ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
KATEDRA EKOLOGIE

MUTUALISTICKÝ VZTAH BAKTERIE WOLBACHIA S VYBRANÝMI DRUHY ŠTĚNIC

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Mgr. Ondřej Balvín, Ph.D.

Bakalant: Kamila Jetenská

2021

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Kamila Jetenská

Environmentální vědy
Aplikovaná ekologie

Název práce

Mutualistický vztah bakterie Wolbachia s vybranými druhy štěnic

Název anglicky

Mutualistic relationship of Wolbachia bacteria with specific bed bug species

---

Cíle práce

Bakterie Wolbachia pipientis je častý vnitrobuněčný endosymbiont hmyzu a háďátek. Jeho projevy bývají různé, ale často hraje roli v pohlavním rozmnožování svého hostitele. Může například indukovat partenogenezi, ale nejběžnější situace zahrnuje inkompatibilitu infikovaných a neinfikovaných populací, případně populací infikovaných různými kmeny bakterie. Protože se bakterie přenáší ovariálně, tento jev často vede ke snížení variability mitochondriální DNA v populaci, což bylo pozorováno v mnoha geneticky populačních studiích.
Infekce bakterií Wolbachia jsou časté u různých druhů štěnic napříč celou čeledí, ale pravděpodobně pouze u podčeledi Cimicinae bakterie vyvinula velmi specifický vztah se svým hostitelem. Od jiných endosymbiontických bakterií, pravděpodobně Rickettsia nebo Cardinium, získala Wolbachia operon pro syntézu biotinu. Tento vitamín štěnicím začala dodávat a stala se tak pro ně nepostradatelnou. Experimentálně je tento vztah ověřen u štěnice domácí. Podle dostupných molekulárních dat je však biotinový operon funkční i u jiných druhů rodu Cimex. Úkolem zadávané práce bude proto mutualismus bakterie Wolbachia ověřit u štěnice netopýří a štěnice tropické. Pro náročnost úkolu bude však v rámci BP pouze provedeno ověření metodického postupu na štěnici domácí a pilotní testy na štěnici tropické. Samotné testy budou provedeny v rámci navazující magisterské práce.

Metodika

Oba druhy štěnic jsou chovány na umělém systému parafilmových sáčků s krví. Experiment bude zahrnovat chov skupin na modifikované krvi: a) krev s antibiotiky; b) krev s antibiotiky a přidanými vitamíny; c) kontrolní skupina. Antibiotika potlačí aktivitu bakterií a omezí vývoj štěnic. Pokud bude dodaný vitamín kompenzovat zastavený metabolismus bakterie, bude zřejmé, že bakterie pro štěnici vitamín syntetizuje. Součástí práce bude základní seznámení se sekvenací DNA, neboť kmeny bakterie v testovaných kmenech štěnic bude potřeba charakterizovat.

Doporučený rozsah práce

40 stran

Klíčová slova

Wolbachia, štěnice, mutualismus, riboflavin, biotin

Doporučené zdroje informací

Je konzultováno průběžně se školitelem

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FŽP

Vedoucí práce

Mgr. Ondřej Balvín, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

Mgr. Markéta Sasínková
Mgr. Markéta Sasínková

Elektronicky schváleno dne 22. 3. 2021

prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 22. 3. 2021

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 25. 03. 2021

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: MUTUALISTICKÝ VZTAH BAKTERIE WOLBACHIA S VYBRANÝMI DRUHY ŠTĚNIC

vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Ondřeje Balvína, Ph.D. a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědoma, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědoma, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzi tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne 17. 3. 2021 ……

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce, panu Mgr. Ondřeji Balvínovi, Ph.D., za pomoc během experimentu, trpělivost a ochotu během nočních hovorů plných repetitivních otázek a slečně Mgr. Markétě Sasínkové též za pomoc a rady.

Velké díky patří mé mamince a nejlepším přátelům za neupadající a pro ně mnohdy vyčerpávající podporu a víru v mé dovednosti během celého studia.

V Praze dne 17. 3. 2021 ……

ABSTRAKT

Bakalářská práce zde řeší unikátní mutualistický vztah bakterie *Wolbachia* a vybraných druhů rodu *Cimex*. Práce testuje metodiku předešlých výzkumů skrze experimentální chov a pozorování syntézy vitamínů B2 a B7 a snaží se potvrdit jejich důležitost během životního cyklu štěnic.

Experiment se zaměřil na druhy *Cimex lectularius*, *Cimex pipistrelli* a *Cimex hemipterus*, u kterých je hodnocen vliv vitamínů syntetizovaných bakterií *Wolbachia*, oproti suplementaci těchto vitamínů a jejich vliv na životní projevy štěnic. Štěnice byly během experimentu rozděleny do několika skupin a každé skupině byla podávána jinak upravená potrava v různých kombinacích. Vitamíny přirozeně syntetizované bakterií *Wolbachia* v těle štěnic byly u některých skupin zastaveny podáním potravy s antibiotiky. Chybějící vitamíny byly poté u jedné ze skupin léčené antibiotiky dodány suplementací. Následovalo pozorování průběhu svlékání jedinců do dospělosti a kladení vajíček.

Získaná data o životních projevech štěnic byla mezi skupinami porovnávána, čímž bylo možné posoudit různé účinnosti vitamínů syntetizovaných bakterií *Wolbachia* oproti vitamínům suplementovaným a důsledek nedostatku těchto vitamínů u skupiny bez suplementace. Nezbytnost vitamínů B2 a B7 pro kladení vajec a vývoj štěnic do dospělce, která byla v minulosti potvrzena u *Cimex lectularius*, se zde ověřila u *Cimex pipistrelli* a *Cimex hemipterus*.

Práce přináší rozbor metodik předešlých výzkumů zabývajících se nutričním vztahem a mutualismem, odhaluje nedostatky metodiky a potvrzuje přítomnost biotinu a riboflavinu, které syntetizuje bakterie *Wolbachia* a její roli v životě štěnic.

Klíčová slova: bakterie *Wolbachia*, biotin, riboflavin, mutualismus

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with a unique obligatory relationship between *Wolbachia* bacteria and selected species of the genus *Cimex.* The work tests the methodology of previous research through experimental breeding and observation of the synthesis of vitamins B2 and B7 and tries to confirm their importance during the bed bug life cycle.

The experiment focused on the species *Cimex lectularius*, *Cimex pipistrelli*, and *Cimex hemipterus,* in which the effect of *Wolbachia*-synthesized against artificially supplemented vitamins on bed bugs' life processes is evaluated. The bed bugs in the experiment were divided into several groups, each group being periodically administered with one of the variants of modified diet. In some of the test groups, the otherwise naturally *Wolbachia*-synthetized vitamins were blocked by the antibiotic-treated blood meal. Subsequently, the deficient vitamins were again artificially supplemented in one of the groups after the antibiotic treatment. Every diet treatment administration was thereafter followed by observation of bed bugs' molting and egg-laying.

The acquired data were compared among the test groups, allowing us to assess the effect of various vitamins synthesized by *Wolbachia* compared to the effect of supplemented vitamins, as well as the consequence of the vitamin deficiency in the test group with no supplementation. Our results confirmed the importance of vitamins B2 and B7 and their necessity for the bed bug egg-laying and metamorphosis. Although the exigence of the above-mentioned vitamins was previously confirmed at *Cimex lectularius* species, our experiment proved it in *Cimex pipistrelli* and *Cimex hemipterus*, too.

This thesis presents an analysis of the methodologies of previous research dealing with nutritional relationship and mutualism, reveals drawbacks of the methodology and confirms the presence of biotin and riboflavin, synthetized by *Wolbachia*, and its role in the bed bugs' life.

Key words: *Wolbachia* bacteria, biotin, riboflavin, mutualism

Obsah

1 Úvod 1

2 Cíle práce 5

3 Bakterie *Wolbachia pipientis* 6

3.1 *Wolbachia pipientis* – přenos a infekce 7

3.2 *Wolachia pipientis* – reprodukční fenotypy způsobené bakterií 7

3.3 bakterie *Wolbachia* - Parazitismus a mutualismus 10

4 Štěnice *(Cimex)* 12

4.1 Štěnice domácí (*Cimex lectularius*) 14

4.2 Štěnice tropická (*Cimex hemipterus*) 16

4.3 Štěnice netopýří *(Cimex pipistreli)* 16

5 Bakterie *Wolbachia* a štěnice 17

5.1 Nutriční závislost štěnice domácí na bakteriálním symbiontu bakterie *Wolbachia* a její lokalizace v bakteriomech 17

5.2 Evoluční původ biotinového operonu a nutričního vztahu mezi bakterií *Wolbachia* a *Cimex lectularius* 17

5.3 Genové dráhy vitamínů B v bakterii *Wolbachia* 19

5.4 Test prevalence bakterie *Wolbachia* v populacích štěnic a kokladogeneze štěnic a bakterií *Wolbachia* 20

6 Metodika 23

6.1 Metodika dřívějších výzkumů 23

6.2 Materiál a podmínky chovů a experimentů 25

6.3 Test vlivu bakterie *Wolbachia* na životní projevy štěnic 26

6.4 Pokus 1 – Test vlivu bakterie *Wolbachia* na larvální vývoj štěnic 27

6.5 Pokus 2 - Vliv bakterie *Wolbachia* na kladení vajec u štěnic 28

7 Výsledky 30

7.1 Pozorování vývojového cyklu 30
7.2 Pozorování kladení vajec 31
8 Diskuse 33
8.1 Test vlivu bakterie *Wolbachia* na larvální vývoj štěnic 33
8.2 Vliv bakterie *Wolbachia* na kladení vajec u štěnic 33
9 Závěr a přínos práce 37
10 Přehled literatury a použitých zdrojů 38

1 Úvod

Veškeré druhy organismů na Zemi přicházejí do styku s jinými, navzájem se ovlivňují a nejrůznějšími způsoby interagují např. přenosem genetické informace, modifikací metabolických drah, či okolního prostředí. Postupem času se mezi mnohými vytvořil velmi úzký vztah, který obecně nazýváme symbióza (Čepička et al. 2007).

Hmyz je bez pochyb nejrozšířenější a nejvíce různorodou třídou živočichů, která obsahuje přes tři čtvrtě milionu popsaných druhů (Volf, Horák, 2007) a která své evoluční úspěšnosti dostála právě díky časté spolupráci s ostatními organismy. U hmyzu proto nacházíme množství symbiotických vztahů. Případů, kdy je do souvislé biologické entity zapojen hostitel a bakterie, je všude mnoho. Obligátní vzájemný vztah mezi hmyzem a bakteriemi patří ale mezi formy nejsofistikovanější (Husník, 2018). Životní strategií mnoha různých organismů je tedy různá forma symbiózy (Tabulka 1). Těchto soužití je velké množství a je možné je rozlišit podle několika kritérií.

Tím prvním může být podoba fyzického vztahu symbiontů. Při ektosymbióze jsou od sebe symbionti fyzicky odděleni, tzn. symbiont žije na povrchu těla hostitele, v jeho dutinách nebo ve vývodech žláz (například sasanka a klaun očkatý) (Margulis, 1998). Při endosymbióze se symbiont naprosto upoutá k tělu hostitele a žije uvnitř, v mezibuněčném prostoru (extracelulární endosymbióza), nebo přímo v buňkách hostitele (intracelulární endosymbióza) (Oborník, 2009).

Pokud organismus bez vytvoření symbiózy nemá šanci přežít a rozmnožovat se, jedná se o formu obligátní. Tyto symbionty můžeme též nazvat jako primární, nebo „P-symbionts“. Pokud se však bez tohoto soužití obejde, jedná se o formu fakultativní, tedy o symbionty sekundární „S-symbionts“ (Lhotský, 2014). U obou těchto typů symbiózy se kontinuum společně stráveného času pohybuje od 1 do 99%. Proces, který zabezpečuje relativně dlouhodobý, stabilně vyvážený poměr hostitele a symbionta se nazývá regulace (Smith, Douglas, 1987). Zásadním kritériem klasifikace symbiózy je výhodnost soužití pro oba organismy. Jak již bylo zmíněno, organismy se ovlivňují za účelem zlepšení svého života, reprodukce, osídlení nových míst, ale nejběžnějším důvodem jsou výživové interakce (Burrows, Pfleger, 2002).

a) **Mutualismus** – Jako mutualismus se označuje vzájemný pozitivní vztah dvou druhů, jehož výsledkem je růst fitness obou partnerů. Toto partnerství nemusí být pro oba druhy stejně prospěšné, ale vzájemným využíváním a společným růstem je jejich život a rozmnožování kvalitnější, než kdyby žili odděleně (např. opylovač a rostlina) (Bronstein, 2015).
b) **Komenzalismus** – Jedná se především o závislost potravní nebo prostorovou. Komenzál hostitele nijak neovlivňuje, přesto že z něj má prospěch. Typické pro sdružování se jednoho druhu s druhem odlišným např. sdružování hyen s velkými šelmami za účelem dojídání mršin, nebo zdržující se ptáci v blízkosti traktorů na poli kvůli poletujícímu hmyzu (Slavíková, 1986).
c) **Amenzálismus (Alelopatie)** – Vztah, který je pro jednoho symbionta nevýhodný (amenzál), ale druhého neovlivňuje (inhibitor) (např. bakterie *Clostridium botulinum* a bažant obecný).
d) **Parazitismus** – Dočasné nebo trvalé soužití – parazit hostitele využívá potravně či prostorově, žije na něm, nebo uvnitř něj a hostitel soužitím strádá. Parazit je zpravidla menší než hostitel a bez hostitele se neobejde (např. klíště obecné a savci, plazi, ptáci, endoparazité – tasemnice, motolice jaterní) (Nermuť, Půža, 2014).
e) **Neutralistická symbióza** – Těžko prokazatelný teoretický vztah, kdy na sebe dva organismy vůbec nepůsobí.
f) **Kompetiční symbióza** – Vztah konkurence, který vysvětluje tzv. efekt červené královny. Jedná se o matematický model z evoluční biologie, který popisuje jevy ve stabilním prostředí. Říká, že pokud v tomto prostředí dojde k evoluci a nějaký druh se změní, ovlivní to ostatní druhy ve stejném prostředí tak, že jsou nuceni se adaptovat, aniž by z adaptace měly nové výhody. Ostatní druhy se tedy mění, aby jejich život nebyl komplikovanější, ale benefity ze změny nedostává (King et al. 2006)

Označení symbiózy	Druh A	Druh B
Mutualistická symbióza	+	+
Komensalistická symbióza	+	0
Parazitická (agonistická) symbióza	+	-
Neutralistická symbióza	0	0
Amensalistická symbióza	0	-
Kompetiční symbióza	-	-

+, zvýšená; -, snížená a 0, neovlivněná fitness organismu.
Hostitel (či symbiont) může být jak druh A, tak B.

Tabulka 1 Přehled symbiotických vztahů a vliv na organismy (Zdroj : http://www1.sci.muni.cz/~mykorrhi/html/typy_symbioz.htm **)**

Tyto vztahy jsou podle všeho závislé na prostředí nebo hostiteli, vyvolané stejným genetickým mechanismem a zafixovány v důsledku selekce. Existují modely, které předpokládají existenci environmentálních variací, které mohou podnítit počáteční změny symbiotického způsobu života (Archibald, 2009). Nicméně u obligátních intracelulárních bakterií, jejichž genomy jsou omezené, studie ukazují, že symbiotické asociace mohou být evolučně stabilní po stovky milionů let (Bordenstein et al. 2009).

Když pomineme původně symbiotické bakterie, které se podílely na vytvoření eukaryotické buňky, pravděpodobně nejčastějším symbiotickým vztahem je parazitismus. Počet parazitických druhů několikrát převyšuje počet druhů volně žijících a podle některých odhadů až v poměru 4:1 (Zimmer, 2005).

Ať už jde o bakterie, nebo jednobuněčného či více buněčného parazita, tyto organismy si svého hostitele obvykle šetří, aby co nejdéle vydržel a zaručoval parazitovi přežití. V mnoha případech dokáže pro svůj prospěch symbiont se svým hostitelem manipulovat (Douglas, 1994). Mezi jednoho stále častěji studovaného manipulátora patří bakterie *Wolbachia pipientis*, která byla předmětem studie i této práce.

Experiment provedený v rámci této práce se opíral o výzkum:

- Co-speciation in bedbug *Wolbachia* parallel the pattern in nematode hosts (Balvín et al. 2018)
- *Wolbachia* as a bacteriocyte -associated nutritional mutualist (Hosokawa et al. 2010)

- Riboflavin Provisioning Underlies *Wolbachia's* Fitness Contribution to Its Insect Host (Moriyama et al. 2015)
- Evolutionary origin of insect –*Wolbachia* nutritional mutualis (Nikoh et al. 2014), kde je bakterie *Wolbachia pipientis* představena jako nezbytná součást života pro štěnici domácí *Cimex lectularius* Linnaeus 1758 díky syntéze biotinu (vitamin B7) a riboflavinu (vitamin B2). V rámci hmyzu jde o jediný dobře popsaný obligátní nutriční vztah s bakterií *Wolbachia*, který je jedním z nejnáročnějších forem symbiózy. Tato práce se snaží potvrdit stejný vztah i u štěnice tropické *Cimex hemipterus* (Fabricius, 1803) a štěnice netopýří *Cimex pipistreli* Jenyns 1839.

2 Cíle práce

a) Vybrat vhodnou variaci naší metodiky pro experimenty v laboratoři na ČZU podle předlohy předešlých výzkumů, které provedl Nikoh et al. (2014), Hosokawa et al. (2010) a Moriyama et al. (2015), kde byl sledovaným objektem druh *Cimex lectularius* a kde byla metodika vyhodnocena jako funkční.

b) Provést předběžné testy dokládající syntézu B-vitamínů (B2 a B7) prostřednictvím bakterie *Wolbachia* u druhů *Cimex pipistrelli* a *Cimex hemipterus* a demonstrovat tak mutualistický vztah těchto druhů s bakterií *Wolbachia.*

3 Bakterie *Wolbachia pipientis*

Bakterie *Wolbachia pipientis* (Obrázek1), jakožto prominentní příklad obligátního, vertikálně přenosného endosymbionta, byla identifikována poprvé v roce 1924 Marshallem Hertinhem a S. Burtem. *Wolbachia* se jako parazit vyskytuje především u členovců *(Arthropoda)* a hlístic - především filárií *(Nematoda)*, kde se nachází převážně v tkáni gonád (Duron, Gavotte, 2007). Statistická analýza odhaduje celkovou incidenci touto bakterií u členovců na 40 % (Bouchery, 2013) ale Duron a Gavotte (2007) udává, že ovlivněno bakterií je 20 - 75 % hmyzích druhů. Jak zmiňuje Ahmed et al. (2015), *Wolbachia* je možná nejběžnější a nejrozšířenější intracelulární bakterií na zemi, jenž dokáže ovlivňovat reprodukci a fyziologii svého hostitele.

Až do devadesátých let našeho století byla *Wolbachia* považována za velmi vzácnou bakterii, která nemá v těle hmyzu velký význam. To se změnilo s příchodem molekulárních metod. V roce 2008 bylo známo 108 druhů hmyzu, hostících bakterii *Wolbachia* (Werren et al. 2008).

Tato bakterie čeledi *Rickettsiacae* patří mezi gramnegativní mikroorganismy. Některé bakterie z této čeledi mohou u lidí způsobovat vážná onemocnění, jako je horečka Skalistých hor, skvrnivka nebo Q-horečka. Fylogeneticky jsou různé kmeny bakterie klasifikovány do evolučně koherentních linií, podle kterých determinujeme jejich distribuci a biologii u hostitelů (Gerth et al. 2014). Dosud bylo popsáno a rozděleno 17 „superskupin“ reprezentujících evoluční linie (Bordenstein, Rosengaus, 2005). Základní rozdělení podle forem symbiózy jsou skupiny A, B, E, F a G, které se vyskytují u členovců, zatímco superskupiny C a D pouze u filárií (Lo et al. 2002). *Wolbachia* se do další generace dostává pouze po mateřské linii a přenáší se cytoplazmou vajíčka. Snaží se všemi možnými způsoby ovlivnit reprodukci hostitele tak, aby byl její přenos na potomky co nejúspěšnější (viz podkapitola 3.2) (Lom, 1995). Infekce bakterie někdy působí zároveň pozitivními a negativními účinky v jiné buňce (Jiggins, Hurst, 2011). Proto pro ni můžeme najít označení „Jekyll a Hyde“ (Zug, Hammerstein, 2012).

U hlístic ze skupiny vlasovců je *Wolbachia* výhradně mutualistická, charakterizována jako primární symbiont a obvykle se nachází u všech individuálních jedinců druhu. Vzájemný vztah mezi hlísticemi a bakterií má tedy za

následek těsnou kokladogenezi, tedy synchronní divergenci linií bakterie *Wolbachia* a linií hlístic a to i na širokých fylogenetických škálách (Dedeine et al. 2001).

U členovců je naproti tomu *Wolbachia* typicky parazitická, jen u některých taxonů hmyzu vykazuje známky mutualismu (Voronin et al. 2012). Přítomnost bakterie u členovců často ovlivňuje reprodukci a mění vzorec fenotypu (viz podkapitola 3.2) (Atyame et al. 2014).

Obrázek 1: elektronogramový snímek bakterie *Wolbachia* uvnitř buňky hmyzu (URL 1)

3.1 *Wolbachia pipientis* – přenos a infekce

Jak už bylo zmíněno, tato bakterie využívá různých strategií svého přenosu. Nejčastěji se přenáší vertikálně – z matky na potomka – neboli uvnitř druhu (Zug, Hammerstein, 2012). Tento způsob infekce cílí na vajíčka hostitele. Zde manipuluje s biologií různými způsoby a především u členovců způsobuje čtyři odlišné reprodukční fenotypy (Obrázek 2) (Werren et al. 2008).

Druhým způsobem je horizontální infekce – mezi druhy (Zug, Hammerstein, 2012). Pro pochopení dynamických procesů za interakcemi hostitel–endosymbiont je klíčová pravděpodobnost infekce. Ta se liší s účinností přenosu a fenotypovými účinky infekce (Werren et al. 2008; Ahmed et al. 2015).

U bakterie *Wolbachia*, stejně jako u všech intracelulárních bakterií se předpokládalo, že po opuštění hostitele zahyne. Po provedených experimentech s tkáňovými buňkami bylo ale zjištěno, že je bakterie při pokojové teplotě schopna přežít bez hostitelské buňky a to až po dobu jednoho týdne, což je důležitý fakt ohledně horizontálního přenosu (Werren et al. 2008).

3.2 *Wolachia pipientis* – reprodukční fenotypy způsobené bakterií

a) **Feminizace** - jedná se o hormonálně vyvolaný projev sekundárních samičích pohlavních znaků u samců. Samčí jedinci u motýlů (*Lepidoptera*) nakaženi touto bakterií nejsou schopni tvořit androgenní hormony a proto se samci s pohlavními chromozomy ZZ vyvíjejí jako samice (Werren et al. 2008). Z infikované samičí populace nechala *Wolbachia* vymizet i určující samičí chromozom W. Skutečnost, kdo bude samec a kdo samice, tedy určuje pouze přítomnost či absence intracelulární bakterie rodu *Wolbachia* (Charlat et al. 2003). Činí tak, jelikož se infekce přenáší pouze maternálně přes cytoplazmu vajíčka. Feminizace vyvolaná bakterií *Wolbachia* byla poprvé popsána u stejnonožců (*Isopoda*) a byla pozorována u některých korýšů (*Crustacea*) (Kageyema et al. 2002).

a) **Partenogeneze** – Pro bakterii *Wolbachia* je způsobení partenogeneze téměř jistá cesta k úspěchu pro její další šíření. Pozorovatelná je např. u blanokřídlých (*Hymenoptera*), třásnokřídlých (*Thysanoptera*) a roztočů (*Acari*). Infekce způsobuje zdvojení chromozomů v neoplodněných haploidních vajíčkách. Jelikož je u haplodiploidních organismů udáváno pohlaví počtem chromozomů (samci-haploidní se vyvíjejí z neoplozeného vajíčka a samice-diploidní z vajíčka oplozeného), bakterie zajistí bez pomoci samců plození pouze diploidních samiček. Infikované samice tak mohou produkovat až dvakrát tolik samic než samice neinfikované (Charlat et al. 2003). Především u roztočů (*Acari*) se krom této arrhenotokní partenogeneze neboli haplodiploidie, vyskytuje ještě thelytokní partenogeneze, kdy dochází k vývoji jedinců obou pohlaví z neoplozeného vajíčka, přičemž dominantně zastoupeny jsou samice a samci se objevují zřídkakdy nebo zcela chybí (Oliver, 2003).

b) **Zabíjení samců neboli „male killing“ (MK)** – Zde se *Wolbachia* soustředí na to, aby měly samice vyšší pravděpodobnost přežití. Samci umírají pár dní po oplodnění samice, čímž se pro samice uvolní potravní zdroj, nebo mohou sami uhynulí samci posloužit jako potrava. Zvyšuje se tak pravděpodobnost dalšího šíření infekce (Charlat et al. 2003). Vyskytuje se u některých zástupců brouků (*Coleoptera*) a motýlů (*Lepidoptera*).

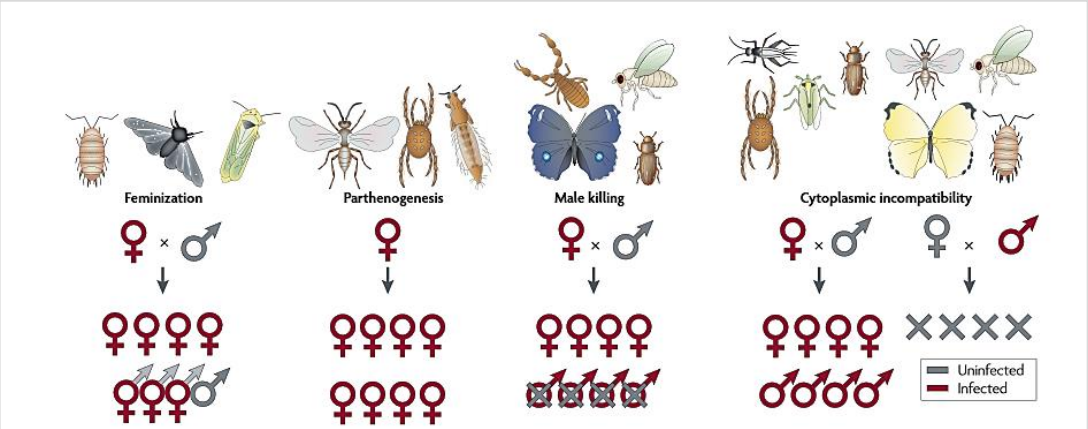
c) **Cytoplazmatická inkompatibilita (CI)** – CI je nejčastější reprodukční fenotyp indukovaný bakterií *Wolbachia* s velmi účinnou strategií. *Wolbachia* umožní samcům úspěšně se spářit pouze se samicí nesoucí stejný druh bakterie. CI způsobuje narušení buněčného cyklu, což vede k asymetrickému vývoji samčích a samičích jedinců. V časné fázi mitózy dochází ke zpoždění rozpadu samčího jaderného obalu a fosforylaci histonu H3. Chromozomy ze samičích pronukleů jsou během profáze kondenzovány a při metafázi uspořádány na metafázové desce, zatímco samčí chromozomy jsou v polo kondenzovaném stavu. Nakonec v anafázi probíhá normální separace samičích chromozomů, ale samčí pronukley jsou buď nataženy na póly centrozomu, nebo vyřazeny úplně. Pokud se nakažený samec spáří s nenakaženou samicí, jedná se o jednosměrnou CI – bakterie uvolňuje toxin do protoplastu spermie. Pokud se samec spáří se samicí nakaženou více druhy bakterie, jedná se o oboustrannou CI. Životaschopná embrya vzniknou pouze, pokud je ve vajíčku přítomný příslušný „záchranný faktor“ (rescue factor), který vyváží modifikaci spermie (Werren et al. 2008). Bordenstein a Werren (1998) zmiňuje tuto anomálii v souvislosti se vznikem reprodukční bariéry, která může zapříčinit vznik nových druhů.

Některé kmeny bakterie *Wolbachia* mohou u různých hostitelů vyvolat různé fenotypy. Stejný kmen bakterie, který u zavíječe čokoládového *(Cadra cautella)* Walker, 1863 způsobuje CI, vyvolá u zavíječe moučného *(Ephestia kuehniella)* Zeller, 1879 MK (Brown et al. 2016). Existují také studie, které naznačují, že některé kmeny bakterie nesou mechanismus pro vyvolání více fenotypů. Tyto veškeré strategie označuje Werren et al. (2008) jako „reprodukční parazitismus“.

Klíčová strategie bakterie *Wolbachia* je tedy žít uvnitř bezobratlých hostitelů a manipulovat s jejich reprodukčními a buněčnými procesy, tudíž omezení potomstva neinfikovaných samiček, dává lepší příležitost k uplatnění potomstvu infikovaných

samiček. To znamená, že i když může být v populaci infikovaných samiček méně než neinfikovaných a i když *Wolbachia* může svým působením na buňky celkovou plodnost samiček podstatně snížit, ve výsledku bude vždy zvýhodněno infikované potomstvo infikovaných samiček (Werren et al. 2008).

Molekulární mechanismy těchto změn mohou osvětlit, jaké faktory se uplatňují v časné fázi oplodňovacího procesu u členovců, a to vše je potenciálně využitelné třeba i při biologickém boji se škůdci (Lom, 1995).



Obrázek 2: Fenotypy vyvolané bakterií *Wolbachia*
Zdroj: (Werren et al. 2008)

3.3 bakterie *Wolbachia* - Parazitismus a mutualismus

Pojem symbióza je nejčastěji chápán jako vztah mezi dvěma organismy. Avšak přesnější definice je soužití dvou organismů, přičemž ne vždy profitují oba stejně. Někdy totiž není ani u často uváděných příkladů jasně rozpoznatelné, zda symbióza danému organismu prospívá, nebo škodí. Parazit může svého hostitele chránit před jiným, zákeřnějším parazitem, který by hostitele velmi rychle usmrtil (Losos, 1984). Jindy zdánlivě prospěšný mutualista, který pro svého hostitele syntetizuje životně důležitou látku, ho je schopen dopovat vytvořeným narkotikem, a tak ho závislostí na sobě „zotročit“. Na první pohled svým kolegou zvýhodněný, rychle rostoucí organismus, může být ve skutečnosti neschopen se rozmnožit. Dostáváme se tedy k otázce: jak je to s bakterií *Wolbachia*?

Obecně je u hmyzu považována za fakultativního parazita. Pokud uvážíme, jak s hostitelem pro vlastní dobro manipuluje, jak odebírá buňce hostitele životně důležité metabolity (organické látky, které se účastní metabolismu) a jak v mnoha případech redukuje plodnost samiček za účelem svého dalšího přenosu. S tím ale

souvisí její mutualistická podoba, jelikož způsobenými reprodukčními fenotypy zvýhodňuje potomky infikovaných samiček a řada hmyzích zástupců se bez ní není schopna rozmnožit nebo vůbec přežít. Zde se dostáváme k tzv. obligátnímu mutualismu, což je pevný a trvalý vztah, typický například u hub a rostlin. Jedinci v obligátním vztahu jsou pro sebe tedy neodmyslitelnou součástí své existence. Bakterii *Wolbachia* tudíž označujeme jako mutualistu jen proto, že je vztah obligátní, jinak by se její podstata dala označit jako spíše parazitická (Ondřej Balvín, 2020, in verb.). Nebylo tomu tak dozajista vždy. Především na začátku vytváření nějakého vztahu mluvíme o fakultativním mutualismu, někdy nazývaným jako protokooperace, kdy jsou pro sebe organismy prospěšné, ne však nezbytné a vztah je dočasný (Correa, Ballard, 2015).

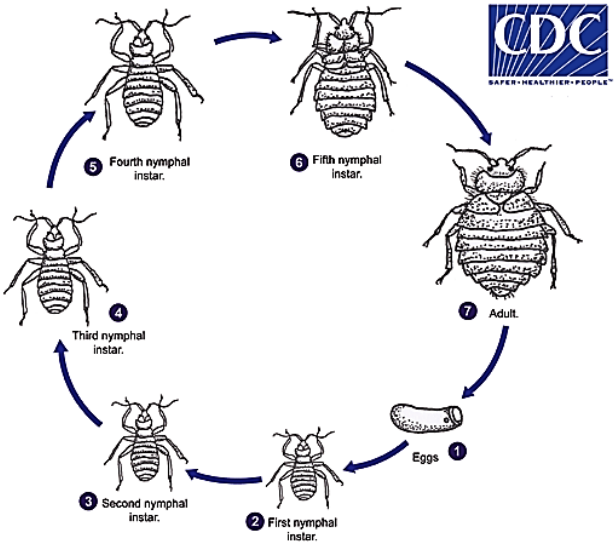
Je pravděpodobné, že mnohé dnes mutualistické vztahy začaly jako parazitické. (Koehncke et al. 2009). Také hostitel mohl najít způsob, jak svého parazita využít, aby mu poskytoval například rezistenci vůči jiným parazitům nebo faktorům prostředí. Ve chvíli, kdy se parazit začal přenášet vertikálně, začalo pro něj být důležité, aby měl jeho hostitel co nejvíce životaschopných a konkurenceschopných potomků (O'Neill, 2004).

4 Štěnice *(Cimex)*

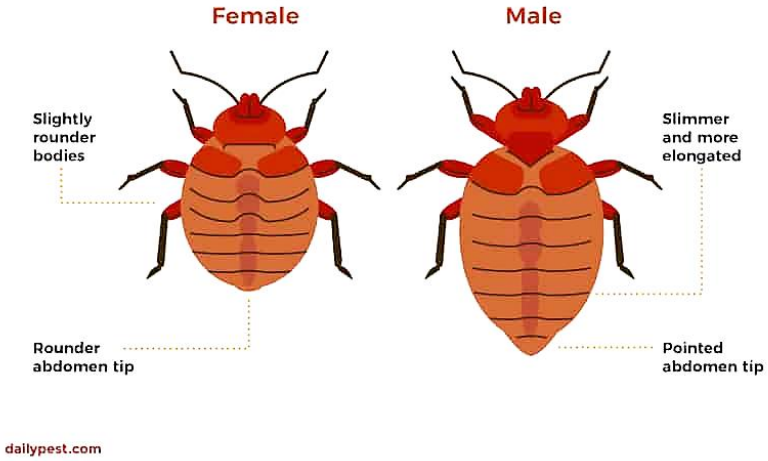
Štenice rodu *Cimex* jsou haematofágní ektoparazité patřící do čeledi štěnicovitých *(Cimicidae),* řádu polokřídlí *(Hemiptera).* Kompletní systematika Čeledi *Cimicidae* dosud není zcela ujednocena. Zahrnuje štěnice asociované s lidmi, netopýry, ptáky atd. Je popsáno přes 110 druhů uspořádaných do 22 rodů a 6 podrodů (Ryckman et al. 1981). *Cimicidae* jsou příbuzní čeledi hladěnkovití (*Anthocoridae)*, jejíž zástupci loví hmyz a roztoče a mohou parazitovat na teplokrevných živočiších. *Cimicidae* jsou pouze dočasnými ektoparazity, obvykle zůstávají v ptačích hnízdech, jeskynních prasklinách nebo ve skulinách lidských obydlí, jelikož nejsou dobře adaptováni na přilnutí k srsti savců nebo k peří ptáků tak, aby se udrželi např. za letu. Pokud se ale stane, že se na srsti nebo peří udrží, distribuují se na delší vzdálenosti (Usinger, 1966).

Protože jde o hmyz podřádu ploštic *(Heteroptera)*, mají svůj pach, který vylučují z párových pachových žláz na ventrální straně třetího hrudního somitu (tělního segmentu). Tuto pachovou stopu ale v odborné literatuře každý popisuje trochu jinak (olejnatý, sladký). U ploštic i u štěnic je primární funkcí pachu obranný mechanismu před predátory. U štěnic zastává i funkci agregační-vytvoření kolonií a vyhledávání partnerů nebo úkrytů (Kemper, 1931).

Štěnice, která žije v průměru šest měsíců, má 7 vývojových stádií (od vajíčka přes nymfu až po dospělého jedince), z toho 5 stádií larválních (Obrázek 3). U larev se jedna tato fáze nazývá instar. Vajíčka jsou bílé podlouhlé útvary, které na délku měří cca 1,2 milimetru. Poté, co samice naklade vajíčka, trvá přibližně 5-8 dní, než se z nich vylíhne nymfa (1. instar). Nymfy se nijak výrazně neliší od dospělců, kromě velikosti těla mají odlišné také zbarvení. V první až druhé vývojové fázi je tělo průhledné. Dá se v něm tedy velmi dobře poznat, zda je jedinec nakrmený či nikoliv. Přechodem na další fázi jedinec roste, tmavne, vyvíjí se tělesná schránka. Proces svlékání a tudíž i celkový vývoj závisí na mnoha faktorech (množství dostupné potravy, látky v potravě i druh) (Hypša, Aksoy, 1997). Samičky mají tělo kulatější, zatímco samci jsou štíhlejší a protáhlejší, zvláště když nejsou nakrmeni. Pohlaví lze poznat podle zahnutí nebo tvaru zadečku, kde je u samců i pouhým okem vidět asymetrie pohlavního orgánu (Obrázek 4).



Obrázek 3:Životní cyklus štěnice (URL 2)



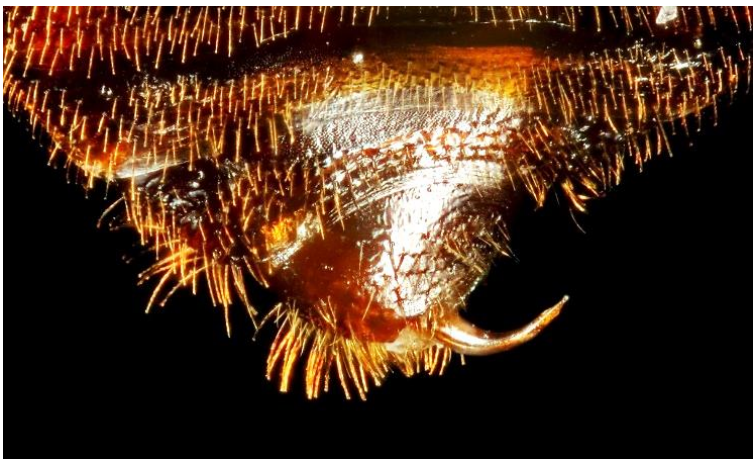
Obrázek 4:Rozdíl ve tvaru těla samice(vlevo) a samce (vpravo) (URL 3)

Dospělci měří v průměru okolo čtyř až pěti milimetrů. Velmi atrofovaná, zakrnělá křídla jsou nenápadná a nefunkční. Mají dorzoventrálně zploštělé, oválné, žlutohnědé nebo červenohnědé tělo, které se po nasátí krve zaoblí. Tykadla se skládají ze čtyř segmentů, přičemž dva distální jsou pokryty hmatovými chloupky pro lepší smyslové vnímání, stejně jako nohy a tělo. Nápadné je silně sklerotizované pronotum, které je dvakrát tak široké, než dlouhé.

Páření se odehrává mimo hostitele a zahrnuje jedinečnou formu kopulace zvané "traumatické oplodnění" (Obrázek 5). Samec pronikne do břišní stěny samice svými vnějšími genitáliemi, které jsou tvořeny levou paramerou (Obrázek 6). Samice se

tedy oplodňuje do sekundárního pohlavního orgánu tzv. paragenitálního sinusu na pravé straně pátého břišního segmentu. Nijak neobvyklé nejsou ani pokusy o stejnopohlavní páření (Usinger, 1966).

Obrázek 5:Samec provádí traumatické oplodnění (URL 4)



Obrázek 6:Detail samčího pohlavního orgánu (URL 5)

Za svůj život naklade štěnice 200–500 vajec, která jsou nejčastěji přichycena na substrátu v úkrytu hostitele. Bez potravy (krve) dokáže dospělá štěnice přežít i několik měsíců. Nejznámější je štěnice domácí, která se vyskytuje především v lidských obydlích a parazituje na lidech (Reinhardt, Siva-Jothy, 2007).

Štěnice asociované s lidmi byly po druhé světové válce téměř vyhubeny ve Spojených státech a dalších vyspělejších zemích. Jejich zmizení bylo pravděpodobně způsobeno všeobecným používáním dichlorodifenyltrichlorethanu (DDT) a jiných širokospektrálních insekticidů během druhé poloviny dvacátého století. Jako příčinu globálního oživení štěnice dává Sailer (1952) zvýšenému pohybu lidské populace prostřednictvím cestování a migrace.

Jak se civilizace rozvíjela, odlesňování a eroze půdy změnily celkovou ekologii Středního východu. Tato změna ovlivnila nejen člověka, ale i netopýry a štěnice. Je možné, že štěnice mohly parazitovat na člověku již během jeho raného vývoje v pleistocénu a dále v období paleolitu a neolitu. Zdá se však pravděpodobnější, že se hostitelsko-parazitický vztah člověka a štěnice trvale ustanovil během období stěhování člověka z jeskyně do vesnic a měst (Usinger, 1966).

Stejně jako jiné organismy jsou i štěnice součástí komplexního ekosystému a jsou ovlivněny různými prvky v jejich prostředí. Z různých faktorů je teplota zdaleka nejdůležitější, protože ovlivňuje všechny aspekty jejich činností (Sailer, 1952).

4.1 Štěnice domácí (*Cimex lectularius*)

Nejznámější druh je bez pochyby štěnice domácí pro svůj vztah s člověkem. V minulosti se vyskytovaly hlavně v Evropě a na Středním východě. První autentické písemné záznamy šíření *Cimex lectularius* byly v Řecku okolo roku 400 př. n. l., v Itálii do roku 77 n. l. a v Číně do roku 600 n. l. Podle Kempera (1931) byl první záznam pro Německo v 11. století ve Strassburgu, pro Francii ve 13. století a pro Anglii v roce 1583. Traduje se, že se štěnice v Anglii před rokem 1666 vůbec nevyskytovaly, ale že byly dovezeny ve dřevě z Ameriky po požáru Londýna právě roku 1666. Před druhou světovou válkou bylo hlavní ohnisko výskytu štěnic v Německu a Anglii (Usinger, 1966).

Obrázek 7:Dospělý jedinec C. lectularius – dorzální strana-samice (foto: Ondřej Balvín)

Běžně se vyskytuje v synantropních koloniích netopýra velkého. Datování na základě mitochondriální DNA ukazuje, že se na člověka upnula dávno v pravěku. Horváth (1913) udává, že je mnohem starší jejich vztah právě s netopýry. Ti byli pro štěnici snadnými hostiteli v dobách, kdy obývali jeskyni daleko od lidí. Jelikož je štěnice domácí druh mírného pásu, je aktivní při teplotě od 13°C do 30°C a prahová teplota pro líhnutí, vývoj a aktivitu je mezi 13°C a 15°C (Usinger, 1966). Extrémně nízké nebo vysoké teploty brzdí, nebo úplně znemožňují její vývoj. Johnson (1942) tvrdil, že ohromný nárůst zamoření v severoevropských městech na počátku 20. století

byl způsoben zvýšeným využitím ústředního topení. Parazituje na netopýrech, lidech, domestikovaných druzích savců. Okolí štěrbinového paragenitálního sinu je ochlupacené.

4.2 Štěnice tropická (*Cimex hemipterus*)

Cimex hemipterus je druh vázaný na teplé oblasti, historicky spojován především s JV Asií, Indií, nebo Afrikou a Jižní Amerikou, kde se výskyt střídá se štěnicí domácí (Balvín et al. 2020). Omori (1941) ho v kontextu s jeho geografickým původem a tehdejším pozorováním popisuje jako intolerantní k nízkým teplotám a to už od 10°C níže, kdy obecně hůře prosperuje. Balvín et al. (2020) ale udává, že se nyní populace hojně vyskytuje i v Moskvě a Petrohradu, kde byla poprvé objevena v roce 2016 a šíří se na Hawai a po celé Evropě. Parazituje na člověku, netopýrech a drůbeži. Má úzké pronotum a postranní průsvitné laloky, které se mírně rozšiřují a končí ostrým hrotem.

Obrázek 8:Dospělý jedinec *C. hemipterus* – dorzální strana – samice (foto: Ondřej Balvín)

4.3 Štěnice netopýří *(Cimex pipistreli)*

Jak již název napovídá, tento druh parazituje na netopýrech. Vyskytuje se především v holarktické oblasti, tedy území Eurasie a Severní Ameriky. Vyznačuje se holým štěrbinovitým tvarem paragenitálního sinu. Vzhledově se opět nijak výrazně neodlišuje od předešlých dvou druhů. Kvůli dlouhým pobytům ve vlhkých jeskyních na netopýřích hostitelích prosperuje i v relativně vysoké vzdušné vlhkosti (Kemper, 1931).

Obrázek 9:Dospělý jedinec *C.pipistrelli* – dorzální strana – samec (foto: Ondřej Balvín)

5 Bakterie *Wolbachia* a štěnice

Vztahem mezi bakterií *Wolbachia* a hmyzem obecně se zabývá nemálo studií. Avšak málo z nich poskytuje jasné odpovědi v souvislosti se štěnicemi. Experiment této práce potřeboval informační základ, od kterého by se studie mohla odvíjet. Každá kapitola zde rozvíjí jednu z japonských studií, ze kterých tato práce vychází. Jednotlivé studie poskytli jak ověřená fakta týkající se příbuzných druhů, se kterými se pracovalo, tak bilanci různých metod, které se mohly dle našich možností a potřeb upravit a aplikovat.

5.1 Nutriční závislost štěnice domácí na bakteriálním symbiontu bakterie *Wolbachia* a její lokalizace v bakteriomech

Z různých populací štěnice domácí byly pro výzkum který provedl Hosokawa et al. (2010) identifikovány dva bakteriální symbionti –*Wolbachia* a γ-proteobacterium. Jako u většiny hmyzu, který je hostitelem endosymbiotických bakterií, i tyto symbionti byli získáni ze specifických buněk zvaných bakteriocyty, které tvoří specializovaný orgán - bakteriom. Ve výzkumu byl symbiont bakterie *Wolbachia* zjištěn u všech 105 zkoumaných jedinců štěnic z různých populací, zatímco γ-proteobacterium bylo detekováno pouze u 53%. Nabízel se tedy závěr, že γ-proteobacterium není hlavním nezbytným symbiontem, jelikož se nevyskytoval u všech jedinců.

Závislost *C. lectularius* na bakterii *Wolbachia* byla zjišťována antibiotickým ošetřením kmene štěnic JESC (japonský kmen štěnice domácí) a to podáváním rifampicinu rozpuštěného v methanolu při koncentraci 10μg/ml. Skupině takto ošetřených štěnic byly navíc kompenzovány vitamíny B. Sledován byl počet nakladených sterilních a fertilních vajíček a proces vývoje do dospělce. Aposymbiotické štěnice vykazovaly vyšší poměr sterilních vajíček a delší dobu vývoje v dospělce. Dále se vliv projevoval na prodlouženém období stádia nymfy, zvýšeném podílu sterilních vajíček nebo úplné neschopnosti dospět. Perorálním doplněním B vitaminů se normalizoval biologický stav hostitele, čímž byla potvrzena základní nutriční role symbionta pro hostitele. Obligátní nutriční vztah *Cimex lectularius* a bakterie *Wolbachia* byl prokázán poskytováním biotinu a riboflavinu. Autoři této studie zdůrazňují, že nutriční vzájemnost spojená s bakteriocyty se může

vyvinout z fakultativních a převládajících mikrobiálních asociací jako je *Wolbachia*, což zdůrazňuje dříve neznámý aspekt vzájemného vývoje a evolučního kontinua.

Fluorescenční *in situ* hybridizace a elektronová mikroskopie zde jednoznačně specifikovala lokalizaci bakterie nejen v bakteriomech, ale i ovariolech a oocytech, což naznačuje mechanismus vertikálního přenosu.

5.2 Evoluční původ biotinového operonu a nutričního vztahu mezi bakterií *Wolbachia* a *Cimex lectularius*

Účelem této studie, kterou provedl Nikoh et al. (2014), bylo definovat, jaké evoluční procesy a mechanismy se podílely na vzniku vzájemného nutričního vztahu mezi bakterií a štěnicemi a jak a kdy v průběhu koevoluce získal druh *Cimex lectularius* biotinový operon. Díky komplexnímu průzkumu genomických dat se zde diskutuje na úrovni evoluční hypotézy o získání biotinového operonu u *C. lectularius* v průběhu koevoluce hmyzu a bakterie *Wolbachia*.

Určil se zde kompletní genom bakterie *Wolbachia* asociované s *Cimex lectularius*, který byl svou velikostí a složením podobný genomům fakultativních endosymbiontů bakterie *Wolbachia*. Ve studii byly použity štěnice kmene JESC, TUA (Tokio, Japonsko), TIH (Toyama, Japonsko) a SYDL (Sydney, Austrálie) a *Cimex japonicus* Usinger, 1966 (Hokkaido, Japonsko), jejichž DNA byla podrobena namnožení a sekvenování.

Po shromáždění bakteriomů z těl 26 štěnic kmene JESC a extrakci DNA ze symbiotických orgánů, byla DNA podrobena sekvenování. Z přečtených fragmentů bylo získáno 1 250 060 bp cirkulárního bakteriálního genomu. Přestože všechny známé genomy bakterie *Wolbachia* spojené s hmyzem mají běžně kompletní cestu pro riboflavin (vitamin B2) a částečnou cestu pro pyridoxin (vitamin B6) a folát (vitamin B9), genom bakterie *Wolbachia* u štěnice *Cimex lectularius* navíc obsahoval kompletní cestu pro biotin (vitamin B7) a částečnou cestu pro thiamin (vitamin B1). Geny pro biotinovou syntézu bioC, bioH, bioF, bioA, bioD a bioB vytvořily kompaktní operon na genomu *C. lectularius*, stejně jako tři geny zapojené do thiaminové dráhy, tenA1, thiD a i thiM. Ze všech těchto výsledků vychází hypotéza, že syntetické dráhy pro biotin, thiamina další vitaminy B se dynamicky pohybovaly napříč různými bakteriálními liniemi, pravděpodobně jako evolučně

soudržné funkční moduly nebo operony. Obsah vitamínů byl analyzován pomocí hmotnostního spektrometru, kdy se odebraly nymfy od různých treatmentů 10 dní po posledním krmení ve třetím instaru. V pokusu se sledoval vývoj štěnic léčených antibiotiky s uměle upravenou potravou se všemi vitamíny, s vitamíny kromě thiaminu a s vitamíny kromě biotinu.

Cimex lectularius byl po přijmutí potravy s ATB opět opožděný ve vývoji a kladení a častý byl předčasný úhyn. Ve čtvrtém instaru byl z hmyzu extrahován a kvantifikován vitamín B, který se u léčených zvířat ATB objevoval v nižším množství než u skupiny kontrolní. Zároveň byla objevena skutečnost, že je štěnice schopná syntetizovat vitamin B1 a B6 (thiamin a pyridoxin). Skupiny bez biotinu a skupiny bez všech vitamínů s ATB dospívaly špatně. Naproti tomu, když byl thiamin selektivně vynechán z potravy doplněné o vitamín B, nebyl pozorován žádný významný pokles kondice. To je pravděpodobně odraz neúplné syntetické cesty pro thiamin v genomu bakterie *Wolbachia* u *C. lectularius*. Fylogenetická analýza podporuje hypotézu, že geny pro syntézu biotinu byly získány jako celý biotinový operon u předka *Cimex lectularius* a *Onchocerca ochengi* laterálním přenosem genů z nepříbuzné bakterie, která byla fakultativní endosymbiont.

5.3 Genové dráhy vitamínů B v bakterii *Wolbachia*

Moriyama et al. (2015) se zde zaměřil na geny zodpovědné za syntézu riboflavinu u kmenů bakterie *Wolbachia* asociovaných s hmyzem. Gen pro syntézu riboflavinu ribA, ribB, ribC ribD, ribE a ribF nebyl nalezen jako koherentní operon, ale byl rozptýlen po genomu bakterie. Vzhledem k tomu, že geny pro syntézu riboflavinu byly stabilní po celou dobu evoluce bakterie, očekává se, že fylogeneze genů pro syntézu riboflavinu by měla odrážet genomickou fylogenezi bakterie *Wolbachia*. Fylogeneze založená na proteinových sekvencích RibA, RibC, RibD, RibE a RibF vykazovala v podstatě stejné vzorce: superskupiny A, B, C, D a F byly identifikovány jako odlišné linie.

Naproti tomu fylogeneze založená na RibB proteinových sekvencích vykazovala zvláštní vzor: byly identifikovány dvě velké sesterské větve, jedna sestávající ze sekvencí superskupin A, B, C, D a F („předpokládaný typ vertikální transmise“) a druhá obsahující sekvence pouze ze superskupin A a B (předběžně nazývané „předpokládaný typ laterální transmise“). Tyto vzorce mohou odrážet složité

vývojové trajektorie RibB během diverzifikace bakterie *Wolbachia*. Z této situace vyplývá, že se RibB mezi superskupinami v historii přenášel horizontálně. Fylogenetické analýzy v genomech bakterie *Wolbachia* projevovaly typické fylogenetické vzorce odrážející genomickou fylogenii bakterie.

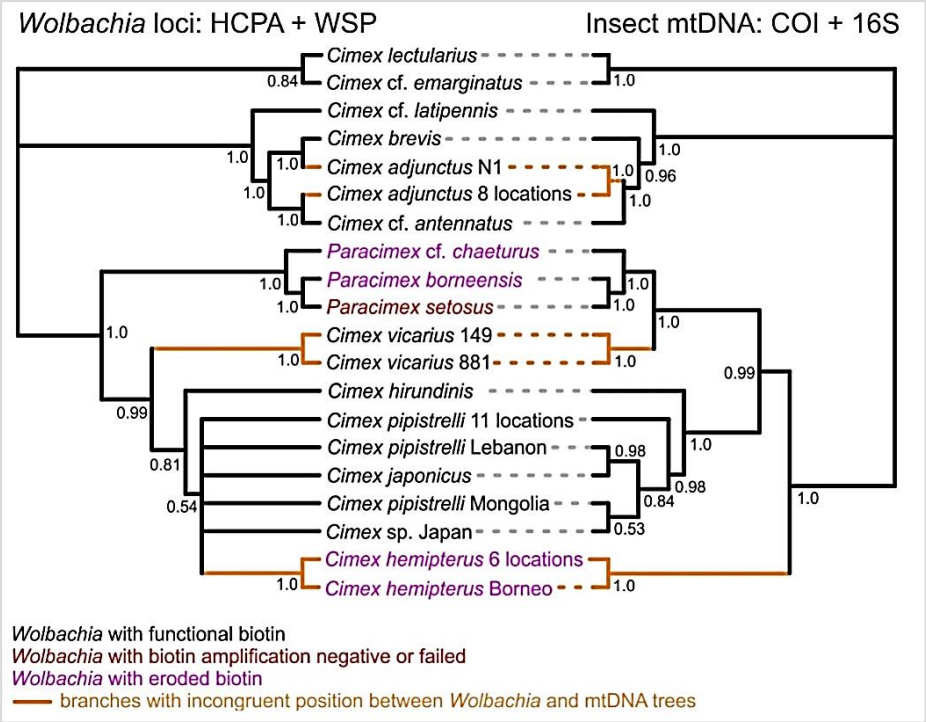
Celkově lze říct, že cesta syntézy ribofavinu napříč různými kmeny *Wolbachia* a shoda mezi geny pro syntézu riboflavinu a genomickou fylogenezí bakterie naznačuje, že cesta syntézy riboflavinu byla stabilně udržována v evolučním průběhu různých kmenů *Wolbachia* spojených s hmyzem.

Experimentální pokus na umělém krmném systému s králičí krví, antibiotiky a doplněnými B vitamíny kromě riboflavinu vykazovaly výrazně nižší míru přežití, nižší míru výskytu dospělých a nižší plodnost než ty, které byly chovány na králičí krvi doplněné všemi vitamíny skupiny B. Štěnice ovlivněné ATB a krmené potravou doplněnou o riboflavin a biotin vykazovaly podobnou míru plodnosti, vývinu do dospělce a přežití jako ty, kterým byla poskytnuta potrava se všemi vitamíny B. Stejné výsledky poskytly i skupiny, kterým byl kromě biotinu a riboflavinu doplněn i thiamin, ačkoliv je pravda, že zde se míra plodnosti lehce propadla. Tyto výsledky jsou v souladu s fakty, že mezi syntézními cestami pro vitamíny B kódovanými v genomu *Cimex lectularius* jsou kompletní cesty pro riboflavin a biotin, ale cesty pro ostatní vitamíny B včetně thiaminu jsou neúplné nebo zcela chybí.

5.4 Test prevalence bakterie *Wolbachia* v populacích štěnic a kokladogeneze štěnic a bakterií *Wolbachia*

Vztah mezi *Nematoda* a bakterií *Wolbachia* je znám jako obligátně mutualistický. V rámci druhů vyšších taxonů je zde 100 % prevalence bakterie *Wolbachia*. Celkově jsou vlastnosti štěnic v souvislosti s bakterií *Wolbachia* více podobné vlastnostem hlístic, než vlastnostem ostatních členovců. Zde řešil Balvín et al. (2018) otázky, zda je tomu tak i v kospeciaci štěnic a bakterie *Wolbachia*. Testovala se zde podobnost fylogenetických stromů mezi bakterií a štěnicemi, prevalence mezi druhy v rámci vyšších taxonů a prevalence v rámci druhů štěnic. Napříč druhy štěnic byla tendence potvrdit přítomnost a potenciální funkci biotinových genů, které jsou podkladem pro mutualistický vztah.

Testovanými objekty byli jedinci z blízce příbuzné linie *Cimex lectularius*-tři druhy z rodu *Paracimex* a další *Cimex sp.* z Japonska. Všichni jedinci patřili do podčeledi *Cimicinae*. Všech 68 jedinců ze všech 15 testovaných druhů štěnice bylo pozitivních na bakterii *Wolbachia.* Geny WSP (*Wolbachia* Surface Protein) vykazovaly u všech druhů jednoznačné sekvence jediného přítomného kmene *Wolbachia*, zatímco HCPA (další lokus kódující protein) vykázal u pěti vzorků (2 od *C. pipistrelli* a 3 od *Cimex hirundinis* Lamarck 1816) dvojitý signál, což u těchto druhů naznačuje přítomnost dvou kmenů *Wolbachia*. V současné době není jasné, zda jsou oba kmeny mutualistické nebo ne a zda nepředstavují případ konkurence mezi dvěma kmeny, které by se časem vyřešily. Výskyt dvou kmenů také naznačuje možnost horizontálního přenosu *Wolbachie* mezi druhy štěnic nebo z jiných druhů hmyzu.



Obrázek 10:Kladogramy založené na mtDNAštěnic (vpravo) a Wolbachia WSP a HCPA lokusech (vlevo). (Balvín et al. 2018).

Biotinové lokusy se ukázaly funkční u všech sledovaných druhů, kromě *Cimex japonicus*, což odhalil už Nikoh et al. (2014) a také *Cimex hemipterus.* Nefunkční sekvence genu se našli výhradně u *Cimex hemipterus* a u dvou druhů *Paracimex.* Rozdíl mezi těmito dvěma skupinami a zbytkem druhů *Cimex* je dále podporován délkou větví těchto taxonů na kokladogramu HCPA a WSP ve srovnání s délkou

větví u jiných druhů *Cimex* s funkčním biotinovým lokusem. Zatímco většina druhů štěnice domácí využívá poskytování biotinu bakterií *Wolbachia,* symbióza bakterie u *C. hemipterus a Paracimex spp.* je pravděpodobně evolučně odlišná a může mít jinou funkci. Tato myšlenka může být testována experimentálně pomocí manipulací *Wolbachia* u *C. hemipterus a Paracimex.*

Tři různé provedené testy kokladogeneze jednoznačně podporovaly těsnou shodu fylogenií mezi štěnicemi a bakterií *Wolbachia*. Studie prokázala 100 % prevalenci v rámci druhu a mezi druhy a úzkou kokladogenezi mezi štěnicemi a bakterií *Wolbachia.*

6 Metodika

Objektem pro experiment této práce se stal *Cimex pipistrelli*, jelikož se u něj objevil i jiný kmen bakterie *Wolbachia* (Balvín et al. 2018). Práce měla odhalit, zda má tento kmen dominantní funkci v syntéze vitamínů B2 a B7, nebo jinou. Dále se testoval *Cimex hemipterus* kvůli posunu čtecího rámce sekvence genu pro vitamin B7 (Balvín et al. 2018). V první řadě se provedl rozbor metodiky dřívějších výzkumů. Nejdůležitějším cílem bylo přizpůsobit a zdokonalit dle předlohy metodiku tak, aby fungovala pro studované druhy. Zároveň bylo potřeba postavit experiment tak, aby test metodiky sloužil k předběžnému prozkoumání vztahu testovaných druhů štěnic a bakterie *Wolbachia*.

6.1 Metodika dřívějších výzkumů

a) Hosokawa et al. (2010)

Zde byly štěnice chovány v Petriho misce, uchovávány v konstantní tmě při teplotě 25 °C s kousky papíru jakožto místem pro kladení. Krmeny byly přes parafilmovou membránu na králičí krvi, zahřáté na 37 °C, každé dva týdny.

Z kolonie kmene JESC byli odebráni jedinci a rozděleni na skupiny po třech samicích a třech samcích vždy do dvou týdnů od narození. Každá skupina byla náhodně přiřazena k následujícím treatmentům:

- ATB v kombinaci se všemi vitamíny
- ATB
- Kontrolní ošetření pouze methanolem, který sloužil jako rozpouštědlo pro ATB

Krmení probíhalo každý týden 20 minut a proces reprodukce trval 8 týdnů, přičemž byl zaznamenáván počet nakladených vajec každé skupiny a zda jsou vajíčka sterilní či fertilní. Pro hodnocení účinků bakterie *Wolbachia* na růst jedinců se odebraly nymfy původní kolonie kmene JESC během prvního týdne od vylíhnutí. Nymfy byly opět náhodně rozděleny do skupin po deseti a opět rozděleny k výše zmíněným experimentálním druhům treatmentů. Pozoroval se jejich vývoj až do dospělce nebo do smrti.

b) Nikoh et al. (2014)

Zde byl pro experiment použit stejný kmen a stejný chovný postup jako u předešlého výzkumu.

Prvotně se odchovali rodiče na krvi doplněné o všechny B-vitamíny. Jejich potomci-nymfy prvního stupně pak byli za účelem vyloučení trans-generačního přenosu vitamínů B krmeni do dospělosti krví bez suplementace B-vitamíny. Těmto dospělým jedincům bylo umožněno páření a jejich potomci byli náhodně rozděleni do následujících experimentálních skupin:

- ATB bez vitamínů
- ATB se všemi deseti vitamíny
- ATB se všemi vitamíny bez B2 nebo bez B7

Hmyz byl krmen jednou týdně a proces se opakoval, dokud hmyz nedospěl nebo neuhynul. Sledovala se zde úspěšnost vývoje larev do dospělce a délka tohoto vývoje.

c) Moriyama et al. (2015)

Zde byl pro experiment použit stejný kmen a stejný chovný postup jako u předešlého výzkumu.

Před nutričním experimentem byli rodiče léčeni ATB a následně chováni na potravě doplněné o všechny B-vitamíny. Jejich potomci pak byli po celou generaci krmeni na krvi bez suplementace, čímž se opět eliminovaly účinky přenosu B-vitamínů od matky. Novorozené nymfy těchto jedinců byly jednou nakrmeny krví bez suplementace a následně rozděleny do pěti skupin, kterým byly přiděleny treatmenty:

- Pouze ATB
- ATB se všemi 10 vitamíny
- ATB se všemi vitamíny bez B2
- ATB + B2 a B7
- ATB + B2, B7 a B1 (thiamin)

Každá skupina o deseti nymfách byla krmena jednou týdně a sledována za účelem získání informací ohledně úspěšnosti vývoje larev do dospělců, délky vývoje do dospělců a míry přežití. Odebraným dospělým samicím bylo následně po dobu 16 týdnů počítáno množství nakladených vajec.

6.2 Materiál a podmínky chovů a experimentů

Kolonii *Cimex hemipterus* přivezla Martina Komárková z Bornea v roce 2015, *Cimex pipistrelli* byl nasbírán Ondřejem Balvínem v kolonii netopýra velkého *Myotis myotis* Borkhausen, 1797 ve městě Dubá v roce 2014, kolonie *Cimex lectularius* byla nasbírána v kolonii stejného druhu netopýra v Hanušovicích Tomášem Bartoničkou, také v roce 2014.

Štěnice byly z velké předpřipravené kolonie rozděleny po párech, vždy do jedné krmící zkumavky, která byla popsána tak, aby bylo zřejmé, o jakou linii se jedná, jakými látkami je upravena jejich potrava a identifikační číslo každé zkumavky.

Prostor laboratoře, kde se se štěnicemi manipulovalo, byl specificky upraven. Krmící místnost byla vybavena červeným světlem, které se používalo během krmícího procesu, aby při manipulaci nebo pozorování nebyl narušen biorytmus štěnic. Krmící nahřívaná plocha zaručovala udržení teploty podávané krve po požadovanou dobu. Klimaboxy zaručovaly klid, teplotu 27 °C a vlhkost vzduchu 70 %, ideální pro vývoj, kladení nebo svlékání štěnic.

Problematika krmení, počítání štěnic a vajíček byla vyřešena krmícími zkumavkami. Víčko z průhledné zkumavky o objemu 15 ml bylo vyříznuto a nahrazeno síťkou, která umožňovala přístup k potravě bez toho, aniž by štěnice prostor zkumavky opustily. Do té byl pro uchycování pohybu štěnic a kladení vajíček přidán černý papírek.

Krev, která byla využívána ke krmení štěnic, byla komerčně dostupná lidská krev z fakultní nemocnice v Bohunicích v Brně. Krev obsahovala konzervant CPDA-1, který po dlouhou dobu udržoval červené krvinky životaschopné, udržováním hladiny ATP. Jedná se o antikoagulační roztok, obsahující kyselinu citronovou, citrát sodný, monobazický fosforečnan sodný, dextrózu a adenin, který umožňuje skladovat krev při teplotě 2-5 °C po dobu až 35 dní (Jedovnická, 2007).

Pro tento experiment se krev vždy v den krmení rozdělila a pro každou skupinu štěnic se utvořila zvlášť krmná dávka do utvořených parafilmových sáčků, které byly pevné, ale štěnice se skrze ně pomocí bodavě-sacího ústrojí snadno nakrmí. Míchání krve s látkami probíhalo v laboratoři vždy jednou týdně těsně před krmením.

Po namíchání byly sáčky s krví nahřáty na desce ve vodní lázni pro udržení teploty krve na 38° C. Poté byly krmící zkumavky přiloženy víčkem dolů na sáček. Krmení jedné zkumavky obvykle trvalo 10-15 min pro úplné nasycení štěnic a probíhalo buď ve tmě, nebo pod červeným osvětlením.

6.3 Test vlivu bakterie *Wolbachia* na životní projevy štěnic

V experimentu se navazovalo na tyto studie: Nikoh et al. (2014), Hosokawa et al. (2010) a Moriyama et al. (2015). Díky výzkumům, kde se potvrdilo dodávání riboflavinu a biotinu bakterií *Wolbachia* štěnícím *C. lectularius*, se na základě studie, kterou provedl Balvín et al. (2018), predikovala stejná skutečnost u druhů *Cimex pipistelli* a *Cimex hemipterus*. Proto práce věnovala pozornost právě vitamínu B2 a B7 a zaměřila se na prokázání jejich syntézy prostřednictvím bakterie *Wolbachia*. Za tímto účelem a díky vědomostem předchozích studií se sledovanými parametry stalo množství nakladených vajíček a vývoj jedinců od larválního stádia až po dospělce, přičemž pomocnými determinanty se stalo i rozlišení vajíček sterilních či fertilních.

Příprava a míchání krve v rámci treatmentů se odvozovala též od předchozích výzkumů. Použité vitamíny byly míchány v rozpouštědle PBS (Phosphate Buffered Saline)-fosfátový roztok s 0,15 NaCl (Lake, Friend, 1968) (viz Tabulka 2). Antibiotikum rifampicin, úzkospektré antibiotikum, které patří mezi antituberkulotika a tlumí nebo úplně vymýtí účinky bakterie, bylo rozpuštěno v methanolu. Kontrolní treatment, tedy treatment pro kontrolní skupinu, neobsahoval žádné přidané látky. PBS a methanol se do kontrolní krve přidával, aby se krev naředila stejně jako krev s ostatními treatmenty. Tím bylo vyloučeno potenciální zvýhodnění „hustší“ krve. Dalším důvodem bylo objevení methanolu pouze v upravené krvi a riziko případné toxicity methanolu.

Compounds*	Final concentration*
Thiamine	100 µg/mL
Riboflavin	20 µg/mL
Nicotinic acid	100 µg/mL
Pantothenic acid	100 µg/mL
Pyridoxine	100 µg/mL
D-biotin	1 µg/mL
Folic acid	30 µg/mL
Cobalamin	1 µg/mL
Choline chloride	185 µg/mL
Meso-inositol	118 µg/mL

*Prescription according to a previous study on the kissing bug *Rhodnius prolixus* (1)

Tabulka 2: Přehled B vitamínů použitých pro úpravu krve podle předlohy (Lake P., Friend W. G., 1968)

6.4 Pokus 1 – Test vlivu bakterie *Wolbachia* na larvální vývoj štěnic

Účelem prvního pokusu bylo charakterizovat vliv treatmentu na vývoj jedince (doba svleku), tedy doba, za kterou se larva vyvine do dospělce. Jelikož šlo o první test, byl zároveň brán jako potvrzení fungující metodiky. Pro tento test se zvolila jen základní forma treatmentů. Pro každou skupinu s určitým počtem jedinců byly vytvořeny tři replikáty každého treatmentu pro BOR a dva replikáty pro CPIP (Příloha 1).

Pro pokus bylo z každé kolonie odděleno množství štěnic v prvním instaru, které bylo rozděleno do několika skupin a vždy třetina skupin pro každý druh štěnice byla přiřazena k jednomu z následujících treatmentů:

- krev obsahovala ATB a všechny vitamíny bez B2 a B7.
+ krev obsahovala všechny vitamíny a ATB.
0 kontrolní skupina-krev neobsahovala vitamíny ani antibiotika

Pro první skupinu štěnic, označenou jako „mínus“, se předpokládal zpomalený vývoj v důsledku chybějících vitamínů B2 a B7, které bakterie normálně syntetizuje.

Pro skupinu označenou “plus“, byl předpoklad zastavení syntézy, ale následné navrácení se k normálu díky dodaným vitamínům, které by bakterie štěnici dodávala, kdyby nebyla použita antibiotika. Očekával se tedy výsledek shodný s kontrolní skupinou.

Skupina “nula“, tedy kontrolní skupina by se měla vyvíjet normálně.

Každá skupina byla krmena 1x týdně, vždy 20 minut a následující týden byli spočítáni svlečení jedinci a proces se po dobu 8 týdnů opakoval. Pro přehled byla

vytvořena tabulka, kam se po každém krmení zapisoval počet štěnic v daném instaru. Během testování se *Cimex hemiterus* (z Bornea-označení BOR) ukázal jako jediná linie schopná reprezentovat prováděný test, proto se statisticky vyhodnotily výsledky pouze z této linie.

Vliv ATB a suplementace vitamínů na vývoj *Cimex hemipterus* byl tedy testován pomocí zobecněného lineárního modelu se smíšenými efekty a Bernoulliho binomickým rozdělením závislé proměnné, tedy dosažení a nedosažení dospělosti. Jako faktor sloužil treatment (úprava krve: ATB + 8 vitamínů bez B2 a B7; ATB + 10 vitamínů včetně B2 a B7; kontrola bez ATB a vitamínů) a příslušnost jedince ke skupině byla použita jako náhodný efekt.

6.5 Pokus 2 - Vliv bakterie *Wolbachia* na kladení vajec u štěnic

Druhá část pokusu byla zaměřena na kladení vajíček. K druhému testu se přistoupilo, jelikož první test u CPIP nefungoval - štěnice se na kontrolní krvi nebyly schopny vyvinout. Samice předurčené k tomuto pokusu byly odchovány z larev krmených neupravenou krví. Jednalo se o panenské jedince izolované od zbytku populace až do doby dospělosti a reprodukční zralosti. Před pářením byly tyto samice nakrmeny čtyřikrát dle požadovaných skupin upravenou krví. Po každém dalším krmení, kdy samice vejce nakladly, následovalo sčítání a zapisování dat. První zaznamenaná snůška byla ze čtvrté dávky upravené krve, aby došlo k ovlivnění rodičovských štěnic antibiotiky. Zvlášť se zapisovala vajíčka fertilní, sterilní, nebo vylíhnuté larvy. Po sečtení se všechna vajíčka zlikvidovala a byl vytvořen nový čistý prostor pro další kladení.

Jelikož u *Cimex lectularius* byl znám fakt, že *Wolbachia* dodává oba vitamíny, práce se snažila potvrdit tuto skutečnost u *Cimex hemipterus* prostřednictvím vynechání vždy buď vitamínu B2, nebo B7 a očekávala se snížená produkce vajec.

Krmná dávka měla potvrdit teorii, že antibiotika bakterii *Wolbachia* utlumí a tím se zvýší mortalita nebo sníží produkce vajíček. Jelikož v prvním testu *Cimex hemipterus* na treatmenty reagoval dobře, rozhodlo se o další specifikaci treatmentů. Skupinám druhu *Cimex pipistrelli* byly treatmenty podávány pouze 4 (0,=,-,+) jelikož se tento druh v prvním testu na treatmentech neprojevoval nejlépe.

0 -kontrolní skupina-krev neobsahovala vitamíny ani antibiotika

= -krev obsahovala pouze ATB

- -krev obsahovala ATB a všechny vitamíny bez B2 a B7.

+ -krev obsahovala všechny vitamíny a ATB

B2 - krev obsahovala všechny vitamíny bez B7

B7 - krev obsahovala všechny vitaminy bez B2

Kontrolní skupina “0“ by měla vajíčka produkovat normálně díky dodávaným B-vitamínům od bakterie.

U skupiny označené “=“ byl předpokládán rapidní pokles schopnosti snášet vejce.

Pro skupinu “B2“ a “B7“ bylo očekávání více méně stejné, jako pro skupinu “=“.

U skupiny “–“ se za předpokladu, že bakterie *Wolbachia* syntetizuje určitý vitamín, očekávalo méně nakladených vajec.

Skupina “+“ měla potvrdit, že je aposymbiotický hostitel po suplementaci B2 a B7 schopen normálně snášet, jelikož ATB potlačují pouze bakterii, nikoliv samotné vitamíny.

7 Výsledky

7.1 Pozorování vývojového cyklu

U prvního pokusu se pozoroval larvální vývoj štěnic po dobu 8 týdnů. U CPIP *(Cimex pipistrelli)* a HAN *(Cimex lectularius)* se okolo druhého instaru objevila absence schopnosti se nakrmit. U CPIP také nesouhlasil proces vývoje v závislosti na treatmentu (kontrolní skupina horší než skupina s vitamíny) (Příloha 1).

Výsledek tohoto testu ukázal jeho velmi malou sílu z důvodu malého počtu skupin pro každý treatment. Pomocí ICC (Intraclass correlation coefficient) testu byla následně testována závislost v rámci hladin náhodného efektu. Jelikož se podobnost jedinců v rámci skupin ukázala jako nulová, byl náhodný efekt z modelu vyřazen.

U skupiny "–" (BOR) dosáhly některé larvy pátého instaru společně s larvami ostatních skupin, ale až do osmého týdne pozorování se nesvlékly do dospělce. Výsledky (Tabulka 3) ukazují, že během 8 týdnů dospělo průměrně nejvíce jedinců u kontrolní skupiny "+" kde se z celkového počtu 48 štěnic vyvinulo do dospělosti 33 jedinců. Ve skupině "0", s celkovým počtem 37 dospělo 17 štěnic. Kontrolní skupina "+" si tedy vedla průměrně lépe, než skupina "0". Kompletní tabulka všech sledovaných skupin a jejich výsledků v přílohách (Příloha 1).

Na základě zredukovaného modelu, předpokládajícího nezávislost jedinců v rámci experimentálních skupin, byl efekt úpravy krve na vývoj štěnic průkazný (χ^2=39,6;p =2,508×10^{-9}). Pomocí mnohonásobného srovnání středních hodnot (Tukey contrasts) byly testovány párové rozdíly mezi skupinami s různým treatmentem. Štěnice, kterým byla dodána antibiotika, ale vitamíny B2 a B7 nebyly kompenzovány, se vyvíjely v dospělce se signifikantně menší pravděpodobností (0,032) než štěnice, kterým byly vitamíny kompenzovány (0,687, z =3,941, p < 0,001) a než štěnice z kontrolní skupiny (0,459, z =-0,03, p = 0,00596). Rozdíl mezi kontrolní skupinou a skupinou s kompenzovanými vitamíny nebyl průkazný (z =2,096; p =0,08310).

Linie	Treatment	Skupina	Celkem larev	Celkem adultů
BOR	+	1	17	10
BOR	+	2	17	13
BOR	+	3	14	10
BOR	0	1	8	2
BOR	0	2	17	7
BOR	0	3	12	8

Tabulka 3: Nejkvalitnější získané výsledky svlékání do dospělců u *Cimex hemipterus*

7.2 Pozorování kladení vajec

Jelikož první pokus poskytnul uspokojující množství informací, v druhém pokusu se rozhodlo o podrobnější specifikaci treatmentů.

Výsledky s kladením vajíček se netestovaly statisticky, jelikož získaná data nebyla vypovídající. Skupiny "–" a "=" měly klást méně, než skupina kontrolní "0", což se nestalo. Statistiky pro neplatný test tedy nebylo potřeba.

Pokus spočíval v pozorovaní počtu nakladených vajíček. Kladení bylo pozorováno po dobu 4 týdnů. Procentuálně nejvyšší počet nakladla linie BOR s treatmentem "0" a "+" a úspěšnost nakladených fertilních vajíček zde činila 94 %. U linie CPIP bylo s úspěšností 99 % nakladených fertilních vajíček u skupiny s treatmentem "–" tedy krev s ATB a všemi vitamíny bez B2 a B7 (Tabulka 4).

Vliv ATB u BOR začal být viditelný až druhý týden u skupiny "=", která byla ve výrazném poklesu na rozdíl od ostatních treatmentů. Ačkoliv se čtvrtý týden zvýšil počet vajec u skupiny "+", skupina "=" měla stejné výsledky jako skupina kontrolní.

Přehled procentuálního množství nakladených fertilních vajec během čtyř týdnů (Příloha 4, první řádek) znázorňuje, že kontrolní skupina nakladla více vajec, než skupina "–" a "=". Projevil se zde pozitivní vliv vitamínů, jelikož skupina "+" nakladla více vajec než skupiny, kde chybí B2 a B7. Skupina "+" je na stejné úrovni jako skupina kontrolní (Příloha 4).

U CPIP se vliv ATB potvrdil u skupiny "=", kdy kladla více sterilních vajec než kontrolní skupina "0". Celkově se zde ale vliv ATB a nutriční vztah nedá potvrdit, protože míra sterility nesouhlasila čtvrtý týden pozorování. Stejný problém nastává u skupiny "+", kde byla míra sterility vyšší než u skupiny "-".

	BOR –*Cimex hemipterus*		
TREATMENT	% fertilních vajíček	Týdenní průměr fertilních vajíček	Týdenní průměr sterilních vajíček
0	94%	4,94	0,27
=	92%	5,04	0,42
-	91%	5,42	0,54
+	94%	6,38	0,38
B2	90%	5,73	0,69
B7	89%	5,71	0,65
	CPIP –*Cimex pipistrelli*		
TREATMENT	% počet fertilních	průměr fertilních	průměr sterilních
0	84%	1,27	0,1
=	78%	0,63	0,2
-	99%	2,09	0,03
+	92%	2,14	0,2
B2	X	X	X
B7	X	X	X

Tabulka 4: Procentuální a průměrný počet vajíček nakladený určitou linií dle podávaných treatmentů za dobu 4 týdny

8 Diskuse

8.1 Test vlivu bakterie *Wolbachia* na larvální vývoj štěnic

Test pozorování vývoje byl zvolen z důvodu snadného získání a porovnání výsledků. Pozorování vývoje bylo provedeno v předešlých studiích, které provedl Hosokawa et al. (2010), Nikoh et al. (2014) a Moriyama et al. (2015) a poskytlo tedy náhled na to, jak by proces měl probíhat.

V experimentu se svlékáním byla linie BOR (*Cimex hemipterus*) schopna jako jediná ve větší míře dokončit cyklus. Předpokládáme, že jelikož je linie BOR v tomto experimentu jediná lidská linie štěnic, reagovala na podávanou potravu (lidskou krev) nejlépe a tím byla schopna projít celým vývojovým stádiem až do dospělce. Bylo tedy potvrzeno, že bez biotinu a riboflavinu mají štěnice mizivou, nebo nulovou možnost se vyvíjet a může se potvrdit důležitost syntetizovaných vitamínů, které dodává bakterie *Wolbachia*.

Z pozorování, že se skupina "+" (BOR) svlékala lépe (ač neprůkazně) než skupina kontrolní, můžeme usuzovat, že suplementované vitamíny, bez ohledu na specifickou přítomnost vitamínů B2 a B7 pomohly této skupině se vyvinout.

Od skupin CPIP a HAN se žádných uspokojivých výsledků nedostalo, jelikož u žádné skupiny, kromě CPIP "+", žádný jedinec nedospěl. Výsledek, který u CPIP ukazuje, že po dodání všech vitamínů u skupiny "+" byly štěnice schopné dospět rychleji než skupiny kontrolní, ilustruje stejný mechanismus jako u BOR, tedy že suplementace B vitamínů sama o sobě pomáhá vývoji. Tento problém již řešil Balvín et al. (2018) při chovu *Cimex pipistrelli,* kdy v kolonii přetrvávaly třetí instary, u kterých se vývoj zastavoval. Přes vědomí ohledně této skutečnosti se doufalo, že pokus ukáže nějaké rozdíly. Bohužel, kontrolní skupina této linie neprosperovala. Přesná příčina špatného prospívání na podané potravě není známa, ale možná je obecná intolerance *C. pipistrelli* k lidské krvi, při které se špatně vyvíjí.

Pravdou je, že některé zvláště netopýří linie mají v rámci období roku sníženou plodnost (Ondřej Balvín, 2020, in verb.). Zda experiment probíhal právě v této sezóně zimního klidu a zda se jedná o klíčový faktor, zůstává nezodpovězenou otázkou.

Na základě tohoto poznatku se budoucí práce mohou zaměřit na rozdělení kontrolní skupiny na skupiny dvě, obě bez ATB, jedna s vitamíny a druhá bez, aby bylo možné kvantifikovat vliv vitamínu samotných.

Rozpor výsledků této práce s výsledky předešlých studií, které provedl Nikoh et al. (2014), kde byl pozorován pouze *Cimex lectularius*, je nesporný. Důvod, proč byl experiment této práce úspěšný jen z části, může vycházet z použití odlišných linií. Může se spekulovat, zda *Cimex pipistrelli*, stejně jako netopýří linii štěnice domácí, nesvědčí lidská krev, a proto ve výzkumu (narozdíl od předchozích) byly výsledky nevypovídající. Pro pravděpodobnost této hypotézy svědčí výsledky kontrolních skupin výzkumu Hosokawa et al. (2010), které poukazují na zpomalený vývoj u *C. lectularius* po manipulaci s potravou, zatím co studie této práce říkají, že omezením účinků bakterie *Wolbachia* u *C. hemipterus* štěnice ztrácí schopnost dospět a stagnuje v pátém instaru.

8.2 Vliv bakterie *Wolbachia* na kladení vajec u štěnic

Tento test byl zvolen z důvodu úspěšnosti prvního testu. Ačkoliv ne u všech druhů první test potvrdil závislost na bakterii *Wolbachia*, vývoj odpovídal vlivu podávané potravy u *Cimex pipistrelli*, který na kontrolní krvi prospíval hůře, než na krvi s kompletní dávkou vitamínů. Test s kladením vajíček se jevil jako spolehlivější – treatmenty se mohly projevovat jasně v počtu nebo v životnosti vajíček.

Souhlasily zde výsledky s predikcí ohledně vlivu podávání vitamínů a syntézy, tedy u kontrolní skupiny "0" a skupiny "+", což znamená, že po suplementaci vitamínů štěnice kladly stejně dobře jako štěnice, kterým s potravou nebylo manipulováno. Linie CPIP a následně i linie BOR ale úspěšnost prováděného experimentu zredukovala, jelikož nejúspěšněji kladla skupina "–" tedy krev s ATB a všemi vitamíny bez B2 a B7 a výsledky byly srovnatelné se skupinou "=" a kontrolní skupiny "0". Z logického hlediska je tedy tento test nevypovídající, jelikož není možné, aby štěnice bez dvou nejdůležitějších vitamínů pro reprodukci a vývoj snášely více vajíček, než štěnice s výhodou v suplementaci.

První týden pokusu u BOR nebyly výsledky kvalitní a srozumitelné. Zpracovaná data (Příloha 2) ukazují všechny treatmenty skoro ve stejné linii. U CPIP vliv ATB nebyl zřejmý. Druhý týden pokusu u BOR se výsledky oproti minulém týdnu výrazně

změnily, stále ale neodpovídají predikci vůči kontrolní skupině. Třetí týden nevykazuje výrazné změny a během čtvrtého týdne, kdy byl očekáván největší efekt, se nepatrně zvýšil počet vajec u skupiny "+" (Příloha 2).

Data z pozorování sterilních vajíček bohužel neříkají žádné užitečné informace, neboť výsledky nesouhlasily s podávanými treatmenty. U CPIP je celkově skupina "=" víc sterilní (kladla více sterilních vajec) než "0". To se ale netýká čtvrtého týdne, kde se míra sterility u skupiny "=" očekávala vyšší, než u skupiny "0". Stejný problém nastává u skupiny "+", kde je míra sterility vyšší než u skupiny "-" (Příloha 3).

Vliv ATB je možná patrný u skupiny BOR v přehledu procentuálního množství nakladených fertilních vajec během čtyř týdnů (Příloha 4, první řádek). Kontrolní skupina zde kladla více než skupina "–" a "=". Stejně tak je možné tušit vliv vitamínů, jelikož skupina "+" kladla více než skupiny, kde chybí B2 a B7 zvlášť. Skupina "+" je na stejné úrovni jako skupina kontrolní. U BOR by podle očekávání neměla skupina "=" klást více než skupina "-" (Příloha 4). Experiment je dle těchto výsledků úspěšný.

Skupina CPIP ani další data v příloze č.4 ale tuto úspěšnost nepotvrzují.

Výsledky kladení vajec po dodávání treatmentu u *Cimex pipistrelli* a *Cimex hemipterus* nám neříkají, že by bakterie vitamíny nedodávala, ale z tohoto testu nelze ani stoprocentně potvrdit, že by je dodávala. Výsledky z počtu sterilních vajíček by ale i přes bezchybnou metodiku nebyly přesné, jelikož samice ve svém přirozeném prostředí občas sterilní vajíčka mezi fertilními nakladou, tedy můžou jednoduše s fertilními korelovat. Vypovídající by tak mohl být poměr sterilních a fertilních vajíček.

Co se týče neúspěšnosti postupu při pozorování kladení vajec, ATB, kterými se samice až do dospělosti krmili, mělo v našem pokusu nejspíše málo času, aby účinně působilo a vliv bakterie *Wolbachia* mohl být prokázán. V metodikách Nikoh et al. (2014) a Moriyama et al. (2015) byl tento problém u *Cimex lectularius* kvalitně ošetřen, ale způsobem, který u *Cimex hemipterus* a *Cimex pipistrelli* nebylo možné aplikovat, neboť ani jeden z těchto dvou druhů nebyl schopný se vyvinout v dospělce na dietě s ATB a nesuplementovanými vitamíny B2 a B7.

Test vztahu bakterie *Wolbachia* a štěnic pomocí sledování vývoje může být v budoucnu aplikován na test s reprezentativním počtem nezávislých skupin pro jednotlivé vitamíny B2 a B7.

Pro test sledování počtů kladených vajíček by bylo v budoucnu vhodné rodičovské štěnice na antibiotikách a bez vitamínů odchovat od larev. Přestože se pro tuto práci nenašel způsob, jak odchov pouze na ATB uskutečnit, japonským studiím se tento odchov u *C. lectularius* podařil. Bylo by tedy vhodné najít jinou možnou variantu odchovu u *C. pipistrelli* a *C. hemipterus.*

Také lze říct, že pro prokázání vlivu vitamínů samotných by bylo vhodné budoucí testování zaměřit i na skupiny s vitamíny bez ATB, tedy testovat skupiny ve všech možných kombinacích s přítomností ATB a vitamínů.

9 Závěr a přínos práce

Experiment se inspiroval metodikou dřívějších prací, které studovali *Cimex lectularius* a postupy aplikoval s modifikacemi na *Cimex hemipterus* a *Cimex pipistrelli*. První test úspěšně prokázal závislost *C. hemipterus* na bakterii *Wolbachia,* pro *C. pipistrelli* je však použitelný s velkou rezervou, jelikož kontrolní skupiny bez antibiotik a vitamínů vykazovaly horší výsledky než experimentální skupina s kompenzovanými vitamíny. Druhý test byl neúspěšný, protože cílové druhy neumožňovaly odchovat celou generaci na antibiotikách bez vitamínů tak, jak to bylo provedeno v japonských studiích, na které práce navazovala. Shrnuté výsledky potvrzují syntetizování biotinu a riboflavinu bakterií *Wolbachia* v těle *C. hemipterus* a důležitost bakterie *Wolbachia* v celém životním cyklu. Práce upozorňuje na možnou citlivost štěnic vůči požité potravě a vůči období, ve kterém se štěnice studují, tudíž i možné neodpovídající výsledky v prováděných pokusech. Nabízí se i možnost špatného, námi vytvořeného životního prostředí v laboratoři. Štěnice se tedy ukazují, přes svoji obecnou odolnost vůči vnějším vlivům, jako velmi citlivé a ovlivnitelné.

10 Přehled literatury a použitých zdrojů

1. Ahmed M. Z., Araujo-Jnr E. V., Welch J. J., Kawahara A. Y., 2015: Wolbachia in butterflies and moths: geographic structure in infection frequency. Frontiers in zoology 12(16). P. 1-9.
2. Archibald J. M., 2009: The Puzzle of Plastid Evolution. Current Biology 19(2). P. 81-88.
3. Atyame C. M., Labbé P., Dumas E., Pascal M., Sylvain Ch., Fort P., Weill M., 2014: Wolbachia Divergence and the Evolution of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens.* PLoS ONE 9(1). P. 1-9.
4. Balvín O., Talbot B., Roth S., Reinhardt K., 2018: Co-speciation in bedbug Wolbachia parallel the pattern in nematode hosts. Sci Rep 8(8798). P. 1-9.
5. Balvín O., Bubová T., Lów J., Sasínková M., Martinů J., Štefka J., 2020: Štěnice tropická v Evropě. DDD 2. S. 73-77.
6. Bouchery T., Lefoulon E., Karadjian G., Neiguitsila A., Martin C., 2013: The symbiotic role of Wolbachia in Onchocercidae and its impact on filariasis. Clinical Microbiology and Infection 19(2). P. 131-140.
7. Bordenstein S. R., Paraskevopoulos Ch., Dunning J. C., Sapountzis P., Lo N., Bandi C., Tettelin H., Werren J. H., Bourtzis K., 2009: Parasitism and mutualism in Wolbachia: what the phylogenomic trees can and cannot say. Molecular biology and evolution 26(1). P. 231–241.
8. Bordenstein S. R., Rosengaus R. B., 2005: Discovery of a Novel Wolbachia Supergroup in Isoptera. Current Microbiology 51(6). P. 393-398.
9. Bordenstein, S. R., Werren, J. H., 1998: Effects of A a B Wolbachia and host genotype on interspecies cytoplasmic incompatibility in Nasonia. Genetics 148(4). P. 1833-1844.
10. Burrows R. L., Pfleger F. L., 2002: Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. Canadian Journal of Botany 80(2). P. 120-130.
11. Bronstein J. L., 2015: Mutualism. Oxford University Press, Oxford.

12. Brown A. M. V., Wasala S. K. W., Howe D. K., Peetz A. B., Zasada I. A., Denver D. R., 2016: Genomic evidence for plant-parasitic nematodes as the earliest Wolbachia hosts. Scientific reports 6(34955). P. 1-14.

13. Correa C. C., Ballard W. J. O., 2015: Wolbachia Associations with Insects: Winning or Losing Againsta Master Manipulator. Frontiers in Ecology and Evolution 3(115). P. 1-18.

14. Čepička I., Kolář F., Synek P., 2007: Mutualismus – vzájemně prospěšná symbióza. Přípravný text biologické olympiády, 42. ročník. Národní institut dětí a mládeže MŠMT ČR, Praha. S. 87. ISBN 978-80-86784-50-2.

15. Dedeine F., Vavre F., Fleury F., Loppin B., Hochberg M. E., Boulétreau M., 2001: Removing symbiotic Wolbachia bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. PNAS 98(11). P. 6247-6252.

16. Douglas E. A., 1994: Symbiotic interactions. Oxford University Press, Oxford. ISBN-13: 978-0198542940.

17. Duron O., Gavotte L., 2007: Absence of Wolbachia in Nonfilariid Worms Parasitizing Arthropods. Current mikrobiology 55(3). P. 193-197.

18. Gerth M., Gansuage M. T., Weigert A., Bleidorn C., 2014: Phylogenomic analyses uncover origin and spread of the Wolbachia pandemic. Nature communications, 5(5117). P. 1-7.

19. Horváth G., 1913: La distribution géographique des cimicides et l´origine des punaises des lits. Extrait du IXe Congres International de Zoologie Tenu a Monaco. S. 294-299.

20. Hosokawa T., Koga R., Yoshitomo K., Meng X. Y., Fukatsu T., 2010: Wolbachia as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. PNAS 107(2). P. 769-774.

21. Husník F., McCutcheon J. P., 2018: Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. Nature Reviews Microbiology 16(2). P. 67-79.

22. Hypša V., Aksoy S., 1997: Phylogenetic characterization of two trans ovarially transmitted endosymbionts of the bedbug Cimex lectularius (Heteroptera: Cimicidae). Insect Molecular Biology 6(3). P. 301-304.

23. Charlat S., Hurst G. D. D., Mercot H., 2003: Evolutionary consequences of Wolbachia infections. Trends in Genetics 19(4). P. 217-223.

24. Jedovnická S., 2007: Krevní transfuze se zaměřením na imunologické aspekty. Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav experimentální biologie, Kyjov. 51 s. (bakalářská práce). „nepublikováno“. Dep. MUNI Masarykova Univerzita v Brně.

25. Jiggins F. M., Hurst G. D. D., 2011: Rapid Insect Evolution by Symbiont Transfer. Science 332(6026). P. 185-186.

26. Johnson C. G., 1942: The ekology oft hebed-bug, Cimexl ectularius L., in Britain. The Journal of Hygiene 41(4). P. 345-461.

27. Kageyema D., Nishimura G., Hoshizaki S., Ishikawa Y., 2002: Feminizing Wolbachia in an insect, Ostrinia furnacalis (Lepidoptera: Crambidae). Heredity 88(6). P. 444–449.

28. Kemper H., 1931: Beiträgezur biologie der bettwanze *(Cimexlectularius L.)*. Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere. 22(1). P. 53-109.

29. King R. C., Stansfield W. D., Mulligan P. K., 2006: A Dictionary of Genetics. Oxford University Press, Oxford.

30. Koehncke A., Telschow A., Werren J. H., Hammerstein P., 2009: Life and Death of an Influential Passenger: Wolbachia and the Evolution of CI-Modifiers by Their Hosts. PLoS ONE 4(2). P. 1-12.

31. Lhotský J., 2014: Když milenky s manželkami táhnou za jeden provaz aneb Redukce genomů u bakteriálních endosymbiontů hmyzu (online) [cit.2014.07.05.], dostupné z https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2014/cislo-5/kdyz-milenky-s-manzelkami-tahnou-za-jeden-provaz.html.

32. Lo N., Casiraghi M, Salati E., Bazzocchi Ch., Bandi C., 2002: How Many Wolbachia Supergroups Exist ?. Molecular Biology and Evolution 19(3). P. 341-346.

33. Lom J., 1995: O složitosti parazitohostitelských vztahů (online) [cit.1995.12.06.], dostupné z https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1995/cislo-12/wolbachia.html.

34. Losos B., 1984: Ekologie živočichů. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.

35. Margulis L., 1998: Symbiotic planet a new look at evolution. Basic Books, New York.

36. Moriyama M., Nikoh N., Hosokawa T., Fukatsu T., 2015: Riboflavin Provisioning Underlies Wolbachia's Fitness Contribution to Its Insect Host. mBio 6(6). P. 1-8.

37. Nermuť J., Půža V., 2014: Parazitické hlístice hmyzu. Živa 4. S. 176-179.

38. Nikoh N., Hosokawa T., Moriyama M., Oshima K., Hattori M., Fukatsu T., 2014: Evolutionary origin of insect-Wolbachia nutritional mutualism. PNAS 111(28). P. 10257-10262.

39. Oborník M., 2009: Endosymbióza jako akcelerátor evoluce. Živa 2. S. 50-52.

40. Oliver D. R., 2003: Life history of the Chironomidae. Annual Review Entomology 16(1). P. 211-230.

41. Omori N., 1941: Comparative studies on the ecology and physiology of common and tropical bedbugs, with special references to there actions to temperature and moisture. Journal of the Medical Association of Taiwan 40(3). P. 555-636.

42. O'Neill S., 2004: Genome Sequence of the Intracellular Bacterium Wolbachia. (online) [cit.2004.03.16.], dostupné z https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0020076.

43. Reinhardt K., Siva-Jothy T. M., 2007: Biology of the Bed Bugs (Cimicidae). Annual Review of Entomology 52. P. 351-374.

44. Ryckman E. R., Bentley G. D., Archbold F. E., 1981: The Cimicidae of the Americas and oceanic islands: a checklist and bibliography. Society for Vector Ecology, Santa Ana, California.

45. Sailer R., 1952: The bed bug: an old bedfellow that's still with us. Pest Control 20(10). P. 22-24.

46. Slavíková J., 1986: Ekologie rostlin. SPN, Praha.

47. Smith D. C., Douglas, A. E., 1987: The biology of symbiosis. Edward Arnold (Publishers) Ltd., London.

48. Usinger R., 1966: Monograph of Cimicidae. Entomological Society of America, Maryland.

49. Volf P., Horák P., 2007: Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha.

50. Voronin D., Cook D. A. N., Steven A., Taylor M. J., 2012: Autophagy regulates Wolbachia populations across diverse symbiotic associations. PNAS 109(25). P. 1638-1646.

51. Werren J. H., Baldo L., Clark M. E., 2008: Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. Nature reviews 6(10). P. 741-751.

52. Zimmer C., 2005: Vládce parazit. Nakladatelství Paseka, Praha.

53. Zug R., Hammerstein P., 2012: Still a Host of Hosts for Wolbachia: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. PLoS ONE 7(6). P. 1-3.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: elektronogramový snímek bakterie *Wolbachia* uvnitř buňky hmyzu (URL 1) 7
Obrázek 2: Fenotypy vyvolané bakterií *Wolbachia* Zdroj: (Werren et al. 2008) 10
Obrázek 3:Životní cyklus štěnice (URL 2) 13
Obrázek 4:Rozdíl ve tvaru těla samice(vlevo) a samce (vpravo) (URL 3)..... 13
Obrázek 5:Samec provádí traumatické oplodnění (URL 4)..... 14
Obrázek 6:Detail samčího pohlavního orgánu (URL 5) 14
Obrázek 7:Dospělý jedinec C. lectularius – dorzální strana-samice (foto: Ondřej Balvín)..... 15
Obrázek 8:Dospělý jedinec *C. hemipterus* – dorzální strana – samice (foto: Ondřej Balvín)..... 16
Obrázek 9:Dospělý jedinec *C.pipistrelli* – dorzální strana – samec (foto: Ondřej Balvín)..... 16
Obrázek 10:Kladogramy založené na mtDNAštěnic (vpravo) a Wolbachia WSP a HCPA lokusech (vlevo). (Balvín et al. 2018). 21

URL 1:: https://alchetron.com/Wolbachia [cit. 2021.02.09]

URL 2:: https://www.cdc.gov/parasites/bedbugs/biology.html [cit. 2015.05.17]

URL 3:: https://premoguard.com/blogs/news/bed-bugs-everything-you-need-to-know-in-2020 [cit. 2020.07.14]

URL 4:: https://www.alexanderwild.com/Insects/A-plague-of-Bed-Bugs/i-hzdnVVq [cit. 2014.04.24]

URL 5:: https://www.lastwordonnothing.com/2012/07/27/tgipf-the-bed-bug-and-his-violent-penis/ [cit. 2012.07.27]

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled symbiotických vztahů a vliv na organismy (Zdroj : http://www1.sci.muni.cz/~mykorrhi/html/typy_symbioz.htm) 3
Tabulka 2: Přehled B vitamínů použitých pro úpravu krve podle předlohy (Lake P., Friend W. G., 1968) 27
Tabulka 3: Nejkvalitnější získané výsledky svlékání do dospělců u *Cimex hemipterus* 31
Tabulka 4: Procentuální a průměrný počet vajíček nakladený určitou linií dle podávaných treatmentů za dobu 4 týdny..... 32

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Kompletní tabulka početu larev a početu jedinců svlečených do dospělců dle jednotlivých treatmentů a linií za 8 týdnů.

Příloha 2: Soubor grafů nakladených fertilních vajíček u BOR a CPIP.

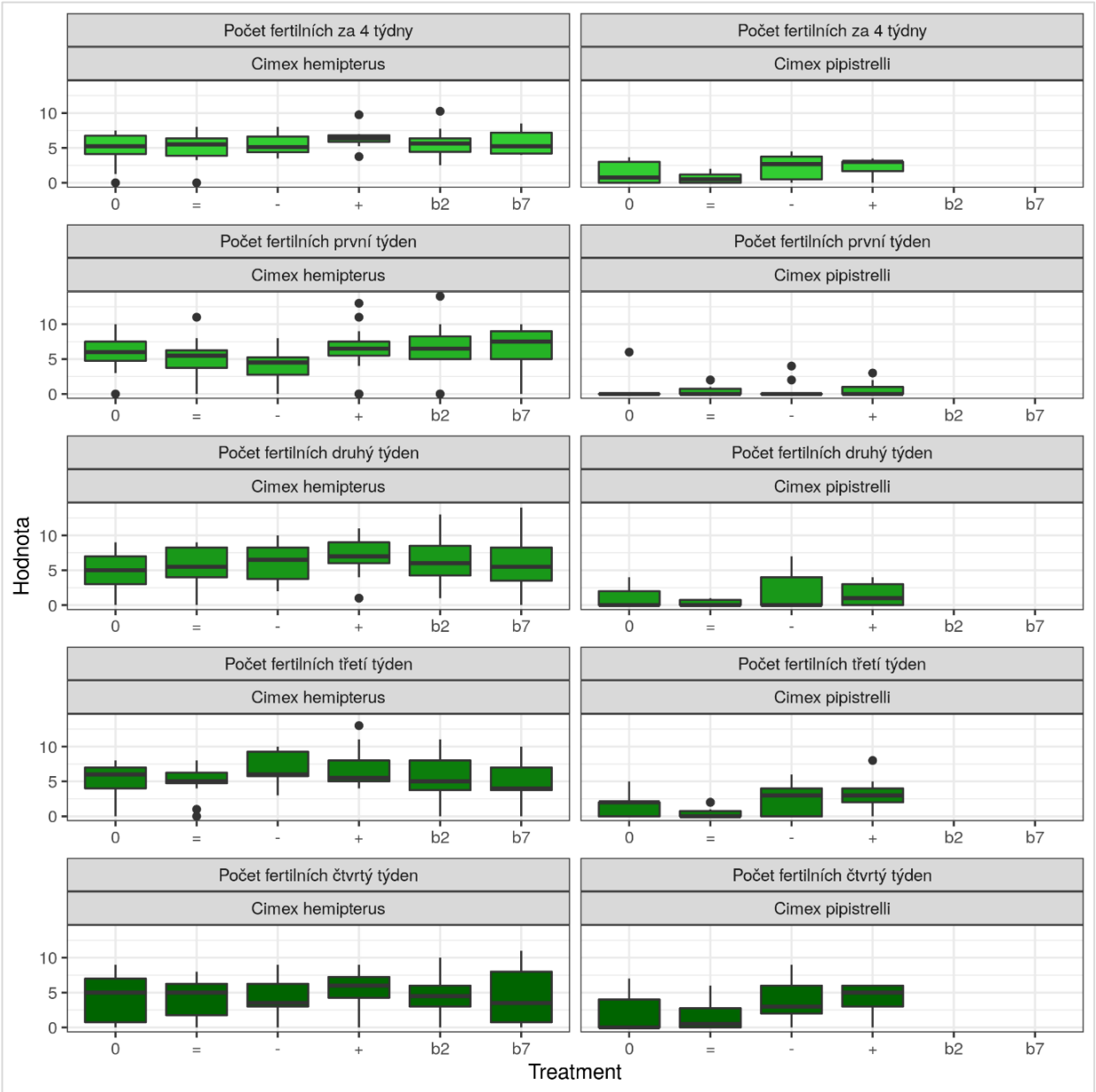
Příloha 3: soubor grafů nakladených sterilních vajíček u BOR a CPIP.

Příloha 4: soubor grafů procentuálního množství nakladených fertilních vajíček u BOR a CPIP.

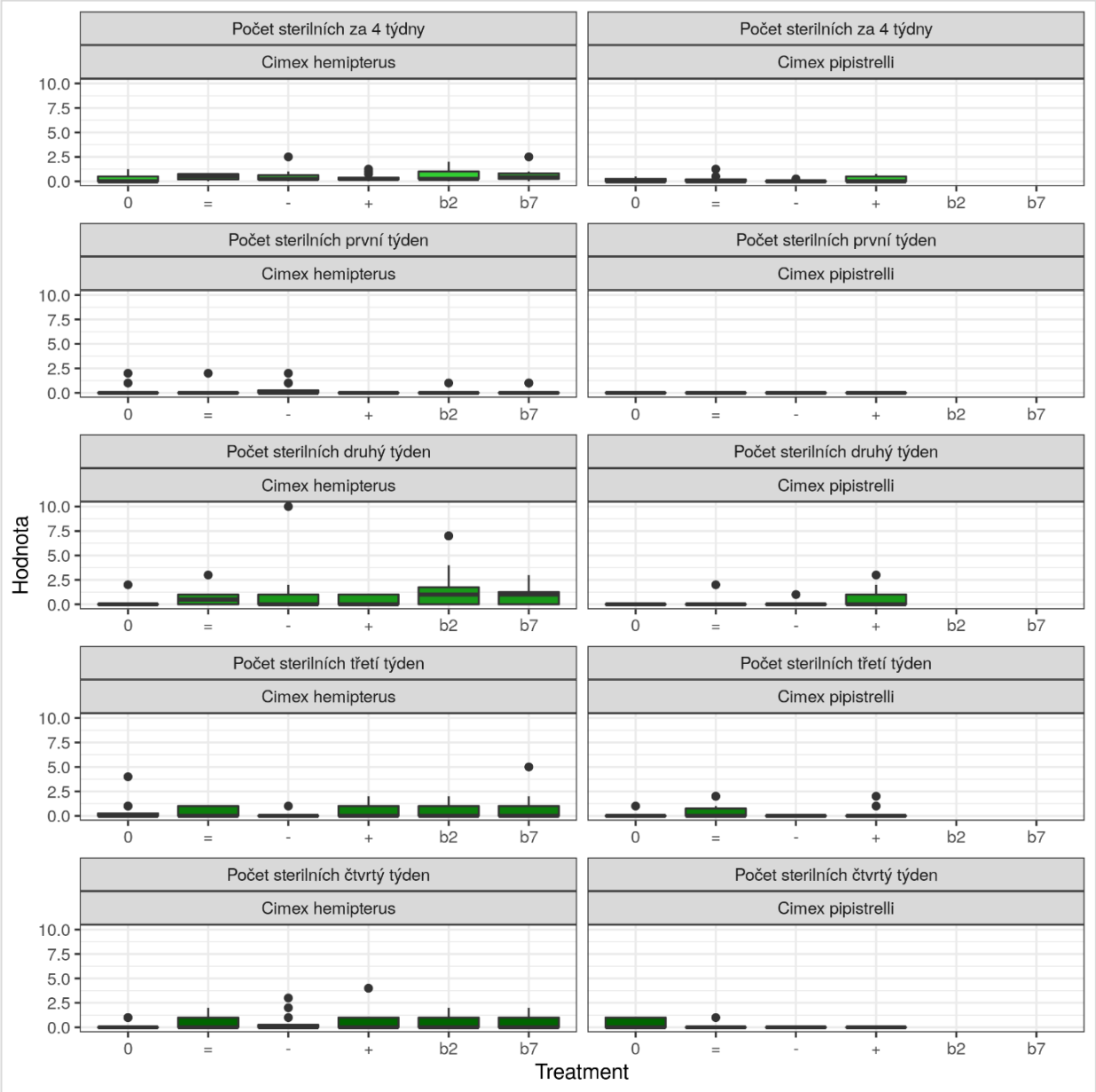
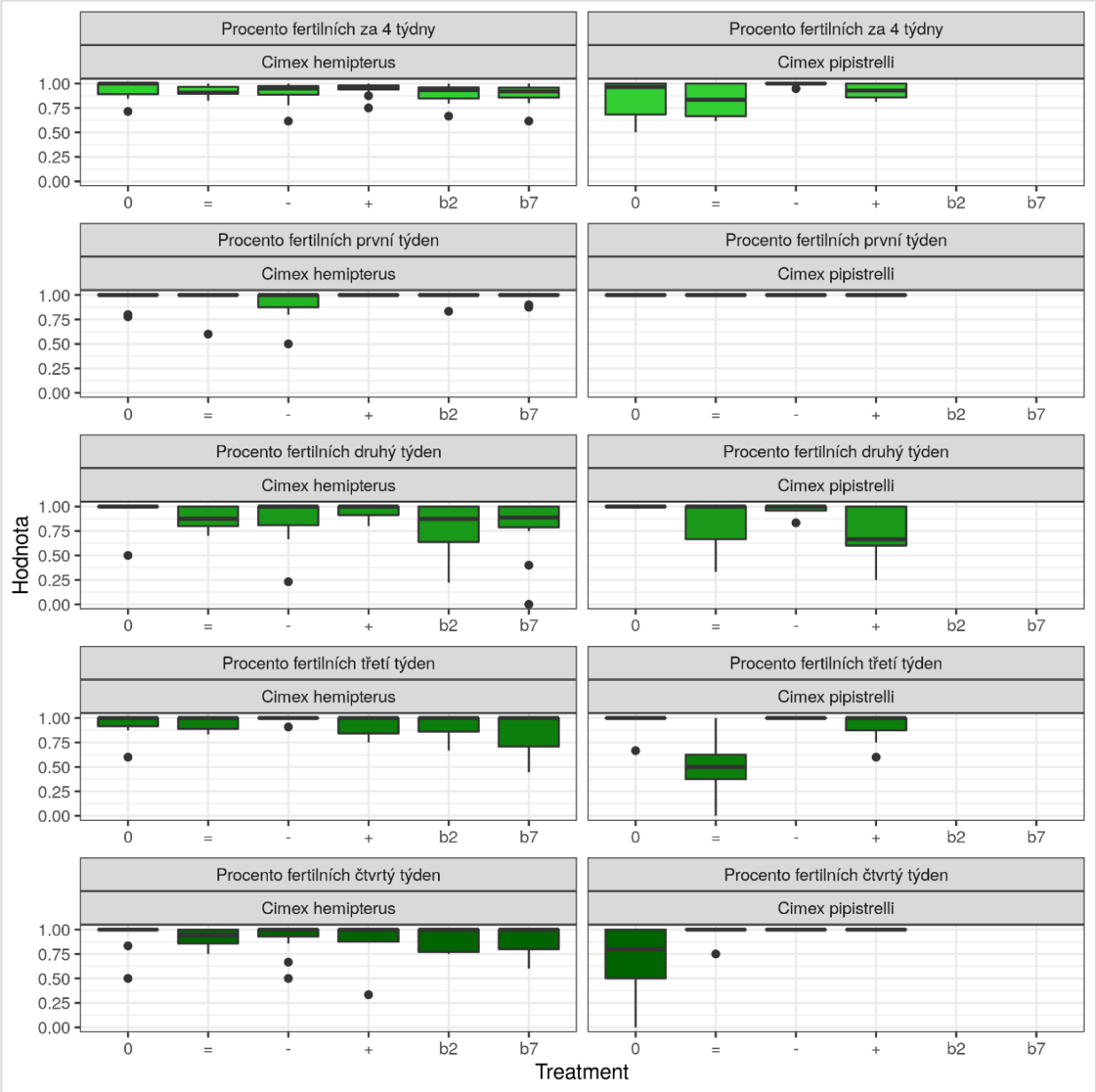
Příloha 1: Kompletní tabulka počtu larev a počtu jedinců svlečených do dospělců dle jednotlivých treatmentů a linií za 8 týdnů

Linie	Treatment	Skupina	Celkem larev	Celkem adultů
BOR	+	1	17	10
BOR	+	2	17	13
BOR	+	3	14	10
BOR	0	1	8	2
BOR	0	2	17	7
BOR	0	3	12	8
BOR	-	1	11	0
BOR	-	2	8	0
BOR	-	3	12	0
CPIP	+	1	8	2
CPIP	+	2	7	3
CPIP	0	1	12	0
CPIP	0	2	10	0
CPIP	-	1	8	0
CPIP	-	2	6	0
HAN	+	1	10	0
HAN	+	2	13	0
HAN	+	3	15	0
HAN	+	4	12	0
HAN	+	5	18	0
HAN	0	1	19	0
HAN	0	2	22	0
HAN	0	3	23	0
HAN	0	4	16	0
HAN	0	5	12	0
HAN	-	1	17	0
HAN	-	2	17	0
HAN	-	3	11	0
HAN	-	4	16	0
HAN	-	5	10	0

Příloha 2: Soubor grafů nakladených fertilních vajíček u BOR (vlevo) a CPIP (vpravo). První řádek představuje průměrné týdenní hodnoty počtu vajíček za 4 týdny, další řádky pak počty vajíček v jednotlivých týdnech. Osa Y znázorňuje množství a osa X použité treatmenty.



Příloha 3: Soubor grafů nakladených sterilních vajíček u BOR (vlevo) a CPIP (vpravo). Množství nakladených vajíček během čtyř týdnů (první řádek) a dále množství nakladených vajíček zaznamenaných v jednotlivých týdnech. Osa Y znázorňuje množství a osa X použité treatmenty



Příloha 4: Soubor grafů procentuálního množství nakladených fertilních vajíček u BOR (vlevo) a CPIP (vpravo). Celkové procentuální množství nakladených vajíček během čtyř týdnů (první řádek) a dále procentuální množství nakladených vajíček zaznamenaných v jednotlivých týdnech. Osa Y znázorňuje množství a osa X použité treatmenty