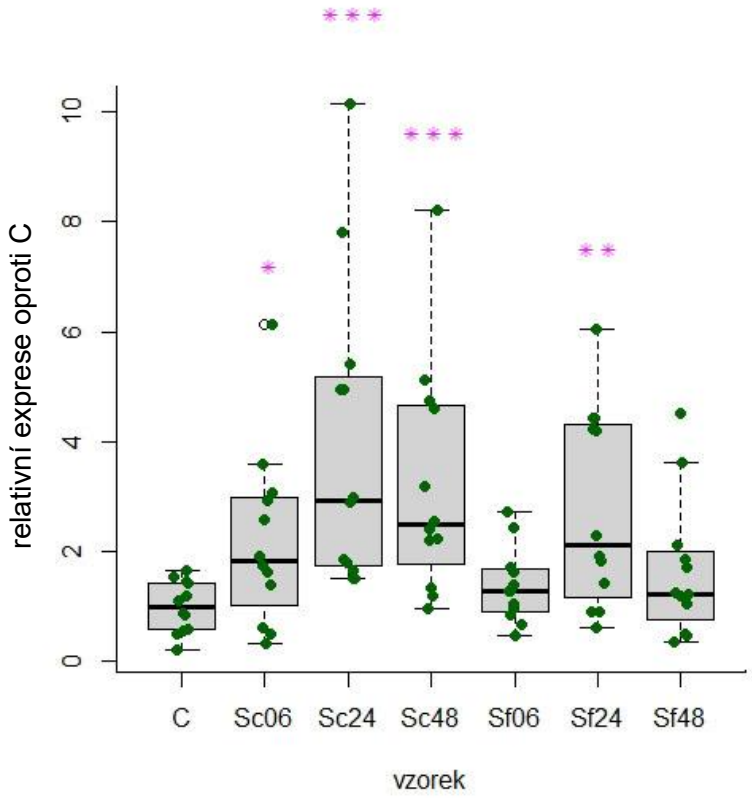
Obrázek č. 6: Graf relativní exprese *Idgf2* u jednotlivých vzorků. C je zkratka pro kontrolní organismus bez napadení hlístovkou, Sc je zkratka vzorku po napadení hlístovkou *S. carpocapsae,* Sf po napadení *S. feltiae*. Čísla značí dobu čelení infekci (6, 24 a 48 hodin). Hvězdičky označují míru signifikance výsledku.

Výsledky byly normalizovány na tři referenční geny. Z obrázku je patrné, že i přes nesignifikantní zvýšení po 48 hodinách je celkově reakce *Idgf2* na infekci po *S. carpocapsae* větší než po infekci *S. feltiae*. Dále lze pozorovat velice silnou expresi *Idgf2* po 24 hodin po napadení u obou hlístovek.

5.1.2 *Idgf4*

Nejdříve byl z naměřených hodnot vypočten Barlettův test pro shodu variancí. Hodnota testové statistiky byla vypočtena 38,257 s hladinou signifikance $1{,}001\times10^{-6}$ při šesti stupních volnosti. Z výsledku lze odečíst, že lze zamítnout nulovou hypotézu o homogenitě variancí. Dále byla využita neparametrická obdoba jednocestné ANOVy, tudíž Kruskal-Wallisův test. Výsledek testové statistiky Kruskal-Wallisova byl 25,548 s hladinou signifikance $2{,}70210^{-4}$ při šesti stupních volnosti. Z výsledku je patrné, že lze zamítnout nulovou hypotézu, a to že infekce slunéček nemá vliv na expresi *Idgf4*. Pro zjištění míry signifikance jednotlivých

vzorků byl vypočten Wilcoxonův test. Tento test vyhodnotil signifikantní výsledek u Sc06 s 0,2234 hladinou signifikance, Sc24 s 0,00011 hladinou signifikance, Sc48 s 0,001 hladinou signifikance a dále Sf24 s 0,00451 hladinou signifikance. Výsledky byly dále zobrazeny do následujícího grafu (Obrázek č. 7).



Obrázek č. 7: Graf relativní exprese *Idgf4* u jednotlivých vzorků. C označuje kontrolní organismus bez napadení hlístovkou, Sc je zkratka vzorku po napadení hlístovkou *S. carpocapsae,* Sf po napadení *S. feltiae*. Čísla určují dobu čelení infekci (6, 24 a 48 hodin). Hvězdičky vyznačují míru signifikance výsledku.

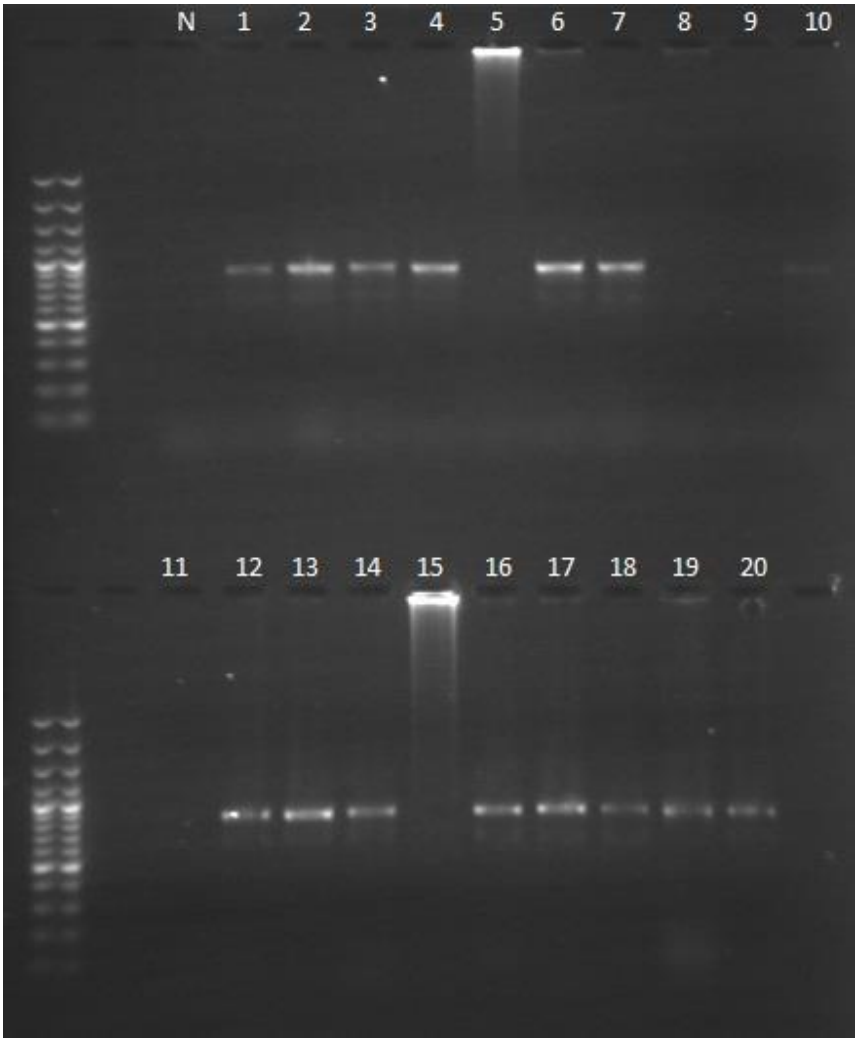
Z obrázku lze pozorovat prokazatelné zvýšení exprese *Idgf4* ve všech časových úsecích po infekci hlístovkou *S. carpocapsae*. Po infekci *S. feltiae* bylo zvýšení exprese *Idgf4* signifikantí pouze po 24 hodin.

5.2 Evoluce *Idgf*

5.2.1 Ověření kvality DNA

K ověření kvality DNA poslaných od pracovníků ČZU v Praze byly využity primery LCO1490 a HCO2198 běžně používané pro tyto účely u bezobratlých. Tyto primery nebyly pro dané vzorky vhodné, protože se nevytvořil žádaný fragment DNA. K ověření DNA byly

tedy navrženy primery v kódující sekvenci pro cytochrom c oxidázu I, ležící v mitochondriální DNA, podle již známých sekvencí daného úseku na sluněčkách. S nově navrženými primery HA1145Fw a HA1987Rev bylo možné ověřit dané DNA s následujícím výsledkem (Obrázek č. 8).



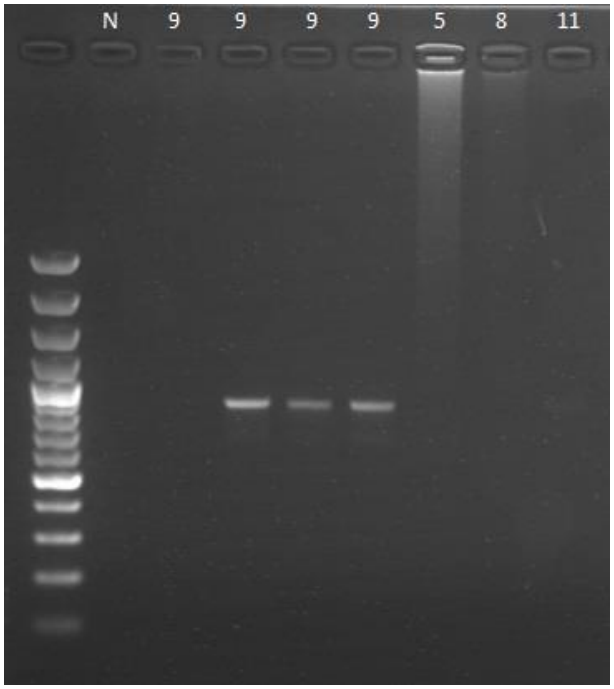
Obrázek č. 8: Ověření prvních 20 vzorků DNA s HA1145Fw a HA1987Rev primery. Vzniklé úseky mají 842 bp. Čísla zastupují názvy druhů podle Tabulky č. 1. N je označení pro negativní kontrolu, což byla reakce PCR bez DNA templátu

Vzorky označené čísly 5, 8, 9, 11, 15 nereagovaly danými s primery. Kvalita těchto DNA byla proto ověřena ve spektrofotometru s následujícími změřenými hodnotami (Tabulka č. 9).

Tabulka č. 8: Hodnoty DNA naměřené v nanodropu

vzorek	koncentrace [ng/µl]	260/280	260/230
5	13,9	2,73	1,65
8	7,6	3,69	1,23
9	8	2,06	0,57
11	66,1	2,21	2,2
15	97,5	2,01	2,03

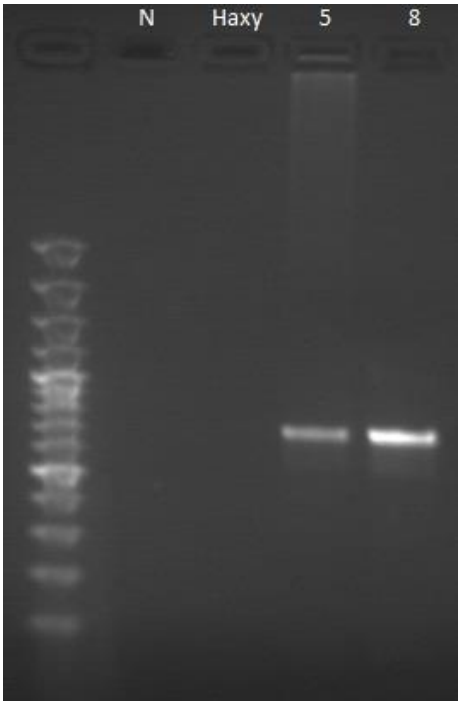
Ideální hodnota poměrů absorbance při 260/280 nm a 260/230 nm se pohybuje okolo 1,8. Jelikož vzorky č. 5, 8 a 9 měly zejména poměr 260/230 velice nízkých hodnot lze odečíst, že tyto vzorky byly zdegradované. Vysoké hodnoty poměrů 260/280 naznačují, že DNA byla kontaminována RNA. Toto tvrzení podpořila i nízká koncentrace DNA ve vzorkách. Vzorky číslo 11 a 15 se podle hodnot zdály být v pořádku. Tyto dva vzorky byly ošetřeny RNázou, avšak to nepomohlo. DNA všech těchto vzorků byla získána izolací z organismů uchovaných v etanolu. Výjimkou byl vzorek č. 15 (*Sospita vigintiguttata*) – tento druh je poněkud těžké získat, proto se nakonec s tímto druhem nepracovalo. Nově vyizolované DNA čtyř druhů (zastoupené čísly 5, 8, 9, a 11) byly ověřeny ve spektrofotometru. Dále byla provedena PCR s primery HA1145Fw a HA1987Rev (Obrázek č. 9).



Obrázek č. 9: DNA nově vyizolovaných DNA s HA1145Fw a HA1987Rev primery. N označuje negativní kontrolu bez teplátové DNA

Je patrné, že až na jeden vzorek organismu číslo 9 byla vyizolovaná DNA v dobrém stavu. Lze vidět i slabší proužek u DNA číslo 11, čehož se v následující PCR zlepšilo použitím

naředěné DNA v poměru 1:1 s deionizovanou vodou. DNA číslo 5 a 8 stále nefungovaly. Zajímavé bylo zjištění, že tyto vzorky číslo 5 a 8 fungovaly s „obecnými“ primery LCO1490 a HCO2198 na rozdíl od všech ostatních druhů (Obrázek č. 10).



Obrázek č. 10: DNA č. 5 a 8 fungují s „obecnými“ primery za vzniku úseku dlouhého 710 bp. N je zkratka pro negativní kontrolu bez templátu. Dále zkratka Haxy označuje Harmonii *axyridis*, u které se nevytvořil proužek v reakci s těmito „obecnými“ primery

Bylo pozorováno, že vzorky č. 5 *Chilocorus bipustulatus* a č. 8 *Exochomus quadripustulatus* nefungovaly s HA1145Fw a HA1987Rev primery jako ostatní druhy, ba naopak jako jediné fungovaly s „obecnými“ primery. Toto zjištění naznačuje, že zmíněné dva druhy jsou vývojově vzdálené od ostatních druhů skupiny Coccinellidae.

5.2.2 Získávání sekvencí

5.2.2.1 *Idgf2*

Hlavním cílem práce bylo získat co nejvíce sekvencí pro pozdější analýzu. Se získáváním sekvencí se začalo u exonu 2 genu *Idgf2*. Přečištěný produkt PCR reakce byl osekvenován u pěti druhů, dále tři sekvence byly získány osekvenováním přečištěné reamplifikované PCR reakce. U některých dalších vzorků bylo potřeba produkt z PCR reakce vyříznout z agarózového gelu a přečistit kitem (viz kapitola 4.12). Výsledek po izolaci DNA z gelu byl přímo osekvenován nebo byl zabudován do bakteriálního plazmidu. Osekvenováním

izolované DNA z gelu byly získány tři sekvence, další dvě sekvence po zabudování do plazmidu. Celkem se z exonu 2 podařilo získat 13 sekvencí. Jedna sekvence byla později vyřazena, protože se nejednalo o požadovanou sekvenci. Jelikož byl úsek ohraničen specifickými primery, lze usoudit, že se zřejmě jednalo o pseudogen. Jinými slovy jde o sekvenci, která ztratila schopnost kódovat funkční protein.

Exony 4 a 5 genu *Idgf2* byly amplifikovány dohromady. Ačkoliv hrozilo, že některé druhy mohou mít dlouhý intron, a tudíž nebude možné je amplifikovat dohromady, obavy se u většiny druhů nepotvrdily. Mezi čtyřmi druhy, které s těmito primery nefungovaly, byly druhy *Chilocorus bipustulatus* a *Exochomus quadripustulatus*. Pravděpodobně měly větší intron než ostatní. Co se týče získání sekvencí tohoto úseku, pět vzorků bylo osekvenováno po přečištění PCR reakce, další čtyři po přečištění reamplifikované PCR reakce. I zde bylo u některých vzorků zapotřebí vyříznou určitý proužek DNA z agarózového gelu a přečistit kitem. Čtyři vzorky byly získány osekvenováním vzniklého vzorku. Jeden vzorek bylo potřeba vyizolovat z agarózového gelu a zabudovat do bakteriálního plazmidu. Po zkontrolování správnosti osekvenovaného úseku byla jedna sekvence vyřazena. Zajímavé bylo, že sekvenci druhu *Subcoccinella vigintiquatorpunctata* bylo nutné otočit, aby byla správně. Zároveň u zmíněného druhu byl úsek exonu 4 pseudogenem, proto byla z toho úseku použita jen sekvence exonu 5. Úhrnem tedy bylo získáno 13 sekvencí úseku s exony 4 a 5, přičemž u exonu 4 bylo o jednu sekvenci méně.

Primery pro exon 6 genu *Idgf2* měly poměrně hodně degenerací. Kvůli tomu se často tvořily i další úseky než onen požadovaný. Z toho důvodu bylo u každého vzorku potřeba daný proužek v agarózovém gelu vyříznout a DNA vyizolovat kitem. Protože navržené primery nebyly vhodné na sekvenování, vyizolované úseky z gelu byly zabudovány do bakteriálního plazmidu a osekvenovány s primery pro plazmidovou sekvenci. Tímto způsobem bylo získáno 12 sekvencí exonu 6. Bohužel po ověření správnosti úseku v programu BLAST bylo 5 sekvencí vyřazeno.

Primery exonu 7 genu *Idgf2* měly hodně degenerací. Pro všechny vzorky bylo potřeba udělat reamplifikaci produktu PCR reakce, aby byl požadovaný proužek viditelný. U každého vzorku bylo dále nutné vyříznout požadovaný proužek z agarózového gelu, vyizolovat DNA pomocí kitu a zabudovat do bakteriálního plazmidu. Bohužel klonování úseku do plazmidu nebylo úspěšné, a proto z tohoto exonu nebyla získána žádná sekvence.

5.2.2.2 *Idgf4*

U genu *Idgf4* bylo začato exonem s primery, které měly nejméně degenerací. Jednalo se o exon 6. Po přečištění PCR reakce bylo osekvenováno pět vzorků, dále tři byly osekvenovány po přečištění reamplifikované PCR reakce. Následně 12 vzorků bylo osekvenováno po izolaci určitého úseku DNA z agarózového gelu. Díky vysoké specifitě primerů bylo získáno celkem 20 sekvencí z 23 možných. Nakonec po ověření správnosti úseku byla jedna sekvence vyřazena. Tudíž k vytvoření fylogenetických stromů bylo použito19 sekvencí.

Dále byl amplifikován exon 7 genu *Idgf4,* rovněž se specifickými primery s málo degeneracemi. Po přečištění PCR reakce bylo osekvenováno šest vzorků, další čtyři po přečištění reamplifikované PCR reakce. Dále dva vzorky byly vyříznuty z gelu a přečištěny kitem, přičemž jeden vzorek byl rovnou osekvenován, zatímco druhý byl osekvenován až po zabudování do bakteriálního plazmidu. Dohromady bylo získáno 12 sekvencí exonu 7.

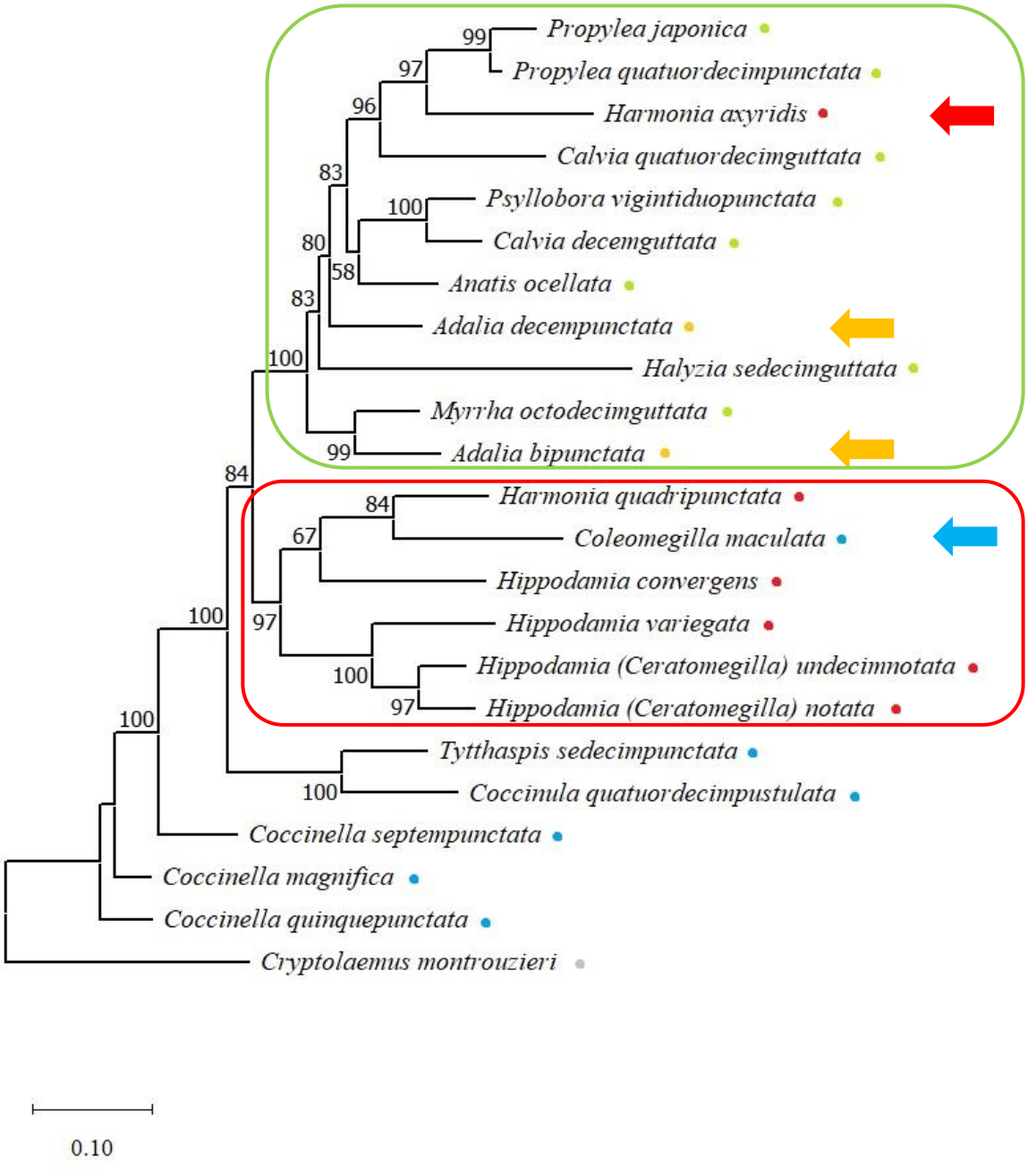
Přehled výsledků PCR jednotlivých exonů byl přiložen v příloze (Příloha č. 5). Získaní sekvencí exonů u jednotlivých druhů byl zaznamenán do následující tabulky (Tabulka č. 10).

Tabulka č. 9: Přehled získaných sekvencí exonů u jednotlivých druhů. + znamená získání sekvence, * je symbol pro získanou sekvenci, která byla po ověření vyřazena, - označuje, že daný druh nefungoval na primery daného exonu. Pozn. u druhu *Sospita vigintiguttata* nebyla použitelná DNA

Číslo	Druh	***Idgf2***				***Idgf4***	
		Exon 2	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 6	Exon 7
1.	*Harmonia quadripunctata*	+	+	+	+	+	+
2.	*Hippodamia variegata*	+			+	+	
3.	*Tytthaspis sedecimpunctata*	-	+	+	+	+	+
4.	*Psyllobora vigintiduopunctata*	+	-	-		+	+
5.	*Chilocorus bipustulatus*	-	-	-	-	+	
6.	*Subcoccinella vigintiquatuorpunctata*	*	*	*	-	+	-
7.	*Coccinula quatuordecimpustulata*	+	+	+	+	+	+
8.	*Exochomus quadripustulatus*	-	-	-			
9.	*Coleomegilla maculata*	+	-	-		+	
10.	*Calvia quatuordecimguttata*	+			+		+
11.	*Propylea quatuordecimpunctata*	+	*	*	-	+	+
12.	*Anatis ocellata*	+	+	+		+	-
13.	*Hippodamia convergens*	-	+	+		-	
14.	*Hippodamia (Ceratomegilla) notata*		+	+	+	+	+
15.	*Sospita vigintiguttata*	-	-	-	-	-	-
16.	*Coccinella quinquepunctata*	+			*	+	+
17.	*Cynegetis impuctata*	-	-	-	-	+	
18.	*Hippodamia (Ceratomegilla) undecimnotata*	+				+	+
19.	*Coccinella magnifica*	+	+	+	+	+	+
20.	*Myrrha octodecimguttata*	+	+	+		*	-
21.	*Adalia bipunctata*	-	+	+	*	+	-
22.	*Adalia decempunctata*	-	+	+	*	+	+
23.	*Calvia decemguttata*		+	+	*	+	-
24.	*Halyzia sedecimguttata*		+	+	*	+	+

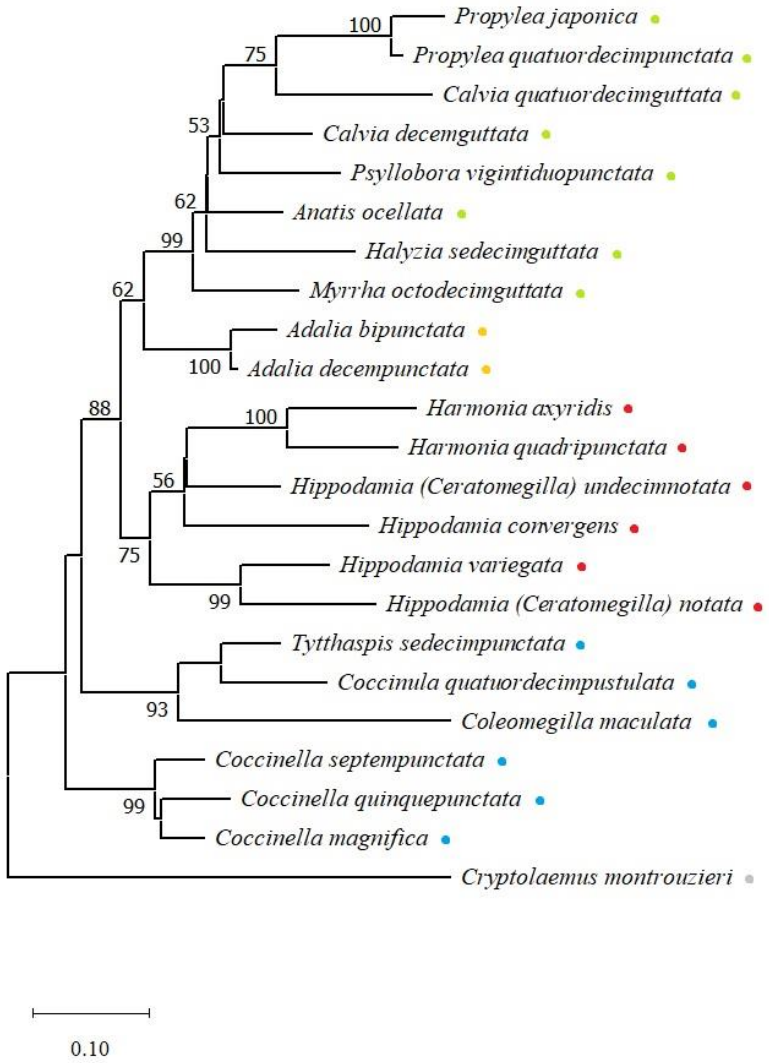
5.2.3 Fylogenetické stromy

Ze všech získaných sekvencí všech exonů byl vytvořen fylogenetický strom podle nukleotidové (Obrázek č. 11) a aminokyselinové sekvence (Příloha č. 6). Dříve byly zmíněné dvě fylogenetické studie, podle kterých se dá pouze porovnat zařazení druhů do jednotlivých skupin. Pro srovnání s fylogenetickým zařazení druhů do skupin byly druhy ve výsledcích opatřeny barvami podle fylogeneze od Nattier a spol. (2021).

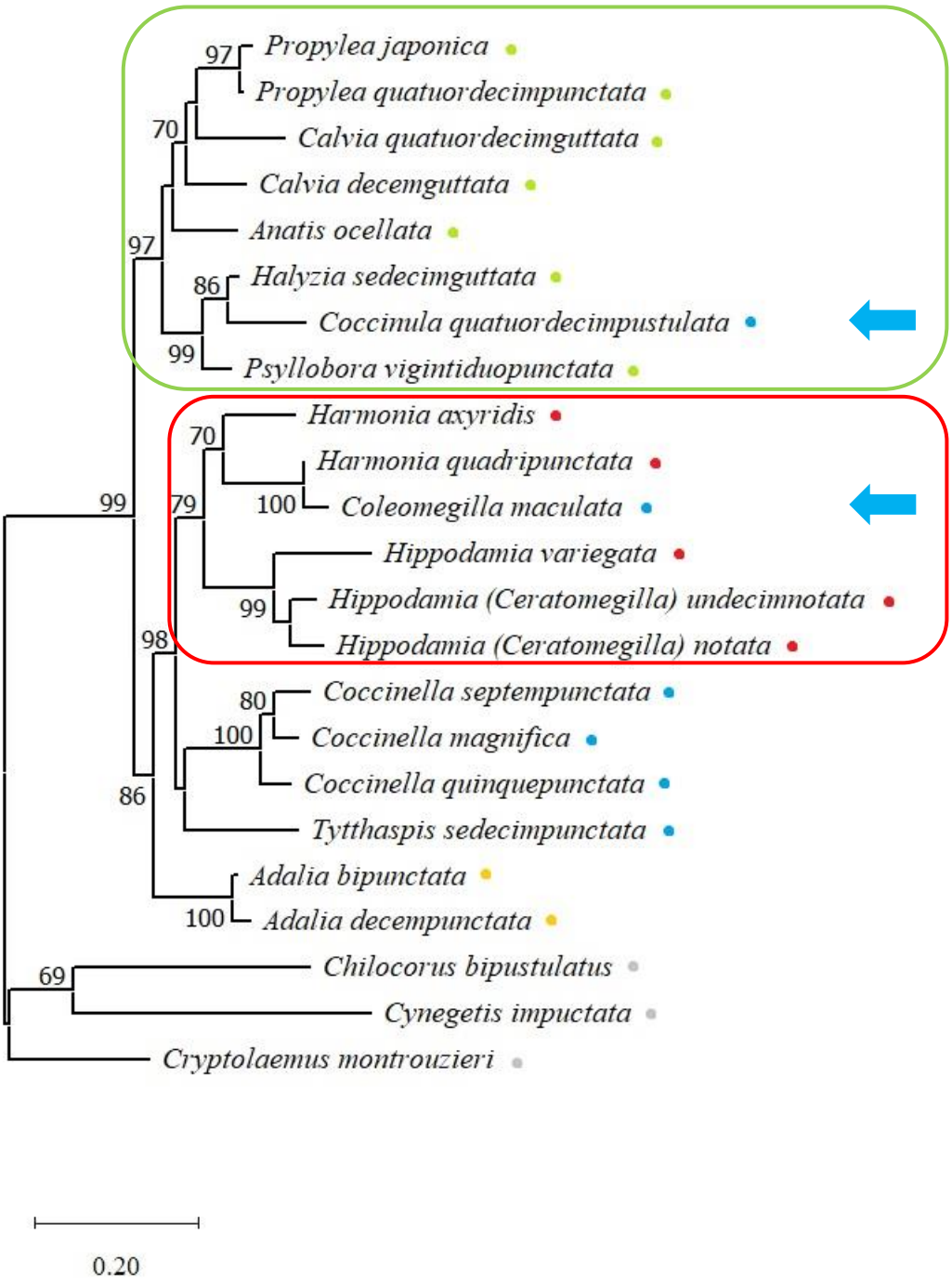


Obrázek č. 11: Fylogenetický strom (SBL = 2,83651515) vytvořený podle všech získaných nukleotidových sekvencí *Idgf*. U jednotlivých větví je uvedena aBayes statistická hodnota nad 50 %. Použitým modelem byl GTR + G.

Z vytvořeného stromu podle aminokyselinové sekvence (Příloha č. 6) bylo zřejmé, že změny na úrovni aminokyselin nebyly dostačující pro vytvoření důvěryhodných výsledků. Proto bylo pracováno pouze s fylogenetickými stromy vytvořenými podle nukleotidové sekvence. Na tomto výsledku (Obrázek č. 11) lze pozorovat hned několik změn. Je patrné, že tyto výsledky zachovávají skladbu jednotlivých druhů monofyletických skupin podle fylogeneze s některými výjimkami. Mezi ně patří zařazení druhů *Harmonia axyridis* a *Coleomegilla maculata*. Geny *Idgf* se u těchto druhů evidentně vyvíjejí nezávisle na zbytku skupiny. Dále je zajímavé, že dva druhy rodu *Adalia* se od sebe také do jisté míry liší. V neposlední řadě si nelze nevšimnout, že monofyletická skupina označená modrou barvou není na stejné větvi. Abychom zjistili, kde se všechny tyto změny odehrály, byly vytvořeny fylogenetické stromy pro jednotlivé geny *Idgf2* (Obrázek č. 12) a *Idgf4* (Obrázek č. 13).



Obrázek č. 12: Vytvořený fylogenetický strom (SBL = 3,05005733) podle získaných nukleotidových sekvencí *Idgf2*. U jednotlivých větví je uvedena aBayes statistická hodnota nad 50 %. Použitým modelem byl GTR + G + I.

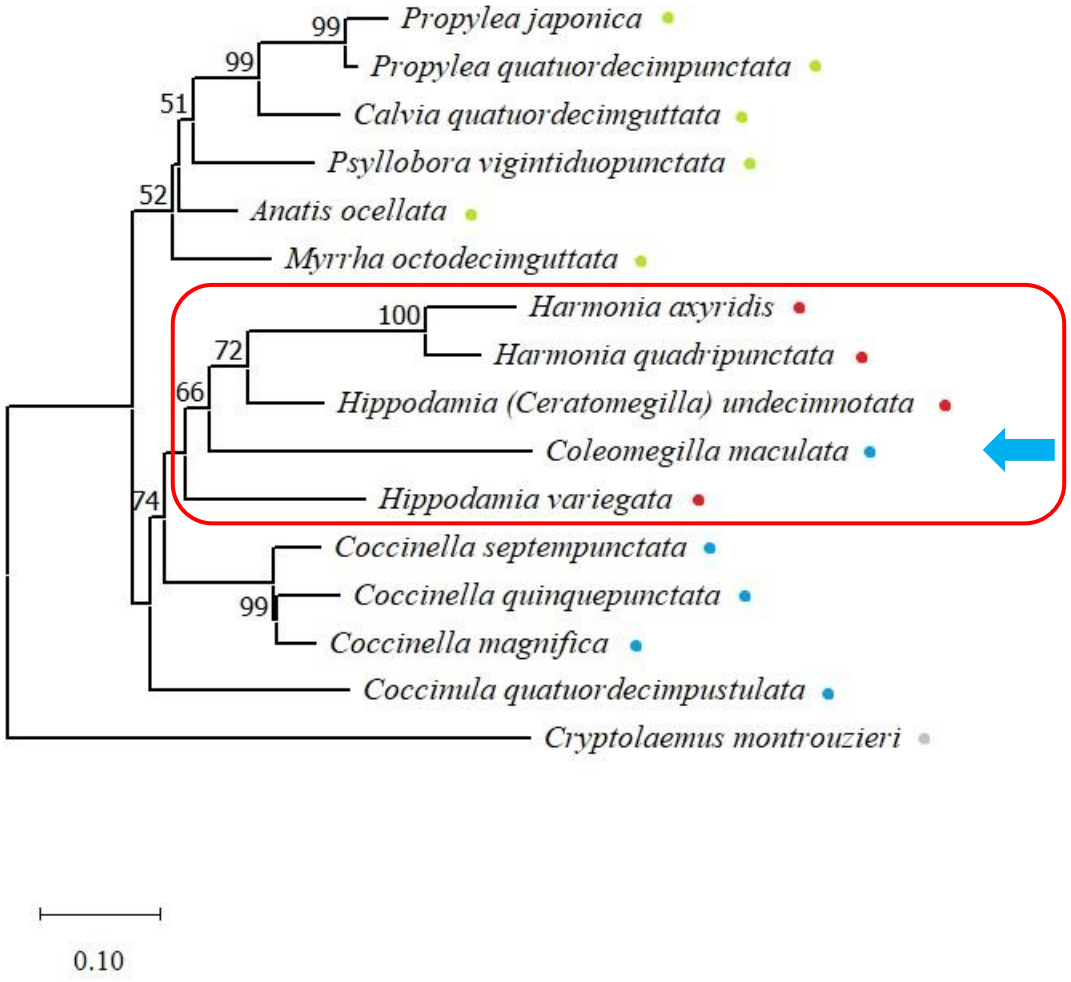


Obrázek č. 13: Fylogenetický strom (SBL = 2,79967107) podle dosažených nukleotidových sekvencí dvou exonů *Idgf4*. U jednotlivých větví je uvedena aBayes statistická hodnota nad 50 %. Použitým modelem byl GTR + G + I.

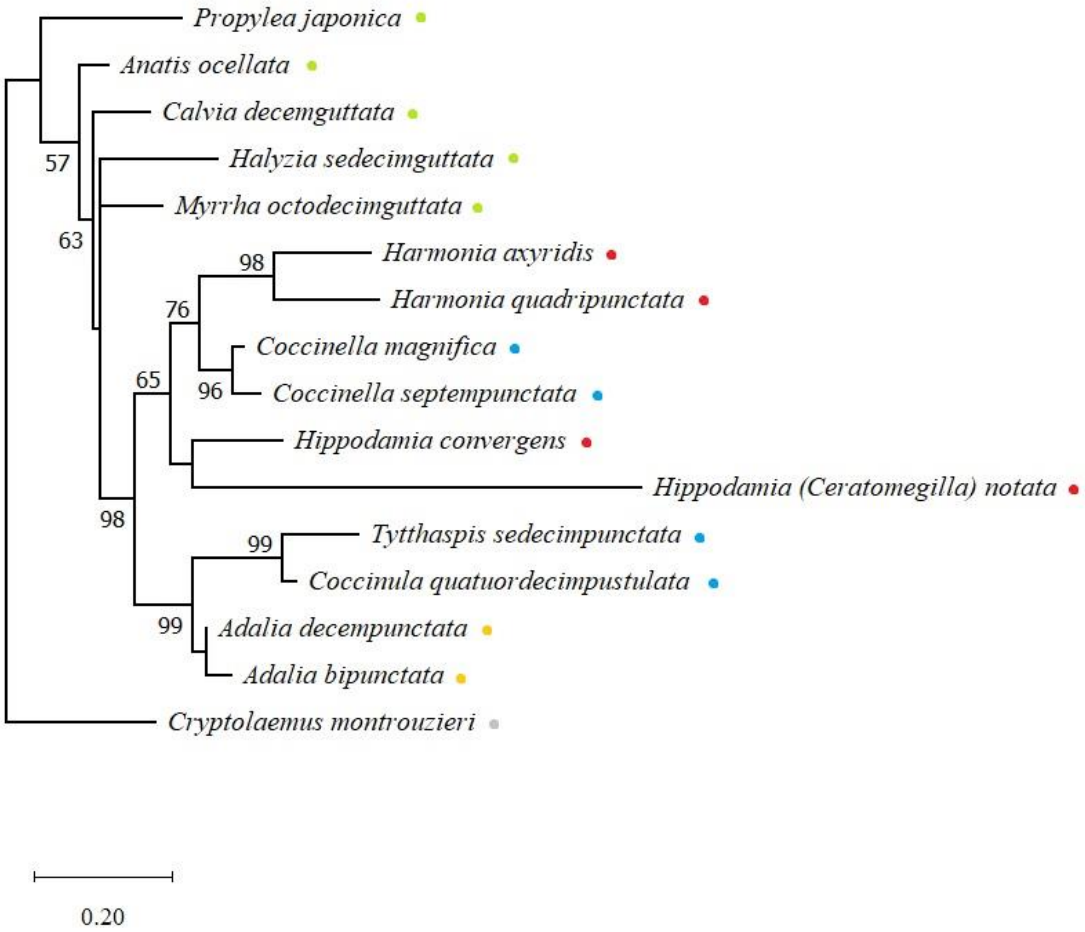
Strom podle *Idgf2* zachoval složení jednotlivých skupin podle fylogeneze oproti výslednému stromu (Obrázek č. 11). Na druhé straně u *Idgf4* lze pozorovat dvě zásadní změny (Obrázek č. 13). První je zařazení druhu *Coleomegilla maculata* do červeně označené skupiny. Druhou výraznou změnou je zařazení druhu *Coccinula quatuordecimpustulata* ke skupině zeleně

označené. Tato změna nebyla pozorovatelná ve výsledném fylogenetickém stromu, zřejmě s přidáním dalších sekvencí zanikla její výraznost.

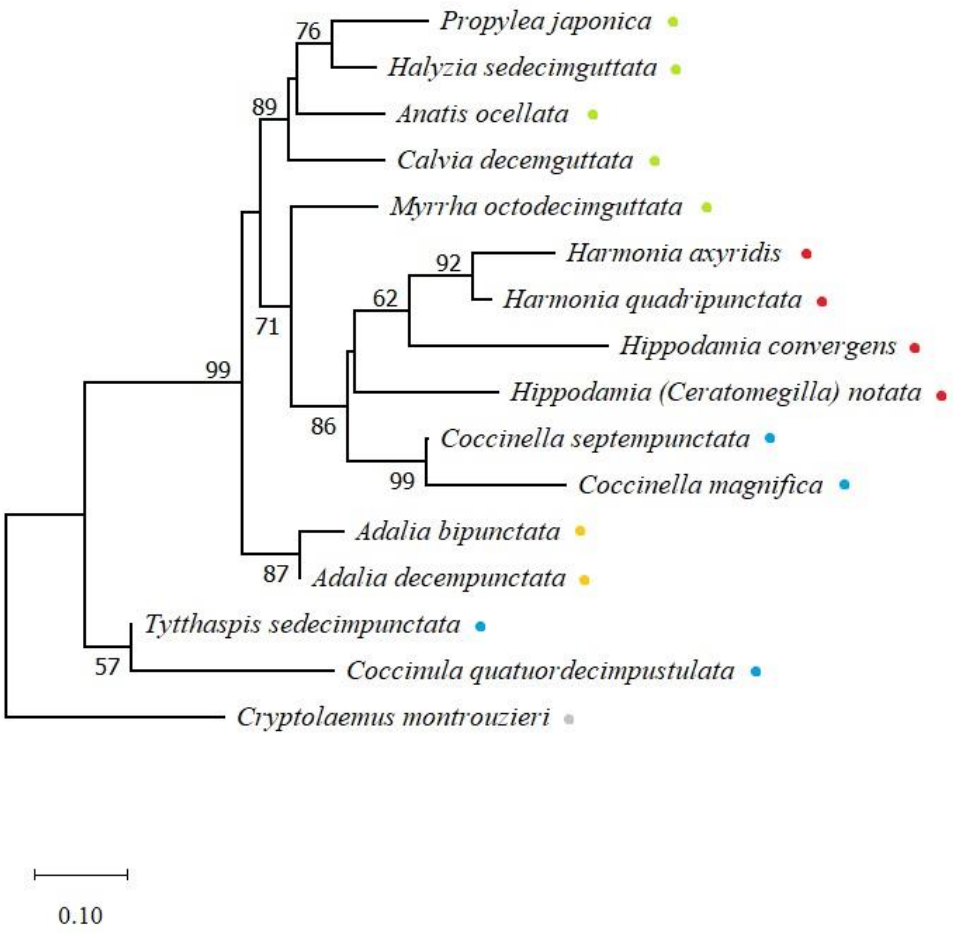
Vytvořené výsledky stále neodhalily některá místa, která nejvíce ovlivnila oddělení několik druhů ze skupin ve výsledném fylogenetickém stromu (Obrázek č. 11). Z toho důvodu byly vytvořeny fylogenetické stromy jednotlivých exonů (Obrázek č. 14 až 19).



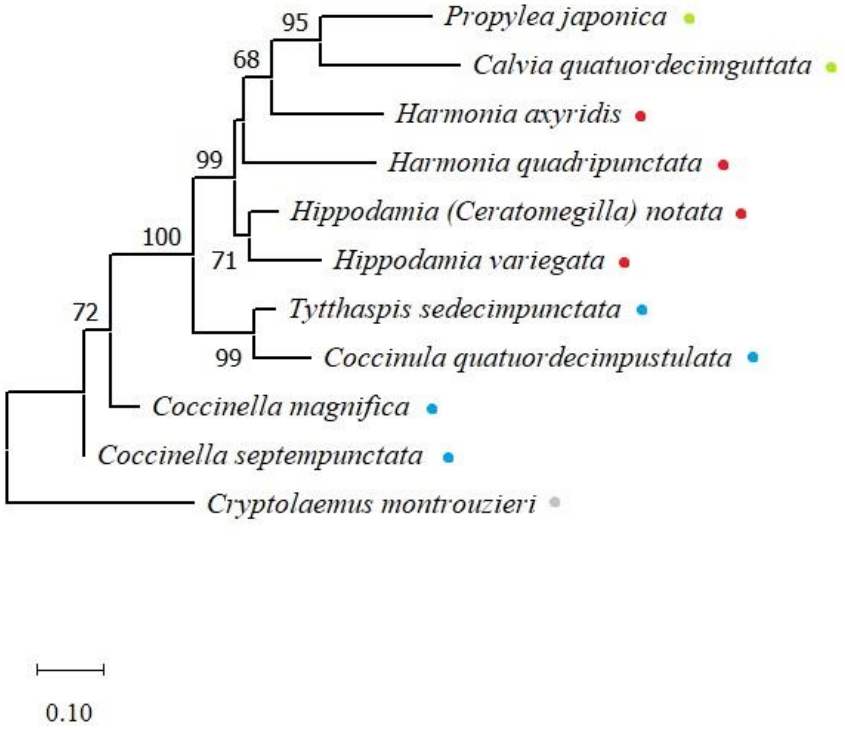
Obrázek č. 14: Fyl. strom (SBL = 2,28281675) podle nukleotidových sekvencí *Idgf2* exonu 2. U jednotlivých větví je uvedena aBayes statistická hodnota nad 50 %. Použitým modelem byl TN93 + G +I.



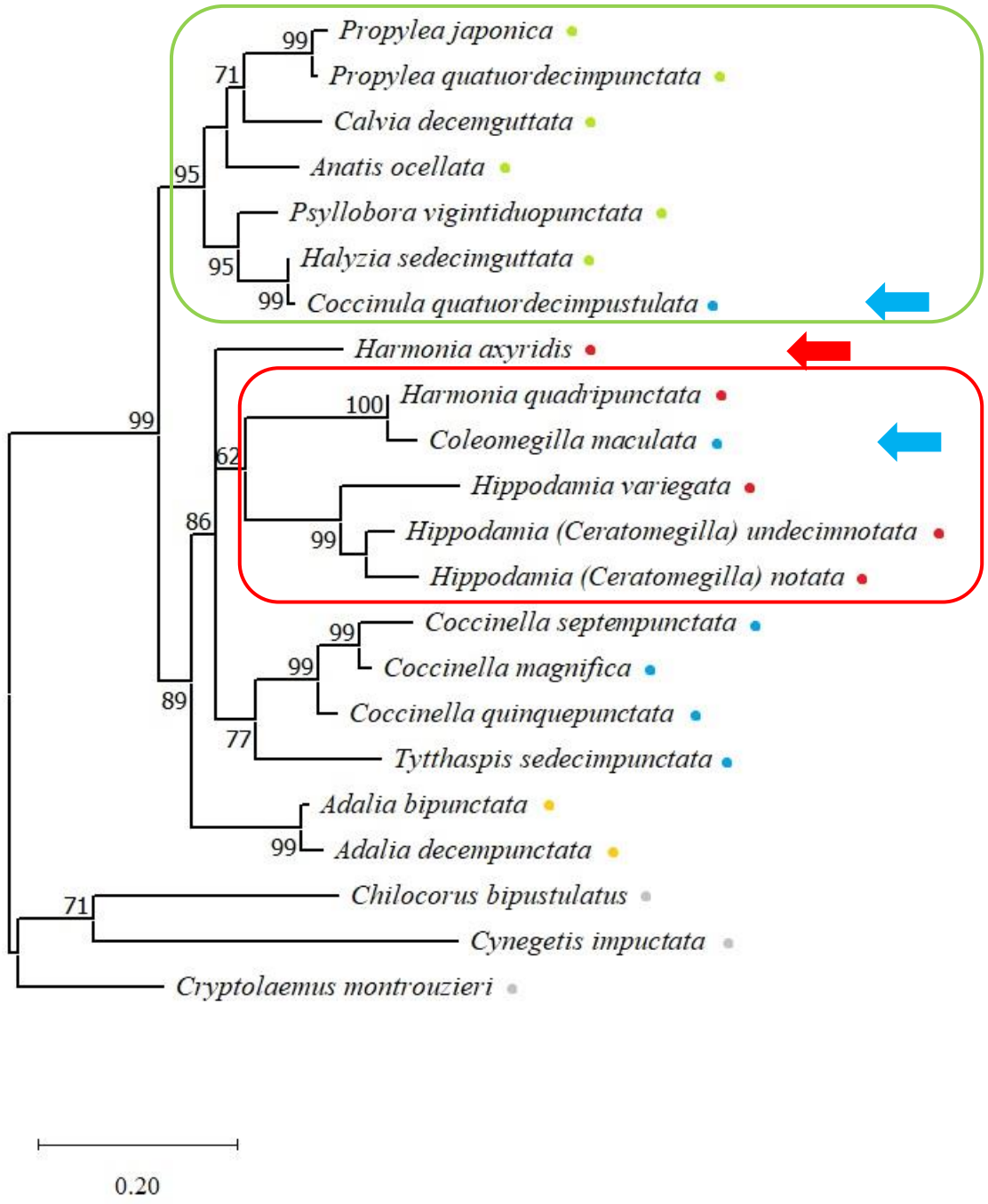
Obrázek č. 15: Fyl. strom (SBL = 2,79955476) podle nukleotidových sekvencí *Idgf2* exonu 4. U jednotlivých větví je uvedena aBayes statistická hodnota nad 50 %. Použitým modelem byl HKY85 + G.



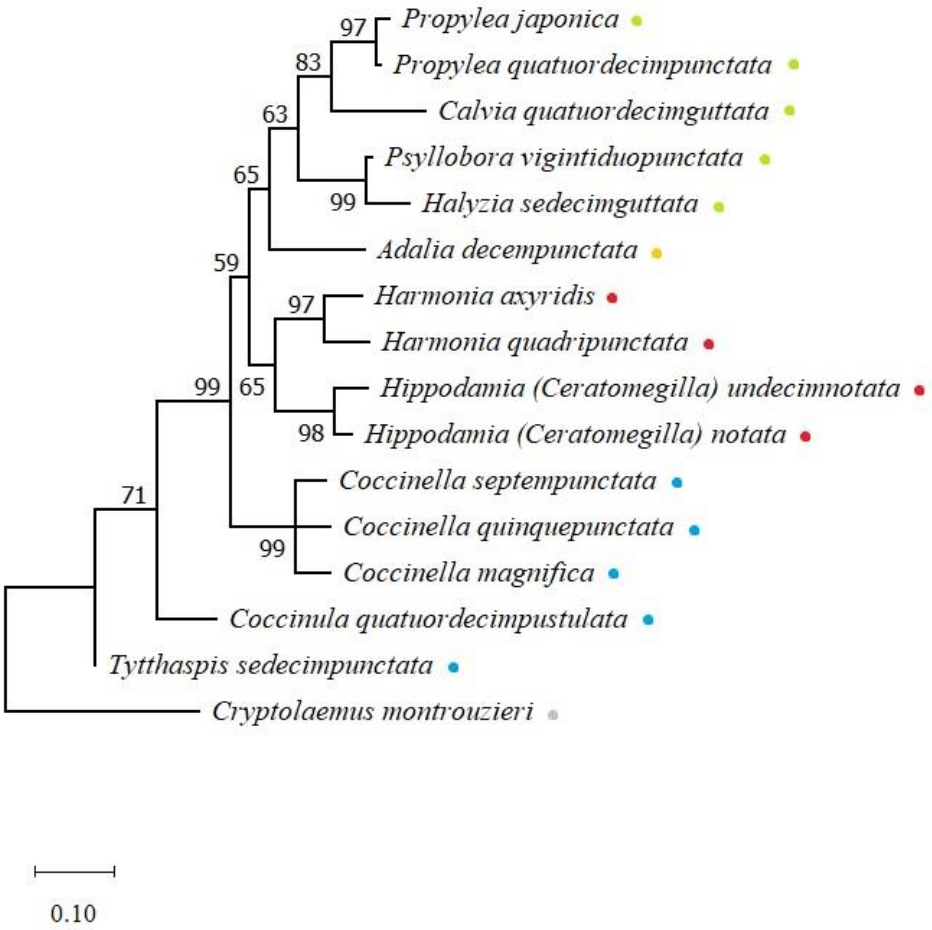
Obrázek č. 16: Fyl. strom (SBL = 2,35150993) podle nukleotidových sekvencí *Idgf2* exonu 5. U jednotlivých větví je uvedena aBayes statistická hodnota nad 50 %. Použitým modelem byl HKY + G.



Obrázek č. 17: Fyl. strom (SBL = 1,90956294) podle nukleotidových sekvencí *Idgf2* exonu 6. U jednotlivých větví je uvedena aBayes statistická hodnota nad 50 %. Použitým modelem byl GTR + G + I.



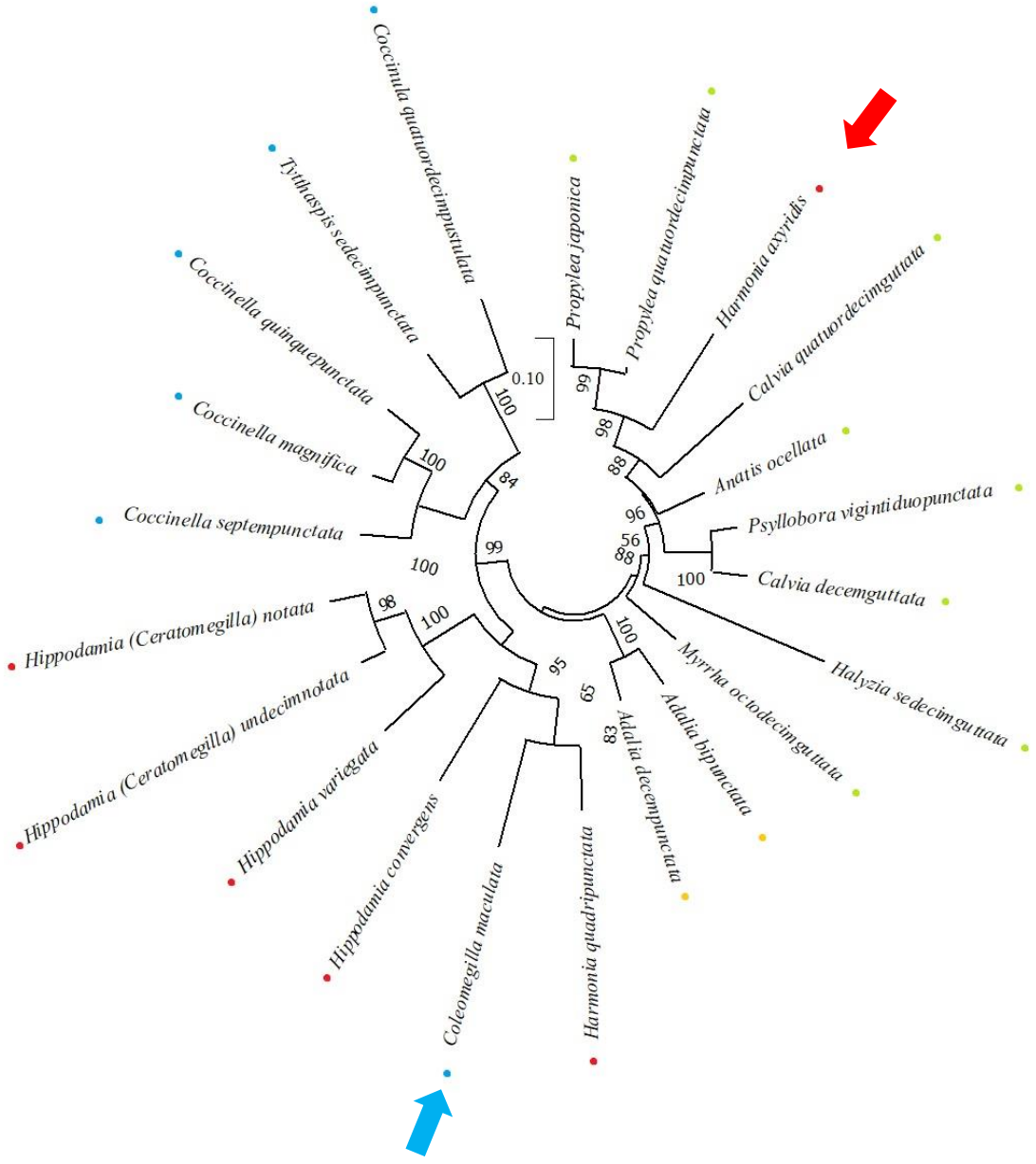
Obrázek č. 18: Fyl. strom (SBL = 1,03583228) podle nukleotidových sekvencí *Idgf4* exonu 6. U jednotlivých větví je uvedena aBayes statistická hodnota nad 50 %. Použitým modelem byl HKY + G + I.



Obrázek č. 19: Fyl. strom (SBL = 1,73788418) podle nukleotidových sekvencí *Idgf4* exonu 7. U jednotlivých větví je uvedena aBayes statistická hodnota nad 50 %. Použitým modelem byl GTR + G + I.

Z jednotlivých exonů lze vyčíst, že ve všech exonech většinou zůstaly zachované monofyletické skupiny podle fylogeneze, pouze se lišily vzájemné vztahy skupin. Co se týče jednotlivých změn, rozdílnost druhu *Halyzia sedecimguttata* oproti zbytku stejné skupiny byla zaznamenána v exonu 6 *Idgf2*. Největší změny se evidentně odehrály v exonu 6 u *Idgf4* (Obrázek č. 17). Tam došlo k oddělení *Harmonie axyridis* od zbytku červeně označené skupiny, přičemž se do této skupiny vmezeřila *Coleomegilla maculata.* Nutno podotknout, že druh *Coleomegilla maculata* se do červeně označené skupiny přidala i v exonu 2 genu *Idgf2*. V exonu 6 genu *Idgf4* se také od ostatních své skupiny lišil druh *Coccinula quatuordecimpustulata,* ale tato odlišnost se ve výsledném fylogenetickém stromu neprojevila. Co se týče modře označené skupiny, v jednotlivých exonech se často oddělovaly druhy rodu *Coccinella* od ostatních stejné skupiny. Tento rozdíl je způsoben zřejmě i jistou odlišností zkoumaných druhů v rámci monofyletické skupiny ve fylogenezi. V neposlední řadě rozdílnost druhů rodu *Adalia* ve výsledném stromu nebyla pozorovaná v žádném z exonu.

Pro ověření, zda tuto odlišnost nezpůsobuje získání sekvence exonu 7 genu *Idgf4* jen jednoho ze dvojice druhů, byl vytvořen fylogenetický strom bez této sekvence. Výsledek i po vypuštění této sekvence se však nijak nezměnil. Do výsledků nebyla zařazena sekvence druhu *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata*, protože se vždy zařazovala mezi podčeleď Coccinellinae, ačkoliv mezi ně nepatří. Protože jednotlivé exony stále nevysvětlily například rozdělení druhů rodu *Adalia* ve výsledném stromu, na závěr byl vytvořen strom bez druhu *Cryptolaemus montrouzieri* (Obrázek č. 20), který mohl mít vliv na celkové výsledky.



Obrázek č. 20: Fylogenetický strom (SBL = 2,52994913) podle nukleotidových sekvencí *Idgf* užší skupiny Coccinellinae. U jednotlivých větví je uvedena aBayes statistická hodnota nad 50 %. Použitým modelem byl GTR + G + I.

Z výsledného stromu (Obrázek č. 20) je patrné, že jednotlivé skupiny podle fylogeneze zůstávají zachované, avšak vztahy mezi nimi zůstávají odlišné od fylogeneze druhu. Po odstranění sekvence druhu *Cryptolaemus montrouzieri* došlo k výrazné změně, a to seřazení druhů rodu *Adalia* k sobě. Jelikož v žádném z exonu nebyl pozorován výrazný rozdíl mezi těmito druhy, je patrné, že sekvence druhu *Cryptolaemus montrouzieri* ovlivňoval některé vztahy. Dále se ucelila modře označená skupina. Avšak některé významné změny zůstaly zachované, a to zařazení druhů *Harmonia axyridis* a *Coleomegilla maculata* mimo ostatní druhy své fylogenetické skupiny.

6 DISKUZE

Z výsledků lze vyvodit, že i u zástupce řádu Coleoptera, *Harmonia axyridis*, patří *Idgf2* a *Idgf4* mezi geny indukované imunitní odpovědí podobně jako u *D. melanogaster* (De Gregorio a spol., 2001) a u *Anopheles gambiae* (Shi, Pakewitz, 2004). U brouků byla doposud popsána pouze vývojová funkce, a to účast IDGF4 při kuklení (Zhu a spol., 2008). Co se týče hlístovkové infekce, byla zkoumána odpověď na *Heterorhabditis bacteriophora* u larev *D. melanogaster* (Arefin a spol., 2014). Šest hodin po infekci byly ze šesti genů *Idgf* indukované jen geny *Idgf1, Idgf3* a *Idgf4*. Z výsledků odpovědi *Idgf2* a *Idgf4* na hlístovkovou infekci u *Harmonia axyridis* je patrné, že v tomto případě reagují oba geny.

Dále bylo zjištěno, že *Idgf2* reaguje na hlístovkovou infekci více než *Idgf4*. To může naznačovat, že IDGF2 je protein, který je více zapojen do procesů imunitní odpovědi. Ačkoliv byl gen *Idgf2* pojmenován podle sekvenační podobnosti s *Idgf2* u *D. melanogaster* (Zhu a spol., 2008), je známé, že se nejedná o homologické geny. Duplikace genu *Idgf* u brouků je nezávislá od duplikací genu *Idgf* u podřádu krátkorozí z řádu dvoukřídlých (Diptera: Brachycera) (Žurovcová a spol., 2019). Z dřívějších poznatků je známo, že *Idgf2* u *D.melanogaster* se podílí na hojení ran (Brož a spol., 2017). Jelikož se *Idgf2* u *Harmonia axyridis* více účastní imunitní reakce, mohlo by jít o konvergenci funkce i sekvence.

Exprese *Idgf2* i *Idgf4* po infekci hlítovkou *S. carpocapsae* byla vyšší než odpověď na *S. feltiae,* což je v souladu s dřívějšími výzkumy (Ebeid a spol., 2014 a Metwally a spol., 2016). Nejprokazatelnější zvýšení exprese jak *Idgf2*, tak *Idgf4* nastalo po 24 hodinách od hlístovkové infekce u obou druhů. Signifikantní zvýšení exprese *Idgf2* i *Idgf4* po napadení *S. feltiae* bylo pozorováno pouze po 24 hodinách. Naproti tomu, signifikantní zvýšení exprese *Idgf2* i *Idgf4* po infekci *S. carpocapsae* bylo po 6 a 24 hodinách, u *Idgf4* i po 48 hodinách. Ačkoliv některé výsledky po napadení *S. feltiae* nebyly signifikantní, je možné i u těchto výsledků vidět určitý trend zvýšené exprese. Dynamika odpovědi *Idgf2* i I*dgf4* byla tedy u obou genů stejná. Jiná dynamika odpovědi genů *Idgf* byla naopak popsána u dospělců *D. melanogaster* na bakteriální infekci (De Gregorio a spol., 2001). Bylo zjištěno, že bakteriální infekce u *D. melanogaster* indukovala pouze tři geny, konkrétně *Idgf1, Idgf2* a *Idgf3*. Tyto geny se lišily i v době zvýšené exprese. *Idgf1* byl indukován brzo po infekci, zatímco *Idgf2* až později po infekci. Avšak jak již bylo zmíněno dříve, u slunéčka *Harmonia axyridis* podobné změny dynamiky exprese genů *Idgf* sledovány nebyly. Exprese genů *Idgf2* a *Idgf4* se lišily pouze v míře odpovědi.

Zajímavý je poznatek, že *S. feltiae* Jakub proniká do hostitele mnohem efektivněji než *S. carpocapsae* 1343, jak uvádí V. Půža a spol. (2021). Navzdory očekávání je to právě *S. carpocapsae*, která má na mortalitu hostitele větší dopad. Výsledek práce potvrzuje vyšší imunitní odpověď na infekci právě této hlístovky.

V současné době není znám průběh hlístovkové infekce u brouků čeledi slunéčkovití. Nicméně studie vědců M. Ch. Roy a Y. Kim (2020) popsala průběh infekce hlístovkou *S. feltiae* na brouku *Tenebrio molitor*. Při pokusu se hlístovky do hostitele dostaly ústním otvorem. Jakmile se hlístovky dostanou do střeva hostitele, začnou uvolňovat bakterie *Xenorhabdus nematophila*, které pomáhají narušovat epitely hostitele pro snazší konečné proniknutí hlístovky do hemocoelu (Sicard a spol., 2004). Po 6 hodinách po infekci byly hlístovky zaznamenány pouze ve střevě, odkud se snažily dostat do hemocoelu hostitele, přičemž je začínaly obklopovat hemocyty (Roy, Kim, 2020). Po uplynutí 24 hodin od infekce se hlístovky dostaly ze střeva do hemocoelu. Agregace hemocytů započatá již po 6 hodinách od infekce vede k celkovému zapouzdření hlístovek hemocyty. Po 24 hodinách od infekce je nejvíce indukovaný imunitní systém. Pokud je efektivita imunitního systému dostačující, 48 hodin po infekci jsou všechny hlístovky zabity hemocyty. Tato dynamika průběhu infekce je porovnatelná s dosaženými výsledky po hlístovkové infekci slunéčka *Harmonia axyridis*. Právě 24 hodin po infekci u obou druhů hlístovek dosáhla exprese *Idgf2* i *Idgf4* nejvyšších hodnot.

Co se týče evoluční části práce, bylo zjištěno, že druhy *Chilocorus bipustulatus* a *Exochomus quadripustulatus* jsou evolučně velice odlišné od zbytku pokusných druhů z čeledi Coccinellidae. Bylo potřeba navrhnout speciální primery pro brouky čeledi slunéčkovití na úsek kódující cytochrom oxidázu I, aby bylo možné ověřit kvalitu DNA daných vzorků. Tyto dva druhy jako jediné nefungovaly s navrženými primery. Naproti tomu tyto odlišné druhy fungovaly s „obecnými" primery LCO1490 a HCO2198 fungující pro celou řadu bezobratlých (Folmer a spol., 1994). Další druh mimo podčeleď Coccinellinae, *Subcoccinella vigintiquatuorpunctata*, se sice zdála, že funguje podobně jako ostatní druhy, avšak po ověření osekvenovaných úseků bylo zjištěno, že se často jednalo o pseudogeny. Tyto úseky v průběhu evoluce ztratily schopnost kódovat funkční protein a obsahují větší množství stop kodonů. Z dalšího druhu mimo podčeleď Coccinellinae, druhu *Cynegetis impuctata,* se podařilo získat sekvenci exonu 6 genu *Idgf4*. Sekvenci tohoto exonu se také podařilo získat od druhu *Chilocorus bipustulatus*. Nicméně sekvence těchto druhů byly zahrnuty pouze do vytvoření fylogenetického stromu exonu 6 *Idgf4* a dále exonu 6 spolu s exonem 7 *Idgf4*. Důvodem bylo to, že po přidání těchto sekvencí ke všem sekvencím ostatních druhů tyto dva

druhy neudržely svou pozici mimo podčeleď Coccinellinae. Tím mohly ovlivnit vztahy jiných druhů stejně tak, jak bylo prokázáno u druhu *Cryptolaemus montrouzieri*.

Ve fylogenetických stromech bylo pozorováno nejvíce změn u exonu 6 genu *Idgf4*. Pro tento exon byly navrženy nejvíce specifické primery ze všech exonů. Přesto, že se zdál být tento exon nejkonzervovanější, právě v tomto exonu se odehrály důležité změny, které se promítly i do výsledného fylogenetického stromu. V genovém stromu exonu 6 *Idgf4* se druhy *Harmonia axyridis* a *Coleomegilla maculata* výrazně vydělily mimo své fylogenetické zařazení (Tomaszewka a spol., 2021, Nattier a spol., 2021). Exon 6 *Idgf4* u čeledi Coccinellidae kóduje α7β7 doménovou inzerci. Jedná se o místo vložené domény podílející se na vazbě substrátu a tepelné stabilitě proteinů podobných chitinázám. Podle M. Žurovcová a spol. (2019) bylo zjištěno, že je tato oblast často pozitivně selektovaná. Z předchozí studie na citlivost druhů *Harmonia axyridis* a *Coleomegilla maculata* vůči hlístovkové infekci je známo, že druh *Harmonia axyridis* je velice odolný vůči hlístovkové infekci (Shapiro-Ilan, Cottrell, 2005). Naopak *Coleomegilla maculata* je více zranitelná napadením hlístovkami. Jelikož právě tyto druhy se nejvíce liší v exonu 6 *Idgf4* od ostatních druhů své skupiny, je možné, že tento úsek je pozitivně selektován v souvislosti s imunitní reakcí.

V této práci bylo tedy dokázáno, že *Idgf2* a *Idgf4* patří mezi geny indukované imunitní odpovědí. V dalším zkoumání by bylo zajímavé zjistit, zda funkce proteinů IDGF je spojená spíše s pasivní imunitou, tedy zda se proteiny IDGF podílejí na stavbě epitelů, či zda se jedná o imunitu aktivní, kdy by proteiny IDGF mohly přímo ovlivňovat hemocyty a jejich aktivaci. Co se týče evoluce genů *Idgf2* a *Idgf4* u brouků čeledi slunéčkovití, výzkum by mohl pokračovat přidáním dalších sekvencí všech exonů za účelem provedení kompletní fylogenetické analýzy a selekčních testů založených na synonymních a nesynonymních substitucích.

7 ZÁVĚR

Byla dokázána indukce genů *Idgf2* i *Idgf4* u slunéčka *Harmonia axyridis* v průběhu hlístovkové infekce. Jedná se o první důkaz v rámci skupiny Coleoptera, že proteiny IDGF2 a IDGF4 jsou součásti imunitní odpovědi. Z výsledků je patrné, že *S. carpocapsae* u daného slunéčka vyvolává silnější indukci exprese genů IDGF než *S. feltiae*. Dále bylo zjištěno, že gen *Idgf2* je po infekci u obou druhů hlístovek více exprimován než gen *Idgf4*. Nejvyšší indukce exprese byla pozorována po 24 hodinách.

Povedlo se amplifikovat a následně osekvenovat exony genu kódují proteiny IDGF většiny druhů. Jelikož dva druhy, *Chilocorus bipustulatus* a *Exochomus quadripustulatus*, nefungovaly na stejné „obecné" primery jako ostatní druhy čeledi slunéčkovití, bylo dokázáno, že tyto druhy jsou evolučně odlišné od zbytku zkoumaných druhů.

Následně bylo zjištěno, že některé sekvence druhu nepatřících do podčeledi Coccinellinae, například *Cryptolaemus montrouzieri*, měly vliv na vztahy jiných druhů ve fylogenetickém stromu. Dále byla zkoumána evoluce genů kódující proteiny IDGF2 a IDGF4 u brouků čeledi slunéčkovití. Bylo zjištěno, že zejména geny druhů *Harmonia axyridis* a *Coleomegilla maculata* se vyvíjejí nezávisle na zbytku skupiny. Výrazně se odlišuje zejména exon 6 genu *Idgf4*, jenž kóduje oblast, kde se u jiných druhů hmyzu často vyskytují pozitivně selektované změny.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AV ČR = Akademie věd České republiky

PřF = Přírodovědecká fakulta

ČZU = Česká zemědělská univerzita

S2 = „Schneider line-2“

DNA = Deoxyribonukleová kyselina

RNA = Ribonukleová kyselina

RNAi = RNA interverence

PCR = Polymerázová řetězová reakce

RT qPCR = Real-Time kvantitativní Polymerázová řetězová reakce

dNTP = deoxyribonukleosidtrifosfáty

ExoSAP = „Exonuclease I“ (*Escherichia coli*), „Shrimp Alkaline Phosphatase“

°C = stupně Celsia

DEPC voda = Voda bez nukleáz, sterilně filtrovaná s přídavkem DEPC (diethyl pyrokarbonát) a autoklávovaná.

ddH_2O = deionizovaná voda

rDNáza = deoxyribonukleáza bez příměsi ribonukleáz

RNáza = ribonukleáza

Tris = tris(hydroxymethyl)aminomethan

HCl = kyselina chlorovodíková

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová

NaCl = chlorid sodný

TAE pufr = Tris-acetát-EDTA pufr

UV = ultrafialové záření

LB médium = „Lysogeny broth“ médium

pH = vodíkový exponent

např. = například

Ct = prahová hodnota cyklu

ANOVA = analýza rozptylu

bp = pár bází

a spol. = a spoluautoři

č. = číslo

Pozn. = poznámka

BLAST = „basic local alignment search tool“

SBL = „Shared Branch Length“

Fyl. strom = fylogenetický strom

GTR = „General Time Reversible“ model s proměnnými hodnotami frekvencí bází a proměnnými hodnotami přeměn

TN93 = „Tamura and Nei (1993)“ substituční model s různými hodnotami proměn pro tranzice a pro transverze, přeměnu purinu a pyrimidinů a proměnnými hodnotami frekvencí bází

HKY85 = „Hasegawa-Kishino-Yano“ substituční model s různými hodnotami proměn pro tranzice a pro transverze a proměnnými hodnotami frekvencí bází

+ G = s gamma distribucí

+ I = „Invariable sites“ model

Q.plant = substituční model pro nukleární proteiny založený na Q matrici

+ R = s gamma distribucí s relaxovými předpoklady

9 SEZNAM LITERATURY

ALTSCHUL, Stephen F., Warren GISH, Webb MILLER, Eugene W. MYERS a David J. LIPMAN, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* [online]. **215**(3), 403-410 [cit. 2022-10-29]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2

AREFIN, Badrul, Lucie KUČEROVÁ, Pavel DOBES et al., 2014. Genome-Wide Transcriptional Analysis of Drosophila Larvae Infected by Entomopathogenic Nematodes Shows Involvement of Complement, Recognition and Extracellular Matrix Proteins. *Journal of Innate Immunity* [online]. **6**(2), 192-204 [cit. 2022-11-05]. ISSN 1662-811X. Dostupné z: doi:10.1159/000353734

ASGARI, Sassan a Otto SCHMIDT, 2004. Isolation of an imaginal disc growth factor homologue from Pieris rapae and its expression following parasitization by Cotesia rubecula. *Journal of Insect Physiology* [online]. **50**(8), 687-694 [cit. 2022-10-01]. ISSN 00221910. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinsphys.2004.05.003

BROŽ, Vaclav, Lucie KUČEROVÁ, Lenka ROUHOVÁ, Jana FLEISCHMANNOVA, Hynek STRNAD, Peter J. BRYANT a Michal ZUROVEC, 2017. Drosophila imaginal disc growth factor 2 is a trophic factor involved in energy balance, detoxification, and innate immunity. *Scientific Reports* [online]. **7**(1) [cit. 2022-10-02]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep43273

DE GREGORIO, Ennio, Paul T. SPELLMAN, Gerald M. RUBIN a Bruno LEMAITRE, 2001. Genome-wide analysis of the Drosophila immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **98**(22), 12590-12595 [cit. 2022-11-05]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.221458698

DIETZL, Georg, 2002. *Single Fly Genomic DNA Prep* [online]. IMP Vienna [cit. 2022-10-04].

EBEID, Amany Ramadan, Atef ABDEL-RAHMAN a Mohamed Ahmed GESRAHA, 2014. Virulence of native entomopathogenic nematodes against the spotted oriental cucumber beetle, Epilachna chrysomelina (F.) (Coleoptera: Coccinellidae) in laboratory and semi-field experiments. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. Cairo, Egypt: Egyptian Society for Biological Control of Pests, (24), 53-56. ISSN 1110-1768.

ESPINOZA, Claudia Y. a Celeste A. BERG, 2020. Detecting New Allies: Modifier Screen Identifies a Genetic Interaction Between Imaginal disc growth factor 3 and combover, a Rho-kinase Substrate, During Dorsal Appendage Tube Formation in Drosophila. *G3 Genes|Genomes|Genetics* [online]. **10**(10), 3585-3599 [cit. 2022-09-22]. ISSN 2160-1836. Dostupné z: doi:10.1534/g3.120.401476

FOLMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. VRIJENHOEK a R. LUTZ, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. **3**(5), 294-299.

GAO, Yun, Yun-Cai LIU, Shun-Ze JIA et al., 2020. Imaginal disc growth factor maintains cuticle structure and controls melanization in the spot pattern formation of Bombyx mori.

PLOS Genetics [online]. **16**(9) [cit. 2022-09-22]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1008980

GAUTIER, Mathieu, Junichi YAMAGUCHI, Julien FOUCAUD et al., 2018. The Genomic Basis of Color Pattern Polymorphism in the Harlequin Ladybird. *Current Biology* [online]. **28**(20), 3296-33027 [cit. 2022-09-01]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2018.08.023

GUINDON, Stéphane, Jean-François DUFAYARD, Vincent LEFORT, Maria ANISIMOVA, Wim HORDIJK a Olivier GASCUEL, 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* [online]. **59**(3), 307-321 [cit. 2022-10-29]. ISSN 1076-836X. Dostupné z: doi:10.1093/sysbio/syq010

HALL, Thomas A., 1999. BIOEDIT: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series* [online]. Oxford University Press, (41), 95-98 [cit. 2022-10-29]. Dostupné z: doi:10.14601/phytopathol_mediterr-14998u1.29

HODEK, Ivo a Alois HONĚK, 1996. *Ecology of Coccinellidae* [online]. 1. Dordrecht: Springer Netherlands [cit. 2022-07-28]. ISBN 978-90-481-4736-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-017-1349-8

HUANG, Zhipeng, Wayne B. HUNTER, Cathy A. CLELAND, Murray WOLINSKY, Stephen L. LAPOINTE a Charles A. POWELL, 2006. A NEW MEMBER OF THE GROWTH-PROMOTING GLYCOPROTEINS FROM DIAPREPES ROOT WEEVIL (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). *Florida Entomologist* [online]. **89**(2), 223-232 [cit. 2022-08-22]. ISSN 0015-4040. Dostupné z: doi:10.1653/0015-4040(2006)89[223:ANMOTG]2.0.CO;2

CHE, LiHeng, Peng ZHANG, ShaoHong DENG et al., 2021. New insights into the phylogeny and evolution of lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) by extensive sampling of genes and species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. **156** [cit. 2022-09-29]. ISSN 10557903. Dostupné z: doi:10.1016/j.ympev.2020.107045

KAWAMURA, Kazuo, Tatsuhiro SHIBATA, Olivier SAGET, David PEEL a Peter J. BRYANT, 1999. A new family of growth factors produced by the fat body and active on Drosophila imaginal disc cells. *Development* [online]. **126**(2), 211-219 [cit. 2022-08-15]. ISSN 1477-9129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.126.2.211

KAYA, H. K. a R. GAUGLER, 1993. Entomopathogenic Nematodes. *Annual Review of Entomology* [online]. **38**(1), 181-206 [cit. 2022-10-08]. ISSN 0066-4170. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.en.38.010193.001145

KIRKPATRICK, Robert B, Rosalie E MATICO, Dean E MCNULTY, James E STRICKLER a Martin ROSENBERG, 1995. An abundantly secreted glycoprotein from Drosophila melanogaster is related to mammalian secretory proteins produced in rheumatoid tissues and by activated macrophages. *Gene* [online]. **153**(2), 147-154 [cit. 2022-09-08]. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/0378-1119(94)00756-I

KUČEROVÁ, Lucie, Vaclav BROŽ, Badrul AREFIN, Houda Ouns MAAROUFI, Jana HURYCHOVA, Hynek STRNAD, Michal ŽUROVEC a Ulrich THEOPOLD, 2016. The Drosophila Chitinase-Like Protein IDGF3 Is Involved in Protection against Nematodes and in Wound Healing. *Journal of Innate Immunity* [online]. **8**(2), 199-210 [cit. 2022-09-27]. ISSN 1662-811X. Dostupné z: doi:10.1159/000442351

LEFORT, Vincent, Jean-Emmanuel LONGUEVILLE a Olivier GASCUEL, 2017. SMS: Smart Model Selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution* [online]. **34**(9), 2422-2424 [cit. 2022-10-30]. ISSN 0737-4038. Dostupné z: doi:10.1093/molbev/msx149

MATSUSHITA, Takefumi, Ikuko FUJII-TAIRA, Yasuhiro TANAKA, Koichi J. HOMMA a Shunji NATORI, 2000. Male-specific IDGF, a Novel Gene Encoding a Membrane-bound Extracellular Signaling Molecule Expressed Exclusively in Testis of Drosophila melanogaster. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **275**(47), 36934-36941 [cit. 2022-09-01]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M003455200

METWALLY, Hala, Al-kazafy Hassan SABRY a Nevien M. GABER, 2016. Biosafety of Different Entomopathogenic Nematodes Species on Some Insects Natural Enemies. *RESEARCH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL BIOLOGICAL AND CHEMICAL SCIENCES*. **7**(6), 1878-1883. ISSN 0975-8585.

NATTIER, Romain, Alice MICHEL-SALZAT, Lucia M. ALMEIDA, Pascaline CHIFFLET-BELLE, Alexandra MAGRO, Karen SALAZAR a Gael J. KERGOAT, 2021. Phylogeny and divergence dating of the ladybird beetle tribe Coccinellini Latreille (Coleoptera: Coccinellidae. *Systematic Entomology* [online]. **46**(3), 632-648 [cit. 2022-09-30]. ISSN 0307-6970. Dostupné z: doi:10.1111/syen.12480

NEDVĚD, Oldřich a Milan DJURIć, 2022. *Ladybirds of Europe*. 1. Novi Sad, Serbia: HabiProt. ISBN 978-86-912033-4-4.

PESCH, Yanina-Yasmin, Dietmar RIEDEL, Kapil R PATIL, Gerrit LOCH a Matthias BEHR, 2016. Chitinases and Imaginal disc growth factors organize the extracellular matrix formation at barrier tissues in insects. *Scientific Reports* [online]. **6**(1) [cit. 2022-09-11]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep18340

PINTEAC, Rucsanda, Xavier MONTALBAN a Manuel COMABELLA, 2020. Chitinases and chitinase-like proteins as biomarkers in neurologic disorders. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation* [online]. **8**(1) [cit. 2022-08-14]. ISSN 2332-7812. Dostupné z: doi:10.1212/NXI.0000000000000921

PŮŽA, Vladimír, Jiří NERMUŤ, Jana KONOPICKÁ a Oxana SKOKOVÁ HABUŠTOVÁ, 2021. Efficacy of the Applied Natural Enemies on the Survival of Colorado Potato Beetle Adults. *Insects* [online]. **12**(11) [cit. 2022-11-02]. ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects12111030

ROY, Miltan Chandra a Yonggyun KIM, 2020. Tolerance of the mealworm beetle, Tenebrio molitor, to an entomopathogenic nematode, Steinernema feltiae, at two infection foci, the intestine and the hemocoel. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. **174** [cit. 2022-11-02]. ISSN 00222011. Dostupné z: doi:10.1016/j.jip.2020.107428

SHAPIRO-ILAN, David I. a Ted E. COTTRELL, 2005. Susceptibility of lady beetles (Coleoptera: Coccinellidae) to entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. **89**(2), 150-156 [cit. 2022-10-08]. ISSN 00222011. Dostupné z: doi:10.1016/j.jip.2005.04.002

SHI, L. a S. M. PASKEWITZ, 2004. Identification and molecular characterization of two immune-responsive chitinase-like proteins from Anopheles gambiae. *Insect Molecular Biology* [online]. **13**(4), 387-398 [cit. 2022-11-05]. ISSN 09621075. Dostupné z: doi:10.1111/j.0962-1075.2004.00496.x

SHI, Xiao-Qin, Wen-Chao GUO, Pin-Jun WAN, Li-Tao ZHOU, Xiang-Liang REN, Tursun AHMAT, Kai-Yun FU a Guo-Qing LI, 2013. Validation of reference genes for expression analysis by quantitative real-time PCR in Leptinotarsa decemlineata (Say). *BMC Research Notes* [online]. **6**(1) [cit. 2022-10-05]. ISSN 1756-0500. Dostupné z: doi:10.1186/1756-0500-6-93

SICARD, Mathieu, Karine BRUGIRARD-RICAUD, Sylvie PAGèS, Anne LANOIS, Noel E. BOEMARE, Michel BREHÉLIN a Alain GIVAUDAN, 2004. Stages of Infection during the Tripartite Interaction between Xenorhabdus nematophila , Its Nematode Vector, and Insect Hosts. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **70**(11), 6473-6480 [cit. 2022-11-05]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.70.11.6473-6480.2004

ŠEDRLOVÁ, Aneta, 2006. *Využití entomopatogenních hlístovek v biologickém boji proti vybraným hmyzím škůdcům*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Vedoucí práce RNDr. Pavel Hyršl, Ph.D.

TAMURA, Koichiro, Glen STECHER, Daniel PETERSON, Alan FILIPSKI a Sudhir KUMAR, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* [online]. **30**(12), 2725-2729 [cit. 2022-10-29]. ISSN 1537-1719. Dostupné z: doi:10.1093/molbev/mst197

TOMASZEWSKA, Wioletta, Hermes E. ESCALONA, Diana HARTLEY et al., 2021. Phylogeny of true ladybird beetles (Coccinellidae: Coccinellini) reveals pervasive convergent evolution and a rapid Cenozoic radiation. *Systematic Entomology* [online]. **46**(3), 611-631 [cit. 2022-09-30]. ISSN 0307-6970. Dostupné z: doi:10.1111/syen.12479

VARELA, Paloma F., Andrea S. LLERA, Roy A. MARIUZZA a José TORMO, 2002. Crystal Structure of Imaginal Disc Growth Factor-2. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **277**(15), 13229-13236 [cit. 2022-08-22]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M110502200

WANG, Hua-Bing, Takashi SAKUDOH, Hideki KAWASAKI et al., 2009. Purification and expression analysis of imaginal disc growth factor in the silkworm, Bombyx mori. *Journal of Insect Physiology* [online]. **55**(11), 1065-1071 [cit. 2022-09-01]. ISSN 00221910. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinsphys.2009.08.001

WARE, Remi, 2005. The ladybird life cycle. In: *UK Ladybird Survey* [online]. [cit. 2022-09-10].

WERLE, E., C. SCHNEIDER, M. RENNER, M. VÖLKER a W. FIEHN, 1994. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research* [online]. **22**(20), 4354-4355 [cit. 2022-09-22]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/22.20.4354

YADAV, Shruti a Ioannis ELEFTHERIANOS, 2018. The Imaginal Disc Growth Factors 2 and 3 participate in the Drosophila response to nematode infection. *Parasite Immunology* [online]. **40**(10) [cit. 2022-09-27]. ISSN 01419838. Dostupné z: doi:10.1111/pim.12581

ZHU, Jia-ying, Qi FANG, Gong-yin YE a Cui HU, 2011. Proteome changes in the plasma of Pieris rapae parasitized by the endoparasitoid wasp Pteromalus puparum. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* [online]. **12**(2), 93-102 [cit. 2022-10-01]. ISSN 1673-1581. Dostupné z: doi:10.1631/jzus.B1000158

ZHU, Qingsong, Yasuyuki ARAKANE, Debarshi BANERJEE, Richard W. BEEMAN, Karl J. KRAMER a Subbaratnam MUTHUKRISHNAN, 2008a. Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. **38**(4), 452-466 [cit. 2022-09-02]. ISSN 09651748. Dostupné z: doi:10.1016/j.ibmb.2007.06.010

ZHU, Qingsong, Yasuyuki ARAKANE, Richard W. BEEMAN, Karl J. KRAMER a Subbaratnam MUTHUKRISHNAN, 2008b. Functional specialization among insect chitinase family genes revealed by RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **105**(18), 6650-6655 [cit. 2022-11-05]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0800739105

ŽUROVCOVÁ, Martina, Vladimir BENEŠ, Michal ŽUROVEC a Lucie KUČEROVÁ, 2019. Expansion of Imaginal Disc Growth Factor Gene Family in Diptera Reflects the Evolution of Novel Functions. *Insects* [online]. **10**(10) [cit. 2022-09-27]. ISSN 2075-4450. Dostupné z: doi:10.3390/insects10100365

10 PŘÍLOHY

Příloha č. 1

V následujících dvou tabulkách byly zapsány evidenční čísla použitých sekvencí k navržení primerů.

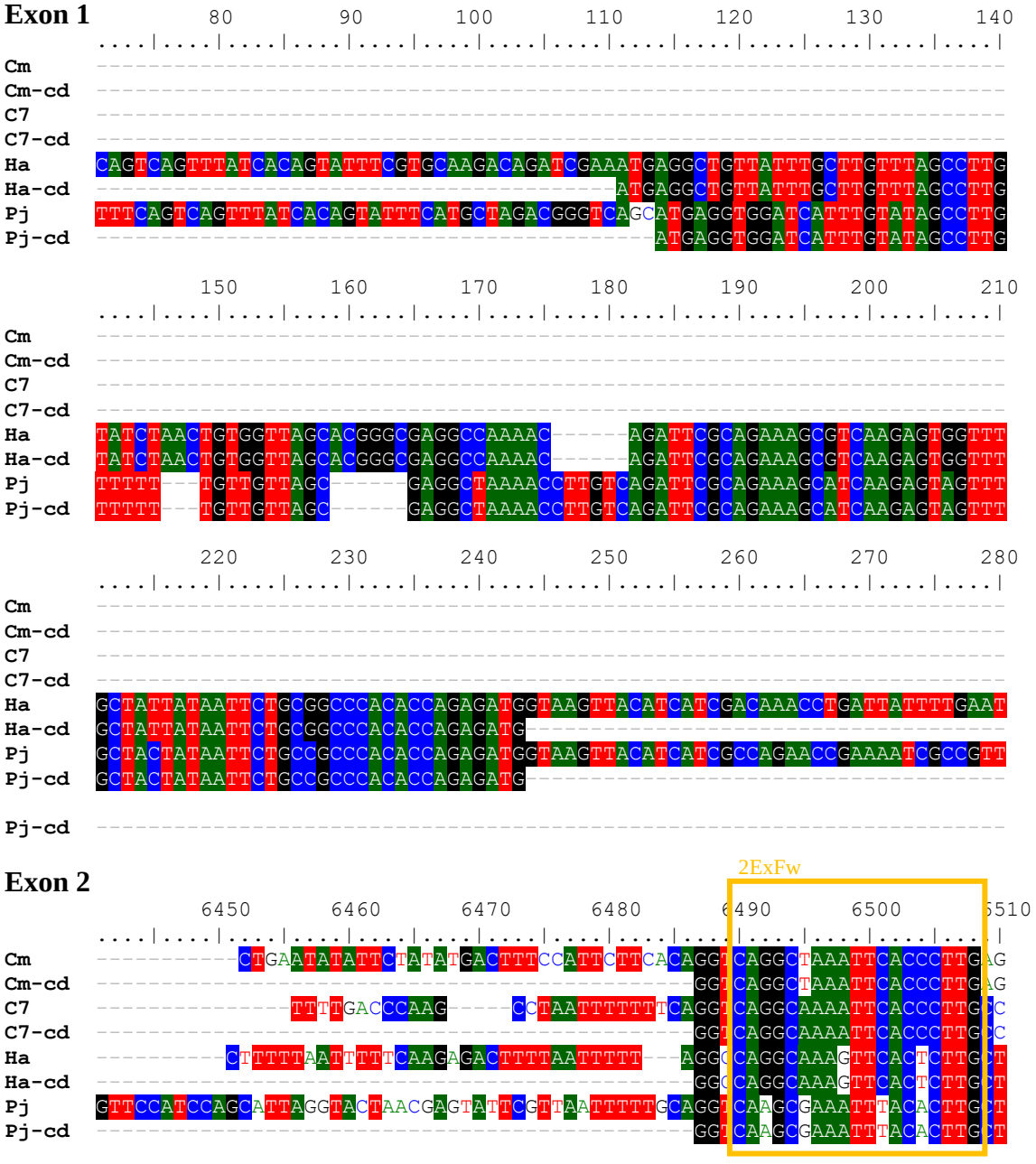
Evidenční číslo	Druh
JABFTP010000071.1	*Cryptolaemus montrouzieri*
BHEC01008642.1	*Coccinella septempunctata*
BHEC01031170.1	*Coccinella septempunctata*
Contig275 Contig275:184870..190048	*Harmonia axyridis*
Contig275 Contig275:179589..183448	*Harmonia axyridis*
JACDNR010001074.1	*Propylea japonica*
CM024239.1	*Propylea japonica*

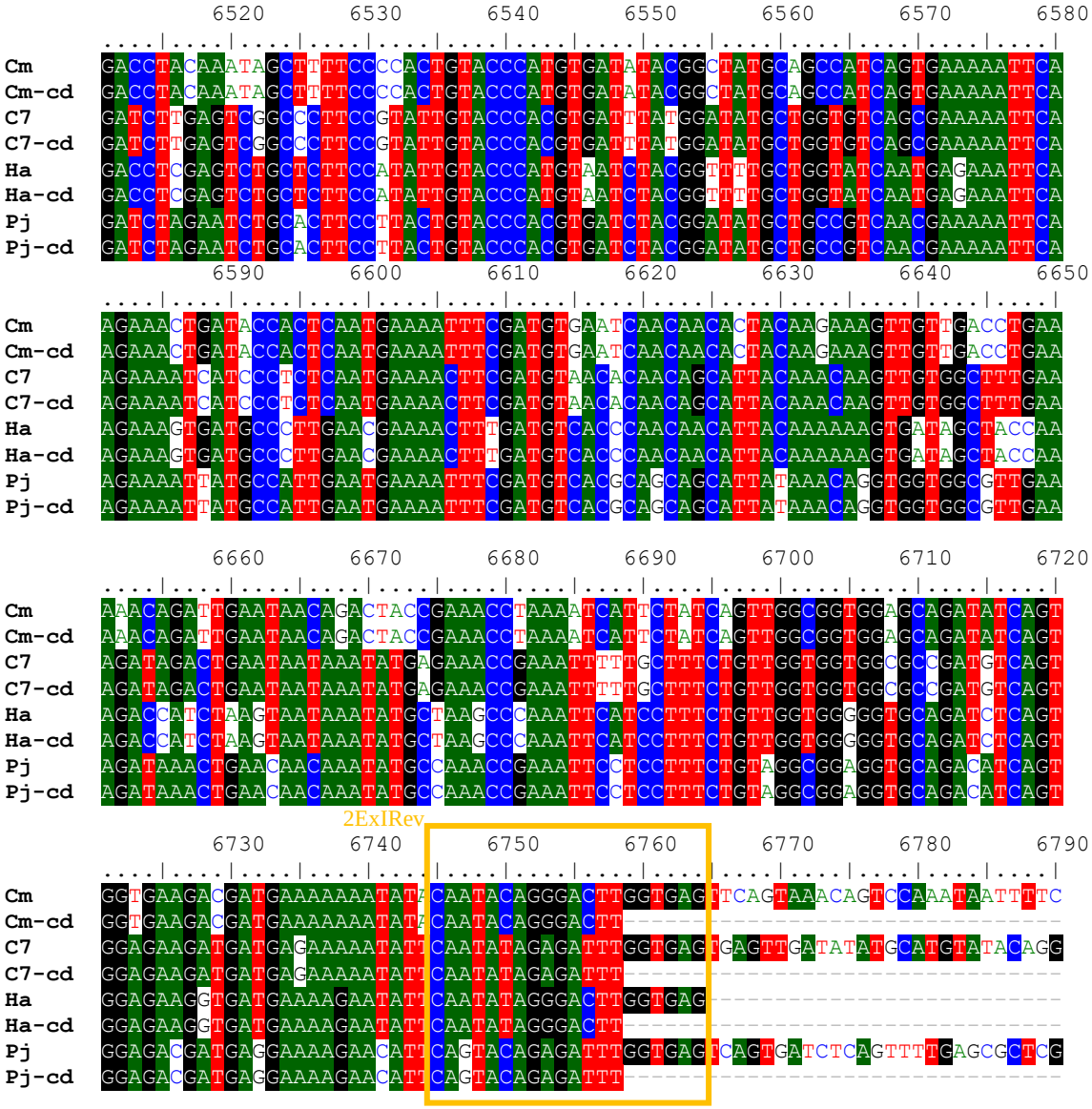
Evidenční číslo	Druh
KX087296.1:2249-3754	*Harmonia quadripunctata*
KJ965564.1	*Hippodamia variegata*
KU910147.1	*Tytthaspis sedecimpunctata*
KU917998.1	*Psyllobora vigintiduopunctata*
KU918089.1	*Chilocorus bipustulatus*
KU917285.1	*Subcoccinella vigintiquatuorpunctata*
KM442499.1	*Coccinula quatuordecimpustulata*
KM450902.1	*Exochomus quadripustulatus*
KR486311.1	*Coleomegilla maculata*
JF888337.1	*Calvia quatuordecimguttata*
KY846705.1	*Propylea quatuordecimpunctata*
KU918775.1	*Anatis ocellata*
HQ984421.1	*Hippodamia convergens*
HQ948244.1	*Hippodamia notata*
KJ963950.1	*Sospita vigintiguttata*
KU918783.1	*Coccinella quinquepunctata*
KU908528.1	*Cynegetis impunctata*
KU917933.1	*Hippodamia undecimnotata*
KM439619.1	*Coccinella magnifica*
KU919438.1	*Myrrha octodecimguttata*
KY492359.1	*Cryptolaemus montrouzieri*
HQ984397.1	*Coccinella septempunctata*
KM207067.1	*Propylea japonica*
MF973573.1	*Harmonia axyridis*

Příloha č. 2

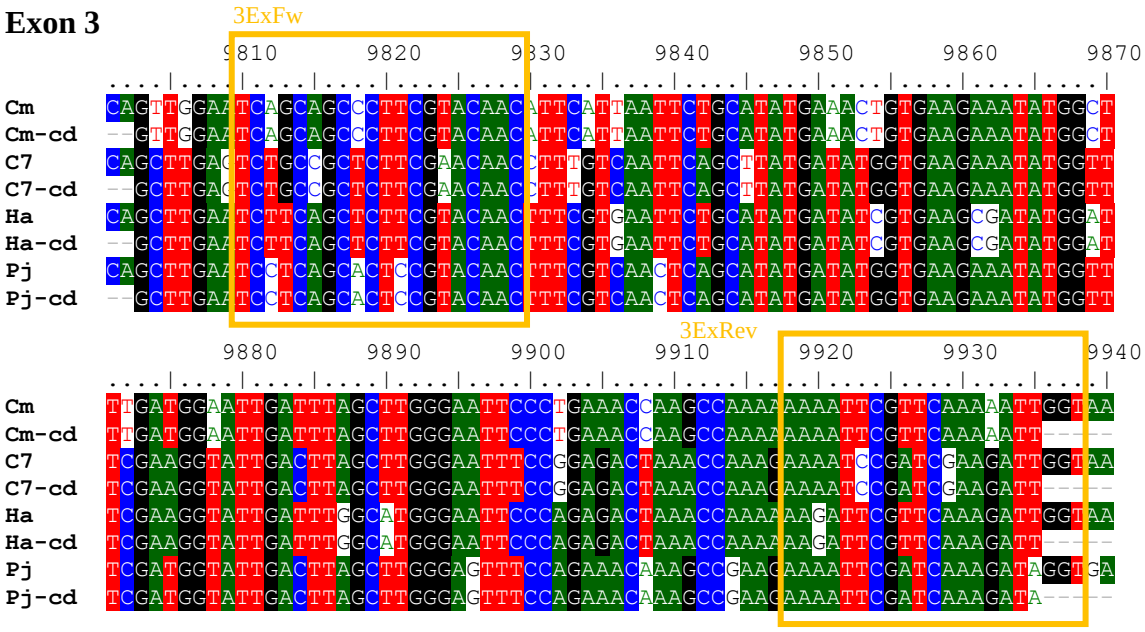
Následuje shrnutí zarovnání sekvencí s primery vyznačenými rámečkem pro každý exon. Oranžovou barvou jsou označeny místa primerů, které byli ve výsledku použity. Šedé rámečky označují místa navržených primerů, které nefungovali a bylo potřeba najít jiný primer, který později fungoval.

Idgf2

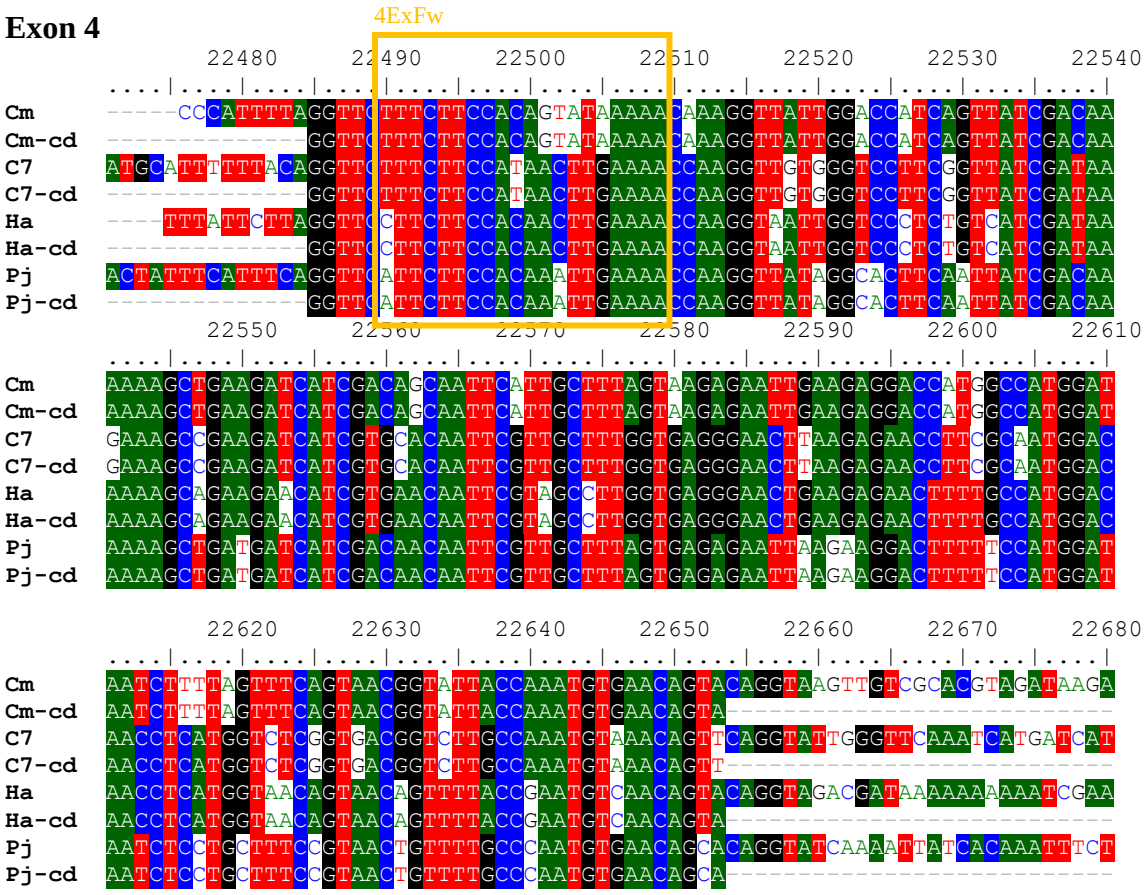



6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580
Cm
Cm-cd
C7
C7-cd
Ha
Ha-cd
Pj
Pj-cd
6590 6600 6610 6620 6630 6640 6650
6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720
6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790
2ExIRev

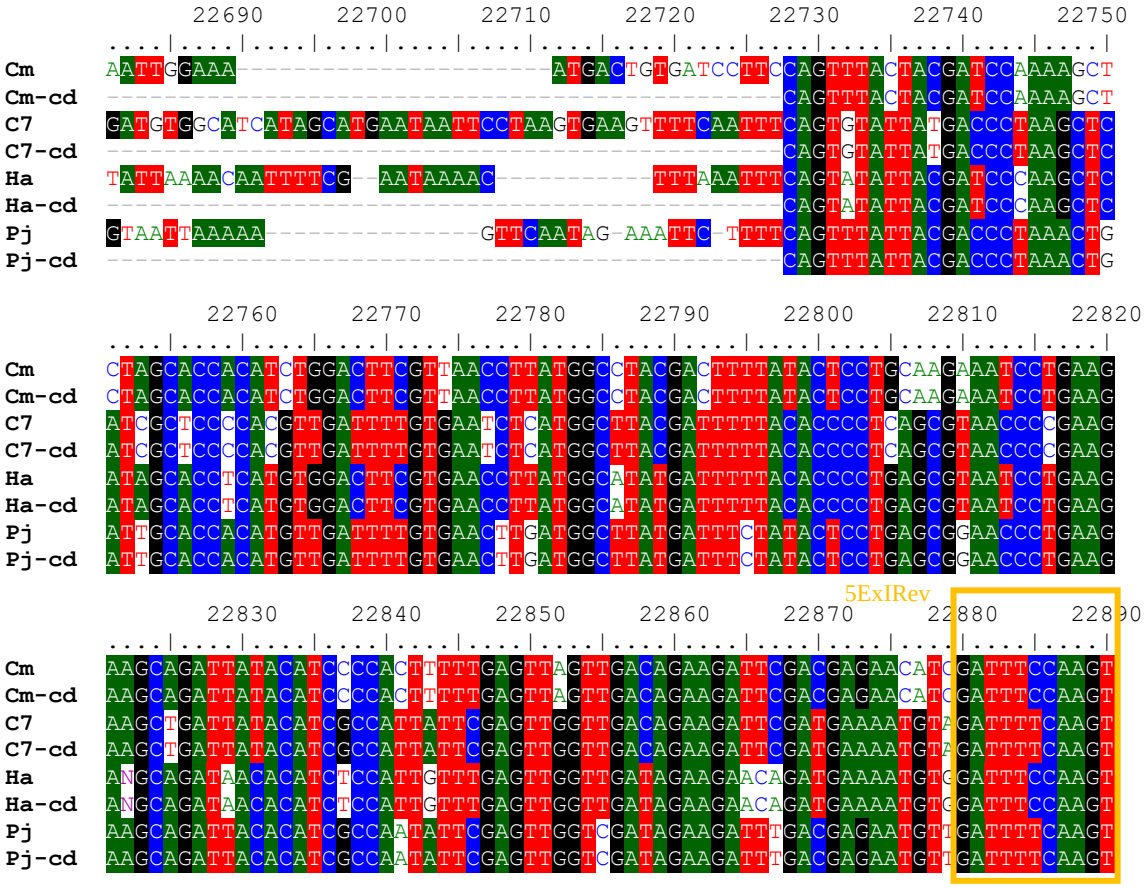
Exon 3

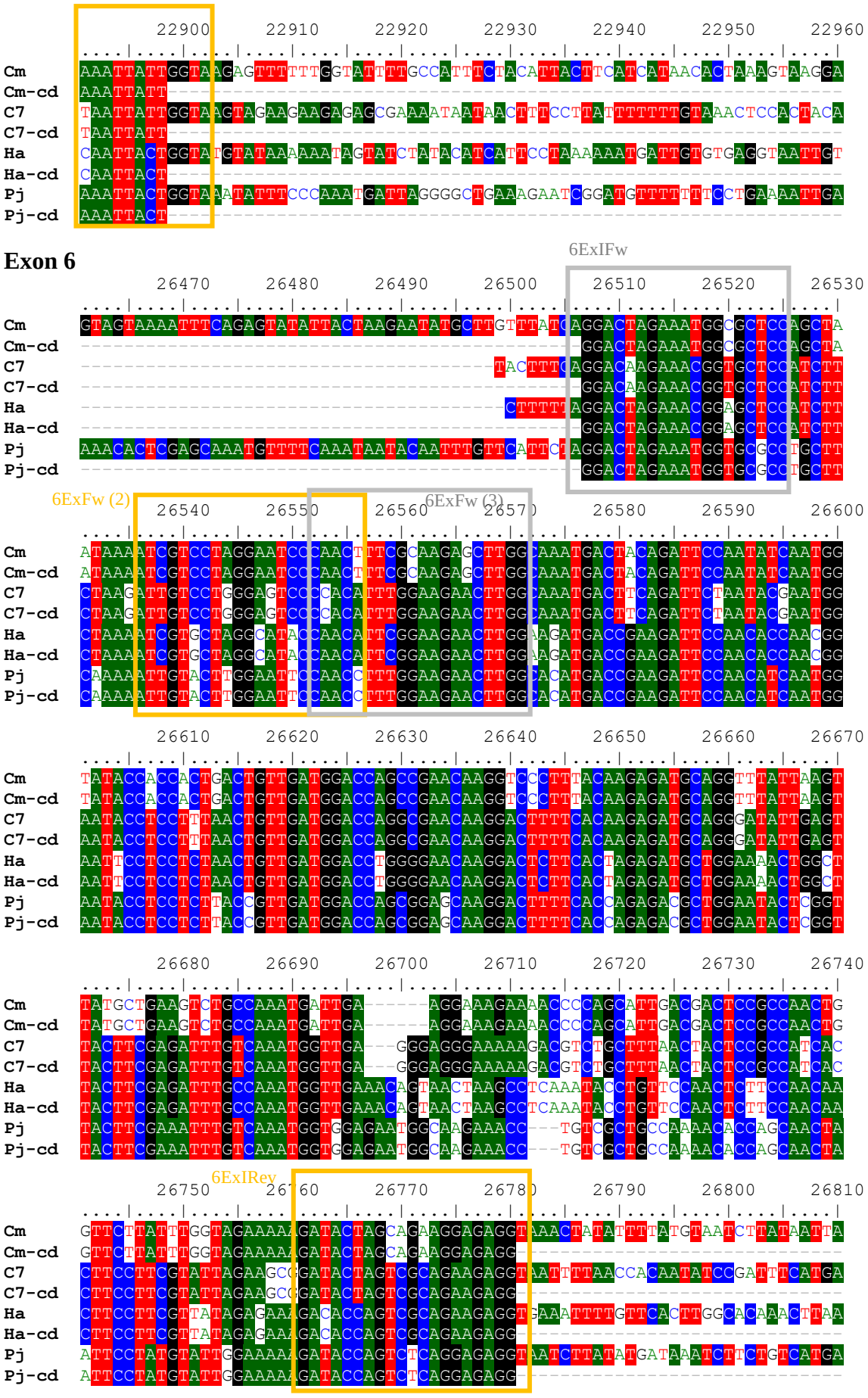

3ExFw
9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870
Cm
Cm-cd
C7
C7-cd
Ha
Ha-cd
Pj
Pj-cd
3ExRev
9880 9890 9900 9910 9920 9930 9940

Exon 4

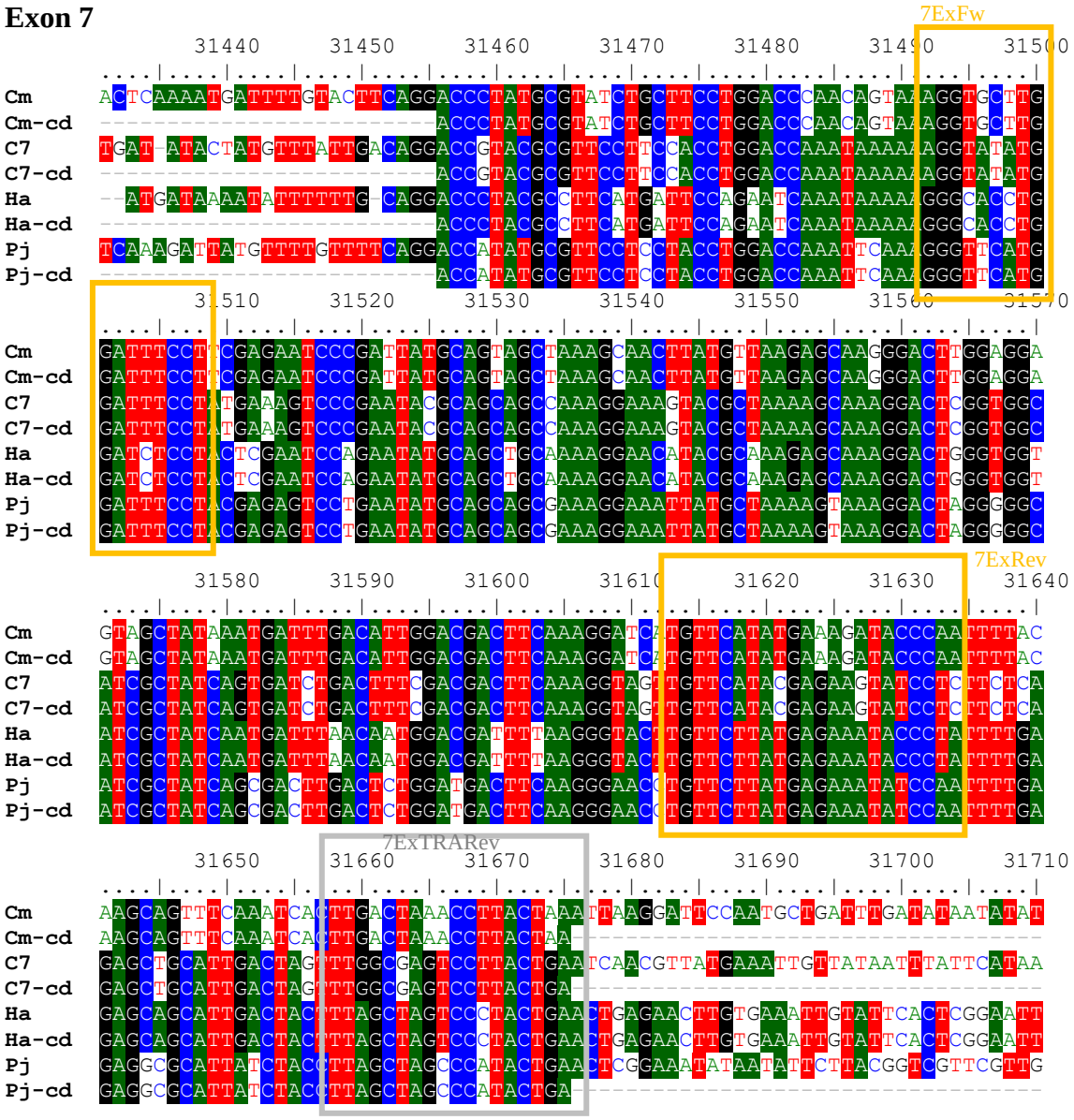

4ExFw
22480
22490
22500
22510
22520
22530
22540
Cm
Cm-cd
C7
C7-cd
Ha
Ha-cd
Pj
Pj-cd
22550
22560
22570
22580
22590
22600
22610
22620
22630
22640
22650
22660
22670
22680

Exon 5


22690
22700
22710
22720
22730
22740
22750
Cm
Cm-cd
C7
C7-cd
Ha
Ha-cd
Pj
Pj-cd
22760
22770
22780
22790
22800
22810
22820
22830
22840
22850
22860
22870
22880
5ExIRev

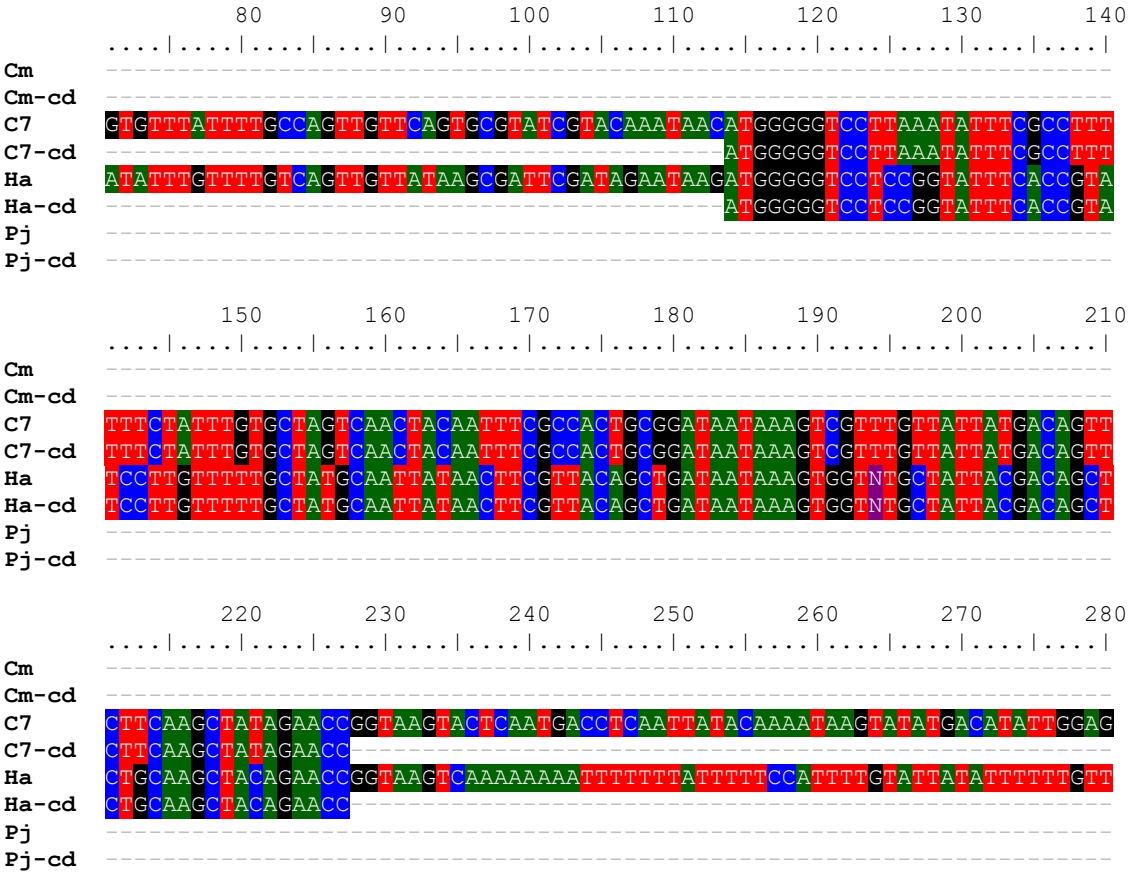

Exon 6
6ExIFw
6ExFw (2)
6ExFw (3)
6ExIRev
Cm
Cm-cd
C7
C7-cd
Ha
Ha-cd
Pj
Pj-cd

Exon 7

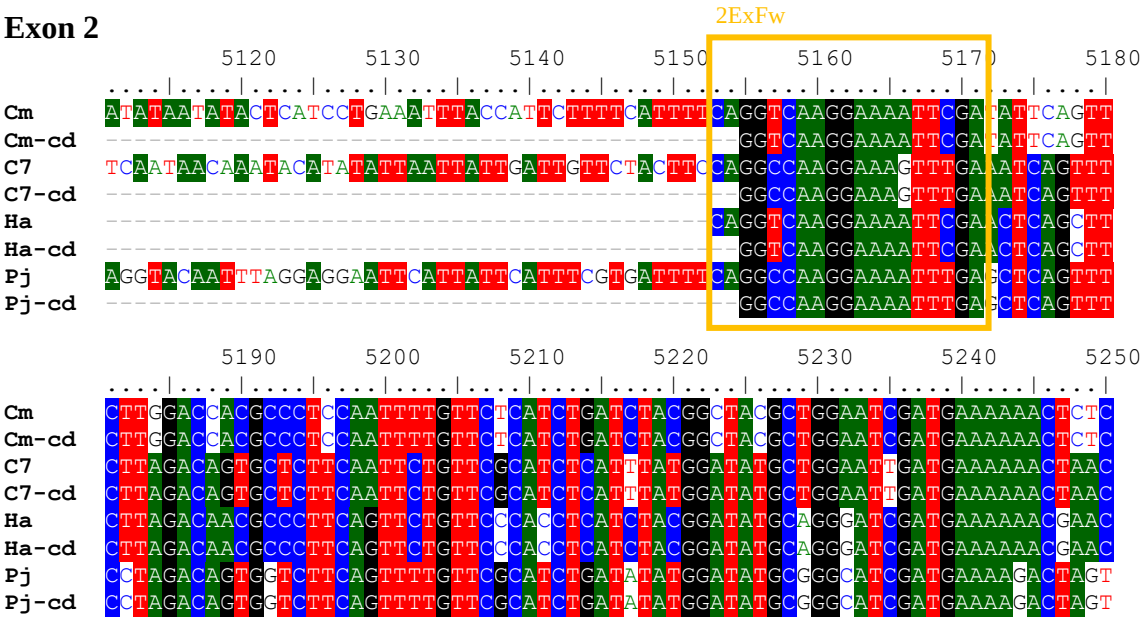


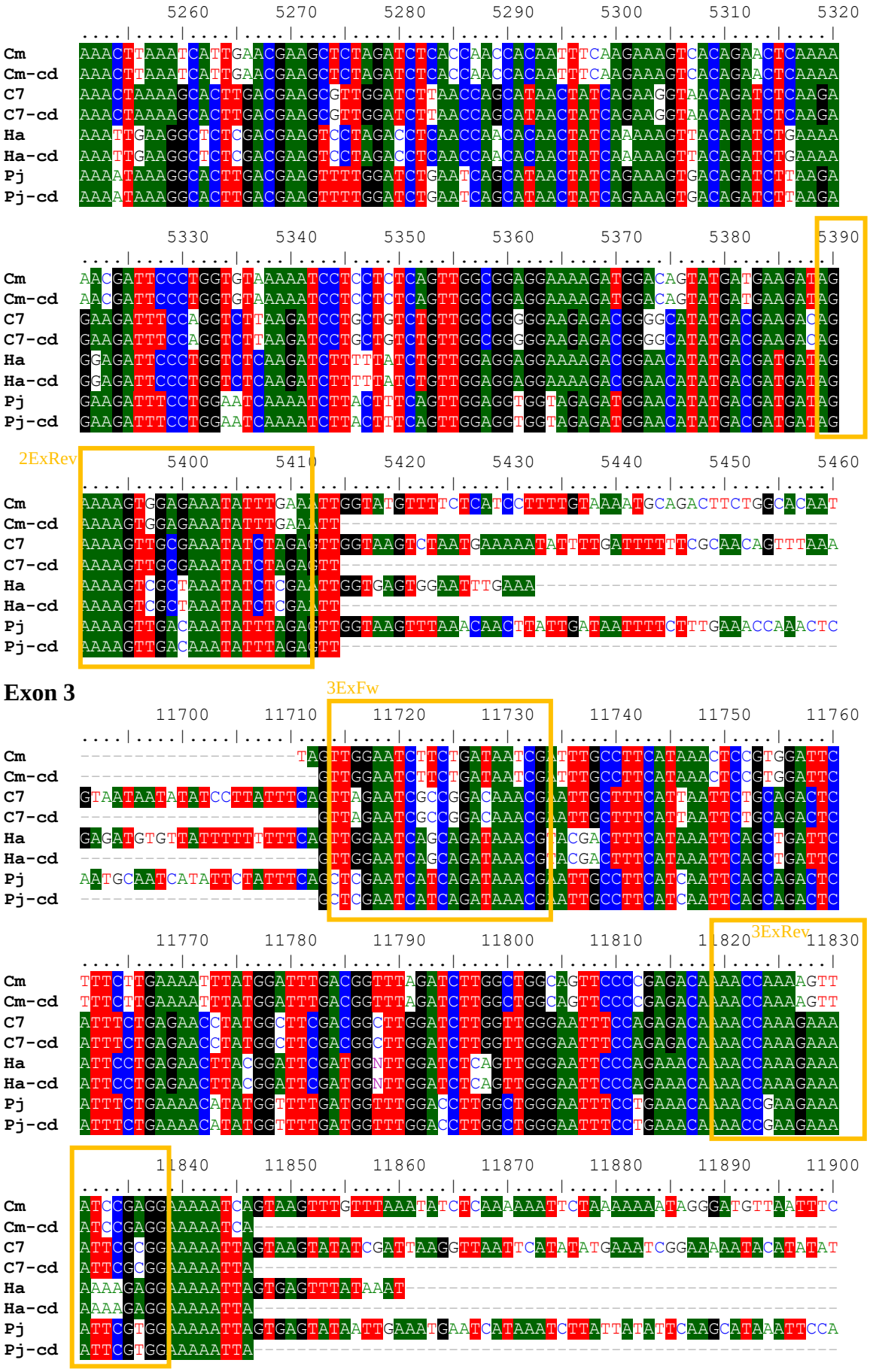
Idgf4

Exon 1

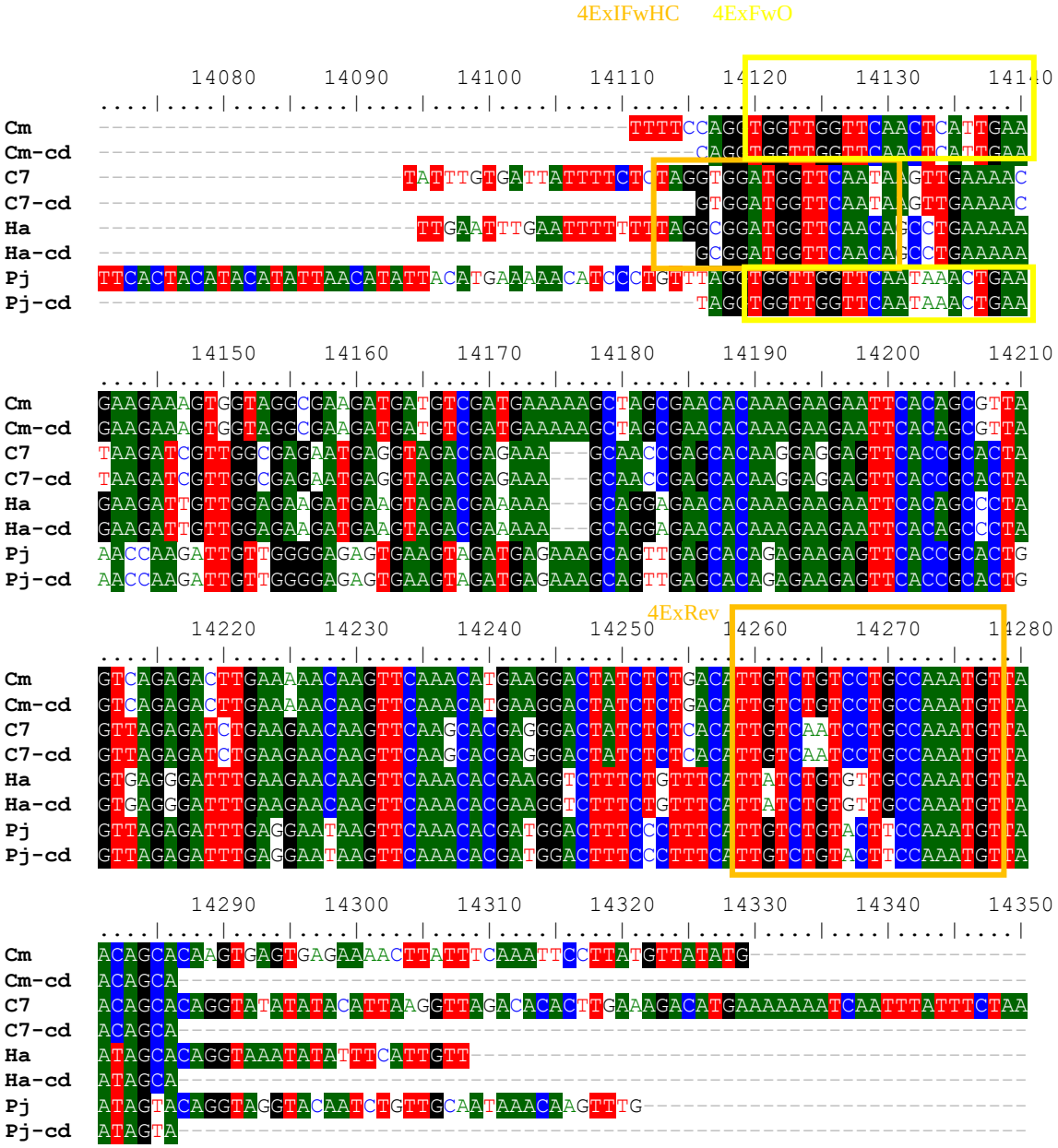


Exon 2

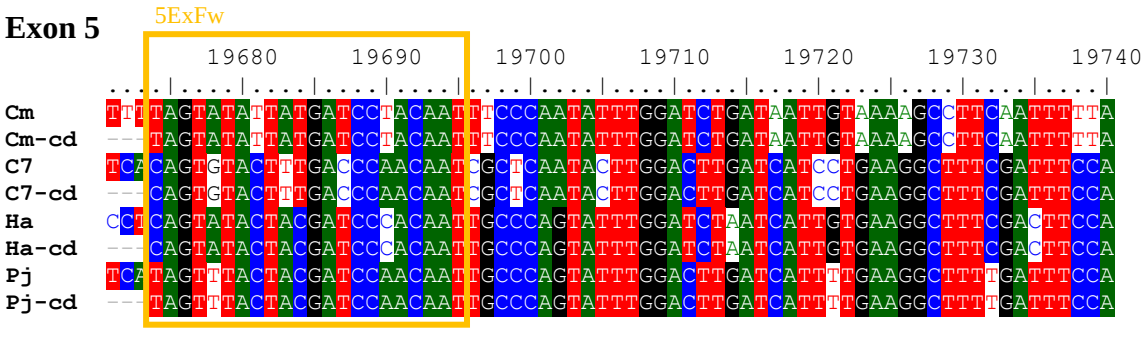


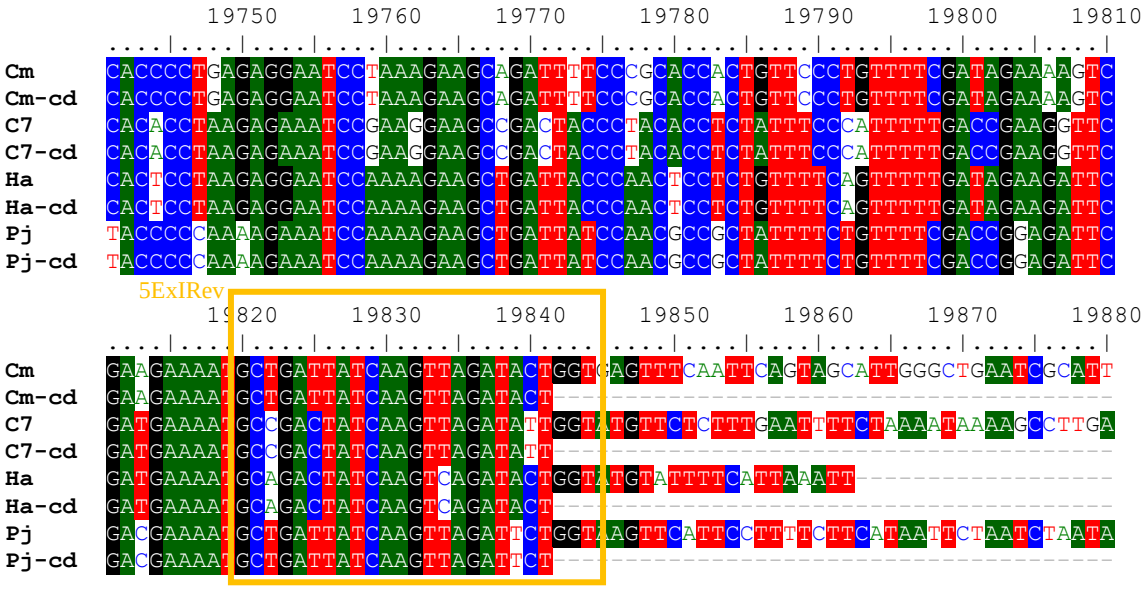

5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
Cm
Cm-cd
C7
C7-cd
Ha
Ha-cd
Pj
Pj-cd
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
2ExRev
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
Exon 3
3ExFw
11700
11710
11720
11730
11740
11750
11760
11770
11780
11790
11800
11810
11820
11830
3ExRev
11840
11850
11860
11870
11880
11890
11900

Exon 4

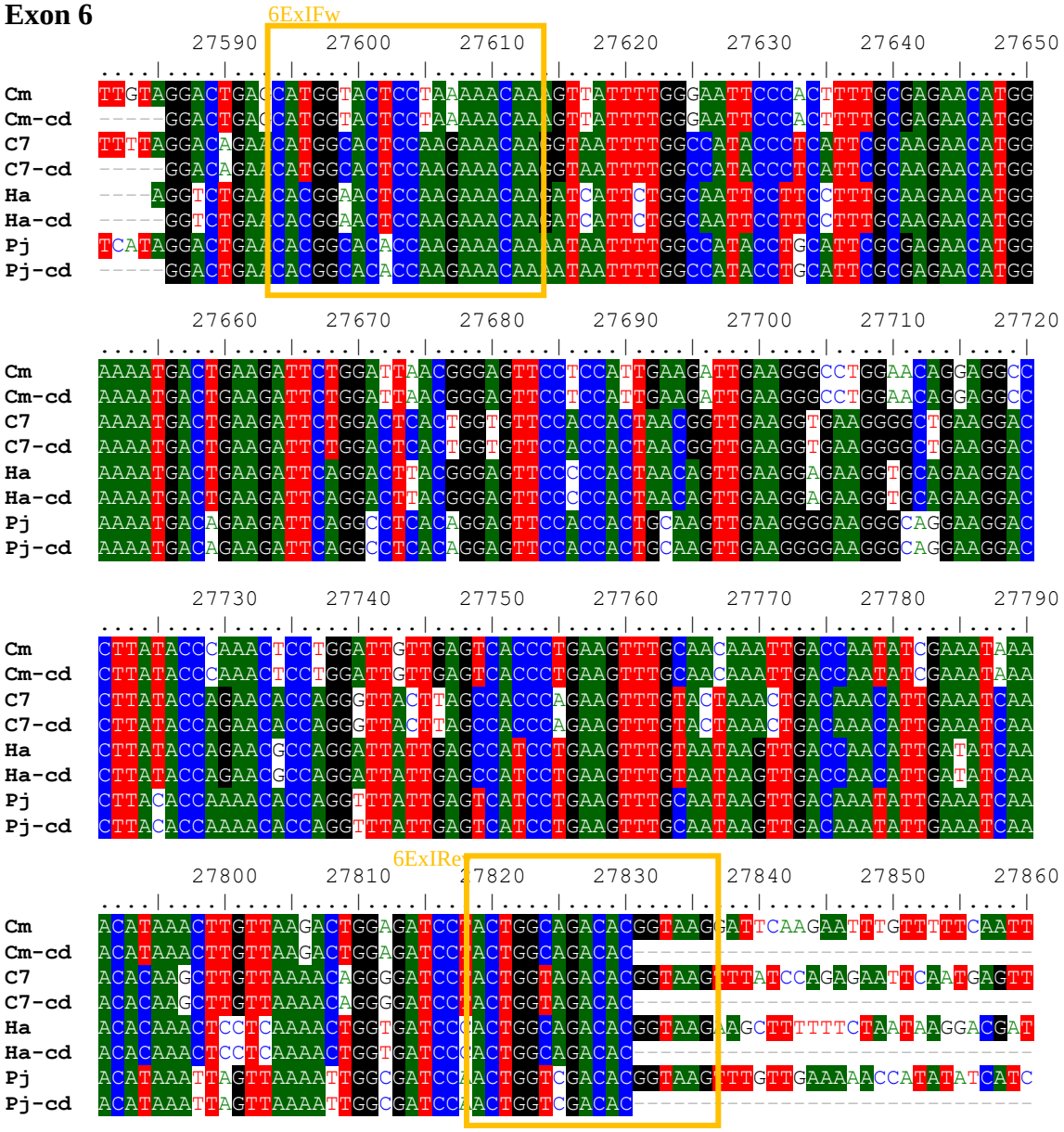

4ExIFwHC
4ExFwO
4ExRev
14080
14090
14100
14110
14120
14130
14140
14150
14160
14170
14180
14190
14200
14210
14220
14230
14240
14250
14260
14270
14280
14290
14300
14310
14320
14330
14340
14350
Cm
Cm-cd
C7
C7-cd
Ha
Ha-cd
Pj
Pj-cd

Exon 5

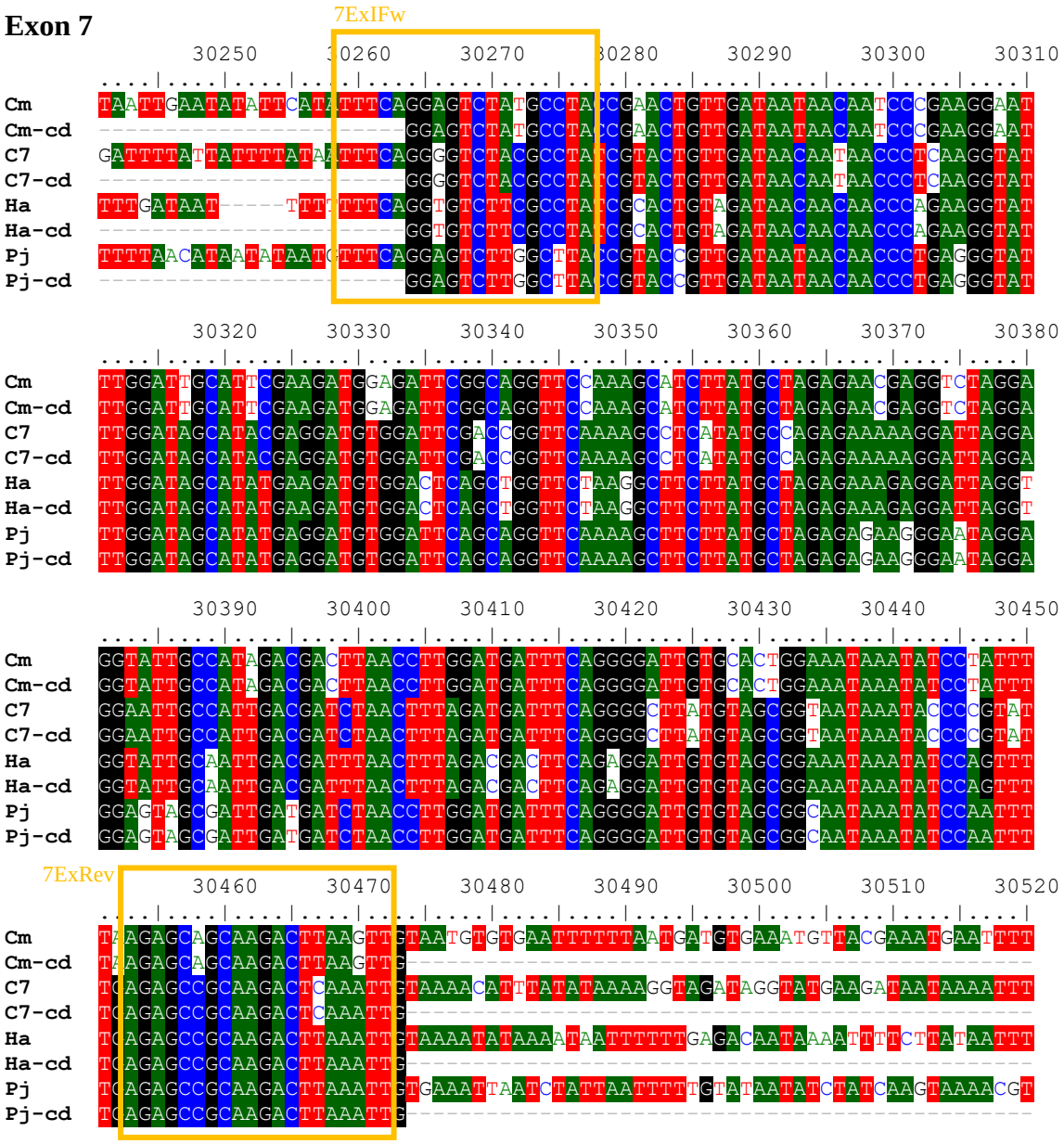

5ExFw
19680
19690
19700
19710
19720
19730
19740
Cm
Cm-cd
C7
C7-cd
Ha
Ha-cd
Pj
Pj-cd


19750
19760
19770
19780
19790
19800
19810
Cm
Cm-cd
C7
C7-cd
Ha
Ha-cd
Pj
Pj-cd
5ExIRev
19820
19830
19840
19850
19860
19870
19880

Exon 6


6ExIFw
27590
27600
27610
27620
27630
27640
27650
27660
27670
27680
27690
27700
27710
27720
27730
27740
27750
27760
27770
27780
27790
6ExIRev
27800
27810
27820
27830
27840
27850
27860

Exon 7


7ExIFw
7ExRev
30250
30260
30270
30280
30290
30300
30310
30320
30330
30340
30350
30360
30370
30380
30390
30400
30410
30420
30430
30440
30450
30460
30470
30480
30490
30500
30510
30520
Cm
Cm-cd
C7
C7-cd
Ha
Ha-cd
Pj
Pj-cd

Příloha č. 3

Příklad vzniklých tabulek s vypočítanými hodnotami ΔCt a ΔΔCt na genu *Idgf2* jedné izolace

hodnoty Ct					
	Idgf2	L18	Δ Ct	průměr ΔCt (C)	ΔΔCt
C	17,9400	27,7200	879,1710	1342,9375	0,6547
Sc6	17,1700	29,8300	6472,0184		4,8193
Sc24	16,1400	28,4100	4938,9889		3,6778
Sc48	16,1700	26,7700	1552,0938		1,1557
Sf6	17,8300	29,2600	2759,1344		2,0546
Sf24	16,1600	28,6400	5712,8701		4,2540
Sf48	17,4000	29,7200	5113,1619		3,8074

hodnoty Ct					
	Idgf2	ARF1	Δ Ct	průměr ΔCt (C)	ΔΔCt
C	17,9400	18,5200	1,4948	1,4927	1,0014
Sc6	17,1700	19,2300	4,1699		2,7935
Sc24	16,1400	18,4400	4,9246		3,2991
Sc48	16,1700	17,2300	2,0849		1,3968
Sf6	17,8300	19,2700	2,7132		1,8177
Sf24	16,1600	19,3300	9,0005		6,0297
Sf48	17,4000	19,5700	4,5002		3,0149

hodnoty Ct					
	Idgf2	C4	Δ Ct	průměr ΔCt (C)	ΔΔCt
C	17,9400	15,5300	0,1882	0,1835	1,0255
Sc6	17,1700	15,7700	0,3789		2,0652
Sc24	16,1400	15,7200	0,7474		4,0735
Sc48	16,1700	15,1300	0,4863		2,6505
Sf6	17,8300	15,7100	0,2300		1,2538
Sf24	16,1600	15,8300	0,7955		4,3357
Sf48	17,4000	15,8300	0,3368		1,8356

Příloha č. 4

Následující tabulky shrnují hodnoty ΔΔCt pro jednotlivé skupiny vzorků.

Idgf2 + L18					
vzorek	I. Izolace	II. Izolace	III. Izolace	IV. Izolace	průměr ΔΔCt
C	0,6547	0,1637	1,8262	1,3555	1,0000
Sc6	4,8193	0,3893	4,2246	1,2735	2,6767
Sc24	3,6778	5,2011	5,6132	2,9873	4,3698
Sc48	1,1557	2,0546	7,0071	0,3184	2,6340
Sf6	2,0546	1,2216	1,2560	0,9651	1,3743
Sf24	4,2540	1,8971	7,0071	2,6369	3,9488
Sf48	3,8074	1,7701	1,2216	0,2930	1,7730

Idgf2 + ARF1					
vzorek	I. Izolace	II. Izolace	III. Izolace	IV. Izolace	průměr ΔΔCt
C	1,0014	0,3769	1,6610	0,9607	1,0000
Sc6	2,7935	0,7485	2,3167	1,7196	1,8946
Sc24	3,2991	8,7670	6,0716	3,6353	5,4433
Sc48	1,3968	3,3452	4,3232	0,3350	2,3500
Sf6	1,8177	2,1918	0,9877	0,8718	1,4672
Sf24	6,0297	1,9213	2,8721	1,6156	3,1097
Sf48	3,0149	2,4659	1,1504	0,4067	1,7594

Idgf2 + S4					
vzorek	I. Izolace	II. Izolace	III. Izolace	IV. Izolace	průměr ΔΔCt
C	1,0255	0,4557	1,3161	1,2027	1,0000
Sc6	2,0652	0,6140	2,5602	2,8408	2,0200
Sc24	4,0735	14,2835	11,7637	6,0055	9,0315
Sc48	2,6505	4,9460	4,1304	0,6226	3,0874
Sf6	1,2538	1,6659	0,7102	0,7302	1,0900
Sf24	4,3357	1,3253	7,1417	2,2599	3,7657
Sf48	1,8356	2,7631	1,0398	0,4107	1,5123

Idgf4 + L18					
vzorek	I. Izolace	II. Izolace	III. Izolace	IV. Izolace	průměr ΔΔCt
C	0,5611	0,2186	1,5544	1,6659	1,0000
Sc6	6,1319	0,3223	2,9410	1,4009	2,6990
Sc24	1,6659	2,9006	4,9462	1,5119	2,7561
Sc48	0,9769	1,3532	8,2040	2,4055	3,2349
Sf6	2,7251	0,9502	0,8388	1,4009	1,4787
Sf24	4,2173	0,8959	4,4270	2,2916	2,9579
Sf48	4,5200	1,2238	1,2452	0,3527	1,8354

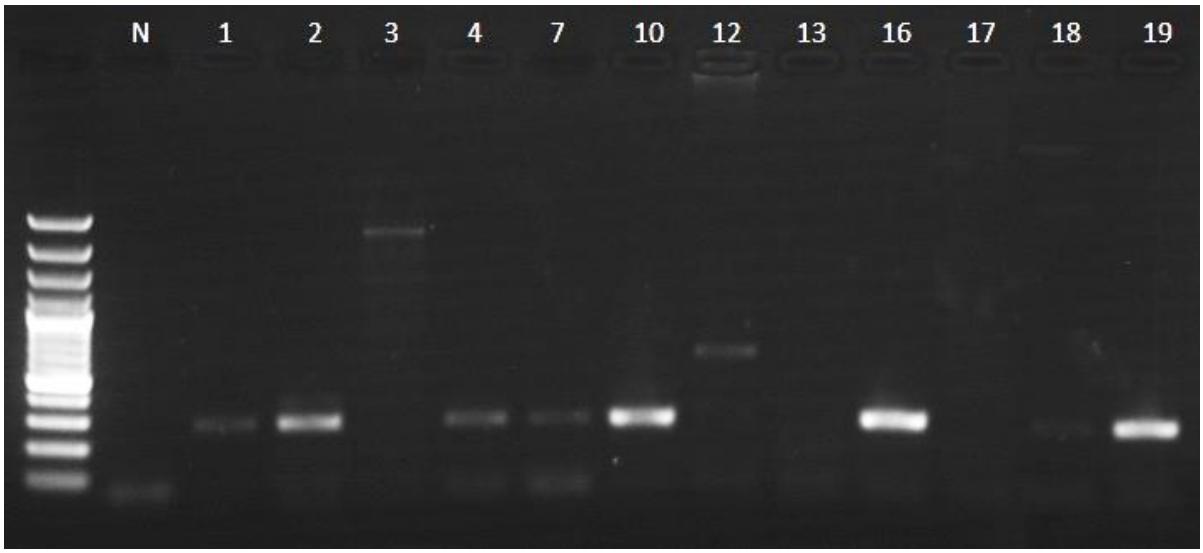
Idgf4 + ARF1					
vzorek	I. Izolace	II. Izolace	III. Izolace	IV. Izolace	průměr ΔΔCt
C	0,8678	0,5089	1,4295	1,1938	1,0000
Sc6	3,5938	0,6266	1,6307	1,9126	1,9409
Sc24	1,5110	4,9434	5,4095	1,8603	3,4310
Sc48	1,1938	2,2276	5,1177	2,5589	2,7745
Sf6	2,4377	1,7237	0,6669	1,2794	1,5269
Sf24	6,0440	0,9173	1,8346	1,4196	2,5539
Sf48	3,6188	1,7237	1,1855	0,4950	1,7557

Idgf4 + S4					
vzorek	I. Izolace	II. Izolace	III. Izolace	IV. Izolace	průměr ΔΔCt
C	0,8604	0,5959	1,0967	1,4470	1,0000
Sc6	2,5724	0,4976	1,7449	3,0591	1,9685
Sc24	1,8064	7,7980	10,1479	2,9755	5,6819
Sc48	2,1933	3,1890	4,7342	4,6047	3,6803
Sf6	1,6280	1,2685	0,4643	1,0375	1,0996
Sf24	4,2079	0,6126	4,4171	1,9227	2,7901
Sf48	2,1333	1,8701	1,0375	0,4840	1,3812

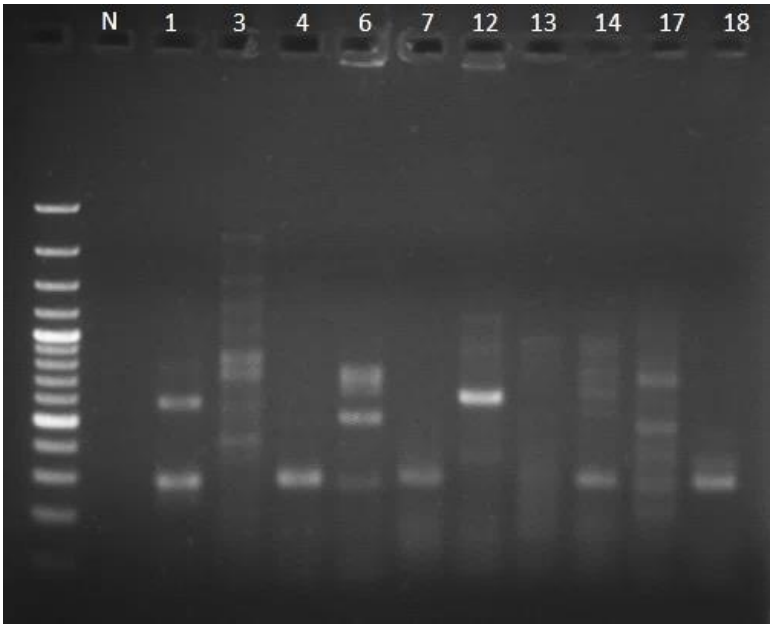
Příloha č. 5

***Idgf2* Exon 2**

Výsledek PCR reakce s primery pro *Idgf2* exon 2. Výrazný produkt o velikosti 275 bp byl u některých vzorků použit rovnou na sekvenování (č. 2, 10, 16 a 19). N zastupuje negativní kontrolu bez templátu. Číslování vzorků odpovídá druhům podle tabulky č. 2.

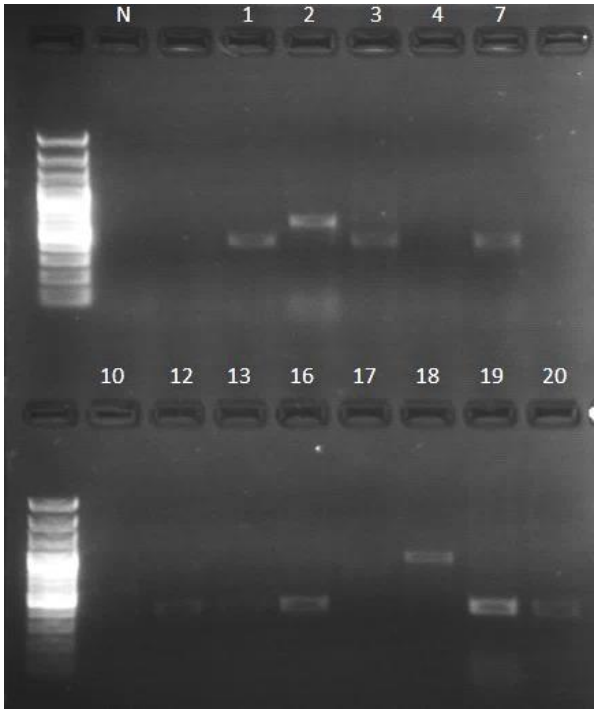


Pro zvýšení produktu se slabým proužkem byla využita reamplifikace – v nové PCR reakci byl použit jako templát produkt z reakce předešlé.



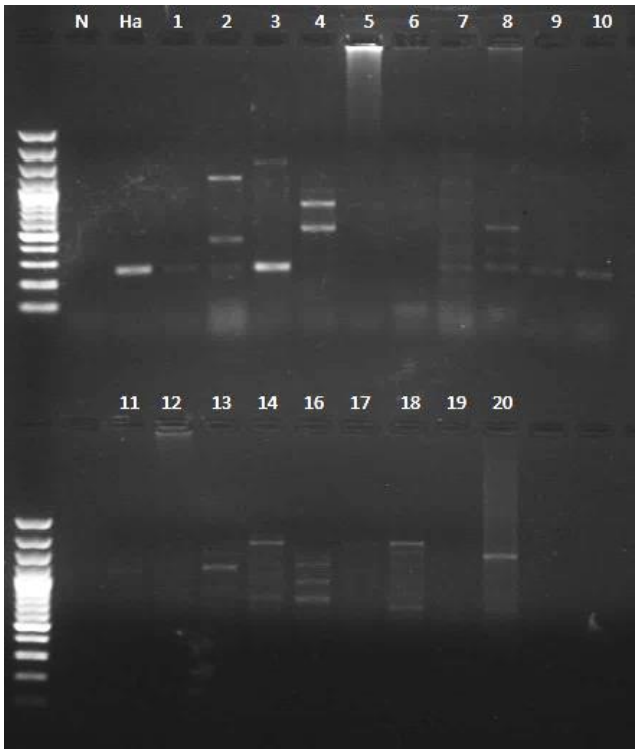
***Idgf2* úsek s exony 4 a 5**

Amplifikovaný úsek genu *Idgf2* o velikosti 400 bp obsahující exony 4 a 5 viditelný u většiny vzorků. N zastupuje beztemplátovou negativní kontrolu. Jelikož řada proužků v první PCR byla slabá, byla provedena reamplifikace těchto vzorků.



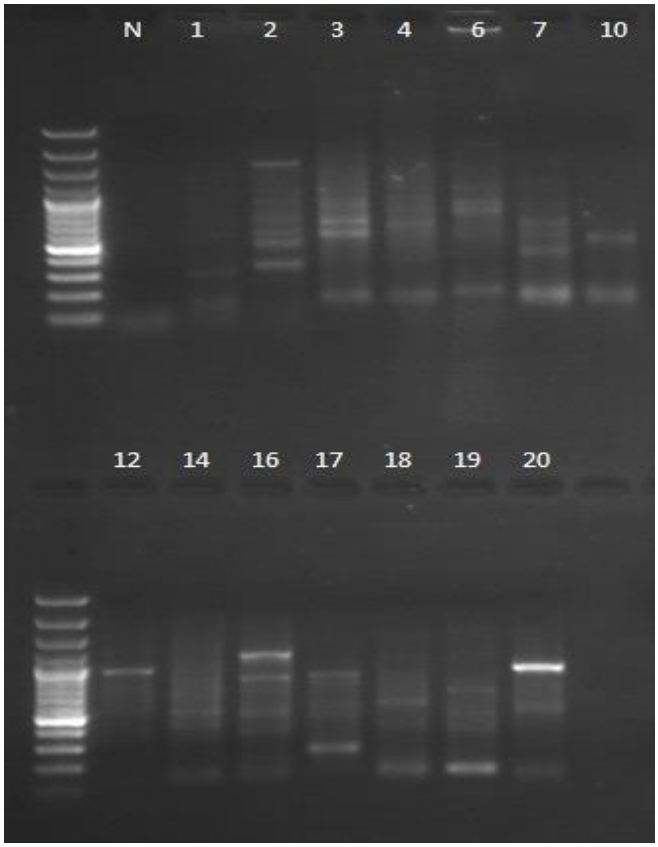
***Idgf2* Exon 6**

Amplifikace exonu 6 o délce 243 bp. N je zkratka pro negativní beztemplátovou kontrolu. Dále Ha je zkratka pro DNA *Harmonie axyridis* pro ověření správnosti PCR reakce.



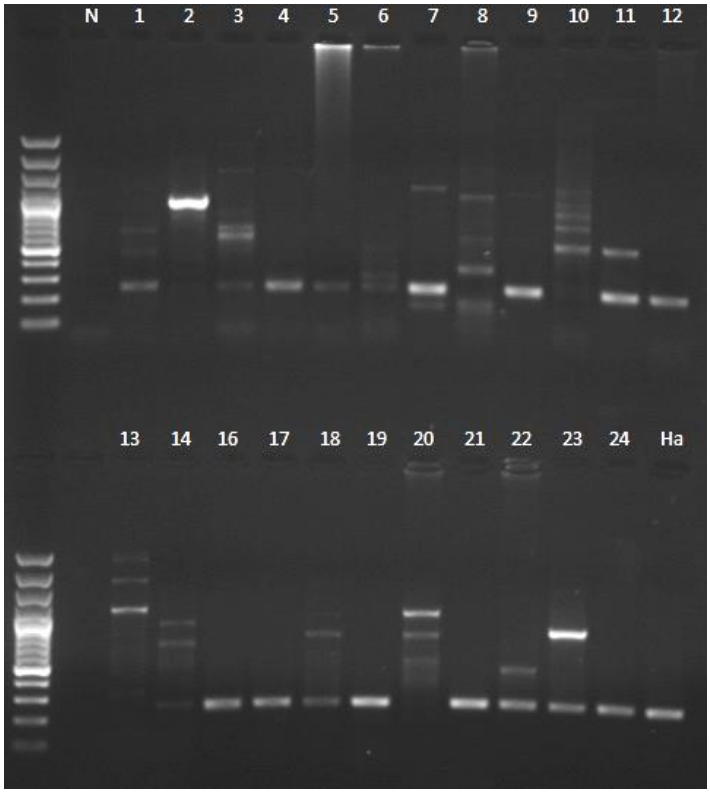
***Idgf2* Exon 7**

Amplifikace exonu 7 *Idgf2* s vybranými vzorky. Jedná se o úsek o velikosti 143 bp. N je zkratka pro negativní beztemplátovou kontrolu.



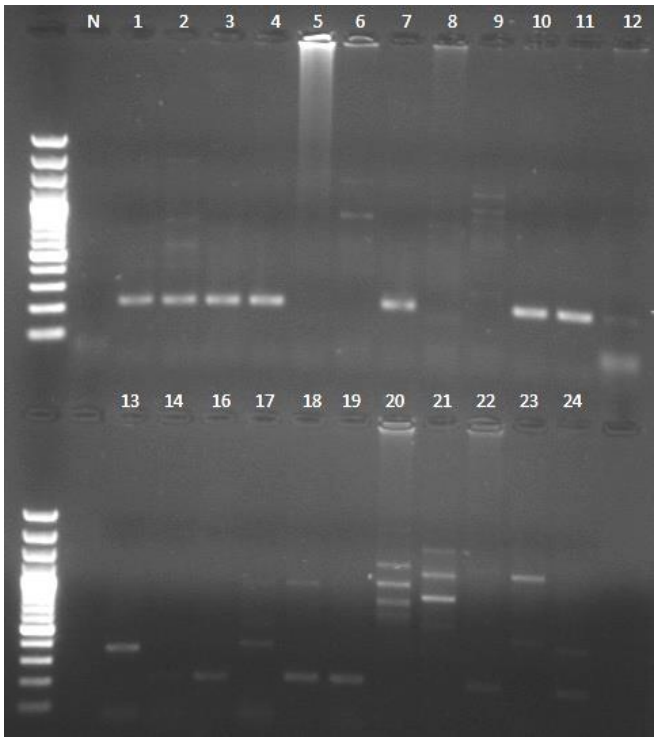
***Idgf4* exon 6**

Amplifikace *Idgf4* exonu 6 o velikosti 243 bp všech zkoumaných DNA druhů. N je označení pro bezteplátovou kontrolu, Ha je zkratka pro DNA *Harmonia axyridis* na ověření funkčnosti PCR.



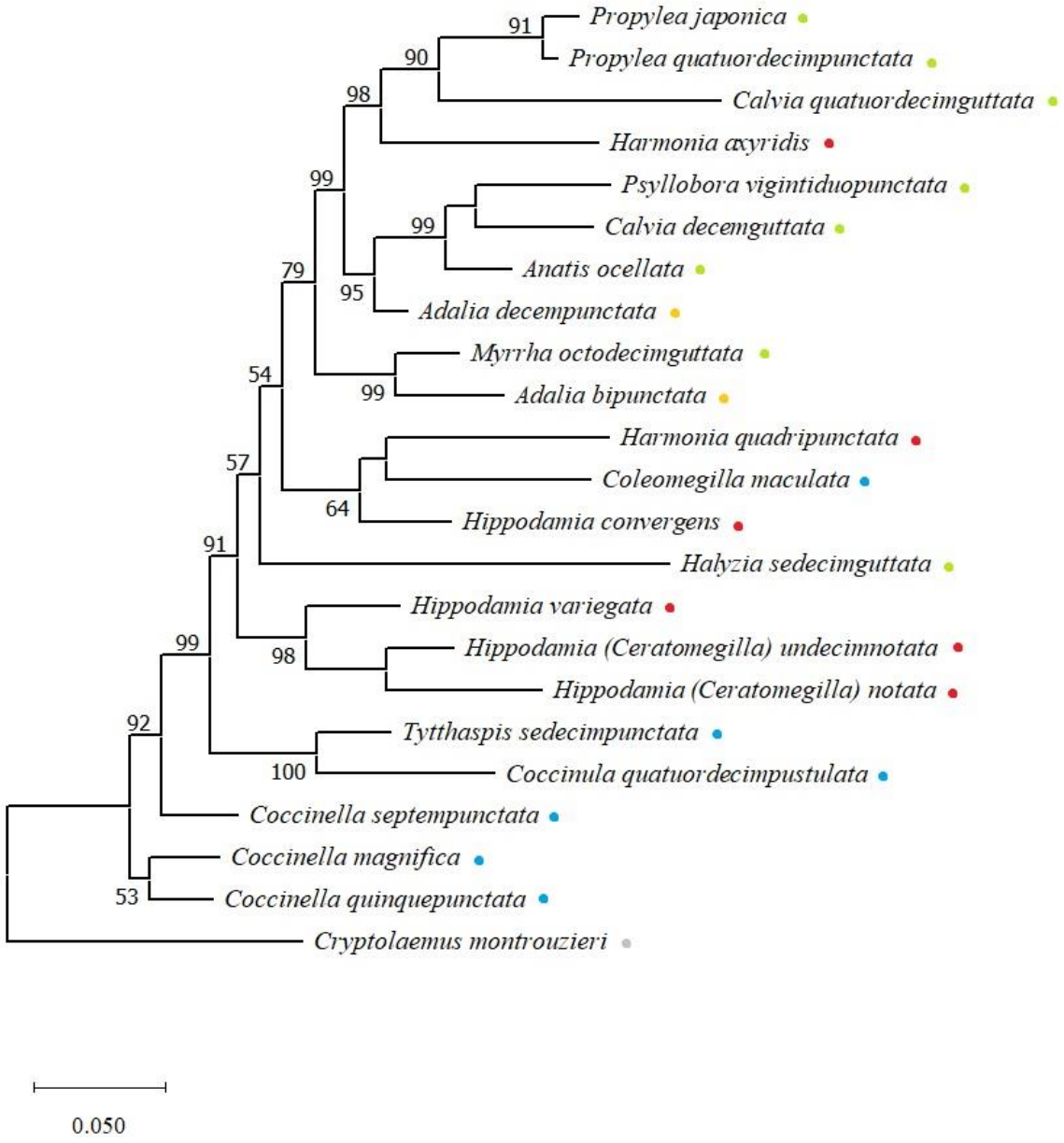
***Idgf4* exon 7**

Amplifikace *Idgf4* exonu 7 o velikosti 214 bp. N označuje kontrolu bez templátu.



Příloha č. 6

Fylogenetický strom podle aminokyselinové sekvence ze všech získaných úseků.



Fylogenetický strom (SBL = 1,59431060) podle aminokyselinových sekvencí *Idgf*. U jednotlivých větví je uvedena aBayes statistická hodnota nad 50 %. Použitým modelem byl Q.plant +R.