

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Diverzita mikrobiomů vybraných druhů ovádů
(Diptera: Tabanidae) a její vliv na přenos trypanosom
(*Trypanosoma* sp.)**

Bakalářská práce

Simona Křepelková

Školitelka: RNDr. Eva Nováková, PhD.

České Budějovice 2017

Křepelková, S., 2017: Diverzita mikrobiomů vybraných druhů ovádů (Diptera: Tabanidae) a její vliv na přenos trypanosom (*Trypanosoma* sp.). [Diversity of the selected species of horseflies (Diptera: Tabanidae) and its effect on the transmission of trypanosomes (*Trypanosoma* sp.). Bc. Thesis, in Czech] – 37 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Three different bacterial symbionts have been known from blood-sucking horse flies (Tabanidae), *Spiroplasma* from family Spiroplasmaceae, *Midichloria* from family Midichloriaceae and *Wolbachia* from family Rickettsiaceae. Microbiomes of tabanids has been explored only marginally, therefore in my thesis I explore them in more details. I have described microbiomes of 7 species from Africa, USA and Czech republic, and found them to contain bacteria from families Spiroplasmataceae, Chthoniobacterales, Pseudomonadaceae, Acetobacteraceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Staphylococcaceae, Halomonadaceae, Moraxellaceae. In addition, I have studied *Trypanosoma*'s influence on the composition to the horse fly microbiome. I have not found significant differences between microbiomes of infected and uninfected individuals, indicating that the presence of *Trypanosoma* may not have any strong effect on the microbiome.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na 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, 18. dubna

Simona Křepelková

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Evě Novákové, za odborné vedení, cenné rady a morální podporu během výzkumu a psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Václavu Hypšovi, Evě Šochové, Janě Říhové za rady a pomoc v laboratoři. Velké díky patří Veronice Škochové za morální podporu a spolupráci v laboratoři.

Obsah

1 ÚVOD	1
1.1 Symbióza.....	1
1.2 Význam symbióza u hmyzu.....	1
1.3 Hostitelské organismy: Tabanidae.....	3
1.3.1 Životní cyklus.....	3
1.3.2 Ekonomický význam.....	4
1.3.3 Tabanidae a symbionti.....	6
2 CÍLE	8
3 MATERIÁL A METODY	9
3.1 Sběr vzorků a izolace DNA.....	9
3.2 PCR.....	10
3.3 Gelová elektroforéza.....	11
3.4 Sanger sekvenace.....	12
3.5 Amplikonové sekvenování.....	12
3.5.1 Zpracování dat.....	13
3.6 R studio.....	14
4 VÝSLEDKY	15
4.1 PCR.....	15
4.2 Sanger sekvenování.....	15
4.3 Analýza amplikonových dat.....	17
5 DISKUZE	25
6 ZÁVĚR	28
7 REFERENCE	29

1 ÚVOD

1.1 Symbióza

Snaha o nalezení termínu, pod který bychom mohli klasifikovat vztahy jako jsou mutualismus či parazitismus vedla botanika Antona de Baryho roku 1878 k vytvoření termínu symbióza. Symbiózu charakterizoval jako „soužití dvou i více organismů, kteří striktně nemusejí být fylogeneticky příbuzní“ (de Bary, 1879). Z hlediska evoluce sehrála symbióza důležitou roli např. při vzniku eukaryotických buněk. Předpokládá se, že složitější organely jako jsou mitochondrie a chloroplasty, vznikly právě bakteriální endosymbiózou. Podrobnější studie odhalily původ mitochondrií z alfa- proteobakterií, které vstoupily do eukaryotických buněk (Andersson et al., 1999). Pro vznik mitochondrií bylo klíčové začlenění endosymbiotické bakterie do buněčných a metabolických procesů například importem proteinů z hostitelské buňky (McCutcheon et al., 2014). Díky funkčnímu importu proteinů hostitele byly vyřazeny homologní proteiny tvořené endosymbionty, což podpořilo ztráty genů z genomu endosymbionta, kódujících například prvky pro DNA a RNA polymerázy, díky čemuž se endosymbiont stal fungujícím prvkem buňky, tedy organelou (Husník, 2017). Díky sérii endosymbióz bylo umožněno například buněčné dýchání či fotosyntéza (Paracer et al., 2000).

1.2 Význam symbiózy u hmyzu

Symbiotické vztahy s bakteriemi rovněž zásadně ovlivnily evoluci hmyzu a výrazně přispěly k diverzifikaci této skupiny. Symbiotické bakterie jsou esenciální pro mnoho druhů hmyzu. Svému hostiteli mohou poskytovat různé nutriční a fitness výhody, či ochranu proti parazitům a predátorům (Buchner, 1965; Costopoulos et al., 2014; Proscodocimi et al., 2015). Bakterie, které poskytují svému hostiteli esenciální látky, které si sám nedokáže vytvořit, nazýváme P- symbionty (primární, obligátní symbiont). P-symbionti využívají své metabolické dráhy pro tvorbu vitamínů a aminokyselin, které poskytují hostiteli, a jsou tedy důležité pro jeho normální vývoj a reprodukci. Z tohoto důvodu by měla ztráta endosymbiontů pro hostitele fatální následky (Buchner, 1965; Douglas, 1989; Baumann et al., 2006; Proscodocimi et al., 2015). Tento jev můžeme pozorovat například u mšic, živící se převážně rostlinnou mízou a

mající tak nedostatek esenciálních aminokyselin, které jim poskytne endosymbiontní gammaproteobakterie *Buchnera aphidicola* (Gündüz et al., 2009). P-symbionti mají často redukovaný genom. Prostřednictvím genomických analýz srovnávajících volně žijící bakterie a bakterie uvnitř hostitele, bylo zjištěno, že dochází k výrazným změnám bakteriálního genomu, především ztrátě genů a následné redukci velikosti genomu (Andersson et al., 1999). U P-symbiontů můžeme zaznamenat dlouhou koevoluční historii s jejich hmyzím hostitelem a pozorujeme zde malé genomy s vyšším obsahem párů bazí A+T (Dale et al., 1999). P-symbionti jsou předáváni vertikálně, tedy z matky na potomky (Prosdocimi et al., 2015). Zejména P-endosymbionty nalezneme v cytosolu ve specializovaných buňkách zvaných bakteriocyty, které jsou buď umístěné v epitelu hmyzího střeva nebo v tukové tkáni, kde je můžeme snadno mikroskopicky rozeznat díky cytoplasmě buněk bohaté na bakterie. Bakteriocyty mohou být formované do útvaru zvaného bakteriom, který byl poprvé pozorován v 17. století Hookem (Hooke, 1667; Prosdocimi et al., 2015). Například u mouchy tse-tse je bakteriom součástí středního střeva (Balmand et al., 2013).

S-symbionti (sekundární, fakultativní) nejsou esenciální pro hostitele a můžeme je dělit na fakultativní mutualisty a reprodukční manipulátory (Moran, 2008). Fakultativní mutualisti poskytují výhody hostiteli ve fitness (Oliver et al., 2003), jako například ochranu proti predátorům nebo teplotní toleranci (Gauthier et al., 2015). Reprodukční manipulátoři, přenášení po mateřské linii (lokalizovaní v gonádách samic), způsobují nadprodukcii samic například prostřednictvím partenogeneze (Moran, 2008; Prosdocimi et al., 2015). S-symbionti se mohou vyskytovat ve střevech hmyzu, žlázách (zažívacích, mléčných) a okolo bakteriocytů s P-symbiontem. Jsou známé i případy, ve kterých S-symbionti pronikli do bakteriocytů či P-symbionty v bakteriocytech nahradili (Buchner, 1965; Moran et al., 2000). U S-symbiontů s kratší dobou koevoluce s hostitelem zaznamenáme velikost genomů a obsah A+T procentuálně mezi volně žijícími druhy bakterií a P-symbionty s delší koevolucí (Dale et al., 1999). V jednom hostiteli můžeme najít jak P tak S-symbionty (Dale et al., 2006). Jedním z dalších rozdílů mezi S- a P-symbiontem je i například možnost kultivace *in vitro* S-symbionta (například *Sodalis glossinidius*), což u P-symbiontů není možné (Dale et al., 1999).

1.3 Hostitelské organismy: Tabanidae

Čeď Tabanidae patří do řádu Diptera zahrnuje přes 4400 popsaných druhů. Mezi podčeďi řadíme Chrysopsinae (s kmeny Bouvieromyiini, Chrysopsini, Rhinomyziny), Pangoniinae (s kmeny Mycteriomyiini, Pangoniini, Philolichini, Scionini) Sceptidinae a Tabaninae (s kmeny Daichlorini, Haematopini, Tabanini) (Mackerras, 1955; Coscarón and Philip, 1979; Pechuman et al., 1983; Roskov et al., 2013). Tabanidae společně s Arthericidae, Pelecorhynchidae a Oreoleptidae jsou řazeni do nadčeďi zvané Tabanoidea a společně s Rhagionoidea tvoří infrařád Tabanomorpha, patřící do podřádu Brachycera (Diptera) (Kerr, 2010; Lambkin et al., 2013).

Vzorky analyzované v této práci řadíme do podčeďi Chrysopsinae a Tabaninae. Podčeď Chrysopsinae zahrnuje druhy *Chrysops*, kteří jsou známými přenašeči parazita *Loa loa* (Connal & Connal, 1922). Do podčeďi Tabaninae řadíme rod *Tabanus*, který patří k jednomu z nejrozmanitějších rodů řádu Diptera (Morita et al., 2016). Většina nemocí, přenášené ovády, je také spojena právě s tímto druhem (Foil et al., 1987).

1.3.1 Životní cyklus

Délka životního cyklu se u jednotlivých druhů liší. Větší druhy z čeďi *Tabanidae* potřebují pro svůj vývoj z vajíčka na dospělé 2-3 roky (Pechuman et al., 1983). Samičky kladou 100 - 800 vajíček většinou v okolí vody (Baldacchino et al., 2014), larvy proto nalezneme ve vodním prostředí. Avšak najdeme mezi tabanidy i druhy, jejichž larvy jsou na souši, jako například larva *Hybomitra microcephala*. Ve stádiu larvy přečkají některé druhy tabanidů zimu (Pechuman et al., 1996, Baldacchino et al., 2014). Larvy jsou aktivními predátory, živí se například červy, často se u nich objevuje i kanibalismus (Baldacchino et al., 2014), avšak v období hibernace dokáží přežít i delší dobu bez potravy (Baldacchino et al., 2014). Larvy různých druhů od sebe můžeme odlišit například pomocí charakteristického útvaru, který nalezneme na jejich pouzdrech, nebo pomocí zadních průduchů. Nejdůležitějším poznávacím znakem je rozsah změn těla, které zaznamenáme během jejich vývoje v dospělce (Pechuman et al., 1983). Stádium kukly trvá od 1-3 týdnů, v závislosti na druhu. Zbarvení kukel

je většinou do hněda s řadou trnů okolo každého třetího abdominálního segmentu (Pechuman et al., 1983). Samečci mají dobu vývoje kratší než samičky (Baldacchino et al., 2014). Přibližná délka života dospělců je okolo 2-3 týdnů (Chvála et al., 1972). Dospělci získávají cukr z rostlinného nektaru a získávají tak potřebnou energii pro let. Samičky navíc bezprostředně po páření sají krev, kterou potřebují pro vývoj vajíček. Výjimku tvoří nehematofágní samičky rodu *Pangonius* a autogenní druhy jako *Tabanus nigrovittatus* u kterých samičky nepotřebují před prvním kladením vajíček žádnou krev (Baldacchino et al., 2014).

1.3.2 Ekonomický význam- přenos nemocí

Mezi hlavní hostitele ovádů patří dobytek, ale ani sání na lidech není neobvyklé. Proto je důležité, zajímat se o množství patogenů, které mohou Tabanidae přenášet. Fungují jako vektory pro přenos řady onemocnění (Pechuman et al., 1996).

Přenos tabanidy může být mechanický nebo biologický, záleží o jakého patogena se jedná. Většina patogenů je přenesena mechanicky. Mechanický přenos je založený na způsobu sání tabanidů. Při sání z kapky krve na infikovaném jedinci se patogeny snadno zachytí na velkých kusadlech či sosáku a jelikož je jejich sání často přerušované, ihned hledají nového hostitele a snadno tak dojde k přenosu patogenů z infikovaného jedince na zdravého (Pechuman et al., 1983; Mullen 2002; Baldacchino et al., 2014). Tabanidae se podílí i na přenosu biologickém, při kterém se patogen vyvine do určitého stádia v těle tabanida, přesune se do slinných žláz a při sání je pak přenesen na finálního hostitele (Mullen, 2002).

Mezi patogeny přenášené tabanidy patří například *Bacillus anthracis*, způsobující onemocnění Anthrax. První zmínka o přenosu této nemoci byla zaznamenána roku 1846 Hintermayerem, který popsal druhy *Tabanus bovinus*, *Chrysops coecutiens*, sající na mrtvém dobytku, kteří poté rozšířili nákazu i na zdravý dobytek (Anthony, 1960).

Tabanidae, konkrétně rod *Chrysops*, funguje také jako vektor pro biologický přenos parazita *Loa loa* (typický pro Afriku). Parazit se vyvine v chrysopsovi do stádia larvy a larva je následně přenesena na člověka, který je definitivním hostitelem (Anthony, 1960).

Ačkoli jedním z hlavních přenašečů trypanosom (Kinetoplastida) je moucha tse-tse, některé kosmopolitní druhy jako *Trypanosoma theileri* a *T. evansi* jsou přenášené například tabanidy druhu *Atylotus agretis*, *Haematopota pluvialis* (Desquesnes et al., 2003). Tabanidae

fungují jako přenašeči těchto trypanosom zvláště v Latinské Americe, kde se moucha tse-tse nevyskytuje (Jones et al., 2001; Hamilton, 2012). *T. theileri* napadá hlavně dobytek, čímž způsobuje velké ekonomické ztráty. Při infekci se výrazně snižuje váha dobytka a později i produkce mléka (Villa et al., 2008). Dalším druhem je *T. evansi*, která se vyvinula z *Trypanosomy brucei*, prostřednictvím delece maxicircle DNA kinetoplastů, potřebné pro cyklický vývoj *T. brucei* v hostitelské mouše tse-tse. *T. evansi* způsobuje onemocnění zvané „surra“, postihující například velbloudy. Tabanidae zde slouží jako mechaničtí vektorů (Desquesnes et al., 2013). Tabanidae mohou dále přenášet trypanosomy druhu *T. vivax*, způsobující onemocnění Nagana u dobytka, které taktéž způsobuje velké ekonomické ztráty (Jones et al., 2001; Hamilton, 2012).

Mezi další přenášené patogeny patří například *Besnoitia besnoiti* a *Anaplasma marginale*. *Besnoitia besnoiti*, parazitující na dobytku, způsobuje onemocnění „bovine besnoitiosis“, které již bylo diagnostikováno i v Evropě (Jacquiet et al., 2010). *Anaplasma marginale* patří do bakteriální čeledi Rickettsiales a na jejím mechanickém přenosu se podílí i jedinci z čeledi Tabanidae, konkrétně druh *Tabanus bovinus* (Wilson et al., 1966, Hornok et al., 2008). Onemocnění anaplazmóza způsobená tímto patogenem postihuje zejména dobytek (Hornok et al., 2008).

1.3.3 Tabanidae a symbionti

Tabanidae nejsou výhradní hematofágové. Jak bylo popsáno výše, v různých vývojových stádiích životního cyklu přijímají jinou, nutričně vyváženou, potravu. Tabanidae nejsou tedy závislí na obligátních symbiontech. V lumen střeva hostí pravděpodobně méně specifické bakteriální komunity, které zřejmě získávají z okolního prostředí (například z vody a z rostlinných šťáv). Celá bakteriální komunita asociovaná s hostitelem se nazývá mikrobiom (Wang et al., 2011). Mikrobiom, podobně jako primární a sekundární symbionti, přispívá k celkovému fitness hostitele, zejména ve vztahu k parazitům a patogenům (Dale et al., 1999; Weiss et al., 2013). Je známa celá řada vektorů, jejichž mikrobiom inhibuje replikaci parazitů nebo virových infekcí (např. moucha tse - tse) (Weiss et al., 2013). Složení mikrobiomu ovádů nebylo dodnes komplexně studováno. Některé práce pouze poukazují na přítomnost bakterií jako je *Spiroplasma* sp. či *Wolbachia* sp. a *Midichloria* sp. (Hornok et al., 2008; Lo et al., 2015).

Spiroplasma byla poprvé objevena v rostlinách (např. kukuřici) a následně izolována z různých druhů hmyzu a klíšťat (Davis, 1974). Je tedy možné, že se do hmyzu přenesla právě z kontaminovaných květů. V roce 1984 byla objevena i u tabanidů (Clark et al., 1984). Roku 1998 byla *Spiroplasma turanicum* izolována i z rodu *Haematopota*. *Spiroplasma* patří do třídy bakterií Mollicutes (Firmicutes). Buňky těchto bakterií jsou malé (0,2 - 0,3 μm), s tenkou buněčnou stěnou. Mezi další spiroplasmy izolované z čeledi Tabanidae patří například *Spiroplasma lineolae* izolovaná roku 1997 z *Tabanus lineola* (French et al., 1997). U většiny druhů spiroplasem byl zaznamenán horizontální přenos (po sání na rostlině) či kombinace vertikálního a horizontálního přenosu mezi různými druhy členovců (Whitcomb, 1980). Jelikož je přenášena samičkami, využívá *Spiroplasma* ke své propagaci strategii „male-killing“, prostřednictvím které zajistí přežití samičích jedinců na úkor samců (Hurst et al., 2000). Tuto strategii uplatňují spiroplasmy například u hostitelů druhu *Drosophila melanogaster* (Diptera) nebo *Danaus chrysippus* (Lepidoptera) (Jiggins et al., 2000; Montenegro et al., 2005).

Wolbachia je endosymbiotická bakterie ze skupiny Alphaproteobacteria. *Wolbachia* je typickým endosymbiontem hmyzu a je přenášena především vertikálně přes hostitelská vajíčka, ačkoli můžeme zaznamenat i přenos horizontální (Werren et al., 1997). *Wolbachia* je známá pro schopnost zvýšit svou prevalenci v populaci prostřednictvím manipulací s reprodukčním systémem svého hostitele. U rodu *Wolbachia* se vyvinula řada mechanismů, skrze které

ovlivňuje svého hostitele, například indukce reprodukční nekompatibility nebo partenogeneze, kdy se vajíčka líhnou bez oplození samečkem. Paradoxem je, že na druhou stranu poskytuje *Wolbachia* hostiteli určité výhody, jako například rezistenci k virovým nákazám (Werren, 1997; Arakaki et al., 2001; Hedges et al., 2008). U čeledi Tabanidae studie uvádějí přítomnost *Wolbachia* „like organism” (Hornok et al., 2008).

Bakterie z rodu *Midichloria* patří mezi Rickettsiales a poprvé byly popsána u klíšťat. *Midichloria* se replikuje uvnitř organel hostitele, které může i poničit, avšak bez zjevných dopadů na funkčnost buněk hostitele (Sassera et al., 2006). Je jediným organismem, který napadá cytosol i mitochondrie (Sassera et al., 2008 a 2006). Infekce midichlorií se projeví u mitochondrie velkou redukcí její matrix (Sacchi et al., 2004). Midichlorii můžeme pozorovat i v reprodukčním systému samiček (v oocytech) (Mariconti et al., 2012). U klíšťat je *Midichloria* přenášena vertikálně (Sassera et al., 2008). U čeledi Tabanidae byla *Midichloria* „like organism” pozorována konkrétně u druhů *Tabanus tergustus* a *Tabanus bovinus* (Hornok et al., 2008).

2 CÍLE

V této práci se budu zabývat diverzitou mikrobiomu vybraných druhů ovádů a jejím vlivem na přenos trypanosom.

- I. Určení diverzity a posouzení hostitelské specifity bakteriálních společenstev u různých druhů tabanidů.
- II. Posouzení závislosti statutu přenašeče (tj. pozitivně diagnostikován rod *Trypanosoma*) na profilu střevního mikrobiomu.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Sběr vzorků a izolace DNA

Pro screening symbiontů bylo použito 41 vzorků z čeledi Tabanidae, a to z České republiky (8 vzorků), USA (4 vzorky) a Afriky (29 vzorků). Podrobné informace o odchytových místech jsou uvedeny v Tabulce I. Osobně odchycené vzorky (ČR a USA) byly skladovány v 96% etanolu v -4 °C a poté byla provedena izolace DNA.

Vzorky pocházející z afrických lokalit byly pro tento projekt poskytnuty Dr. Votýpkou ve formě DNA templátů. K izolaci DNA z českých a amerických vzorků byl použit izolační kit QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen). Při izolaci byl dodržován postup dle návodu od výrobce. Kvalita vyizolované DNA byla ověřena na nanofotometru a poté byla DNA použita jako templát pro amplifikaci požadovaných úseků prostřednictvím metody PCR (Polymerázová řetězová reakce).

Tab. I : Analyzované vzorky čeledi Tabanidae

Pracovní název	Lokalita odchytu	<i>Trypanosoma</i>	GPS lokalit
CAR_HF69	CAR	<i>Trypanosoma cervi</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF71	CAR	<i>Trypanosoma theileri</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF72	CAR	<i>Trypanosoma cervi</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF210	CAR	n	4°22'N 18°35'E
CAR_HF212	CAR	n	4°22'N 18°35'E
CAR_HF23	CAR	<i>Trypanosoma cervi</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF24	CAR	<i>Trypanosoma cervi</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF25	CAR	<i>Trypanosoma cervi</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF26	CAR	n	4°22'N 18°35'E
CAR_HF139	Gabon	n	0°40'60" N 11°30' E
CAR_HF142	Gabon	n	0°40'60" N 11°30' E
CAR_HF143	Gabon	n	0°40'60" N 11°30' E
CAR_HF10	CAR	<i>Trypanosoma theileri</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF11	CAR	n	4°22'N 18°35'E
CAR_HF12	CAR	<i>Trypanosoma theileri</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF257	Gabon	n	0°40'60" N 11°30' E
CAR_HF258	Gabon	n	0°40'60" N 11°30' E
CAR_HF64	CAR	n	4°22'N 18°35'E
CAR_HF65	CAR	<i>Trypanosoma theileri</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF66	CAR	n	4°22'N 18°35'E
CAR_HF67	CAR	<i>Trypanosoma cervi</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF68	CAR	<i>Trypanosoma theileri</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF126	Gabon	n	0°40'60" N 11°30' E
CAR_HF127	Gabon	n	0°40'60" N 11°30' E
CAR_HF22	CAR	n	4°22'N 18°35'E
CAR_HF45	CAR	<i>Trypanosoma theileri</i>	4°22'N 18°35'E
CAR_HF46	CAR	n	4°22'N 18°35'E
CAR_HF48	CAR	n	4°22'N 18°35'E
CAR_HF50	CAR	n	4°22'N 18°35'E
CAR_HF51	CAR	<i>Trypanosoma theileri</i>	4°22'N 18°35'E
TB_US_1	USA	<i>Trypanosoma</i> sp.	44°10'06.5'' N 89°38'30.6W
TB_US_2	USA	<i>Trypanosoma</i> sp.	44°10'06.5'' N 89°38'30.6W
TB_US_3	USA	<i>Trypanosoma</i> sp.	44°10'06.5'' N 89°38'30.6W
TB_US_4	USA	<i>Trypanosoma</i> sp.	44°10'06.5'' N 89°38'30.6W
TB_CZ_1	CZ__Mašovice	n	49.4453297N 14.8135600E
TB_CZ_3	CZ__Mašovice	n	49.4453297N 14.8135600E
TB_CZ_4	CZ__Mašovice	n	49.4453297N 14.8135600E
TB_CZ_5	CZ__Mašovice	n	49.4453297N 14.8135600E
TB_CZ_6	CZ__Mašovice	n	49.4453297N 14.8135600E
TB_CZ_7	CZ__Mašovice	n	49.4453297N 14.8135600E
TB_CZ_8	CZ__Mašovice	n	49.4453297N 14.8135600E
TB_CZ_9	CZ__Mašovice	n	49.4453297N 14.8135600E

3.2 PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Metoda PCR byla využita za účelem:

- i. otestování kvality získané DNA, především přítomnosti bakteriálního templátu, amplikonovým sekvenováním (PCR s EMP primery).
- ii. taxonomického zařazení jednotlivých vzorků z ČR a USA pomocí sekvencí genu COX.

Pro přípravu jednotlivých PCR reakcí o objemu 20 μ l byl použit PPP Master Mix (Top-Bio). Podmínky a informace o použitých primerech jsou uvedeny v Tabulce II. Celá reakce poté proběhla v Mastercycleru, ve kterém byl zvolen vhodný program pro dané primery. Velikost získaných produktů PCR byla ověřena na gelové elektroforéze.

Tab. II: Primery použité pro PCR reakce

Označení primeru	Sekvence (5'-3')	Zdroje	Nasedací teplota	Počet cyklů	Účel PCR
EMP 515f	GTG CCA GCM GCC GCG GTA A	Caporaso et al., 2011	50 °C	35	amplifikace 16S rRNA
EMP 806r	GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT	Caporaso et al., 2011	50 °C	35	amplifikace 16S rRNA
COIL 6625	CCGGATCCTTYTGRTTYTTYGGNCAYCC	Hafner et al., 1994	55 °C	35	určení druhů hostitelů
COIH 7005	CCGGATCCACNACRTARTANGTRTCRTG	Hafner et al., 1994	55 °C	35	určení druhů hostitelů

3.3 Gelová elektroforéza

PCR produkty (1-2 μ l) byly následně smíchány s fluorescenčním barvivem SYBR Green (Invitrogen) + DNA Loading Dye (Thermo Scientific) a napipetovány do předem připraveného 1% agarózového gelu. Abych byla schopna posoudit délku fragmentů, nanasla jsem do jedné z jamek i 1 kb DNA Ladder (O'GeneRuler, Thermo Scientific). Po skončení separace, jsem detekovala fragmenty prostřednictvím UV záření v přístroji UVITEC. U některých vzorků bylo

naamplifikováno více fragmentů DNA, pravděpodobně v důsledku nespécifického nasedání primerů na templát, případně vzniku primerových dimerů.

3.4 Sanger sekvenace a zpracování dat

Pozitivní PCR produkty, sekvenované pro gen COX, byly enzymaticky přečištěné pomocí exonukleázy Exo I. (Thermo Scientific) a alkalické fosfatázy Fast AP (Thermo Scientific) a odeslané na Sanger sekvenaci. Výsledné nukleotidové sekvence byly následně zpracovány v programu Geneious (<http://www.geneious.com>), kde byly odstraněny nepřesně osekvenované konce sekvencí. Prostřednictvím Standard Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)

jsem vyhledala nejpodobnější sekvence v databázi nr a přibližně tak zjistila taxonomickou příslušnost jednotlivých sekvencí. Základní fylogenetická analýza sekvencí COX byla provedena v programu Geneious prostřednictvím ML (Maximum Likelihood) analýzy v programu PhyML (Guindon et al., 2005) s použitím modelu HKY85.

3.5 Amplikonové sekvenování a zpracování dat

DNA všech vzorků tabanidů byla přepipetována na destičku dle předem vytvořené mapy a odeslána na amplikonové sekvenování. Amplikonové knihovny 16S rRNA byly vytvořeny spolupracující laboratoří (Prof. Noah Fierer, CU Boulder, CO, USA) dle protokolu EMP (Earth Microbiome Project, <http://www.earthmicrobiome.org/>). Celkově bylo osekvenováno 384 barcodově odlišných vzorků v jednom multiplexovém běhu platformy Illumina MiSeq, z toho 41 vzorků pro tento projekt. Na destičku jsem k napipetovaným vzorkům dále přidala H₂O, sloužící jako negativní kontrola (BLANK) pro možný případ kontaminace při amplifikaci, případně „well to well“.

3.5.1 Zpracování dat

Sekvenační data ve formě „pair-end” readů byla zpracována pomocí bioinformatických nástrojů popsaných níže. Primární zpracování tj. párování a demultiplexování, včetně kontroly kvality, bylo provedeno prostřednictvím programů Usearch (<http://www.drive5.com/usearch/>) a Qiime (<http://qiime.org/>), dle následujících kroků:

1. Prostřednictvím scriptu „*validate_mapping_file.py*” (Qiime), jsem ověřila správnost formátu mapy.
2. Použitím scriptu „*prep_fastq_for_uparse_paired.py*” (Usearch) – určeného pro „pair end” data došlo k demultiplexování hrubých Illumina dat, tedy k přiřazení konkrétních sekvencí jednotlivým vzorkům na základě jejich barkodu.
3. Script „*fastq_merge_pairs*” (Usearch) sloučil „pair-end” sekvence do celé délky ampliconu. Minimální přesah párových sekvencí byl nastaven na 20 bp. Minimální délka výsledné sekvence byla omezena na 200 bp.
4. Prostřednictvím scriptu „*fastq_filter*” (Usearch) bylo provedeno kvantitativní filtrování s parametrem *fastq_maxee* nastaveným na hodnotu 0,5.
5. Pomocí scriptu „*derep_fulllength*” byla data prostřednictvím programu Usearch 9 dereplikovaná, tzn. sekvence byly roztrženy do jednotlivých skupin na základě 100% shody. Tento krok zajistil snížení komplexity dat před vytvořením databáze.
6. Script „*sort_by_size*” v programu Usearch 7 s nastavením minimální velikosti dereplikovaných skupin na hodnotu 2, zajistil odstranění sekvencí, které se v datasetu vyskytovaly jen jednou.
7. Díky scriptu „*cluster_otus*” (Usearch) jsem vytvořila de novo databázi, ve které se vyskytovaly sekvence reprezentující jednotlivé OTU.
8. Scripty „*usearch_global*” a „*create_otu_table_from_uc_file.py*” (Usearch) byly demultiplexované sekvence (krok 3) namapovány na databázi a byla vytvořena OTU tabulka.

9. Pomocí scriptů „*biom convert*“, „*assign_taxonomy.py*“ a „*biom add-metadata*“ (Qiime) byla OTU tabulka převedena do formátu biom a jednotlivým OTU přiřazena taxonomická klasifikace. Taxonomická klasifikace byla přiřazena na základě sekvenční podobnosti s využitím algoritmu blast a databáze SILVA implementované do programu Qiime.
10. Script „*filter_taxa_from_otu_table.py*“ (Qiime) byl použit za účelem vyfiltrování nebakteriálních sekvencí, tzn. archeálních, chloroplastových a mitochondriálních.
11. Scripty „*summarize-table*“ a „*single_rarefaction*“ (Qiime) provedly sumarizace dat pro výběr počtu sekvencí a následně použitého znáhodnění, tj. normalizace datasetu. Znáhodnění bylo provedeno na 800, 1000 a 10000.
12. Použitím scriptu „*plot_taxa_summary.py*“ a „*beta_diversity.py*“ (Qiime), byly zjištěny základní charakteristiky diversity a podobnosti analyzovaných mikrobiomů.

3.6 R studio

Následné analýzy probíhaly v programu R studio (<https://www.rstudio.com/>), s využitím modulů vyvinutých pro mikrobiální ekologii. Konkrétně byly využity funkce modulu vegan (Oksanen, 2011), vhodné pro analýzy bakteriálních společenstev. První byly provedeny analýzy podobnosti NMDS (Non-metric multidimensional scaling) mezi mikrobiomy tabanidů z různých geografických oblastí a statistické vyhodnocení v rámci celého datasetu (funkce Adonis, modulu vegan). Funkcí Adonis byla provedena analýza rozptylu za použití distančních matic (použity Braz-Curtis distance) (Oksanen, 2011). Párovým testováním bylo hodnoceno, zda jsou rozdíly mezi mikrobiomovými profily v předem definovaných párech (Afrika+USA, USA+ČR, ČR+Afrika) statisticky významné.

NMDS analýza byla dále použita na zobrazení podobnosti mezi *Trypanosoma* pozitivními a negativními jedinci. Statistická významnost rozdílů mezi těmito dvěma skupinami byla rovněž hodnocena pomocí funkce Adonis.

4 VÝSLEDKY

4.1 PCR

Amplifikace 29 z 42 vzorků testovaných na přítomnost bakteriální DNA s EMP primery (Tabulka II) byla úspěšná. Negativní výsledky byly zaznamenány výhradně u vzorků afrických tabanidů (13/30), pro které byl dostupný pouze DNA templát. Vzhledem k celkově nízkému počtu analyzovaných vzorků a vyšší kvalitě DNA polymerázy používané pro vytvoření amplikonových knihoven, byly na amplikonové sekvenování odeslány všechny vzorky (viz Materiál a metody Tabulka I).

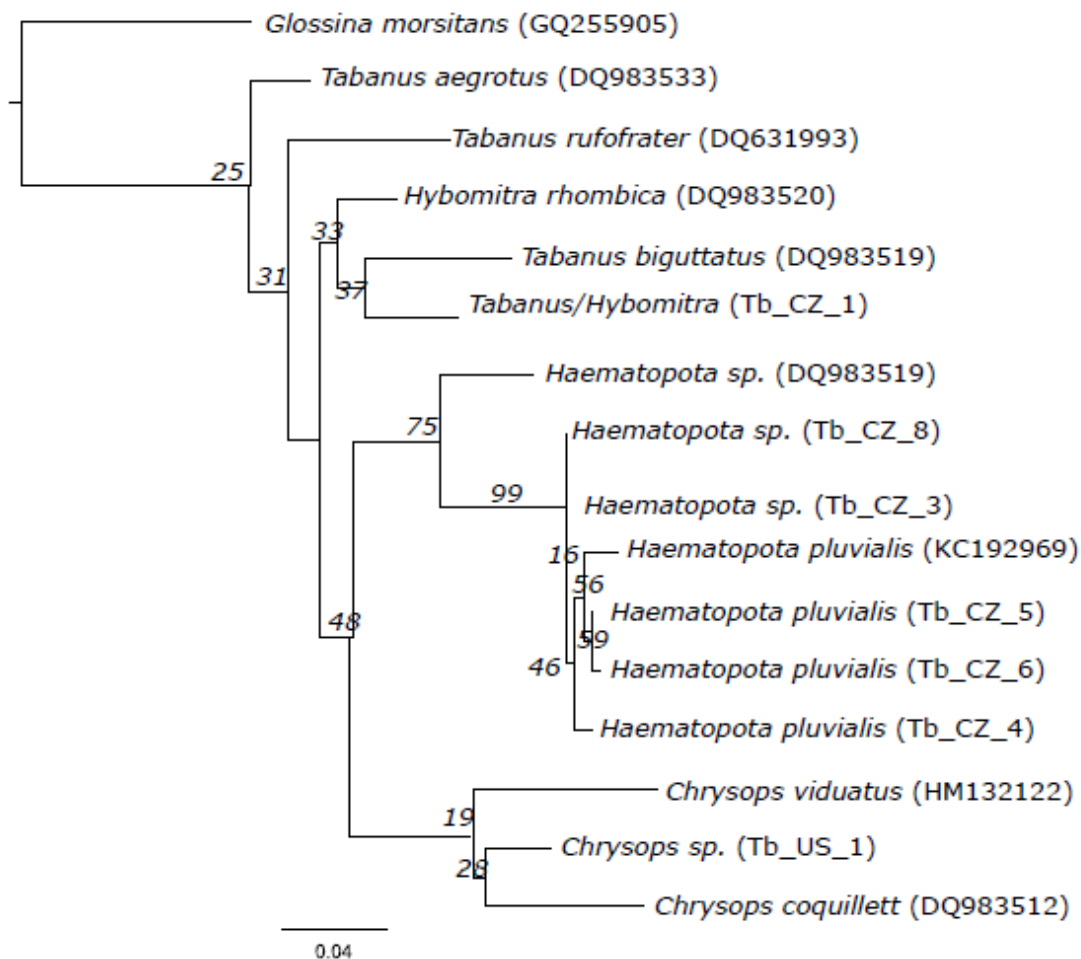
S primery COIL6625 a COIH 7005 pro amplifikaci COX genu jsem získala 7 PCR produktů.

4.2 Sanger data

Pro gen COX se mi podařilo amplifikovat 7 vzorků. U 5 jedinců jsem byla schopna určit jejich rodové zařazení na základě sekvenční shody (viz Tabulka III.). Pro vzorek (Tb_CZ_1) nebyly výsledky jednoznačné, proto jsem ho z dat vyřadila. Po dalším zpracování 5 výsledných sekvencí v programu Geneious (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012) byl vytvořen fylogenetický strom, viz Obrázek I, a potvrzena taxonomická příslušnost jednotlivých vzorků.

Tabulka III.: Výsledky Blast vyhledávání u českých a amerických jedinců.

Přístupový kód	Druh	Totožnost	Query c.	Pracovní název
DQ983519	<i>Haematopota</i> sp.	94,20%	100,00%	Tb_CZ_3
KC192969	<i>Haematopota</i> <i>pluvialis</i>	97,90%	94,29%	Tb_CZ_4
KC192969	<i>Haematopota</i> <i>pluvialis</i>	98,50%	94,29%	Tb_CZ_5
KC192969	<i>Haematopota</i> <i>pluvialis</i>	98,20%	95,10%	Tb_CZ_6
KC192969	<i>Haematopota</i> sp.	98,20%	94,29%	Tb_CZ_8
DQ983512	<i>Chrysops</i> <i>coquillett</i>	93,50%	100,00%	Tb_US_1
DQ983520	<i>Hybomitra</i> <i>rhombrica</i>	94,50%	100,00%	Tb_CZ_1



Obr.1: Fylogenetický strom analyzovaných vzorků Tabanidae (označeny jako Tb_) s hodnotami bootstrapů. Kódy v závorkách jsou přístupová čísla použitých sekvencí z databáze GenBank.

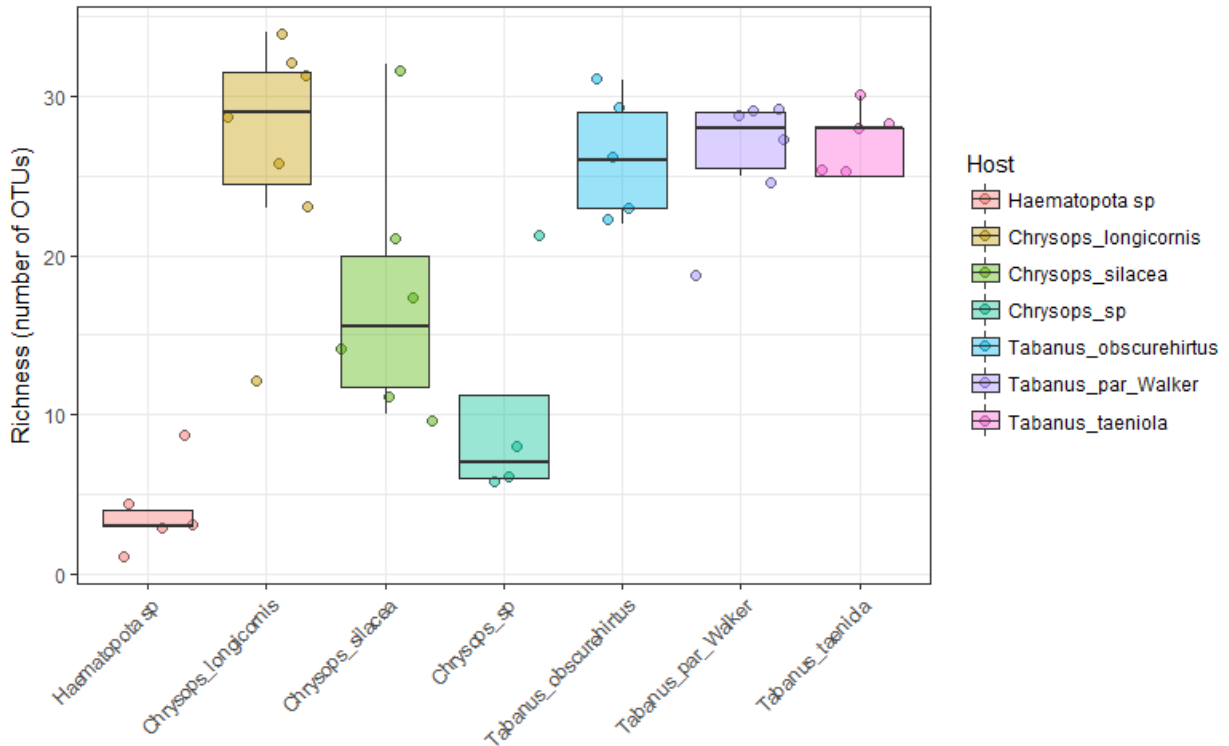
4.3 Analýza ampliconových dat

Průměrný počet ampliconů získaných pro jeden vzorek byl 9487. Výsledný dataset, znáhodněný na počet 800 sekvencí, obsahoval 42 vzorků. S cílem zachování celého datasetu, bez nutnosti vyřazování vzorků, byla hladina znáhodnění nastavena poměrně nízko (800 readů, viz Materiál a metody - 3.5.1 Zpracování dat). Vliv znáhodnění na celkové rozdíly mezi mikrobiomy byl testován pro další dvě úrovně, tj. 1000 a 10000 readů. Zvolená úroveň znáhodnění měla minimální vliv na celkové (ne)podobnosti mikrobiomů.

Po primární analýze celého datasetu byla provedena kontrola BLANK vzorků, tedy posouzení možné kontaminace „well to well” a kontaminace v průběhu amplifikačního procesu. Blank v těsné blízkosti analyzovaných vzorků tabanidů obsahoval 7831 sekvencí, představující 27 OTU. Nejpočetnější OTU reprezentovaly bakteriální rody *Enterococcus*, *Buchnera*, *Arsenophonus*. Tyto “kontaminační OTU” se u vzorků tabanidů vyskytly v zanedbatelném množství (0,1%, 0,01%, 0,04% pro jednotlivé OTU z celkového počtu readu) a neovlivnily tak výsledné mikrobiomové profily.

V taxonomicky klasifikovaných OTU z kroku 9, tedy před přefiltrováním dat na výhradně bakteriální OTU, byly identifikovány 2 OTU trypanosom. U amerických vzorků byla přítomnost trypanosomy potvrzena u tří vzorků ze čtyř (průměrná hodnota 1828 readů). Amplikonová data pro české vzorky neobsahovala žádné sekvence trypanosom. Tato data nahradila metodu klasické PCR diagnostiky a byla dále využita pro analýzu na pozadí přítomnosti parazita (viz Výsledky).

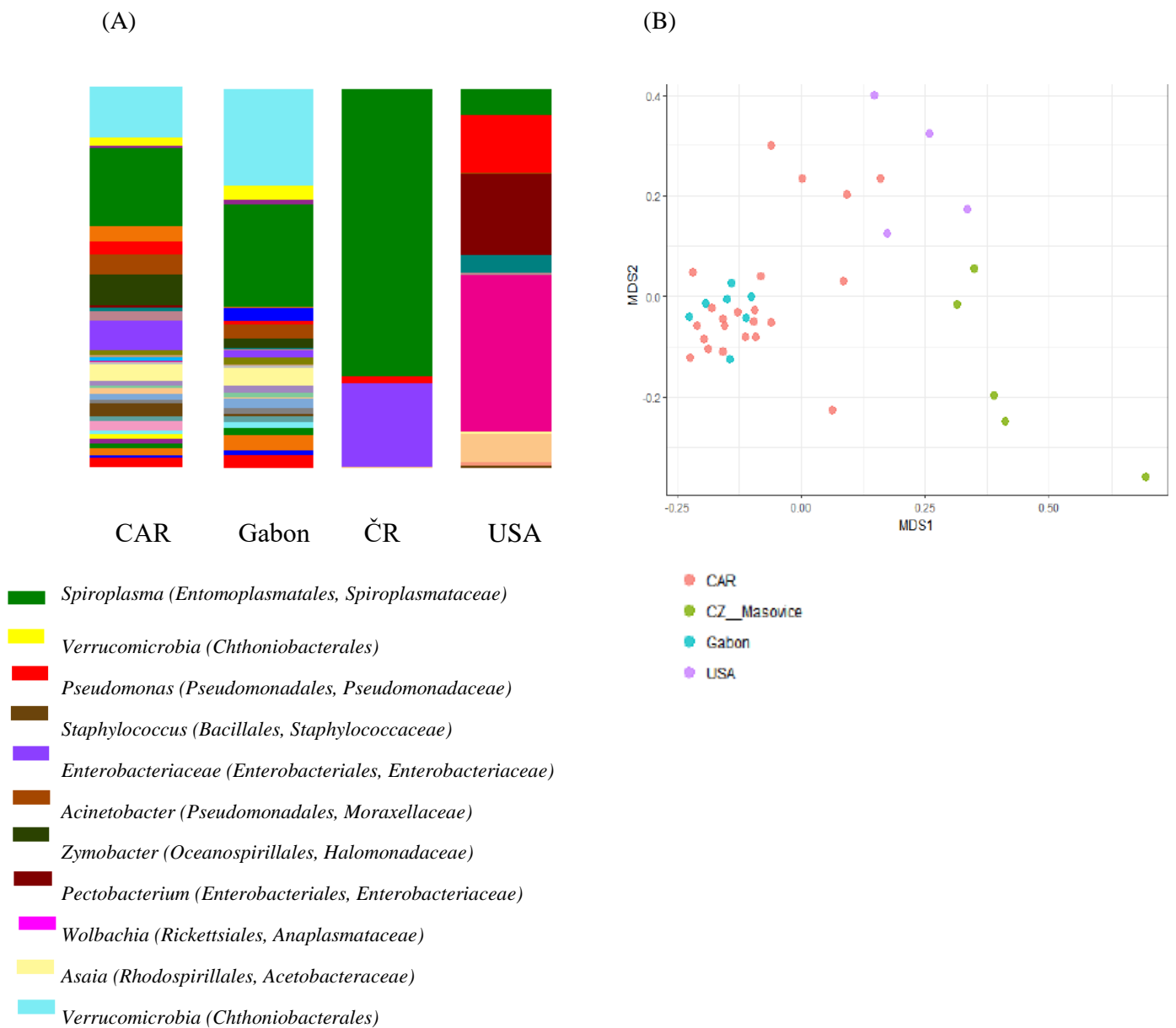
Základní analýza bohatosti společenstev (richness) poukázala na nepoměrné, řádově odlišné zastoupení bakteriálních rodů u vzorků z geograficky vzdálených lokalit, např. Afriky a České republiky (Obr 3A). Extrémně nízkou richness u českých vzorků způsobuje přítomnost bakterií rodu *Spiroplasma*, která tvoří až 99,6% celého mikrobiomu (vzorek Tb_CZ_7), průměrná hodnota 3478 readů (tj. 62% spiroplasmy pro 6 vzorků), viz Obrázek 3. Poté proběhla analýza pro OTU, které jsou nad 1 % ze všech readů (viz Obrázek 2).



Obr. 2: Richness mikrobiomu pro jednotlivé druhy analyzovaných tabanidů zohledněná pro OTU s počtem readů nad 1% z celkového množství dat.

Analýzy taxa summary (Qiime) ve výsledku odhalily větší rozmanitost mikrobiomů u afrických druhů (Obr.3, Obr.4), ve kterých měly největší zastoupené čeledě Spiroplasmataceae, Chtoniobacterales, Pseudomonadaceae, Acetobacteraceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Staphyococcaceae, Halomonadaceae, Moraxellaceae. U českých druhů se v největší míře vyskytovaly bakterie z čeledí Spiroplasmataceae a Enterobacteriaceae u amerických pak rod Anaplasmataceae a Enterobacteriaceae.

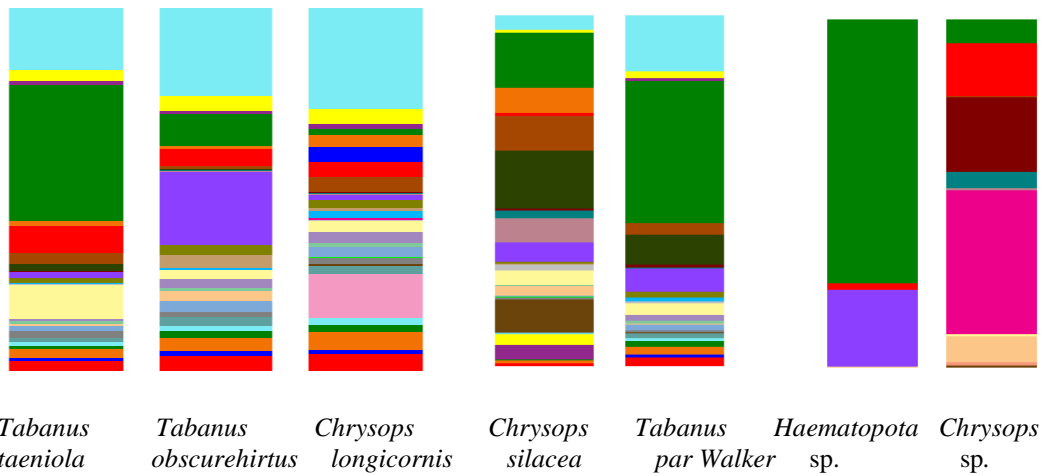
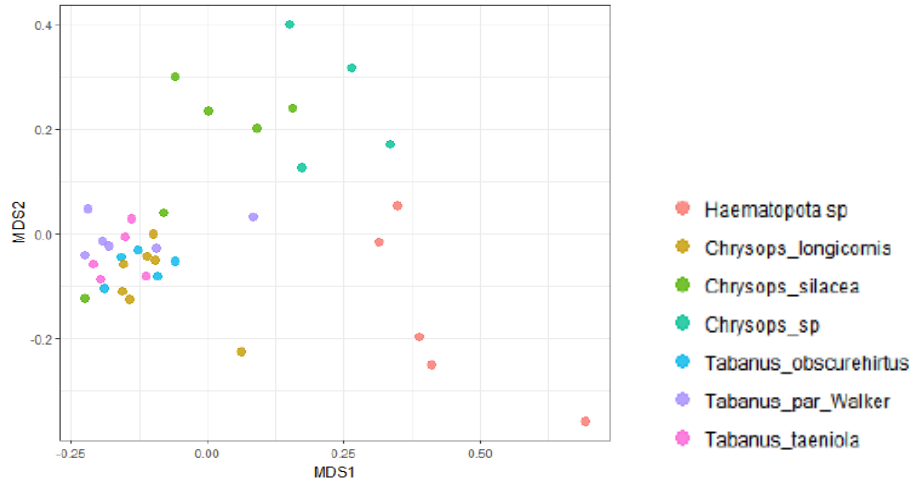
Podobnost mezi jednotlivými mikrobiomy s definovaným geografickým původem byla zobrazena pomocí NMDS analýzy. Statistické vyhodnocení odhalilo signifikantně významné rozdíly na 99% hladině významnosti mezi mikrobiomy tabanidů pocházejících z Afriky a České republiky (adonis $R^2=0,17993$). Stejně tak tomu bylo v porovnání mezi Afrikou a USA (adonis $R^2=0,12233$). Mezi mikrobiomy tabanidů z USA a České republiky byly rozdíly signifikantní na 95% hladině významnosti (adonis $R^2=0,21025$). Rozdíly mezi mikrobiomy afrických tabanidů z lokalit Gabon a CAR nebyly statisticky signifikantní.



Obr.3: Taxa summary Tabanidů dle lokality odchyty (A) a grafický výsledek NMDS analýzy nepodobnosti mezi jedinci z definovaných lokalit (B). Sloupce taxonomických přehledů sumují data pro všechny jedince odchycené v dané lokalitě, tj. CAR:23, Gabon:7, ČR:6, USA:4.

Druh *Haematopota sp.* (český druh) má nejmenší rozmanitost druhů v mikrobiomu, oproti tomu *Tabanus* (africký vzorek) má rozmanitost největší. Podobnost mezi mikrobiomy analyzovaných druhů tabanidů je zobrazena pomocí NMDS analýzy. Vzhledem k vysoké

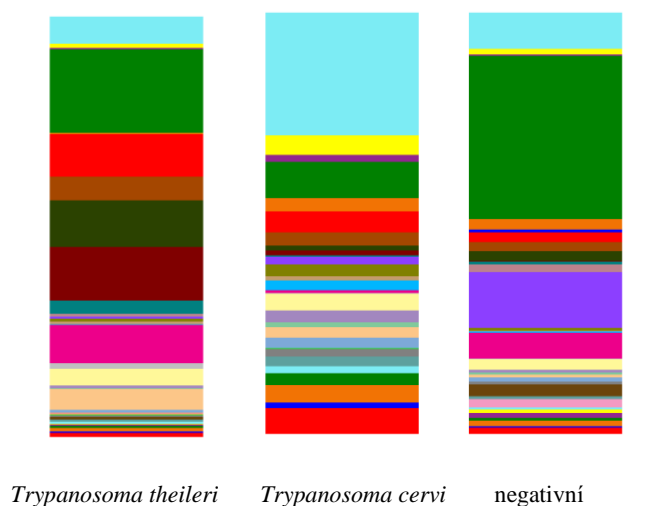
variabilitě mezi jedinci v rámci jednoho druhu (zejména *Chrysops silacea* a *Haematopota* sp., Obr. 3B) a zároveň nízkému počtu jedinců, nebyly rozdíly mezi mikrobiomy analyzovaných druhů statisticky hodnoceny.



- *Spiroplasma* (Entomoplasmatales, Spiroplasmataceae)
- Verrucomicrobia (Chthoniobacterales)
- *Pseudomonas* (Pseudomonadales, Pseudomonadaceae)
- *Staphylococcus* (Bacillales, Staphylococcaceae)
- Enterobacteriaceae (Enterobacteriales, Enterobacteriaceae)
- *Acinetobacter* (Pseudomonadales, Moraxellaceae)
- *Zymobacter* (Oceanospirillales, Halomonadaceae)
- *Pectobacterium* (Enterobacteriales, Enterobacteriaceae)
- *Wolbachia* (Rickettsiales, Anaplasmataceae)
- *Asaia* (Rhodospirillales, Acetobacteraceae)
- Verrucomicrobia (Chthoniobacterales)

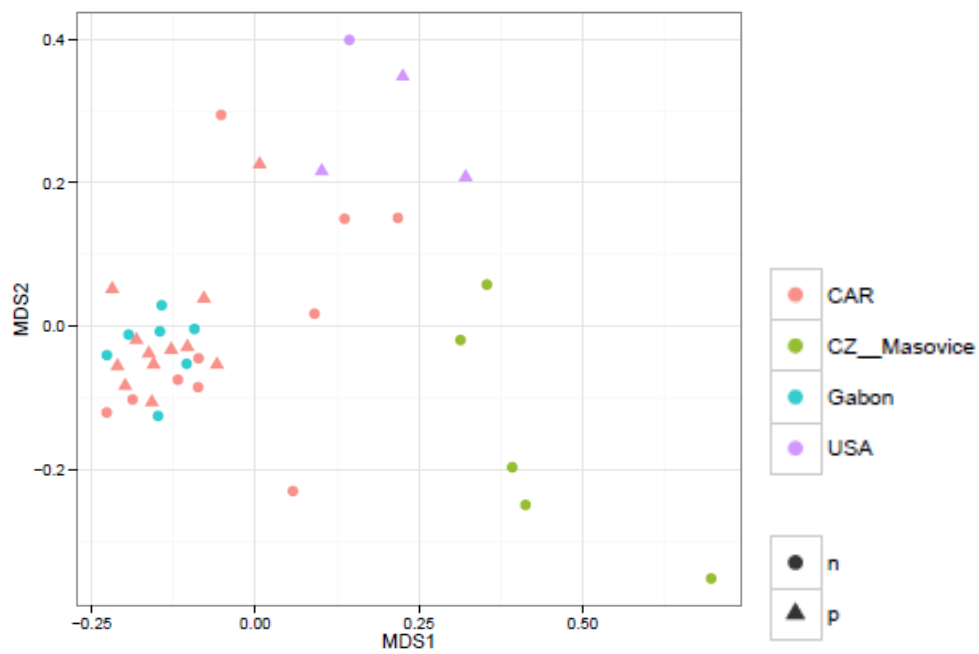
Obr.4: NMDS a taxa summary pro jednotlivé vzorky dle jejich druhové příslušnosti.

Analýzy na pozadí přítomnosti *Trypanosomi theileri* a *T. cervi* neprokázaly výrazný vliv parazita na složení mikrobiomů hostitele. Patern pro umístění pozitivních vzorků v NMDS klastrovací analýze je náhodný.



- Spiroplasma* (Entomoplasmatales, Spiroplasmataceae)
- Enterobacteriaceae (Enterobacteriales)
- Verrucomicrobia (Chthoniobacteriales)
- Wolbachia* (Rickettsiales, Anaplasmataceae)
- Pseudomonas* (Pseudomonadales, Pseudomonadaceae)
- Zymobacter* (Oceanospirillales, Halomonadaceae)
- Pectobacterium* (Enterobacteriales, Enterobacteriaceae)

Obr.5: Analýza mikrobiomů u infikovaných a neinfikovaných jedinců parazity rodu *Trypanosom*. Z výsledných grafů můžeme pozorovat rozmanitější mikrobiom u druhů infikovaných druhem *Trypanosoma theileri*.



Obr.6: Analýza NMDS na pozadí infekce *Trypanosomy cervi* a *T. theileri*.

5 DISKUZE

Tato práce přináší komplexní popis mikrobiomů afrických, amerických i českých druhů Tabanidů a identifikuje zásadní rozdíly bohatosti těchto mikrobiálních společenstev. Analýzy bohatosti společenstev prokázaly nepoměrné zastoupení bakteriálních rodů v porovnání vzorků z Afriky a České republiky. Výskyt jednotlivých druhů tabanidů závisí na sezóně a na zeměpisné šířce (Chvála et al., 1972). Sezónnost výskytu a tedy i časově odlišné vývoje larev v půdě by mohly mít vliv a množství bakterií z půdy. Z výsledku jsou patrné nepoměrné rozdíly ve složení mikrobiomů mezi stejnými druhy z jedné oblasti (CAR) i mezi druhy z obou oblastí (CAR, Gabon). Protože nemám k dispozici podrobnější data kdy byly vzorky sesbírány, nemohu posoudit, zda by mohla být rozdílná richness vysvětlena právě na základě rozdílných sezónních podmínek sběru vzorků. Na druhou stranu například u komárů byla prokázána zásadní redukce mikrobiomu v průběhu metamorfózy (Wang et al., 2011). Z tohoto důvodu jsou pro pochopení vlivu vnějších podmínek vývoje larvy na mikrobiom dospělce nutné další studie, které se zaměří na vývoj mikrobiomu v průběhu ontogeneze u vybraných druhů tabanidů.

Druhým vysvětlením rozdílností richness může být analogie se studií zabývajících se vlivem geografické polohy na složení lidského mikrobiomu. Ta ukázala, že lidský mikrobiom se mění směrem od tropického pásu k rovníkům, kdy richness postupně směrem k rovníkům klesá (Dikongué et al., 2017). V mojí práci byla zachycena největší richness u afrických druhů, tedy v tropickém pásu a nejmenší v České republice, která je z hlediska polohy k rovníku nejvzdálenější.

Nízká richness mikrobiomu českých vzorků *Haematopota* sp. a *Haematopota pluvialis* je zapříčiněná přítomností bakterií rodu *Spiroplasma*. *Spiroplasma* podobně jako *Wolbachia* je typickým manipulátorem svých hostitelů a je schopna vertikálního přenosu. Vertikální přenos spiroplasmy z generace na generaci i její vliv na reprodukci a dlouhověkost hostitele byl prokázán například u mšic druhu *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera) (Fukatsu et al., 2000). U octomilky *Drosophila melanogaster* bylo také prokázáno, že se *Spiroplasma* zaslouhuje o snížení produkce samečků, prostřednictvím „male-specific mortality” během embryonálního vývoje (Hurst et al., 2000; Von der Schulenburg et al., 2000). Hlavní hostitelskou tkání pro bakterie *Spiroplasma* a podobné reprodukční manipulátory jsou proto především ovaria samic.

Jelikož byla DNA pro mojí práci izolována z celých těl jedinců, nevím, zda a do jaké míry je identifikovaná spiroplasma vázaná na lumen střeva. Kmen *Spiroplasma* EC-1, nalezený ve střevě a hemolymfě *Ellychnia corrusca* (Coleoptera), je ale podobný linii *Spiroplasma* izolované z tabanidů (Hackett et al., 1989). *Spiroplasma* se mimo jiné vyskytuje i ve floému rostlin, proto mohli Tabanidae získat tuto bakterii i při sání nektaru, případně při krmení se na mšicích (Schutz et al., 1989).

Celkové složení mikrobiomu afrických vzorků obsahovalo 10 dominantních druhů u českých a amerických jedinců převládaly vždy 2 bakteriální druhy. Vysoká variabilita mikrobiomů mezi jedinci zaznamenaná v mé práci byla pozorována i ve skupině dalších dipter ze skupiny Muscidae, taktéž krevsajícího hmyzu, u kterého krev sají i samci. U mikrobiomů tabanidů a druhu *Haematobia irritans* (Muscidae) můžeme najít shody zejména v přítomnosti bakterií rodu *Wolbachia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*. Podobně jako Tabanidae funguje tento druh jako vektor pro přenos řady patogenů. Při bližším průzkumu mikrobiomu *Haematobia irritans* během ontogenetického vývoje bylo zjištěno, že se mikrobiom vajíček podobá mikrobiomu dospělých samčích jedinců, samičí a samčí mikrobiom je signifikantně odlišný. Samčí mikrobiom tedy leží uprostřed mezi samičím mikrobiomem a mikrobiomem vajíček. Můžeme zde tedy zaznamenat variabilitu během vývoje, která je způsobená vyšším obsahem bakterie *Wolbachia* u dospělců (Palavesam et al., 2012). Po analýzách bylo zjištěno, že je diverzita (richness) mikrobiomů ve skupině Muscidae také ovlivněna druhem hostitele, jeho složením potravy a reprodukčním chováním (v jakém prostředí probíhá vývoj larvy) (Greenberg, 1973).

Trypanosoma

Analýza 17 pozitivních a 23 negativních vzorků ovádů (diagnostikovány *T. cervi* a *T. theileri*) neprokázala signifikantní vliv přítomnosti parazita na mikrobiomový profil hostitele. Avšak u jiných hostitelských druhů můžeme korelace mezi parazity a mikrobiomem zaznamenat. U mouchy tse-tse (Diptera), přenášejíci *T. brucei*, byly zaznamenány interakce mezi parazitem a mikrobiomem hostitele. Komensální a obligátní bakterie mikrobiomu striktně hematofágní mouchy tse-tse, *Sodalis* a *Wigglesworthia*, jsou zapojené i do přenosu parazita. *Sodalis* také produkuje molekuly, které se zaslouhují o rezistenci mouchy tse-tse vůči infekci

(Dale et al.,1999; Weiss et al., 2013). Například u triatom pozitivně diagnostikovaných na přítomnost *Trypanosoma cruzi* byla, v porovnání s neinfikovanými jedinci, zaznamenána vyšší diverzita mikrobiomu. Po řadě testů byly jako hlavní faktory ovlivňující složení mikrobiomu stanoveny druhové zařazení jednotlivých vzorků a právě přítomnost *T. cruzi* (Diaz et al., 2016).

6 ZÁVĚR

Mikrobiom krevsajícího hmyzu čeledi Tabanidae má největší zastoupení bakterií z čeledí Spiroplasmatacea, Chthoniobacterales, Pseudomonadaceae, Acetobacteraceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Staphylococcaceae, Halomonadaceae, Moraxellaceae. Při porovnání richness mezi různými lokalitami odchyty a mezi jednotlivými jedinci, byla zaznamenána největší richness u afrických vzorků a nejmenší u českých vzorků. Tento výsledek může být vysvětlen na základě odlišného sezóního odchyty hmyzu nebo na základě odlišných podnebných pásů, ze kterých byly vzorky získány. Hodnocení vlivu parazita druhu *Trypanosoma theileri* a *Trypanosoma cervi* na podobu mikrobiomu nebylo v této práci prokázáno. Tématem navazujícího výzkumu by měl být důkladnější popis mikrobiomu v rámci ontogenetického vývoje jedinců.

7 REFERENCE

- Andersson, S. G., Kurland, C.G. (1999). Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Current opinion in microbiology*, 2(5), 535-541.
- Anthony, D. W. (1960). Tabanidae attracted to an ultraviolet light trap. *The Florida Entomologist*, 43(2), 77-80.
- Arakaki, N., Miyoshi, T., Noda, H. (2001). *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 268(1471), 1011-1016.
- Baumann, P., Moran, N. A., & Baumann, L. (2006). Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. *The Prokaryotes: Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology*, 403-438.
- Baldacchino, F., Porciani, A., Bernard, C., & Jay-Robert, P. (2014a). Spatial and temporal distribution of Tabanidae in the Pyrenees Mountains: the influence of altitude and landscape structure. *Bulletin of entomological research*, 104(01), 1-11.
- Baldacchino, F., Puech, L., Manon, S., Hertzog, L. R., & Jay-Robert, P. (2014b). Biting behaviour of Tabanidae on cattle in mountainous summer pastures, Pyrenees, France, and effects of weather variables. *Bulletin of entomological research*, 104(04), 471-479.
- Baldacchino, F., Desquesnes, M., Mihok, S., Foil, L. D., Duvallet, G., & Jittapalapong, S. (2014c). Tabanids: Neglected subjects of research, but important vectors of disease agents!. *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 596-615.
- 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.
- Buchner, P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. *Ecology and Evolution*. London: Croom Helm Ltd. P. 1–28.

- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.
- Clark, T. B. (1984). Diversity of spiroplasma host-parasite relationships. *Israel journal of medical sciences*, 20(10), 995-997.
- Cleveland, L.R. (1926). Symbiosis among animal swith special reference to termites and their intestinal flagellates. *Quarterly Review of Biology*, 1 (1), 51–60.
- Connal, A., Connal, S.L.M. (1922) The development of *Loa loa* (Guyot) in *Chrysops silacea* (Austen) and in *Chrysops dimidiata* (van der Wulp). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 16, 64–80.
- Coscarón S., Papavero, N. (1993) An Illustrated Manual for the Identification of the Neotropical Genera and Subgenera of Tabanidae (Diptera). Museu Paraense Emilio Goeldi.
- Coscarón, S., Philip, C. B. (1979). A Revision of Mycteromyiini ("Genus *Mycteromyia*" of Authors), a New Tribe of Neotropical Horse Flies (Diptera, Tabanidae). California Academy of Sciences.
- Dale, C., Maudlin, I. (1999). *Sodalis* gen. nov. and *Sodalis glossinidius* sp. nov., a microaerophilic secondary endosymbiont of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(1), 267-275.
- Dale, C., Moran, N. A. (2006). Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*, 126(3), 453-465.
- Davis, R. E. (1974). *Spiroplasma* in corn stunt-infected individuals of the vector leafhopper *Dalbulus maidis* [Mycoplasmalike organism]. *Plant Disease Reporter*.
- Díaz, S., Villavicencio, B., Correia, N., Costa, J., & Haag, K. L. (2016). Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasites & Vectors*, 9(1), 636.

- De Bary, A. (1879) The phenomenon of symbiosis. *Karl J. Trubner, Strasbourg, Germany*.
- Desquesnes, M., Holzmüller, P., Lai, D. H., Dargantes, A., Lun, Z. R., Jittaplapong, S. (2013). *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *BioMed Research International*, 2013.
- Desquesnes, M., & Dia, M. L. (2003). Mechanical transmission of *Trypanosoma congolense* in cattle by the African tabanid *Atylotus agrestis*. *Experimental parasitology*, 105(3), 226-231.
- Dikongué, E., & Ségurel, L. (2017). Latitude as a co-driver of human gut microbial diversity?. *BioEssays*, 39(3).
- Douglas, A. E. (1989). Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews*, 64(4), 409-434.
- Foil, L.D., Adams, W.V., McManus, J.M. & Issel, C.J. (1987) Bloodmeal residues on mouthparts of *Tabanus fuscicostatus* (Diptera: Tabanidae) and the potential for mechanical transmission of pathogens. *Journal of Medical Entomology*, 24, 613–616.
- French, F. E., Whitcomb, R. F., Tully, J. G., Carle, P., Bové, J. M., Henegar, R. B., Williamson, D. L. (1997). *Spiroplasma lineolae* sp. nov., from the Horsefly *Tabanus lineola* (Diptera: Tabanidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 1078-1081.
- 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.
- Gauthier, J. P., Outreman, Y., Mieuze, L., & Simon, J. C. (2015). Bacterial communities associated with host-adapted populations of pea aphids revealed by deep sequencing of 16S ribosomal DNA. *PloS one*, 10(3), e0120664.
- Greenberg, B. (1973) Flies and Diseases Voll II, Biology and Disease Transmission. *Princeton University Press*.

- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., & Gascuel, O. (2005). PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic acids research*, 33(suppl 2), W557-W559.
- Gündüz, E. A., Douglas, A. E. (2009). Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 276(1658), 987-991.
- Hackett, K. J., Clark, T. B. (1989). Ecology of spiroplasmas. *The mycoplasmas*, 5(441), 113-200.
- Hafner, M. S., Sudman, P. D., Villablanca, F. X., Spradling, T. A., Demastes, J. W., & Nadler, S. A. (1994). Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science*, 265(5175), 1087
- Hamilton, P.B., 2012. Is *Trypanosoma vivax* genetically diverse? *Trends in Parasitology*, 28 (5),173.
- Hedges, L. M., Brownlie, J. C., O'Neill, S. L., & Johnson, K. N. (2008). *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*, 322(5902), 702-702.
- Hornok, S., Földvári, G., Elek, V., Naranjo, V., Farkas, R., de la Fuente, J. (2008). Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in bloodsucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Veterinary parasitology*, 154(3), 354-359.
- Hooke, R. (1667) *Micrographia: or some physiological description of minute bodies*. London.
- Hurst, G. D., & Jiggins, F. M. (2000). Male-killing bacteria in insects: mechanisms, incidence, and implications. *Emerging infectious diseases*, 6(4), 329.
- Husník F. (2017) Genomic and cellular integration in the tripartite nested mealybug symbiosis. PhD thesis, 2-32.

- Chvála, M., Lyneborg, L., & Moucha, J. (1972). The horse flies of Europe (Diptera, Tabanidae). The horse flies of Europe (Diptera, Tabanidae).
- Jacquet, P., Lienard, E., Franc, M., 2010. *Bovine besnoitiosis*: epidemiological and clinical aspects. *Veterinary parasitology*, 174 (1), 30–36.
- Jiggins, F. M., Hurst, G. D. D., Jiggins, C. D., vd SCHULENBURG, J. H. G., & Majerus, M. E. N. (2000). The butterfly *Danaus chrysippus* is infected by a male-killing *Spiroplasma* bacterium. *Parasitology*, 120(5), 439-446.
- Jones, T.W., Davila, A.M.R., 2001. *Trypanosoma vivax* – out of Africa. *Trends in Parasitology*, 17 (2), 99–101.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28 (12), 1647-1649.
- Kerr, P. H. (2010). Phylogeny and classification of Rhagionidae, with implications for *Tabanomorpha* (Diptera: Brachycera). *Zootaxa*, 2592, 1-133.
- Lambkin, C. L., Sinclair, B. J., Pape, T., Courtney, G. W., Skevington, J. H., Meier, R., Wiegmann, B. M. (2013). The phylogenetic relationships among infraorders and superfamilies of Diptera based on morphological evidence. *Systematic Entomology*, 38(1), 164-179.
- Lo, W. S., Lai, Y. C., Lien, Y. W., Wang, T. H., Kuo, C. H. (2015). Complete genome sequence of *Spiroplasma litorale* TN-1T (DSM 21781), a bacterium isolated from a green-eyed horsefly (*Tabanus nigrovittatus*). *Genome announcements*, 3(5), e01116-15.
- Mackerras, I. M. (1955). The classification and distribution of tabanidae (Diptera) 2. History: Morphology: Classification: Subfamily *Pangoniinae*. *Australian Journal of Zoology*, 3(3), 439-511.

- Mariconti, M., Epis, S., Sacchi, L., Biggiogera, M., Sassera, D., Genchi, M., Bazzocchi, C. (2012). A study on the presence of flagella in the order Rickettsiales: the case of '*Candidatus Midichloria mitochondrii*'. *Microbiology*, *158*(7), 1677-1683.
- McCutcheon, J. P., Keeling, P. J. (2014). Endosymbiosis: Protein targeting further erodes the organelle/symbiont distinction. *Current Biology*, *24*(14), R654-R655.
- Montenegro, H., Solferini, V. N., Klaczko, L. B., & Hurst, G. D. D. (2005). Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. *Insect molecular biology*, *14*(3), 281-287.
- Moran, N. A., McCutcheon, J. P., Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual review of genetics*, *42*, 165-190.
- Moran, N. A., Baumann, P. (2000). Bacterial endosymbionts in animals. *Current opinion in microbiology*, *3*(3), 270-275.
- Morita, S. I., Bayless, K. M., Yeates, D. K., Wiegmann, B. M. (2016). Molecular phylogeny of the horse flies: a framework for renewing tabanid taxonomy. *Systematic Entomology*, *41*(1), 56-72.
- Mullen, B. A. (2002). Horse flies and Deer flies (Tabanidae). 265-279.
- Oksanen, J. (2011). Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. *R package version*, *1*(7), 11-12.
- Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(4), 1803-1807.
- Palavesam, A., Guerrero, F. D., Heekin, A. M., Wang, J., Dowd, S. E., Sun, Y., de León, A. A. P. (2012). Pyrosequencing-based analysis of the microbiome associated with the horn fly, *Haematobia irritans*. *PLoS One*, *7*(9), e44390.

Paracer, Surindar, and Vernon Ahmadjian (2000). Symbiosis: an introduction to biological associations. Oxford University Press, 3-133.

Pechuman, L. L., Dearborn, R. (1996). The Horse Flies and Deer Flies of Maine (Diptera, Tabanidae). Maine Agricultural and Forest Experiment Station, University of Maine.

Pechuman, L. L., Teskey, H. J., Webb, D. W. (1983). Tabanidae. Natural History Survey Division.

Philip, C.B. (1957) A new era in ideas of systematic relationships of world Tabanidae (Diptera) inaugurated by Mackerras, and its impact on nomenclature of horseflies of the western hemisphere. *Annals of the Entomological Society of America*, 50 (6), 550–555.

Prosdocimi, Erica M., Mapelli F., Gonella E., Borin S., Crotti E., (2015) Microbial ecology-based methods to characterize the bacterial communities of non-model insects. *Journal of microbiological methods* 119, 110-125.

Ribeiro, P. B., Oliveira, C. M. B., Costa, P. R. P., Brum, J. G. W. (1985). Foréticos da *Dermatobia hominis* (L. Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae), no Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 37(5), 507-509.

Roskov, Y., Kunze, T., Paglinawan, L., Orrell, T., Nicolson, D., Culham, A., Hernandez, F. (2013). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2013 Annual Checklist.

Sacchi, L., Bigliardi, E., Corona, S., Beninati, T., Lo, N., Franceschi, A. (2004). A symbiont of the tick *Ixodes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to that of the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Tissue and Cell*, 36(1), 43-53.

Sassera, D., Lo, N., Bouman, E. A., Epis, S., Mortarino, M., Bandi, C. (2008). “*Candidatus* Midichloria” endosymbionts bloom after the blood meal of the host, the hard tick *Ixodes ricinus*. *Applied and environmental microbiology*, 74(19), 6138-6140.

- Sassera, D., Beninati, T., Bandi, C., Bouman, E. A., Sacchi, L., Fabbi, M., Lo, N. (2006). ‘*Candidatus* Midichloria mitochondrii’, an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(11), 2535-2540.
- Villa, A., Gutierrez, C., Gracia, E., Moreno, B., Chacon, G., Sanz, P.V., Buescher, P., Touratier, L., 2008. Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish Cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149 (1), 352–354.
- Von der Schulenburg, J. H. G., Majerus, T. M., Dorzhu, C. M., Zakharov, I. A., Hurst, G. D., Majerus, M. E. (2000). Evolution of male-killing *Spiroplasma* (*Procaryotae: Mollicutes*) inferred from ribosomal spacer sequences. *The Journal of general and applied microbiology*, 46(2), 95-98.
- Votýpka, J., d’Avila-Levy, C. M., Grellier, P., Maslov, D. A., Lukeš, J., Yurchenko, V. (2015). New approaches to systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re) description. *Trends in parasitology*, 31(10), 460-469.
- Wang, Y., Gilbreath III, T. M., Kukutla, P., Yan, G., & Xu, J. (2011). Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PloS one*, 6(9), e24767.
- 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 Pathog*, 9(4), e1003318.
- Werren, J. H. (1997). Biology of *Wolbachia*. *Annual review of entomology*, 42(1), 587-609.
- Werren, J. H., Zhang, W., Guo, L. R. (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 261(1360), 55-63.
- Whitcomb, R. F. (1980). The genus *Spiroplasma*. *Annual Reviews in Microbiology*, 34(1), 677-704.

Wilson, B. H., Meyer, R. B. (1966). Transmission studies of bovine anaplasmosis with the horseflies, *Tabanus fuscicostatus* and *Tabanus nigrovittatus*. *American journal of veterinary research*, 27(116).