

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Struktura mikrobiomů odlišných genetických linií vší

Polyplax serrata

Bakalářská práce

Damián Dedecius

Školitel: prof. RNDr. Václav Hypša, CSc.

Konzultant: doc. RNDr. Eva Nováková, Ph.D.

České Budějovice 2022

Dedecius, D., 2022: Struktura mikrobiomů odlišných genetických linií vší *Polyplax serrata* [Microbiome structure in different genetic lineages of the louse *Polyplax serrata*, Bc. Thesis, in Czech] – 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The microbiome structure of hematophagous insects is still a generally unexplored topic. This paper discusses the microbiome structure of different genetic lineages of the louse *Polyplax serrata*. The samples were collected from locations in the hybrid zone of the specific lineage of *P. serrata*. For the analyses of alpha and beta diversity, we have used data from amplicon sequencing and then analysed them in RStudio. We mapped the 30 most represented bacteria genera and presented them as a heat-map graph. The analyses results showed that the microbiomes of different genetic lineages have very similar diversity, variability and structure. Additionally, we also established a strange genetic lineage called Hybrid1 whose microbiomes contain *Wolbachia*, a reproductive manipulator bacteria, which possibly can alter the whole concept of hybrids in this particular hybrid zone of a specific lineage of *P. serrata*.

Čestné prohlášení

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

V Českých Budějovicích, dne 8. prosince 2022

.....

Damián Dedecius

Poděkování

Především bych chtěl poděkovat vedoucímu mé práce Václavu Hypšovi a mé konzultantce Evě Novákové za jejich nesčetné rady a připomínky, rovněž za všechny čas strávený vedením mých kroků, a v neposlední řadě také za jejich lidský a vždy vstřícný přístup. Dále děkuji Janě Martinů za poskytnutí potřebného materiálu a za její trpělivost a čas věnovaný mému „zaučení“ v laboratoři. Janě Říhové děkuji za její ochotu zasvětit mě do světa terénního sběru vzorků a Janu Zimovi děkuji za přípravu amplikonové knihovny našeho datasetu. Mé díky rovněž patří všem zbylým členům laboratoře, kteří si vždy našli chvíli na dobrou radu či pomoc.

Finanční podpora

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky z grantu 21-02532S Vztahy mezi genetickou diversifikací a ekologií při sekundárním kontaktu: hybridní zóna a ekologická speciace v systému hostitel-parazit-symbiont.

OBSAH

1	ÚVOD	1
1.1	Mikrobiom a symbióza	1
1.1.1	Mikrobiom hmyzu.....	2
1.2	Symbiotické bakterie hmyzu.....	3
1.2.1	Primární endosymbionti	3
1.2.2	Sekundární endosymbionti.....	5
1.2.3	Reprodukční manipulátoři.....	6
1.3	Mikrobiom hematofágního hmyzu	7
1.3.1	Variabilita složení mikrobiomů u hematofágního hmyzu.....	10
1.4	Veš <i>Polyplax serrata</i>	10
1.4.1	Symbiotické bakterie vši <i>Polyplax serrata</i>	11
1.4.2	Modelový systém práce: genetická struktura populace vši <i>P. serrata</i>	11
2	CÍLE	13
3	MATERIÁL A METODY	14
3.1	Sběr vzorků	14
3.2	Molekulární určení hostitelů	17
3.2.1	Izolace DNA a spektrofotometrie	17
3.2.2	PCR & gelová elektroforéza	17
3.2.3	Molekulární určení vší, výběr vzorků pro re-sekvenování a zpracování genomických dat vší.....	18
3.3	Analýza ampliconových dat	19
3.3.1	Ampliconová knihovna.....	19
3.3.2	Zpracování ampliconových dat.....	20
3.3.3	Dekontaminace dat.....	21
3.3.4	Analýza dat v RStudios	22

4	VÝSLEDKY	26
4.1	Alfa-diverzita mikrobiomů	28
4.2	Beta-diverzita mikrobiomů	30
4.3	Bakteriální složení mikrobiomů.....	32
5	DISKUZE	34
5.1	Podobnost a variabilita mikrobiomů genetických linií vší <i>P. serrata</i>	34
5.2	Struktura mikrobiomů vší <i>P. serrata</i>	36
6	ZÁVĚR	39
7	BIBLIOGRAFIE	40
8	PŘÍLOHY	53

1 ÚVOD

1.1 Mikrobiom a symbióza

Mikrobiom se v posledních desetiletích stal velmi populární a neustále se rozvíjející oblastí výzkumu (Berg et al., 2020), a současně roste zájem o toto téma i v nevědecké sféře. První definici termínu **mikrobiom** poskytli v roce 1988 John Whipps a jeho kolegové, kteří jej velmi obecně popsali jako „charakteristické mikrobiální společenství, obývající dané prostředí s definovanými fyzikálně-chemickými vlastnostmi“ (Whipps et al., 1988). Dnešní nejcitovanější definice ovšem pochází z roku 2001 od J. Lederberga. Ten definici specifikoval a vymezil jednotlivé interagující skupiny mikroorganismů v mikrobiomu. V současnosti je tedy mikrobiom popisován jako „společenství komenzálních, symbiotických a patogenních mikroorganismů, sdílející společný prostor v těle hostitele“ (Lederberg & McCray, 2001).

Pro porozumění pojmu **symbióza**, který je v následujícím textu hojně využíván, je potřeba si tento termín ujasnit. V roce 1879 Anton de Bary definoval symbiózu jakožto „soužití dvou rozdílných organismů“ (Oulhen et al., 2016). V širším slova smyslu může tedy symbióza, jakožto společné soužití dvou rozdílných druhů, být **mutualistická** (prospěšná pro oba druhy), **komezální** (jeden z druhů profituje na druhém bez poškozování jeho fitness) či **parazitická** (jeden z druhů profituje na druhém druhu na úkor jeho fitness) (Dimijian, 2017).

Výše zmíněné pojmy jsou potřebné k pochopení vztahů v modelovém systému této práce, který zahrnuje hostitelskou myšici rodu *Apodemus*, parazitickou veš *Polyplax serrata* a symbiotické bakterie hmyzího mikrobiomu. Pojem **symbiont** je zde vnímám v jeho původní, široké definici, tedy jako „organismus žijící v bezprostřední blízkosti (či uvnitř) jiného druhu“. Jako **parazitismus** je dále označen vztah mezi hostitelskou myšicí rodu *Apodemus* a jejím „parazitickým symbiontem“ vší *Polyplax serrata*. **Mutualismus** je v této práci uváděn především v souvislosti se symbiotickými bakteriálními složkami mikrobiomu vší (a dalšího hmyzu), které jsou pro svého hostitele přínosné, často dokonce nepostradatelné.

1.1.1 Mikrobiom hmyzu

Diverzita a složení mikrobiomu přímo ovlivňuje biologii a chování hostitelského druhu (Oliver & Martinez, 2014). Přeneseně tedy může mikrobiom ovlivňovat ekologickou niku, kterou jeho hostitel obývá, a to na základě změn v hostitelském chování, které jsou poté reflektovány v interakcích hostitelské populace (Brown et al., 2020). Mikrobiomy mohou vykazovat výraznou druhovou specifitu a často jsou velmi rozdílné i mezi blízce příbuznými hostitelskými taxony (Adair et al., 2020). A vzhledem k tomu, že vnější prostředí je nezanedbatelným zdrojem nových „součástí“ mikrobiomu (např. díky horizontálnímu přenosu, viz kapitola 1.2.2 Sekundární endosymbionti), je nutné brát v potaz také geografické rozmístění hostitelů a jejich ekologickou niku, které mohou výrazně ovlivnit finální složení mikrobiomu (Gupta et al., 2017; Brown et al., 2020). Roli může hrát také hybridizace hostitelů – kombinace genů z nezávisle se vyvinutých genotypů může způsobit nesoulad mezi mikrobiomem a jeho hostitelem (Lim & Bordenstein, 2020).

Nejenom vnější prostředí a genetika mají vliv na složení mikrobiomu. U některých druhů hmyzu bylo prokázáno, že klíčovým faktorem ovlivňujícím složení mikrobiomu je vývojové stádium hostitele. Ontogenetické změny střevního mikrobiomu hmyzu jsou obecně vysvětlovány dvěma hlavními faktory: a) podstatnou přestavbou gastrointestinálního traktu během metamorfózy a b) odlišnými potravními potřebami larev a dospělců (Hammer & Moran, 2019; Brown et al., 2020).

Mimořádná evoluční úspěšnost hmyzu spočívá především v jeho schopnosti využívat různé potravní zdroje a ve schopnosti obsadit a trvale obývat širokou škálu stanovišť. Ta jsou často silně limitována nedostupností živin, nebo poskytují pouze nevyvážené zdroje potravy s chybějícími esenciálními látkami, které jsou potřebné pro správný vývoj a fungování hostitelského organismu (Feldhaar & Gross, 2009). Potencionálním evolučním řešením je změna potravní specializace a s tím spojené morfologicko-fyziologické a behaviorální změny, které jsou ovšem velmi nákladné (Coll & Guershon, 2002; Denno & Fagan, 2003). Alternativní, a evolučně preferovanou cestou, je asimilace metabolických produktů symbiotických (mutualistických) mikroorganismů sídlících v mikrobiomu trávícího traktu hmyzu (Baumann, 2005).

V kontrastu s vyššími obratlovci má hmyzí mikrobiom menší diverzitu, což se ukazuje být výhodné pro jeho studium, neboť menší komplexita poskytuje možnost zaměřit se více na konkrétní jednotlivé mikroorganismy a jejich účel v mikrobiomu (Weiss & Aksoy, 2011).

1.2 Symbiotické bakterie hmyzu

V hmyzím mikrobiomu můžeme nalézt širokou škálu mutualistických, parazitických či komenzálních symbiontů-mikroorganismů. Někteří jsou pro svého hostitele esenciální, někteří manipulují jeho reprodukční chování a někteří přenášejí nebezpečné choroby (Berg et al., 2020).

Dlouhodobě studovanou, a zřejmě tou nejvýznamnější složkou mikrobiomu hmyzu, jsou symbiotické, často silně specializované (až obligátní) bakterie, jejichž mutualistické vztahy s hmyzími hostiteli jsou v přírodě velmi častým jevem. Některé hmyzí druhy dokonce udržují mutualistické vztahy i s několika symbiotickými bakteriemi (Buchner, 1965). Symbionti tak mohou v rámci jednoho hostitele nejenom koexistovat, ale i vzájemně kooperovat (Vautrin & Vavre, 2009; Oliver & Martinez, 2014). Podle (Baumann, 2005) více než 15 % veškerých druhů hmyzu hostí ve svém těle endosymbiotická mutualistická společenství, a přes 10 % jich je zcela závislých na svých obligátních bakteriálních symbiontech (Douglas, 1998; Wernegreen, 2002).

Mutualistické bakterie poskytují svým hostitelům esenciální látky, které se v potravě hostitelů nenacházejí, a proto byly jejich mutualistické vztahy s hostiteli studovány a popsány především u skupin hmyzu, které konzumují nutričně chudou či jinak živinami limitovanou stravu (Moran et al., 2008; Weiss & Aksoy, 2011). Tyto skupiny jsou fylogeneticky i ekologicky velmi rozdílné (Wernegreen, 2002), například u fytofágních druhů (mšice, molice, červci...) doplňují symbiotické bakterie dusíkaté látky a aminokyseliny, na které je floém rostliny chudý (Weiss & Aksoy, 2011). Konkrétním příkladem je mutualistická bakterie mšic *Buchnera aphidicola*, která svému hostiteli poskytuje esenciální aminokyseliny, které mšice poté využívají k syntéze proteinů (Douglas, 1998; Shigenobu et al., 2000). Podobně je tomu u detritofágních a xylofágních termitů či mravenců, jejichž symbionti doplňují nutriční obsah detritu a zároveň v trávicím traktu napomáhají při rozkladu lignocelulózy (Engel & Moran, 2013; Oliver & Martinez, 2014). K bezobratlým závislých na nevyvážených zdrojích potravy řadíme také hematofágy (viz kapitola 1.3 Mikrobiom hematofágního hmyzu).

1.2.1 Primární endosymbionti

Obligátní bakteriální mutualisty, jejichž přítomnost je nezbytná pro správný vývoj a úspěšnou reprodukci hostitele, nazýváme **primárními endosymbionty** (dále jen P-symbionti) (Weiss & Aksoy, 2011). P-symbionti jsou v těle hostitele typicky lokalizováni

pouze ve specializovaném orgánu, tzv. **bakteriomu** (Moran et al., 2008), který je složen z jednotlivých buněk, zvaných **bakteriocyty**. Ty mohou být buďto vmezeřeny mezi epiteliální buňky trávicího traktu (např. u mravenců rodu *Camponotus*; Wernegreen, 2002), nebo mohou vytvářet již zmíněné bakteriomy přiléhající ke střevu hostitele jako jakési „pseudo-orgány“ (např. u švábů; Baumann, 2005). P-symbionti jsou uvnitř bakteriocytů rozmístěni volně v cytoplasmě (např. bakterie *Blochmannia* či *Wigglesworthia*), nebo uvnitř vakuol, jak je tomu u již zmíněné *Buchnery* (Feldhaar & Gross, 2009).

Fylogeneze P-symbiontů kopíruje fylogenetický vývoj jejich hostitelů (Baumann, 2005). Jedná se o jeden z nejstarších typů mutualistické symbiomy (Dimijian, 2017), jehož původ můžeme datovat až do doby před 270 milióny let (Wu et al., 2006). V důsledku tohoto dlouhodobého soužití dnes nemohou symbionti existovat bez svých hostitelů (a naopak), a částečně také proto, že v rámci evoluce došlo v jejich genomu k dramatickým redukčním (Dale & Moran, 2006). Zredukovány byly například geny zodpovědné za určité metabolické (především degradační) dráhy, obranné imunitní mechanismy, některé regulační funkce, a především dochází ke ztrátám genů zodpovědných za kontrolu a opravu DNA (Feldhaar & Gross, 2009; McCutcheon & Moran, 2012).

Oproti „volně žijícím“ bakteriím jsou intracelulární mutualističtí symbionti přenášení pouze **vertikálně** (tedy z matky na potomstvo), nejčastěji prostřednictvím cytoplasmy vajíček (Dale & Moran, 2006). Vertikální přenos vede ke snížení virulence endosymbiontů, která nejenže znesnadňuje potencionální horizontální přenos (Vautrin & Vavre, 2009), ale také negativně ovlivňuje velikost populace a její strukturu. Kvůli nemožnosti rekombinace s liniemi v odlišných hostitelích můžeme P-symbionty považovat za klony, které se množí asexuální cestou (Moran, 1996). To v jejich populaci zvyšuje vliv **genetického driftu**, který způsobuje kumulaci mutací v genomu, což může vést ke ztrátám funkčnosti genů a následně k úplnému mizení těchto genů z genomu. Zároveň v této malé populaci dochází k náhodnému **bottleneck-efektu**, který způsobuje, že se z mateřské populace bakterií přenesou na potomka pouze část původní populace (která má určité mutace a stává se novou mateřskou populací). Bottleneck-efekt tak zvyšuje účinek genetického driftu a oba tyto efekty umožňují častější fixace škodlivých mutací (Moran, 1996; McCutcheon & Moran, 2012). V genomech P-symbiontů byly nejvíce zaznamenány škodlivé mutace vedoucí k deleci a inzerci genů, či inaktivaci částečně prospěšných, nicméně ne funkčně nezbytných genů (Burke & Moran, 2011). Všechny tyto faktory vedou k rapidnímu zmenšení genomu P-symbiontů.

S redukcí genomu také souvisí extrémně rychlá sekvenční evoluce a změny v nukleotidovém složení DNA. V porovnání s „volně žijícími“ příbuznými bakteriemi dochází v malých genomech P-symbiontů k preferenci adeninu a thyminu (A+T) na úkor guaninu a cytosinu (G+C) (Moran et al., 2008; Hildebrand et al., 2010). Existuje několik teorií, snažících se vysvětlit upřednostnění A+T před G+C, které pracují s možností přímé selekce pro tento trend. Některé teorie uvádějí, že se jedná o kombinaci populačně-genetických faktorů a postupně se hromadících škodlivých mutací (McCutcheon & Moran, 2012). Například u endosymbiotické bakterie mouchy tse-tse *Wigglesworthia glossinidia* je pravděpodobné, že preference A+T je výsledkem ztráty genů SOS reparace, které zajišťují opravu DNA a zabraňují vzniku mutací (Akman et al., 2002).

1.2.2 Sekundární endosymbionti

V mikrobiomu hostitele můžeme kromě obligátních mutualistických P-symbiontů najít rovněž fakultativní symbionty, kteří nejsou pro svého hostitele esenciální z hlediska vývoje a reprodukce (Baumann, 2005). U některých jedinců stejného druhu je nemusíme vůbec nalézt. Jedná se o tzv. **sekundární endosymbionty** (dále jen S-symbionti), jejichž přítomnost může hostiteli přinášet řadu výhod pro jeho fitness (Moran et al., 2008). Typickým příkladem jsou opět mšice a jejich symbionti. Mutualistická bakterie *Regiella insecticola* poskytuje svému hostiteli rezistenční výhodu proti patogenním houbám (Scarborough et al., 2005), zatímco fakultativní *Hamiltonella defensa* a *Serratia symbiotica* zvyšují rezistenci vůči parazitoidům mšic (Oliver et al., 2003).

Hlavními rozdíly mezi obligátními P-symbionty a fakultativními S-symbionty jsou lokalizace v těle hostitele, způsoby přenosu a udržení se v populaci hostitele. S-symbionti se v těle hostitele vyskytují jak intracelulárně, tak extracelulárně, a to v nesespecializovaných buňkách i tkáních (Fukatsu et al., 2000; Moran et al., 2008). Přenášeni jsou S-symbionti vertikální cestou, a to společně s P-symbionty – příkladem je moucha tse-tse, jejíž fakultativní bakterie *Sodalis glossinidius* se vertikálně přenáší s obligátní mutualistickou bakterií *Wigglesworthia glossinidia* (Dale & Welburn, 2001; Nováková et al., 2015). Přenos mezi hostiteli může ale také probíhat **horizontální cestou**, tedy přenosem skrze prostředí mezi samotnými hostiteli (mezidruhově či vnitrodruhově – např. kanibalismus), ne však z rodičů na jejich potomstvo (Bright & Bulgheresi, 2010). Tuto skutečnost podporují fylogenetická data, která ukazují nekongruenci ve fylogenetických stromech hostitelů a jejich mutualistických S-symbiontů, naznačující častý horizontální přenos bakterií (Russell et al., 2003).

Mezi výhody horizontálního přenosu patří možnost rekombinace s liniemi v odlišných hostitelích, snížení vlivu genetického driftu a bottleneck-efektu a zmenšení rizika uchycení škodlivých alel a jejich předání do další generace (Bright & Bulgheresi, 2010; Burke & Moran, 2011). Potencionálními důsledky horizontálního získání nových linií či druhů symbiontů je koexistence a sdílené poskytování výhod hostiteli, ale také úplné nahrazení současných P-symbiontů (Koga et al., 2013) (Chong & Moran, 2018). Příklad koexistence endosymbiontů můžeme nalézt opět u některých druhů mšic. Hlavním obligátním P-symbiontem je *Buchnera aphidicola*, která je lokalizována v bakteriomu, má silně redukovaný genom a poskytuje hostiteli potřebné aminokyseliny. Stejnou funkci má ovšem spolupracující bakterie *Serratia symbiotica*, kterou bychom tak mohli označit jako „ko-primárního endosymbionta“ (Koga et al., 2003). Společně s nimi se může v mikrobiomu mšice vyskytovat i fakultativní S-symbiont *Hamiltonella defensa*, která je přenášena horizontální i vertikální cestou, a která pomáhá hostiteli v obraně před parazitoidy (Dale & Moran, 2006).

Význam S-symbiontů také záleží na daném prostředí hostitele (Moran et al., 2008). Je výhodné udržovat si fakultativního sekundárního symbionta i v případě, že jím poskytované výhody hostitel nevyužívá? Jak ukazuje studie (Oliver et al., 2008) zabývající se již zmíněnou hamiltonellou u mšic, linie infikované touto bakterií jsou úspěšnější a předčí neinfikované linie v prostředí, kde jsou parazitoidi hostitele přítomni. Situace se ovšem obrátí ve chvíli, kdy jsou parazitoidi z prostředí odstraněni.

1.2.3 Reprodukční manipulátoři

Specifickým typem fakultativních symbiontů jsou **reprodukční manipulátoři**. Oproti jiným S-symbiontům, kteří se v populaci hostitele udržují mutualistickými vztahy, zvyšující svou vlastní fitness skrze zvyšování fitness svého hostitele (Dedeine et al., 2003), reprodukční manipulátoři mění reprodukční strategie hostitele ve svůj prospěch i na úkor fitness hostitele (Vautrin & Vavre, 2009; Kikuchi, 2009). Reprodukční manipulace se vyvinuly v průběhu evoluce u různých druhů symbiontů hned několikrát – například bakterie *Cardinium hertigii* (parazitující na řadě členovců; Zchori-Fein & Perlman, 2004), *Arsenophonus nasoniae* (parazitující na vosách rodu *Nasonia*; Gherna et al., 1991), a některé druhy rodů *Spiroplasma* (parazitě motýlů a octomilek; Jiggins et al., 2000), a *Rickettsia* (parazitě vos, sluněček a pisivek; (Perlman et al., 2006), a také zřejmě nejvíce prostudovaný reprodukční manipulátor *Wolbachia pipientis*.

Wolbachii můžeme nalézt u většiny druhů hmyzu (Werren et al., 2008)– některé studie odhadují infekci u více než 60 % hmyzích druhů (Jeyaparakash & Hoy, 2000; Hilgenboecker et al., 2008). Wolbachie způsobují napříč systémem svých hostitelských druhů až čtyři reprodukční fenomény (Werren et al., 2008; Kikuchi, 2009):

- a) **Indukci partenogenetické thelytokie**, kdy se z neoplozeného vajíčka vyvíjejí pouze samice (u skupin Thysanoptera a Hymenoptera – především u parazitoidních vos rodu *Nasonia*; Stouthamer et al., 1990),
- b) **feminizaci samců** (u skupin Hemiptera, Isopoda a Lepidoptera; Rousset et al., 1997; Hiroki et al., 2002),
- c) **eliminaci infikovaných samců** (tzv. male-killing) ve prospěch infikovaných sestřiných jedinců (u skupin Coleoptera, Diptera, Lepidoptera...; Hurst et al., 1999; Charlat et al., 2007),
- d) **cytoplasmatickou inkompatibilitu (CI)**, která zabraňuje infikovaným samcům plodit potomstvo se samicemi, které nemají stejný typ wolbachie (u skupin Acari, Coleoptera, Diptera, Orthoptera...; Stouthamer et al., 1999).

Ačkoliv je wolbachie především parazitickým manipulátorem, u filariálních hlístic plní funkci obligátního mutualisty (Dedeine et al., 2003; Taylor et al., 2005), stejně jako byl zaznamenán mutualistický vztah u hostitelské štěnice *Cimex lectularius* (Balvín et al., 2018) a některých kůrovců (Zchori-Fein et al., 2006). Zaznamenán je i případ, kdy wolbachie postupem času ztratila schopnost reprodukční manipulace – u hostitele *Drosophila simulans* došlo v průběhu 25 let trvajícího výzkumu k přeměně parazitické wolbachie na mutualistu, který naopak zvyšuje fekunditu potomstva octomilky (Weeks et al., 2007) a zároveň podporuje hostitelovu přirozenou obranu proti virům, nematodům či jiným patogenním bakteriím (Hamilton et al., 2013).

1.3 Mikrobiom hematofágního hmyzu

V rámci hmyzu existuje celá řada skupin, které se alespoň v některé části svého ontogenetického vývoje živí krví (typickým příkladem jsou komáři), tato práce se nicméně zabývá pouze **obligátními hematofágy** neboli parazitickými druhy, které se živí výhradně krví obratlovců (Lehane, 2005). Výzkum mikrobiomů hematofágního hmyzu byl dlouho dobu opomíjen, a ačkoliv v současnosti již existují práce na toto téma, jejich prioritním zaměřením jsou patogenní součásti mikrobiomů, obzvláště pokud představují hrozbu pro člověka

(Sonenshine & Stewart, 2021). Často tyto studie vznikají také na ne-obligátních hematofázích, především na komárech, klíš'atech a mouchách tse-tse (Saldaña et al., 2017).

Krev obratlovců je jakožto potrava bohatá na proteiny a soli (Song et al., 2019), zato je poměrně chudá na určité kofaktory, a především B-vitamíny (Nogge, 1976), které hmyz obecně získává primárně z potravy (Douglas, 1998; Moran & Wernegreen, 2000; Feldhaar & Gross, 2009). Hematofágové proto některé látky musejí získávat prostřednictvím svých obligátních bakteriálních symbiontů (viz kapitola 1.2.1 Primární endosymbionti). A přestože se všichni hematofágové živí krví obratlovců, vidíme v jejich mikrobiomech poměrně velkou diverzitu, především rozdílné P- / S-symbionty (Sonenshine & Stewart, 2021).

Klasickým příkladem hematofágního hostitele a jeho mikrobiálních symbiontů je moucha tse-tse rodu *Glossina* (Diptera: Glossinidae) (Demirbas-Uzel et al., 2021). Moucha tse-tse je hmyz významný i pro člověka, neboť přenáší parazitický mikroorganismus rodu *Trypanosoma*, který může u obratlovců vyvolat spavou nemoc (Aksoy, 2011). Kromě toho její mikrobiom hostí také symbionty, díky kterým se tse-tse může živit krví obratlovců (Douglas, 1998). Obligátním P-symbiontem je bakterie *Wigglesworthia glossinidia*, která svému hostiteli doplňuje vitamíny (především B6 a B9; Michalkova et al., 2014), podporuje jeho imunologický systém a larvální vývoj a zvyšuje tak jeho fekunditu (Aksoy, 1995; Chen et al., 1999). Fakultativním S-symbiontem je bakterie *Sodalis glossinidius*, která podporuje hostitelovu obranu před parazitickými trypanosomami (Hamidou Soumana et al., 2013). Třetím hlavním symbiontem je *Wolbachia*, která u některých druhů *Glossina* způsobuje CI (Alam et al., 2011). Nynější studie prokázaly přítomnost i čtvrtého významného symbionta, kterým je bakterie rodu *Spiroplasma* (Doudoumis et al., 2017). U jiných hmyzích hostitelů je tato bakterie zodpovědná za obranu před parazitoidy, hlísticemi či patogenními houbami (Xie et al., 2010), ale také se projevuje jako reprodukční manipulátor způsobující u některých druhů eliminace infikovaných samců, tj. **male-killing** (Anbutsu & Fukatsu, 2003).

Melophagus ovinus (kloš ovčí) patřící do skupiny Hippoboscidae je dalším zástupcem z řádu Diptera, který je obligátně hematofágní (Petersen et al., 2007). Jeho hlavními symbionty jsou bakterie rodu *Arsenophonus* a *Sodalis* (Nováková et al., 2015). *Arsenophonus* vykazuje mnoho rysů typických pro P-symbionty (Nováková et al., 2009), včetně lokalizace uvnitř bakteriomu a poskytování látek chybějících v přijímané krvi. Oproti tomu *Sodalis* není lokalizován v bakteriomu, a také není v populaci klošů natolik hojně zastoupen – můžeme ho tedy označit jako fakultativního S-symbionta (Nováková et al., 2015). Všechny dipterní

hematofágní druhy samozřejmě ve svých mikrobiomech hostí také řadu jiných (často pro jiné živočichy patogenních) (Lehane, 2005; Engel & Moran, 2013) bakterií, ty ale povětšinou nejsou dobře zmapované (Wang et al., 2011). U obligátních hematofágů jsou pravděpodobně nejlépe prostudované mikrobiomy u triatom.

Triatomy, ploštice podčeledi Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), jsou obligátní hematofágové obývající oba americké kontinenty a pro člověka jsou významné především jako přenašeči Chagasovy choroby, jejímž původcem je opět parazitická trypanosoma, tentokrát *T. cruzi* (Rassi Jr. et al., 2010). Výskyt trypanosom je u triatom poměrně běžný, a protože s nimi musejí mikrobiální symbionti interagovat v rámci sdíleného životního prostředí, mohou parazitovi v rámci kompetice či nepřímým vlivem znemožnit jeho přenos (Cirimotich et al., 2011; Aksoy et al., 2014). Podle studie (Brown et al., 2020) je nejvíce zastoupeným symbiontem v mikrobiomu triatom bakterie rodu *Dietzia*, která není „pravým P-symbiontem“. Nepřenáší se sice vertikální cestou, stále ale plní funkci endosymbionta, která poskytuje hostiteli chybějící látky. *Dietzia* byla objevena i u některých dalších hematofágních druhů hmyzu (Malele et al., 2018). Volně žijící triatomy, na kterých byla studie (Brown et al., 2020) prováděna, rovněž ukazují dramatickou změnu ve složení mikrobiálních bakterií v průběhu své ontogeneze. Od silně diverzifikovaného mikrobiomu jedinců prvního instaru přechází triatomy k dominanci jediné bakterie u dospělců. To může být způsobeno například svlékáním, během kterého hmyz často svléká i část předžaludků a střev, což vede k narušení složení bakteriálního mikrobiomu (Kim et al., 2014; Nalepa, 2017).

U štěnice *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) byla v nedávné době (Balvín et al., 2018) objevena závislost na symbiontu wolbachii, konkrétně na biotinu (vitamín B7) a riboflavinu, které bakterie svému hostiteli poskytuje (Hosokawa et al., 2010). Zajímavé je, že geny zajišťující syntézu biotinu byly získány horizontálně od ko-symbiotické bakterie rodu *Cardinium* nebo *Rickettsia* (Nikoh et al., 2014), zatímco geny pro riboflavin jsou homologní a wolbachii vlastní napříč všemi jejími liniemi u různých hostitelů (Moriyama et al., 2015). Fylogenetické stromy štěnice a wolbachie jsou kongruentní a zdá se, že se vztah mezi bakterií a hostitelem více podobá obligátně mutualistického vztahu (který wolbachie udržuje s filariálními hlísticemi), nežli sekundárně mutualistickým vztahem, který wolbachie udržuje s některými druhy hmyzu (Balvín et al., 2018). Důvodem této změny je zřejmě horizontální získ genů pro biotin. Prevalence wolbachie byla u *C. lectularius* 100 %, což naznačuje, že se bakterie skutečně stala P-symbiontem (Sakamoto & Rasgon, 2006).

1.3.1 Variabilita složení mikrobiomů u hematofágního hmyzu

Diverzitu, variabilitu a strukturu mikrobiomů hmyzu určuje mnoho faktorů (Engel & Moran, 2013), přičemž se ukazuje, že jedním z nejzásadnějších faktorů je hostitelská specifita (Adair et al., 2020). Hostitel ovlivňuje svůj mikrobiom nepřímo skrze tepelnou toleranci jednotlivých mikrobiálních organismů, svou imunitou či trávením potravy (Oliver & Martinez, 2014; Brown et al., 2020). Geografická lokalita a habitat hostitele jsou dalšími významnými faktory ovlivňující mikrobiom (Park et al., 2019; Cohen et al., 2020), ukázkou mikrobiomů lišících se podle geografické lokality jsou například komáří druhy *Aedes albopictus* a *Aedes aegypti* (Zouache et al., 2011).

Vliv hostitelské specifity je dobře prostudovaná především u triatom. Podle studie (Brown et al., 2020) byly rozdíly v mikrobiálním složení zaznamenány i u druhů žijících sympatricky v jediném hnízdě, ze kterých byly odebrány vzorky. Tato informace ukazuje, že environmentální zdroje bakterií nehrají ve složení mikrobiomů přílišnou roli. Variabilita habitatů hostitele může ovlivnit složení mikrobiomu skrze změnu environmentálního zdroje horizontálně získávaných symbiontů (Adair et al., 2020), přičemž geografická lokalita je důležitým faktorem především pro vnitro-druhovou variabilitu mikrobiomů (Brown et al., 2020).

1.4 Veš *Polyplax serrata*

Anoplura (vši) jsou jedním ze čtyř podřádů skupiny Phthiraptera, do které se řadí také *Amblycera* (luptouši), *Ischnocera* (pěřovky) a *Rhynchothiphirina* (všiváci). Zatímco zbylé tři podřády mají kousací ústní ústrojí a parazitují na kůži (všiváci se živí krví) ptáků a savců (Light et al., 2010), vši mají sací ústrojí a živí se výhradně krví. Jsou to **obligátní permanentní ektoparazité** placentálů, a protože na svých hostitelích tráví celý vývojový cyklus, vyvinuly se u vší morfologické adaptace, které napomáhají jejich ektoparazitickému způsobu života (Snodgrass, 1945) – redukce křídel, zploštělé tělo, tarsální dráčky k uchycení na hostiteli, účinný sací aparát a samozřejmě vhodní symbionti, díky kterým se mohou vši krmit výhradně krví (Baumann, 2005; Light & Hafner, 2007). Většina vší (až 67 %) je vázána na řád Rodentia (hlodavci) (Lehane, 2005).

Rod *Polyplax*, patřící do čeledi Polyplacidae, má poměrně široké spektrum hostitelů z řádu Rodentia (hlodavci). Pro tuto práci je stěžejní druh *Polyplax serrata*, jehož typickými hostiteli jsou zástupci čeledi Muridae (myšovití) (Light et al., 2010).

1.4.1 Symbiotické bakterie vši *Polyplax serrata*

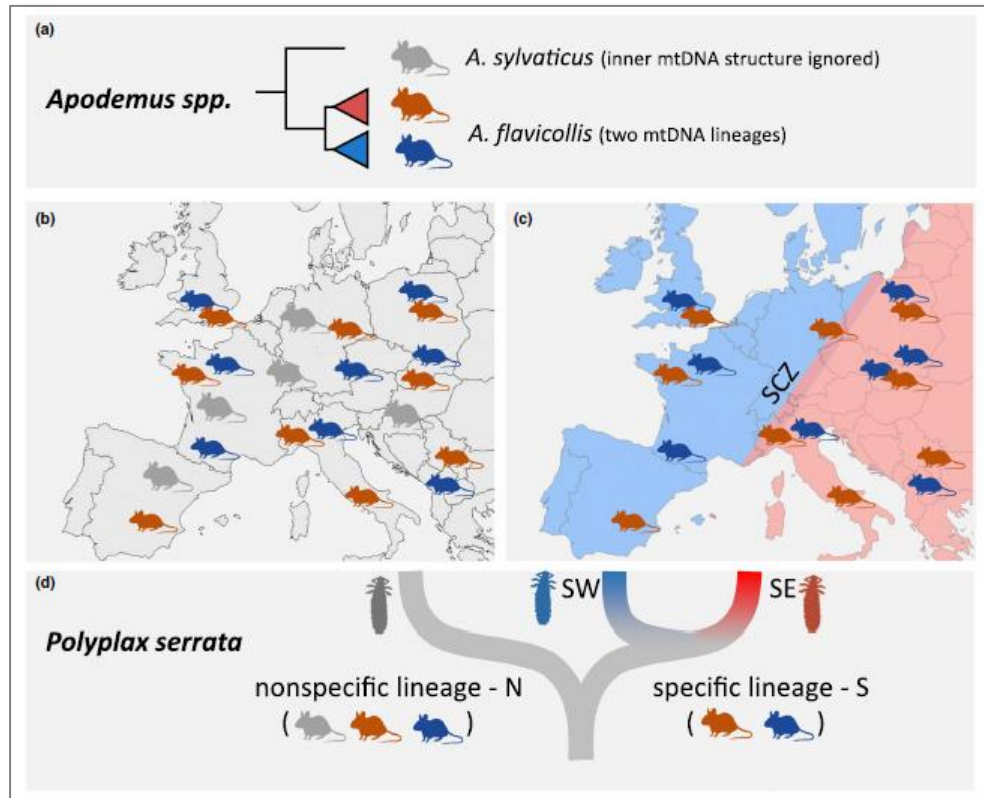
Paul Buchner již v roce 1965 na základě velké morfologické rozdílnosti bakterií vši a diverzity jejich bakteriálních symbiontů správně předpokládal, že tito symbionti mají polyfyletický původ (Buchner, 1965). To se potvrdilo i v novodobých studiích využívajících molekulární metody. Analýza symbiontů (16S rDNA sekvence) rodu *Polyplax* rovněž odhalila endosymbionta z rodu *Legionella* (Hypša & Křížek, 2007). Práce (Říhová et al., 2017) potvrzuje jedinečný fylogenetický původ obligátní symbiózy mezi legionellou (*L. polyplacis*) a *P. serrata*. Práce rovněž ukazuje, že se genom bakterie vyvíjel stejnou evoluční cestou jako genomy jiných obligátních symbiontů (nízký počet G+C vazeb, zmenšení genomu, ztráta sekrečních systémů souvisejících s virulencí). Stejně jako u symbiontů již zmíněné štěnice *Cimex lectularius* (Nikoh et al., 2014), došlo také u *L. polyplacis* k horizontálnímu získání šesti genů kódujících syntézu biotinu. Funkce *L. polyplacis* jakožto P-symbionta potvrzuje navazující práce (Říhová et al., 2021), která zároveň představuje (na základě amplikonového screeningu dat) další ko-symbionty koexistující v mikrobiomu vši *P. serrata*, například bakterie čeledi Neisseriaceae. Tyto bakterie jsou pravděpodobně v brzkém stádiu procesu změny na P-symbionta vši, neboť u nich můžeme pozorovat typické znaky P-symbiontů, jako jsou degenerativní procesy genomu, preferenci A+T bází a ztrátu některých metabolických schopností (McCutcheon et al., 2019; Říhová et al., 2021).

1.4.2 Modelový systém práce: genetická struktura populace vši *P. serrata*

V Evropě můžeme nalézt hned několik druhů rodu *Apodemus* (Rodentia: Muridae), na kterých *Polyplax serrata* parazituje. Pro modelový systém této práce jsou nicméně důležité tyto dva druhy – *Apodemus sylvaticus* (myšice křovinná) a *Apodemus flavicollis* (myšice lesní). Tyto fylogeneticky i ekologicky velmi blízké druhy se výrazně liší evoluční historií, výskytem nedávných bottleneck efektů, umístěním glaciálních refugií, či způsobem zpětné rekolonizace Evropy (Michaux et al., 2004; Michaux et al., 2005). Tyto rozdílné demografické a ekologické historie musely výrazně ovlivnit i ektoparazity myšic, proto je modelový vztah *Apodemus-Polyplax* ideální pro studium evoluce hostitelské specifity a populační genetiky (Štefka & Hypša, 2008).

Vši *Polyplax serrata* se geneticky (na základě mitochondriální DNA) dělí na nesespecifickou (N) a specifickou (S) linii. Zatímco N-linie parazituje na obou druzích rodu *Apodemus*, S-linie parazituje pouze na *A. flavicollis*. S-linie se poté dělí na západní (SW) a východní (SE) haplotypy (Martinů et al., 2018). Důvodem rozdělení S-linie je pravděpodobně sekundární kontakt hostitelů (po návratu z glaciálních refugií) – myšice opět rekolonizovaly Evropu, nicméně jejich parazité

(jejichž rychlost evoluční speciace je vyšší; Nieberding et al., 2004; McCoy et al., 2005) již byli natolik geneticky odlišní, že došlo k vytvoření hybridní zóny parazitů uvnitř panmiktické populace hostitele (Martinů et al., 2020).



Obr. 1 Genetické linie vši *Polyplax serrata* a její vztah k hostitelským druhům rodu *Apodemus*; převzato ze článku (Martinů et al., 2020)

2 CÍLE

Primárním cílem této práce je celková analýza taxonomické struktury mikrobiomů u odlišných genetických linií vši rodu *Polyplax*. Konkrétně byly stanoveny tyto dílčí cíle:

- I. Molekulární determinace hostitelů rodu *Apodemus*
- II. Bio-informatické zpracování amplikonových dat a posouzení jejich struktury ve vztahu ke genetické struktuře vši

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Sběr vzorků

Sběr vzorků byl prováděn na několika lokalitách v České republice a v Německu. Místa pro sběr byla určena na základě předchozích celoevropských sběrů vší (Martinů et al., 2018) a pilotní studie hybridní zóny mezi **SW** a **SE** liniemi vší *Polyplax serrata* (Martinů et al., 2020). Celkem bylo získáno 93 vzorků (viz Tabulka I) ze 36 lokalit (viz Mapa 1). Hostitelské myšice rodu *Apodemus* byly chytány do mrtvolových pastí, navnaděných olejem ze sardinek. Chycené myšice byly poté zpracovány a byli z nich získáni ektoparazité podle následujících kroků:

- 1) Mrtvé myšice byly co nejšetrněji a co nejvíce sterilně přemístěny do papírových sáčků.
- 2) Nejprve byly ze hřbetu myšic odebrány environmentální stěry (4N6 FLOQSwabs Genetics; Copan). Poté byl odebrán kus kůže případně prst z chodidla pro budoucí molekulární určení druhu myšice. Všechny nástroje byly po každém použití řádně vysterilizovány ethanolem a ohněm.
- 3) Ze srsti myšic byly poté s pomocí entomologické pinzety a jemného kartáčku odebráni ektoparazité, kteří byli následně roztříděni a uchováni v připravených mikrozkuvkách typu Eppendorf (1,5 ml), naplněných absolutním ethanolem. Mezi nejběžnější nalézané ektoparazity patří roztoči, klíšťata, blechy a také vší.
- 4) Po odebrání ektoparazitů byla myšici otevřena břišní dutina, odkud je odebírána slezina.

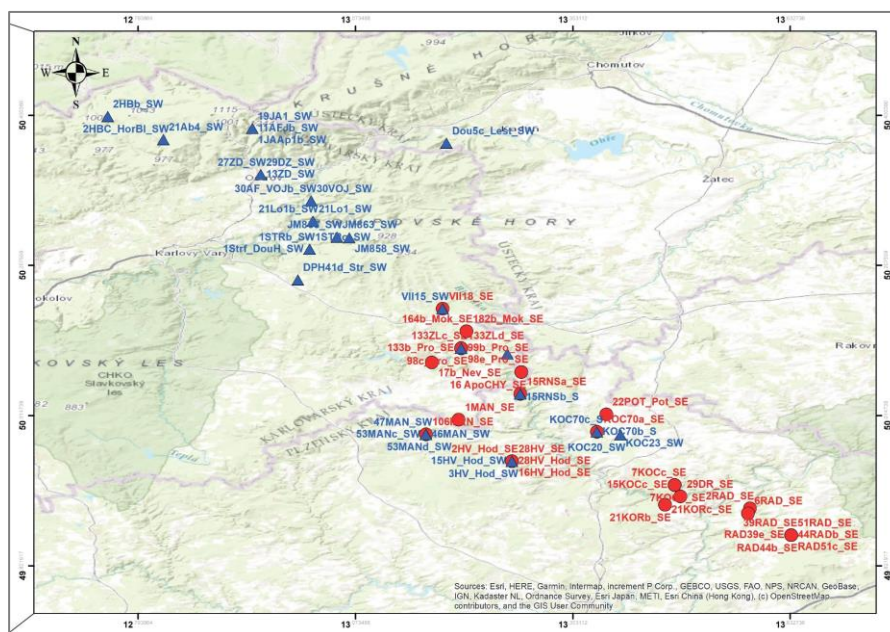
Environmentální stěry, další ektoparazité (kromě vší) a sleziny hostitelů jsou získávány pro další výzkum v rámci projektu *Vztahy mezi genetickou diversifikací a ekologií při sekundárním kontraktu: hybridní zóna a ekologická speciace v systému hostitel-parazit-symbiont*. Ze stěrů, kůže, slezin a ektoparazitů jsou následně získána amplikonová data s cílem najít (environmentální) zdroj symbiontů pro mikrobiom vší.

Tabulka I Seznam vzorků a lokalit, na kterých byly sesbírány

	VZOREK	ZEMĚ	LOKALITA	GPS_N	GPS_E
1	19MocAp12bXN	CZ	Močidlec	50.051529	13.225564
2	19MocAp19XNb	CZ	Močidlec	50.051529	13.225564
3	19MocAp19XN	CZ	Močidlec	50.051529	13.225564
4	19MocAp24XN	CZ	Močidlec	50.051529	13.225564
5	15HXDXN	GE	Holzen_(u_Landshut)	48.607345	12.16431
6	11HXDXN	GE	Holzen_(u_Landshut)	48.607345	12.16431
7	10D18	GE	Schwarzenberg_im_Erzgebirge	50.538248	12.782663
8	13D18	GE	Schwarzenberg_im_Erzgebirge	50.538248	12.782663
9	8RB19	CZ	Rabštejn_nad_Střelou_Řopíky	50.04219	13.28938
10	17RB19	CZ	Manětín_Chlum.hora	50.00880	13.20407
11	14ZDAp19	CZ	Dolní_Žďár	50.323875	12.951383
12	RpT48	CZ	Volenice	49.54776	13.88366
13	6ASPOB	GE	Oberhöcking	48.647810	12.662417
14	14AFOB	GE	Oberhöcking	48.647810	12.662417
15	1SDAFb	CZ	Bukovina_Kralovicko	49.98996	13.411963
16	4SDAF	CZ	Bukovina_Kralovicko	49.98996	13.411963
17	21AbAf3	CZ	Abertamy	50.368981	12.826261
18	KOC31	CZ	Potvorov-Bukovina	49.989676	13.413873
19	KOC32	CZ	Potvorov-Bukovina	49.989676	13.413873
20	KOC78	CZ	Řemešín	49.993582	13.383746
21	KOC82b	CZ	Lednice	49.942399	13.514572
22	RGF2	GE	Haugshöhe_(Burglengenfeld)	49.064234	12.094629
23	12UAZ22	GE	Kicklingen	48.56740	10.59781
24	15UAZ22	GE	Kicklingen	48.56740	10.59781
25	42MAN	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny	49.990235	13.163820
26	38MAN	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny	49.990235	13.163820
27	19HrAp2	CZ	Hrdějovice	49.019631	14.460599
28	15HVPXN	CZ	Hadačka/Výrov/Plasy	49.966145	13.458213
29	22HVPXN	CZ	Hadačka/Výrov/Plasy	49.966145	13.458213
30	ROK11	CZ	Díly	49.784539	13.636232
31	ROK7	CZ	Díly	49.784539	13.636232
32	133ZL18c	CZ	Protivec_přední	50.100910	13.209159
33	133ZL18d	CZ	Protivec_přední	50.100910	13.209159
34	46MANb	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny	49.990235	13.163820
35	46MANc	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny	49.990235	13.163820
36	46MAND	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny	49.990235	13.163820
37	47MANb	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny	49.990235	13.163820
38	53MANa	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny	49.990235	13.163820
39	53MANb	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny	49.990235	13.163820
40	53MANc	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny	49.990235	13.163820
41	106MANb	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny_dál_od_vsi	49.990235	13.163820
42	106MANc	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny_dál_od_vsi	49.990235	13.163820
43	106MAND	CZ	Nová_Doubravice_Nečtiny_dál_od_vsi	49.990235	13.163820
44	2HVXHodXSE	CZ	Hodovíz	49.955631	13.274449
45	28HVXHodXSE	CZ	Hodovíz	49.955631	13.274449
46	KOC14	CZ	Potvorov-Bukovina	49.989676	13.413873
47	KOC20	CZ	Potvorov-Bukovina	49.989676	13.413873
48	KOC36	CZ	Potvorov-Bukovina	49.989676	13.413873
49	KOC36b	CZ	Potvorov-Bukovina	49.989676	13.413873
50	KOC36c	CZ	Potvorov-Bukovina	49.989676	13.413873
51	KOC70	CZ	Řemešín	49.993582	13.383746
52	KOC70b	CZ	Řemešín	49.993582	13.383746
53	KOC70c	CZ	Řemešín	49.993582	13.383746
54	21AbAf4	CZ	Abertamy	50.368981	12.826261
55	JM866	CZ	Mlýnská_vojenský_prostor_Doupov	50.243753	13.049278
56	JM863	CZ	Mlýnská_vojenský_prostor_Doupov	50.243753	13.049278
57	JM858	CZ	Mlýnská_vojenský_prostor_Doupov	50.242703	13.065384

POKRAČOVÁNÍ TABULKY I

58	21LoAf1b	CZ	Lomnice	50.263955	13.018557
59	11RNS	CZ	Rabštejn_nad_Střelou	50.042148	13.285275
60	11RNSb	CZ	Rabštejn_nad_Střelou	50.042148	13.285275
61	11RNSc	CZ	Rabštejn_nad_Střelou	50.042148	13.285275
62	15RNS	CZ	Rabštejn_nad_Střelou	50.042148	13.285275
63	15RNSb	CZ	Rabštejn_nad_Střelou	50.042148	13.285275
64	15RNSc	CZ	Rabštejn_nad_Střelou	50.042148	13.285275
65	16ApoXCHYb	CZ	Dvorec_transekt_1b	50.070213	13.286550
66	19ApoXCHY	CZ	Dvorec_transekt_1b	50.070213	13.286550
67	19ApoXCHYb	CZ	Dvorec_transekt_1b	50.093628	13.268670
68	19ApoXCHYc	CZ	Dvorec_transekt_1b	50.093628	13.268670
69	VII12	CZ	Verušičky	50.151525	13.185240
70	VII13	CZ	Verušičky	50.151525	13.185240
71	VII14	CZ	Verušičky	50.151525	13.185240
72	VII15	CZ	Verušičky	50.151525	13.185240
73	VII18	CZ	Verušičky	50.151525	13.185240
74	7KOCXKocXSea	CZ	Kočín_u_Kralovic_podél_Kralovického_potoka	49.925264	13.483384
75	7KOCXKocXSeb	CZ	Kočín_u_Kralovic_podél_Kralovického_potoka	49.925264	13.483384
76	15KOCXKocXSEa	CZ	Kočín_u_Kralovic_podél_Kralovického_potoka	49.925264	13.483384
77	15KOCXKocXSEb	CZ	Kočín_u_Kralovic_podél_Kralovického_potoka	49.925264	13.483384
78	21KORXKorXSEb	CZ	Koryta_u_Kralovic_u_hřbitova	49.899712	13.471053
79	21KORXKorXc	CZ	Koryta_u_Kralovic_u_hřbitova	49.899712	13.471053
80	RAD39e	CZ	Chomle	49.860663	13.633590
81	RAD44	CZ	Chomle	49.860663	13.633590
82	RAD51c	CZ	Chomle	49.860663	13.633590
83	30AFXVOJb	CZ	Vojkovice	50.289979	13.0161917
84	11XAFXJ	CZ	Jáchymov	50.383049	12.940642
85	13ZDA	CZ	Dolní_Žďár	50.323875	12.951383
86	27ZDA	CZ	Dolní_Žďár	50.323875	12.951383
87	1STRb	CZ	Doupovské_Hradiště	50.2279325	13.0141564
88	1STRc	CZ	Doupovské_Hradiště	50.2279325	13.0141564
89	2HBb	CZ	Horní_Blatná	50.398511	12.754487
90	8HRB	CZ	Nahořánky_Hrbeček	49.181174	13.650722
91	1Ja19Apb	CZ	Jáchymov	50.383049	12.940642
92	HR1	CZ	Hartmanice	49.165755	13.449493
93	HR5	CZ	Hartmanice	49.165755	13.449493



Mapa 1 Mapa znázorňující lokality, na kterých byly sesbírány vzorky; poskytnuto Janou Martinů

3.2 Molekulární určení hostitelů

3.2.1 Izolace DNA a spektrofotometrie

Vzhledem k obtížné druhové identifikaci myšic *Apodemus flavicollis* a *A. sylvaticus* na základě morfologických znaků byly druhy určeny za pomoci molekulárních metod (Michaux et al., 2001). V laboratorních podmínkách byly odebrané kousky kůže či prsty myšic zpracovány podle protokolu z Blood & Tissue Kit *Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)* od německé společnosti QIAGEN. Jedinou odchylkou od protokolu bylo přizpůsobení množství elučního AE-pufu, kterého bylo s ohledem na množství vstupní tkáně přidáno poloviční množství. Rovněž byla prodloužena doba (z 1 minuty na 5 min), po kterou byla membrána izolační kolonky prosycována přidáním AE-pufem při pokojové teplotě.

Vzorky byly následně podrobeny spektrofotometrickému měření na zařízení NanoPhotometer P330 (Implen), kde byla změřena čistota a koncentrace DNA. Jako kontrolní blank zde sloužil 1 µl pufru AE. Podle výsledků měření byly vzorky případně naředěny, nejčastěji DNA izoláty slezin v poměru 1:9 µl (DNA:PCR ultračistá voda od firmy Top-Bio).

3.2.2 PCR & gelová elektroforéza

K amplifikaci 265–290 bp dlouhého úseku mitochondriálního genu pro cytochrom b byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR) (Michaux et al., 2001). Celkový objem PCR směsi byl 25 µl a reakce byla namíchána takto: 9,5 µl PCR ultračistá voda (Top-Bio), 12,5 µl 2x PPP Master Mix (Top-Bio), 1 µl forward-primeru (10uM), 1 µl reverse-primeru (10uM), a 1 µl DNA. Sekvence použitých primerů byly převzaty z publikace (Michaux et al., 2001), viz Tabulka II. PCR probíhala v přístroji Mastercycler X50s (Eppendorf) za použití programu (viz Tabulka III) vycházejícího z doporučení výrobce PPP Master Mixu. Nasedací teplota primerů byla převzata z výše uvedené publikace.

Tabulka II Primery (a jejich sekvence) použité při PCR

HOSTITEL	PRIMER	SEKVENCE (5' – 3')
<i>Apodemus sylvaticus</i>	SylUP (forward)	GAGGAGGATTCTCAGTAGAC
<i>Apodemus sylvaticus</i>	SylDN (reverse)	TTAATATGGGGTGGGGTGTTA
<i>Apodemus flavicollis</i>	FlaUp (forward)	AGCTACACTAACACGTTTC
<i>Apodemus flavicollis</i>	FlaDN (reverse)	GCGTATGCAAATAGGAAGTAC

Tabulka III PCR program

FÁZE CYKLU	TEPLOTA	ČAS	POČET CYKLŮ
Počáteční denaturace	95 °C	5 min	1
Denaturace	94 °C	20 s	
Nasedání primerů	52 °C	30 s	33
Syntáza DNA	72 °C	1 min	
Konečná syntéza DNA	72 °C	10 min	1
Udržovací teplota	10 °C		

K rozdělení různě dlouhých DNA fragmentů, vzniklých při PCR, byla použita gelová elektroforéza. K přípravě 1% agarózového gelu bylo použito 0,4g agarózy, 40ml TE-pufu a 1 µl barviva GelRed (Biotum). Barviva bylo použito méně (2 µl na 50 ml gelu) než doporučuje výrobce, neboť bylo toto množství dostačující (doporučení technika naší laboratoře). Do každé jamky v gelu byly poté napipetovány 4 µl PCR produktu. K určení přibližné velikosti DNA fragmentů byly využity 4 µl 100 bp Plus DNA Ladder (GeneRuler 100bp Plus; Thermo Scientific). V poslední části byly výsledné gely zdokumentovány pod UV světlem za použití programu Alliance 4.7 v přístroji UVITEC (Uvitec Cambridge). Na základě přítomnosti či absence PCR produktů odpovídající velikosti byly jednotlivé vzorky přiřazeny ke správnému hostitelskému druhu (*A. sylvaticus* či *A. flavicollis*).

3.2.3 Molekulární určení vší, výběr vzorků pro re-sekvenování a zpracování genomických dat vší

Velmi podobným způsobem byly zpracovány vzorky vší. DNA byly izolovány dle protokolu *Isolation of Genomic DNA from Tissue* z QIAamp DNA Micro Kit od společnosti QIAGEN. Následovala opět PCR reakce, tentokrát s primery amplifikující produkty o velikosti 381 bp cytochrom oxidázy I. (forward L6625 a reverse H7005; (Hafner et al., 1994). Výsledné PCR produkty byly poté enzymaticky přečištěny exonukleázou (Exo I; Thermo Scientific) a alkalickou fosfatázou (Fast AP; Thermo Scientific). Následně byly PCR produkty zaslány na Sanger sekvenaci do firmy SEQme (<https://www.seqme.eu/en/sanger-sequencing/>). Výsledné sekvence byly poté zpracovány v programu Geneious Prime (<https://www.geneious.com/>) a přidány k datasetu vší specifické (S) i nespecifické (N) linie získaných z předchozích celoevropských sběrů. Na základě umístění vzorků v NJ stromě (vytvořeném v programu Geneious Prime) byla poté zajištěna příslušnost k S nebo N linii, a u specifické linie došlo k rozřazení do SW či SE linie.

Získané informace o vzorcích byly zaneseny do mapy a následně byli vybráni vhodní kandidáti pro celogenomové sekvenování napříč transektem **S**-linie (viz Mapa 1). U **N**-linie byli vybráni vši z obou hostitelských druhů, sdílejících stejnou lokalitu. Lokalit bylo vybráno několik, tak aby od sebe byly různě geograficky vzdálené. Celkem 102 vší z **S**-linie a 37 vší z **N**-linie bylo zasláno do Roy J. Carver Biotechnology Center (University of Illinois Urbana-Champaign, USA), kde byl re-sekvenován jejich genom. Získaná data byly namapována na referenční genom *P. serrata* a jednotlivé vši byly genotypovány. Pomocí bio-informatické pipeline (Martinů et al., 2020), instalované na výpočetním serveru Katedry parazitologie, byly získány jaderné SNP, které byly dále analyzovány pomocí metod PCA a PCoA v programu RStudio (<https://posit.co/>), viz Graf P3 a P4 v Přílohách.

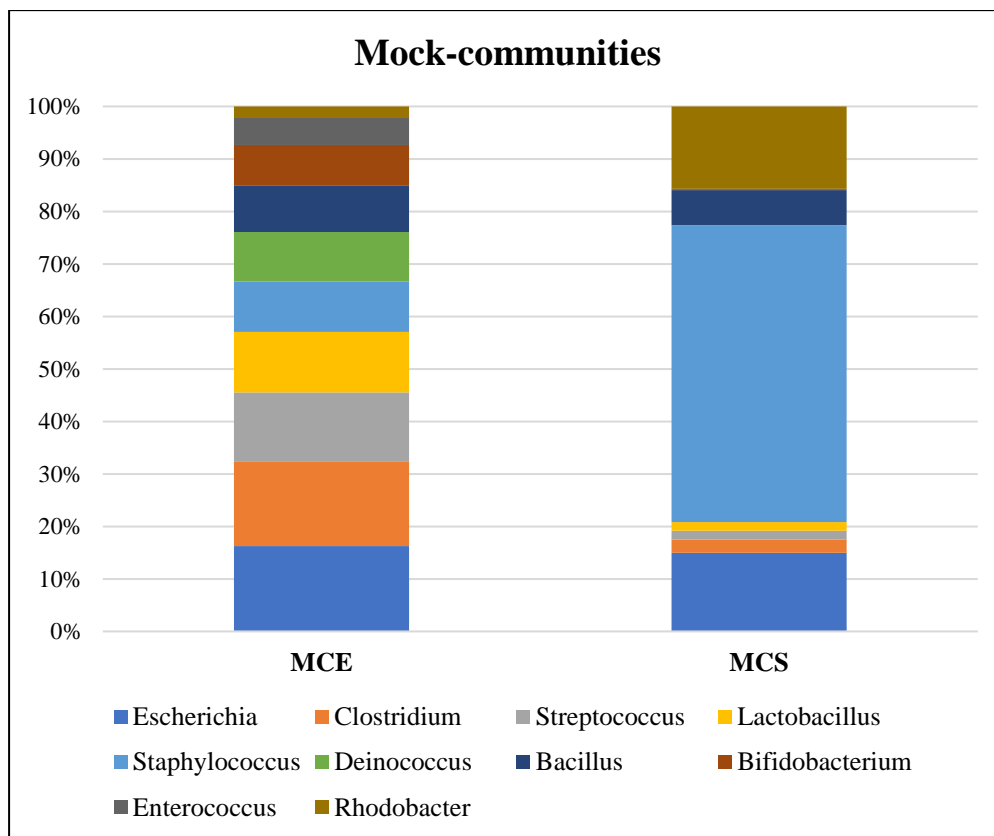
Tato data mi byla poskytnuta Janou Martinů a na jejich základě byly vybrány vzorky pro analýzu mikrobiomů pomocí amplikonového sekvenování.

3.3 Analýza amplikonových dat

3.3.1 Amplikonová knihovna

Amplikonová knihovna 16S rRNA byla připravena technikem Janem Zimou, dle protokolu EMP (Earth Microbiome Project; <https://earthmicrobiome.org/>). Jedná se o PCR proces, v němž jsou DNA templáty amplifikovány za pomoci unikátních barcodových primerů. Produkty každého vzorku jsou označeny jedinečnou kombinací 12 bp dlouhého barcodu forward primeru a 5 bp dlouhého barcodu reverse primeru. Společně s DNA vzorky byl amplifikován prázdný templát (sterilní voda, sloužící jako negativní kontrola) a 2 vzorky uměle vytvořených komunit se známým mikrobiálním profilem (tzv. „mock-communities“ sloužící jako pozitivní kontroly).

Mock-communities jsou komerčně dodávané směsi bakteriální kultur, které jsou do amplifikace přidávány, neboť poté umožňují vyhodnotit případný amplifikační bias (Bakker, 2018). Obvykle jsou amplifikovány dvě mock-communities, označované jako „even“ a „staggered“. Zatímco u „even“ (**MCE**) jsou bakteriální složky rovnoměrně zastoupeny (většinou po 10 %), „staggered“ (**MCS**) komunity mají některé bakteriální složky s velmi nízkou koncentrací – díky tomu pak poskytují lepší test citlivosti sekvenování (viz Graf 1).



Graf 1 Pozitivní kontroly (MCE a MCS) neboli „mock-communitites“

3.3.2 Zpracování ampliconových dat

Výchozími daty byly soubory pair-end readů (forward-ready R1 a reverse-ready R2), vygenerované sekvenátorem Illumina MiSeq. Celkem bylo osekvenováno 1676146 readů z 96 vzorků (93 vzorků + 3 kontroly). Zpracování těchto dat proběhlo v programech Usearch (<http://www.drive5.com/usearch/>) a Qiime1.9 (<http://qiime.org/>).

Celý postup je shrnut v následujících bodech:

- 1) Illumina MiSeq sekvenátor poskytl data v podobě 3 složek – R1 ready (forward sekvence), R2 ready (reverse sekvence) a I1 ready (5 bp dlouhé barcodové sekvence z reverse primeru).
- 2) S pomocí programu qiime1 byly příkazem **extract_barcode.py**. nejprve z readů R1 extrahovány 12 bp dlouhé barcody pocházející z forward primeru (indexy I2)
- 3) Před demultiplexováním byla kvalita readů R1 a R2 zkontrolována v programu FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

- a. V dalším bodě by za normálních okolností došlo ke spárování forward (R1) a reverse (R2) sekvencí do společné složky (fastq_mergepairs), nicméně kvůli nízké kvalitě R2 sekvencí byly tyto reads kompletně vyřazeny a zbylá analýza byla provedena pouze na R1 readech
- 4) Data byla demultiplexována za pomoci příkazu **usearch -fastx_demux** (došlo k rozřídění jednotlivých readů ke konkrétním vzorkům na základě unikátních barcodů, tj. I1 a I2 indexů)
- 5) Sekvence byly filtrovány na základě jejich kvality
 - a. Nejprve byly z readů R1 odstraněny zbytky sekvence forward primerů (příkaz **usearch -fastx_truncate**)
 - b. Následná filtrace a trimming sekvencí byl spuštěn příkazem **usearch -fastq_filter** (s nastavením parametru kvality maxee na hodnotu 5)
- 6) Pomocí tří příkazů byl vytvořen reprezentativní set (databáze), který je poté využit pro tvorbu OTU tabulky
 - a. **usearch -fastx_uniquies** + **usearch -sortbysize** (seřazení identických sekvencí v datasetu a odstranění sekvencí, které se v souboru dat vyskytují pouze jednou)
 - b. **usearch -cluster_otus** (vytvoření nové databáze – data jsou rozříděna do klastrů podle 97% sekvenční podobnosti)
- 7) Demultiplexované sekvence byly k reprezentativnímu setu přiřazeny příkazy **usearch -fastq_filter & usearch -usearch_global** – výsledkem bylo vytvoření OTU tabulky (matice s počty readů jednotlivých OTU pro každý vzorek)
- 8) Jednotlivé OTU byly přiřazeny do taxonomického systému za použití blast algoritmu a databáze SILVA139_3 (<https://www.arb-silva.de/download/archive/qiime/>)
- 9) OTU tabulka byla převedena do formátu tabulátorem odděleného textu

3.3.3 Dekontaminace dat

Negativní kontrola obsahovala 662 readů, proto bylo z datasetu odstraněno 5 OTU s nejvyšší četností readů, které pravděpodobně představovaly kontaminace. Mezi odstraněnými OTU byly například bakterie rodu *Sphingomonas*, která je běžným kontaminantem v naší laboratoři. Ve druhém kroku byl výsledný dataset pročištěn od všech nebakteriálních OTU (např. chloroplasty, Archea, Eukaryota) – odstraněno bylo 21 OTU.

3.3.4 Analýza dat v RStudio

Dataset byl před analýzami znáhodněn na 1000 readů, což způsobilo odebrání 13 vzorků (185 OTU) z celkových 93. Analýzy diverzity mikrobiomů a další přidružené statistiky byly prováděny v programu R (<https://www.r-project.org/>), respektive v jeho uživatelském prostředí RStudio (<https://posit.co/>), za použití vybraných funkcí vhodných pro analýzu bakteriálních společenstev balíčku **MicroEco** (<https://chiliubio.github.io/microeco/>). Grafická podoba výsledků vznikla v rámci balíčku **ggplot2** (<https://ggplot2.tidyverse.org/>). Postupováno bylo podle scriptu poskytnutého konzultantkou Evou Novákovou, který byl upraven pro tato data.

K vyhodnocení alfa-diverzity byla využita funkce **trans_alpha\$new()**. Pro samotný výpočet alfa-diverzity byla využita funkce **microtable\$cal_alphadiv()** za použití kvantitativních indexů **Richness** (ukazující počet bakteriálních OTU u jednotlivých linií) a **Shannon** (ukazující počet OTU a zároveň jejich relativní abundanci v mikrobiomu).

```
trans_alpha$new(dataset = NULL, group = NULL, by_group = NULL, order_x = NULL)
Arguments:
dataset the object of microtable Class.
group default NULL; the sample column used for the statistics; If provided, can return data_stat.
by_group default NULL; perform the differential test among groups (group parameter) within
each group (by_group parameter).
order_x default NULL; a sample_table column name or a vector containing sample names; if
provided, order samples by using factor.
```

Obr. 2 Parametry funkce trans_alpha\$new(); z <https://github.com/ChiLiubio/microeco>

```
microtable$cal_alphadiv(measures = NULL, PD = FALSE)
Arguments:
measures default NULL; one or more indexes from "Observed", "Coverage", "Chao1", "ACE",
"Shannon", "Simpson", "InvSimpson", "Fisher", "PD"; If null, use all those measures.
'Shannon', 'Simpson' and 'InvSimpson' are calculated based on vegan::diversity function;
'Chao1' and 'ACE' depend on the function vegan::estimateR; 'PD' depends on the
function picante::pd.
PD TRUE or FALSE, whether phylogenetic tree should be calculated, default FALSE.
```

Obr. 3 Parametry funkce microtable\$cal_alphadiv(); z <https://github.com/ChiLiubio/microeco>

Pro výpočet nepodobnosti mezi jednotlivými liniemi byly použity Bray-Curtis distance v rámci funkcí **trans_beta\$new(measure = „bray“)** a **trans_beta\$cal_group_distance()**. Výpočet beta-diverzity byl proveden funkcí **microtable\$cal_betadiv()**. Beta-diverzita byla následně vyhodnocena za použití klastrovací analýzy NMDS s využitím funkce **trans_beta\$cal_ordination(ordination= „NMDS“)**. Poté byla provedena analýza adonis2

z balíčku **vegan**, která posuzuje signifikanci nalezených nepodobností – použita byla funkce **trans_beta\$cal_manova()**.

```
trans_beta$new(dataset = NULL, measure = NULL, group = NULL)
Arguments:
dataset the object of microtable class.
measure default NULL; bray jaccard, wei_unifrac or unwei_unifrac, or other name of matrix you add in microtable$beta_diversity; used for ordination, manova or group distance. The measure must be one of names of microtable$beta_diversity list. Please see microtable$cal_betadiv function for more details.
group default NULL; sample_group used for manova, betadisper or group distance.
```

Obr. 4 Parametry funkce **trans_beta\$new()**; z <https://github.com/ChiLiubio/microeco>

```
trans_beta$cal_group_distance(within_group = TRUE, by_group = NULL)
Arguments:
within_group default TRUE; whether transform sample distance within groups, if FALSE, transform sample distance between any two groups.
by_group default NULL; one colname name of sample_table in microtable object. If provided, transform distances by the provided by_group parameter. This is especially useful for ordering and filtering values further. When within_group = TRUE, by_group parameter is the format of paired groups. When within_group = FALSE, by_group parameter is the format same with the group information in sample_table.
```

Obr. 5 Parametry funkce **trans_beta\$cal_group_distance()**; z <https://github.com/ChiLiubio/microeco>

```
microtable$cal_betadiv(method = NULL, unifrac = FALSE, binary = FALSE, ...)
Arguments:
method default NULL; a character vector with one or more elements; If default, "bray" and "jaccard" will be used; see vegdist function and method parameter in vegan package.
unifrac default FALSE; TRUE or FALSE, whether unifrac index should be calculated.
binary default FALSE; TRUE is used for jaccard and unweighted unifrac; optional for other indexes.
... parameters passed to vegdist function.
```

Obr. 6 Parametry funkce **microtable\$cal_betadiv()**; z <https://github.com/ChiLiubio/microeco>

```
trans_beta$cal_ordination(
  ordination = "PCoA",
  ncomp = 3,
  trans_otu = FALSE,
  scale_species = FALSE
)
Arguments:
ordination default "PCoA"; "PCA", "PCoA" or NMDS; PCA: principal component analysis; PCoA: principal coordinates analysis; NMDS: non-metric multidimensional scaling.
ncomp default 3; the returned dimensions.
trans_otu default FALSE; whether species abundance will be square transformed, used for PCA.
scale_species default FALSE; whether species loading in PCA will be scaled.
```

Obr. 7 Parametry funkce **trans_beta\$cal_ordination()**; z <https://github.com/ChiLiubio/microeco>

```

trans_beta$scal_manova(
  manova_all = TRUE,
  manova_set = NULL,
  group = NULL,
  p_adjust_method = "fdr",
  ...
)

```

Arguments:

`manova_all` default TRUE; TRUE represents test for all the groups, i.e. the overall test; FALSE represents test for all the paired groups.

`manova_set` default NULL; other specified group set for manova, such as "Group + Type" and "Group*Type"; see also `adonis2`.

`group` default NULL; a column name of `sample_table` used for manova. If NULL, search group stored in the object.

`p_adjust_method` default "fdr"; p.adjust method when `manova_all = FALSE`; see method parameter of `p.adjust` function for available options.

... parameters passed to `adonis2` function of `vegan` package.

Obr. 8 Parametry funkce `trans_beta$scal_manova()`; z <https://github.com/ChiLiubio/microeco>

Pro zobrazení bakteriálního profilu analyzovaných mikrobiomů byla použita vizualizace pomocí heat-mapy, funkcí `trans_abund$plot_heatmap()`. Relativní zastoupení třiceti nejpočetněji zastoupených bakteriálních složek bylo graficky zpracováno za pomoci funkce `trans_abund$new()`.

```

trans_abund$new(
  dataset = NULL,
  taxrank = "Phylum", Genus
  show = 0,
  ntaxa = 10, 30
  groupmean = NULL,
  delete_full_prefix = TRUE,
  delete_part_prefix = FALSE,
  prefix = NULL,
  use_percentage = TRUE,
  input_taxaname = NULL
)

```

Arguments:

`dataset` default NULL; the object of `microtable` class.

`taxrank` default "Phylum"; taxonomic rank.

`show` default 0; the relative abundance threshold used for filtering.

`ntaxa` default 10; how many taxa will be used, ordered by abundance from high to low; this parameter does not conflict with the parameter `show`; both can be used.

`groupmean` default NULL; calculating mean abundance for each group; select a group column name in `microtable$sample_table`.

`delete_full_prefix` default TRUE; whether delete both the prefix of taxonomy and the character in front of them.

`delete_part_prefix` default FALSE; whether only delete the prefix of taxonomy.

`prefix` default NULL; character string; can be used when `delete_full_prefix = T` or `delete_part_prefix = T`; default NULL represents using the "letter+_", e.g. "k_" for Phylum level; Please alter this parameter when the prefix is not standard.

`use_percentage` default TRUE; show the abundance percentage.

`input_taxaname` default NULL; character vector; input taxa names for selecting some taxa.

Obr. 9 Parametry funkce `trans_abund$new()`; z <https://github.com/ChiLiubio/microeco>

```

trans_abund$plot_heatmap(
  color_values = rev(RColorBrewer::brewer.pal(n = 11, name = "RdYlBu")),
  facet = NULL,
  facet2 = NULL,
  facet3 = NULL,
  facet4 = NULL,
  order_facet = NULL,
  x_axis_name = NULL,
  order_x = NULL,
  withmargin = TRUE,
  plot_numbers = FALSE,
  plot_text_size = 4,
  plot_breaks = NULL,
  margincolor = "white",
  plot_colorscale = "log10",
  min_abundance = 0.01,
  max_abundance = NULL,
  strip_text = 11,
  xtext_size = 10,
  ytext_size = 11,
  xtext_keep = TRUE,
  xtitle_keep = TRUE,
  grid_clean = TRUE,
  xtext_type_hor = TRUE,
  legend_title = "% Relative\nAbundance",
  pheatmap = FALSE,
  ...
)

```

Argumentis:

`color_values` default `rev(RColorBrewer::brewer.pal(n = 11, name = "RdYlBu"))`; colors palette for the plotting.

`facet` default `NULL`; a character string; if using facet, provide a column name in `sample_table`, such as "Group".

`facet2` default `NULL`; the second facet, used with `facet` parameter together; `facet2` should have a finer scale; use this parameter, please first install package `ggh4x`.

`facet3` default `NULL`; the third facet, used with `facet` and `facet2` parameter together.

`facet4` default `NULL`; the fourth facet, used with `facet`, `facet2` and `facet3` parameter together.

`order_facet` `NULL`; vector; used to order the facet, such as, `c("Group1", "Group3", "Group2")`.

`x_axis_name` `NULL`; a character string; a column name of `sample_table` used to show the sample names in x axis.

`order_x` default `NULL`; vector; used to order the sample names in x axis; must be the samples vector, such as, `c("S1", "S3", "S2")`.

`withmargin` default `TRUE`; whether retain the tile margin.

`plot_numbers` default `FALSE`; whether plot the number in heatmap.

`plot_text_size` default 4; If `plot_numbers` `TRUE`, text size in plot.

`plot_breaks` default `NULL`; The legend breaks.

Obr. 10 Parametry funkce `trans_abund$plot_heatmap()`; z <https://github.com/ChiLiubio/microeco>

4 VÝSLEDKY

Výsledný dataset obsahoval 96 vzorků (93 vzorků + 2 pozitivní a 1 negativní kontrola). Hrubá data z Illumina MiSeq platformy obsahovala 1676146 readů. Během zpracování ampliconových dat programy Usearch a Qiime1.9 byly odstraněny ready R2, čímž se počet readů zmenšil na polovinu. Po Demultiplexování, odfiltrování readů nízké kvality a následné dekontaminaci vstoupilo do analýz v programu R **619936 readů** (597626 readů nejsou-li započteny pozitivní a negativní kontroly). V průměru bylo tedy získáno 6457 readů na jeden vzorek, přičemž medián je 5951 readů. Normalizací datasetu na počet 1000 readů pro každý vzorek bylo 13 vzorků s nízkým počtem readů z následných analýz odstraněno (odstraněné vzorky jsou v Tabulce IV označeny šedým písmem).

Každý vzorek byl zařazen k odpovídající genetické linii vši (viz Tabulka IV).

Tabulka IV Přiřazení jednotlivých vzorků k hostitelskému druhu a zařazení do genetických linií

	VZOREK	HOSTITEL	LINE_BASIC	LINIE	GENOM
1	19MocAp12bXN	<i>A_flavicollis</i>	N	N	NGenom
2	19MocAp19XNb	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
3	19MocAp19XN	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
4	19MocAp24XN	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	Ngenom
5	15HXDXN	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NA
6	11HXDXN	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
7	10D18	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
8	13D18	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
9	8RB19	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
10	17RB19	<i>A_flavicollis</i>	N	N	NGenom
11	14ZDAp19	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
12	RpT48	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
13	6ASPOB	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
14	14AFOB	<i>A_flavicollis</i>	N	N	NGenom
15	1SDAFb	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
16	4SDAF	<i>A_flavicollis</i>	N	N	NGenom
17	21AbAf3	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
18	KOC31	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
19	KOC32	<i>A_flavicollis</i>	N	N	NGenom
20	KOC78	<i>A_flavicollis</i>	N	N	NGenom
21	KOC82b	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
22	RGF2	<i>A_flavicollis</i>	N	N	NGenom
23	12UAZ22	<i>A_flavicollis</i>	N	N	NGenom
24	15UAZ22	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
25	42MAN	<i>A_flavicollis</i>	N	N	NGenom
26	38MAN	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
27	19HrAp2	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NA

POKRAČOVÁNÍ TABULKY IV

28	15HVPXN	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
29	22HVPXN	<i>A_flavicollis</i>	N	N	NGenom
30	ROK11	<i>A_flavicollis</i>	N	N	NGenom
31	ROK7	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NGenom
32	133ZL18c	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
33	133ZL18d	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
34	46MANb	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid1	Sgenom
35	46MANc	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid1	Sgenom
36	46MAND	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid1	Sgenom
37	47MANb	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid1	Sgenom
38	53MANa	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid1	Sgenom
39	53MANb	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid1	Sgenom
40	53MANc	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid1	Sgenom
41	106MANb	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
42	106MANc	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
43	106MAND	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
44	2HVXHodXSE	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
45	28HVXHodXSE	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
46	KOC14	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
47	KOC20	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
48	KOC36	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
49	KOC36b	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
50	KOC36c	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
51	KOC70	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
52	KOC70b	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
53	KOC70c	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
54	21AbAf4	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
55	JM866	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
56	JM863	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
57	JM858	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
58	21LoAf1b	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
59	11RNS	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
60	11RNSb	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
61	11RNSc	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
62	15RNS	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
63	15RNSb	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
64	15RNSc	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
65	16ApoXCHYb	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
66	19ApoXCHY	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
67	19ApoXCHYb	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
68	19ApoXCHYc	<i>A_flavicollis</i>	H	Hybrid	Sgenom
69	VII12	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
70	VII13	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
71	VII14	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
72	VII15	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
73	VII18	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
74	7KOCXKocXSea	<i>A_flavicollis</i>	S	SE	Sgenom

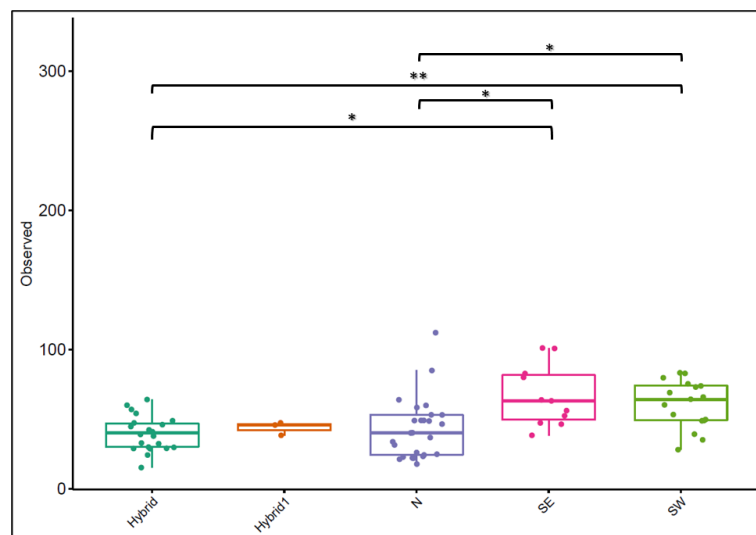
POKRAČOVÁNÍ TABULKY IV

75	7KOCXKocXSeb	<i>A_flavicollis</i>	S	SE	Sgenom
76	15KOCXKocXSEa	<i>A_flavicollis</i>	S	SE	Sgenom
77	15KOCXKocXSEb	<i>A_flavicollis</i>	S	SE	Sgenom
78	21KORXKorXSEb	<i>A_flavicollis</i>	S	SE	Sgenom
79	21KORXKorXc	<i>A_flavicollis</i>	S	SE	Sgenom
80	RAD39e	<i>A_flavicollis</i>	S	SE	Sgenom
81	RAD44	<i>A_flavicollis</i>	S	SE	Sgenom
82	RAD51c	<i>A_flavicollis</i>	S	SE	Sgenom
83	30AFXVOJb	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
84	11XAFXJ	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
85	13ZDA	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
86	27ZDA	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
87	1STRb	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
88	1STRc	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
89	2HBb	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
90	8HRB	<i>A_flavicollis</i>	S	SE	NA
91	1Ja19Apb	<i>A_flavicollis</i>	S	SW	Sgenom
92	HR1	<i>A_flavicollis</i>	S	SE	Sgenom
93	HR5	<i>A_sylvaticus</i>	N	N	NA
94	NK	<i>negative</i>	NA	NA	NA
95	MCE	<i>positive</i>	NA	NA	NA
96	MCS	<i>positive</i>	NA	NA	NA

Následující grafy a analýzy počítají s pěti genetickými liniemi, do kterých byly vši zařazeny na základě celo-genomových analýz provedených Janou Martinů – nespecifická linie (N), specifická západní (SW) a východní (SE) linie a dvě hybridní linie **Hybrid (H)** a **Hybrid1 (H1)**.

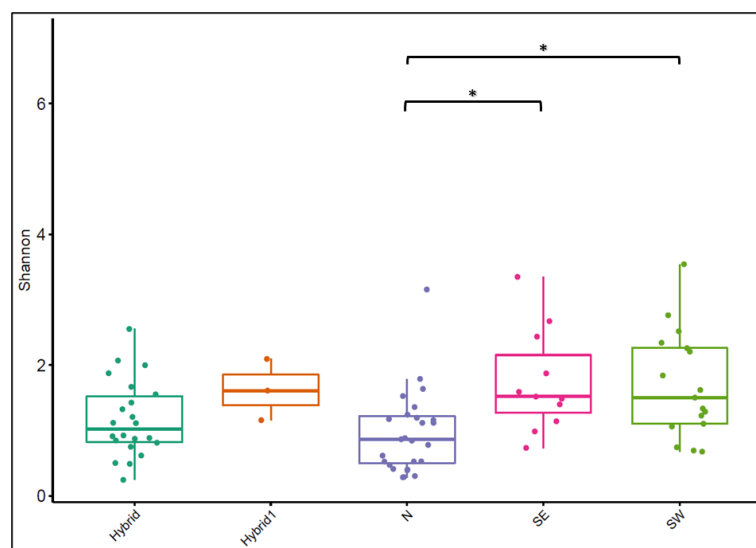
4.1 Alfa-diverzita mikrobiomů

Základní analýzou, která byla provedena je výpočet alfa-diverzity s použitím indexu **Richness** (označován jako index „Observed“). Tato analýza ukazuje odlišnou mikrobiální bohatost jednotlivých linií, respektive počet bakteriálních OTU pro jednotlivé linie. Nejvyšší richness byla zaznamenána u **SE** linie. Signifikantní rozdíly v počtu identifikovaných OTU byly na hladině významnosti 95 % zaznamenány mezi liniemi **Hybrid - SE**, **N - SW** a **N - SE**. Signifikantně odlišná richness na hladině významnosti 99 % byla zaznamenána mezi liniemi **Hybrid - SW** (viz Graf 2).



Graf 2 Vyhodnocení alfa-diverzity s využitím indexu **Richness** (zde na ose y označovaným jako „Observed“), výstup statistické analýzy viz Tabulka P1 (Přílohy)

Pro vytvoření Grafu 3 byla opět vypočítána alfa-diverzita mikrobiomů jednotlivých linií vší, tentokrát za použití indexu **Shannon**, který kromě počtu OTU počítá také s jejich relativní abundancí v mikrobiomu. Graf ukazuje, že celková vyváženost složení mikrobiomů je mezi různými liniemi vší velmi podobná (viz Tabulka V a Tabulka P2 v Přílohách). Hodnoty blízké 1 naznačují dominanci jednoho či několika málo bakteriálních OTU (hodnota 0 ukazuje na absolutní dominanci pouze jednoho druhu). Jediné viditelné signifikantní rozdíly (a to na nejnižší hladině významnosti) byly zaznamenány mezi liniemi **N - SW** a **N - SE**.



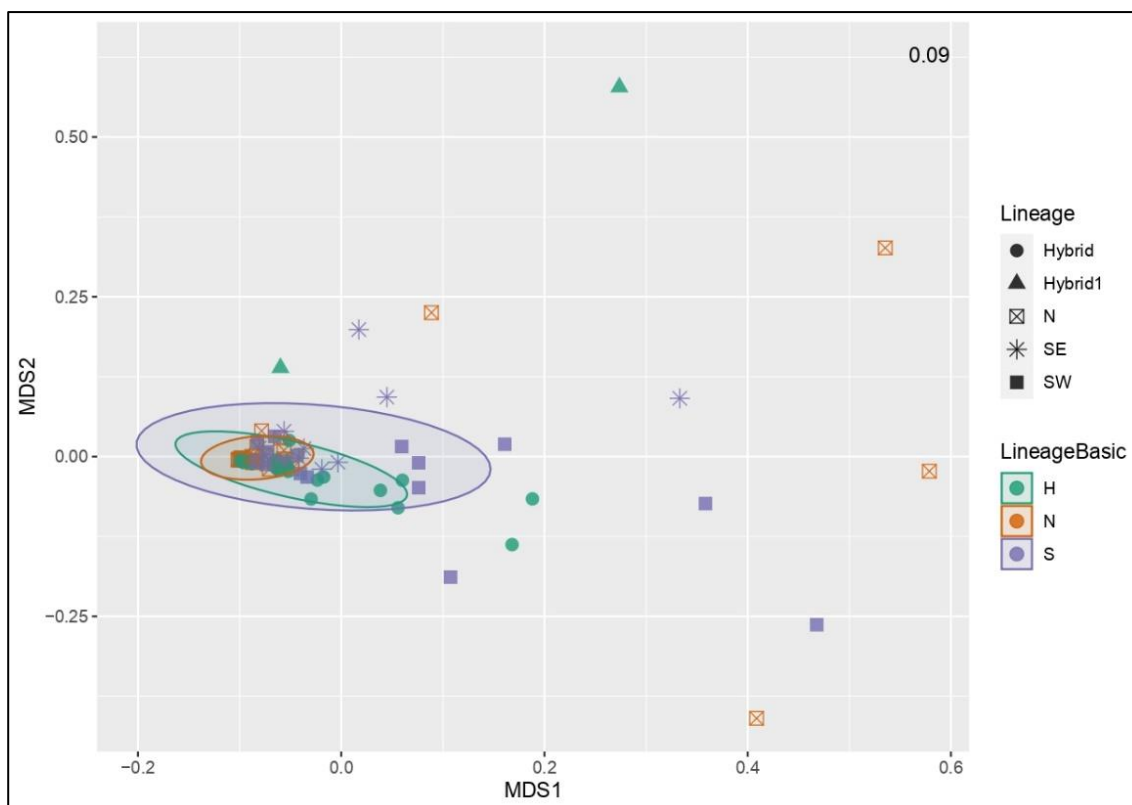
Graf 3 Vyhodnocení alfa-diverzity s využitím indexu **Shannon**, výstup statistické analýzy viz Tabulka P1 (Přílohy)

Tabulka V Vyváženost složení mikrobiomů mezi genetickými liniemi

LINIE (POČET)	INDEX	PRŮMĚR	SD
Hybrid (22)	Observed	39.7727273	12.3863666
	Shannon	1.1711969	0.5844462
Hybrid1 (3)	Observed	43.6666667	4.9328829
	Shannon	1.6206554	0.4683012
N-lineage (27)	Observed	49.1111111	39.1096421
	Shannon	1.0808021	0.9360114
SW-lineage (17)	Observed	60.5882353	17.0589376
	Shannon	1.6895857	0.8104027
SE-lineage (11)	Observed	66.4545455	21.8785906
	Shannon	1.7440641	0.7845144

4.2 Beta-diverzita mikrobiomů

NMDS klastrovací analýza na základě Bray-Curtis distancí ukázala, že mikrobiomy všech linií jsou si svým OTU složením velmi podobné. Na Grafu 4 jsou některé body lokalizovány mimo společné elipsy – jedná se o vnitro-skupinovou variabilitu uvnitř linií. Čím blíže jsou si body, tím podobnější jsou si mikrobiomy.



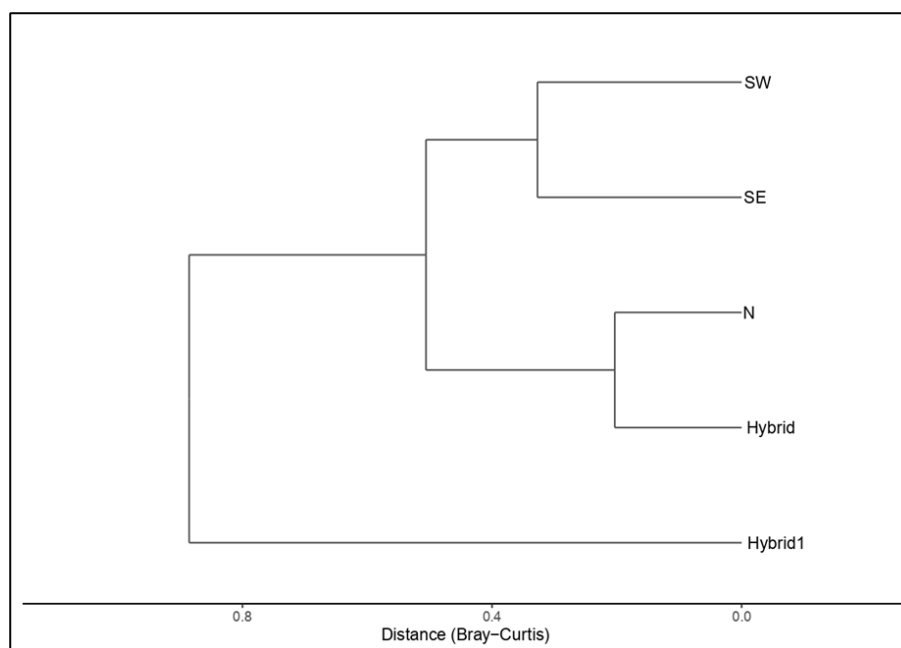
Graf 4 NMDS klastrovací analýza – barvy označují LineageBasic a tvary Lineage

Výsledek analýzy adonis2 ukazuje, že mezi základními liniemi (tzv. „LineageBasic“) **N**, **H** a **S** není signifikantní rozdíl ($R^2 = 0,04554$, $P = 0.055$).

Tabulka VI Výsledek analýzy adonis2

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)
LineageBasic	2	0.3861	0.04554	1.8372	0.055
Residual	77	8.0923	0.95446		

Pro jednodušší a bližší znázornění podobností linií byly využity Bray-Curtis distance – vzniklý stromek ukazuje, které linie jsou si podobnější, a které jsou si naopak nepodobné. Z Grafu 5 je patrné, že nejvíce podobné mikrobiomy nalezneme mezi liniemi **SW** a **SE**, stejně jako mezi liniemi **N** a **Hybrid**. Linie **Hybrid1** je všem ostatním liniím stejně nepodobná.

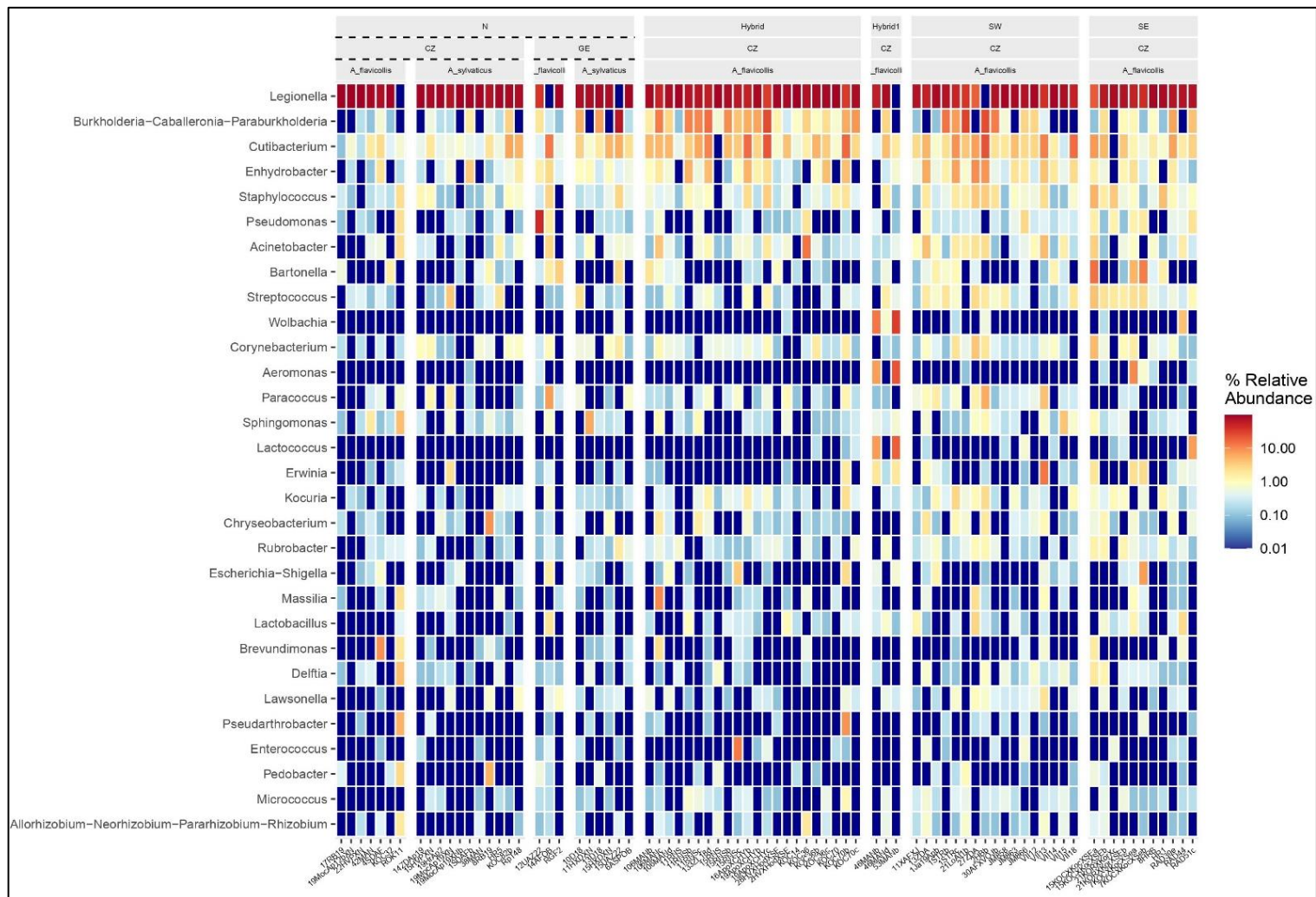


Graf 5 Bray-Curtis distance zobrazující bližší podobnosti mezi genetickými liniemi

Tabulka VII Porovnání základních linií (LineageBasic – **N**, **H** a **S**) na základě Bray-Curtis distancí

SKUPINY	METODA	F	R2	P.value	P.adjusted
N vs H	bray	1.559435	0.03024539	0.152	0.225
N vs S	bray	2.529172	0.04554673	0.041	0.123
H vs S	bray	1.294505	0.02475412	0.225	0.225

4.3 Bakteriální složení mikrobiomů



Graf 6 Heat-mapa znázorňující bakteriální zastoupení v mikrobiomech vši *P. serrata*

V mikrobiomech bylo detekováno celkem 1196 bakteriálních OTU – pro vytvoření heat-mapy bylo ovšem vybráno pouze **30** nejvíce dominantních rodů. Bakterie rodu *Legionella* byla identifikována v naprosté většině (94 %) vzorků. Dalšími bakteriemi, majoritně zastoupenými v mikrobiomech napříč genetickými liniemi, jsou rody *Paraburkholderia*, *Cutibacterium* a *Enhydrobacter*. U linie **Hybrid1** je možné vidět výskyt bakterií rodu *Wolbachia*, *Aeromona* a *Lactococcus*, které se jinak u naprosté většiny vzorků nevyskytují. Některé bakteriální rody jsou v heat-mapě jasně viditelné (v odstínech žluté až červené) pouze u několika málo (nebo i jediného) vzorků, příkladem jsou rody *Pseudomonas*, *Massilia*, *Erwinia* nebo *Enterococcus*.

5 DISKUZE

5.1 Podobnost a variabilita mikrobiomů genetických linií vší *P. serrata*

Pro porovnání variability a struktury mikrobiomů byla zvolena pouze jedna proměnná – odlišné genetické linie vší *Polyplax serrata*. Alternativní parametry, které rovněž mohou mít na strukturu mikrobiomů vliv (Adair & Douglas, 2017), jako například geografická poloha, habitat hostitele (Park et al., 2019) či vývojové stádium hostitele (Tsuchida et al., 2002; Brown et al., 2020), nebyly v této práci zohledněny. Jedním z důvodů je geografický původ sběru vzorků, které všechny pocházejí z navzájem blízkých lokalit – sběr vzorků je totiž v současnosti soustředěn do míst, kde je předpokládána hybridní zóna mezi SW a SE genetickou linií *P. serrata*. Celý soubor dat byl tedy vyhodnocován pouze mezi odlišnými genetickými liniemi a v rámci této proměnné nebyla nalezena žádná signifikantní diference či majoritní rozdíly ve variabilitě a struktuře mikrobiomů.

Absence variability nicméně neznamená, že byly mikrobiomy zcela uniformní. Jak ukazuje Graf 4, uvnitř jednotlivých linií je viditelný vnitro-skupinový rozptyl, nicméně majoritní část všech mikrobiomů je seskupena do jednoho těsného klastru. Můžeme tedy říci, že vnitro-skupinová variabilita převládá nad mezi-skupinovou variabilitou.

Takto vysoká podobnost mikrobiomů nebyla u linií zcela očekávaným výsledkem. Přinejmenším nespecifická (N) a specifická (S) linie se dle všech parametrů zdají být spíše dvěma samostatnými druhy, které (pokud víme) spolu nehybridizují, přestože se vyskytují sympatricky na stejném hostiteli (Štefka & Hypša, 2008; Martinů et al., 2018). Podobnost jejich mikrobiomů je tedy překvapivá, vezmeme-li v potaz, že druhová specifita hostitelů hraje ve složení mikrobiomů hmyzu důležitou roli (Adair & Douglas, 2017; Brown et al., 2020). Rozdílná struktura mikrobiomů v závislosti na hostitelské specifitě byla studována a popsána především na fytofágních mšicích (Tsuchida et al., 2002), kde jsou rozdíly patrné především v různé diverzitě sekundárních symbiontů (Sandstrom et al., 2001; Zytynska & Weisser, 2016). S-symbionti často svým hostitelům poskytují mnoho výhod, které zvyšují fitness hostitele (Oliver et al., 2003; Scarborough et al., 2005) a v rámci mezidruhové kompetice jsou poté úspěšnější ty hostitelské druhy, které mají své mikrobiální společenství lépe „přizpůsobené“ svému habitatu, podmínkám a potřebám (např. v případě hojného výskytu parazitoidů, druhy mající S-symbionta, který zvyšuje hostitelovu obranu před parazitoidy, budou úspěšnější než jiné druhy bez tohoto S-symbionta; Oliver et al., 2003).

Teorií, proč není variabilita u zkoumaných mikrobiomů viditelná, je hned několik. Zaprvé je potřeba vzít v úvahu (alespoň u **N** a **S** linie) genetickou vzdálenost jednotlivých linií. U triatom jsou změny ve variabilitě mikrobiomů dobře viditelné i u blízce příbuzných druhů (Brown et al., 2020), dalším krokem by proto bylo zjištění mitochondriální vzdálenosti mezi **N** a **S** linií (potencionálně i u ostatních linií) a následné porovnání této vzdálenosti s jinými druhy (nejpravděpodobněji se zmíněnými triatomami), u kterých je diferenciací mikrobiomů dobře viditelná. Druhým vysvětlením chybějící variability je habitat a životní strategie *P. serrata*. Protože se jedná o obligátního permanentního parazita (Lehane, 2005), **N** i **S** linie žijí ve stejném, jasně definovaném a pravděpodobně neměnicím se prostředí (srst myšic). Obě linie tedy mají stejný (omezený) environmentální zdroj potencionálních symbiontů získávaných horizontální cestou. Tímto směrem se ubírá již zmíněná environmentální studie *P. serrata*, založená na amplikonových datech získaných ze stěrů, kousků kůže a slezin hostitelských myšic. Snahou tohoto výzkumu je zjistit, nakolik se liší a popřípadě i mění mikrobiomy žijících na stejném hostiteli. Vzorky 46MANb a 46MANd z genetické linie **Hybrid1** tento rozdíl v mikrobiomu dobře ilustrují. Oba vzorky byly získány z jediného hostitele, konkrétně z *Apodemus flavicollis*, nicméně vzorek 46MANb má oproti druhému vzorku ve svém mikrobiomu více zastoupeny bakterie rodu *Aeromonas*, *Lactococcus* a také více viditelný rod *Wolbachia* (viz Graf 6). Podobně je tomu také u tří vzorků KOC36(b/c), u kterých má pouze první vzorek KOC36 jasně viditelnou bakterii rodu *Acinetobacter*.

Nicméně mikrobiomy jedinců stejného druhu mají rovněž tendenci být si navzájem podobnější než mikrobiomy jedinců odlišných druhů. V našem případě by si tedy genetické linie **SW** a **SE** měly být navzájem podobnější v porovnání s jinými liniemi, což také potvrzuje dendrogram Bray-Curtis distancí, znázorněný na Grafu 5. Tento „trend“ podobnost mikrobiomů může být výsledkem hostitelské selekce mikrobiálních složek (trávení potravy, imunita hostitele nebo tepelná tolerance symbiontů (Oliver & Martinez, 2014; Adair & Douglas, 2017) nebo také koevolucí mikrobiom s hostitelským druhem (Lim & Bordenstein, 2020). Liší se ovšem mikrobiom vši v závislosti právě na druhu parazitovaných hostitelů?

Pokud mezi sebou porovnááme **N** a **S** linii, nemusí se rozdíly způsobené nízkou hostitelskou specifitou **N**-linie ve výsledcích vůbec projevit. Nicméně provedená analýza na **N**-linii (která parazituje jak na *A. flavicollis* tak na *A. sylvaticus*) ukazuje, že v našem případě není druh obratlovčího hostitele faktorem signifikantně ovlivňujícím profil mikrobiomu, viz Graf P3 a Obr. P5 (Přílohy)

5.2 Struktura mikrobiomů vši *P. serrata*

Naprosté většině mikrobiomů (94 %) dominuje jediný bakteriální rod *Legionella*. Toto zjištění není překvapivé, neboť víme, že legionella (konkrétně *L. polyplacis*) plní u vši *P. serrata* funkci P-symbionta (Říhová et al., 2017). U celkem 5 vzorků (6 %) datasetu nebyla legionella pomocí amplikonového screeningu potvrzena, což může být způsobeno několika faktory. Prvním možným vysvětlením je PCR-bias, kdy jsou zejména v prvních cyklech PCR amplifikovány DNA templáty jiných bakterií (Polz & Cavanaugh, 1998), i přestože je legionella přítomna. Potencionálním řešením by bylo provedení TP-PCR neboli triplet-PCR (Aird et al., 2011). Další možnou příčinou by mohl být fyziologický stav vši, neboť legionella je, stejně jako většina P-symbiontů, přenášena **vertikální cestou** skrze cytoplasmu vajíček (Vautrin & Vavre, 2009). Pokud by tedy veš krátce před jejím odebráním z hostitele nakladla vajíčka, mohla by většinové množství svého symbionta předat svým potomkům.

Vzorky, u nichž nebyla legionella zaznamenána pomocí amplikonového screeningu byly poté podrobeny další analýze. Geny legionelly byly blastovány proti celkové assembly metagenomického datasetu. Výsledkem bylo potvrzení přítomnosti legionelly u 4 z celkových 5 vzorků – jediným vzorkem bez legionelly tak zůstal vzorek 15UAZ22 (pocházející z *A. sylvaticus* z Německa). Kromě již zmíněných fyziologických faktorů by mohlo být vysvětlením také ontogenetické stádium této vši. Teoreticky mohlo při přenosu symbionta (*L. polyplacis*) z matky na potomstvo dojít k chybě, která způsobila absenci legionelly v daném vajíčku. Larva, která by se z takového vajíčka vylíhla, by potencionálně mohla určitý čas přežít i bez svého primárního symbionta, nebyla by už však schopna dospět nebo se reprodukovat. Jak ukazují práce z minulého století, v některých případech hostitelé po experimentálním odstranění symbiontů umírají, v některých případech ale přežijí a nejsou poté schopni reprodukce či žijí jen velmi krátkou dobu (Puchta, 1955; Koch, 1956; Nogge, 1976).

Co se složení mikrobiomu týče (viz Graf 6), dalšími hojně zastoupenými bakteriálními rody jsou *Paraburkholderia* (u 53 % vzorků) a *Cutibacterium* (73 % vzorků), přičemž oba tyto rody jsou více viditelné u hybridů (**H**) a u specifické (**S**) linie. *Cutibacterium* je velmi běžná, často komenzální bakterie, kterou můžeme nalézt v mikrobiomu kůže, tedy na povrchu těla (Mayslich et al., 2021). Oproti tomu *Paraburkholderia* je bakteriální symbiont některých améb (Noh et al., 2022). Rod *Sphingomonas*, který je běžným kontaminantem naší laboratoře, je v heat-mapě zastoupen velmi málo, nicméně u všech vzorků je alespoň trochu viditelný.

Nápadným a „zvláštním“ jevem je genetická linie **Hybrid1**, v jejímž mikrobiomu jsou zastoupeny rody *Wolbachia*, *Aeromonas* a *Lactococcus*, které ovšem jinak nemají v dalších mikrobiomech zastoupení (zcela chybí u naprosté většiny vzorků). Linie **Hybrid1 (H1)** je sama o sobě zvláštní, neboť ve všech analýzách založených na nukleárních SNP markerech klastruje do samostatné linie, která je všem ostatním liniím (co se složení mikrobiomu týče) stejně nepodobná (viz Graf 5). Na PCA analýze poskytnuté Janou Martinů (viz Graf P4 v Přílohách) je jasně viditelné, že **H1** se klastruje do vlastní skupiny mimo ostatní linie. A příčinou „zvláštnosti“ této linie by mohla být právě jedna z bakteriálních složek mikrobiomu **H1** – bakterie rodu *Wolbachia* se kromě linie **H1** prokazatelně vyskytuje pouze v jediném dalším vzorku (RAD44). Přítomnost wolbachie a jasně viditelný posun na úrovni populační genetiky **Hybridů1** je velmi nápadná a bude zcela určitě vyžadovat další výzkum. V této souvislosti ale narážíme hned na několik faktorů, které mohou dalším výzkum komplikovat.

Wolbachie je u hmyzu hojně rozšířený (Jeyapakash & Hoy, 2000) reprodukční manipulátor, známý svou schopností vyvolávat cytoplasmatickou inkompatibilitu (**CI**; Stouthamer et al., 1999), která vede k jednosměrnému ochuzení genetické informace v hostitelské populaci. V tomto konkrétním případě by však reprodukční manipulace wolbachie zasáhly do hybridní zóny specifické (**S**) linie *P. serrata*, čímž by bakterie teoreticky ovlivnila hybridizaci obou populací. V takovém případě by výslední hybridi **SW** a **SE** linie měli jinou genetickou podobu (například protože by se mateřská DNA jedné populace vůbec nedostala k možnosti hybridizace) než „normální“ hybridy vznikající bez přítomnosti wolbachie. Další komplikaci představuje efekt zvaný **paternální eliminace genomu (PGE)**, který byl zdokumentován u vším blízce příbuzných pisivek z řádu Psocodea (Hodson et al., 2017). **PGE** způsobuje, že paternálně děděné chromozomy nejsou nikdy předány potomstvu, a samci tak předávají pouze genetickou informaci získanou z maternální linie. Také bylo prokázáno, že někteří samci lidské vši *Pediculus humanus* přenášejí geny pocházející pouze z maternální linie (McMeniman & Barker, 2006). Podle (Breeuwer & Werren, 1990) mohou reprodukční manipulátoři (například právě wolbachie) vytvářením bariér v toku genů podpořit míru a rychlost hostitelské speciace.

V rámci našeho modelového systému odlišných linií *P. serrata* může nerovnoměrná distribuce genetického materiálu (z obou pohlaví) navíc spojená s komplikacemi způsobenými wolbachii (**CI**) ovlivnit výslednou hybridizaci na úrovni populační genetiky tak, že zde bude vznikat linie „normálních“ hybridů a linie „nenormálních“ hybridů(1). Několik studií

provedených na blízce příbuzných druzích hmyzu potvrzuje, že reprodukční manipulátoři mohou svým působením podpořit reprodukční izolaci a potencionálně tak přispívat k rostoucí druhové rozmanitosti (Jaenike et al., 2006; Bordenstein & Werren, 2007).

V původním datasetu (93 vzorků) klastrovalo do linie **Hybrid1** celkem 7 vzorků, nicméně znáhodnění a filtrace dat způsobila odstranění 4 těchto vzorků z výsledných analýz. U všech vyřazených vzorků nicméně proběhly metagenomické screeniny, které měly odhalit přítomnost wolbachie. Důležitým poznatkem by bylo získání celého genomu wolbachie, či alespoň zjištění, zda vlastní geny pro kompatibilitu. Nicméně v rámci metagenomických dat se nepodařilo nalézt dostatečně silný signál wolbachie, prokazatelně se zde ale vyskytují jednotlivé ready (využití 16S rRNA z amplikonových dat). Těchto readů je ovšem velmi málo, což s největší pravděpodobností ukazuje na bias v metagenomickém nebo amplikonovém (případně v obou) screeningu. Případy podobných ne-konzistencí v podobě přítomnosti readů pro jednotlivé bakterie, a obecně rozdíly mezi amplikonovými a metagenomickými přístupy zmiňuje také recentní studie na vších (Doña et al., 2021).

6 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala strukturou mikrobiomů odlišných genetických linií vší *Polyplax serrata*. Rozdíly mikrobiomů byly předpokládány přinejmenším mezi **N** a **S** linií (závislost na hostitelské specifitě), nicméně výsledné analýzy neukázaly ve variabilitě či diverzitě mikrobiomu žádné signifikantní rozdíly. Ve složení mikrobiomů převládá vnitro-skupinová variabilita nad mezi-skupinovou. V rámci genetických analýz byla také ustanovena zvláštní samostatná linie **Hybrid1**, které se ukázala být ostatním liniím velmi nepodobná.

Dominantním bakteriálním druhem byla v mikrobiomech určena legionella, která u *P. serrata* plní funkci primárního symbionta, a její majoritní zastoupení tedy bylo očekávané. Překvapivým zjištěním bylo objevení wolbachie v mikrobiomu linie **Hybrid1**, přičemž přítomnost této bakterie může být zdůvodněním vysoké odlišnosti této linie.

7 BIBLIOGRAFIE

Adair, K., Bost, A., Bueno, E., Kaunisto, S., Kortet, R., Peters-Schulze, G., Martinson, V., & Douglas, A. (2020). Host determinants of among-species variation in microbiome composition in drosophilid flies. *The ISME Journal*, *14*(1), 217-229. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0532-7>

Adair, K., & Douglas, A. (2017). Making a microbiome: the many determinants of host-associated microbial community composition. *Current Opinion in Microbiology*, *35*, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.11.002>

Aird, D., Ross, M., Chen, W., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, D., Nusbaum, C., & Gnirke, A. (2011). Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biology*, *12*(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-2-r18>

Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., & Aksoy, S. (2002). Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature Genetics*, *32*(3), 402-407. <https://doi.org/10.1038/ng986>

Aksoy, S. (1995). *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., taxa consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of tsetse flies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *45*(4), 848-851. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-4-848>

Aksoy, S. (2011). Sleeping sickness elimination in sight: time to celebrate and reflect, but not relax. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001008>

Aksoy, S., Weiss, B., & Attardo, G. (2014). Trypanosome transmission dynamics in tsetse. *Current Opinion in Insect Science*, *3*, 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.003>

Alam, U., Medlock, J., Brelsfoard, C., Pais, R., Lohs, C., Balmand, S., Carnogursky, J., Heddi, A., Takac, P., Galvani, A., Aksoy, S., & Schneider, D. (2011). *Wolbachia* symbiont infections induce strong cytoplasmic incompatibility in the tsetse fly *Glossina morsitans*. *PLoS Pathogens*, *7*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002415>

Anbutsu, H., & Fukatsu, T. (2003). Population dynamics of male-killing and non-male-killing Spiroplasmas in *Drosophila melanogaster*. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(3), 1428-1434. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1428-1434.2003>

Bakker, M. (2018). A fungal mock community control for amplicon sequencing experiments. *Molecular Ecology Resources*, 18(3), 541-556. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12760>

Balvín, O., Roth, S., Talbot, B., & Reinhardt, K. (2018). Co-speciation in bedbug *Wolbachia* parallel the pattern in nematode hosts. *Scientific Reports*, 8(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25545-y>

Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 155-189. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.59.030804.121041>

Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R. et al. (2020). Microbiome definition revisited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>

Bordenstein, S., & Werren, J. (2007). Bidirectional incompatibility among divergent *Wolbachia* and incompatibility level differences among closely related *Wolbachia* in *Nasonia*. *Heredity*, 99(3), 278-287. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800994>

Breeuwer, J., & Werren, J. (1990). Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, 346(6284), 558-560. <https://doi.org/10.1038/346558a0>

Bright, M., & Bulgheresi, S. (2010). A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 218-230. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2262>

Brown, J., Mihaljevic, J., Des Marteaux, L., & Hrček, J. (2020). Metacommunity theory for transmission of heritable symbionts within insect communities. *Ecology and Evolution*, 10(3), 1703-1721. <https://doi.org/10.1002/ece3.5754>

Brown, J., Rodríguez-Ruano, S., Poesakkannu, A., Batani, G., Schmidt, J., Roachell, W., Zima, J., Hypša, V., & Nováková, E. (2020). Ontogeny, species identity, and environment dominate microbiome dynamics in wild populations of kissing bugs (Triatominae). *Microbiome*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00921-x>

* Buchner, P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. *Ecology and Evolution*, 1-28.

Burke, G., & Moran, N. (2011). Massive genomic decay in *Serratia symbiotica*, a recently evolved symbiont of aphids. *Genome Biology and Evolution*, 3, 195-208. <https://doi.org/10.1093/gbe/evr002>

Cirimotich, C., Ramirez, J., & Dimopoulos, G. (2011). Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens, 10(4), 307-310. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.006>

Cohen, H., McFrederick, Q., & Philpott, S. (2020). Environment shapes the microbiome of the blue orchard bee, *Osmia lignaria*. *Microbial Ecology*, 80(4), 897-907. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01549-y>

Coll, M., & Guershon, M. (2002). Omnivory in terrestrial arthropods: mixing plant and prey diets. *Annual Review of Entomology*, 47(1), 267-297. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145209>

Dale, C., & Moran, N. (2006). Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*, 126(3), 453-465. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.014>

Dale, C., & Welburn, S. (2001). The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. *International Journal for Parasitology*, 31(5-6), 628-631. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00151-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00151-5)

Dedeine, F., Bandi, C., Boulétreau, M., & Kramer, L. (2003). Insights into *Wolbachia* obligatory symbiosis. *Insect Symbiosis*, 267-282. <https://doi.org/10.1201/9780203009918.ch16>

Demirbas-Uzel, G., Augustinos, A., Doudoumis, V., Parker, A., Tsiamis, G., Bourtzis, K., & Abd-Alla, A. (2021). Interactions between tsetse endosymbionts and *Glossina pallidipes* salivary gland hypertrophy virus in *Glossina* hosts. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.653880>

Denno, R., & Fagan, W. (2003). Might nitrogen limitation promote omnivory among carnivorous arthropods?. *Ecology*, 84(10), 2522-2531. <https://doi.org/10.1890/02-0370>

Dimijian, G. (2017). Evolving together: the biology of symbiosis, Part 1. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 13(3), 217a-226. <https://doi.org/10.1080/08998280.2000.11927678>

Doña, J., Virrueta Herrera, S., Nyman, T., Kunnasranta, M., & Johnson, K. (2021). Patterns of microbiome variation among infrapopulations of permanent bloodsucking parasites. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642543>

Doudoumis, V., Blow, F., Saridaki, A., Augustinos, A., Dyer, N., Goodhead, I., Solano, P., Rayaisse, J., Takac, P., Mekonnen, S., Parker, A., Abd-Alla, A., Darby, A., Bourtzis, K., & Tsiamis, G. (2017). Challenging the *Wigglesworthia*, *Sodalis*, *Wolbachia* symbiosis dogma in tsetse flies: *Spiroplasma* is present in both laboratory and natural populations. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04740-3>

Douglas, A. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43(1), 17-37. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.17>

Engel, P., & Moran, N. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699-735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>

Feldhaar, H., & Gross, R. (2009). Insects as hosts for mutualistic bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 299(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.05.010>

Fukatsu, T., Nikoh, N., Kawai, R., & Koga, R. (2000). The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2748-2758. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.7.2748-2758.2000>

Gherna, R., Werren, J., Weisburg, W., Cote, R., Woese, C., Mandelco, L., & Brenner, D. (1991). *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the causative agent of the son-killer trait in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(4), 563-565. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-4-563>

Gupta, V., Paul, S., & Dutta, C. (2017). Geography, ethnicity or subsistence-specific variations in human microbiome composition and diversity. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01162>

Hafner, M., Sudman, P., Villablanca, F., Spradling, T., Demastes, J., & Nadler, S. (1994). Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science*, 265(5175), 1087-1090. <https://doi.org/10.1126/science.8066445>

Hamidou Soumana, I., Simo, G., Njiokou, F., Tchicaya, B., Abd-Alla, A., Cuny, G., & Geiger, A. (2013). The bacterial flora of tsetse fly midgut and its effect on trypanosome transmission. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, S89-S93. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.03.029>

Hamilton, P., Perlman, S., & Knoll, L. (2013). Host defense via symbiosis in *Drosophila*. *PLoS Pathogens*, 9(12), 1-4. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003808>

Hammer, T., & Moran, N. (2019). Links between metamorphosis and symbiosis in holometabolous insects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1783). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0068>

Hildebrand, F., Meyer, A., Eyre-Walker, A., & Nachman, M. (2010). Evidence of selection upon genomic GC-content in bacteria. *PLoS Genetics*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001107>

Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., & Werren, J. (2008). How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*, 281(2), 215-220. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x>

Hiroki, M., Kato, Y., Kamito, T., & Miura, K. (2002). Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). *Naturwissenschaften*, 89(4), 167-170. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0303-5>

Hodson, C., Hamilton, P., Dilworth, D., Nelson, C., Curtis, C., & Perlman, S. (2017). Paternal genome elimination in *Liposcelis* booklice (Insecta: Psocodea). *Genetics*, 206(2), 1091-1100. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.199786>

Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X., & Fukatsu, T. (2010). *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 769-774. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911476107>

Hypša, V., & Křížek, J. (2007). Molecular evidence for polyphyletic origin of the primary symbionts of sucking lice (Phthiraptera: Anoplura). *Microbial Ecology*, 54(2), 242-251. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9194-x>

Charlat, S., Reuter, M., Dyson, E., Hornett, E., Duploux, A., Davies, N., Roderick, G., Wedell, N., & Hurst, G. (2007). Male-killing bacteria trigger a cycle of increasing male fatigue and female promiscuity. *Current Biology*, 17(3), 273-277. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.068>

Chen, X., Li, S., & Aksoy, S. (1999). Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *Journal of Molecular Evolution*, 48(1), 49-58. <https://doi.org/10.1007/PL00006444>

Chong, R., & Moran, N. (2018). Evolutionary loss and replacement of *Buchnera*, the obligate endosymbiont of aphids. *The ISME Journal*, 12(3), 898-908. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0024-6>

Jaenike, J., Dyer, K., Cornish, C., Minhas, M., & Noor, M. (2006). Asymmetrical reinforcement and *Wolbachia* infection in *Drosophila*. *PLoS Biology*, 4(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040325>

Jeyaprakash, A., & Hoy, M. (2000). Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology*, 9(4), 393-405. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2000.00203.x>

Jiggins, F., Hurst, G., Jiggins, C., v. d. Schulenburg, J., & Majerus, M. (2000). The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium. *Parasitology*, 120(5), 439-446. <https://doi.org/10.1017/S0031182099005867>

Kikuchi, Y. (2009). Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes and Environments*, 24(3), 195-204. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME09140S>

Kim, J., Han, S., Kim, C., Jo, Y., Futahashi, R., Kikuchi, Y., Fukatsu, T., & Lee, B. (2014). Molting-associated suppression of symbiont population and up-regulation of antimicrobial activity in the midgut symbiotic organ of the *Riptortus–Burkholderia* symbiosis, 43(1), 10-14. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.10.010>

Koga, R., Bennett, G., Cryan, J., & Moran, N. (2013). Evolutionary replacement of obligate symbionts in an ancient and diverse insect lineage. *Environmental Microbiology*, 15(7), 2073-2081. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12121>

Koga, R., Tsuchida, T., & Fukatsu, T. (2003). Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1533), 2543–2550. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2537>

* Koch, A. (1956). The experimental elimination of symbionts and its consequences. *Experimental Parasitology*, 5(5), 481-518. [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(56\)80008-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(56)80008-8)

Lederberg, J., & McCray, A. (2001). Ome SweetOmics--A genealogical treasury of words. *The scientist*, 15(7), 8-8.

Lehane, M. (2005). *The biology of blood-sucking in insects* (2 ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511610493>

Light, J., & Hafner, M. (2007). Phylogenetics and host associations of *Fahrenholzia* sucking lice (Phthiraptera: Anoplura). *Systematic Entomology*, 32(2), 359-370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.00367.x>

Light, J., Smith, V., Allen, J., Durden, L., & Reed, D. (2010). Evolutionary history of mammalian sucking lice (Phthiraptera: Anoplura). *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-292>

Lim, S., & Bordenstein, S. (2020). An introduction to phyllosymbiosis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1922). <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2900>

Malele, I., Nyingilili, H., Lyaruu, E., Tauzin, M., Bernard Ollivier, B., Cayol, J., Fardeau, M., & Geiger, A. (2018). Bacterial diversity obtained by culturable approaches in the gut of *Glossina pallidipes* population from a non sleeping sickness focus in Tanzania: preliminary results. *BMC Microbiology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1288-3>

Martinů, J., Hypša, V., & Štefka, J. (2018). Host specificity driving genetic structure and diversity in ectoparasite populations: coevolutionary patterns in *Apodemus* mice and their lice. *Ecology and Evolution*, 8(20), 10008-10022. <https://doi.org/10.1002/ece3.4424>

Martinů, J., Štefka, J., Poosakkannu, A., & Hypša, V. (2020). “Parasite turnover zone” at secondary contact: a new pattern in host–parasite population genetics. *Molecular Ecology*, 29(23), 4653-4664. <https://doi.org/10.1111/mec.15653>

Mayslich, C., Grange, P., & Dupin, N. (2021). *Cutibacterium acnes* as an opportunistic pathogen: an update of its virulence-associated factors. *Microorganisms*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020303>

McCoy, K., Chapuis, E., Tirard, C., Boulinier, T., Michalakis, Y., Bohec, C., Maho, Y., & Gauthier-Clerc, M. (2005). Recurrent evolution of host-specialized races in a globally distributed parasite. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1579), 2389-2395. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3230>

McCutcheon, J., Boyd, B., & Dale, C. (2019). The life of an insect endosymbiont from the cradle to the grave. *Current Biology*, 29(11), R485-R495. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.032>

McCutcheon, J., & Moran, N. (2012). Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 13-26. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2670>

McMeniman, C., & Barker, S. (2006). Transmission ratio distortion in the human body louse, *Pediculus humanus* (Insecta: Phthiraptera). *Heredity*, 96(1), 63-68. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800760>

Michalkova, V., Benoit, J., Weiss, B., Attardo, G., Aksoy, S., & Drake, H. (2014). Vitamin B6 generated by obligate symbionts is critical for maintaining proline homeostasis and fecundity in tsetse flies. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(18), 5844-5853. <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-14>

Michaux, J., Libois, R., & Filippucci, M. (2005). So close and so different: Comparative phylogeography of two small mammal species, the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Heredity*, 94(1), 52-63. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800561>

Michaux, J., Kinet, S., Filippucci, M., Libois, R., Besnard, A., & Catzeflis, F. (2001). Molecular identification of three sympatric species of wood mice (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. alpicola*) in western Europe (Muridae: Rodentia). *Molecular Ecology Notes*, 1(4), 260-263. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00100.x>

Michaux, J., Libois, R., Paradis, E., & Filippucci, M. (2004). Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(3), 788-798. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.02.018>

Moran, N. (1996). Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(7), 2873-2878. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.2873>

Moran, N., McCutcheon, J., & Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 165-190. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119>

Moran, N., & Wernegreen, J. (2000). Lifestyle evolution in symbiotic bacteria: insights from genomics. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(8), 321-326. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01902-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01902-9)

Moriyama, M., Nikoh, N., Hosokawa, T., Fukatsu, T., & McFall-Ngai, M. (2015). Riboflavin provisioning underlies *Wolbachia*'s fitness contribution to its insect host. *mBio*, 6(6), e01732-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.01732-15>

Nalepa, C. (2017). What kills the hindgut flagellates of lower termites during the host molting cycle?. *Microorganisms*, 5(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms5040082>

Nieberding, C., Morand, S., Libois, R., & Michaux, J. (2004). A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271(1557), 2559-2568. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2930>

Nikoh, N., Hosokawa, T., Moriyama, M., Oshima, K., Hattori, M., & Fukatsu, T. (2014). Evolutionary origin of insect–*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10257-10262. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409284111>

* Nogge, G. (1976). Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Westwood) caused by loss of symbionts. *Experientia*, 32(8), 995-996. <https://doi.org/10.1007/BF01933932>

Noh, S., Capodanno, B., Xu, S., Hamilton, M., Strassmann, J., Queller, D., & Maggie Sogin, E. (2022). Reduced and nonreduced genomes in *Paraburkholderia* symbionts of social amoebas. *mSystems*, 7(5), e00562-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.00562-22>

Nováková, E., Husník, F., Šochová, E., Hypša, V., & Goodrich-Blair, H. (2015). *Arsenophonus* and *Sodalis* symbionts in louse flies: an analogy to the *Wigglesworthia* and *Sodalis* system in tsetse flies. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6189-6199. <https://doi.org/10.1128/AEM.01487-15>

Nováková, E., Hypša, V., & Moran, N. (2009). *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-143>

Oliver, K., Russell, J., Moran, N., & Hunter, M. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1803-1807. <https://doi.org/10.1073/pnas.0335320100>

Oliver, K., Campos, J., Moran, N., & Hunter, M. (2008). Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1632), 293-299. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1192>

Oliver, K., & Martinez, A. (2014). How resident microbes modulate ecologically-important traits of insects. *Current Opinion in Insect Science*, 4, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.08.001>

* Oulhen, N., Schulz, B., & Carrier, T. (2016). English translation of Heinrich Anton de Bary's 1878 speech, 'Die Erscheinung der Symbiose' ('De la symbiose'). *Symbiosis*, 69(3), 131-139. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0409-8>

Park, R., Dzialo, M., Spaepen, S., Nsabimana, D., Gielens, K., Devriese, H., Crauwels, S., Tito, R., Raes, J., Lievens, B., & Verstrepen, K. (2019). Microbial communities of the house fly *Musca domestica* vary with geographical location and habitat. *Microbiome*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0748-9>

Perlman, S., Hunter, M., & Zchori-Fein, E. (2006). The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1598), 2097-2106. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3541>

Petersen, F., Meier, R., Kutty, S., & Wiegmann, B. (2007). The phylogeny and evolution of host choice in the Hippoboscoidea (Diptera) as reconstructed using four molecular markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(1), 111-122. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.04.023>

Polz, M., & Cavanaugh, C. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3724-3730. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.3724-3730.1998>

* Puchta, O. (1955). Experimentelle Untersuchungen über die Bedeutung der Symbiose der Kleiderlaus *Pediculus Vestimenti* Burm. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 17(1), 1-40. <https://doi.org/10.1007/BF00260226>

Rassi Jr., A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388-1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)

Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P., & Solignac, M. (1997). *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 250(1328), 91-98. <https://doi.org/10.1098/rspb.1992.0135>

Russell, J., Latorre, A., Sabater-Munoz, B., Moya, A., & Moran, N. (2003). Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Molecular Ecology*, 12(4), 1061-1075. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01780.x>

Říhová, J., Batani, G., Rodríguez-Ruano, S., Martinů, J., Vácha, F., Nováková, E., & Hypša, V. (2021). A new symbiotic lineage related to *Neisseria* and *Snodgrassella* arises from the dynamic and diverse microbiomes in sucking lice. *Molecular Ecology*, 30(9), 2178-2196. <https://doi.org/10.1111/mec.15866>

Řihová, J., Nováková, E., Husník, F., & Hypša, V. (2017). *Legionella* becoming a mutualist: adaptive processes shaping the genome of symbiont in the louse *Polyplax serrata*. *Genome Biology and Evolution*, 9(11), 2946-2957. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx217>

Sakamoto, J., & Rasgon, J. (2006). Geographic distribution of *Wolbachia* infections in *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae), 43(4), 696-700. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2006\)43\[696:GDOWII\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2006)43[696:GDOWII]2.0.CO;2)

Saldaña, M., Hegde, S., & Hughes, G. (2017). Microbial control of arthropod-borne disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(2), 81-93. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160373>

Sandstrom, J., Russell, J., White, J., & Moran, N. (2001). Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Molecular Ecology*, 10(1), 217-228. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01189.x>

Scarborough, C., Ferrari, J., & Godfray, H. (2005). Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310(5755), 1781-1781. <https://doi.org/10.1126/science.1120180>

Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., & Ishikawa, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 407(6800), 81-86. <https://doi.org/10.1038/35024074>

Snodgrass, R. (1945). The feeding apparatus of biting and sucking insects affecting man and animals. *Annals of the Entomological Society of America*, 38(1), 32-32. <https://doi.org/10.1093/aesa/38.1.32>

Sonenshine, D., & Stewart, P. (2021). Microbiomes of blood-feeding arthropods: genes coding for essential nutrients and relation to vector fitness and pathogenic infections. A review. *Microorganisms*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122433>

Song, S., Sanders, J., Baldassarre, D., Chaves, J., Johnson, N., Piaggio, A., Stuckey, M., Nováková, E., Metcalf, J., Chomel, B., Aguilar-Setién, A., Knight, R., & McKenzie, V. (2019). Is there convergence of gut microbes in blood-feeding vertebrates?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1777). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0249>

Stouthamer, R., Breeuwer, J., & Hurst, G. (1999). *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology*, 53(1), 71-102. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.71>

Stouthamer, R., Luck, R., & Hamilton, W. (1990). Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), 2424-2427. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2424>

Štefka, J., & Hypša, V. (2008). Host specificity and genealogy of the louse *Polyplax serrata* on field mice, *Apodemus* species: A case of parasite duplication or colonisation?. *International Journal for Parasitology*, 38(6), 731-741. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.011>

Taylor, M., Bandi, C., & Hoerauf, A. (2005). *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes, 245-284. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)60004-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60004-8)

Tsuchida, T., Koga, R., Shibao, H., Matsumoto, T., & Fukatsu, T. (2002). Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Molecular Ecology*, 11(10), 2123-2135. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01606.x>

Vautrin, E., & Vavre, F. (2009). Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict?. *Trends in Microbiology*, 17(3), 95-99. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.002>

Wang, Y., Gilbreath, T., Kukutla, P., Yan, G., Xu, J., & Leulier, F. (2011). Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024767>

Weeks, A., Turelli, M., Harcombe, W., Reynolds, K., Hoffmann, A., & Keller, L. (2007). From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biology*, 5(5), 997-1005. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050114>

Weiss, B., & Aksoy, S. (2011). Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in Parasitology*, 27(11), 514-522. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.05.001>

Wernegreen, J. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics*, 3(11), 850-861. <https://doi.org/10.1038/nrg931>

Werren, J., Baldo, L., & Clark, M. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 741-751. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>

* Whipps, J., Lewis, K., & Cooke, R. (1988). Mycoparasitism and plant disease control, 161-187.

Wu, D., Daugherty, S., Van Aken, S., Pai, G., Watkins, K., Khouri, H., Tallon, L., Zaborsky, J., Dunbar, H., Tran, P., Moran, N., Eisen, J., & Parkhill, J. (2006). Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biology*, 4(6), 453-465. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040188>

Xie, J., Vilchez, I., Mateos, M., & Raine, N. (2010). *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012149>

Zchori-Fein, E., Borad, C., & Harari, A. (2006). Oogenesis in the date stone beetle, *Coccotrypes dactyliperda*, depends on symbiotic bacteria. *Physiological Entomology*, 31(2), 164-169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2006.00504.x>

Zchori-Fein, E., & Perlman, S. (2004). Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Molecular Ecology*, 13(7), 2009-2016. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02203.x>

Zouache, K., Raharimalala, F., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L., Ravelonandro, P., & Mavingui, P. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(3), 377-389. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x>

Zytynska, S., & Weisser, W. (2016). The natural occurrence of secondary bacterial symbionts in aphids. *Ecological Entomology*, 41(1), 13-26. <https://doi.org/10.1111/een.12281>

* Zdroje označené hvězdičkou jsou citovány podle současné literatury, nikoliv na základě četby původní práce.

8 PŘÍLOHY

Tabulka P1. Dunn's Kruskal-Wallisův test vícenásobných porovnání genetických linií vší *P. serrata*

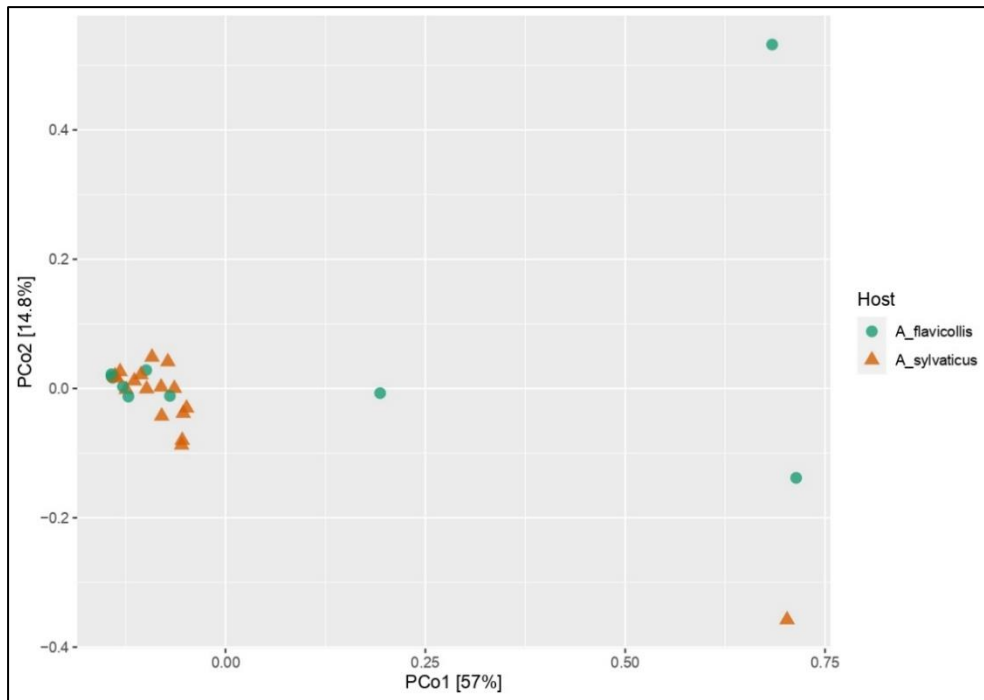
METODA	SKUPINA	POROVNÁNÍ	Z	P.unadjusted	P.adjusted	SIGNIF.	
1	Observed	Hybrid1	Hybrid - Hybrid1	-0.268200301375382	0.788545143025919	1	ns
2	Observed	N	Hybrid - N	-0.569162130247963	0.569246117758342	1	ns
3	Observed	Hybrid1	Hybrid1 - N	0.00262058849709982	0.997909075291179	0.997909075291179	ns
4	Observed	SE	Hybrid - SE	-3.19614193141018	0.00139278580669275	0.0125350722602347	*
5	Observed	SE	Hybrid1 - SE	-1.55861668722656	0.119087131046689	0.714522786280135	ns
6	Observed	SE	N - SE	-2.84259199306264	0.00447483150288951	0.0313238205202266	*
7	Observed	SW	Hybrid - SW	-3.32976039389629	0.000869207471529454	0.00869207471529454	**
8	Observed	SW	Hybrid1 - SW	-1.45344762784146	0.146099510783548	0.73049755391774	ns
9	Observed	SW	N - SW	-2.9448936364474	0.00323065702362931	0.0258452561890345	*
10	Observed	SW	SE - SW	0.271359941022385	0.786114208917852	1	ns
11	Chao1	Hybrid1	Hybrid - Hybrid1	0.00741599398013567	0.994082947136952	0.994082947136952	ns
12	Chao1	N	Hybrid - N	-0.650034574381284	0.515669888723668	1	ns
13	Chao1	Hybrid1	Hybrid1 - N	-0.314277047633103	0.75331062906365	1	ns
14	Chao1	SE	Hybrid - SE	-2.81807771245157	0.00483121151182262	0.0434809036064036	*
15	Chao1	SE	Hybrid1 - SE	-1.60470734187006	0.108558225444368	0.542791127221839	ns
16	Chao1	SE	N - SE	-2.38735259304836	0.0169702067091986	0.11879144696439	ns
17	Chao1	SW	Hybrid - SW	-3.09930701613246	0.00193973899868837	0.0193973899868837	*
18	Chao1	SW	Hybrid1 - SW	-1.60548873069024	0.108386291267744	0.650317747606466	ns
19	Chao1	SW	N - SW	-2.62951364210103	0.00855071010645471	0.0684056808516377	ns
20	Chao1	SW	SE - SW	0.102886782218075	0.918052828286499	1	ns
21	ACE	Hybrid1	Hybrid - Hybrid1	0.0508513380930982	0.959443981880074	1	ns
22	ACE	N	Hybrid - N	-0.212889530508804	0.831413128650363	1	ns
23	ACE	N	Hybrid1 - N	-0.151897012254888	0.879268164826008	1	ns
24	ACE	SE	Hybrid - SE	-2.46840870326914	0.0135715266664344	0.108572213331475	ns
25	ACE	SE	Hybrid1 - SE	-1.4475061900642	0.147755204017221	0.738776020086107	ns
26	ACE	SE	N - SE	-2.37737234612575	0.0174364770958194	0.122055339670735	ns
27	ACE	SW	Hybrid - SW	-2.76429756211759	0.00570454917622938	0.0570454917622938	ns
28	ACE	SW	Hybrid1 - SW	-1.47542505230436	0.14009830417764	0.840589825065838	ns
29	ACE	SW	N - SW	-2.68562328673499	0.00723946608101144	0.0651551947291029	ns
30	ACE	SW	SE - SW	0.0487660021568126	0.961105776272085	0.961105776272085	ns
31	Shannon	Hybrid1	Hybrid - Hybrid1	-1.25539240917336	0.209336343588751	1	ns
32	Shannon	Hybrid	Hybrid - N	1.09446406739064	0.273751498447427	1	ns
33	Shannon	Hybrid1	Hybrid1 - N	1.78609935099713	0.0740831732365675	0.444499039419405	ns
34	Shannon	SE	Hybrid - SE	-1.92281622164528	0.0545031341246681	0.436025072997345	ns
35	Shannon	Hybrid1	Hybrid1 - SE	0.0960999960208595	0.923441154468632	0.923441154468632	ns
36	Shannon	SE	N - SE	-2.86386479589522	0.00418506604671197	0.0376655944204078	*
37	Shannon	SW	Hybrid - SW	-1.86745082792708	0.0618386574722372	0.432870602305661	ns
38	Shannon	Hybrid1	Hybrid1 - SW	0.270831447957238	0.786520671502573	1	ns
39	Shannon	SW	N - SW	-2.96299739099131	0.00304659151351945	0.0304659151351945	*
40	Shannon	SE	SE - SW	0.27653891466973	0.782134174893043	1	ns
41	Simpson	Hybrid1	Hybrid - Hybrid1	-1.35497627960568	0.175425114581634	0.701700458326536	ns
42	Simpson	Hybrid	Hybrid - N	1.44709388214338	0.14787063126114	0.887223787566839	ns
43	Simpson	Hybrid1	Hybrid1 - N	2.05322857944538	0.040050413861977	0.320403310895816	ns

POKRAČOVÁNÍ TABULKY IV

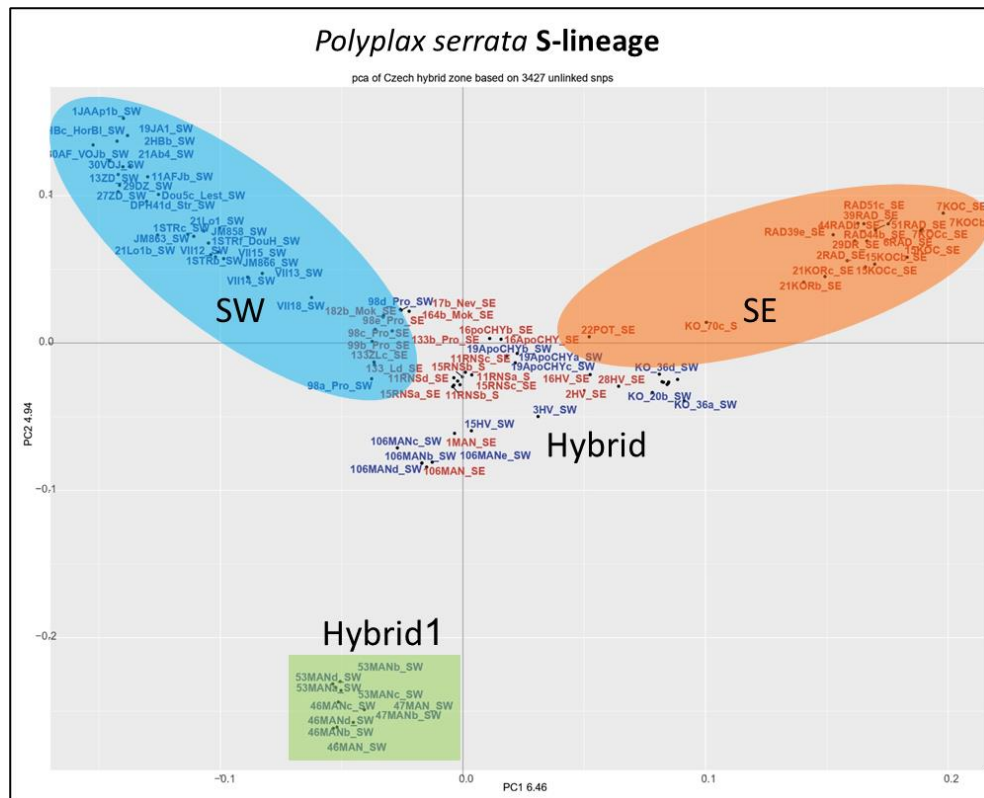
44	Simpson	SE	Hybrid - SE	-1.44608492702248	0.14815338286336	0.7407669143168	ns
45	Simpson	Hybrid1	Hybrid1 - SE	0.460479147599952	0.645172335569534	1	ns
46	Simpson	SE	N - SE	-2.65484722380442	0.00793443344168768	0.0714099009751891	ns
47	Simpson	SW	Hybrid - SW	-1.4876182420522	0.136851599838452	0.957961198869162	ns
48	Simpson	Hybrid1	Hybrid1 - SW	0.56456903827902	0.572366929633437	1	ns
49	Simpson	SW	N - SW	-2.89395667508471	0.00380420648268074	0.0380420648268074	*
50	Simpson	SE	SE - SW	0.138566811006554	0.889792471224462	0.889792471224462	ns
51	InvSimpson	Hybrid1	Hybrid - Hybrid1	-1.35497627960568	0.175425114581634	0.701700458326536	ns
52	InvSimpson	Hybrid	Hybrid - N	1.44709388214338	0.14787063126114	0.887223787566839	ns
53	InvSimpson	Hybrid1	Hybrid1 - N	2.05322857944538	0.040050413861977	0.320403310895816	ns
54	InvSimpson	SE	Hybrid - SE	-1.44608492702248	0.14815338286336	0.7407669143168	ns
55	InvSimpson	Hybrid1	Hybrid1 - SE	0.460479147599952	0.645172335569534	1	ns
56	InvSimpson	SE	N - SE	-2.65484722380442	0.00793443344168768	0.0714099009751891	ns
57	InvSimpson	SW	Hybrid - SW	-1.4876182420522	0.136851599838452	0.957961198869162	ns
58	InvSimpson	Hybrid1	Hybrid1 - SW	0.56456903827902	0.572366929633437	1	ns
59	InvSimpson	SW	N - SW	-2.89395667508471	0.00380420648268074	0.0380420648268074	*
60	InvSimpson	SE	SE - SW	0.138566811006554	0.889792471224462	0.889792471224462	ns
61	Fisher	Hybrid1	Hybrid - Hybrid1	-0.268200301375382	0.788545143025919	1	ns
62	Fisher	Hybrid	Hybrid - N	-0.569162130247963	0.569246117758342	1	ns
63	Fisher	Hybrid1	Hybrid1 - N	0.00262058849709982	0.997909075291179	0.997909075291179	ns
64	Fisher	SE	Hybrid - SE	-3.19614193141018	0.00139278580669275	0.0125350722602347	*
65	Fisher	SE	Hybrid1 - SE	-1.55861668722656	0.119087131046689	0.714522786280135	ns
66	Fisher	SE	N - SE	-2.84259199306264	0.00447483150288951	0.0313238205202266	*
67	Fisher	SW	Hybrid - SW	-3.32976039389629	0.000869207471529454	0.00869207471529454	**
68	Fisher	SW	Hybrid1 - SW	-1.45344762784146	0.146099510783548	0.73049755391774	ns
69	Fisher	SW	N - SW	-2.9448936364474	0.00323065702362931	0.0258452561890345	*
70	Fisher	SW	SE - SW	0.271359941022385	0.786114208917852	1	ns

Tabulka P2 Indexy alfa-diverzity pro všechny genetické linie vši *P. serrata*

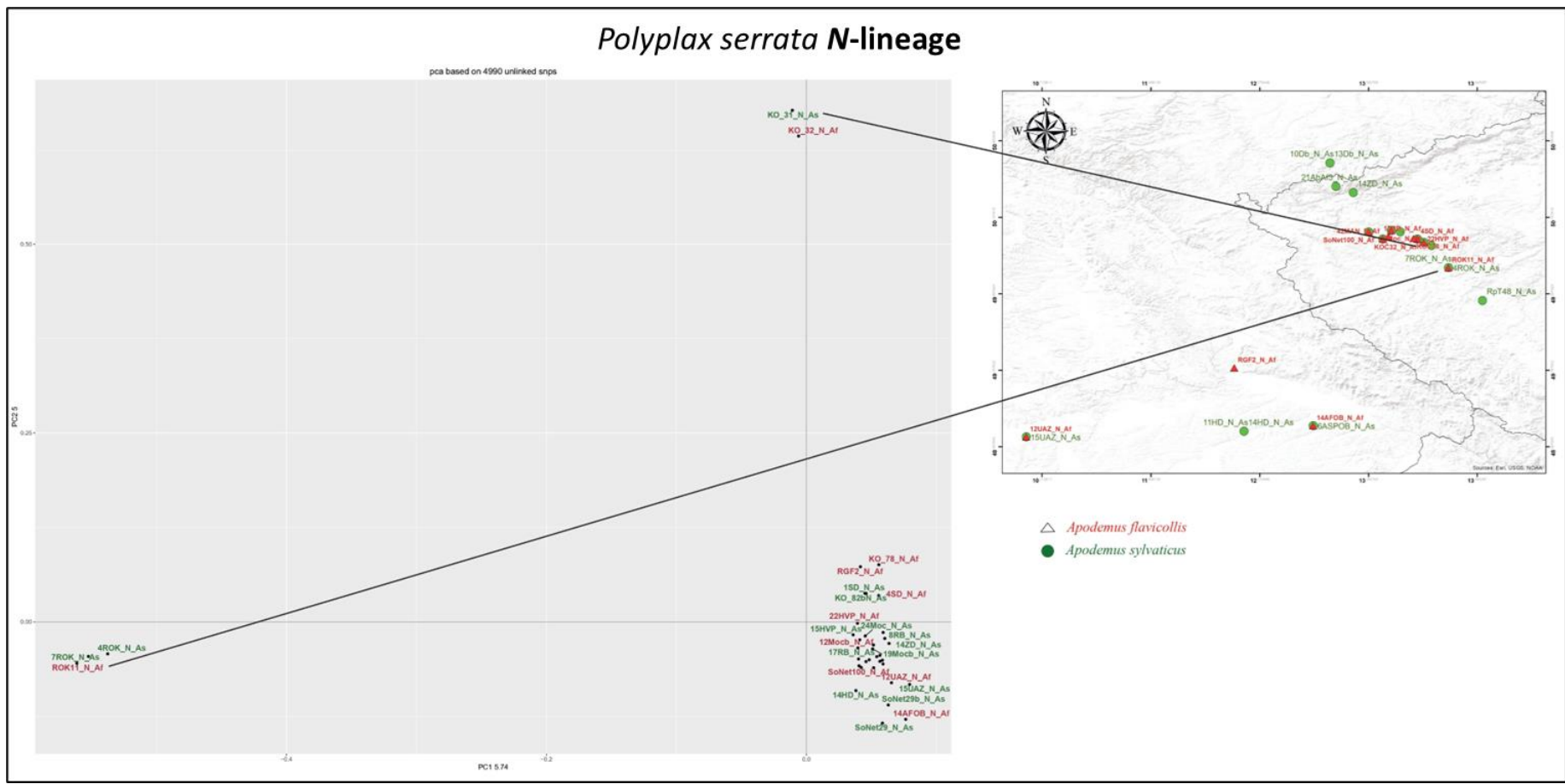
METODA	HYBRID	HYBRID1	N	SE	SW
Observed	323	97	560	396	412
Chao1	422	112.12	645.0862	499.9577	512.5634
se.chao1	26.21237	7.60044	18.80974	24.72421	24.10233
ACE	413.9587	122.7675	661.9120	507.5163	525.5332
se.ACE	10.21786	5.379158	11.718150	11.223300	11.363695
Shannon	1.50086	2.097740	1.705323	2.228019	2.234151
Simpson	0.451141	0.7460411	0.4369869	0.5667747	0.6100434
InvSimpson	1.82196	3.937645	1.776158	2.308268	2.564388
Fisher	53.66871	19.17283	99.95401	80.38884	76.10934



Graf P3 PCoA analýza nespecifické (N) linie *P. serrata* na rozdílných hostitelích



Graf P4 PCA analýza specifické (S) linie a její rozdělení na SW, SE, H a H1 linii; ©Jana Martinů



Obr. P5 PCA analýza nescifické (N) linie a mapa daného transektu; poskytnuto Janou Martinů