

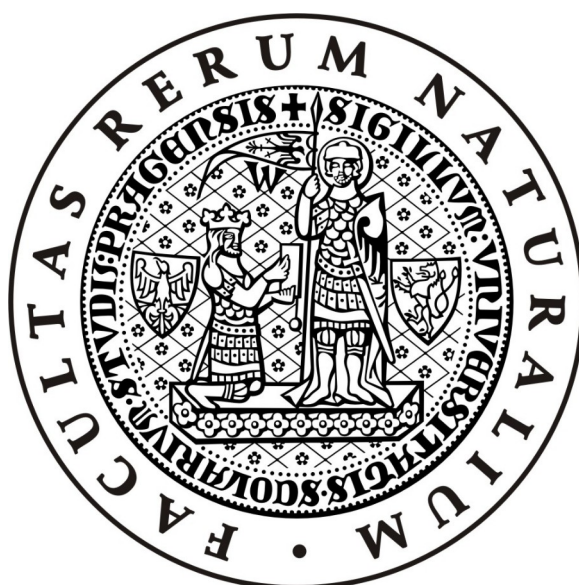
UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program Biologie

Studijní obor Parazitologie

Katedra parazitologie



Bc. Michal Šíma

**Hostitelská specifita, diverzita a distribuce malarických parazitů
v kontaktní zóně dvou druhů slavíků**

Host specificity, diversity and distribution of avian malaria parasites
in a contact zone of two nightingale species

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Pavel Munclinger Ph.D.

Školitel specialista: doc. RNDr. Jan Votýpka Ph.D.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Pavlu Munclingerovi za vedení, které mi během celé práce ve své laborce poskytoval a za cenné rady při sepisování této diplomky. Také bych chtěl velmi poděkovat Petru Synkovi, který mě zasvětil do laboratorních technik a udělal si na mě čas vždy, když bylo třeba. Mé poděkování patří i Janu Votýpkovi za odborné rady z oblasti parazitologie, dále Radce Reifové a jejímu týmu (bez nichž by práce na toto téma nemohla vzniknout) za odchyt ptáků a izolaci DNA, Honzovi Suchanovi za pomoc s kvantitativní PCR, Tomáši Albrechtovi za statistické analýzy a samozřejmě GA ČR (P506/10/0716) za financování projektu. V neposlední řadě chci poděkovat své rodině a přítelkyni, kteří mě nejen během sepisování této práce podporovali.

Abstrakt

Předpokládá se, že kontaktní zóna ptáků funguje jako bariéra pro rozšiřující se populace parazitů. Studoval jsem Haemosporida (rodů *Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*) dvou druhů slavíků, jejichž kontaktní zóna leží v Evropě. Celkem jsem detekoval 20 linií parazitů. Oba druhy slavíků sdílely všechny hlavní linie hemosporid. Celková prevalence se velmi lišila mezi dvěma druhy hostitelů (slavík tmavý byl více parazitován než slavík obecný), ale příliš se neměnila v různých zónách uvnitř jednoho druhu. Parazitémie nejběžnější linie LULU1 z rodu *Haemoproteus*, zjištěná pomocí kvantitativní PCR, se nelišila významně mezi dvěma druhy hostitelů. Bylo parazitováno šest z devíti odchycených hybridů. Genetické linie v nich nalezené byly stejné jako běžné linie u rodičovských druhů. Zdá se, že kontaktní zóna má malý (nebo žádný) vliv na rozšíření parazitů ze skupiny hemosporida.

Abstract

Avian contact zones were suggested to act as barriers to parasite expansions. I studied haemosporidian parasites (genera *Plasmodium*, *Haemoproteus*, and *Leucocytozoon*) of two Nightingale species which meet in a contact zone in Europe. In total 20 lineages of parasites were detected. Surprisingly, all common lineages were shared by the two host species. The parasite prevalence vary between species (Trush Nightingales were more often parasitized than Common Nightingales.) but did not vary to a large extent within zones inside species. Parasitemia of the most frequent *Haemoproteus* LULU1 lineage assessed by Real-Time PCR method did not differ significantly between the two host species. Six out of nine hybrids of the nightingale species were parasitized. Haemosporidian lineages found in hybrids were also frequent in the parental species. In conclusion, the nightingale contact zone seems to have only little (if any) effect on the distribution of haemosporidian parasites.

I OBSAH

I OBSAH	4
II ÚVOD A CÍLE PRÁCE	6
II. 1 ÚVOD.....	6
II. 2 CÍLE PRÁCE.....	8
III LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	9
III. 1 PARAZITI V HYBRIDNÍCH ZÓNÁCH	9
III. 2 STUDOVANÍ HOSTITELÉ	11
III. 2. 1 Slavík tmavý (<i>Luscinia luscinia</i>).....	11
III. 2. 2 Slavík obecný (<i>Luscinia megarhynchos</i>).....	12
III. 2. 3 Genetické analýzy	14
III. 3 ŽIVOTNÍ CYKLY A ZPŮSOBY PŘENOSU PTAČÍCH HEMOSPORID.....	17
III. 3. 1 Haemoproteidae	18
III. 3. 2 Plasmodidae	19
III. 3. 3 Leucocytozoidae.....	20
III. 4. PREVALENCE A SPECIFICITA PTAČÍCH HEMOSPORID.....	23
III. 4. 1 Studie na větším počtu hostitelských druhů.....	23
III. 4. 2 Studie na jednom hostitelském druhu.....	26
III. 4. 3 Studie podobné našemu výzkumu.....	31
IV METODIKA.....	35
IV. 1 ODCHYT PTÁKŮ, IZOLACE DNA A IDENTIFIKACE DRUHŮ.....	35
IV. 2 NESTED PCR	36
IV. 3 AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA A SEKVENACE.....	38
IV. 4 URČENÍ GENETICKÝCH LINIÍ PARAZITŮ A SMÍŠENÉ INFEKCE	39
IV. 5 KVANTITATIVNÍ PCR.....	40
IV. 6 TVORBA FYLOGENETICKÝCH STROMŮ.....	44
IV. 7 STATISTICKÉ ANALÝZY.....	44
V VÝSLEDKY	46
V. 1 PREVALENCE HEMOSPORID U SLAVÍKŮ.....	46
V. 1. 1 Celkové prevalence u slavíka obecného a slavíka tmavého	46
V. 1. 2 Detekované genetické linie u slavíka obecného a slavíka tmavého	47
V. 1. 3 Prevalence u slavíků v dalekých alopatriích.....	49
V. 1. 4 Detekované genetické linie u slavíků v dalekých alopatriích.....	50
V. 1. 5 Prevalence u slavíků v blízkých alopatriích.....	51
V. 1. 6 Detekované genetické linie u slavíků v blízkých alopatriích.....	52
V. 1. 7 Prevalence u slavíků v sympatrii.....	53
V. 1. 8 Detekované genetické linie u slavíků v sympatrii.....	54

V. 2 POROVNÁNÍ DIVERZITY A PREVALENCE MEZI DRUHY	55
V. 3 DETEKOVANÉ SMÍŠENÉ INFEKCE	59
V. 4 FYLOGENETICKÉ STROMY	60
V. 4. 1 <i>Haemoproteus</i> spp.	61
V. 4. 2 <i>Plasmodium</i> spp.	62
V. 4. 3 <i>Leucocytozoon</i> spp.	63
V. 5 HOSTITELSKÁ SPECIFICITA GENETICKÝCH LINIÍ.....	64
V. 6 GEOGRAFICKÉ ROZŠÍŘENÍ VYBRANÝCH LINIÍ	66
V. 7 PARAZITÉMIE	70
V. 8 HYBRIDI.....	71
VI DISKUZE.....	72
VI. 1 PREVALENCE A DETEKOVANÉ LINIE.....	72
VI. 2 SPECIFICITA A GEOGRAFICKÉ ROZŠÍŘENÍ HEMOSPORID.....	75
VI. 3 SMÍŠENÉ INFEKCE.....	77
VI. 4 PARAZITÉMIE.....	77
VI. 5 KONTAKTNÍ ZÓNA	78
VII ZÁVĚRY	81
VIII PŘÍLOHY	83
IX CITOVANÁ LITERATURA	977

II ÚVOD A CÍLE PRÁCE

II. 1 ÚVOD

Hybridní (nebo kontaktní) zóny jsou oblasti, kde se vyskytují dvě populace odlišitelné na základě jedné nebo více dědičných vlastností. Ty se zároveň časově i prostorově překrývají a kříží. Poskytují při tom životaschopné a alespoň částečně plodné potomstvo (Arnold 1997). Jejich studium dlouhou dobu probíhalo jen na rostlinných systémech a to z několika důvodů. Tím nejzákladnějším byl asi fakt, že se lidé domnívali, že k hybridizaci (křížení dvou příbuzných druhů) u živočichů dochází málo, a tak není důležité tento fenomén sledovat. Později se ovšem ukázalo, že i v živočišných systémech je to poměrně častý jev, kterému je třeba se věnovat. I z těchto důvodů byly první studie zaměřené na parazity v hybridních zónách rostlin, později živočichů, ze kterých může mít člověk nějaký (převážně ekonomický) užitek a až později se vědci zaměřili na volně žijící živočichy a jejich parazity (Mouliá 1999).

Přirozené kontaktní zóny jsou dobrým modelem pro studium, protože ukazují přirozenou situaci bez experimentálních zásahů. Nejvíce studií bylo provedeno v hybridní zóně myši *Mus musculus musculus* a *M. m. domesticus* a jejich parazitických helmintech i prvocích (Sage et al. 1986, Mouliá et al. 1993, Derothe et al. 1997, Derothe et al. 1999, Derothe et al. 2001).

My jsme si pro tuto práci zvolili kontaktní zónu dvou blízce příbuzných hostitelských druhů, slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*) a slavíka tmavého (*L. luscinia*). Jedná se o tažné ptáky z řádu pěvců (Passeriformes) a čeledi lejskovitých (Muscicapidae). Oba druhy zimují v Africe a hnízdí v Evropě (Hudec et al. 1983). K jejich divergenci došlo podle sekvence mitochondriálního cytochromu b během pleistocénu před 3,3 miliony let (Wink et al. 2002). Po skončení doby ledové následoval návrat z refugií kolem Středomoří do původních areálů rozšíření, kde se druhy opět setkaly. K tomuto kontaktu došlo ve střední a východní Evropě. Zde se pak vytvořila kontaktní hybridní zóna těchto druhů (Sorjonen et al. 1986).

Stejně jako další živočichové jsou i ptáci hostiteli spousty parazitů. Takovou velkou skupinou parazitů jsou i Haemosporida. Jedná se o monofyletickou skupinu obligátně dixenních (dvouhostitelských) protist (Perkins et al. 2002). Patří do kmene Apicomplexa a jsou typičtí tím, že se jejich merogonie a tvorba gametocytů odehrává v obratlovčím hostiteli a transformace gametocytů v gamety a pohlavní rozmnožování probíhá ve vektorech (definitivních hostitelích), kterými jsou různí zástupci krevsajícího dvoukřídleho hmyzu

(Diptera). Haemosporida mají pohyblivou zygotu, zoitům chybí konoid a počet mikrogamet je relativně malý (Valkiunas 2005).

Ptačí hemosporida byla studována v mnoha systémech. Jednalo se o práce, které se zabývaly buď velkým množstvím hostitelských druhů, převážně ze skupiny pěvců (např. Bensch et al. 2000, Richard et al. 2002, Pérez-Tris et al. 2007), nebo jedním konkrétním druhem pěvce (např. Rintamäki et al. 1998, Hatchwell et al. 2000, Waldenström et al. 2004). Hlavním cílem vědců bylo zjistit prevalenci, diverzitu a specifitu hemosporid (převážně rodů *Plasmodium* a *Haemoproteus*) u svých hostitelů.

Další rozměr studia ptačích hemosporid nastínili ve svých pracích Reullier et al. 2006 a Wiley et al. 2009. Tito autoři se věnovali hemosporidům v kontaktních zónách dvou druhů pěvců. V prvním případě se jednalo o sedmihláska hajního a sedmihláska švitořivého, kdy autoři na základě nested PCR a následné sekvenace objevili osm unikátních genetických linií hemosporid. Většina z nich vykazovala vysokou hostitelskou specifitu a hlavní podíl prevalence tvořil rod *Haemoproteus*. Také zjistili, že dochází k přeskoku parazitů mezi druhy hostitelů v kontaktní zóně (Reullier et al. 2006). V druhém případě šlo o kontaktní zónu lejska černohlavého a lejska bělokrkého. Autoři pro určení prevalence použili pouze metodu pozorování krevních roztěrů světelným mikroskopem. Na jejím základě byli schopni určit jen prevalenci (zabývali se pouze rodem *Haemoproteus*). Podařilo se jim odchytit několik hybridních jedinců, takže byli schopni porovnat, jak se liší prevalence u kříženců a jejich rodičů (Wiley et al. 2009).

Obě tyto studie mají na jednu stranu své velké klady, ale na druhou stranu i několik podstatných nedostatků, kterým bych se ve své práci rád vyvaroval. V obou sice byli autoři schopni určit hodnotu prevalence, ale ani v jednom případě se nezabývali mírou nakažení hostitelů, tedy parazitémií. Ve druhé studii dokonce nepoužili k určení prevalence žádné molekulární metody, takže neodhalili nic o diverzitě ani specifitě jednotlivých genetických linií hemosporid.

Důvodů, proč jsem si vybral právě krevní hemosporida je několik. Dají se jednoduše detekovat z krve například pomocí metody nested PCR (Hellgren et al. 2004), proto není nutné hostitele zabíjet a navíc se vyskytují ve velké spoustě unikátních genetických linií, takže poskytují mnoho informací o diverzitě a hostitelské specifitě.

Tým Radky Reifové shromáždil v letech 2006-2009 krevní vzorky z obou druhů slavíků a jejich hybridů napříč celým hnízdním areálem z Evropy (i několik vzorků ze severní Afriky). Dohromady jsem poté analyzoval DNA z 370 ptáků ze zón daleké alopatrie, blízké alopatrie a sympatrie. Doposud bylo u slavíka obecného a slavíka tmavého nalezeno osm

genetických linií hemosporid (tři z rodu *Haemoproteus* a pět z rodu *Plasmodium*) (Bensch et al. 2009). Díky této studii jsem objevil dalších 14 linií rodu *Plasmodium* a tři linie rodu *Leucocytozoon*, které mohou parazitovat v těchto hostitelských druzích.

II. 2 CÍLE PRÁCE

Diplomová práce si klade za cíl:

- 1) určit celkovou prevalenci ptačích hemosporid u dvou blízce příbuzných druhů slavíků (*Luscinia luscinia* a *L. megarhynchos*) a jejich hybridů,
- 2) porovnat prevalenci rodů hemosporid u hostitelských druhů na jednotlivých odchyťových lokalitách (daleká alopatrie, blízká alopatrie a sympatrie),
- 3) určit genetické linie (unikátní haplotypy) ptačích hemosporid u těchto hostitelů a tím zjistit jejich diverzitu,
- 4) porovnat hostitelskou specifitu nalezených parazitů,
- 5) vytvořit fylogenetické stromy pro jednotlivé rody hemosporid (*Haemoproteus*, *Plasmodium* a *Leucocytozoon*) pro ilustraci genetické příbuznosti k definovaným druhům (morfo-species) a
- 6) porovnat pomocí kvantitativní PCR hodnotu parazitémie rodu *Haemoproteus* u vybraných jedinců slavíka obecného, slavíka tmavého a jejich hybridů ze zóny sympatrie.

III LITERÁRNÍ PŘEHLED

III. 1 PARAZITI V HYBRIDNÍCH ZÓNÁCH

Hybridní zóna je oblast, kde jsou dvě populace odlišitelné na základě jedné nebo více dědičných vlastností, zároveň se časově i prostorově překrývají a kříží se. Při tom poskytují životaschopné a alespoň částečně plodné potomstvo (Arnold 1997).

Proto je tato oblast velmi zajímavá i z parazitologického pohledu – v hybridních (kontaktních) zónách lze poměrně jednoduše sledovat hostitelskou specificitu parazitů i prevalence u rodičovských druhů a hybridních jedinců.

Na základě pozorování „čistých“ druhů a jejich kříženců byly publikovány čtyři hypotézy, které se pokouší tuto velmi složitou problematiku zhodnotit a porovnat (Fritz a kol., 1994). Se studiem hybridních zón se ovšem začalo u rostlinných systémů, a proto i tyto hypotézy byly původně aplikovány na rostliny (Mouliá 1999). Hypotézy popisují rezistenci hybridních rostlin vůči herbivorům pomocí srovnání výskytu herbivorů u rodičovských druhů a hybridů. Hybridy jsou zde převážně míněni jedinci F1 generace, ale autoři popisují, že tyto hypotézy platí i pro komplexnější systémy při zpětném křížení (Fritz et al. 1994). Později se ukázalo, že se hypotézy mohou uplatnit i u živočichů.

ADITIVNÍ HYPOTÉZA

Aditivní hypotéza předpokládá, že rezistence hybridů se nebude lišit od průměru rezistencí rodičů. To znamená, že počet parazitů u hybridního jedince bude nižší než u jednoho a vyšší než u druhého rodičovského druhu (obr. 1) (Boecklen and Spellenberg 1990). V živočišných systémech ji podporuje například studie z hybridní zóny slávky jedlé (*Mytilus edulis*) a slávky středomořské (*M. galloprovincialis*) a jejich motolice *Proisorhynchus squamatus* (Coustau et al. 1991).

HYPOTÉZA DOMINANCE

Hypotéza dominance tvrdí, že se úroveň rezistence hybridních potomků významně liší od průměru rezistencí rodičů, ale neliší se významně od rezistence jednoho z nich. Rezistence hybridních potomků se může podobat rezistenci buď odolnějšího nebo náchylnějšího rodiče (obr. 1) (Fritz et al. 1994).

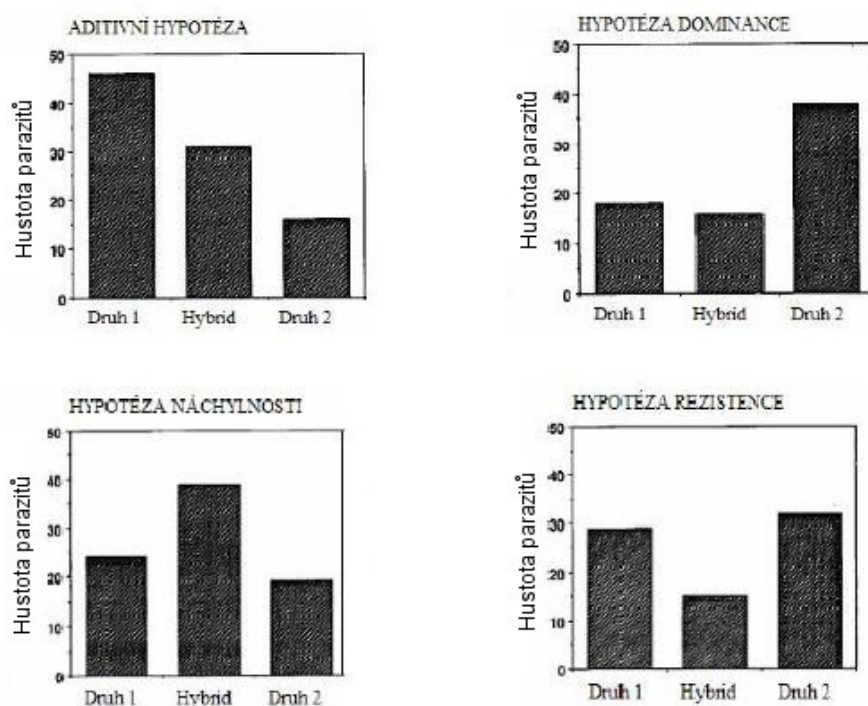
HYPOTÉZA NÁCHYLNOSTI

Tato hypotéza předpokládá vyšší hustotu parazitů u hybridního hostitele než u rodičovských druhů a to i v místech, kde se vyskytují pohromadě. Hybridy budou mnohem náchylnější k parazitaci než jejich rodiče (obr. 1) (Whitman 1989). U živočichů se s ní

můžeme setkat např. v systému kachna tmavá (*Anas rubripes*), kachna divoká (*A. platyrhynchos*) a jejich hybridů, parazitovaném *Sarcocystis* ze skupiny Apicomplexa (Mason and Clark 1990).

HYPOTÉZA REZISTENCE

Podle poslední hypotézy budou hybridy odolnější proti parazitům než oba rodičovské druhy, takže budou parazitováni nejméně ze všech tří skupin (první rodič, druhý rodič a hybrid) (obr. 1) (Boecklen and Spellenberg 1990). Tato hypotéza byla podpořena studií provedenou na skokanovi krátkonohém (*Pelophylax lessonae*) a skokanovi skřehotavém (*P. ridibundus*), kteří jsou parazitováni motolicí *Haplometra cylindracea* (Joly et al. 2007).



Obr. 1. Hypotézy popisující parazitaci v systému rodičovských druhů a hybridů. (Upraveno dle Fritz et al. 1994)

Vlastnost rezistence proti danému parazitovi může být kódována různými geny u „čistých“ rodičovských druhů. Při jejich křížení dojde k rekombinaci alel, takže se u hybridů může ztratit výhoda odolnosti proti parazitovi. Nově vzniklý jedinec – hybrid, bude pak k nákaze tímto parazitem náchylnější (Sage et al. 1986).

Pokud dojde ke křížení druhů obývajících rozdílné habitaty může nastat následující situace – jeden z rodičů žije v místě vysokého výskytu parazita a druhý se s ním naopak téměř nesetká. Pak záleží na tom, jaký z habitatů si pro svůj život hybridní jedinec vybere (Le Brun et al. 1992).

III. 2 STUDOVANÍ HOSTITELÉ

Slavíci (*Luscinia* spp.) jsou drobní pěvci vyskytující se v palearktické oblasti. Rod *Luscinia* obsahuje 11 druhů a má následující systematické zařazení:

Říše: Animalia

Kmen: Chordata

Třída: Aves

Řád: Passeriformes

Čeleď: Muscicapidae

Pro mou práci jsou podstatné dva druhy, a to konkrétně slavík tmavý (*Luscinia luscinia*) a slavík obecný (*Luscinia megarhynchos*).

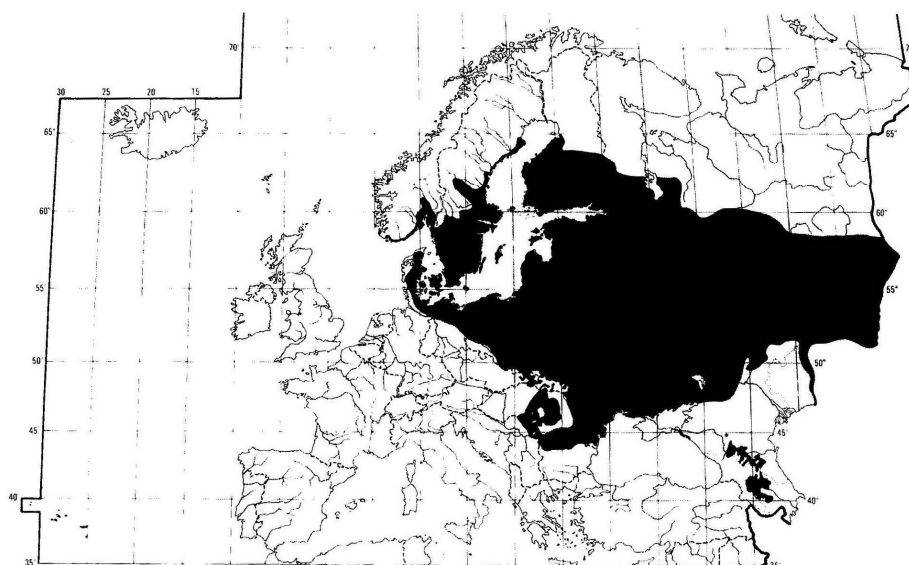
III. 2. 1 Slavík tmavý (*Luscinia luscinia*)

Slavík tmavý (Linnaeus 1758) je monotypický druh zbarvený méně výrazně než příbuzný slavík obecný. Má skvrnitou hrud' a olivově šedě zbarvené peří (obr. 2). Je to tažný pták zimující jižně od rovníku v Etiopii, Keni, Tanzanii, Zambii, Malawi, Zimbabwe, Mozambiku, Namibii, Botswaně a Nigerii (Cramp et al. 1988). Z Evropy ze západních krajů areálu táhnou ptáci jihovýchodním směrem nad Egyptem, také kolem Rudého moře a přes západní okraj Arábie (tato východní cesta je nejspíše užívána při zpětném jarním tahu – od března do dubna). Podzimní tah probíhá od konce července do září. Potrava je živočišná, koncem léta i rostlinná. Sbírá hmyz, pavouky nebo plže (Hudec et al. 1983).



Obr. 2. Slavík tmavý.
(Upraveno dle del Hoyo et al. 2005)

Během hnízdění (obr. 3) obývá vlhké listnaté lesy, zejména pobřežní a podmáčené podrosty vrb, olší, jasanů, bříz, topolů a lísek s hustým bylinným patrem. Hnízdí v kopřivách a ostružiní (Cramp et al. 1988). Na průtahu se vyskytuje převážně rovněž kolem vodních toků s hustě zarostlými břehy, také však i na sušších místech (staré zahrady, parky...) (Hudec et al. 1983). Na zimovišti je lokalizován v křoví většinou pod 1500 m n. m. V jižní Africe bývá nalézán v prostředí hustě pokrytém houštím z pryšců nebo libor (Cramp et al. 1988).



Obr. 3. Geografické rozšíření slavíka tmavého *Luscinia luscinia* během hnízdění. (Upraveno dle Cramp et al. 1988)

Páry hnízdí jednotlivě. Samec přiletá o několik dní dříve. Hnízdo staví jen samice zpravidla na zemi, jen výjimečně až do výšky 1,5 metru. Základ hnízda je ze suchého loňského listí, hluboká kotlinka vystlaná drobnějším listím, kořínky, mechem... (Hudec et al. 1983). Hnízdí jednou ročně, kladou 4 – 5 vajec od poloviny do konce května, stavba trvá čtyři dny. Mláďata opouští hnízdo 11 – 12 dní po vylíhnutí. Někteří samci se množí už v prvním roce, samice a většina samců ale až později (Cramp et al. 1988).

III. 2. 2 Slavík obecný (*Luscinia megarhynchos*)

Slavík obecný (Brehm 1831) je polytypický druh se 3 poddruhy (*L. m. megarhynchos* – slavík obecný evropský, hnízdící v Evropě až po Krymský poloostrov, v severní Africe a na Středním východě až v centrálním Turecku; *L. m. africana* – slavík obecný kavkazský, který hnízdí od východního Turecka až po oblast mezi Kaspickým a Černým mořem a *L. m. hafizi* – slavík obecný středoasijský z oblasti kolem Aralského jezera až po Mongolsko).

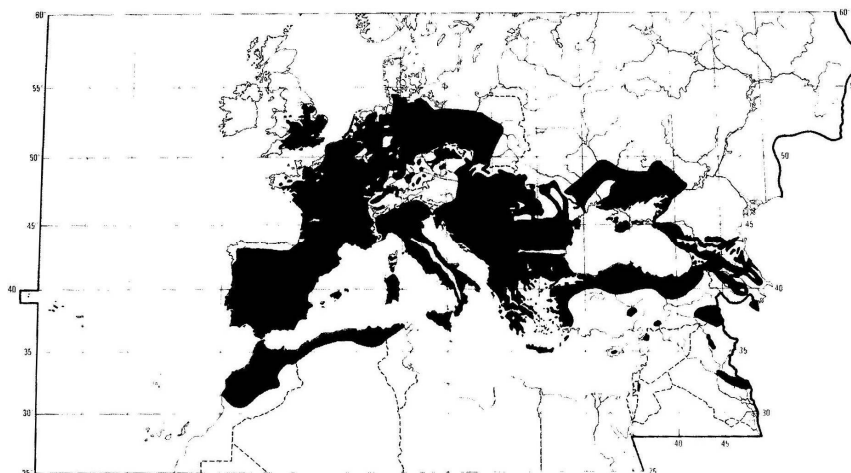
Objevuje se zde geografická proměnlivost – ptáci jsou směrem k východu světlejší a větší (obr. 4). Zimují v tropické Africe, nejčastěji v savanách ve vysoké trávě nebo v trnitém křoví. *L. m. megarhynchos* zimuje mezi Saharou a deštným lesem od západní Afriky po Ugandu, Senegal, Gambii, Mali, Nigerii a Súdán; *L. m. africana* a *L. m. hafizi* odlétají na zimu hlavně do Keni a Tanzanie, ale také do Omanu, Súdánu, Ugandy, Somálska a Etiopie (Cramp et al. 1988). Někteří ptáci mohou přezimovat i ve Středozeří (Hudec et al. 1983).



Obr. 4. Slavík obecný.

1 – *Luscinia megarhynchos megarhynchos*; 2 – *Luscinia megarhynchos hafizi*.
(Upraveno dle del Hoyo et al. 2005)

L. m. megarhynchos hnízdí v západním palearktu v mírnějším a teplejším klimatu než slavík tmavý (Cramp et al. 1988) (obr. 5). Obývá často sušší písčité půdy a slunné svahy kopců. Velmi často se vyskytuje v řídkých listnatých lesích nebo v křovinách či mezi stromy s křovinatým podrostem v otevřené krajině. Hlavně ho lze nalézt v nížinách, méně pak v pahorkatinách. Žije i na rozlehlých starých hřbitovech, v zahradách a v sadech (Hudec et al. 1983).



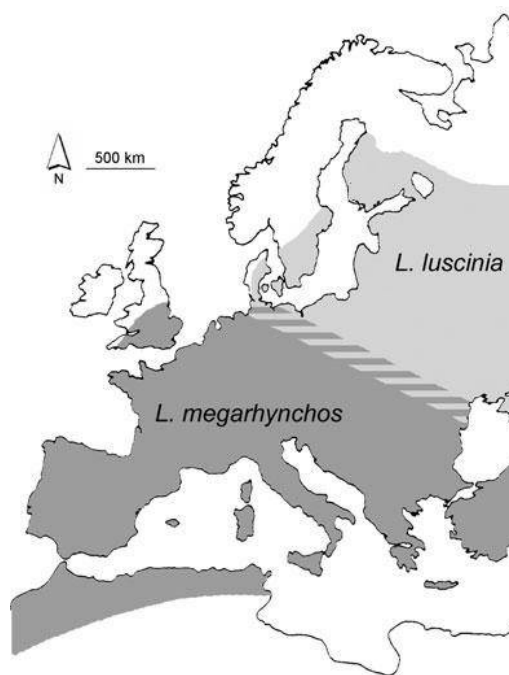
Obr. 5. Geografické rozšíření slavíka obecného *Luscinia megarhynchos* během hnízdění.
(Upraveno dle Cramp et al. 1988)

Hnízdí jednotlivě. Nejdříve přilétají někteří samci, následovaní hlavní vlnou příletu samců a samic. Hnízdo je nejčastěji na zemi, ukryto v hustém křoví nebo často v kopřivách. Velmi zřídka až do výšky 4,5 metru. Vnější část je postavena ze suchého listí, které tvoří hlubokou polokouli. Vnitřek je vyložen lístky, travinami a kořínky. Hnízdí jednou v roce (jen ve Středozeří nepravidelně dvakrát) (Hudec et al. 1983). Hnízdo staví jen samice po dobu tří dnů. Po naklazení vajec trvá inkubace 13 dní. Mláďata jsou krmena oběma rodiči (Cramp et al. 1988). Mláď slavici opouští hnízdo po 11 dnech, kdy nejsou ještě schopni letu (Hudec et al. 1983).

Potrava je téměř výhradně živočišná (hmyz, pavouci, žížaly, měkkýši), jen na podzim sbírají občas i bobule (Hudec et al. 1983)

III. 2. 3 Genetické analýzy

Podle dřívějších odhadů na základě sekvence mitochondriálního cytochromu b došlo k oddělení dvou druhů slavíků (*Luscinia luscinia* a *L. megarhynchos*) během pleistocénu před 3,3 miliony let (Wink et al. 2002). Po skončení doby ledové následoval návrat z refugií kolem Středomoří do původních areálů rozšíření, kde se druhy opět setkaly. K tomuto kontaktu došlo ve střední a východní Evropě. Zde se pak vytvořila kontaktní hybridní zóna těchto druhů (Sorjonen et al. 1986) (obr. 6).



Obr. 6. Kontaktní zóna druhů *Luscinia luscinia* a *Luscinia megarhynchos*. Světle šedá – hnízdiště slavíka tmavého, tmavě šedá – hnízdiště slavíka obecného. (Upraveno dle Storchová et al. 2009)

V sympatrických populacích je možné rozeznat zhruba pět procent hybridních jedinců na základě morfologických znaků (Becker 2007). Mezi druhy díky odloučení vznikla nekompletní prezygotická izolace a hybridní samice jsou sterilní narozdíl od hybridních samců (Stadie 1991).

Tento fakt dokazuje i první odchycená hybridní samice, která nevykazovala žádné známky reprodukční aktivity. To naznačuje, že sterilita hybridních samic hraje důležitou roli v reprodukční izolaci slavíka tmavého a slavíka obecného. Nečekaně měla tato samice velké tukové zásoby a byla již v procesu pelichání (které u „čistých“ druhů nastává až o měsíc později) (obr. 7). Tyto nezvyklé vlastnosti mohou poukazovat na sníženou hladinu fitness u hybridních samic a vést ke speciaci slavíků (Reifová et al. 2011a).



Obr. 7. Hybridní samice odchycená v červnu 2009 poblíž Mladé Boleslavi. (Upraveno dle Reifová et al. 2011a)

U druhů, kde může dojít k vzájemnému křížení byla sledována i postzygotická izolace na základě pohlavních chromozomů – u drosofilů byla zjištěna rychlejší evoluce X chromozomů nad autozomy (Betancourt et al. 2002). Díky tomuto poznatku Ritchie v roce 2007 tvrdil, že tato skutečnost může vést ke speciaci druhů na základě pohlavního výběru (Ritchie 2007).

Z tohoto důvodu se Storchová et al. 2009 zaměřili na pohlavní chromozomy u slavíků . Ptáci se řadí do chromozomálního typu abraxas – samci jsou homogametičtí a mají dva pohlavní chromozomy Z, samice jsou naopak heterogametické s pohlavními chromozomy Z a W. Z výsledků sekvenace osmi autozomálních lokusů a čtyř lokusů na chromozomu Z vyplynulo, že k divergenci slavíka tmavého a slavíka obecného došlo podle Z chromozomů před 2,2 miliony let, kdežto podle autozomů před 1,3 miliony lety (autoři si tento rozdíl

vysvětlují rozdílnou efektivní velikostí populace pro pohlavní chromozomy a autozomy). Populace se nejspíše nerozdělili na striktní alopatrii, ale výměna genů probíhala i během speciace v sympatrii nebo parapatrii). Z chromozomy (narozdíl od autozomů) jsou více diferencovány mezi druhy slavíků a hrají tak důležitou roli ve speciaci (jejich role se uplatňuje v prezygotické i postzygotické izolaci. Také zjistili, že zde probíhá silný genový tok mezi oběma druhy slavíků i po jejich vzájemné izolaci. Tento přenos je silnější na autozomech než na pohlavních chromozomech a probíhá častěji ze slavíka obecného směrem ke slavíku tmavému (Storchová et al. 2009).

III. 3 ŽIVOTNÍ CYKLY A ZPŮSOBY PŘENOSU PTAČÍCH HEMOSPORID

Životní cykly ptačích hemosporid jsou komplikované a vždy více(dvou)hostitelské. Během svého vývoje tito paraziti mění hostitele, způsob reprodukce i podobu své buňky. Hemosporida se vyvíjí ve dvou typech hostitelů- obratlovec (pták) a bezobratlý vektor (krevsající dvoukřídlý hmyz, Diptera). Protože k pohlavnímu množení dochází v přenašeči, je hmyz považován za definitivního hostitele a pták za mezihostitele.

Během sání krve přenašeč inokuluje sporozoity spolu se slinami do hostitele. Tato morfologická stádia poté invadují do fixních tkání ptáka, kde umožňují vznik exoerytrocytárních jednojaderných merontů (schizontů). Tyto buňky se několikrát asexuálně množí (merogonie=schizoginie) a slouží k distribuci po hostitelském těle. Exoerytrocytární merozoiti indukují buď opakování merogoniálního cyklu nebo vývoj sexuálních stádií (gametocytů=gamontů) v krevních buňkách. Pohlavní stádia jsou samčí (mikrogametocyty) a samičí (makrogametocyty). Gametocyty jsou infekční pro přenašeče.

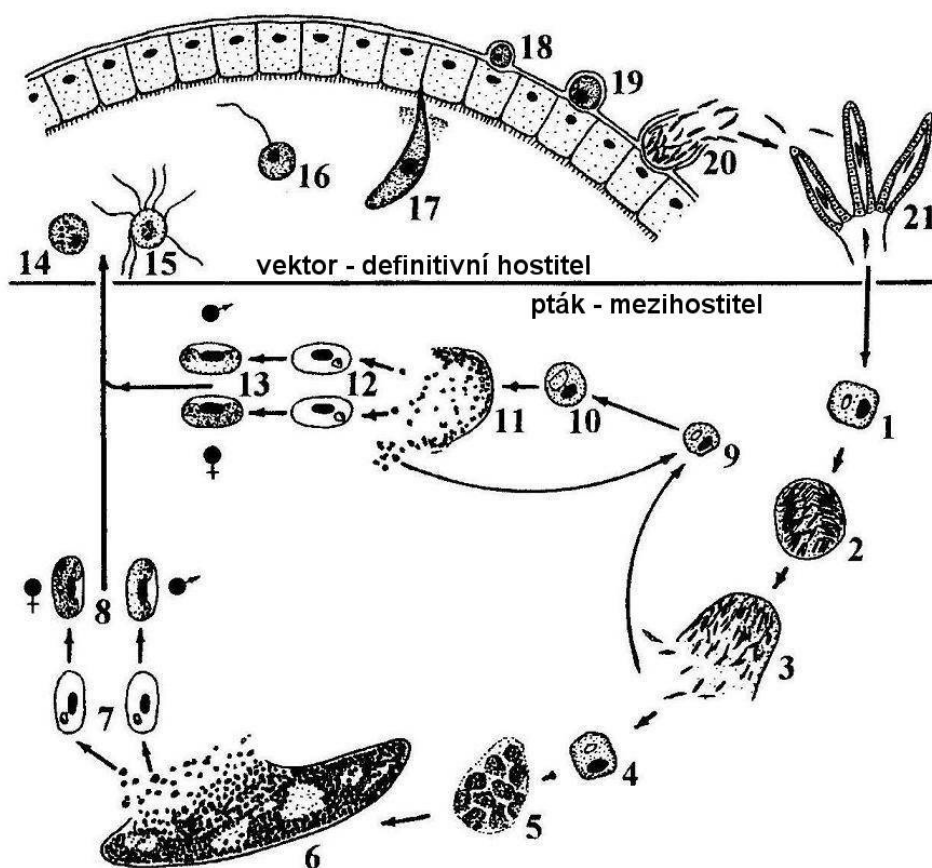
Infekce v ptačím hostiteli zahrnuje pět hlavních fází: a) prepatentní, kdy dochází k vývoji parazita mimo krev, b) akutní s vývojem v krevních buňkách a rychlým vzestupem parazitémie, c) kritická, kdy hladina parazitémie dosahuje svého vrcholu, d) chronická (v této fázi se v krevních buňkách vyskytuje již minimum parazitů) a e) latentní, kdy zcela mizí z krve z důvodu odpovědi imunitního systému hostitele. Nakažený hostitel se z infekce zřídka kdy vyléčí. Parazitémie se většinou udržuje na minimální hladině a k jejímu zvýšení (relapsu nákazy) dochází během reprodukční sezóny vektorů, kdy je tak usnadněn přenos prvoků na další generaci mezihostitelů.

Krátce po nasátí gametocytů dojde ve střevě přenašeče ke gametogenezi (hlavními stimuly pro její začátek jsou změny v koncentraci kyslíku a oxidu uhličitého během přenosu krve z obratlovce do vektora) a gametocyty jsou uvolněny z hostitelské buňky. Makrogametocyty produkují jednu kulatou makrogametu, zatímco produktem exflagelace mikrogametocytů je osm vláknitých mikrogamet. Kopulace probíhá v extracelulárním prostředí. Zygota (jako jediné vývojové stádium je diploidní) je transformována do protáhlého pohyblivého ookinetu, který penetruje peritrofickou matrix a epiteliální membránu střeva. Zůstává pod bazální laminou a vyvíjí se ve stádium oocysty, která je obalena stěnou vytvořenou z materiálu hostitele. Během sporogonie vzniká uvnitř oocysty spousta protáhlých sporozoitů. Po dozrání oocysty se sporozoiti přesouvají do hemocélu hostitele a vnikají do

jeho slinných žláz. Tato infekční stádia jsou během sání vektora vpravena do krve meziphostitele a celý cyklus se opakuje (Valkiunas 2005).

III. 3. 1 Haemoproteidae

Sporozoiti injikovaní do krve během sání vektora zahajují vývoj exoerytrocytárních merontů (obr. 8). Tato fáze cyklu se nejčastěji vyskytuje v plicích, méně pak v ledvinách, slezině, kosterním svalstvu, srdci a dalších orgánech. Během vývoje se meronty mohou rozpadnout na cytometry obsahující několik jader. Počet generací exoerytrocytárních merontů předcházejících gametogenezi není nikdy nižší než dvě (Atkinson et al. 1986).



Obr. 8. Životní cyklus rodu *Haemoproteus*.

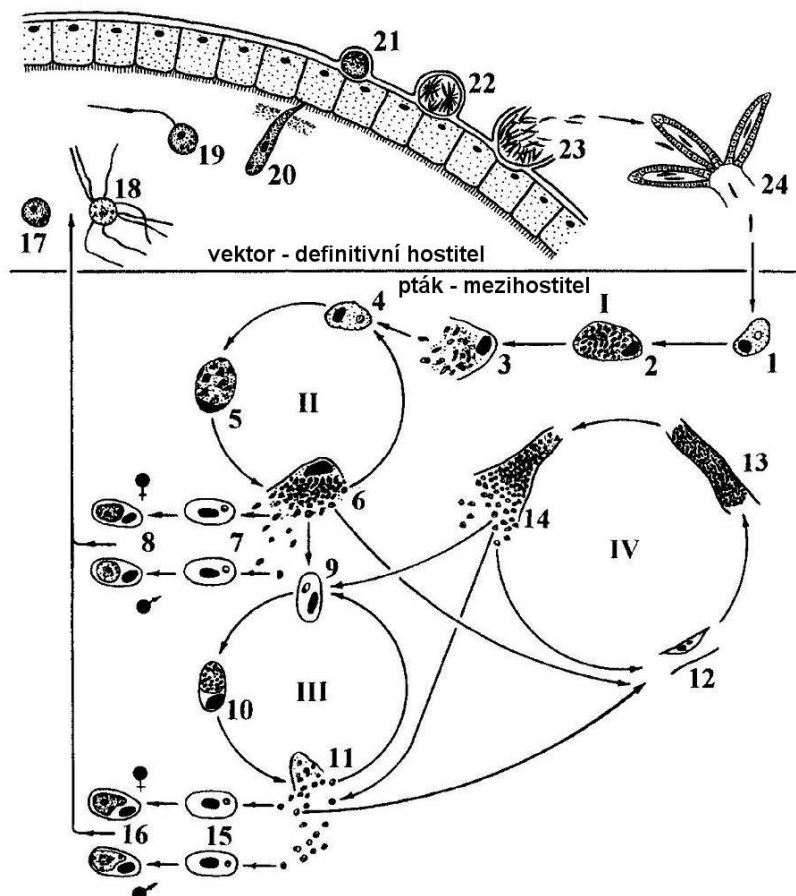
1 – sporozoit v endoteliální buňce; 2, 3 – exoerytrocytární meronti první generace s merozoity; 4 – merozoit v endoteliální buňce; 5, 6 – růst a dospívání megalomerontů v kosterní svalovině; 7 – merozoiti v erythrocytech; 8 – zralé gametocyty; 9 – merozoit v retikuloendoteliální buňce sleziny; 10, 11 – růst a dospívání merontů ve slezině; 12 – merozoiti v erythrocytech; 13 – zralé gametocyty; 14 – makrogameta; 15 – exflagelace mikrogamet; 16 – oplození makrogamety; 17 – ookinet penetrující peritroficovou matrix; 18 – mladá oocysta; 19, 20 – sporogonie; 21 – sporozoiti ve slinných žlázách vektora.
(Upraveno dle Valkiunas 2005)

První generace merontů se vyvíjí v endotelu kapilár a v myofibroblastech. Protáhlé merozoity zahajují sekundární merogonii v endoteliálních buňkách kapilár a myofibroblastů a

také dávají vzniknout merontům v retikulárních buňkách sleziny (podle některých autorů je právě zde místo, odkud probíhá poté většina relapsů, Atkinson et al. 1988). 17 dní po infekci meronty dospívají a produkují mnoho merozoitů, které napadají červené krvinky (v nichž žádná jiná část cyklu neprobíhá), kde se mění v gametocyty. Ty jsou infekční pro přenašeče. V případě rodu *Haemoproteus* jsou těmito definitivními hostiteli Diptera ze skupin Ceratopogonidae a Hippoboscidae (obr. 11). Pár minut po nasátí zralé gametocyty unikají z červených krvinek. Další vývoj probíhá podle obecného schématu pro ptačí hemosporida (Valkiunas 2005).

III. 3. 2 Plasmodidae

Ze sporozoitů injikovaných do ptačí krve vzniká první generace primárních exoerytrocytárních merontů (kryptozoitů) (obr. 9). Ty se vyvíjí v retikulárních buňkách mnoha orgánů a tkání (nejčastěji ve slezině). Merozoiti, kteří se tvoří v kryptozoitech indukují vznik druhé generace primárních exoerytrocytárních merontů (metakryptozoitů). Ty se vyvíjí v makrofázích mnoha orgánů. Merozoiti z metakryptozoitů jsou již schopni infikovat červené krvinky různého stáří (někteří merozoiti se dále množí v metakryptozoitech a vzniká tak další generace metakryptozoitů, kdežto jiní unikají do červených krvinek, kde dochází k vývoji v gametocyty). Doba od nakažení po vznik prvních gametocytů nepřesáhne 120 hodin. Merozoiti, kteří prodělali další vývoj v metakryptozoitech, poté pronikají do červených krvinek, kde se mění na trofozoity a později na erytrocytární meronty (v nich asexuálním dělením vznikají merozoiti). Část těchto merozoitů pokračuje ve vývoji až do stádia gametocytů (další část penetruje opět endoteliální buňky orgánů a indukuje sekundární exoerytrocytární merogonii za vzniku fanerozoitů, které jsou zodpovědné za následné relapsy).



Obr. 9. Životní cyklus rodu *Plasmodium*.

I, II – primární exoerytrocytární merogonie; III – erytrocytární merogonie; IV – sekundární exoerytrocytární merogonie; 1 – sporozoit v retikuloendoteliální buňce; 2, 3 – kryptozoiti; 4 – merozoit v makrofágu; 5, 6 – metakryptozoiti; 7 – merozoiti v erythrocytech; 8 – gametocyty; 9 – merozoit v makrofágu; 10, 11 – erythrocytární meronti; 12 – merozoit v endoteliální buňce kapilár; 13, 14 – fanerozoity; 15 – merozoity v erythrocytech; 16 – gametocyty; 17 – makrogameta; 18 – exflagelace mikrogamet; 19 – oplození makrogamety; 20 – ookinet penetrující peritroficičnou matrix; 21 – mladá oocysta; 22, 23 – sporogonie; 24 – sporozoiti ve slinných žlázách vektora.

(Upraveno dle Valkiunas 2005)

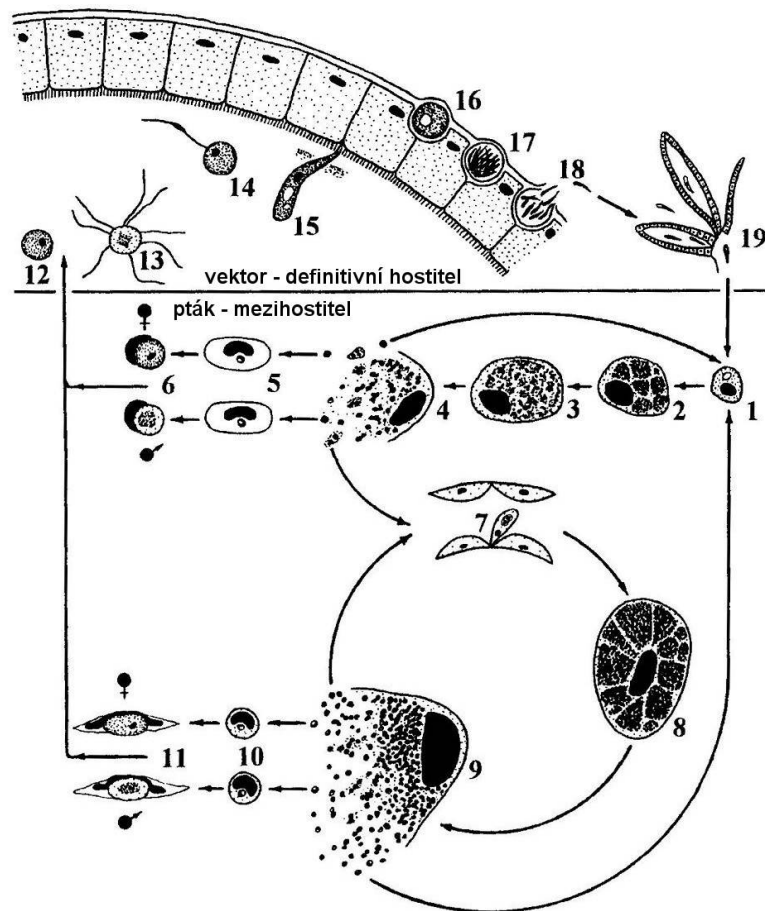
Po nasátí gametocytů společně s krví, dochází v přenašeči (Diptera ze skupiny Culicidae, hlavně rody *Culex*, *Aedes* a *Culiseta*, obr. 11). ke stejnému vývoji, který je popsán v obecném schématu (Valkiunas 2005).

III. 3. 3 Leucocytozoidae

Injikování sporozoiti se mohou vyvíjet pouze v parenchymatických buňkách jater, poté pronikají do hepatocytů, kde z nich vznikají meronti první generace (obr. 10). Jejich cytoplasma invaginuje a člení buňku na několik částí obsahujících velké množství jader. Tyto části se nazývají cytomery. Invaginace cytoplasmy pokračuje až do rozdělení buňky na jednojaderné merozoity (zbytek cytoplasmy s několika jádry je obklopen plasmatickou

membránou a nazývá se syncytium). Merozoiti, kteří se dostanou z jater penetrují do mladých i zralých erytrocytů, kde se z nich tvoří gametocyty. Někteří merozoiti nejspíš indukují v jaterních buňkách sekundární exoerytrocytární merogonii.

Syncytia se dostávají z jater a vnikají do mnoha orgánů, kde jsou fagocytovány makrofágy a dalšími buňkami retikuloendoteliálního systému. Zde se z nich stávají velcí meronti druhé generace (megalomeronti). Megalomeronti se vyskytují především v ptačí slezině či lymfatických uzlinách a dávají vzniknout tisícům jednojaderných merozoitů. Merozoiti penetrují do lymfocytů a dalších leukocytů a tvoří zde gametocyty.

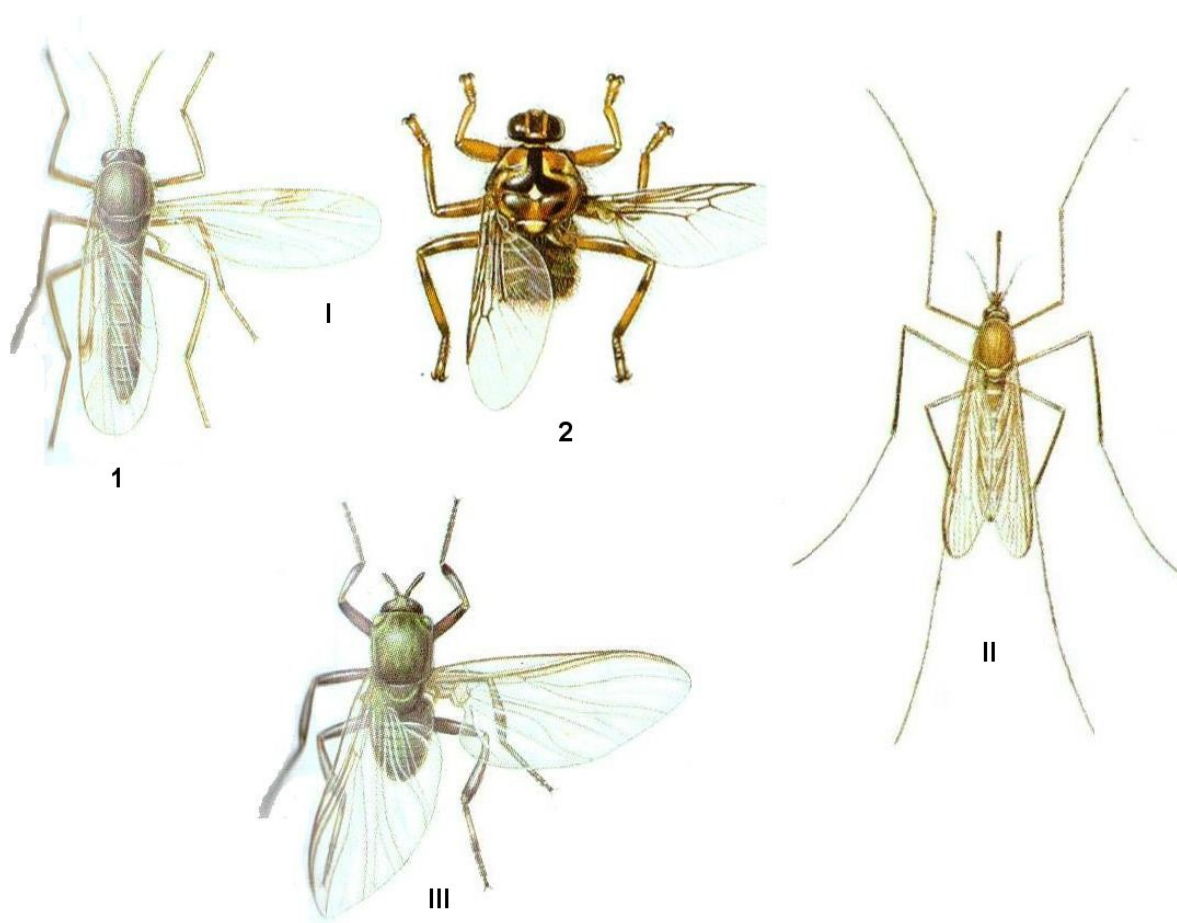


Obr. 10. Životní cyklus rodu *Leucocytozoon*.

1 – sporozoit nebo merozoit v buňce jater; 2 – 4 – jaterní meronti; 5 – merozoiti v erytrocytech; 6 – gametocyty; 7 – syncytium nebo merozoit v retikuloendoteliální buňce; 8, 9 – megalomeronti; 10 – merozoiti v leukocytech; 11 – gametocyty ve fuziformních hostitelských buňkách; 12 – makrogameta; 13 – exflagelace mikrogamet; 14 – oplodnění makrogamety; 15 – ookinet penetrující peritrofickou matrix; 16 – mladá oocysta; 17, 18 – sporogonie; 19 – sporozoiti ve slinných žlázách vektora.

(Upraveno dle Valkiunas 2005)

Gametocyty jsou nasáty vektorem (Diptera: Simuliidae, obr. 11), kde se vyvíjí stejným způsobem jako ostatní ptačí hemosporida (Valkiunas 2005).



Obr. 11. Přenašeči ptačích hemosporid.

I – přenašeči rodu *Haemoproteus*, 1 – *Culicoides* spp., 2 - Hippoboscidae; II – přenašeč rodu *Plasmodium*, *Culex* spp.; III – přenašeč rodu *Leucocytozoon*, *Simulium* spp.
 (Upraveno dle Chinery 2007)

III. 4. PREVALENCE A SPECIFICITA PTAČÍCH HEMOSPORID

Prevalence je podíl (procento) nakažených hostitelů v populaci (Volf and Horák et al. 2007) a její zjištění u slavíka tmavého a slavíka obecného byl jeden z hlavních cílů mé práce. Proto se v této kapitole zaměřím na studie, které se právě prevalenci (a specificitě) hemosporid u různých druhů pěvců věnují.

III. 4. 1 Studie na větším počtu hostitelských druhů

Před objevem molekulárních metod byla prevalence jednoduše studována pozorováním obarvených krevních roztěrů světelným mikroskopem. Greiner et al. v roce 1975 například zjistili, že u 57 026 ptáků z 388 druhů (zastupujících 55 čeledí) hnízdících v Severní Americe je celková prevalence ptačích hemosporid 36,9 % (konkrétně pro rod *Haemoproteus* 19,5 %, *Plasmodium* 3,8 % a *Leucocytozoon* 17,7 %). Hodnoty se také lišily v závislosti na geografickém rozšíření a čeledi ptáků (Greiner et al. 1975).

Po rozmachu molekulárních metod Bensch et al. 2000 na základě publikovaných sekvencí cytochromu b ze 17 druhů plasmodií (Escalante et al. 1998) navrhli sadu primerů, která by během PCR reakce byla schopna amplifikovat část tohoto genu u hemosporid, ale zároveň by neamplifikovala nespecifické úseky ptačí DNA. Pro studii použili 12 druhů pěvců, ve kterých se jim díky citlivé PCR reakci podařilo odhalit 17 linií z rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium*. Vzorky krve ze sýkory modřinky a rákosníka velkého použili i k porovnání s metodou světelné mikroskopie. Zjistili tak, že parazitémie se pohybovala mezi 0,04-7,9 %. Navíc se ukázalo, že pomocí PCR se podařilo odhalit tři pozitivní jedince, kteří se na krevním roztěru jeví jako negativní (Bensch et al. 2000).

Tato metodika byla posléze použita v několika studiích, jako například u afrických pěvců a tažných pěvců z Evropy (Waldenström et al. 2002). Jak ukazuje tabulka (tab. I), prevalence se značně liší mezi jednotlivými druhy hostitelů i sezónní variabilitou. Následnou sekvenací pozitivních vzorků bylo odhaleno velké množství genetických linií hemosporid (Waldenström et al. 2002).

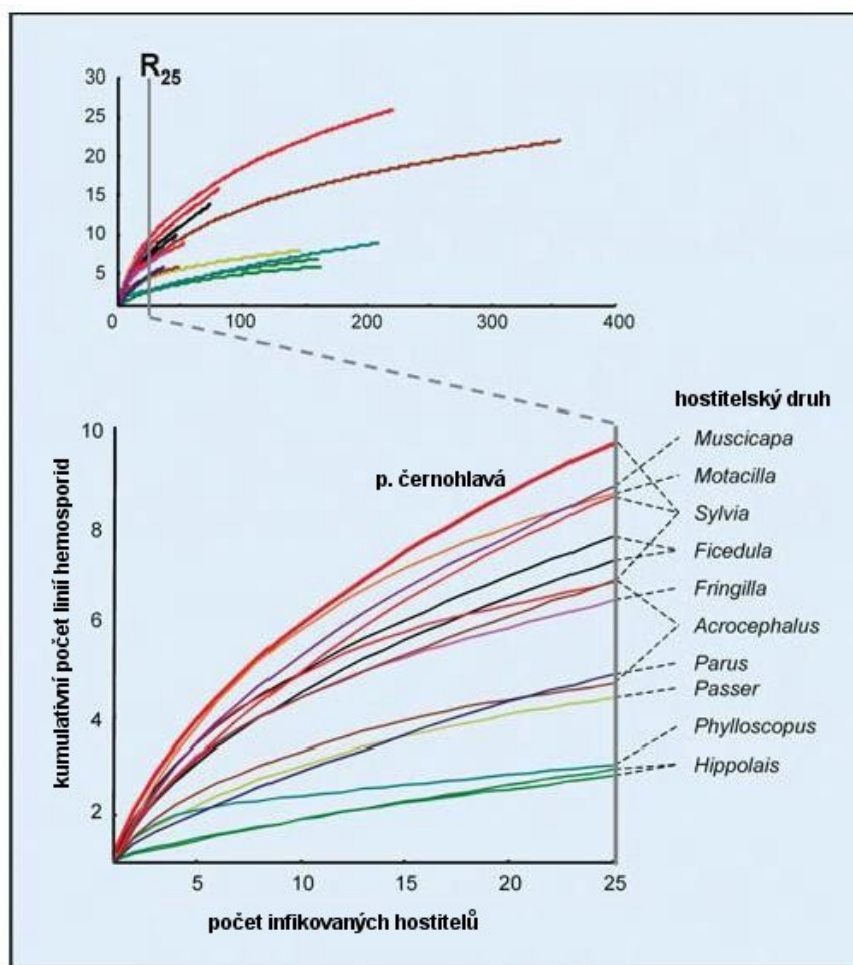
Tab. I. Prevalence u afrických a evropských tažných pěvců.
(Upraveno dle Waldenström et al. 2002)

hostitel	jaro				podzim			
	vyšetřeno	nakaženo	%	linie	vyšetřeno	nakaženo	%	linie
<i>Acrocephalus</i>								
Great reed warbler	44	2	4.5	GRW1	8	1	12.5	GRW1
Greater swamp warbler	1	1	100	LSW1	—	—	—	
Lesser swamp warbler	11	3	27.3	LSW1	13	9	69.2	GRW2, GRW4, LSW1, LSW2
African reed warbler	6	4	66.7	MW1, ARW1	14	4	28.6	GRW4, MW1, SW1
Eurasian reed warbler	30	5	16.7	MW1, SW1, ARW1	24	3	12.5	SW1, SGS1, RW2
Sedge warbler	44	13	29.5	GRW4, SW1, SW2, SW3, SW5	54	20	37.0	SW1, SW2, SW3, SW5, SGS1
Marsh warbler	—	—	—		2	0	—	
<i>Hippolais</i>								
Icterine warbler	1	1	100	HIICT2	20	9	45.0	HIICT1
Olivaceous warbler (<i>laeneni</i>)	10	4	40.0	HIP2	11	2	18.2	GRW4, HIP2
Olivaceous warbler (<i>opaca</i>)	8	2	25.0	HIP2, HIP4	3	0	—	
<i>Cisticola</i>								
Winding cisticola	11	0	—		9	0	—	
Zitting cisticola	4	0	—		4	0	—	
<i>Prinia</i>								
River prinia	5	0	—		5	0	—	
<i>Phylloscopus</i>								
Willow warbler	—	—	—		5	0	—	
Bonelli's warbler	—	—	—		1	0	—	
Wood warbler	—	—	—		2	2	100	PHSIB1
	175	55			175	50		

V roce 2002 Richard et al. porovnávali dosud publikované metody PCR detekce hemosporid. Vybrali si čtyři sady primerů – dvě pro amplifikaci podjednotky 18S ribozomální DNA (Feldman et al. 1995, Li et al. 1995) a dvě pro amplifikaci cytochromu b (Bensch et al. 2000 a nová sada vytvořená autory). Po prvních analýzách bylo zřejmé, že sady pro ribozomální podjednotku nejsou pro dané vzorky vhodné (amplifikovaly i nespecifické úseky nebo se hodily jen pro rod *Plasmodium*). Primery pro amplifikaci cyt b se naopak jevily jako velmi dobré a obě sady měly velmi podobné výsledky. Falešně pozitivní výsledky byly odhaleny při druhém běhu PCR. K analýze bylo použito 189 afrických pralesních ptáků celkem z 29 druhů a celková prevalence měla hodnotu 40 % (75 nakažených jedinců) (Richard et al. 2002).

Rozsáhlou a velmi zajímavou studii, která se zabývala počtem genetických linií hemosporid u jednoho druhu hostitele provedli v roce 2007 Pérez-Tris et al. Jejich výzkum zahrnoval 4470 jedinců z 47 druhů evropských pěvců. Celkem odhalili 1911 parazitárních infekcí (na základě PCR reakce amplifikující část cytochromu b). Díky sekvenaci objevili 92 linií náležících do rodu *Haemoproteus* 45 linií k rodu *Plasmodium*. Pro každý druh hostitele určili celkový počet linií a počet linií, které jsou specifické pouze pro onen sledovaný druh. Pro druhy, kde měli velký počet jedinců, určili R_{25} index počtu linií. Tento index vyjadřuje počet linií u 25 náhodně vybraných jedinců hostitelského druhu. Tím umožňuje omezit vliv

velmi vzácných linií parazitů i rozdílnou velikost vzorků hostitelských druhů (Pérez-Tris et al. 2007) (obr. 12).



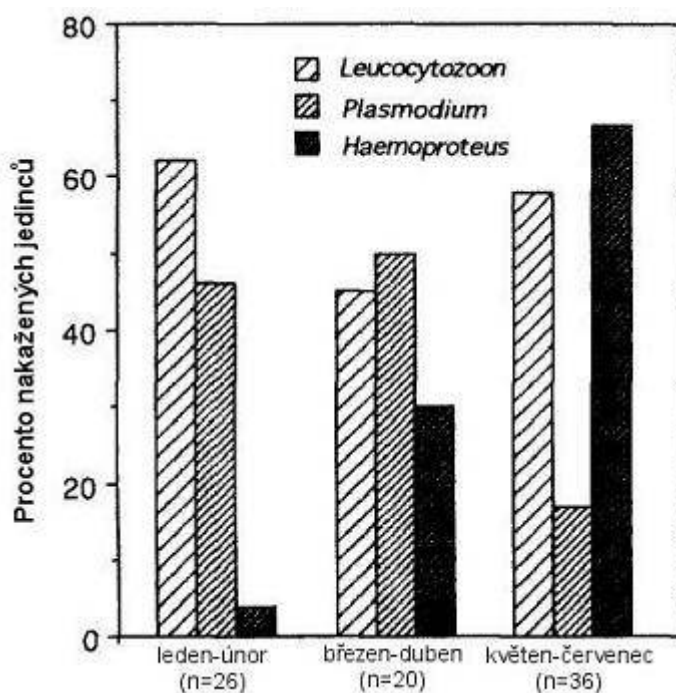
Obr. 12. Zobrazení R_{25} indexu vybraných ptačích hostitelů. (Upraveno dle Pérez-Tris et al. 2007)

Nejvyšší počet linií (26) byl zaznamenán u 415 jedinců pěnice černošlá (*Sylvia atricapilla*). Stejně tak bylo u tohoto druhu nalezeno největší množství exkluzivních linií (73,1 % všech infekcí u *S. atricapilla*), které jsou typické pouze pro tuto pěnici, a proto měl její R_{25} index nejvyšší hodnotu – 9,6 (s prevalencí 53,5 %). U ostatních dalších druhů pěnic (pěnice slavíková a pěnice hnědokřídlá) nenašli autoři tak vysoký počet linií, ale hodnoty jejich R_{25} indexů byly přesto velmi vysoké (8,6, respektive 6,8; a prevalence 30 %, respektive 70 %). Druh s druhým nejvyšším počtem linií byl rákosník velký (*Acrocephalus arundinaceus*), který byl zastoupen 858 jedinci. Odhaleno v něm bylo 22 linií (z toho 31,8 % exkluzivních) a R_{25} index se dostal na hodnotu 6,8 (a prevalence 41,6 %). Nejvíce jedinců (943) autoři shromáždili z budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*). Objeví v nich 9 parazitárních linií (33,3 % exkluzivních) a R_{25} index měl hodnotu 3, s prevalencí 22,16 % (Pérez-Tris et al. 2007).

III. 4. 2 Studie na jednom hostitelském druhu

V roce 1998 byla provedena studie zaměřená na budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*) z Finska. Pro krevní analýzy bylo vybráno 312 ptáků. Celkem objevili na základě krevních roztěrů 51 infikovaných jedinců (prevalence 16,3 %) a dva druhy ptačích hemosporid (*Haemoproteus belopolskyi*, 66,6 % všech infekcí, a *Leucocytozoon phylloscopus*, 33,3 % infekcí). Zástupce rodu *Plasmodium* nebyl nalezen stejně jako nedošlo k odhalení žádných smíšených infekcí (Rintamäki et al. 1998).

V roce 2000 Hatchwell et al. zjišťovali prevalenci u evropské populace kosa černého (*Turdus merula*) z Velké Británie. V 82 jedincích identifikovali celkem šest druhů hemosporid. V této studii zjistili, že prevalence pro rod *Haemoproteus* (dva morfospecies) je 37,8 %, pro *Plasmodium* (dva morfospecies) 37,8 % a pro *Leucocytozoon* (dva morfospecies) 57,3 %. Důležitým výstupem také bylo, že hladina prevalence se měnila během ročního období (obr. 13) (Hatchwell et al. 2000).

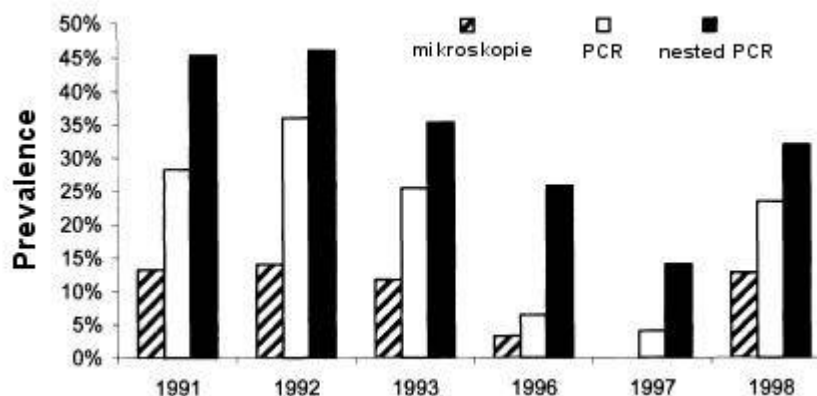


Obr. 13. Prevalence u kosa černého v závislosti na ročním období. (Upraveno dle Hatchwell et al. 2000)

Výhodou metody světelné mikroskopie je její nízká cena a možnost spočítat přímo parazitémii (obecný termín vyjadřující množství parazita v krvi hostitele, Horák and Volf et al. 2007). Naopak její nevýhody jsou hlavně ty, že pro správnou identifikaci parazitů je třeba dobře školený personál. Navíc při pozorování světelným mikroskopem se nedají odlišit jednotlivé genetické linie parazitů (kromě morfologicky rozlišitelných morfospecies). Také

často dochází k podcenění hodnoty prevalence, protože při slabé parazitémii lze některé infekce přehlédnout (Waldenström et al. 2004). Z těchto důvodů vědci hledali nové způsoby, jak zjistit prevalenci ptačích hemosporid.

Přelom ve studiu ptačí malárie přišel v roce 2004, kdy Waldenström et al. vymysleli metodu nested PCR, ve které dochází k použití dvou sad primerů ve dvou za sebou následujících PCR reakcích (vnější a vnitřní sada, amplifikuje se část mitochondriálního cytochromu b). Tím se výrazně zvýší citlivost metody a dojde i k odhalení velmi slabých infekcí (obr. 14).



Obr. 14. Porovnání metod na určení prevalence ptačích hemosporid. (Upraveno dle Waldenström et al. 2004)

Jako modelový druh byl vybrán rákosník velký ze švédské populace. Celkem testovali 283 ptáků z několikaletého odchytového souboru. K porovnání citlivosti nové metody byla použita klasická mikroskopie i dříve publikovaná metoda PCR od Bensch et al. 2000. Z grafu (obr. 14) jednoznačně vyplývá, že metoda nested PCR je nejcitlivější z dosud publikovaných metod. Ovšem při tak vysoké citlivosti je zde již velké riziko kontaminací, a proto je nutnost používat negativní kontroly. Autoři u 80 vybraných vzorků chtěli otestovat, zda metoda poskytuje shodné výsledky i při několika opakováních. S těmito 80 vzorky vyzkoušeli tři nezávislé běhy nested PCR a pouze u dvou vzorků dostali odlišné výsledky. Na základě ředící řady také zjistili, že jsou schopni odhalit i velmi nízké parazitémie – až do jedné nakažené červené krvinky ze sta tisíc nenakažených (Waldenström et al. 2004).

Velká studie byla provedena v roce 2006 na 17 populacích majny opečné (*Acridotheres tristis*). Autoři chtěli porovnat prevalenci u 11 nativních populací v Indii a u šesti populací introdukovaných do různých částí světa (tab. II.). Celková prevalence u 297 ptáků měla hodnotu 45,5 % (pro rod *Haemoproteus* 9 % a pro *Plasmodium* 36,4 %). K samotnému určení prevalence použili tři sady primerů (dvě pro amplifikaci různých částí mitochondriální DNA –

cyt b a COIII (Beadell et al. 2004) a třetí pro amplifikaci části DNA s vhodnými restrikčními místy pro odhalení smíšených infekcí (Beadell and Fleischer 2005). Celkem objevili 16 různých linií rodu *Plasmodium* a pět linií rodu *Haemoproteus* v nativních indických populacích (s připočtením introdukovaných populací se počet navýšil na 26, respektive sedm) (Isthiaq et al. 2006).

Tab. II. Porovnání prevalence u nativních a introdukovaných populací majny obecné. (Upraveno dle Isthiaq et al. 2006)

oblast	doba introdukce	velikost vzorku	<i>Plasmodium</i>		<i>Haemoproteus</i>	
			počet	%	počet	%
introdukované populace						
Australia	1862–1872	26	12	46	5	19
Fiji	1890–1900	10	0	0	0	0
Hawaii	1865	92	9	10	0	0
New Zealand	1895	41	22	54	3	7
South Africa	1888–1900	10	8	80	0	0
Cook Islands	1920 (from NZ)	22	9	40	4	18
nativní populace						
India		96	48	50	15	1
Haryana		15	10	66	3	20
Uttar Pradesh		10	3	30	0	0
Gujarat		1	0	0	1	100
Madhya Pradesh		8	5	63	2	25
Maharashtra		8	5	63	1	13
West Bengal		9	3	67	0	0
Orissa		10	4	40	1	10
Andhra Pradesh		10	5	50	1	10
Karnataka		10	8	80	4	40
Tamil Nadu		10	4	40	1	10
Assam		5	1	20	1	20

Doposud používané molekulární metody k detekci ptačích hemosporid měly jednu velkou nevýhodu, a to tu, že byly zaměřeny jen na rody *Haemoproteus* a *Plasmodium*, kdežto infekce rodem *Leucocytozoon* byly opomíjeny. Proto Hellgren et al. 2004 navrhli sadu primerů, která by byla schopna v druhé části nested PCR (Waldenström et al. 2004) amplifikovat i část cytochromu b právě parazitů rodu *Leucocytozoon*. Ke studiu si vybrali 86 jedinců slavíka modráčka (*Luscinia svecica*) odchycených ve středním a jižním Švédsku. Celkem detekovali 22 linií ptačích hemosporid (čtyři z rodu *Haemoproteus*, prevalence 1,2 %; osm linií z rodu *Plasmodium*, prevalence 24 % a deset linií rodu *Leucocytozoon*, prevalence 48 %). Celková prevalence těchto krevních parazitů u slavíka modráčka byla 59 %. Díky ředění zjistili, že jsou touto metodou schopni detekovat parazitární infekci s vyšší než 50% úspěšností i při jedné nakažené krvince z jednoho milionu nenakažených (Hellgren et al. 2004).

Podobnou studii zaměřenou na mnoho populací lesňáčka žlutohrdlého (*Geothlypis trichas*) ze Severní Ameriky provedli v roce 2008 Pagenkopp et al. Celkem odchytili 552 ptáků a prevalenci určili díky nested PCR (Hellgren et al. 2004) určili jako 52,7%. Identifikovali 18 linií ptačích hemosporid, tři z rodu *Haemoproteus* (prevalence 3 %), 13

z rodu *Plasmodium* (prevalence 43 %) a 2 z rodu *Leucocytozoon* (prevalence nižší než jedno procento (Pagenkopp et al. 2008).

Pérez-Tris and Besch se v roce 2005 věnovali více populacím pěnice černohlavé (*Sylvia atricapilla*) z mnoha lokalit v západní Evropě. Jejich vzorek hostitelů odchytených v letech 1999-2003 měl velikost 361 jedinců. K odhalení prevalence byla použita metoda nested PCR publikovaná Waldenströmem et al. 2004 (nezabývali se tudíž infekcemi rodem *Leucocytozoon*). Společná prevalence pro oba rody hemosporid byla 51 %. Objevili 24 parazitárních linií (20 linií rodu *Haemoproteus*, prevalence 39 % a 4 linie rodu *Plasmodium*, prevalence 8 %) (Pérez-Tris and Besch 2005a).

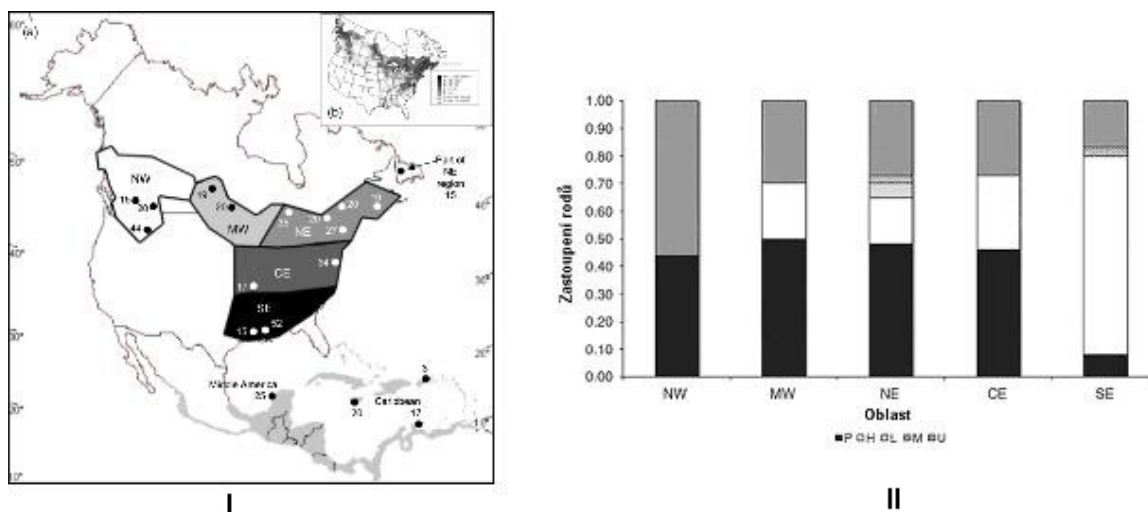
Nejrozsáhlejší studii zaměřenou na jeden hostitelský druh (sýkora modřinka – *Cyanistes caeruleus*) provedli Wood et al. v roce 2007. Celkem odchytili 997 sýkor během čtyř sezón (2001, 2003-2005) z jedné populace v jižní Anglii. Díky nested PCR (Waldenström et al. 2004) zjistili, že celková prevalence má hodnotu 28,4 % (pro rod *Haemoproteus* se třemi genetickými liniemi a prevalencí 0,8 % a pro rod *Plasmodium* s 8 liniemi a prevalencí 27,8 %). Prevalence se mezi jednotlivými identifikovanými liniemi velmi lišily (tab. III) (Wood et al. 2007).

Tab. III. Prevalence jednotlivých genetických linií hemosporid v populaci sýkor. (Upraveno dle Wood et al. 2007)

parazit	linie	počet infikovaných	prevalence (%)
<i>Plasmodium relictum</i>	pSGS1 ¹	102	10.2
<i>Plasmodium</i> sp.	pTURDUS1	97	9.7
<i>Plasmodium</i> sp.	pBT7	46	4.6
<i>Plasmodium relictum</i>	pGRW11	13	1.3
<i>Plasmodium</i> sp.	pBLUTI1	6	0.6
<i>Plasmodium</i> sp.	pBLUTI2	1	0.1
<i>Plasmodium</i> sp.	pBLUTI4	1	0.1
<i>Plasmodium</i> sp.	pBLUTI5	1	0.1
společně <i>Plasmodium</i>	–	277	27.8
<i>Haemoproteus</i> sp.	hWW1	3	0.3
<i>Haemoproteus minutus</i>	hTURDUS2	2	0.2
<i>Haemoproteus</i> sp.	hBLUTI1	1	0.1
společně <i>Haemoproteus</i>	–	9	0.9
<i>Plasmodium</i> + <i>Haemoproteus</i>	–	283	28.4

Studii zaměřenou na mnoho populací lesňáčka lejskovitého (*Setophaga ruticilla*) ze Severní a střední Ameriky (obr. 15) publikovali v roce 2008 Durrant et al. Odchyt ptáků proběhl v letech 2001-2006. Celkem analyzovali krevní vzorky z 437 jedinců. Prevalence pro hemosporida byla 28,4 %. Identifikovali 15 linií z rodu *Haemoproteus* (prevalence 17 %) a 10 linií rodu *Plasmodium* (prevalence 11 %). Prevalence rodu *Leucocytozoon* byla tak nízká, že

ho z dalších analýz vyřadili. Zastoupení rodů ve třech z pěti oblastí bylo velmi podobné, u dvou (NW a SE, obr. H) se lišilo (Durrant et al. 2008).



Obr. 15. Odchytné lokality a zastoupení ptačích hemosporid v nakažených jedincích I. lejskovitého. I – odchytné lokality; II – graf ukazující zastoupení jednotlivých rodů hemosporid v nakažených ptácích, P – *Plasmodium* spp.; H – *Haemoproteus* spp., L – *Leucocytozoon* spp., M – smíšené infekce, U – neznámá linie (pozitivní infekce, ale neurčené linie), NW – severozápad, MW – středozápad, NE – severovýchod, CE – středovýchod, SE – jihovýchod. (Upraveno dle Durrant et al. 2008)

Studii, kterou publikovali v roce 2007 Pérez-Tris et al. (Pérez-Tris et al. 2007) se nechal ve své diplomové práci z roku 2009 inspirovat Petr Synek, který své pozorování zaměřil na čtyři populace (dvě z ČR, jedna z Pamíru a jedna ze Švédska) hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*). Celkem bylo mikroskopicky i metodou nested PCR (Hellgren et al. 2004) vyšetřeno 279 dospělých ptáků. Společná prevalence tří rodů hemosporid byla 61,7 %. Nejvíce odhalených genetických linií (12) patřilo k rodu *Plasmodium* (prevalence 15 %), šest linií bylo z rodu *Haemoproteus* (prevalence 55,1 %) a šest linií rodu *Leucocytozoon* (prevalence 10 %) (tab. IV). Byl vypočítán i R_{25} index s hodnotou 5,97 linie (Synek 2009).

Tab. IV. Prevalence genetických linií ptačích hemosporid ve vzorku 279 jedinců h. rudého. (Upraveno dle Synek 2009)

název linie	rod parazita	počet infekcí	prevalence
SGS1	Plasmodium	17	5,3%
Plas.sp.		9	2,8%
WW3		5	1,6%
PADOM02		5	1,6%
FANTAIL01		3	0,9%
BT6		2	0,6%
BT8		1	0,3%
ROFI4		1	0,3%
LK05		1	0,3%
ROFI5		1	0,3%
ROFI6		1	0,3%
GRW06		1	0,3%
ROFI7		1	0,3%
ROFI2		Haemoproteus	154
CCF3	5		1,6%
Haem.sp.	5		1,6%
ROFI1	4		1,2%
SISKIN1	4		1,2%
ROFI3	3		0,9%
PYER1	2		0,6%
BT2	Leucocytozoon	25	7,8%
ROFI8		2	0,6%
ROFI9		2	0,6%
BT1		1	0,3%
BT5		1	0,3%
EMSP05		1	0,3%

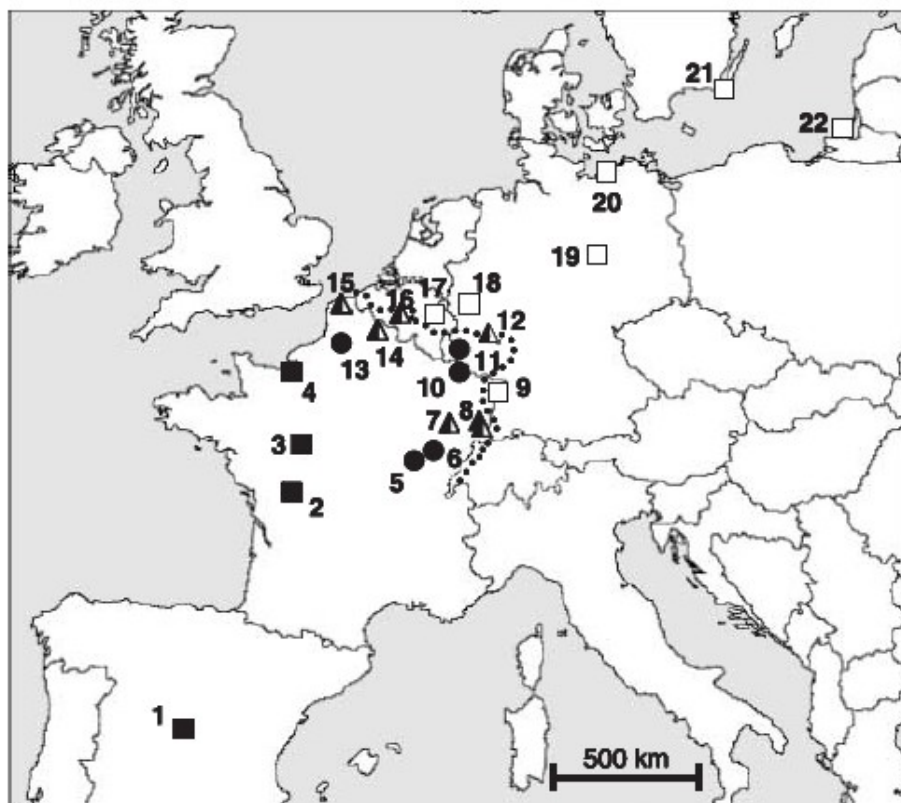
III. 4. 3 Studie podobné našemu výzkumu

Výše zmiňované studie se věnovaly detekci prevalence u jednoho druhu hostitele nebo naopak porovnání prevalence u většího množství hostitelských druhů. Naše práce je ovšem zaměřena na krevní parazity ze skupiny hemosporida v kontaktní zóně dvou blízce příbuzných druhů slavíků (slavík tmavý a slavík obecný). Proto jsem v literatuře hledal podobné případy, kdy se autoři věnovali i interakci mezi dvěma hostitelskými druhy nebo dokonce jejich hybridům. V následující části tyto studie podrobněji rozeberu.

SEDMIHLÁSEK HAJNÍ (*Hippolais icterina*) a S. ŠVITOŘIVÝ (*H. polyglotta*)

Oba sedmihlásci jsou drobní evropsští pěvci z čeledi Sylviidae (pěnicovití). Jsou to tažní ptáci zimující v Africe (Hudec et al. 1983) a k jejich divergenci ze společného předka došlo stejně jako v případě slavíka tmavého a slavíka obecného podle cytochromu b před třemi miliony lety (Helbig and Seibold 1999). Kontaktní zóna těchto druhů je umístěna v západní Evropě.

Celkem bylo ve studii vyšetřeno 286 jedinců (179 sedmihlásků švitořivých a 106 sedmihlásků hajních) z 22 lokalit mezi Španělskem a Ruskem (obr. 16), což zahrnuje celý hnízdní areál sedmihláška švitořivého a západní část areálu sedmihláška hajního.



Obr. 16. Místa odchyty sedmihlásků s naznačenou linií kontaktní zóny.
 Čísla – odchytové lokality; prázdné symboly – populace sedmihláška hajního; plné symboly – populace sedmihláška švitořivého; čtverce – daleká alopatrie; kruhy – blízká alopatrie; trojúhelníky – sympatrie; tečkovaná linie – kontaktní zóna obou druhů.
 (Upraveno dle Reullier et al. 2006)

Ptáci byli chytáni v hnízdní sezóně (květen až červenec) v letech 2001 a 2002 a k detekci krevních parazitů byla použita metoda nested PCR vynalezena Hellgrenem et al. 2004. Celková prevalence byla ohromná, na 12 z 22 lokalit dosahovala 100 % (tab. V). Průměrná prevalence byla 92,6 % u sedmihláška švitořivého a 90,7 % u sedmihláška hajního. Převážná část prevalence byla tvořena rodem *Haemoproteus*, naproti tomu rod *Plasmodium* (s prevalencí 2,5 %) se vůbec nevyskytoval u slavíka hajního. Díky sekvenaci pozitivních vzorků odhalili autoři osm parazitárních linií (šest z rodu *Haemoproteus* a dvě z rodu *Plasmodium*). Také objevili 13 smíšených infekcí, z nichž deset tvořily infekce dvěma liniemi rodu *Haemoproteus*.

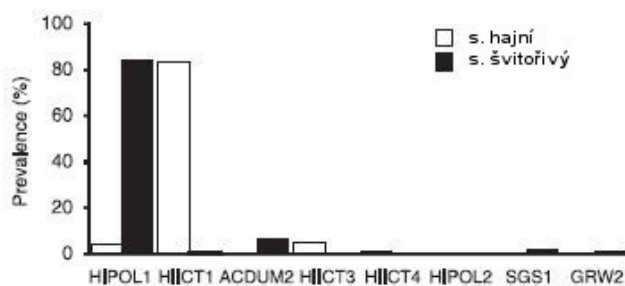
Tab. V. Prevalence na jednotlivých lokalitách u sedmihlásků.

Číslo populace – viz obr. Q; popis lokalit – A – daleká alopatrie, RA – blízká alopatrie, S – sympatrie; popis druhů – MW – sedmihlásek švitořivý, IW – s. hajní; genetické linie SGS1 a GRW2 patří k rodu *Plasmodium*, kdežto zbytek k rodu *Haemoproteus*.

(Upraveno dle Reullier et al. 2006)

Prevalence (počet nakažených ptáků)													
populace	lokalita	druh	n	inf.	smiš. inf.	genetické linie parazitů							
						HIPOL 1	HIICT 1	ACDUM 2	HIICT 3	HIICT 4	HIPOL 2	SGS 1	GRW 2
1. Madrid	A	MW	19	11	1	9	0	2	0	0	0	0	1
2. Chizé	A	MW	12	12	2	12	0	2	0	0	0	0	0
3. Tours	A	MW	10	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0
4. Caen	A	MW	10	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0
5. C'teaux	A	MW	12	12	1	9	0	3	0	0	0	1	0
6. Auxonne	RA	MW	11	10	1	8	0	0	0	0	1	2	0
7. Conflans	S	IW	11	11	1	1	10	0	1	0	0	0	0
		MW	12	11	2	11	0	2	0	0	0	0	0
8. Mulhouse	S	IW	5	5	0	0	5	0	0	0	0	0	0
		MW	15	13	1	13	0	0	0	0	0	0	1
9. Strasbourg	A	IW	11	10	1	0	10	0	1	0	0	0	0
10. Saarlouis	RA	MW	11	11	0	11	0	0	0	0	0	0	0
11. Trier	RA	MW	10	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0
12. Bingen	S	IW	4	3	0	1	2	0	0	0	0	0	0
		MW	23	17	1	15	1	2	0	0	0	0	0
13. Amiens	RA	MW	4	4	0	4	0	0	0	0	0	0	0
14. Le Quesnoy	S	IW	11	11	0	1	9	0	1	0	0	0	0
		MW	21	21	0	21	0	0	0	0	0	0	0
15. Hazebrouck	S	IW	3	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0
		MW	8	7	0	7	0	0	0	0	0	0	0
16. Gembloux	S	IW	6	6	0	0	6	0	0	0	0	0	0
		MW	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
17. Liège	A	IW	10	10	0	1	9	0	0	0	0	0	0
18. Köln	A	IW	2	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0
19. Magdeburg	A	IW	10	10	1	0	10	0	0	1	0	0	0
20. Rostock	A	IW	11	10	1	0	9	0	2	0	0	0	0
21. Öland	A	IW	12	11	0	0	11	0	0	0	0	0	0
22. Rybachy	A	IW	10	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0

Velmi zajímavým výsledkem této studie byla i zjištěná vysoká hostitelská specifita parazitárních linií. Dvě hlavní genetické linie HIPOL1 a HIICT1 z rodu *Haemoproteus* (obr. 17) se vyskytovaly (i když s nepoměrným zastoupením) jako jediné u obou druhů sedmihlásků. Linie HIPOL1 naprosto převažovala, a tvořila hlavní podíl na prevalenci, u sedmihláška švitořivého, zatímco linie HIICT1 dominovala u sedmihláška hajního. Navíc tyto dvě linie se liší pouze jedinou substitucí v sekvenci cytochromu b (Reullier et al. 2006).



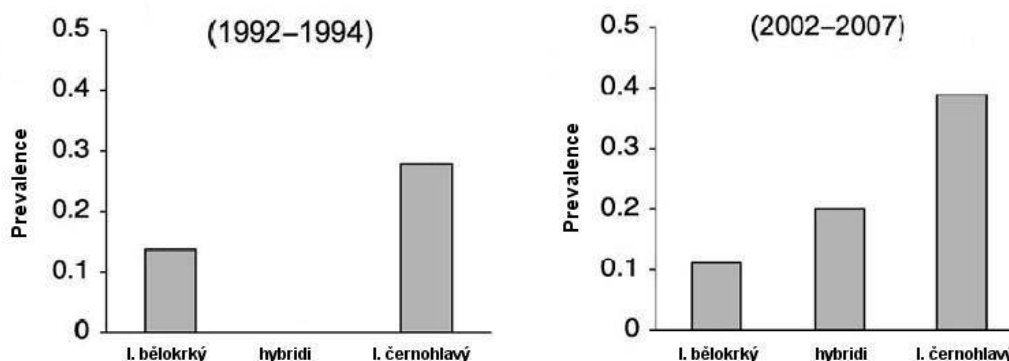
Obr. 17. Prevalence osmi parazitárních linií u sedmihlásků.
(Upraveno dle Reullier et al. 2006)

Bohužel v celém odchytové souboru byl identifikován pouze jeden hybridní jedinec (a to navíc bez parazitární infekce), což neumožnilo zjistit nic o tom, jak se chovají kříženci dvou druhů sedmihlásků při setkání s krevním parazitem. Nevýhodou je i to, že se autoři nepokusili určit parazitární a nezjistili tak, jak vysokou mírou jsou jednotliví ptáci nakaženi a zda se tato vlastnost liší mezi druhy.

LEJSEK BĚLOKRKÝ (*Ficedula albicollis*) a L. ČERNOHLAVÝ (*F. hypoleuca*)

Lejscí jsou drobní pěvci z čeledi lejskovitých (Muscicapidae). Zimují v subsaharské Africe a hnízdí od Evropy až po střední Asii. Zóna sympatrie je ve střední a východní Evropě (Svenson et al. 2004). Oba druhy jsou morfologicky odlišitelné a při vzájemném setkání jsou schopni křížení. Hybridní jedinci mají smíšené morfologické znaky (Sætre et al. 2003).

Odchyt probíhal v letech 1992-1994 a 2002-2007. Celkem bylo odchyceno 1282 ptáků (1231 lejsků bělokrkých, 36 lejsků černoahlavých a 15 hybridů) v prvním období a 136 (72 lejsků bělokrkých, 49 lejsků černoahlavých a 15 hybridů) v druhém. Všichni jedinci byli vyšetřeni pomocí mikroskopie na přítomnost rodu *Haemoproteus* (obr. 18).



Obr. 18. Prevalence rodu *Haemoproteus* u dvou druhů lejsků a jejich hybridů ve dvou odchytovéch obdobích. (Upraveno dle Wiley et al. 2009)

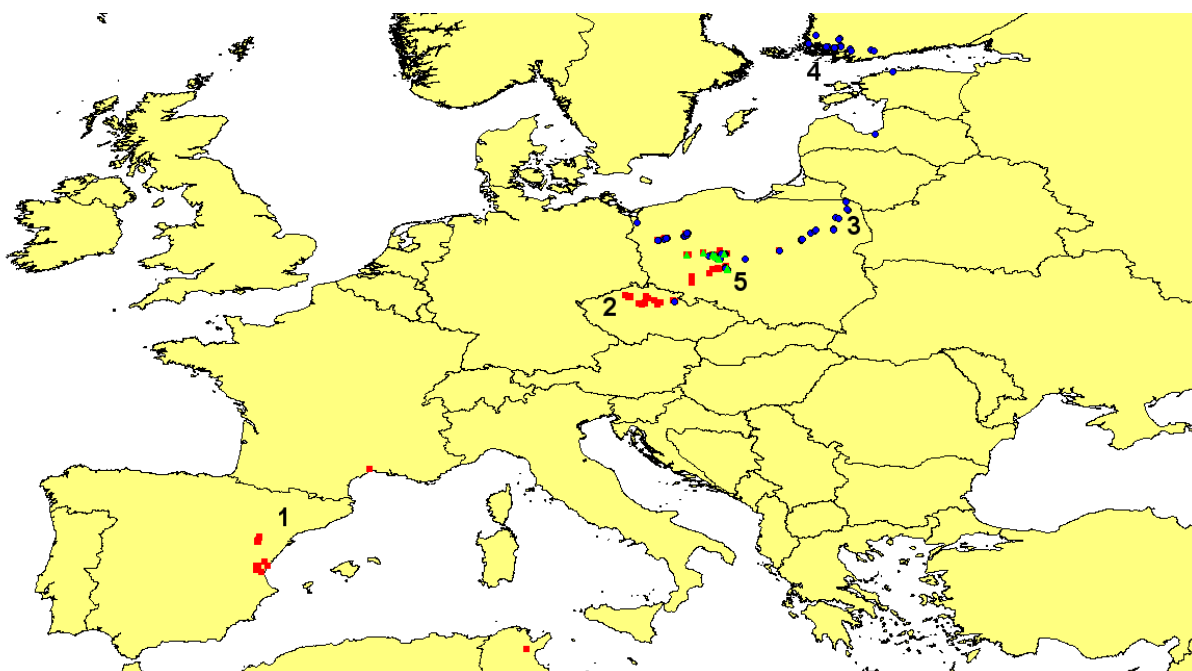
Z grafů (obr. 18) jednoznačně vyplývá, že prevalence rodu *Haemoproteus* je u lejska černoahlavého výrazně vyšší než u lejska bělokrkého. Při sečtení prevalencí z obou sezón vyšlo najevo, že tato hodnota u hybridních jedinců se nachází mezi hodnotami obou rodičovských druhů (Wiley et al. 2009).

Narozdíl od předchozí studie prováděné na sedmihláscích, soubor vzorků obsahuje více hybridních jedinců, ale kvůli tomu, že Wiley et al. 2009 neprováděli molekulární detekci parazitů, nebyli schopni určit genetické linie hemosporid a s tím důležitou vlastnost hostitelské specificity.

IV METODIKA

IV. 1 ODCHYT PTÁKŮ, IZOLACE DNA A IDENTIFIKACE DRUHŮ

K odchytu slavíků došlo v letech 2006-2009. Celkem bylo chyceno 370 ptáků, z toho 196 slavíků obecných, 165 slavíků tmavých a devět hybridních jedinců. Ptáci byli chytáni ve třech zonách: daleká alopatrie [slavík obecný (n=38) – Španělsko, Francie, Tunisko; slavík tmavý (n=35) – Lotyšsko, Finsko, Estonsko], blízká alopatrie [slavík obecný (n=55) – Česká republika; slavík tmavý (n=36) – Polsko] a v sympatrii v Polsku [slavík obecný (n=103); slavík tmavý (n=94)]. Hybridi byli odchyceni v polské sympatrii (obr. 19).



Obr. 19. Lokality odchytu slavíků.

Červený čtverec – slavík obecný; modrý kruh – slavík tmavý; zelený trojúhelník – hybrid; 1 – daleká alopatrie (Španělsko, Francie, Tunisko) slavíka obecného; 2 – blízká alopatrie (Česká republika, JZ Polsko) slavíka obecného; 3 – blízká alopatrie (SV Polsko) slavíka tmavého; 4 – daleká alopatrie (Finsko, Lotyšsko, Estonsko) slavíka tmavého; 5 – sympatrie obou druhů (Polsko).

Všem jedincům byla odebrána z brachiální žíly krev, která byla uložena v čistém ethanolu pro pozdější izolaci DNA. K izolaci DNA z krve došlo pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Druhy byly rozlišeny na základě genotypů ve dvou lokusech na chromozomu Z (ADAMTS a SPINZ), F1 hybridy jsou heterozygoti na obou těchto lokusech (Reifová et al. 2011b). Tato první část metodiky (odchyt ptáků, izolace DNA a identifikace druhů) byla provedena Radkou Reifovou a jejím týmem. Do svých pokusů jsem tedy použil

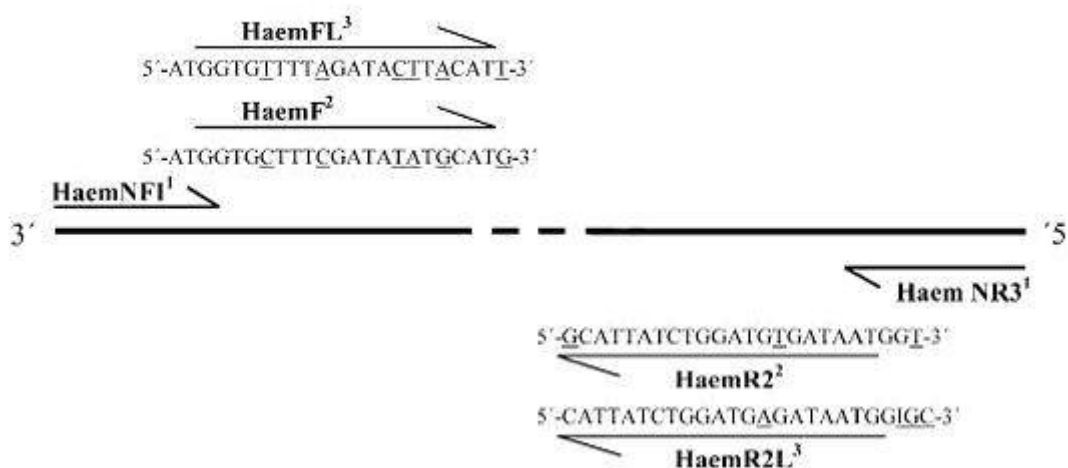
již vyizolovanou DNA (vše od měření koncentrace na spektrofotometru až po tvorbu fylogenetických stromů jsem již prováděl sám).

Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000). Koncentrace se pohybovala v rozmezích 2-15 ng/μl a tyto vzorky byly použity přímo do PCR reakce.

IV. 2 NESTED PCR

K detekci parazitů byla použita vysoce citlivá metoda nested PCR reakce, která umožňuje rozlišit nákazy rodem *Leucocytozoon* od zbylých dvou rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium* (viz obr. 20). Hellgren et al. 2004 potvrdili, že touto metodou je možné zachytit jeden nakažený erytrocyt ze 100 tisíc nenakažených.

Jedná se o dvoustupňovou reakci PCR se dvěma sadami primerů pro amplifikaci části mitochondriálního genu pro cytochrom b.



Obr. 20. Znárodnění kombinace primerů.

1 – primery pro počáteční fázi nested PCR reakce; 2 – sada primerů pro amplifikaci rodů *Plasmodium* a *Haemoproteus*; 3 – sada primerů pro amplifikaci rodu *Leucocytozoon*; podtržené báze – rozdíly mezi primery pro *Plasmodium* + *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*.

(Upraveno dle Hellgren et al 2004)

V první, iniciální reakci, dochází k amplifikaci 566 bázového úseku (včetně primerů) genu pro cyt b všech tří zmíněných rodů hemosporid. Tato reakce probíhá v objemu 10 μ l s vnějšími primery HaemNFI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3'), I je univerzální báze pro inosin, a HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') podle následujícího protokolu:

5 μ l QIAGEN Multiplex Master Mixu (Qiagen, Hilden, Německo),

0,5 μ l (10 μ M) každého primeru

4 μ l DNA.

Z důvodu použití Multiplex Master Mixu obsahujícímu *Taq* DNA polymerázu byla na počátku reakce inkubována při teplotě 95°C 15 minut. Vlastní cyklus poté sestával z 20 opakování, denaturace probíhala při teplotě 94°C 30 sekund, nasedání primerů (annealing) při teplotě 50°C 90 sekund a syntéza řetězce DNA při teplotě 72°C 45 sekund. Po skončení cyklu byla teplota udržována na hodnotě 72°C po dobu 10 minut.

V následující PCR reakci, kdy byla jako templát použita DNA z reakce iniciální, došlo na základě použití dvou sad primerů k odlišení rodu *Leucocytozoon* od dvou zbývajících rodů hemosporid. Tato reakce probíhá v objemu 30 μ l buď s primery společnými pro rody *Haemoproteus* a *Plasmodium* HaemF (5'-ATGGTGCTTTCGATATATGCATG-3') a HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3'), kdy se amplifikuje úsek dlouhý 480 bp (bez primerů) nebo speciálními primery pro rod *Leucocytozoon* HaemFL (5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3') a HaemR2L (5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3') a délkou amplifikovaného úseku 478 bp (bez primerů). Reakce pro odlišení rodů byly prováděny vždy samostatně podle protokolu:

3 μ l PCR pufu Dynex

0,2 mM každého deoxyribonukleotid trifosfátu (Fermentas, Burlington, Kanada),

2 μ l (10 μ M) každého vnitřního primeru,

0,1 μ l (1U rekombinantně vyrobené) DNA polymerázy Dynex,

1,5 μ l DNA z předchozí iniciální PCR reakce,

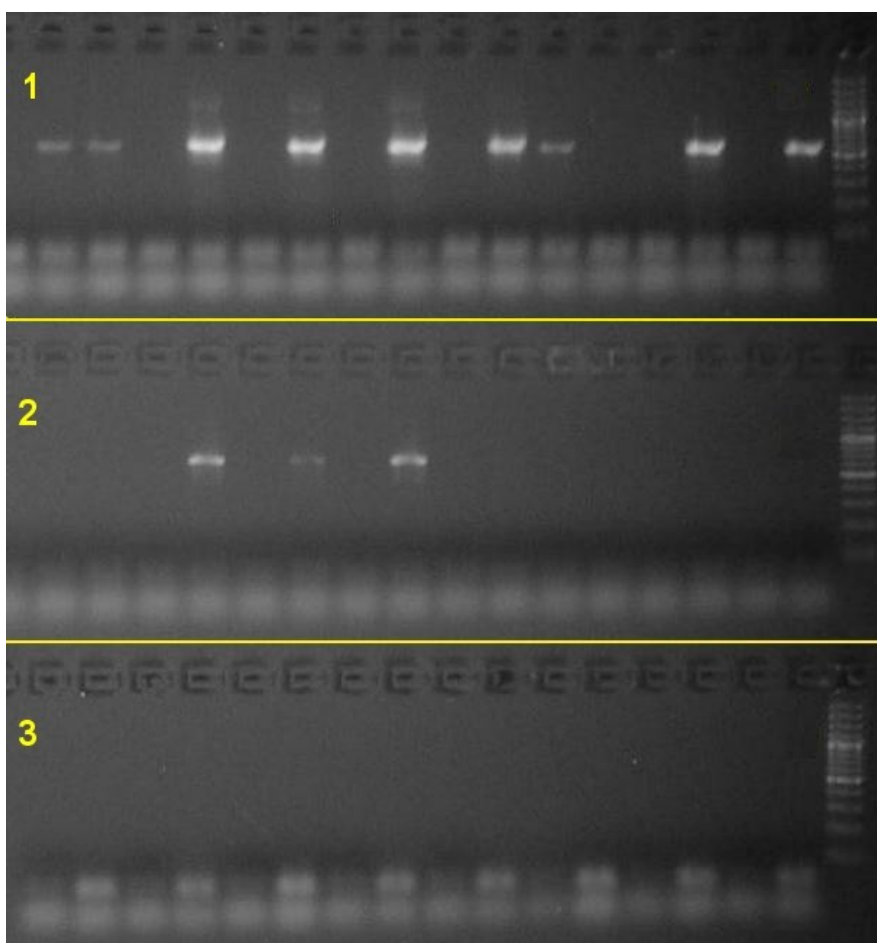
zbytek objemu do 30 μ l byl doplněn deionizovanou vodou.

Podmínky této reakce byly stejné jako u reakce iniciální, jen chyběla 10 minutová počáteční fáze inkubace při 95°C a počet cyklů byl stanoven na 35.

Všechny PCR reakce byly prováděny v termocyklerech iCycler (Biorad, Hercules, USA) a MIREsearch, Waltham, USA).

IV. 3 AGARÓZOVÁ ELEKTROFORÉZA A SEKVENACE

5 μ l konečného PCR produktu bylo společně s 5 μ l nanášecího pufu nanášeno na 2% agarózový gel (Invitrogen, Carlsbad, USA), pro každý běh byl také použit standard (Fermentas, Burlington, Kanada). Po 40 minutách elektroforézy při napětí 100 V byla stanovena pozitivita či negativita vzorků. Na každých 8 vzorků byla použita negativní kontrola (deionizovaná voda místo DNA produktu z PCR reakce), aby nedošlo k chybnému určení falešně pozitivních výsledků z důvodu kontaminace během práce (obr. 21). Všechny detekce pomocí PCR a elektroforézy byly provedeny minimálně dvakrát, v případě problematických vzorků (velmi slabý signál či nesouhlasné výsledky jednotlivých běhů) i vícekrát.



Obr. 21. Výsledek elektroforézy po nested PCR.

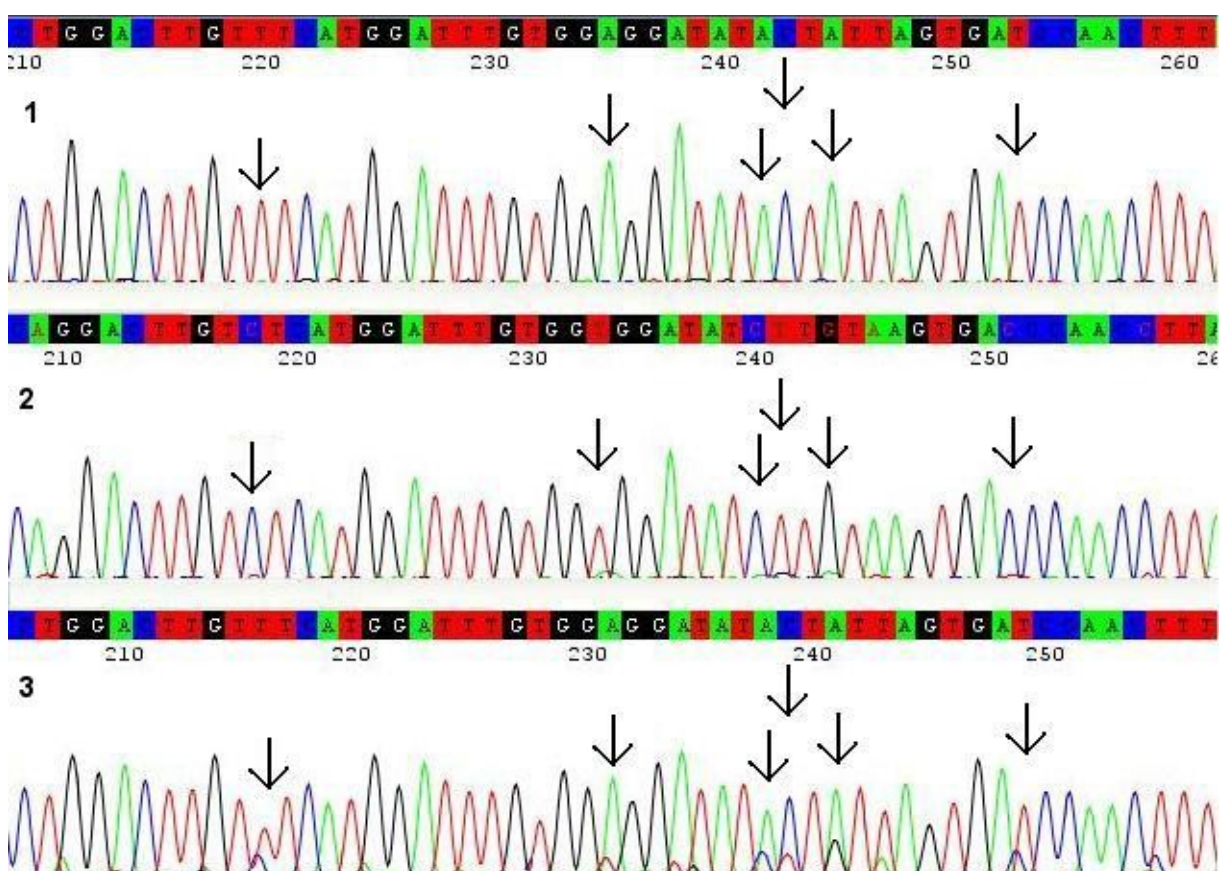
1 – devět pozitivních infekcí rodu *Haemoproteus* nebo *Plasmodium*; 2 – tři pozitivní infekce rodem *Leucocytozoon*; 3 – negativní kontroly (deionizovaná voda místo DNA); vpravo třikrát nanesen standard.

Všechny pozitivní vzorky (vždy zbylých 25 μ l DNA z PCR reakce) byly zaslány na sekvenaci do Macrogenu (Korea) společně s primerem (10 μ M) HaemF při nákaze rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium* či primerem (10 μ M) HaemFL při nákaze rodem *Leucocytozoon*.

IV. 4 URČENÍ GENETICKÝCH LINIÍ PARAZITŮ A SMÍŠENÉ INFEKCE

Výsledné sekvence byly alignovány a editovány v programu BioEdit (Hall 1999), který využívá ClustalW Multiple Alignment. Unikátní haplotypy, které se lišily alespoň o 1 záměnu v sekvenci cyt b od sekvencí uvedených v GenBank, byly osekvenovány od 3' konce primerem HaemR2 (pro rod *Leucocytozoon* HaemR2L). Pomocí programu BioEdit byly z těchto sekvencí vytvořeny kontigy.

Smíšené infekce byly odhalovány vizuálně pomocí programu CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, Velká Británie) (obr. 22) na základě dvojitých peaků v sekvenci (Perez-Tris and Bensch 2005b).



Obr. 22. Vyšetřování smíšených infekcí v programu CodonCode Aligner.

1, 2 – sekvence představující infekci jednou linií parazita (unikátním haplotypem); 3 – smíšená infekce haplotypu 1 a 2; šipky naznačují pozice, kde se „čisté“ linie 1 a 2 liší, tyto pozice jsou u smíšené infekce nápadné dvojími peaky.

IV. 5 KVANTITATIVNÍ PCR

Na základě kvantitativní PCR jsem chtěl zjistit relativní parazitěmii u nakažených jedinců. Rozhodl jsem se spočítat poměr mezi množstvím kopií části intronu jaderného genu ptáka (18S) a částí mitochondriálního genu parazita (cyt b) v daném vzorku.

Po zalignování námi nalezených sekvencí cyt b (a dalších hlavních linií ptačích hemosporid nalezených v GenBank) jsem pomocí programu Primer3Plus navrhl primery, které by mohly být vhodné pro amplifikaci hlavních rodů hemosporid. Stejnou operaci jsem provedl i pro ptačí intron 18S (sekvence jen z GenBank).

Celkem byly navrženy čtyři sady primerů pro amplifikaci části genu pro mitochondriální cytochrom b parazita, které se měly lišit specificitou pro různé rody/linie:

- 1) LULU1qPCRf: CTGGGGTGCAACCGTTATTA
LULU1qPCRr: GGGCTATAAAAGGGAATATAAAATGC
Délka produktu 137 bp (včetně primerů), tato sada měla být specifická pro nejběžnější linii (LULU1 z rodu *Haemoproteus*).
- 2) UNIqPCRf: CCTTGGGGTCAAATGAGTTT
UNIqPCRr: TCCTCCACAAATCCATGAAA
Délka produktu 90 bp (včetně primerů), sada měla být univerzální pro všechny tři rody hemosporid.
- 3) HPqPCRf: TTTCATGGATTTGTGGAGGA
HPqPCRr: TCCTAAAGGATTAGAGCTACCTTG
Délka produktu 149 bp (včetně primerů), sada měla být vhodná pro amplifikaci rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium*.
- 4) SGS1qPCRf: ACAGCTTTTATGGGTTACGTATTACC
SGS1qPCRr: ACAGATATCCACCACATATCCA
Délka produktu 121 bp (včetně primerů), tato sada měla specificky amplifikovat nejběžnější linii rodu *Plasmodium* (SGS1).

A dvě sady primerů pro amplifikaci části ptačího jaderného intronu 18S:

1) 18S1qPCR_F: CTCCCGCTCCTTGGATAACT

18S1qPCR_R: TCACCATGGTAGGCACAGAC

Délka produktu 228 bp (včetně primerů), tato sada měla amplifikovat část intronu 18S všech pěvců a neměla nasedat na lidskou DNA.

2) 18S2qPCR_F: GCGTGCATTTATCAGACCAA

18S2qPCR_R: CACCATGGTAGGCACAGACA

Délka produktu 157 bp (včetně primerů), úsek amplifikovaný touto sadou měl být kratší variantou předchozí sady.

Pro optimalizaci metody jsem vybral vhodné vzorky (ptáky nakažené různými liniemi parazitů i ptáky nenakažené). Pro všechny zmíněné sady jsem se pokusil na základě gradientové PCR určit ideální teplotu pro nasedání primerů. Protokol pro tuto PCR byl shodný jako u druhé reakce v nested PCR, jen teplota nasedání primerů se lišila vždy v každé z osmi jamek PCR destičky, kde byl nanesen stejný vzorek (teplota byla v rozmezích 58-63°C nebo 60-64°C) a počet cyklů byl stanoven na 39. Reakce jsem prováděl v termocykleru iCycler (Biorad, Hercules, USA). Na každých 8 vzorků byla použita negativní kontrola (deionizovaná voda místo DNA).

Poté jsem provedl agarózovou elektroforézu podle stejného protokolu (obr. 23) a již zde jsem se u některých sad primerů přesvědčili, že amplifikují i nespecifický úsek DNA nebo nerozlišují jednotlivé rody parazitů, proto byly z následujících pokusů vyřazeny.



Obr. 23. Výsledek elektroforézy po gradientové PCR.

Se zvyšující se teplotou (šipka naznačuje směr růstu teploty) jsou jasně patrné slabší bandy (horší nasedání primerů na templátovou DNA). Proto byla pro kvantitativní PCR zvolena teplota 63°C, která byla vhodná nejen pro zde zobrazené primery HPqPCR ale i pro sadu 18S1qPCR pro amplifikaci ptačího genu. Vlevo nanesen standard.

Ukázalo se, že nebudu schopen nalézt vhodné primery, pro amplifikování rodů *Plasmodium* a *Leucocytozoon* kvůli jejich velké variabilitě a přítomnosti vysokému počtu linií (hlavně u rodu *Plasmodium*) zjištěných na základě nested PCR. Proto byl jako nejvhodnější

kandidát pro kvantitativní PCR vybrán rod *Haemoproteus*, který byl u mých vzorků nalezen jen ve dvou liniích (LULU1 a ROBIN1) zato však s nejvyšší prevalencí.

Pro porovnání parazitémie mezi dvěma druhy slavíků jsem vybral nakažené jedince slavíka obecného ze zóny sympatrie (n=11), doplnil jsem je 15 nakaženými slavíky tmavými (každý z jiné lokality ze zóny sympatrie; prevalence u tohoto druhu byla mnohem vyšší) a přidal jsem hybridy nakažené rodem *Haemoproteus* (n=4). Jako negativní kontrola pro kvantitativní PCR byla použita deionizovaná voda místo DNA a pro ujištění, že zvolená sada primerů (HPqPCR) amplifikuje jen cyt b rodu *Haemoproteus* byly k pokusu přidány vzorky s potvrzenou nákazou různými liniemi rody *Plasmodium* i *Leucocytozoon*. Pro amplifikaci jaderného intronu ptáka byla zvolena sada primerů 18S1qPCR.

Kvantitativní PCR byla prováděna v objemu 10 μ l na jednu reakci podle následujícího protokolu:

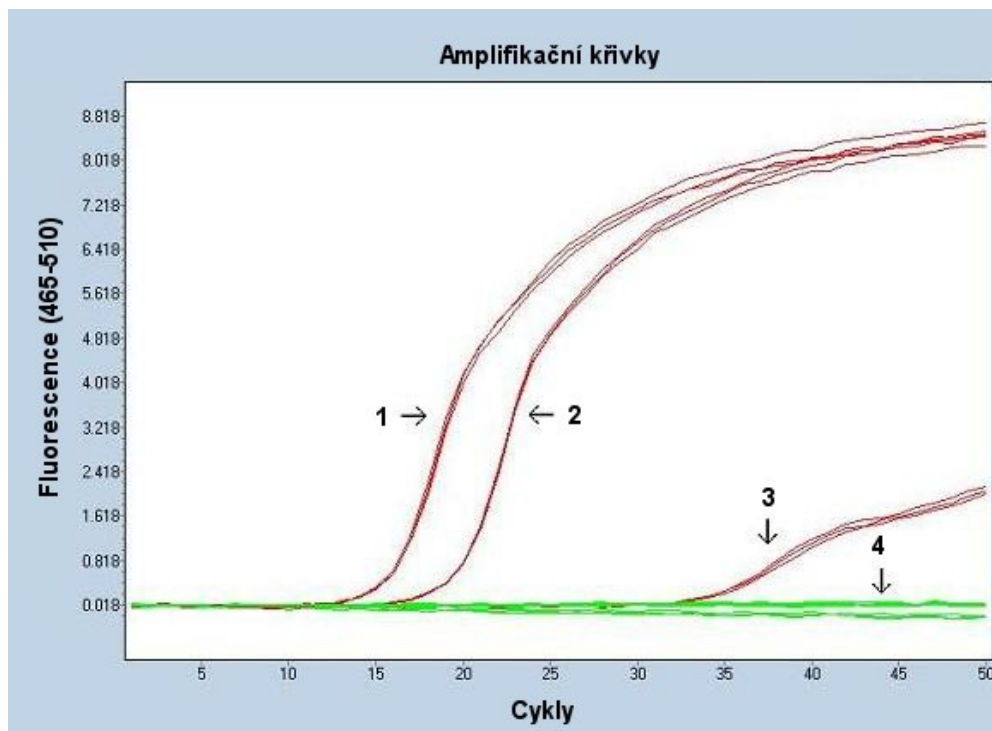
5 μ l SYBR green supermix (Biorad, Hercules, USA),

1 μ l (5 μ M) od každého primeru

2 μ l deionizované vody

1 μ l DNA

Podmínky reakce byly následující: pre-inkubace probíhala při teplotě 95°C 10 minut. Vlastní cyklus poté sestával z 50 opakování, denaturace probíhala při teplotě 95°C 10 sekund, anneling při teplotě 63°C 12 sekund a syntéza řetězce DNA při teplotě 72°C 15 sekund, kdy se měří signál SYBR greenu. Melting teploty byly nastaveny na 97°C 10 sekund \rightarrow 65°C 60 sekund \rightarrow 97°C continuous (k zaznamenání melting curves, které ukazují, jestli se tvoří jen 1 požadovaný produkt). Reakci uzavíralo chlazení při 40°C po dobu 10 sekund. Pro zvýšení pravděpodobnosti správného výsledku byly pro všechny vzorky použity triplikáty (jak pro sadu primerů pro amplifikaci cyt b tak pro sadu pro 18S) (obr. 24).



Obr. 24. Ukázka amplifikačních křivek po kvantitativní PCR.

1, 2 – triplikáty dvou vzorků s primery pro amplifikaci ptačího genu 18S; 3 – triplikát vzorku s primery pro amplifikaci parazitárního genu pro cytochrom b; 4 – triplikáty negativní kontroly (deionizovaná voda místo DNA) s primery pro amplifikaci ptačího genu 18S i parazitárního genu pro cytochrom b a triplikát vzorku, který je negativní pro infekci LULU1 (primery pro cyt b).

Výsledkem kvantitativní PCR jsou amplifikační křivky, vyjadřující grafické znázornění fluorescenčního signálu proti hodnotě cyklu PCR. V prvních cyklech je změna fluorescence zanedbatelná. V určitém cyklu v kterém křivka začne exponenciálně růst se nechá proložit Threshold, což je linie definující CT. Hodnota CT (Threshold cycle) se poté používá ke kvantifikaci exprese. Křivky negativních kontrol měly buď zanedbatelnou hodnotu fluorescence nebo začaly exponenciálně stoupat až ve velmi pozdních cyklech (42+) oproti vzorkům. Ke kontrole produktů PCR a negativních kontrol byla použita analýza disociačních křivek, která vyhodnocuje teplotu tání produktů PCR a umožňuje rozpoznání primer dimer artefaktů. Z jednotlivých triplikátů pak byl vypočítán aritmetický průměr.

Pro výpočet relativní parazitémie byla použita metoda delta/delta CT. Kvantitativní PCR probíhala v LightCycleru 480 II (Roche, Germany).

IV. 6 TVORBA FYLOGENETICKÝCH STROMŮ

Fylogenetické stromy nebyly hlavním výstupem této práce. Sloužily jen pro ilustraci příbuzenských vztahů mezi námi nalezenými liniemi, dalšími liniemi zachycenými v předešlých studiích o slavících a známými morfospecies ptačích hemosporid.

K sestavení stromů byly použity naše sekvence a sekvence uložené v databázi MalAvi (Bensch et al. 2009), které jsou zpětně dohledatelné podle názvu linie i v databázi GenBank. Editaci sekvencí a tvorbu alignmentu byla provedena v programu BioEdit (Hall 1999). K samotné tvorbě fylogenetických stromů byly použity programy MEGA4 (Tamura et al. 2007) a MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001) s využitím metod Neighbour-joining a Baesyánská analýza (10 milionů generací, model GTR+I+G, 2 konvergentní běhy, 4 řetězce, burn-in 2,5 milionu stromů). Grafická úprava a editace stromů do finální podoby byl použit program Dendroscope (Huson 2007).

IV. 7 STATISTICKÉ ANALÝZY

Pro srovnání diverzity ptačích hemosporid jsem použil metodu molekulární variance (AMOVA). Jedná se o hierarchickou analýzu rozptylu, pomocí které jsem chtěl zjistit, kolik procent variability vysvětlí dvě skupiny (dva druhy hostitelů), kolik procent vysvětlí zóny každého druhu (daleká alopatrie, blízká alopatrie, sympatrie) a kolik procent variability zbyde na vnitřek jedné zóny (Excoffier et al. 1992). Do analýzy jsem vkládal sekvence a počítal jsem s jejich rozdíly. Vloženou jednotkou byla vždy jedna sekvence z jednoho nakaženého ptáka (v případě smíšených infekcí se vkládaly samostatně obě sekvence). Zohledňuje se tu jen poměr detekovaných linií a jejich diverzita, nikoliv prevalence. Průkaznost byla zjišťována pomocí deseti tisíc permutací.

Pro porovnání prevalence mezi dvěma druhy hostitelů jsem použil zobecněné lineární modely (GLM) v prostředí R. Protože vstupní data nemají normální, ale binomické rozdělení. Použil jsem tedy binomický model a logit link.

Data binomického charakteru vznikají vždy, když sledujeme výskyt nějakého jevu a hodnotíme jen zda nastal nebo nenastal. Kromě často sledované úmrtnosti to může být i narození, konzumace (kořisti predátorem) nebo právě napadení (třeba hostitele parazitem). Binomická data nemají opakování, jaké se vyskytuje u dat z normálního rozdělení. Je to tak proto, že v rámci jednoho pokusu se výskyt všech událostí sečte a vyjádří jako prevalence.

Volbou binomického rozdělení ve funkci glm se použije funkce logit link. Pracuje se zde s transformací teoretické pravděpodobnosti, a nikoli s transformací prevalence. Lineární prediktor se vztahuje k link transformovaným středním hodnotám pravděpodobností (Pekár and Brabec 2009).

V VÝSLEDKY

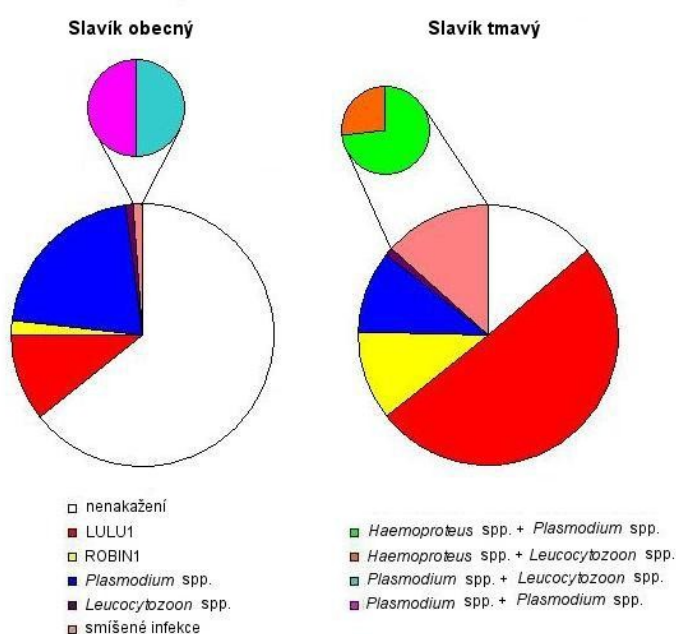
V. 1 PREVALENCE HEMOSPORID U SLAVÍKŮ

V. 1. 1 Celkové prevalence u slavíka obecného a slavíka tmavého

Celkem bylo diagnostikováno 370 ptáků, z toho 196 jedinců slavíka obecného, 165 jedinců slavíka tmavého a devět hybridů (jejichž výsledky budou zmíněny později) na přítomnost ptačích hemosporid. Vzorky byly nasbírány na pěti lokalitách – pro oba druhy v dalekých a blízkých alopatriích a v místě společného výskytu, v sympatrii. Určení prevalence proběhlo metodou nested PCR.

Celková prevalence u slavíka obecného byla 35,71 % (70 nakažených jedinců). Detekoval jsem tři rody hemosporid – *Haemoproteus*, *Plasmodium* a *Leucocytozoon*. Prevalence rodu *Haemoproteus* byla 12,24 % (způsobena dvěma genetickými liniemi), rodu *Plasmodium* 22,96 % (11 linií) a rodu *Leucocytozoon* 1,53 % (dvě linie). Byly odhaleny dvě smíšené infekce (obr. 25).

Celková prevalence u slavíka tmavého byla 86,06 % (142 nakažených jedinců). Detekovány byly tři stejné rody. Prevalence rodu *Haemoproteus* byla 74,55 % (způsobena dvěma genetickými liniemi), rodu *Plasmodium* 20,00 % (11 linií) a rodu *Leucocytozoon* 4,85 % (tři linie). Bylo odhaleno 22 smíšených infekcí (obr. 25).



Obr 25. Celková prevalence u dvou druhů slavíků.

V. 1. 2 Detekované genetické linie u slavíka obecného a slavíka tmavého

Nejvyšší prevalenci u slavíka obecného vykazovala linie LULU1 (z rodu *Haemoproteus*), jejíž podíl na prevalenci byl 30 %, velmi podobnou prevalenci ovšem vykazovala i linie SGS1 z rodu *Plasmodium*. Její podíl na prevalenci byla 27 %. Obě detekované linie rodu *Leucocytozoon* měly velmi nízkou prevalenci (tab. VI).

Tab. VI. Detekované genetické linie a jejich prevalence u slavíka obecného. Součet prevalencí převyšující hodnotu 100 % je způsoben smíšenými infekcemi.

název linie	rod parazita	počet infekcí	prevalence (%)	podíl na prevalenci (%)	podíl na prevalenci v rámci rodu (%)
LULU1	<i>Haemoproteus</i> (n=24)	21	10,71	30,00	87,50
ROBIN1		3	1,53	4,29	12,50
SGS1	<i>Plasmodium</i> (n=45)	19	9,69	27,14	42,22
LINN1		12	6,12	17,14	26,67
AFTRU5		1	0,51	1,43	2,22
AEMO01		1	0,51	1,43	2,22
WW3		1	0,51	1,43	2,22
RTSR1		5	2,55	7,14	11,11
ACCTAC01		2	1,02	2,86	4,44
GRW06		1	0,51	1,43	2,22
GRW09		1	0,51	1,43	2,22
GRW10		1	0,51	1,43	2,22
AFTRU4		1	0,51	1,43	2,22
RS4	<i>Leucocytozoon</i> (n=3)	1	0,51	1,43	33,33
SFC8		2	1,02	2,86	66,67

Nejvyšší prevalenci u slavíka tmavého (stejně jako u předchozího druhu) vykazovala linie LULU1, jejíž podíl na prevalenci byl v tomto případě téměř 74 %. Této hodnotě se prevalence žádné další linie nepřiblížila a dokonce nikdy nepřesáhla ani 5 %. (tab. VII).

Tab. VII. Detekované genetické linie a jejich prevalence u slavíka tmavého. Součet prevalencí převyšující hodnotu 100 % je způsoben smíšenými infekcemi.

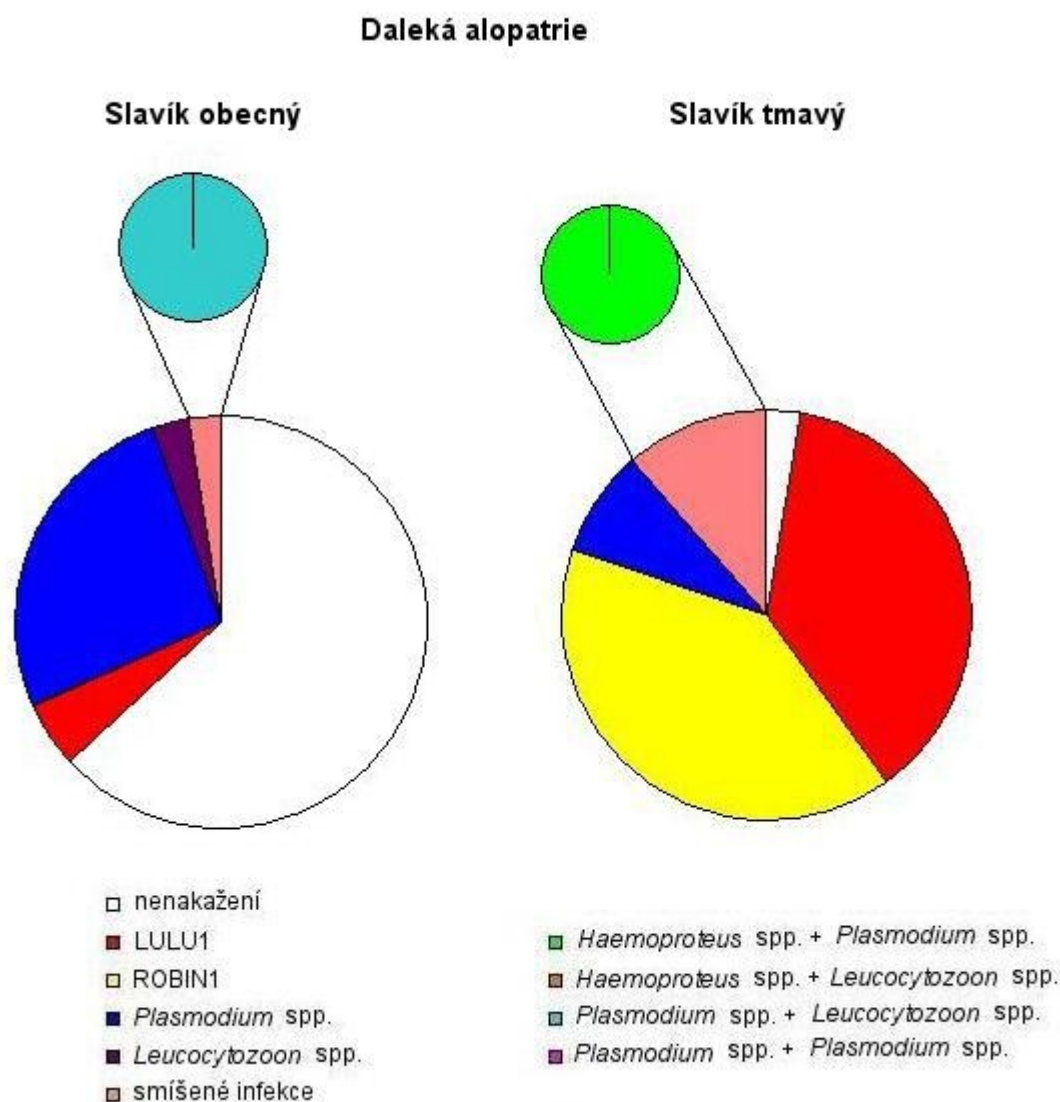
název linie	rod parazita	počet infekcí	prevalence (%)	podíl na prevalenci (%)	podíl na prevalenci v rámci rodu (%)
LULU1	<i>Haemoproteus</i> (n=123)	105	63,64	73,94	85,37
ROBIN1		18	10,91	12,68	14,63
SGS1	<i>Plasmodium</i> (n=33)	8	4,85	5,63	24,24
LINN1		3	1,82	2,11	9,09
AEMO01		7	4,24	4,93	21,21
WW3		4	2,42	2,82	12,12
RTSR1		3	1,82	2,11	9,09
GRW10		2	1,21	1,41	6,06
GRW11		3	1,82	2,11	9,09
SYBOR9		1	0,61	0,70	3,03
LULU2		1	0,61	0,70	3,03
LULU3		1	0,61	0,70	3,03
RS4		<i>Leucocytozoon</i> (n=8)	6	3,64	4,23
SFC8	1		0,61	0,70	12,50
LULU4	1		0,61	0,70	12,50

V. 1. 3 Prevalence u slavíků v dalekých alopatriích

V dalekých alopatriích bylo odchyceno 73 ptáků, z toho 38 slavíků obecných ve Španělsku, Francii a Tunisku a 35 slavíků tmavých v Lotyšsku, Finsku a Estonsku.

Prevalence u slavíka obecného v této zóně byla 36,84 % (14 nakažených jedinců). Pro rod *Haemoproteus* měla hodnotu 5,26 % (způsobena jednou genetickou linií), pro rod *Plasmodium* 28,95 % (pět linií) a pro rod *Leucocytozoon* 5,26 % (jedna linie). Byly odhalena jedna smíšená infekce (obr. 26).

Prevalence u slavíka tmavého měla hodnotu 97,14 % (34 nakažených jedinců). Prevalence rodu *Haemoproteus* byla 88,57 % (způsobena dvěma genetickými liniemi) a rodu *Plasmodium* 20,00 % (5 linií). Zástupci rodu *Leucocytozoon* v daleké alopatrii slavíka tmavého detekováni nebyli. Odhalil jsem čtyři smíšené infekce (obr. 26).



Obr. 26. Prevalence v dalekých alopatriích u dvou druhů slavíků.

V. 1. 4 Detekované genetické linie u slavíků v dalekých alopatriích

Nejvyšší prevalenci u slavíka obecného vykazovala linie LINN1 (z rodu *Plasmodium*), jejíž podíl na prevalenci byl skoro 36 %, následovala ji linie SGS1 ze stejného rodu s hodnotou přes 21 %. (tab. VIII).

Tab. VIII. Detekované genetické linie a jejich prevalence u slavíka obecného v daleké alopatrii. Součet prevalencí převyšující hodnotu 100 % je způsoben smíšenými infekcemi.

název linie	rod parazita	počet infekcí	prevalence (%)	podíl na prevalenci (%)	podíl na prevalenci v rámci rodu (%)
LULU1	<i>Haemoproteus</i> (n=2)	2	5,26	14,29	100,00
SGS1	<i>Plasmodium</i> (n=11)	3	7,89	21,43	27,27
LINN1		5	13,16	35,71	45,45
RTSR1		1	2,63	7,14	9,09
ACCTAC01		1	2,63	7,14	9,09
GRW06		1	2,63	7,14	9,09
SFC8	<i>Leucocytozoon</i> (n=2)	2	5,26	14,29	100,00

V daleké alopatrii slavíka tmavého zcela dominoval rod *Haemoproteus*. Obě jeho detekované linie (LULU1 a ROBIN1) měly podíl na prevalenci převyšující 40 %. Prevalence žádné linie rodu *Plasmodium* nepřesáhla 10 % (tab. IX).

Tab. IX. Detekované genetické linie a jejich prevalence u slavíka tmavého v daleké alopatrii. Součet prevalencí převyšující hodnotu 100 % je způsoben smíšenými infekcemi.

název linie	rod parazita	počet infekcí	prevalence (%)	podíl na prevalenci (%)	podíl na prevalenci v rámci rodu (%)
LULU1	<i>Haemoproteus</i> (n=31)	17	48,57	50,00	54,84
ROBIN1		14	40,00	41,18	45,16
SGS1	<i>Plasmodium</i> (n=7)	1	2,86	2,94	14,29
LINN1		1	2,86	2,94	14,29
AEMO01		1	2,86	2,94	14,29
RTSR1		3	8,57	8,82	42,86
SYBOR9		1	2,86	2,94	14,29

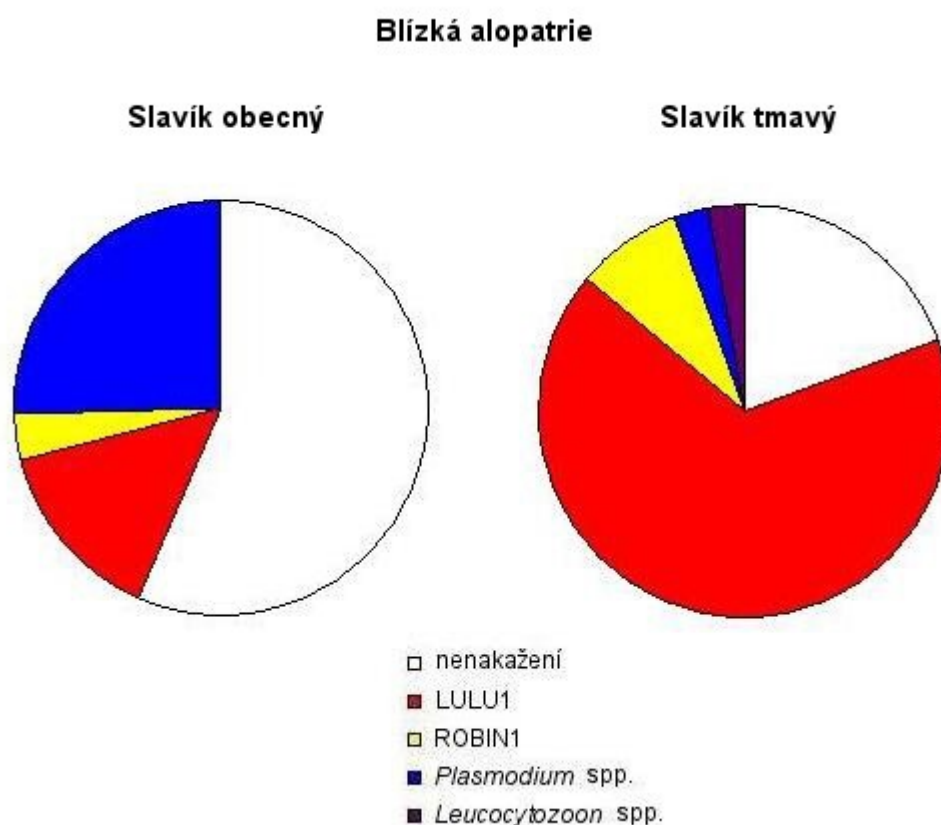
V. 1. 5 Prevalence u slavíků v blízkých alopatriích

V blízkých alopatriích bylo odchyceno 91 ptáků, z toho 55 slavíků obecných v České republice a 36 slavíků tmavých v Polsku.

Prevalence u slavíka obecného v blízké alopatrii byla 43,63 % (24 nakažených jedinců). Rod *Haemoproteus* vykazoval prevalenci 18,18 % (dvě genetické linie) a rod *Plasmodium* 25,45 % (pět linií). Zástupce rodu *Leucocytozoon* zde nebyl nalezen (obr. 27).

Prevalence u slavíka tmavého měla hodnotu 80,56 % (29 nakažených jedinců). Prevalence rodu *Haemoproteus* byla 75,00 % (způsobena dvěma genetickými liniemi), rodu *Plasmodium* jen 2,78 % (jediná linie) a rodu *Leucocytozoon* také 2,78 % (jedna linie) (obr. 27).

V této zóně nebyla ani u jednoho hostitelského druhu detekována žádná smíšená infekce.



Obr. 27. Prevalence v blízkých alopatriích u dvou druhů slavíků.

V. 1. 6 Detekované genetické linie u slavíků v blízkých alopatriích

Nejvyšší prevalenci u slavíka obecného v blízké alopatrii měla linie LULU1 (z rodu *Haemoproteus*), jejíž podíl na prevalenci byl přes 33 %, následovala ji linie SGS1 z rodu *Plasmodium* s hodnotou přes 25 %. (tab. X).

Tab. X. Detekované genetické linie a jejich prevalence u slavíka obecného v blízké alopatrii.

název linie	rod parazita	počet infekcí	prevalence (%)	podíl na prevalenci (%)	podíl na prevalenci v rámci rodu (%)
LULU1	<i>Haemoproteus</i> (n=10)	8	14,55	33,33	80,00
ROBIN1		2	3,64	8,33	20,00
SGS1	<i>Plasmodium</i> (n=14)	6	10,91	25,00	42,86
LINN1		2	3,64	8,33	14,29
RTSR1		4	7,27	16,67	28,57
ACCTAC01		1	1,82	4,17	7,14
GRW10		1	1,82	4,17	7,14

V blízké alopatrii slavíka tmavého dominoval opět rod *Haemoproteus*. Podíl na prevalenci linie LULU1 převyšoval 82 %. Prevalence linií z rodů *Plasmodium* a *Leucocytozoon* byly zcela zanedbatelné (tab. XI).

Tab. XI. Detekované genetické linie a jejich prevalence u slavíka tmavého v blízké alopatrii.

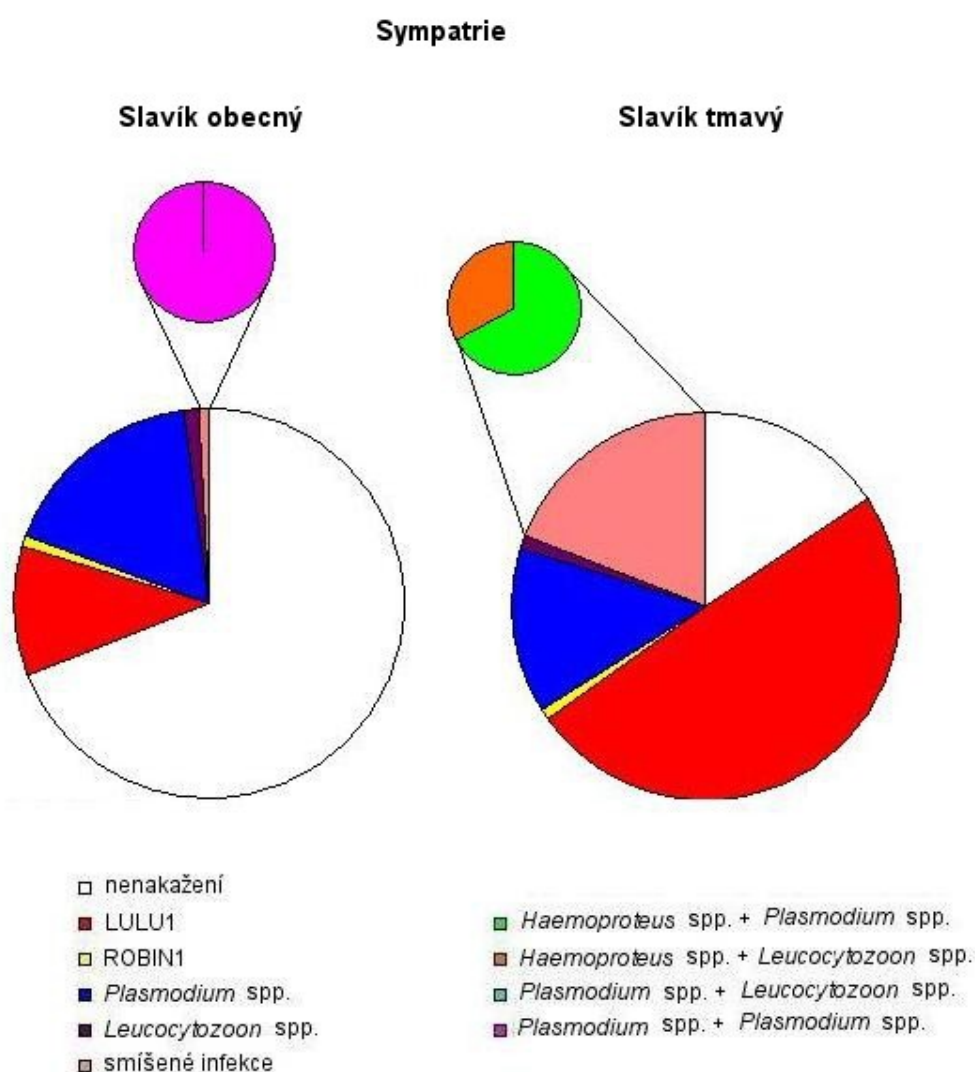
název linie	rod parazita	počet infekcí	prevalence (%)	podíl na prevalenci (%)	podíl na prevalenci v rámci rodu (%)
LULU1	<i>Haemoproteus</i> (n=27)	24	66,67	82,76	88,89
ROBIN1		3	8,33	10,34	11,11
AEMO01	<i>Plasmodium</i> (n=1)	1	2,78	3,45	100,00
RS4	<i>Leucocytozoon</i> (n=1)	1	2,78	3,45	100,00

V. 1. 7 Prevalence u slavíků v sympatrii

V zóně sympatrie v Polsku bylo odchyceno 197 ptáků, z toho 103 slavíků obecných 94 slavíků tmavých.

Prevalence hemosporid slavíka obecného v sympatrii byla 31,07 % (32 nakažených jedinců). Rod *Haemoproteus* vykazoval prevalenci 11,65 % (dvě genetické linie), rod *Plasmodium* 19,42 % (sedm linií) a rod *Leucocytozoon* 0,97 % (1 linie). Byla zde detekována jedna smíšená infekce (obr. 28).

Prevalence u slavíka tmavého měla hodnotu 84,04 % (79 nakažených jedinců). Prevalence rodu *Haemoproteus* byla 69,15 % (způsobena dvěma genetickými liniemi), rodu *Plasmodium* 26,60 % (osm linií) a rodu *Leucocytozoon* 7,45 % (tři linie). V sympatrii jsem u slavíka tmavého odhalil 18 smíšených infekcí (obr. 28).



Obr. 28. Prevalence v sympatrii u dvou druhů slavíků.

V. 1. 8 Detekované genetické linie u slavíků v sympatrii

Nejvyšší prevalenci u slavíka obecného v sympatrii měla linie LULU1 (z rodu *Haemoproteus*), jejíž podíl na prevalenci byl přes 34 %, následovala ji linie SGS1 z rodu *Plasmodium* s hodnotou přes 31 %. Prevalence většiny zbylých linií nepřesáhla 5 % (tab. XII).

Tab. XII. Detekované genetické linie a jejich prevalence u slavíka obecného v sympatrii. Součet prevalencí převyšující hodnotu 100 % je způsoben smíšenými infekcemi.

název linie	rod parazita	počet infekcí	prevalence (%)	podíl na prevalenci (%)	podíl na prevalenci v rámci rodu (%)
LULU1	<i>Haemoproteus</i> (n=12)	11	10,68	34,38	91,67
ROBIN1		1	0,97	3,13	8,33
SGS1	<i>Plasmodium</i> (n=20)	10	9,71	31,25	50,00
LINN1		5	4,85	15,63	25,00
AFTRU5		1	0,97	3,13	5,00
AEMO01		1	0,97	3,13	5,00
WW3		1	0,97	3,13	5,00
GRW09		1	0,97	3,13	5,00
AFTRU4		1	0,97	3,13	5,00
RS4	<i>Leucocytozoon</i> (n=1)	1	0,97	3,13	100,00

Nejvyšší podíl na prevalenci v sympatrii slavíka tmavého měla opět linie LULU1 s hodnotou přes 81 %. Prevalence dalších linií byla nízká a nikdy nepřesáhla 10 % (tab. XIII).

Tab. XIII. Detekované genetické linie a jejich prevalence u slavíka tmavého v sympatrii. Součet prevalencí převyšující hodnotu 100 % je způsoben smíšenými infekcemi.

název linie	rod parazita	počet infekcí	prevalence (%)	podíl na prevalenci (%)	podíl na prevalenci v rámci rodu (%)
LULU1	<i>Haemoproteus</i> (n=65)	64	68,09	81,01	98,46
ROBIN1		1	1,06	1,27	1,54
SGS1	<i>Plasmodium</i> (n=25)	7	7,45	8,86	28,00
LINN1		2	2,13	2,53	8,00
AEMO01		5	5,32	6,33	20,00
WW3		4	4,26	5,06	16,00
GRW10		2	2,13	2,53	8,00
GRW11		3	3,19	3,80	12,00
LULU2		1	1,06	1,27	4,00
LULU3		1	1,06	1,27	4,00
RS4		<i>Leucocytozoon</i> (n=7)	5	5,32	6,33
SFC8	1		1,06	1,27	14,29
LULU4	1		1,06	1,27	14,29

V. 2 POROVNÁNÍ DIVERZITY A PREVALENCE MEZI DRUHY

Nejprve jsem se zaměřil na porovnání variability (diverzity) mezi hostitelskými druhy. Výsledkem analýzy byla následující tabulka.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	1	331.361	2.97642 Va	18.02
Among populations within groups	4	123.037	0.51219 Vb	3.10
Within populations	230	2997.331	13.03187 Vc	78.88
Total	235	3451.729	16.52048	

Fixation Indices

FSC : 0.03782 (p = 0.01644+-0.00119)
FST : 0.21117 (p < 0.00001)
FCT : 0.18017 (p = 0.10109+-0.00302)

Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že se mezi druhy vysvětlí 18 % variability, ovšem test pro tuto skutečnost nebyl průkazný (FCT), uvnitř jednoho druhu mezi zónami daleká alopatrie, blízká alopatrie a sympatrie jsou vysvětlena 3 % variability (dostatečně průkazné, FSC) a téměř 79 % variability zbývá na populaci v jedné odchytové zóně (hodnota FST potvrdila, že je to průkazné a že se ve vzorku objevuje struktura daná populací).

V metodice bylo ovšem zmíněno (kap. IV. 7), že výše uvedená analýza nezohledňuje prevalenci, a proto bylo nutné použít i jiné testy (lineární modely GLM). Položil jsem si následující otázky, které jsem chtěl otestovat:

- 1) Celková prevalence se neliší mezi dvěma druhy hostitelů.

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	-1.00654	0.08361	-12.038	<2e-16 ***
druhST	1.00046	0.10030	9.974	<2e-16 ***

2) Prevalence nejběžnější linie LULU1 se neliší mezi dvěma druhy hostitelů.

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-2.1260	0.2309	-9.209	<2e-16 ***
druhST	2.6856	0.2819	9.526	<2e-16 ***

3) Prevalence linie ROBIN1 se neliší mezi dvěma druhy hostitelů.

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-4.1692	0.5818	-7.166	7.71e-13 ***
druhST	2.0692	0.6331	3.268	0.00108 **

4) Prevalence nejběžnější rodu *Haemoproteus* se neliší mezi dvěma druhy hostitelů.

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-1.9752	0.2178	-9.068	<2e-16 ***
druhST	3.0498	0.2818	10.824	<2e-16 ***

Na základě výsledků testů můžu s vysokou podporou říci, že se signifikantně mezi druhy hostitelů liší celková prevalence, prevalence linie LULU1 a ROBIN1 i prevalence rodu *Haemoproteus*.

Po analýzách pro celý odchyťový areál jsem se zaměřil na rozdíly mezi jednotlivými zónami odchyty – daleká alopatrie, blízká alopatrie a sympatrie. Interakce říká, zda je pattern ve vztahu k oblasti stejný u obou druhů, či ne. Pokud ano, lze testovat zvlášť slavíka tmavého a slavíka obecného.

1) Nejprve jsem se zaměřil na linii LULU1 a pomocí uvedených modelů jsem zjistili, že interakce nebyla průkazná:

Analysis of Deviance Table

Model 1: LULU1 ~ oblast + druh + oblast:druh

Model 2: LULU1 ~ oblast + druh

	Resid. Df	Resid. Dev	Df	Deviance	P(> Chi)
1	356	343.56			
2	358	344.00	-2	-0.44	0.802

2) Podobně jsem se podíval i na interakce u linie ROBIN1.

Analysis of Deviance Table

Model 1: ROBIN1 ~ oblast + druh + oblast:druh

Model 2: ROBIN1 ~ oblast + druh

	Resid. Df	Resid. Dev	Df	Deviance	P(> Chi)
1	356	107.301			
2	358	115.677	-2	-8.376	0.01518 *

Zde je ovšem interakce jednoznačně průkazná (ROBIN1 se chová ve vztahu k oblasti jinak u obou druhů), takže když se jsem se zaměřil samostatně na jednotlivé druhy, výsledek je následující:

Slavík obecný:

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-3.2771	0.7203	-4.550	5.38e-06 ***
oblastDA	-17.2889	2876.2459	-0.006	0.995
oblastSYM	-1.3576	1.2364	-1.098	0.272

Slavík tmavý:

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	-2.3979	0.6030	-3.976	7e-05 ***
oblastDA	1.9924	0.6948	2.868	0.00413 **
oblastSYM	-2.1347	1.1723	-1.821	0.06862

Z výsledků je jednoznačné, že u slavíka obecného co se týká nákazy linií ROBIN1, není žádný pattern, naopak u slavíka tmavého je tento pattern jasný. Je zde hezky vidět, že daleká alopatrie se úplně liší od alopatrie blízké (0.00413). V sympatrii je to jinak na opačnou stranu (viz záporné znaménko u Estimate) se signifikancí 0.06862 od blízké alopatrie. Obecně je v sympatrii nejméně ROBIN1 (-2.1347 rozdíl oproti blízké alopatrii), pak v blízké alopatrii (to je v Interceptu) a nejvíce nakažených je v daleké alopatrii (+1.9924). Tyto výsledky jsou uvedeny v logaritmické škále.

V. 3 DETEKOVANÉ SMÍŠENÉ INFEKCE

K detekci smíšených infekcí jsem použil metodu odečítání dvojitých peaků v sekvenci cytochromu b v programu CodonCode Aligner. Celkem jsem odhalil 24 smíšených infekcí, dvě u slavíka obecného a 22 u slavíka tmavého. Ve všech případech se jednalo o infekci způsobenou dvěma různými liniemi hemosporid.

V případě slavíka obecného šlo v jednom případě o infekci liniemi SGS1 a AEMO1 (obě *Plasmodium* spp.) a v druhém případě se vyskytly smíšeně linie LINN1 (*Plasmodium* spp.) a SFC8 (*Leucocytozoon* spp.).

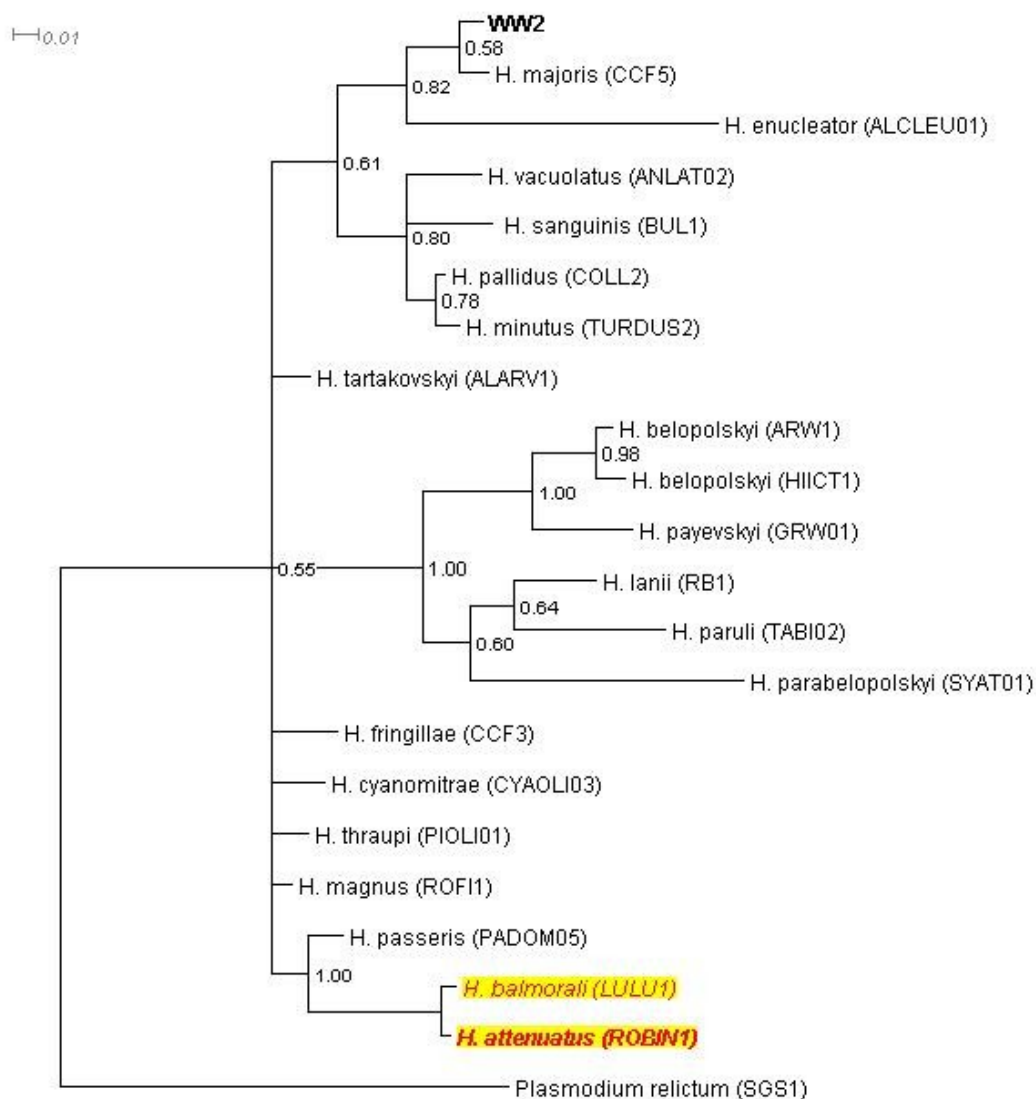
U slavíka tmavého se jednalo vždy o smíšenou infekci linie LULU1 (*Haemoproteus* spp.) a další linie – pětkrát se vyskytla kombinace s linií SGS1, pětkrát s AEMO1, třikrát s RTSR1, dvakrát s WW3, jednou s GRW11 (všechny tyto linie náleží do rodu *Plasmodium*), dále čtyřikrát s RS4, jednou s SFC8 a jednou s LULU4 (všechny tři z rodu *Leucocytozoon*).

V. 4 FYLOGENETICKÉ STROMY

Následující fylogenetické stromy pro jednotlivé rody ptačích hemosporid byly vytvořeny pomocí Bayesiánských metod (obr. 29-31). Do stromů byly zahrnuty vždy známé morfologické druhy přiřazené ke konkrétní genetické linii, poté všichni zástupci hemosporid detekováni dříve u slavíka obecného, slavíka tmavého a slavíka modráčka (Bensch et al. 2009) a námi zachycené linie ze slavíka obecného a slavíka tmavého.

Stromy slouží hlavně k tomu, aby se ukázala vzájemná genetická příbuznost mnou detekovaných linií a také těchto linií k již definovaným morfospecies (morfologicky odlišitelným druhům hemosporid).

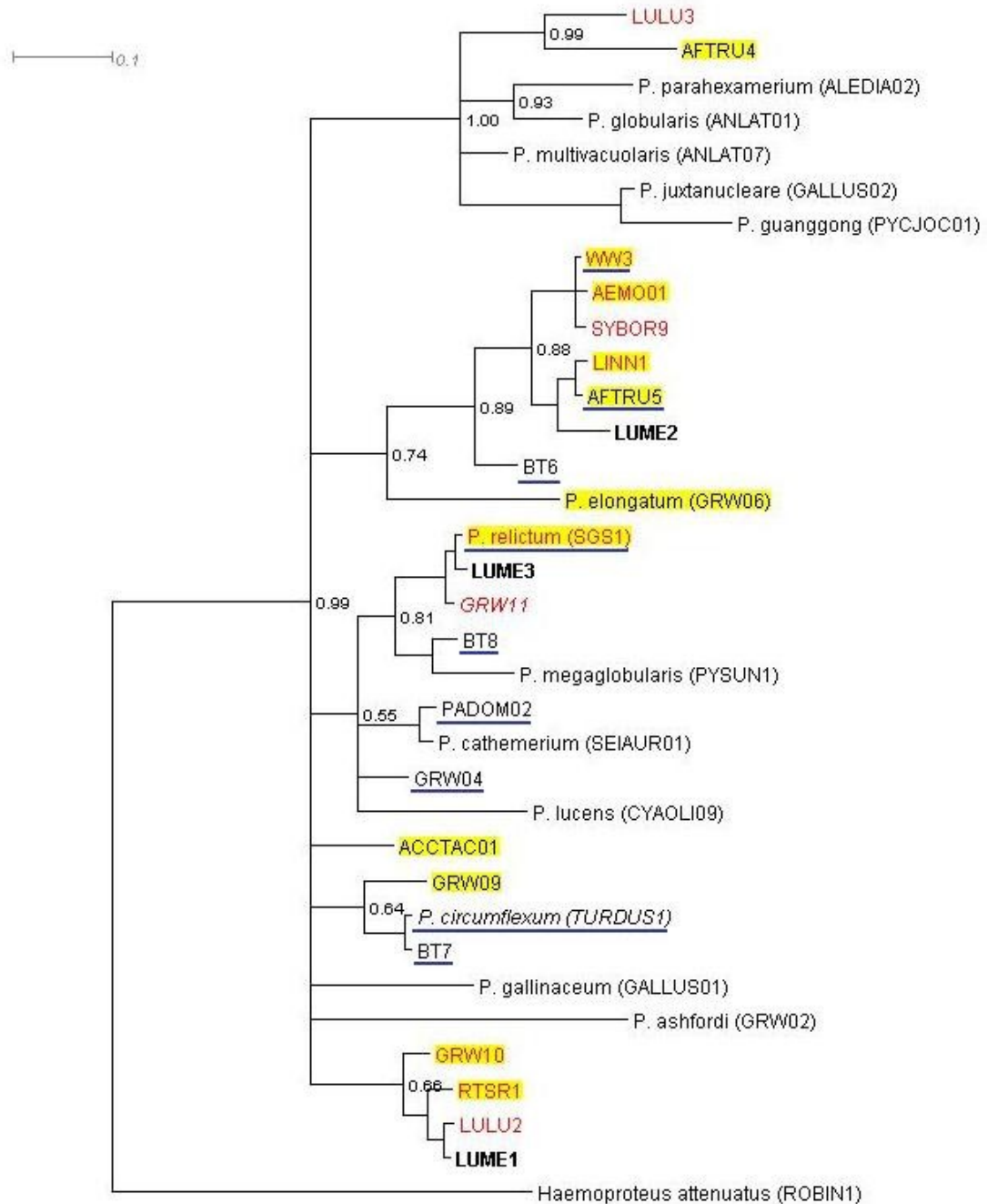
V. 4. 1 *Haemoproteus* spp.



Obr. 29. Fylogenetický strom rodu *Haemoproteus*.

Do stromu jsou zahrnuty známé morfologické druhy rodu přiřazené ke konkrétní linii, dále zástupci hemosporid již dříve nalezené u slavíka obecného (tučně), slavíka tmavého (kurzivou) a námi nalezené linie ze slavíka obecného (žlutý obdélník) a slavíka tmavého (červeně). K zakotvení stromu došlo pomocí *Plasmodium relictum* (SGS1).

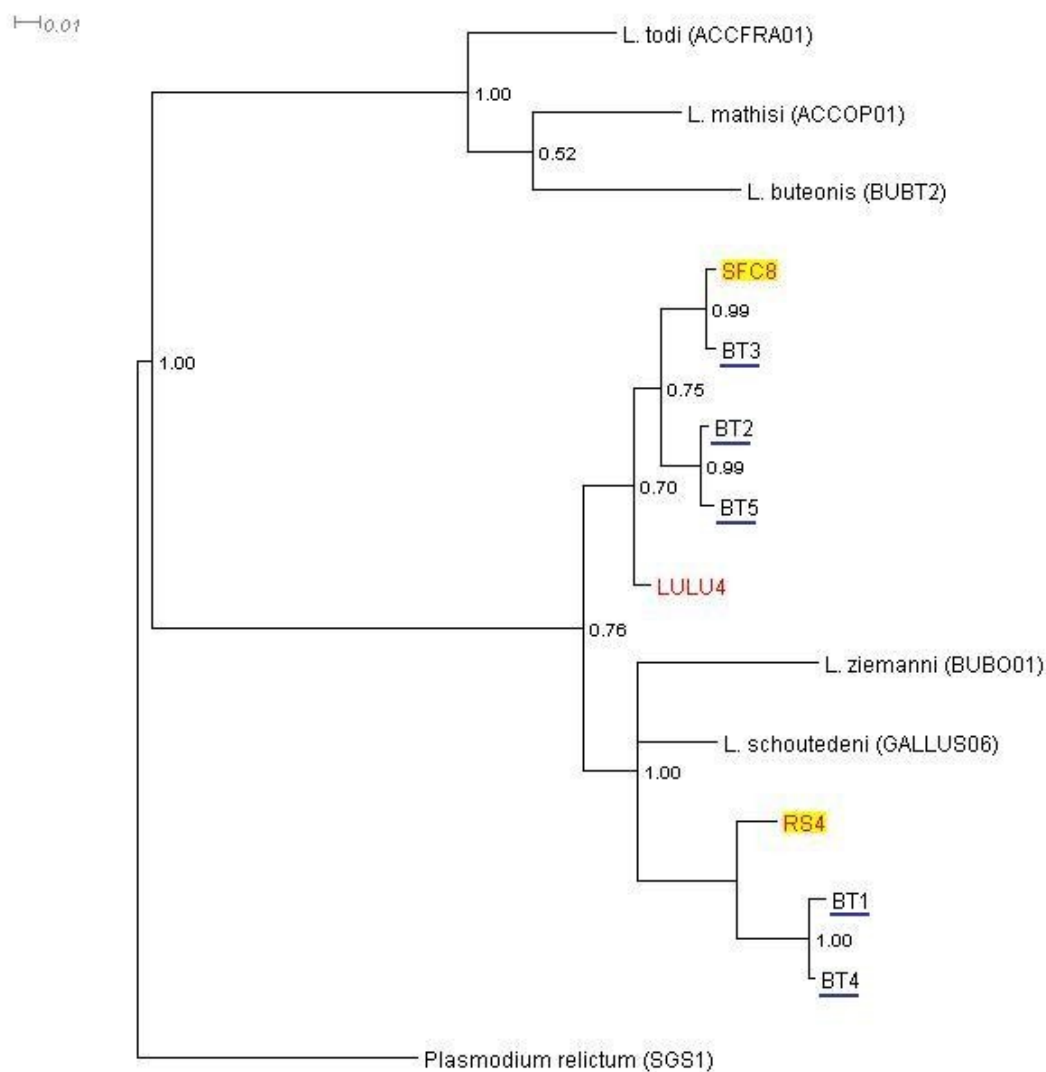
V. 4. 2 *Plasmodium* spp.



Obr. 30. Fylogenetický strom rodu *Plasmodium*.

Do stromu jsou zahrnuty známé morfologické druhy rodu přiřazené ke konkrétní linii, dále zástupci hemosporid již dříve nalezené u slavíka obecného (tučně), slavíka tmavého (kurzivou), slavíka modráčka (modré podtržení) a námi nalezené linie ze slavíka obecného (žlutý obdélník) a slavíka tmavého (červeně). K zakořenění stromu došlo pomocí *Haemoproteus attenuatus* (ROBIN1).

V. 4. 3 *Leucocytozoon* spp.



Obr. 31. Fylogenetický strom rodu *Leucocytozoon*.

Do stromu jsou zahrnuty známé morfologické druhy rodu přiřazené ke konkrétní linii, dále zástupci hemosporid již dříve nalezené slavíka modráčka (modré podtržení) a námi nalezené linie ze slavíka obecného (žlutý obdélník) a slavíka tmavého (červeně). K zakořenění stromu došlo pomocí *Plasmodium relictum* (SGS1).

V. 5 HOSTITELSKÁ SPECIFICITA GENETICKÝCH LINIÍ

Následující tabulka (tab. XIV) uvádí přehled mnou detekovaných genetických linií ptačích hemosporid u studovaných druhů hostitelů (slavík obecný a slavík tmavý). U každé linie je vždy uvedeno, k jakému druhu hemosporid patří, v jakých hostitelích (se zařazením do čeledi a řádu) byla nalezena před naší studií a oblast, kde byli daní hostitelé odchyceni. V tabulce nejsou zaznamenány linie LULU2, LULU3 a LULU4, které byly poprvé detekovány v mé studii a jsou tudíž známy jen z jednoho hostitele (ve všech třech případech se jedná o slavíka tmavého).

Tab. XIV. Tabulka uvádí námi detekovaných 17 genetických linií ptačích hemosporid. Každá linie je přiřazena k druhu parazita, hostitelům, ve kterých byla nalezena a oblasti, kde byli hostitelé odchyceni. Data vychází z databáze MalAvi (Bensch et al. 2009).

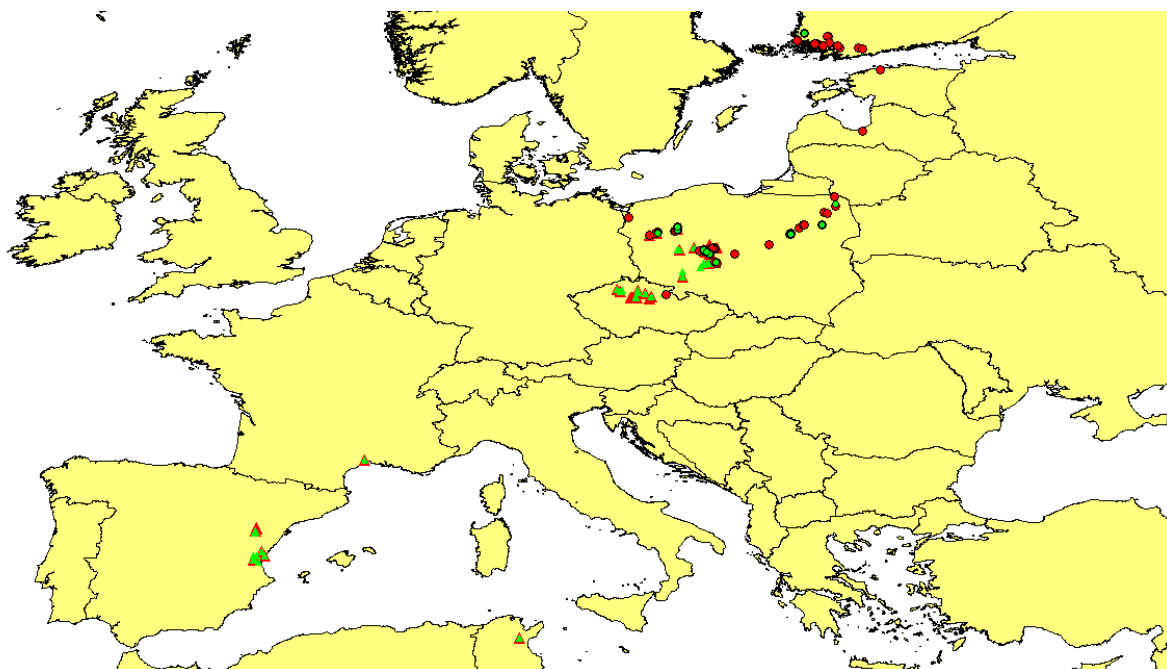
Linie	Morfospecies	Hostitel	Čeď	Řád	Lokalita
LULU1	<i>H. balmorali</i>	<i>Luscinia luscinia</i>	Muscicapidae	Passeriformes	Evropa
ROBIN1	<i>H. attenuatus</i>	<i>Luscinia megarhynchos</i> , <i>Luscinia luscinia</i> , <i>Saxicola rubetra</i> , <i>Erithacus rubecula</i>	Muscicapidae	Passeriformes	Evropa, Afrika
ACCTAC01	<i>P. spp.</i>	13 druhů hostitelů	9 čeledí	Passeriformes, Accipitriformes, Piciiformes, Coraciiformes,	Afrika, Evropa
AEMO01	<i>P. spp.</i>	<i>Aegypius monachus</i> , <i>Terpsiphone viridis</i> , <i>Ficedula albicollis</i>	Accipitridae, Monarchidae, Muscicapidae	Accipitriformes, Passeriformes	Evropa, Afrika
AFTRU4	<i>P. spp.</i>	<i>Turdus pelios</i>	Turdidae	Passeriformes	Afrika
AFTRU5	<i>P. spp.</i>	<i>Luscinia svecica</i> , <i>Turdus pelios</i>	Muscicapidae, Turdidae	Passeriformes	JZ Asie, Afrika
GRW06	<i>P. elongatum</i>	24 druhů hostitelů	18 čeledí	Ciconiiformes, Passeriformes, Columbiformes, Coraciiformes, Strigiformes	celosvětově
GRW09	<i>P. spp.</i>	39 druhů hostitelů	12 čeledí	Passeriformes	Evropa, Afrika
GRW10	<i>P. spp.</i>	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>	Sylviidae	Passeriformes	Evropa
GRW11	<i>P. spp.</i>	20 druhů hostitelů	9 čeledí	Passeriformes, Galliformes,	Evropa, Afrika, Japonsko, JZ Asie
LINN1	<i>P. spp.</i>	<i>Carduelis cannabina</i> , <i>Parus caeruleus</i> , <i>Turdus merula</i> , <i>Turdus philomelos</i> , <i>Anthornis melanura</i>	Fringillidae, Paridae, Turdidae, Meliphagidae	Passeriformes	Evropa, Nový Zéland

RTSR1	<i>P. spp.</i>	<i>Cercotrichas galactotes,</i> <i>Acrocephalus arundinaceus,</i> <i>Falco naumanni,</i> <i>Quelea quelea,</i> <i>Ficedula hypoleuca,</i> <i>Sylvia borin</i>	Muscicapidae, Sylviidae, Falconidae, Ploceidae	Passeriformes, Accipitriformes	Evropa, Afrika
SGS1	<i>P. relictum</i>	47 druhů hostitelů	15 čeledí	Passeriformes, Gruiformes, Galliformes, Procellariiformes, Sphenisciformes	celosvětově
SYBOR9	<i>P. spp.</i>	<i>Sylvia borin,</i> <i>Stiphrornis erythrothorax</i>	Sylviidae, Muscicapidae	Passeriformes	Evropa, Afrika
WW3	<i>P. spp.</i>	9 druhů hostitelů	8 čeledí	Passeriformes	Severní Amerika, Evropa, Afrika
RS4	<i>L. spp.</i>	<i>Phoenicurus phoenicurus,</i> <i>Sylvia atricapilla</i>	Muscicapidae	Passeriformes	Evropa
SFC8	<i>L. spp.</i>	<i>Muscicapa striata</i>	Muscicapidae	Passeriformes	Afrika

V. 6 GEOGRAFICKÉ ROZŠÍŘENÍ VYBRANÝCH LINIÍ

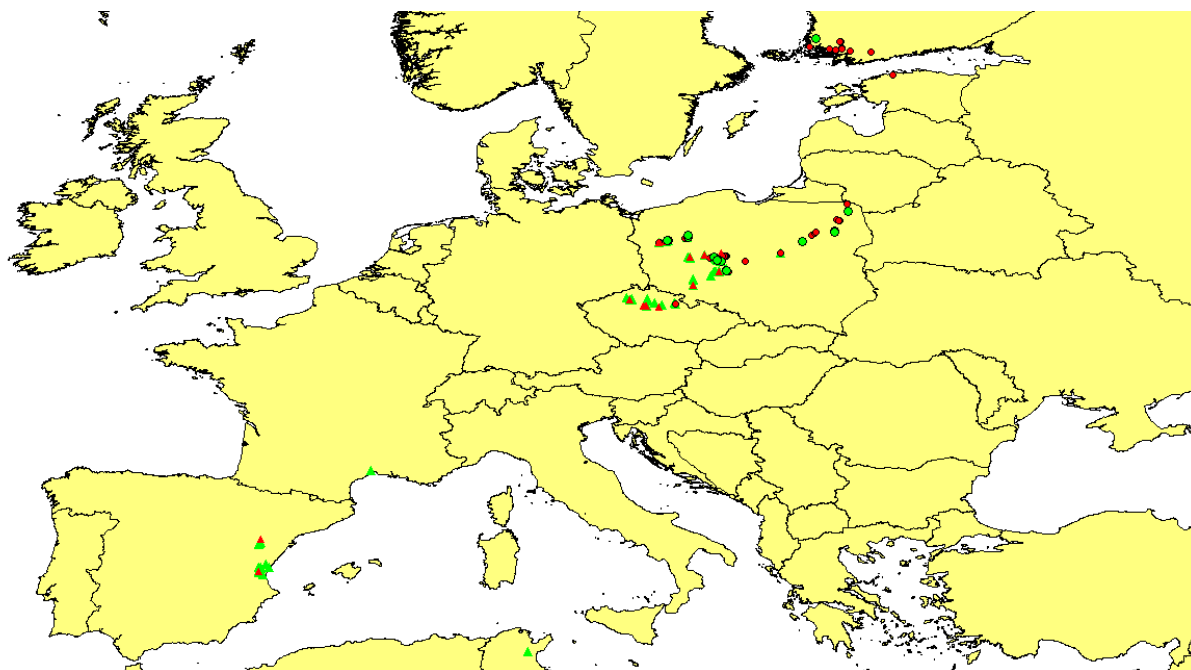
Na následujících mapách bude zaznamenáno geografické rozšíření vybraných genetických linií (těch, kde je patrný nějaký trend) ptačích hemosporid u slavíka obecného a slavíka tmavého.

První mapa (obr. 32) zobrazuje celkový přehled odchycených nakažených (jakýmkoliv rodem ptačích hemosporid) a nenakažených ptáků napříč celým odchytovým areálem.



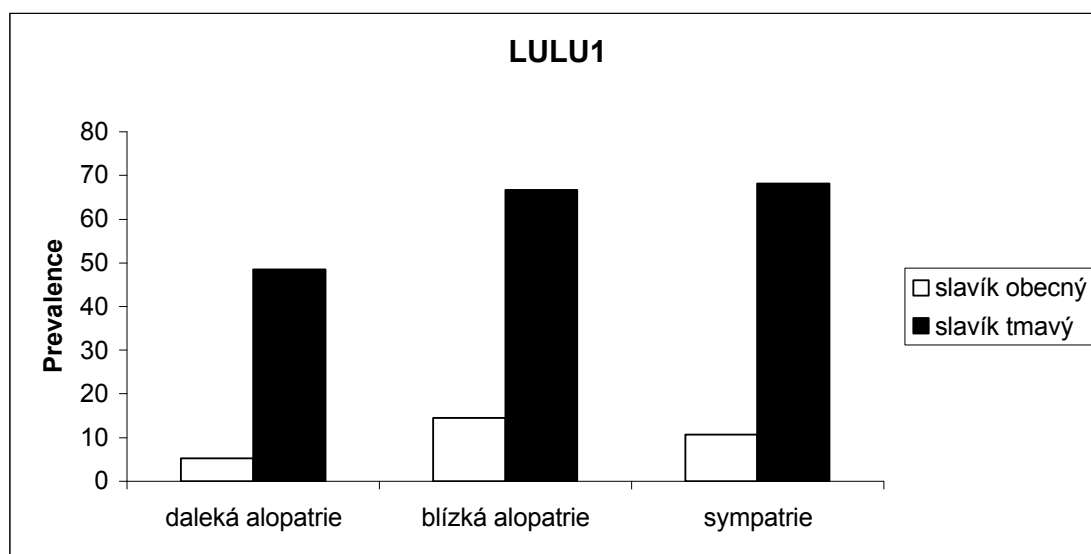
Obr. 32. Nakažení a nenakažení ptáci.
Červený trojúhelník – nakažený slavík obecný; červený kruh – nakažený slavík tmavý; zelený trojúhelník – nenakažený slavík obecný; zelený kruh – nenakažený slavík tmavý;

Na dalších dvou mapách (obr. 33 a obr. 35) je zobrazen výskyt nejběžnější genetické linie LULU1 (z rodu *Haemoproteus*). První ukazuje výskyt v celém areálu a druhá zaostření na zónu sympatrie a blízkých alopatrií obou druhů slavíků. Jsou zde vyznačeni i nenakažení jedinci. Jednoznačně vyšší prevalenci této linie u slavíka tmavého dokazuje i graf. (obr. 34).

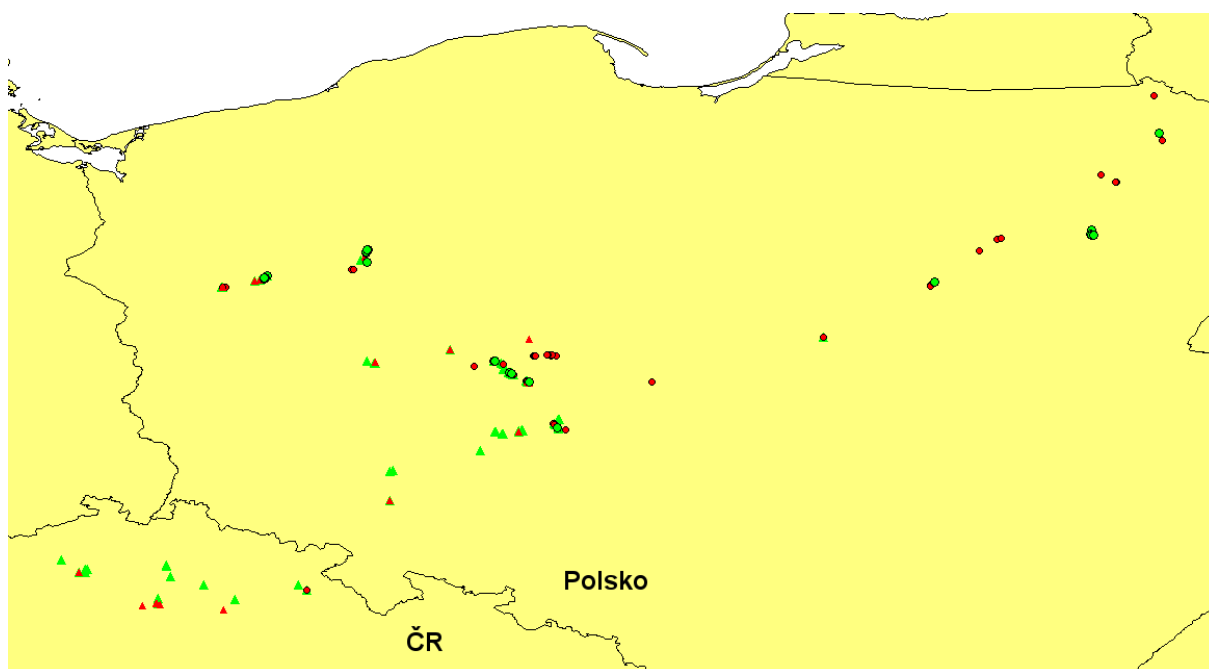


Obr. 33. Výskyt linie LULU1 v celém odchytové areálu.

Červený trojúhelník – LULU1 u slavíka obecného; červený kruh – LULU1 u slavíka tmavého; zelený trojúhelník – nenakažený slavík obecný; zelený kruh – nenakažený slavík tmavý.

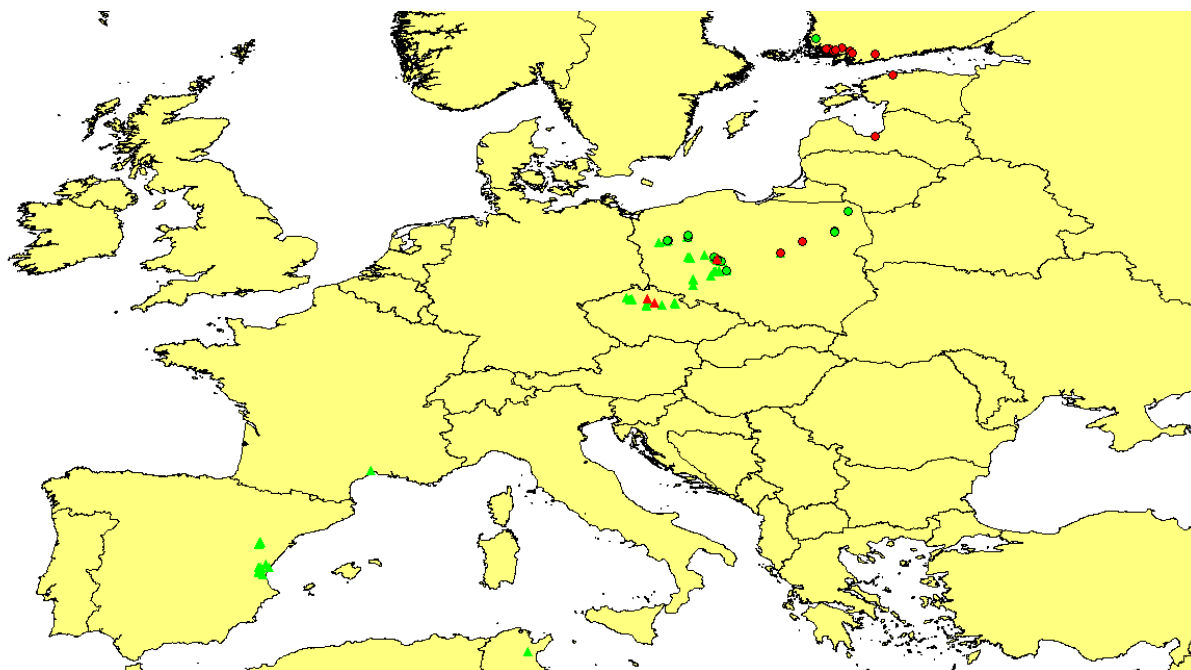


Obr. 34. Porovnání prevalence linie LULU1 v daleké alopatrii, blízké alopatrii a sympatrii u dvou druhů slavíků.

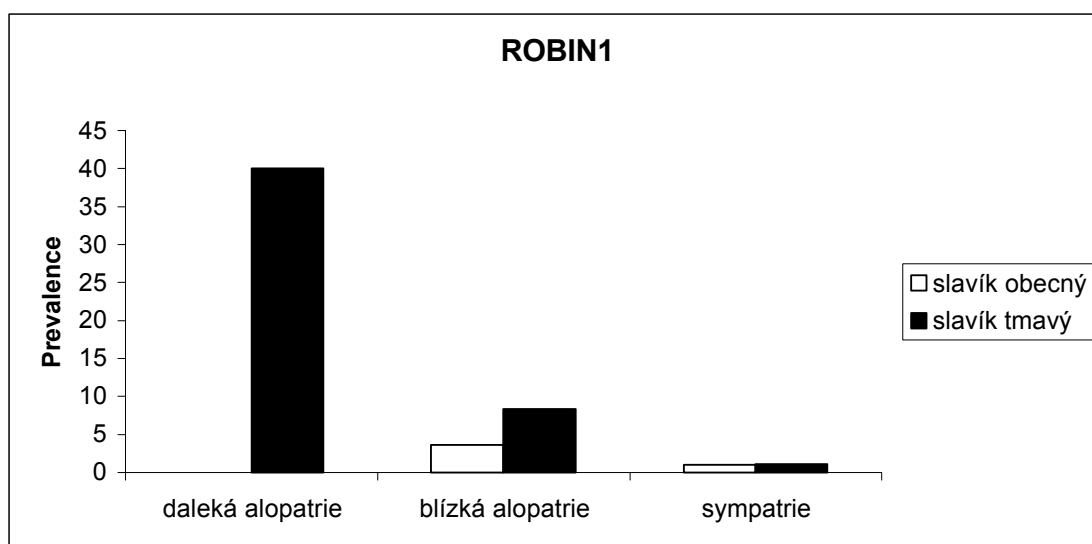


Obr. 35. Výskyt linie LULU1 v sympatrii a blízkých alopatriích.
 Červený trojúhelník – LULU1 u slavíka obecného; červený kruh – LULU1 u slavíka tmavého; zelený trojúhelník – nenakažený slavík obecný; zelený kruh – nenakažený slavík tmavý.

Poslední mapa (obr. 36) zobrazuje výskyt linie ROBIN1 (z rodu *Haemoproteus*), kde je jasně patrné rozšíření převážně v severní části hnízdního areálu, což ukazuje i graf (obr. 37) s prevalencemi této linie ve všech třech odchyťových zónách slavíka obecného a slavíka tmavého.



Obr. 36. Výskyt linie ROBIN1 v celém odchyťovém areálu.
 Červený trojúhelník – ROBIN1 u slavíka obecného; červený kruh – ROBIN1 u slavíka tmavého; zelený trojúhelník – nenakažený slavík obecný; zelený kruh – nenakažený slavík tmavý.



Obr. 37. Porovnání prevalence linie ROBIN1 v daleké alopatrii, blízké alopatrii a sympatrii u dvou druhů slavíků.

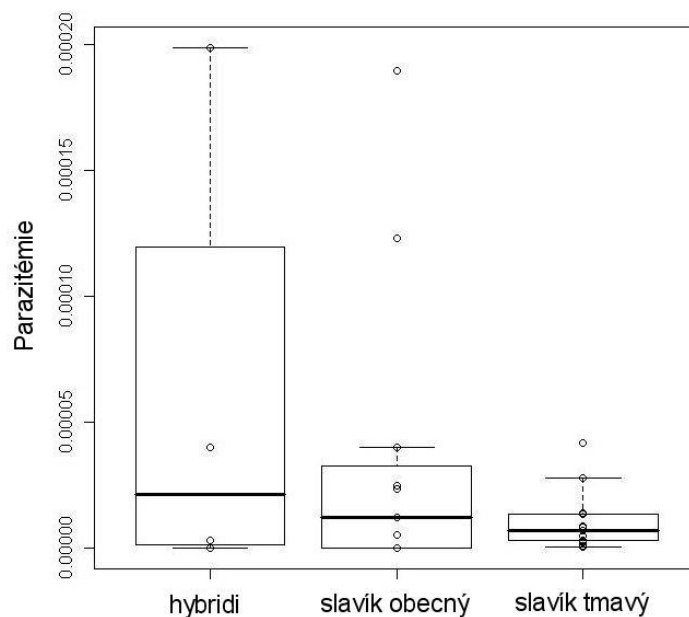
V. 7 PARAZITÉMIE

Hodnota parazitémie byla měřena pomocí kvantitativní PCR reakce, kdy jsem zjišťoval relativní poměr mezi množstvím kopií jaderného genu (18S) ptačího hostitele a množstvím kopií mitochondriálního genu (cyt b) parazita.

Pro porovnání parazitémie mezi dvěma druhy slavíků a jejich hybridy jsem zvolil nejběžnější rod hemosporid *Haemoproteus* a navrhl jsem primery, které amplifikují část cyt b obou jeho nalezených linií (LULU1 a ROBIN1), které se liší pouze jedinou substitucí v sekvenci tohoto genu.

Vybral jsem nakažené jedince slavíka obecného ze zóny sympatrie (n=11) a doplnil jsem je 15 nakaženými jedinci slavíka tmavého (každý z jiné lokality v sympatrii) a všemi čtyřmi nakaženými hybridy.

Naměřené hodnoty parazitémie byly velmi nízké, jak ukazuje obrázek (obr. 38) a pohybovaly se v rozmezí $1 \cdot 10^{-8}$ - $1,98 \cdot 10^{-4}$, což odpovídá jedné nakažené krvince ze sta milionů až zhruba dvěma nakaženým krvinkám z deseti tisíc nenakažených.



Obr. 38. Boxplot a konkrétní hodnoty vyjadřující parazitémii linií LULU1 a ROBIN1 u dvou druhů slavíků a jejich hybridů.

Slavík tmavý vykazoval jednoznačně vyšší prevalenci, nabízely se tedy dvě možnosti, které by vysvětlovaly hodnotu parazitémie – zda se k vyšší prevalenci pojí i vyšší parazitémie nebo vyšší prevalence znamená nižší parazitémii (imunitní systém hostitele je na parazita lépe připraven, a proto je hodnota parazitémie nižší).

Na základě Man-Whitney testu jsem zjistil, že rozdíly v parazitémii mezi dvěma druhy slavíků nejsou průkazné ($W=87$; $p\text{-value}=0.8384$). U slavíka obecného se objevily dvě odlehle hodnoty parazitémie, stejně tak tomu bylo i u jednoho hybridního jedince.

V. 8 HYBRIDI

Celkem bylo odchyceno devět hybridních jedinců v polské zóně sympatrie. Celková prevalence hemosporid měla hodnotu 66,67 % (šest nakažených jedinců). Byla u nich odhalena jedna smíšená infekce. Nejčastější linie byla stejně jako u slavíka tmavého LULU1 z rodu *Haemoproteus*, jejíž prevalence převyšovala 44 % (tab. XV).

Tab. XV. Detekované genetické linie a jejich prevalence u hybridů slavíka tmavého a slavíka obecného. Součet prevalencí převyšující hodnotu 100 % je způsoben smíšenou infekcí.

název linie	rod parazita	počet infekcí	prevalence (%)	podíl na prevalenci (%)	podíl na prevalenci v rámci rodu (%)
LULU1	<i>Haemoproteus</i> (n=4)	4	44,44	66,67	100,00
SGS1	<i>Plasmodium</i>	2	22,22	33,33	66,67
AEMO01	(n=3)	1	11,11	16,67	33,33

V případě smíšené infekce se u hybridních jedinců jednalo o kombinovanou infekci linií LULU1 (rod *Haemoproteus*) a AEMO01 (rod *Plasmodium*).

Díky kvantitativní PCR jsem zjistil, že hodnota parazitémie u hybridů se výrazně neliší od hodnoty parazitémie ani jednoho z rodičovských druhů, i když čtyři nakažení jedinci jsou pro nějakou podrobnější analýzu malý vzorek.

VI DISKUZE

VI. 1 PREVALENCE A DETEKOVANÉ LINIE

Během naší studie jsem vyšetřoval 370 ptáků (196 slavíků obecných, 165 slavíků tmavých a devět hybridů) na přítomnost hemosporid. Zjistil jsem celkovou prevalenci 36 % u slavíka obecného, 86 % u slavíka tmavého a 67 % u hybridních jedinců. Prevalence u slavíka obecného je poměrně shodná v porovnání s mnoha studiemi provedenými na jednotlivých hostitelských druzích pěvců – hýlovi mexickém (Kimura et al. 2006), rákosníkovi velkém (Bensch et al. 2007) nebo lesňáčkovi žlutohrdlém (Pagenkopp et al. 2008), naopak prevalence u slavíka tmavého je vyšší než ve většině ostatních studií a blíží se téměř studii provedené v kontaktní zóně sedmihlásků, kde prevalence u sedmihláška hajního i sedmihláška švitořivého měla hodnotu nad 90 % (Reullier et al. 2006).

Celkové prevalence se signifikatně lišily mezi oběma druhy hostitelů, stejně tomu bylo i v případě prevalence rodu *Haemoproteus* i jeho dvou detekovaných linií LULU1 a ROBIN1. Ve všech těchto statistikách jednoznačně vede slavík tmavý. Když se zaměřím na porovnání prevalence v jednotlivých zónách odchyty hostitelů, tak jsem nejvyšší hodnotu u slavíka obecného zjistil v blízké alopatrii (skoro 44 %). U slavíka tmavého je v tomto ohledu na prvním místě daleká alopatrie, s prevalencí přes 97 % a pouze jedním nenakaženým jedincem. V této zóně k tomu velmi přispívá vysoký výskyt linie ROBIN1 z rodu *Haemoproteus*, a jak bylo ukázáno, výskyt této linie bude nejspíše geograficky omezen na severní část areálu, protože v dalších zónách je její abundance velmi nízká. V tomto ohledu mohou hrát velkou roli vhodné přenašeči. Předchozí studie podporují hypotézu, že přítomnost odpovídajících vektorů je jedním z hlavních důvodů geografické distribuce parazitů. Dalším důvodem může být hostitelská specificita (v tomto případě specificita na mezihostitele – ptáka), která může hrát roli v globálním rozšíření parazita (nikoliv ovšem uvnitř areálu jednoho druhu) (Jenkins and Owens 2011).

Ovšem jak bylo ukázáno, prevalence u jednotlivých druhů mezi různými populacemi je velmi variabilní vlastností a může nabývat všech hodnot od 0 do 100 % (Scheuerlein and Ricklefs 2004). Ve své práci jsme ale ukázal, že prevalence uvnitř jednoho hostitelského druhu i mezi různými populacemi může být velmi stálá, od tohoto faktu vybočovala jen prevalence linie ROBIN1, jak bylo zmíněno výše. Je ale možné, že se prevalence jednotlivých linií může měnit v krátkodobém měřítku například díky koevoluci parazita a hostitele (Richner 1998), kompetici mezi jednotlivými druhy parazitů (Paul et al. 2002) nebo díky

přítomnosti či nepřítomnosti vhodných přenašečů (Sol et al. 2000, Yohannes et al. 2009). Je tedy patrné, že se může lišit v rámci hostitelského druhu (Ishtiaq et al. 2005) i v rámci jedné populace obývajících různé habitaty (Wood et al. 2007).

Zajímavějším údajem by tedy mohl být počet genetických linií, které lze u hostitelského druhu nalézt. V našem případě se jednalo o 20 linií ptačích hemosporid (dvě linie rodu *Haemoproteus*, 15 linií rodu *Plasmodium* a tři linie rodu *Leucocytozoon*). Obecně se předpokládá, že se u tažných ptáků vyskytuje větší počet linií – mohou se u nich totiž objevit linie přenášené na zimovišti i ty, k jejichž přenosu dochází v místě hnízdění (Smith et al. 2004). Tento fakt potvrdilo již mnoho studií (Križanauskiene et al. 2006, Hellgren et al. 2007a, Synek 2009). Metodika použitá k detekci parazitů byla ovšem velmi citlivá a byla tedy schopná odhalit i velmi malé množství parazitů. To může být problém u vzácných linií, kdy není jisté, zda v hostiteli dokončují svůj vývoj nebo se do jeho krve dostaly jen při náhodném sání vektora a dál se nevyvíjí. Proto by bylo nejlepší citlivou metodu nested PCR kombinovat s mikroskopickou detekcí, která je schopna odhalit gametocyty v periferní krvi. Ty jsou dokladem toho, že parazit v hostiteli dokončil vývoj a je připraven na přenos do vektora (Valkiunas et al. 2009).

Nejběžnější detekovanou linií u obou druhů slavíků byla linie LULU1 z rodu *Haemoproteus* (u slavíka obecného prevalence přes 10 %, u slavíka tmavého více jak 63 %). Tato linie byla poprvé objevena u slavíka tmavého odchyceného v Kaliningradu (Hellgren et al. 2007b) a byla přiřazena k morfologickému druhu *Haemoproteus balmorali*, který sjednocuje ještě další tři genetické linie (Hellgren et al. 2007b, Valkiunas et al. 2008).

Druhou linií z rodu *Haemoproteus*, velmi častou hlavně u slavíka tmavého (prevalence téměř 11 %), byla linie ROBIN1, kterou detekoval Hellgren v roce 2005 ve švédské populaci červenky obecné (Hellgren 2005). Linie ROBIN1 je jedinou známou genetickou linií, která patří k druhu *Haemoproteus attenuatus*.

Zajímavostí je, že v sekvenci cytochromu b se tyto dva morfologicky odlišitelné druhy (*H. balmorali* má výrazně širší gametocyty, vytlačuje jádro erytrocytu k okraji krvinky, chybí mu protáhle rostoucí mikrogamety, Valkiunas 2005) liší jedinou záměnou nukleotidů.

Detekovaných linií z rodu *Plasmodium* bylo sice o mnoho víc než linií rodu *Haemoproteus*, ale prevalence většiny z nich nepřesáhla 5 % a žádná se nedostala nad hodnotu 10 %. Této hranici se blížila jen prevalence linie SGS1. Tato linie byla detekována a pojmenována v roce 2002 z vrabce hnědohřbetého odchyceného v Nigerii (Waldenström et al. 2002). Je to nejběžnější linie ptačích plasmodií patřící k morfologickému druhu *Plasmodium relictum*, do kterého spadá ještě jedna další linie (Valkiunas et al. 2007). Podle

fylogenetického stromu rodu *Plasmodium* se zdá, že velmi blízce příbuznou linií bude i námi detekovaná GRW11, kterou popsali Pérez-Tris et al. v roce 2005 z pěnice černohlavé (Pérez-Tris et al. 2005).

Dalšími zajímavými detekovanými liniemi byly LINN1 a AFTRU5, které se liší jedinou substitucí v sekvenci cytochromu b. Obě linie popsali Hellgren et al. z konopy obecné, respektive z drozda afrického (Hellgren et al. 2007a). Podobná byla i situace u linií AEMO01, WW3 a SYBOR9, které se též liší jen jedinou záměnou v sekvenci cyt b. WW3 popsali Waldenström et al. v roce 2002 z budníčka většího (Waldenström et al. 2002), line SYBOR9 byla popsána z pěnice slavíkové v roce 2007 (Pérez-Tris et al. 2007) a AEMO01 detekovali Szollosi et al. v roce 2009 z lejska bělokrkého (Szollosi et al. 2009). Podle fylogenetického stromu se zdá, že všech těchto pět linií je příbuzných morfologickému druhu *Plasmodium elongatum*, který jsem detekoval díky linii GRW06 (poprvé objevena v rákosníkoví velkém, Pérez-Tris et al. 2007).

Jasný klastr ve fylogenetickém stromu utvořily linie GRW10, RTSR1 a LULU2. GRW10 popsali jako první Pérez-Tris et al. z rákosníka velkého (Pérez-Tris et al. 2007), RTSR1 byla zaznamenána z pěvce ryšavého (Waldenström et al. 2002) a linie LULU2 je nová linie, kterou jsem detekoval ze slavíka tmavého. Liší se jedinou záměnou v sekvenci cytochromu b od již známé linie COLL9 z lejska bělokrkého (Szollosi et al. 2009).

Poměrně dobře definovaný klastr utvořily i linie AFRTU4 a LULU3. AFTRU4 popsali Hellgren et al. z drozda afrického (Hellgren et al. unpubl.) a linie LULU3 je nově objevenou linií u slavíka tmavého. Liší se jen dvěma záměnami v sekvenci cytochromu b od definované linie COLL11 z lejska bělokrkého (Kulma and Qvarnstrom submit. 2010).

Linie GRW09, poprvé detekována z rákosníka velkého (Hellgren et al. 2007a), se řadí do blízkosti morfologického druhu *Plasmodium circumflexum*.

Jediná linie, která zůstala ve fylogenetickém stromě rodu *Plasmodium* zcela osamocena, je ACCTAC01. Tato linie byla objevena v jestřábovi tachiro v Gabonu (Beadell et al. 2009).

U všech tří zachycených linií rodu *Leucocytozoon* je zcela patrné, že geneticky patří velmi blízko k liniím (BT1-BT5) již dříve zachyceným ve slavíku modráčkovi (Hellgren et al. 2004). Jedná se konkrétně o linie RS4 detekované v rehkovi a SFC8 v lejskovi šedém (Hellgren et al. 2007a). Poslední linie rodu *Leucocytozoon* LULU4 je nově objevenou linií tohoto rodu. Byla detekována ve slavíkovi tmavém.

Jak vyplývá z výše uvedených informací, dva morfologicky odlišitelné druhy se mohou lišit i jedinou záměnou v sekvenci genu pro cytochrom b, jak dokazuje příklad *Haemoproteus balmorali* a *H. attenuatus*. Hellgren et al. v roce 2007 pomocí porovnávání sekvencí

morfologicky odlišitelných druhů ptačích hemosporid stanovili, že u těchto parazitů je bezpečnou hranicí pro odlišení druhů 5 % záměn v sekvenci genu pro cytochrom b. Tento rozdíl by měl zaručovat, že k jejich divergenci došlo již před dlouhou dobou. Do jednoho druhu lze tedy zařadit linie, jejichž rozdíl v sekvenci cytochromu b nepřesáhne 5 % a nejsou u nich přítomny žádné morfologické rozdíly (Hellgren et al. 2007b). Předpokládá se, že k akumulaci záměn v genu pro cytochrom b ptačích hemosporid dochází asi třikrát pomaleji, než je tomu v sekvenci cytochromu b hostitelů, to odpovídá přibližně 0,67 % divergenci za milion let (Ricklefs and Fallon 2002), u ptáků je to 2 % za milion let (Lovette 2004).

VI. 2 SPECIFICITA A GEOGRAFICKÉ ROZŠÍŘENÍ HEMOSPORID

Hostitelská specificita rodu *Haemoproteus* se zdá být užší než u rodů *Plasmodium* i *Leucocytozoon* (Valkiunas 2005), některé studie ukázaly ale i opak (Isthiaq et al. 2007, Beadell et al. 2009). Například Fallon et al. detekovali jednu linii rodu *Haemoproteus*, která je schopna napadnout ptáky ze až tři čeledí pěvců (strnadovité, zeleňáčkovité a banakitovité) (Fallon et al. 2003).

To, že linie rodu *Haemoproteus* jsou hostitelsky poměrně striktně specifické, potvrdila i tato studie. Nejběžnější linie LULU1 byla dříve detekována ve slavíkovi tmavém v Kaliningradu (Hellgren et al. 2007b). I druhá linie téhož rodu, ROBIN1, byla zaznamenána jen v hostitelích z čeledi lejskovití (Hellgren 2005, Hellgren et al. 2007a, Dimitrov et al. 2010). Všichni zaznamenaní hostitelé těchto dvou linií jsou evropské tažné ptáky, a proto je velmi složité rozhodnout, zda k jejich přenosu dochází během hnízdění v Evropě nebo na africkém zimovišti. Je ovšem jisté, že obě linie jsou hostitelsky vysoce specifické a omezené pouze na pěvce z čeledi lejskovitých. Tato skutečnost vynikne ještě lépe u linie LULU1, která doposud byla nalezena jen ve slavíkovi tmavém (Hellgren et al. 2007b). Z dat, které jsem během naší studie nashromáždil vyplývá, že linie LULU1 je rozšířena v celé Evropě, kdežto linie ROBIN1 má jasně severnější areál.

Předpokládá se, že hostitelská specificita linií z rodu *Plasmodium* je velmi nízká a že většina z nich jsou generalisti, tedy vyskytují se u velkého množství hostitelů z různých čeledí nebo dokonce i řádů (Valkiunas 2005). To potvrdili i různé studie (Waldenström et al. 2005, Križanauskiene 2006, Beadell et al. 2009). Teorii o úplném generalismu celého rodu nepodporuje jen velmi málo studií (Isthiaq et al. 2007). Podobné výsledky poskytla i naše práce. Z celkového počtu 13 známých detekovaných linií rodu *Plasmodium* (zbylé dvě byly nově objevené) jich šest infikuje ptačí hostitele z více řádů (Bensch et al. 2009). Tato

skutečnost je nejvíce patrná na příkladu linií SGS1, GRW06 a ACCTAC01. SGS1 a GRW06 mají celosvětové rozšíření, jak ukázalo mnoho studií (Beadell et al. 2006, Hellgren et al. 2007a, Ejiri et al. 2009; respektive Szymanski and Lovette 2005, Hellgren et al. 2007a, Santiago-Alarcon et al. 2010). Linie ACCTAC01 je patrně pouze africkou linií, byla zaznamenána v mnoha hostitelích v Gabonu (Beadell et al. 2009), jen jednou se jí podařilo detekovat v Evropě, v maďarské populaci lejska bělokrkého (Szollosi et al. 2009), což je ovšem pták zimující v Africe, takže k nákaze došlo patrně tam.

Další tři linie byly již zaznamenány u dvou ptačích řádů, jedná se o RTSR1, AEMO01 a GRW11 (Bensch et al. 2009). Na základě lokalit odchyty a nakažených hostitelů lze předpokládat, že k přenosu linie RTSR1 dochází na zimovišti ptáků, tedy v Africe. Byla identifikována v africkém snovači rudozobém v Zimbabwe (Durrant et al. 2007), zbylé identifikace proběhly buď v Evropě nebo v Africe, ale vždy se jednalo o tažné ptáky (Bensch et al. 2007, Hellgren et al. 2007a, Dimitrov et al. 2010). Podobná situace je i u linie AEMO01, kdy africkým ptákem hostícím tuto linii je lejskovec nádherný (Hellgren et al. 2007a). Linie GRW11 se nejspíše přenáší v Evropě a Asii (v Africe byla zaznamenána jen v tažné pěnici slavíkové, Hellgren et al. 2007a), ostatní záznamy jsou buď z Evropy (Zethindjiev et al. 2008, Dimitrov et al. 2010, Hellgren et al. 2007a) nebo z Japonska (Ejiri et al. 2009, Kim et al. 2009)

Zbýlých sedm linií je specifických výhradně pro pěvce (Bensch et al. 2009). GRW09 byla detekována převážně u afrických ptáků (zbytek byly tažní) z 12 čeledí (Beadell et al. 2006, Bensch et al. 2007, Beadell et al. 2009), takže se dá předpokládat její přenos v Africe. Linie WW3 byla zaznamenána v Evropě, Africe i Severní Americe a byla již potvrzena u 8 ptačích čeledí, ale její přenos lze předpokládat jen v Africe a Severní Americe, protože v případě evropských odchytů se jednalo o tažné ptáky (Bensch and Akeson 2003, Hellgren 2005). V Americe byla detekována například v lesňáčkovi žlutohrdlém (Pagenkopp et al. 2008) nebo sojce zelenavé (Ferrell et al. 2007), výskyt v Africe potvrdil nález ve snovači (Durrant et al. 2007). Linie LINN1 byla detekována v pěvcích ze čtyř čeledí. Nejspíš se jedná o linii přenášenou v Evropě (Wood et al. 2007, Hellgren et al. 2007a), její výskyt mimo Evropu byl zjištěn jen u tažných ptáků.

AFTRU4 byla doposud objevena jen v jednom druhu afrického pěvce, drozdu zpěvném (Hellgren et al. 2007a, Beadell et al. 2009), podobná situace je i u AFTRU5, která byla navíc detekována i v tažném slavíku modráčkovi (Martinsen et al. 2008). Stejně to bude nejspíše i s liniemi GRW10 (dosud identifikovaná jen v jednom tažném druhu, rákosníkovi velkém, Bensch et al. 2007) a SYBOR09, jejíž detekce proběhla u evropského tažného druhu (pěnice

slavíkové), ale i striktně afrického pěvce červenky pralesní (Hellgren et al. 2007a, Beadell et al. 2009). Tyto linie se tedy přenáší nejspíš na africkém kontinentu.

V případě námi zjištěných linií z rodu *Leucocytozoon* proběhla dřívější detekce jen velmi sporadicky, a to vždy pouze v tažných ptácích (Hellgren et al. 2007a) takže nejsem schopen určit, zda k přenosu dochází na hnízdišti v Evropě nebo během zimování v Africe. Mohlo by se tedy zdát, že rod *Leucocytozoon* je velmi hostitelsky specifický, ale tato skutečnost je možná podmíněna nedostatkem studií. I když jiné práce potvrzují alespoň specificitu co se hostitelských řádů týká (Synek 2009).

VI. 3 SMÍŠENÉ INFEKCE

Přestože prevalence ptačích hemosporid byla velmi vysoká, podařilo se mi detekovat jen 25 smíšených infekcí, dvě u slavíka obecného, 22 u slavíka tmavého a jednu u hybridních jedinců. V převážné většině se jednalo o smíšené infekce rodem *Haemoproteus* (linie LULU1 a *Plasmodium* (několik nejčastějších linií). Toto číslo se může zdát nízké a jedním z důvodů může být použitá metodika. Smíšené infekce rodu *Haemoproteus/Plasmodium* a rodu *Leucocytozoon* lze snadno objevit použitím specifických primerů v nested PCR reakci (Hellgren et al. 2004), ale těchto se v mém vzorku moc nevyskytovalo, protože i samotná prevalence rodu *Leucocytozoon* byla velmi nízká. Smíšené infekce rodů *Haemoproteus* a *Plasmodium* jsem detekoval pomocí studia výstupu sekvenátoru, tedy porovnáváním jednotlivých sekvencí mezi sebou a sledováním dvojíých peaků (Pérez-Tris and Bensch 2005b).

Díky velkému počtu linií rodu *Plasmodium* (a jejich nízké prevalenci) a velmi vysoké prevalenci linie LULU1 jsem upustil od dalších možností odhalování smíšených infekcí, protože by s největší pravděpodobností nepřinesly žádné další zásadní výsledky a byly by časově i finančně mnohem náročnější.

VI. 4 PARAZITÉMIE

Stále se zlepšující metody pro zjišťování prevalence ptačích hemosporid vedou k závěru, že i její hodnoty budou růst, je proto tedy velmi důležité, zaměřit se na další vlastnost parazitů – parazitémii, která ovlivňuje dopad parazita na zdraví hostitele (Bentz et al. 2006). Její hodnota také určuje, jak je nakažený hostitel schopen se s infekcí vypořádat (Fallon and Ricklefs 2008). Navíc tato studie zahrnovala i několik hybridů, a tak parazitémie

byla další vlastností, kterou bylo možné mezi těmito jedinci a jedinci z „čistých“ rodičovských druhů porovnat.

Věnoval jsem se měření parazitémie linií LULU1 a ROBIN1 z rodu *Haemoproteus*. Pomocí kvantitativní PCR jsem porovnával poměr mezi množstvím kopií jaderného genu (18S) ptačího hostitele a množstvím kopií mitochondriálního genu (cyt b) parazita. Na základě výsledků se prevalence jeví jako velmi nízká (dostala se až na hodnotu jedné nakažené krvinky ze 100 milionů nenakažených) a nelišila se mezi hostitelskými druhy. Protože jsem k měření použil jen vzorky, u kterých jsem měl potvrzenou infekci na základě nested PCR, je zpětně velmi zajímavé, že je tato detekční metoda schopna odhalit i tak velmi slabé nákazy.

Je ovšem zřejmé, že výši parazitémie ovlivňuje spousta faktorů, jako například počet vhodných vektorů (Sol et al. 2000), s čímž souvisí i možnost, že parazitémie se zvyšuje v době, kdy je větší šance přenosu parazita na dalšího hostitele, tedy v době, kdy je nejvyšší kapacita vektorů (Hasselquist et al. 2007). Navíc parazitémie souvisí s virulencí a ta se mezi jednotlivými druhy parazitů liší (Mackinnon and Read 2004).

Autoři předchozích studií, které se věnovaly měření parazitémie pomocí kvantitativní PCR, si pro svůj výzkum zvolili hemosporida z rodu *Plasmodium* (Zehtindjiev et al. 2008, Knowles et al. 2011). Zehtindjiev et al. zjistili velmi vysoké hodnoty – až 85 %, i když zde se jednalo o ptáky v akutní fázi infekce, čili se předpokládalo, že parazitémie bude nabývat vyšších hodnot (Zehtindjiev et al. 2008). A jak ukázala studie Knowles et al. z roku 2011, parazitémie se mění během ročních období a zdá se, že roste se stářím hostitele (Knowles et al. 2011).

U rodu *Haemoproteus* lze předpokládat, že hodnota parazitémie bude mnohem nižší než u rodu *Plasmodium*. Při nákaze rodem *Haemoproteus* se v krvi totiž vyskytují jen gametocyty. Merozoity rodu *Haemoproteus* lze nalézt pouze v tkáních hostitele, nikoliv v jeho krvinkách, jak je tomu u rodu *Plasmodium* (což je důvod jeho vysokých hodnot parazitémie) (Valkiunas 2005).

VI. 5 KONTAKTNÍ ZÓNA

Studium parazitů v kontaktní zóně dvou druhů je velmi zajímavou záležitostí, protože právě paraziti mohou ovlivňovat posun zóny ve prospěch jednoho druhu a nepospěch druhu dalšího (Prenter et al. 2004). Reullier et al. se v roce 2006 zaměřili na kontaktní zónu sedmihláska hajního a sedmihláska švitořivého. Již dříve bylo zjištěno, že dochází

k postupnému posunu kontaktní zóny severovýchodním směrem v neprospěch sedmihláska hajního (Secondi et al. 2003). Výsledky parazitárního výzkumu této zóny dokázaly, že i když jsou linie hemosporid detekovaných u sedmihlásků vysoce hostitelsky specifické, dochází k jejich přeskoku právě v sympatrii při kontaktu druhů. Bylo dokázáno, že k přeskoku dochází mnohem častěji právě ze sedmiháska švitořivého do sedmihláska hajního. Ústup sedmihláska hajního může být paradoxně způsoben tím, že sedmihlásek švitořivý hostí více parazitů. Jeho imunitní systém je na parazitární nákazy lépe připraven a při kontaktu s novým parazitem, se s ním lépe vyrovná a je tedy schopný přežít i infekci parazita od sedmiháska švitořivého (Reullier et al. 2006).

V této studii se bohužel podařilo odchytit jen jednoho hybrida, takže autoři nebyli schopni definovat, jak se právě kříženci chovají v případě parazitární nákazy. V tomto ohledu byla lepší studie provedená v kontaktní zóně lejska bělokrkého a lejska černošedého, kde sice díky použité metodice (zjistili jen, zda jsou ptáci pozitivní či negativní na nákazu rodem *Haemoproteus*) nemohli určit žádné parazitární přeskoky, ale díky 15 odchyceným hybridům zjistili, že hodnota prevalence u kříženců je rovna zhruba průměru hodnot prevalencí „čistých“ rodičovských druhů (Wiley et al. 2009).

Tento výsledek se velmi podobal tomu, co jsem zjistil během své studie i já. Při porovnání prevalencí v zóně sympatrie, kde bylo odchyceno 103 slavíků obecných, 94 slavíků tmavých a devět hybridů, jsem došel k následujícímu závěru. Prevalence rodičů je 31 %, respektive 84 % a prevalence hybridů 67 % a má tedy zhruba průměrnou hodnotu. Lze tedy říci, že zjištěné hodnoty prevalence v kontaktní zóně slavíků podporují aditivní hypotézu, tedy že počet parazitů u hybridního jedince bude nižší než u jednoho a vyšší než u druhého rodičovského druhu (Boecklen and Spellenberg 1990). Díky poměrně nízké hostitelské specificitě detekovaných linií jsem nemohl určit, zda k dochází k přeskoku parazitů při kontaktu jejich hostitelů. Hodnota parazitémie se u hybridních jedinců také nelišila od parazitémie zjištěné u slavíka obecného ani slavíka tmavého.

Celkově lze tedy říci, že vytvoření obecného závěru je velmi problematické. Na téma parazitizmu v kontaktní zóně ptáků (konkrétně hemosporida u pěvců) byly kromě této studie provedeny další dvě práce, jejichž metodika byla zcela rozdílná, stejně tak tomu bylo i s výsledky. Narozdíl od studie o sedmihláscích (Reullier et. al 2006) mnou detekované nejběžnější linie nebyly hostitelsky příliš specifické (byly přítomny u slavíka obecného i jeho blízkce příbuzného slavíka tmavého), takže nemůžu říci, zda v kontaktní zóně slavíků dochází k nějaké interakci mezi parazity hostitelských druhů.

Jak se v této studii ukázalo, je velký rozdíl ve výši prevalence ptačích hemosporid mezi slavíkem obecným a slavíkem tmavým. Tato skutečnost platí v celém areálu a je velmi zajímavé, že se zmíněný pattern zachovává i v kontaktní zóně obou druhů. Důvodem může být obývání různých habitatů a z toho plynoucí rozdíl v expozici vektorům. Zatímco slavík obecný se vyskytuje spíše na sušších lokalitách, slavík tmavý obývá vlhčí habitaty (Hudec et al. 1983) a může být tím pádem vystaven většímu tlaku přenašečů. Druhým důvodem by mohla být vyšší specificita linie LULU1, která tvořila většinový podíl prevalence u slavíka tmavého. Také není jasné, zda k přenosu hlavních linií dochází v Evropě při hnízdění nebo během zimování v Africe, proto by do budoucna bylo velmi dobré zaměřit se na studium vektorů, které by tuto složitou problematiku mohlo objasnit.

VII ZÁVĚRY

Slavík obecný a slavík tmavý se zásadně liší v prevalenci ptačích hemosporid rodů *Haemoproteus*, *Plasmodium* a *Leucocytozoon*. Celková prevalence byla u slavíka obecného téměř 36 %, prevalence rodu *Haemoproteus* byla 12 %, rodu *Plasmodium* 23 % a rodu *Leucocytozoon* 1,5 %. Celková prevalence u slavíka tmavého byla 86 %, prevalence rodu *Haemoproteus* byla 74,5 %, rodu *Plasmodium* 20 % a rodu *Leucocytozoon* 5 %. Prevalence u hybridů měla hodnotu skoro 67 %.

Prevalence na odchyťových lokalitách jednotlivých druhů se příliš nelišila. V případě slavíka tmavého výrazně vynikala zóna daleké alopatrie, kde prevalence převyšovala 97 % (u slavíka obecného měla v daleké alopatrii hodnotu 37 %). Zajímavé je, že vysoký rozdíl v prevalenci mezi druhy byl dodržen i v kontaktní zóně, v sympatrii. Prevalence u slavíka tmavého zde přesáhla 84 %, zatímco u slavíka obecného byla v této zóně na hodnotě pouhých 31 %.

Kromě daleké alopatrie u slavíka obecného vykazovala vždy nejvyšší prevalenci linie LULU1 z rodu *Haemoproteus*. Zajímavé geografické rozšíření jsem pozoroval u linie ROBIN1 (*Haemoproteus attenuatus*) – vyskytovala se převážně v severní části hnízdního areálu slavíka tmavého.

Celkem jsem detekoval 20 unikátních genetických linií ptačích hemosporid, dvě z rodu *Haemoproteus*, 15 z rodu *Plasmodium* a tři z rodu *Leucocytozoon*. Obě linie rodu *Haemoproteus* vykazují poměrně vysokou hostitelskou specifitu. Objevil jsem také tři zcela nové linie (dvě z rodu *Plasmodium* a jednu z rodu *Leucocytozoon*).

Detekoval jsem 25 smíšených infekcí, z nichž převážná většina byla objevena u slavíka tmavého a tvořila je infekce linií LULU1 a běžných linií z rodu *Plasmodium*.

Parazitémie linií LULU1 a ROBIN1 z rodu *Haemoproteus* se významně nelišila mezi druhy hostitelů a měla vždy velmi nízkou hodnotu.

Díky zjištění prevalence a parazitémie u hybridních jedinců můžeme říci, že se ani jedna z těchto hodnot neliší od průměrů, které jsem objevil u „čistých“ rodičovských druhů. Lze tedy říci, že situace v kontaktní hybridní zóně slavíků podporuje aditivní hypotézu

parazitismu, tedy že počet parazitů (počet linií a míra nákazy) u hybridního jedince bude nižší než u jednoho a vyšší než u druhého rodičovského druhu.

VIII PŘÍLOHY

Příloha 1. Odchycení ptáci.

V následující tabulce jsou uvedeni všichni odchycení jedinci se zařazením do druhu (SO – slavík obecný, ST – slavík tmavý, HYB - hybrid). Je zde vidět oblast (DA – daleká alopatrie, BA – blízká alopatrie, SYM – sympatrie), stát (CZ – Česká republika, E – Španělsko, EST – Estonsko, F – Francie, FIN – Finsko, LV – Lotyšsko, PL – Polsko, TN – Tunisko), konkrétní lokalita, GPS souřadnice a rok, kdy byli jednotliví ptáci odchyceni. Navíc jsou u každého infikovaného ptáka vyznačeny detekované linie parazitů zařazené do rodu.

	kód	druh	oblast	stát	lokality	GPS_N	GPS_W	rok	<i>Haemoproteus</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Leucocytozoon</i>
1	S0013	SO	DA	E	Benaguasil (Valencia)	39,5850	-0,6282	2007		LINN1	
2	S0014	SO	DA	E	Benaguasil (Valencia)	39,5850	-0,6282	2007		SGS1	
3	S0016	SO	DA	E	Benaguasil (Valencia)	39,5850	-0,6282	2007	LULU1		
4	S0023	SO	DA	E	Vilamarxant (Valencia)	39,5593	-0,6082	2007		SGS1	
5	S0030	SO	DA	E	Eslida (Valencia)	39,8928	-0,3189	2007			SFC8
6	S0031	SO	DA	E	Eslida (Valencia)	39,8905	-0,3178	2007		LINN1	SFC8
7	S0032	SO	DA	E	Almenara (Valencia)	39,7511	-0,1947	2007		LINN1	
8	S0038	SO	DA	E	Campredo (Deltebre)	40,7443	-0,5711	2007		RTSR1	
9	S0042	SO	DA	E	Tortosa (Deltebre)	40,8476	-0,5263	2007		ACCTAC01	
10	S0043	SO	DA	E	Tortosa (Deltebre)	40,8754	-0,5106	2007	LULU1		
11	S0272	SO	DA	TN	Djebel Oust (Tunis)	36,4000	10,1433	2007		GRW06	
12	S0273	SO	DA	F	Montpellier Les Bois	43,6105	3,8755	2007		LINN1	
13	S0274	SO	DA	F	Montpellier Les Bois	43,6105	3,8755	2007		LINN1	
14	S0277	SO	DA	F	Montpellier Les Bois	43,6105	3,8755	2007		SGS1	
15	S0015	SO	DA	E	Benaguasil (Valencia)	39,5850	-0,6282	2007			
16	S0017	SO	DA	E	Benaguasil (Valencia)	39,5850	-0,6282	2007			
17	S0018	SO	DA	E	Benaguasil (Valencia)	39,5850	-0,6282	2007			
18	S0019	SO	DA	E	Marines (Valencia)	39,7405	-0,6282	2007			
19	S0020	SO	DA	E	Marines (Valencia)	39,7405	-0,5335	2007			
20	S0021	SO	DA	E	Marines (Valencia)	39,7381	-0,5334	2007			

21	S0022	SO	DA	E	Vilamarxant (Valencia)	39,5593	-0,6082	2007		
22	S0024	SO	DA	E	Vilamarxant (Valencia)	39,5654	-0,6039	2007		
23	S0025	SO	DA	E	Vilamarxant (Valencia)	39,5664	-0,6058	2007		
24	S0026	SO	DA	E	Vilamarxant (Valencia)	39,5672	-0,6069	2007		
25	S0027	SO	DA	E	Manises (Valencia)	39,4854	-0,4398	2007		
26	S0028	SO	DA	E	Manises (Valencia)	39,4859	-0,4409	2007		
27	S0029	SO	DA	E	Eslida (Valencia)	39,8895	-0,3168	2007		
28	S0033	SO	DA	E	Almenara (Valencia)	39,7534	-0,1966	2007		
29	S0034	SO	DA	E	Almenara (Valencia)	39,7491	-0,1967	2007		
30	S0035	SO	DA	E	Amposta (Deltebre)	40,6711	-0,5967	2007		
31	S0036	SO	DA	E	Amposta (Deltebre)	40,6715	-0,5960	2007		
32	S0037	SO	DA	E	Amposta (Deltebre)	40,6960	-0,5557	2007		
33	S0039	SO	DA	E	Campredo (Deltebre)	40,7431	-0,5713	2007		
34	S0040	SO	DA	E	Campredo (Deltebre)	40,7422	-0,5719	2007		
35	S0041	SO	DA	E	Campredo (Deltebre)	40,7658	-0,5394	2007		
36	S0271	SO	DA	TN	Djebel Oust (Tunis)	36,4000	10,1433	2007		
37	S0275	SO	DA	F	Montpellier Les Bois	43,6105	3,8755	2007		
38	S0276	SO	DA	F	Montpellier Les Bois	43,6105	3,8755	2007		
39	S0003	SO	BA	CZ	Lysá nad Labem	50,1869	14,8614	2006		ACCTAC01
40	S0045	SO	BA	CZ	Litoměřice	50,5366	14,1005	2007		RTSR1
41	S0046	SO	BA	CZ	Litoměřice	50,5366	14,1011	2007		LINN1
42	S0048	SO	BA	CZ	Roudnice nad Labem	50,4361	14,2443	2007	LULU1	
43	S0055	SO	BA	CZ	Borek (Stará Boleslav)	50,2028	14,6580	2007		SGS1
44	S0056	SO	BA	CZ	Nový Vestec (Stará Boleslav)	50,1878	14,7090	2007		SGS1
45	S0057	SO	BA	CZ	Káraný (Stará Boleslav)	50,1752	14,7491	2007		SGS1
46	S0058	SO	BA	CZ	Káraný (Stará Boleslav)	50,1741	14,7543	2007	LULU1	
47	S0059	SO	BA	CZ	Káraný (Stará Boleslav)	50,1741	14,7543	2007	LULU1	
48	S0060	SO	BA	CZ	Lysá nad Labem	50,1869	14,8614	2007	LULU1	
49	S0062	SO	BA	CZ	Ostrá (Lysá nad Labem)	50,1876	14,8758	2007	LULU1	
50	S0063	SO	BA	CZ	Ostrá (Lysá nad Labem)	50,1758	14,8928	2007	LULU1	
51	S0064	SO	BA	CZ	Převýšov (Chlumecký n. Cidl.)	50,1395	15,4077	2007		LINN1

52	S0065	SO	BA	CZ	Převýšov (Chlumec n. Cidl.)	50,1403	15,4099	2007	LULU1	
53	S0066	SO	BA	CZ	Nový Bydžov (Chlumec n. C.)	50,2224	15,5014	2007		SGS1
54	S0068	SO	BA	CZ	Nový Bydžov (Chlumec n. C.)	50,2226	15,5015	2007		GRW10
55	S0070	SO	BA	CZ	Kopidlno	50,3382	15,2484	2007	ROBIN1	
56	S0072	SO	BA	CZ	Kopidlno	50,3387	15,2480	2007		RTSR1
57	S0073	SO	BA	CZ	Březno (Mladá Boleslav)	50,4103	15,0046	2007		SGS1
58	S0074	SO	BA	CZ	Březno (Mladá Boleslav)	50,4099	15,0046	2007		RTSR1
59	S0079	SO	BA	PL	Kilianów (Wroclaw)	51,0131	16,7504	2007		RTSR1
60	S0080	SO	BA	PL	Kilianów (Wroclaw)	51,0136	16,7495	2007	LULU1	
61	S0262	SO	BA	CZ	Bakov n. Jizerou (Mladá Boleslav)	50,4932	14,9438	2007	ROBIN1	
62	S0278	SO	BA	CZ	Litoměřice	50,5384	14,1039	2008		SGS1
63	S0001	SO	BA	CZ	Milovice	50,2282	14,8833	2006		
64	S0002	SO	BA	CZ	Milovice	50,2282	14,8833	2006		
65	S0004	SO	BA	CZ	Litoměřice	50,5366	14,1011	2006		
66	S0005	SO	BA	CZ	Litoměřice	50,5366	14,1011	2006		
67	S0006	SO	BA	CZ	Litoměřice	50,5366	14,1011	2006		
68	S0047	SO	BA	CZ	Litoměřice	50,5363	14,1001	2007		
69	S0049	SO	BA	CZ	Roudnice nad Labem	50,4366	14,2428	2007		
70	S0050	SO	BA	CZ	Roudnice nad Labem	50,4369	14,2429	2007		
71	S0051	SO	BA	CZ	Kyškovice (Roudnice n. L.)	50,4678	14,2966	2007		
72	S0052	SO	BA	CZ	Kyškovice (Roudnice n. L.)	50,4345	14,2954	2007		
73	S0053	SO	BA	CZ	Brzánky (Roudnice n. L.)	50,4660	14,3088	2007		
74	S0054	SO	BA	CZ	Brzánky (Roudnice n. L.)	50,4664	14,3092	2007		
75	S0061	SO	BA	CZ	Ostrá (Lysá nad Labem)	50,1862	14,8772	2007		
76	S0067	SO	BA	CZ	Nový Bydžov (Chlumec n. C.)	50,2228	15,5012	2007		
77	S0069	SO	BA	CZ	Nový Bydžov (Chlumec n. C.)	50,2232	15,4988	2007		
78	S0071	SO	BA	CZ	Kopidlno	50,3387	15,2480	2007		
79	S0075	SO	BA	CZ	Kolomuty (Mladá Boleslav)	50,4078	14,9776	2007		
80	S0076	SO	BA	CZ	Kolomuty (Mladá Boleslav)	50,4081	14,9774	2007		
81	S0077	SO	BA	CZ	Kolomuty (Mladá Boleslav)	50,4078	14,9776	2007		
82	S0078	SO	BA	PL	Kilianów (Wroclaw)	51,0133	16,7505	2007		

83	S0081	SO	BA	PL	Brzeg Dolny (Wroclaw)	51,2561	16,7732	2007		
84	S0082	SO	BA	PL	Brzeg Dolny (Wroclaw)	51,2527	16,7529	2007		
85	S0083	SO	BA	CZ	Šestajovice (Jaroměř)	50,3389	16,0145	2007		
86	S0259	SO	BA	CZ	Bakov n. Jizerou (Mladá Boleslav)	50,4932	14,9438	2007		
87	S0260	SO	BA	CZ	Bakov n. Jizerou (Mladá Boleslav)	50,4923	14,9459	2007		
88	S0261	SO	BA	CZ	Bakov n. Jizerou (Mladá Boleslav)	50,4922	14,9458	2007		
89	S0263	SO	BA	CZ	Bakov n. Jizerou (Mladá Boleslav)	50,4922	14,9458	2007		
90	S0264	SO	BA	CZ	Bakov n. Jizerou (Mladá Boleslav)	50,4932	14,9438	2007		
91	S0265	SO	BA	CZ	Bakov n. Jizerou (Mladá Boleslav)	50,4932	14,9438	2007		
92	S0360	SO	BA	CZ	Pohoří (Opočno)	50,2948	16,0759	2008		
93	S0384	SO	BA	CZ				2009		
94	S0088	SO	SYM	PL	Debnica (Ostrow Wlkp)	51,5727	17,7942	2007		LINN1
95	S0091	SO	SYM	PL	Debnica (Ostrow Wlkp)	51,5703	17,7867	2007	LULU1	
96	S0095	SO	SYM	PL	Przygodzice (Ostrow Wlkp)	51,5884	17,8180	2007		LINN1
97	S0106	SO	SYM	PL	Olobok, Prosna	51,6366	18,0747	2007		SGS1
98	S0109	SO	SYM	PL	Olobok, Prosna	51,6399	18,0718	2007		LINN1
99	S0112	SO	SYM	PL	Rumin (Konin)	52,1997	18,1692	2007		GRW09
100	S0127	SO	SYM	PL	Slomcyce (Ślupca)	52,3177	17,8766	2007	LULU1	
101	S0129	SO	SYM	PL	Czolnochow, Prosna	52,0420	17,7259	2007		SGS1
102	S0130	SO	SYM	PL	Czolnochow, Prosna	52,0427	17,7300	2007	LULU1	
103	S0146	SO	SYM	PL	Sroda Wlkp.	52,2298	17,2318	2007	LULU1	
104	S0160	SO	SYM	PL	Radolinek (Czarnkow)	52,9792	16,5444	2007	LULU1	
105	S0161	SO	SYM	PL	Radolinek (Czarnkow)	52,9808	16,5426	2007		RS4
106	S0171	SO	SYM	PL	Trzebicz (Dresdenko), Notec	52,7933	15,7041	2007	LULU1	
107	S0174	SO	SYM	PL	Gosciniac (Dresdenko), Notec	52,7857	15,6591	2007	LULU1	
108	S0184	SO	SYM	PL	Santok, Warta/Notec	52,7366	15,3994	2007	LULU1	
109	S0190	SO	SYM	PL	Koscian	52,1292	16,6321	2007	LULU1	
110	S0313	SO	SYM	PL	Chocz	51,9766	17,8598	2008	LULU1	
111	S0314	SO	SYM	PL	Chocz	51,9672	17,8725	2008	LULU1	
112	S0315	SO	SYM	PL	Chocz	51,9680	17,8718	2008		WW3
113	S0316	SO	SYM	PL	Kwileń	51,9808	17,8470	2008		SGS1, AEMO01

114	S0320	SO	SYM	PL	Czolnochów	52,0426	17,7258	2008		LINN1
115	S0327	SO	SYM	PL	Czolnochów	52,0456	17,7224	2008		AFTRU5
116	S0328	SO	SYM	PL	Czolnochów	52,0480	17,7202	2008	ROBIN1	
117	S0331	SO	SYM	PL	Czolnochów	52,0499	17,7109	2008		SGS1
118	S0338	SO	SYM	PL	Prusinów	52,0487	17,7035	2008		LINN1
119	S0347	SO	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1398	17,5904	2008		SGS1
120	S0348	SO	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1391	17,5910	2008		AFTRU4
121	S0357	SO	SYM	PL	Lisewo	52,0789	17,6639	2008		SGS1
122	S0363	SO	SYM	PL	Chocz	51,9784	17,8479	2009		SGS1
123	S0366	SO	SYM	PL	Kwileń	51,9833	17,8439	2009		SGS1
124	S0369	SO	SYM	PL	Chocz	51,9707	17,8659	2009		SGS1
125	S0373	SO	SYM	PL	Chocz	51,9681	17,8710	2009		SGS1
126	S0084	SO	SYM	PL	Zakrzow (Twardogora)	51,4188	17,4800	2007		
127	S0085	SO	SYM	PL	Uciechow (Odolanow)	51,5718	17,5931	2007		
128	S0086	SO	SYM	PL	Przygodzice (Ostrow Wlkp)	51,5783	17,8249	2007		
129	S0087	SO	SYM	PL	Raczyce (Ostrow Wlkp)	51,5716	17,6027	2007		
130	S0089	SO	SYM	PL	Debnica (Ostrow Wlkp)	51,5752	17,7908	2007		
131	S0090	SO	SYM	PL	Debnica (Ostrow Wlkp)	51,5713	17,7873	2007		
132	S0092	SO	SYM	PL	Bonikow (Odolanow)	51,5508	17,6591	2007		
133	S0093	SO	SYM	PL	Bonikow (Odolanow)	51,5512	17,6579	2007		
134	S0094	SO	SYM	PL	Bonikow (Odolanow)	51,5534	17,6602	2007		
135	S0096	SO	SYM	PL	Przygodzice (Ostrow Wlkp)	51,5880	17,8182	2007		
136	S0098	SO	SYM	PL	Nowa wes (Gyzalki), Prosna	52,0347	17,7464	2007		
137	S0099	SO	SYM	PL	Nowa wes (Gyzalki), Prosna	52,0322	17,7375	2007		
138	S0100	SO	SYM	PL	Nowa wes (Gyzalki), Prosna	52,0322	17,7375	2007		
139	S0107	SO	SYM	PL	Olobok, Prosna	51,6360	18,0748	2007		
140	S0110	SO	SYM	PL	Smitow (Nowe Skamierzyce), Prosn	51,6742	18,1105	2007		
141	S0111	SO	SYM	PL	Smitow (Nowe Skamierzyce), Prosn	51,6747	18,1132	2007		
142	S0128	SO	SYM	PL	Czolnochow, Prosna	52,0424	17,7258	2007		
143	S0135	SO	SYM	PL	Kretkow	52,0751	17,6619	2007		
144	S0136	SO	SYM	PL	Komorze Przybyslawskie (Pyrzdry)	52,1216	17,6431	2007		

145	S0137	SO	SYM	PL	Komorze Przybyslawskie (Pyrzdry)	52,1223	17,6442	2007
146	S0138	SO	SYM	PL	Komorze Przybyslawskie (Pyrzdry)	52,1223	17,6442	2007
147	S0143	SO	SYM	PL	Pogorzelnica (Pyrzdry)	52,1390	17,5913	2007
148	S0145	SO	SYM	PL	Sroda Wilkp.	52,2298	17,2318	2007
149	S0158	SO	SYM	PL	Kuznica Czarkowska (Czarnkow)	52,9575	16,5179	2007
150	S0159	SO	SYM	PL	Kuznica Czarkowska (Czarnkow)	52,9565	16,5127	2007
151	S0167	SO	SYM	PL	Trzebicz (Dresdenko), Notec	52,8274	15,7645	2007
152	S0172	SO	SYM	PL	Trzebicz (Dresdenko), Notec	52,7933	15,7041	2007
153	S0173	SO	SYM	PL	Trzebicz (Dresdenko), Notec	52,7904	15,7001	2007
154	S0175	SO	SYM	PL	Gosciniec (Dresdenko), Notec	52,7857	15,6591	2007
155	S0182	SO	SYM	PL	Santok, Warta/Notec	52,7374	15,3990	2007
156	S0183	SO	SYM	PL	Santok, Warta/Notec	52,7361	15,3994	2007
157	S0185	SO	SYM	PL	Santok, Warta/Notec	52,7342	15,3899	2007
158	S0187	SO	SYM	PL	Koscian	52,1376	16,5618	2007
159	S0188	SO	SYM	PL	Koscian	52,1385	16,5627	2007
160	S0189	SO	SYM	PL	Koscian	52,1255	16,6208	2007
161	S0191	SO	SYM	PL	Koscian	52,1279	16,6326	2007
162	S0193	SO	SYM	PL	Witkowice, Bzura	52,3317	20,2475	2007
163	S0280	SO	SYM	PL	Olobok	51,6392	18,0716	2008
164	S0281	SO	SYM	PL	Olobok	51,6394	18,0740	2008
165	S0284	SO	SYM	PL	Olobok, Bystřica kanál	51,6356	18,0747	2008
166	S0285	SO	SYM	PL	Olobok, Prosna	51,6377	18,0744	2008
167	S0286	SO	SYM	PL	Wola Droszewska	51,6314	18,0803	2008
168	S0289	SO	SYM	PL	Wola Droszewska	51,6299	18,0799	2008
169	S0290	SO	SYM	PL	Wielowiés, Cegielnia	51,5944	18,1096	2008
170	S0291	SO	SYM	PL	Wielowiés, Cegielnia	51,6015	18,1048	2008
171	S0294	SO	SYM	PL	Chocz	51,9708	17,8657	2008
172	S0298	SO	SYM	PL	Chocz	51,9765	17,8560	2008
173	S0300	SO	SYM	PL	Chocz	51,9776	17,8529	2008
174	S0301	SO	SYM	PL	Chocz	51,9776	17,8535	2008
175	S0302	SO	SYM	PL	Chocz	51,9775	17,8523	2008

176	S0303	SO	SYM	PL	Chocz	51,9776	17,8519	2008		
177	S0305	SO	SYM	PL	Chocz	51,9782	17,8479	2008		
178	S0306	SO	SYM	PL	Chocz	51,9774	17,8482	2008		
179	S0307	SO	SYM	PL	Kwileń	51,9800	17,8469	2008		
180	S0318	SO	SYM	PL	Chocz	51,9699	17,8675	2008		
181	S0319	SO	SYM	PL	Czolnochów	52,0426	17,7258	2008		
182	S0321	SO	SYM	PL	Czolnochów	52,0426	17,7258	2008		
183	S0322	SO	SYM	PL	Czolnochów	52,0421	17,7298	2008		
184	S0325	SO	SYM	PL	Czolnochów	52,0443	17,7326	2008		
185	S0330	SO	SYM	PL	Czolnochów	52,0482	17,7152	2008		
186	S0337	SO	SYM	PL	Prusinów	52,0487	17,7035	2008		
187	S0345	SO	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1389	17,5917	2008		
188	S0349	SO	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1385	17,5915	2008		
189	S0351	SO	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1414	17,6114	2008		
190	S0352	SO	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1421	17,6014	2008		
191	S0353	SO	SYM	PL	Ruda Komorska	52,1194	17,6652	2008		
192	S0364	SO	SYM	PL	Chocz	51,9775	17,8473	2009		
193	S0365	SO	SYM	PL	Kwileń	51,9797	17,8494	2009		
194	S0368	SO	SYM	PL	Chocz	51,9744	17,8675	2009		
195	S0370	SO	SYM	PL	Chocz	51,9759	17,8567	2009		
196	S0376	SO	SYM	PL	Prusinow, Proсна	52,0493	17,7069	2009		
197	S0011	ST	DA	LV	Riga	56,9500	24,0500	2006	ROBIN1	
198	S0012	ST	DA	LV	Riga	56,9500	24,0500	2006	ROBIN1	
199	S0230	ST	DA	FIN	Ruissalo	60,4369	22,2054	2007		SYBOR9
200	S0231	ST	DA	FIN	Ruissalo	60,4409	22,2037	2007	LULU1	
201	S0232	ST	DA	FIN	Ruissalo	60,4422	22,2031	2007	LULU1	
202	S0233	ST	DA	FIN	Turku, Raisionjoki	60,4535	22,1950	2007	ROBIN1	
203	S0234	ST	DA	FIN	Turku, Raisionjoki	60,4535	22,1950	2007	LULU1	RTSR1
204	S0235	ST	DA	FIN	Turku, Raisionjoki	60,4523	22,1978	2007	ROBIN1	
205	S0236	ST	DA	FIN	Turku, Raisionjoki	60,4548	22,1013	2007	ROBIN1	
206	S0237	ST	DA	FIN	Turku, Raisionjoki	60,4543	22,0984	2007		SGS1

207	S0238	ST	DA	FIN	Kustavi	60,5416	21,4294	2007	LULU1	
208	S0239	ST	DA	FIN	Kustavi	60,5431	21,4235	2007	LULU1	
209	S0240	ST	DA	FIN	Kustavi	60,5843	21,4002	2007		LINN1
210	S0241	ST	DA	FIN	Laitila	60,8916	21,6927	2007	LULU1	
211	S0243	ST	DA	FIN	Laitila	60,8864	21,6885	2007	LULU1	
212	S0244	ST	DA	FIN	Laitila	60,8886	21,6904	2007	LULU1	
213	S0245	ST	DA	FIN	Poytya	60,7710	22,6488	2007	LULU1	
214	S0246	ST	DA	FIN	Poytya	60,7492	22,6293	2007	LULU1	
215	S0247	ST	DA	FIN	Suksela (Paimio)	60,5060	22,6922	2007	LULU1	
216	S0248	ST	DA	FIN	Suksela (Paimio)	60,5062	22,6907	2007	LULU1	AEMO01
217	S0249	ST	DA	FIN	Suksela (Paimio)	60,5047	22,6903	2007	ROBIN1	
218	S0250	ST	DA	FIN	Paimio	60,4567	22,7013	2007	LULU1	
219	S0251	ST	DA	FIN	Salo	60,3758	23,0609	2007	ROBIN1	RTSR1
220	S0252	ST	DA	FIN	Salo	60,3767	23,0617	2007	LULU1	
221	S0253	ST	DA	FIN	Salo	60,2940	23,1127	2007	ROBIN1	
222	S0254	ST	DA	FIN	Kaarina	60,3967	22,3866	2007	ROBIN1	
223	S0255	ST	DA	FIN	Kuusisto	60,4071	22,4747	2007	ROBIN1	
224	S0256	ST	DA	FIN	Kuusisto	60,4042	22,4631	2007	LULU1	RTSR1
225	S0257	ST	DA	FIN	Karstu (Lohja)	60,3190	23,8871	2007	LULU1	
226	S0258	ST	DA	FIN	Lohja	60,2709	24,0389	2007	ROBIN1	
227	S0267	ST	DA	EST	Tallinn	59,4383	24,7545	2007	ROBIN1	
228	S0268	ST	DA	EST	Tallinn	59,4383	24,7545	2007	ROBIN1	
229	S0269	ST	DA	EST	Tallinn	59,4383	24,7545	2007	ROBIN1	
230	S0270	ST	DA	EST	Tallinn	59,4383	24,7545	2007	LULU1	
231	S0242	ST	DA	FIN	Laitila	60,8877	21,6897	2007		
232	S0195	ST	BA	PL	Lipa (Pultusk)	52,7496	21,1104	2007	LULU1	
233	S0196	ST	BA	PL	Lipa (Pultusk)	52,7461	21,1105	2007	LULU1	
234	S0197	ST	BA	PL	Gnojno (Pultusk)	52,7798	21,1421	2007	LULU1	
235	S0199	ST	BA	PL	Gnojno (Pultusk)	52,7824	21,1422	2007	ROBIN1	
236	S0200	ST	BA	PL	Gnojno (Pultusk)	52,7824	21,1422	2007	ROBIN1	
237	S0201	ST	BA	PL	Gnojno (Pultusk)	52,7824	21,1422	2007	LULU1	

238	S0202	ST	BA	PL	Gnojno (Pultusk)	52,7819	21,1439	2007	LULU1	
239	S0203	ST	BA	PL	Gnojno (Pultusk)	52,7707	21,1329	2007	LULU1	
240	S0204	ST	BA	PL	Gnojno (Pultusk)	52,7717	21,1346	2007	ROBIN1	
241	S0205	ST	BA	PL	Nozewo (Ostroleka)	53,0304	21,5036	2007	LULU1	
242	S0206	ST	BA	PL	Nozewo (Ostroleka)	53,0293	21,5056	2007	LULU1	
243	S0207	ST	BA	PL	Nozewo (Ostroleka)	53,0321	21,5044	2007	LULU1	
244	S0208	ST	BA	PL	Teodorowo (Ostroleka), Narew	53,1172	21,6420	2007	LULU1	
245	S0209	ST	BA	PL	Teodorowo (Ostroleka), Narew	53,1172	21,6420	2007	LULU1	
246	S0210	ST	BA	PL	Teodorowo (Ostroleka), Narew	53,1172	21,6420	2007	LULU1	
247	S0211	ST	BA	PL	Laskowiec (Ostroleka), Narew	53,1319	21,6801	2007	LULU1	
248	S0212	ST	BA	PL	Laskowiec (Ostroleka), Narew	53,1319	21,6801	2007	LULU1	
249	S0213	ST	BA	PL	Laskowiec (Ostroleka), Narew	53,1304	21,6802	2007	LULU1	
250	S0217	ST	BA	PL	Wizna, Narew	53,1545	22,4089	2007		AEMO01
251	S0218	ST	BA	PL	Wizna, Narew	53,1545	22,4089	2007		RS4
252	S0221	ST	BA	PL	Grajewo	53,6452	22,4860	2007	LULU1	
253	S0222	ST	BA	PL	Sojczyn Gradowy (Grajewo)	53,5840	22,6035	2007	LULU1	
254	S0223	ST	BA	PL	Sojczyn Gradowy (Grajewo)	53,5843	22,6027	2007	LULU1	
255	S0224	ST	BA	PL	Sojczyn Gradowy (Grajewo)	53,5844	22,6122	2007	LULU1	
256	S0225	ST	BA	PL	Sojczyn Gradowy (Grajewo)	53,5835	22,6138	2007	LULU1	
257	S0226	ST	BA	PL	Sojczyn Gradowy (Grajewo)	53,5815	22,6033	2007	LULU1	
258	S0227	ST	BA	PL	Szczebra (Augustow)	53,9165	22,9778	2007	LULU1	
259	S0228	ST	BA	PL	Smolniki (Suwalki)	54,2751	22,9112	2007	LULU1	
260	S0359	ST	BA	CZ	Pohoří (Opočno)	50,2955	16,0749	2008	LULU1	
261	S0198	ST	BA	PL	Gnojno (Pultusk)	52,7798	21,1421	2007		
262	S0214	ST	BA	PL	Wizna, Narew	53,1998	22,4098	2007		
263	S0215	ST	BA	PL	Wizna, Narew	53,1627	22,3996	2007		
264	S0216	ST	BA	PL	Wizna, Narew	53,1560	22,4084	2007		
265	S0219	ST	BA	PL	Wizna, Narew	53,1542	22,4115	2007		
266	S0220	ST	BA	PL	Wizna, Narew	53,1534	22,4263	2007		
267	S0229	ST	BA	PL	Juryzdyka (Suwalki)	53,9788	22,9574	2007		
268	S0097	ST	SYM	PL	Nowa wes (Gyzalki), Prosna	52,0347	17,7464	2007	LULU1	AEMO01

269	S0101	ST	SYM	PL	Chocz, Prosna	51,9756	18,8580	2007	LULU1	
270	S0102	ST	SYM	PL	Chocz, Prosna	51,9726	17,8645	2007	LULU1	
271	S0103	ST	SYM	PL	Chocz, Prosna	51,9756	18,8580	2007	LULU1	
272	S0104	ST	SYM	PL	Olobok, Prosna	51,6350	18,0781	2007	LULU1	AEMO01
273	S0105	ST	SYM	PL	Olobok, Prosna	51,6373	18,0760	2007	LULU1	
274	S0108	ST	SYM	PL	Olobok, Prosna	51,6398	18,0695	2007	LULU1	
275	S0113	ST	SYM	PL	Babia (Konin)	52,1798	18,0904	2007	LULU1	
276	S0114	ST	SYM	PL	Barlogi (Konin), Warta	52,1863	18,0466	2007	LULU1	WW3
277	S0115	ST	SYM	PL	Barlogi (Konin), Warta	52,1908	18,0351	2007	LULU1	GRW11
278	S0116	ST	SYM	PL	Barlogi (Konin), Warta	52,1886	18,0524	2007	LULU1	
279	S0117	ST	SYM	PL	Barlogi (Konin), Warta	52,1893	18,0538	2007	LULU1	LULU4
280	S0118	ST	SYM	PL	Barlogi (Konin), Warta	52,1903	18,0264	2007	LULU1	WW3
281	S0119	ST	SYM	PL	Barlogi (Konin), Warta	52,1949	18,0272	2007	LULU1	
282	S0121	ST	SYM	PL	Barlogi (Konin), Warta	52,1882	18,0146	2007	LULU1	SGS1
283	S0122	ST	SYM	PL	Zagorow, Warta	52,1858	17,9023	2007	LULU1	SGS1
284	S0123	ST	SYM	PL	Zagorow, Warta	52,1830	17,9064	2007	LULU1	SFC8
285	S0124	ST	SYM	PL	Zagorow, Warta	52,1793	17,9113	2007	LULU1	
286	S0125	ST	SYM	PL	Zagorow, Warta	52,1829	17,9274	2007	LULU1	
287	S0126	ST	SYM	PL	Zagorow, Warta	52,1857	17,9261	2007	LULU1	SGS1
288	S0131	ST	SYM	PL	Czolnochow, Prosna	52,0421	17,7297	2007		WW3
289	S0132	ST	SYM	PL	Czolnochow, Prosna	52,0459	17,7222	2007		WW3
290	S0133	ST	SYM	PL	Prusinow, Prosna	52,0485	17,7061	2007	LULU1	
291	S0134	ST	SYM	PL	Prusinow, Prosna	52,0482	17,7069	2007	LULU1	
292	S0139	ST	SYM	PL	Pogorzelnica (Pyzdry)	52,1413	17,5951	2007	LULU1	
293	S0140	ST	SYM	PL	Pogorzelnica (Pyzdry)	52,1416	17,5960	2007	LULU1	
294	S0142	ST	SYM	PL	Pogorzelnica (Pyzdry)	52,1390	17,5913	2007		LINN1
295	S0147	ST	SYM	PL	Radolin (Czarnkow), Notec	53,0161	16,5573	2007	LULU1	
296	S0150	ST	SYM	PL	Radolin (Czarnkow), Notec	53,0185	16,5608	2007	LULU1	
297	S0151	ST	SYM	PL	Radolin (Czarnkow), Notec	53,0185	16,5608	2007		LULU2
298	S0152	ST	SYM	PL	Radolin (Czarnkow), Notec	53,0209	16,5630	2007	LULU1	SGS1
299	S0153	ST	SYM	PL	Ciszkowo (Czarnkow)	52,8816	16,4358	2007	LULU1	

300	S0154	ST	SYM	PL	Ciszkowo (Czarnkow)	52,8800	16,4524	2007	LULU1	
301	S0155	ST	SYM	PL	Czarnkow, Notec	52,9149	16,5386	2007		LINN1
302	S0156	ST	SYM	PL	Czarnkow, Notec	52,9156	16,5394	2007		GRW10
303	S0163	ST	SYM	PL	Biala (Czarnkow), Notec	53,0347	16,5704	2007	LULU1	
304	S0166	ST	SYM	PL	Trzebicz (Dresdenko), Notec	52,8258	15,7637	2007	LULU1	
305	S0176	ST	SYM	PL	Gosciniac (Dresdenko), Notec	52,7851	15,6585	2007		SGS1
306	S0177	ST	SYM	PL	Santok, Warta/Notec	52,7352	15,4244	2007	LULU1	
307	S0178	ST	SYM	PL	Santok, Warta/Notec	52,7343	15,4247	2007		GRW10
308	S0179	ST	SYM	PL	Santok, Warta/Notec	52,7352	15,4244	2007	LULU1	
309	S0180	ST	SYM	PL	Santok, Warta/Notec	52,7361	15,4249	2007	LULU1	
310	S0181	ST	SYM	PL	Santok, Warta/Notec	52,7363	15,3989	2007	LULU1	
311	S0192	ST	SYM	PL	Witkowice, Bzura	52,3322	20,2475	2007	ROBIN1	
312	S0194	ST	SYM	PL	Witkowice, Bzura	52,3314	20,2477	2007	LULU1	
313	S0266	ST	SYM	PL	Szczecin	53,4287	14,5528	2007		GRW11
314	S0279	ST	SYM	PL	Przystajnia	51,5853	18,1738	2008		SGS1
315	S0287	ST	SYM	PL	Przystajnia, Proсна	51,5856	18,1702	2008	LULU1	
316	S0288	ST	SYM	PL	Olobok	51,6326	18,0764	2008	LULU1	
317	S0293	ST	SYM	PL	Wielowiés, Cegielnia	51,6052	18,0992	2008	LULU1	
318	S0297	ST	SYM	PL	Chocz	51,9756	17,8584	2008		RS4
319	S0299	ST	SYM	PL	Chocz	51,9775	17,8541	2008	LULU1	
320	S0304	ST	SYM	PL	Chocz	51,9775	17,8643	2008	LULU1	RS4
321	S0308	ST	SYM	PL	Kwileń	51,9800	17,8469	2008	LULU1	
322	S0311	ST	SYM	PL	Chocz	51,9689	17,8694	2008	LULU1	
323	S0312	ST	SYM	PL	Chocz	51,9699	17,8675	2008	LULU1	SGS1
324	S0323	ST	SYM	PL	Czolnochów	52,0421	17,7306	2008	LULU1	RS4
325	S0324	ST	SYM	PL	Czolnochów	52,0444	17,7333	2008	LULU1	RS4
326	S0326	ST	SYM	PL	Czolnochów	52,0442	17,7218	2008	LULU1	AEMO01
327	S0329	ST	SYM	PL	Czolnochów	52,0493	17,7175	2008		AEMO01
328	S0333	ST	SYM	PL	Prusinów	52,0490	17,7060	2008	LULU1	
329	S0334	ST	SYM	PL	Prusinów	52,0479	17,7066	2008		GRW11
330	S0335	ST	SYM	PL	Prusinów	52,0479	17,7054	2008	LULU1	

331	S0336	ST	SYM	PL	Prusinów	52,0482	17,7039	2008	LULU1	
332	S0339	ST	SYM	PL	Nowe Miasto, Warta	52,1019	17,4303	2008	LULU1	
333	S0340	ST	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1419	17,5986	2008	LULU1	RS4
334	S0341	ST	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1410	17,5944	2008	LULU1	
335	S0343	ST	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1409	17,5955	2008	LULU1	AEMO01
336	S0344	ST	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1400	17,5924	2008	LULU1	
337	S0350	ST	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1414	17,6071	2008	LULU1	
338	S0355	ST	SYM	PL	Ruda Komorska	52,1158	17,6620	2008	LULU1	
339	S0356	ST	SYM	PL	Ruda Komorska	52,1158	17,6620	2008	LULU1	
340	S0367	ST	SYM	PL	Kwileń	51,9806	17,8473	2009	LULU1	
341	S0371	ST	SYM	PL	Chocz	51,9680	17,8723	2009	LULU1	
342	S0372	ST	SYM	PL	Chocz	51,9683	17,8713	2009		LULU3
343	S0374	ST	SYM	PL	Chocz	51,9777	17,8529	2009	LULU1	
344	S0375	ST	SYM	PL	Prusinow, Proсна	52,0488	17,7061	2009	LULU1	
345	S0378	ST	SYM	PL	Czolnochów	52,0422	17,7292	2009	LULU1	
346	S0380	ST	SYM	PL	Ruda Komorska	52,1183	17,6647	2009	LULU1	
347	S0141	ST	SYM	PL	Pogorzelnica (Pyzdry)	52,1404	17,5900	2007		
348	S0148	ST	SYM	PL	Radolin (Czarnkow), Notec	53,0164	16,5590	2007		
349	S0149	ST	SYM	PL	Radolin (Czarnkow), Notec	53,0168	16,5595	2007		
350	S0157	ST	SYM	PL	Romanowo Dolne (Czarnkow), Notec	52,9376	16,5657	2007		
351	S0162	ST	SYM	PL	Biała (Czarnkow), Notec	53,0334	16,5738	2007		
352	S0164	ST	SYM	PL	Biała (Czarnkow), Notec	53,0374	16,5645	2007		
353	S0165	ST	SYM	PL	Trzebicz (Dresdenko), Notec	52,8258	15,7637	2007		
354	S0168	ST	SYM	PL	Trzebicz (Dresdenko), Notec	52,8144	15,7451	2007		
355	S0169	ST	SYM	PL	Trzebicz (Dresdenko), Notec	52,8069	15,7350	2007		
356	S0170	ST	SYM	PL	Trzebicz (Dresdenko), Notec	52,8075	15,7358	2007		
357	S0292	ST	SYM	PL	Wielowiés, Cegielnia	51,6025	18,1011	2008		
358	S0317	ST	SYM	PL	Chocz	51,9688	17,8703	2008		
359	S0332	ST	SYM	PL	Prusinów	52,0501	17,7096	2008		
360	S0342	ST	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1415	17,5965	2008		
361	S0379	ST	SYM	PL	Czolnochów	52,0420	17,7275	2009		

362	S0120	HYB	SYM	PL	Barlogi (Konin), Warta	52,1944	18,0264	2007	LULU1	
363	S0144	HYB	SYM	PL	Sroda Wilkp.	52,2296	17,2337	2007	LULU1	
364	S0186	HYB	SYM	PL	Koscian	52,1376	16,5606	2007	LULU1	AEMO01
365	S0283	HYB	SYM	PL	Raduchów	51,5804	18,1639	2008		SGS1
366	S0309	HYB	SYM	PL	Kwileń	51,9793	17,8497	2008		SGS1
367	S0354	HYB	SYM	PL	Ruda Komorska	52,1182	17,6643	2008	LULU1	
368	S0282	HYB	SYM	PL	Przystajnia	51,5864	18,1725	2008		
369	S0346	HYB	SYM	PL	Pogorzelnica	52,1389	17,5917	2008		
370	S0377	HYB	SYM	PL	Prusinow, Proсна	52,0480	17,7042	2009		

Příloha 2. Kvantitativní PCR.

Tato tabulka uvádí výsledná data z kvantitativní PCR. Jedinci jsou zařazeni do druhu (SO – slavík obecný, ST – slavík tmavý, HYB - hybrid). Vlevo jsou uvedeny triplikáty vzorků, kde se amplifikovala část jaderného ptačího genu pro 18S, vpravo triplikáty téhož vzorku s amplifikovanou částí mitochondriálního parazitárního genu pro cytochrom b. Hodnoty uvedené tučně nebyly započteny do průměru z důvodu větší odchylky od zbývajících dvou hodnot z triplikátu (rozdíl se lišil o více než 1 cyklus).

		ptačí gen 18S				parazitární gen pro cyt b			
kód	druh	1	2	3	průměr	1	2	3	průměr
S0127	SO	16,54	16,47	16,64	16,55	32,26	31,39	31,87	31,84
S0130	SO	15,84	15,88	16,32	16,01	41,35	41,71	40,95	41,34
S0146	SO	16,24	16,47	16,45	16,39	37,40	38,94	38,42	38,68
S0160	SO	16,41	16,37	16,49	16,42	28,90	28,93	28,54	28,79
S0171	SO	16,41	16,49	16,46	16,45	33,75	31,41	30,70	31,06
S0174	SO	15,60	15,51	15,37	15,49	32,00	31,91	31,52	31,81
S0184	SO	17,63	17,91	17,92	17,82	39,68	40,38	38,70	40,03
S0190	SO	14,87	14,63	14,57	14,69	30,12	30,15	29,90	30,06
S0313	SO	17,35	17,51	17,54	17,47	30,33	30,94	30,10	30,46
S0314	SO	15,28	15,29	15,21	15,26	41,47	41,66	40,81	41,31
S0328	SO	16,52	16,69	16,66	16,62	34,00	34,59	33,93	34,17
S0097	ST	14,95	14,93	14,86	14,91	35,81	35,95	35,77	35,84
S0101	ST	13,99	14,82	14,65	14,49	30,61	30,84	30,50	30,65
S0105	ST	15,30	14,81	15,61	15,24	32,73	31,82	31,78	32,11
S0113	ST	18,16	18,67	18,26	18,36	36,10	35,63	36,24	35,99
S0116	ST	16,52	16,37	16,35	16,41	36,48	36,24	35,31	36,36
S0133	ST	17,65	17,78	17,69	17,71	34,80	34,43	34,27	34,50
S0147	ST	15,56	15,64	15,72	15,64	34,11	34,37	33,81	34,10
S0153	ST	17,30	17,28	16,95	17,18	35,42	35,40	34,18	35,41
S0163	ST	17,59	17,52	17,90	17,67	32,33	32,09	31,29	32,21
S0166	ST	17,41	17,11	17,24	17,25	35,90	35,92	35,87	35,90
S0177	ST	14,74	15,14	14,89	14,92	33,14	33,55	32,82	33,17
S0192	ST	13,86	13,80	13,97	13,88	29,45	28,63	28,95	29,01
S0311	ST	15,95	15,94	15,90	15,93	32,41	31,77	32,09	32,09
S0312	ST	16,51	16,56	16,56	16,54	32,50	32,74	32,81	32,68
S0323	ST	16,62	16,59	16,50	16,57	33,64	33,81	33,67	33,71
S0120	HYB	15,41	15,57	15,43	15,47	29,84	30,52	29,85	30,07
S0144	HYB	17,22	17,44	17,56	17,41	29,95	29,74	29,42	29,70
S0186	HYB	15,90	15,92	15,85	15,89	33,91	34,41	34,45	34,26
S0354	HYB	14,88	15,03	13,73	14,96	40,53	40,20	40,68	40,47

IX CITOVANÁ LITERATURA

- Arnold ML. 1997.** *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, 215 p.
- Atkinson CT, Greinier EC, Forrester DJ. 1986.** Pre-erythrocytic development and associated host responses to *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *Journal of Protozoology* 33, 375-381.
- Atkinson CT, Greinier EC, Forrester DJ. 1988.** Pathogenicity of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *Journal of Protozoology* 74, 228-239.
- Beadell JS, Covas R, Gebhard C, Ishtiaq F, Melo M, Schmidt BK, Perkins SL, Graves GR, Fleischer RC. 2009.** Host associations and evolutionary relationships of avian blood parasites from West Africa. *International Journal for Parasitology* 39, 257-266.
- Beadell JS, Fleischer RC. 2005.** A restriction enzymebased assay to distinguish between avian hemosporidians. *Journal of Parasitology* 91, 683-685.
- Beadell JS, Gering E, Austin J, Dumbacher JP, Peirce MA, Pratt TK, Atkinson CT, Fleischer RC. 2004.** Prevalence and differential host-specificity of two avian blood parasite genera in the Australo-Papuan region. *Molecular Ecology* 13, 3829-3844.
- Beadell JS, Ishtiaq F, Covas R, Melo M, Warren BH, Atkinson CT, Bensch S, Graves GR, Jhala YV, Peirce MA, Rahmani AR, Fonseca DM, Fleischer RC. 2006.** Global phylogeographic limits of Hawaii's avian malaria. *Proceedings of the Royal Society of London B* 273, 2935-2944.
- Becker J. 2007.** About Nightingales (*Luscinia megarhynchos*), Trush Nightingales (*Luscinia luscinia*) and their hybrids—further results of an investigation via bird ringing in the Frankfurt (Oder) area. *Vogelwarte* 45, 15-26.
- Bensch S, Akesson S. 2003.** Temporal and spatial variation of hematozoans in Scandinavian willow warblers. *Journal of Parasitology* 89, 388-391.
- Bensch S, Hellgren O, Perez-Tris J. 2009.** MalAvi: A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* 9, 1353-1358.
- Bensch S, Stjernman M, Hasselquist D, Ostman O, Hansson B, Westerdahl H, Pinheiro RT. 2000.** Host specificity in avian blood parasites: a study of *Plasmodium* and *Haemoproteus* mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 267, 1583-1589.
- Bensch S, Waldenström J, Jonzen N, Westerdahl H, Hansson B, Sejberg D, Hasselquist D. 2007.** Temporal dynamics and diversity of avian malaria parasites in a single host species. *Journal of Animal Ecology* 76, 112-122.
- Bentz S, Rigaud T, Barroca M, Martin-Laurent F, Bru D, Moreau J, Faivre B. 2006.** Sensitive measure of prevalence and parasitaemia of haemosporidia from European blackbird (*Turdus merula*) populations: value of PCR-RFLP and quantitative PCR. *Parasitology* 133, 685-692.
- Betancourt AJ, Presgraves DC, Swanson WJ. 2002.** A test for faster X evolution in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* 19, 1816-1819.

- Boecklen WJ, Spellenberg R. 1990.** Structure of herbivore communities in two oak *Quercus* spp.) hybrid zones. *Oecologia* 85, 92-100.
- Coustau C, Renaud F, Maillard C, Pasteur N, Delay B. 1991.** Differential susceptibility to a trematode parasite among genotypes of *Mytilus edulis/galloprovincialis* complex. *Genetical research* 57, 207-212.
- Cramp S et al. 1988.** *Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa: The Birds of the Western Palearctic Volume V: Tyrant Flycatchers to Thrushes.* Oxford University Press, Oxford, 1063 p.
- del Hoyo J, Elliott A, Christie D et al. 2005.** *Handbook of the Birds of the World Volume 10: Cuckoo-shrikes to Thrushes.* Lynx Edicions, Barcelona, 896 p.
- Derothe JM, Le Brun N, Loubes C, Perriat-Sanguinet M, Moulia C. 2001.** Susceptibility of natural hybrids between house mouse subspecies to *Sarcocystis muris*. *International Journal for Parasitology* 31, 15-19.
- Derothe JM, Loubes C, Orth A, Renaud F, Moulia C. 1997.** Comparison between patterns of pinworm infection (*Aspicularis tetraptera*) in wild and laboratory strains of mice, *Mus musculus*. *International Journal for Parasitology* 27, 645-651.
- Derothe JM, Loubes C, Perriat-Sanguinet M, Orth A, Moulia C. 1999.** Experimental trypanosomiasis of natural hybrids between house mouse subspecies. *International Journal for Parasitology* 29, 1011-1016.
- Dimitrov D, Zehindjiev P, Bensch S. 2010.** Genetic diversity of avian blood parasites in SE Europe: Cytochrome b lineages of the genera *Plasmodium* and *Haemoproteus* (Haemosporida) from Bulgaria. *Acta Parasitologica* 55, 201-209.
- Durrant KL, Marra PP, Fallon SM, Colbeck GJ, Gibbs HL, Hobson KA, Norris DR, Bernik S, Lloyd VL, Fleischer RC. 2008.** Parasite assemblages distinguish populations of a migratory passerine on its breeding grounds. *Journal of Zoology* 274, 318-326.
- Durrant KL, Reed JL, Jones PJ, Dallimer M, Cheke RA, McWilliam AN, Fleischer RC. 2007.** Variation in haematozoan parasitism at local and landscape levels in the red-billed quelea *Quelea quelea*. *Journal of Avian Biology* 38, 662-671.
- Ejiri H, Sato Y, Sawai R, Sasaki E, Matsumoto R, Ueda M, Higa Y, Tsuda Y, Omori S, Murata K, Yukawa M. 2009.** Prevalence of avian malaria parasite in mosquitoes collected at a zoological garden in Japan. *Parasitology Research* 105, 629-633.
- Escalante AA, Freeland DE, Collins WE, Lal AA. 1998.** The evolution of primate malaria parasites based on the gene encoding cytochrome *b* from the linear mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8124-8129.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479-491.
- Fallon SM, Ricklefs RE, Swanson BL, Bermingham E. 2003.** Detecting avian malaria: an improved PCR diagnostic. *Journal of Parasitology* 89, 1044-1047.
- Fallon SM, Ricklefs RE. 2008.** Parasitemia in PCR-detected *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds. *Journal of Avian Biology* 39, 514-522.

- Feldman RA, Freed LA, Cann RL. 1995.** A PCR test for avian malaria in Hawaiian birds. *Molecular Ecology* 4, 663-673.
- Ferrell ST, Snowden K, Marlar AB, Garner M, Lung NP. 2007.** Fatal hemoprotozoal infections in multiple avian species in a zoological park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38, 309-316.
- Fritz RS, Nichols-Orians CM, Brunfeldt SJ. 1994.** Interspecific hybridization of plants and resistance to herbivores: hypotheses, genetics, and variable responses in a diverse community. *Oecologia* 97, 106-117.
- Greiner EC, Bennett GF, White EM, Coombs RF. 1975.** Distribution of the avian hematozoa of North America. *Canadian Journal of Zoology*, 53, 1762-1787.
- Hall TA. 1999.** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95-98.
- Hasselquist D, Östman Ö, Waldenström J, Bensch S. 2007.** Temporal patterns of occurrence and transmission of the blood parasite *Haemoproteus payevskyi* in the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Journal of Ornithology* 148, 401-409.
- Hatchwell BJ, Wood MJ, Anwar M, Perrins CM. 2000.** The prevalence and ecology of the haematozoan parasites of European blackbirds, *Turdus merula*. *Canadian Journal of Zoology* 78, 684-687.
- Helbig AJ, Seibold I. 1999.** Molecular phylogeny of Palearctic–African *Acrocephalus* and *Hippolais* warblers (Aves: Sylviidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11, 246-260.
- Hellgren O, Krizanauskiene A, Bensch S, Waldenstrom J, Szollosi E, Valkiunas G. unpublished.** Molecular phylogenetics reveal evolutionary constraints of novel introductions of Avian blood parasites
- Hellgren O, Krizanauskiene A, Valkiunas G, Bensch S. 2007b.** Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome b lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida, Haemoproteidae). *Journal of Parasitology* 93, 889-896.
- Hellgren O, Waldenström J, Bensch S. 2004.** A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90, 797-802.
- Hellgren O, Waldenstrom J, Perez-Tris J, Szollosi E, Hasselquist D, Krizanauskiene A, Ottosson U, Bensch S. 2007a.** Detecting shifts of transmission areas in avian blood parasites - a phylogenetic approach. *Molecular Ecology* 16, 1281-1290.
- Hellgren O. 2005.** The occurrence of haemosporidian parasites in the Fennoscandian bluethroat (*Luscinia svecica*) population. *Journal of Ornithology* 146, 55-60.
- Horák P, Volf P et al. 2007.** *Paraziti a jejich biologie*. Triton Praha, 318 p.
- Hudec K et al. 1983.** *Fauna ČSSR. Ptáci 3/1*. Academia, Praha, 704 p.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R. 2007.** Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* 8, 460.
- Chinery M. 2007.** *Insects of Britain and Western Europe*. A & C Black Publishers Ltd., London, 320 p.

- Ishtiaq F, Beadell JS, Baker AJ, Rahmani AR, Jhala YV, Fleischer RC. 2005.** Prevalence and evolutionary relationships of haematozoan parasites in native versus introduced populations of common myna *Acridotheres tristis*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 273, 587-594.
- Ishtiaq F, Gering E, Rappole JH, Rahmani AR, Jhala YV, Dove CJ, Milensky C, Olson SL, Peirce MA, Fleischer RC. 2007.** Prevalence and diversity of avian hematozoan parasites in Asia: a regional survey. *Journal of Wildlife Diseases* 43, 382-398.
- Jenkins T, Owens IPF. 2011.** Biogeography of avian blood parasites (*Leucocytozoon* spp.) in two resident hosts across Europe: phylogeographic structuring or the abundance-occupancy relationship? *Molecular Ecology* DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05221.x.
- Joly P, Guesdon V, Fromont E, Plenet S, Grolet O, Guegan JF, Hurtrez-Bousses S, Thomas F, Renaud F. 2007.** Heterozygosity and parasite intensity: lung parasites in the water frog hybridization complex. *Parasitology* 135, 95-104.
- Kim KS, Tsuda Y, Yamada A. 2009.** Bloodmeal identification and detection of avian malaria parasite from mosquitoes (Diptera: Culicidae) inhabiting coastal areas of Tokyo Bay, Japan. *Journal of Medical Entomology* 46, 1230-1234.
- Kimura M, Dhondt AA, Lovette IJ. 2006.** Phylogeographic structuring of *Plasmodium* lineages across the North American range of the house finch (*Carpodacus mexicanus*). *Journal of Parasitology* 92, 1043-1049.
- Knowles SC, Wood MJ, Alves R, Wilkin TA, Bensch S, Sheldon BC. 2011.** Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. *Molecular Ecology* 20, 1062-1076.
- Križanauskiene A, Hellgren O, Kosarev V, Sokolov L, Bensch S, Valkiunas G. 2006.** Variation in host specificity between species of avian hemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology* 92, 1319-1324.
- Kulma K, Qvarnstrom A. submitted 2010.** *Animal Ecology*
- Le Brun N, Renaud F, Berebi P, Lambert A. 1992.** Hybrid zones and host-parasite relationships: effect on the evolution of parasitic specificity. *Evolution* 46, 56-61.
- Li J, Wirtz RA, Mcconkey GA, Sattabongkot J, Waters AP, Rogers MJ, McCutchan TF. 1995.** *Plasmodium*: Genus-Conserved Primers for Species Identification and Quantitation. *Experimental Parasitology* 81, 182-190.
- Lovette IJ. 2004.** Mitochondrial dating and mixed-support for the “2% rule” in birds. *AUK* 121, 1-6.
- Mackinnon MJ, Read AF. 2004.** Immunity promotes virulence evolution in a malaria model. *PloS Biology* 2, e230.
- Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ. 2008.** A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47, 261-273.
- Mason JR, Clark L. 1990.** Sarcosporidiosis observed more frequently in hybrids of Mallards and American Black Ducks. *The Wilson Bulletin* 102, 160-162.

- Mouliá C, Le Brun N, Dallas J, Orth A, Renaud F. 1993.** Experimental evidence of genetic determinism in high susceptibility to intestinal pinworms infection in mice: a hybrid zone model. *Parasitology* 106, 387-393.
- Mouliá C. 1999.** Parasitism of plant and animal hybrids: are facts and fate the same? *Ecology* 80, 392-406.
- Pagenkopp KM, Klicka J, Durrant KL, Garvin JC, Fleischer RC. 2008.** Geographic variation in malarial parasite lineages in the common yellowthroat (*Geothlypis trichas*). *Conservation Genetics* 9, 1577-1588.
- Paul REL, Nu VAT, Krettli AU, Brey PT. 2002.** Interspecific competition during transmission of two sympatric malaria parasite species to the mosquito vector. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 269, 2551-2557.
- Pekár S, Brabec M. 2009.** Moderní analýza biologických dat: Zobecněné lineární modely v prostředí R. Scientia, Praha. 236 p.
- Pérez-Tris J, Bensch S. 2005a.** Dispersal increases local transmission of avian malarial parasites. *Ecology Letters* 8, 838-845.
- Pérez-Tris J, Bensch S. 2005b.** Diagnosing genetically diverse avian malarial infections using mixed-sequence analysis and TA-cloning. *Parasitology* 131, 15-23.
- Pérez-Tris J, Hellgren O, Krizanauskiene A, Waldenström J, Secondi J, Bonneaud C, Fjeldsa J, Hasselquist D, Bensch S. 2007.** Within-host speciation of malaria parasites. *PlosOne* 2, e235.
- Perkins SL, Schall JJ. 2002.** A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology* 88, 972-978.
- Prenter J, McNeil C, Dick JCA, Dunn AM. 2004.** Roles of parasites in animal invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 385-391.
- Reifová R, Kverek P, Reif J. 2011a.** The first record of a female hybrid between the Common Nightingale (*Luscinia megarhynchos*) and the Thrush Nightingale (*Luscinia luscinia*) in Nature. *Journal of Ornithology* DOI 10.1007/s10336-011-0700-7.
- Reifová R, Reif J, Antczak M, Nachman MW. 2011.** Ecological character displacement in the face of gene flow: Evidence from two species of nightingales. *BMC Evolutionary Biology* 11, 138.
- Reullier J, Pérez-Tris J, Bensch S, Secondi J. 2006.** Diversity, distribution and exchange of blood parasites meeting at an avian moving contact zone. *Molecular Ecology* 15, 753-763.
- Ricklefs RE, Fallon SM. 2002.** Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269, 885-892.
- Richard FA, Sehgal RNM, Jones HI, Smith TB. 2002.** A comparative analysis of PCR-based detection methods for avian malaria. *Journal of Parasitology*, 88, 819-822.
- Richner H. 1998.** Host-parasite interactions and life-history evolution. *Zoology* 101, 333-344.
- Rintamäki PT, Ojanen M, Pakkala H, Tynjälä M. 1998.** Blood parasites of migrating Willow Warblers (*Phylloscopus trochilus*) at a stopover site. *Canadian Journal of Zoology* 76, 984-988.
- Ritchie MG. 2007.** Sexual selection and speciation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38, 79-102.

- Sætre GP, Borge T, Lindroos K, Haavie J, Sheldon BC, Primmer C, Sylvänen, AC. 2003.** Sex chromosome evolution and speciation in *Ficedula* flycatchers. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270, 53-59.
- Sage RD, Heyneman D, Lim KC, Wilson AC. 1986.** Wormy mice in a hybrid zone. *Nature* 324, 60-63.
- Santiago-Alarcon D, Outlaw DC, Ricklefs RE, Parker PG. 2010.** Phylogenetic relationships of haemosporidian parasites in New World Columbiformes, with emphasis on the endemic Galapagos dove. *International Journal for Parasitology* 40, 463-470.
- Secondi J, Bretagnolle V, Compagnon C, Faivre B. 2003.** Species-specific song convergence in a moving hybrid zone between two passerines. *Biological Journal of the Linnean Society* 80, 507-517.
- Scheuerlein A, Ricklefs RE. 2004.** Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 271, 1363-1370.
- Smith RB, Greiner EC, Wolf BO. 2004.** Migratory movements of sharp-shinned hawk (*Accipiter striatus*) captured in New Mexico in relation to prevalence, intensity, and biogeography of avian hematozoa. *AUK* 121, 837-846.
- Sol D, Jovani R, Torres J. 2000.** Geographical variation in blood parasites in feral pigeons: the role of vectors. *Ecography* 23, 307-314.
- Sorjonen J. 1986.** Mixed singing and interspecific territoriality—consequences of secondary contact of 2 ecologically and morphologically similar nightingale species in Europe. *Ornis Scandinavica* 17, 53-67.
- Stadie C. 1991.** Erdsanger I; Nachtigall und Sprosser. *Europäische Vogelwelt* 3, Sonderheft, 130-189.
- Storchová R, Reif J, Nachman MW. 2009.** Female heterogamety and speciation: reduced introgression of the Z chromosome between two species of nightingales. *Evolution* 64-2, 456-471.
- Svenson L et al. 2004.** *Ptáci Evropy, severní Afriky a Blízkého východu*. Svojtka&Co, Praha, 400 p.
- Synek P. 2009.** Původci ptačí malárie a ostatní hemosporida hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*). *Diplomová práce katedry Parazitologie PřF UK*, 116 p.
- Szollosi E, Balazs R, Hasselquist D, Torok J. 2009.** The effect of parental quality and malaria infection on nestling performance in the Collared Flycatcher (*Ficedula albicollis*). *Journal of Ornithology* 150, 541-550.
- Szymanski MM, Lovette IJ. 2005.** High lineage diversity and host sharing of malarial parasites in a local avian assemblage. *Journal of Parasitology* 91, 768-774.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Valkiunas G, Iezhova TA, Krizanauskiene A, Palinauskas V, Bensch S. 2008.** In vitro hybridization of *Haemoproteus* spp.: an experimental approach for direct investigation of reproductive isolation of parasites. *Journal of Parasitology* 94, 1385-1394.

- Valkiunas G, Iezhova TA, Loiseau C, Sehgal RNM. 2009.** Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics detect sporozoites of hemosporidian parasites in peripheral blood of naturally infected birds. *Journal of Parasitology* 95, 1512-1515.
- Valkiunas G, Zehntindjiev P, Hellgren O, Ilieva M, Iezhova TA, Bensch S. 2007.** Linkage between mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites, with a description of *Plasmodium (Novyella) ashfordi* sp. nov. *Parasitology Research* 100, 1311-1322.
- Valkiunas G. 2005.** *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 932 p.
- Waldenström J, Bensch S, Hasselquist D, Östman Ö. 2004.** A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90, 191-194.
- Waldenström J, Bensch S, Kiboi S, Hasselquist D, Ottoson U. 2002.** Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology* 11, 1545-1554.
- Whitman TG. 1989.** Plant hybrid zones as sinks for pests. *Science* 244, 1490-1493.
- Wiley C, Qvarnström A, Gustafsson L. 2009.** Effects of hybridization on the immunity of collared *Ficedula albicollis* and pied flycatchers *F. hypoleuca*, and their infection by haemosporidians. *Journal of Avian Biology* 40, 352-357.
- Wink M, Sauer-Gurth H, Gwinner E. 2002.** Evolutionary relationships of stonechats and related species inferred from mitochondrial-DNA sequences and genomic fingerprinting. *British Birds* 95, 349-355.
- Wood MJ, Cosgrove CL, Wilkin TA, Knowles SCL, Day KP, Sheldon BC. 2007.** Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. *Molecular Ecology* 16, 3263-3273.
- Yohannes E, Križanauskiene A, Valcu M, Bensch S, Kempenaers B. 2009.** Prevalence of malaria and related haemosporidian parasites in two shorebird species with different winter habitat distribution. *Journal of Ornithology* 150, 287-291.
- Zehntindjiev P, Ilieva M, Westerdahl H, Hansson B, Valkiunas G, Bensch S. 2008.** Dynamics of parasitemia of malaria parasites in a naturally and experimentally infected migratory songbird, the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Experimental Parasitology* 119, 99-110.