

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

# Diverzita a populační struktura bakteriálních symbiontů vší rodu *Polyplax*

Bakalářská práce

Kateřina Žižková

RNDr. Eva Nováková, Ph.D.

České Budějovice 2017

Žižková, K., 2017: Diverzita a populační struktura bakteriálních symbiontů vší rodu *Polyplax*. [Diversity and population structure of the bacterial symbionts from lice of the genus *Polyplax*. Bc. Thesis, in Czech] – 57 p., Fakulty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

Microbiome diversity of lice is large and still not much explored. This paper discusses microbiome of lice *Polyplax serrata* where are two primary symbionts, *Legionella* and bacterium from the order Neisseriales. In this system, we detected, and partially phylogenetically classified, another unknown coP-symbiont. Then the diversity and population structure of symbionts were clarified on the background of hosts population structure (lice, mice). I analyzed population diversity of symbionts depending on their geographic location, the effect of composition of lice microbiome on the mouse, the effect of primary symbionts on the microbiome. Based on the microbiome analysis, I confirmed the previous results of our laboratory, which divides lineages of the louse *Polyplax serrata* into the 3 clusters, i.e. specific line, nonspecific line and line of *Apodemus agrarius* on the population level.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci 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 školitelů 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, dne 19. dubna 2017

Kateřina Žižková

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala především vedoucí práce Evě Novákové, za nespočet rad, připomínek a času, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat Evě Šochové za pomoc a vstřícnost při fylogenetických analýzách a stejně tak Janě Říhové za cenné rady a morální podporu. Dále děkuji Sonie Rodríguez za pomoc při bioinformatických analýzách a Václavu Hypšovi za externí konzultace. Velký dík patří i Janě Martinů a všem členům laboratoře za poskytnutí potřebných vzorků, dat a materiálu.

# Obsah

1 Úvod.....	1
1.1 Co si představit pod pojmem „symbióza“ .....	1
1.2 Mikrobiom.....	2
1.3 Role primárních symbiontů v mikrobiomech.....	2
1.3.1 Genomy primárních symbiontů.....	3
1.4 Role sekundárních symbiontů v mikrobiomech.....	4
1.4.1 Horizontální přenos symbiontů .....	5
1.5 Vši a jejich symbionti.....	5
1.5.1 Phthiraptera .....	6
1.5.2 Anoplura.....	6
1.5.3 Symbionti vši.....	6
1.6 Modelový systém: hostitel <i>Apodemus</i> vs. <i>Polyplax serrata</i> .....	7
2 Cíle práce .....	9
3 Materiál a metodika.....	10
3.1 Materiál určený k amplikonovému sekvenování.....	10
3.2 Základní zpracování amplikonových dat .....	14
3.3 Analýzy amplikonových datasetů .....	15
3.4 Testování specifických primerů a detekce symbiontů .....	16
3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction) .....	18
3.6 Gelová elektroforéza .....	19
3.7 Klonování a transformace .....	19
3.8 Sangerovo sekvenování.....	20
3.9 Zpracování Sanger sekvencí a fylogeneze .....	20
4 Výsledky .....	22
4.1 Identifikace primárních a koprímárních symbiontů z amplikonových dat.....	22
4.2 Testování specifických primerů a detekce coP-symbionta .....	24
4.3 Fylogeneze .....	24
4.4 Mikrobiomy vši rodu <i>Polyplax</i> z <i>A. agrarius</i> .....	27
4.5 Analýzy specifická linie <i>Polyplax serrata</i> .....	29
4.5.1 Geografie jako determinant mikrobiomového profilu.....	29
4.5.2 Genealogie jako determinant mikrobiomového profilu .....	33
4.6 Analýzy nespecifické linie .....	34
5 Diskuze.....	35
5.1 Diverzita vši rodu <i>Polyplax</i> .....	35
5.2 Mikrobiomy na pozadí genetické struktury hostitelů.....	37

5.3 Mikrobiom vši rodu <i>Polyplax</i> z <i>A. flavicollis</i> (specifická linie).....	38
5.4 Mikrobiom vši rodu <i>Polyplax</i> z <i>A. sylvaticus</i> a <i>A. flavicollis</i> (nespecifická linie).....	39
6 Závěr .....	39
7 Literatura .....	40
8 Přílohy .....	48
8.1 Specifická linie – párové porovnání států Evropy.....	48
8.2 Specifická linie – párové porovnání lokalit v České republice .....	53

## 1 Úvod

Zatímco ekologické kategorie primárních a sekundárních symbiontů byly definovány snad už Buchnerem (Buchner, 1965) a v molekulární éře doplněny o charakteristiky genomické, stejné období naznačilo, že nám tyto dvě vyhraněné kategorie nemohou k popisu symbiotických systémů stačit (viz 1.3, 1.4). Genomika přinesla obrovské množství poznatků o molekulární podstatě modelových symbiotických systémů, metabolických závislostech atd., ale neodhalila diverzitu symbiotických vztahů na populační úrovni, tedy omezovala se na vybrané jedince (vzorky) analyzovaného druhu. S rozvojem markerového amplikonového sekvenování, které umožňuje v multiplexových runech analyzovat stovky vzorků, se nám otevřely dveře pro studium diverzity symbiomy v populacích hostitelů. Dostupnost těchto technologií jsme využili pro studium symbióz vší druhu *Polyplax*, který byl považován za klasický příklad bilaterální symbiomy s bakteriemi rodu *Legionella*, s cílem poodhalit strukturu symbiotických vztahů v různých populacích vší *Polyplax serrata* (viz 2.).

### 1.1 Co si představit pod pojmem „symbióza“

Pojem „symbióza“ byl původně definován Albertem Frankem (Frank, 1877), který použil tento termín ve smyslu vzájemného soužití dvou různých organismů. Většina podob symbiomy představuje permanentní interakci mezi hostitelským organismem a symbiontem žijícím uvnitř nebo na povrchu daného hostitele (Szathmary & Smith, 1995; Einat Zchori-Fein & Kostas Bourtzis, 2012). Jednou z podob symbiomy je parazitismus, ve kterém parazit využívá hostitele jako zdroj potravy a životní prostředí, takže hostitele zpravidla poškozuje a nepřináší mu žádné výhody (Leung & Poulin, 2008). Parazitismus je v této práci popsán mezi vešmi (parazit) a myšicemi (hostitel).

Větší pozornost je zde soustředěna na bakteriální symbiózu zvanou mutualismus, která se nejčastěji vyskytuje u hmyzu (Way, 1963). U tohoto typu jsou symbionti pro hostitele užiteční a poskytují mu živiny nebo umožňují funkce, které mu chybí (Leung & Poulin, 2008; Weiss, & Aksoy, 2011). Sdružení všech mikroorganismů žijících uvnitř a vně daného hostitele nese název mikrobiom (viz 1.2). Toto souhrnné označení zahrnuje jak primární (obligátní) a sekundární (fakultativní) symbionty, tak bakterie extracelulární, například ve střevě hostitele (viz 1.3, 1.4; Weiss & Aksoy, 2011; Goodrich et al., 2014).

Ukázalo se, že vztahy hostitel-symbiont jsou často evolučně staré a pravděpodobně ani jeden partner nemůže žít bez přítomnosti druhého (Douglas, 2010; Weiss, & Aksoy, 2011). Odhadované stáří těchto sdružení je v rozmezí 30 až 270 milionů let. Mnoho symbióz hmyzu

předchází původu savců, krytosemenných rostlin a jiných dominantních skupin organismů (Dale & Moran, 2006). Symbiotické mikroorganismy jsou schopné kolonizovat téměř všechny mnohobuněčné organismy od rostlin k živočichům (Peterson et al., 2009; Binek, 2012).

## **1.2 Mikrobiom**

V současné době je lidský mikrobiom jednou z nejpobulárnějších oblastí vědy a výzkumu (Mazmanian et al., 2008; Goodrich et al., 2014.). Zjišťuje se vliv mikrobiomu na zdraví, obezitu i životní úroveň člověka. Lidský gastrointestinální trakt hostí kolem 500 mikrobiálních taxonů obsahujících odhadem 1014 mikrobů, což je podstatně více, než je počet buněk v lidském těle (Eckburg et al., 2005; Round et al., 2010). Na rozdíl od vyšších eukaryot, hmyz hostí podstatně méně pestré mikrobiální společenství. Menší diverzita mikrobiomů hmyzu umožňuje lépe pochopit vliv symbiontů na jednotlivé fyziologické procesy.

Mikrobiální organismy mají zásadní vliv na příjem živin, reprodukci a schopnost hmyzího hostitele přenášet patogeny (Azambuja et al., 2005; Jupatanakul et al., 2014). Kooperace s mikroorganismy je nejvíce studovaná hlavně u potravně specializovaného hmyzu. Symbionti poskytují esenciální látky chybějící v krvi, potravě hematofágů (např. mouchy tsetse, vši, štěnic). U fytofágů, například mšic, molic a červců, dodávají živiny minimálně obsažené ve floemu a xylemu rostlin a u detritovorního hmyzu (termity, mravenci) doplňují nutriční obsah detritu (Aksoy & Rio, 2005; Weiss & Aksoy, 2011).

V hostiteli nacházíme řadu různých symbiontů, kteří mohou být pro každého jedince unikátní. Co se důležitosti týče, tak první místo zaujímají primární symbionti, kteří plní nejdůležitější funkce v mikrobiálních společenstvech a jejich absence zásadně negativně ovlivňuje fyziologické funkce hostitelů (Weiss & Aksoy, 2011). V mikrobiomu často dochází ke kooperaci mezi několika primárními symbionty, tak i mezi více sekundárními symbionty (Dale & Moran, 2006).

## **1.3 Role primárních symbiontů v mikrobiomech**

Primární symbionti (P-symbionti) mají roli nepostradatelných partnerů svých hostitelů a jsou tedy pevně začleněni do jejich populací. Odhaduje se, že nejméně 10-15 % hmyzích druhů je závislých na obligátních P-symbiontech (Einat Zchori-Fein & Kostas Bourtzis, 2012). P-symbionti poskytují svým hostitelům esenciální látky chybějící nebo nedostatečně obsažené v potravě daného jedince a jsou tedy pro hostitele životně důležité (Kirkness et al., 2010). Jedná se nejčastěji o hmyz fytofágní, kterému poskytují esenciální aminokyseliny nebo o hematofágní hmyz, kde dochází k doplnění především skupiny vitamínů B (Einat Zchori-Fein



& Kostas Bourtzis, 2012). Například u mšice *Cinara cedri*, poskytuje symbiont esenciální aminokyseliny nedostatečně obsažené v potravě hostitele, které jsou následně využity k syntéze proteinů (Shigenobu et al., 2000). V genomu primárního symbionta *Wigglesworthia glossinidia* je kódováno několik vitamínových biosyntetických drah, jejichž produkty pravděpodobně doplňují obsah vitamínů v krvi obratlovců, potravě much tsetse (Akman et al., 2002). V případě, že je u tsetse bakterie *Wigglesworthia* uměle eradikována, dochází k sterilizaci samic (Pais et al., 2008). U mravence *Camponotus floridanus* je molekulární podstatou symbiomy s bakterií *Blochmannia floridanus* řada metabolických drah, které jsou zapojeny do hostitelské výživy, včetně recyklace dusíku, asimilace, biosyntézy aminokyselin a mastných kyselin (Gil et al., 2003). Symbionti dokáží chránit své hostitele i proti predaci. Například brouk rodu *Paederus* využívá toxin produkovaný symbiontem k ochraně proti slíd'ákovitým pavoukům (Costopoulos et al., 2014).

Primární symbionti se nacházejí v hostitelských buňkách (bakteriocytech), které mohou tvořit komplexní symbiotický orgán, pojmenovaný bakteriom (Braendle et al., 2003). Bakteriocyty jsou vysoce specializované buňky, které jsou schopny pojmout až několik tisíc bakteriálních symbiontů (McLean & Houk, 1973). Symbiotické orgány se nejčastěji nachází v hemocoelu (např. u sajícího hmyzu), ve specializovaném segmentu střeva nebo ve slepém střevě či malphigických trubicích (u hematofágního hmyzu a brouků), ale i v tukovém tělese (u švábů a mravenců; Gottlieb et al., 2008).

Primární symbionti jsou přenášeni mechanismem vertikálního přenosu, tedy přenosu z matky na potomstvo (Dale & Moran, 2006). Vertikální přenos má dopad na strukturu populace, ekologii a evoluční biologii. V každé generaci dochází následkem vertikálního přenosu ke snížení velikosti populace symbiontů, označované jako „bottleneck“, což má za následek ztrátu genetické rozmanitosti a vyšší míru fixace škodlivých mutací (Nei et al., 1975; Tajima, 1989)

### **1.3.1 Genomy primárních symbiontů**

Ve srovnání s volně žijícími bakteriemi je míra akumulací škodlivých mutací u primárních symbiontů neporovnatelně vyšší. V jejich genomech byly pozorovány nejčastější mutace v podobě delece, zodpovědné za ztrátu částí DNA, inaktivaci genů či jejich zkrácení a následné pseudogenizaci (Parkhill et al., 2003; Burke & Moran, 2011). Symbiotické genomy mají obecně nízký obsah GC nukleotidů, který je pravděpodobně způsoben právě těmito mutacemi (Moran, 1996; Wernegreen & Funk, 2004). Tyto škodlivé mutace se dále dědí a směřují ke zmenšování genomů (Ohta, 1992). Tento jev je nazýván genetickým driftem

(Moran & Bennett, 2014; Bennett & Moran, 2015). Jako příklady můžeme uvést symbionty much tsetse (*Wigglesworthia glossinidia*) či mšic (*Buchnera aphidicola*), s velikostí genomu 617 kbp a GC obsahem 25.3 % (van Ham et al., 2003; Belda et al., 2010; Weiss & Aksoy, 2011). Genomové práce odhalily, že obligátní symbióza zahrnuje nejen extrémní redukci genomu, ale i rapidní evoluci bílkovin a změnu kodónů (McCutcheon & Moran, 2012). Dochází ke ztrátě genů nadbytečných i prospěšných.

Nedávné studie naznačují, že některé hostitelské genomy také prošly neobvyklými změnami, které jsou spojeny se symbiózou, včetně získání genů z horizontálního bakteriálního přenosu (Husník et al., 2013). Tyto extrémy jsou poháněny dvěma hlavními faktory: symbiotickou evolucí způsobenou genetickým driftem a selekcí bakterií uvnitř hostitele (Husník et al., 2013). Interakce těchto sil má za následek rychlé evoluční změny obou symbiotických partnerů, ale hlavně zmenšení genomu primárního symbionta. Obligátní symbióza, ve které jsou tyto změny nevratné se nazývá „rabbit hole“ (Wernegreen, 2002; Husník et al., 2013; Bennett & Moran, 2015). Chybějící geny u primárního symbionta mohou být doplněny sekundárním symbiontem, který s primárním symbiontem koexistuje, a dokonce může primárního symbionta v systému zcela nahradit (Moran & Bennett, 2014).

#### **1.4 Role sekundárních symbiontů v mikrobiomech**

Na rozdíl od primárních symbiontů nejsou sekundární symbionti nezbytní pro přežití nebo reprodukci hostitele (Oliver et al., 2003). Často jsou pro hostitele užiteční a poskytují mu řadu výhod. Mezi ně patří odolnost proti nepříznivým přírodním podmínkám, jako jsou vysoké či nízké teploty, ochrana proti patogenním houbám nebo proti parazitoidům. Ochranu proti parazitoidům poskytuje některým druhům mšic například fakultativní symbiont *Hamiltonella defensa* (Oliver et al., 2003; Oliver et al., 2009; Einat Zchori-Fein & Kostas Bourtzis, 2012).

Sekundární symbionti jsou obvykle přítomni v nesespecializovaných buňkách a tkáních, a to jak v intracelulárním, tak i v extracelulárním prostředí (Fukatsu et al., 2000). Někteří S-symbionti jsou schopni měnit reprodukční strategii hostitele. Jedna z nejčastějších manipulací je tzv. cytoplazmatická inkompatibilita, studovaná nejvíce u bakterie *Wolbachia pipientis* způsobující nekompatibilitu mezi infikovanými a neinfikovanými kmeny. Infikování samci sterilizují neinfikované samice, čímž se zvyšuje počet infikovaných samic, a tedy šíření symbionta populací (Yen & Barr, 1971; Stouthamer et al., 1999; Dobson et al., 1999). Podobnou reprodukční manipulací je například „son-killing“, tj. zabíjení samčích embryí,

známé u bakterií *Arsenophonus nasoniae* a *Cardinium hertigi* (Oliver et al., 2003, Moran et al., 2008).

Jeden z největších rozdílů mezi sekundárními a primárními symbionty je způsob jejich přenosu. Primární symbionti jsou přenášeni výhradně vertikálně, zatímco sekundární symbionti se mezi hostitelskými druhy často šíří horizontálním přenosem (Perotti, 2009). V některých případech je prokázán i přenos sekundárních symbiontů spolu s primárními symbionty vertikální cestou (Nováková et al., 2015).

#### **1.4.1 Horizontální přenos symbiontů**

Skutečnost, že se fylogeneze hostitelů neslučuje s fylogenetickými stromy jejich symbiontů, připisujeme mezidruhovému horizontálnímu přenosu symbiontů (Russel et al., 2003; Viljakainen et al., 2008). Mezi symbionty, o kterých je známo, že migrují pomocí horizontálního přenosu patří například rod *Arsenophonus* nebo *Wolbachia* (Chiel et al., 2009). Horizontální přenos symbiontů eliminuje následky genetického driftu přenosem nových (sekundárních) symbiontů, kteří mohou poskytnout důležité vlastnosti daným hostitelům (Burke & Moran, 2011). Tato spolupráce může vést k situaci, kdy se původně fakultativní bakterie stanou závislými na hostiteli a buď zcela nahradí původního primárního symbionta, nebo se stanou dalším ko-primárním symbiontem. Předpokládá se, že symbiont much tsetse (*Wigglesworthia glossinidia*), se vyvinul právě z takové fakultativní bakterie (Khachane et al., 2007). U mšice *Cinara Cedri* například doplňuje primárního symbionta (*Buchnera aphidicola*), bakterie druhu *Serratia symbiotica*, která se přímo podílí na produkci esenciálních aminokyselin a představuje tak ko-primárního symbionta tohoto systému (Sandström et al., 2001; Koga et al., 2003). Dalším příkladem je u brouků symbiont *Nardonella* sp., který koexistuje se *Sodalis* v linii *Sitophilus* (Conord et al., 2008).

K horizontálnímu přenosu dochází buď mezidruhově nebo v rámci jednoho druhu, a to například při páření či kanibalismu (Huigens et al., 2000; Moran & Dunbar, 2006). Ke kompenzaci důsledků genetického driftu dochází nejen přenosem celých symbiontů, ale i pouze horizontálním přenosem jednotlivých genů či operonů (HGT-horizontal gene transfer; Kidwell, 1993; Heuer & Smalla, 2007).

#### **1.5 Vši a jejich symbionti**

Hmyz je nejrozšířenější a také nejvíce různorodou třídou živočichů, obsahuje přes tři čtvrtě miliónu popsaných druhů, a proto u něj nacházíme mnoho parazitických druhů (Volf et al., 2007). Tato studie se soustředí zejména na hematofágní zástupce, kteří jsou výhradně

obligátně parazitičtí, tj. permanentní. Mezi permanentní parazity, jejichž celý životní cyklus probíhá na hostiteli, řadíme vši, všenky a kloše (Volf et al., 2007).

### 1.5.1 Phthiraptera

Vši a všenky (Insecta, Phthiraptera) jsou obligátní a permanentní paraziti řady živočichů. Podle klasifikace se Phthiraptera dělí do čtyř podřádů: podřád Amblycera (všenky), Ischnocera (všenky), Rhynchothripina (všiváci) a Anoplura (vši; Light & Hafner, 2007). Všenky a všiváci parazitují na ptácích a savcích a mají kousací ústní ústrojí, které používají ke zpracování kůže a někdy i získávání krve svých hostitelů (Marshall, 1981). Vši jsou ektoparaziti pouze savců (Johnson et al., 2004; Light & Hafner, 2007).

### 1.5.2 Anoplura

Vši podřádu Anoplura se dělí na šest odlišných linií, tj. Polyplacidae, Pediculidae, Haematopinidae, Linognathidae, Rhynchophthirina, Haematomyzidae (Hypša & Křížek, 2007). Tito paraziti jsou morfologicky přizpůsobeny k životu na savčím těle. Jsou bezkřídlí, dorsoventrálně zploštělí a mají jeden tarsální dráp na každé noze, který jim pomáhá udržet se ve vlasech či v srsti hostitele (Light & Hafner, 2007). Vši prochází proměnou nedokonavou zahrnující tři nymfální vývojová stádia (Volf et al., 2007). Vývoj z nymf po dospělce trvá 3-5 týdnů v závislosti na druhu (Elsheikha & Khan, 2011). Dospělci kladou vajíčka označovaná jako hnidy na vlasy nebo na srst hostitele. Pomocí jejich specifického bodavě sacího ústrojí dokážou vši sát krev přímo z hostitelských cév každé tři hodiny (Elsheikha & Khan, 2011). Rozsáhlé napadení vešmi může způsobit hostiteli anémii (Nelson et al., 1975). Organismy z podřádu Anoplura jsou známy jako přenašeči různých patogenů člověka (Kim, 2006). Například druh *Pediculus humanus* je přenašečem bakterie *Rickettsia prowazekii* způsobující skvrnitý tyfus (Andersson et al., 1998; Weinert et al., 2009). Infekční materiál se do těla dostává spolu s trusem přes poškrábanou kůži nebo přes sliznici (Lehane, 2005).

### 1.5.3 Symbionti vší

Vši (Anoplura) spadají do skupiny hmyzu, která je známá svou spoluprací s intracelulárními symbiotickými bakteriemi (Bandi et al., 1995). Primární symbionti vší tvoří polyfyletickou skupinu několika vzdálených linií. Předchozí studie ukazují, že existuje alespoň šest linií endosymbiontů vší, z nichž všechny jsou umístěny v třídě Gammaproteobacteria (gramnegativní bakterie; Sasaki-Fukatsu et al., 2006; Allen et al., 2007; Hypša & Křížek 2007; Allen et al., 2009; Fukatsu et al., 2009; Perotti et al., 2009) a spadají do řádů Enterobacteriales a Legionellales (Hypša & Křížek, 2007)

Nejvíce prozkoumaná je symbióza lidských vší, *Pediculus humanus* a *Phthirus pubis*, s primárním symbiontem *Riesia pediculicola*. Bakterie rodu *Riesia* je primárním symbiontem nejen lidských vší, ale i šimpanzí vší (*Pediculus schaeffi*) a gorilí vší (*Phthirus gorillae*; Sasaki-Fukatsu et al., 2006). Tyto symbiotické bakterie produkují kyselinu pantothenovou (vitamin B5), bez které by nymfa vší nepřežila (Perotti et al., 2009). Rod *Riesia* je často fylogeneticky spojován s rodem *Arsenophonus* (Sasaki-Fukatsu et al. 2006; Allen a kol. 2007). Symbionti ze skupiny *Arsenophonus* se vyskytují v 5 % druhů členovců, jako sekundární i primární symbionti. Nalezneme je v pavoukocích, klíšťatech, švábech, v polokřídlem a v blanokřídlem hmyzu, ve vších, v mouchách a broucích (Duron et al., 2008). Dalším příkladem symbiotických asociací vší jsou bakterie rodu *Wolbachia*, nalezené u rodu *Haematopinus* (Hypša & Křížek, 2007), která parazituje na praseti divokém. U lachtana medvědího se jedná o veš *Proechinophthirus fluctus*, která hostí symbionty z rodu *Sodalis* a *Rickettsia* (Boyd et al., 2016).

Na základě předchozích studií se ukázalo, že tyto symbiotické bakterie jsou nezbytné pro přežití a reprodukci vší. P-symbionti se ve vších nacházejí v bakteriomech a jsou hlavními zdroji k doplnění stravy zejména o vitamíny skupiny B (Aschner, 1934; Griffiths & Beck, 1974). Pro bakteriální symbionty vší je typická hostitelská specifická a jen velmi zřídka dochází k přenosu bakterií na jiný hostitelský rod vší (Light & Hafner, 2007).

Tato práce se zabývá linií vší Polyplacidae a konkrétně druhem *Polyplax serrata*. *Polyplax* je jeden z nejvíce druhově bohatých rodů vší se 78 popsány druhy. Vší rodu *Polyplax* můžeme nalézt na hlodavcích a rejscích řádu *Rodentia* a *Soricomorpha* (Light et al., 2010). Z pohledu širokého spektra hostitelů, je tento druh nejčastěji nacházen u myšic rodu *Apodemus* (Štefka & Hypša, 2008). Tato práce obsahuje data ze vší získaných z myšice křovinné (*A. sylvaticus*), lesní (*A. flavicollis*), malooké (*A. microps*) a temnopásé (*A. agrarius*).

Rod *Polyplax* obsahuje jako primárního symbionta bakterii rodu *Legionella*, která spadá do čeledi Legionellaceae (Legionellales; Hypša & Křížek, 2007). Nová studie (Říhová, 2015) rozšiřuje známou diverzitu vší o dalšího primárního symbionta z řádu Neisseriales (Betaproteobacteria) a tím tvoří další linii.

### **1.6 Modelový systém: hostitel *Apodemus* vs. *Polyplax serrata***

Systém *Apodemus-Polyplax* se jeví jako dobrý model pro zkoumání rozmanitosti genetické struktury symbiontů na populační úrovni. Genetická struktura a rozmanitost populace hrají velkou roli v soužití parazitů, jejich evoluci a vzniku nových druhů. Tvorba genetické

struktury závisí na řadě faktorů, jako je například historie populace, životní prostředí a životní strategie. Z předchozích studií víme, že diverzita parazitů a struktura populace je ovlivněna několika faktory, především společnou demografickou historií (Niebergin et al., 2004; van Shaik et al., 2014) a například hostitelskými rozptylovými schopnostmi (Štefka & Hypša, 2008; van Shaik et al., 2014).

Tento model už byl dříve zkoumán a popsán ve studii Jana Štefky a Václava Hypši v roce 2008 a Jany Martinů v roce 2016 (Štefka & Hypša, 2008; Martinu et al., 2016). Na obecné a fylogenetické úrovni jsou vši rodu *Polyplax* jasně spojeny s evoluční historií a distribucí myšice rodu *Apodemus*. Avšak specifická a fylogeografie se mění ve třech liniích na základě rozdílnosti mtDNA parazita. Vši rodu *Polyplax* se dělí na linii specifickou, obsahující vši z druhu *Apodemus flavicollis* (S-linie), nespecifickou, obsahující vši z druhů *Apodemus sylvaticus* a *Apodemus flavicollis* (N-linie) a linii vši z druhů *A. agrairus* (Aa-linie) (viz Obr.1). Dále se specifická linie dělí podle haplotypů na východní a západní. Haplotypové testy a testy neutrality pro S a N linii naznačují, že vši vstoupily do refungia v severních oblastech společně s jejich hostiteli. Byly potvrzené podstatné rozdíly v genetické diverzitě mezi liniemi S a N, čímž se stvrdila rozmanitost dvou parazitických linií s různým stupněm hostitelské specifity (Martinu et al., 2016). V této práci se zabývám otázkou, do jaké míry se pozorované fylogeografické paterny v hostitelských populacích vši odrážejí na podobě mikrobiomů druhu *Polyplax serrata*.

## 2 Cíle práce

Tato práce je součástí velkého projektu, který se zabývá populační diverzitou vší rodu *Polyplax* parazitující myšice rodu *Apodemus*, konkrétně *A. flavicollis*, *A. agrarius*, *A. sylvaticus* a *A. microps*.

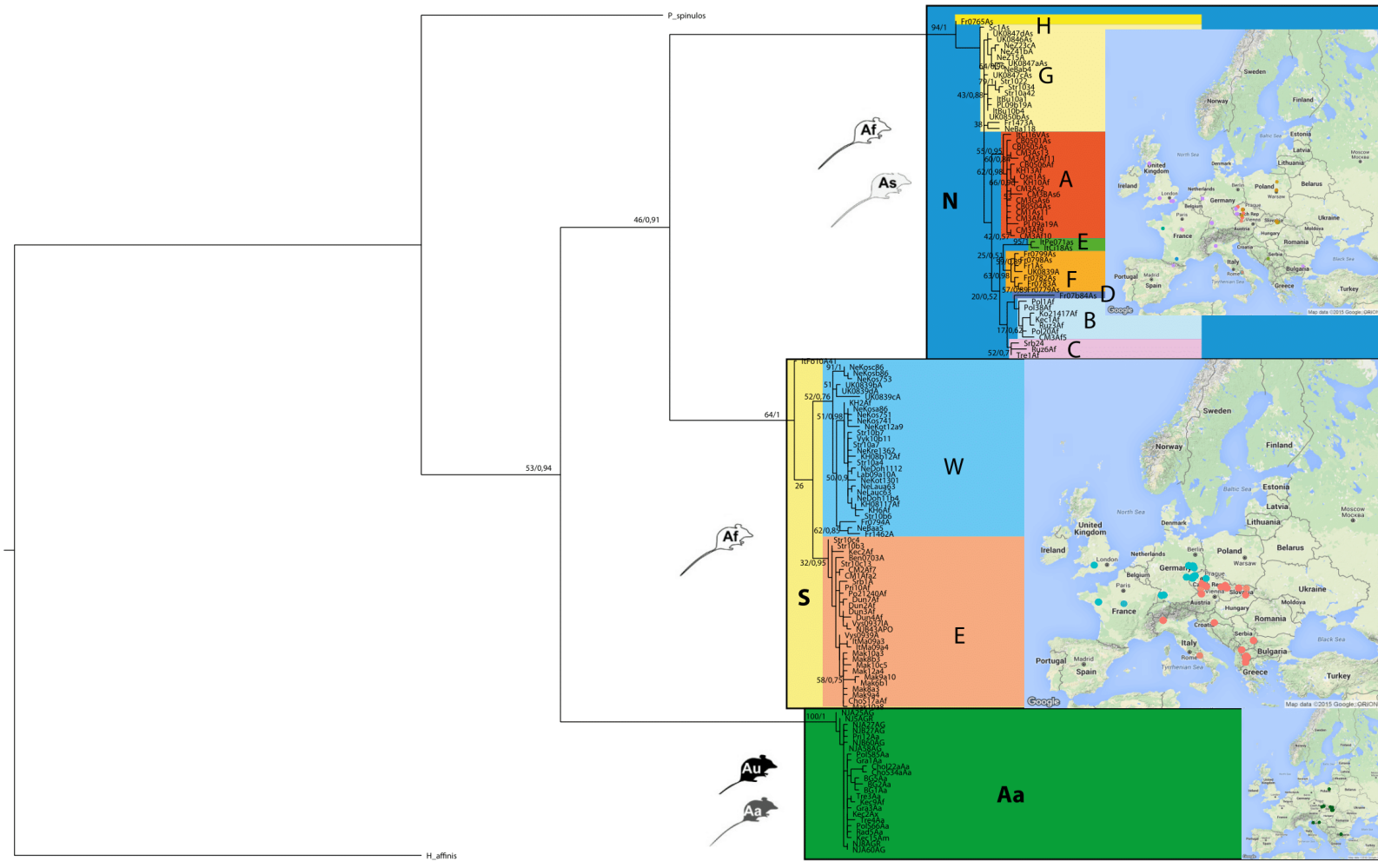
- Prvním cílem je identifikovat primární a ko-primární symbionty z NGS (Next generation sequencing) dat dostupných pro vybrané populace všech hostitelů. Z předchozích studií byla získána data o populační diverzitě vší rodu *Polyplax* napříč Evropou. První cíl je tedy získaná data zpracovat a získat vhled do symbiotických vztahů napříč populacemi hostitele. Tato data obsahují informace o přítomnosti a relativní abundanci symbiontů v jednotlivých hostitelích-vzorcích.
- Dalším cílem je interpretovat diverzitu a populační strukturu symbiontů na pozadí populační struktury hostitelů (veš, myšice). Konkrétně je analyzován vliv geografického a fylogenetického původu hostitele na mikrobiomové profily.
- V ampliconových datech jsme detekovali sekvence neznámého symbionta (v textu referován jako „coP-symbiont“), který se nachází ve velkém zastoupení v populacích *Polyplax serrata* z *A. flavicollis*. Vzhledem k velikosti sekvencí z ampliconových dat (cca 250bp) je velice obtížné navrhnout specifické primery. Cílem je s pomocí obecných primerů získat delší sekvenci pro 16S rRNA tohoto symbionta a objasnit jeho fylogenetický původ.

### 3 Materiál a metodika

#### 3.1 Materiál určený k amplikonovému sekvenování

Tato práce je součástí komplexního výzkumného projektu zaměřeného na populační genetiku myšic (rod *Apodemus*) a jejich parazitů. V předchozích fázích projektu byl proveden sběr materiálu a popsány genealogické vztahy mezi jednotlivými liniemi vši rodu *Polyplax*, které vykazují různou míru specifity napříč analyzovanými druhy hostitelů (viz Obr. 1). Materiál pocházející z různých evropských lokalit a čtyř druhů myšic (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. agrarius*, *A. microps*; viz Obr. 2), byl v podobě DNA templátů (izolovaných z celých jednotlivých vší RNDr. Janou Martinů) poskytnut školitelem. Za účelem studia bakteriálních společenstev, včetně vnitrobuněčných symbiontů vší, byly DNA templáty odeslány na amplikonové sekvenování 16S rRNA provedené spolupracující laboratoří (Prof. Noah Fierer, CU Boulder, CO, USA). V jednom multiplexovém runu platformy Illumina MiSeq bylo osekvenováno 367 barcodově odlišených vzorků. Konkrétně bylo provedeno cílené sekvenování 291bp V3-V4 regionu 16S rRNA, pomocí 515f-806r primerů dle protokolu EMP (Earth Microbiome Project, <http://press.igsb.anl.gov/earthmicrobiome/protocols-and-standards/16s>). Hrubá amplikonová data v podobě pair-end readů o délce 291bp byla dále zpracována pomocí níže popsaných bioinformatických postupů.





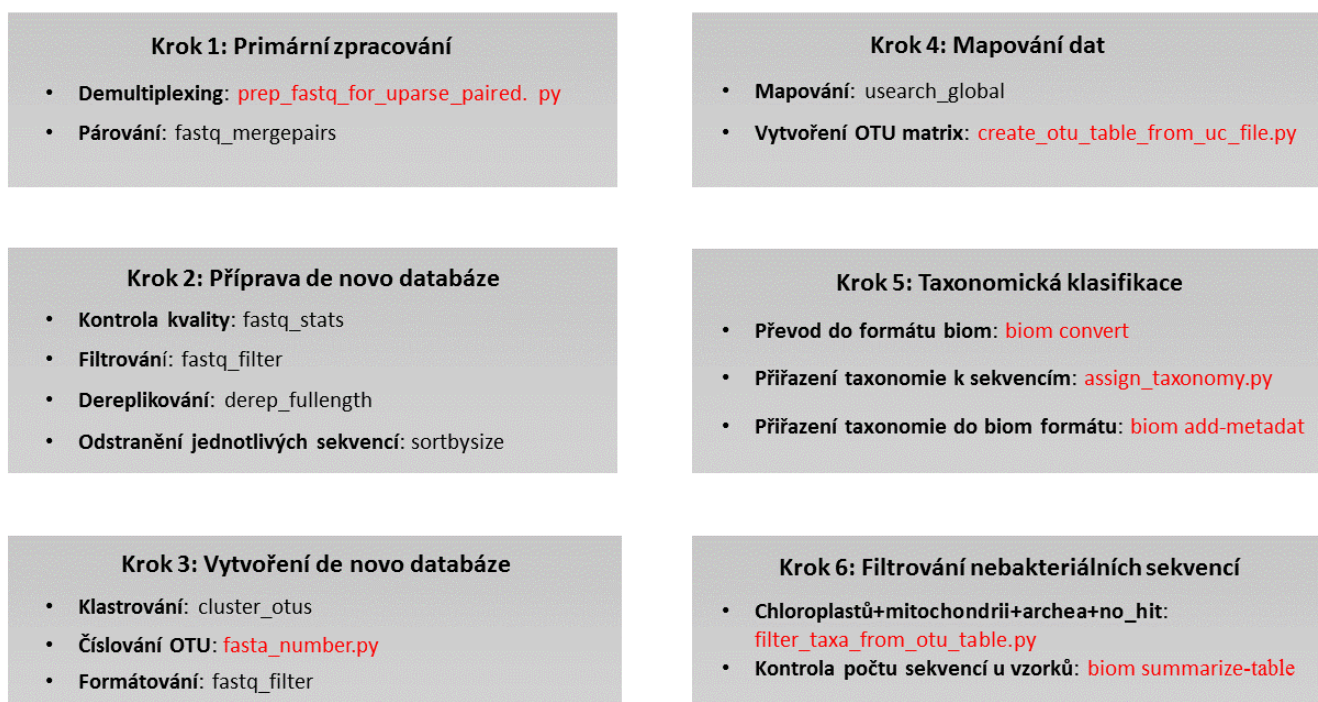
Obr. 1: Genetické pozadí hostitelských vší *Polyplax serrata*: S-linie (žlutá) parazitující pouze druh *Apodemus flavicollis*, N-linie (modrá) linie parazitující jak *A. flavicollis*, tak *A. sylvaticus* a Aa-linie z myšic druhu *A. agrarius* (zelená). V obrázku je znázorněno rozdělení specifické linie na W-západ (modrá) a E-východ (ružová). Obrázek je převzat z práce: Martinu et al., 2016.



Tab. I: Přehled vzorků odeslaných na amplikonové sekvenování

<b>Státy</b>	<b>Počet vzorků</b>	<i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Apodemus flavicollis</i>	<i>Apodemus agrarius</i>	<i>Apodemus microps</i>
<b>Česká Republika</b>	159	12	117	15	0
<b>Francie</b>	29	21	7	0	0
<b>Německo</b>	47	7	40	0	0
<b>Itálie</b>	26	9	17	0	0
<b>Makedonie</b>	33	0	33	0	0
<b>Slovensko</b>	38	0	22	7	7
<b>Velká Británie</b>	33	22	11	0	0
<b>Bulharsko</b>	1	0	0	1	0
<b>Španělsko</b>	1	1	0	0	0
<b>celkem</b>	367	72	247	23	7

## 3.2 Základní zpracování ampliconových dat



Obr. 3: Shrnutí postupu při bioinformatického zpracování ampliconových dat. Program Qiime byl použit u příkazů označených červeně a Usearch u černých příkazů.

Soubor hrubých Illumina pair-end dat byl zpracován do podoby OTU (Operation Taxonomic Unit) matrix příkazy programu Usearch (<http://drive5.com/usearch/>) a Qiime (<http://qiime.org/>) podle schématu prezentovaného na Obr. 2.

- Krok 1: První krok obsahuje příkaz demultiplexování. Došlo k rozřídění dat a jejich přiřazení ke konkrétním vzorkům. Přiřazeny byly na základě barcodů, které byly použity pro přípravu knihoven. Každý vzorek má svůj barcod, který slouží jako klíč k třídění dat v demultiplexování. Dále první krok zahrnoval párování readů. Příkazem `fastq_mergepairs` se spojily forwardové a reverzní ready tak, aby překryv sekvencí činil nejméně 20bp a zároveň minimální výsledná délka sekvence byla 200 bp.
- Krok 2: Tento krok obsahuje filtrování dat dle kvality, které bylo provedeno s nastavením parametru „maxee“ na hodnotu 0,5. Za účelem snížení komplexity dat před vytvořením databáze byly sekvence dereplikovány, tedy rozříděny do skupin na základě absolutní shody. Jedinečné sekvence byly z dereplikovaného setu odstraněny.

- Krok 3: *De novo* databáze byla vytvořena na základě 97 % sekvenční shody. Jednotlivým sekvencím, představujícím takový klastr, bylo přiřazeno označení OTU1-OTUn. Hrubé sekvence byly přeformátovány do fasta formát.
- Krok 4: Demultiplexované a spárované sekvence, které prošly v druhém kroku kontrolou kvality byly zpětně mapovány na *de novo* databázi (Krok 3) příkazem `usearch_global`. Výsledkem tohoto kroku byla OTU matrix obsahující informace o počtu jednotlivých OTU pro každý vzorek.
- Krok 5: Po vytvoření OTU matrix jsme převedli data do formátu biom. Jednotlivá OTU byla s pomocí blast algoritmu (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) implementovaného do programu qiime taxonomicky zařazena. Zdrojem taxonomických informací byla databáze SILVA 123 (May 2016, <https://www.arb-silva.de/download/archive/qiime/>).
- Krok 6: Z OTU matrix, v podobě biom souboru, byly odstraněny všechny nebakteriální sekvence, tj. chloroplasty, mitochondrie, Archea a také sekvence označené jako „no blast hit“, které nebylo možno taxonomicky zařadit.

V posledním kroku došlo k znáhodnění dat. Každému vzorku náleží jiný počet readů a pro jakékoli komparativní analýzy je nutné data normalizovat. Vzhledem k rozsahu 117-835386 readů o průměru 19893, jsme pro hladinu znáhodnění zvolili 2500 readů. Aby bylo možné získaná data číst a identifikovat primární symbionty, převedl se OTU matrix biom do tabulátorové podoby. Analýza 8 negativních kontrol zahrnutých do amplikonového sekvenování vyloučila kontaminaci analyzovaných vzorků. Negativní kontroly obsahovaly minimální množství readů (v řádu stovek) a jednotlivá OTU z negativních kontrol nebyla u všech mikrobiomů zastoupena.

### 3.3 Analýzy amplikonových datasetů

Následné analýzy znáhodněného setu byly prováděny v programu R studio, který disponuje moduly vhodnými pro analýzy bakteriálních společenstev (<https://www.rstudio.com/>). Na statistické testování byla použita permutativní vícerozměrná ANOVA realizovaná v R (Funkce `adonis` v balíčce `vegan`, Oksanen, 2011). Modul `vegan` obsahuje nástroje pro analýzu diverzity, metody koordinace a nástroje pro analýzu odlišností (Oksanen, 2011). Na analýzy jsme použili funkce dalších 16 modulů jako jsou například: `datasets`, `biom`, `ggplot2`, `permute`, `rjson`, a další.

Do R studia jsme načetli metadata z předem vytvořené mapy a OTU matrix v podobě biom formátu. Bray-Curtis distance byly použity pro výpočet matice nepodobnosti mezi analyzovanými vzorky. Metoda NMDS (Non-metric multidimensional scaling) byla použita za účelem vyhodnocení vlivu vybraných faktorů, zejména hostitelského nebo geografického pozadí, na mikrobiomové profily. Konkrétně jsme analyzovali mikrobiomy vši rodu *Polyplax serrata* z *A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. microps* a jejich případnou hostitelskou specifitu.

S cílem odhalit, do jaké míry mají primární symbionti vliv na zjištěné odlišnosti, jsme specifickou linií analyzovali pro dva odlišné datasey. První představoval kompletní dataset zahrnující všechna OTU. Za účelem posouzení vlivu horizontálně přenášené složky mikrobiomu jsme z druhého datasetu odstranili nejvíce zastoupené symbionty (*Legionella* OTU1 a „*Buchnera aphidicola*“ OTU3). Pro oba datasey jsme analyzovali vliv geografického pozadí na úrovni zemí (205 vzorků, 6 evropských zemí; viz Obr. 10 a 11) a lokalit (95 vzorků, 6 lokalit; viz Obr. 12 a 13), rozdělení S-linie na východní a západní větev (188 vzorků z toho 80 vzorků z východu a 108 vzorků ze západu; viz Obr. 14 a 15). Se stejným cílem jsme analyzovali nespecifickou linií, ze které jsme odstranili *Legionella* OTU1 a *Staphylococcus* OTU2 (50 vzorků, 5 evropských zemí; viz Obr. 16 a 17).

### **3.4 Testování specifických primerů a detekce symbiontů**

Na základě výsledků amplikonového sekvenování bylo k detekci symbiontů v populacích vši a testování specificky navržených primerů vybráno 18 vzorků DNA. Amplikonová data pro tyto vzorky obsahovala konkrétní OTU s vysokým počtem sekvencí (5-49,83 %) se sníženým GC obsahem. Kromě DNA templátů z amplikonového datasetu byly na testování primerů a detekci symbiontů použity také celé vši (uchované v etanolu, -20 °C) pocházející ze stejných jedinců myšic použitých k amplikonovému sekvenování (viz Tab.II). Izolace DNA vši byla provedena podle návodu izolačního kitu Blood & Tissue kitu (Qiagen). Následně byla koncentrace DNA změřena na nanofotometru (NanoPhotometer P-Class, IMPLEN). V případě nízkých hodnot nebo nedostatečného množství daného vzorku u původních DNA templátů (vzorek NJ27A a StrAF36a), byl použit amplifikační kit (Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit). Takto připravená DNA byla dále použita pro PCR (Polymerase Chain Reaction).

Tab. II: Základní informace o použitých vzorcích z amplikovaných dat. Na základě analýz amplikonových dat (čísla udávají počty sekvencí) poskytuje tabulka přehled o přítomnosti třech symbiontických linií (OTU) ve vzorcích DNA, které byly následně použity pro testování specifických primerů na PCR diagnostiku.

Vzorky	Hostitel	Lokalita CZ	P-symb (OTU3)	LegA (OTU1)	LegB (OTU4)	Izolace 2016	Účel
Str22	A. sylvaticus	Stružná	0	597	1	ne	x
NJ27A	A. agrarius	Nový Jičín	1	0	1932	ne	test prim <sup>1</sup> +Psymb <sup>2</sup>
NJ60A	A. agrarius	Nový Jičín	0	1	2342	ne	test prim
NJ60B	A. agrarius	Nový Jičín	0	1	2377	ne	test prim
NJ58B	A. agrarius	Nový Jičín	5	2	2294	ne	test prim
StrAF36b	A. flavicollis	Stružná	2400	74	0	ne	test prim+Psymb
StrAF1a	A. flavicollis	Stružná	2190	210	0	ne	x
StrAF16d	A. flavicollis	Stružná	2037	218	0	ne	x
StrAF16	A. flavicollis	Stružná	x	x	x	ano	test prim
StrAF20a	A. flavicollis	Stružná	2006	231	0	ne	x
StrAF20	A. flavicollis	Stružná	x	x	x	ano	test prim
StrAF36a	A. flavicollis	Stružná	1917	217	0	ne	test prim+Psymb
StrAF16b	A. flavicollis	Stružná	1887	406	1	ne	x
StrAF16	A. flavicollis	Stružná	x	x	x	ano	test prim
StrAF15a	A. flavicollis	Stružná	1849	540	0	ne	x
StrAF20b	A. flavicollis	Stružná	1793	547	0	ne	x
StrAF36c	A. flavicollis	Stružná	1591	456	0	ne	test prim
StrAF36	A. flavicollis	Stružná	x	x	x	ano	test prim+Psymb
StrAF1c	A. flavicollis	Stružná	1536	704	0	ne	x
StrAF15b	A. flavicollis	Stružná	1427	641	1	ne	x
StrAF15	A. flavicollis	Stružná	x	x	x	ano	test prim
StrAF20c	A. flavicollis	Stružná	1282	397	0	ne	x
StrAF20	A. flavicollis	Stružná	x	x	x	ano	test prim+Psymb
StrAF15c	A. flavicollis	Stružná	1157	779	0	ne	test prim
StrAF19b	A. flavicollis	Stružná	130	2004	0	ne	x
StrAF1b	A. flavicollis	Stružná	49	1973	2	ne	x
StrAF19c	A. flavicollis	Stružná	163	1870	0	ne	test prim
StrAF13a	A. flavicollis	Stružná	1	1471	1	ne	x
StrAF13c	A. flavicollis	Stružná	1	909	0	ne	x
StrAF13	A. flavicollis	Stružná	x	x	x	ano	test prim
StrAF16a	A. flavicollis	Stružná	110	857	0	ne	x
StrAF39b	A. flavicollis	Stružná	0	792	0	ne	x
StrAF39b	A. flavicollis	Stružná	x	x	x	ano	test prim
StrAF21	A. flavicollis	Stružná	x	x	x	ano	test prim

<sup>1</sup> test prim - zkratka účelu, při kterém byly dané vzorky použity k testování specifických primerů

<sup>2</sup> Psymb - zkratka účelu, při kterém byly dané vzorky použity k detekci CoP-symbionta



### 3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerázová řetězová reakce byla provedena za účelem testování primerů specifických na dvě linie bakterií *Legionella* identifikovaných v ampliconových datech. PCR byla dále použita k získání delšího úseku sekvence 16S rRNA primárního symbionta („coP-symbiont“) nově identifikovaného v ampliconovém datasetu. Specifické primery byly navrženy tak, aby nasedly na daný úsek DNA sekvence 16S rRNA u primárního symbionta *Legionella* a rozpoznaly dvě linie *Legionella*, zde pojmenovány jako LegA a LegB. Z OTU matrix víme, jaké vzorky jsou pozitivní na LegA a LegB a díky tomu jsme mohli testovat různé kombinace těchto primerů. Testování specificky navržených primerů a detekce coP-symbionta se prováděla s HotStar DNA polymerázou (Qiagen) nebo s Plain PP Master Mixem (TopBio). Testování primerů zahrnovalo jak klasickou PCR, tak gradientové reakce. V rámci gradientové reakce, použité pro optimalizaci podmínek PCR s konkrétním párem primerů, bylo testováno pět nasedacích teplot (45 °C, 49,7 °C, 53,4 °C, 57,3 °C a 60 °C). PCR reakce se uskutečnila v přístroji Mastercycler (Eppendorf) s použitím vhodných programů.

Tab. III: Specifické primery, nspecifické primery a jejich sekvence, které byly použity na detekci dvou linií *Legionella*. Všechny páry amplifikují malou ribosomální podjednotku 16S rRNA.

Primery	LegA	LegB	Sekvence (5'-3')	Zdroj
<b>Leg22F</b>	ano	ano	TGGCTCAGATTGAACGCTGG	Nově navrženy
<b>Leg1557R</b>	ano	ano	GTTCCCCTAYGGCTACCTTG	Nově navrženy
<b>LegA603F</b>	ano	ne	GTGCGTAGGTTGTATGGTAA	Nově navrženy
<b>LegA695R</b>	ano	ne	CCCTATCCCATACTCTAGTTTGGT	Nově navrženy
<b>LegB622R</b>	ne	ano	TTACCACACCACCTACGCAC	Nově navrženy
<b>LegB695R</b>	ne	ano	CCCTATCCTATACTCTAAGTCTGGCA	Nově navrženy
<b>DR</b>	nesp.	nesp.	CRACACGAGCTGACGACA	(Hypša & Křížek, 2007)
<b>DF</b>	nesp.	nesp.	CACACTGGAAGCTGAGAYACG	(Hypša & Křížek, 2007)
<b>R1060</b>	nesp.	nesp.	CTTAACCCAACATTTCTCAACACGAG	(Hypša & Křížek, 2007)
<b>F40</b>	nesp.	nesp.	GCGGCAAGCCTAACACAT	(Hypša & Křížek, 2007)
<b>Leg 16 R3</b>	nesp.	nesp.	AGCCGGTGCTTATTCTTT	Nově navrženy
<b>Leg 16 F3</b>	nesp.	nesp.	ACTATYKACTTCTGGTGC	Nově navrženy



<b>EMP (515f)</b>	nesp.	nesp.	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	(Parada et al., 2015)
<b>EMP (806r)</b>	nesp.	nesp.	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	(Parada et al., 2015)
<b>L4</b>	nesp.	nesp.	GACCAACAGCTAGTTGA	(Hypša & Křížek, 2007)
<b>EUB 16S</b>	nesp.	nesp.	CCATTGTAGCACGTGT	(O'Neill et al., 1992)

Tab. IV: Složení reakce s HotStar polymerázou

<b>Složky</b>	<b>(<math>\mu</math>l)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	18,2
<b>dNTPs (deoxynukleotidová směs)</b>	1
<b>Pufr</b>	2,5
<b>Forward primer</b>	1
<b>Reverse primer</b>	1
<b>polymeráza</b>	0,3
<b>DNA</b>	1

Tab. V: Složení reakce s Master mixem

<b>Složky</b>	<b>(<math>\mu</math>l)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	7
<b>MM</b>	10
<b>Forward primer</b>	1
<b>Reverse primer</b>	1
<b>DNA</b>	1

Tab. VI: Podmínky PCR s Hot Star polymerázou a Master mixem

	<b>Hot Star polymeráza</b>		<b>Master mix</b>	
<b>Úvodní denaturace</b>	15 min	95 °C	5 min	94 °C
<b>Denaturace</b>	1 min	94 °C	20 s	94 °C
<b>Nasedání primerů</b>	1 min	53 °C	10 s	57 °C
<b>Extenze</b>	1 min	72 °C	30 s	72 °C
<b>Finální extenze</b>	10 min	72 °C	7 min	72 °C
<b>Počet cyklů (denaturace-extenze)</b>	35x		35x	

### 3.6 Gelová elektroforéza

Výsledky polymerázové řetězové reakce byly vyhodnoceny podle velikosti pomocí gelové elektroforézy. Do připraveného 1% agarázového gelu bylo napipetováno přibližně 2  $\mu$ l PCR produktu smíchaným s fluorescenčním barvivem SYBR GREEN (Invitrogen) a se stejným množstvím směsi 6x DNA Loading Dye (Thermo Scientific). Dále byl použit 1 kb DNA Ladder pro určení přibližné délky DNA fragmentů. Gely byly následně vizualizovány UV zářením v zařízení UVITEC s pomocí programu Alliance.

### 3.7 Klonování a transformace

Produkty získané z PCR reakcí s nespecifickými primery DR a DF byly klonovány pomocí NEB PCR Cloning kitu, do pMini T Vectoru. Nejprve byla připravena ligační směs složená z 1 $\mu$ l PCR produktu, 1 $\mu$ l pMiniT Vectoru, 3 $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 4 $\mu$ l Cloning Mixu 1 a 1 $\mu$ l Cloning Mixu

2. Směs byla inkubována 15 minut při pokojové teplotě (25 °C). Dále byla směs umístěna na 2 minuty na led. 2,5 µl ligační směsi bylo smícháno s 25 µl kompetentními buňkami (NEB 5 - alpha Competent *E. coli*) a nechána na ledu po dobu 20 minut. Transformace byla provedena tepelným šokem při 42 °C v termobloku (30 s). Následně byla směs přesunuta zpátky na 5 minut na led. Poté bylo k směsi připipetováno 300 µl SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) média a tento mix byl umístěn na 60 minut do třepačky (250 rpm) a inkubován při teplotě 37 °C. Buňky byly rozetřeny na SOC plotny žehličkou a uchovány přes noc v inkubátoru (37 °C).

Druhý den byla provedena selekce narostlých kolonií, které byly zbarveny do bílé barvy. Z každé Petriho misky bylo odebráno 5 kolonií. „Colony PCR“ byla provedena s primery Cloning F a Cloning R (NEB PCR Cloning kit).

Tab. VII: Colony PCR

Úvodní denaturace	2 min	94 °C
Denaturace	15 s	94 °C
Nasedání primerů	15 s	53 °C
Extenze	60 s	68 °C
Finální extenze	5 min	68 °C
Počet cyklů (denaturace-extenze)	30x	

### 3.8 Sangerovo sekvenování

Před sekvenování je nutné z produktů PCR odstranit zbylé primery a neinkorporované nukleotidy. PCR z narostlých kolonií (23 vzorků) bylo enzymaticky přečištěno přidáním 0,2 µl fosfatázy (Fast Up, výrobce) a 0,2 µl exonukleázy (EXO 1, výrobce). Podmínky enzymatického přečištění byly: inkubace při teplotě 37 °C na 15 minut a inaktivace enzymu při teplotě 80 °C po dobu 15 minut. Z takto upravených vzorků se odpipetovalo 5 µl roztoku a smíchalo se s 5 µl primerem (Cloning F) a směs byla poslána na Sangerovo sekvenování.

### 3.9 Zpracování Sanger sekvencí a fylogeneze

Sestavení datasetu a následná rekonstrukce fylogeneze pro linii coP-symbionta byla provedena pod vedením doktorandky Evy Šochové. Sekvence coP-symbionta získané sekvenací z narostlých kolonií byly zpracovávány pomocí programu Geneious. V prvním kroku byly odstraněny sekvence vektorů, primerů a případně špatně osekvenované konce. Primární identifikace sekvencí byla provedena pomocí serveru NCBI BlastSearch (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), který vyhledal nejpodobnější sekvence v nukleotidové databázi nr. V taxonomickém zařazení reprezentativních sekvencí

jednotlivých OTU dle databáze Silva, byl coP-symbiont určen jako *Buchnera aphidicola*. Za účelem určení přibližné fylogenetické pozice coP-symbionta byl sestaven dataset 395 sekvencí 16S rRNA o délce 790 bp. K vytvoření alignmentu byl použit program Mafft s použitím E-INS-i algoritmu implementovaný do platformy Geneious. K rekonstrukci fylogenetického stromu byla použita metoda Maximum likelihood (ML) s pomocí programu PhyML v 3.0 (Guindon et al., 2009). Pro výběr modelu substituce nukleotidů byl použit jModelTest (Santorum, 2014), na jehož základě byl použit GTR model (General Time Reversible; Rodriguez et al., 1990) s gamma distribucí se 4 rychlostmi substituce a s parametrem alpha. Dále byla použita metoda Subtree pruning a regrafting (SPR), která prohledává topologii a vzdálenosti větví. Vytvořený fylogenetický strom byl upraven v programu FigTree v1.4.2 a jeho výsledná grafická podoba byla provedena v programu InkScape v0.91/Adobe Illustrator.

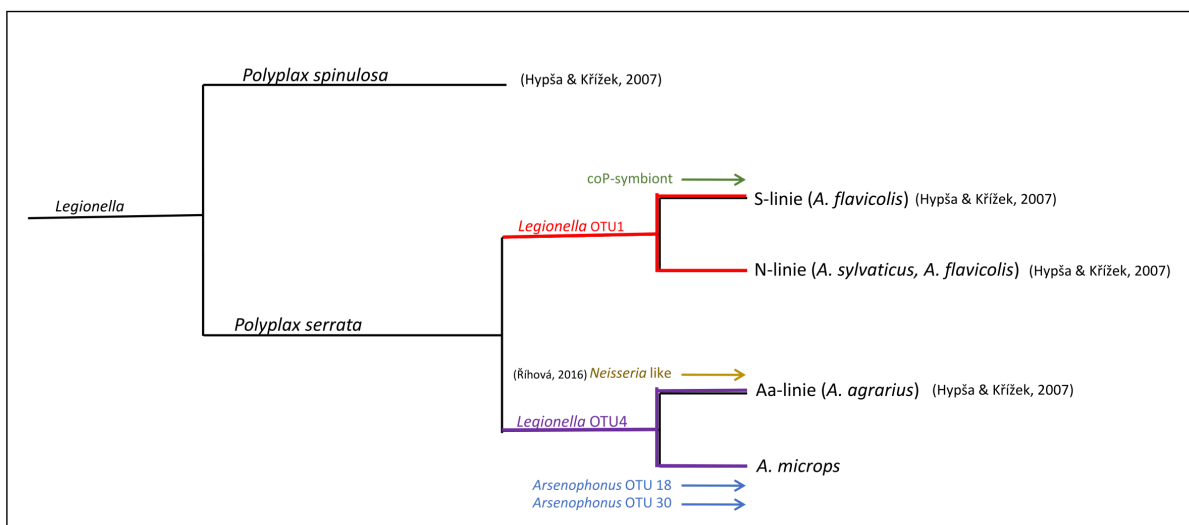
## 4 Výsledky

### 4.1 Identifikace primárních a koprímárních symbiontů z ampliconových dat

Zpracováním ampliconových dat jsme získali OTU matrix pro 367 odlišných vzorků, kde byl průměrný počet ampliconů získaných pro jeden vzorek 19893 readů. Výsledný dataset byl znáhodněn na 2500 readů. Na základě početnosti jednotlivých OTU a GC obsahu byly identifikované symbiotické linie, ze kterých byla vytvořena tabulka, která ukazuje procentuální zastoupení symbiontů v jednotlivých mikrobiomech myšic a jejich GC obsah nukleotidů (viz Tab. VIII, zahrnutý jsou bakterie, které v mikrobiomu zaujímaly více než 0,5 %). Na pozadí GC obsahu sekvencí pro jednotlivá OTU (viz Tab. VIII) a genealogie *P. serrata* jsme zrekonstruovali pravděpodobné evoluční schéma symbiotických vztahů této vší s bakteriemi (viz Obr. 4).

Bakterie rodu *Legionella* byla identifikována ve všech analyzovaných mikrobiomech vší druhu *Polyplax serrata* ze čtyř druhů myšic (viz Tab. VIII). Na základě této distribuce a nízkého GC obsahu získaných sekvencí, považujeme OTU1 a OTU4 pro rod *Legionella* za primární symbionty. Zatímco hlavní složkou mikrobiomu vší druhu *Polyplax serrata* z *A. agrarius* je OTU4, dále referovaná jako *Legionella* B, ve vších z *A. flavicollis* a *A. sylvaticus* nacházíme ve velkém počtu *Legionella* A OTU1. Přítomnost těchto dvou linií naznačuje kodiverzifikaci symbionta se vším hostitelem parazitujícím na geneticky odlišných liniích myšic, viz evoluční schéma Obr. 4. Dalšího, pravděpodobně primárního symbionta, představují sekvence OTU3, které byly identifikovány dle blast vyhledávání v databázi SILVA jako symbiont *Buchnera aphidicola*. OTU3 nalezneme pouze v mikrobiomech vší z *A. flavicollis* a v této práci ho značíme jako coP-symbionta (viz Obr. 4). Zajímavý je mikrobiom vší z *A. microps*, ve kterém nalezneme *Legionella* B a dvě linie bakterií *Arsenophonus*. *Arsenophonus* OTU13 má GC obsah 53,7 %, takže se pravděpodobně jedná o recentně získaného sekundárního symbionta. Sekvence *Arsenophonus* OTU18 má GC obsah pod 49,4 %, z čehož usuzujeme, že jde spíše o primárního symbionta. V linii *P. serrata* z *A. agrarius* potvrdila ampliconová data přítomnost bakterie ze skupiny Neisseriales.





Obr. 4: Schéma evoluce bakteriální symbiózy u vši rodu *Polyplax*. Ilustrace, založená na výsledcích amplikonových dat, zobrazuje primárního symbionta *Legionella* a jeho evoluci s druhy *Polyplax spinulosa* a *Polyplax serrata*. V rámci druhu *Polyplax serrata* sleduje *Legionella* (OTU1 a OTU4) diverzifikaci vši na linii S, N, Aa a Am, vázané na různé druhy myšic. Vstup dalších symbiontů (coP-symbiont, primární a sekundární linie *Arsenophonus*, a *Neisseria*-like symbiont) je naznačen pro příslušné linie *P. serrata* barevnými šipkami.

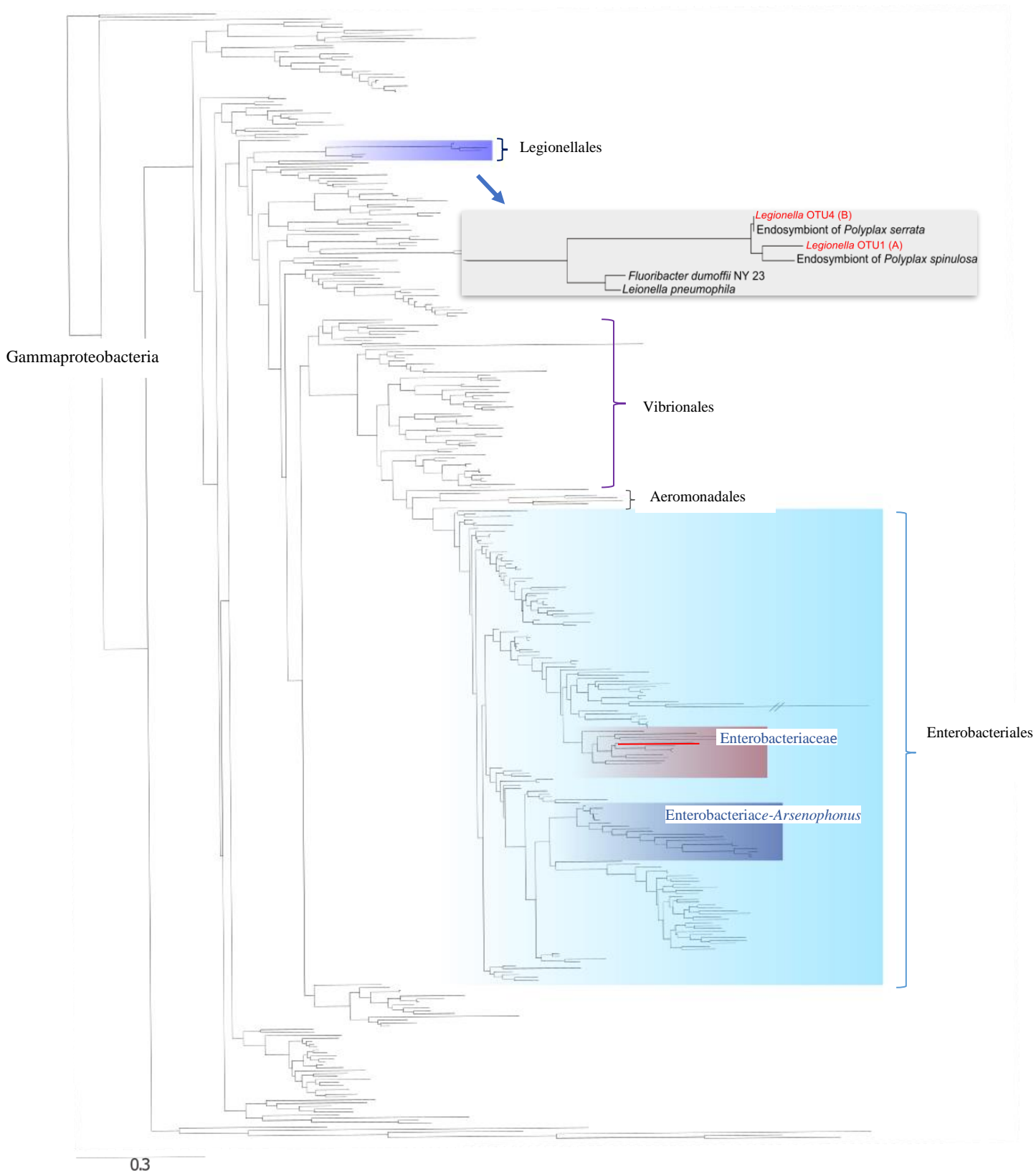
## 4.2 Testování specifických primerů a detekce coP-symbionta

Testy specifických primerů prokázaly funkčnost páru Leg22F a LegA695R, který detekuje *Legionella* A (OTU1).

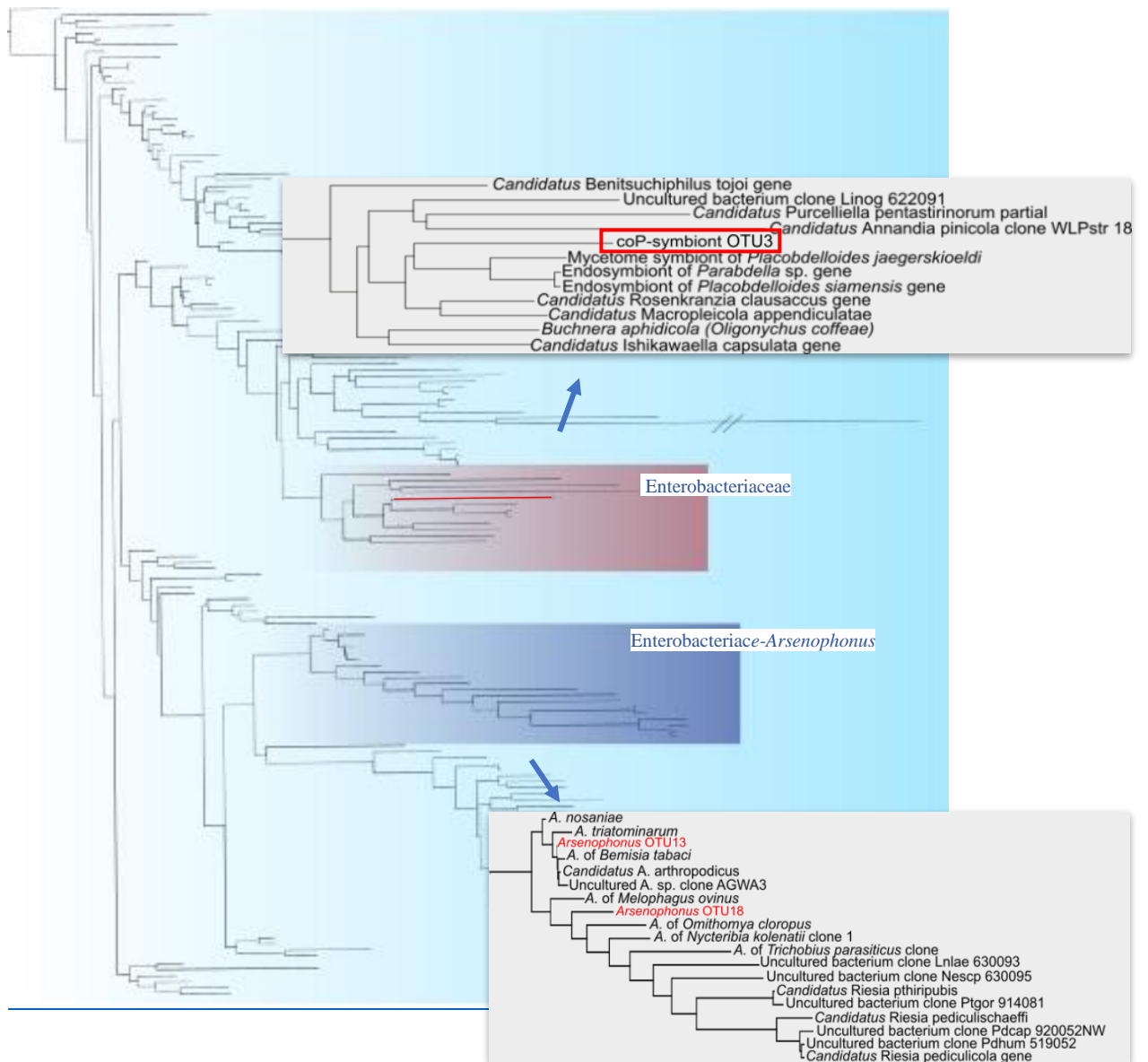
Ve vzorcích z klonování, které byly poslané na Sangerovo sekvenování, bylo detekováno ve 22 vzorcích 6 různých bakterií. Podařilo se detekovat *Legionella* A (2 vzorky), *Neisseria*-like OTU8 (4 vzorky), *Escherichia* OTU10 (1 vzorek), *Acinetobacter* OTU5 (2 vzorky), a *Bartonella* OTU20 (5 vzorků). V osmi vzorcích byl osekvenován neznámý CoP-symbiont OTU3, z kterého jsme získali sekvenci dlouhou 790bp. Sekvence byly rozpoznány pomocí serveru NCBI BlastSearch (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 4.3 Fylogeneze

Fylogenetická analýza vytvořená z 395 sekvencí z Gammaproteobacteria 16S rRNA zařadila sekvence symbiotických OTU identifikované v amplikonovém datasetu do dvou řádů, tj. Legionellales a Enterobacteriales. CoP-symbiont se klastroval do rodu Enterobacteriaceae s dalšími symbionty much, mravenců, mšic a dalších. Sesterskou skupinou je fylogenetická větev symbiontů pijavic (*Placobdeloides siamensis* a *Parabdella* sp.). Bakterie z řádu Nesseriales nebyla do databáze zařazena, protože nespadá do Gammaproteobacteria.



Obr. 5: Fylogenetická kostra třídy Gammaproteobacteria, ve které jsou vyznačeny některé významné skupiny bakterií, včetně zvýrazněné Legionellales, kam se řadí námi detekované *Legionella* OTU1 (A) a *Legionella* OTU4 (B). V čeledi Enterobacteriaceae (Enterobacteriales) je červeně zvýrazněná fylogenetická větev determinující neznámého coP-symbionta.

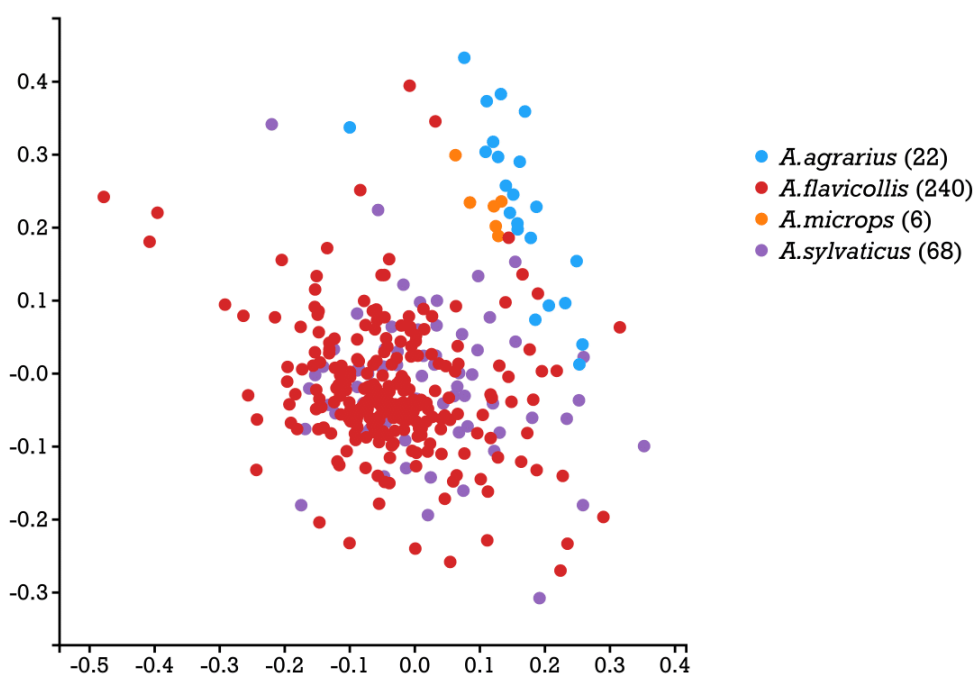


Obr. 6: Fylogenetická rekonstrukce řádu Enterobacteriales s vyznačením monofyletických skupin Enterobacteriaceae a Enterobacteriaceae-Arsenophonus. V první skupině je vyznačen coP-symbiont. Druhá skupina je vyznačena pro ilustraci umístění bakterií rodu *Arsenophonus* včetně námi detekovaných *Arsenophonus* OTU13 a OTU18, které byly nalezeny v datech ampliconového sekvenování (viz. Výsledky a Diskuze).

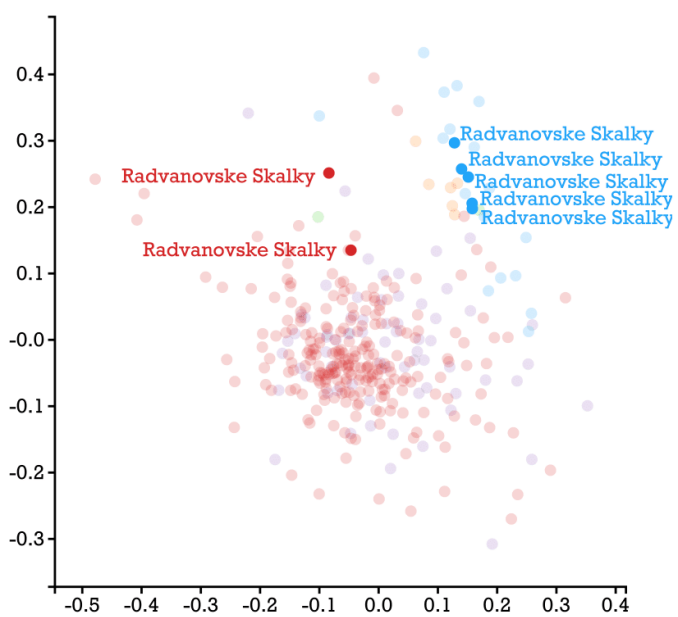


#### 4.4 Mikrobiomy vší rodu *Polyplax* z *A. agrarius*

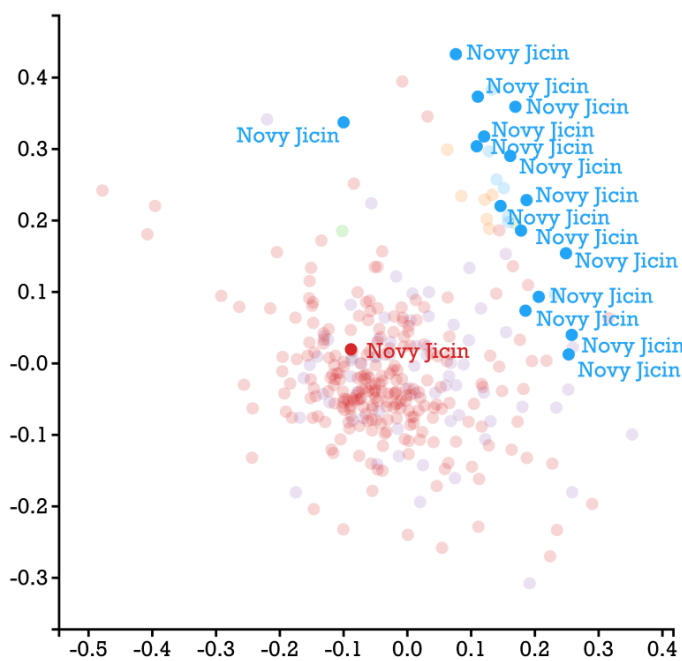
V mikrobiomu vší *P. serrata* z *A. agrarius* dominuje *Legionella* OTU4, která zaujímá 49,83 %. NMDS (Non-metric multidimensional scaling). Analýzy prokázaly jasné oddělení mikrobiomů linie *Polyplax* z *A. agrarius* od mikrobiomů ostatních hostitelů (viz Obr. 7, 8, 9). Odlišnost mikrobiomových profilů je determinována linií *P. serrata* parazitující myšice *A. agrarius*, nikoliv geografickým původem vzorků (viz Obr. 8 a 9). Vzhledem k celkově nízkému počtu analyzovaných vzorků (22) pocházejících z 6 lokalit, nebyly mikrobiomy linie vší z *A. agrarius* a *A. microps* (6 vzorků, 2 lokality) podrobněji analyzovány. Výsledky mikrobiomových analýz pro linie *P. serrata* z druhů *A. flavicollis* a *A. sylvaticus* jsou prezentovány na základě genealogie všech hostitelů, která je znázorněna v části Materiál a metody na Obr. 1.



Obr. 7: Znázornění mikrobiomů vší druhů *Polyplax serrata* z *A. agrarius*, *A. flavicollis*, *A. microps* a *A. sylvaticus* na základě podobnosti složení mikrobiomů. Každá tečka znázorňuje mikrobiom jednoho jedince rodu *Polyplax* a barvami jsou odlišeny jednotlivé druhy hostitelů.



Obr. 8: Znázornění mikrobiomů vší *Polyplax serrata* z *A. agrarius* a z *A. flavicollis* pocházející z Radvanovských skalek



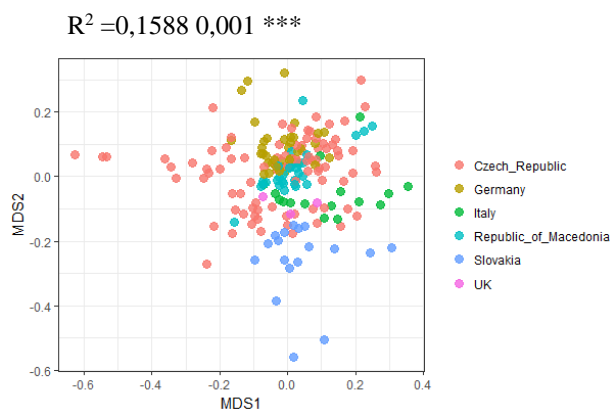
Obr. 9: Znázornění mikrobiomů vší *Polyplax serrata* z *A. agrarius* a z *A. flavicollis* pocházející z Nového Jičína

## 4.5 Analýzy specifická linie *Polyplax serrata*

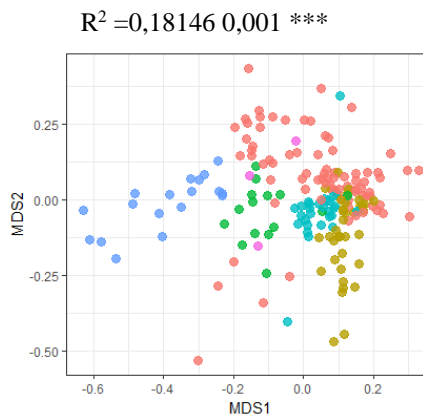
### 4.5.1 Geografie jako determinant mikrobiomového profilu

Vliv geografického původu vzorků na mikrobiomový profil byl posuzován na dvou odlišných datasetech (viz Materiál a metody 3.3) a dvou geografických úrovních: v rámci evropských států (205 vzorků, Obr 2) a v rámci odchytových lokalit v jednotlivých státech (95 vzorků, Obr.2)

NMDS analýza složení mikrobiomů u specifické linie vši *P. serrata* (*A. flavicollis*) potvrdila signifikantní rozdíly mezi vzorky pocházejícími z různých států, a to jak v kompletním datasetu (viz Obr. 10, Tab. IX), tak datasetu bez hlavních symbiotických OTU (viz Obr. 11, Tab. X). Odlišnost mikrobiomů byla dále testována pro jednotlivé páry států. Z 15 párů států za přítomnosti všech symbiontů (tj. plný dataset) vyšlo 13 párů signifikantně odlišných (viz Tab. IX, obrazová příloha 8.1). Po odstranění *Legionella* OTU1 (A) a *Buchnera aphidicola* OTU3 (coP-symbiont) bylo signifikantně odlišných 12 párů (Tab. X, obrazová příloha 8.1). Signifikační výsledky statistických analýz provedených funkcí adonis jsou uváděné v jednotlivých tabulkách a obrázcích jako hodnota  $R^2$  s označením \*\*\* pro hladinu významnosti 99 % a \*\* pro 95 %. Všechny prezentované grafy jsou výsledkem NMDS analýz matic (ne)podobnosti a osy grafů určují pouze jeho orientaci.



Obr. 10: Znárodnění mikrobiomů vši *Polyplax serrata* (S-linie) z evropských států se všemi symbionty.



Obr. 11: Znárodnění mikrobiomů vši *Polyplax serrata* (S-linie) z evropských států bez hlavních symbiontů.

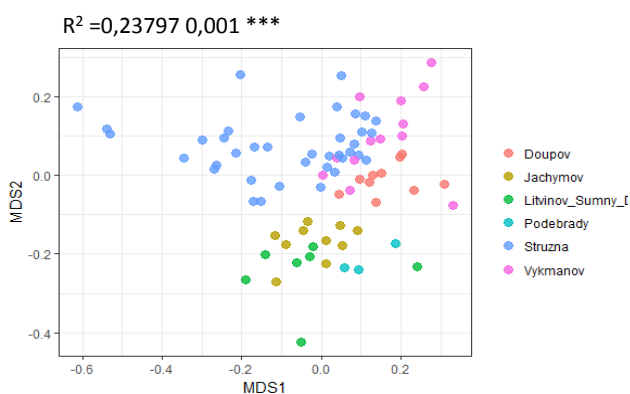
Tab. IX: Výsledky statistické analýzy odlišnosti mikrobiomů vší *Polyplax serrata* (S-linie) z evropských států v plném datasetu.

All	Česká Republika	Itálie	Německo	UK	Makedonie
<b>Itálie</b>	0,042 0,001 ***				
<b>Německo</b>	0,0732 0,001 ***	0,13185 0,001 ***			
<b>UK</b>	0,01622 0,098.	0,08159 0,061.	0,08242 0,001 ***		
<b>Makedonie</b>	0,04225 0,001 ***	0,11995 0,001 ***	0,0895 0,001 ***	0,07624 0,001 ***	
<b>Slovensko</b>	0,09849 0,001 ***	0,20384 0,001 ***	0,27216 0,001 ***	0,14535 0,001 ***	0,24871 0,001 ***

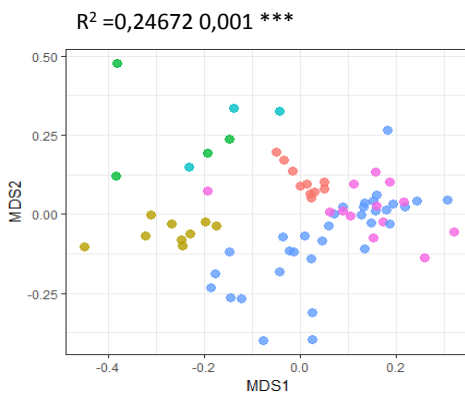
Tab. X: Výsledky statistické analýzy odlišnosti mikrobiomů vší *Polyplax serrata* (S-linie) z evropských států po odstranění dominantních symbiontů.

	Česká Republika	Itálie	Německo	UK	Makedonie
<b>Itálie</b>	0,05399 0,001 ***				
<b>Německo</b>	0,08859 0,001 ***	0,14631 0,001 ***			
<b>UK</b>	0,021192 0,025 *	0,0965 0,012 *	0,09121 0,001 ***		
<b>Makedonie</b>	0,03978 0,001 ***	0,11675 0,001 ***	0,08507 0,001 ***	0,08625 0,001 ***	
<b>Slovensko</b>	0,12466 0,001 ***	0,22052 0,001 ***	0,27587 0,001 ***	0,004 **	0,2468 0,001 ***

Signifikantní rozdíly mezi mikrobiomovými profily byly nalezeny i na úrovni lokalit pro oba analyzované datasety (Obr. 12 a 13). Pro Českou republiku bylo párově porovnáno 15 párů lokalit. V případě plného datasetu byly signifikantně odlišné mikrobiomy z 10 párů lokalit. Po odstranění hlavních symbiontů, byly signifikantní rozdíly nalezeny pro 8 párů (Tab. XI a XII, obrazová příloha 8.2).



Obr. 12: Znázornění mikrobiomů vší *Polyplax serrata* z *A. flavicollis* (S-linie) v plném datasetu.



Obr. 13: Znázornění mikrobiomů vší *Polyplax serrata* z *A. flavicollis* (S-linie) bez hlavních symbiontů.

Tab. XI: Výsledky statistické analýzy odlišnosti mikrobiomů specifické linie vší *Polyplax serrata* z lokalit v ČR se všemi symbionty.

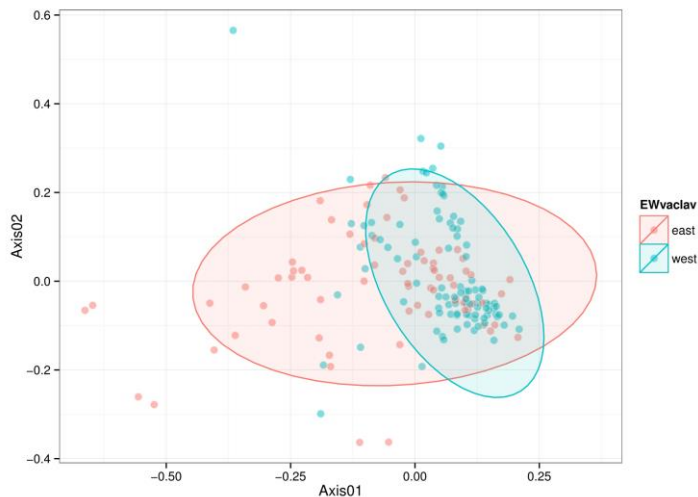
All	Doupov	Jáchymov	Litvínov Sumny Důl	Vykmanov	Stružná
<b>Jáchymov</b>	0,29592 0,001 ***				
<b>Litvínov Sumny Důl</b>	0,25557 0,001 ***	0,17678 0,001 ***			
<b>Vykmanov</b>	0,15053 0,001 ***	0,23696 0,001 ***	0,21749 0,001 ***		
<b>Stružná</b>	0,10928 0,001 ***	0,12247 0,001 ***	0,08865 0,001 ***	0,07864 0,001 ***	
<b>Poděbrady</b>	0,25333 0,003 **	0,23692 0,002 **	0,19947 0,006 **	0,20703 0,003 **	0,7779 0,003 **

Tab. XII: Výsledky statistické analýzy odlišnosti mikrobiomů specifické linie vší *Polyplax serrata* z lokalit v ČR bez hlavních symbiontů.

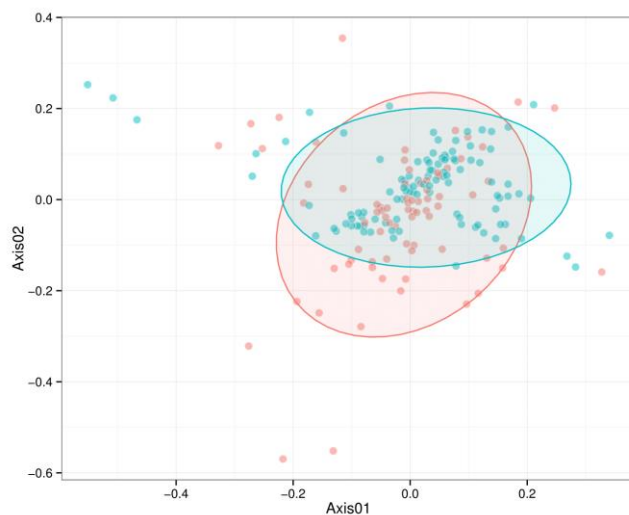
	Doupov	Jáchymov	Litvínov Sumny Důl	Vykmanov	Stružná
<b>Jáchymov</b>	0,3073 0,001 ***				
<b>Litvínov Sumny Důl</b>	0,22028 0,003 **	0,19214 0,002 **			
<b>Vykmanov</b>	0,18397 0,001 ***	0,25213 0,001 ***	0,18231 0,001 ***		
<b>Stružná</b>	0,10989 0,001 ***	0,14399 0,001 ***	0,08284 0,001 ***	0,05851 0,002 **	
<b>Poděbrady</b>	0,26334 0,003 **	0,26581 0,007 **	0,25114 0,029 *	0,22455 0,005 **	0,09756 0,001 ***

### 4.5.3 Genealogie jako determinant mikrobiomového profilu

Specifická linie, dělicí se dle haplotypů na východní a západní větve (viz Obr. 1), umožnila posouzení rozdílů mezi mikrobiomy na populační úrovni (podložené genealogií). Analýza 80 vzorků z východní a 108 vzorků ze západní větve odhalila signifikantní rozdíly mezi mikrobiomy z těchto dvou skupin jak v plném datasetu (viz Obr. 14) tak bez hlavních symbiontů (viz Obr. 15).



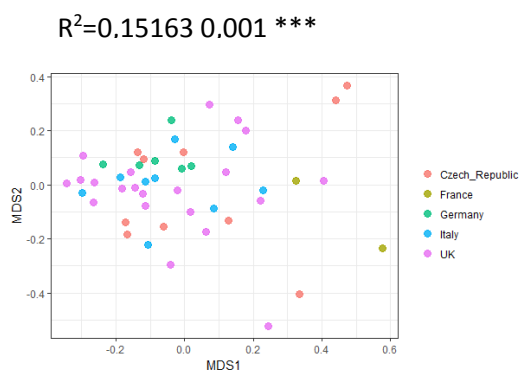
Obr. 14: Zobrazení mikrobiomů vší *Polyplax serrata* specifické linie rozdělené na západ a východ v plném datasetu ( $R^2= 0,06175^{***}$ ).



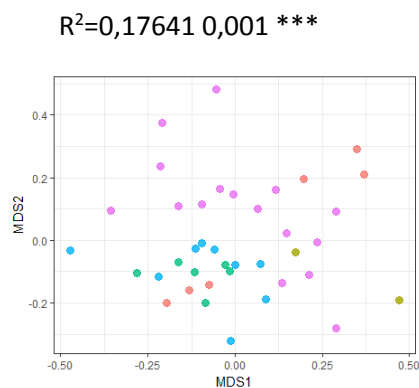
Obr. 15: Zobrazení mikrobiomů vší *Polyplax serrata* specifické linie rozdělené na západ a východ bez hlavních symbiontů ( $R^2= 0,0247^{***}$ ).

## 4.6 Analýzy nespecifické linie

Analýzy z nespecifické linie obsahovaly 50 vzorků z 5 států. Mikrobiomy vši *P. serrata* z *A. flavicollis* byly zastoupeny deseti vzorky a mikrobiomy vši *P. serrata* z *A. sylvaticus* ve zbylých 40 vzorcích. Analýza nepodobnosti mezi mikrobiomy vši z různých států Evropy poukázala na signifikantní rozdíly v plném datasetu i datasetu bez symbiotických linií. Párové porovnání ale ukázalo signifikantní rozdíly v plném datasetu pouze pro Německo s UK a po odstranění dominujících symbiontů i pro Itálii a UK (viz Tab. XIII a XIV).



Obr. 16: Nespecifická linie mikrobiomů vši *Polyplax serrata* v plném datasetu.



Obr. 17: Nespecifická linie mikrobiomů vši *Polyplax serrata* bez dominantních symbiontů.

Tab. XIII: Výsledky statistické analýzy odlišnosti mikrobiomů vši *Polyplax serrata* (N-linie) z evropských států v plném datasetu.

all	Česká Republika	Francie	Německo	Itálie
<b>Francie</b>	0,13889 0,067.			
<b>Německo</b>	0,12156 0,039 *	0,38 0,032 *		
<b>Itálie</b>	0,09046 0,038 *	0,19394 0,018 *	0,11994 0,043*	
<b>UK</b>	0,05398 0,017 *	0,08008 0,12 *	0,09158 0,001 ***	0,05937 0,015 *

Tab. XIV: Výsledky statistické analýzy odlišnosti mikrobiomů vši *Polyplax serrata* (N-linie) z evropských států bez hlavních symbiontů.

	Česká Republika	Francie	Německo	Itálie
<b>Francie</b>	0,19205 0,183			
<b>Německo</b>	0,12146 0,17	0,31756 0,03 *		
<b>Itálie</b>	0,11487 0,012 *	0,15708 0,023 *	0,12804 0,007 **	
<b>UK</b>	0,07258 0,014*	0,06781 0,154	0,12532 0,001 ***	0,07671 0,001 ***



## 5 Diskuze

### 5.1 Diverzita vši rodu *Polyplax*

Endosymbiotické bakterie vši doplňují především skupinu vitamínů B, které jsou nedostatečně zastoupené ve stravě a jsou proto nezbytné pro život vši (Douglas, 1989). Předchozí studie ukázaly, že existuje minimálně šest odlišných linií endosymbiontů vši, které se řadí do Gammaproteobacteria do skupiny gramnegativních bakterií (Sasaki-Fukatsu et al., 2006; Allen et al., 2007; Hypša & Křížek, 2007). Tato práce přináší novou symbiotickou linii vši, která se řadí do Enterobacteriales a nikoliv již do Legoinellales a Neisseriales (coP-symbiont; Obr. 4). Kvůli nedostatku informací z 16S rRNA sekvencí v Enterobacteriaceae, nejsou vztahy v této skupině přesně určené (Hypša & Křížek, 2007).

Na základě výsledků z amplikonových dat jsme vytvořili schéma (viz Obr. 4), které představuje koexistenci několika primárních symbiontů v mikrobiomech vši *Polyplax serrata*. Ve specifické linii pravděpodobně dochází ke kooperaci *Legionella* OTU1 (A) s nově detekovaným coP-symbiontem. U linie vši *Polyplax serrata* z *A. agrarius* doplňuje symbionta *Legionella* OTU4 (B) nedávno detekovaný primární symbiont z Neisseriales (Říhová, 2015). V mikrobiomech vši druhu *Polyplax Serrata* z *A. microps* dominují vedle *Legionella* OTU4 (B) dva druhy *Arsenophonus* (viz Tab. VIII). Kompenzace pomocí sekundárních či ko-primárních symbiontů je běžný mechanismus, jak se vyrovnat s „rabbit hole“, která představuje důsledky nevratitelné obligátní symbiózy, při které se ztrácí geny a zmenšují se genomy (Wernegreen, 2002; Moran et al., 2008). Hostitelé symbionty vyžadují pro nutriční a správný vývoj primárního symbionta, ale genom symbionta z důsledku akumulace mutací z vertikálního přenosu ztrácí geny a dochází k jeho celkovému zmenšení (Moran, 1996). V momentě, kdy hostitel už nemá dostatek genů ze svého primárního symbionta, dochází ke kompenzaci těchto genů ze sekundárního symbionta, který může doplnit primární symbionty ve funkci ko-primárního symbionta a časem může zastat místo primárního symbionta úplně (Koga et al., 2003; Allen et al., 2010). Například u již zmíněné mšice *Cinara cedri* nalezneme primárního symbionta *Buchnera*, která koexistuje s druhým symbiontem *Serratia symbiotica* (Lamelas et al., 2011). K úplnému nahrazení primárního symbionta došlo například ve skupině Auchenorrhyncha v liniích včetně cikád, ostrostřelců a pěnodělek, kde byl hlavní symbiont *Sulcia muelleri*, který byl nahrazen novým typem symbionta přeneseným horizontálním přenosem (Bennett et al., 2015).

Tato skutečnost vysvětluje, proč primární symbionti mají nejmenší genomy ze všech buněčných organismů (McCutcheon & Moran, 2012). Nejvíce prostudovaný genom je

z *Buchnera aphidicola*, který vykazuje známky genetického driftu (Shigenobu et al., 2000). Server NCBI BlastSearch (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) určil největší podobnost s coP-symbiontem právě se symbiontem *Buchnera aphidicola* (90 %). Je možné, že u coP-symbionta došlo také k redukci genomu, a to může být jedním z důvodů, proč BlastSearch řadí coP-symbionta právě k *Buchnera aphidicola*.

Fylogeneticky se coP-symbiont řadí k symbiontům pijavic. Fylogenetická pozice v Enterobacteriaceae může být lehce zavádějící. Přesné stanovení evolučních vztahů se potýká s nedostatky dat, s množstvím artefaktů při fylogenetických analýzách a s obtížněji sledovaným horizontálním přenosem symbiotických forem mezi hostiteli v rámci této skupiny (Naum et al., 2008; Raychoudhury et al., 2009). Prozatím žádná z používaných metod, jako je ML (maximum likelihood) a BI (Bayesian interference) s různými modely použité na nukleové (GTR+I+ $\Gamma$ ) a aminokyselinové (GTR/LG/WAG+I+ $\Gamma$ ) data, nebyly schopné vyřešit hlubší fylogenetické vztahy a správné umístění symbiotických taxonů. Příkladem je zahrnutí bakterie *Riesia* do P-symbiotické linie nebo zkreslené umístění *Wigglesworthia* v klastru *Buchnera* (Husník et al., 2011). Uspořádání fylogenetických stromů naznačuje, že jsou symbionti tříděni podle jejich délek větví či AT obsahem nukleotidů. *Placobdeloides siamensis* a *Parabdelia* sp. jsou primární symbionti pijavic, kteří se značí právě vysokým AT (53,7 %) obsahem nukleotidů na 16S rRNA genu (Kikuchi & Fukatsu, 2002). CoP-symbiont, kterého jsme detekovali, má AT obsah nukleotidů vysoký 55 %. Je možné, že zrovna známý fylogenetický artefakt, při kterém se přitahují symbionti se zvýšeným AT obsahem nukleotidů může tady hrát důležitou roli (Husník et al., 2011).

Vzhledem k nedostatečnému množství vzorků získaných z mikrobiomů vši *Polyplax serrata* z *A. microps* nelze vyvozovat přesné závěry, ale detekce kooperace dvou druhů *Arsenophonus* s *Legionella* OTU4 (B) se jeví jako zajímavý cíl dalšího výzkumu. Rod *Arsenophonus* představuje jednu z nejbohatších a nejvíce rozšířených rodů symbiotických bakterií. Jedinci z rodu *Arsenophonus* se objevují jako sekundární symbionti, kdy vykazují schopnost horizontálního vstupu do hostitelských linií, ale můžeme je najít i jako primární symbionty v obligátním vztahu se svým hostitelem a schopni vertikálního přenosu (Gherna et al., 1991, Nováková et al., 2009). V našich datech se *Arsenophonus* liší především rozdílným GC obsahem nukleotidů. *Arsenophonus* OTU13 (zastupuje 20,67 % mikrobiomu z *A. microps*) obsahuje 53,7 % GC nukleotidů, takže předpokládáme, že tato linie, zastává roli sekundárního symbionta. *Arsenophonus* OTU18 (zastupuje 17,5 % mikrobiomu z *A. microps*) má GC obsah 49,4 % což už může naznačovat, že se jedná o primárního symbionta. Na základě předchozích

analýz, chceme také upozornit, že rod *Arsenophonus* je v současné době parafyletický, a to kvůli dvěma liniím, které jsou popsány jako rody *Riesia* a *Phlomobacter*, ale spadají do rodu *Arsenophonus* (Nováková et al., 2009). Právě bakterie *Riesia* je primárním symbiontem nejen lidských vší, ale i šimpanzích vší a gorilích vší (Sasaki-Fukatsu et al., 2006). Otázkou dalšího výzkumu by mohlo být upřesnění pozice *Arsenophonus*, jakožto bakterie *Riesia* v pozici ko-primárního symbionta v mikrobiomu vší *Polyplax serrata* z *A. microps*.

## 5.2 Mikrobiomy na pozadí genetické struktury hostitelů

Mikrobiomy hmyzu, a tedy i mikrobiomy vší mají oproti obratlovcům podstatně nižší diverzitu a jsou do značné míry ovlivněny potravou hostitele (Cohen et al., 2015). Identifikovali jsme 19 různých symbiontů (OTU), které zaujímají více než 0,5 % z celého mikrobiomu vší *Polyplax serrata* (63 % Gammaproteobacteria, 10,5 % Betaproteobacteria, 5,3 % Alphaproteobacteria, 10,5 % Actinobacteria, 5,3 % Flavobacteria, 5,3 % Bacili). V mikrobiomu vší *Polyplax serrata* dominují v 37,9 % bakterie *Legionella* OTU1 (A), v 7 % *Staphylococcus*, v 3,9 % *Legionella* OTU4 (B) a v 3,8 % *Buchnera aphidicola* (coP-symbiont). Velice podobné jsou v tomto ohledu například mikrobiální společenstva mšic, která také zahrnují obligátní symbionty a několik málo dalších bakterií. U mšic bylo detekováno 21 bakterií (OTU), pro které více než 98 % sekvencí pochází ze známých symbiontů mšic (Gauthier et al., 2015). Právě u fytofágního hmyzu se setkáváme s nejchudší mikrobiální rozmanitostí, kde se ve vzorku vyskytuje i méně než 12 bakterií (OTU; Russel et al., 2013; Jink et al., 2014). Na úrovni jednotlivce, může být rozmanitost mikrobiální diverzity obohacena o různé jiné bakteriální taxony či viry a houby atd. V našich datech jsme například zaznamenali přítomnost *Staphylococcus* či *Geobacillus* a mnoha dalších. Podobně jako u mšic je proto u vší *P. serrata* ekologický a evoluční význam těchto dalších mikrobiálních spoluúčastníků pravděpodobně zanedbatelný v porovnání s primárními a sekundárními symbionty.

Rozmanitost a genetická struktura mikrobiomů jsou základními předpoklady pro přežití a evoluci populací (Price, 1980; Banks & Paterson, 2005). Genetická struktura sdružení *Polyplax*-*Apodemus* jako parazit-hostitel se jeví jako dobrý model pro studium ko-evoluce na úrovni populace. V obecné rovině genealogie jsou vší rodu *Polyplax* jasně spojené s evoluční historií a distribucí *Apodemus* a dělí se na tři linie (tj. specifická, nespecifická a linie z *A. agrarius*; Štefka & Hypša, 2008).

Analyzovali jsme nejprve všechny vzorky, s cílem prokázat odlišnost mikrobiomu vší *P. serrata* z *A. agrarius* od specifické a nespecifické linie, což se potvrdilo na Obr. 7.

Za účelem zjistit, zda je mikrobiom vši rodu *Polyplax* z *A. agrarius* odlišný ve spojitosti s hostitelem nebo geografii jsme analyzovali dvě lokality (Radvanovské skalky a Nový Jičín), ve kterých dominuje *A. agrarius*. Podoba mikrobiomů byla jasně závislá na hostitelské taxonomii (viz Obr. 7, 8, 9). Z výsledků (viz Obr. 7) této analýzy lze vyčíst velkou podobnost mikrobiomů *P. serrata* z *A. sylvaticus* a z *A. flavicollis*, jakožto specifické a nespecifické linie, které byly označeny ve studii Jany Martinů (Martinu et al., 2016) jako monofyletické sestry.

Předpokládáme, že bakterie diskutované v oddílu 5.1, tedy především *Legionella* (A a B), jsou přenášeny v mikrobiomech jednotlivých linií *Polyplax* vertikálně. Zajímá nás tedy, jaká je hlavní determinující síla při formaci struktury mikrobiomů, jestli jde o vliv vertikální či horizontální složky. V mikrobiomech mšic jsou hlavními determinanty, které formují mikrobiální strukturu, ekologické síly (např. tlak nepřátel) a horizontální přenos symbiontů (Gauthier et al., 2015).

### **5.3 Mikrobiom vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (Specifická linie)**

Za účelem zjistit vliv vertikální či horizontální složky u vši *Polyplax serrata*, jsme z mikrobiomu vši specifické linie odstranili primární symbionty (*Legionella* OTU1 a CoP-symbiont OTU3) a porovnávali výsledky analýz mikrobiomy v plném datasetu s mikrobiomy bez dominantních symbiontů. Nejdříve jsme porovnávali evropské státy, kdy mikrobiomy vši vyšly signifikantně odlišně téměř ve všech párech. Výsledky analýz provedených jak u evropských států, tak v případě jednotlivých lokalit České republiky prokázaly téměř u ve všech porovnaných párů signifikantní rozdíly. Nejpodobnější si byly mikrobiomy vši z Poděbrad se všemi lokalitami (viz Tab. XI a XII). Tyto výsledky ukazují, že mikrobiomy vši jsou závislé na fylogeografii svých hostitelů a že primární symbionti nejsou hlavní hnací silou (i po jejich odstranění z dat jsou zachované signifikantní rozdíly). Mikrobiomy vši *P. serrata*, podobně jako mšic (Gauthier et al., 2015), jsou tedy převážně ovlivněny-formovány horizontální složkou, tedy bakteriemi z prostředí. Ve studii, která se zabývala mikrobiomy hostitelsky nespecifických blech (*Ctenocephalides f. felis*) z koček a psů v porovnání s mikrobiomy blech (*Echidnophaga ambulans ambulans*), které jsou hostitelsky specifické, byl rovněž prokázán vliv hostitelského prostředí (Lawrence et al., 2015).

Párové porovnávání mikrobiomů v plném datasetu s mikrobiomy bez dominantních symbiontů jsme použili také s cílem zjistit, zda jsou mikrobiomy signifikantně odlišné i mezi dvěma geneticky odlišnými liniemi specifické linie vši *P. serrata* (východ/západ viz Obr. 1). Výsledky i v tomto případě poukázaly na signifikantní rozdíly, potvrzující rozdělení vši ze specifické linie i na úrovni mikrobiomu.

#### 5.4 Mikrobiom vši rodu *Polyplax* z *A. sylvaticus* a *A. flavicollis* (Nespecifická linie)

Mikrobiom vši *Polyplax serrata* z *A. sylvaticus* obsahuje 40,07 % *Legionella* A OTU1 (Legionellaceae) s GC obsahem nukleotidů 47 %. Druhým nejvíce zastoupeným OTU je *Staphylococcus* (Staphylococcaceae) v 4,63 % a GC obsahem nukleotidů 50,99 %. U analýz nespecifické linie jsme opět porovnávali rozdíly mezi evropskými státy na úrovni mikrobiomu. Vzhledem k tomu, že nespecifická linie vši *Polyplax serrata* parazituje dva druhy hostitele (*A. sylvaticus* a *A. flavicollis*) a nemá jasnou genetickou strukturu, předpokládali jsme, že ani mikrobiomy z této linie nebudou tolik specifické. Minimum signifikantně odlišných párů pro porovnání mikrobiomů nespecifické linie z různých lokalit tento předpoklad potvrzují.

### 6. Závěr

Markerové amplikonové sekvenování umožnilo studium diverzity symbiózy v populacích hostitelů vši *Polyplax serrata*. V této studii jsem detekovala pět nezávislých symbiotických linií vázaných na různé hostitelské populace, tj. *Legionella*, *Neisseria*-like, dvě linie rodu *Arsenophonus*, a „coP-symbiont“. Zatímco symbionti rodu *Legionella* a *Neisseria*-like bakterie byly již dříve popsány, nově jsem v populacích *P. serrata* z lokality Stružná identifikovala coP-symbionta ze skupiny Enterobacteriaceae. Z pohledu evoluční historie symbiotických vztahů vši *Polyplax* s bakteriemi, představuje *Legionella* s velkou pravděpodobností původního symbionta rodu *Polyplax*, identifikovaného u druhu *Polyplax spinulosa* a všech genetických liniích druhu *Polyplax serrata*. Bakterie příbuzné řádu Neisseriales, *Arsenophonus* a coP-symbiont jsou pravděpodobně mladšími symbionty vázanými na odlišné genetické linie *P. serrata*.

Genetická struktura *P. serrata* byla identifikována jako hlavní faktor ovlivňující podobu mikrobiomů. Složení mikrobiomů *P. serrata* z hostitelských druhů *A. agrarius* a *A. microps* je zásadně odlišné od mikrobiomů vši u myšic druhu *A. sylvaticus* a *A. flavicollis*. Fylogeografické patterny nalezené pro populace *P. serrata* se promítají i do podoby mikrobiálních společenstev. Mikrobiomy vši z různých lokalit a genealogických linií jsou signifikantně odlišné. Rozdíly na populační úrovni hostitele nejsou determinovány hlavními symbiotickými liniemi, ale horizontální, pravděpodobně environmentálně získanou, složkou mikrobiomu.

## 7. Literatura

- 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.
- Aksoy, S., & Rio, R. V. (2005). Interactions among multiple genomes: tsetse, its symbionts and trypanosomes. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(7), 691-698.
- Allen, J. M., Light, J. E., Perotti, M. A., Braig, H. R., & Reed, D. L. (2009). Mutational meltdown in primary endosymbionts: selection limits Muller's ratchet. *PLoS One*, 4(3), e4969.
- 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.
- Andersson, S. G., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C. M., Podowski, R. M., ... & Kurland, C. G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 396(6707), 133-140.
- Aschner, M. (1934). Studies on the symbiosis of the body louse. *Parasitology*, 26(03), 309-314.
- Azambuja, P., Garcia, E. S., & Ratcliffe, N. A. (2005). Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in parasitology*, 21(12), 568-572.
- Bandi, C., Sironi, M., Damiani, G., Magrassi, L., Nalepa, C. A., Laudani, U., & Sacchi, L. (1995). The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 259(1356), 293-299.
- Banks, J. C., & Paterson, A. M. (2005). Multi-host parasite species in cophylogenetic studies. *International journal for parasitology*, 35(7), 741-746.
- 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.
- Bennett, G. M., & Moran, N. A. (2015). Heritable symbiosis: The advantages and perils of an evolutionary rabbit hole. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10169-10176.
- Binek, M. (2012). Mikrobiom człowieka—zdrowie i choroba. *Post. Mikrobiol*, 51, 27-36.
- Boyd, B. M., Allen, J. M., Koga, R., Fukatsu, T., Sweet, A. D., Johnson, K. P., & Reed, D. L. (2016). Two Bacterial Genera, *Sodalis* and *Rickettsia*, Associated with the Seal Louse *Proechinophthirus fluctus* (Phthiraptera: Anoplura). *Applied and environmental microbiology*, 82(11), 3185-3197.
- 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 Biol*, 1(1), e21.

- Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G., & McDADE, J. E. (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Annals of Internal Medicine*, 90(4), 656-658.
- Buchner, P. (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms (Interscience, New York), p 909.
- Burke, G. R., & Moran, N. A. (2011). Massive genomic decay in *Serratia symbiotica*, a recently evolved symbiont of aphids. *Genome biology and evolution*, 3, 195-208.
- Cohen, C., Toh, E., Munro, D., Dong, Q., & Hawlena, H. (2015). Similarities and seasonal variations in bacterial communities from the blood of rodents and from their flea vectors. *The ISME journal*, 9(7), 1662-1676.
- Conord, C., Despres, L., Vallier, A., Balmand, S., Miquel, C., Zundel, S., ... & Heddi, A. (2008). Long-term evolutionary stability of bacterial endosymbiosis in Curculionioidea: additional evidence of symbiont replacement in the Dryophthoridae family. *Molecular Biology and Evolution*, 25(5), 859-868.
- Costopoulos, K., Kovacs, J. L., Kamins, A., & Gerardo, N. M. (2014). Aphid facultative symbionts reduce survival of the predatory lady beetle *Hippodamia convergens*. *BMC ecology*, 14(1), 5.
- Chiel, E., Zchori-Fein, E., Inbar, M., Gottlieb, Y., Adachi-Hagimori, T., Kelly, S. E., ... & Hunter, M. S. (2009). Almost there: transmission routes of bacterial symbionts between trophic levels. *PLoS One*, 4(3), e4767.
- Dale, C., & Moran, N. A. (2006). Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell*, 126(3), 453-465.
- 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.
- Douglas, A. E. (1989). Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews*, 64(4), 409-434.
- Douglas, A. E. (2010). *The symbiotic habit*. Princeton University Press.
- 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.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., ... & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *science*, 308(5728), 1635-1638.
- Einat Zchori-Fein & Kostas Bourtzis (2012). Manipulative tenants: bacteria associated with arthropods. 1. United States of America: Taylor and Francis Group, 2012. ISBN 978-1-4398-2749-9.
- Elsheikha, H. M., & Khan, N. A. (Eds.). (2011). *Essentials of veterinary parasitology*. Horizon Scientific Press.

- Frank, A. B. (1877). Uber die biologischen Verhaltnisse des Thallus einiger krusten flechten. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen.*, 2, 123-200.
- Fukatsu, T., Hosokawa, T., Koga, R., Nikoh, N., Kato, T., Hayama, S. I., ... & Tanaka, I. (2009). Intestinal endocellular symbiotic bacterium of the macaque louse *Pedicinus obtusus*: distinct endosymbiont origins in anthropoid primate lice and the old world monkey louse. *Applied and environmental microbiology*, 75(11), 3796-3799.
- 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., Miezuet, 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.
- Gherna, R. L., Werren, J. H., Weisburg, W., Cote, R., Woese, C. R., Mandelco, L., & Brenner, D. J. (1991). NOTES: *Arsenophonus nasoniae* gen. nov., sp. nov., the Causative Agent of the Son-Killer Trait in the Parasitic Wasp *Nasonia vitripennis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(4), 563-565.
- Gil, R., Silva, F. J., Zientz, E., Delmotte, F., González-Candelas, F., Latorre, A., ... & Van Ham, R. C. (2003). The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), 9388-9393.
- Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., ... & Spector, T. D. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4), 789-799.
- Gottlieb, Y., Ghanim, M., Gueguen, G., Kontsedalov, S., Vavre, F., Fleury, F., & Zchori-Fein, E. (2008). Inherited intracellular ecosystem: symbiotic bacteria share bacteriocytes in whiteflies. *The FASEB Journal*, 22(7), 2591-2599.
- Griffiths, G. W., & Beck, S. D. (1974). Effects of antibiotics on intracellular symbiotes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Cell and tissue research*, 148(3), 287-300.
- Guindon, S., Delsuc, F., Dufayard, J. F., & Gascuel, O. (2009). Estimating maximum likelihood phylogenies with PhyML. *Bioinformatics for DNA sequence analysis*, 113-137.
- Heuer, H., & Smalla, K. (2007). Horizontal gene transfer between bacteria. *Environmental biosafety research*, 6(1-2), 3-13.
- Huigens, M. E., Luck, R. F., Klaassen, R. H. G., & Maas, M. F. MJTN & Stouthamer, R. 2000 Infectious parthenogenesis. *Nature*, 405, 178-179.
- 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., ... & Von Dohlen, C. D. (2013). Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell*, *153*(7), 1567-1578.
- 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.
- Jing, X., Wong, A. C. N., Chaston, J. M., Colvin, J., McKenzie, C. L., & Douglas, A. E. (2014). The bacterial communities in plant phloem-sap-feeding insects. *Molecular ecology*, *23*(6), 1433-1444.
- Johnson, K. P., Yoshizawa, K., & Smith, V. S. (2004). Multiple origins of parasitism in lice. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *271*(1550), 1771-1776.
- Jupatanakul, N., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2014). The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses*, *6*(11), 4294-4313.
- Khachane, A. N., Timmis, K. N., & dos Santos, V. A. M. (2007). Dynamics of reductive genome evolution in mitochondria and obligate intracellular microbes. *Molecular biology and evolution*, *24*(2), 449-456.
- Kidwell, M. G. (1993). Lateral transfer in natural populations of eukaryotes. *Annual review of genetics*, *27*(1), 235-256.
- Kikuchi, Y., & Fukatsu, T. (2002). Endosymbiotic bacteria in the esophageal organ of glossiphoniid leeches. *Applied and environmental microbiology*, *68*(9), 4637-4641.
- Kim, K. C. (2006). Blood-sucking lice (Anoplura) of small mammals: True parasites. In *Micromammals and macroparasites* (pp. 141-160). Springer Japan.
- Kirkness, E. F., Haas, B. J., Sun, W., Braig, H. R., Perotti, M. A., Clark, J. M., ... & Gerlach, D. (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.
- Koga, R., Tsuchida, T., & Fukatsu, T. (2003). Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *270*(1533), 2543-2550.
- Lamelas, A., Gosalbes, M. J., Manzano-Marín, A., Peretó, J., Moya, A., & Latorre, A. (2011). *Serratia symbiotica* from the aphid *Cinara cedri*: a missing link from facultative to obligate insect endosymbiont. *PLoS Genet*, *7*(11), e1002357.
- Lawrence, A. L., Hii, S. F., Chong, R., Webb, C. E., Traub, R., Brown, G., & Šlapeta, J. (2015). Evaluation of the bacterial microbiome of two flea species using different DNA-isolation techniques provides insights into flea host ecology. *FEMS microbiology ecology*, *91*(12), fiv134.
- Lehane, M. J. (2005). *The biology of blood-sucking in insects*. Cambridge University Press.
- Leung, T. L. F., & Poulin, R. (2008). Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. *Vie et Milieu*, *58*(2), 107.

- Light, J. E., & Hafner, M. S. (2007). Cophylogeny and disparate rates of evolution in sympatric lineages of chewing lice on pocket gophers. *Molecular phylogenetics and evolution*, 45(3), 997-1013.
- Light, J. E., Smith, V. S., Allen, J. M., Durden, L. A., & Reed, D. L. (2010). Evolutionary history of mammalian sucking lice (Phthiraptera: Anoplura). *BMC evolutionary biology*, 10(1), 292.
- Marshall, A. G. (1981). *The ecology of ectoparasitic insects*. Academic Press Inc.(London) Ltd.
- Martinu, J., Hypsa, V., & Stefka, J. (2016). Flexibility of co-evolutionary patterns in ectoparasite populations: genetic structure and diversity in Apodemus mice and their lice. *bioRxiv*, 065060.
- Mazmanian, S. K., Round, J. L., & Kasper, D. L. (2008). A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature*, 453(7195), 620-625.
- McCutcheon, J. P., & Moran, N. A. (2012). Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 13-26.
- McDade, J. E., Shepard, C. C., Fraser, D. W., Tsai, T. R., Redus, M. A., & Dowdle, W. R. (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New England Journal of Medicine*, 297(22), 1197-1203.
- McLean, D. L., & E. J. Houk. (1973). "Phase contrast and electron microscopy of the mycetocytes and symbiotes of the pea aphid, Acyrthosiphon pisum." *Journal of Insect Physiology* 19.3 :625631-629633.
- Michaux, J. R., Libois, R., & Filippucci, M. G. (2005). So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the Yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the Woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. *Heredity*, 94(1), 52.
- Moran, N. A. (1996). Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(7), 2873-2878.
- Moran, N. A., & Bennett, G. M. (2014). The tiniest tiny genomes. *Annual review of microbiology*, 68, 195-215.
- Moran, N. A., & Dunbar, H. E. (2006). Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(34), 12803-12806.
- 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., & Mira, A. (2001). The process of genome shrinkage in the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Genome biology*, 2(12), research0054-1.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., & Latorre, A. (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), 218-229.

- Naum, M., Brown, E. W., & Mason-Gamer, R. J. (2008). Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the enterobacteriaceae? *Journal of molecular evolution*, 66(6), 630-642.
- Nei, M., Maruyama, T., & Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 1-10.
- Nelson, W. A., Keirans, J. E., Bell, J. F., & Clifford, C. M. (1975). Review article: host-ectoparasite relationships. *Journal of Medical Entomology*, 12(2), 143-166.
- Nieberding, C., Morand, S., Libois, R., & Michaux, J. R. (2004). A parasite reveals cryptic phylogeographic history of its host. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 271(1557), 2559-2568.
- Nikoh, N., McCutcheon, J. P., Kudo, T., Miyagishima, S. Y., Moran, N. A., & Nakabachi, A. (2010). Bacterial genes in the aphid genome: absence of functional gene transfer from *Buchnera* to its host. *PLoS Genet*, 6(2), e1000827.
- Nováková, E., Husník, F., Šochová, E., & Hypša, V. (2015). *Arsenophonus* and *Sodalis* symbionts in louse flies: an analogy to the *Wigglesworthia* and *Sodalis* system in tsetse flies. *Applied and environmental microbiology*, 81(18), 6189-6199.
- 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.
- Ohta, T. (1992). The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23(1), 263-286.
- Oksanen, J. (2011). Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. *R package version*, 1(7), 11-12.
- Oliver, K. M., Degnan, P. H., Hunter, M. S., & Moran, N. A. (2009). Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. *Science*, 325(5943), 992-994.
- 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.
- 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.
- Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2015). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental microbiology*.
- Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A., Murphy, L. D., Thomson, N., Harris, D. E., ... & Cerdeño-Tárraga, A. M. (2003). Comparative analysis of the genome sequences of

*Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature genetics*, 35(1), 32-40.

Perotti, M. A., Kirkness, E. F., Reed, D. L., & Braig, H. R. (2009). Endosymbionts of lice. *Insect symbiosis*, 3, 205-220.

Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., ... & Baker, C. C. (2009). The NIH human microbiome project. *Genome research*, 19(12), 2317-2323.

Price, P. W. (1980). *Evolutionary biology of parasites* (Vol. 15). Princeton University Press.

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.

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.

Round, J. L., O'Connell, R. M., & Mazmanian, S. K. (2010). Coordination of tolerogenic immune responses by the commensal microbiota. *Journal of autoimmunity*, 34(3), J220-J225.

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.

Russell, J. A., Weldon, S., Smith, A. H., Kim, K. L., Hu, Y., Łukasik, P., ... & Oliver, K. M. (2013). Uncovering symbiont-driven genetic diversity across North American pea aphids. *Molecular Ecology*, 22(7), 2045-2059.

Říhová, J. (2015): Symbiotické bakterie vši rodu Polyplax: základní fylogenetická a genomická charakterizace. *Bakalářská práce*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta.

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.

Santorum, J. M., Darriba, D., Taboada, G. L., & Posada, D. (2014). jmodeltest.org: selection of nucleotide substitution models on the cloud. *Bioinformatics*, btu032.

Sasaki-Fukatsu, K., Koga, R., Nikoh, N., Yoshizawa, K., Kasai, S., Mihara, M., ... & Fukatsu, T. (2006). Symbiotic bacteria associated with stomach discs of human lice. *Applied and environmental microbiology*, 72(11), 7349-7352.

Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., & Ishikawa, H. (2000). Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 407(6800), 81-86.

Stouthamer, R., Breeuwer, J. A., & Hurst, G. D. (1999). *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Reviews in Microbiology*, 53(1), 71-102.

Szathmary, E., & Smith, J. M. (1995). The major evolutionary transitions. *Nature*, 374(6519), 227.

Štefka, J., & Hypša, V. (2008). Host specificity and genealogy of the louse *Polyplax serrata* on field mice, *Apodemus* species: A case of parasite duplication or colonisation? *International journal for parasitology*, 38(6), 731-741.

Tajima, F. (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 597-601.

van Ham, R. C., Kamerbeek, J., Palacios, C., Rausell, C., Abascal, F., Bastolla, U., ... & Tamames, J. (2003). Reductive genome evolution in *Buchnera aphidicola*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(2), 581-586.

van Schaik, J., Kerth, G., Bruyndonckx, N., & Christe, P. (2014). The effect of host social system on parasite population genetic structure: comparative population genetics of two ectoparasitic mites and their bat hosts. *BMC evolutionary biology*, 14(1), 18.

Viljakainen, L., Reuter, M., & Pamilo, P. (2008). *Wolbachia* transmission dynamics in Formica wood ants. *BMC evolutionary biology*, 8(1), 55.

VOLF, Petr, Petr HORÁK a a kol. (2007) *Paraziti a jejich biologie*. 1. Praha: TRITON, ISBN 978-80-7387-008-9.

Way, M. J. (1963). Mutualism between ants and honeydew-producing Homoptera. *Annual review of entomology*, 8(1), 307-344.

Weinert, L. A., Werren, J. H., Aebi, A., Stone, G. N., & Jiggins, F. M. (2009). Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *Bmc Biology*, 7(1), 6.

Weiss, B., & Aksoy, S. (2011). Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in parasitology*, 27(11), 514-522.

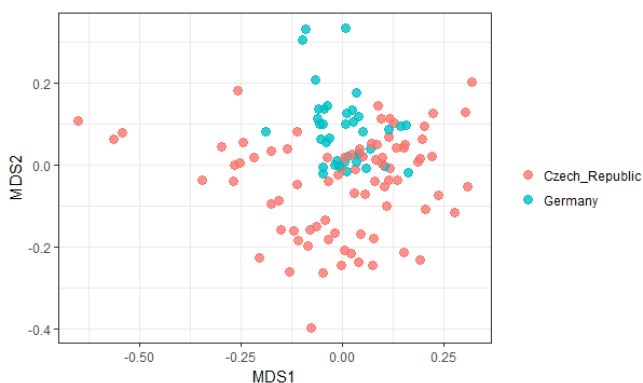
Wernegreen, J. J., & Funk, D. J. (2004). Mutation exposed: a neutral explanation for extreme base composition of an endosymbiont genome. *Journal of molecular evolution*, 59(6), 849-858.

Wernegreen, J. J. (2002). Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics*, 3(11), 850-861.

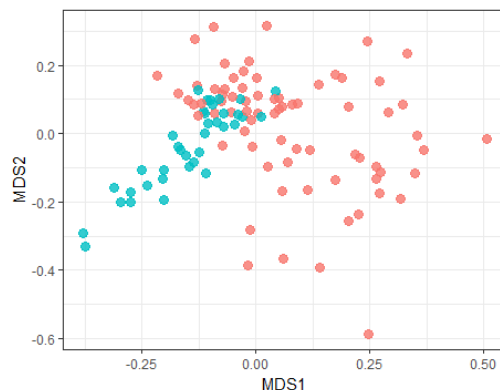
Yen, J. H., & Barr, A. R. (1971). New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L.

## 8. Přílohy

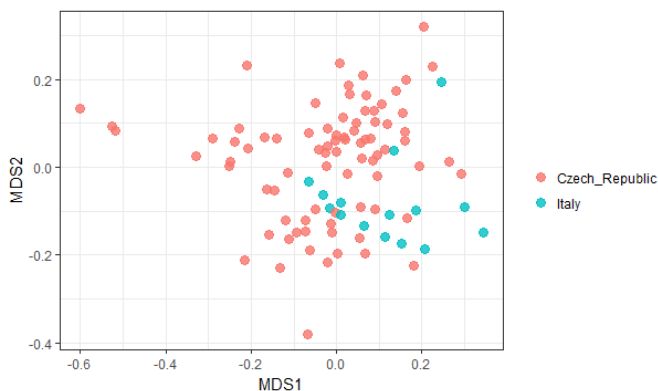
### 8.1 Specifická linie – párové porovnání států Evropy



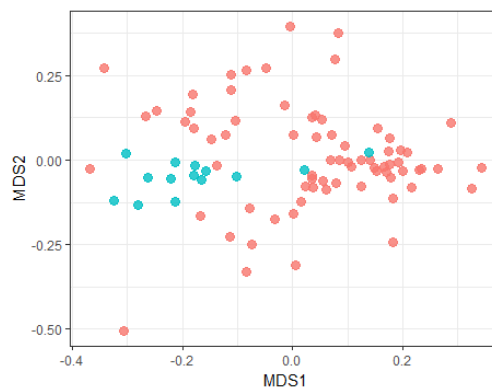
Obr. 1: Znárodnění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) České republiky a Německa v plném datasetu.



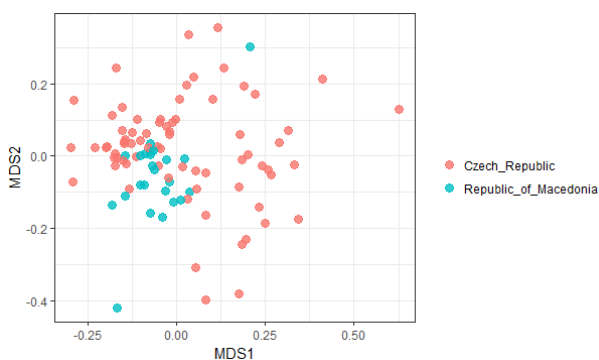
Obr. 2: Znárodnění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) České republiky a Německa bez hlavních symbiontů.



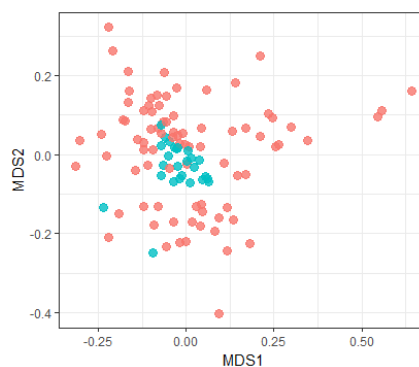
Obr. 3: Znárodnění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) České republiky a Itálie v plném datasetu.



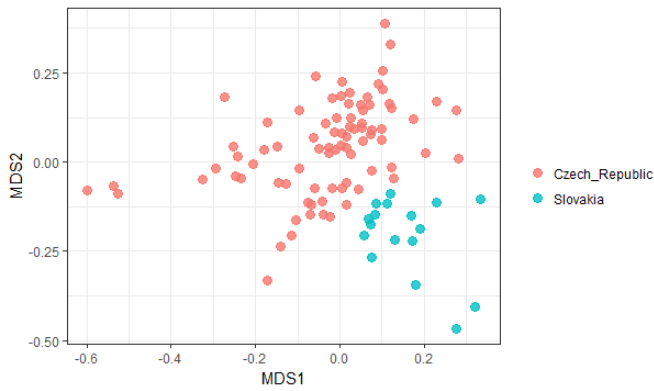
Obr. 4: Znárodnění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) České republiky a Itálie bez hlavních symbiontů.



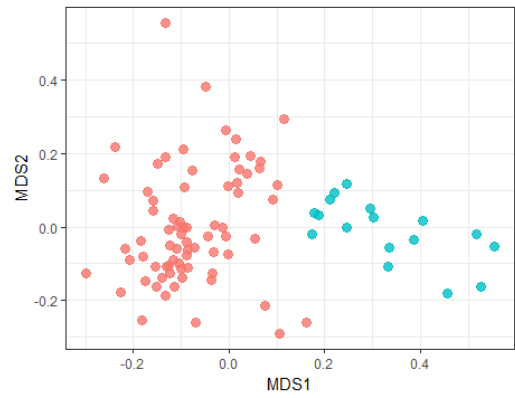
Obr. 5: Znárodnění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) České republiky a Makedonie v plném datasetu.



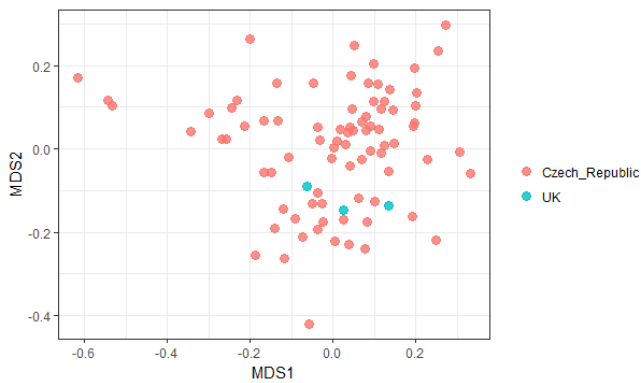
Obr. 6: Znárodnění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) České republiky a Makedonie bez hlavních symbiontů.



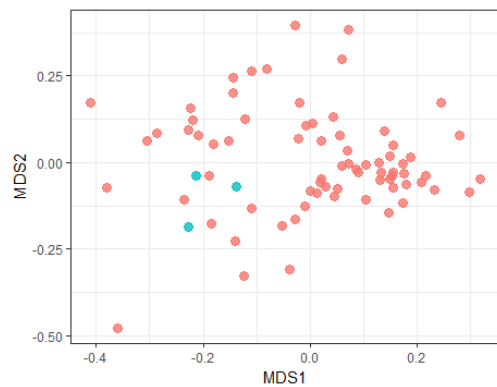
Obr. 7: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) České republiky a Slovenska v plném datasetu.



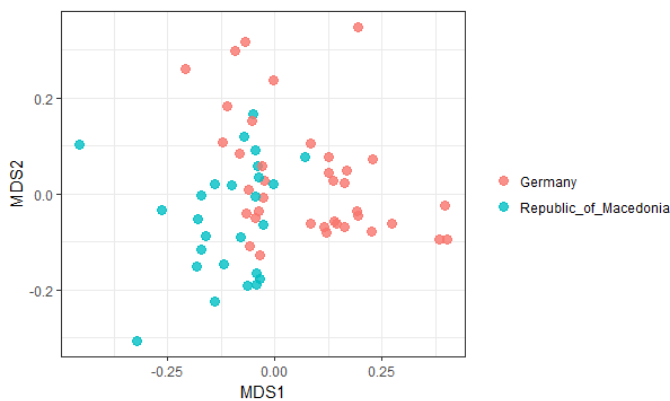
Obr. 8: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) České republiky a Slovenska bez hlavních symbiontů.



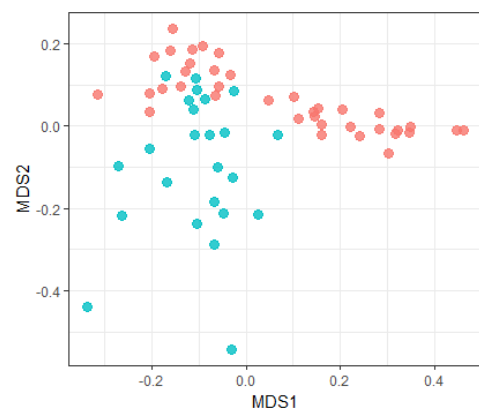
Obr. 9: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) České republiky a UK v plném datasetu.



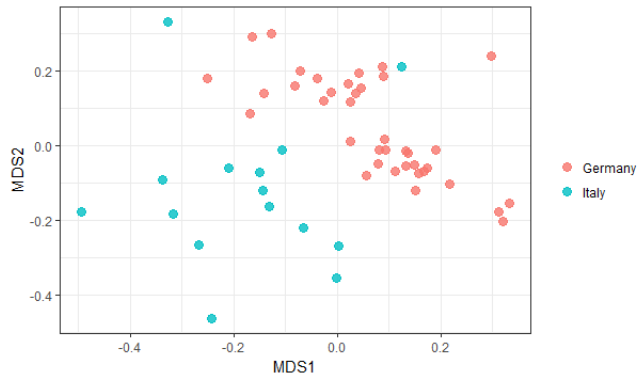
Obr. 10: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) České republiky a UK bez hlavních symbiontů.



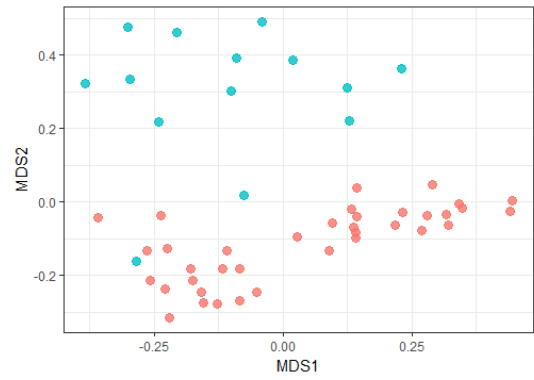
Obr. 11: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) specifické linie Makedonie a Německa v plném datasetu.



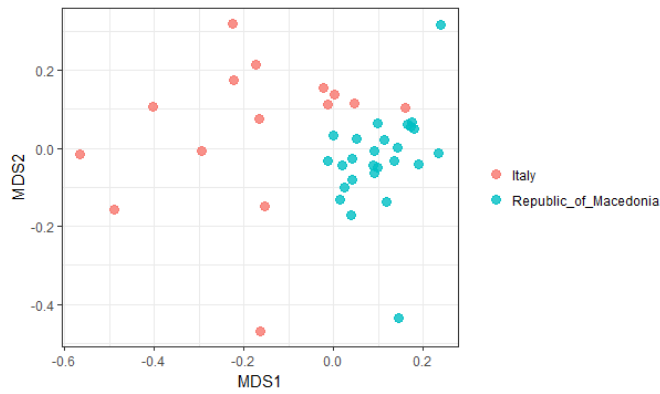
Obr. 12: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Makedonie a Německa bez hlavních symbiontů.



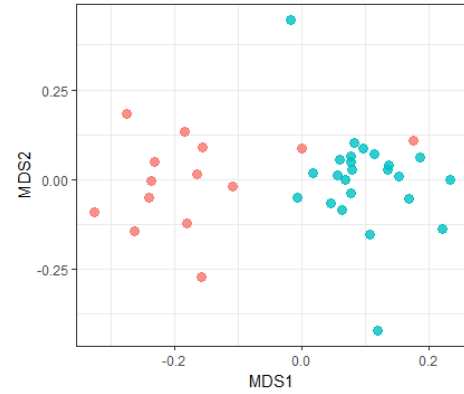
Obr. 13: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Itálie a Německa v plném datasetu.



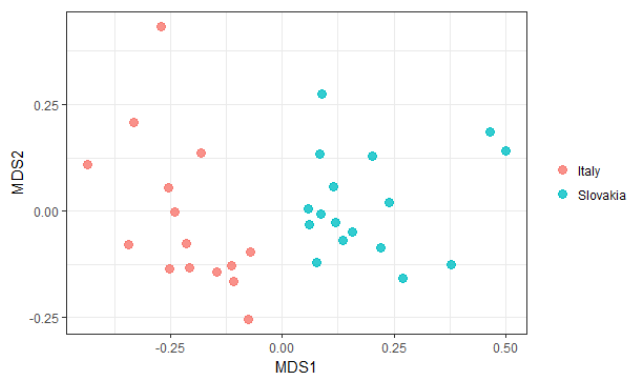
Obr. 14: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Itálie a Německa bez hlavních symbiontů.



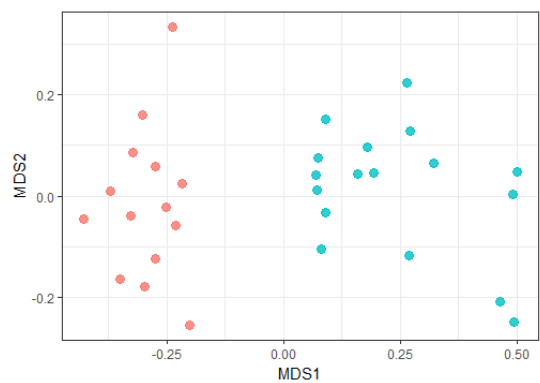
Obr. 15: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Itálie a Makedonie v plném datasetu.



Obr. 16: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Itálie a Makedonie bez hlavních symbiontů.

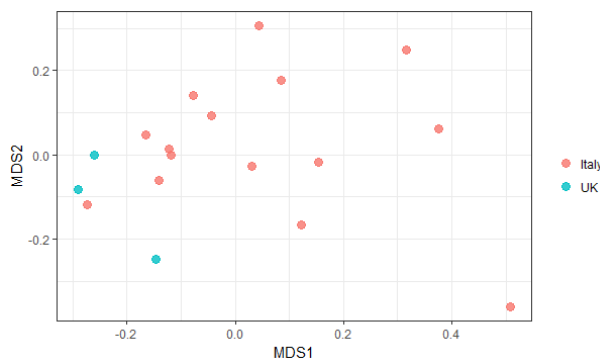


Obr. 17: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Itálie a Slovenska v plném datasetu.

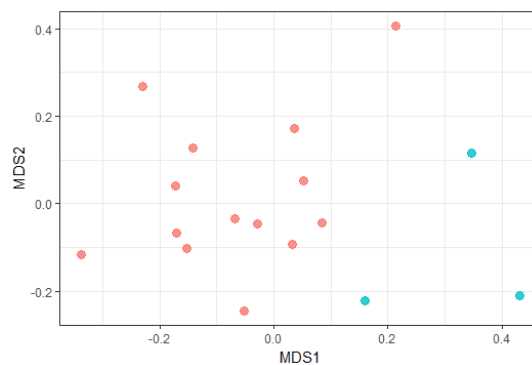


Obr. 18: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Itálie a Slovenska bez hlavních symbiontů.

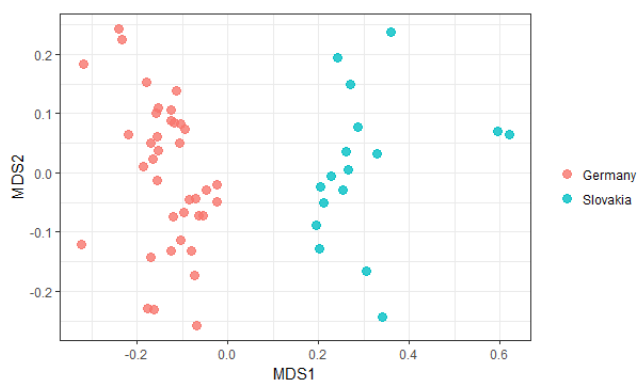




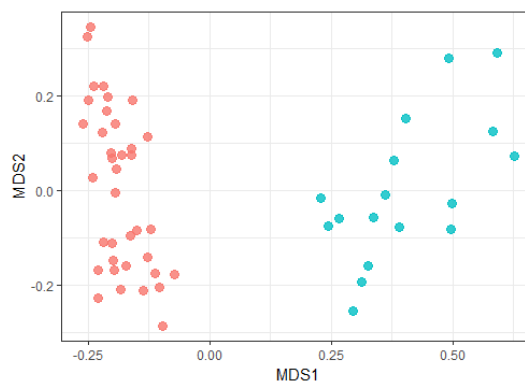
Obr. 19: Znázornění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Itálie a UK v plném datasetu.



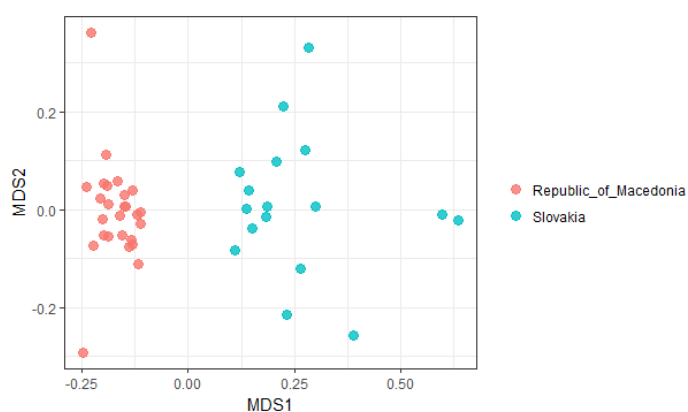
Obr. 20: Znázornění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Itálie a UK bez hlavních symbiontů.



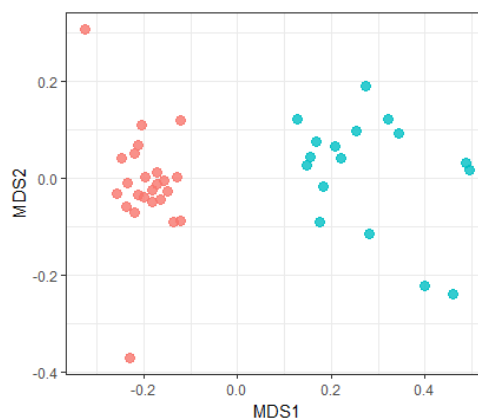
Obr. 21: Znázornění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Slovenska a Německa v plném datasetu.



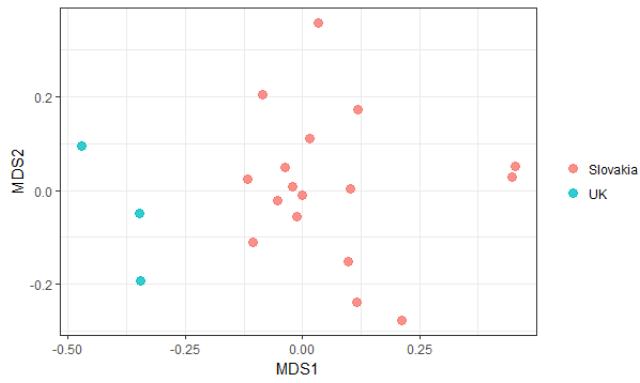
Obr. 22: Znázornění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Slovenska a Německa bez hlavních symbiontů.



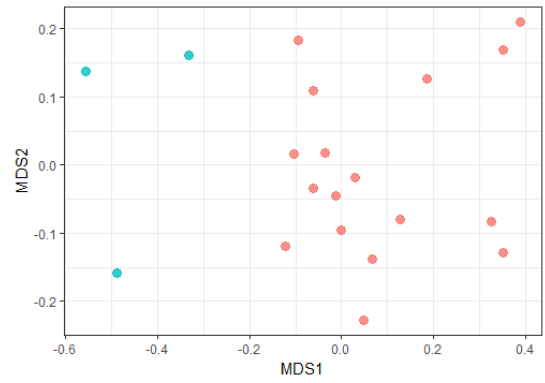
Obr. 23: Znázornění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Makedonie a Slovenska v plném datasetu.



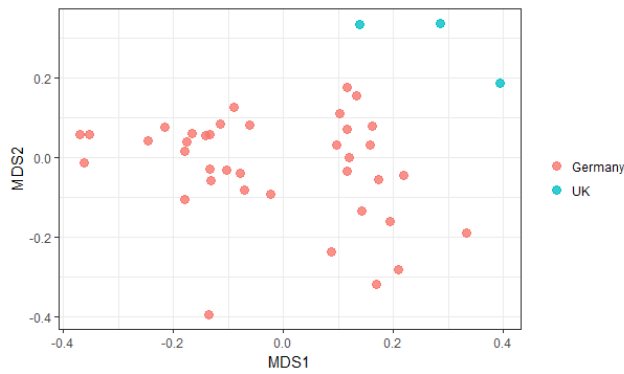
Obr. 24: Znázornění mikrobiomů vši rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Makedonie a Slovenska bez hlavních symbiontů.



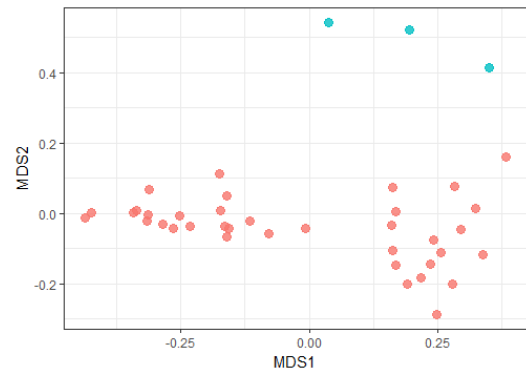
Obr. 25: Znáznornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Slovenska a UK v plném datasetu.



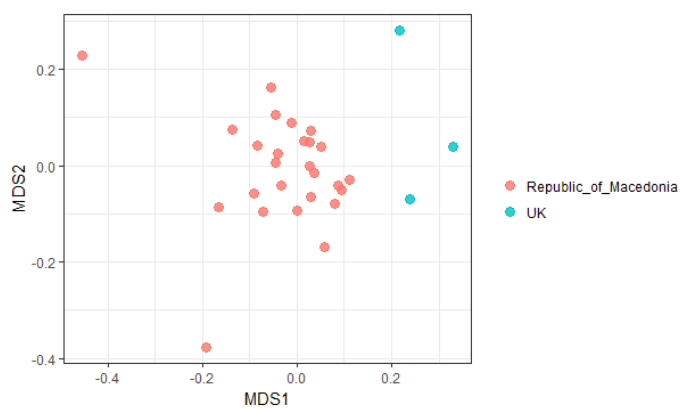
Obr. 26: Znáznornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Slovenska a UK bez hlavních symbiontů.



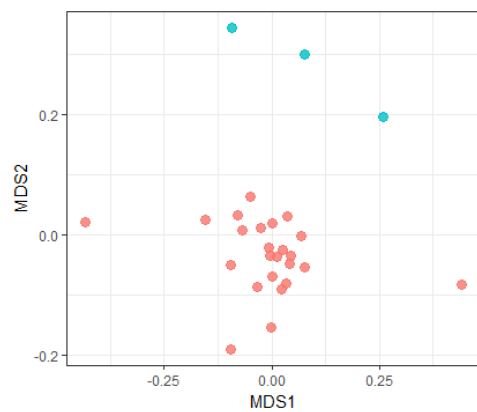
Obr. 27: Znáznornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) UK a Německa v plném datasetu.



Obr. 28: Znáznornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) UK a Německa bez hlavních symbiontů.

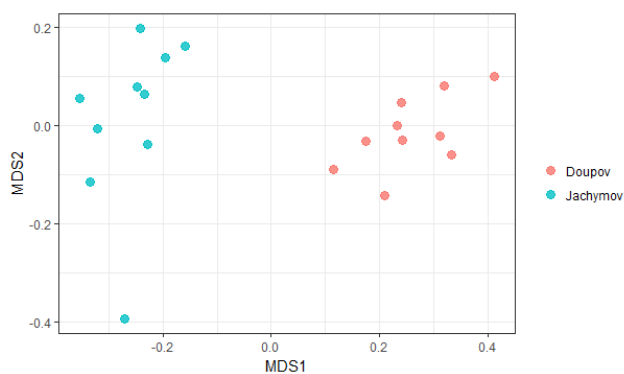


Obr. 29: Znáznornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) UK a Makedonie v plném datasetu.

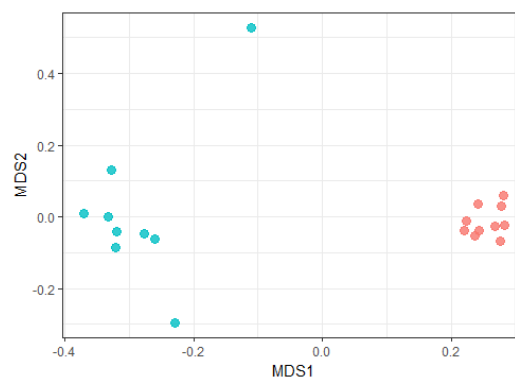


Obr. 30: Znáznornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) UK a Makedonie bez hlavních symbiontů.

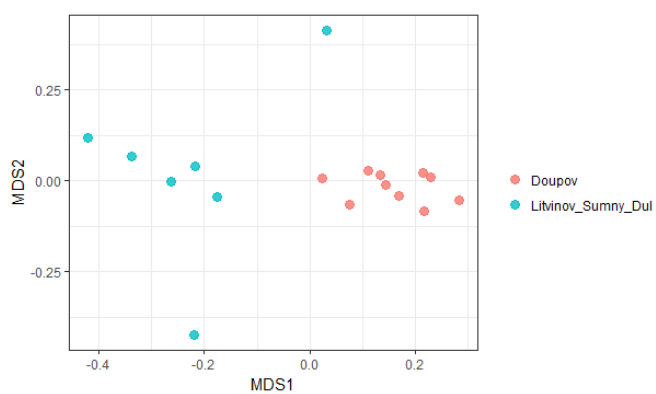
## 8.2 Specifická linie – párové porovnání lokalit v České republice



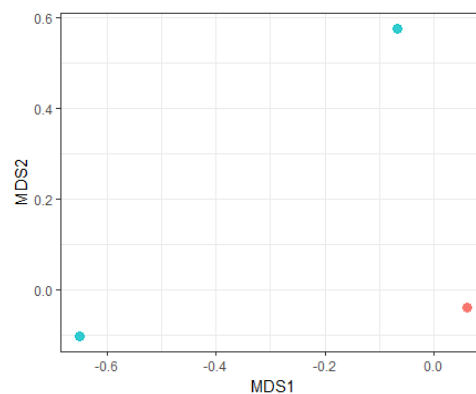
Obr. 31: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Doupova a Jáchymova v plném datasetu.



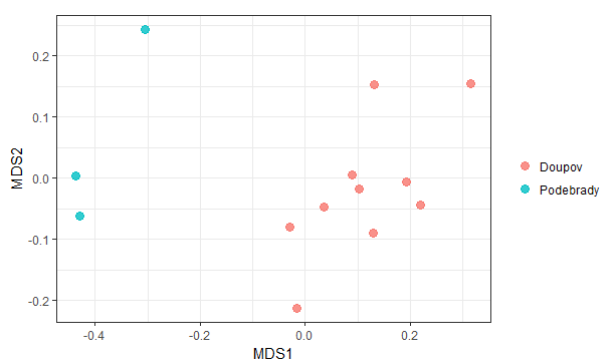
Obr. 32: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Doupova a Jáchymova bez hlavních symbiontů.



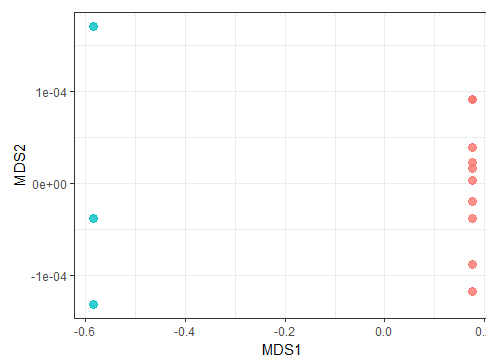
Obr. 33: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Doupova a Litvinova v plném datasetu.



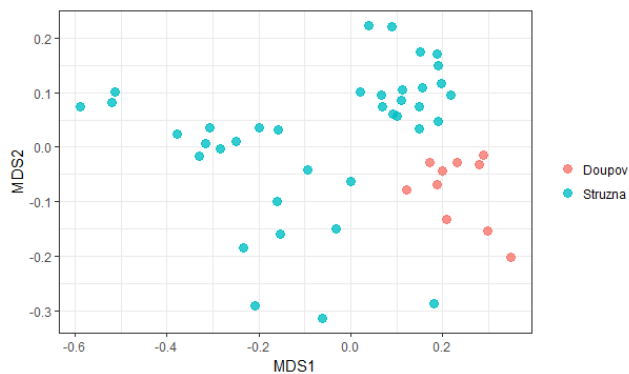
Obr. 34: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Doupova a Litvinova bez hlavních symbiontů.



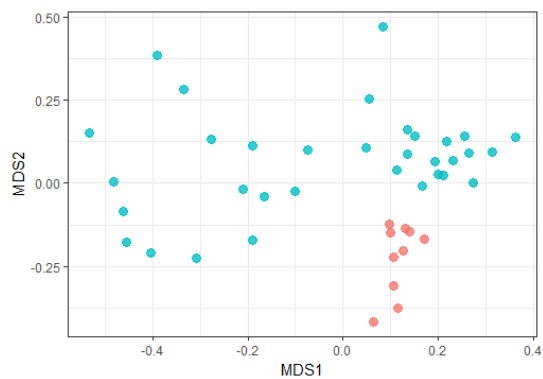
Obr. 35: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Doupova a Poděbrad v plném datasetu.



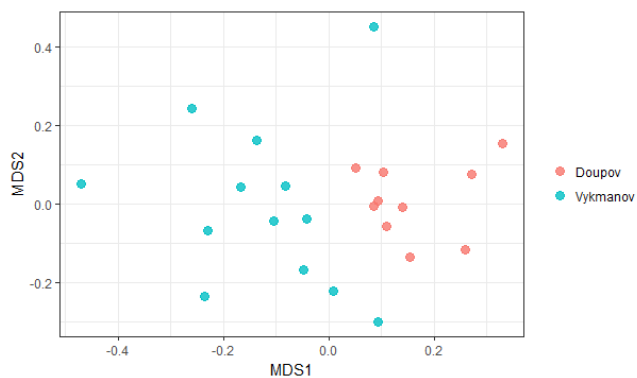
Obr. 36: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Doupova a Poděbrad bez hlavních symbiontů.



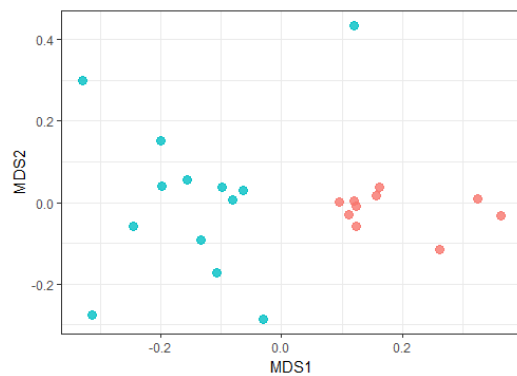
Obr. 37: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Doupova a Stružné v plném datasetu.



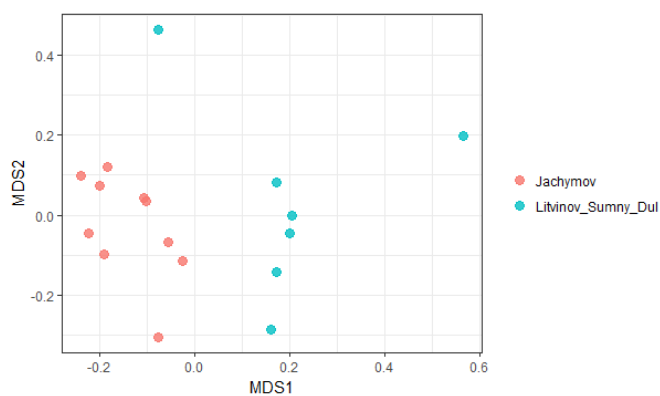
Obr. 38: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Doupova a Stružné bez hlavních symbiontů.



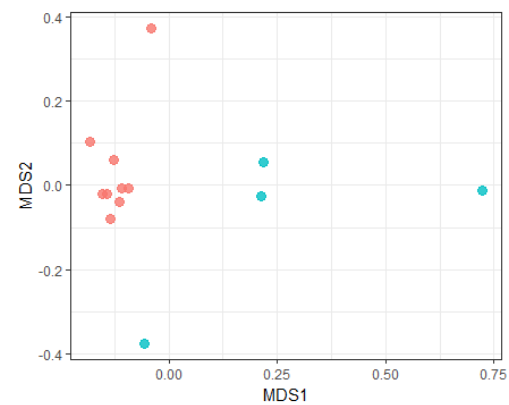
Obr. 39: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Doupova a Vykmánova v plném datasetu.



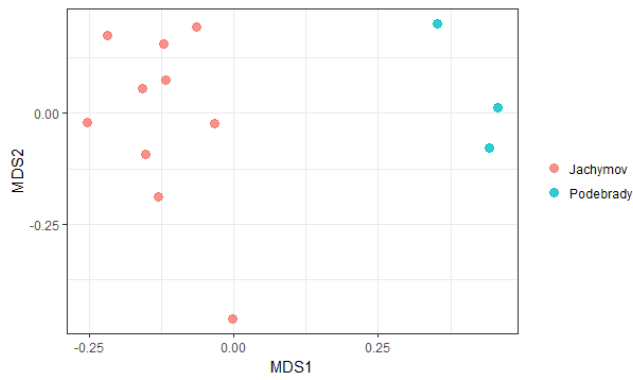
Obr. 40: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Doupova a Vykmánova bez hlavních symbiontů.



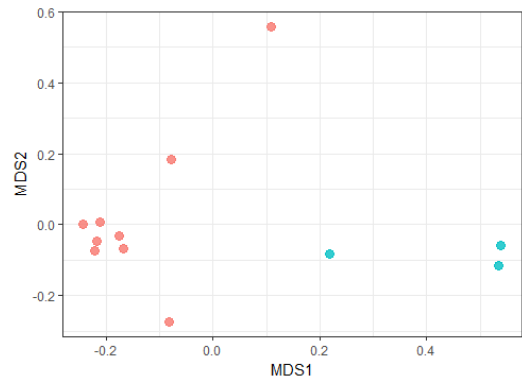
Obr. 41: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Litvínova a Jáchymova v plném datasetu.



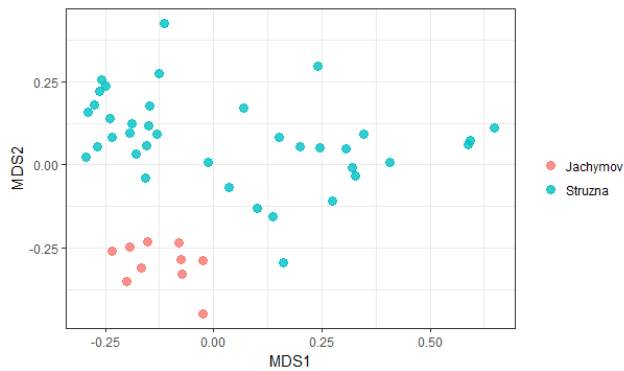
Obr. 42: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Litvínova a Jáchymova bez hlavních symbiontů.



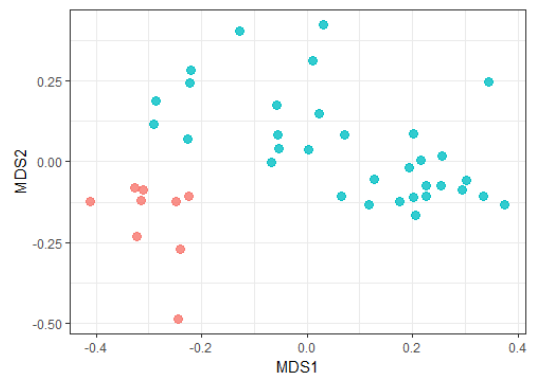
Obr. 43: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Poděbrad a Jáchymova v plném datasetu.



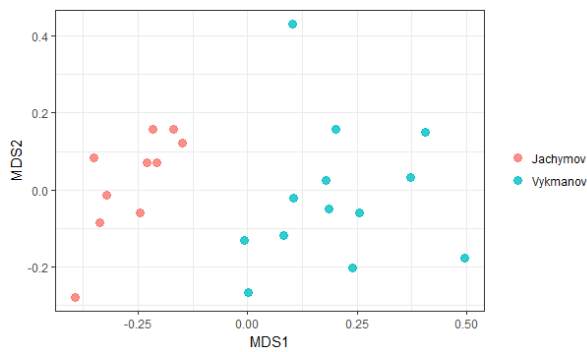
Obr. 44: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Poděbrad a Jáchymova bez hlavních symbiontů.



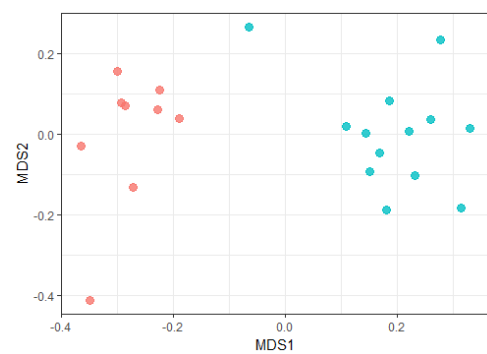
Obr. 45: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Stružné a Jáchymova v plném datasetu.



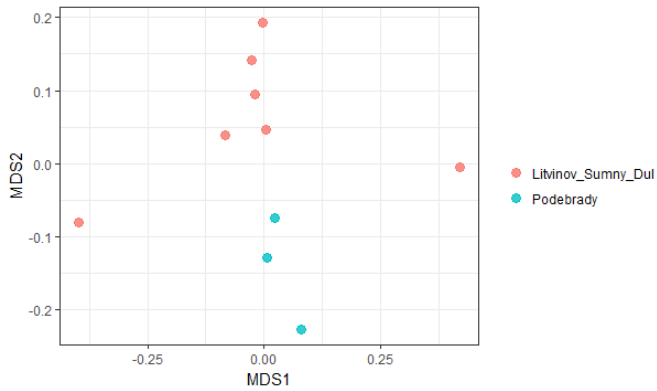
Obr. 46: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Stružné a Jáchymova bez hlavních symbiontů.



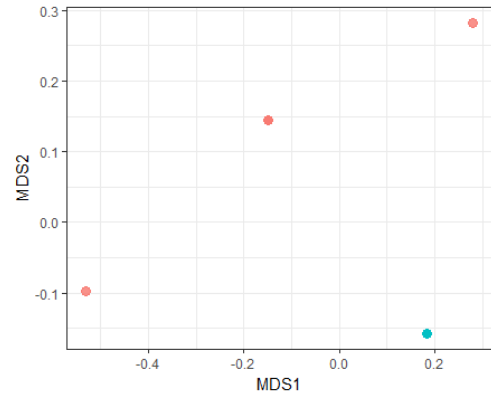
Obr. 47: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Vykmánova a Jáchymova v plném datasetu.



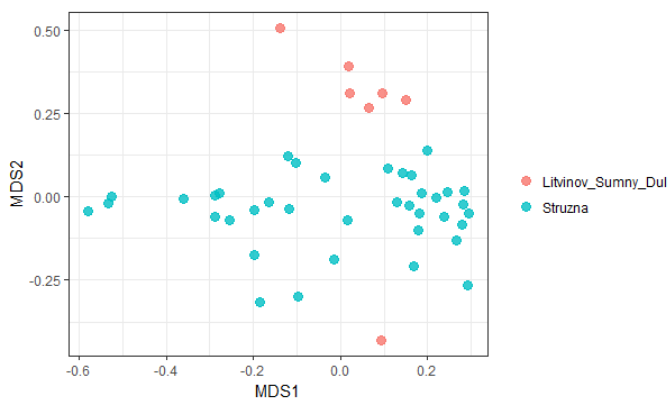
Obr. 48: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Vykmánova a Jáchymova bez hlavních symbiontů.



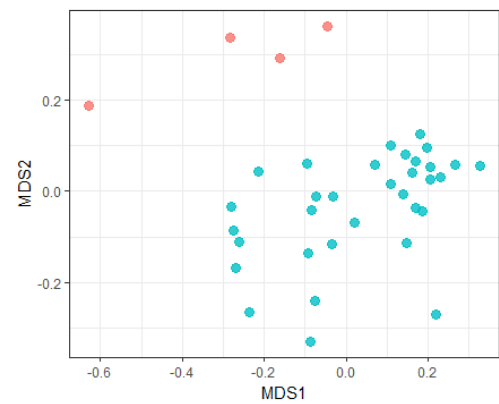
Obr. 49: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Litvínova a Poděbrad v plném datasetu.



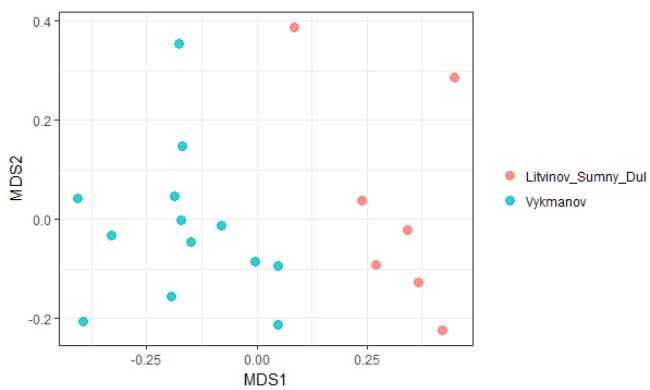
Obr. 50: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Litvínova a Poděbrad bez hlavních symbiontů.



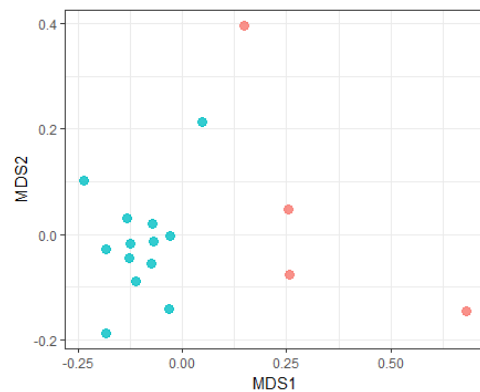
Obr. 51: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Litvínova a Stružné v plném datasetu.



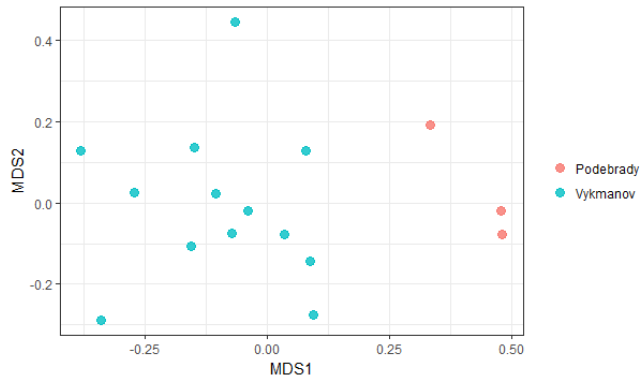
Obr. 52: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Litvínova a Stružné bez hlavních symbiontů.



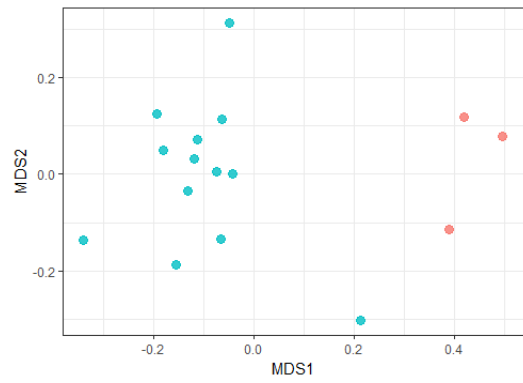
Obr. 53: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Litvínova a Vykmánova v plném datasetu.



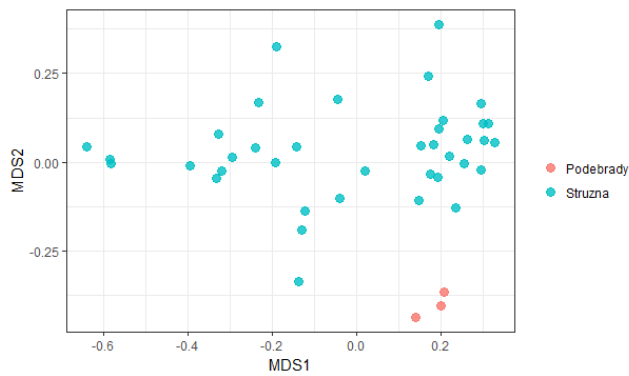
Obr. 54: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Litvínova a Vykmánova bez hlavních symbiontů.



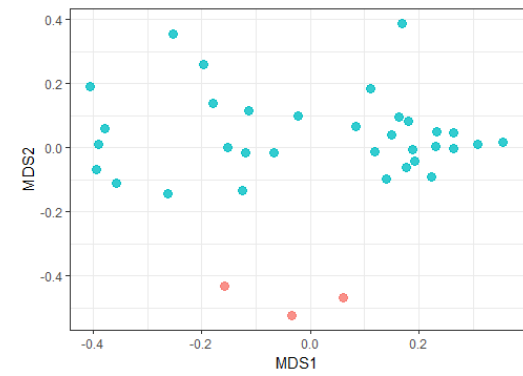
Obr. 55: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Poděbrady a Vykmánova v plném datasetu.



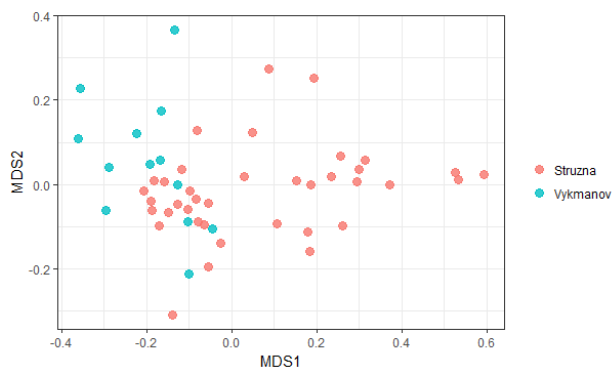
Obr. 56: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Poděbrady a Vykmánova bez hlavních symbiontů.



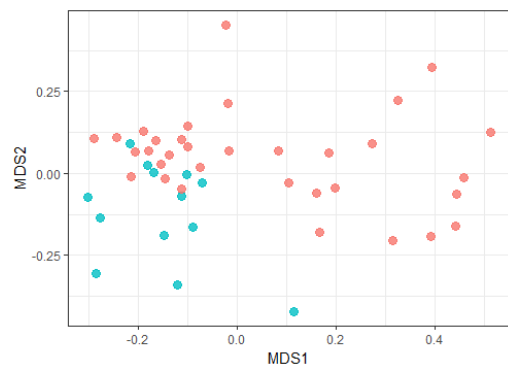
Obr. 57: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Poděbrady a Stružné v plném datasetu.



Obr. 58: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Poděbrady a Stružné bez hlavních symbiontů.



Obr. 59: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Stružné a Vykmánova v plném datasetu.



Obr. 60: Znázornění mikrobiomů vší rodu *Polyplax* z *A. flavicollis* (specifické linie) Stružné a Vykmánova bez hlavních symbiontů.