

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Vliv ekologických a environmentálních faktorů na mikrobiomy vybraných  
krevsajících členovců**

Diplomová práce

Bc. Simona Křepelková

Školitelka: doc. RNDr. Eva Nováková, PhD

České Budějovice 2021

Křepelková, S.,2021: Vliv ekologických a environmentálních faktorů na mikrobiomy vybraných krevsajících členovců. [Effect of ecological and environmental factors on microbiomes of hematophagous arthropods. Mgr. Thesis, in Czech]- 61 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: Effects of ecological and environmental factors on the composition of the microbiome were studied on selected hematophagous arthropods in comparison with phytophagous species. Firstly, I focused on microbiome profiles of *Triatoma* species from the same locations. Secondly, I focused on possible convergence of microbiome composition among selected hematophagous arthropods from the same habitat.

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

V Českých Budějovicích, 29.4. 2021

Bc. Simona Křepelková

## Poděkování

Za veškerou pomoc a cenné rady při psaní diplomové práce bych ráda poděkovala hlavně své školitelce Evě Novákové. Dále patří velké díky Sonie Rodriguez a dalším studentům laboratoře.

## Obsah:

1. <b>Úvod</b> .....	1
1.1 Mikrobiom.....	1
1.1.1 Mikrobiomy bezobratlých.....	2
1.1.2 Hematofágové: vztah mikrobiom, patogen a hostitel.....	4
1.2 Konvergence mikrobiomů krevsajících živočichů.....	5
1.3 Prostředí jako zdroj symbiotických bakterií.....	6
1.4 Modelové organismy a jejich mikrobiomy.....	6
1.4.1 Heteroptera (Hemiptera).....	7
1.4.1.1 Pyrrhocoroidea.....	7
1.4.1.2 Triatominae (Reduviidae).....	9
1.4.1.2.1 Mikrobiom triatom a přenášení parazitů.....	11
1.4.2 Ixodida.....	12
1.4.2.1 Mikrobiom Ixodida.....	13
2. <b>Cíle práce</b> .....	15
3. <b>Materiál a metody</b> .....	16
3.1 Vzorčky a příprava DNA templátu.....	16
3.2 PCR (Polymerázová řetězová reakce), elektroforéza, Sanger sekvenace.....	17
3.3 High throughput ampliconové sekvenování.....	20
3.3.1 Ampliconové knihovny.....	20
3.4 Zpracování dat.....	21
4. <b>Výsledky</b> .....	22
4.1 Templátová DNA a PCR.....	22
4.2 Sanger sekvenování.....	22
4.3 Ampliconové knihovny.....	22
4.4 Druhovú specifita mikrobiomů Triatom jejichž populace jsou ovlivňovány shodnými environmentálními faktory.....	23
4.5 Konvergence mezi mikrobiomy analyzovaných členovců.....	28
5. <b>Diskuze</b> .....	31
5.1 Mikrobiomové profily Triatom, jejichž populace jsou ovlivňovány shodnými environmentálními faktory.....	31
5.2 Konvergence mezi mikrobiomy členovců.....	32
6. <b>Závěr</b> .....	35
7. <b>Seznam použité literatury</b> .....	36
8. <b>Přílohy</b> .....	53

## Předmluva

Nemoci přenášené krevsajícími členovci způsobují na celém světě vysokou morbiditu. Pokroky související s genomikou hmyzích vektorů tak mohou pomoci v rozvoji strategií pro následnou kontrolu populací krevsajících členovců a onemocnění jimi přenášenými. Z tohoto důvodu je důležité věnovat se studiu biologie vektorů v celé jeho komplexitě, tj. včetně bakteriální složky tvořící mikrobiomy. Znalosti mikrobiálního profilu můžeme následně využít pro vytvoření účinných strategií pro boj s patogeny.

Tato práce se zabývá dvěma skupinami krevsajících členovců, triatomami a klíšťaty, kteří figurují jako zásadní vektorů celosvětově rozšířených chorob. Triatomy jsou známí vektorů Chagasovy choroby, která je na Americkém kontinentu značně rozšířená. Nicméně doposud rozsáhlejší studie mikrobiomů Amerických triatom neprobíhají. Klíšťata jsou v mé práci zastoupena druhem *Ornithodoros turicata* ze skupiny měkkých klíšťat, která lze nalézt na stejných stanovištích jako triatomy. *O. turicata* je vektorem *Borrelia turicatae*, která způsobuje relapsující horečky. Tento druh bakterie je často spojován s chorobami prasat. Při sání infikovaného klíštěte na lidech pak může dojít k vážným toxickým reakcím a sekundárním infekcím.

Cílem této práce je determinovat mikrobiomové profily několika druhů rodu *Triatoma* pocházejících ze stejného stanoviště a posoudit vlivy enviromentálních faktorů na jejich složení. Následně posoudit možnou konvergenci mezi mikrobiomy triatom, klíšťat a triatomám příbuzných nehematofágních ploštic ze stejného stanoviště. V neposlední řadě pak posoudit vliv bakteriální složky prostředí na mikrobiomy hostitelů. Kapitoly úvodu se věnují obecnému seznámení s mikrobiomem bezobratlých, tématu mikrobiomu u krevsajících členovců (klíšťat, triatom a jim příbuzných ploštic) a mikrobiomu šťávysajících živočichů.

# 1. Úvod

## 1.1 Mikrobiom

Pojem mikrobiom představuje společenství všech mikroskopických organismů, které osidluje orgán či tkáň obratlovců, případně bezobratlých. Tento termín můžeme také použít, pokud se jedná o mikroorganismy žijící v jednom prostředí. Jedná se o ekologickou komunitu, která je tvořena komensálními, symbiotickými a patogenními organismy. Mikrobiom najdeme zejména ve střevech, kde je tvořen bakteriemi, archei, viry a někdy i jednobuněčnými eukaryoty (Kaufmann et al., 2000; Feldhaar, 2011).

Studie zabývající se komplexním poznáním mikrobiomu jsou záležitostí posledních dvou desetiletí a jedná se o velmi rychle rostoucí a moderní téma. Pro vědeckou komunitu představují výzkumy lidských mikrobiomů příslib nových možností kontroly lidského zdraví. Je pravdou, že hlavně studie a znalosti čerpané z lidského mikrobiomu dále určují směry a tempo výzkumu mikrobiomů dalších obratlovců a bezobratlých. Mezi hlavní projekty určující směr a vývoj výzkumů mikrobiomů patří například Human Microbiome Project (<https://hmpdacc.org/hmp/>, Turnbaugh et al., 2007) a Earth Microbiome Project (Gilbert et al., 2014). Human Microbiome Project si klade za cíl sestavit hlavní komponenty lidského mikrobiomu a objasnit jejich vliv na fyziologii a predispozici k různým chorobám. Earth Microbiome Project je masivní spoluprací mezi vědci z celého světa se zaměřením na charakterizaci mikrobiálního života na naší planetě. Oba projekty zároveň napomohly vývoji vhodných bioinformatických nástrojů umožňujících zpracování a následné analýzy ampliconových i metagenomických dat, které je možné využít jak pro podrobnější studie mikrobiomu obratlovců a bezobratlých, tak pro mikrobiom jednotlivých prostředí (Turnbaugh et al., 2007, Gilbert et al 2010- meeting report vision of an emp).

### 1.1.1 Mikrobiomy bezobratlých

Hmyz je nejrozmanitější skupinou živočichů (Basset et al., 2012), jejíž evoluční úspěšnost je často přičítána symbiotickým vztahům s mikroorganismy. Bakteriální symbionti ovlivňují řadu základních vlastností a fyziologických funkcí hmyzu. Zaslужují se například o správný vývoj hmyzu a jeho odolnost vůči tepelnému stresu či patogenům (Oliver et al., 2014; McLean et al., 2016; Brown et al., 2020).

Studium mikrobiomu bezobratlých je významné z hlediska spojení znalostí s medicínou a epidemiologií. V oblasti medicíny se některé druhy hmyzu využívají pro experimentální práce na mikrobiálních komunitách, kde se sleduje jejich interakce s hostitelem (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Z hlediska hmyzích vektorů přenášejících řadu patogenů, se sleduje vliv mikroorganismů osidlujících střevo na přenášené patogeny, které se v tomto prostředí vyvíjejí. Tyto výzkumy mají za hlavní cíl vytvořit strategie kontroly přenašečů a tím zastavit šíření hmyzem přenášených onemocnění (McMeniman et al., 2009; Engel & Moran, 2013). V posledních letech se objevují studie zaměřené na interakce střevních mikroorganismů s imunitním systémem (Engel & Moran, 2013).

Mikroorganismy najdeme hlavně ve střevě hmyzu, které vytváří vhodné podmínky pro mikrobiální kolonii. Většina druhů hmyzu má ve svém mikrobiomu bakterie druhově podobné organismům ze střevního mikrobiomu obratlovců. Některé druhy hmyzu hostí i mikroorganismy, které jsou druhově specifické (Engel & Moran, 2013). K těm patří i více specializovaní symbionti, které lze na základě jejich evolučně ekologických charakteristik zařadit do dvou kategorií. Jedná se o tzv. obligátní (P-primární symbionty) a fakultativní symbionty (S-sekundární symbionti). Obligátní symbionti jsou na hostiteli striktně závislí a sdílí s ním stejnou evoluční trajektorii. Nalezneme je ve specializovaných buňkách (případně orgánech) zvaných bakteriocyty, respektive bakteriomy (Moran & Telang, 1998; Pontes & Dale, 2006;). Právě obligátní symbionti tvoří esenciální látky nezbytné pro život a prospívání hmyzích hostitelů závislých na nutričně nevyvážené potravě (Pontes & Dale, 2006; Weiss et al., 2011). Typicky se jedná o fytofágní a striktně hematofágní skupiny hmyzu. Učebnicovým příkladem je obligátní symbióza mšic s bakterií *Buchnera aphidicola* (např. Baumann, 2005). *B. aphidicola* je typickým P-symbiontem poskytující mšicím především esenciální aminokyseliny, které rostlinné šťávy neobsahují (Wilson et al., 2010). Fakultativní endosymbionti nepodmiňují přímo existenci svého hostitele, ale mohou ovlivňovat jeho fitness. Mezi fakultativní endosymbionty patří jak mutualisté, tak reprodukční manipulátoři.

Vyskytují se zejména v okolí bakteriocytů, v reprodukčních orgánech a v mléčných či slinných žlázách. Mezi zástupce této skupiny řadíme například rody *Wolbachia*, *Spiroplasma* a *Hamiltonella* (Fukatsu et al., 2001; Moran et al., 2008; Werren et al., 2008, Degnan et al., 2009). Fakultativní symbionti mají mechanismy, skrze které ovlivňují biologii svého hostitele a tím docílí nárůstu infikovaných hostitelů v celé populaci (Oliver et al., 2003; Werren et al., 2008). Tyto mechanismy mohou být pro hmyz také prospěšné a přímo zvyšovat fitness hostitele. Například *H. defensa*, jak by mohl její název napovědět, je schopná prostřednictvím manipulací ochránit svého hostitele proti parazitujícím vosím larvám (Oliver et al., 2019). Podobně tak některé linie bakterií rodu *Spiroplasma*, které chrání svého hostitele proti parazitujícím hlísticím (Jaenike et al., 2010). V tomto případě se tedy jedná o mutualistický vztah hostitele s bakteriemi (Bronstein, 2015). Reprodukční manipulátoři naopak prosazují vlastní propagační mechanismy, které mění poměr pohlaví infikovaných hostitelů (způsobují nadprodukcí samiček), jelikož je bakterie přenášena jen po mateřské linii. Během embryogeneze dochází i k usmrcení samčích jedinců. Často tuto strategii využívají například bakterie rodu *Wolbachia* (Hurst et al., 1999; Moran et al., 2008).

Kromě bakterií vytvářejících s hmyzem širokou škálu symbiotických vztahů se ve střevě hmyzu vyskytují jednobuněčné eukaryotní organismy (protisté a houby), archaea a viry. Protisté byli nejlépe popsáni u termitů a švábů (Hongoh, 2011). Houby se vyskytují často u hmyzu, jehož potravou je zejména dřevo a hrají roli při jeho trávení. Archea nalézáme například u vos a termitů (Paul et al., 2012; Brune, 2018;).

Mikrobiomy jednotlivých druhů bezobratlých se výrazně liší zejména ve velikosti, diverzitě, lokalizaci a funkci ve střevě. Většina štávy sajících druhů má ve svém střevním mikrobiomu velmi malé množství mikroorganismů (Cheung et al., 1993). Existují i případy, kde nejsou detekovány žádné střevní bakterie (např. Hammer et al., 2019). Naopak u hmyzu, živícího se dřevem (termity, švábi, cvrčci), nalézáme v porovnání s velikostí těla největší množství bakterií (Cazemier et al., 1997). Mezi nejvíce zastoupené bakteriální skupiny ve střevním mikrobiomu patří *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Clostridia*, *Actinomycetes*, *Spirochetes*, *Verrucomicrobia*, a *Actinobacteria* (Colman et al., 2012).



### 1.1.2 Hematofágové: vztah mikrobiom, patogen a hostitel

Zástupci členovců, kteří se živí výhradně krví obratlovců, jsou označováni jako obligátní hematofágové. Od ostatních druhů bezobratlých se nápadně liší především uspořádáním ústního ústrojí, které je morfologicky uzpůsobené k sání. Mezi obligátní hematofágy řadíme hmyz ze skupin Neoptera (vši), Hemiptera (triatomy a štěnice), Diptera (mouchy tse-tse, kloše a muchule) a skupinu Ixodidae (klíšťaťata) (Lukashevich et al., 2003; Anderson & Magnarelli, 2008). Podobně jako u jiných bezobratlých, ovlivňuje rozmanitost a složení mikrobiomu zejména imunitu a trávení hematofágních hostitelů (Minard et al., 2013; Telleria et al., 2018). Výživově je krev bohatá na bílkoviny a soli, je však chudá na řadu vitamínů. Při jejím trávení se navíc uvolňuje toxické množství hemu a močoviny (Ribeiro & Arcá, 2009; Song SJ et al., 2019). Primární funkcí řady symbiotických bakterií u hematofágních hostitelů je tak syntéza esenciálních vitamínů a odbourávání toxických produktů metabolismu (Akman et al., 2002; Allen et al., 2007; Pais et al., 2008; Smith et al., 2015).

U hematofágních členovců, kteří jsou přenašeči (vektory) řady virových, bakteriálních i jednobuněčných eukaryotních patogenů a parazitů, mohou navíc symbiotické bakterie ovlivňovat vektorovou kapacitu svých hostitelů. Jelikož mikrobiom hematofágních vektorů využívá stejnou niku jako přenášené patogeny či parazité, tedy lumen a stěnu střeva, (Azambuja et al., 2005; Mosbacher et al., 2011; Castro et al., 2012;), může mikrobiom přímo bránit přenosu parazitů v rámci soutěže o zdroje, případně zabraňovat replikaci a přenosu parazitů nepřímo v rámci posílení nebo iniciace imunitní odpovědi (Geiger et al., 2013; Dennison et al., 2014). Zejména vertikálně přenášení symbionti hrají důležitou roli v replikaci a přenosu patogenů (Dennison et al., 2014). Konkrétní interakce střevních mikrobiomů s přenášenými patogeny byly popsány zejména u komárů a klíšťaťat. Symbionti z rodu *Wolbachia* ovlivňují u různých druhů komárů kompetenci pro přenos specifických parazitů a virů (Martinez et al., 2014). Určité linie rodu *Wolbachia* mohou u některých druhů snižovat proliferaci a přenos viru (Lu et al., 2012). U jiných druhů komárů má naopak přítomnost tohoto symbionta za následek zvýšenou míru infekce (Dodson et al., 2014). Například studie dvou kolonií komárů *Culex quinquefasciatus* a *Culex tarsalis* infikovaných symbionty rodu *Wolbachia* popisuje zvýšenou odolnost vůči arbovirové infekci, jejímž následkem se snižuje možný přenos viru Západonilské horečky na obratlovce (Glaser et al., 2010).

## 1.2 Konvergence mikrobiomů krevsajících živočichů

Konverencí rozumíme v evoluční biologii typ evoluce, kdy se nepříbuzné druhy vyvíjejí pod podobnými selekčními tlaky (např. vliv podobného prostředí nebo potravní strategie), na základě kterých pak vykazují podobné biologické charakteristiky (King & Stansfield.,2006). V případě mikrobiomu lze posuzovat kompoziční (ve smyslu taxonomické) a funkční konvergence. Kompoziční konverencí rozumíme sdílení fylogeneticky blízkých/shodných taxonů ve střevních mikrobiomech vzdáleně příbuzných nebo nepříbuzných hostitelů. Funkční konvergence mikrobiomů je podmíněna obdobnou genomickou kapacitou fylogeneticky odlišných mikrobiomů (Song et al., 2019).

Na otázku, zda ve stejném prostředí nebo za stejných ekologických podmínek dochází k formování podobných mikrobiomů u různých druhů hostitelů, se již pokoušelo odpovědět několik studií. Například u zástupců myrmekofágních savců (živících se pouze mravenci, jako je mravenečník, mravencojed a pásovec) je složení bakteriálních komunit podobné, což naznačuje silnou konvergenci střevního mikrobiomu (Delsuc et al., 2014). Tyto evoluční konvergence jsou výsledkem adaptace na přísně specializovaný druh stravování. Z genomového sekvenování různých druhů obratlovců vyplývá, že zejména potrava a fylogenetický původ hostitele má na evoluční vývoj mikrobiomu značný vliv. Při porovnávání mikrobiomů mezi masožravci, všežravci a býložravci, byly sledovány zásadní rozdíly v jejich bakteriálním složení (Ley et al., 2008). Při porovnání mikrobiomů hematofágních pěnkv a netopýrů byla zjištěna minimální taxonomická konvergence a zásadní funkční konvergence. Ač se bakteriální taxony mezi nepříbuznými druhy hematofágních hostitelů lišily, jejich funkce v mikrobiomu byla podobná (Song et al., 2019).

V rámci bezobratlých byla konvergence mikrobiálních komunit podrobněji studována u členovců a pijavic druhu *Haementeria officinalis* (Siddall et al, 2004; Perkins et al., 2005). Ač jde o nepříbuzné skupiny bezobratlých, jejich symbionti prošli podobným evolučním vývojem a vykazují obdobné charakteristiky, tj. fylogenetický původ, lokalizaci, morfologii a genomové charakteristiky. Symbiont druhu *Haementeria officinalis* popsáný jako *Candidatus Providencia siddallii* (Gammaproteobacteria) klastruje s větví *Providencia* sdružující patogeny člověka i členovců. *Candidatus Providencia siddallii* se nachází v bakteriocytech, má silně redukovaný genom bohatý na AT baze, omezené metabolické schopnosti a pleomorfní tvar, tedy vlastnosti charakteristické pro obligátní endosymbionty hmyzu. Z metabolické kapacity genomu tohoto symbionta rovněž vyplývá, že se jedná jak o funkční

konvergenci (syntéza vitaminů B), tak i kompoziční (mezi fylogeneticky vzdálenými jedinci) (Manzano-Marín et al., 2015).

### 1.3 Prostředí jako zdroj symbiotických bakterií

U ektoparazitů obratlovců, jako jsou vši nebo klíšťata, existují důkazy o vývoji symbiotických linií z původních patogenů obsažených v nasáté krvi obratlovců. „*Francisella*-like endosymbiont“, obligátní endosymbiont klíšťat, poskytující svým hostitelům esenciální látky, se pravděpodobně vyvinul ze savčího patogenu druhu *Francisella tularensis*, získaného při sání krve klíštětem (Sun et al., 2000; Scoles, 2004). Podobný evoluční scénář byl pozorován také u vši *Polyplax serrata* a *Polyplax spinulosa*, u kterých se pravděpodobně jejich obligátní endosymbiont *Candidatus Legionella polyplacis* (Legionellaceae) vyvinul právě z patogenu obratlovců (Říhová et al., 2017). Uvažovalo se i o opačném evolučním propojení prostředí a mikrobiomu hematofágních členovců tj. vývoj virulentního patogenu obratlovců *Coxiella burnetii*, který vznikl evoluční transformací mateřsky zděděného endosymbionta klíšťat (Duron et al., 2015, Gerhart et al., 2016). Nicméně recentní studie dokládá, že *Coxiella* u měkkých klíšťat je více podobná *C. burnetii* (lidský patogen), než *Coxiella* u tvrdých klíšťat. Navíc existuje několik subtypů, které jsou buď endosymbionti nebo patogeny, z čehož vyplývá, že se vyvinulo několik linií nezávisle na patogenní *Coxiella*. U endosymbiontů klíšťat tedy nedošlo k zisku faktorů virulence, jak se dříve předpokládalo (Brenner et al., 2020).

### 1.4 Modelové organismy a jejich mikrobiomy

Jako modelové organismy byli vybráni zástupci pocházející ze stejného stanoviště (hnízda hlodavců *Neotoma albigula*), u kterých předpokládáme působení totožných enviromentálních vlivů. Jedná se o druhy blízké fylogeneticky, tedy *Triatoma* spp. a *Largus californicus*, nebo ekologicky (potravní specializací-hematofágie) *Triatoma* sp. a *Ornithodoros turicata*. Následné kapitoly se zabývají přehledem dostupných charakteristik mikrobiomů těchto organismů.

### 1.4.1 Heteroptera (Hemiptera)

Heteroptera je skupinou hmyzu s bodavě sacím ústním ústrojím, přizpůsobeným k sání rostlinných a živočišných šťáv (Kuechler et al., 2012). Některé druhy ze skupiny heteropter řadíme k významným zemědělským škůdcům (mšice) i medicínsky významným parazitům (triatomy, štěnice). V neposlední řadě jsou zástupci heteropter i nositeli virů (například přenos alphavirus – like RNA virus plošticí *Pyrrhocoris apterus*) (Vinokurov & Koloniuk, 2019).

Podřád Heteroptera tvoří osm infrařádů Dipsocoromorpha, Enicocephalomorpha, Gerromorpha, Leptopodomorpha, Nepomorpha, Pentatomomorpha, Cimicomorpha. Celý tento podřád obsahuje přes 38 000 druhů (Henry, 2017). Následující kapitoly se zaměří na mikrobiomy triatom a jim blízkým fytofágním plošticím rodu *Largus*.

#### 1.4.1.1 Pyrrhocoroidea

Šťávysající heteroptery mají ústní ústrojí uzpůsobené k sání rostlinné mízy. Mezi hlavní zástupce patří například mšice, cikády, molice apod. Dle nároků na potravu rozlišujeme monofágy (sají na jednom rostlinném druhu), oligofágy (sají na několika rostlinných druzích) a polyfágy. Kvůli specifické potravě mají heteroptery uzpůsobenou část střeva, která umožní oddělení živin od přebytečné vody (Schafer & Ahmad, 2000; Wang et al., 2020). Nadčeleď Pyrrhocoroidea tvoří rody Largidae a Pyrrhocoridae s více než 520 druhy hmyzu. Pro druhy této nadčeledi je typická část střeva zvaná „caeca“ neboli krypty, ve kterých se vyskytují bakterie. Krypty jsou morfologicky charakteristické pro jednotlivé druhy. Asociace s bakteriemi jsou ve většině případů dědičné. Bakterie se podílí na inhibici vývoje cizích bakterií, které se běžně vyskytují u příbuzných druhů hmyzu (Glasgow, 1914).

#### Čeleď Pyrrhocoridae

Pyrrhocoridae je šťávysající rod zahrnující přes 300 druhů, jehož zástupci jsou celosvětově rozšířeni. Nejčastěji se setkáme s druhem *Pyrrhocoris apterus*. *Pyrrhocoridae* patří do skupiny hmyzu s proměnou nedokonalou. Vývoj zahrnuje pět nymfálních instaru (Socha, 1993). Živiny získávají hlavně ze semen stromů. Výjimečně se mohou krmit i na mrtvém hmyzu. Často je řada zástupců z této čeledi využívána jako modelový organismus pro řadu

výzkumů. Hlavním důvodem může být nenáročnost hmyzu pro chování v laboratorních podmínkách (Henrici, 1938; Southwood & Leston, 1959).

Specifické bakterie *Coriobacterium glomerans* (obligátní) a *Gordonibacter* sp. (obligátní) se nachází ve střevě, nikoli v kryptách. Tyto bakterie mají zásadní vliv na vývoj a reprodukci svého hostitele a jsou přenášeny kontaminační cestou, tedy ve výměšcích ulpívajících na povrchu vajíček (Haas & König 1987; Kaltenpoth et al., 2009; Sudakaran et al., 2012). Mezi druhy, formující mikrobiom *P. apterus*, patří například *Brevundimonas* sp. (Alphaproteobacteria), *Rhizobium* sp. (Alphaproteobacteria), *Caulobacter* sp. (Alphaproteobacteria), *Ensifer* sp. (Alphaproteobacteria). Dále pak *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria) a *Hafnia* sp. (Gammaproteobacteria). U tohoto druhu byla nalezena i unikátní skupina bakterií *Coriobacterium glomerans* (Actinobacteria), *Rickettsiales* sp. (Alphaproteobacteria) a *Clostridium* sp. (Clostridia). Bakterie z rodu *Bifigobacterium* byla první bakterie izolovaná ze všech vývojových stádií s výjimkou vajíček. Hlavním úkolem bakterií tohoto hmyzu je rozklad potravy, kterou se ploštice živí (Sudakaran et al., 2012).

Při porovnání mikrobiomů mezi vývojovými stádii jsou nejčastěji zastoupené *Clostridium* sp., *C. glomerans*, *Gordonibacter* sp., *Klebsiella* sp., vyskytující se i u vajíček. Jedná se o vertikální přenos z matky na potomky. Než se jedinec vyvine v dospělce, je bakteriální abundace velmi nízká a mezi instary prakticky neměnná. Studie zabývající se vlivem potravy na složení mikrobiomu u tohoto hmyzu naznačují, že některé detekované bakterie z Alpha- a Gammaproteobacteria mohou být získávané právě z potravy (Sudakaran et al., 2012).

## Čeď **Largidae**

Zástupci tohoto rodu jsou takéž šťávysající hmyzem. Mezi hlavní zdroj potravy patří semena rostlin a rostlinné šťávy. Střední střevo je rozděleno na pět částí. Krypty jsou v páté části středního střeva. Mikrobiom této skupiny nebyl doposud ve větší míře zkoumán, nicméně existují studie, které potvrzují přítomnost gram pozitivních bakterií (*Lactobacillus* sp.) lokalizovaných v kryptách (Chattopadhyay & Choudhuri, 1981). V posledních letech byl u této čeledi zaznamenán symbiotický vztah s bakterií *Burkholderia* (Betaproteobacteria). *Burkholderia* je bakterie, která kolonizuje kukuřici, kořeny rostlin (Takeshita et al., 2015). Z podrobnějších výzkumů této symbiózy vyplývá, že se jedná o bakterii, kterou hmyz získává v průběhu vývoje ze svého okolí a to každou generaci. Tato strategie je u hmyzu poměrně

vzácná (Kikuchi et al., 2011, Gordon et al., 2016). Získání symbionti z prostředí se vyskytují například v mořských habitatech (Gordon et al., 2016). *Burkholderia* byla také zachycena u druhů z čeledi Alydidae (Pentatomorpha: Coreoidea), kde se podílí na zlepšování hostitelské imunity a zvyšování odolnosti hmyzu proti insekticidům (Gordon et al., 2016). U druhu *L. californicus* byla v kryptách rovněž popsána přítomnost symbionta druhu *Pseudomonas nactus*, který nebyl doposud podrobněji studován (Booth et al., 1990).

#### 1.4.1.2 Triatominae (Reduviidae)

Podčeleď Triatominae se dělí na 6 kmenů: Alberproseniini, Boldoberini, Cavernicoliny, Linschvosteusini, Rhodniini, Triatomini (Schofield & Galvão, 2009). Největší epidemiologický význam mají rody *Triatoma* a *Rhodnius* (Vallejo, 2009). Většina druhů triatom se vyskytuje na Americkém kontinentu. V Severní Americe, ze které pochází mnou analyzované vzorky triatom, jsou v největší míře zastoupeny druhy *Triatoma gerstaeckeri*, *T. indictiva*, *T. lecticularia*, *T. sanguisuga*, a *T. rubida* (Bern et al., 2011; Curtis-Robles et al., 2017). Existují však i druhy, které jsou rozšířené mimo zmíněné oblasti jako *T. rubrofasciata* (Asie), rod *Linshcosteus* (Indie) (Jurberg & Galvao, 2006; Schofield & Galvao, 2009).

Většina triatom je sylvalických. Hlavními hostiteli těchto druhů jsou zejména volně žijící savci a ptáci. Nicméně existují i druhy triatom, které jsou synantropní. Synantropním druhem rozumíme triatomy, které se přesunuly do blízkosti lidských obydlí, kde sají na domácích zvířatech i na lidech. Z tohoto důvodu se stávají důležitými přenašeči Chagasovy choroby. Mezi nejrozšířenější synantropní druhy patří *Triatoma infestans* a *Rhodnius prolixus*. Výskyt těchto druhů je monitorován. V posledních letech se začaly v okolí lidských obydlí objevovat i druhy, které byly považované za výhradně sylvalické. V USA jsou u lidských obydlí nacházeny druhy *T. rubida*, *T. sanguisuga* a *T. recurva*. Z tohoto důvodu je na místě podrobnější studie triatom a kontrola jejich šíření (Schofield et al., 2000).

Životní cyklus triatom zahrnuje pět nymfálních stádií. Délka vývojového cyklu se druhově liší a závisí jak na dostupnosti potravy, tak na podmínkách prostředí (Zarate & Zarate, 1985; Dujardin & Schofield, 2004). U většiny trvá 3-4 měsíce, u některých až dva roky (Jurberg & Galvao, 2006). Stejně jako dospělci se i larvy živí krví obratlovců (Jurberg & Galvao, 2006). Z tohoto důvodu nalezneme u triatom řadu modifikací zažívacího a ústního ústrojí se specifickým složením slin (Schofield et al., 2000; Valejjo et al., 2009).

Sliny triatom totiž snižují srážlivost krve, což umožňuje delší dobu sání (Kollien & Schaub, 2000; Jurberg & Galvao, 2006). Alespoň jedno sání krve je vždy nutné k přechodu do dalšího vývojového stádia. Některé druhy triatom vyžadují dokonce i více krmení mezi jednotlivými vývojovými stádii (Villacís et al., 2008).

Dosavadní studie nám dávají pouze omezené množství informací týkající se mikrobiomů triatom z Jižní a Severní Ameriky. Dostupná data jsou založená na volně žijících a v koloniích chovaných triatomách. Z těchto studií vyplývá, že u jihoamerických druhů mikrobiomy vykazují nízkou taxonomickou diverzitu, často s jedním dominujícím rodem. V porovnání s mikrobiomy ostatních druhů hmyzu, jsou mikrobiomy triatom méně komplexní (da Mota et al., 2012; Gumiel et al., 2015; Díaz et al., 2016). Dalším charakteristickým znakem mikrobiomu triatom je i hostitelská specifita, kdy se určité bakterie vyskytují pouze u specifických druhů triatom (da Mota et al., 2012; Gumiel et al., 2015; Díaz et al., 2016; Rodríguez-Ruano et al., 2018). Složení mikrobiomu se liší i mezi úzce příbuznými hostiteli. V některých případech mohou rozdíly v mikrobiomu odrážet i fylogenetické vztahy hostitelů (fylosymbióza) (Lim & Bordenstein, 2020). Nicméně je známo, že prostředí je přirozeným zdrojem bakterií, a tak může mít lokalita i habitat na složení mikrobiomu značný vliv (Ingala et al., 2019). Triatomy odchované v koloniích vykazují ještě nižší komplexnost mikrobiomu se stále patrnými dominujícími druhy (da Mota et al., 2012).

Složení mikrobiomu se během ontogeneze drasticky mění. U prvních instarů je patrná vysoká diverzita, která se se postupně ztrácí až zůstává jen jeden dominující druh. Tento posun byl už dříve prokázán u laboratorních kolonií *R. prolixus* (Rodríguez-Ruano et al., 2018) a následně potvrzen v přirozených populacích severoamerických druhů *T. rubida*. Statisticky je ontogeneze významným faktorem, jak změny složení vysvětlit (Brown et al., 2020).

Jak již bylo zmíněno, hlavní potravou triatom je krev, která je chudá na značné množství látek potřebných pro správný vývoj hmyzu (Kollien & Schaub, 2000; Schofield, 2000). Doposud bylo zjištěno, že triatomy udržují vztahy s bakteriemi, které se nacházejí volně v lumen střeva. Tyto bakterie se mezi jednotlivými jedinci přenášejí koprofágií nebo při vzájemném sání (Schofield, 2000; Beard et al., 2001). Právě tyto bakterie jsou podle předpokladů zodpovědné za doplnění potřebných látek, například vitaminů skupiny B (Baines, 1956). Diverzita a složení mikrobiomu může dále ovlivňovat imunitu, trávení a teplotní toleranci triatom (Oliver & Martinez, 2014; Brown et al., 2020).

Diverzita a početnost jednotlivých bakteriálních taxonů v mikrobiomu triatom může záviset na fázi životního vývoje a době uplynulé od posledního příjmu potravy. Jedním z nejméně studovaných taxonů zastoupených v mikrobiomech některých druhů triatomů je *Rhodococcus rhodnii*, nacházející se volně v lumen střeva. *R. rhodnii* pravděpodobně plní funkci nutričního symbionta a poskytuje svému hostiteli látky chybějící v krvi obratlovců (Baines, 1956; Beard et al., 2001; Lima et al., 2018). Pokud se z nějaké příčiny tato bakterie v mikrobiomu nevyskytuje, má to za následek špatný ontogenetický vývoj hostitele. U takovýchto jedinců je pak zvýšená mortalita mezi jednotlivými stádii vývoje (Baines, 1956; Beard et al., 2001). V mikrobiomech severoamerických druhů odhalily recentní studie dominující bakterie rodu *Dietzia* ze skupiny Actinomycetales (Brown et al., 2020). *Dietzia* byla dříve izolována i z přírodních habitatů a je zde tedy předpoklad, že je tento rod velmi rozšířen (Koerner et al., 2009). Mezi další symbiotické bakterie patří například *Candidatus Arsenophonus triatominarum*, který se vyskytuje například v srdci, hemolymfě a slinných žlázách (Hypša & Dale, 1997). Součástí mikrobiomu jsou i bakterie *Mycobacterium*, *Bartonella*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* (Neumann et al., 2016; Laroche et al., 2017; Rodríguez-Ruano et al., 2018). Další mikroorganismy, které byly izolovány ze slinných žláz triatomů jsou například *Gordonia polyisoprenivorans* (*Rhodnius nasutus*), *Enterococcus faecalis* (*Triatoma infestans*), *Proteus mirabilis* (*T. infestans*), *Corynebacterium xerosis* (*T. infestans*). Tyto bakterie byly taktéž pozorovány i ve střevě triatomů (Lima et al., 2018).

#### 1.4.1.2.1 Mikrobiom triatom a přenášení parazitů

Mezi hlavní parazity přenášené plošticemi patří *Trypanosoma cruzi* a *Trypanosoma rangeli*. Zatímco *T. cruzi* jako původce Chagasovy choroby má zásadní epidemiologický význam, *T. rangeli* je medicínsky nevýznamná. Oba parazité prodělávají relativně složitý vývojový cyklus v prostředí, které je tvořeno mikrobiomem spolu se střevním epitelem (Schofield & Salvatella, 2006; Lee et al., 2010). V současné době se zdá, že má *T. cruzi* vliv na své vektory pouze v případě, kdy hladoví. Z tohoto důvodu je označována jako subpatogenní. Na druhou stranu medicínsky nevýznamná *T. rangeli* je pro hostitele rodu *Rhodnius* patogenní, jelikož výrazně snižuje množství symbiotických bakterií (Vallejo, 2009).

Trypanosomy mohou infikovat samce i samičky, ve všech vývojových stádiích od nymfy po dospělce. Míra infekce trypanosomou se pak zvyšuje s jejich stářím (Bern et al., 2011).



Triatoma získá trypanosomu během sání na infikovaném savčím hostiteli (Bern et al., 2011; Garcia et al., 2016). Mezi hlavní rezervoáry infekce patří nejčastěji vačice, skunkové, ale i domestikovaní psi (Montgomery, 2014). Nejčastějšími vektory *T. cruzi* v Severní Americe jsou *T. sanguisuga*, *T. gerstaeckeri*, *T. rubida* (Beard et al., 2003). Ve střevě ploštic je trypanosoma ovlivněna řadou biochemických i fyziologických faktorů. Na vývoj trypanosomy působí látky spojené s trávením ploštic jako je hemolytický faktor, peptidy odvozené od  $\alpha$ -D- globulinu, lektiny (Azambuja et al., 2005; Garcia et al., 2016). V prostředí střeva také dochází ke konfrontaci s mikrobiomem ploštic. Obecně platí, že symbiotické bakterie mohou ovlivnit vývoj přenášených parazitů, některé bakterie jsou schopny patogen i zničit. Například bakterie mikrobiomu ploštic *Serratia marcescens*, produkující látku prodigiosin, je schopna *T. cruzi* zahubit. Společně s látkou prodigiosin dochází k produkci toxických látek s antiparazitárním účinkem tj. cytotoxické metalloproteázy, hemolysinu, hemaglutininu i antibiotik, jejichž působení nebylo zcela prokázáno (Azambuja et al., 2005). Studium mikrobiomu triatom, podobně jako jiných vektorů, je proto velice aktuálním tématem. Pochopení zákonitostí vývoje mikrobiomu triatom by mohlo vést k rozšíření spektra dostupných kontrolních strategií a zásadně tak ovlivnit kontrolu šíření Chagasovy choroby.

Studie z předchozích let zaznamenaly vyšší bakteriální diverzitu u jedinců pozitivních na *T. cruzi* (Montoya-Porras et al., 2018; Rodríguez-Ruano et al., 2018). Nicméně recentní studie na vyšším počtu vzorků, porovnávající mikrobiomy infikovaných ploštic s neinfikovanými, zjistily, že je rozmanitost bakterií pouze slabě strukturována druhem ploštic a jen slabě ovlivněna přítomností *T. cruzi*. K podobným závěrům došla i studie z roku 2019 (Waltmann et al., 2019). Ačkoli je tato problematika aktuální, dosavadní studie poskytují jen omezené informace týkající se interakce mikrobiomu triatom a *T. cruzi*.

#### **1.4.4 Ixodida**

Zástupce z řádu Ixodida řadíme mezi krevsající ektoparazity. Ixodida dělíme na Ixodidae (tvrdá klíš'ata), Argasidae (měkká klíš'ata) a Nuttalliellidae. Tyto skupiny spojuje hned několik společných znaků, nicméně morfologie a ekologie je zcela odlišná. Z hlediska morfologie se liší zejména ústní ústrojí a tělo klíš'ete. Tvrdá klíš'ata mají ústní ústrojí podobné ptačímu zobáku. Na jejich hřbetu mají tvrdý štít, z toho důvodu tvrdá klíš'ata. Měkká klíš'ata žádný štít nemají, ústa mají na spodní straně těla.

Společným znakem oběma rodinám klíšťat jsou jejich hostitelé. Mezi hlavní hostitele patří obratlovci, ptáci a plazi (Díaz-Martín et al., 2015).

Většina zástupců Ixodida je exofilních, setrvávajících v půdě. Po přichycení na hostitele několik dnů sají krev a znovu se vrátí do půdy, kde v případě samic nakladou vajíčka. V případě druhů ze skupiny Argasidae mluvíme o klíšťatech endofilických. V přirozeném prostředí se většinou nacházejí v hnízdech či norách, podobně jako triatomy. Obdobně byl zaznamenán výskyt těchto klíšťat i v prostředí synantropickém, kde jedinci kolonizují zařízení pro domestikovaná zvířata a lidská obydlí. Takovéto prostředí přinese klíšťatům ochranu před nepříznivými klimatickými podmínkami a stálý přísun krve. Většina argasidů se krmí velmi rychle a postačí jim i velmi malé množství potravy. Někteří zástupci jsou schopni přežít bez potravy i několik let (Oleaga et al., 1990; Sonenshine et al., 2002; Mans & Neitz, 2004; Vial, 2009).

Klíšťata, jako přenašeči řady patogenů (virů, bakterií, prvoků) infikující člověka, volně žijící zvířata i domácí mazlíčky (De la Fuente et al., 2008), mají zásadní epidemiologický význam. Stejně tak jejich sání může způsobit hostiteli značné problémy jako ztrátu krve, paralýzu, či alergickou reakci (Jongejan & Uilenberg, 2004). Měkká klíšťata obecně přenášejí virové a bakteriální nákazy, které ve většině případů vyvolají hořčnaté onemocnění (příkladem jsou prasečí mor a tzv. „relapsing fever“). Tvrdá klíšťata jsou vektory mnohem závažnějších onemocnění. Mezi hlavní příklady patří Lymeská borelióza, vyvolaná bakterií *Borrelia burgdorferi*. Nejčastějšími přenašeči tohoto onemocnění jsou druhy *Ixodes ricinus* a *Ixodes scapularis* (Díaz-Martín et al., 2015).

#### **1.4.4.1 Mikrobiom Ixodida**

Podobně jako triatomy mají i klíšťata symbionty, kteří jim poskytují potřebné látky pro správný vývoj (Benson et al., 2004; Duron et al., 2017). V mikrobiomu se vyskytují intracelulární symbionti, kteří mají vliv na přenos patogenů, reprodukci a vektorovou kompetenci klíšťat (Bonnet et al., 2013; Yang et al., 2013). Endosymbionti se dále podílejí na stabilizaci peritrofoické membrány a zajišťují tak celistvost epitelu ve střevech klíštěte (Narasimhan & Fikrig, 2015).

Obečně lze říct, že se v mikrobiomu klíšťat vyskytují převážně gramnegativní bakterie ze skupiny Proteobacteria. Mezi hlavní zástupce patří například *Coxiella* (Almeida et al., 2012), která je u mnohých klíšťat dominující (Yang et al., 2013) *Francisella* (například u druhu *Dermacentor reticulatus*) (Ivanov et al., 2011), *Wolbachia* spp. (například u druhů *Ixodes scapularis*, *Ornithodoros moubata*) (Noda et al., 1997), *Rickettsia* (tvrdá i měkká klíšťata) (Macaluso et al., 2002; Kurtti et al., 2015), *Candidatus* Midichloria mitochondrii (Sassera et al., 2006), *Anaplasma phagocytophilum* (tvrdá klíšťata) (Ohashi et al., 2005), *Ehrlichia chaffeensis* (tvrdá klíšťata) (Murphy et al., 1998). V neposlední řadě byl u druhů *I. ricinus* a *Dermacentor* spp. zaznamenán výskyt symbiontů rodu *Arsenophonus* (Mediannikov et al., 2012), které lze rovněž nalézt u triatom. U zmíněných symbiontů je studován jejich manipulativní přístup ke svému hostiteli. *Coxiella* například manipuluje reprodukci klíštěte (Klyachko et al., 2007), *Candidatus* Midichloria dokáže vstoupit do hostitelských mitochondrií ve vaječnicích a zničit je (Beninati et al., 2009). Navíc pokud se v mikrobiomu klíštěte vyskytuje bakterie *Rickettsia*, zabraňuje sama bakterie další infekci *Rickettsia* a brání klíště i před jinými patogeny (Macaluso et al., 2002).

Patogen vstupuje do klíštěte při sání infikovaného hostitele a kolonizuje jeho střevo. V některých případech ale střevo opustí a přesune se do slinných žláz klíštěte. Tento proces pozorujeme například u spirochét rodu *Borrelia* a bakterií *Anaplasma phagocytophilum*. Jakmile je jednou klíště infikováno, zůstává infikováno po celý život (Levine et al., 1991; Narasimhan & Fikrig, 2015). Měkká klíšťata se během jednoho vývojového cyklu krmí několikrát a mohou tak získat větší množství patogenů od vícero hostitelů. Tvrdá klíšťata se krmí v každé vývojové fázi pouze jednou, z toho důvodu mají jen omezenou možnost patogen získat a přenášet. Proces přenosu patogenu během vývoje klíštěte mezi jednotlivými stádii a jeho migrace do slinných žláz není ještě zcela objasněn. Je tedy na místě otázka, jestli symbionti mikrobiomu klíšťat mají v těchto procesech svojí roli (Narasimhan & Fikrig, 2015).

## 2. Cíle práce

V této diplomové práci se budu zabývat vlivem ekologických a environmentálních faktorů na mikrobiomy vybraných členovců. Konkrétně se zaměřím na následující témata.

- I. Determinovat mikrobiomové profily několika druhů Triatomínů, jejichž populace jsou ovlivňovány shodnými environmentálními faktory, a posoudit vliv hostitelské specifity na formování mikrobiomu severoamerických triatom.
- II. Posoudit možnou konvergenci mezi mikrobiomy krevsajících členovců pocházejících ze stejného stanoviště.
- III. Posoudit vliv bakteriální složky prostředí na mikrobiomové profily vybraných hostitelů.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Vzorky a příprava DNA templátu

Soubor analyzovaných členovců pochází ze třech lokalit ve Spojených státech Amerických, tj. Chaparral Wildlife Management Area (Texas), Univerzity of Arizona Desert Station (UADS, Arizona) a Las Cienegas National Conservation Area (LCNCA, Arizona; viz Obr.1). Jedná se o velmi odlišné biomy, u kterých lze předpokládat rozdílná enviromentální společenstva bakterií, které mohou ovlivnit mikrobiomy modelových organismů. Chaparral je travnatá texaská krajina s nízkými keři a stromy (průměrná roční vlhkost okolo 50%). Tato lokalita se částečně podobá LCNCA, kde je však výrazně nižší průměrná roční vlhkost v rozmezí 25-40%. UADS je součástí severní hornaté části Sonorské pouště s průměrnou roční vlhkostí 10-20%. Z těchto oblastí bylo z hnízd kryš druhu *Neotoma albigula* sesbíráno 134 vzorků hematofágních a fytofágních členovců. Analýzy byly následně provedeny pro vzorky vždy z jednoho stanoviště a to buď pro vzorky se stejnou potravní specializací nebo vzorky fylogeneticky příbuzné. Konkrétně šlo o krevsající druhy z podčeledi Triatominae: *Triatoma protracta*, *Triatoma rubida*, *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma lecticularia*. K analýzám byly vybrány triatomy, u kterých nebyla prokázána přítomnost *Trypanozomy cruzi*. Soubor vzorků triatom byl pro srovnání doplněn klíšaty druhu *Ornithodoros turicata* (23 vzorků) a triatomám příbuzným fytofágním druhem ploštic *Largus californicus* (7 vzorků). Současně s těmito členovci byly analyzovány vzorky z prostředí, ve kterém se výše zmíněné organismy přirozeně vyskytují, a které mohou přímo ovlivňovat složení jejich mikrobiomu. Jednalo se o 8 vzorků dřeva, roztočů a prachu sesbíraných z hnízd Neotom. Podrobné informace o vzorcích, jsou shrnuty v příloze (Tab.P1).



Obr.1: Lokality sběru vzorků

Izolace DNA triatom pomocí DNeasy Blood and Tissue kits (Qiagen) proběhla z velké části z celých abdomenů, jelikož nebyly prokázány statisticky signifikantní rozdíly mezi mikrobiomovými profily ze střev a celých jedinců (Rodríguez-Ruano et al., 2018). Kit DNeasy Blood and Tissue kits (Qiagen) byl využit i pro izolaci DNA z ostatních jedinců (klíšťat, fytofágních ploščic). U druhů *Largus californicus* bylo pro izolaci použito pouze vypitvané střevo. Pro soubor enviromentálních vzorků byl použit kit MagAttract PowerSoil (Qiagen). Izolace DNA probíhala dle návodu poskytnutého výrobcem. Získaná DNA byla následně použita jako templát pro přípravu amplikonových knihoven a ověření taxonomického zařazení vzorků pomocí amplifikace genu pro cytochrom b.

### 3.2 PCR (Polymerázová řetězová reakce), elektroforéza, Sanger sekvenace

Metoda PCR s EMP primery (Caporaso et al., 2011) byla využita za účelem otestování kvality vyizolované DNA a pro ověření přítomnosti bakteriálního templátu. Následně byla provedena PCR reakce s primery amplifikující cytochrom b pro molekulární taxonomické zařazení jednotlivých vzorků.

PCR reakce byla připravena vždy o objemu 20  $\mu$ l s využitím PPP Master Mixu (Top Bio). Informace o použitých EMP primerech (Caporaso et al., 2011) a cytochrom b primerech (Monteiro et al., 2003) jsou uvedeny v Tab.1. Pár primerů 7432F a 7433R pro gen cytB

nicméně nedokázal amplifikovat produkt v případě *T. protracta*, stejná problematika byla již dříve z *cytB* zaznamenána (Lyman DF et al., 1999). V důsledku toho byly vytvořeny alternativní primery Tpr\_F a Tpr\_R na základě dostupných *T. protracta* *cytB* sekvencí a sekvencí dalších druhů triatom z GenBank (Tab.1). Všechny PCR reakce probíhaly v Mastercycleru, ve kterém byl na základě použitých primerů zvolen vhodný program. Velikost získaných produktů reakce PCR byla následně ověřena na gelové elektroforéze.

Pro účel gelové elektroforézy bylo 1-2  $\mu$ l amplifikovaných PCR produktů smícháno společně s fluorescenčním barvivem SYBR Green (Invitrogen) a DNA Loading Dye (Thermo Scientific). Vzniklý roztok byl poté napipetován do 1% agarózového gelu. Velikost fragmentů jsem určila za pomoci 1kb DNA Ladderu (O'GeneRuler, Thermo Scinetific), který jsem také nanesla do jedné z jamek.

Následně byly PCR produkty triatom a klíšťat sekvenované pro gen cytochrom b enzymaticky přečištěny exonukleázou Exo I (Thermo Scinetific) a alkalickou fosfatázou Fast AP (Thermo Scinetific). Ke každému produktu bylo přidáno 0,2  $\mu$ l enzymu. Po přečištění v Mastercycleru bylo z každého PCR produktu odpipetováno 5  $\mu$ l, ke kterému se následně napipetovalo 5  $\mu$ l reverzního primeru. Výsledné produkty byly následně odeslány na Sanger sekvenaci. Výsledné nukleotidové sekvence byly poté zpracovány v programu Geneious. Na základě kvality byly sekvence v programu nejprve osekány a pomocí BLAST algoritmu porovnány s databází NCBI.

Tab.1: Přehled použitých primerů

Primer	Sekvence primeru (5'-3')	Zdroje	Velikost produktu
EMP F (515f)	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	Caporaso et al., 2011a	~300-350 bp
EMP R (806rB)	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	Caporaso et al., 2011a	~300-350 bp
7432 F	GGACGWGGWATTTATTATGGATC	Monteiro et al., 2003	663bp
7433 R	GCWCCAATTCARGTTARTAA	Monteiro et al., 2003	663bp
Tpr_F	CCTACTATCCGCGGTTTCCTT	Brown et al., 2020	380bp
Tpr_R	GGGATGGATCGGAGAATTGCG	Brown et al., 2020	380bp
PL1* (forward)	GGAAGGAGCTGACGCGAGTT	Caporaso et al., 2011a	1190bp
PL2* (reverse)	GTTCAAGCTCGGAGAGTGTG	Caporaso et al., 2011a	1190bp

\*PL1 má 96 různých variant lišících se 12 bp dlouhým Goley barcodem. PL2 má 5 variant lišících se 5 bp dlouhým barcodem



### 3.3 High throughput ampliconové sekvenování

#### 3.3.1 Ampliconové knihovny

S pomocí EMP protokolu (Earth Microbiome Project, <http://www.warthmicrobiome.org>) byly sestaveny ampliconové knihovny 16S rRNA genu. Ve dvou ampliconových knihovnách vytvořených v průběhu dvou let byly produkty PCR ze 134 vzorků. Jedna knihovna obsahovala vzorky z Texasu (*T. gerstaeckeri*, *T. lecticularia*, *O. turicata*). Druhá knihovna se skládala výhradně ze setu arizonských vzorků triatom (*T. protracta*, *T. rubida*). Pro posouzení kvality a citlivosti sekvenování bylo použito 7 negativních kontrol a tři pozitivní kontroly. Pozitivní kontroly byly tvořeny mock komunitami, které jsou běžně komerčně dostupné (staggered s odlišným druhovým zastoupením jednotlivých bakterií a equal, kde je všech deset bakterií ve stejném poměru (ATCC® MSA-1000™, ATCC® MSA-1001™). Knihovny byly postaveny Janem Zimou a odeslány na sekvenování na platformě Illumina MiSeq s použitím v2 kitu s 500 cykly čtení.

Knihovny vznikly pomocí „dvojitě barcodové strategie“ (primery Tab.P2-P3). Každý PCR produkt měl unikátní kombinaci primerů. Pro sekvenaci 480 vzorků v jednom runu bylo použito 5 různých reversních primerů a 96 forwardových primerů. Výsledkem PCR byly amplicony o délce cca 500 bp (zahrnující adapter, barcode, primer a 16S rRNA gen V4/V5 hypervariabilní oblasti). Jelikož předešlé sekvenování hmyzích mikrobiomů s primery 515F/926R vykazovalo nižší specifitu k 16S rRNA genům (vyšší specifita k hostitelské 18S rRNA), byl navržen 18S rRNA blokační primer. Blokační primer byl použit v desetkrát vyšší koncentraci než amplifikační primery tak, aby obsadil většinu nasedacích míst na genech 18S rRNA, se kterými reversní primer 926R může hybridizovat. PCR amplicony byly čištěny pomocí magnetických kuliček a ekvimolárně smíchány na základě koncentrace DNA. Jelikož čištění úplně neodstranilo vysoké koncentrace blokačního primeru, byla knihovna purifikována pomocí Pippin Prep (Sage science), aby došlo k odstranění fragmentu DNA kratších než 300 bp a delších než 1100 bp.

### 3.4 Zpracování dat

Primární zpracování souboru hrubých Illumina pair-end readu (kontrola kvality, párování, demultiplexování) proběhlo v programech Usearch v7.0.1001 (fastq\_mergepairs with fastq\_minovle set to 20; Edgar, 2013) a Qiime 1.8 (split\_libraries\_fastq.py with phred\_quality\_threshold set to 19; Caporaso et al., 2010b). Následně pomocí skriptu „derep\_fulllength“ (Usearch) byla data dereplikována, čímž byl zjištěn počet naprosto shodných sekvencí. Dále pomocí příkazu „sortbysize“ došlo k seřazení datasetu, ze kterého byly následně odstraněny sekvence vyskytující se v setu pouze jednou. S využitím BLAST algoritmu a databáze SILVA 123 bylo každé OTU taxonomicky zařazeno (Camacho et al., 2009, Quast et al., 2013). Poté byla tabulka OTU pomocí programu Qiime (Bokulich et al., 2013) filtrována. Při filtraci došlo k odstranění OTU s nízkou abundancí, nebakteriálních, mitochondriálních a chloroplastových OTU. Tři OTU, které byly indentifikovány jako kontaminující (tvořeny bakteriemi rodu *Sphingomonas*, *Geobacillus*) byly přítomny ve všech negativních kontrolách (celkové množství readů  $223 \pm 195$ ) a z celého datasetu byly taktéž vyfiltrovány. Z datasetu bylo dále odstraněno 15 vzorků *T. gerstaeckeri*, jelikož měli nižší počet readů, než nastavenou hladinu znárodnění.

Pro posouzení cílů této práce byly vytvořeny různé datasety pro jednotlivé lokality a stanoviště (hnízda), ve kterých byly vzorky sbírány. Datasety, normalizované náhodným výběrem jednoho tisíce readů pro každý vzorek, byly následně analyzovány s maximálním počtem dostupných vzorků i v podobě podskupin náhodně vybraných dat s porovnatelným počtem jedinců. Následné analýzy bakteriálních společenstev proběhly v programu R studio (<https://www.rstudio.com/>) s vyžitím modulů pro mikrobiální ekologii, konkrétně modulu vegan (Oksanen et al, 2013). Pro posouzení diverzity byly využity indexy Richness a Shannon. Podobnosti mezi společenstvy jednotlivých lokalit byly analyzovány na základě Bray-Curtis distancí a vizualizovány pomocí Non-Metric Dimensional Scaling (NMDS, Minchin, 1987). Statistická významnost (ne)podobnosti mezi porovnávanými skupinami vzorků byla vyhodnocena pomocí funkce adonis (součást balíku vegan určeného pro běžné analýzy používané v mikrobiální ekologii, Oksanen et al., 2013) a Kruskal-Wallis testem pro porovnání rozdílů v indexech alfa diverzity.

## 4. Výsledky

### 4.1 Templátová DNA a PCR

Amplifikace DNA 134 vzorků ploštic a klíšťat EMP primery proběhla úspěšně. DNA enviromentálních vzorků (2 vzorky roztočů, 3 vzorky dřeva, 3 vzorky prachu) se však ani po následných amplifikacích a čištěních nepodařilo získat. Vzhledem k absenci enviromentálních DNA neproběhly analýzy týkající se posouzení bakteriální složky na jednotlivé mikrobiomy.

### 4.2 Sanger sekvenování

Pro gen *cytB* se podařilo amplifikovat 134 vzorků. Na základě sekvenční shody jsem byla schopna určit jejich taxonomické zařazení. Sanger sekvenace byla zásadní u nedospělých instarů triatom, které nelze morfologicky určit. Výsledkem molekulární determinace je set čtyř druhů triatom, tj. *T. gerstaeckeri* (18), *T. lecticularia* (12), *T. rubida* (46), *T. protracta* (21), sedmi jedinců ploštic druhu *Largus californicus*, 23 klíšťat druhu *Ornithodoros turicata* zastoupených výhradně larválními instary (soubor vzorků viz Tab.P1).

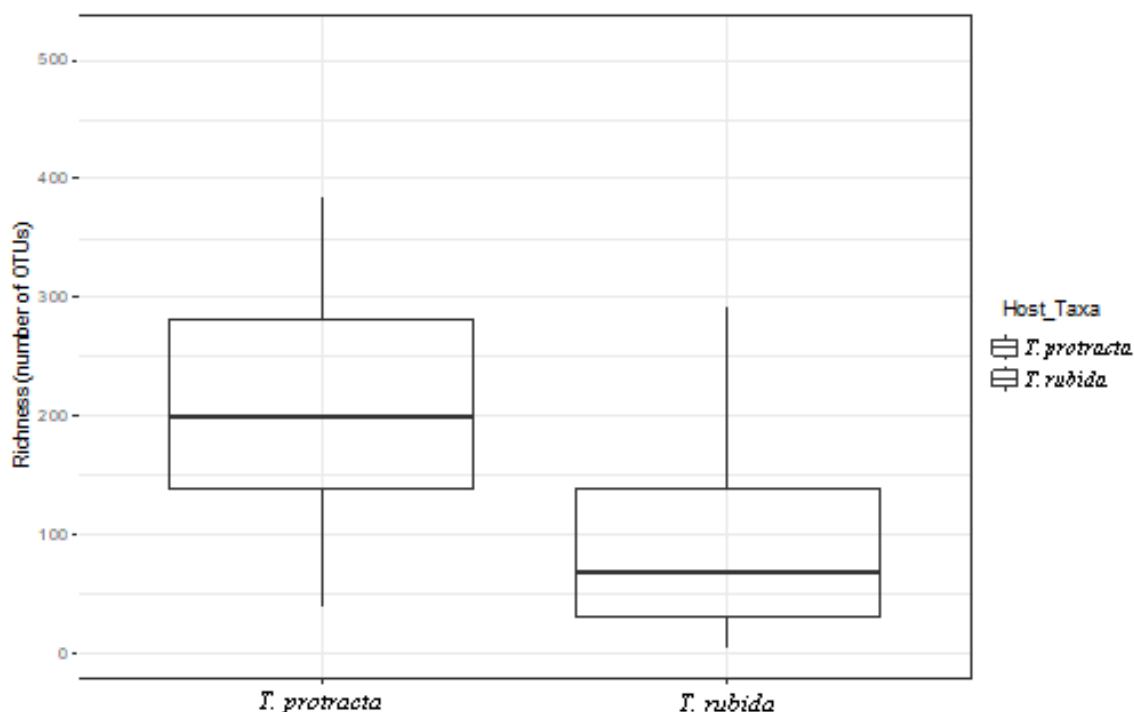
### 4.3 Amplikonové knihovny

Průměrný počet sekvencí pro analyzované vzorky byl 13883. Z takzvaných mock komunit, tedy komunit se známým složením, které sloužily jako pozitivní kontroly, byly získány sekvence všech 10 bakteriálních druhů s abundancí srovnatelnou s jejich původním zastoupením v komerčně dodávaném DNA templátu. Mock komunity „staggered“ obsahovaly jak 2 bakteriální druhy s vysokou abundancí (40%), tak druhy zastoupené v extrémně nízkém množství (0,04% původního DNA templátu). Námi získaná amplikonová data dokázala v těchto pozitivních kontrolách odhalit i bakterie s nejnižší abundancí, tj. *Bifidobacterium adolescentis* a *Deinococcus radiodurans*. Předpokládáme proto, že data pro analyzované vzorky členovců představují jejich kompletní mikrobiom včetně bakteriálních taxonů s nižším zastoupením.

#### 4.4 Druhová specifita mikrobiomů Triatom jejichž populace jsou ovlivňovány shodnými enviromentálními faktory

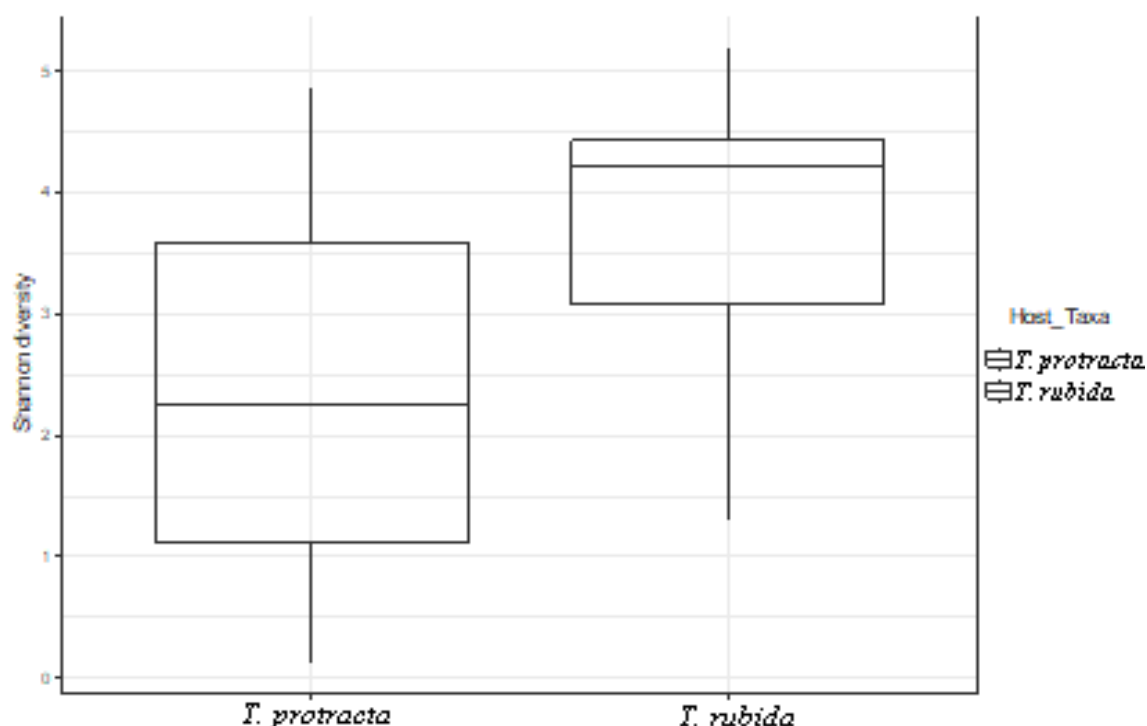
Podobnosti mikrobiomů triatom ze shodného prostředí byly posouzeny na jedincích druhu *T. protracta* a *T. rubida* z oblastí UADS (University Arizona Desert Station) a LCNCA (Las Cienegas National Conservation Area). Z mikrobiomových profilů triatom z obou lokalit je na první pohled patrná vysoká míra interindividuální variability (Obr.2-7). Oba druhy hostí jak společný bakteriální taxon (rod *Mycobacterium*), tak odlišná OTU s vysokou četností (například rod *Dietzia* a rod *Proteiniphilum*, Obr.P1). Analýzy diverzity proběhly nejprve pro kompletní set vzorků a poté pro subset s vyrovnaným zastoupením počtu jedinců přes jednotlivé instary.

Analýzy celého datasetu *T. protracta* a *T. rubida* (UADS) ukázaly nesignifikantní rozdíly v alfa diverzitě (Shannon, Kruskal-Wallis test:  $P = 0,029$  a Richness, Kruskal-Wallis test:  $P = 0,037$ ). V subsetu s vyrovnaným zastoupením vzorků ukázaly analýzy signifikantní rozdíly pouze v prosté bohatosti mikrobiomů (Richness, Kruskal-Wallis test:  $P = 0,001$ ; Obr.2)



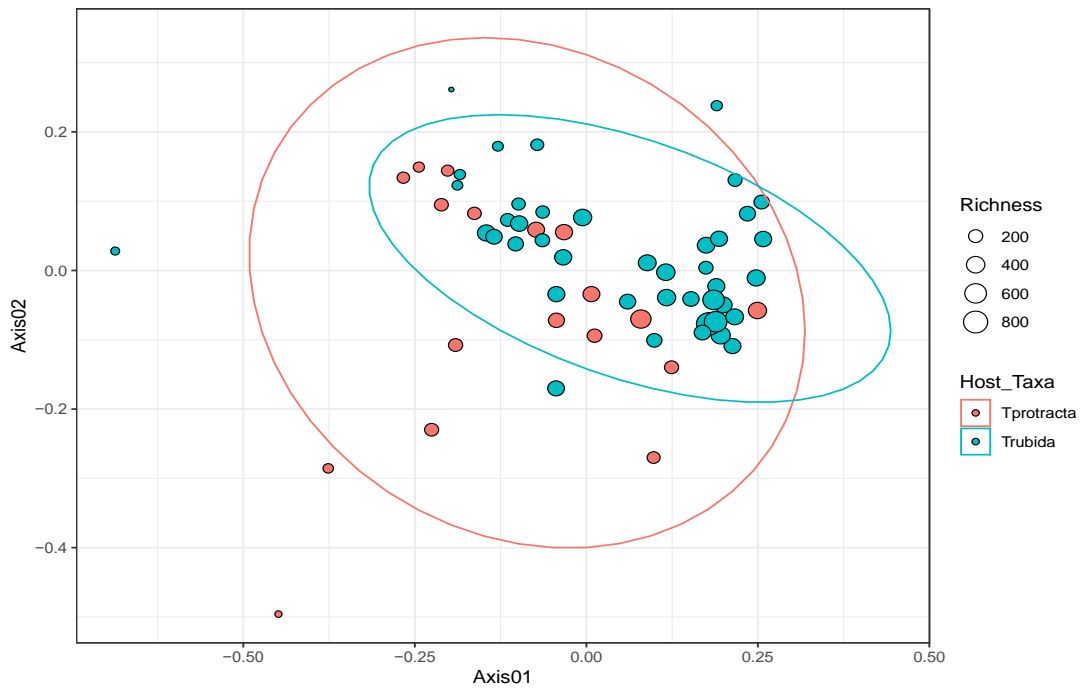
Obr.2: Richness index mikrobiomů kalkulovaný pro vyrovnané skupiny vzorků *T. protracta* a *T. rubida* z lokality UADS.

Porovnání Richness indexu diverzity mikrobiomů mezi *T. protracta* a *T.rubida* z oblasti LCNCA neodhalilo signifikantní rozdíly (Kruskal-Wallis test:  $P = 0.441$ ). Pouze při porovnání hodnot Shannon indexů mezi jedinci z analyzovaných druhů byl zaznamenán signifikantní rozdíl (Kruskal-Wallis test:  $P = 0,004$ ; Obr.3). Analýzy subsamplovaného datasetu potvrdily signifikantní rozdíl mezi hodnotami Shannon indexů pro mikrobiomy *T. rubida* a *T. protracta* pouze na nižší hladině významnosti 95% (Richness, Kruskal-Wallis  $P=0,136$ ; Shannon, Kruskal-Wallis  $P= 0,040$ ).

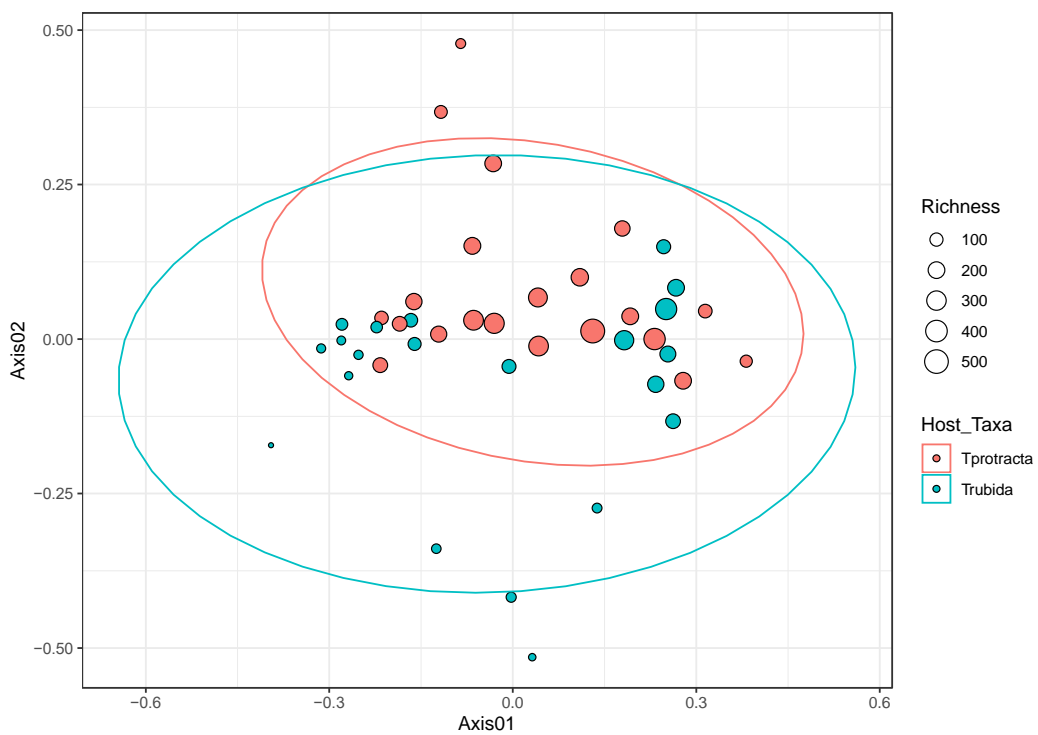


Obr.3: Shannon index diversity mikrobiomů pro celý dataset *T. protracta* a *T.rubida* z oblasti LCNCA.

Mikrobiomy analyzovaných druhů z UADS a LCNCA se od sebe signifikatně liší především svou vzájemnou podobností, tj. distancemi v klastrovací analýze (Obr.4-7). Pro jedince z oblasti UADS (celý dataset) analýza NMDS ukazuje signifikantní rozdíly na hladině významnosti 99% (adonis,  $R^2=0,04$ ,  $p<0,004$ ; Obr.4). Analýza subsetu s vyrovnaným zastoupením vzorků opět ukazuje signifikantní výsledky, ale na nižší hladině významnosti (adonis,  $R^2=0,04$ ,  $p<0,022$ ; Obr.5).

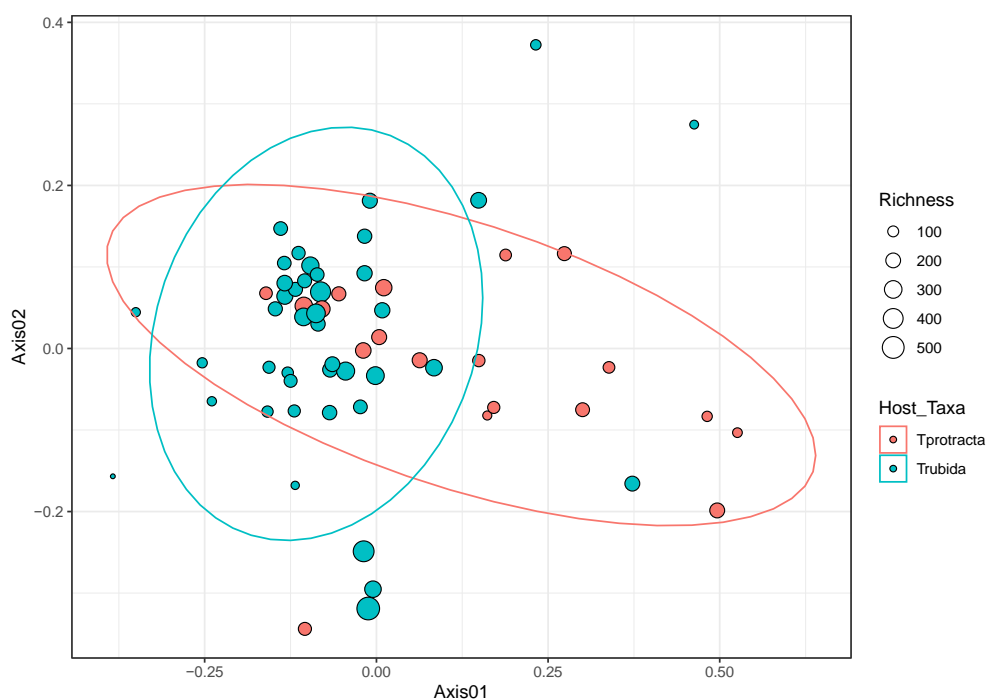


Obr.4: NMDS analýza mikrobiomů druhů *T. protracta* a *T. rubida* z lokality UADS pro celý dataset. Elipsy jsou statisticky významné na hladině významnosti 95%

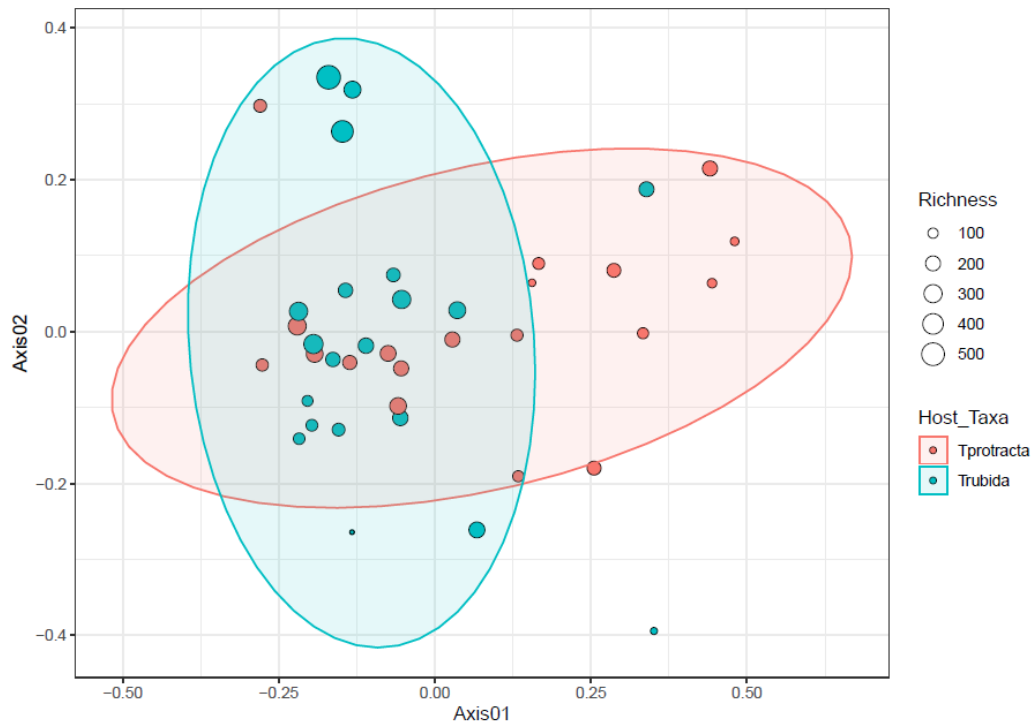


Obr.5: NMDS analýza mikrobiomů druhů *T. protracta* a *T. rubida* pro vyrovnaný dataset vzorků z UADS. Elipsy jsou statisticky významné na hladině významnosti 95%.

Signifikatní mezidruhové rozdíly na hladině významnosti 99% byly nalezeny i mezi jedinci *T. protracta* a *T. rubida* pocházející z LCNCA. Statisticky signifikantní rozdíly byly potvrzeny jak pro kompletní, tak pro subsamplovaný dataset těchto vzorků (adonis,  $R^2=0,05$ ,  $p<0,001$ ; Obr.6 a 7).



Obr.6: NMDS analýza celého datasetu mikrobiomů druhů *T. protracta* a *T. rubida* z lokality LCNCA. Elipsy jsou statisticky signifikantní na hladině významnosti 95%.

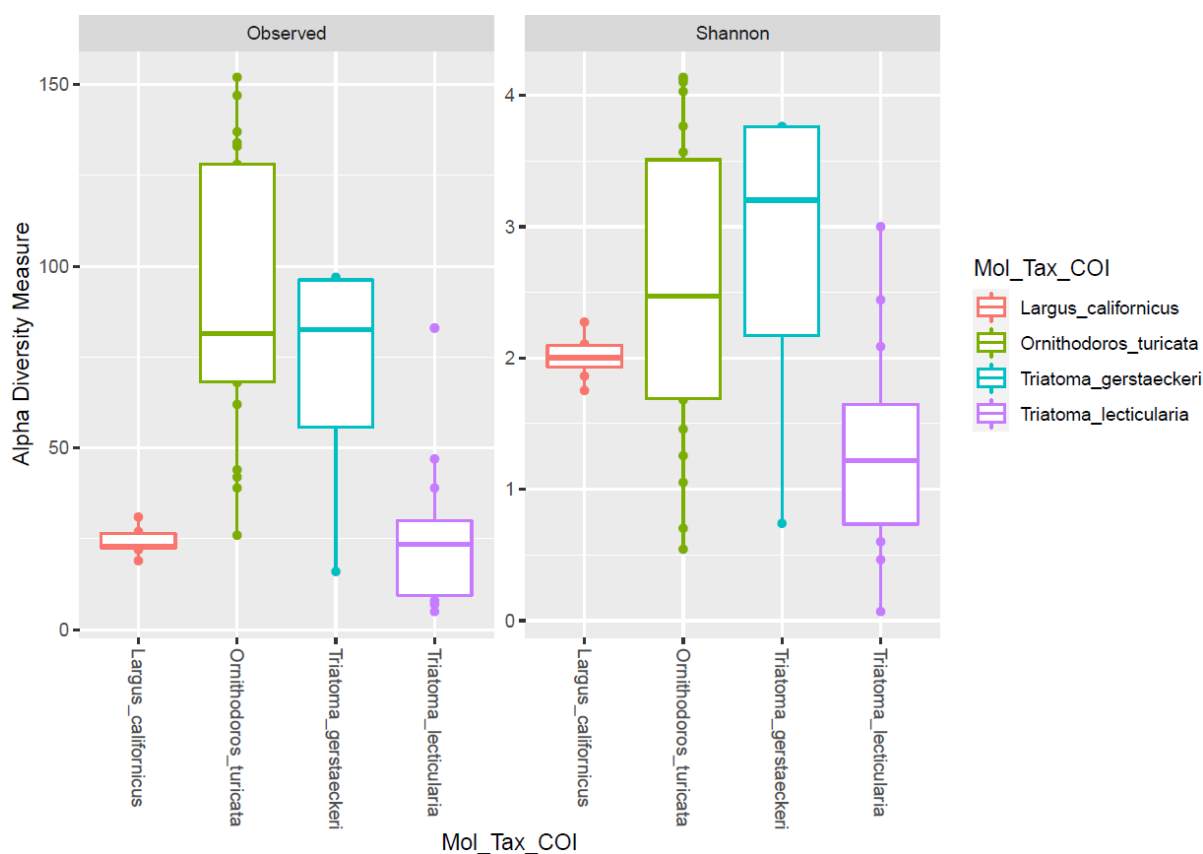


Obr.7: NMDS analýza vyrovnaného datasetu druhů *T. protracta* a *T. rubida* z lokality LCNCA. Elipsy jsou statisticky signifikantní na hladině významnosti 95%.



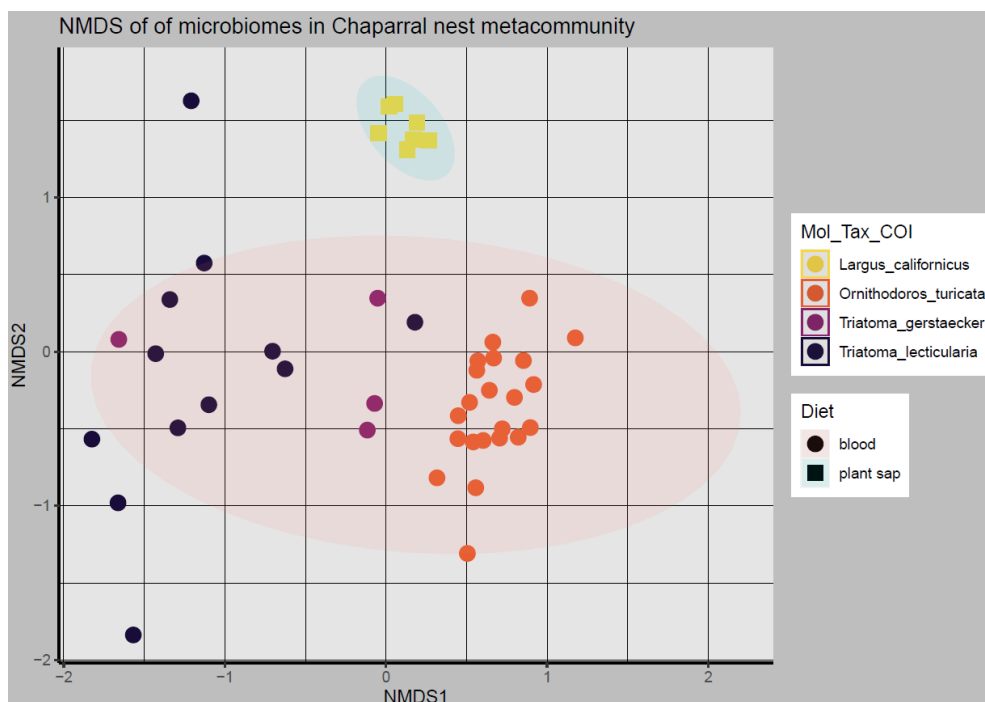
#### 4.5 Konvergence mezi mikrobiomy analyzovaných členovců

Na druhém datasetu (vzorky z Chaparralu) jsem posuzovala možnou konvergenci mikrobiomu u nepříbuzných druhů hematofágních členovců. Statistické analýzy vzorků z Chaparralu prokázaly signifikantní rozdíly jak pro mikrobiomy analyzovaných druhů (adonis,  $R^2=0,47$ ,  $p<0,001$ ; Obr.8), tak mezi mikrobiomy skupin specializujících se na hematofágnii a fytofágním druhem plošnice *Largus californicus* (adonis,  $R^2=0,18$ ,  $p<0,001$ ). Z výsledků z oblasti Chaparral vyplývá, že jsou mikrobiomy studované komunity zásadně ovlivněny druhem a potravní specializací hostitele (Obr.9).

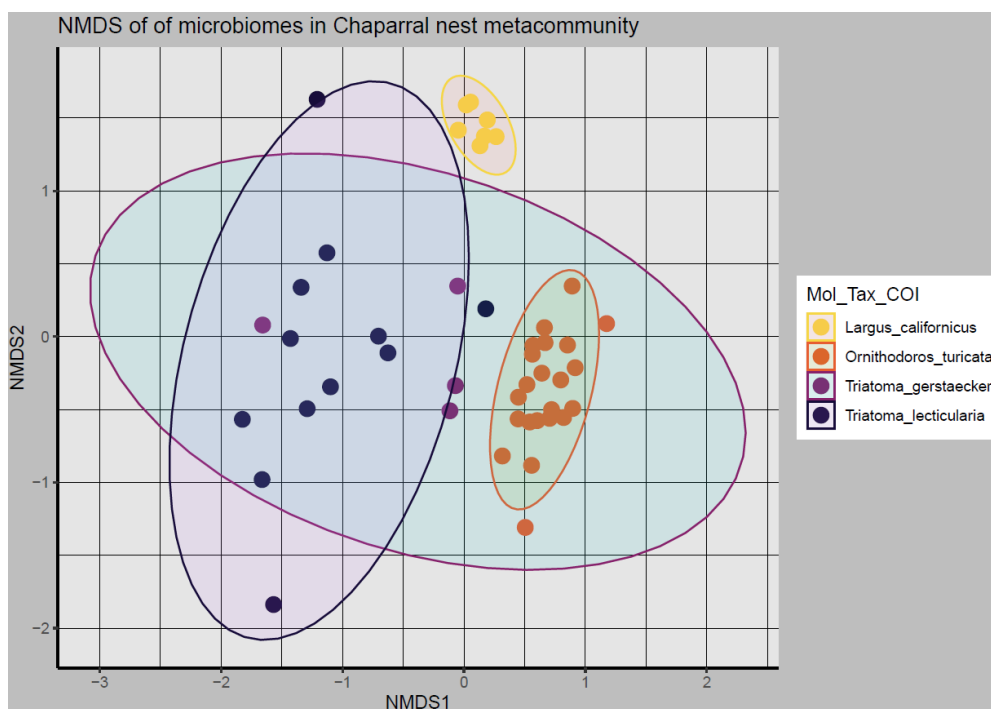


Obr.8: Alfa diverzitní indexy (Richness, Shannon) mikrobiomů u jednotlivých analyzovaných druhů bezobratlých.

A

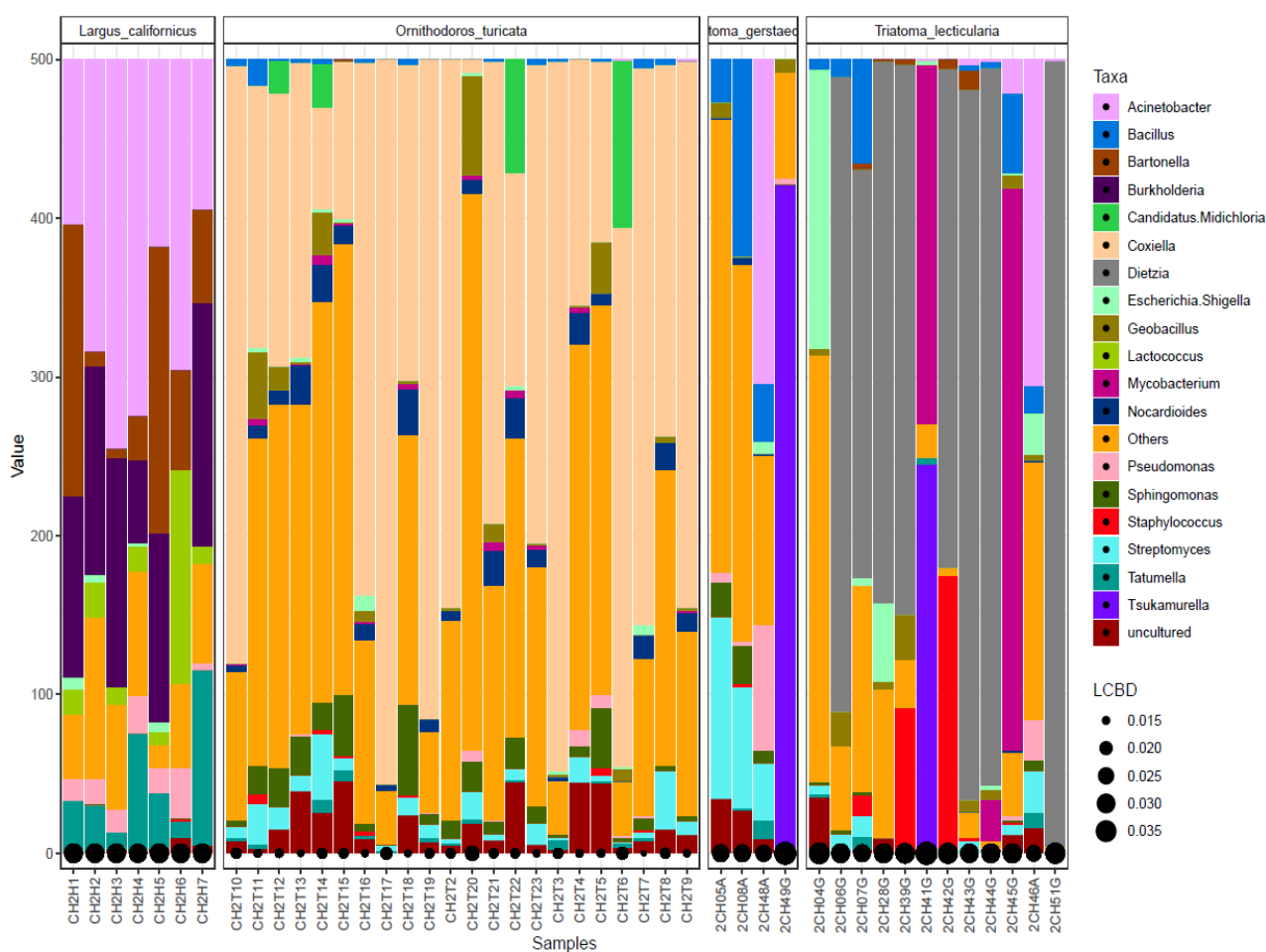


B



Obr.9: NMDS analýzy pro hematofágní a fytofágní druhy z oblasti Chaparral. A: signifikantní rozdíly mezi druhy specializující se na fytofágnii a hematofágnii. B: signifikantní rozdíly mikrobiomů analyzovaných druhů.

Z mikrobiomového profilu je zřejmá druhová specifita. Mikrobiomy jednotlivých hostitelských druhů jsou dominovány odlišnými bakteriálními taxony. Pro fytofágní druh *Largus californicus* je dominujícím rodem *Acinetobacter*, *Bartonella* a *Burkholderia*. U druhu *Ornithodoros turicata* je v největší míře zastoupený rod *Coxiella*. U zástupců *Triatoma gerstaeckeri* je hlavním rodem *Bacillus*, *Streptomyces*. Naproti tomu u *T. lecticularia* dominují bakteriální rody *Dietzia*, *Mycobacterium* a *Acinetobacter* (Obr.10). Z výsledků analýz je patrná konvergence mikrobiomu nepříbuzných hematofágních druhů, u kterých jsou sice odlišné dominující bakterie, ale sdílejí poměrně vysoké množství OTU (Tab.P4) V největší míře jsou zde zastoupeny druhy patřící do skupin Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Sphingobacteriia, Flavobacteriia.



Obr.10: Složení mikrobiomu jednotlivých analyzovaných druhů členovců (zleva *Largus californicus*, *Ornithodoros turicata*, *T. gerstaeckeri*, *T. lecticularia*) z oblasti Chaparral. Barevně odlišeno je prvních 20 nejpočetněji zastoupených bakteriálních taxonů.

## 5. Diskuze

### 5.1 Mikrobiomové profily Triatom, jejichž populace jsou ovlivňovány shodnými environmentálními faktory.

Z výsledků statistických analýz plyne, že se mikrobiomy druhů *T. protracta* a *T. rubida* od sebe signifikantně liší, přestože analyzovaní jedinci pocházejí ze stejných stanovišť a získávají potravu z totožných hostitelů, hlodavců *Neotoma albigula* (Obr. 2-7). Z toho vyplývá, že shodné environmentální faktory nemusí mít na složení mikrobiomu zásadní vliv. Hlavní roli v determinanci mikrobiomového profilu hraje zejména druhová příslušnost triatom. V principu to může být způsobeno například vertikálním přenosem bakterií nebo odlišnou schopností různých druhů triatom přijímat bakterie z prostředí a začleňovat je do svého mikrobiomu.

Triatomy nemají typický vertikální přenos symbiontů, jako je to u jiných zástupců hematofágů. Můžeme spekulovat, zda by mohlo jít o nepřímou vertikální transmisí. Nepřímá transmisí byla popsána u druhu *R. prolixus* a bakterií *Rhodococcus*, kdy potomci získávají symbionta skrze výkaly svých rodičů (Eichler & Schaub, 2002). Další možností by mohl být získání symbionta z prostředí (z půdy, z vajec), podobně jako u jiných druhů ploštic. Například u zástupce *Pyrrhocoris apterus*, byl zaznamenán přenos symbionta *Coriobacterium glomerans* skrze povrch vajíček. Dospělé samice během kladení vajíček aplikují na jejich povrch bakterii, která je později vychytaná potomkem. Povrchová sterilizace vajíček vedla k tomu, že potomci zmíněného symbionta ve svém mikrobiomu neměli. Tímto způsobem byla potvrzena teorie přenosu bakterie nepřímou vertikální transmisí přes povrch vajec (Kaltenpoth et al., 2009). Dalším příkladem může být *Riptortus clavatus* (Alydidae) a symbiont rodu *Burkholderia*. Po řadě pokusů bylo zjištěno, že nymfy po každou generaci získávají symbionta z prostředí, konkrétně z půdy v lokalitách výskytu hmyzu (Kikuchi et al., 2007).

U druhu *T. rubida* dominoval bakteriální rod *Dietzia*. Bakterie rodu *Dietzia* jsou oportunními patogeny, z čehož můžeme usuzovat, že tuto bakterii získávají triatomy během sání krve na infikovaném hostiteli nebo z prostředí, ve kterém se vyskytují (Koerner et al., 2009). U několika jedinců *T. protracta* byl výskyt rodu *Dietzia* také zaznamenán, otázkou ale zůstává, zda v mikrobiomu tohoto druhu zastává nějakou funkční roli nebo se jedná jen o náhodnou infekci. Dominujícím rodem byl totiž u *T. protracta* rod *Proteiniphilum*.

Výskyt bakterií rodu *Dietzia* byl i u dalších druhů triatom zaznamenán. S největší pravděpodobností má tedy v jejich mikrobiomu důležitou funkční roli (Waltmann et al., 2019). Tento bakteriální rod byl pozorován například u druhu *T. maculata*, u kterého patřil mezi rody s největším zastoupením v mikrobiomu (Montoya-Parras, 2019). Výskyt těchto bakterií byl dále zaznamenán i u dalších hematofágních hostitelů jako jsou mouchy tsetse a komáři (Malele et al., 2018; Yadav et al., 2018).

Rod *Mycobacterium* byl rodem vyskytujícím se u obou zástupců triatom. U ploštic druhu *Rhodnius prolixus* byla prokázána přítomnost *Mycobacterium leprae* ve výkalech (Da Silva Neumann et al., 2018), nicméně jsem nedokázala určit přesně druhovou příslušnost nalezeného OTU a je tedy otázkou, zda se jednalo o tento patogen. Výskyt této bakterie byl studován i u dalších krevsajících zástupců klíšťat a komárů (Wallace et al., 2010; Yadav et al., 2015; Budachetri et al., 2016). Z jiných hematofágních systémů jsou známy evoluční scénáře pro vývoj symbiotických asociací s bakteriemi, které byly hostitelem získány z nasáté krve (Peacock et al., 2012). Z krátkých amplikonů v této práci nemůžeme posoudit, zda se v případě bakterií *Dietzia* a *Mycobacterium* jedná o symbionty, které zastávají v mikrobiomu nutriční či jinou funkci. Abychom byli schopni určit jejich skutečný význam je zapotřebí metagenomických a metatranskriptomických nástrojů.

Pro posouzení vlivu bakteriální složky prostředí bylo nutné vyizolovat DNA z environmentálních vzorků. Bohužel se izolace DNA ani přes opětovné pokusy izolace, následné precipitace alkoholem a přečištění nezdařila, z tohoto důvodu jsem vliv prostředí nebyla schopna analyzovat.

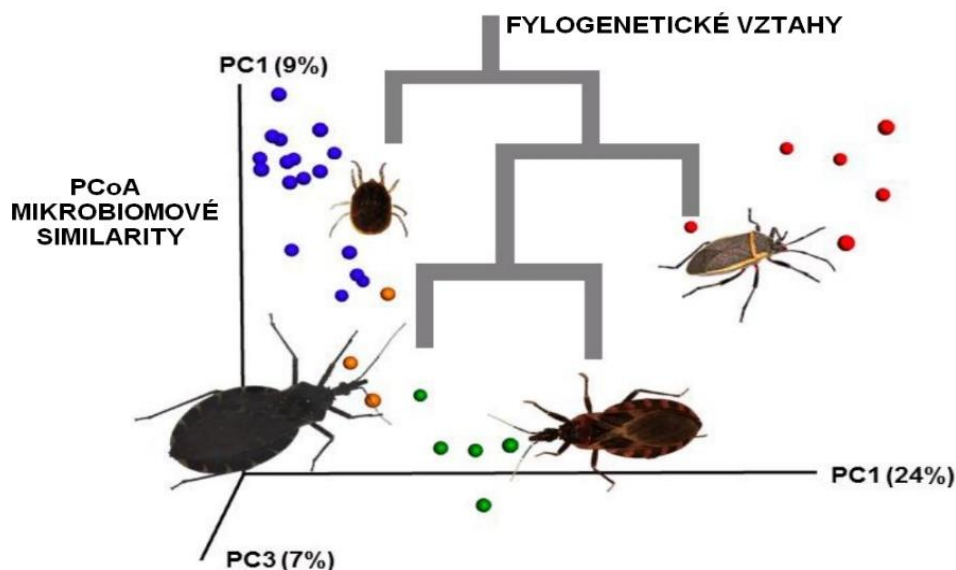
## 5.2 Konvergence mezi mikrobiomy členovců.

Taxonomické a/ nebo funkční konvergence střevních mikrobiomů, na které působí stejné selekční tlaky, byly potvrzeny u rozmanité škály vzdáleně příbuzných obratlovců i bezobratlých. Častým determinantem konvergence je úzce specializovaná potravní strategie (myrmekofágie, herbivorní a karnivorní savci, Delsuc et al., 2014; Muegge et al., 2011). U myrmekofágních savců (živící se pouze mravenci) bylo pozorováno obdobné složení mikrobiomu i u vzdáleně příbuzných druhů (Delsuc et al., 2014). Další zaznamenané konvergence byly i u druhů s úzce vymezeným potravním zdrojem. Po srovnání střevních mikrobiomů dvou druhů pand živících se výhradně bambusem s masožravými příbuznými, byly zjištěny shody ve struktuře mikrobiomu mezi býložravci (Huang et al., 2021).

V rámci bezobratlých byly podobné funkční konvergence popsány například u mravenců a termitů žijících v symbióze s houbami. Mezi jimi sdílené bakteriální rody patří *Enterobacter*, *Rahnella* a *Pseudomonas* (Aylward et al., 2014; Barcoto, 2017).

Hematofágie patří mezi úzce specializované potravní strategie využívané několika skupinami bezobratlých. Jelikož je krev jako potrava chudá na vitamíny skupiny B, předpokládáme, že symbiotické bakterie, případně celé mikrobiomy hematofágních členovců plní obdobnou nutriční funkci, kdy poskytnou hostiteli esenciální vitamíny. Tento předpoklad je zatím podpořen značnou podobností genomů obligátních symbiotických bakterií much tsetse, vší, klošů ale i zcela nepříbuzných pijavic rodu *Haementeria officinalis* (Manzano-Marín et al., 2015). V rámci celých mikrobiomů asociovaných s obligátními či příležitostnými hematofágy, nebyly taxonomické a funkční konvergence podrobně studovány. Mnou analyzovaný dataset, pocházející z jediného stanoviště v oblasti Chapparal, byl cíleně sestaven za účelem rozlišení dvou faktorů, které mohou determinovat charakteristiky mikrobiomu, tj. fylogenetický původ hostitele a jeho potravní specializace.

Mezi krevsajícími členovci jsem zaznamenala značné množství sdílených OTU (Tab.P4). Můžeme tedy předpokládat, že i v tomto případě dochází u mnou studovaných bezobratlých ke konvergenci na základě stejné potravní specializace (Obr.11). Z Obr. 11 je patrné, že fylogenetická příbuznost hostitelů s odlišnou potravní strategií neovlivňuje podobnost jejich mikrobiomu. Na druhou stranu je možné, že byly sdílené bakterie získány při sání ze stejného hostitele *Neotoma albigula*. Pro potvrzení platnosti patternu sdíleného mikrobiomu je potřeba metaanalýzy přes širší set hematofágních členovců.



Obr. 11: Ekologické a fylogenetické determinanty mikrobiomu členovců.

Sdílené OTU analyzované pro krevsající hostitele lze nalézt i u řady jiných hematofágů. Zajímavým příkladem je gramnegativní bakterie rodu *Bordetella*. Některé zástupce tohoto rodu řadíme k lidským patogenům. *Bordetella pertussis* je původcem černého kašle a byl dříve izolován například ze vší (Majid et al., 2020). Mezi sdílené OTU s vysokou četností patří i gramnegativní bakterie rodu *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* a grampozitivní *Staphylococcus*. Tyto rody byly zaznamenány v mikrobiomu blech (Murrell et al., 2003). Dalším příkladem jsou gramnegativní bakteriální rody *Flavobacterium* a *Acinetobacter* běžně se vyskytující v půdě a vodě. Podobně jako *Oxalobacteraceae*, *Roseomonas*, *Tatumella*, *Mesorhizobium*, *Flavobacterium*, *Agrococcus*, *Sphingobacterium*, *Escherichia-Shigella*, *Massilia*, *Serratia* a *Chyseeobacterium*, byly i tři výše zmíněné taxony popsány v mikrobiomech komárů (Kämpfer et al., 2010; Apte-Deshpande et al., 2012; Duguma et al., 2013; Minard et al., 2013a; Minard et al., 2013b; Chen et al., 2014; Chandler et al., 2015; Ngo et al., 2015; Buck et al., 2016; Yadav et al., 2018; Gao et al., 2020). K dalším sdíleným rodům patří i grampozitivní *Corynebacterium*, který je také součástí mikrobiomu komárů (Verhulst et al., 2010). Bakteriální rod *Nubsella* byl recentně identifikován v mikrobiomu pijavice (McClure et al., 2021).

## 6. Závěr

Tato práce přinesla nové poznatky mikrobiálních profilů triatom (*T. rubida*, *T. protracta*) ze Spojených států. Z výsledků analýz byly získané sdílené OTU mezi vybranými krevsajícími zástupci ploštic a klíšťat. Je zde tedy předpoklad, že by mohlo jít o taxonomickou konvergenci mezi mikrobiomy nepříbuzných krevsajících členovců. Nicméně pro definitivní potvrzení popsaného patternu jsou nutné rozsáhlejší analýzy.



## 7. Seznam použité literatury

- Abd Majid, M. A., Khoo, J. J., Lim, F. S., Khor, C. S., Loong, S. K., Low, V. L., ... & AbuBakar, S. (2020). Bacterial profiling of head lice isolated from the Orang Asli: A first report in Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 37(4), 884-895.
- Adéyeyè, O., & Phillips, J. S. (1996). Photoperiodic response in the soft tick, *Ornithodoros turicata*. *International journal for parasitology*, 26(6), 629-635.
- 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.
- Alejandro Manzano-Marín, Alejandro Oceguera-Figueroa, Amparo Latorre, Luis F. Jiménez-García, Andres Moya, Solving a Bloody Mess: B-Vitamin Independent Metabolic Convergence among Gammaproteobacterial Obligate Endosymbionts from Blood-Feeding Arthropods and the Leech *Haementeria officinalis*, *Genome Biology and Evolution*, Volume 7, Issue 10, October 2015, Pages 2871–2884
- 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.
- Almeida, A. P., Marcili, A., Leite, R. C., Nieri-Bastos, F. A., Domingues, L. N., Martins, J. R., & Labruna, M. B. (2012). Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks and tick-borne diseases*, 3(4), 203-206.
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of ticks. *Infectious disease clinics of North America*, 22(2), 195-215.
- Apte-Deshpande, A., Paingankar, M., Gokhale, M. D., & Deobagkar, D. N. (2012). *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. *PLoS One*, 7(7), e40401.
- Aylward, F. O., Suen, G., Biedermann, P. H., Adams, A. S., Scott, J. J., Malfatti, S. A., ... & Currie, C. R. (2014). Convergent bacterial microbiotas in the fungal agricultural systems of insects. *MBio*, 5(6).

- Azambuja, P., Garcia, E. S., & Ratcliffe, N. A. (2005). Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends in parasitology*, *21*(12), 568-572.
- Baines, S. (1956). The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Journal of Experimental Biology*, *33*(3), 533-541.
- Barcoto, M. D. O. (2017). Fungus-growing insects host a convergent microbiome with functional similarities to other lignocellulose-feeding insects.
- Basset, Y., Cizek, L., Cuénoud, P., Didham, R. K., Guilhaumon, F., Missa, O., ... & Leponce, M. (2012). Arthropod diversity in a tropical forest. *Science*, *338*(6113), 1481-1484.
- Beard, C. B., Dotson, E. M., Pennington, P. M., Eichler, S., Cordon-Rosales, C., & Durvasula, R. V. (2001). Bacterial symbiosis and paratransgenic control of vector-borne Chagas disease. *International journal for parasitology*, *31*(5-6), 621-627.
- Beard, C. B., Pye, G., Steurer, F. J., Rodriguez, R., Campman, R., Peterson, A. T., ... & Robinson, L. E. (2003). Chagas disease in a domestic transmission cycle in southern Texas, USA. *Emerging infectious diseases*, *9*(1), 103.
- Beninati, T., Riegler, M., Vilcins, I. M. E., Sacchi, L., McFadyen, R., Krockenberger, M., ... & Lo, N. (2009). Absence of the symbiont *Candidatus Midichloria mitochondrii* in the mitochondria of the tick *Ixodes holocyclus*. *FEMS microbiology letters*, *299*(2), 241-247.
- Bennett, G. M., Abbà, S., Kube, M., & Marzachi, C. (2016). Complete genome sequences of the obligate symbionts “*Candidatus Sulcia muelleri*” and “*Ca. Nasuia deltocephalinicola*” from the pestiferous leafhopper *Macrostelus quadripunctulatus* (Hemiptera: Cicadellidae). *Genome Announc.*, *4*(1), e01604-15.
- Benson, M. J., Gawronski, J. D., Eveleigh, D. E., & Benson, D. R. (2004). Intracellular symbionts and other bacteria associated with deer ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Applied and environmental microbiology*, *70*(1), 616-620.
- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., & Montgomery, S. P. (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clinical microbiology reviews*, *24*(4), 655-681.
- Bhat, U. K. M., & Goverdhan, M. K. (1973). Transmission of Kyasanur Forest disease virus by the soft tick, *Ornithodoros crossi*. *Acta virologica*, *17*(4), 337-42.

- Bonnet, S., De la Fuente, J., Nicollet, P., Liu, X., Madani, N., Blanchard, B., ... & Joncour, G. (2013). Prevalence of tick-borne pathogens in adult *Dermacentor* spp. ticks from nine collection sites in France. *Vector-borne and zoonotic diseases*, 13(4), 226-236.
- Booth, C. L. (1990). Biology of *Largus californicus* (Hemiptera: Largidae). *The Southwestern Naturalist*, 15-22.
- Brenner, A. E., Munoz-Leal, S., Sachan, M., Labruna, M. B., & Raghavan, R. (2020). Ticks convert pathogenic *Coxiella* into endosymbionts. *bioRxiv*.
- Bronstein, J. L. (Ed.). (2015). *Mutualism*. Oxford University Press, USA.
- Brown, J. J., Mihaljevic, J. R., Des Marteaux, L., & Hrček, J. (2020). Metacommunity theory for transmission of heritable symbionts within insect communities. *Ecology and evolution*, 10(3), 1703-1721.
- Brown, J. J., Rodríguez-Ruano, S. M., Poesakkannu, A., Batani, G., Schmidt, J. O., Roachell, W., ... & Nováková, E. (2020). Ontogeny, species identity, and environment dominate microbiome dynamics in wild populations of kissing bugs (Triatominae). *Microbiome*, 8(1), 1-16.
- Brune, A. (2018). Methanogens in the digestive tract of termites. In *(Endo) symbiotic methanogenic archaea* (pp. 81-101). Springer, Cham.
- Buck, M., Nilsson, L. K., Brunius, C., Dabiré, R. K., Hopkins, R., & Terenius, O. (2016). Bacterial associations reveal spatial population dynamics in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Scientific Reports*, 6(1), 1-9.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... & Knight, R. (2011a). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(Supplement 1), 4516-4522.
- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., ... & Knight, R. (2010b). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, 7(5), 335-336.

- Castro, M., Sánchez, L., Pérez, D., Carbonell, N., Lefèvre, P., Vanlerberghe, V., & Van der Stuyft, P. (2012). A community empowerment strategy embedded in a routine dengue vector control programme: a cluster randomised controlled trial. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *106*(5), 315-321.
- Cazemier, A. E., den Camp, H. J. O., Hackstein, J. H., & Vogels, G. D. (1997). Fibre digestion in arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *118*(1), 101-109.
- Colman, D. R., Toolson, E. C., & Takacs-Vesbach, C. D. (2012). Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities?. *Molecular ecology*, *21*(20), 5124-5137.
- Cowdry, E. V. (1925). A group of microorganisms transmitted hereditarily in ticks and apparently unassociated with disease. *Journal of Experimental Medicine*, *41*(6), 817-830.
- Curtis-Robles, R., Snowden, K. F., Dominguez, B., Dinges, L., Rodgers, S., Mays, G., & Hamer, S. A. (2017). Epidemiology and molecular typing of *Trypanosoma cruzi* in naturally-infected hound dogs and associated triatomine vectors in Texas, USA. *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(1), e0005298.
- Da Mota, F. F., Marinho, L. P., de Carvalho Moreira, C. J., Lima, M. M., Mello, C. B., Garcia, E. S., ... & Azambuja, P. (2012). Cultivation-independent methods reveal differences among bacterial gut microbiota in triatomine vectors of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*, *6*(5), e1631.
- Degnan, P. H., Yu, Y., Sisneros, N., Wing, R. A., & Moran, N. A. (2009). *Hamiltonella defensa*, genome evolution of protective bacterial endosymbiont from pathogenic ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(22), 9063-9068.
- De la Fuente, J., Maritz-Olivier, C., Naranjo, V., Ayoubi, P., Nijhof, A. M., Almazán, C., ... & Kocan, K. M. (2008). Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC genomics*, *9*(1), 1-16.
- Delsuc, F., Metcalf, J. L., Wegener Parfrey, L., Song, S. J., González, A., & Knight, R. (2014). Convergence of gut microbiomes in myrmecophagous mammals. *Molecular ecology*, *23*(6), 1301-1317.

- Dennison, N. J., Jupatanakul, N., & Dimopoulos, G. (2014). The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Current opinion in insect science*, 3, 6-13.
- Díaz-Martín, V., Manzano-Román, R., Obolo-Mvoulouga, P., Oleaga, A., & Pérez-Sánchez, R. (2015). Development of vaccines against *Ornithodoros* soft ticks: an update. *Ticks and tick-borne diseases*, 6(3), 211-220.
- Díaz, S., Villavicencio, B., Correia, N., Costa, J., & Haag, K. L. (2016). Triatomine bugs, their microbiota and *Trypanosoma cruzi*: asymmetric responses of bacteria to an infected blood meal. *Parasites & vectors*, 9(1), 1-11.
- Dodson, B. L., Hughes, G. L., Paul, O., Matakchiero, A. C., Kramer, L. D., & Rasgon, J. L. (2014). *Wolbachia* enhances West Nile virus (WNV) infection in the mosquito *Culex tarsalis*. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(7), e2965.
- Donaldson, T. G., de Leon, A. A. P., Li, A. I., Castro-Arellano, I., Wozniak, E., Boyle, W. K., ... & Lopez, J. E. (2016). Assessment of the geographic distribution of *Ornithodoros turicata* (Argasidae): climate variation and host diversity. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(2), e0004383.
- Dujardin, J. P., Bermudez, H., Casini, C., Schofield, C. J., & Tibayrenc, M. (1997). Metric differences between silvatic and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. *Journal of Medical Entomology*, 34(5), 544-551.
- Dujardin, J. P., Muñoz, M., Chavez, T., Ponce, C., Moreno, J., & Schofield, C. J. (1998). The origin of *Rhodnius prolixus* in Central America.
- Dujardin, J. P., & Schofield, C. J. (2004). Triatominae: systematics, morphology and population biology. *The Trypanosomiases*, 181-201.
- Duron, O., Binetruy, F., Noël, V., Cremaschi, J., McCoy, K. D., Arnathau, C., ... & Chevillon, C. (2017). Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Molecular ecology*, 26(11), 2905-2921.
- Ebenezer, K. S., Tamilselvan, C., & Manivanan, R. (2019). Molecular characterization and distance tree identification of unique environmental carryover proteobacteria *Mesorhizobium* sp. in the midgut of *Anopheles stephensi*.

- Eichler, S., & Schaub, G. A. (2002). Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental parasitology*, *100*(1), 17-27.
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects—diversity in structure and function. *FEMS microbiology reviews*, *37*(5), 699-735.
- Estrada-Peña, A., Álvarez-Jarreta, J., & Cabezas-Cruz, A. (2018). Reservoir and vector evolutionary pressures shaped the adaptation of *Borrelia*. *Infection, Genetics and Evolution*, *66*, 308-318.
- Feldhaar H (2011) Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology* *36*: 533-543
- Fukatsu, T., Tsuchida, T., Nikoh, N., & Koga, R. (2001). Spiroplasma symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(3), 1284-1291.
- Gao, H., Cui, C., Wang, L., Jacobs-Lorena, M., & Wang, S. (2020). Mosquito microbiota and implications for disease control. *Trends in parasitology*, *36*(2), 98-111.
- Garcia, A. R., Rocha, A. D. P., Moreira, C. C., Rocha, S. L., Guarneri, A. A., & Elliot, S. L. (2016). Screening of fungi for biological control of a triatomine vector of chagas disease: temperature and Trypanosome infection as factors. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(11), e0005128.
- Gilbert, J. A., Meyer, F., Antonopoulos, D., Balaji, P., Brown, C. T., Brown, C. T., ... & Stevens, R. (2010). Meeting report: the terabase metagenomics workshop and the vision of an Earth microbiome project. *Standards in genomic sciences*, *3*(3), 243-248.
- Gilbert, J. A., Jansson, J. K., & Knight, R. (2014). The Earth Microbiome project: successes and aspirations. *BMC biology*, *12*(1), 69.
- Geiger, A., Fardeau, M. L., Njiokou, F., & Ollivier, B. (2013). *Glossina* spp. gut bacterial flora and their putative role in fly-hosted trypanosome development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *3*, 34.
- Glaser, R. L., & Meola, M. A. (2010). The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PloS one*, *5*(8), e11977.

- Glasgow, H. (1914). The gastric caeca and the caecal bacteria of the Heteroptera. *The Biological Bulletin*, 26(3), 101-170.
- Gordon, E. R. L., McFrederick, Q., & Weirauch, C. (2016). Phylogenetic evidence for ancient and persistent environmental symbiont reacquisition in Largidae (Hemiptera: Heteroptera). *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(24), 7123-7133.
- Gumiel, M., da Mota, F. F., de Sousa Rizzo, V., Sarquis, O., De Castro, D. P., Lima, M. M., ... & Azambuja, P. (2015). Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-17.
- Haas, F., & König, H. (1987). Characterisation of an anaerobic symbiont and the associated aerobic bacterial flora of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *FEMS Microbiology Ecology*, 3(2), 99-106.
- Hammer, T. J., Sanders, J. G., & Fierer, N. (2019). Not all animals need a microbiome. *FEMS microbiology letters*, 366(10), fnz117.
- H. Henrici (1938) Die Hautdrüsen der Landwanzen (Geocorisae) ihr mikroskopische Anatomie, ihr Histologie und Entwicklung. Teil 1. Die abdominalen Stinkdrüsen, die Drüsenpakete und die zerstreuten Hautdrüsen *Zool. Jb., Anat.*, 65 (1938), pp. 141-228
- Henry, T. J. (2017). Biodiversity of heteroptera. *Insect biodiversity: science and society*, 1, 279-335.
- Hongoh, Y. (2011). Toward the functional analysis of uncultivable, symbiotic microorganisms in the termite gut. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(8), 1311-1325.
- Hypša, V., & Dale, C. (1997). In vitro culture and phylogenetic analysis of “*Candidatus Arsenophonus triatominarum*,” an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 1140-1144.
- Huang, G., Wang, X., Hu, Y., Wu, Q., Nie, Y., Dong, J., ... & Wei, F. (2021). Diet drives convergent evolution of gut microbiomes in bamboo-eating species. *Science China Life Sciences*, 64(1), 88-95.

- Hurst, G. D., Jiggins, F. M., Hinrich Graf von der Schulenburg, J., Bertrand, D., West, S. A., Goriacheva, I. I., ... & Majerus, M. E. (1999). Male-killing Wolbachia in two species of insect. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 266(1420), 735-740.
- Chandler, J. A., Liu, R. M., & Bennett, S. N. (2015). RNA shotgun metagenomic sequencing of northern California (USA) mosquitoes uncovers viruses, bacteria, and fungi. *Frontiers in microbiology*, 6, 185.
- Chattopadhyay, A. K., & Choudhuri, D. K. (1981). Studies on the endocellular procaryotes in *Lohita grandis* (Gray)(Hemiptera: Pyrrhocoridae): II. cultivation of presumptive endocellular procaryotes. *Applied entomology and zoology*, 16(2), 162-164.
- Chen, S., Kaufman, M. G., Korir, M. L., & Walker, E. D. (2014). Ingestibility, digestibility, and engineered biological control potential of *Flavobacterium hibernum*, isolated from larval mosquito habitats. *Applied and environmental microbiology*, 80(3), 1150-1158.
- Cheung, W. W., & Purcell, A. H. (1993). Ultrastructure of the digestive system of the Le fopper *Euscelidius variegatus* Kirshbaum (Homoptera: Cicadellidae), with and without congenital bacterial infections. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 22(1), 49-61.
- Ingala, M. R., Becker, D. J., Bak Holm, J., Kristiansen, K., & Simmons, N. B. (2019). Habitat fragmentation is associated with dietary shifts and microbiota variability in common vampire bats. *Ecology and evolution*, 9(11), 6508-6523.
- Ivanov, I. N., Mitkova, N., Reye, A. L., Hübschen, J. M., Vatcheva-Dobrevska, R. S., Dobrev, E. G., ... & Muller, C. P. (2011). Detection of new Francisella-like tick endosymbionts in *Hyalomma* spp. and *Rhipicephalus* spp.(Acari: Ixodidae) from Bulgaria. *Applied and environmental microbiology*, 77(15), 5562-5565.
- Jaenike, J., Unckless, R., Cockburn, S. N., Boelio, L. M., & Perlman, S. J. (2010). Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. *Science*, 329(5988), 212-215.
- Jongejan, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology-Cambridge*, 129, S3.



- Jupatanakul, N., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2014). The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses*, 6(11), 4294-4313.
- Jurberg, J., & Galvão, C. (2006). Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health.
- Kämpfer, P., Chandel, K., Prasad, G. B. K. S., Shouche, Y. S., & Veer, V. (2010). Chryseobacterium culicis sp. nov., isolated from the midgut of the mosquito Culex quinquefasciatus. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(10), 2387-2391.
- Kaltenpoth, M., Winter, S. A., & Kleinhammer, A. (2009). Localization and transmission route of Coriobacterium glomerans, the endosymbiont of pyrrhocorid bugs. *FEMS Microbiology Ecology*, 69(3), 373-383.
- Kaufman MG, Walker ED, Odelson DA & Klug MJ (2000) Microbial community ecology & insect nutrition. *American Entomologist* 46: 173-185.
- Kikuchi, Y., Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2007). Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Applied and environmental microbiology*, 73(13), 4308-4316.
- Kikuchi, Y., Hosokawa, T., & Fukatsu, T. (2011). An ancient but promiscuous host-symbiont association between Burkholderia gut symbionts and their heteropteran hosts. *The ISME journal*, 5(3), 446-460.
- Kim, H. J. (2017). *Habitat-Host-Vector Interactions of Ornithodoros turicata Dugès (Ixodida: Argasidae) in Texas, USA* (Doctoral dissertation).
- King R., STANSFIELD W.D., MULLIGAN P.K., *A Dictionary of Genetics. Seventh Edition.* Oxford: Oxford University Press, 2006. ISBN 9780195307627.
- Klyachko, O., Stein, B. D., Grindle, N., Clay, K., & Fuqua, C. (2007). Localization and visualization of a Coxiella-type symbiont within the lone star tick, Amblyomma americanum. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6584-6594.
- Koerner, R. J., Goodfellow, M., & Jones, A. L. (2009). The genus Dietzia: a new home for some known and emerging opportunist pathogens. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 55(3), 296-305.

- Kollien, A., & Schaub, G. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology today*, *16*(9), 381-387.
- Krishnan, M., Bharathiraja, C., Pandiarajan, J., Prasanna, V. A., Rajendhran, J., & Gunasekaran, P. (2014). Insect gut microbiome—An unexploited reserve for biotechnological application. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, *4*, S16-S21.
- Kuechler, S. M., Renz, P., Dettner, K., & Kehl, S. (2012). Diversity of symbiotic organs and bacterial endosymbionts of lygaeoid bugs of the families Blissidae and Lygaeidae (Hemiptera: Heteroptera: Lygaeoidea). *Applied and environmental microbiology*, *78*(8), 2648-2659.
- Kurti, T. J., Felsheim, R. F., Burkhardt, N. Y., Oliver, J. D., Heu, C. C., & Munderloh, U. G. (2015). *Rickettsia buchneri* sp. nov., a rickettsial endosymbiont of the blacklegged tick *Ixodes scapularis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *65*(Pt 3), 965.
- Laroche, M., Berenger, J. M., Mediannikov, O., Raoult, D., & Parola, P. (2017). Detection of a potential new *Bartonella* species “*Candidatus Bartonella rondoniensis*” in human biting kissing bugs (Reduviidae; Triatominae). *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(1), e0005297.
- Lee, B. Y., Bacon, K. M., Connor, D. L., Willig, A. M., & Bailey, R. R. (2010). The potential economic value of a *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease) vaccine in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*, *4*(12), e916.
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.*, *25*, 697-743.
- Levine, J. F., Sonenshine, D. E., Nicholson, W. L., & Turner, R. T. (1991). *Borrelia burgdorferi* in ticks (Acari: Ixodidae) from coastal Virginia. *Journal of medical entomology*, *28*(5), 668-674.
- Ley, R. E., Lozupone, C. A., Hamady, M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2008). Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(10), 776-788.
- Lima, M. S., Laport, M. S., Lorosa, E. S., Jurberg, J., dos Santos, K. R. N., da Silva Neto, M. A. C., ... & Atella, G. C. (2018). Bacterial community composition in the salivary glands of triatomines (Hemiptera: Reduviidae). *PLoS neglected tropical diseases*, *12*(9), e0006739.
- Lim, S. J., & Bordenstein, S. R. (2020). An introduction to phylosymbiosis. *Proceedings of the Royal Society B*, *287*(1922), 20192900.

- Lu, P., Bian, G., Pan, X., & Xi, Z. (2012). Wolbachia induces density-dependent inhibition to dengue virus in mosquito cells. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(7), e1754.
- Lukashevich, E. D., & Mostovski, M. B. (2003). Hematophagous insects in the fossil record. *Paleontological Journal c/c of paleontologicheskii zhurnal*, 37(2), 153-161
- Macaluso, K. R., Sonenshine, D. E., Ceraul, S. M., & Azad, A. F. (2002). Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second Rickettsia. *Journal of medical entomology*, 39(6), 809-813.
- Mann, A. E., Mitchell, E. A., Zhang, Y., Curtis-Robles, R., Thapa, S., Hamer, S. A., & Allen, M. S. (2020). Comparison of the bacterial gut microbiome of North American *Triatoma* spp. with and without *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in microbiology*, 11, 364.
- Mans, B. J., & Neitz, A. W. (2004). Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(1), 1-17.
- Manzano-Marín, A., Oceguera-Figueroa, A., Latorre, A., Jiménez-García, L. F., & Moya, A. (2015). Solving a bloody mess: B-vitamin independent metabolic convergence among gammaproteobacterial obligate endosymbionts from blood-feeding arthropods and the leech *Haementeria officinalis*. *Genome biology and evolution*, 7(10), 2871-2884.
- Martinez, J., Longdon, B., Bauer, S., Chan, Y. S., Miller, W. J., Bourtzis, K., ... & Jiggins, F. M. (2014). Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects: a comparative analysis of Wolbachia strains. *PLoS Pathog*, 10(9), e1004369.
- McClure, E. A., Nelson, M. C., Lin, A., & Graf, J. (2021). *Macrobodella decora*: Old World leech gut microbial community structure conserved in a new world leech. *Applied and Environmental Microbiology*.
- McLean, A. H., Parker, B. J., Hrček, J., Henry, L. M., & Godfray, H. C. J. (2016). Insect symbionts in food webs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1702), 20150325.
- McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W., Sidhu, M., Wang, Y. F., & O'Neill, S. L. (2009). Stable introduction of a life-shortening Wolbachia infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323(5910), 141-144.

- Minard, G., Mavingui, P., & Moro, C. V. (2013a). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & vectors*, 6(1), 1-12.
- Minard, G., Tran, F. H., Raharimalala, F. N., Hellard, E., Ravelonandro, P., Mavingui, P., & Valiente Moro, C. (2013b). Prevalence, genomic and metabolic profiles of Acinetobacter and Asaia associated with field-caught Aedes albopictus from Madagascar. *FEMS microbiology ecology*, 83(1), 63-73.
- Mediannikov, O., Subramanian, G., Sekeyova, Z., Bell-Sakyi, L., & Raoult, D. (2012). Isolation of Arsenophonus nasoniae from Ixodes ricinus ticks in Slovakia. *Ticks and tick-borne diseases*, 3(5-6), 367-370.
- Monteiro, F. A., Barrett, T. V., Fitzpatrick, S., Cordon-Rosales, C., Feliciangeli, D., & Beard, C. B. (2003). Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors Rhodnius prolixus and R. robustus. *Molecular ecology*, 12(4), 997-1006.
- Moran, N. A., & Telang, A. (1998). Bacteriocyte-associated symbionts of insects. *Bioscience*, 48(4), 295-304.
- Moran, N. A., McCutcheon, J. P., & Nakabachi, A. (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual review of genetics*, 42, 165-190.
- Mosbacher, M. E., Klotz, S., Klotz, J., & Pinnas, J. L. (2011). Bartonella henselae and the potential for arthropod vector-borne transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(5), 471-477.
- Muegge, B. D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J. C., González, A., Fontana, L., ... & Gordon, J. I. (2011). Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science*, 332(6032), 970-974.
- Murphy, G. L., Ewing, S. A., Whitworth, L. C., Fox, J. C., & Kocan, A. A. (1998). A molecular and serologic survey of Ehrlichia canis, E. chaffeensis, and E. ewingii in dogs and ticks from Oklahoma. *Veterinary parasitology*, 79(4), 325-339.
- Murrell, A., Dobson, S. J., Yang, X., Lacey, E., & Barker, S. C. (2003). A survey of bacterial diversity in ticks, lice and fleas from Australia. *Parasitology Research*, 89(4), 326-334.
- Narasimhan, S., & Fikrig, E. (2015). Tick microbiome: the force within. *Trends in parasitology*, 31(7), 315-323.

- Neumann, A. D. S., Dias, F. D. A., Ferreira, J. D. S., Fontes, A. N. B., Rosa, P. S., Macedo, R. E., ... & Lara, F. A. (2016). Experimental infection of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Triatominae) with *Mycobacterium leprae* indicates potential for leprosy transmission. *PLoS One*, *11*(5), e0156037.
- Ngo, C. T., Aujoulat, F., Veas, F., Jumas-Bilak, E., & Manguin, S. (2015). Bacterial diversity associated with wild caught *Anopheles* mosquitoes from Dak Nong Province, Vietnam using culture and DNA fingerprint. *PLoS One*, *10*(3), e0118634.
- Noda, H., Munderloh, U. G., & Kurtti, T. J. (1997). Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Applied and environmental microbiology*, *63*(10), 3926-3932.
- Nováková, E., Hypša, V., Klein, J., Footit, R. G., von Dohlen, C. D., & Moran, N. A. (2013). Reconstructing the phylogeny of aphids (Hemiptera: Aphididae) using DNA of the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *68*(1), 42-54.
- Ohashi, N., Inayoshi, M., Kitamura, K., Kawamori, F., Kawaguchi, D., Nishimura, Y., ... & Masuzawa, T. (2005). *Anaplasma phagocytophilum*-infected ticks, Japan. *Emerging infectious diseases*, *11*(11), 1780.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'hara, R. B., ... & Oksanen, M. J. (2013). Package 'vegan'. *Community ecology package, version*, *2*(9), 1-295.
- 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.
- Oliver, K. M., and Martinez, A. J. (2014). How resident microbes modulate ecologically-important traits of insects. *Curr. Opin. Insect Sci.* *4*, 1–7. doi: 10.1016/j.cois.2014.08.001
- Oliver, K. M., & Higashi, C. H. (2019). Variations on a protective theme: *Hamiltonella defensa* infections in aphids variably impact parasitoid success. *Current opinion in insect science*, *32*, 1-7.
- Oleaga, A., Pérez Sánchez, R., & Encinas Grandes, A. (1990). Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever.

- 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.
- Palavesam, A., Guerrero, F. D., Heekin, A. M., Wang, J., Dowd, S. E., Sun, Y., ... & de Leon, A. A. P. (2012). Pyrosequencing-based analysis of the microbiome associated with the horn fly, *Haematobia irritans*. *PLoS One*, 7(9), e44390.
- Paul, K., Nonoh, J. O., Mikulski, L., & Brune, A. (2012). "Methanoplasmatales," Thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8245-8253.
- Peacock, L., Cook, S., Ferris, V., Bailey, M., & Gibson, W. (2012). The life cycle of *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense* in the tsetse fly. *Parasites & vectors*, 5(1), 1-13.
- Perkins, S. L., Budinoff, R. B., & Siddall, M. E. (2005). New Gammaproteobacteria associated with blood-feeding leeches and a broad phylogenetic analysis of leech endosymbionts. *Applied and environmental microbiology*, 71(9), 5219-5224.
- Pontes, M. H., & Dale, C. (2006). Culture and manipulation of insect facultative symbionts. *Trends in microbiology*, 14(9), 406-412.
- Ribeiro JMC, Arcà B. Chapter 2 from sialomes to the sialoverse: an insight into salivary potion of blood-feeding insects. In: *Advances in Insect Physiology*. Academic Press; 2009. p. 59–118. doi:[https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(09\)37002-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(09)37002-2).
- Rich, S. M., Caporale, D. A., Telford, S. R., Kocher, T. D., Hartl, D. L., & Spielman, A. (1995). Distribution of the *Ixodes ricinus*-like ticks of eastern North America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(14), 6284-6288.
- Rodriguez-Ruano, S. M., Škočová, V., Rego, R. O. M., Schmidt, J. O., Roachell, W., Hypša, V., & Novakova, E. (2018). Microbiomes of North American Triatominae: the grounds for Chagas disease epidemiology. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1167.
- Říhová, J., Nováková, E., Husník, F., & Hypša, V. (2017). *Legionella* becoming a mutualist: adaptive processes shaping the genome of symbiont in the louse *Polyplax serrata*. *Genome Biology and Evolution*, 9(11), 2946-2957.

- Salem, H., Kreutzer, E., Sudakaran, S., & Kaltenpoth, M. (2013). A ctenobacteria as essential symbionts in firebugs and cotton stainers (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Environmental microbiology*, 15(7), 1956-1968.
- Sassera, D., Beninati, T., Bandi, C., Bouman, E. A., Sacchi, L., Fabbi, M., & Lo, N. (2006). 'Candidatus Midichloria mitochondrii', an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(11), 2535-2540.
- Scoles, G. A. (2004). Phylogenetic analysis of the Francisella-like endosymbionts of Dermacentor ticks. *Journal of medical entomology*, 41(3), 277-286.
- Shi, W., Syrenne, R., Sun, J. Z., & Yuan, J. S. (2010). Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the 'omics' age. *Insect Science*, 17(3), 199-219.
- Schaefer, C. W., & Ahmad, I. (2000). Cotton stainers and their relatives (Pyrrhocoroidea: Pyrrhocoridae and Largidae). *Heteroptera of economic importance*, 271-307.
- Schmitz, O. J., & Price, J. R. (2011). Convergence of trophic interaction strengths in grassland food webs through metabolic scaling of herbivore biomass. *Journal of Animal Ecology*, 80(6), 1330-1336.
- Schofield, C. J. Biosystematics and evolution of the Triatominae. *Cadernos de Saúde Pública*. 2000, 16, 89 – 92.
- Schofield, C. J., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta tropica*, 110(2-3), 88-100.
- Schofield, C. J., Jannin, J., & Salvatella, R. (2006). The future of Chagas disease control. *Trends in parasitology*, 22(12), 583-588.
- Siddall, M. E., Perkins, S. L., & Desser, S. S. (2004). Leech mycetome endosymbionts are a new lineage of alphaproteobacteria related to the Rhizobiaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(1), 178-186.
- Socha R., (1993). *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera)-an experimental model species: a review. *Eur. J. Entomol*, 90(3), 241-286.
- Sonenshine, D. E., Lane, R. S., & Nicholson, W. L. (2002). Ticks (Ixodida). In *Medical and veterinary entomology* (pp. 517-558). Academic Press.

- Song, S. J., Sanders, J. G., Baldassarre, D. T., Chaves, J. A., Johnson, N. S., Piaggio, A. J., ... & Aguilar-Setién, A. (2019). Is there convergence of gut microbes in blood-feeding vertebrates?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, *374*(1777), 20180249.
- Southwood, R., & Leston, D. (1959). Land and water bugs of the British Isles.
- Smith, T. A., Driscoll, T., Gillespie, J. J., & Raghavan, R. (2015). A Coxiella-like endosymbiont is a potential vitamin source for the Lone Star tick. *Genome biology and evolution*, *7*(3), 831-838.
- Sudakaran, S., Salem, H., Kost, C., & Kaltenpoth, M. (2012). Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Molecular Ecology*, *21*(24), 6134-6151.
- Sun, L. V., Scoles, G. A., Fish, D., & O'Neill, S. L. (2000). Francisella-like endosymbionts of ticks. *Journal of invertebrate pathology*, *76*(4), 301-303.
- Takeshita, K., Matsuura, Y., Itoh, H., Navarro, R., Hori, T., Sone, T., ... & Kikuchi, Y. (2015). Burkholderia of plant-beneficial group are symbiotically associated with bordered plant bugs (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). *Microbes and environments*, ME15153.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The human microbiome project. *Nature*, *449*(7164), 804.
- Vallejo, G. A., Guhl, F., & Schaub, G. A. (2009). Triatominae–Trypanosoma cruzi/T. rangeli: Vector–parasite interactions. *Acta tropica*, *110*(2-3), 137-147.”
- Verhulst, N. O., Andriessen, R., Groenhalen, U., Kiss, G. B., Schulz, S., Takken, W., ... & Smallegange, R. C. (2010). Differential attraction of malaria mosquitoes to volatile blends produced by human skin bacteria. *PloS one*, *5*(12), e15829.
- Vial, L. (2009). Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite*, *16*(3), 191-202.
- Villacís, A. G., Arcos-Terán, L., & Grijalva, M. J. (2008). Life cycle, feeding and defecation patterns of *Rhodnius ecuadoriensis* (Lent & León 1958)(Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *103*(7), 690-695.



- Vinokurov, K. S., & Koloniuk, I. (2019). Discovery and characterization of a novel alphavirus-like RNA virus from the red firebug *Pyrrhocoris apterus* L.(Heteroptera). *Journal of invertebrate pathology*, *166*, 107213.
- Wang, Y., Brožek, J., & Dai, W. (2020). Morphological disparity of the mouthparts in polyphagous species of Largidae (Heteroptera: Pentatomomorpha: Pyrrhocoroidea) reveals feeding specialization. *Insects*, *11*(3), 145.
- Weiss, B. L., Wang, J., & Aksoy, S. (2011). Tsetse immune system maturation requires the presence of obligate symbionts in larvae. *PLoS Biol*, *9*(5), e1000619.
- Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E. (2008). Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(10), 741-751.
- Wilson, A. C., Ashton, P. D., Calevro, F., Charles, H., Colella, S., Febvay, G., ... & Douglas, A. E. (2010). Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, with its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect molecular biology*, *19*, 249-258.
- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C., & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the national academy of sciences*, *106*(10), 3698-3703.
- Yadav, K. K., Chandel, K., Bhagyawant, S. S., & Veer, V. (2018). 14 Midgut Bacterial Microbiota of Important Mosquito Disease Vectors and Its Role in Control of Parasite Transmission. *Microbial Control of Vector-Borne Diseases*.
- Yang, J., Liu, Z., Guan, G., Liu, Q., Li, Y., Chen, Z., ... & Yin, H. (2013). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in ruminants, rodents and ticks in Gansu, north-western China. *Journal of medical microbiology*, *62*(2), 254-258.
- Zárate, L. G., & Zárate, R. J. (1985). A checklist of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) of Mexico. *International Journal of Entomology*, *27*(1-2), 102-127.

## 8. Přílohy

Tab.P1: Soubor vzorků

Pracovní název	Taxonomie	Řád	Instar	Místo sběru	Templát	Potrava
CH2H7	<i>Largus californicus</i>	Hemiptera	L6	Chaparral	střevo	rostlinné šťávy
CH2T18	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1	Chaparral	celé tělo	krev
CH2H1	<i>Largus californicus</i>	Hemiptera	L6	Chaparral	střevo	rostlinné šťávy
CH2T2	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1_L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2H2	<i>Largus californicus</i>	Hemiptera	L6	Chaparral	střevo	rostlinné šťávy
CH2T3	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1_L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2H3	<i>Largus californicus</i>	Hemiptera	L6	Chaparral	střevo	rostlinné šťávy
CH2T6	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1_L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2H4	<i>Largus californicus</i>	Hemiptera	L6	Chaparral	střevo	rostlinné šťávy
CH2T16	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1_L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2H5	<i>Largus californicus</i>	Hemiptera	L6	Chaparral	střevo	rostlinné šťávy
CH2T17	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1_L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2H6	<i>Largus californicus</i>	Hemiptera	L6	Chaparral	střevo	rostlinné šťávy
CH2T10	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1_L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T11	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1_L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T19	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1_L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T22	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1_L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T15	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1_L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T23	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L1_L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T9	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T13	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T14	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L2	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T1	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L2_L3	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T7	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L2_L3	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T12	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L2_L3	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T20	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L2_L3	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T21	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L2_L3	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T4	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L3_L4	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T5	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L3_L4	Chaparral	celé tělo	krev
CH2T8	<i>Ornithodoros turicata</i>	Ixodida	L3_L4	Chaparral	celé tělo	krev
2CH49G	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L5	Chaparral	střevo	krev
2CH08A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L2	Chaparral	abdomen	krev
2CH48A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L1	Chaparral	abdomen	krev
2CH19G	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L3	Chaparral	abdomen	krev
2CH20G	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L3	Chaparral	abdomen	krev
2CH22G	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L3	Chaparral	abdomen	krev
2CH31G	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L3	Chaparral	abdomen	krev
2CH32G	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L3	Chaparral	abdomen	krev

Pracovní název	Taxonomie	Řád	Instar	Místo sběru	Templát	Potrava
2CH10A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L2	Chaparral	abdomen	krev
2CH11A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L2	Chaparral	abdomen	krev
2CH13A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L2	Chaparral	abdomen	krev
2CH15A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L2	Chaparral	abdomen	krev
2CH24A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L2	Chaparral	abdomen	krev
2CH37A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L2	Chaparral	abdomen	krev
2CH55A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L2	Chaparral	abdomen	krev
2CH56A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L2	Chaparral	abdomen	krev
2CH05A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L1	Chaparral	abdomen	krev
2CH12A	<i>Triatoma gerstaeckeri</i>	Hemiptera	L1	Chaparral	abdomen	krev
2CH04G	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L6	Chaparral	střevo	krev
2CH28G	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L6	Chaparral	střevo	krev
2CH39G	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L5	Chaparral	střevo	krev
2CH51G	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L5	Chaparral	střevo	krev
2CH41G	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L4	Chaparral	střevo	krev
2CH42G	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L4	Chaparral	střevo	krev
2CH43G	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L4	Chaparral	střevo	krev
2CH44G	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L4	Chaparral	střevo	krev
2CH06G	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L3	Chaparral	střevo	krev
2CH07G	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L3	Chaparral	střevo	krev
2CH45G	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L3	Chaparral	střevo	krev
2CH46A	<i>Triatoma lecticularia</i>	Hemiptera	L2	Chaparral	abdomen	krev
TU31i6A2	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L6	UADS	abdomen	krev
TU52i6A3	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L6	UADS	abdomen	krev
TU53i6A0	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L6	UADS	abdomen	krev
TU28i5A1	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L5	UADS	abdomen	krev
TU35i5A1	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L5	UADS	abdomen	krev
TU69i6A1	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L6	UADS	abdomen	krev
TU49i4A2	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU71i5A1	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L5	UADS	abdomen	krev
TU81i5A0	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L5	UADS	abdomen	krev
TU49i4B1	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU58i3A1	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU59i3A3	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU62i3A2	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU66i3A1	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU50i3A3	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU50i3C3	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU56i3B3	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU84i2A0	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L2	UADS	abdomen	krev
TU1i4A3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU38i4A2	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU47i4A3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU48i4A1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev

Pracovní název	Taxonomie	Řád	Instar	Místo sběru	Templát	Potrava
TU64i4A2	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU74i4A1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU2i4A3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU36i4A3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU36i4B3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU36i4C3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU37i4A3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU37i4B3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU39i4B1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU39i4C1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU54i4A3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU54i4B2	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU55i4A1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU55i4B1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU55i4C1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU55i4D1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L4	UADS	abdomen	krev
TU4i3A3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU5i4A1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU65i3A2	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU67i3A2	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU30i3A3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU30i3D3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU30i3E3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU30i3F3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU40i3A3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU40i3B3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU41i3B2	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU50i3B3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU56i3C3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU57i3A1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU57i3B1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L3	UADS	abdomen	krev
TU60i2A3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L2	UADS	abdomen	krev
TU60i2B3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L2	UADS	abdomen	krev
TU60i2C3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L2	UADS	abdomen	krev
TU60i2D2	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L2	UADS	abdomen	krev
TU68i2A2	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L2	UADS	abdomen	krev
TU68i2C2	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L2	UADS	abdomen	krev
TU68i2D2	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L2	UADS	abdomen	krev
LC35i5A3	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L5	LCNCA	abdomen	krev
LC34i5A1	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L5	LCNCA	abdomen	krev
LC36i4A1	<i>Triatoma protracta</i>	Hemiptera	L4	LCNCA	abdomen	krev
LC32i5A1	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L5	LCNCA	abdomen	krev
LC33i2A3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L2	LCNCA	abdomen	krev
LC33i2B3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L2	LCNCA	abdomen	krev

Pracovní název	Taxonomie	Řád	Instar	Místo sběru	Templát	Potrava
LC33i2C3	<i>Triatoma rubida</i>	Hemiptera	L2	LCNCA	abdomen	krev
U2V33	prach	-	-	LCNCA	-	-
U3V34	dřevo	-	-	LCNCA	-	-
U4V35	roztoči	-	-	LCNCA	-	-

Tab.P2: Forward primery pro amplikonové knihovny

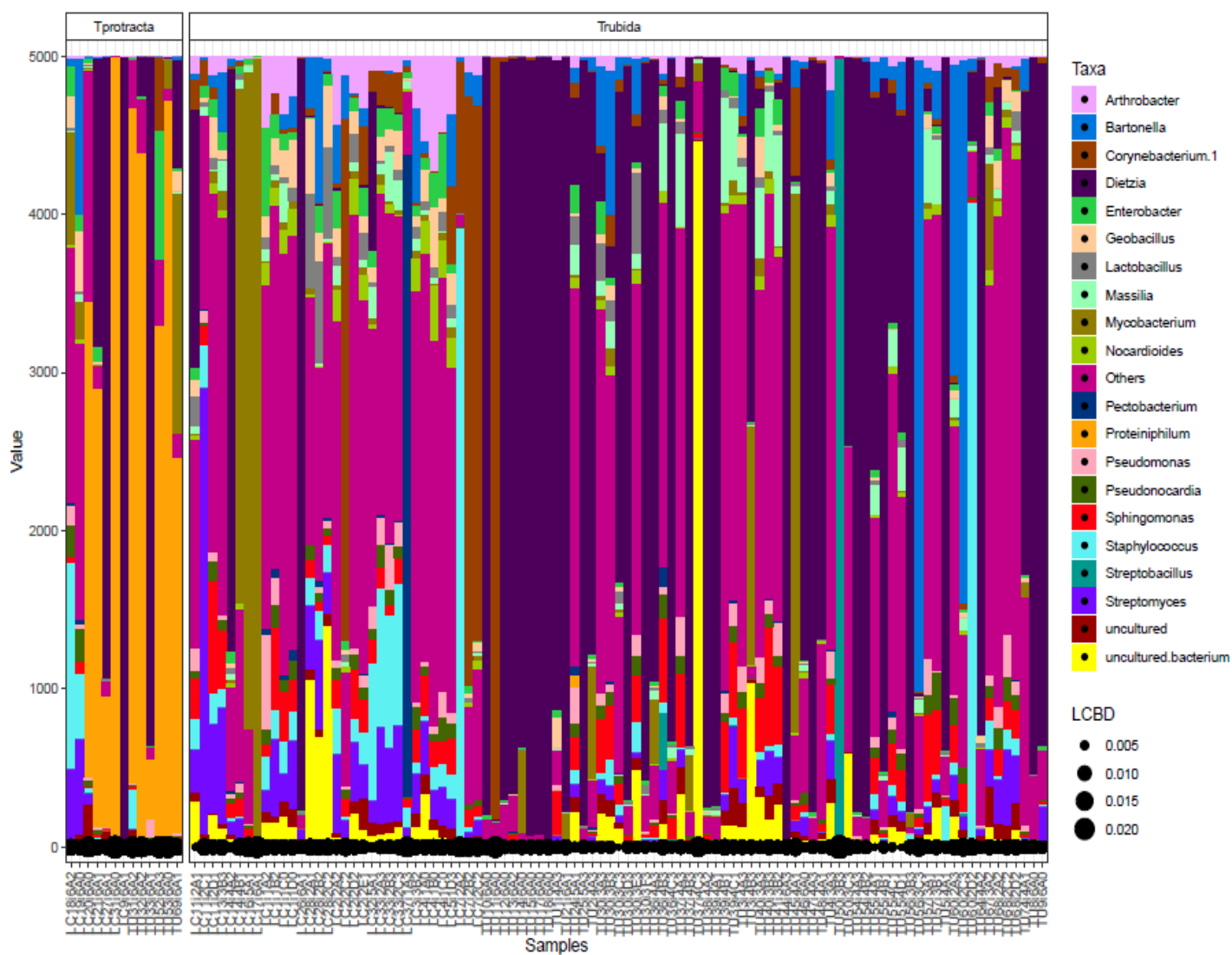
Forward primer	Sekvence
515rebc0	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAGCCTTCGTCGCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc1	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTCCATACCGAATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc2	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAGCCCTGCTACATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc3	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCCTAACGGTCCATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc4	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCGCGCCTAAACTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc5	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTATGGTACCCAGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc6	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTACAATATCTGTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc7	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAATTTAGGTAGGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc8	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGACTCAACCAGTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc9	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGCCTCTACGTCGATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc10	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTACTACTGAGGATTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc11	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAATTCACCTCCTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc12	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCGTATAAATGCGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc13	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTATGCTGCAACACTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc14	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTACTCGTCTGCTGATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc15	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTTCCTTAGTAGTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc16	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCGTCCGTATGAATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc17	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTACGTGAGGAACGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc18	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGGTTGCCCTGTATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc19	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCATATAGCCCGATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc20	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGCCTATGAGATCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc21	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCAAGTGAAGGGATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc22	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCACGTTTATTCCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc23	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTAATCGGTGCCATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc24	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGACTAATGGCCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc25	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCGGGACACCCGATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc26	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCTGTCTATACTATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc27	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTATGCCAGAGATTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc28	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCGTTTGAATGATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc29	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAAGAATCATGATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc30	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGATATCGTCTTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc31	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCGGTGACCTACTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc32	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAATGCGCGTATATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc33	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCTTGATTCTTGATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc34	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGAAATCTTGAAGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc35	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGAGATACAGTTCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc36	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGTGGAGTCTCATTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA

Forward primer	Sequence
515rebc37	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTACCTTACACCTTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc38	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTAATCTCGCCGGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc39	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTATCTAGTGGCAATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc40	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTACGCTTAACGACTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc41	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTACGGATTATGGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc42	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTATACATGCAAGATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc43	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCTAGTGCAGAAATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc44	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAATCTTGCGCCGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc45	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAGGATCAGGGAATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc46	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAATAACTAGGGTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc47	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTATTGCAGCAGCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc48	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGATGTGCTAAGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc49	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGTAGTAGACCATTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc50	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAGTAAAGATCGTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc51	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCTCGCCCTCGCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc52	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTCTCTTTCGACATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc53	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTACATACTGAGCATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc54	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGTTGATACGATGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc55	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGTCAACGCTGTCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc56	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGAGACCCTACATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc57	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTACTTGGTGTAAAGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc58	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTATTACGTATCATTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc59	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCACGCAGTCTACTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc60	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGTGCACGCCATTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc61	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCCGGACAAGAAGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc62	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGTCTGGACGCTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc63	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTACTAACGCGTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc64	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGCGATCACACCTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc65	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCAAACGCTAATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc66	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGAAGAGGGTTGATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc67	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGAGTGGTCTGTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc68	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTACACAAAGGCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc69	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTACGACGATTGTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc70	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTATCCAAGCGCATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc71	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAGAGCCAAGAGCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc72	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGGTGAGCAAGCATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc73	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTAAATATACCCTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc74	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTTCGGACCTATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc75	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGTCGTCCAAATGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc76	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGCACAGTCGCTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc77	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTACTGTGGCCGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc78	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGGTTCATGAACATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc79	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTAAACAATAATCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc80	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCTTATTAACGTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc81	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGCTCGAAGATTCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc82	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTATTTGATTGGTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc83	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGTCAAAGTGACTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA

<b>Forward primer</b>	<b>Sekvence</b>
515rebc84	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCTATGTATTAGTTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc85	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTACTCCCGTGTGATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc86	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCGGTATAGCAATTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc87	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGACTCTGCTCAGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc88	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGTATGCTCCAGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc89	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTACCGAAGGTATTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc90	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTTGTAGTATGAGTATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc91	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTAATGGTTCAGCATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc92	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGAACAGTACTCTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc93	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTCGCACCCATACATATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc94	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTGTGCCATAATCGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA
515rebc95	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGCTACTCTACTTAGTATGGTAATTGTGTGYCAGCMGCCGCGGTAA

Tab.P3: Reverse primery pro amplikonové knihovny

<b>Reverse</b>	<b>Sekvence</b>
926rebc0	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACCTCAGTCAGCCAGCCCCGYCAATTYMTTTRAGTTT
926rebc6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATCAGAGTCAGCCAGCCCCGYCAATTYMTTTRAGTTT
926rebc2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCCAGCAGTCAGCCAGCCCCGYCAATTYMTTTRAGTTT
926rebc3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTACTAAGTCAGCCAGCCCCGYCAATTYMTTTRAGTTT
926rebc12	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATATTGAAGTCAGCCAGCCCCGYCAATTYMTTTRAGTTT



Obr.P1: Mikrobiomové profily *T. protracta* a *T. rubida* z lokalit LCNCA a UADS





Tab.P4: Sdílené OTU u analyzovaných druhů hematofágů

OTU	Taxonomie	OTU	Taxonomie
OTU_103	Bordetella (Betaproteobacteria)	OTU_263	Devosia (Alphaproteobacteria)
OTU_104	Luteimonas (Gammaproteobacteria)	OTU_264	Novosphingobium (Alphaproteobacteria)
OTU_1054	Microbacterium (Actinobacteria)	OTU_292	Oxalobacteraceae (Betaproteobacteria)
OTU_112	Pseudomonas (Gammaproteobacteria)	OTU_298	Corynebacterium (Actinobacteria)
OTU_114	Flavobacterium (Flavobacteriia)	OTU_306	Microbacterium (Actinobacteria)
OTU_129	Rhodobacteraceae (Alphaproteobacteria)	OTU_31	Pseudomonas (Gammaproteobacteria)
OTU_13	Acinetobacter (Gammaproteobacteria)	OTU_323	Sphingobacterium (Sphingobacteriia)
OTU_131	Sphingomonas (Alphaproteobacteria)	OTU_349	Roseomonas (Alphaproteobacteria)
OTU_139	Comamonadaceae (Betaproteobacteria)	OTU_362	Chryseobacterium (Flavobacteriia)
OTU_1637	Chroococciopsis (Cyanobacteria)	OTU_4	Staphylococcus (Firmicutes)
OTU_19	Tatumella (Gammaproteobacteria)	OTU_434	Altererythrobacter (Alphaproteobacteria)
OTU_191	Mesorhizobium (Alphaproteobacteria)	OTU_457	Sphingomonas (Alphaproteobacteria)
OTU_2	Enterococcus (Firmicutes)	OTU_495	Sphingobacterium (Sphingobacteriia)
OTU_217	Flavobacterium (Flavobacteriia)	OTU_50	Stenotrophomonas (Gammaproteobacteria)
OTU_224	Methylobacterium (Alphaproteobacteria)	OTU_51	Rhizobium (Alphaproteobacteria)
OTU_228	Sphingomonas (Alphaproteobacteria)	OTU_54	Chryseobacterium (Flavobacteriia)
OTU_23	Acinetobacter (Gammaproteobacteria)	OTU_552	Agrococcus (Actinobacteria)
OTU_237	Lysinibacillus (Bacilli)	OTU_56	Sphingobacterium (Sphingobacteriia)
OTU_25	Rhodobacter (Alphaproteobacteria)	OTU_58	Chryseobacterium (Flavobacteriia)
OTU_259	Roseomonas (Alphaproteobacteria)	OTU_612	Polyangiaceae (Deltaproteobacteria)
OTU_7	Escherichia-Shigella (Gammaproteobacteria)	OTU_62	Massilia (Betaproteobacteria)
OTU_70	Nubsella (Sphingobacteriia)	OTU_989	Serratia (Gammaproteobacteria)