

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Mikrobiomy komářích hostitelů:
metodologická revize dosavadní praxe s využitím amplikonového
sekvenování na Illumina platformách.**

Bakalářská práce

Eliška Juhaňáková

Školitel: RNDr. Eva Nováková, PhD.

České Budějovice 2017

Juhaňáková, E., 2017: Mikrobiomy komářích hostitelů: metodologická revize dosavadní praxe s využitím amplikonového sekvenování na Illumina platformách. [Mosquito host microbiome: methodological revision existing studies by using amplicon sequencing on Illumina platforms. Bc. Thesis, in Czech.] – 38 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation:

Representatives of the order Diptera from the mosquito family (Culicidae) are important vectors of human pathogens causing fatal diseases. Their vectorial capacity is closely related to their microbiome composition. Bacterial communities are either inherited from their parents or are obtained from the environment. This thesis deals with the methodological revisions of common approaches used for mosquito microbiome studies with the use of amplicon sequencing on Illumina platforms. This thesis evaluates effects of using different preservative approaches on the profile of mosquito microbiome. Furthermore, it determines the biological template suitable for realistic description of mosquito intestinal microbiome and assesses effects of sample pooling (classical epidemiological approach) on the resulting microbiome profile.

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

V Českých Budějovicích, 18. dubna 2017

Eliška Juhaňáková

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé školitelce Evě Novákové, za cenné rady, věcné připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Sonie Marii Rodriguez Ruano za cenné a užitečné rady při laboratorní práci a provádění bioinformatických analýz. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Václavu Hypšovi, Jakubu Vávrovi a ostatním členům laboratoře za užitečné rady a podporu při zpracování mé bakalářské práce.

1	Úvod.....	- 1 -
1.1	Symbióza	- 1 -
1.2	Vztah vektor symbiont.....	- 2 -
1.3	Komáři jako vektoři	- 2 -
1.4	Mikrobiom jako faktor ovlivňující vektorovou kapacitu.....	- 3 -
1.5	Mikrobiom, jeho přenos a zisk.....	- 4 -
1.6	Vývoj mikrobiomu napříč vývojovými stádii.....	- 5 -
1.6.1	Pozitivní vlivy mikrobiomu na hostitele	- 5 -
1.7	Symbiotické bakterie	- 6 -
1.7.1	<i>Asaia</i>	- 6 -
1.7.2	<i>Wolbachia</i>	- 6 -
1.8	Dosavadní praktiky v přístupu studie mikrobiomu u komaru	- 7 -
2	Cíle	- 9 -
3	Materiál a metodika.....	- 10 -
3.1	Sběr vzorků	- 10 -
3.1.1	Pitvání komárů.....	- 11 -
3.2	Molekulární metody.....	- 12 -
3.2.1	Prezervace vzorků.....	- 12 -
3.2.1.1	NAP pufr	- 12 -
3.2.1.1.1	Výroba NAP pufru	- 12 -
3.2.1.2	Allprotect Tissue Reagent (Qiagen).....	- 12 -
3.2.1.3	Ethanol	- 13 -
3.2.2	Izolace DNA a RNA.....	- 13 -
3.2.3	PCR (polymerázová řetězová reakce)	- 15 -
3.2.4	Gelová elektroforéza.....	- 15 -
3.2.5	Amplikonová sekvenace na Illumina platformách	- 16 -
3.3	Analýza dat	- 16 -
3.3.1	Amplikonová data	- 16 -

3.3.2	Převzatá amplitudová data.....	- 18 -
4	Výsledky.....	- 19 -
5	Diskuze.....	- 25 -
6	Závěr.....	- 29 -
7	Použitá literatura	- 30 -

1 Úvod

1.1 Symbióza

V přírodě můžeme nalézt mnoho podob vzájemných vztahů mezi organismy. Některé z nich jsou prospěšné pouze pro jeden organismus a jiné mohou být prospěšné pro oba partnery. Pro vysvětlení symbiózy existují dvě definice. První z nich považuje symbiózu za mutualismus a je založena na faktu, že z tohoto vztahu profitují oba organismy (Heiko et al., 2008). Druhá definice je založena na škole Antona de Bary z roku 1879, který zavedl pojem symbióza a rozdělil jí na několik typů, mezi něž patří vztahy parazitické, komenzální i mutualistické (de Bary, 1879).

Jedním z několika druhů symbiózy je mutualistická symbióza. Pokud se organismus účastní mutualistické symbiózy, je označován jako primární symbiont nebo hostitel. Jedná se o vztah, který se buduje po velmi dlouhou dobu. Symbiont je přenášen vertikálně, což znamená, že se přenáší v populaci hostitele z generace na generaci. Pro hostitele je primární symbiont nepostradatelnou součástí jeho života, jelikož v prostředí, ve kterém je zdroj limitovaný, by bez pomoci primárního symbionta zemřel. Primární symbiont poskytuje hostiteli živiny, které si nemůže sám obstarat v dostatečném množství. Modelovým příkladem takového vztahu je *Buchnera aphidicola* zásobující svého hostitele mšice (Aphidoidea) esenciálními aminokyselinami (Douglas, 1998). Primární symbiont může také ovlivňovat rozmnožování hostitele. Primární symbiont je však na hostiteli také závislý. Došlo u něj k významné redukci a ztrátě genů a k přizpůsobení se prostředí v hostiteli natolik, že by bez hostitelské buňky nemohl existovat (Weiss & Aksoy, 2011).

Dalším druhem symbiózy je symbióza komenzální. Na rozdíl od obligátní může být komenzální symbióza přechodná. Hostitel a v tomto případě symbiont sekundární bez sebe mohou existovat. Tato symbióza je zřejmě novodobější. Může být přenášena vertikálně (z generace na generaci) i horizontálně, což znamená přenos mezi jedinci v rámci jedné generace, případně z prostředí (Weiss & Aksoy, 2011). Za komenzální symbiózu je považován vztah, ze kterého symbiont těží, ale neomezuje přítom hostitele (Leung & Poulin, 2008). Mezi komenzální symbionty patří i některé intracelulární bakterie. Například symbiotickou bakterii *Sodalis glossinidius* můžeme najít u mouchy tse-tse (Dale et al., 1999). Střevní bakteriální komunity (mikrobiomy) jsou také druhem komenzální symbiózy. Tyto bakterie jsou ovlivňovány exogenními faktory, mezi které patří například strava a prostředí, a endogenními faktory neboli vnitřní prostředí střev. Komenzální střevní mikrobiom je zapojen do řady biologických aspektů života hmyzího hostitele, v některých

případech může ovlivňovat i jeho chování (Wada-Katsumata et al., 2015). Například u *Drosophila melanogaster* ovlivňují komenzální bakterie výběr partnera změnou hladiny pohlavních feromonů (Sharon et al., 2010). Vztah mezi hostitelem a komenzálními symbionty ovlivňuje i vztah mezi hostitelem a parazitem nebo hostitelem a patogenem (Weiss & Aksoy, 2011).

1.2 Vztah vektor symbiont

Hmyz často figuruje jako přenašeč (vektor) široké škály patogenů infikujících rostliny a zvířata (Gray & Banerjee, 1999). V nedávných studiích bylo zjištěno, že symbiotické bakterie hmyzu hrají velkou roli v jejich reakci na patogeny a parazitoidy (Currie et al., 2003). Některé mikroorganismy, které jsou přenašečům nemocí vrozené, mohou inhibovat výskyt patogenů v jejich těle (viz kapitola 1.3.1) (Favia et al., 2007). Proto by mohl být vztah vektora a jeho symbiontů stěžejní pro epidemiologii malárie, žluté zimnice, Západonilského viru nebo horečky dengue a dalších.

1.3 Komáři jako vektoři

Komárovití (Culicidae) jsou řazeni do řádu dvoukřídlého hmyzu (Diptera). Čeleď komárovitých obsahuje přes 3,500 druhů a je kosmopolitně rozšířena (Fang, 2010). Mezi hlavní rody komárů, přenášející lidské patogeny, patří *Aedes*, *Anopheles* a *Culex* (Minard et al., 2013). Velmi nebezpečnými RNA viry je rodina virů Flaviviridae, která se podle klinických projevů u lidí rozděluje na dvě hlavní skupiny. První skupinou jsou viscerotropní flaviviry, které způsobují smrtelné hemoragické horečky. Mezi tyto viry patří například virus Dengue nebo virus žluté horečky (Gaunt et al., 2001). Přenašečem viru žluté horečky je komár *Aedes aegypti* (podčeď Culicinae) (Ryšavý et al., 1989). Nebezpečný virus Dengue je přenášen komáry *Aedes aegypti* a *Aedes albopictus* (podčeď Culicinae) v Latinské Americe, ve Spojených státech amerických, Evropě, Africe a Asii (Clyde et al., 2006). Druhou skupinou jsou encefalitické flaviviry způsobující invazivní neurologické onemocnění. Mezi tyto viry patří například virus Japonské encefalitidy nebo Západonilský virus (Gaunt et al., 2001). Virus Japonské encefalitidy je rozšířen v Asii a v západním Pacifiku a jeho primárním vektorem je komár *Culex tritaeniorhynchus* (podčeď Culicinae) (Yun & Lee, 2014). Do životního cyklu Západonilského viru patří kromě komára a člověka i ptáci, ve kterých virus přežívá a dále se množí. Nejvýznamnějším přenašečem Západonilského viru je komár rodu *Culex* sp. (podčeď Culicinae). Mezi další rody šířící tento virus patří například *Anopheles* (podčeď Anophelinae) přenášející tento virus mezi

lidmi ve Spojených státech amerických, Izraeli nebo na Madagaskaru, rod *Aedes* (podčeleď Culicinae) šířící virus v Rusku, Africe nebo Spojených státech amerických, dále rod *Mansonia* (podčeleď Culicinae) šířící virus v Africe nebo *Ochlerotatus* (podčeleď Culicinae) šířící virus ve Spojených státech amerických (Khan et al., 2017). Do rodiny Flaviviridea patří také virus Zika přenášený komáry rodu *Aedes* (podčeleď Culicinae) rozšířený v Africe, Asii a v Severní, Jižní a Centrální Americe (Song et al., 2017). Další skupinou virů přenášenou komáry jsou alphaviry. Jedním z nejvýznamějších virů je virus Chikunguny a přenášený komáry rodu *Aedes* (podčeleď Culicinae). Tento virus je rozšířen v Africe, Asii, Evropě, Americe a na ostrovech Indického oceánu (Coffey et al., 2014).

Významnými parazity v kontextu smrtelných nemocí světového měřítka jsou jednobuněčná eukaryota z rodu *Plasmodium* (kmen Apicomplexa). Tito parazité způsobující malárii jsou přenášeni výhradně komáry rodu *Anopheles* (podčeleď Anophelinae) (Wang et al., 2012).

Ve většině případů se patogeny dostávají do těla komára při sání krve, čímž se dostávají do střeva jedince, kde se odehrává imunitní odpověď (Janeh et al., 2017). Trávicí soustava komára je tvořena třemi hlavními částmi. Těmito částmi jsou stomodeum, mesenteron a proctodeum. Stomodeum slouží k nasávání potravy pomocí speciální hltanové pumpy. Mesenteron je část trávicího traktu obstarávající trávení potravy pomocí enzymů a vstřebávající potravu natrávenou žaludkem, který je krytý peritrofickou membránou (Kramář, 1958). Peritrofická membrána tvoří fyzickou bariéru bránící průniku patogenu do hemolymfy jedince (Osta et al., 2004). Peritrofická membrána pokrývá i střevo komára (Lehane, 2005), které je součástí třetí části trávicího traktu komára a to proctodea (Kramář, 1958) a je tvořena z chitinu, proteinů a proteoglykanů (Wang & Granados, 2001).

1.4 Mikrobiom jako faktor ovlivňující vektorovou kapacitu

Mikrobiom může ovlivňovat vektorovou kapacitu, tedy schopnost přenášet patogeny, pomocí různých mechanismů (Azambuja et al., 2005). Mezi tyto mechanismy patří například produkce antipatogenních látek symbiontem, vyvolání produkce antipatogenních látek hostitelem nebo imunitní odpověď zprostředkovaná mikrobiálními symbionty jako například *Wolbachia* nebo *Asaia* (Dennison et al., 2014). Například jeden druh bakterie *Wolbachia*, konkrétně druh wMel, inhibuje výskyt viru žluté zimnice u octomilky (*Drosophila melanogaster*) (Van den Hurket al., 2012). Dalším příkladem působení bakterie *Wolbachia* může být zamezení přenosu parazita *Plasmodium* komárem druhu *Aedes aegypti* (Sinkins, 2013). V některých případech se mohou symbiotické bakterie inhibovat mezi sebou.

Například bakterie *Asaia* dokáže inhibovat výskyt bakterie *Wolbachia* u komárů. To naznačuje, že interakce mezi bakteriálními endosymbionty a rovnováha v jejich zastoupení může být pro hostitele zásadní, a může přímo ovlivňovat jeho vektorovou kapacitu (Hughes et al., 2014). Význam v přenosu patogenů nebo v jejich inhibici může hrát i hustota zastoupení symbionta v komárovi, konkrétně *Wolbachia*. Se zvyšující se hustotou buněk bakterie *Wolbachia* se zvyšuje i resistance vůči viru Dengue (Lu et al., 2012). Bylo zjištěno, že výskyt bakterie *Wolbachia* v komářích mikrobiomech může být negativně ovlivněn zvyšující se teplotou. V kontextu s globálním oteplováním může být tato informace znepokojující s ohledem na šíření nebezpečných patogenů jako je například Západonilský virus (Nováková et al., 2017).

1.5 Mikrobiom, jeho přenos a zisk

Ledenberg a McCray (2001) označili mikrobiom jako ekologickou komunitu skládající se z komenzálních, symbiotických a parazitických mikroorganismů, které se nacházejí v tělech živočichů. Tyto mikroorganismy mohou být předávány z matky na potomka neboli vertikálně (Stevens et al., 1975) nebo z jedince na jedince tedy horizontálně (Lohe et al., 1995). Mezi bakterie děděné z předchozí generace patří například *Wolbachia* nebo *Asaia* (Rossi et al., 2015). K přenosu bakterií může docházet i mezi jednotlivými stádii, obzvláště pokud vývoj jednotlivých stádií probíhá v různých prostředích (Gendrin & Christophides, 2013). Pokud nejsou bakterie děděny nebo přenášeny mezi jedinci, musí dojít k jejich přenosu z prostředí. V případě komárů dochází k přenosu symbiotických bakterií z vody, ve které probíhal jejich vývoj (Dennison et al., 2014). Komáři patří mezi hmyz s proměnou dokonalou. Jejich životní cyklus tedy prochází od vajíčka, přes larvu a kuklu až k dospělci (Kramář, 1958). Složení bakteriálních komunit může záviset na pohlaví jedince, na vývojovém stádiu nebo na ekologických podmínkách prostředí (Minard et al., 2013). Každý komářský druh má své vlastní ekologické priority a požadavky na vodní prostředí a tedy i různé složení bakteriálních komunit ve střevě, což může ovlivňovat jejich schopnost přenášet lidské patogeny (Minard et al., 2013). Většině komárů vyhovuje teplé vlhké prostředí, ve kterém se za vhodných podmínek rychle a až nekontrolovatelně množí (Rozkošný, 1980). Zisk bakterií z prostředí probíhá prostřednictvím potravy. Potrava komárů se liší jak mezi samcem a samicí, tak i mezi jednotlivými vývojovými stádii (Kramář, 1958).

1.6 Vývoj mikrobiomu napříč vývojovými stádii

Po ukončení vývoje uvnitř samičky jsou vajíčka kladena na vodní hladinu. Larvy se živí filtrací nebo seškrabáváním organického materiálu z povrchu předmětů plovoucích ve vodě (Kramář, 1958). Larva komára prochází během svého vývoje v dospělce čtyřmi larválními instary. Rychlost vývoje závisí především na teplotě a částečně i světle (Kramář, 1958). Komáří larvy obsahují velké množství fotosyntetizujících cyanobakterií, které u dospělých jedinců nenajdeme. Podle studie prováděné na komárech *An. gambiae* mohou tvořit cyanobakterie až 40% mikrobiálních komunit (Wang et al., 2011). Ve většině případů dochází k přenosu bakterií pouze mezi larvou a kuklou, nikoli mezi kuklou a dospělcem (Lindh et al., 2008). Tento jev je připisován meconiální peritrofické membráně, kterou je možné pozorovat pouze u larvy a kukly (Moncayo et al., 2005). Meconiální peritrofická membrána je tvořena z peritrofické membrány obohacené o meconium. Tato membrána se účastní sterilizace střev během metamorfózy z kukly na dospělce odstraněním nebo skrytím bakterií získaných během stádia larvy a kukly potřebných pro přežití dospělého jedince (Moncayo et al., 2005). Některé bakterie jsou během sterilizace střev ukryty v malpighických trubicích (Chavshin et al., 2015).

Kukla komára se živí stejně jako jeho larva a jejich vývoj probíhá také ve vodě (Kramář, 1958). V bakteriálních komunitách kukel se vyskytují například zástupci Comamonadaceae, Erythrobacteraceae, Proteobacteria nebo již zmíněné Cyanobacteria (Wang et al., 2011). Složení bakteriálních komunit po metamorfóze jedince je ovlivňováno typem přijímané potravy. Dospělý samec saje rostlinný nektar. Samice mohou také sát rostlinný nektar, pro vývin vajíček však potřebují krev obratlovců (Foster, 1995). Po sání krve dochází k velkým změnám bakteriální komunity ve střevě jedince. Ve střevě dospělého komára nalezneme především bakterie ze skupin Enterobacteriaceae nebo Propionibacteriaceae (Wang et al., 2011). Mezi významné bakteriální rody, které se vyskytují u většiny druhů komárů, patří například *Pantoea*, *Asaia* nebo *Acinetobacter* (Minard et al., 2013). Střevo dospělého je pokryto peritrofickou membránou, která tvoří podobně jako meconiální peritrofická membrána fyzickou bariéru mezi patogenem a hemolymfou jedince (Shen & Jacobs-Lorena, 1998).

1.6.1 Pozitivní vlivy mikrobiomu na hostitele

Jednou z významných rolí mikrobiomu je poskytnutí výhody v oblasti výživy. Tato výhoda se často objevuje i u sociálního hmyzu jako jsou termiti, včely nebo mravenci (Engel & Moran, 2013). Může se projevat při trávení potravy a to dvěma způsoby. Prvním

způsobem je produkce látek, které pomáhají při zpracování potravy. Druhým způsobem je přímé zpracování potravy symbiotickou bakterií (Minard et al., 2013).

Další výhoda zprostředkovaná bakteriálním společenstvem střeva může být imunitní odpověď. Jako příklad může sloužit studie, ve které byla po odstranění mikrobiomu jedince antibiotiky prokázána větší citlivost k viru Dengue a jednobuněčnému parazitovi *Plasmodium falciparum* (Dong et al., 2009). Mikrobiom může snižovat citlivost komárů k lidským patogenům přes aktivaci imunitní odpovědi nebo produkci antiparazitálních molekul (Cirimotich et al., 2011).

1.7 Symbiotické bakterie

1.7.1 *Asaia*

Asaia, α -proteobacterium z rodiny *Acetobacteriaceae* (Damiani et al., 2010), je součástí bakteriálních komunit u velkého množství druhů komárů (Favia et al., 2007). Tyto bakterie jsou přenášeny vertikálně maternální dědičností, ale i horizontálně paternální dědičností (Damiani et al., 2008). Z výsledků studie Rossi et al. (2015) vyplývá, že bakterie rodu *Asaia* je přítomna ve slinných žlázách jedince, v reprodukčních orgánech nebo ve střevě. Byla však zjištěna podmínka výskytu této bakterie v reprodukčních orgánech a střevech. Pokud najdeme bakterii rodu *Asaia* ve střevech, nenajdeme ji v reprodukčních orgánech a naopak (Rossi et al., 2015). Přirozeným a pravděpodobně i původním prostředím endosymbiotické bakterie rodu *Asaia* jsou květiny. Komáři pravděpodobně získali tuto bakterii z prostředí, ve kterém probíhal jejich vývoj a kde se zároveň vyskytovaly květiny obsahující tuto bakterii rodu *Asaia* (Favia et al., 2007). *Asaia* se může vyskytovat u komára *Anopheles stephensi*, kterému poskytuje tato symbiotická bakterie vitamíny (Minard et al., 2013). *Asaia* by mohla být využita pro paratransgenezi (Minard et al., 2013). Mezi hlavní důvody patří dominance v rámci komářích mikrobiomů, možnost poměrně snadné kultivace v bezbuněčném médiu, snadná transformace s cizí DNA a široká distribuce u larev a dospělých komárů (Favia et al., 2008).

1.7.2 *Wolbachia*

Jedním z nejvýznamnějších zástupců symbiotických bakterií u komárů je *Wolbachia* (čleď Rickettsiaceae). *Wolbachia* může představovat jak klasického reprodukčního manipulátora, například u řádů hmyzu Isoptera, Coleoptera, Orthoptera, Hemiptera nebo Diptera (Mohanty et al., 2016), tak i nutričního symbionta například u štěnice *Cimex*

lectularius (Hosokawa et al., 2010). Bakterii rodu *Wolbachia pipientis* (čeleď Rickettsiaceae) se vyskytuje zhruba u 40 % druhů hmyzu (Zug & Hammerstein, 2012). U této endosymbiotické bakterie dochází k maternální dědičnosti, což společně s cytoplazmatickou inkompatibilitou poskytuje bakterii rodu *Wolbachia* velmi dobrou životní strategii, díky níž může docházet k téměř nekontrolovatelnému šíření této bakterie populací hostitele (Sinkins, 2013). *Wolbachia* se může vyskytovat v hlavě, svalech, malpighických trubicích, vaječnicích a varlatech u druhů komárů jako je *Culex pipiens* nebo *Aedes albopictus*. U jiných druhů komárů můžeme najít tuto bakterii například v hemolymfě (Minard et al., 2013). U komárů, kteří jsou infikováni tímto rodem bakterie, často dochází k neobvyklým reprodukčním jevům, které mohou končit smrtí embrya. K zániku embrya dojde při spojení neinfekční samice s infekčním samcem. Reprodukční výhoda se projevuje u infekčních samic, které se mohou rozmnožovat jak s infekčním, tak i s neinfekčním samcem (Weiss & Aksoy, 2011).

Důvodem proč je *Wolbachia* označována za symbionta je fakt, že svého hostitele chrání před virovými infekcemi pomocí imunitních odpovědí, kterými mohou být například imunitní dráhy nazývané Toll, Imd nebo JAK/STAT. Všechny tyto dráhy byly sledovány převážně na octomilkách (*Drosophila melanogaster*) (Dennison et al., 2014).

1.8 Dosavadní praktiky v přístupu studie mikrobiomu u komárů

Ukazuje se, že mikrobiom komárů má výrazný vliv na vektorovou kapacitu komárů (viz kapitola 1.3.1). Proto se stal mikrobiom cílem mnoha studií. Komáří mikrobiom je zkoumán na kultivaci závislými (angl. „culture-dependent“) a na kultivaci nezávislými (angl. „culture-independent“) přístupy (Minard et al., 2013). Výsledky „culture-dependent“ metod bývají často zkreslené v závislosti na podmínkách a použitých technikách kultivace. Výrazně lepších výsledků bývá dosaženo za použití „culture-independent“ ekologických metod založených na analýze genů 16S rRNA. Tyto výsledky mohou být použity pro lepší porozumění vztahu uvnitř bakteriálních komunit nebo vztahů mezi bakteriální komunitou a hostitelem, případně přenášeným patogenem (Yun et al., 2014). Mezi metody používané pro identifikaci bakteriálních komunit patří například elektroforéza na gradientovém denaturačním gelu (z angl. „denaturing gradient gel electrophoresis“, DGGE). Tato elektroforéza dokáže rozdělit DNA fragmenty o stejné délce na základě různé komplementarity párů bází (Muyzer et al., 1993). Dalším typem elektroforetické separace je například elektroforéza v pulzním poli (z angl. „pulsed field gradient electrophoresis“, PFGE). Tato elektroforéza rozděluje fragmenty DNA o velikosti větší než 2000 kb za použití 1,5% agarózy (Schwartz & Cantor, 1984). Elektroforéza v pulzním poli byla například

použita při zjišťování diverzity bakterií u komára *Aedes albopictus* (Moro et al., 2013). Dalším typem elektroforézy je polymorfismus konformace jednovláknové DNA (z angl. „single-strand conformation polymorfism“, SSCP) sloužící k detekci mutace v rámci jedné báze na principu změny pohyblivosti fragmentu v akrylamidovém gelu (Hayashi, 1991). Pro studium vlastností mikrobiomu komárů, konkrétně pro zjištění počtu bakterií při sání krve, byla použita rastrová elektronová mikroskopie (Gusmão et al., 2010). Průzkum mikrobiálních komunit pomocí amplifikace a sekvenace 16S rRNA genů se stal standartní technikou pro porovnávání komunit z hlediska času a prostředí (Claesson et al., 2010). Velmi efektivním přístupem pro studium mikrobiomu, co do počtu a identifikace jednotlivých bakterií, je amplikonová sekvenace na Illumina platformách. Tato amplikonová sekvenace má velký potenciál k vytvoření kvalitních databází a umožňuje analýzu mikrobiálních komunit s větším rozlišením (Burke & Darling, 2016).

Všechny tyto metody jsou používány na jednotlivcích nebo na skupinách komárů, takzvaných poolech. Tyto skupiny skládající se ze dvou a více jedinců jsou používány pro výzkumy zabývajícími se populacemi, jelikož je možné obsáhnout a zahrnout více jedinců a tím vytvořit lepší obraz problematiky. Poolování je často používáno pro určení množství přenosu arbovirů, jako například virus Západonilské horečky (Condotta et al., 2004). Tato metoda byla použita například za druhé světové války při detekci sifilisu mezi vojáky (Dorfman, 1943). Poolování je používáno z několika důvodů. Jedním z nich jsou menší finanční náklady na výzkum jednotlivce, jelikož finanční náklady vynaložené na vzorek s jednotlivcem jsou vyšší než finanční náklady vynaložené na vzorek obsahující dva a více jedinců. Další výhodou může být časová úspora nebo snížení počtu pracovní síly (Ko et al., 1991). Poolování vzorků není ale vhodné pro studium interakcí mezi mikrobiomem, jeho symbionty a patogeny. Poolované vzorky totiž neumožňují vztáhnout konkrétní mikrobiomový profil k infekčnímu statutu hostitele.

2 Cíle

Komáři patří mezi jedny z největších přenašečů patogenů, které mohou lidem způsobovat smrtelná onemocnění. Výsledky novodobých studií ukazují, že zásadní roli v kapacitě přenosu patogenu a citlivosti komára k lidským patogenům hraje mikrobiom zastoupený různými bakteriálními komunitami obývající střevo komára. Je tudíž stěžejní pro budoucí studie dobře prozkoumat a identifikovat složení a zastoupení těchto bakteriálních komunit. Proto byly pro tuto práci stanoveny následující cíle:

1. Vyhodnocení vlivu použití odlišných prezervačních přístupů na profil mikrobiomů komárů rodu *Aedes*.
2. Determinace biologického templátu vhodného pro realistický popis střevního mikrobiomu komárů.
3. Posouzení vlivu poolování vzorků (sloučení více jedinců do jednoho analyzovaného vzorku - klasický epidemiologický přístup analýzy) na výsledný profil mikrobiomu.

3 Materiál a metodika

Metodický rámec této práce byl navržen za účelem optimalizace molekulárního zpracování hmyzích vzorků pro realistické analýzy střevního mikrobiomu pomocí 16S rRNA amplikonové sekvenace na Illumina platformách. Konkrétně byly testovány vlivy následujících postupů na výsledné mikrobiomové profily: i) použití tří odlišných preservačních činidel: Napbuffer (Camacho-Sanchez et al., 2013), Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) a etanol (100%, PENTA), ii) izolace DNA z různých tkání a iii) izolace DNA z jednotlivců a sloučených skupin („pool“) komárů. Potenciální vliv prostředí na složení mikrobiomů byl minimalizován odchytom jednoho vývojového stádia hostitele, tedy dospělce komárů, na stejné lokalitě. Jelikož jsme vzorky komárů sbírali ve dvou různých dnech během dvou měsíců, je možné pozorovat i změny dané časem. V původním návrhu projektu byla zahrnuta i eliminace vlivu prostředí v podobě laboratorního odchovu larev, získaných ze stejné odchytové lokality, do stádia dospělce. Polovina z těchto jedinců měla být nakrmena krví. Nasátí a nenasátí jedinci byli určeni pro přímou komparaci mikrobiomových profilů. Porovnání nebylo možné uskutečnit vzhledem k nízkému počtu laboratorně odchovaných dospělců přijímajících potravu. Následující metodické postupy byly uplatněny pro mikrobiomové profilování střevních komunit ve volně žijících populacích komárů.

3.1 Sběr vzorků

Sběr vzorků byl prováděn v Třeboni na souřadnicích N 49° 00' 07.2" E 14° 46' 29.3" ve dnech 20. 7. 2016 a 17. 8. 2016. Odchyt komárů byl prováděn entomologickou odsávačkou. Po odchytu komárů byla entomologická odsávačka umístěna na pár minut do lednice. Důvodem bylo zpomalení pohybu komárů pro jejich snazší přemístění pod stereomikroskopem do mikrozkušavek typu Eppendorf o velikosti 1,5 ml. Pro uchování DNA a RNA byl použit Nap buffer (Nucleic acid buffer) vlastní výroby, dále byl použit Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) a etanol (100%, PENTA). Celkem bylo nachytáno 242 samičích jedinců. Tito jedinci byli většinou střední velikosti. Na základě morfologického popisu Kramář (1958) byly vzorky taxonomicky zařazeny do rodu *Aedes*. Jejich tělo mělo tmavší barvy, které vytvářely kontrast oproti světlým kresbám tvořených světlými šupinkami. Zadeček těchto samičích jedinců byl ze strany zašpičatělý, jelikož měly dobře vyvinuté štěty. Většina z nich měla na zadečkových tergitech světlé pásy, které se směrem ke středu článku zužovaly (Kramář, 1958). Z celkového počtu bylo 140 jedinců použito

vcelku na metodu poolování. Předpokládáme, že pooly obsahovaly jen jeden druh komára. Jedinci byli náhodně rozděleni do 9 poolů o dvou četnostech. Šest poolů obsahovalo 10 jedinců a 4 pooly obsahovaly 20 jedinců. Ze zbylého počtu bylo 22 jedinců vypitváno a 80 samic komárů bylo použito vcelku. Plánovaný celkový počet vzorků určených pro izolaci DNA templátů a následné amplikonové sekvenování byl 134 (viz Tab. I.). Vzhledem ke kontaminaci některých vzorků v průběhu jejich přípravy pro amplikonovou sekvenaci byl počet vzorků zaslaných na amplikonovou sekvenaci 116 (viz Tab. II.). Ke kontaminaci mohlo dojít při izolaci DNA nebo při přípravě PCR. Kontaminace byla odhalena gelovou elektroforézou.

Tab. I.: Schéma rozdělení komářích jedinců do jednotlivých kategorií podle použitých preservačních postupů při pokojové teplotě (RT) a při teplotě – 20 °C.

	Pitvání			Pooly	
		Celý jedinec	Střevo	Tělo bez střeva	Celý jedinec
Preservační činidla	Allprotect Tissue Reagent (RT)	10	0	0	0
	Allprotect Tissue Reagent -20 °C	10	0	0	0
	Nap buffer (RT)	10	0	0	0
	Nap buffer -20 °C	10	0	0	0
	Etanol (RT)	10	0	0	10
	Etanol -20 °C	10	0	0	0
	Bez činidla (RT)	20	22	22	0

3.1.1 Pitvání komárů

Pitva komárů probíhala pod stereomikroskopem při pokojové teplotě v PBS pufru (Phosphate Buffer Saline). Komárům byl nejprve oddělen zadeček od hlavy a hrudi. Poté byl zadeček opatrně otevřen pinzetou a bylo vyjmuto střevo spolu s malpighickými trubicemi. Ty byly poté jemně odděleny od zbytku střeva. Do jedné zkumavky bylo umístěno střevo. Do druhé zkumavky byl umístěn zbytek těla. Takto připravené vzorky byly ihned podrobeny

extrakci DNA nebo RNA. Pitva a následná izolace DNA byla provedena u 22 jedinců, tedy u 44 vzorků.

3.2 Molekulární metody

3.2.1 Prezervace vzorků

Pro prezervaci vzorků byla použita tři různá preservační činidla z důvodu porovnání výtěžků DNA. Byla zvolena taková činidla, aby bylo možné rozdíly mezi výtěžky DNA snadno rozlišit a porovnat výsledky podle vlastností těchto činidel. Tato činidla byla použita i v jiných studiích na jiných vzorcích.

3.2.1.1 NAP pufr

Zkratka NAP pochází z anglického Nucleicacid preservation. Toto činidlo je velmi snadné na výrobu a v porovnání s činidlem Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) je i velmi levné. Může být uchováváno při teplotě $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazáku, popřípadě při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. NAP pufr dokáže stabilizovat vzorky DNA při pokojové teplotě až deset měsíců (Camacho-Sanchez, 2013). Nevýhodou je zvýšené povrchové napětí roztoku, což zapříčiňuje horší smáčení vzorku v činidle.

3.2.1.1.1 Výroba NAP pufru

Chemikálie:

- 7,44 g EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctovádisodná sůl dihydrát)
- 700 g síran amonný
- 7,35 g citronan sodný
- kyselina sírová
- 1 l deionizovaná voda

Postup: Síran amonný, EDTA a citronan sodný byly za stálého míchání při teplotě 50°C - 65°C rozpuštěny v 1 litru deionizované vody. Po úplném rozpuštění složek roztoku a zchlazení na teplotu okolí bylo pH upraveno kyselinou sírovou na hodnotu 5,2 (Camacho-Sanchez, 2013).

3.2.1.2 Allprotect Tissue Reagent (Qiagen)

Vlastnosti tohoto prezervantu jsou optimalizované pro izolování DNA, RNA i proteinů. Nevýhodou tohoto činidla je vysoká cena. Vzorky mohou být v Allprotect Tissue

Reagent (Qiagen) přechovávány při teplotách mezi 2-8°C až 12 měsíců. Pro delší skladování je doporučenou teplotou -20 °C nebo -80 °C. Prezervant stabilizuje vzorek v rozmezí teplot 15-25 °C až po dobu 7 dní, což je pro účely terénních sběrů zásadní.

3.2.1.3 Ethanol

Poslední volbou pro uchování vzorků byl absolutní etanol (PENTA). Toto činidlo neumožňuje pracovat s RNA a zamezuje tak dalšímu zkoumání přenášených RNA virů. Etanol byl zvolen na základě výsledků studie porovnávající účinnost činidel na izolaci DNA z tkání krysy (Camacho-Sanchez, 2013).

3.2.2 Izolace DNA a RNA

Izolace RNA byla prováděna ve flowboxu, aby nedošlo ke kontaminaci vzorků. Práce s RNA musela být prováděna velice opatrně a rychle, aby nedocházelo k degradaci RNA. Izolovaná RNA byla přechovávána při -80 °C. S DNA bylo pracováno v běžných sterilních podmínkách laboratoře, jelikož DNA není tak náchylná k degradaci jako RNA. Pro izolaci RNA a DNA byl použit izolační kit QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen) v kombinaci s RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen). Z jednoho vzorku byla izolována DNA i RNA. Izolace RNA probíhala dle protokolu RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen). Izolace DNA proběhla z kolonky gDNA Eliminator spin column (Qiagen), která byla použita v prvním kroku izolace RNA, a dále bylo postupováno dle protokolu QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen). Pro konečné promývání kolonky, tj. eluci DNA, bylo použito 2 x 20 µl ultra-čisté vody („PCR gradewater“). Vyizolovaná DNA byla uchována při teplotě -18 °C až -20 °C. Po provedení izolace byly porovnány účinnosti jednotlivých prezervačních činidel změnění koncentrace a namátkově i kvality DNA. Měření koncentrace a kvality DNA a RNA bylo prováděno na nanofotometru (NanoPhotometer P-Class, IMPLEN). Nejprve byl jako blank použit 1 µl deionizované vody. Poté byly postupně měřeny vzorky DNA a RNA z izolovaných komárů a výsledky byly zapisovány do tabulky (Tab. II.). Vždy bylo použité množství 1µl.

Tab. II.: Koncentrace DNA a RNA (neobsahuje poolované vzorky).

SampleI D	Koncentrace (ng/μl)		Sample ID	Koncentrace (ng/μl)		Sample ID	Koncentrace (ng/μl)	
	DNA	RNA		DNA	RNA		DNA	RNA
5b1	113	5,2	5b42B	11,2	10,8	6b21	62	60
5b2	2,5	5,6	5b43B	2255	7,6	6b22	15,5	7,6
5b3	147	3,2	5b44B	71,2	14,8	6b23	24,5	4,8
5b4	149	3,6	5b45B	3,4	2,8	6b24	26,5	24
5b5	12,3	6	5b46B	682	3,6	6b25	16	6,4
5b6	149	3,6	5b48B	315	4	6b26	58	20,4
5b7	148	0,4	5b49B	1035	4,8	6b27	25,5	11,6
5b8	149	5,2	5b50B	383	2,8	6b28	38	14
5b9	2,5	7,2	5b41G	1155	13,2	6b29	35	30,4
5b10	2,7	9,2	5b42G	408	26	6b30	25	11,6
5b11	148	2	5b43G	637	19,2	6b31	4	10,8
5b12	1203	3,2	5b44G	208	32	6b32	6	6,4
5b13	21,6	9,2	5b45G	115	27,2	6b33	45,5	18,8
5b14	568	4,8	5b46G	2,4	12	6b34	19	7,6
5b15	29,1	1,6	5b47G	2,2	30,8	6b35	22,5	7,6
5b16	336	1,2	5b48G	1098	29,6	6b36	11,5	18
5b17	337	1,2	5b49G	755	30	6b38	6	9,2
5b18	12,4	0,8	5b51G	775	12	6b41B	29,5	35,2
5b19	20,7	2,8	5b52G	6,4	11,6	6b42B	23	38,4
5b20	4,3	2	6b1	22	7,6	6b43B	18,5	10,8
5b21	6,9	2,4	6b2	13,5	2,8	6b44B	6,5	7,2
5b22	1163	2	6b3	28	14,8	6b45B	29,5	16
5b23	184	6	6b4	50,5	17,2	6b46B	17	14
5b24	12,5	8,4	6b5	15,5	11,2	6b47B	22,5	5,2
5b25	9,8	8,8	6b6	12	8	6b48B	20,5	12
5b26	478	2	6b7	4,5	4,4	6b49B	15	28
5b27	2,1	23,2	6b8	5,5	8,8	6b42G	10,5	7,2
5b28	3,2	9,6	6b9	7	47,6	6b46G	4,5	16,4
5b30	3460	24	6b10	11,5	22,4	6b49G	8,05	12,8
5b31	19,5	26,8	6b11	110	5,2	Cb1	6,5	20
5b32	20,2	6	6b12	36	10	Cb2	5,5	13,2

5b33	372	6,23	6b13	23	5,6			
5b34	3455	5,2	6b14	13	2,8			
5b35	3090	22,8	6b15	16,5	2,4			
5b36	37,1	1,4	6b16	43,5	4,4			
5b37	8,7	2,4	6b17	33,5	5,6			
5b40	133	1,2	6b18	33,5	2,4			
5b41B	5,4	6,4	6b19	13	2,4			

3.2.3 PCR (polymerázová řetězová reakce)

K amplifikaci DNA získané z komárů byla použita polymerázová řetězová reakce. Pro tuto reakci byly použity primery 806R a 515F pro ověření přítomnosti bakteriální složky v DNA (Walters, 2015). PCR reakce probíhala na přístroji Mastercycler (Eppendorf) při vhodném programu (viz Tab. III.). Celkový objem reakční směsi byl 20 μ l. První složkou byla PCR cleanwater v množství 7 μ l. Dále byly přidány oba primery, každý v množství 1 μ l. Další složkou reakční směsi byl PPP Master Mix (Top-Bio) v množství 10 μ l a poslední složkou byl 1 μ l vyizolované DNA.

Tab. III.: PCR program.

		teplota	čas
1.	Počáteční denaturace	95 °C	2:00 min
2.	Denaturace	94 °C	0:45 min
3.	Nasedání primerů	55 °C	1:00 min
4.	Syntéza DNA	72 °C	1:00 min
5.	Finální syntéza DNA	72 °C	10:00 min
	Udržovací teplota	12 °C	
	Počet cyklů	25	Od 2. do 5. kroku

3.2.4 Gelová elektroforéza

Ke zjištění přibližné velikosti získaných úseků DNA byla použita gelová elektroforéza. Přibližně 1 μ l vzorku byl smíchán s 1 μ l fluorescenčního barviva SYBR Green (Invitrogen) a 1 μ l DNA LoadingDye (ThermoScientific). Tato směs byla napipetována na 1% agarózový gel. Použitými laddery byly 1kb DNA Ladder (O'GeneRuler 1kb, ThermoScientific) a 100 bp Plus DNA Ladder (GenRuler 100 bp, ThermoScientific). Po

ukončení gelové elektroforézy byly gely zdokumentovány pomocí přístroje UVITEC od firmy CleaverScientific Ltd.

3.2.5 Amplikonová sekvenace na Illumina platformách

Amplikonové knihovny 16S rRNA byly připraveny spolupracující laboratoří (Prof. Noah Fierer, CU Boulder, CO, USA) dle protokolu EMP (Earth Microbiome Project, <http://press.igsb.anl.gov/earthmicrobiome/protocols-and-standards/16s/>). Celkově bylo v jednom multiplexovém runu platformy Illumina MiSeq osekvenováno 384 barcodově odlišených vzorků. Podle původního plánu mělo být odesláno 134 vzorků (viz Tab. I.). Z důvodu kontaminace, ke které mohlo dojít během izolace DNA a RNA nebo přípravě PCR, byl počet vzorků odeslaných na ampliconovou sekvenaci 116.

3.3 Analýza dat

3.3.1 Amplikonová data

Pro zpracování celého souboru hrubých Illumina pair-end dat byly použity programy Usearch 7.0.1090 a 9.0.2132 (verze i86linux32, <http://www.drive5.com/usearch/>) a Qiime 1.8 (www.qiime.org). V těchto programech bylo provedeno párování, demultiplexování a kontrola kvality dat dle následujícího schématu.

Kroky provedené v programu Usearch 7 a 9 (<http://www.drive5.com/usearch/>):

- Demultiplexování datasetu na základě barcodové mapy pro jednotlivé vzorky „`prep_fastq_for_uparse_paired.py`“.
- Párování forward a reverse sekvencí do společného kontigu pomocí scriptu „`fastq_mergepairs`“.
- Kontrola kvality příkazem „`fastq_filter`“ s nastavením parametru kvality maxee na hodnotu 0.5.
- Dereplikace, tedy rozřídění sekvencí ze setu dat „`eliska_dataset.fna`“ příkazem „`derep_fulllength`“ na základě absolutní sekvenční shody.
- Odstranění sekvencí vyskytujících se v souboru dat pouze jednou příkazem „`sortbysize`“ s nastavením minimálního počtu sekvencí v rozříděných skupinách (klastrech) na počet 2 („`-minsize2`“).
- Klastrování dat příkazem „`cluster_otus`“ do *de novo* databáze, respektive reprezentativního setu sekvencí. Příkaz třídí data do skupin (klastřů) podle 97 %

sekvenční podobnosti a označí jednotlivé skupiny „OTU_1“ až „OTU_n“ („Operational Taxonomic Unit“).

- Přiřazení demultiplexovaných sekvencí k databázi vytvořené v předchozím kroku příkazem „usearch_global“ a vytvoření OTU tabulky, tedy matice s počty jednotlivých OTU pro každý vzorek.

Příkazy provedené v programu Qiime 1.8 (www.qiime.org):

- Převedení OTU tabulky příkazem „biom convert“ do formátu BIOM.
- Zjištění taxonomického zařazení jednotlivých OTU příkazem „assign_taxonomy.py“ s použitím metody „blast“ a databáze SILVA (SILVA 123 květen 2016, <https://www.arb-silva.de/download/archive/qiime/>).
- Přiřazení taxonomické informace do OTU tabulky příkazem „add_metadata“.
- Kontrola přítomnosti a následné odstranění nebakteriálních sekvencí z OTU tabulky. Příkazem „filter_taxa_from_otu_table.py“ byly konkrétně odstraněny OTU pro chloroplasty, mitochondrie, *Archaea* a OTU bez taxonomického zařazení.
- Kontrola počtu sekvencí pro jednotlivé vzorky za účelem stanovení hladiny znáhodnění byla provedena příkazem „biom summarize-table“.
- Normalizace počtu sekvencí přes celý soubor vzorků byl proveden náhodným výběrem 400 sekvencí příkazem „single_rarefaction.py“.
- Provedení analýzy beta diverzity posuzující podobnost společenstev sledováním druhového složení mezi společenstvy (<http://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=analyza-a-hodnoceni-biologickyh-dat--statisticke-hodnoceni-biodiverzity--metody-hodnoceni-diverzity--beta-biodiverzita-a-vicerozmerna-analyza-biodiverzity>).

Vzhledem k vysoké nespecifitě forwardového EMP primeru 515F (Walters, 2015), který amplifikuje jak 16S rRNA, tak 18S rRNA hostitele a přenášených eukaryotních patogenů, byly forwardové ready použity pro molekulární determinaci hostitelské taxonomie. Forwardový dataset byl zpracován dle schématu popsaného výše s použitím SILVA databáze (SILVA_123_release.zip, květen 2016, <https://www.arb-silva.de/download/archive/qiime/>) pro malou ribozomální podjednotku, obsahující prokaryotická i eukaryotická data. OTU odpovídající komářím sekvencím byly z datasetu vyfiltrovány na základě vyhledávání klíčového slova „Insecta“. Taxonomická determinace

byla následně ověřena pomocí blast vyhledávání konkrétní OTU sekvence v databázi nr. Poté byly sečteny ready pro jednotlivé eukaryotní OTU 18S pro každý vzorek. Aby mohl být vzorek určen, jako určitý druh komára, muselo být OTU odpovídající tomuto druhu komára vyšší než 98 % readů. Treshold byl tímto stanoven na hodnotu 98 %.

Další dílčí analýzy dat připravených v programech Qiime 1.8 (www.qiime.org) a Usearch 7.0.1090 a 9.0.2132 (verze i86linux32, <http://www.drive5.com/usearch/>) byly provedeny v programu R studio (<https://www.rstudio.com>) za použití funkčních balíčků biom (<https://cran.r-project.org/web/packages/biom/index.html>) a vegan (<https://cran.rstudio.com/web/packages/vegan/vegan.pdf>). Matice nepodobnosti byla vypočtena s použitím 9m Bray-Curtis distancí. Podobnost mikrobiomu byla analyzována v rámci 5 definovaných skupin odpovídajícím: i) odlišnému sběru dat ve dnech 20.7. 2016 a 17.8. 2016, ii) třem odlišným činidlům použitým na uchování celých komárů, iii) odlišného tkáňového templátu v podobě celého těla, střeva a zbytku těla bez střeva jedince, iv) zjištění podobnosti druhů *Aedes* sp. a *Ochlerotatus* sp., v) vlivu pokojové teploty a teploty – 20 °C, ve kterých byly vzorky uchovávány po dobu 7 dní, na vzorky uložené v preservačních činidlech. Pro různé druhy preservací za použití tří odlišných preservačních činidel a skladování vzorků při pokojové teplotě a při teplotě – 20 °C byla provedena analýza richness programu v R studio (<https://www.rstudio.com>) za použití modulu ggplot2 (<http://ggplot2.org/>) a clickme (<http://rclickme.com/>).

3.3.2 Převzatá amplikonová data

Vzhledem k relativně nízkému počtu poolovaných vzorků dostupných pro analýzy, byl v této práci zároveň analyzován dataset 16S rRNA amplikonů pro mikrobiomy komářích hostitelů z provincie Ontario, Kanada. Data byla zpracována dle schématu popsaného výše, tedy programy Usearch 7.0.1090 a 9.0.2132 (verze i86linux32, <http://www.drive5.com/usearch/>) a Qiime 1.8 (www.qiime.org). Z výsledného biomu byli vyfiltrováni jedinci druhu *Aedes vexans*. Dále byla provedena analýza podobnosti mikrobiomových profilů mezi pooly skládajících se z různého počtu jedinců a individuálně izolovanými vzorky. Analýza podobnosti byla provedena v programu R studio (<https://www.rstudio.com>) s použitím modulu vegan (<https://cran.rstudio.com/web/packages/vegan/vegan.pdf>). Dále byla provedena analýza richness, ukazující počet OTU, a Shannon diversity, ukazující počet OTU a zároveň i jejich

zastoupení, opět v programu R studio (<https://www.rstudio.com>) za použití modulu ggplot2 (<http://ggplot2.org/>) a clickme (<http://rclickme.com/>).

4 Výsledky

Výsledky ampliconové sekvenace obsahovaly forwardové i reverzní ready. Po spojení readů datasetu forward a reverse se zmenšil celkový počet readů v datasetu. Průměrný počet ampliconů získaných pro jeden vzorek byl 3421. Výsledný dataset znáhodněný na počet 400 sekvencí (Materiál a metodika 3.3), obsahoval 95 vzorků.

Analýza 18S rRNA forwardových readů datasetu ukázala, že jedinci, jejichž DNA byla zaslána na ampliconovou sekvenci, patřili do druhu *Aedes vexans*, do rodu *Ochlerotatus* sp., do druhu *Aedes cinereus* a do druhu *Culex* sp. (viz Tab. IV.). Jedinci rodu *Ochlerotatus* byli vyřazeni ze setu dat používaného pro následné datové analýzy. Jedinci rodu *Ochlerotatus* se však vyskytovaly i ve vzorcích obsahující DNA templáty z poolů. Proto byla provedena adonis analýza v programu R studio (<https://www.rstudio.com>), ve které byla porovnávána podobnosti rodů *Aedes* a *Ochlerotatus*. Výsledek analýzy podobnosti ukázal, že mezi těmito rody není podobnost, jelikož výsledek analýzy byl nesignifikantní ($R^2 = 0,432$) dále nebyl dodržen 98 % treshold, a proto nemohly být pooly použity. Vzorky Cb1 a Cb2 obsahující DNA z jedinců odchycených ve stádium larev a následně vylíhnutých v laboratorních podmínkách patří dle sekvenční shody se sekvencemi GenBanku k rodu *Culex* sp.. Proto byly tyto dva vzorky z datasetu také vyřazeny.

Tab. IV.: Výsledky analýzy 18S rRNA (* nesplněno treshold 55,5%-89,6%).

Taxonomické zařazení	“Blast Hits“			Počet vzorků	
	“Identification“	“Query coverage“	“Identity“	jedinci	pooly
<i>Aedes vexans</i>	<i>A. vexans</i> 18S	100 %	100 %	74	9*
<i>Ochlerotatus</i> sp.	<i>Ochlerotatus</i> <i>albifasciatus</i> partial 18S rRNA	100 %	100 %	23	X
<i>Aedes</i> <i>cinereus</i>	<i>Aedes cinereus</i> small subunit	100 %	100 %	7	X

	ribosomal RNA gene, partial sequence				
<i>Ochlerotatus</i> sp.	<i>Ochlerotatus</i> punctator isolate 1791 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100 %	99 %	1	X
<i>Culex</i> sp.	<i>Culex eduardoi</i> partial 18S rRNA gene	100 %	100 %	2	X

Spolu se vzorky byly na ampikonovou sekvenaci zaslány čtyři negativní kontroly. Kontroly označené jako NTC1 a NTC2 obsahovaly minimální počet ampikonů, a proto mohla být vyloučena kontaminace. Konkrétně pro kontroly NTC1 a NTC2 bylo osekvenováno 253 a 928 readů. U kontroly NTC3 a ENC, kde proběhla amplifikace ve větší míře, byla provedena kontrola identifikovaných taxonů *Spiroplasma* v zastoupení 26,5% s průměrem 386 readů na vzorek, *Stenotrophomonas* v zastoupení 43,6 % s průměrem 16 readů na vzorek, *Chryseobacterium* v zastoupení 16% s průměrem 15 readů na vzorek, *Escherichia-Shigella* v zastoupení 96,6 % s průměrem 85 readů na vzorek, *Geobacillus* v zastoupení 65,8 % s průměrem 22 readů na vzorek, *Comamonadaceae* v zastoupení 68,4 % s průměrem 34 readů na vzorek a *Anoxybacillus* v zastoupení 63,2 % s průměrem 26 readů na vzorek. U obou kontrol však vzhledem k typu taxonu mohla být kontaminace vyloučena.

Výsledek analýzy v programu R studio (<https://www.rstudio.com>) zkoumající vliv dne odchyty jedinců na mikrobiom celých komárů, ze kterých byla DNA izolována bez přidání preservačních činidel, byl nesignifikantní ($R^2 = 0,372$). To znamená, že datum sběru vzorků nemá vliv na výslednou podobu mikrobiomu z celého komářího těla izolované bez přidání preservačního činidla. Analýza zaměřující se na použití třech odlišných preservačních činidel na uchování celých komárů ukázala, že preservační činidla nemají vliv na mikrobiom celých komárů ($R^2 = 0,631$). Výsledek analýzy posuzující rozdíl mezi mikrobiomy získanými z odlišného tkáňového templátu byl nesignifikantní ($R^2 = 0,981$).

Výsledek analýzy zkoumající vliv teploty, ve které byly vzorky skladovány po dobu 7 dní, na nasbírané vzorky uložené v preservačních činidlech byl ve všech třech párových porovnáních nesignifikantní ($R^2_{\text{(Etanol)}}= 0.215$, $R^2_{\text{(Nap pufr)}}= 0,152$, $R^2_{\text{(AllprotectTissueReagent)}}= 0,137$).

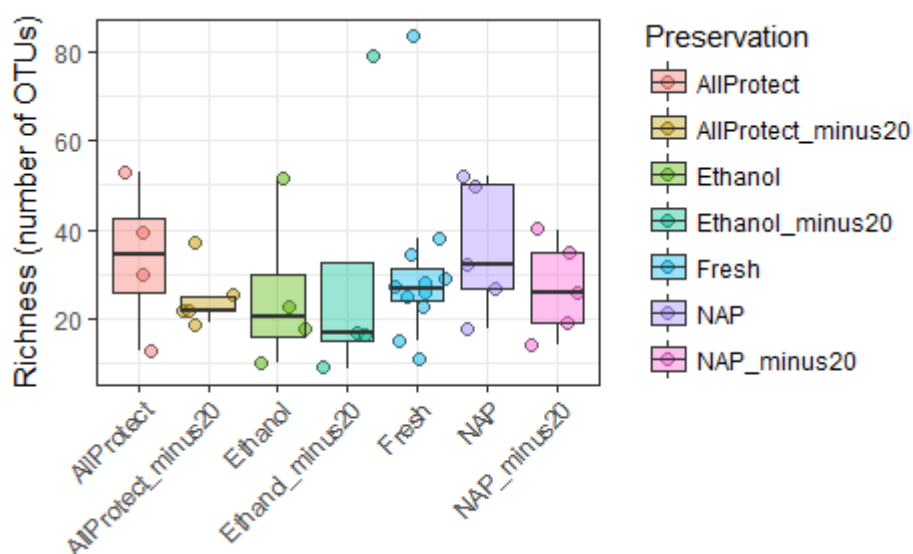
Dále byl sledován vliv preservačního činidla na templát DNA. Nejvyšší průměrné hodnoty koncentrace byly naměřeny u vzorků v Etanolu (PENTA) skladovaných před izolací DNA při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nejnižší průměrné hodnoty koncentrace byly naměřeny u vzorků v Etanolu (PENTA) skladovaných před izolací DNA při pokojové teplotě. Vzorky uchovávané v preservačních činidlech při pokojové teplotě měly vždy nižší průměrné koncentrace než vzorky skladované při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. U vzorků bez činidla byly nejvyšší průměrné koncentrace naměřeny u vzorků střeva a nejnižší u celého jedince. Upřesněné hodnoty najdeme v tabulce (viz Tab. V.).

Tab. V.: Průměrné koncentrace DNA vzorků v různých preservačních činidlech (vzorky byly před izolací DNA skladovány při pokojové teplotě RT nebo při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

		Průměrná koncentrace DNA (ng/μl)		
		Celý jedinec	Střevo	Tělo bez střeva
Preservační činidla	Allprotect Tissue Reagent (RT)	35,7	X	X
	Allprotect Tissue Reagent ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)	268,01	X	X
	Nap buffer (RT)	32,6	X	X
	Nap buffer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)	591,05	X	X
	Etanol (RT)	16,3	X	X
	Etanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$)	891,93	X	X
	Bez činidla (RT)	54,4	370,3	274,6

Pro různé druhy preservací za použití tří odlišných preservačních činidel a skladování vzorků při pokojové teplotě a při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla provedena analýza richness. Výsledek ukazuje, že etanol obsahuje nejmenší počet OTU jak při pokojové teplotě, tak i při teplotě -

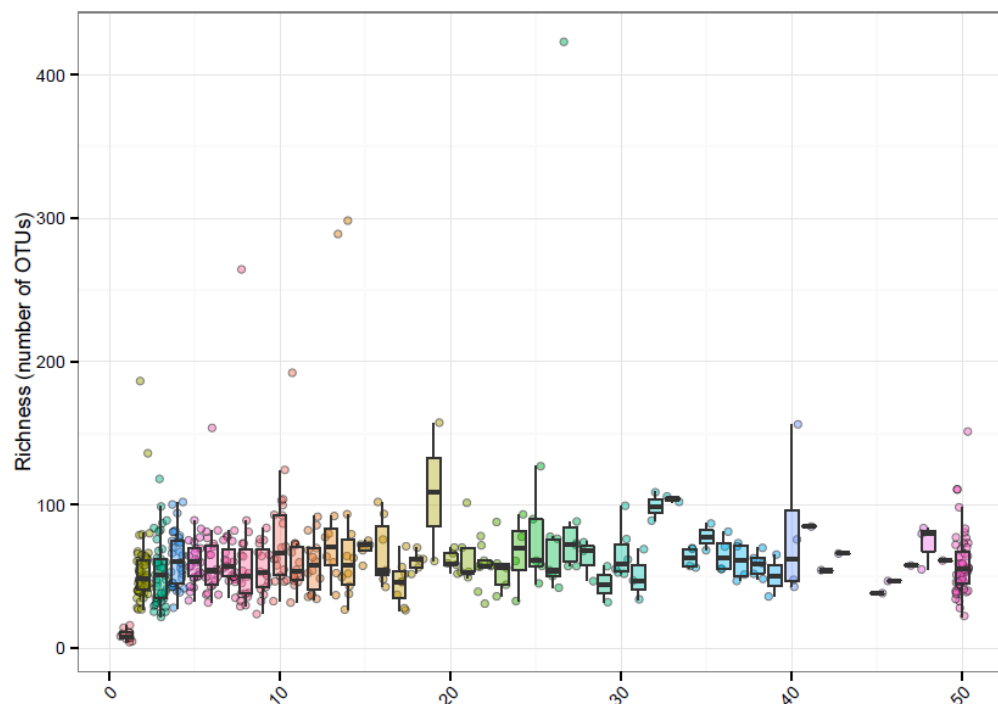
20 °C. Naopak Nap pufr a Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) dosáhly velmi dobrých výsledků v porovnání množství OTU se vzorky, ze kterých bylo DNA vyizolováno již v den odchyty komárů.



Obr. 1: Richness mikrobiomů u vzorků z Třeboně při použití různých preservačních činidel a různých skladovacích teplot.

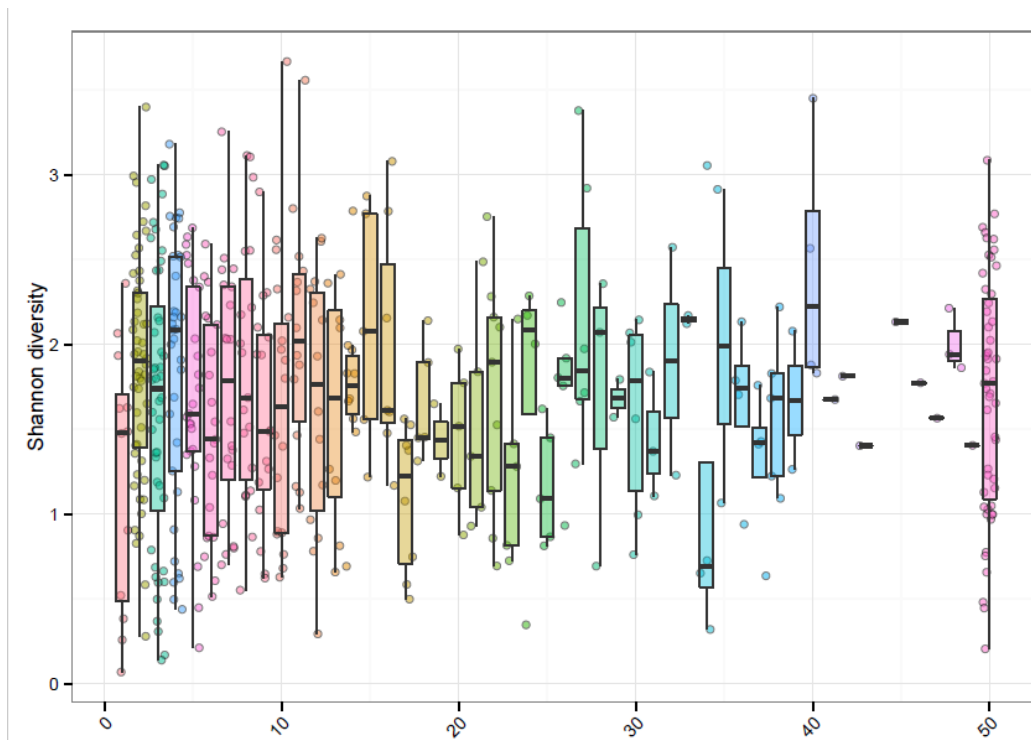
Analýza vlivu poolování jedinců z datasetu z provincie Ontario *Aedes vexans*

Analýza podobnosti mikrobiomových profilů mezi pooly skládajícími se z různého počtu jedinců v porovnání s individuálně izolovanými jedinci ukazuje, že pooly obsahující 50 jedinců mají odlišné mikrobiální složení než jednotliví komáři. Výsledek richness (viz Obr. 2) ukazuje, že všechny poolované vzorky dosahují přibližně stejného množství OTU, které představuje přibližně dvojnásobek OTU identifikovaných z jednoho komára.



Obr. 2: Richness vzorků z provincie Ontario. Na ose X jsou uvedeny počty komárů od jednoho po 50 tvořících analyzovaný pool.

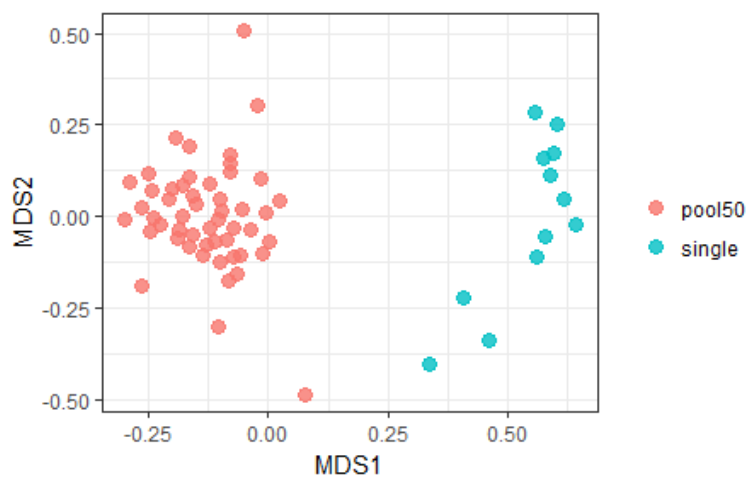
Výsledek Shannon diversity (viz Obr. 3) ukazuje, že celková bohatost mikrobiálního složení všech vzorků je přibližně stejná. U vzorků izolovaných z jednoho komára byl zjištěn zvýšený výskyt bakterií *Staphylococcus*, *Asaia*, *Wolbachia*, *Saprosiraceae* nebo *Acinetobacter*. Mezi nejhojněji zastoupené bakterie u poolovaných vzorků patří například *Asaia*, *Pseudomonas*, *Kluyvera*, (čeleď Enterobacteriaceae), *Enterobacter*, *Zymobacter*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Wolbachia*.



Obr. 3: Shannon diversity ze vzorků datasetu 16S rRNA amplikonů z provincie Ontario. Na ose X jsou uvedeny počty komárů od jednoho po 50 tvořících analyzovaný pool.

Výsledek analýzy nepodobnosti

NMDS analýza Bray-Curtis distancí odhalila signifikantně odlišné bakteriální komunity u poolovaných vzorků obsahujících 50 jedinců a u vzorků obsahujících jednoho jedince komára (viz Obr. 4).



Obr. 4: Výsledek NMDS analýzy podobnosti poolovaných vzorků o četnosti 50 jedinců a vzorků obsahujících pouze jednoho jedince. Osy grafu jsou arbitrární a pouze určují jeho orientaci.

5 Diskuze

Současné studie se zaměřují na vztah mezi vektorem, jeho symbionty a patogeny (Favia et al., 2007). Proto bylo jedním z cílů této práce definovat optimální podmínky sběru dat analyzovaných v tomto kontextu. Ukazuje se, že důležitou roli u krevsajícího hmyzu přenášejícího patogeny na člověka hraje mikrobiální složení střeva. Střevní komunity komára se nepodílí jen na výživě jedince, ale i na imunitní odpovědi proti patogenům získaných sáním krve nakažených jedinců (Dennison et al., 2014). Proto je důležité získat kvalitní obraz o celkovém složení střevního mikrobiomu a odhalit interakce v tripartitním vztahu hostitele s jeho symbionty a patogeny.

Pro preservaci nasbíraných vzorků byla použita tři odlišná preservační činidla a to etanol (100%, PENTA), NAP pufr a Allprotect Tissue Reagent (Qiagen). Na základě mých výsledků porovnávajících vliv používání preservačních činidel by neměla mít tato činidla žádný vliv na vzorky při jejich skladování. To potvrzuje i studie Jerry J. Lou et al. (2013) v kontextu dlouhodobého skladování vzorků s použitím Allprotect Tissue Reagent (Qiagen), která ukazuje, že Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) je velmi spolehlivý preservant, který dokáže uchovat DNA a RNA v původním stavu při pokojové teplotě až podobu 7 dní. NAP pufr byl vybrán z důvodu velmi dobrých preservačních výsledků při izolaci DNA z krys. Byl u nich testován pro preservaci vzorků po dobu 7 týdnů a 10 měsíců při pokojové teplotě. Při porovnání účinností s etanolem bylo zjištěno, že NAP pufr byl vždy lepší než etanol (Camacho-Sanchez, 2013). Mé výsledky však ukázaly silnou závislost výtěžku na skladovací teplotě, v případě skladování vzorků při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ dosahovala preservace etanolem vyšší průměrné koncentrace DNA ve vzorku než při použití NAP nebo dokonce Allprotect Tissue Reagent (Qiagen). Pokud porovnáme průměrné koncentrace DNA naměřené u vzorků uskladněných při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a při pokojové teplotě, zjistíme, že průměrné koncentrace u vzorků uschovaných při pokojové teplotě jsou výrazně nižší než u vzorků uschovaných při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a to u všech použitých protekčních činidel. Účinnost ochrany DNA při pokojové teplotě klesá v závislosti na použitém činidlu od Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) přes NAP až nejméně účinnému etanolu. V případě skladování při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ je tomu přesně naopak. Moje výsledky ukazují, že teplota, při které jsou vzorky skladovány, nemá vliv na složení mikrobiom komárů. To je důležité hlavně v případě terénního sběru dat, kde není možné umístit vzorky do chladicího zařízení, které by udržovalo teplotu vzorků okolo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Výsledky studií Cooper R. D. (1998) na komárech čeledi Anophelinae ukazují, že mražení vzorků zachovává množství DNA i po opakovaném rozmrazování a následném

mražení vzorků. Proto je nejlepším způsobem preservace mražení vzorků. Pokud však není možné uchovávat vzorky při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, je nejlepším preservačním řešením Nap pufr, jelikož je levnější než Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) a dosahoval vyšších nebo stejných průměrných koncentrací jako Allprotect Tissue Reagent (Qiagen). Nap pufr dosahoval dobrých výsledků i v analýze richness. Je zřejmé, že pro jednodušší používání NAP pufru by bylo výhodné zmírnit povrchové napětí tohoto činidla pro snadnější smáčení vzorku. Jako vhodný by se jevil některý z velmi slabých a biologicky kompatibilních detergentů, např. z řady Tween.

Dalším přístupem použitým v této práci bylo pitvání samičích jedinců komára rodu *Aedes*. Výsledek analýzy neukazuje signifikantní rozdíly mezi mikrobiomovými profily z odlišného tkáňového templátu. To znamená, že bakteriální komunity, které nalezneme ve střevě jedince, mohou být přítomné i v ostatních orgánech komára, nebo že mikrobiom střeva výrazně dominuje vzorku DNA izolované z celého jedince. Podle Minard et al. (2013) můžeme bakteriální komunity podobné střevním bakteriálním komunitám najít i v orgánech jako jsou slinné žlázy nebo reprodukční orgány (Minard et al., 2013), což výsledky mé práce potvrzují.

Důležitým faktorem, který by mohl hrát roli ve složení mikrobiomu komára a pro jeho následné zkoumání, je datum odchyty jedinců. Mé výsledky ukazují, že datum sběru vzorků nemá významný vliv na složení mikrobiomu. Toto zjištění potvrzuje i studie Muturi et al. (2017), která odhalila jistou individuální proměnlivost složení bakteriálních komunit, která byla detekována jak u vzorků ze stejného data sběru, tak i u vzorků z různých dat sběru. Tato individuální proměnlivost může být způsobena vnitřními nebo vnějšími faktory. To naznačuje, že mikrobiomy se mění na základě individuální proměnlivosti, nikoli na základě různého datu sběru (Muturi et al., 2017). Mezi faktory ovlivňující individuální proměnlivost složení bakteriálních komunit může patřit například typ výživy larvy a dospělce, fyziologické podmínky střeva, infekce parazity a patogeny nebo stáří jedince (Wang et al., 2011). Mé vzorky byly sbírány v rozmezí zhruba jednoho měsíce. V případě většího časového horizontu záleží změna mikrobiomu na druhu komára. Například u druhu *Aedes vexans* ke změnám v mikrobiomovém profilu dochází (Nováková et al., 2017).

Jedním z cílů této práce bylo porovnání zastoupení bakteriálních komunit získaných z dospělých jedinců odchycených v přírodě ve stádiu dospělce a larvy, která měla dokončit metamorfózu v laboratorních podmínkách podobně jako ve studii prováděné na komárech *Anopheles gambiae* v Keni (Wang et al., 2011). Část jedinců vylíhnutých v laboratoři měla být nakrmena beraní krví. Výsledky se však nepodařilo získat, jelikož se nevylíhl dostatečný

počet samičích jedinců a vylíhnuté jedince se nepodařilo krví nakrmit. Tyto problémy byly nejspíše způsobeny zvolením nevhodných podmínek pro odchov larev.

Jedním z hlavních cílů práce bylo také posouzení vlivu poolování na mikrobiom komárů. Výsledky nebylo možné získat z důvodu obtížného a špatného určení morfotypu komárů, čímž došlo ke kontaminaci poolů komáry rodu *Ochloretatus*. Přestože výsledek analýzy porovnávající podobnost mikrobiomu mezi jedinci rodu *Aedes* a *Ochlerotatus* byl nesignifikantní, pooly nemohly být pro další analýzy použity, jelikož nebyla dodržena 98% hladina thresholdu. Tento fakt by mohl potvrzovat vliv prostředí na mikrobiom komárů, jelikož komáři pocházely ze stejné lokality (Minard et al., 2013). Za účelem naplnění třetího cíle této práce byl použit set dat pro druh *Aedes vexans* Torronta. Analýzy podobnosti mikrobiomů ukázaly, že poolované vzorky mají odlišné složení mikrobiomu než vzorky obsahující DNA pouze z jednoho jedince. Výsledky richness ukazují, že všechny poolované vzorky obsahují přibližně stejné množství OTU. Pokud však porovnáme množství OTU u poolovaných vzorkům se vzorky obsahujícími pouze jednoho jedince zjistíme, že poolované vzorky obsahují přibližně dvakrát tolik OTU než vzorky z jednotlivců. Odlišné složení mikrobiomu bylo možno pozorovat již při porovnávání vzorků, které obsahovaly jednoho komára a vzorků, které obsahovaly dva komáry. Z toho lze usoudit, že v poolovaných vzorcích ztrácíme informaci o počtu a identitě komárů obsahujících určitý druh bakterie. Tuto doměnku potvrzuje i studie Minard et al. (2014) naznačující, že poolováním vzorkům můžeme ztratit variabilitu bakteriálního složení. Tato ztráta informace může být v kontextu hledání souvislostí mezi patogeny a mikrobiomem komára zásadní. Mezi vektorem a jeho symbiontem může existovat velmi silné pouto, jelikož jejich vztah může být stěžejní pro jejich přežití. Symbiotické bakterie jako jsou například některé druhy bakterie *Wolbachia* mohou inhibovat výskyt patogenu v těle hostitele (Hoffmann et al., 2011). Komáří mikrobiom jedince může obsahovat více než jeden kmen bakterie *Wolbachia* (Nováková et al., 2017). Míra inhibice patogenu je však ovlivňována celkovým složením mikrobiálních komunit. Některé druhy bakterií mohou potlačovat svůj výskyt v hostiteli navzájem (Hughes et al., 2014). Dalším faktorem ovlivňující složení bakteriálních komunit mohou být i podmínky prostředí nejen z hlediska výživy, ale i z hlediska okolní teploty, která také ovlivňuje míru zastoupení některých komunit v hostiteli. Jako příklad může opět sloužit bakterie *Wolbachia* jejíž zastoupení může se zvyšující se teplotou klesat (Nováková et al., 2017). Ze studie Lu et al. (2012) vyplývá, že míra zastoupení například bakterie *Wolbachia* je pro její působení na patogeny, konkrétně na virus Dengue, zásadní. Proto je důležité znát co nejlépe celkové složení mikrobiomu hostitele jako jednotlivce a vzájemné vztahy

bakteriálních komunit pro určení epidemiologického významu různých druhů patogenů a možnost reagovat na jejich šíření v populaci lidí použitím přístupů, které by účinně likvidovali jejich následný výskyt v lidské populaci. Poolování vzorků však nenabízí možnost determinovat přesné složení bakteriálních komunit a jejich míru zastoupení, která je pro řešení tohoto problému zásadní. Tento přístup poskytuje pouze informaci o výskytu a míře zastoupení patogenu nebo bakteriálních komunit v populaci.

Poolování vzorků tedy může být výhodné, pokud chceme zjistit přítomnost patogenů nebo infekce v populaci hostitele, jelikož jsme schopni zahrnout větší množství jedinců, čímž se zvyšuje pravděpodobnost detekce infekce nebo patogenu v populaci (Gu et al., 2008). Tato metoda je také méně finančně a časově náročná (Ko et al., 1991). Výsledky takových studií jsou používány pro určení vektorové kapacity různých druhů komárů v přenosu arbovirů (Gu et al., 2004).

Jedním z hlavních problémů stále zůstává finanční stránka věci. Pokud by bylo možné snížit ekonomické náklady na izolaci DNA z jednotlivce, bylo by to tím nejlepším řešením, jelikož tento přístup je nejlepším řešením problematiky korelace mikrobiomových profilů tripartitního komplexu mezi hostitelem, jeho symbiontem a patogenem. Do budoucna by se dal problém se ztrátou identity jedince v poolovaném vzorku vyřešit molekulárním označením genetické informace jednotlivce, díky čemuž by bylo možné po sekvenaci zpětně identifikovat konkrétního jedince a složení jeho bakteriálních komunit i se zastoupením patogenů.

6 Závěr

Komáři (čeleď Culicidae) jsou přenašeči patogenů, které mohou u lidí vyvolat smrtelně nebezpečné nemoci. Jejich vektorová kapacita je ovlivňována složením střevních bakteriálních komunit. Tyto bakteriální komunity mohou být děděny z předchozích generací nebo mohou být získány z prostředí. V této práci jsem provedla metodologickou revizi dosavadní praxe s využitím amplikonového sekvenování na Illumina platformách. Nejlepším preservačním činidlem z hlediska průměrné koncentrace a výsledků richness byl Nap purf. Pro realistický popis střevního mikrobiomu komárů mohou být jedinci použiti vcelku, jelikož mikrobiom střeva výrazně dominuje vzorku DNA izolované z celého jedince. Metoda poolování není vhodná pro jakékoli korelace mikrobiomových profilů. Při poolování vzorků dochází ke ztrátě identity komára a souvislostí v tripartitním komplexu komár jako hostitel, jeho symbionty a patogenem.

7 Použitá literatura

- Aydt, H., Turner, S. J., Cai, W., & Low, M. Y. H. (2008). Symbiotic simulation systems: An extended definition motivated by symbiosis in biology. In *Principles of Advanced and Distributed Simulation, 2008. PADS'08. 22nd Workshop on* (pp. 109-116). IEEE.
- Azambuja, P., Garcia, E. S., & Ratcliffe, N. A. (2005). Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in parasitology*, *21*(12), 568-572.
- Burke, C. M., & Darling, A. E. (2016). A method for high precision sequencing of near full-length 16S rRNA genes on an Illumina MiSeq. *Peer J*, *4*, e2492.
- Camacho-Sanchez, M., Burraco, P., Gomez-Mestre, I., & Leonard, J. A. (2013). Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Molecular ecology resources*, *13*(4), 663-673.
- Cirimotich, C. M., Dong, Y., Clayton, A. M., Sandiford, S. L., Souza-Neto, J. A., Mulenga, M., & Dimopoulos, G. (2011). Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science*, *332*(6031), 855-858.
- Claesson, M. J., Wang, Q., O'sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J. R., Ross, R. P., & O'toole, P. W. (2010). Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic acids research*, gkq873.
- Clyde, K., Kyle, J. L., & Harris, E. (2006). Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *Journal of virology*, *80*(23), 11418-11431.
- Coffey, L. L., Failloux, A. B., & Weaver, S. C. (2014). Chikungunya virus – vector interactions. *Viruses*, *6*(11), 4628-4663.
- Condotta, S. A., Hunter, F. F., & Bidochka, M. J. (2004). West Nile virus infection rates in pooled and individual mosquito samples. *Vector-Borne & Zoonotic Diseases*, *4*(3), 198-203.
- Cooper, R. D. (1998). Preservation of anopheline mosquitoes for DNA probe analysis. *Journal of the American Mosquito Control Association-Mosquito News*, *14*(1), 58-60.

- Currie, C. R., Bot, A. N. M., & Boomsma, J. J. (2003). Experimental evidence of a tripartite mutualism: bacteria protect ant fungus gardens from specialized parasites. *Oikos*, *101*(1), 91-102.
- Dale, C., & Maudlin, I. (1999). *Sodalis gen. nov.* and *Sodalis glossinidius sp. nov.*, a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *49*(1), 267-275.
- Damiani, C., Ricci, I., Crotti, E., Rossi, P., Rizzi, A., Scuppa, P., Capone, A., Ulissi, U., Epis, S., Genchi, M., Sagnon, N., Faye, I., Kang, A., Chouaia, B., Whitehorn, C., Moussa, G. W., Mandrioli, M., Esposito, F., Sacchi, L., Bandi, C., Daffonchio, D., Favia, G. & Sagnon, N. F. (2010). Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microbial ecology*, *60*(3), 644-654.
- Damiani, C., Ricci, I., Crotti, E., Rossi, P., Rizzi, A., Scuppa, P., Esposito, F., Bandi, C., Daffonchio, D. & Favia, G. (2008). Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors. *Current Biology*, *18*(23), R1087-R1088.
- *De Bary A. Die Erscheinung der Symbiose. Strassburg: Verlag von Karl J. Trubner, 1879. 30 S.
- Dennison, N. J., Jupatanakul, N., & Dimopoulos, G. (2014). The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Current opinion in insect science*, *3*, 6-13.
- Dong, Y., Manfredini, F., & Dimopoulos, G. (2009). Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS pathogens*, *5*(5), e1000423.
- Dorfman, R. (1943). The detection of defective members of large populations. *The Annals of Mathematical Statistics*, *14*(4), 436-440.
- Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual review of entomology*, *43*(1), 17-37.
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, *37*(5), 699-735.

- Fang, J. (2010). A world without mosquitoes: eradicating any organism would have serious consequences for ecosystems--wouldn't it? Not when it comes to mosquitoes. *Nature*, 466(7305), 432-435.
- Favia, G., Ricci, I., Damiani, C., Raddadi, N., Crotti, E., Marzorati, M., Rizzi, A., Urso, R., Brusetti, L., Borin, S. & Mora, D. (2007). Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(21), 9047-9051.
- Favia, G., Ricci, I., Marzorati, M., Negri, I., Alma, A., Sacchi, L., Bandi, C. & Daffonchio, D. (2008). Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. In *Transgenesis and the Management of Vector-Borne Disease* (pp. 49-59). Springer New York.
- Foster, W. A. (1995). Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annual review of entomology*, 40(1), 443-474.
- Gaunt, M. W., Sall, A. A., de Lamballerie, X., Falconar, A. K., Dzhibanian, T. I., & Gould, E. A. (2001). Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *Journal of General Virology*, 82(8), 1867-1876.
- Gendrin, M., & Christophides, G. K. (2013). The *Anopheles* mosquito microbiota and their impact on pathogen transmission. *Anopheles mosquitoes-New insights into malaria vectors*, 10, 55107.
- Gray, S. M., & Banerjee, N. (1999). Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(1), 128-148.
- Gu, W., Lampman, R., & Novak, R. J. (2004). Assessment of arbovirus vector infection rates using variable size pooling. *Medical and veterinary entomology*, 18(2), 200-204.
- Gu, W., Unnasch, T. R., Katholi, C. R., Lampman, R., & Novak, R. J. (2008). Fundamental issues in mosquito surveillance for arboviral transmission. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(8), 817-822.
- Gusmão, D. S., Santos, A. V., Marini, D. C., Bacci, M., Berbert-Molina, M. A., & Lemos, F. J. A. (2010). Culture-dependent and culture-independent characterization of

microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta tropica*, 115(3), 275-281.

Hayashi, K. (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *Genome Research*, 1(1), 34-38.

Hoffmann, A. A., Montgomery, B. L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P. H., Muzzi, F., Muzzi, F., Greenfield, M., Durkan, M., Leong, Y. S., Dong, Y., & Cook, H. (2011). Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, 476(7361), 454-457.

Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X. Y., & Fukatsu, T. (2010). *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(2), 769-774.

Hughes, G. L., Dodson, B. L., Johnson, R. M., Murdock, C. C., Tsujimoto, H., Suzuki, Y., Patt, A. A., Cui, L., Nossa, C. W., Barry, R. M., & Sakamoto, J. M. (2014). Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(34), 12498-12503.

Chavshin, A. R., Oshaghi, M. A., Vatandoost, H., Yakhchali, B., Zarenejad, F., & Terenius, O. (2015). Malpighian tubules are important determinants of *Pseudomonas* transstadial transmission and longtime persistence in *Anopheles stephensi*. *Parasites & vectors*, 8(1), 36.

Janeh, M., Osman, D., & Kambris, Z. (2017). Damage-Induced Cell Regeneration in the Midgut of *Aedes albopictus* Mosquitoes. *Scientific Reports*, 7.

Khan, S. A., Chowdhury, P., Choudhury, P., & Dutta, P. (2017). Detection of West Nile virus in six mosquito species in synchrony with seroconversion among sentinel chickens in India. *Parasites & Vectors*, 10(1), 13.

Ko, Y. C., Lan, S. J., Yen, Y. Y., & Chen, W. J. (1991). Efficiency gains from the use of sample pooling technique: a theoretical example of dengue virus detection in vector. *Gaoxiong yi xue ke xue za zhi= The Kaohsiung journal of medical sciences*, 7(2), 49-55.

- Kramář, J. (1958). *Fauna ČSR: Komáři bodaví*. Praha: Československá akademie věd.
- Lederberg, J., & McCray, A. T. (2001). Ome SweetOmic--A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist*, 15(7), 8-8.
- Lehane, M. J. (2005). *The biology of blood-sucking in insects*. Cambridge University Press.
- Leung, T. L. F., & Poulin, R. (2008). Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. *Vie et Milieu*, 58(2), 107.
- Lindh, J. M., Borg-Karlson, A. K., & Faye, I. (2008). Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water. *Acta tropica*, 107(3), 242-250.
- Lohe, A. R., Moriyama, E. N., Lidholm, D. A., & Hartl, D. L. (1995). Horizontal transmission, vertical inactivation, and stochastic loss of mariner-like transposable elements. *Molecular biology and evolution*, 12(1), 62-72.
- Lou, J. J., Mirsadraei, L., Sanchez, D. E., Wilson, R. W., Shabihkhani, M., Lucey, G. M., ... & Yong, W. H. (2014). A review of room temperature storage of biospecimen tissue and nucleic acids for anatomic pathology laboratories and biorepositories. *Clinical biochemistry*, 47(4), 267-273.
- Lu, P., Bian, G., Pan, X., & Xi, Z. (2012). *Wolbachia* induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(7), e1754.
- Minard, G., Mavingui, P., & Moro, C. V. (2013). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & vectors*, 6(1), 146.
- Minard, G., Tran, F. H., Dubost, A., Tran-Van, V., Mavingui, P., & Valiente Moro, C. (2014). Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus*: a pilot study. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 59.
- Mohanty, I., Rath, A., Mahapatra, N., & Hazra, R. K. (2016). *Wolbachia*: A biological control strategy against arboviral diseases. *Journal of Vector Borne Diseases*, 53(3), 199.

- Moncayo, A. C., Lerdthusnee, K., Leon, R., Robich, R. M., & Romoser, W. S. (2005). Meconial peritrophic matrix structure, formation, and meconial degeneration in mosquito pupae/pharate adults: histological and ultrastructural aspects. *Journal of medical entomology*, 42(6), 939-944.
- Muturi, E. J., Ramirez, J. L., Rooney, A. P., & Kim, C. H. (2017). Comparative analysis of gut microbiota of mosquito communities in central Illinois. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(2), e0005377.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.
- Nováková, E., Woodhams, D. C. W., Rodriguez-Ruano, S. M., Brucker, R. M., Leff, J. W., Maharaj, A., Amir, A., Knight, R., & Scott, J. (2017). Mosquito Microbiome Dynamics, a Background for Prevalence and Seasonality of West Nile Virus. *Frontiers in Microbiology*, 8, 526.
- Osta, M. A., Christophides, G. K., Vlachou, D., & Kafatos, F. C. (2004). Innate immunity in the malaria vector *Anopheles gambiae*: comparative and functional genomics. *Journal of experimental biology*, 207(15), 2551-2563.
- Rossi, P., Ricci, I., Cappelli, A., Damiani, C., Ulissi, U., Mancini, M. V., Valzano, M., Capone, A., Epis, S., Crotti, E., & Chouaia, B. (2015). Mutual exclusion of *Asaia* and *Wolbachia* in the reproductive organs of mosquito vectors. *Parasites & vectors*, 8(1), 278.
- Rozkošný, R. (1980). *Klíč vodních larev hmyzu*. Praha: Academia.
- Ryšavý, B., Zpěvákova-Sokoltová, H., & Zpěvák, I. (1989). *Základy parazitologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství.
- Sharon, G., Segal, D., Ringo, J. M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I., & Rosenberg, E. (2010). Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46), 20051-20056.

- Shen, Z., & Jacobs-Lorena, M. (1998). A Type I Peritrophic Matrix Protein from the Malaria Vector *Anopheles gambiae* Binds to Chitin CLONING, EXPRESSION, AND CHARACTERIZATION. *Journal of Biological Chemistry*, 273(28), 17665-17670.
- Shin, S. C., Kim, S. H., You, H., Kim, B., Kim, A. C., Lee, K. A., Yoon, J. H., Ryu, J. H., & Lee, W. J. (2011). *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science*, 334(6056), 670-674.
- Schirmer, M., Ijaz, U. Z., D'Amore, R., Hall, N., Sloan, W. T., & Quince, C. (2015). Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic acids research*, gku1341.
- Schwartz, D. C., & Cantor, C. R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *cell*, 37(1), 67-75.
- Sinkins, S. P. (2013). *Wolbachia* and arbovirus inhibition in mosquitoes. *Future microbiology*, 8(10), 1249-1256.
- Song, B. H., Yun, S. I., Woolley, M., & Lee, Y. M. (2017). Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *Journal of Neuroimmunology*.
- Stevens, C. E., Beasley, R. P., Tsui, J., & Lee, W. C. (1975). Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *New England Journal of Medicine*, 292(15), 771-774.
- Moro, C. V., Tran, F. H., Raharimalala, F. N., Ravelonandro, P., & Mavingui, P. (2013). Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC microbiology*, 13(1), 70.
- Van den Hurk, A. F., Hall-Mendelin, S., Pyke, A. T., Frentiu, F. D., McElroy, K., Day, A., Higgs, S., & O'Neill, S. L. (2012). Impact of *Wolbachia* on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(11), e1892.
- Vitek, C. J., Richards, S. L., Robinson, H. L., & Smartt, C. T. (2009). A Model to Assess the Accuracy of Detecting Arboviruses in Mosquito Pools. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 25(3), 374-378.

- Wada-Katsumata, A., Zurek, L., Nalyanya, G., Roelofs, W. L., Zhang, A., & Schal, C. (2015). Gut bacteria mediate aggregation in the German cockroach. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(51), 15678-15683.
- Walters, W., Hyde, E. R., Berg-Lyons, D., Ackermann, G., Humphrey, G., Parada, A., Gilbert, J. A., Jansson, J. K., Caporaso, J. G., Fuhrman, J. A., & Apprill, A. (2016). Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. *mSystems*, *1*(1), e00009-15.
- Wang, P., & Granados, R. R. (2001). Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Archives of insect biochemistry and physiology*, *47*(2), 110-118.
- Wang, Y., Gilbreath III, T. M., Kukutla, P., Yan, G., & Xu, J. (2011). Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PloS one*, *6*(9), e24767.
- Wang, S., Ghosh, A. K., Bongio, N., Stebbings, K. A., Lampe, D. J., & Jacobs-Lorena, M. (2012). Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(31), 12734-12739.
- Weiss, B., & Aksoy, S. (2011). Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in parasitology*, *27*(11), 514-522.
- Yun, S. I., & Lee, Y. M. (2014). Japanese encephalitis: the virus and vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*, *10*(2), 263-279.
- Yun, J. H., Roh, S. W., Whon, T. W., Jung, M. J., Kim, M. S., Park, D. S., Yoon, Ch., Nam, Y. D., Kim, Y. J., Choi, J. H., & Kim, J. Y. (2014). Insect gut bacterial diversity determined by environmental habitat, diet, developmental stage, and phylogeny of host. *Applied and environmental microbiology*, *80*(17), 5254-5264.
- Zug, R., & Hammerstein, P. (2012). Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PloS one*, *7*(6), e38544.

* Označené zdroje jsou citovány podle současné literatury, nikoli na základě četby původní práce.