

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

Intracelulární symbionti krevsajících dvoukřídлых skupiny  
**Hippoboscoidea**

Bakalářská práce

Eva Šochová

Školitel: RNDr. Filip Husník

České Budějovice 2014

Šochová, E., 2014: Intracelulární symbionti krevsajících dvoukřídých skupiny Hippoboscoidea. [The intracellular symbionts of blood-feeding Diptera group Hippoboscoidea. Bc. Thesis, in Czech.] – 63 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Blood-sucking parasites from the Hippoboscoidea group (Insecta: Diptera) harbor symbiotic bacteria providing them with B-vitamins and cofactors missing from their blood diet. Although including medically important vectors such as tsetse flies, evolutionary history of symbiosis in the whole group is poorly understood. This thesis is focused on analysis of symbionts in the Hippoboscidae family (parasites of birds and mammals). Phylogenetic approach was employed to determine lineages of obligatory and facultative symbionts present in this group. Results of the study indicate that relationships between Hippoboscoidea and their symbionts are extremely dynamic with frequent replacements of obligate symbionts. To which extent is this dynamic evolutionary history of symbiotic systems in Hippoboscoidea caused by features of their parasitic lifestyle (e.g. host switches from mammals to birds) will be an interesting question for further studies.

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 – diplomové] práce, a to [v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou] elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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, 25. dubna 2014

Eva Šochová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Filipu Husníkovi za cenné a užitečné rady při laboratorní práci a provádění fylogenetických analýz, Evě Novákové za poskytnutí jejích dat, Alimu Halajjanovi a Kateřině Sam za sbírání vzorků klošů.

## Obsah

1.	Úvod	1
1.1.	Symbióza	1
1.2.	Obligátní a fakultativní symbionti hmyzu	1
1.3.	Nejčastější symbionti skupiny Hippoboscoidea	2
1.3.1.	<i>Arsenophonus</i> (Gammaproteobacteria: Enterobacteriaceae)	3
1.3.2.	<i>Sodalis</i> (Gammaproteobacteria: Enterobacteriaceae)	4
1.3.3.	<i>Wolbachia</i> (Alphaproteobacteria: Rickettsiaceae)	6
1.4.	Hippoboscoidea (Insecta: Diptera)	7
1.4.1.	Glossinididae	8
1.4.2.	Nycteribiidae a Streblidae	12
1.4.3.	Hippoboscidae	13
2.	Cíle	15
3.	Materiály a metody	16
3.1.	Vzorky a izolace DNA	16
3.2.	Polymerázová řetězová reakce	18
3.3.	Gelová elektroforéza	20
3.4.	Klonování a transformace	21
3.5.	Skládání sekvencí	21
3.6.	Alignmenty a fylogenetické analýzy	22
3.7.	MLST analýza wolbachie	23
3.8.	Mitochondriální genomy	23
4.	Výsledky	23
4.1.	Sekvence a fylogenetické stromy	23
4.2.	Mitochondriální genomy	24
5.	Diskuze	33
5.1.	Robustní fylogeneze hostitelů – zásadní faktor pro mapování evoluce symbiózy	33
5.2.	16S rRNA gen a jeho použitelnost pro fylogeneze symbiotických bakterií	36
5.3.	Dynamika vztahů symbiont-parazit(Hippoboscoidea)-hostitel	36
5.4.	Jaká je role Wolbachie v krevsajícím hmyzu?	38
6.	Závěr	39
7.	7. Přílohy	39
8.	8. Elektronické přílohy	41
9.	9. Seznam použité literatury	41

## 1. Úvod

### 1.1. Symbióza

Termín symbióza byl poprvé použit Antonem de Barrym v polovině 19. století jako „*soužití různých druhů*“. Zásadními symbiotickými kroky evoluce bylo pozření jedné prokaryotické buňky jinou prokaryotickou buňkou za vzniku buňky eukaryotické a jejích organel, mitochondrií a plastidů (Margulis, 1973). Symbióza je všudypřítomná asociace týkající se většiny organismů, od Archea přes Bacteria až po Eucaryota. Houby vytváří asociace typu mykorhiza (Wilkinson, 2001) nebo se podílí na vzniku lišejníků. Rostliny využívají opylovače a roznašeče semen, nebo hlízkové bakterie pro fixaci dusíku (Jones et al., 2007). Člověk například využil domestikace hospodářských zvířat a plodin v zemědělství. Střevní mikrobiom a genom hostitele tvoří koadaptovaný komplex, hologenom, který je důležitý pro speciaci a je považován za jednotku selekce v evoluci (Zilber-Rosenberg & Rosenberg, 2008; Brucker & Bordenstein, 2013).

### 1.2. Obligátní a fakultativní symbionti hmyzu

Obligátní symbionti jsou nutní pro podporu normálního vývoje hostitele (Moran et al., 2008). Obligátní symbionti poskytují svým hostitelům látky chybějící nebo nedostatečně zastoupené v jejich potravě (Baumann, 2005). Vyskytují se především u hmyzu sajícího na rostlinách, kde doplňují esenciální aminokyseliny chybějící ve floému a xylému (Douglas et al., 1998; Baumann, 2005), a u obligátně krevsajících členovců, kterým poskytují B vitamíny a kofaktory (Aksoy, 2003). Jejich výskyt v hostiteli je omezen na specializovaný orgán zvaný bakteriom, který je tvořený skupinou specializovaných buněk hostitele zvaných bakteriocyty. Bakteriom může být tvořen z buněk tukového tělesa, buněk střevní stěny nebo vysoce specializovanými buňkami, které jsou vývojově určeny v embryu (Buchner, 1965; Braendle et al., 2003). Obligátní symbionti jsou přenášeni vertikálně a ko-divergují se svým hostitelem, protože jejich asociace s hostitelem vznikla před miliony let. Obligátní symbionti jsou nutní pro vývoj a reprodukci hostitele, a proto nedochází příliš často k jejich úplné ztrátě (Moran et al., 2008), spíše jsou nahrazeni jinou linií symbionta, nebo doplněni dalším obligátním ko-symbiontem. Tyto příklady jsou známy téměř ze všech symbiotických skupin hmyzu a jsou nejlépe zmapované pro skupinu Auchenorrhyncha (Moran et al., 2005;

McCutcheon et al., 2009; Koga et al., 2013). Mikroorganismem, který nahrazuje, nebo doplňuje, obligátního symbionta a přebírá jeho funkci, může být velmi často fakultativní symbiont. Pro obligátní symbionty je typická extrémní redukce genomu. Také je pro ně běžné zastoupení nukleotidů bohaté na adenin a thymin. Dalším charakteristickým znakem je rychlá evoluce sekvencí, která vede k zrychlení substituce aminokyselin ve všech genech. U obligátních symbiontů chybí mobilní elementy, bakteriofágové, většina repetitivní DNA a také obsahují málo pseudogenů (Moran et al., 2008).

Fakultativní symbionti tvoří heterogenní skupinu s ohledem na jejich funkci i lokalizaci v hostiteli (Baumann, 2005). Fakultativní symbionti nejsou nutní pro reprodukci hostitele (Moran et al., 2008). Jsou podobní invazivním patogenům svou schopností napadat různé buňky včetně reprodukčních orgánů a také se vyskytují v hemolymfě (Dobson et al., 1999; Fukatsu et al., 2000). Pro zajištění úspěšného šíření ovlivňují fakultativní symbionti hostitelův fenotyp dvěma způsoby. V prvním případě zvyšují hostitelovu životnost, například ochranou proti přirozeným nepřítelům, nepříznivým environmentálním podmínkám jako je teplota (Oliver et al., 2010) a poskytováním různých metabolitů (Moran et al., 2008). Druhým mechanismem je indukce reprodukčních fenotypů. Strategií přenosu v populaci je přeměna samců na samice. Toho může být dosaženo feminizací nebo indukci thelytokie. Zvýšená produkce dcer samicí je dosažena pomocí zabíjení samců/synů (male-killing/son-killing). Poslední strategií, kterou reprodukční manipulátoři užívají je cytoplasmatická inkompatibilita (Stouthamer et al., 1999). Fakultativní symbionti se šíří horizontálním přenosem jak mezi hostiteli jednoho druhu, tak i mezi hostiteli různých druhů (O'Neil et al., 1992; Sandström et al., 2001). Vzhledem k tomu, že mnoho fylogeneticky jasně vymezených skupin symbiotických bakterií obsahuje obligátní i fakultativní symbionty, zřejmě dochází k přechodu od fakultativního k obligátnímu životnímu stylu. Obligátní symbionti se tak pravděpodobně často vyvíjí z fakultativních symbiontů, kteří ztratili schopnost horizontálního přenosu a byli domestikováni hostitelem. Genomy fakultativních symbiontů obsahují mnoho repetitivních úseků, velké množství mobilních elementů, plazmidy, bakteriofágy a geny od nich odvozené (Moran et al., 2008).

### 1.3. Nejčastější symbionti skupiny Hippoboscoidea

Níže jsem rozepsala obecnou charakteristiku třech rodů bakterií, které jsou pro skupinu Hippoboscoidea nejčastějšími symbionty. Mikrobiomy krevsajícího hmyzu jsou obecně velmi chudé. Kromě endosymbiotických bakterií může mikrobiom dále obsahovat

bakterie získané z prostředí (Geiger et al., 2009; Lindh & Lehane, 2011) nebo patogenní bakterie savců jako například *Bartonella* spp. (Morse et al., 2012b).

### 1.3.1. *Arsenophonus* (Gammaproteobacteria: Enterobacteriaceae)

Rod *Arsenophonus* vytváří polyfyletickou skupinu se širokým spektrem hostitelů a symbiotických vztahů od fakultativních reprodukčních manipulátorů ke koevolvujícím obligátním mutualistům. Zahrnuje jak fakultativní symbionty, tak obligátní symbionty, a proto v tomto rodu vzniká mnoho nejasností ve fylogenezi i taxonomii celé skupiny. Do rodu *Arsenophonus* dle fylogenetických patří symbionti, kteří byli pojmenováni vlastními názvy jako *Aschnera chinzeii* (Hosokawa et al., 2012), *Riesia pediculicola* (Sasaki-Fukatsu et al., 2006) nebo *Phlomobacter fragariae* (Zreik et al., 1998). *Arsenophonus* byl detekován především u členovců, ale také u rostlin (Tab. I).

Tab. I: Distribuce a role bakterií z rodu *Arsenophonus* v hostitelích.

Hostitel	Čeď hostitele	Fenotyp	Reference
Arthropoda	Aleyrodidae	fakultativní symbiont/mutualista	Thao et al., 2000; Thao & Baumann, 2004
	Aphididae	fakultativní symbiont	Rusell et al., 2002
	Apidae	fakultativní symbiont	Babendreier et al., 2007
	Hippoboscidae	obligátní i fakultativní symbiont	Dale et al., 2006; Trowbridge et al., 2006; Duron et al., 2014
	Ixodoidea	fakultativní symbiont	Grindle et al., 2003
	Myrmeleontoidae	fakultativní symbiont	Dunn & Stabb, 2005
	Nycteribiidae	obligátní symbiont	Hosokawa et al., 2012; Duron et al., 2014
	Pteromalidae	son-killing	Gherna et al., 1991
	Pthiridae	obligátní symbiont	Allen et al., 2007
	Strebliidae	obligátní symbiont	Trowbridge et al., 2006; Duron et al., 2014
	Psyllidae	fakultativní symbiont	Subandiyah et al., 2000; Thao et al., 2000; Spaulding & von Dohlen, 2001; Hansen et al., 2007
Rostliny	Reduviidae, Triatominae	fakultativní symbiont	Hypša & Dale, 1997; Šofrová et al., 2008
	Amaranthaceae	fytopatogeneze	Sémétey et al., 2007
	Rosaceae	fytopatogeneze	Zreik et al., 1998;

Rod *Arsenophonus* disponuje alespoň čtyřmi rozdílnými druhy fenotypu (Nováková et al., 2009). Jsou jimi son-killing u *A. nasoniae* (Gherna et al., 1991), fytopatogeneze (Zreik et al., 1998), obligátní asociace s bakteriocyty hostitele (Trowbridge et al., 2006; Allen et al., 2007; Perotti et al., 2007) a fakultativní symbióza (Thao & Baumann, 2004).

V současné době jsou dostupné dva genomy pro endosymbionta z fylogenetické linie *Arsenophonus*: *A. nasoniae* a *R. pediculicola*. Velikost genomu *A. nasoniae* je přibližně 3,5 Mb a je poměrně AT bohatý (64%). Asi deset procent genomu tvoří extrachomosomální DNA, která obsahuje fágové, profágové a plasmidové sekvence. Plasmidy *A. nasoniae* kódují mnoho skupin genů pro pili typu IV, které vykazují vysokou homologii s *tra* geny, které se účastní konjugace (Darby et al., 2010). Sekvence fágů jsou podobné se sekvencemi fágů z jiných symbiontů, jako je *S. glossinidius* a *H. defensa*. Gammaproteobakteriální symbionti jsou zřejmě schopni si mezi sebou měnit elementy fágů horizontálním přenosem genů (Degnan & Moran, 2008; Darby et al., 2010). *A. nasoniae* si zachoval mnoho metabolických drah, které jsou běžné pro volně žijící příbuzné bakterie. Přestože bičík nebyl u *A. nasoniae* nikdy pozorován (Gherna et al., 1991), genom obsahuje 49 kompletních genů bičíku rozdělených do dvou klastrů (Darby et al., 2010).

Na rozdíl od *A. nasoniae*, obligátní symbiont vši, *Riesia pediculicola*, má zřejmě funkční bičík, který může používat k migraci mezi bakterií a ovarii (Perotti et al., 2007). Genom *R. pediculicola* je redukovaný podobně jako u ostatních obligátních symbiontů. Jeho velikost je 575 kb a obsahuje jeden plasmid, který kóduje tři klíčové geny (*panB*, *panC* a *panE*) biosyntetické dráhy pro kyselinu pantothenovou (vitamin B<sub>5</sub>) (Kirkness et al., 2010).

### 1.3.2. *Sodalis* (Gammaproteobacteria: Enterobacteriaceae)

Rod *Sodalis* patří stejně jako rod *Arsenophonus* k liniím symbiotických bakterií, které si osvojily různé typy symbiózy, od fakultativního komensalismu k obligátnímu mutualismu (Heddi et al., 1998; Snyder et al., 2011;). *Sodalis* a blízké příbuzné bakterie byly popsány ze širokého spektra hmyzu, ale i jako oportunní patogen člověka (Tab. II). Endosymbionti z rodu *Sodalis* jsou známi jak z hmyzu, který se živí na rostlinách, tak z parazitů živočichů (Snyder et al., 2011). Protože nepříbuzné druhy hostitelů obsahují příbuzné druhy *sodalise*, zřejmě je tato bakterie schopná šířit se horizontálním přenosem (Chrudimský et al., 2012).



Tab. II: Distribuce a role bakterií z rodu *Sodalis* v hostitelích.

Čeď hostitele	Fenotyp	Reference
Plantae/Hominidae	oportunní patogen	Clayton et al., 2012
Aphidoidea	fakultativní symbiont	Burke, 2009
Cerambycidae	fakultativní symbiont	Grünwald et al., 2010
Cercopidae	obligátní symbiont	Koga et al., 2013
Curculionidae	fakultativní i obligátní symbiont	Campbell 1992; Conord et al., 2008; Toju et al., 2010; Toju & Fukatsu 2011
Formicidae	fakultativní symbiont	Sameshima et al., 1999
Glossinidae	fakultativní symbiont	Dale and Maudlin, 1999
Hippoboscidae	fakultativní symbiont	Nováková & Hypša 2007; Chrudimský et al., 2012
Monophlebidae	fakultativní symbiont	Rosas-Pérez et al., 2014
Pentatomidae	fakultativní symbiont	Kaiwa et al., 2010; Kaiwa et al., 2011
Phlopteridae	obligátní symbiont	Fukatsu et al., 2007
Pseudococcidae	fakultativní symbiont	Gruwell et al., 2010

Linie HS izolovaná z člověka je blíže příbuzná primárnímu symbiontovi nosatců rodu *Sitophilus* (např. *Sitophilus oryzae* primary endosymbiont; SOPE) a fakultativnímu symbiontovi skupiny Pentatomidae. Nízká rychlost evoluce molekulárních sekvencí HS linie neukazuje žádné charakteristické degenerativní změny spojené s posunem k obligátní asociaci s hostitelem, a proto by tato linie mohla být volně žijícím předkem symbiontů z rodu *Sodalis* (Clayton et al., 2012). Velikost jejího genomu je přibližně 4,7 Mb (Oakeson et al., 2014).

Ke koevoluci s hostitelem došlo u rodu *Sitophilus* a jeho symbionta *Sodalis pierantonius* str. SOPE (dříve jen SOPE) (Oakeson et al., 2014). Koevoluce začala zhruba před 20 miliony let a během ní došlo k nahrazení původního symbionta *Nardonella* sp. (Lefevre et al., 2004; Conord et al., 2008). Na rozdíl od jiných obligátních symbiontů je genom *S. pierantonius* poměrně velký (4,5 Mb) a obsahuje ohromné množství pseudogenů a mobilních elementů (Moran & Plague 2004; Plague et al. 2008). I přes relativně krátkou dobu symbiotické asociace došlo u *S. pierantonius* k rozsáhlé degeneraci genomu inaktivací genů, delecemi a přestavbami genomu. Také má zvýšenou rychlost evoluce rRNA a proteinů (Oakeson et al., 2014). Genom *S. pierantonius* obsahuje neobvykle velké množství IS elementů, které se nachází převážně v mezigenových úsecích (Clayton et al., 2012). IS zřejmě mohou hrát roli i v modulaci genové exprese nebo snižování exprese pseudogenů a také se účastnily duplikace několika chromosomálních oblastí, včetně oblastí kódujících

chaperoniny *groEL* a *groES*, a pravděpodobně zprostředkovaly mnoho delecí (Oakeson et al., 2014).

*S. pierantonius* i *S. glossinidius* prošli specifickou a nezávislou ztrátou genů v porovnání s linií HS a geny, které zůstaly zachované, jsou u obou symbiontů dost podobné, zřejmě díky podobnému stylu života (Clayton et al., 2012). *S. pierantonius* ztratil geny pro rekombinaci DNA, ale geny reparace DNA si zachoval neporušené. *S. pierantonius* je schopný syntetizovat většinu aminokyselin s výjimkou tryptofanu, methioninu a histidinu. Také je schopný syntetizovat riboflavin, NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> a koenzym A, thiamin a folát. Dráha pro syntézu pyridoxinu je nekompletní a dráha pro syntézu biotinu je poškozená pseudogenizací všech genů kromě *bioH*, který je neeseneciální. *S. glossinidius* a *S. pierantonius* se v poskytování aminokyselin a vitamínů značně liší (Oakeson et al., 2014). Může za to buď fakt, že jejich hostitelé se živí jinou potravou (Rio et al., 2003), nebo kooperace *S. glossinidius* s *W. glossinidia* v syntéze vitamínů a kofaktorů (Belda et al., 2010). *S. pierantonius* postrádá úsek SSR-1 sekrečního systému typu tří (TTSS). Rozdíly ve ztrátách různých částí TTSS v rodu *Sodalis* mohou naznačovat, že fungování TTSS se liší podle druhu symbiózy s hostitelem. Přítomnost všech tří úseků TTSS u linie HS a vysoký stupeň konzervovanosti mezi HS a *S. glossinidius* naznačuje, že je původní a nikoli získaný nezávisle horizontálním transferem (Oakeson et al., 2014). O genomice *S. glossinidius* jsem se podrobně rozepsala níže v kapitole 1. 4. 1 o symbiontech skupiny Glossinidae.

### 1.3.3. *Wolbachia* (Alphaproteobacteria: Rickettsiaceae)

*Wolbachia* je obligátně intracelulární a maternálně přenosná bakterie, která je široce rozšířena mezi členovci: Insecta 40-66 % (Hilgenboecker et al., 2008, Zug & Hammerstein, 2012), Acarina, Arachnae, Scorpiones, Isopoda a Collembola (Hilgenboecker et al., 2008; Saridaki & Bourtzis, 2010; Werren et al., 2008) a také se objevuje jako obligátní mutualista u skupin Filarioidea (Nematoda) (Taylor et al., 2005) a Cimicidae (Heteroptera) (Hosokawa et al., 2010). U hmyzu je tato bakterie lokalizována v reprodukčních tkáních a je spojena s indukci partenogeneze, feminizace, male-killing a cytoplasmatické inkompatibility (Werren et al., 2008; Saridaki & Bourtzis, 2010).

*Wolbachia* je velice různorodá skupina bakterií formálně přiřazená k jednomu druhu *Wolbachia pipientis* (Lo et al., 2007). Tento druh je klasifikován do 13 superskupin ("supergroups") od A do N, z nichž supergroup G je považována za umělý výsledek rekombinačních událostí (Zhou et al., 1998; Cheng et al., 2000; Lo et al., 2002; Gorham et

al., 2003; Rowley et al., 2004; Bordenstein & Rosengaus, 2005; Casiraghi et al., 2005; Lo et al., 2007; Ros et al., 2009; Augustinos et al., 2011). Pro jejich genotypování se používá gen *wsp* (*Wolbachia* surface protein) a MLST analýza (Multi Locus Sequence Typing) (Baldo et al., 2006; Paraskevopoulos et al., 2006).

Cytoplasmatická inkompatibilita (CI) je vysoce rozšířený efekt na reprodukci hostitele, kterým *Wolbachia* disponuje. Může být jednosměrná nebo obousměrná. Jednosměrná CI vede k letalitě embrya, pokud se infikovaný samec páří s neinfikovanou samicí, nebo samicí infikovanou jinou linií. Reciproké křížení a křížení jedinců se stejným typem nákazy jsou plně kompatibilní. Obousměrná CI se objevuje v kříženích mezi jedinci infikovanými liniemi *wolbachie* s různými vlastnostmi CI (Werren et al., 2008; Saridaki & Bourtzis, 2010). O této vlastnosti se uvažuje jako o novém nástroji ke kontrole hmyzích škůdců a přenašečů nemocí, který by byl šetrný k životnímu prostředí (Zabalou et al., 2004; Xi et al., 2005; Bourtzis & Robinson, 2006; Bourtzis, 2008; Zabalou et al., 2009; Apostolaki et al., 2011; Medlock et al., 2013;). Několik takovýchto pokusů již bylo provedeno s vysokou úspěšností (Hoffmann et al., 2011; Walker et al., 2011).

Inzerční sekvence, transpozony a sekvence bakteriofágů (WO) představují až 21 % genomů *wolbachii* (Wu et al., 2004; Klasson et al., 2008; Klasson et al., 2009b; Kent and Bordenstein, 2010). Toto dělá z *wolbachie* pravděpodobný cíl rozsáhlé škály horizontálního genového přenosu mobilních elementů, ale dosud existuje jen malé množství důkazů (Doudoumis et al., 2012; Doudoumis et al., 2013). *Wolbachia* je také jeden z nejčastějších zdrojů HGT v genomech hmyzu (Husník et al., 2013; Sloan et al., 2014).

#### 1.4. Hippoboscoidea (Insecta: Diptera)

Hippoboscoidea patří do skupiny Calypttratae, jedné z největších skupin Diptera (McAlpine, 1989). Zřejmě jsou sesterskou skupinou ke skupině Muscoidea zahrnující i Oestroidea (Nirmala et al., 2001). Hippoboscidae je skupina vysoce specializovaného ektoparazitického hmyzu, která obsahuje čtyři taxony: Glossinididae, Nycteribiidae, Streblidae a Hippoboscidae (Hennig, 1973; McAlpine, 1989). Glossinididae jsou bazální a sesterské k *Pupipara*, která je monofyletická a obsahuje ostatní tři skupiny Hippoboscoidea. Nycteribiidae a Streblidae jsou sesterské Hippoboscidae. Monofylie Streblidae nebyla dosud přesvědčivě potvrzena (Petersen et al., 2007). Všechny tyto skupiny vykazují unikátní a nápadné morfologické a fyziologické adaptace. Většina z nich je specificky spojena s jejich ektoparazitickým životem (Petersen et al., 2007). Je pro ně typická adenotrofická viviparita

(Meier et al., 1999). Jediná larva se vyvíjí v samičí děloze, kde je krmena sekrety z přídatných žláz, zvané mléčné žlázy. Třetí stadium larvy je odloženo buď jako pohyblivá larva, která se rychle zakuklí (Glossinidae, Hippoboscidae), nebo jako měkká prokukla (Streblidae, Nycteribiidae) (Hill, 1963). Glossinidae a Pupipara hostí několik odlišných linií obligátních symbiontů. Tento fakt by mohl odrážet specializaci Pupipara k pravému ektoparazitismu nebo hostitelské přeskoky ze savců na ptáky (Duron et al., 2014).

#### 1.4.1. Glossinididae

Glossinididae zahrnují pouze 22 druhů, ale jsou nejvíce studovanou skupinou Hippoboscoidea, protože jsou vektorem významných onemocnění (Krinski, 2002). Zástupci rodu *Glossina* jsou rozšířeni v tropické subsaharské Africe a jsou vektory *Trypanosoma* spp., které způsobují onemocnění Nagana u dobytka a spavou nemoc u lidí (Van den Bossche et al., 2010, Welburn et al., 2001).

V družích *Glossina* byly popsány tři hlavní symbiotické bakterie (Aksoy, 2000). První z nich je *Wigglesworthia glossinidia*. Jedná se o obligátního bakteriálního endosymbionta celé skupiny Glossinidae a jeho absence vede k samičí sterilitě (Nogge, 1976; Pais et al., 2008). Molekulárně fylogenetické analýzy ukazují, že tato symbiotická asociace je relativně stará a trvá přibližně 50-80 milionů let (Chen et al., 1999). V samicích *Glossina* spp. se nalézají dvě odlišné populace *W. glossinidia*. První z nich je lokalizována intracelulárně v bakteriocytech, které tvoří bakteriom v přední části střeva. U této populace se předpokládá, že svému hostiteli poskytuje esenciální látky jako B-vitamíny a kofaktory, které chybí v krvi obratlovců (Nogge, 1981; Aksoy, 1995; Aksoy et al., 1995; Akman et al., 2002; Wang et al., 2009). Extracelulární populace *W. glossinidia* se nachází v mléčných sekretech a v lumen mléčných žláz, jimiž je symbiont přenášen na potomstvo (Ma & Denlinger, 1974; Attardo et al., 2008; Pais et al., 2008). Velikost genomu *W. glossinidia* je 698 - 720 kb (Akman et al., 2002; Rio et al., 2012). Genom obsahuje geny, které kódují kompletní strukturu bičíku (Akman et al., 2002). Geny bičíku (*fliC*, *motA*) jsou vysoce exprimovány v extracelulární populaci mléčných žláz, ale nikoli v intracelulární populaci bakteriomu (Rio et al., 2012). Exprese genů bičíku v mléčných žlázách byla spekulována jako mechanismus vertikálního přenosu bakterie ze samice do vyvíjející se larvy v děloze (Wang et al., 2013).

*W. glossinidia* poskytuje svému hostiteli dvě funkční výhody. První z nich je syntéza látek. Ačkoli její genom není velký, kóduje neobvykle mnoho biosyntetických drah pro

výrobu B-vitaminů a kofaktorů (Akman et al., 2002; Rio et al., 2012), především biotinu, thiazolu, kyseliny lipoové, riboflavinu, folátu, pantothenátu, thiaminu, pyridoxinu a protohemu (Wang et al., 2013).

Druhá potenciální funkce *W. glossinidia* je indukce imunity hostitele. Pouze 1-5% much tsetse je schopno přenášet trypanozomu v přírodních populacích (Aksoy et al., 2003). Resistence Glossinidae vůči nákaze tímto parazitem je ovlivněna i jejich vnitřním mikrobiomem (Weiss et al., 2013). *W. glossinidia* ovlivňuje proces imunitního zrání v larválních a juvenilních stádiích a má vliv na fagocytární hemocyty (Weiss et al., 2006; Pais et al., 2008; Weiss et al., 2011; Weiss et al., 2012). *S. glossinidius* a *Wolbachia* zřejmě k imunitnímu zrání přispívají jen omezeně (Weiss et al., 2012). *W. glossinidia* zřejmě ovlivňuje vektorovou kompetenci parazita regulací hostitelské humorální imunity (Wang et al., 2009). Ochranou tak energeticky náročného procesu, jako je parazitární infekce, může tento obligátní symbiont nepřímo profitovat z reprodukční fitness hostitele (Weiss et al., 2011). Tukové těleso a hemocyty se nejvíce účastní systemické reakce, která zahrnuje buněčné mechanismy, enkapsulaci a fagocytózu, a humorální mechanismy, syntézu antimikrobiálních peptidů, koagulaci a melanizaci (Hao et al., 2003). Proventriculus, hranice mezi stomodeem a mesodeem, produkuje peritroficičnou matrix, fyzickou bariéru, která také brání infekci trypanozomou (Weiss et al., 2013), a také exprimuje antimikrobiální peptidy (AMPs) zvláště *attacin* a *defensin*, které mají trypanocidní účinek (Hao et al., 2003; Lehane et al., 2003; Hu & Aksoy, 2005; Hu & Aksoy, 2006). Tyto dva AMPs jsou také ve vysoké míře produkovány tukovým tělesem, ale nikoli buňkami střeva, zatímco AMP *dipteracin* je produkován ve stejné míře všemi třemi tkáněmi (Hao et al., 2001; Hao et al., 2003). V komunikaci mezi proventriculem a tukovým tělesem zřejmě hrají roli reaktivní meziprodukty oxid dusnatý (NO) a peroxid vodíku (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Hao et al., 2003). Fakultativní symbiont *S. glossinidius* i obligátní symbiont *W. glossinidia* jsou vůči *attacinu* a *dipteracinu* rezistentní zřejmě díky dlouhodobé koevoluci s hostitelem (Hao et al., 2001; Hu & Aksoy et al., 2005). Peptidoglykan rozpoznávající proteiny (Peptidoglycan Recognition Proteins, PGRPs) rozpoznávají molekulární struktury na patogenech a spouští proteolytickou kaskádu pomocí signální dráhy (Imunne Deficiency Pathway; IMD). Této signální dráhy se účastní transkripční aktivátor Relish, který reguluje transkripci antimikrobiálních peptidů *attacinu*, *cecropinu* a *dipteracinu* (Lehane et al., 2003; Hu & Aksoy, 2006). Exprese těchto AMP zřejmě závisí na dostatku potravy (Akoda et al., 2009). PGRP-LB, jeden z proteinů PGRP, je exprimovaný pouze dospělci v mléčných žlázách a bakteriocytech, kde se zároveň nachází i *W. glossinidia*, a má amidázovou aktivitu recyklující peptidoglykan *W. glossinidae*.

Amidázová aktivita brání spuštění IMD dráhy, která by zničila tohoto obligátního symbionta. Tento protein je přenášen do potomka skrze mléčné sekrety samice (Wang et al., 2009; Wang & Aksoy, 2012). Také má významný trypanocidní účinek (Lehane et al., 2003; Wang et al., 2009).

Druhým symbiontem je *Sodalis glossinidius*, který hraje roli fakultativního symbionta. Tato asociace je pravděpodobně mnohem mladší, ale konkrétní datování není známo. *S. glossinidius* je rozšířen v mnoha tkáních jako je hemolymfa, slinné žlázy, mléčná žláza a také ve střevě, kde žije v těsné blízkosti místa vývoje trypanozom (Aksoy et al., 1997; Cheng & Aksoy, 1999; Dale & Maudlin, 1999). Stejně jako *W. glossinidia* je přenášen do larvy skrze mléčné sekrety samice (Attardo et al., 2008; Pais et al., 2008). Byl také nalezen i v děloze, spermatéce a tukovém tělese (Balmand et al., 2013). Na rozdíl od *W. glossinidia* je výskyt *S. glossinidius* v přírodních populacích heterogenní (Geiger et al., 2005).

Přesná funkce *S. glossinidius* v druzích rodu *Glossina* zatím nebyla vyřešena, ale uvažuje se o tom, že ovlivňuje hostitelovu životnost a citlivost k infekci trypanozomou (Dale & Welburn, 1987; Dale & Maudlin, 1999; Geiger et al., 2005; Geiger et al., 2007) a doplňuje thiamin ve spolupráci s *W. glossinidia* (Belda et al., 2010).

Velikost genomu tohoto symbionta je 4,2 Mb a tím je velmi podobná velikostem genomů volně žijících příbuzných. Přesto je až 25% jeho kódujících sekvencí tvořeno pseudogeny (Toh et al., 2006; Belda et al., 2010). Sekvence kódující geny tvoří pouze 51% chromosomu, a proto je tento genom jedním s nejmenší kódující kapacitou mezi bakteriálními genomy. Extrachromosomální DNA je tvořena třemi plasmidy pSG1, pSG2 a pSG3 a také jedním fágem ΦSG1 (Toh et al., 2006). Tato bakterie si zachovala znaky typicky spojené s patogenezí jako je například sekreční systém typu tři (type three secretion system; TTSS) organizovaný do tří úseků SSR1, SSR2 a SSR3, které byly zřejmě získány horizontálním genovým transferem a které sdílí homologie s TTSS z bakterií rodu *Salmonella* a *Yersinia*. Strukturní geny spojené s tímto systémem jsou zachované na rozdíl od genů efektorových proteinů, které jsou patogenní pro hostitelskou buňku (Toh et al., 2006). *S. glossinidius* si také zachoval některé geny kompletní struktury bičíku, který by mohl být důležitý při kolonizaci larvy v děloze (Toh et al., 2006; Wang et al., 2013).

*S. glossinidius* má modifikovaný vnější membránový protein (outer membrane protein; *ompA*), který představuje molekulární adaptaci přispívající k imunitní toleranci hostitelem (Weiss et al., 2008). Tento protein se také účastní produkce biofilmu ve střevě hostitele, který dále chrání *S. glossinidius* před imunitní reakcí hostitele (Maltz et al., 2012).

*S. glossinidius* si zachoval zřejmě spíše syntetické dráhy než degradační dráhy a jeho genom obsahuje mnoho genů pro reparaci DNA. Zachované jsou například funkční dráhy glykolýzy, glukoneogeneze, citrátového cyklu a pentózového cyklu (Toh et al., 2006). Kóduje mnoho genů pro syntézu aminokyselin mimo L-arginin (Belda et al., 2010), ale postrádá geny pro jejich degradaci. Chybí také například geny související s anaerobní respirací nebo s fermentací anaerobního laktátu a butarátu (Toh et al., 2006). *S. glossinidius* zřejmě získává thiamin od *W. glossinidia*, protože ztratil schopnost syntetizovat tento metabolit, ale zachoval si transportér k jeho získávání z prostředí (Snyder et al., 2010; Wang et al., 2013).

Genom *S. glossinidius* obsahuje několik systémů pro získávání železa, mezi nimi sideroforový systém, který syntetizuje a transportuje sideroforový achromobactin (Darby et al., 2005; Runyen-Janecky et al., 2010). Siderofory jsou železo chytající molekuly sekretované mikroorganismy. Po navázání je železo přeneseno do bakteriální buňky pomocí receptoru specifického pro siderofor (Miethke & Marahiel, 2007). *S. glossinidius* kóduje gen *fur*, jehož produkt reguluje expresi hem a železo přenášejícího systému (Sit iron acquisition) (Runyen-Janecky et al., 2010). Achromobactinový operon je exprimovaný *in vivo* v *Glossina* spp.. Tato exprese je ovlivňována přímo dostupným množstvím železa pomocí Fur represorového proteinu a přispívá za určitých podmínek k růstu symbionta. Fakt, že si tato bakterie navzdory jisté genomové degradaci zachovala regulaci exprese genu odpovídajícího na hladiny železa v prostředí, je zřejmě důležitý pro udržení v přírodních populacích hostitele (Smith et al., 2013).

Třetím symbiontem běžným v mouchách tsetse je reprodukční manipulátor, *Wolbachia pipientis*. MLST a *wsp* analýzy odhalily dvě superskupiny infikující Glossinididae. Superskupina A byla nalezena u *G. morsitans*, *G. m. centralis*, *G. pallidipes* a *G. brevipalpis*. Pouze *G. gambiensis* obsahuje superskupinu B (Zhou et al., 1998; Cheng et al., 2000; Doudoumis et al., 2012). Glossinididae v superskupině A jsou členové tří oddělených a vzdáleně příbuzných skupin, což podporuje hypotézu horizontálního přenosu *W. pipientis* z nepříbuzných taxonů, jako to bylo popsáno pro mnoho skupin členovců (Baldo et al., 2008; Raychoudhury et al., 2009; Ros et al., 2009; Salunke et al., 2010). Sesterské druhy *G. m. morsitans* a *G. m. centralis* hostí blízké příbuzné druhy wolbachie, což může být výsledek ko-divergentního procesu (Doudoumis et al., 2013). U *G. m. morsitans* byl prokázán transfer tří genů do jaderného genomu hostitele, jsou jimi *16S rRNA*, *fbpA* a *wsp* (Doudoumis et al., 2012). *Wolbachia* způsobuje silnou cytoplasmatickou

inkompatibilitu u *G. m. morsitans*. Díky tomu může být použita k zavedení požadovaných fenotypů *Glossina* ssp. v přírodních populacích (Alam et al., 2011; Medlock et al., 2013).

Mimo bakteriálních symbiontů obsahují Glossinidae DNA virus SGHV (Salivary gland Hypertrophy Virus), který způsobuje hypertrofii slinných žláz (Jaenson, 1978). Je přenášen transovariálně, ale i přes mléčné žlázy. Ve velkých titrech snižuje plodnost a životnost (Abd-Alla et al., 2011). Mikrobiom je dále většinou doplněn malým počtem několika dalších bakterií (Geiger et al., 2009; Geiger et al., 2011; Lindh & Lehane, 2011; Geiger et al., 2013).

#### 1.4.2. Nycteribiidae a Streblidae

Nycteribiidae jsou obligátní ektoparazité netopýrů s vysoce specializovanou a redukovanou tělesnou morfologií (Hennig, 1973). Streblidae jsou také obligátní ektoparazité netopýrů, ale na rozdíl od Nycteribiidae si zachovávají křídla alespoň během části svého života (McAlpine, 1989). Obě skupiny zahrnují asi 500 druhů (Petersen et al., 2007).

Během evoluce obou skupin došlo několikrát k nezávislému získávání různorodých symbiontů, alespoň jednou u Nycteribiidae a alespoň třikrát u Streblidae (Morse et al., 2013). Rod *Trichobius* (Streblidae: Trichobiinae) obsahuje symbiotickou bakterii z rodu *Arsenophonus* (Trowbridge et al., 2006; Nováková et al., 2009; Lack et al., 2011, Duron et al., 2014). Také Nycteribiinae (Nycteribiidae) hostí endosymbionta z rodu *Arsenophonus*, *Aschnera chinzeii*, která je ve fylogenetických analýzách sesterská endosymbiontovi vši primátů *Riesia pediculicola* (Hosokawa et al., 2012; Duron et al., 2014), ale může se jednat pouze o artefakt přitahování dlouhých větví (LBA, long-branch attraction). Velikost genomu tohoto symbionta je odhadována na 0,76 Mb. Symbiont se u dospělců nalézá v bakteriocytech v břišní dutině a u dospělých samic v mléčných žlázách. Tento obligátní symbiont je přenášen vertikálně (Hosokawa et al., 2012).

*Wolbachia* patřící do superskupiny F byla omezeném počtu nalezena u Nycterophylia (Streblidae) (Morse et al., 2012).

Nycteribiidae a Streblidae také hostí bakterie z rodu *Bartonella*. Rod *Bartonella* zahrnuje bakterie, které parazitují erythrocyty nebo epiteliální buňky širokého spektra savčích hostitelů, mezi nimi i člověka (Mogollon-Pasapera et al., 2009; Chomel & Kasten, 2010; Harms & Dehio, 2012). Tato bakterie byla detekována u druhů *Trichobius major* (Streblidae) (Reeves et al., 2005) a *Cyclopodia greffi greffi* (Nycteribiidae) (Billeter et al., 2012). Spektrum jejich hostitelů v obou skupinách je podle dalších výzkumů mnohem širší, kde se



šíří jak vertikálně tak i horizontálně a také je možné, že došlo k přeskoku z hostitele na jiného hostitele, a to z Rodentia na Chiroptera (Morse et al., 2012b).

#### 1.4.3. Hippoboscidae

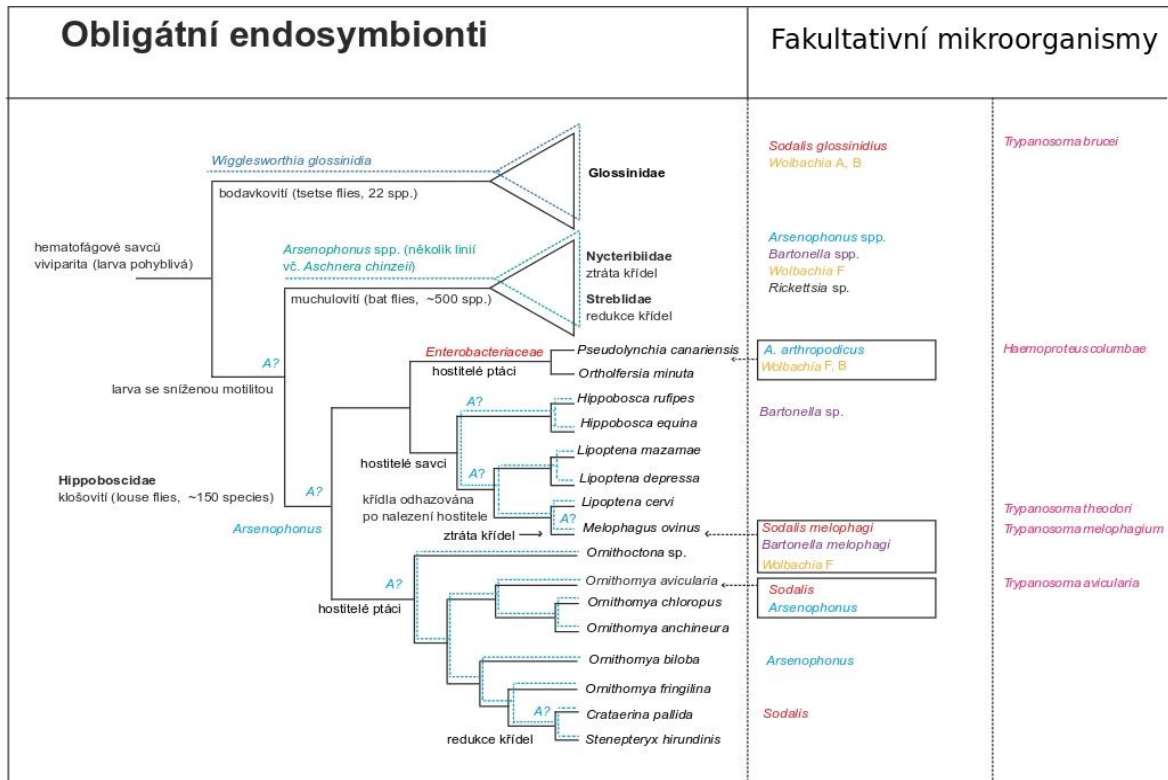
Hippoboscidae zahrnují přibližně 150 druhů. Jejich hostiteli jsou ptáci a savci (Petersen et al., 2007). U Hippoboscidae se vyskytují nejméně dvě linie symbiotické bakterie *Arsenophonus* (Duron et al., 2014). První z nich je společná jak pro Hippoboscidae, tak i Streblidae a vytváří monofyletickou skupinu obligátního symbionta v linii této bakterie. To naznačuje, že byla získána pouze jednou během evoluce Hippoboscoidea, nebo vznikla nezávisle ze stejného předka (Trowbridge et al., 2006; Duron et al., 2014). Další linie je pouze u Hippoboscidae (Duron et al., 2014). *Arsenophonus* jako obligátní symbiont se vyskytuje u druhu *Melophagus ovinus*, kde hraje podobnou roli jako *W. glossinidia* v Glossinidae (Nováková et al., nepublikováno), takže je možné předpokládat, že u dalších zástupců této skupiny bude situace obdobná. *Pseudolynchia canariensis* hostí fakultativního symbionta *Arsenophonus arthropodicus*, který je blízce příbuzný *Arsenophonus* spp. z Pteromalidae, Aphioidea a Aleyrodoidea. Velikost genomu tohoto symbionta je odhadována na 3,51 Mb. (Dale et al., 2006). Na rozdíl od *A. nasoniae*, který indukuje son-killing, *A. arthropodicus* nevykazuje žádné narušení poměru pohlaví (Dale et al., 2006; Duron et al., 2008) a infekce se vyskytuje jak u samic, tak u samců (Dale et al., 2006). Druh *Ornithomya avicularia* hostí různé linie arsenophona, který může být jak obligátní, tak fakultativní symbiont (Nováková et al., 2009) (Obr. 1). Evoluce arsenophona ve skupině Pupipara je velmi složitá a ovlivněná jak vertikálním, tak horizontálním transferem s přeskoky mezi hostiteli (Duron et al., 2014).

Druhou symbiotickou bakterií Hippoboscidae je *Sodalis*. *P. canariensis* obsahuje druhého symbionta, který je obligátní a patří do skupiny Enterobacteriaceae a který je podle publikovaných fylogenetických stromů blízce příbuzný rodům *Sodalis* a *Wigglesworthia*. Buď se jedná o ancestrálního symbionta celé skupiny, nebo nahradil předchozího symbionta (Dale et al., 2006). *Crataerina melbae* hostí linii sodalise, která je svým původem nezávislá na linii tohoto symbionta v příbuzné skupině Glossinidae, ale je více příbuzná linii z rodu *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionioidea). Toto může odrážet schopnost sodalise přeskakovat mezi různými hostitelskými skupinami. Na základě negativních PCR výsledků pro rod *Arsenophonus* bylo spekulováno, že tento *Sodalis* hraje roli obligátního symbionta (Nováková & Hypša, 2007). Tato hypotéza se ukázala být chybná (Husník, nepublikováno).

Mimo jiné blízce příbuzný *Sodalis* byl nalezen i u rodu *Ornithomya* (Hippoboscidae), což naznačuje, že mohl být zděděn z jejich společného předka. Jiný druh Hippoboscidae, *M. ovinus* také obsahuje sodalise jako fakultativního symbionta, *Sodalis melophagi*, který má původ pravděpodobně nezávislý jak na linii symbionta u Glossinididae, tak na linii symbionta u *C. melbae*. *S. melophagi* vykazuje podobnost se *S. glossinidius* v TTSS, ale tento systém je u něj mnohem jednodušší. SSR-1 kompletně chybí, SSR-2 je silně poškozen, jen SSR-3 je kompletní a možná funkční (Chrudimský et al., 2012).

Třetím známým symbiontem Hippoboscidae je *Wolbachia*, která patří do dvou superskupin, A a F (Dale et al., 2006).

Bartonellae jsou patogeni savců, které přenáší krevsající členovci. U druhu *Lipoptena cervi* byla detekována a vizualizována *Bartonella schoenbuchensis* ve středním střevě (Dehio et al., 2001, Dehio et al., 2004). U druhu *Melophagus ovinus* byla popsána *B. melophagi* (Bemis & Kania. 2007) a byl hypotetizován její vertikální přenos, ale u ostatních Lipopteninae (Hippoboscidae) tento přenos nebyl zaznamenán (Halos et al., 2004). *Bartonella* sp. během evoluce třikrát nezávisle znovu získala gen *gpsA* (glycerol-3-phosphate dehydrogenáza) od tří různých bakterií z rodů *Arsenophonus*, *Serratia* a *Helicobacter*. Přenos z arsenophona zřejmě proběhl skrze krev sajícího parazita ze skupin Siphonaptera, nebo Nycteribiidae a Streblidae. Na druhé straně *Lipoptena cervi* tento gen získala od rodu *Helicobacter* a přenos zřejmě proběhl na hostitelském savci (Zhu et al., 2014).



Obr. 1: Evoluce symbiózy ve skupině Hippoboscoidea. Autor grafického zpracování: Filip Husník. Fylogenetický strom z Petersen et al. (2007) byl modifikován na základě literární rešerše. Vzhledem k nejistotě o přesném vzniku obligátních linií, jsou potenciální vzniky symbiózy s rodem *Arsenophonus* vyznačeny symbolem A?.

## 2. Cíle

Evoluce symbiózy skupiny Hippoboscoidea je velmi nejasná. Skupina Glossinidae je bazální a má malý počet druhů, a proto se na jejím základě nedají vyvozovat obecné závěry pro celou skupinu Hippoboscoidea, i když se jí a jejím symbiontům věnuje velká pozornost, protože se jedná o významné vektory patogenů. Odvozenější skupiny Nycteribiidae, Streblidae a Hippoboscidae zahrnují mnohem více druhů, ale o jejich symbiontech jsou dostupné jen útržkové informace. To nás vedlo k provedení této práce, jejímž cílem bylo udělat analýzu symbiontů skupiny Hippoboscidae a s pomocí fylogeneze hostitelů zjistit, kteří ze symbiontů jsou obligátní mutualisté koevolvující s hostiteli a kteří reprezentují pouze fakultativní infekce.

### 3. Materiály a metody

#### 3.1. Vzorky a izolace DNA

Vzorky Hippoboscidae byly obdrženy od Ali Halaijan (University of Limpopo, Jihoafrická republika) ve dvou sběrech, lokalita sběru Jižní Afrika (Tab. III), a od Kateřiny Sam, Ph.D. (Jihočeská univerzita), lokalita sběru Papua Nová Guinea (Tab. IV). U prvního sběru z Jižní Afriky se předpokládalo, že bude možné druh hostitele určit podle dat v GenBanku. To nebylo příliš úspěšné, a proto druhý sběr z Jižní Afriky a sběr z Papuy Nové Guinei byl nafocen pro případné budoucí morfologické dourčení. Vzorky byly pro uchování uloženy do ethanolu (96 %) a zmrazeny v – 20°C. Izolace DNA byla provedena kitem podle návodu výrobce (QIAamp DNA Micro Kit, Qiagen). Koncentrace DNA byla změřena přístrojem Qubit (Invitrogen) a její kvalita byla ověřena na 1% agarosovém gelu při standartní elektroforéze.

Tab. III: Tabulka hostitelů jihoafrických Hippoboscidae.

Čeď	Druh ptáka	Pracovní kód	Lokalita odběru (A.Halaijan zatím neposkytl detaily zkratk)
Accipitridae	jestřáb tachiro ( <i>Accipiter tachiro</i> )	A2	Vernon Crookes NR, Eastern valley site, Umzinto
Accipitridae	káně lesní ( <i>Buteo buteo</i> )	B1	Mpumalanga
Accipitridae	sup bělohavý ( <i>Gyps fulvus coprotheres</i> )	G1	Blouberg Nature Reserve, Indermark, Limp prov
Accipitridae	sup bělohavý ( <i>Gyps fulvus coprotheres</i> )	G9	Blouberg Nature Reserve
Accipitridae	luněk šedý ( <i>Elanus caeruleus</i> )	E1	District road north-west of Bosveld Paradys, Limpopo
Alaudidae	skřivan bělobřichý ( <i>Calendulauda sabota</i> )	CB2	De Loskop
Alaudidae	skřivan proměnlivý ( <i>Mirafra africana</i> )	M1	De Loskop
Columbidae	holub skvrnitý ( <i>Columba Guinea</i> )	BC1	Tolwe
Columbidae	holub narůžovělý ( <i>Columba larvata</i> )	C1	Vernon Crookes NR, Waterfall site, Umzinto
Columbidae	holub skalní ( <i>Columba livia</i> )	CV2	Dep of zoology and entomology, Uni of Pretoria, Pretoria
Columbidae	holub skalní ( <i>Columba livia</i> )	C4	Botany Dep Garden, Uni of Pretoria, Pretoria

Columbidae	hrdlička senegalská ( <i>Streptopelia senegalensis</i> )	S1	Aloe Forest (site 2), Suikerbosrand NR, GP
Emberizidae	strnad skřivanovitý ( <i>Emberiza impetuani</i> )	E1	Brandvlei
Estrildidae	astrild pestrý ( <i>Pytilia melba</i> )	P8	Blouberg
Falconidae	poštolka amurská ( <i>Falco amurensis</i> )	F5	New Castle
Fringillidae	zvonohlík bělohrdlý ( <i>Serinus albogularis</i> )	S5	Brandvlei
Hirundinidae	vlaštovka menší ( <i>Cecropis abyssinica</i> )	C2	Hilltop Farm, Colenso
Laniidae	ťuhýk afrotropický ( <i>Lanius collaris</i> )	L3	Windy Hill, Wartburg 29°29'26.92" S 30°33'49.82" E
Malaconotidae	ťuhýkovec černohřbetý ( <i>Dryoscopus cubla</i> )	D2	Golwe camp
Malaconotidae	ťuhýkovec černohřbetý ( <i>Dryoscopus cubla</i> )	D3	Golwe camp
Malaconotidae	ťuhýkovec jižní ( <i>Laniarius ferrugineus</i> )	L1	EEC
Malaconotidae	ťuhýkovec jižní ( <i>Laniarius ferrugineus</i> )	L6	Levubu
Malaconotidae	ťuhýkovec jihoafrický ( <i>Telophorus zeylonus</i> )	T4	Lamberts bay
Muscicapidae	pěvec hnědokřídli ( <i>Cercotrichas leucophrys</i> )	CL4	Blouberg
Muscicapidae	drozdík kapský ( <i>Cossypha caffra</i> )	CF2	EEC
Muscicapidae	drozdík zpěvný ( <i>Cossypha dichroa</i> )	CC2	Woodbush, Polokwane, Limp prov
Muscicapidae	drozdík oranžovohlavý ( <i>Cossypha natalensis</i> )	C8	UL, Turf
Passeridae	vrabec kapský ( <i>Passer melanurus</i> )	BP8	Brandvlei
Ploceidae	snovač kaferský ( <i>Euplectes orix</i> )	E14	Brandvlei
Ploceidae	přádelník mahalský ( <i>Plocepasser mahali</i> )	P24	PNR, 1 <sup>st</sup> dam
Ploceidae	snovač žlutý ( <i>Ploceus velatus</i> )	P6	LC de Villiers sports grounds, GP
Ploceidae	snovač žlutý ( <i>Ploceus velatus</i> )	P13	Worcester
Ploceidae	snovač žlutý ( <i>Ploceus velatus</i> )	P18	De Loskop
Pycnonotidae	bulbulec zemní ( <i>Phyllastrephus terrestris</i> )	P16	Golwe camp
Pycnonotidae	bulbulec zemní ( <i>Phyllastrephus terrestris</i> )	P20	Blouberg
Sylviidae	pěnicovec krátkoocasý šedohřbetý ( <i>Camaroptera brachyura brevicaudata</i> )	CB7	Blouberg
Sylviidae	cistovník pokřovní ( <i>Cisticola chiniana</i> )	C7	PNR
Sylviidae	cistovník pokřovní ( <i>Cisticola chiniana</i> )	C10	Blouberg
Sylviidae	cistovník pokřovní ( <i>Cisticola</i> )	C12	Blouberg

	<i>chiniana</i> )		
Sylviidae	pěnice žlutohrdlá ( <i>Parisoma subcaeruleum</i> )	P5	PNR
Turdidae	drozd rudozobý ( <i>Turdus libonyanus</i> )	TB4	Blouberg
Turdidae	drozd olivový ( <i>Turdus olivaceus</i> )	T1	Windy Hill, Wartburg
Turdidae	drozd oranžovoprstý ( <i>Zoothera gurneyi</i> )	Z2	Woodbush, Polokwane, Limp prov
Turdidae	drozd oranžovoprstý ( <i>Zoothera gurneyi</i> )	Z3	Woodbush
Upupidae	dudek chocholátý ( <i>Upupa epops</i> )	U2	University of Limpopo

Tab. IV: Tabulka papuánských Hippoboscidae.

Čeď	Druh ptáka	Pracovní kód	Lokalita odběru (GPS pozice)
Alcedinidae	<i>Alcedo azurea</i>	WAN	S5 13.601 E145 05.150
Paramythiidae	<i>Paramythia montium</i>	3700	S5 47.206 E145 03.544
Rhipiduridae	<i>Rhipidura maculipectus</i>	WA3	S5 13.601 E145 05.150

### 3.2. Polymerázová řetězová reakce

Celkový objem reakční směsi byl pro každou reakci vždy stejný - 25 µl. Reakce se ale lišily reakčními podmínkami, druhem pufru, druhem polymerázy (Tab. V) a primery (Tab. VI). Složení bylo 17,2 µl dH<sub>2</sub>O, 2,5 µl pufru, 1+1 µl forward a reverse primeru, 1 µl směsi nukleotidů (Top-Bio), 0,3 µl DNA polymerázy a 2 µl DNA (u amplifikace kolonií byla použita celá kolonie místo DNA). Amplifikace byla provedena pomocí přístroje Mastercycler (Eppendorf). Jednotlivé reakční programy se lišily podle toho, zda se jednalo o hostitelské geny, nebo geny jejich symbiontů (Tab. VII).

Tab. V: Tabulka chemikálií použitých v PCR reakcích.

Druh reakce	Polymeráza	Pufr	Výrobce
Geny symbiontů/hostitelů	High Fidelity PCR Enzyme Mix	10X High Fidelity PCR Buffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	Thermo Scientific
Geny symbiontů/hostitelů	Pfu DNA Polymeráza	10x Pfu PCR Buffer (25 mM Mg SO <sub>4</sub> )	Fermentas
Geny symbiontů/hostitelů	Hot Start Tag DNA Polymeráza	10x Hot Start PCR Buffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	Qiagen
Colony PCR	Taq DNA Polymeráza	10x Taq PCR Buffer	Top-Bio

Tab. VI: Tabulka primerů použitých v PCR reakcích.

Označení	Sekvence	Produkt (reference)
F40 forward	GCGGCAAGCCTAACACAT	16S rDNA (Hypša & Křížek, 2007)
R1060 reverse	CTTAACCCAACATTTCTCAACACGAG	
16S_eubF forward	GCTTAACACATGCAAG	16S rDNA (O'Neill et al., 1992)
16S_eubR reverse	CCATTGTAGCACGTGT	
COIa9 forward	CCCGGTAAAATTTAAAATATAAACTTC	COI (Petersen et al., 2007)
COIb8 reverse	CCACATTTATTTTGATTTTTTGG	
COIa4 forward	TACAATTTATCGCCTAAACTTCAGCC	COI (Petersen et al., 2007)
CObb12	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	
A3389lep forward	TCATAAGTTCARTATCATTG	COI (Brown et al., 1999; Brown et al., 1994)
S2792lep reverse	ATACCTCGACGTTATTCAGA	
Hip16SF forward	CGCCTGTTTAACAAAAACAT	16S mt rDNA (Petersen et al., 2007)
Hip16SR reverse	TGAACTCAGATCATGTAAGAAA	
EF2 forward	GGAAAT GGGAAAAGGCTCCTTCAAGTA YGCYTGGG	EF (Moran et al., 1999)
EFS175 reverse	ATGTGAGCAGTGTGGCAATCCAA	
806F forward	GTNGTNAARATGCCNMGNTGGGA	GAD (Petersen et al., 2007)
1098R reverse	TTNGGNAGYTGNCNCCCAT	
28s rc28A forward	AGCGGAGGAAAAGAAAC	28S rDNA (Petersen et al., 2007)
28s 28C reverse	GCTATCCTGAGGGAAACTTCGG	
28s rc28B forward	CCCGTCTTGAAACACGGACC	28S rDNA (Petersen et al., 2007)
28s 28P reverse	GGCTTACGCCAAACACTTCTACGC	
28s rc28C forward	CCGAAGTTTCCCTCAGGATAGC	28Sr rDNA (Petersen et al., 2007)
28s 28E	CCTTATCCCGAAGTTACG	
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAA	Klonovaná sekvence
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
Geny wolbachie		
Označení	Sekvence	Produkt
gatB_F forward	GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT	aspartyl/glutamyl-tRNA(Gln)
gatB_R reverse	TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA	amidotransferase, subunit B (Baldo et al., 2006)
coxA_F forward	TTGGRGCRATYAACT TTATAG	cytochrome c oxidase, subunit I (Baldo et al., 2006)

coxA_R reverse	CTAAAGACTTTKACRCCAGT	
hcpA_F forward	GAAATARCAGTTGCTGCAAA	conserved hypothetical protein (Baldo et al., 2006)
hcpA_R reverse	GAA AGT YRA GCA AGY TCT G	
ftsZ_F forward	ATYATGGARCATATAAARGATAG	cell division protein (Baldo et al., 2006)
ftsZ_R reverse	TCR AGY AAT GGA TTR GAT AT	
fbpA_F forward	GCTGCTCCRCTTGGYWTGAT	fructose-bisphosphate aldolase (Baldo et al., 2006)
fbpA_R reverse	CCRCCAGARAAAAYYACTATTC	
16Swolb99F forward	TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT	16S rDNA (O'Neill et al., 1992)
16Swolb994R reverse	GAATAGGTATGATTTTCATGT	

Tab. VII: Tabulka programů PCR reakcí.

Druh reakce	Počáteční denaturace	Počet cyklů	Denaturace	Nasedání primerů	Syntéza	Finální syntéza
Geny hostitele	3 min / 95°C	30	1 min/ 94°C	1 min/ 45°C	1 min/ 72°C	10 min/ 72°C
	15 min/ 95°C	30	1 min/ 94°C	1 min/ 45°C	1 min/ 72°C	10 min/ 72°C
Geny symbionta	2 min/ 95°C	35	1 min/ 94°C	1 min/ 55°C	50 s/ 72°C	10 min/ 72°C
	15 min/ 95°C	35	1 min/ 94°C	1 min/ 55°C	50 s/ 72°C	10 min/ 72°C
Colony PCR	3 min/ 94 °C	35	1 min/ 94°C	1 min/ 50°C	1 min/ 72°C	10 min/ 72°C
Geny MLST wolbachie	2 min/ 94 °C	37	30 s/ 94°C	45 s/ 54°C	1,5 min/ 72°C	10 min/ 72°C

### 3.3. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza byla použita k oddělení fragmentů získaných v PCR a k potvrzení přítomnosti inzertů v izolovaných plazmidech štěpených restriční endonukleázou. 2,5 µl PCR produktu (nebo restriční reakce) bylo smícháno s 2,5 µl loading dye + fluorescenční barvivo SybrGreen (Invitrogen). Smíchané vzorky byly nanášeny do 1 % agarosového gelu. K přibližné determinaci velikosti DNA fragmentů byl použit DNA



ladder (O'GeneRuler 1 kb, Thermo Scientific). Gely byly vizualizovány pod UV transiluminátorem TI3 (Biometra), vyfoceny a upraveny v programu AlphaDigiDoc RT.

### 3.4. Klonování a transformace

PCR produkty pro geny symbiontů byly klonovány do vektoru pGEM®-T Easy (Promega). Ligační směs byla připravena z 0,5 µl vektoru, 2,5 µl pufru (2x rapid ligation buffer, Promega), 2 µl PCR produktu, 0,5 µl T4 ligázy (Promega) a inkubována 24 hodin při 4 °C, nebo 1,5 hodiny při 25 °C. Chemicky kompetentní buňky *Escherichia coli* DH5α (25 - 50 µl) byly rozmrazeny na ledu. Ligační směs k nim byla připipetována a směs jsem nechala inkubovat 20 minut na ledu. Transformace byla provedena tepelným šokem (42 °C) na 50 sekund v přístroji Digital Dry Bath (Labnet). Tento mix byl zchlazen na ledu po dobu 2 minut a potom bylo přidáno 175 µl ohřátého SOC média (37 °C). Buňky byly inkubovány přibližně 3 hodiny na třepačce (37 °C, 210 RPM). Transformované buňky byly rozetřeny na předehřáté Petriho misky s 1% agarem s ampicilinem, na které bylo rozetřeno 40 µl X-galu (40 mg/ml, 5-bromo-4-chloro-3-inodyl-beta-D-galactosidase, Serva). Petriho misky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

Petriho misky se několik dní nechaly v lednici pro lepší rozlišení modrých kolonií a bílé kolonie byly potom naočkovány do falkonek s LB médiem (5 ml) obsahujícím ampicilin (100 mg/l) a inkubovány 24 hodin na třepačce (37 °C, 210 RPM). Plasmidy byly izolovány kitem dle návodu výrobce (Plasmid Miniprep Spin Kit, Jetquick). Přítomnost insertu byla potvrzena štěpením plasmidů restriční endonukleázou EcoRI (Fermentas). Reakční směs se skládala z 1 µl pufru (10X FastDigest Buffer, Fermentas), 0,3 µl enzymu (FastDigest EcoRI, Fermentas), 2 µl izolovaného plasmidu a 6.7 µl ddH<sub>2</sub>O. Směs byla krátce zcentrifugována a inkubována 15 minut při 37 °C. Po restrikci byly vzorky nanášeny do 1% agarosového gelu a ověřena délka insertu.

### 3.5. Skládání sekvencí

Kvalita hrubých sekvencí byla zkontrolována v programu Geneious (Drummond et al., 2013). V programu Geneious byly také odstraněny sekvence vektoru a reverse/forward primerů, aby se zabránilo vnesení umělého signálu do fylogenetických analýz. Sekvence genů byly v tomto programu složeny do consensus sekvencí (contigů). Základní ověření

sekvencí bylo provedeno pomocí serveru NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) prohledáváním nukleotidové a proteinové databáze.

### 3.6. Alignmenty a fylogenetické analýzy

Složené sekvence byly zarovnány do alignmentu v programu Mafft (Kato et al., 2002; Kato et al., 2009) s použitím algoritmu E-INS-i. Alignmenty byly použity bez úprav a potom byly ověřeny v programu Gblocks (Castresana, 2002). Nejednoznačně zalignované pozice byly odstraněny pouze u alignmentu symbiotické bakterie *Arsenophonus*. Ke konstrukci fylogenetických stromů byly použity dvě odlišné metody. Maximum likelihood (ML) analýza byla provedena v programu PhyML v3.0 (Guindon & Gascuel, 2003; Guindon et al., 2009) a Bayesiánská analýza (BI) byla provedena s použitím programu MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001). Pro obě pravděpodobnostní metody byly evoluční modely pro evoluci proteinů a DNA ověřeny pomocí programů jModelTest (Posada, 2009) (<https://code.google.com/p/jmodeltest2>) a ProtTest (Abascal et al., 2005) (<http://darwin.uvigo.es/software/prottest.html>). Pro nukleotidové sekvence byl použit General Time Reversible (GTR) model (Rodriguez et al., 1990) s odhadnutými proporcemi invariantních pozic (I) a rozdílnou evoluční rychlostí modelovanou gamma distribucí ( $\Gamma$ ) se čtyřmi kategoriemi rychlosti substituce a s parametrem (alpha) odhadnutým z datasetu. Pro proteinová data byly použity LG model (Le & Gascuel, 2008) v ML analýzách a WAG model (Whelan & Goldman, 2001) v BI analýzách, oba dva s odhadnutými proporcemi invariantních pozic (I) a variabilní evoluční rychlostí mezi pozicemi modelovanou gamma distribucí ( $\Gamma$ ) se čtyřmi kategoriemi rychlosti substituce s parametrem (alpha) odhadnutým z datasetu. V ML analýzách byl použit Subtree pruning and regrafting (SPR) algoritmus prohledávání topologií pro snížení šance uvíznutí v lokálním maximu funkce likelihood. Pro ověření robustnosti získaných stromů byla použita Bootstrap analýza se 100 pseudoreplikacemi. BI analýzy byly puštěny na 5 milionů generací ve dvou nezávislých bězích a ukládáním každých 100 stromů. Výsledné soubory s parametry pro jednotlivé generace byly ověřeny v programu Tracer v1.6 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) a byl určen burn-in. Nezkonvergovaná část stromů byla odstraněna a byl vytvořen majoritní konsensus. V analýzách symbiontů nebyla zařazena sekvence *Sodalis pierantonius* str. SRPE, protože vytváří artefakty ve fylogenetických stromech.

### 3.7. MLST analýza wolbachie

Nukleotidové sekvence pro pět genů *M. ovinus* použitých v MLST analýze (Tab. VI), byly nejprve translatovány do proteinových sekvencí, které byly alignovány v programu Mafft (Kato et al., 2002; Kato et al., 2009) s použitím algoritmu E-INS-i. a opět převedeny do nukleotidových sekvencí. Konstrukce fylogenetických stromů proběhla podle výše uvedeného postupu v kapitole 3.6. Taxon sampling tohoto velmi diverzifikovaného rodu byl získán z MLST databáze (<http://pubmlst.org./wolbachia>) a zredukován na zástupce hlavních linií s pomocí školitele.

### 3.8. Mitochondriální genomy

Ke skládání mitochondriálních genomů nás vedl fakt, že v PCR reakcích často nefungovaly primery na mitochondriální geny (COI a 16S rRNA). V GenBanku je k dispozici jen omezený taxon sampling pro skupinu Hippoboscoidea pro navržení specifitějších primerů a z jaderných genů pouze fragmenty genů pro 28S rRNA a CAD. Contigy mitochondriálních genomů byly identifikovány v genomických datech vygenerovaných v naší laboratoři (*Melophagus ovinus*, *Lipoptena cervi*, *Ornithomya biloba*, *Crataerina pallida*) pomocí kombinace programů BlastN a tBlastN (Altschul et al., 1990). Vyhledání čtecích rámců (ORF) genů a jejich předběžnou anotaci pomocí NCBI BlastSearch jsem provedla v programu Geneious. Finální anotaci proteinů a genů pro tRNA a rRNA pro kompletní genom *M. ovinus* jsem vytvořila pomocí serveru MITOS (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/>).

## 4. Výsledky

### 4.1. Sekvence a fylogenetické stromy

Ze 48 jedinců klošů jsem pro práci použila 47 exemplářů, protože jedno ze zvířat jsem na základě morfologie a výsledku Blastu získané sekvence elongačního faktoru musela vyřadit (vzorek 3700) jako zástupce jiné skupiny (*Simulium* sp.; Chironomoidea; Nematocera). Amplifikace hostitelských genů byla dost obtížná a získala jsem sekvence pouze několika genů. Pro gen cytochrom oxidázy I jsem získala 19 sekvencí (dva různé pro

čtyři vzorky se překrývající úseky), pro elongační faktor 20 sekvencí a 1 sekvenci pro druh roztoče, který se nechává přenášet na křídlech klošů (*Promyialges* sp.; Astigmata) pro 28S rDNA 9 sekvencí, také různé úseky, a pro 16S rDNA 1 sekvenci. Gen CAD domény se mi nepovedl amplifikovat. Z amplifikace symbiontů pro gen 16S rDNA jsem získala 17 sekvencí arsenophona, 9 sekvencí sodalise a 22 sekvencí wolbachie. U 9 zvířat se mi nepovedlo získat jak geny hostitelů, tak ani geny symbiontů. Všechny získané geny hostitelů a symbiontů s vypočítaným CG obsahem jsou shrnuty v tabulce Tab. VII.

Ze získaných sekvencí symbiontů pro gen 16S rRNA jsem zkonstruovala fylogenetické stromy pro arsenophona (Obr. 2) a sodalise (Obr. 3), spočítala procentuální zastupení wolbachie a určila přibližně její fylogenetickou superskupinu. Superskupina F převažuje (64%) a patří do ní i wolbachie z *Melophagus ovinus* a *Lipoptena cervi* (zahrnut pouze *M. ovinus*, Obr. 5). Zbylé sekvence a wolbachie z *Crataerina melbae* spadají do superskupiny A nebo B, které jsou pomocí 16S rRNA genu velmi špatně rozlišitelné. Detekované superskupiny jsou uvedeny v tabulce (Tab. VII). V celkovém počtu vzorků je zastoupení wolbachie 46,8 %, kde jsou zahrnuty i vzorky, ze kterých jsem nenaamplifikovala sekvenci symbionta, ani hostitele, a 57,9 % ve vzorcích, ze kterých jsem nenaamplifikovala alespoň sekvenci hostitele, nebo symbionta.

#### 4.2. Mitochondriální genomy

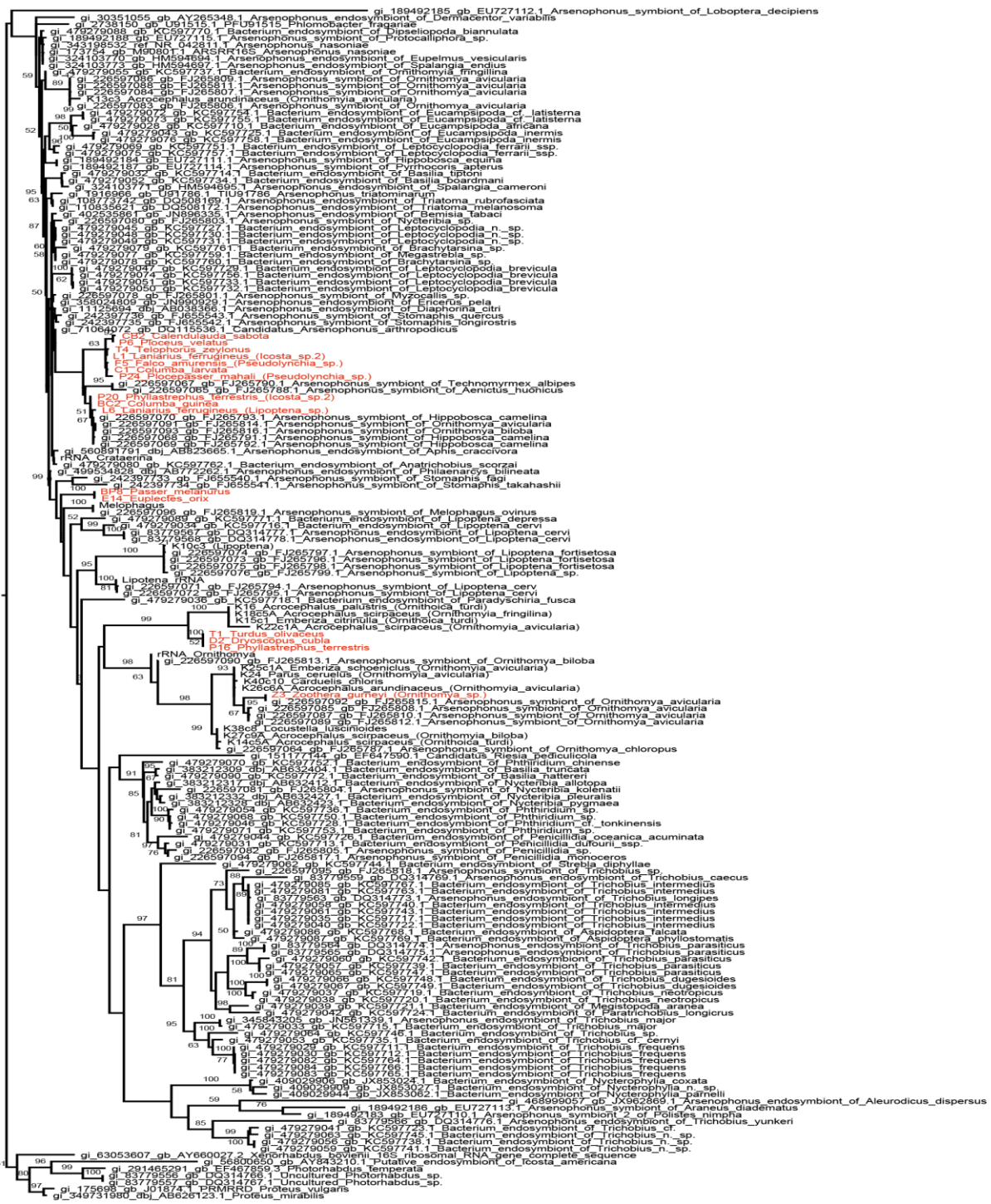
Mitochondriální genom jsem kompletně složila pro druh *Melophagus ovinus* (Obr. 4), pro další dva druhy *Ornithomya biloba* a *Crataerina pallida* byly genomy rozděleny do několika kusů (contigů). Pro druh *Lipoptena cervi* se podařilo z genomových dat získat jen několik fragmentů. Genom *O. biloba* je v deseti kusech a genom druhu *C. pallida* je v osmi kusech. K dokončení těchto dvou genomů bude nutné pomocí PCR dosekvenovat chybějící úseky a bude to předmětem mé další práce. Ze všech tří genomů jsem použila sekvenci cytochrom oxidázy I pro analýzy hostitelských genů klošů. Genom druhu *Melophagus* jsem použila k namapování zbylých dvou genomů a zantovala přítomné geny. Ve všech druzích byly nalezeny pseudogeny v jaderném genomu kloše (“nuclear mitochondrial DNA”, Numt).

Tab. VIII: Tabulka detekovaných symbiontů s jejich GC obsahem, obdržených hostitelských genů a předběžné určení hostitele (neurčený hostitelský druh kloše je značen symbolem H?). U každé detekované wolbachie je uvedena v závorce superskupina.

Čeď	Druh ptáka	Pracovní kód	Detekování symbionti	CG obsah	Hostitelské geny	Druh kloše
Accipitridae	<i>Accipiter tachiro</i>	A2	<i>Sodalis</i> , <i>Wolbachia</i> (A/B)	50,1	EF, COI	<i>Icosta</i> sp. 1
Accipitridae	<i>Buteo buteo</i>	B1	NA		NA	
Accipitridae	<i>Gyps coprotheres</i>	G1	<i>Wolbachia</i> (F)		COI	<i>Icosta</i> sp. 1
Accipitridae	<i>Gyps coprotheres</i>	G9	<i>Sodalis</i>	49,7	EF, COI	<i>Icosta</i> sp. 1
Accipitridae	<i>Elanus caeruleus</i>	E1	<i>Sodalis</i> , <i>Wolbachia</i> (F)	NA	EF, COI, 28S	<i>Pseudolynchia</i> sp.
Alaudidae	<i>Calendulauda sabota</i>	CB2	<i>Arsenophonus</i> , <i>Wolbachia</i> (F)	54,1	EF ( <i>Promyialges</i> sp.; Astigmata)	
Alaudidae	<i>Mirafra africana</i>	M1	NA		NA	
Alcedinidae	<i>Alcedo azurea</i>	WAN	<i>Sodalis</i> , <i>Wolbachia</i> (A/B)	51,1	EF	<i>Icosta</i> sp. 1
Columbidae	<i>Columba guinea</i>	BC1	<i>Arsenophonus</i>	54,7	NA	
Columbidae	<i>Columba larvata</i>	C1	<i>Arsenophonus</i> , <i>Wolbachia</i> (F)	53,9	28S	
Columbidae	<i>Columba livia</i>	CV2	<i>Sodalis</i> , <i>Wolbachia</i> (A/B)	55,4	COI	<i>Ornithomya</i> sp.
Columbidae	<i>Columba livia</i>	C4	<i>Wolbachia</i> (F)		NA	
Columbidae	<i>Streptopelia senegalensis</i>	S1	<i>Wolbachia</i> (F)		NA	
Estrildidae	<i>Pytilia melba</i>	P8	<i>Wolbachia</i> (F)		NA	
Falconidae	<i>Falco amurensis</i>	F5	<i>Arsenophonus</i> , <i>Wolbachia</i> (F)	54,0	EF, COI	<i>Pseudolynchia</i> sp.
Fringillidae	<i>Serinus albogularis</i>	S5	NA		EF	
Hirundinidae	<i>Cecropis abyssinica</i>	C2	<i>Wolbachia</i> (F)		COI	<i>Pseudolynchia</i> sp.
Laniidae	<i>Lanius collaris</i>	L3	NA		COI, 28S	<i>Icosta</i> sp. 2
Malaconotidae	<i>Dryoscopus cubla</i>	D2	<i>Arsenophonus</i>	48,9	COI, 16S	H?
Malaconotidae	<i>Dryoscopus cubla</i>	D3	NA		NA	

Malaconotidae	<i>Laniarius ferrugineus</i>	L1	<i>Arsenophonus, Wolbachia (A/B)</i>	53,8	COI	<i>Icosta</i> sp. 2
Malaconotidae	<i>Laniarius ferrugineus</i>	L6	<i>Arsenophonus, Wolbachia (F)</i>	55,1	EF	<i>Icosta</i> sp. 2
Malaconotidae	<i>Telophorus zeylonus</i>	T4	<i>Arsenophonus</i>	53,9	EF	<i>Icosta</i> sp. 2
Muscicapidae	<i>Cercotrichas leucophrys</i>	CL4	NA		NA	
Muscicapidae	<i>Cossypha caffra</i>	CF2	<i>Wolbachia (F)</i>		COI, 28S	<i>Icosta</i> sp. 2
Muscicapidae	<i>Cossypha dichroa</i>	CC2	NA		NA	
Muscicapidae	<i>Cossypha natalensis</i>	C8	<i>Sodalis</i>	49,7	EF	<i>Icosta</i> sp. 2
Paramythiidae	<i>Paramythia montium</i>	3700	NA		EF ( <i>Simulium tormentor</i> ; Chironomoidea)	
Passeridae	<i>Passer melanurus</i>	BP8	<i>Arsenophonus</i>	52,6	EF	
Ploceidae	<i>Euplectes orix</i>	E14	<i>Arsenophonus, Wolbachia (F)</i>	52,6	NA	
Ploceidae	<i>Plocepasser mahali</i>	P24	<i>Arsenophonus, Wolbachia (F)</i>	53,1	EF, COI, 28S	<i>Pseudolynchia</i> sp.
Ploceidae	<i>Ploceus velatus</i>	P6	<i>Arsenophonus, Wolbachia (F)</i>	54,5	28S	<i>Lipoptena</i> sp.
Ploceidae	<i>Ploceus velatus</i>	P13	<i>Sodalis</i>	50,5	EF	<i>Icosta</i> sp. 2
Ploceidae	<i>Ploceus velatus</i>	P18	NA		NA	
Pycnonotidae	<i>Phyllastrephus terrestris</i>	P16	<i>Arsenophonus</i>	49,3	COI, 28S	H?
Pycnonotidae	<i>Phyllastrephus terrestris</i>	P20	<i>Arsenophonus, Wolbachia (A/B)</i>	53,7	EF	<i>Icosta</i> sp. 2
Rhipiduridae	<i>Rhipidura maculipectus</i>	WA3	<i>Arsenophonus</i>	NA	EF	
Sylviidae	<i>Camaroptera brachyura brevicaudata</i>	CB7	NA		EF	
Sylviidae	<i>Cisticola chiniana</i>	C7	<i>Wolbachia (A/B)</i>		COI, 28S	<i>Icosta</i> sp. 2
Sylviidae	<i>Cisticola chiniana</i>	C10	NA		NA	
Sylviidae	<i>Cisticola chiniana</i>	C12	NA		EF	<i>Icosta</i> sp. 2
Sylviidae	<i>Parisoma subcaeruleum</i>	P5	<i>Sodalis, Wolbachia (A/B)</i>	50,3	EF, COI, 28S	<i>Icosta</i> sp. 2

Turdidae	<i>Turdus olivaceus</i>	T1	<i>Arsenophonus</i>	48,9	COI	H?
Turdidae	<i>Turdus libonyanus</i>	TB4	NA		EF	<i>Pseudolynchia</i> sp.
Turdidae	<i>Zoothera gurneyi</i>	Z2	<i>Wolbachia</i> (A/B)		COI	<i>Ornithomya</i> sp.
Turdidae	<i>Zoothera gurneyi</i>	Z3	<i>Arsenophonus</i>	51,1	EF, COI	<i>Ornithomya</i> sp.
Upupidae	<i>Upupa epops</i>	U2	<i>Sodalis</i>	47,8	EF, COI	<i>Pseudolynchia</i> sp.

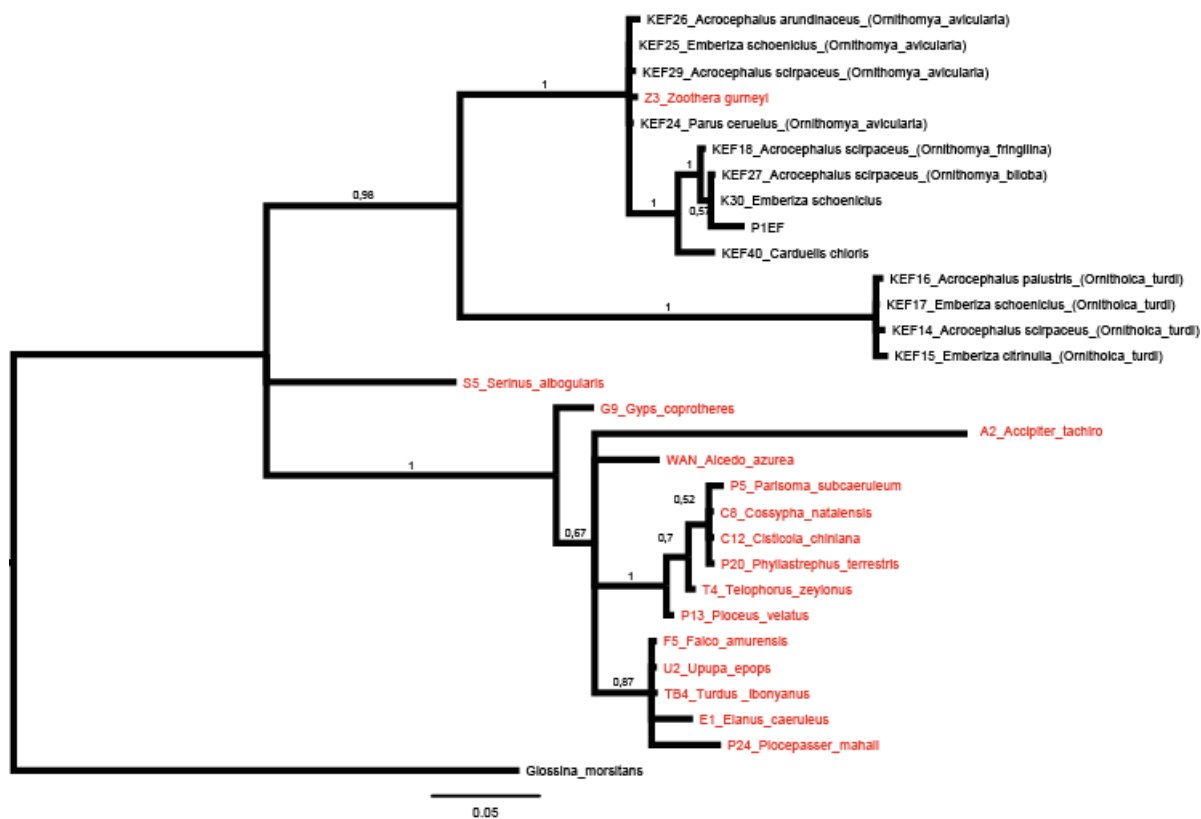


Obr. 2: Rekonstrukce evoluce bakterie *Arsenophonus* pomocí 16S rDNA. Fylogram získaný z ML analýzy v programu Phylml. Hodnoty bootstrapů jsou vyznačeny nad uzly. BI analýza po ořezání v programu Gblocks ztratila fylogenetickou informaci, proto je uložena v elektronických přílohách.. Jako outgroup byly použity volně žijící bakterie z rodů *Proteus*, *Pororhabdus* a *Xenorhabdus*. Červenou barvou jsou zvýrazněné mnou sekvenovaní symbionti, jejichž název je kombinace pracovního kódu a hostitelského druhu ptáka. Sekvence od E. Novákové jsou ve formátu KXX (hostitelský druh kloš).

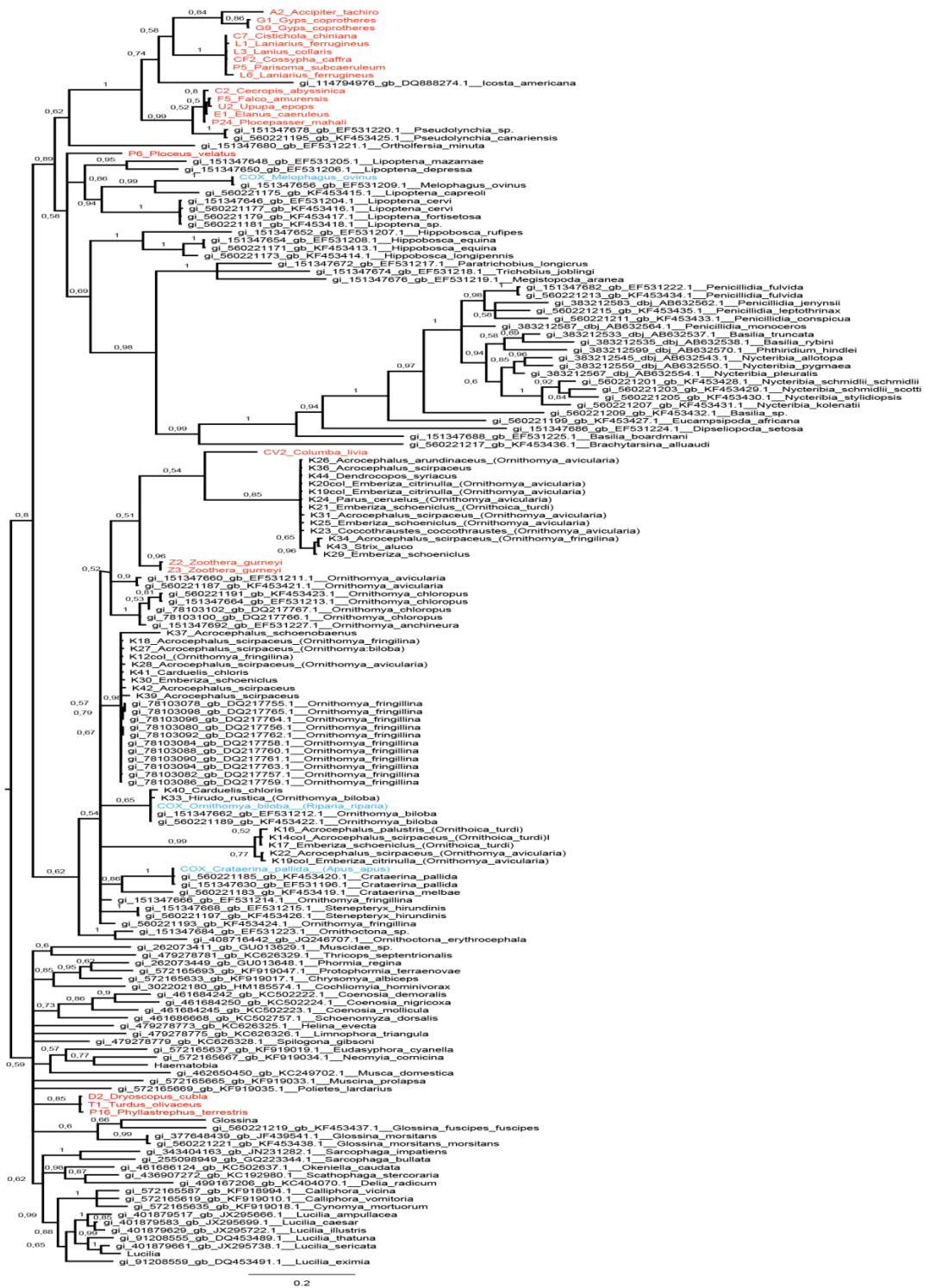




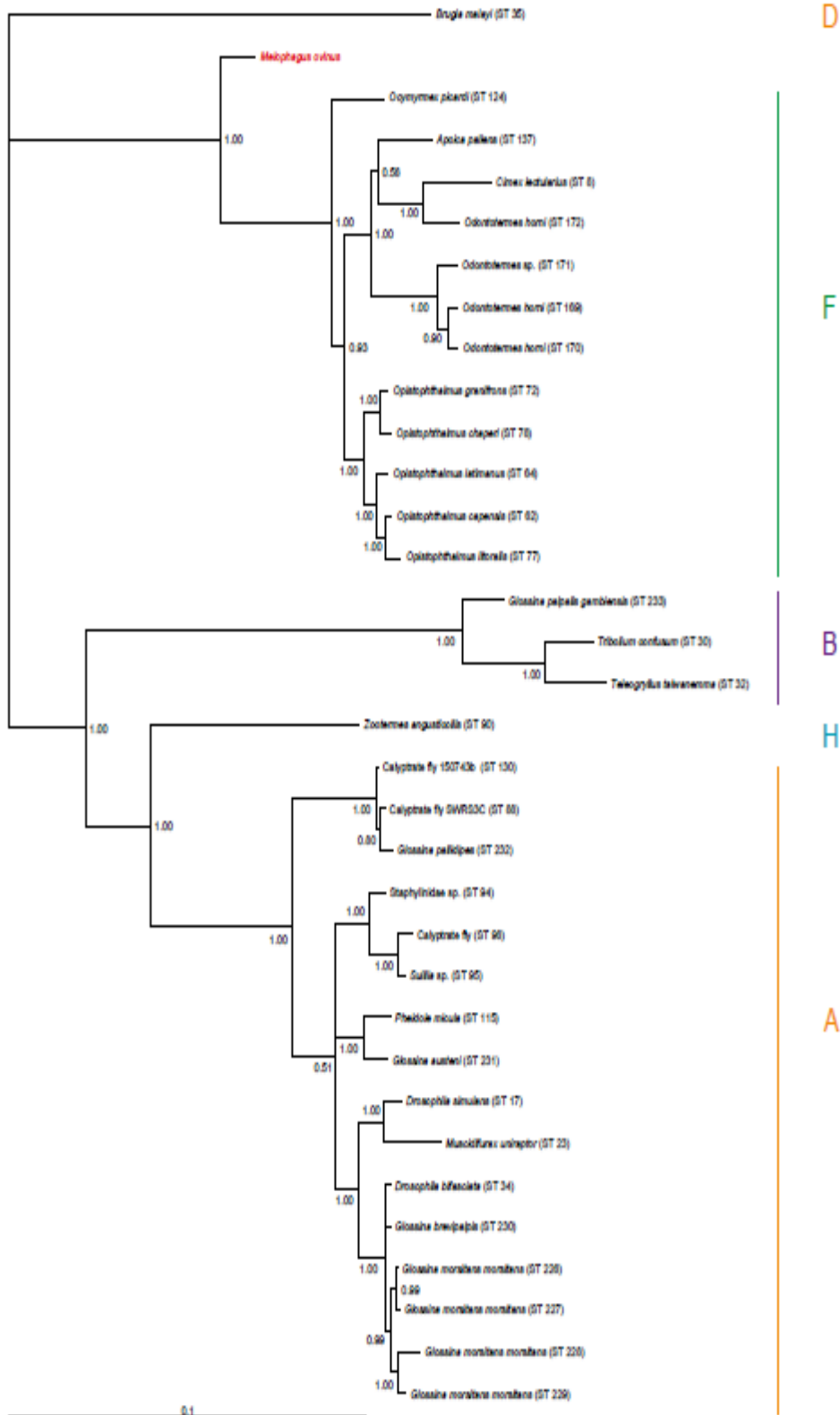
Obr. 3: Rekonstrukce evoluce bakterie *Sodalis* pomocí 16S rDNA. Nejednoznačně zaligované pozice byly odstraněny v programu Gblocks. Majoritní konsensus získaný z BI analýzy v programu MrBayes. Hodnoty posteriorních pravděpodobností jsou vyznačeny nad uzly. Jako outgroup byly použity volně žijící bakterie z rodů *Proteus*, *Protorhabdus* a *Xenorhabdus*. Červenou barvou jsou zvýrazněné mnou sekvenované symbionty, jejichž název je kombinace pracovního kódu a hostitelského druhu ptáka.



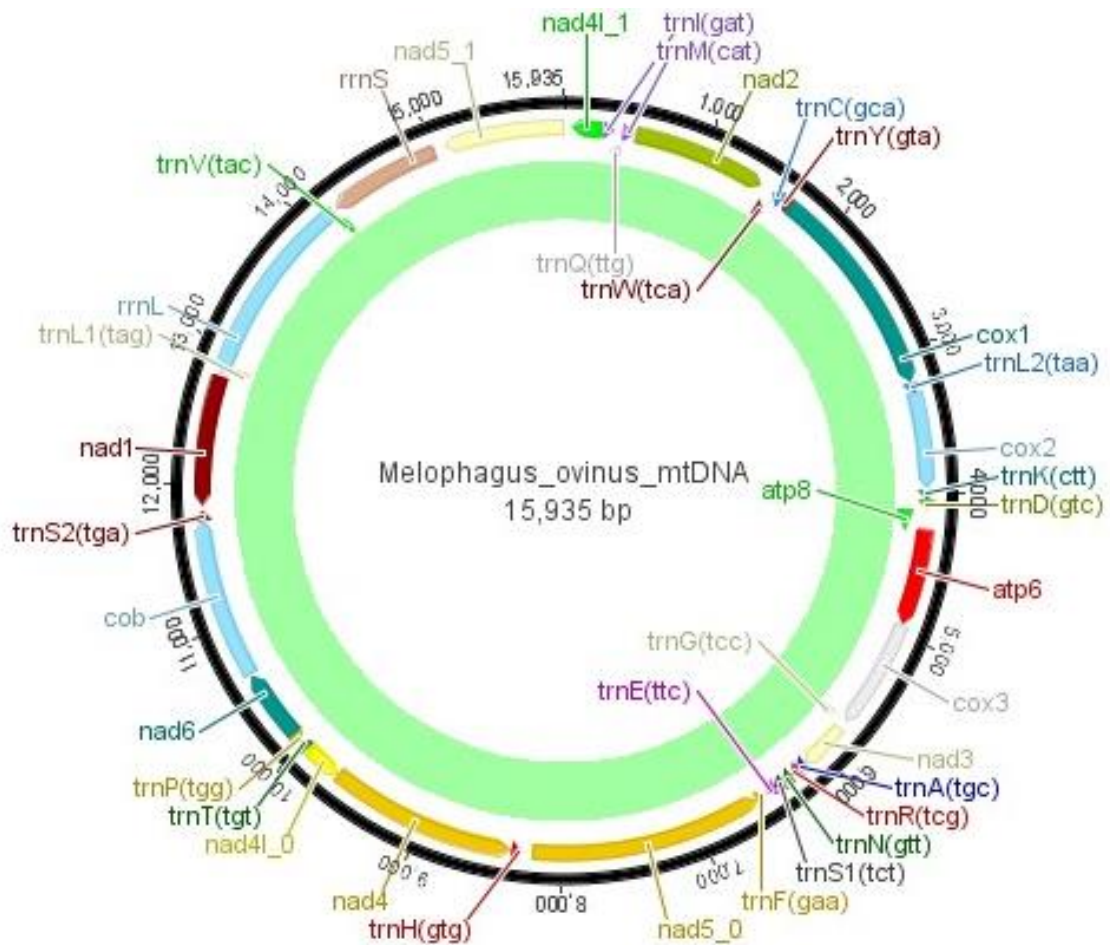
Obr. 4: Rekonstrukce fylogeneze hostitele pomocí genu pro elongační faktor. Majoritní konsensus získaný z BI analýzy v programu MrBayes. Hodnoty posteriorních pravděpodobností jsou vyznačeny nad uzly. Jako outgroup byla použita *Glossina morsitans*. Červenou barvou jsou zvýrazněny mnou sekvenované vzorky, jejichž název je kombinace pracovního kódu a hostitelského druhu ptáka. Sekvence od E. Novákové jsou ve formátu KEFXX (hostitelský druh kloše).



Obr. 4: Rekonstrukce fylogeneze hostitele pomocí genu COI. Fylogenetický strom získaný z BI analýzy v programu MrBayes. Hodnoty posteriorních pravděpodobností jsou vyznačeny nad uzly. Jako outgroup použity ostatní Calyptratae. Červenou barvou jsou zvýrazněny mnou sekvenované vzorky, jejichž název je kombinace pracovního kódu a hostitelského druhu ptáka, modrou barvou jsou zvýrazněny geny COI získané z mitochondriálních genomů. Sekvence od E. Novákové jsou ve formátu KXX (hostitelský druh kloše).



Obr. 5: Rekonstrukce evoluce superskupin wolbachie s použitím MLST analýzy. Majoritní konsensus získaný z BI analýzy v programu MrBayes. Červenou barvou je zvýrazněn druh *Melophagus ovinus*.



Obr. 6: Složený a zantovaný mitochondriální genom druhu *Melophagus ovinus*. Anotace byla provedena pomocí serveru MITOS (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/>).

## 5. Diskuze

### 5.1. Robustní fylogeneze hostitelů – zásadní faktor pro mapování evoluce symbiomy

Fylogeneze skupiny Calypttratae byla v posledních letech středem pozornosti několika studií založených jak na molekulární, tak na morfologické úrovni. Shodují se na monofylii a pozici skupiny Hippoboscoidea uvnitř skupiny Calypttratae (Nirmala et al., 2001; Dittmar et al., 2006; Petersen et al., 2007; Kutty et al., 2010; Wiegmann et al., 2011; Lambkin et al., 2013). Ve všech těchto studiích také Hippoboscoidea vychází jako sesterská skupina Muscoidea (Kutty et al., 2010), přestože tato topologie může být způsobena pouze nedostatečným taxon samplingem s chybějícími neparazitickými předky Hippoboscoidea. Fylogeneze samotných Hippoboscoidea není úplně dořešena. Glossinididae tvoří

monofyletickou skupinu sesterskou k ostatním třem skupinám tvořícím monofyletickou skupinu Pupipara (Petersen et al., 2007). Obě skupiny asociované s netopýry, Nycteribiidae a Streblidae, zřejmě tvoří jednu větev. Nycteribiidae jsou pravděpodobně monofyletičtí, monofylie Streblidae nebyla dosud přesvědčivě potvrzena (Dittmar et al., 2006; Petersen et al., 2007).

Hippoboscidae jsou dle provedených analýz monofyletická skupina. Zřejmě nejlepší fylogenetická analýza této skupiny byla provedena ve studii Petersen et al. (2007), ale použitý taxon sampling nezahrnuje fylogeneticky zásadní rody ptačích klošů, a obsahuje především druhy ze Severní Ameriky a Evropy (Maa, 1969; Dick, 2006). Taxonomií Hippoboscidae se nikdo dlouhodobě nevěnuje, takže klíče k morfologickému určování téměř neexistují. Z vnitřní topologie skupiny Hippoboscidae (t. j. podčeledi Hippoboscinae, Lipopteinae a Ornithomyinae) zatím nebyla konsistentně podpořena monofylie Ornithomyinae a i v mých analýzách nebyly pozice těchto tří podčeledí Hippoboscidae jednoznačně určitelné. Nejvíce problematická se zdá podskupina Olfersini (Petersen et al., 2007), která dle mých analýz zahrnuje rody *Ortholfersia*, *Icosta*, *Pseudolynchia* a pravděpodobně několik dalších rodů, pro které nejsou molekulární data. Vzhledem k tomu, že zásadní otázkou v evoluci Hippoboscidae je předpokládaný hostitelský přeskok z ptáků na savce (nebo naopak), je překvapivé, že vztah mezi podčeleděmi parazitujícími savce (Lipopteinae a Hippoboscinae) a ptačími zástupci (Ornithomyinae s. l.) není zcela vyřešen.

Z výše uvedených důvodů bylo možné osekvenované vzorky určit s jistotou molekulárně pouze u několika vzorků a pro většinu vzorků ze skupiny Olfersini byla určena pouze příbuznost s rody *Pseudolynchia* a *Icosta* (Tab VIII). Z genů použitých v této práci se gen pro elongační faktor zdá být jako relativně dobrý marker pro rekonstrukci fylogeneze (Obr. 4), ale jeho nevýhodou je nulový taxon sampling v GenBanku pro skupinu Hippoboscidae. Z genů použitých v práci Petersen et al. (2007) se mi konzistentně dařilo amplifikovat pouze gen pro cytochrom oxidázu I. Ostatní geny (28S rRNA, CAD) se mi amplifikovat nedařilo (Tab. VIII). Celkově nízká úspěšnost v amplifikaci genů pomocí PCR mohla být způsobena i nízkou kvalitou a fragmentací vyizolované DNA. Čistota ethanolu použitého pro sběry nám nebyla poskytnuta a vzorky byly zaslány poštou při pokojové teplotě.

Numts (“nuclear mitochondrial DNA”) vznikají přesunem mitochondriální DNA do jaderné DNA a potom tyto nefunkční sekvence volně akumulují mutace. Tyto sekvence byly zaznamenány v mnoha organismech (<http://www.pseudogene.net>) včetně Diptera (Richly & Leister, 2004; Pamilo et al., 2007; Black & Bernhardt, 2009; Hlaing et al., 2009; Rogers &

Griffiths-Jones, 2012). Korelace mezi velikostí genomu a počtem Numts není jednoznačná (Richly & Leister, 2004). Ve skupině Diptera je rekordmanem komár *Aedes aegypti* s 233 Numts (Black & Bernhardt, 2009). Přenesených kopií jednoho mitochondriálního genu se může vyskytovat více (Sunnucks & Hales, 1996). Podobně v genomu *M. ovinus* jsem objevila nejméně 32 takových Numts ve většině mitochondriálních genů, nejen v COI. Toto číslo je určitě podhodnocené kvůli nízké kvalitě assembly genomu *M. ovinus*. Předběžné analýzy genomů *C. melbae* a *O. biloba* ukazují, že Numts jsou v jejich sekvencích také hojné.

Gen pro cytochrom oxidázu I se hojně používá pro řešení vztahů na druhové i populační úrovni, ale jeho obrovskou nevýhodou jsou pseudogeny, které je možné koamplifikovat. COI se také hojně využívá pro barcoding, ale díky výskytu Numts může docházet nadhodnocování celkového počtu druhů (Song et al., 2008). Numts nejenom cytochrom oxidázy I, ale i ostatních fylogenetických markerů, tak mohou způsobovat závažné problémy ve fylogenetických stromech (van der Kuyl et al., 1995; Zischler et al., 1995; Zhang & Hewitt, 1996; Sauer et al., 1998). Na druhé straně výhodou genu pro COI je velký taxon sampling v GenBanku. Při prohlížení COI sekvencí klošů jsem zjistila, že převážná většina obsahuje stop kodony. Některé stop kodony mohou být způsobeny nižší kvalitou sekvencí, ale koamplifikaci pseudogenů nelze zatím vyloučit. Ale jak se zdá i přes možnou koamplifikaci pseudogenů je stále možné fylogenezi hostitelů pomocí tohoto genu rekonstruovat (Obr. 5). Při navrhování nových primerů bude lepší zvolit sekvence mimo daný gen, aby došlo k eliminaci jeho pseudogenů a ověřit funkčnost primerů ligováním PCR produktu do plazmidů a sekvenací klonů.

Většina klošů, které jsem používala v analýzách, klastruje s bazálními druhy ve skupině Hippoboscidae. S velkou pravděpodobností se jedná o rody *Icosta* a *Pseudolynchia*. Tři kloši jsou zástupci rodu *Ornithomya*. Další tři vzorky jsou ve fylogenezi zahrnuti mezi ostatní Calyptratae. Buď se jedná o artefakt/následek Numts, nebo se jedná o jinou linii Calyptratae. Taxonomické zařazení těchto tří vzorků do Hippoboscidae tak nemohlo být provedeno. Jeden kloš klastruje s rodem *Lipoptena*, který saje na savcích. Zřejmě se jedná o náhodnou kontaminaci, kdy na hostitelském ptákově náhodou přistál savčí kloš.

## 5.2. 16S rRNA gen a jeho použitelnost pro fylogeneze symbiotických bakterií

Screening a základní fylogenezi bakterií rodu *Arsenophonus* a *Sodalis* je většinou nutné začít s genem pro 16S rRNA, který má v GenBanku největší taxon sampling. Tento gen ale přináší řadu problémů. Rozlišení fakultativních a recentně získaných obligátních symbiontů nelze často rozlišit na základě délky větví a GC obsahu získaných sekvencí. Fakultativní symbionti mají více kopií tohoto genu, které se od sebe mohou částečně lišit. Tato často naprosto neznámá variabilita tak může podporovat vznik šumu ve fylogenetických analýzách (Šofrová et al., 2008). Především proto, že fakultativní symbionti v tomto genu obsahují jen velmi malé množství informativních pozic. V analýzách pak tyto druhy vytváří krátké větve a tak nepřímo podporují přitahování dlouhých větví obligátních arsenophonů. V těchto analýzách by určitě pomohla multi-genová analýza a bohatý taxon sampling, ale bylo by nutné získat DNA materiál pokrývající hlavní linie rodu *Arsenophonus*. Vzhledem k dostupnosti genomového sekvenování symbiotických bakterií byl proto 16S rRNA screening využit pro zjištění hlavních linií obligátních symbiontů v Hippoboscidae. Tyto linie budou v budoucnu vybrány na cílené genomové sekvenování pokrývající hlavní linie ve fylogenezi hostitelů a diverzitu jejich symbiotických systémů. Takto získaná data pak budou moci být použita i k robustní multi-genové analýze symbiontů.

## 5.3. Dynamika vztahů symbiont-parazit(Hippoboscoidea)-hostitel

Evoluce arsenophona v celé skupině Pupipara je velmi složitá a ovlivněná jak vertikálním, tak horizontálním transferem s přeskoky mezi hostiteli (Hosokawa et al., 2012; Duron et al., 2014). V mých analýzách jsem detekovala obligátní i fakultativní arsenophony. Rod *Ornithomya* hostí nejméně tři různé linie arsenophona, kdy pravděpodobně dvě z nich jsou fakultativní (Obr. 2). Otázkou ale stále zůstává kolik je ve skutečnosti obligátních linií arsenophona v Hippoboscidae. Moje analýzy obsahují několik sekvencí z genomických dat, kde je funkce obligátního symbionta potvrzena. Výsledky potvrzují, že linií je několik. Takto časté replacementy symbiontů a vznik několika obligátních linií může být i důsledek geografie. Při geografickém oddělení populací hostitelů může docházet k získání různých



linií obligátních symbiontů, nebo náhradám toho původního. Fakt, že spolu klastrují fakultativní a obligátní symbionti by mohl naznačovat, že obligátní symbionti vznikají z fakultativních. Druhově nejpočetnější fakultativní linie klastruje s fakultativním symbiontem *A. arthropodicus*, který je na bázi *A. arthropodicus*, kterého je možné pěstovat *in vitro* (Dale et al., 2006), a tedy přežije mimo hostitelské buňky, by mohl plnit funkci symbiotického předka v linii arsenophona. Toto by mohlo vysvětlovat několikanásobné získání různých linií arsenophona ve skupině Hippoboscoidea. Hostitel *A. arthropodicus*, *Pseudolynchia canariensis*, se vyskytuje v těsném kontaktu se všenkami *Colubicola columbae*. Vzhledem k tomu, že infekce arsenophonem byla u několika druhů všenek také detekována (Husník, nepublikováno), není vyloučeno, že zde dochází k hostitelským přeskokům Arsenophona mezi všenkami a kloši.

*Sodalis* vytváří v Hippoboscidae jak fakultativní, tak jednu obligátní linii. Obligátní linie sodalise klastruje s primárním endosymbiontem *Pseudolynchia canariensis*, který je podle fylogenetických stromů blízce příbuzný rodu *Sodalis* a dle některých analýz i rodu *Wigglesworthia*, který mohl v minulosti také vzniknout z fakultativních sodalisů (Husník et al., 2011). Tato obligátní linie sodalise se vyvíjí v koevoluci s hostiteli z podskupiny Olfersini. Detekovala jsem také jednoho fakultativního sodalise z kloše *Ornithomya* sp., který se ve fylogenetických analýzách nachází v polytomii společně s liniemi sodalisů z ostatních Hippoboscidae (rody *Melophagus*, *Crataerina* a *Ornithomya*; Obr. 3), takže nelze určit, zda se jedná o jednu, nebo několik nezávislých linií fakultativních sodalisů, kteří infikují Hippoboscidae. O sodalisovi *C. melbae* se spekulovalo jako o obligátním symbiontovi (Nováková & Hypša 2007), ale tato hypotéza se ukázala být s velkou pravděpodobností chybná (Husník, nepublikováno) a má analýza tuto hypotézu také zpochybňuje. Tento mnou dekonaný fakultativní *Sodalis* je z kloše parazitizujícího holuba *Columba livia*, který je zároveň hostitelem všenky *Columbicola columbae*. Zajímavé je, že na této větvi se nachází i obligátní *Sodalis* z *C. columbae*. Bylo prokázáno, že *C. columbae* používá kloše k forezi a přeskoku mezi hostitelskými ptáky (Harbison & Clayton, 2011). Linie sodalise v *C. columbae*, nenaznačuje striktní koevoluci s hostiteli a zřejmě zde velmi nedávno docházelo k opakovanému zisku nového symbionta z prostředí a následným náhradám původního symbionta (Smith et al., 2013).

Podobná situace dle mých výsledků je běžná i u skupiny Hippoboscidae, protože se v této skupině vyskytují fakultativní i obligátní symbionti ze dvou hlavních rodů - *Arsenophonus* a *Sodalis*. Je možné, že opětovný zisk fakultativních sodalisů proběhl ze všenek díky jejich blízkému kontaktu a to nejen na skupině Columbidae, protože kloši

jsou spíše generalisté ve výběru hostitele a parazitují na více druzích ptáků (Corbet, 1956). Protože nepříbuzné druhy hostitelů obsahují příbuzné druhy sodalise (Obr. 3), je tato bakterie schopná šířit se horizontálním transferem, jak to navrhl Chrudimský et al. (2012). Také je možné, že během evoluce docházelo k několikanásobnému získání symbionta z prostředí (například nasátím z krve hostitele nebo kontaktem s všenkami). Podobnou situaci naznačuje nedávná charakterizace HS linie sodalise (Clayton et al., 2012).

Dynamika evoluce symbiózy ve skupině Pupirara může souviset s tím, že se v této skupině nenachází žádný obligátní symbiont s extrémně malým genomem na rozdíl od floém a xylém sajícího hmyzu. Redukovaný genom naznačuje dlouhodobou asociaci s hostitelem a poskytování funkčních výhod hostiteli (Baumann, 2005; Moran et al., 2008). Přestože nahrazování obligátních symbiontů je běžné v mnoha skupinách hmyzu (Lefevre et al., 2004; Moran et al., 2005; Conord et al., 2008; McCutcheon et al., 2009; Koga et al., 2013), obligátní linie symbiontů v Hippoboscoidea jsou překvapivé tím, že jsou zřejmě následkem několikanásobného nahrazování symbiontů, které se odehrálo relativně recentně v několika nezávislých vlnách. Blízký kontakt se všenkami by mohl vést k přeskokům symbiontů mezi hostiteli. Také se zřejmě v prostředí vyskytuje fakultativní předek těchto symbiotických linií, který umožnil několikanásobné získání nové linie toho samého symbionta. Časté přeskoky mezi hostiteli a přesuny fakultativních linií symbiontů dělají z těchto dvou rodů bakterií velmi zajímavé modely pro genomové analýzy. Vliv hostitelské specifity (různá úroveň s přeskoky ze savců na ptáky), biogeografie (např. migrace některých ptáků) a interakcí s ostatními organismy (všenky roztoči a patogenní mikroorganismy obratlovců) na mikrobiomy krevsajícího hmyzu je v současné době téměř neznámý.

#### 5.4. Jaká je role Wolbachie v krevsajícím hmyzu?

Procentuální zastoupení wolbachie v mém samplingu je 57,9 %, což je ve shodě s dříve publikovanými odhady (Hilgenboecker et al., 2008, Zug & Hammerstein, 2012). *Wolbachia* detekovaná v mých analýzách spadá převážně do superskupiny F a z menší části do superskupiny A. *P. canariensis* hostí také superskupiny A a F. Dale et al., (2006) superskupinu F označil jako superskupinu B, ale toto bylo zpochybnováno a také v mých analýzách tato sekvence klastruje se superskupinou F. Diverzita superskupiny F je poměrně vysoká, zahrnuje wolbachie z termitů a filárií a je poměrně častá v krevsajícím hmyzu, kromě Hippoboscidae se vyskytuje i u Streblidae (Morse et al., 2012), Amblycera (Covacin

& Barker, 2007) a Cimicidae, kde se chová jako obligátní mutualista (Hosokawa et al., 2010). *Wolbachia* ze superskupiny A u *G. m. morsitans* způsobuje cytoplasmatickou inkompatibilitu (Alam et al., 2011). Otázkou zůstává jaký je fenotyp wolbachie ve skupině Hippoboscidae. Zda také způsobuje CI nebo další reprodukční manipulace. Vzhledem ke sdílení hostitelů s jinými obligátními bakteriemi a absencí v bakteriomu se přepokládá spíše fakultativní role. Další otázkou je koevoluce wolbachie s hostitelem. Bylo hypotézováno, že *Wolbachia* u všenek nekoevoluje, protože dochází k jejímu horizontálnímu transferu mezi hostitelským ptákem a všenkou a že roli v tomto přenosu hrají kloši, které všenky využívají k přeskoku mezi hostiteli (Covacin & Barker, 2007). Toto by naznačovalo, že *Wolbachia* podobně jako *Sodalis* a *Arsenophonus*, může být získána z prostředí.

## 6. Závěr

Krevsající parazité ze skupiny Hippoboscoidea obsahují symbiotické bakterie, které jim poskytují B-vitaminy a kofaktory chybějící v jejich potravě. Evoluce symbiózy v této skupině dosud zůstává nejasná. Pro objasnění symbiotických vztahů v podskupině Hippoboscidae jsem použila Sangerova sekvenování několika a následné rekonstrukce fylogenetických stromů. Výsledky této práce naznačují, že vztahy mezi skupinou Hippoboscoidea a jejími symbionty jsou velmi dynamické s častými náhradami obligátních symbiontů. Jaký je vliv parazitického způsobu života skupiny Hippoboscoidea na dynamičnost tohoto systému, zůstává nezodpovězenou otázkou, která může být tématem dalších prací. Časté přeskoky mezi hostiteli a přesuny fakultativních linií symbiontů dělají z těchto dvou rodů bakterií velmi zajímavé linie pro budoucí genomové analýzy.

## 7. Přílohy

Vysvětlivky:

CI - cytoplasmatická inkompatibilita

SOPE - *Sitophilus oryzae* primary endosymbionta

HS - Human *Sodalis*

IS - inzerční sekvence

TTSS – Type Three Secretion System

WO - Wolbachia Bacteriophage Family  
 AMPs - antimikrobiální peptidy  
 PGRPs - Peptidoglycan Recognition Proteins  
 IMD - Imunne Deficiency Pathway  
 MLST - Multilocus Sequence Typing  
 SGHV - Salivary gland Hypertrophy Virus  
 ML - Maximum likelihood  
 BI - Bayesiánská analýza (Bayesian interference)  
 Numt - “nuclear mitochondrial DNA”  
 EF – elongační faktor  
 COI – cytochrom oxidáza I  
 HGT – horizontal gene transfer

Tab. VIII: Data pro alignment od Evy Novákové.

Kód vzorku	Druh kloše	Druh ptáka	COX	EF
K12N	<i>Ornithomya fringilina</i>	?	K12coI	
K14N	<i>Ornithoica turdi</i>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	K14coI	K14EF
K15N	<i>Ornithoica turdi</i>	<i>Emberiza citrinilla</i>	K15coI	K15EF
K16N	<i>Ornithoica turdi</i>	<i>Acrocephalus palustris</i>	K16	K16EF
K17N	<i>Ornithoica turdi</i>	<i>Emberiza schoeniclus</i>	K17	K17EF
K18N	<i>Ornithomya fringilina</i>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	K18	K18EF
K19N	<i>Ornithomya avicularia</i>	<i>Emberiza citrinilla</i>	K19coI	
K20N	<i>Ornithomya avicularia</i>	<i>Emberiza citrinilla</i>	K20coI	
K21N	<i>Ornithoica turdi</i>	<i>Emberiza schoeniclus</i>	K21	
K22N	<i>Ornithomya avicularia</i>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	K22	
K23S	<i>Ornithomya avicularia</i>	<i>Coccothraustes coccothraustes</i>	K23	
K24N	<i>Ornithomya avicularia</i>	<i>Parus ceruelus</i>	K24	K24EF
K25N	<i>Ornithomya avicularia</i>	<i>Emberiza schoeniclus</i>	K25	K25EF
K26N	<i>Ornithomya avicularia</i>	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	K26	K26EF
K27N	<i>Ornithomya biloba</i>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	K27	K27EF
K28N	<i>Ornithomya avicularia</i>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	K28	
K29N	<i>Ornithomya avicularia?</i>	<i>Emberiza schoeniclus</i>	K29	K29EF
K30N	?	<i>Emberiza schoeniclus</i>	K30	K30EF
K31N	<i>Ornithomya avicularia</i>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	K31	
K33N	<i>Ornithomya biloba</i>	<i>Hirudo rustica</i>	K33	
K34N	<i>Ornithomya fringilina</i>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	K34	
K36N	<i>Ornithomya avicularia ?</i>	<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	K36	
K37N		<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	K37	
K39N		<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	K39	
K40N		<i>Carduelis chloris</i>	K40	K40EF
K41N		<i>Emberiza schoeniclus</i>	K41	

K42N		<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	K42	
K43S		<i>Strix aluco</i>	K43	
K44N		<i>Dendrocopos syriacus</i>	K44	

## 8. 8. Elektronické přílohy

Na CD přiloženém k práci jsou umístěna tato data:

Matice (fasta): COI, EF, 16S rRNA *Sodalis*, 16S rRNA *Arsenophonus*

Alignmenty neupravené (fasta, nexus, phylip): COI, EF, 16S rRNA *Sodalis*, 16S rRNA *Arsenophonus*

Stromy ML (pdf): COI, EF, 16S rRNA *Sodalis*

Stromy BI (pdf): 16S rRNA *Arsenophonus*

Mitochondriální genomy (fasta s contigy): *M. ovinus* (+gff soubor anotace), *O. biloba*, *C. pallida*

## 9. 9. Seznam použité literatury

Abascal, F., Zardoya, R., Posada, D. (2005). ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics*, 21(9), 2104-2105.

Abd-Alla, A. M., Parker, A. G., Vreysen, M. J., Bergoin, M. (2011). Tsetse salivary gland hypertrophy virus: hope or hindrance for tsetse control?. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8), e1220.

Akman, L., 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.

Akoda, K., Van den Bossche, P., Marcotty, T., Kubi, C., Coosemans, M., De Deken, R., Van den Abbeele, J. (2009). Nutritional stress affects the tsetse fly's immune gene expression. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(3), 195-201.

Alam, U., Medlock, J., Brelsfoard, C., Pais, R., Lohs, C., Balmand, S., Carnogursky, J., Heddi, A., Takac, P., Galvani, A., Aksoy, S (2011). *Wolbachia* symbiont infections induce strong cytoplasmic incompatibility in the tsetse fly *Glossina morsitans*. *PLoS Pathogens*, 7(12), e1002415.

- Allen, J. M., Reed, D. L., Perotti, M. A., Braig, H. R. (2007). Evolutionary relationships of “*Candidatus* Riesia spp.,” endosymbiotic Enterobacteriaceae living within hematophagous primate lice. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1659-1664.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.
- 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.
- Aksoy, S., Pourhosseini, A. A., Chow, A. (1995). Mycetome endosymbionts of tsetse flies constitute a distinct lineage related to Enterobacteriaceae. *Insect Molecular Biology*, 4(1), 15-22.
- Aksoy, S., Chen, X. A., Hypša, V. (1997). Phylogeny and potential transmission routes of midgut-associated endosymbionts of tsetse (Diptera: Glossinidae). *Insect Molecular Biology*, 6(2), 183-190.
- Aksoy, S. (2000). Tsetse—a haven for microorganisms. *Parasitology Today*, 16(3), 114-118.
- Aksoy, S. (2003). Symbiosis in tsetse. *Insect Symbiosis* (Bourtzis, K. and Miller, TA, eds), 53-65.
- Apostolaki, A., Livadaras, I., Saridaki, A., Chrysargyris, A., Savakis, C., Bourtzis, K. (2011). Transinfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with *Wolbachia*: towards a symbiont-based population control strategy. *Journal of Applied Entomology*, 135(7), 546-553.
- Attardo, G. M., Lohs, C., Heddi, A., Alam, U. H., Yildirim, S., Aksoy, S. (2008). Analysis of milk gland structure and function in *Glossina morsitans*: Milk protein production, symbiont populations and fecundity. *Journal of Insect Physiology*, 54(8), 1236-1242.
- Augustinos, A. A., Santos-Garcia, D., Dionyssopoulou, E., Moreira, M., Papapanagiotou, A., Scarvelakis, M., Doudoumis, V., Ramos, S., Aguiar, A. F., Borges, P. A. V., Khadem, M., Latorre, A., Tsiamis, G., Bourtzis, K. (2011). Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled?. *PloS One*, 6(12), e28695.
- Babendreier, D., Joller, D., Romeis, J., Bigler, F., Widmer, F. (2007). Bacterial community structures in honeybee intestines and their response to two insecticidal proteins. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(3), 600-610.

- Baldo, L., Hotopp, J. C. D., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., Hayashi, C., Maiden, M. C. J., Tettelin, H., Werren, J. H. (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7098-7110.
- Baldo, L., Ayoub, N. A., Hayashi, C. Y., Russell, J. A., Stahlhut, J. K., Werren, J. H. (2008). Insight into the routes of *Wolbachia* invasion: high levels of horizontal transfer in the spider genus *Agelenopsis* revealed by *Wolbachia* strain and mitochondrial DNA diversity. *Molecular Ecology*, 17(2), 557-569.
- Balmand, S., Lohs, C., Aksoy, S., Heddi, A. (2013). Tissue distribution and transmission routes for the tsetse fly endosymbionts. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, S116-S122.
- Baumann, P. (2005). Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annual Review of Microbiology*, 59, 155-189.
- Belda, E., Moya, A., Bentley, S., Silva, F. J. (2010). Mobile genetic element proliferation and gene inactivation impact over the genome structure and metabolic capabilities of *Sodalis glossinidius*, the secondary endosymbiont of tsetse flies. *BMC Genomics*, 11(1), 449.
- Bemis, D. A., Kania, S. A. (2007). Isolation of *Bartonella* sp. from sheep blood. *Emerging Infectious Diseases*, 13(10), 1565.
- Billeter, S. A., Hayman, D. T. S., Peel, A. J., Baker, K., Wood, J. L. N., Cunningham, A., Suu-Ire, R., Dittmar, K., Kosoy, M. Y. (2012). *Bartonella* species in bat flies (Diptera: Nycteribiidae) from western Africa. *Parasitology*, 139(03), 324-329.
- Black, I. V., Bernhardt, S. A. (2009). Abundant nuclear copies of mitochondrial origin (NUMTs) in the *Aedes aegypti* genome. *Insect Molecular Biology*, 18(6), 705-713.
- Bordenstein, S., Rosengaus, R. B. (2005). Discovery of a novel *Wolbachia* supergroup in Isoptera. *Current Microbiology*, 51(6), 393-398.
- Bourtzis, K., Robinson, A. S. (2006). Insect pest control using *Wolbachia* and/or radiation. *Insect Symbiosis*, 2, 225-246.
- Bourtzis, K. (2008). *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. *Springer, New York*.
- Braendle, C., Miura, T., Bickel, R., Shingleton, A. W., Kambhampati, S., Stern, D. L. (2003). Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid-*Buchnera* symbiosis. *PLoS Biology*, 1(1), e21.

- Brown, J. M., Pellmyr, O., Thompson, J. N. Harrison, R. G. (1994) Phylogeny of *Greya* (Lepidoptera: Prodoxidae), based on nucleotide sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I and II: congruence with morphological data. *Molecular Biology and Evolution*, 11, 128–141.
- Brown, B., Emberson, R. M. Paterson, A. M. (1999) Phylogeny of ‘*Oxycanus*’ lineages of hepialid moths from New Zealand inferred from sequence variation in the mtDNA COI and II gene regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13, 463–473.
- Brucker, R. M., Bordenstein, S. R. (2013). The hologenomic basis of speciation: gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*. *Science*, 341(6146), 667-669.
- Buchner, P. (1965). Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms. *Interscience, New York*.
- Burke, G. R., Normark, B. B., Favret, C., Moran, N. A. (2009). Evolution and diversity of facultative symbionts from the aphid subfamily Lachninae. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5328-5335.
- Campbell, B. C., Bragg, T. S., Turner, C. E. (1992). Phylogeny of symbiotic bacteria of four weevil species (Coleoptera: Curculionidae) based on analysis of 16S ribosomal DNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22(5), 415-421.
- Casiraghi, M., Bordenstein, S. R., Baldo, L., Lo, N., Beninati, T., Wernegreen, J. J., Werren, J. H., Bandi, C. (2005). Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology*, 151(12), 4015-4022.
- Castresana, J. (2002). Gblocks, v. 0.91 b. online version available at [http://molevol.cmima.csic.es/castresana.Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana.Gblocks_server.html) (accessed 6 February 2012).
- Clayton, A. L., Oakeson, K. F., Gutin, M., Pontes, A., Dunn, D. M., von Niederhausern, A. C., Weiss, R. B., Fisher, M., Dale, C. (2012). A novel human-infection-derived bacterium provides insights into the evolutionary origins of mutualistic insect–bacterial symbioses. *PLoS Genetics*, 8(11), e1002990.
- Conord, C., Despres, L., Vallier, A., Balmand, S., Miquel, C., Zundel, S., Lemperiere, G., Heddi, A. (2008). Long-term evolutionary stability of bacterial endosymbiosis in Curculionoidea: additional evidence of symbiont replacement in the Dryophthoridae family. *Molecular Biology and Evolution*, 25(5), 859-868.
- Covacin, C., Barker, S. C. (2007). Supergroup F *Wolbachia* bacteria parasitise lice (Insecta: Phthiraptera). *Parasitology Research*, 100(3), 479-485.



- 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 Bacteriology*, 49(1), 267-275.
- Dale, C., Beeton, M., Harbison, C., Jones, T., Pontes, M. (2006). Isolation, pure culture, and characterization of “*Candidatus Arsenophonus arthropodicus*,” an intracellular secondary endosymbiont from the hippoboscids louse fly *Pseudolynchia canariensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2997-3004.
- Darby, A. C., Lagnel, J., Matthew, C. Z., Bourtzis, K., Maudlin, I., Welburn, S. C. (2005). Extrachromosomal DNA of the symbiont *Sodalis glossinidius*. *Journal of Bacteriology*, 187(14), 5003-5007.
- Darby, A. C., Choi, J. H., Wilkes, T., Hughes, M. A., Werren, J. H., Hurst, G. D. D., Colbourne, J. K. (2010). Characteristics of the genome of *Arsenophonus nasoniae*, son-killer bacterium of the wasp *Nasonia*. *Insect Molecular Biology*, 19(s1), 75-89.
- Dehio, C., Lanz, C., Pohl, R., Behrens, P., Bermond, D., Piémont, Y., Pelz, K., Sander, A. (2001). *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(4), 1557-1565.
- Dehio, C., Sauder, U., Hiestand, R. (2004). Isolation of *Bartonella schoenbuchensis* from *Lipoptena cervi*, a blood-sucking arthropod causing deer ked dermatitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5320-5323.
- Degnan, P. H., Moran, N. A. (2008). Evolutionary genetics of a defensive facultative symbiont of insects: exchange of toxin-encoding bacteriophage. *Molecular Ecology*, 17(3), 916-929.
- Dick, C. W. (2006). Checklist of world Hippoboscidae (Diptera: Hippoboscoidea). *Department of Zoology, Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois*.
- Dittmar, K., Porter, M. L., Murray, S., Whiting, M. F. (2006). Molecular phylogenetic analysis of nycteribiid and streblid bat flies (Diptera: Brachycera, Calyptratae): implications for host associations and phylogeographic origins. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(1), 155-170.
- Dobson, S. L., Bourtzis, K., Braig, H. R., Jones, B. F., Zhou, W., Rousset, F., O'Neill, S. L. (1999). *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 29(2), 153-160.

- Doudoumis, V., Tsiamis, G., Wamwiri, F., Brelsfoard, C., Alam, U., Aksoy, E., Dalaperas, S., Abd-Alla, A., Ouma, J., Takac, P., Aksoy, S., Bourtzis, K. (2012). Detection and characterization of *Wolbachia* infections in laboratory and natural populations of different species of tsetse flies (genus *Glossina*). *BMC Microbiology*, 12(Suppl 1), S3.
- Doudoumis, V., Alam, U., Aksoy, E., Abd-Alla, A. M., Tsiamis, G., Brelsfoard, C., Serap, A., Bourtzis, K. (2013). Tsetse-*Wolbachia* symbiosis: Comes of age and has great potential for pest and disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, S94-S103.
- Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43(1), 17-37.
- Drummond, A. J., et al. "Geneious v5. 5 created by Biomatters Available: <http://www.geneious.com>." (2013).
- Dunn, A. K., & Stabb, E. V. (2005). Culture-independent characterization of the microbiota of the ant lion *Myrmeleon mobilis* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8784-8794.
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., Hurst, G. D. (2008). The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *Bmc Biology*, 6(1), 27.
- Duron, O., Schneppat, U. E., Berthomieu, A., Goodman, S. M., Droz, B., Paupy, C., Nkoghe, J. O., Tortosa, N. R. P. (2014). Origin, acquisition and diversification of heritable bacterial endosymbionts in louse flies and bat flies. *Molecular Ecology*, doi:10.1111/mec.12704.
- 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.
- Fukatsu, T., Koga, R., Smith, W. A., Tanaka, K., Nikoh, N., Sasaki-Fukatsu, K., Yoshizawa, K., Dale, C., Clayton, D. H. (2007). Bacterial endosymbiont of the slender pigeon louse, *Columbicola columbae*, allied to endosymbionts of grain weevils and tsetse flies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6660-6668.
- Geiger, A., Ravel, S., Frutos, R., Cuny, G. (2005). *Sodalis glossinidius* (Enterobacteriaceae) and vectorial competence of *Glossina palpalis gambiensis* and *Glossina morsitans morsitans* for *Trypanosoma congolense* savannah type. *Current Microbiology*, 51(1), 35-40.

- Geiger, A., Ravel, S., Mateille, T., Janelle, J., Patrel, D., Cuny, G., Frutos, R. (2007). Vector competence of *Glossina palpalis gambiensis* for *Trypanosoma brucei* *sl.* and genetic diversity of the symbiont *Sodalis glossinidius*. *Molecular Biology and Evolution*, 24(1), 102-109.
- Geiger, A., Fardeau, M. L., Grebaut, P., Vatunga, G., Josénando, T., Herder, S., Cuny, G., Truc, P., Ollivier, B. (2009). First isolation of *Enterobacter*, *Enterococcus*, and *Acinetobacter* spp. as inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis palpalis*) midgut. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1364-1370.
- Geiger, A., Fardeau, M. L., Njiokou, F., Joseph, M., Asonganyi, T., Ollivier, B., & Cuny, G. (2011). Bacterial diversity associated with populations of *Glossina* spp. from Cameroon and distribution within the Campo sleeping sickness focus. *Microbial Ecology*, 62(3), 632-643.
- Geiger, A., Fardeau, M. L., Njiokou, F., & Ollivier, B. (2013). *Glossina* spp. gut bacterial flora and their putative role in fly-hosted trypanosome development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3.
- Gherna, R. L., Werren, J. H., Weisburg, W., Cote, R., Woese, C. R., Mandelco, L., Brenner, D. J. (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.
- Gorham, C. H., Fang, Q. Q., Durden, L. A. (2003). *Wolbachia* endosymbionts in fleas (Siphonaptera). *Journal of Parasitology*, 89(2), 283-289.
- Grindle, N., Tyner, J. J., Clay, K., Fuqua, C. (2003). Identification of *Arsenophonus*-type bacteria from the dog tick *Dermacentor variabilis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 83(3), 264-266.
- Gruwell, M. E., Hardy, N. B., Gullan, P. J., Dittmar, K. (2010). Evolutionary relationships among primary endosymbionts of the mealybug subfamily *Phenacoccinae* (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), 7521-7525.
- Grünwald, S., Pilhofer, M., Höll, W. (2010). Microbial associations in gut systems of wood- and bark-inhabiting longhorned beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *Systematic and Applied Microbiology*, 33(1), 25-34.
- Guindon, S., Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), 696-704.

- Guindon, S., Delsuc, F., Dufayard, J. F., Gascuel, O. (2009). Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. *Methods of Molecular Biology*, 537, 113-137.
- Halos, L., Jamal, T., Maillard, R., Girard, B., Guillot, J., Chomel, B., Vayssier-Taussat, M., Boulouis, H. J. (2004). Role of *Hippoboscidae* flies as potential vectors of *Bartonella* spp. infecting wild and domestic ruminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 6302-6305.
- Hansen, A. K., Jeong, G., Paine, T. D., Stouthamer, R. (2007). Frequency of secondary symbiont infection in an invasive psyllid relates to parasitism pressure on a geographic scale in California. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(23), 7531-7535.
- Hao, Z., Kasumba, I., Lehane, M. J., Gibson, W. C., Kwon, J., Aksoy, S. (2001). Tsetse immune responses and trypanosome transmission: implications for the development of tsetse-based strategies to reduce trypanosomiasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12648-12653.
- Hao, Z., Kasumba, I., Aksoy, S. (2003). Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(11), 1155-1164.
- Harms, A., Dehio, C. (2012). Intruders below the radar: molecular pathogenesis of *Bartonella* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(1), 42-78.
- Heddi, A., Charles, H., Khatchadourian, C., Bonnot, G., Nardon, P. (1998). Molecular characterization of the principal symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae*: a peculiar G+ C content of an endocytobiotic DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 47(1), 52-61.
- Hennig, W. (1973). Ordnung Diptera (Zweiflügler). *Handbuch der Zoologie* 4.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., Werren, J. H. (2008). How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiology Letters*, 281(2), 215-220.
- Hill, D. S. (1963). The life history of the British species of *Ornithomya* (Diptera: Hippoboscidae). *Transactions of the Royal Entomological Society of London*, 115(13), 391-407.
- Hlaing, T., Tun-Lin, W., Somboon, P., Socheat, D., Setha, T., Min, S., Chang, M. S., Walton, C. (2009). Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. *BMC Genetics*, 10(1), 11.

- Hoffmann, A. A., Montgomery, B. L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P. H., Muzzi, F., Greenfield, M., Durkan, M., Leong, Y. S., Dong, Y., Cook, H., Axford, J., Callahan, A. G., Kenny, N., Omodei, C., McGraw, E. A., Ryan, P. A., Ritchie, S. A., Turelli, M., O'Neill, S. L. (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.
- Hosokawa, T., Nikoh, N., Koga, R., Satô, M., Tanahashi, M., Meng, X. Y., Fukatsu, T. (2012). Reductive genome evolution, host-symbiont co-speciation and uterine transmission of endosymbiotic bacteria in bat flies. *The ISME Journal*, 6(3), 577-587.
- Hu, Y., Aksoy, S. (2005). An antimicrobial peptide with trypanocidal activity characterized from *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(2), 105-115.
- Hu, C., Aksoy, S. (2006). Innate immune responses regulate trypanosome parasite infection of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1194-1204.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755.
- Husník, F., Chrudimský, T., Hypša, V. (2011). Multiple origins of endosymbiosis within the Enterobacteriaceae ( $\gamma$ -Proteobacteria): convergence of complex phylogenetic approaches. *BMC Biology*, 9(1), 87.
- Husnik, F., Nikoh, N., Koga, R., Ross, L., Duncan, R. P., Fujie, M., Tanaka, M., Satoh, N., Bachtrog, D., Wilson, A. C. C., von Dohlen, C. D., Fukatsu, T., McCutcheon, J. P. (2013). Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell*, 153(7), 1567-1578.
- Hypša, V., Dale, C. (1997). In vitro culture and phylogenetic analysis of “*Candidatus Arsenophonus triatominarum*,” an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 1140-1144.
- 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.

- 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.
- Cheng, Q., Aksoy, S. (1999). Tissue tropism, transmission and expression of foreign genes in vivo in midgut symbionts of tsetse flies. *Insect Molecular Biology*, 8(1), 125-132.
- Cheng, Q., Ruel, T. D., Zhou, W., Molloo, S. K., Majiwa, P., O'Neill, S. L., Aksoy, S. (2000). Tissue distribution and prevalence of *Wolbachia* infections in tsetse flies, *Glossina* spp. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(1), 44-50.
- Chomel, B. B., Kasten, R. W. (2010). Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3), 743-750.
- Chrudimský, T., Husník, F., Nováková, E., Hypša, V. (2012). *Candidatus Sodalis melophagi* sp. nov.: phylogenetically independent comparative model to the tsetse fly symbiont *Sodalis glossinidius*. *PloS One*, 7(7), e40354.
- Jaenson, T. G. (1978). Virus-like rods associated with salivary gland hyperplasia in tsetse, *Glossina pallidipes*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72(3), 234-238.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 619-633.
- Kaiwa, N., Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Meng, X. Y., Kimura, N., Ito, M., Fukatsu, T. (2010). Primary gut symbiont and secondary, *Sodalis*-allied symbiont of the scutellerid stinkbug *Cantao ocellatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(11), 3486-3494.
- Kaiwa, N., Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Meng, X. Y., Kimura, N., Ito, M., Fukatsu, T. (2011). Bacterial symbionts of the giant jewel stinkbug *Eucorysses grandis* (Hemiptera: Scutelleridae). *Zoological Science*, 28(3), 169-174.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059-3066.
- Katoh, K., Asimenos, G., Toh, H. (2009). Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods of Molecular Biology*, 537, 39-64.
- Kent, B. N., Bordenstein, S. R. (2010). Phage WO of *Wolbachia*: lambda of the endosymbiont world. *Trends in Microbiology*, 18(4), 173-181.

- Kirkness, E. F., Haas, B. J., Sun, W., Braig, H. R., Perotti, M. A., Clark, J. M., Lee, S. H., Robertson, H. M., Kennedy, R. C., Elhaik, E., Gerlach, D., Kriventseva, E. V., Elsik, C. G., Graur, D., Hill, C. A., Veenstra, J. A., Walenz, B., Tubío, J. M. C., Ribeiro, J. M. C., Rozas, J., Johnston, J. S., Reese, J. T., Popadic, A., Tojo, M., Raoult, D., Reed, D. L., Tomoyasu, Y., Kraus, E., Mittapalli, O., Margam, V. M., Li, H., Meyer, J. M., Johnson, R. M., Romero-Severson, J., VanZee, J. P., Alvarez-Ponce, D., Vieira, F. G., Aguadé, M., Guirao-Rico, S., Anzola, J. M., Yoon, K. S., Strycharz, J. P., Unger, M. F., Christley, S., Lobo, N. F., Seufferheld, M. J., Wang, N., Dasch, G. A., Struchiner, C. J., Madey, G., Hannick, L. I., Bidwell, S., Joardar, V., Caler, E., Shao, R., Barker, S. C., Cameron, S., Bruggner, R. V., Regier, A., Johnson, J., Viswanathan, L., Utterback, T. R., Sutton, G. G., Lawson, D., Waterhouse, R. M., Venter, J. G., Strausberg, R. L., Berenbaum, M. R., Collins, F. H., Zdobnov, E. M., Pittendrigh B. R. (2010). Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(27), 12168-12173.
- Klasson, L., Walker, T., Sebahia, M., Sanders, M. J., Quail, M. A., Lord, A., Sanders, S., Earl, J., O'Neill, S. L., Thomson, N., Sinkins, S. P., Parkhill, J. (2008). Genome evolution of *Wolbachia* strain wPip from the *Culex pipiens* group. *Molecular Biology and Evolution*, *25*(9), 1877-1887.
- Klasson, L., Westberg, J., Sapountzis, P., Näslund, K., Lutnaes, Y., Darby, A. C., Veneti, Z., Chen, L., Braig, H. R., Garrett, R., Bourtzis, K., Andersson, S. G. (2009). The mosaic genome structure of the *Wolbachia* wRi strain infecting *Drosophila simulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(14), 5725-5730.
- Koga, R., Bennett, G. M., Cryan, J. R., Moran, N. A. (2013). Evolutionary replacement of obligate symbionts in an ancient and diverse insect lineage. *Environmental Microbiology*, *15*(7), 2073-2081.
- Krinsky, W. L. (2002). Tsetse flies (Glossinidae). *Academic Press, Boston*.
- Kutty, S. N., Pape, T., Wiegmann, B. M., Meier, R. (2010). Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorrhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's fly. *Systematic Entomology*, *35*(4), 614-635.
- Lack, J. B., Nichols, R. D., Wilson, G. M., & Van Den Bussche, R. A. (2011). Genetic signature of reproductive manipulation in the phylogeography of the bat fly, *Trichobius major*. *Journal of Heredity*, *102*(6), 705-718.

- Lambkin, C. L., Sinclair, B. J., Pape, T., Courtney, G. W., Skevington, J. H., Meier, R., Yeates, D. K., Blagoderov, V., Wiegmann, B. M. (2013). The phylogenetic relationships among infraorders and superfamilies of Diptera based on morphological evidence. *Systematic Entomology*, 38(1), 164-179.
- Le, S. Q., Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1307-1320.
- Lefevre, C., Charles, H., Vallier, A., Delobel, B., Farrell, B., Heddi, A. (2004). Endosymbiont phylogenesis in the Dryophthoridae weevils: evidence for bacterial replacement. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6), 965-973.
- Lehane, M. J., Aksoy, S., Gibson, W., Kerhornou, A., Berriman, M., Hamilton, J., Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Lehane, S., Hall, N. (2003). Adult midgut expressed sequence tags from the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans* and expression analysis of putative immune response genes. *Genome Biology*, 4(10), R63.
- Lehane, M. J., Aksoy, S., Levashina, E. (2004). Immune responses and parasite transmission in blood-feeding insects. *Trends in Parasitology*, 20(9), 433-439.
- Lindh, J. M., & Lehane, M. J. (2011). The tsetse fly *Glossina fuscipes fuscipes* (Diptera: Glossina) harbours a surprising diversity of bacteria other than symbionts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99(3), 711-720.
- Lo, N., Casiraghi, M., Salati, E., Bazzocchi, C., Bandi, C. (2002). How many *Wolbachia* supergroups exist?. *Molecular Biology and Evolution*, 19(3), 341-346.
- Lo, N., Paraskevopoulos, C., Bourtzis, K., O'Neill, S. L., Werren, J. H., Bordenstein, S. R., Bandi, C. (2007). Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3), 654-657.
- Ma, W. C., Denlinger, D. L. (1974). Secretory discharge and microflora of milk gland in tsetse flies. *Nature* 247, 301-303.
- Maa, T. C. (1969). A revised checklist and concise host index of Hippoboscidae (Diptera). *Pacific Insects Monograph*, 20, 261-299.
- Maltz, M. A., Weiss, B. L., O'Neill, M., Wu, Y., Aksoy, S. (2012). OmpA-mediated biofilm formation is essential for the commensal bacterium *Sodalis glossinidius* to colonize the tsetse fly gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(21), 7760-7768.
- Margulis, L. (1973). Symbiosis and evolution. *Readings in Biology and Man*, 225(2), 140.
- McAlpine, J. F. (1989). Phylogeny and classification of the Muscomorpha. *Manual of Nearctic Diptera*, 3, 1397-1518.



- McCutcheon, J. P., McDonald, B. R., Moran, N. A. (2009). Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(36), 15394-15399.
- Margaret J, M. N. (1999). Consequences of evolving with bacterial symbionts: insights from the squid-vibrio associations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 30(1), 235-256.
- Medlock, J., Atkins, K. E., Thomas, D. N., Aksoy, S., Galvani, A. P. (2013). Evaluating paratransgenesis as a potential control strategy for african trypanosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(8), e2374.
- Meier, R., Kotrba, M., Ferrar, P. (1999). Ovoviviparity and viviparity in the Diptera. *Biological Reviews*, 74(3), 199-258.
- Miethke, M., Marahiel, M. A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 413-451.
- Mogollon-Pasapera, E., Otvos Jr, L., Giordano, A., Cassone, M. (2009). *Bartonella*: emerging pathogen or emerging awareness?. *International Journal of Infectious Diseases*, 13(1), 3-8.
- Moran, N. A., Kaplan, M. E., Gelsey, M. J., Murphy, T. G., Scholes, E. A. (1999). Phylogenetics and evolution of the aphid genus *Uroleucon* based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Systematic Entomology*, 24(1), 85-93.
- Moran, N. A., Plague, G. R. (2004). Genomic changes following host restriction in bacteria. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14(6), 627-633.
- Moran, N. A., Tran, P., Gerardo, N. M. (2005). Symbiosis and insect diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8802-8810.
- Moran, N. A., McCutcheon, J. P., Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, 42, 165-190.
- Morse, S. F., Dick, C. W., Patterson, B. D., Dittmar, K. (2012). Some like it hot: evolution and ecology of novel endosymbionts in bat flies of cave-roosting bats (Hippoboscoidea: Nycterophiliinae). *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8639-8649.
- Morse, S. F., Olival, K. J., Kosoy, M., Billeter, S., Patterson, B. D., Dick, C. W., Dittmar, K. (2012). Global distribution and genetic diversity of *Bartonella* in bat flies (Hippoboscoidea: Sreblidae: Nycteribiidae). *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1717-1723.

- Morse, S. F., Bush, S. E., Patterson, B. D., Dick, C. W., Gruwell, M. E., Dittmar, K. (2013). Evolution, multiple acquisition, and localization of endosymbionts in Bat flies (Diptera: Hippoboscoidea: Streblidae and Nycteribiidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 2952-2961.
- Nirmala, X., Hypša, V., Žurovec, M. (2001). Molecular phylogeny of Calyptratae (Diptera: Brachycera): the evolution of 18S and 16S ribosomal rDNAs in higher dipterans and their use in phylogenetic inference. *Insect Molecular Biology*, 10(5), 475-485.
- Nogge, G. (1976). Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Westwood) caused by loss of symbionts. *Experientia*, 32(8), 995-996.
- Nogge, G. (1981). Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in hematophagous arthropods. *Parasitology* 82, 101-104.
- Nováková, E., Hypša, V., Moran, N. A. (2009). *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiology*, 9(1), 143.
- Oakeson, K. F., Gil, R., Clayton, A. L., Dunn, D. M., von Niederhausern, A. C., Hamil, C., Aoyagi, A., Duval, B., Baca, A., Silva, F. J., Vallier, A., Jackson, D. G., Latorre, A., Weiss, R. B., Heddi, A., Moya, A., Dale, C. (2014). Genome Degeneration and Adaptation in a Nascent Stage of Symbiosis. *Genome Biology and evolution*, 6(1), 76-93.
- Oliver, K. M., Degnan, P. H., Burke, G. R., Moran, N. A. (2010). Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual Review of Entomology*, 55, 247-266.
- O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M., Karr, T. L., Robertson, H. M. (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7), 2699-2702.
- Pais, R., Lohs, C., Wu, Y., Wang, J., Aksoy, S. (2008). The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19), 5965-5974.
- Pamilo, P., Viljakainen, L., Vihavainen, A. (2007). Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. *Molecular Biology and Evolution*, 24(6), 1340-1346.
- Paraskevopoulos, C., Bordenstein, S. R., Wernegreen, J. J., Werren, J. H., Bourtzis, K. (2006). Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of

- Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. *Current Microbiology*, 53(5), 388-395.
- Perotti, M. A., Allen, J. M., Reed, D. L., Braig, H. R. (2007). Host-symbiont interactions of the primary endosymbiont of human head and body lice. *The FASEB Journal*, 21(4), 1058-1066.
- Petersen, F. T., Meier, R., Kutty, S. N., Wiegmann, B. M. (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.
- Plague, G. R., Dunbar, H. E., Tran, P. L., Moran, N. A. (2008). Extensive proliferation of transposable elements in heritable bacterial symbionts. *Journal of Bacteriology*, 190(2), 777-779.
- Posada, D. (2009). Selection of models of DNA evolution with jModelTest. *Methods of Molecular Biology*, 537, 93-112.
- Raychoudhury, R., Baldo, L., Oliveira, D. C., Werren, J. H. (2009). Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. *Evolution*, 63(1), 165-183.
- Reeves, W. K., Loftis, A. D., Gore, J. A., Dasch, G. A. (2005). Molecular evidence for novel *Bartonella* species in *Trichobius major* (Diptera: Streblidae) and *Cimex adjunctus* (Hemiptera: Cimicidae) from two southeastern bat caves, USA. *Journal of Vector Ecology*, 30(2), 339.
- Richly, E., Leister, D. (2004). NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 21(6), 1081-1084.
- Rio, R. V., Lefevre, C., Heddi, A., Aksoy, S. (2003). Comparative genomics of insect-symbiotic bacteria: influence of host environment on microbial genome composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6825-6832.
- Rio, R. V., Symula, R. E., Wang, J., Lohs, C., Wu, Y. N., Snyder, A. K., Bjornson, R. D., Oshima, K., Biehl, B. S., Perna, N. T., Hattori, M., Aksoy, S. (2012). Insight into the transmission biology and species-specific functional capabilities of tsetse (Diptera: Glossinidae) obligate symbiont *Wigglesworthia*. *Molecular Biology*, 3(1), e00240-11.
- Rodriguez, F. J. L. O. J., Oliver, J. L., Marin, A., Medina, J. R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*, 142(4), 485-501.

- Rogers, H. H., Griffiths-Jones, S. (2012). Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genomes of *Drosophila*. *PloS one*, 7(3), e32593.
- Ros, V. I., Fleming, V. M., Feil, E. J., Breeuwer, J. A. (2009). How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 1036-1043.
- Rosas-Pérez, T., Rosenblueth, M., Rincón-Rosales, R., Mora, J., Martínez-Romero, E. (2014). Genome sequence of “*Candidatus* Walczuchella monophlebidarum” the flavobacterial endosymbiont of *Llaveia axin axin* (Hemiptera: Coccoidea: Monophlebidae). *Genome Biology and Evolution*, 6(3), 714-726.
- Rowley, S. M., Raven, R. J., McGraw, E. A. (2004). *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Current Microbiology*, 49(3), 208-214.
- Runyen-Janecky, L. J., Brown, A. N., Ott, B., Tujuba, H. G., Rio, R. V. (2010). Regulation of high-affinity iron acquisition homologues in the tsetse fly symbiont *Sodalis glossinidius*. *Journal of Bacteriology*, 192(14), 3780-3787.
- Russell, J. A., Latorre, A., Sabater-Muñoz, B., Moya, A., Moran, N. A. (2003). Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Molecular Ecology*, 12(4), 1061-1075.
- Salunke, B. K., Salunkhe, R. C., Dhotre, D. P., Khandagale, A. B., Walujkar, S. A., Kirwale, G. S., Ghate, H. V., Patole, M. S., Shouche, Y. S. (2010). Diversity of *Wolbachia* in *Odontotermes* spp. (Termitidae) and *Coptotermes heimi* (Rhinotermitidae) using the multigene approach. *FEMS Microbiology Letters*, 307(1), 55-64.
- Sameshima, S., Hasegawa, E., Kitade, O., Minaka, N., Matsumoto, T. (1999). Phylogenetic comparison of endosymbionts with their host ants based on molecular evidence. *Zoological Science*, 16(6), 993-1000.
- Sandström, J. P., Russell, J. A., White, J. P., Moran, N. A. (2001). Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Molecular Ecology*, 10(1), 217-228.
- Saridaki, A., Bourtzis, K. (2010). *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. *Current Opinion in Microbiology*, 13(1), 67-72.
- Sasaki-Fukatsu, K., Koga, R., Nikoh, N., Yoshizawa, K., Kasai, S., Mihara, M., Kobayashi, M., Tomita, T., Fukatsu, T. (2006). Symbiotic bacteria associated with stomach discs of human lice. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7349-7352.

- Sasaki-Fukatsu, K., Koga, R., Nikoh, N., Yoshizawa, K., Kasai, S., Mihara, M., Kobayashi, M., Tomita, T., Fukatsu, T. (2006). Symbiotic bacteria associated with stomach discs of human lice. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7349-7352.
- Sauer, J., Hines, J., Gough, G., Thomas, I. (1998). Numts: a challenge for avian systematics and population biology. *The Auk*, 115(1), 214-221.
- Sémétey, O., Gatineau, F., Bressan, A., Boudon-Padieu, E. (2007). Characterization of a gamma-3 proteobacteria responsible for the syndrome “*basses richesses*” of sugar beet transmitted by *Pentastiridius* sp. (Hemiptera: Cixiidae). *Phytopathology* 97:72–78
- Sloan, D. B., Nakabachi, A., Richards, S., Qu, J., Murali, S. C., Gibbs, R. A., Moran, N. A. (2014). Parallel histories of horizontal gene transfer facilitated extreme reduction of endosymbiont genomes in sap-feeding insects. *Molecular Biology and Evolution*, msu004.
- Smith, W. A., Oakeson, K. F., Johnson, K. P., Reed, D. L., Carter, T., Smith, K. L., Koga, R., Fukatsu, T., Clayton, D. H., Dale, C. (2013). Phylogenetic analysis of symbionts in feather-feeding lice of the genus *Columbicola*: evidence for repeated symbiont replacements. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 109.
- Smith, C. L., Weiss, B. L., Aksoy, S., Runyen-Janecky, L. J. (2013). Characterization of the achromobactin iron acquisition operon in *Sodalis glossinidius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(9), 2872-2881.
- Snyder, A. K., Deberry, J. W., Runyen-Janecky, L., Rio, R. V. (2010). Nutrient provisioning facilitates homeostasis between tsetse fly (Diptera: Glossinidae) symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1692), 2389-2397.
- Snyder, A. K., McMillen, C. M., Wallenhorst, P., Rio, R. V. (2011). The phylogeny of *Sodalis*-like symbionts as reconstructed using surface-encoding loci. *FEMS Microbiology Letters*, 317(2), 143-151.
- Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., Crandall, K. A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13486-13491.
- Spaulding, A. W., von Dohlen, C. D. (2001). Psyllid endosymbionts exhibit patterns of co-speciation with hosts and destabilizing substitutions in ribosomal RNA. *Insect Molecular Biology*, 10(1), 57-67.

- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A., Hurst, G. D. (1999). *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 71-102.
- Subandiyah, S., Nikoh, N., Tsuyumu, S., Somowiyarjo, S., Fukatsu, T. (2000). Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoological Science*, 17(7), 983-989.
- Sunnucks, P., Hales, D. F. (1996). Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). *Molecular Biology and Evolution*, 13(3), 510-524.
- Šorfová, P., Škeříková, A., Hypša, V. (2008). An effect of 16S rRNA intergenic variability on coevolutionary analysis in symbiotic bacteria: Molecular phylogeny of *Arsenophonus triatominarum*. *Systematic and Applied Microbiology*, 31(2), 88-100.
- Taylor, M. J., Bandi, C., Hoerauf, A. (2005). *Wolbachia* bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Advances in Parasitology*, 60, 245-284.
- Thao, M. L., Moran, N. A., Abbot, P., Brennan, E. B., Burckhardt, D. H., Baumann, P. (2000). Cospeciation of psyllids and their primary prokaryotic endosymbionts. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2898-2905.
- Thao, M. L., Baumann, P. (2004). Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (*Sternorrhyncha*: *Aleyrodidae*). *Current Microbiology*, 48(2), 140-144.
- Toh, H., Weiss, B. L., Perkin, S. A., Yamashita, A., Oshima, K., Hattori, M., Aksoy, S. (2006). Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. *Genome Research*, 16(2), 149-156.
- Toju, H., Hosokawa, T., Koga, R., Nikoh, N., Meng, X. Y., Kimura, N., Fukatsu, T. (2010). “*Candidatus* Curculioniphilus buchneri,” a novel clade of bacterial endocellular symbionts from weevils of the genus *Curculio*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 275-282.
- Toju, H., Fukatsu, T. (2011). Diversity and infection prevalence of endosymbionts in natural populations of the chestnut weevil: relevance of local climate and host plants. *Molecular Ecology*, 20(4), 853-868.
- Trowbridge, R. E., Dittmar, K., Whiting, M. F. (2006). Identification and phylogenetic analysis of *Arsenophonus*- and *Photorhabdus*-type bacteria from adult

- Hippoboscidae and Streblidae (Hippoboscoidea). *Journal of Invertebrate Pathology*, 91(1), 64-68.
- Van den Bossche, P., Rocque, S. D. L., Hendrickx, G., Bouyer, J. (2010). A changing environment and the epidemiology of tsetse-transmitted livestock trypanosomiasis. *Trends in Parasitology*, 26(5), 236-243.
- Van der Kuyl, A. C., Kuiken, C. L., Dekker, J. T., Perizonius, W. R., Goudsmit, J. (1995). Nuclear counterparts of the cytoplasmic mitochondrial 12S rRNA gene: a problem of ancient DNA and molecular phylogenies. *Journal of Molecular Evolution*, 40(6), 652-657.
- Walker, T., Johnson, P. H., Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F. D., McMeniman, C. J., Leong, Y. S., Dong, Axford, J., Kriesner, P., Lloyd, A. L., Ritchie, S. A., O'Neill, S. L., Hoffmann, A. A. (2011). The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 476(7361), 450-453.
- Wang, J., Wu, Y., Yang, G., Aksoy, S. (2009). Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tsetse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence trypanosome transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(29), 12133-12138.
- Wang, J., Aksoy, S. (2012). PGRP-LB is a maternally transmitted immune milk protein that influences symbiosis and parasitism in tsetse's offspring. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10552-10557.
- Wang, J., Brelsfoard, C., Wu, Y., Aksoy, S. (2013). Intercommunity effects on microbiome and GpSGHV density regulation in tsetse flies. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, S32-S39.
- Weiss, B. L., Mouchotte, R., Rio, R. V., Wu, Y. N., Wu, Z., Heddi, A., Aksoy, S. (2006). Interspecific transfer of bacterial endosymbionts between tsetse fly species: infection establishment and effect on host fitness. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7013-7021.
- Weiss, B. L., Wu, Y., Schwank, J. J., Tolwinski, N. S., Aksoy, S. (2008). An insect symbiosis is influenced by bacterium-specific polymorphisms in outer-membrane protein A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), 15088-15093.
- Weiss, B. L., Wang, J., Aksoy, S. (2011). Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. *PLoS Biology*, 9(5), e1000619.
- Weiss, B. L., Maltz, M., Aksoy, S. (2012). Obligate symbionts activate immune system development in the tsetse fly. *The Journal of Immunology*, 188(7), 3395-3403.

- Weiss, B. L., Wang, J., Maltz, M. A., Wu, Y., Aksoy, S. (2013). Trypanosome infection establishment in the tsetse fly gut is influenced by microbiome-regulated host immune barriers. *PLoS Pathogens*, 9(4), e1003318.
- Welburn, S. C., Fèvre, E. M., Coleman, P. G., Odiit, M., Maudlin, I. (2001). Sleeping sickness: a tale of two diseases. *Trends in Parasitology*, 17(1), 19-24.
- Werren, J. H., Baldo, L., Clark, M. E. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 741-751.
- Whelan, S., Goldman, N. (2001). A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, 18(5), 691-699.
- Wiegmann, B. M., Trautwein, M. D., Winkler, I. S., Barr, N. B., Kim, J. W., Lambkin, C., Bertone, M. A., Cassel, B. K., Bayless, K. M., Heimberg, A. M., Wheeler, B. M., Peterson, K. J., Pape, T., Sinclair, B. J., Skevington, J. H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S. N., Schmidt-Ott, U., Kampmeier, G. E., Thompson, F. C., Grimaldi, D. A., Beckenbach, A. T., Courtney, G. V., Friedrich, M., Meier, R., Yeates Yeates, D. K. (2011). Episodic radiations in the fly tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5690-5695.
- Wilkinson, D. M. (2001). Mycorrhizal evolution. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(2), 64-65.
- Wu, M., Sun, L. V., Vamathevan, J., Riegler, M., Deboy, R., Brownlie, J. C., McGraw, E. A., Martin, W., Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Madupu, R., Beanan, M. J., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Durkin, A. S., Kolonay, J. F., Nelson, W. C., Mohamoud, Y., Berry, P. L. K., Young, M. B., Utterback, T., Weidman, J., Nierman, W. C., Paulsen, I. T., Nelson, K. E., Tettelin, H., O'Neill, S. L., Eisen, J. A. (2004). Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis* wMel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. *PLoS Biology*, 2(3), e69.
- Xi, Z., Khoo, C. C., Dobson, S. L. (2005). *Wolbachia* establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science*, 310(5746), 326-328.
- Zhang, D. X., Hewitt, G. M. (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Trends in Ecology and Evolution*, 11(6), 247-251.
- Zabalou, S., Riegler, M., Theodorakopoulou, M., Stauffer, C., Savakis, C., Bourtzis, K. (2004). *Wolbachia* -induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(42), 15042-15045.



- Zabalou, S., Apostolaki, A., Livadaras, I., Franz, G., Robinson, A. S., Savakis, C., Bourtzis, K. (2009). Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitidis capitata* genetic sexing strain. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 132(3), 232-240.
- Zchori-Fein, E., Brown, J. K. (2002). Diversity of prokaryotes associated with *Bemisia tabaci* (*Gennadius*) (*Hemiptera: Aleyrodidae*). *Annals of the Entomological Society of America*, 95(6), 711-718.
- Zhou, W., Rousset, F., O'Neill, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265(1395), 509-515.
- Zhu, Q., Kosoy, M., Olival, K. J., Dittmar, K. (2014). Horizontal Transfers and Gene Losses in the phospholipid pathway of *Bartonella* reveal clues about early ecological niches. *doi: 10.1101/003350*.
- Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. (2008). Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(5), 723-735.
- Zischler, H., Höss, M., Handt, O., Von Haeseler, A., Van Der Kuyl, A. C., Goudsmit, J. (1995). Detecting dinosaur DNA. *Science*, 268(5214), 1192.
- Zreik, L., Bove, J. M., Garnier, M. (1998). Phylogenetic characterization of the bacterium-like organism associated with marginal chlorosis of strawberry and proposition of a Candidatus taxon for the organism, “*Candidatus Phlomobacter fragariae*”. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(1), 257-261.
- 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.