

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra parazitologie**



**Původci ptačí malárie a ostatní hemosporida
hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*)**

Diplomová práce

Petr Synek

Školitel:

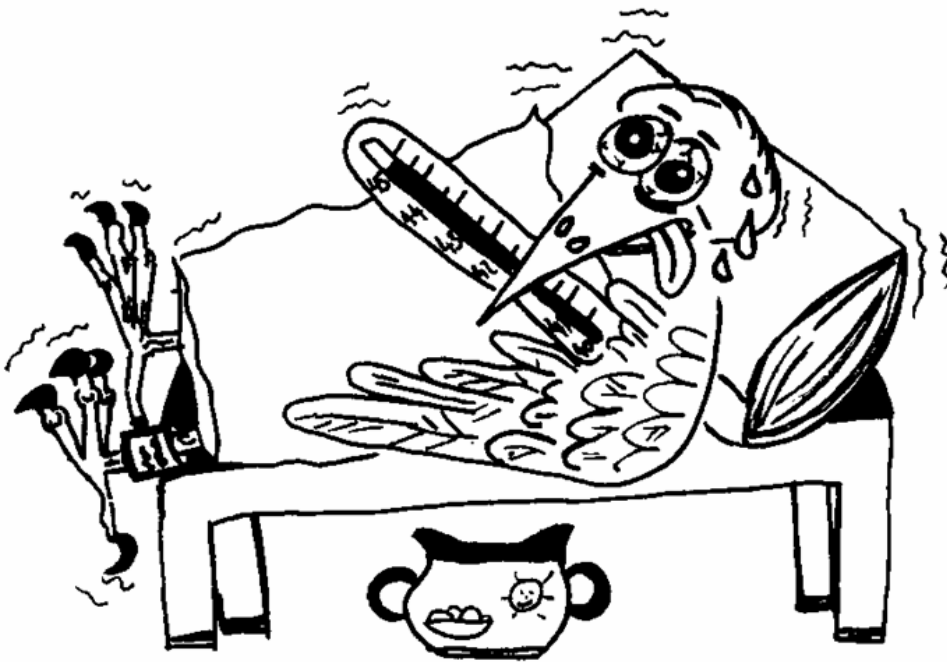
Mgr. Pavel Munclinger, Ph.D.

Konzultanti:

Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.

Praha 2009



Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně, s použitím citované literatury.

V Praze 26. 4. 2009

Poděkování

Na úvod bych chtěl poděkovat lidem, kteří mi během výzkumu i sepisování diplomové práce pomáhali a podporovali mě. Můj dík patří především mému školiteli dr. Pavlovi Munclingerovi za vedení v průběhu projektu, zasvěcování do laboratorních technik, cenné rady, pomoc v terénu i laboratoři, poskytnutí fotografií z terénu, připomínkování vznikajícího textu a celkovou podporu vůbec.

Dále bych chtěl poděkovat dr. Janu Votýpkovi za odborné parazitologické konzultace, cenné rady a nápady v projektu určování potencionálního přenašeče, zapůjčení materiálu k odchytu hematofágního hmyzu a připomínkování vznikajícího textu.

Za pomoc s výpočty a statistickým zpracováním dat děkuji dr. Tomášovi Albrechtovi (zobecněné lineární modely), Václavovi Janouškovi (programování v Perlu) a Zuzaně Starostové (Bayesiánská analýza).

Dále bych chtěl poděkovat Tomášovi Albrechtovi, Michalovi Vinklerovi a Janu Schnitzerovi za pomoc při terénní práci, cenné rady v laboratoři i v terénu a poskytnutí dat o studovaném hostitelském druhu. Za poskytnutí dat o počtu alel *Mhc* děkuji Martě Promerové a o celkové heterozygotnosti Radce Polákové. Za pomoc s určováním komárů a muchniček děkuji Janě Rádrové a Ondřejovi Černému. Za celkovou podporu nejen při psaní diplomové práce, ale během celého studia děkuji své rodině a kamarádům.

I OBSAH

I OBSAH	4
II ÚVOD A CÍLE PRÁCE	6
II.1. ÚVOD.....	6
II.2. CÍLE PRÁCE	9
III LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
III.1. HOSTITELSKÁ SPECIFITA, IDENTIFIKACE A DIVERZITA PTAČÍCH HEMOSPORID	10
III.1.1. Hostitelská specifita druhů rodu <i>Plasmodium</i>	11
III.1.2. Hostitelská specifita druhů rodu <i>Haemoproteus</i>	13
III.1.3. Hostitelská specifita a identifikace druhů rodu <i>Leucocytozoon</i>	15
III.1.4. Diverzita linií hemosporid v jednom hostitelském druhu ptáka.....	17
III.2. VÝVOJOVÉ CYKLY A ZPŮSOB PŘENOSU PTAČÍCH HAEMOSPORID	20
III.2.1. Vývojový cyklus zástupců rodu <i>Plasmodium</i>	21
III.2.2. Vývojový cyklus rodu <i>Haemoproteus</i>	23
III.2.3. Vývojový cyklus rodu <i>Leucocytozoon</i>	25
III.3. PATOGENITA PTAČÍCH HEMOSPORID	27
III.3.1. Hlavní mechanismy patogenního působení na ptačího hostitele.....	27
III.3.2. Patologické působení hemosporid na volně žijící pěvce.....	28
III.3.3. Vliv hemosporid na přenašeče	37
IV METODIKA	38
IV.1. TERÉNNÍ ČÁST PROJEKTU A HOSTITELSKÝ DRUH	38
IV.1.1. Výzkumná lokalita	38
IV.1.2. Studovaný hostitelský druh: hýl rudý <i>Carpodacus erythrinus</i> (Pallas, 1770)	40
IV.1.3. Sběr vzorků v terénu	41
IV.2. LABORATORNÍ A BIOINFORMATICKÉ METODY	43
IV. 2.1 Izolace DNA a kontrola její kvality	43
IV.2.2. Molekulární detekce parazitů: Nested PCR	44
IV.2.3. Určení genetických linií parazitů	47
IV.2.4. Detekce smíšených infekcí více liniemi hemosporid.....	48
IV.2.5. Mikroskopická detekce parazitů: vyšetření krevních roztěrů	50
IV.2.6. Statistické analýzy a další výpočty	51
IV. 3. METODIKA IDENTIFIKACE POTENCIONÁLNÍCH PŘENAŠEČŮ NA STUDOVANÉ LOKALITĚ	52
IV.3.1. Odchyt hematofágního hmyzu	52
IV.3.2. Určování hematofágního hmyzu	53
IV.3.3. Detekce hemosporid v odchyceném hematofágních hmyzu	54
IV.4. ZÍSKÁVÁNÍ DAT O HOSTITELSKÉM DRUHU	55

V VÝSLEDKY	56
V.1. EPIZOOTOLOGIE PTAČÍCH HEMOSPORID U HÝLA RUDÉHO NA ZÁKLADĚ PCR DETEKCE	56
V.1.1. Celkový počet vyšetřovaných vzorků, celková prevalence a smíšené infekce	56
V.1.2. Detekované rody ptačích hemosporid, počty unikátních linií a jejich prevalence	56
V.1.3. Epizootologie na jednotlivých lokalitách	58
V.2. MIKROSKOPICKÁ DETEKCE A JEJÍ POROVNÁNÍ S PCR DIAGNOSTIKOU	65
V.2.1. Prevalence, parazitémie a determinace druhů	65
V.2.2. Porovnání mikroskopické a PCR detekce	65
V.3. HOSTITELSKÁ SPECIFITA A DIVERZITA DETEKOVANÝCH LINIÍ	68
V.3.1. Hostitelské specifity linií hemosporid	68
V.3.2. Diverzita linií v rámci hostitelského druhu – stanovení indexu R_{25}	72
V.4. VZTAH PREVALENCE A CHARAKTERISTIK HOSTITELSKÉHO DRUHU	75
V.4.1. Faktory ovlivňující pravděpodobnost infekce hemosporidy	75
V.4.2. Vliv hemosporid na hmotnost a reprodukční úspěch a samčí ornament	77
V.5. URČOVÁNÍ POTENCIONÁLNÍHO PŘENAŠEČE NA LOKALITĚ	79
V.5.1. Odchycené druhy hematofágních Dipter	79
V.5.2. Detekované linie hemosporid v přenašečích	80
VI.5.3. Vyšetření sentinelů	82
VI DISKUZE	84
VI.1. EPIZOOTOLOGIE PTAČÍCH HEMOSPORID HÝLA RUDÉHO	84
VI.1.1. Prevalence a diverzita linií v rámci hostitelského druhu	84
VI.1.2. Variace zastoupení linií v místě a čase	85
VI.1.3. Specifita linií jednotlivých rodů a charakteristika linií	86
VI.2. MIKROSKOPICKÁ DETEKCE KREVNÍCH PARAZITŮ A JEJÍ POROVNÁNÍ S PCR DIAGNOSTIKOU	89
VI.3. VZTAH PREVALENCE A CHARAKTERISTIK HOSTITELSKÉHO DRUHU	90
VI.3.1. Vliv prevalence na hmotnost, jejich reprodukční úspěch a ornamentaci samců	90
VI.3.2. Vliv věku, pohlaví, počtu alel <i>Mhc</i> a celkové heterozygotnosti na prevalenci	92
VI.3.3. Vliv mikroskopicky určené prevalence na charakteristiky hostitele	93
VI. 4. URČOVÁNÍ POTENCIONÁLNÍHO PŘENAŠEČE NA LOKALITĚ	94
VI.4.1. Odchycené druhy hematofágního hmyzu a selektivita odchyty	94
VI.4.2. Zachycené linie	955
VII ZÁVĚRY	98
VIII PŘÍLOHY	100
IX CITOVANÁ LITERATURA	108
IX CITOVANÁ LITERATURA	109

II ÚVOD A CÍLE PRÁCE

II.1. ÚVOD

Jako ptačí malárii označujeme parazitární onemocnění ptáků způsobované prvky ze skupiny Haemosporida, konkrétně rodem *Plasmodium*. Někdy ovšem bývají pojmem malaričtí parazité označováni i zástupci rodů *Haemoproteus* a *Leucocytozoon* (a za ptačí malárii je pak považována i symptomatická infekce těmito dvěma rody hemosporid). Takovéto široké používání pojmu ptačí malárii však již není v moderní literatuře považováno za korektní a pomalu se od něj ustupuje.

Haemosporida tvoří jednoznačně definovanou monofyletickou skupinu obligátně dixenních parazitických protist (Perkins et al. 2002, Martinsen et al. 2008), patřících do kmene Apicomplexa, u kterých se merogonie a tvorba gametocytů odehrává v obratlovčím hostiteli (známe zástupce z obojživelníků, plazů, ptáků a savců) a transformace gametocytů v gamety a sporogonie probíhá ve dvoukřídlém hmyzu (Diptera). Mezi typické znaky této skupiny patří pohyblivá zygota (tzv. ookinet), absence konoidu u zoitů a relativně malý počet samčích mikrogamet (Valkiunas 2005).

Haemosporida patří mezi nejlépe prozkoumané skupiny parazitických protist zejména proto, že tento taxon obsahuje původce lidské malárie (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* a *P. malariae*). Znalost biologie jednotlivých taxonů v rámci řádu je však značně rozdílná. Z pochopitelných důvodů se drtivá většina prací zabývá právě lidskými plasmodii, případně malým počtem dalších druhů rodu *Plasmodium*, které slouží jako modelové organismy ke studiu lidské malárie.

Početně nejvýznamnější ekologickou skupinou dle spektra hostitelů jsou Haemosporida ptáků. Velká část poznatků o jejich biologii pochází právě z dob, kdy ptačí zástupci r. *Plasmodium* hráli významnou roli jako modelový organismus ve studiu lidské malárie, což vedlo k objasnění jejich životního cyklu, vývinu chemoterapie a kultivace parazitů *in vitro*. Poté, co byly objeveny druhy plasmodií parazitující v erythrocytech drobných savců, ptačí plasmodia svoji výsadní roli modelového organismu ztratila. Avšak i nyní, když se savčí plasmodia ukázala v mnoha ohledech vhodnějším modelem ke studiu lidské malárie, ptačí plasmodia své pozice nevyklidila a v mnoha laboratořích se užívají k různým modelovým studiím dodnes. Jejich hlavním pozitivem je nízká cena experimentů, a tak jsou stále cenným modelem v imunologických a biochemických studiích a studiích o interakcích vektora a parazitů (Nagao et al. 2008).

Výše uvedená skutečnost však vedla k akumulaci poznatků hlavně o ptačích zástupcích rodu *Plasmodium* týkajících se především údajů získaných experimentálně

v laboratoři. Zástupci ostatních rodů byli detailněji zkoumáni zejména tehdy, pokud napadali a patogenně působili na hospodářsky významné druhy ptáků, tedy hlavně kurovitě a vrubozobé (Isobe et al. 1993; Ito & Gotanda 2005)

Ve své práci bych se chtěl zaměřit především na Haemosporida volně žijících pěvců (Passeriformes) a na způsob jejich přenosu hmyzími vektory. V teoretickém úvodu se pokusím shrnout jak poznatky získané tradičními metodami (vyšetření infekcí pomocí mikroskopování krevních roztěrů a pracující s konceptem morfologicky definovaných druhů) s poznatky získanými moderními molekulárními metodami, především detekcí parazitů pomocí PCR a založenými na práci s unikátními haplotypy jednotlivých linií hemosporid. Tyto metody zažily v posledních letech značný rozmach pro jejich relativní metodickou nenáročnost a dostupnost studijního materiálu (krev infikovaných ptačích hostitelů).

V praktické části se zaměřuji na výzkum ptačích hemosporid v oblastech, které byly dlouhodobě opomíjeny či zanedbávány, nebo stále zůstávají značně problematické. Mezi nejvíce opomíjená témata patří studium přenašečů. V současné době většina prací studuje molekulárními metodami prevalenci, specifitu a diverzitu parazitů u ptačích mezihostitelů a činí dalekosáhlé závěry, ale samotná prevalence v populacích přenašečů a specifita hemosporid byla studována prozatím velmi okrajově. V případě hlavních vektorů pro rod *Haemoproteus*, tiplíků rodu *Culicoides*, nejsou k dispozici žádné práce vzniklé na základě molekulárních dat (a pracující tedy s konceptem samostatné linie parazita).

Navíc je velký nedostatek komplexních studií, které by v sobě shrnovaly všechny (nebo alespoň mnohé) aspekty působení hemosporid na jejich ptačí hostitele na jedné detailně ovzorkované populaci za delší časové období a zároveň by se věnovaly jejich vektorům. Existují některé výjimky, například dlouhodobá studie na sojkách chocholatých (*Cyanocitta cristata*), provedená americkými autory, kteří se zabývali epizootologií a patologickým působením druhu *Haemoproteus danilewskyi* (Garvin & Greiner 2003a; Garvin et al. 2003). Autoři zároveň studovali i vektorovou specifitu tohoto parazita (Garvin & Greiner 2003b). Nevýhodou této studie je, že se zaměřuje jen na jeden nejhojnější morfologicky definovaný druh parazita a při studiu nebylo zároveň použito molekulárních metod ke genetické charakterizaci parazitů a ověření prevalence. Jinou komplexní studii zaměřující se na jednu konkrétní populaci a vliv parazitů na hostitele provedl Bensch et al. (2007) na populaci rákosníka velkého (*Acrocephalus arundinaceus*), bohužel však chybí jakékoliv informace o vektorech na dané lokalitě. Toto prázdné místo na poli studia ptačích hemosporid jsme se pokusili vyplnit naší studií, která si klade za cíl komplexně posoudit vliv hemosporid na malou hnízdní populaci hýla rudého a pomocí molekulárních metod zjistit i počty, prevalenci

jednotlivých linií, jejich variaci během několika let a v neposlední řadě rozšířit všechny tyto informace i o určení potencionálních vektora některých linií v místě hnízdiště.

Samotné výsledky studií o vlivu hemosporid na jednotlivé charakteristiky a kondici ptačích hostitelů jsou značně nekonzistentní. Někteří autoři na základě svých výsledků považují tyto parazity za zcela nepatogenní. Tato práce nemá ambice tuto problematiku vyřešit, ale klade si za cíl porovnat úspěšnost mikroskopického určení prevalence a PCR detekce pro vysvětlení vlivů na nejrůznější charakteristiky hostitele. Většina autorů, která se touto problematikou doposud zabývala, určovala prevalenci pouze na základě mikroskopického vyšetření krevních roztěrů. V současné době panují rozpaky nad tím, jak tyto studie interpretovat, protože se zdá, že často došlo k podhodnocení prevalence (Fallon et al. 2003; Ishtiaq et al. 2007). Bentz et al. 2007 ale ve své studii ukázal, že starší studie pracující s mikroskopickým určením prevalence, lze interpretovat ve smyslu vyšších parazitemií. Ve své studii provedl určení prevalence hemosporid u kosa černého (*Turdus merula*) pomocí mikroskopického vyšetření roztěrů a zároveň pomocí kvantitativní PCR, která umožňuje relativně přesně určit skutečnou parazitémii v krvi hostitele. Zjistil, že mikroskopické vyšetření odhalí sice podstatně méně infekcí (66 % prevalence dle mikroskopického vyšetření, 97 % dle PCR detekce), ale takto zachycené infekce spolehlivě odpovídají vyšší parazitémii zjištěné pomocí qPCR. Starší studie tedy většinou zachytily menší prevalenci, ale zachytily jako pozitivní jedince s relativně vysokou parazitémii (Bentz et al. 2007), což může mít při studiu vlivu ptačích hemosporid na některé charakteristiky ptačího hostitele větší biologický smysl než zachycení naprosté většiny všech infekcí (tedy i těch v chronickém, latentním stavu s velmi nízkou parazitémii). Je však otázkou, zda a případně kdy tyto chronické infekce přecházejí do akutní fáze a jestli nemohou hostitele ovlivňovat více než se předpokládalo. Právě tuto skutečnost bych chtěl testovat ve svojí práci pomocí modelů, které využívají jak data o prevalenci získané PCR detekcí, tak mikroskopických vyšetřeních krevních roztěrů.

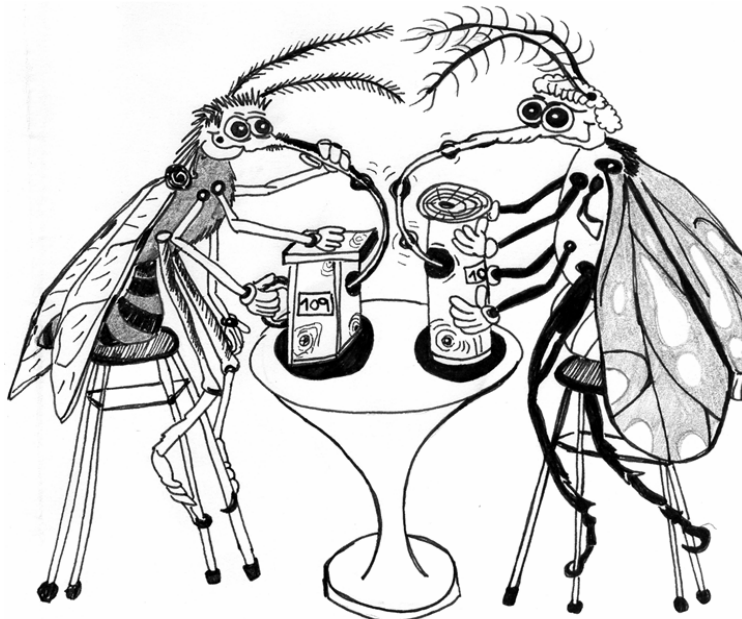
Přínosem mé diplomové práce je její komplexnost využívající unikátní data získaná týmem Tomáše Albrechta a jeho spolupracovníků ve spojení se studiem infekcí ptačími hemosporidy. Unikátní je rovněž výběr modelového hostitele hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*), který jako jeden z mála evropských pěvců zimuje v jižní Asii (viz kapitola V.2.). Všechny ostatní studie zabývající se hemosporidy u evropských migrantů pracují s ptáky, kteří táhnou do subsaharské Afriky. Hemosporida u tohoto druhu byla doposud studována velmi okrajově, pouze v rámci mnohadruhových srovnání s vyšetřením jen malého počtu jedinců a bez uvedení bližších informací o biologii hemosporid (Krizanauskiene et al 2006;

Hellgren et al 2007b). Prozatím byly zaznamenány u hýla rudého 4 linie hemosporid (hemoprotoevé ROFI1 a ROFI2 a plasmodia BT7 a SGS1).

II.2. CÍLE PRÁCE

Diplomová práce si klade za cíl:

1. získání komplexních informací o prevalenci krevních hemosporid u hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) na hnízdní lokalitě ve Vltavském luhu na Šumavě
2. určení genetických linií hemosporid (unikátních haplotypů), které daný ptačí druh napadají a vytvoření fylogenetických stromů na základě získaných dat a dat z databáze GenBank a specializované databáze MalAvi
3. porovnání metod vedoucích k určení prevalence (mikroskopování krevních roztěrů (dle Votýpka et al. 2003) a nested PCR (dle Hellgren et al. 2004) a otestování, která metoda zjišťování prevalence dává lepší výsledky v modelech testujících vliv na hostitele
4. určení vlivu parazitace na hostitele a to především ve vztahu ke kondici jedince (hmotnost), reprodukčnímu úspěchu samců (úspěch ve vnitropárových i mimopárových paternitách) i samic (velikost snůšky a počet vysezených mláďat), reprodukčním investicím (ornamentace samců) a dále určení vztahu parazitace a genetické variability hostitele (celková heterozygotnost) a počtu alel pro *Mhc I*
5. faunistický průzkum hematofágních dvoukřídlých a pokus o určení možného přenašeče krevních hemosporid v místě hnízdiště a detekce linií hemosporid pomocí PCR především u tiplíků, u nichž nebyl podobný výzkum ještě nikdy proveden.



III LITERÁRNÍ PŘEHLED

III.1. HOSTITELSKÁ SPECIFITA, IDENTIFIKACE A DIVERZITA PTAČÍCH HEMOSPORID

V průběhu 20. století se formovaly dva extrémní názory na hostitelskou specifitu ptačích hemosporid. První názor zastával striktní hostitelskou specifitu jednotlivých druhů. S každým nálezem v novém druhu ptačího hostitele byl tedy popsán nový druh parazita. Druhý extrémní přístup shrnoval do jednoho druhu i organismy morfologicky lehce odlišné a zastával minimální hostitelskou specifitu hemosporid. Současní autoři uznávají určitou hostitelskou specifitu, ale druhy hemosporid z více hostitelských druhů ptáků, které nevykazovaly žádné morfologické rozdíly a nelišily se výrazně ani v molekulárních znacích (viz níže), byly shrnuty pod jeden druh. K roku 2005 bylo za validní považováno 132 druhů rodu *Haemoproteus* (zredukováno z původních 280 druhů), 35 druhů rodu *Leucocytozoon* (z původně 143 druhů) a 38 druhů rodu *Plasmodium* (z původních 89) parazitujících u ptáků (Valkiunas, 2005).

V současné době je platná taxonomie založena především na morfologii stádií z periferní krve ptáků, stádiích z vektorů a na datech o životních cyklech z experimentálních nákaz v laboratoři. S rozvojem molekulárních metod v posledních letech se ale ukazuje, že si i tento systém postupně vyžádá rozsáhlé revize.

Ukazuje se, že i v rámci uznaných platných druhů hemosporid existuje množství kryptických druhů, které se dají rozlišit pouze s pomocí molekulárně biologických metod. Rozdíl v sekvenci genu pro cytochrom *b* u druhu *Leucocytozoon ziemanni* ze sov byl 10 %, což zdaleka přesahuje hranici prozatímne stanovenou pro rozlišení druhů (Sehnal et al. 2006). Pomocí porovnání sekvencí morfologicky definovaných druhů a následných fylogenetických analýz stanovil Hellgren et al. (2007a) u ptačích hemosporid bezpečnou hranici pro odlišení druhů na 5 % záměn v sekvencích genu pro cytochrom *b*. Rozdíl 5 % v sekvencích by měl zaručovat, že takto definované druhy budou představovat již velmi dlouhou dobu oddělené, evolučně samostatné entity (Hellgren et al. 2007a; Valkiunas et al. 2007a). U sekvencí genu pro cytochrom *b* u ptáků bylo zjištěno, že k 2 % divergenci sekvencí dojde přibližně za milion let (Lovette 2004). Předpokládá se, že k akumulaci záměn v cytochromu *b* ptačích hemosporid dochází asi třikrát pomaleji než v sekvencích cytochrom *b* jejich ptačích hostitelů, což by odpovídalo 0,67 % divergenci za milion let (Ricklefs & Fallon 2002). Na linie hemosporid lišící se 5 % záměn můžeme tedy nahlížet jako na samostatné druhy přestože nevykazují výrazné morfologické rozdíly. To, že hranice 5 % je rozhodně postačující a zřejmě dokonce nadhodnocená pro Hemosporida obecně, podporuje i uznání lidského *Plasmodium*

falciparum a *P. reichenowi* z šimpanze za dva samostatné druhy, které se však liší pouze 3,3 % záměn v cytochromu *b* a jejich oddělení se odhaduje na dobu před 4 – 4,75 miliony let (Escalante et al. 1998).

Hranici 5 % záměn k rozlišení dvou druhů hemosporid byla podpořena také experimentálně, v pokusech s hybridizací hemosporid *in vitro*. Bylo zjištěno, že morfologicky definované druhy rodu *Haemoproteus* s procentem záměn v genu pro cytochrom *b* větším než 5 % se nejsou schopny křížit (Valkiunas 2008b).

S využíváním cytochromu *b* pro barcoding ptačích hemosporid se nabízí otázka, jak je právě tento mitochondriální gen pro účely definování jednotlivých linií vhodný. Na tuto otázku se pokusil odpovědět Bensch et al. (2004), který zjistil, že unikátní sekvence genu pro cytochrom *b* se pojí vždy i s unikátní linií rychle se vyvíjecího jaderného genu pro dihydrofolát reduktázu – thymidilát syntázu (DHFR-TS). Variabilita v sekvencích cytochromu *b* tedy velmi pravděpodobně odráží i celkovou variabilitu v genomech jednotlivých parazitů (Bensch et al. 2004; Hellgren et al. 2007a; Valkiunas et al. 2007a).

V následujících kapitolách jsou rozebrány obecné principy a příklady hostitelské specifity u jednotlivých hemosporid se zaměřením na práce jak starší, pracující striktně s morfologickým určením druhů, tak nové práce pracující především s jednotlivými haplotypy unikátních linií.

III.1.1. Hostitelská specifita druhů rodu *Plasmodium*

III.1.1.1. Specifita rodu *Plasmodium* u mezihostitelů – ptáků

Na základě tradiční taxonomie byly druhy rodu *Plasmodium* považovány za generalisty s minimální hostitelskou specifitou a specifické nanejvýš v rámci čeledi hostitele (Valkiunas 2005). Studie z posledních let využívající molekulární techniky při detekci a identifikaci parazitů však odhalily poněkud složitější situaci.

Většina molekulárních studií podporuje relativně nízkou specifitu parazitů rodu *Plasmodium* s tím, že nepracuje s konceptem druhu, ale s konceptem unikátní linie (unikátního haplotypu) genu pro cytochrom *b*. Waldenstrom et al. (2002) zjistili, že mnoho linií ptačích plasmodií parazituje u zástupců různých ptačích rodů, často i čeledí. Podobná data uvádějí i autoři dalších molekulárních studií (Krizanauskiene et al. 2006; Hellgren et al. 2007b; Krizanauskiene et al. 2006; Beadell et al. 2009). Méně často nalezneme v rámci rodu *Plasmodium* linie, které se prozatím zdají být striktně hostitelsky specifické (Ishtiaq et al. 2007; Beadell et al. 2009), naopak známe poměrně velký počet linií, které jsou naprostými generalisty a byly potvrzeny z obrovského počtu studovaných hostitelských druhů někdy

patřících i do různých řádů. Například linie SGS1 druhu *Plasmodium relictum* napadá dle současných znalostí více jak 30 druhů hostitelů z 11 čeledí dvou řádů ptačích hostitelů; linie GWR04 (patřící ke stejnému druhu) je sice specifická pro pěvce (Passeriformes), ale parazituje ve 45 druzích ze 14 čeledí. I linie některých jiných morfologických druhů vykazují nízkou hostitelskou specifitu: linie TURDUS1 druhu *P. circumflexum* byla doposud nalezena v 8 čeledích dvou řádů a linie GWR06 reprezentující druh *P. elongatum* dokonce ve 13 čeledích pěti ptačích řádů (Bensch et al. 2009)

III.1.1.2. Vektorová specifita rodu *Plasmodium* a diverzita linií v rámci jednoho druhu vektora

Specifita v rámci přenašečů je u rodu *Plasmodium* omezena na čeleď komárovití (Culicidae). Většina druhů plasmodií se vyvíjí v řadě druhů a dokonce rodů komárů. Například častý parazit pěvců *Plasmodium relictum* dokončí svůj vývoj asi ve dvaceti druzích komárů patřících do rodů *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres*, *Culex*, *Culiseta* a *Mansonia* (Hunninen 1953; Work et al. 1990; La Pointe et al. 2005).

Vektorová specifita pro jednotlivé unikátní linie ptačích hemosporid byla zatím zkoumána velmi zřídka. Možnost přenosu jedné unikátní linie rodu *Plasmodium* více rody komárů (*Aedes* a *Lutzia*) naznačuje ve své práci Ejiri et al. (2008). V této práci rovněž uvádí možnost přenosu více samostatných linií plasmodií jedním druhem komára (*Culex quinquefasciatus*). Studie byla provedena na malém ostrově u pobřeží Japonska, kde průměrná prevalence plasmodií u komárů dosahovala 1,1 %.

Pouze nenasáté samice nebo samice komárů s oddělenými zadečky studovala Kimura (2008) na východě USA. Zjistila, že některé linie rodu *Plasmodium* se vyskytují v různých druzích komárů (*Culex pipiens*, *C. restuans*), některé dokonce v různých rodech (*Culex*, *Aedes*). Velice časté byly i případy, kdy jeden druh vektora hostil různé linie parazitů (*Culex pipiens* 11 linií, *C. restuans* 8 linií).

Ishtiaq et al. (2008) analyzovali ve studii z Nové Kaledonie 804 nenasátých samic náležících ke 14 druhům. Identické linie plasmodií byly nalezeny u komárů až 10 druhů patřících do čtyř rodů.

Zmíněné studie ukazují na často malou hostitelskou specifitu plasmodií na úrovni jednotlivých linií. Všechny výsledky však byly získány na základě PCR analýz, k ověření konkrétních životních cyklů parazitů a přenosu jednotlivých linií je nutné tyto výsledky definitivně potvrdit experimentálním přenosem v laboratoři (Ishtiaq 2008).

III.1.2. Hostitelská specifita druhů rodu *Haemoproteus*

III.1.2.1. Specifita rodu *Haemoproteus* u meziphostitelů – ptáků

Analýzou experimentálních dat stanovili někteří autoři (Bennett et al. 1972) hostitelskou specifitu jednotlivých morfologicky definovaných druhů na úroveň ptačích čeledí. U některých dobře definovaných morfologických druhů se ale zdá, že specifita sahá pouze po úroveň ptačích řádů. Roli zde samozřejmě hraje jak příbuznost hostitelských čeledí, tak i jejich vymezení, které je pouze relativní. V současné době existuje shoda, že jednotlivé linie hemoproteů (nerozlišitelné na základě morfologie gametocytů) parazitující ve stejném řádu ptáků a s počtem záměn v cytochromu *b* menším jak 5 % považujeme za jeden druh. Morfologicky shodné (nebo podobné) kmeny, jež infikují více řádů ptáků, případně se liší ve více než 5 % sekvence genu pro cyt *b* považujeme za samostatné druhy (Hellgren et al. 2007a). Tento princip je uplatňován především z praktických důvodů, protože změny v systému ptáků při uvažované striktní hostitelské specifitě na úrovni čeledí obvykle následovaly také změny v systému hemoproteů. Zmatky v tradičním taxonomickém systému přineslo i zjištění, že různé druhy rodu *Haemoproteus* mají různě širokou hostitelskou specifitu. Existují striktně specifické druhy, druhy specifické v rámci různých taxonomických jednotek jako je rod a čeleď a výjimečně jsou některé druhy specifické pouze v rámci řádu (Valkiunas, 2005).

Více světla do této problematiky jistě vnesou rutinní aplikace molekulárních metod ve studiu hemoproteů, které si zřejmě vyžádají ustanovení nových a naopak zrušení některých stávajících druhů. Příkladem využití molekulárních technik při odhalení kryptických druhů je studie, kterou provedl Valkiunas et al. (2007a). Byly studovány linie patřící do morfologicky definovaného druhu *Haemoproteus belopolskyi*, u kterých nebylo možné nalézt žádné morfologické rozdíly a procento záměn mezi jednotlivými liniemi se pohybovalo mezi 2,8 až 3,9 % a u těchto linií. Jedna monofyletická skupina linií se však od ostatních lišila až o 8,1 % a při bližším studiu byly nalezeny prokazatelné rozdíly ve velikosti jádra těchto parazitů, což vedlo k popisu nového, morfologicky jasně definovaného druhu *Haemoproteus parabelopolskyi*.

Využívání primární informace o odlišnosti genetických linií v taxonomii (k popisu doposud kryptických druhů) podporuje zejména přiřazování jednotlivých haplotypů k popsáným, morfologicky definovaným druhům (Hellgren et al. 2007a; Valkiunas et al. 2007b; Palinauskas et al. 2007; Valkiunas et al. 2008a). I přes snahu mnoha autorů je k dnešnímu dni (30. 3. 2009) z více jak 850 unikátních haplotypů hemosporid propojena s morfologicky definovanými druhy méně než desetina (Bensch et al. 2009)

Některé molekulární studie naznačují minimálně u části linií hemoproteů méně striktní hostitelskou specifitu než jakou by bylo možno očekávat na základě morfospecies (jednotlivé morfologicky podložené druhy většinou zahrnují několik linií, a tedy i více hostitelů). Několikrát bylo prokázáno, že jedna linie parazita (většinou zatím nepřirazeného ke konkrétnímu popsanému druhu) napadá hostitele patřícího do různých čeledí. Například Fallon et al. (2005) zaznamenali jeden haplotyp druhu *Haemoproteus* sp. v zástupcích tří čeledí pěvců banakitovitých (Coerebidae), strnadovitých (Emberizidae) a zelenáčkovitých (Vireonidae). K podobným závěrům došli i další vědci u jiných linií hemoproteů (Beadell et al. 2004; Szymanski & Lovette 2005). Autoři však neprováděli současně s PCR i mikroskopickou detekci parazitů. Není tedy jisté, zda se v krvi zkoumaných ptáků nacházely gametocyty parazitů dokazující schopnost příslušného ptačího druhu sloužit jako hostitele. PCR diagnostika je totiž natolik citlivá, že je někdy schopna detekovat i sporozoity, kteří byli vektorem vpraveni do krve ptáka, ale dále se v něm nevyvíjí (Krizanauskiene et al. 2006). Mikroskopická kontrola krevních roztěrů spolu s PCR diagnostikou byla provedena ve studii, kdy autoři na základě morfologie přiřadili získanou sekvenci ke konkrétnímu druhu. Jedna linie druhu *Haemoproteus majoris* byla nalezena v krvi pěvců patřících do čtyř čeledí: pěnicovití (Sylviidae), sýkorovití (Paridae), lejskovití (Muscicapidae) a pěnkavovití (Fringillidae) (Krizanauskiene et al. 2006).

III.1.2.2. Vektorová specifita rodu *Haemoproteus*

Přenašeči hemoproteů patří do čeledí Ceratopogonidae (rod *Culicoides* – tiplíci) a Hippoboscidae (kloši). Role klošů jako vektorů hraje významnou roli hlavně u hemoproteů parazitujících u ptáků čeledi měkkozobí (Columbidae). U ostatních řádů jsou vektory převážně tiplíci. Přenos na pěvce byl doposud prokázán pouze prostřednictvím tiplíků (*Culicoides* spp.). Studie zabývající se jejich rolí jako přenašečů hemoproteů byly prováděny především v USA a Kanadě. Prevalence hemoproteů v populaci vektorů je většinou velmi nízká, odpovídá však prevalenci ostatních protozoálních parazitů přenášených členovci. Na dvou vzájemně izolovaných lokalitách na Floridě byla prokázána prevalence infikovaných samic tiplíků v rozmezí od 0,6 do 2,1 % (Atkinson 1988).

Druhy hemoproteů, jež byly ve vztahu parazit-vektor nejvíce studovány, využívají za přenašeče větší počet druhů. Např. *H. mansonii* úspěšně ukončí svůj vývoj v tiplících několika druhů: *Culicoides arboricola*, *C. edeni*, *C. haematopotus*, *C. hinmani*, *C. knowltoni* a *C. shagnumensis*. V jiných druzích – *C. baueri*, *C. nanus*, *C. paraensis* a *C. scanloni* – se vývoj zastaví ve stadiu oocysty (Atkinson 1991). Jedna z posledních studií prokázala, že jako vektor *H. danilewskyi* parazitující v sojce chocholaté (*Cyanocitta cristata*) může na Floridě sloužit

rovněž několik druhů tiplíků – jmenovitě *Culicoides arboricola*, *C. edeni*, *C. knowltoni*, *C. stellifer* a *C. beckae* (Garvin a Greiner 2003).

Opačný příklad, kdy se v jednom druhu tiplíka (*C. impuctatus*) může vyvíjet až pět druhů rodu *Haemoproteus*, byl zaznamenán v jiné studii. Valkiunas et al. (2002) prokázali, že daný tiplík slouží jako vektor druhu *H. fringillae* a že je schopen přenášet i druhy *H. balmorali* (z lejska šedého – *Muscicapa striata*), *H. dolniki* (z pěnkavy obecné – *Fringilla coelebs*) a *H. tartakovskyi* (z křivky obecné – *Loxia curvirostra*). Nakonec potvrdili stejného tiplíka i jako přenašeče druhu *H. belopolskyi* z pěnice černohlavé (*Sylvia atricapilla*) (Valkiunas & Iezhova 2004a).

Molekulárními metodami na úrovni genetických linií přenášených hemoproteů nebyli zatím tiplíci studováni.

III.1.3. Hostitelská specifita a identifikace druhů rodu *Leucocytozoon*

III.1.3.1. Specifita rodu *Leucocytozoon* u mezihostitelů – ptáků

Při identifikaci druhů rodu *Leucocytozoon* narážíme na podobný problém jako u zástupců rodu *Haemoproteus* – parazitémie u volně žijících ptáků jsou většinou velmi nízké a pro tradiční metodu určování pod mikroskopem potřebujeme vyhledat gametocyty v periferní krvi. Gametocyty leukocytozoonů jsou navíc náchylné k poškození a deformacím v průběhu přípravy krevních roztěrů. Oproti rodům *Haemoproteus* a *Plasmodium* máme k dispozici méně charakteristických morfologických struktur, které by mohly sloužit k identifikaci druhu, a tím se snižuje pravděpodobnost rozlišení dvou samostatných druhů při mikroskopickém určování (Valkiunas et al. 2008c). To vede k vyšší pravděpodobnosti výskytu kryptických druhů v rámci tohoto rodu (Seghal et al. 2006).

Možná i díky tomuto zkreslení nejsou k dispozici žádná věrohodná data o výskytu jednoznačně definovaného druhu rodu *Leucocytozoon* u ptáků z více řádů a proto je tento rod tradičně považován za nejvíce hostitelsky specifický v rámci všech hemosporid. Známe samozřejmě výjimky, kdy parazit infikuje zástupce různých čeledí ze stejného řádu. Například sporozoiti *Leucocytozoon fringillinarum* úspěšně infikovali pěvce ze tří čeledí (vlhovcovití – Icteridae, strnadovití – Emberizidae a astrildovití – Estrildidae) (Valkiunas 2005).

Většina druhů leukocytozoonů se vyznačuje užší hostitelskou specifitou, kdy určitý druh parazita napadá pouze hostitele v rámci jednoho rodu či dokonce druhu. Příkladem může být *L. sakharoffi* z krkavce velkého (*Corvus corax*) a vrány americké (*C. brachyrhynchos*, Corvidae), který již není schopen napadat sojku chocholatou (*Cyanocitta cristata*) ze stejné

čeledi (Khan & Fallis 1971). Striktní hostitelská specifita se vyskytuje například u druhu *L. caulleryi* z kura domácího (*Gallus gallus*), který nebyl doposud zaznamenán v žádném jiném ptačím druhu (Morii 1992).

Avšak právě nedostatek morfologických struktur gametocytů a častý výskyt kryptických druhů povede zřejmě v budoucnosti k přehodnocení druhové diverzity a hostitelské specifity s využitím molekulárních metod. Některé kryptické druhy již byly odhaleny ve studii zaměřené na druh *Leucocytozoon toddi*. Morfologicky shodné linie parazitů z káňat (*Buteo* spp.) a jestřábů (*Accipiter* spp.) se lišily v sekvenci genu pro cytochrom *b* až o 10 % (Sehnal et al. 2006). Podobných studií ale dosud není příliš mnoho, protože většina autorů ve svých studiích opomíjí rod *Leucocytozoon* kvůli větší náročnosti PCR protokolů zachycujících infekci všemi rody. Tato skutečnost vnáší do molekulárních studií zabývajících se diverzitou a hostitelskou specifitou hemosporid značnou nerovnoměrnost.

III.1.3.2. Vektorová specifita rodu *Leucocytozoon* a diverzita linií v rámci jednoho druhu vektora

Jednotlivé druhy leukocytozoonů využívají jako přenašeče různé druhy muchniček (Simuliidae). Většina druhů je přenášena muchničkami rodu *Simulium* a *Eusimulium*, rody *Cephia* a *Prosimulium* slouží jako přenašeči u menšího počtu dosud studovaných druhů. Většina druhů muchniček může sloužit jako vektor více druhů leukocytozoonů. Například druhy *Leucocytozoon danilewskyi*, *L. dubreuilii*, *L. fringillinarum*, *L. lovati* a *L. sakharoffi* úspěšně dokončili svůj vývoj v *Simulium aureum* i *Eusimulium latipes* (Valkiunas 2005). Vektorem se při experimentálních nálezích mohou stát i muchničky, které běžně na ptácích nesají. Bariéry vývoje leukocytozoonů v jednotlivých druzích muchniček nejsou tedy fyziologické, ale spíše ekologické (Desser & Yang 1973; Sato et al. 2009).

Jeden druh rodu *Leucocytozoon* (*L. caulleryi*), který však u pěvců nebyl zaznamenán je přenášěn i tiplíky rodu *Culicoides* (tento Morii 1992). Tento druh ale nebyl zaznamenán u pěvců (Mori 1992). Leukocytozoon patří do samostatného podrodu *Akiba* (Bennett et al. 1965).

Jedinou studii zabývajících se vektorovou specifitou parazitů rodu *Leucocytozoon* na úrovni genetických linií publikoval Sato et al. (2009). Autoři zjistili identickou linii *Leucocytozoon* sp. (odpovídající morfologickému druhu *L. lovati*) u tří druhů muchniček dvou rodů (*Simulium japonicum*, *S. uchidai* a *Prosimulium hirtipes*).

Roli ve specifitě vztahu parazit-vektor hraje především potravní specializace muchniček a jejich vertikální distribuce v biotopu při shánění potravy. Mamalofilní

muchničky mohou být tedy ekologicky izolované od ornitofilních a muchničky sající v korunách stromů mají omezenou možnost stát se vektory parazitů pozemních ptáků. Všechny tyto faktory mají velký epidemiologický význam (Černý 2006).

III.1.4. Diverzita linií hemosporid v jednom hostitelském druhu ptáka

Rozsáhlejší studie zaměřené na určitý ptačí druh často prokazují větší počet linií hemosporid. Při kombinaci data několika studií se počty linií pro daný druh hostitele zvyšují a částečně odráží i geografickou variabilitu v rozšíření jednotlivých, striktně specifických i generalistických linií. Pokud studujeme jedince odchycené na rozsáhlém území, bude pravděpodobně nalezen u stejného počtu jedinců i vyšší počet linií než na území malém. Počet linií na dané lokalitě je tedy dán součtem generalistických linií, které infikují mnoho hostitelských druhů a počtem linií unikátních pro daného hostitele (se striktní hostitelskou specifitou) na dané lokalitě. Počet linií samozřejmě stoupá se zvětšujícím se vzorkem studovaných jedinců (Pérez-Tris et al. 2007).

Jako příklad uvádím několik studií hostitelských ptačích druhů s počty zaznamenaných linií a s celkovou prevalencí jednotlivých hemosporid. U příkladů se zaměřuji především na pěvce, ostatní ptačí řady např. sokolovití dravci (Falconiformes) či sovy (Strigiformes) vykazují výrazně nižší počty linií, a to i u srovnatelně velkého vzorku (Ortego et al. 2008; Krone et al. 2008). Studie se poměrně často zabývají pouze rody *Plasmodium* a *Haemoproteus*, zatímco rod *Leucocytozoon* opomíjí. Tato disproporce je dána tím, že většina autorů používá PCR protokoly, které neumožňují detekci parazitů rodu *Leucocytozoon*.

V následující tabulce shrnuji výsledky studií zabývajících se jedním hostitelským druhem pěvce. Uveden je druh hostitele, celkový počet jedinců ve studii, území, kde byly sbírány vzorky, počet linií jednotlivých rodů, prevalenci pro daný rod a citaci studie. Informace o území informuje, zda se jednalo o studii na mnoha populacích náhodně odchycených jedinců na rozsáhlém území (naprostá většina studií) nebo pouze jedné populace z malého území (těch je zatím velmi málo).

Tab. 1: Tabulka studií zaměřených na výskyt rodů *Plasmodium* (P), *Haemoproteus* (H) a *Leucocytozoon* (L) u jednoho hostitelského ptačího druhu.

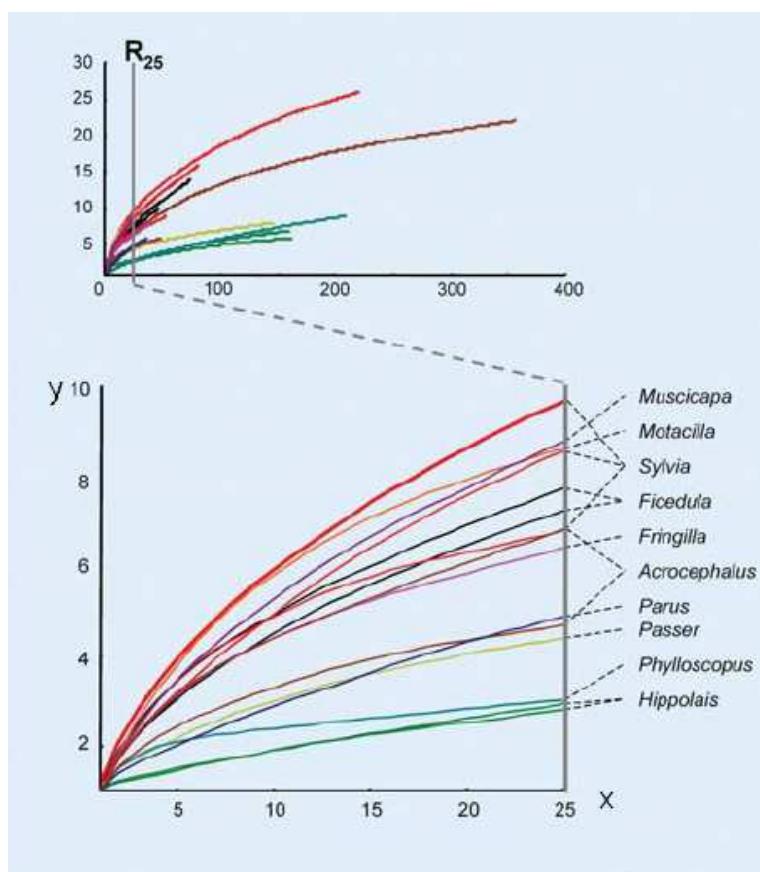
hostitel	území a počet jedinců ^a	P ^b	H	L ^c	citace
lesňáček žlutohrdlý (<i>Geothlypis trichas</i>)	mnoho populací z východu USA, jižní Kanady a Baham (552)	13 (43 %)	3 (3 %)	2 (<1 %)	Pegenkopp et al. 2008
lesňáček lejskovitý (<i>Setophaga ruticilla</i>)	mnoho populací z východu USA a jižní Kanady (437)	10 (11 %)	15 (17 %)	NA	Durrant et al. 2008
hýl mexický (<i>Carpodacus mexicanus</i>)	8 lokalit náhodně rozmístěných po pevninské části USA (490)	3 (33 %)	2 (9 %)	NA	Kimura et al. 2006
pěnice černohlavá (<i>Sylvia atricapilla</i>)	mnoho lokalit z celé západní Evropy (361)	4 (8 %)	20 (39 %)	NA	Perez-Tris & Bensch 2005a
slavík modráček (<i>Luscinia svecica</i>)	několik lokalit ve středním a jižním Švédsku (86)	8 (24 %)	1 (1 %)	5 (48 %)	Hellgren et al. 2004
budníček větší (<i>Phylloscopus trochilus</i>)	41 lokalit o celém Švédsku (556)	2 (<1 %)	2 (23 %)	NA	Bensch & Akesson 2003
sýkora modřinka (<i>Cyanistes caeruleus</i>)	jedna populace v jižní Anglii (997)	8 (28 %)	3 (1 %)	NA	Wood et al. 2007
rákosník velký (<i>Acrocephalus arundinaceus</i>)	jedna populace ve středním Švédsku (470)	10 (28 %)	8 (22 %)	NA	Bensch et al. 2007

^a číslo v závorce udává počet studovaných jedinců; ^b počet genetických linií příslušného rodu parazitů, v závorce je uvedena celková prevalence pro daný rod; ^c NA – ve studii chybí informace

Na základě srovnání velkého počtu studií bylo prokázáno, že čím více linií daný druh ptáka hostí, tím větší je i celková prevalence všech hemosporid (Arriero & Moller 2008).

Zajímavou a velmi rozsáhlou studii týkající se počtu linií provedl Perez- Tris et al. 2007. Spolu s dalšími autory shromáždil a analyzoval obrovské množství vzorků ptáků(4470) náležící 47 druhům. Celkem našli 45 linií rodu *Plasmodium* a 92 linií rodu *Haemoproteus* (s rodem *Leucocytozoon* nepracovali). Pro každý druh určil celkový počet linií a počet linií specifických pouze pro daný druh. Pro druhy s velkým počtem studovaných jedinců vypočítal tzv. R₂₅ index počtu linií (viz graf 1.). R₂₅ index vyjadřuje počet linií u 25 náhodně zvolených jedinců analyzovaného druhu. Tento index umožňuje omezit vliv extrémně vzácných linií

parazitů a samozřejmě ošetřuje vliv velikosti vzorků od různých druhů hostitelů. Z analyzovaných druhů uvádím několik příkladů u druhů s největším vzorkem jedinců zahrnutých do analýzy. Nejvyšší počet linií (26) byl zaznamenán u 415 jedinců pěnic černohlavých (*Sylvia atricapilla*), z nichž bylo 73,1 % specifických pro tento druh (také nejvíce ze všech studovaných druhů). Index R_{25} dosahoval hodnoty 9,6 linií na 25 náhodných jedinců (opět nejvyšší hodnota). Ačkoli ostatní druhy pěnic měly o něco nižší celkové počty linií a výrazně nižší počet exkluzivních linií, indexy R_{25} byly podobné. Největší počet jedinců zahrnutých do analýzy byl u druhu budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*), a to 943 jedinců, kteří však hostili pouze 9 linií, z toho 3 byli pro tento druh unikátní, nízký byl i R_{25} index, a to 3,0. 858 jedinců rákosníka velkého (*Acrocephalus arundinaceus*) hostilo 22 linií hemosporid, 31,8 % jich bylo specifických pro tento druh a index R_{25} dosahoval hodnoty 6,8. 232 jedinců vrabce domácího hostilo 6 linií, exkluzivních byly jen 2 a index R_{25} dosahoval hodnoty pouze 4,4 (Perez- Tris et al. 2007).



Graf 1. Graf zobrazuje index R_{25} u vybraných druhů ptáků, na ose x je vyneseno počet vyšetřovaných jedinců a na ose y je kumulativní počet linií ptačích hemosporid (upraveno dle Perez-Tris et al. 2007)

III.2. VÝVOJOVÉ CYKLY A ZPŮSOB PŘENOSU PTAČÍCH HAEMOSPORID

Vývojové cykly všech hemosporid jsou obligátně heteroxenní a často velmi komplikované. Během vývoje mění parazit hostitele, způsoby reprodukce a vytváří různá morfologicky odlišná stadia. Jako hostitelé slouží dvě skupiny organismů: (i) obratlovci, kteří slouží jako meziphostitelé, ve kterých probíhá nepohlavní množení a (ii) krev sající dvoukřídla (Diptera), kteří slouží jako přenašeči a zároveň jako definitivní hostitelé, v nichž probíhá pohlavní množení parazita.

Přenašeč během sání na obratlovci inokuluje do jeho krve spolu se slinami i sporozoity, kteří invadují do fixních tkání hostitele a dávají vznik exoerytrocytárním merontům (schizontům). Tato stadia se asexuálně množí (merogonie = schizogonie) a vzniká několik generací merozoitů, jež představují asexuální stadia určené k distribuci po organismu hostitele. Exoerytrocytární merozoiti vstupují buď do dalších merogonií (ve fixních tkáních nebo v krevních buňkách) nebo dávají vznik sexuálním stádiím (samičím makrogametocytům a samčím mikrogametocytům) v krvinkách.

Gametocyty jsou infekční stadia pro vektory a v jejich střevě produkují gamety (gametogeneze). Impulsem pro gametogenezi jsou změny v koncentraci O_2 a CO_2 v nasáté krvi. Makrogametocyt dává vznik oválné, nepohyblivé samičí makrogametě. Mikrogametocyt produkuje procesem zvaným exflagelace osm nitkovitých pohyblivých samčích mikrogamet. Gamety spolu v lumen střeva vektora kopulují a vzniká zygota, která se záhy mění na pohyblivý ookinet. Ookinet penetruje peritrofickou membránu (nebo uniká ze střevního prostoru ještě před její tvorbou) a proniká stěnou střeva. Na jeho vnější straně, pod bazální laminou, se transformuje na oocystu. V ní probíhá sporogonie, jejímž výsledkem je vytvoření mnoha podlouhlých sporozoitů. Ze zralé oocysty se sporozoiti uvolňují do hemocélu a aktivně pronikají do slinných žláz vektora. Sporozoiti jsou infekční stadia pro obratlovčí hostitele. S výjimkou stadia zygoty jsou Haemosporida ve všech fázích vývoje haploidní a redukční dělení probíhá na počátku vývoje ookinetu (Valkiunas 2005).

V obratlovčím hostiteli můžeme rozlišit několik fází infekce hemosporidy. Během počáteční prepatentní fáze dochází k vývoji mimo krev, zatímco akutní fáze je charakterizována objevením se parazitů v krvi a rychlým vzestupem parazitémie. Pro hostitele následuje kritická fáze, kdy parazitémie dosahuje svého vrcholu. Po odeznění příznaků onemocnění vstupuje infekce do chronické fáze, která je charakteristická velmi nízkou parazitémií (minimem parazitů v periferní krvi) a může přejít až do latentní fáze, kdy parazit kompletně vymizí z periferní krve, ale stále ještě přežívá v endotelu, jaterním parenchymu či v jiných tkáních. V případě ptáků však parazité v krvi obvykle v malých hustotách zůstávají

po dlouhou dobu. Jednou infikovaný pták se parazitů do konce života většinou již nezbaví a v benigní chronické fázi je pak vhodným zdrojem infekce (Valkiunas 2005). Typické jsou pro ptačí hemosporida také relapsy infekcí, kdy dochází k pravidelnému nárůstu parazitémie, nejčastěji v souvislosti s obdobím hnízdění. Při relapsu dojde k určitému navýšení počtu parazitů v periferní krvi dospělce, a tím i ke zvýšení pravděpodobnosti přenosu infekce na novou generaci ptáků. V průběhu infekce může docházet i k nepravidelným rekrudescencím, což je zvýšení parazitémie během chronické či latentní fáze v důsledku oslabení imunity hostitele (Bennett et al. 1993).

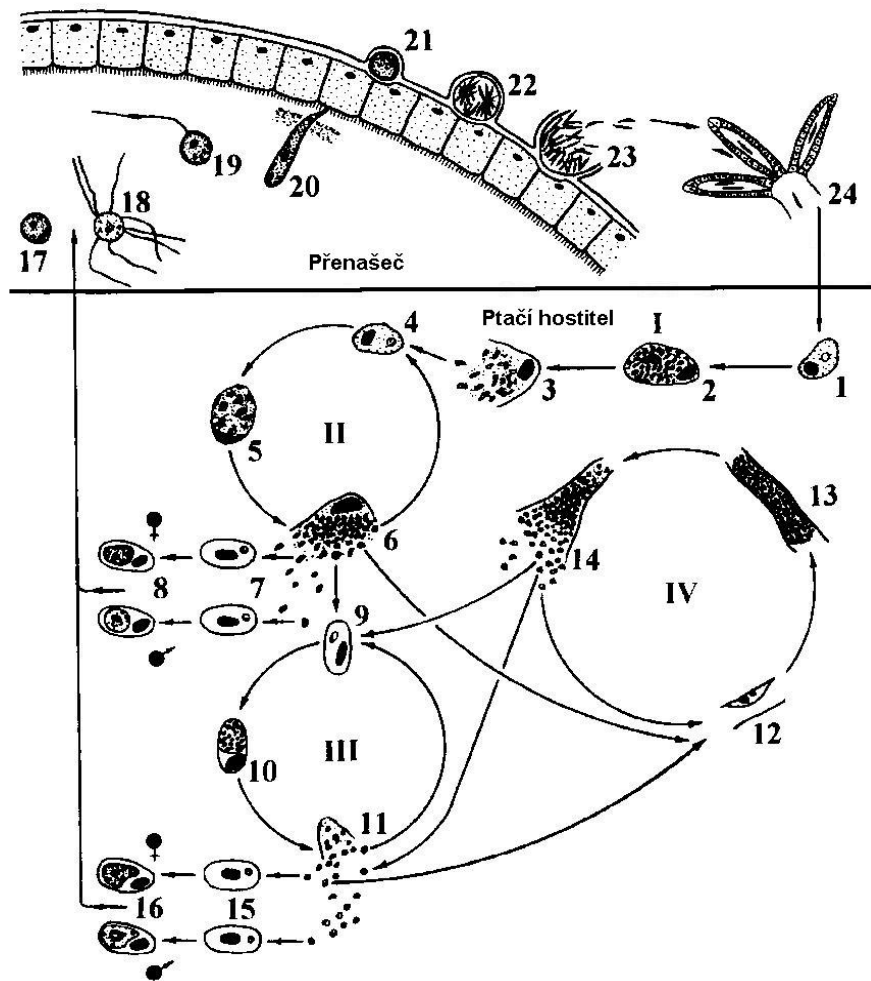
III.2.1. Vývojový cyklus zástupců rodu *Plasmodium*

III.2.1.1. Vývoj v ptačím hostiteli

Vývoj v ptačím hostiteli můžeme rozdělit na tři fáze: exoerytrocytární merogonii, erytrocytární merogonii a tvorbu gametocytů (viz obr. 1.). Exoerytrocytární merogonii dále dělíme na primární (preerytrocytární) a sekundární (posterytrocytární). Primární fáze se skládá ze dvou generací merontů – nazývaných kryptozoiti a metakryptozoiti. Během sekundární merogonie dochází k tvorbě několika generací merontů – fanerozoitů. Sporozoiti injikovaní do krve invadují do různých fixních tkání (nejčastěji do sleziny) a vytvářejí tu první generaci exoerytrocytárních merontů (kryptozoiti). Kryptozoiti dávají vznik asi stovce merozoitů, kteří ještě nemohou infikovat erytrocyty. Napadají makrofágy v orgánech a transformují se v metakryptozoity (v druhou generaci primárních exoerytrocytárních merontů). Metakryptozoiti produkují velké množství merozoitů, kteří jsou již schopni napadat erytrocyty. Čas od inokulace sporozoitů po maturaci první generace metakryptozoitů odpovídá prepatentní periodě a trvá asi 5 dní (Valkiunas 2005).

Merozoiti v erytrocytech vytvářejí další asexuálně se množící stádia, nebo dávají vznik gametocytům. Nepohlavní množení merozoitů probíhá jak v mladých, tak ve vyzrálých erytrocytech. Parazit se stává kulovitým a vzniká tzv. trofozoit. Někdy mladý trofozoit obsahuje velkou vakuolu a excentricky uložené jádro, této fázi se říká „prstýnek“. Během dospívání trofozoitu se mění jeho tvar. Od okamžiku, kdy se trofozoit poprvé v buňce rozdělí, se mu říká erytrocytární meront. Jejich počet v napadeném erytrocytu je hlavním znakem k mikroskopické identifikaci druhu. Dalším určovacím znakem jsou granula hemozoinu – jejich počet, barva a tvar se u různých druhů mění. Doba trvání exoerytrocytární merogonie je opět u různých druhů proměnlivá. Jeden cyklus u většiny druhů ptačích plasmodií trvá od 24 do 36 hodin a cyklů může proběhnout různé množství. Část merozoitů vzniklých z erytrocytárních merontů napadá další erytrocyty, část se mění na gametocyty a zbylí merozoiti penetrují do

endoteliálních buněk kapilár, kde iniciují vznik fanerozoitů (sekundárních merontů). Fanerozoiti dále produkují merozoity, schopné napadat krevní buňky. Maturace první generace fanerozoitů obvykle časově odpovídá prudkému zvýšení parazitémie v krvi hostitele. Po odeznění akutní fáze infekce, fanerozoiti společně s erythrocytárními meronty produkují malé množství merozoitů a jsou tak odpovědni za nízký stav parazitémie v průběhu chronické fáze infekce (Valkiunas 2005).



Obr. 1. Životní cyklus rodu *Plasmodium* (na příkladu ptačího plasmodia *P. relictum*): I, II – primární exoerythrocytární merogonie; III – erythrocytární merogonie; IV – sekundární exoerythrocytární merogonie; 1 – sporozoit v buňce sleziny; 2, 3 – kryptozoit; 4 – merozoit v makrofágu; 5, 6 – metakryptozoiti; 7 – merozoiti v erythrocytech; 8 – gametocyty; 9 – merozoit v erythrocytu; 10, 11 – erythrocytární meronti; 12 – merozoit v endoteliální buňce kapilár; 13, 14 – fanerozoiti; 15 – merozoiti v erythrocytech; 16 – gametocyty; 17 – makrogameta; 18 – exflagelace mikrogamet; 19 – oplození makrogamet; 20 – ookinet penetrující peritrofickou membránu; 21 – mladá oocysta; 22, 23 – sporogonie; 24 – sporozoit ve slinných žlázách vektora (Upraveno dle Valkiunas 2005).

III.2.1.2. Vývoj v přenašeči

Několik minut po nasátí krve přenašečem se dospělé gametocyty uvolňují z erythrocytů do lumen střeva komára. Vývoj od vzniku gamet po tvorbu oocysty se od ostatních rodů

hemosporid neliší. Během vývoje se oocysta podstatně zvětšuje a vznikají v ní stovky sporozoitů, jejichž množství závisí na druhu parazita a teplotě, při které se oocysta vyvíjí. Při příliš vysoké teplotě životaschopnost sporozoitů klesá a vývoj se zpomaluje stejně tak jako v příliš nízké teplotě. K degeneraci oocysty však dochází až při poklesu okolní teploty na 4 °C. Při teplotě 24 °C trvá vývoj *Plasmodium relictum* v komárovi *Culex pipiens* zhruba 7 dní. Dozrálá oocysta praská, sporozoiti putují do slinných žláz, kde mohou přežívat až několik týdnů (Valkiunas 2005).

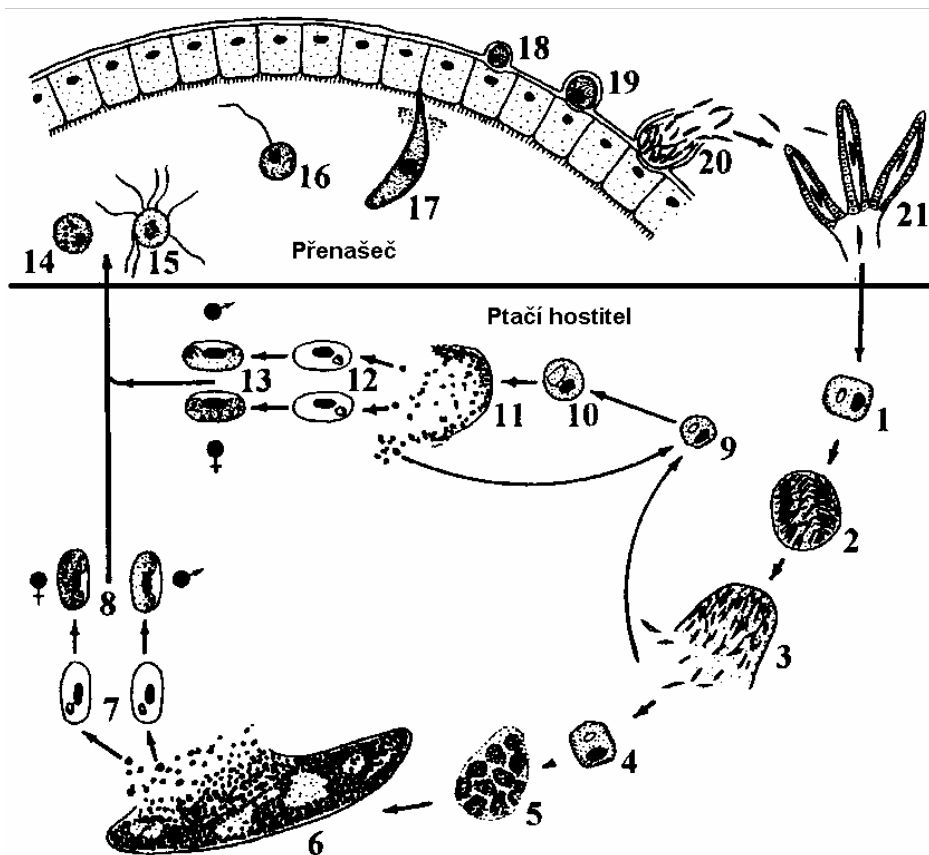
III.2.2. Vývojový cyklus rodu *Haemoproteus*

III.2.2.1. Vývoj v ptačím hostiteli

Sporozoiti injikovaní do krevního oběhu ptáka zahajují vývoj jako exoerytrocytární meronty nejčastěji v endotelu kapilár v plicích, méně často pak v játrech, slezině, ledvinách či kosterním svalstvu (viz obr.2.). Počet generací exoerytrocytárních merontů předtím, než se objeví první gametocyty, není nikdy nižší než dvě. Meronti všech generací jsou schopni produkovat merozoity. Prepatentní fáze (do objevení prvních krevních stadií) trvá u většiny druhů 11 až 21 dnů. Merozoiti uvolnění do krevního řečiště okamžitě napadají erythrocyty a mění se v gametocyty. Vytrálé gametocyty potencionálně schopné gametogeneze se objevují v krvi dva až šest dnů po invazi merozoitů do krve (Atkinson et al. 1986).

Malarický pigment (hemozoin), který se vytváří v důsledku metabolické aktivity gametocyty (trávení hemoglobinu), tvoří zlatavá, hnědá nebo černá granula (Sullivan 2002). Počet a tvar granul je důležitým diagnostickým znakem. V současné době je morfologie gametocytů a jejich vliv na morfologii hostitelského erythrocytu základním vodítkem k mikroskopickému určení druhu z krevního roztěru (Valkiunas et al. 2008c)

U infekcí druhu rodu *Haemoproteus* se vyskytují časté relapsy. Dosud nebyla spolehlivě identifikována stadia, která jsou za ně odpovědná. Někteří autoři se domnívají, že by mohlo jít o meronty, vyvíjející se v retikulárních buňkách sleziny (Atkinson et al. 1988).



Obr.2. Životní cyklus rodu *Haemoproteus* (na příkladu *H. mansonii*):

1 – sporozoit v endoteliální buňce; 2, 3 – exoerytrocytární meront první generace s merozoity; 4 – merozoiti v endoteliální buňce; 5, 6 – růst a dospívání megalomerontů ve svalové tkáni; 7 – merozoiti v erythrocytech; 8 – dospělý gametocyt; 9 – merozoit v buňce sleziny; 10, 11 – rostoucí a dospívající meronti ve slezině; 12 – merozoiti v erythrocytech; 13 – dospělý gametocyt; 14 – makrogameta; 15 – exflagelace mikrogamet; 16 – oplození makrogamety; 17 – ookinetu penetrující peritroficičnou membránu; 18 – mladá oocysta; 19, 20 – sporogonie; 21 – sporozoit ve slinných žlázách vektoru (Upraveno dle Valkiunas 2005).

III.2.2.2. Vývoj v přenašeči

Po nasátí hmyzím přenašečem se zralé gametocyty stávají kulovitými a během několika minut unikají z erythrocytů. Gametogeneze, oplození, vývoj zygoty, ookinetu a oocysty probíhají podle obecně platného schématu pro Haemosporida (viz kapitola 3.2.2.). Velikost a morfologie gamet, zygoty a ookinetu jsou důležitým určovacím znakem hemoproteů ve hmyzím vektorovi (Valkiunas 2005).

Zralá oocysta obvykle praská (postupné uvolňování sporozoitů bylo pozorováno jen u několika druhů), sporozoiti se dostávají do hemocélu a penetrují do slinných žláz vektoru, kde jsou připraveni na infekci obratlovčího hostitele během sání. Většina druhů hemoproteů (nejlépe prozkoumané jsou druhy *H. mansonii* a *H. nettiotis*), u nichž známe životní cyklus, se vyvíjí v tiplících. V tomto případě dává malá oocysta (průměr do 20 μm) vzniknout asi stovce sporozoitů (Valkiunas et al. 2002). Sporogonie v tiplíkovi se obvykle uskuteční do 10 dnů po infekci, což je důsledkem nutnosti synchronizace s krátkým gonotrofickým cyklem tohoto

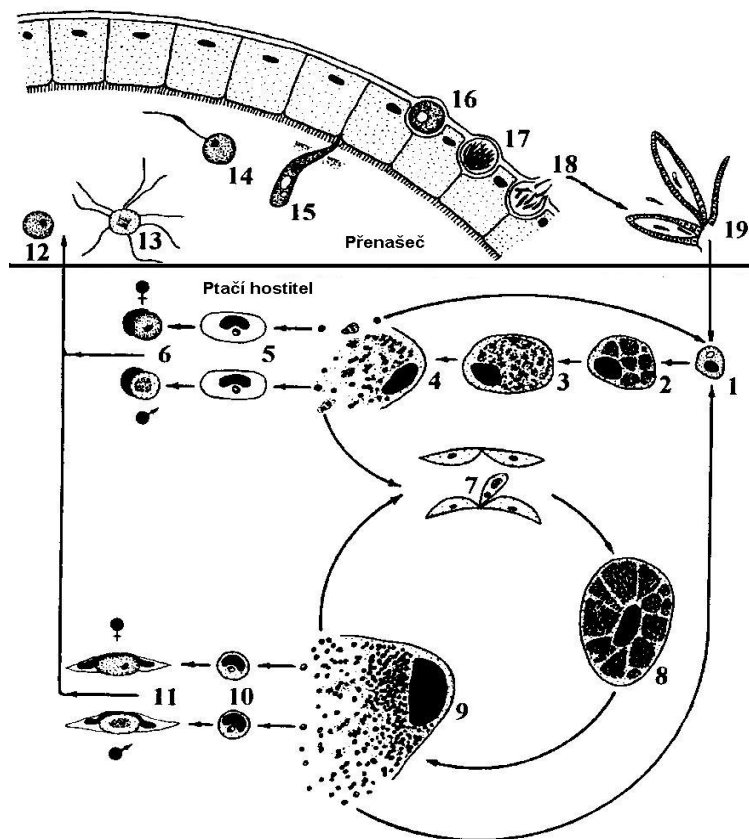
hmyzu (Atkinson 1991). Sporogonie v kloších je charakteristická většími rozměry oocysty (okolo 40 μm) a větším počtem sporozoitů vyvíjejících se v jedné oocystě (několik set). Vývoj trvá delší dobu a není nijak synchronizován s gonotrofickým cyklem kloše, který tráví většinu času na svém hostiteli (permanentní parazitismus) a saje opakovaně v krátkých intervalech, a navíc je relativně dlouhověký. Typičtí zástupci přenášení kloši jsou *H. columbae* a *H. palumbis* (Klei et al. 1968).

III.2.3. Vývojový cyklus rodu *Leucocytozoon*

III.2.3.1. Vývoj v ptačím hostiteli

Sporozoiti injikovaní vektorem do krve ptáka se mohou vyvíjet pouze v hepatocytech (viz obr.3.). Po penetraci do jaterního parenchymu se sporozoiti mění na mnohojaderné jaterní meronty první generace. Jejich vývoj trvá asi 5 dnů a poté se vytvářejí jednojaderní merozoiti. Část merozoitů napadá další hepatocyty a indukuje sekundární merogonii. Většina se ale dostává do krve, kde invadují erythrocyty a mění se v gametocyty. Mladé gametocyty způsobují hypertrofii a deformaci napadených krvinek a jejich jader. Plně zralé gametocyty jsou kulovité nebo oválné, avšak netvoří protáhlé fuziformní buňky (viz dále). Vzhledem k odlišnému metabolismu netvoří gametocyty ani žádná jiná stadia malarický pigment (Steele & Noblet 2001).

Do krve se dostávají i fragmenty jaterních merontů se dvěma a více jádry (syncytia). Tyto fragmenty jsou krví rozesety do mnoha tělních orgánů, kde mohou být fagocytováni makrofágy. V nich vzniká druhá generace merontů, které nazýváme pro jejich obří rozměry megalomeronti. Megalomeronty můžeme nalézt po celém organismu ptačího hostitele, ale k jejich agregaci dochází především ve slezině a lymfatických uzlinách. Megalomeronti dávají během 5 dnů vznik tisícům jednojaderných merozoitů, jež napadají lymfocyty i jiné mononukleární leukocyty a vznikají z nich gametocyty druhé generace. Malá část merozoitů vytváří zase megalomeronty, a ti jsou pak zodpovědní za chronickou fázi infekce. I druhá generace gametocytů silně deformuje hostitelské krvinky (tentokrát leukocyty). Známe dva typy gametocytů: oválný (či kulatý) a fuziformní typ (protáhlý, se zužujícími se konci). Oba typy jsou infekční pro vektora. (Steele a Noblet 2001; Valkiunas 2005).



Obr. 3. Životní cyklus rodu *Leucocytozoon* (na příkladu *L. simondi*):

1 – sporozoit nebo merozoit v hepatocytu; 2, 3, 4 – jaterní meronti; 5 – merozoiti v erythrocytech; 6 – kulovité gametocyty v erythrocytech; 7 – syncitium (fragment hepatického meronta s více jádry) nebo merozoit v buňce sleziny; 8, 9 – megalomeront; 10 – merozoiti v mononukleárních leukocytech; 11 – protáhlé gametocyty ve fuziformních hostitelských buňkách; 12 – makrogameta; 13 – exflagelace mikrogamet; 14 – oplození makrogamety; 15 – ookinet penetrující peritrofickou membránu; 16 – mladá oocysta; 17, 18 – sporogonie; 19 – sporozoit ve slinných žlázách vektora (Upraveno dle Valkiunas 2005).

III.2.3.2. Vývoj v přenašeči

Nedlouho po nasátí dochází ve střevě muchničky ke tvorbě gamet. Samčí gamety (mikrogamety) se tvoří z mikrogametocytů procesem zvaným exflagelace. Exflagelace stejně jako u většiny hemosporid neprobíhá při teplotách nižších než 15 °C. Zato při teplotách 26 °C až 40 °C dochází k exflagelaci velmi záhy po nasátí (do 1 minuty). Právě vyšší teploty v daném rozmezí jsou blízké tělesné teplotě ptáků a to vyvrací hypotézu, že stimulem k exflagelaci je pokles teploty nasáté krve. Uvedená skutečnost souvisí s ekologií muchniček, které se dlouhou dobu před nasátím i po něm zdržují na kůži svého hostitele a prolézají jeho peřím, a proto se jejich teplota blíží tělesné teplotě ptáka. Vývoj mikrogamet v přenašeči tedy nezávisí na podnebí v oblasti výskytu a to umožnilo leukocytozoonům napadat i ptáky chladného pásu (Fallis 1964).

III.3. PATOGENITA PTAČÍCH HEMOSPORID

Patogenní účinek hemosporid na jejich ptačí hostitele se u jednotlivých druhů (a to jak parazitů, tak i hostitelů) liší a je určován především životním cyklem parazita a epidemiologií nemoci, kterou způsobuje. Patogenním působením parazita na přenašeče se zabývá podstatně méně studií. Mnozí autoři zastávají názor, že patogenní vliv hemosporid na volně žijící ptáky není příliš velký a že úmrtí způsobená parazity jsou spíše výjimkou potvrzující pravidlo (Bennett et al. 1993). Avšak vzhledem k celosvětovému rozšíření, velké diverzitě a často vysoké prevalenci hemosporid mohou tyto parazité populace svých hostitelů přesto výrazně ovlivňovat (Arriero & Moller 2008).

III.3.1. Hlavní mechanismy patogenního působení na ptačího hostitele

III.3.1.1. Exoerytrocytární meronti

Vývoj v ptačím hostiteli začíná vývojem první exoerytrocytární generace z nepříliš početných sporozoitů injikovaných přenašečem do krve a proto první generace merontů způsobuje patologické změny pouze v případech silných infekcí.

Meronti dalších generací mohou být nebezpečnější. U rodu *Haemoproteus* nenastávají komplikace příliš často. Závažnější patologické změny působí v této fázi infekce paraziti rodu *Plasmodium*. Silné infekce jsou spojené s ucpáním cév mozku a jiných orgánů metakryptozoity nebo fanerozoity. Výsledkem je omezené zásobení daného orgánu krví, tkáň obklopující meronty trpí anoxií a dochází k jejich odumírání. U napadeného ptáka je možno sledovat příznaky paralýzy (Bennett et al. 1993).

V případě leukocytozoonů jsou patologické změny spojené především s vývojem megalomerontů v játrech, slezině, plicích či jiných tkáních hostitele. Dospělí megalomeronti dosahují více jak 200 μm v průměru a obsahují tisíce merozoitů. Často kolem nich dochází k rozvoji zánětlivých reakcí. Po skončení merogonie a uvolnění merozoitů z megalomerontů praskají přilehlé kapiláry a následné krvácení vede později v daném místě k tvorbě nekrózy (Miller et al. 1983). Druhy leukocytozoonů, v jejichž životním cyklu se megalomeronti nevytvářejí (*L. fringillinarum*, *L. berestneffi*), působí podstatně méně vážné patologické změny (Khan & Fallis 1970)

III.3.1.2. Krevní stadia

Mezi nejvýznamnější patologické změny působené ptačími hemosporidy patří destrukce krvinek a následná anémie. Hlavní příčinou anémie je odstraňování parazitovaných krvinek slezinou. K rozvoji anémie nedochází u infekcí rodem *Haemoproteus* příliš často. Přímá destrukce erytrocytů, spojená s vývojem erytrocytárních merontů, je typická pro infekce rodem *Plasmodium*. V průběhu parazitémie byly zaznamenány také změny v chemickém složení krevní plasmy, které zvyšovaly efektivitu destrukce napadených buněk (Valkiunas 2005).

Během infekce leukocytozoony dochází k rozvoji silné anémie, protože dochází k destrukci erytrocytů působením tzv. anti-erytrocytárního faktoru, který se po napadení parazitem objevuje v krevní plasmě. Další patologické změny působí gametocyty, jež vytvářejí s parazitovanou buňkou až 40 µm velké komplexy a mohou ucpávat drobné kapiláry (Kocan 1968).

Výše popsané patologické působení hemosporid vede u infikovaných ptáků ke zvětšení sleziny a jater. V případě silné infekce může být zvětšení těchto orgánů až dvacetinásobné a může vést k jejich prasknutí (Atkinson et al. 1988).

III.3.2. Patologické působení hemosporid na volně žijící pěvce

Protože patologické působení ptačích hemosporid představuje poměrně obsáhlou problematiku a poznatky získané z různých ptačích řádů se jen těžko zobecňují, zaměřím se v následujícím textu především na pěvce (Passeriformes), přesněji na volně žijící pěvce. Existuje sice množství prací popisujících případy úhynů v zoologických zahradách a umělých chovech, jedná se však ve většině případů o pouhé kazuistiky s uvedením druhu uhynulého ptáka a detekovanými druhy hemosporid (Donovan et al. 2008; Paperna & Martelli 2008). Často se též jedná o infekce exotických hostitelů napadených místními parazity (koevoluce, viz dále), což může výrazně ovlivňovat efekty patogenního působení (Bennett et al. 1993). O případech zavlečení parazitů na nová území se zmiňuji v kapitole o epizootiích.

Přestože podle současných znalostí parazituje u volně žijících pěvců okolo 90 druhů hemosporid, většina poznatků o patogenitě této skupiny pochází ze studia experimentálních nákaz kanárů několika málo druhy parazitů. Zobecňování takto generovaných dat komplikuje skutečnost, že kanár často není přirozeným hostitelem daného druhu parazita a proto mohou být pozorované příznaky netypické. Parazit může u přirozeného hostitele díky jejich dlouhodobé koevoluci způsobovat infekce s mírnějším průběhem než bylo experimentálně zjištěno u kanárů. Na druhou stranu jsou ptáci žijící v přírodě vystaveni mnoha stresovým faktorům, které mohou patogenní účinky hemosporid podstatnou měrou ovlivňovat a

zesilovat. Paraziti, jež se zdáli být neškodní v umělých podmínkách, mohou svého hostitele ve volné přírodě výrazně hendikepovat. Problémem při studiu patogenního vlivu hemosporid na volně žijící pěvce je také určité zkreslení skutečné prevalence parazitů v populaci na základě metod odběru vzorků. K odchytu ptáků se používají sítě nebo pasti, případně odchyt v hnízdních budkách. Těmito metodami však odchytíme ptáky s nízkou parazitémií, nejčastěji v chronické fázi. Jedinci s vysokou parazitémií v akutní fázi infekce mají totiž často sníženou pohyblivost a většinu času tráví v úkrytu mimo hnízdo. To vede k tomu, že se je podaří odchytit s menší pravděpodobností než zdravé ptáky (či ptáky v chronické fázi infekce) a výsledná prevalence parazitů v populaci a negativní vliv parazitů na hostitele jsou podhodnoceny (Valkiunas 2005).

III.3.2.1. Infekce vedoucí ke smrti ptačího hostitele

Studii o mortalitě volně žijících pěvců způsobované hemosporidy je poměrně málo, krom jiného i proto, že šance zachytit v přírodě silně infikované jedince je velmi malá (viz výše). Navíc oslabené jedince s výraznými patologickými příznaky infekce rychle eliminují predátoři (Valkiunas 2005).

Několik případů silné infekce druhem *Plasmodium cathemerium* a následného úmrtí pěvců bylo popsáno v USA. Slabí ptáci neschopní letu nebo již mrtví jedinci patřili ke druhům vrána americká (*Corvus brachyrhynchos*), vrabec domácí (*Passer domesticus*) a drozd stěhovavý (*Turdus migratorius*). Intenzita parazitémie byla velmi vysoká a pohybovala se v rozmezí od 28 do 74 % napadených erytrocytů. V mozku ptáků našli autoři velké množství fanerozoitů, jež byli odpovědní za neurologické symptomy vedoucí ke smrti ptáka. (Stone et al. 1971, dle Valkiunas 2005).

Ojediněle byly popsány z volné přírody rovněž případy úmrtí pěvců v důsledku napadení parazity rodu *Haemoproteus*. Slabý jedinec jiříčky obecné (*Delichon urbica*) s těžkou anémií byl nalezen bez pohybu na zemi v Zambii. Autoři u něj prokázali vysokou parazitémii blíže určeným druhem *Haemoproteus* sp. (napadeno bylo 40 % erytrocytů), přitom vysoká parazitémie obvykle nepřesahuje hranici 10 % infikovaných krvinek (Peirce 1984).

Nejméně informací je o mortalitě pěvců působené rodem *Leucocytozoon*. Infekce těmito parazity jsou zřejmě u pěvců benigní (na rozdíl od některých jiných ptačích řádů např. Galliformes, Anseriformes či Strigiformes) (Bennett et al. 1993).

III.3.2.2. Epizootie ve volné přírodě

K epizootiím způsobovaným hemosporidy dochází hlavně v případech introdukce nového druhu parazita na danou lokalitu nebo introdukce ptačích hostitelů do endemických oblastí výskytu parazita (spojeno především s hospodářsky významnými druhy či chovy exotického ptactva). V obou případech dochází k setkání a interakci dvou druhů, které neprošly společnou koevolucí.

Jeden z nejlépe prozkoumaných případů epizootie byl zaznamenán na Havajských ostrovech, kam byl nechtěně introdukován druh *Plasmodium relictum* spolu se svým vektorem komárem druhu *Culex quinquefasciatus*. Tato introdukce měla dramatický dopad na početnost populací, hranici rozšíření a dokonce i samotné přežití původních druhů pěvců (van Riper et al. 1986).

Ptačí hemosporida zanesená občasně na Havajské ostrovy tažnými ptáky nepředstavovala pro místní faunu žádný problém, protože se zde nevyskytoval vhodný přenašeč. Až ve druhé polovině 18. století po objevu souostroví Evropany sem bylo na velrybářských lodích společně s komáry zavlečeno *Plasmodium relictum*. Komáři se rychle rozšířili po ostrovech a obsadili vlhké a teplé nížiny do 1000 m n. m. a spolu s nimi se začala šířit i ptačí malárie. Od počátků šíření infekce, se kterou se endemické druhy pěvců dosud nesetkaly, vymřela více jak polovina místní avifauny (nejvíce byla postižena čeled' šatovníkovití, *Drepanididae*). Stalo se tak dříve, než byl novými osadníky zlikvidován jejich habitat a tak je většinu druhů kladena za oběť introdukovaným infekcím, ke kterým kromě ptačí malárie patřil i virus ptačích neštovic. Fatální dopad malárie na místní avifaunu byl potvrzen v pokusu, kdy byly endemické druhy ptáků obývajících vyšší polohy přemístěny do nížin (do zón aktivního přenosu *P. relictum*). Během několika dnů se u nich rozvinula letální forma malárie. (van Riper et al., 1986)

Zkázu původních ptačích druhů na Havaji dokonala kompetice ze strany zavlečených ptáků, u kterých se infekce *P. relictum* neprojevovala klinicky tak výrazně. Endemičtí havajští ptáci naštěstí získávají na *P. relictum* postupně určitou rezistenci a pomalu se opět vrací do oblastí, kde se ptačí malárie vyskytuje. Navíc došlo ke změně některých prvků jejich chování, které nyní vedou ke snížení pravděpodobnosti nákazy malárií. Například šatovník karmínový (*Himatione sanguinea*) a šatovník (*Vestiaria coccinea*) podnikají denně pravidelné migrace, kdy odlétají trávit noc (doba největší aktivity vektora) do vyšších poloh, kde se komáři nevyskytují (van Riper et al., 1986).

III.3.2.3. Terénní experimentální studie o vlivu hemosporid na pěvčí hostitele

U většiny terénních experimentálních studií se jedná o manipulované experimenty s léčením kontrolních skupin pěvců. Experimentální studii na populaci sýkor modřinek (*Cyanistes caeruleus*) infikovaných parazity *Haemoproteus majoris* a *Leucocytozoon majoris* provedl Merino et al. 2000. Samice léčili pomocí antimalarika primaquinu a na konci hnízdní sezony zjistili, že léčené samice mají více potomků. Menší počet mláďat u neléčených samic autoři vysvětlují tím, že si tyto samice nemohou dovolit investovat tolik energie do rodičovské péče (velikosti snůšek se u léčené skupiny a kontrolní nelišily). Studie byla jednou z prvních, která ukázala, že hemosporida mohou mít vliv na populace volně žijících pěvců, i když to z předchozích studií nebylo zřejmé, protože příznaky u dospělců nejsou většinou letální.

Podobnou studii na populaci jiříček obecných (*Delichon urbica*) provedl později Marzal et al. (2005). Samice léčili opět primaquinem a zjistili, že léčené samice mají výrazně vyšší počet odchovaných potomků. Zjistili ale také, že kromě vyššího reprodukčního úspěchu nemá léčba vliv na žádné jiné sledované imunologické a tělesné charakteristiky.

III.3.2.4. Studie analyzující terénní data o vlivu hemosporid na pěvčí hostitele

V této kapitole se zaměřuji především na vliv parazitů na charakteristiky hostitele, pro něž mám vlastní data a s nimiž budu v následujících modelech počítat. Uvádím pouze poznatky týkající se přímého působení ptačích hemosporid a obecné informace omezují na minimum, protože se jedná o problematiku o velmi rozsáhlou, komplikovanou, studovanou na mnoha modelech a úrovních a není účelem této práce rozebírat všechny její aspekty. Navíc je tato problematika obecně probírána v pracích kolegů, kteří se zabývali nejrůznějšími aspekty biologie našeho modelového organismu hýla rudého (viz diplomové práce: Schnitzer 2003; Vinkler 2007; či publikace Albrecht et al. 2007). Terénní studie mají oproti manipulovaným experimentům tu nevýhodu, že mohou odrážet vliv třetího faktoru, který působí jak na prevalenci hemosporid, tak na sledovaný faktor; to je též důvod, proč je potřeba přistupovat k interpretacím výsledků takovýchto studií velmi opatrně (Merila & Anderson 1999).

Vliv na hmotnost jedince

V terénních studiích provedených na souboru dat z hostitelů jednoho druhu je efekt hemosporid na hmotnost jejich hostitelů většinou neprokazatelný. Příkladem mohou být studie na strnádkách rodu *Aimophila* (Deviche et al. 2005); lesňáčcích modropláštíkových (*Dendroica cerulea*) (Gibb et al. 2005) či lejských černohlavých (*Ficedula hypoleuca*) (Sanz et al. 2002).

Také experimentální infekce pěvců odchycených v terénu a infikovaných v laboratoři za kontrolovaných podmínek naznačují, že vliv ptačích hemosporid na hmotnost hostitele bude u linií parazitů charakteristických pro příslušné hostitele minimální. Žádný efekt na hmotnost u křivek a zvonků odchycených v přírodě a experimentálně nakažených linií SGS1 druhu *Plasmodium relictum* nezaznamenali ani Palinauskas et al. (2008) ani Valkiunas et al. (2006). Ti provedli podobný experiment s druhem *Haemoproteus belopolskyi* a u experimentálně infikovaných pěnic černohlavých (*Sylvia atricapilla*) zjistili sice úbytek na váze po prodělání akutní fáze infekce, ale tento efekt trval pouze po dobu šesti dnů a potom se hmotnost infikovaných ptáků již nelišila od hmotnosti ptáků v kontrolní skupině.

Vliv na reprodukční úspěch

Častěji než vliv parazitů na hmotnost hostitele, bylo v terénních nemanipulovaných studiích prokazováno negativní působení hemosporid na reprodukční úspěch svých pěvčích hostitelů, i když ani zde tento vliv nevychází jednoznačně.

Existují terénní studie, které jasně potvrdily negativní vliv infekce hemosporidy na reprodukční úspěch samic pěvců (Merila & Anderson. 1999; Sanz et al. 2001).

Množství studií však žádný vliv neprokázalo (Dale et al. 1996; Dufva 1996; Siikamaki et al. 1997; Hatchwell et al. 2001; Bensch et al. 2007) a existují dokonce studie, které popisují pozitivní korelaci reprodukčního úspěchu samic a prevalencí hemosporid v jejich krvi (Davidar & Morton 1993; Fargallo & Merino 2004). Autoři těchto studií to vysvětlují tím, že nakažená samice investuje do většího počtu méně kvalitního potomstva. Kvalitu potomstva ale autoři často dále netestují ani hypotézu netestují dále v čase, proto jsou tyto výsledky značně diskutabilní.

U samců se s vlivem hemosporid na reprodukční úspěch až na výjimky (Sundberg 1995) u pěvců příliš nepočítá. Tato data navíc nejsou zcela spolehlivá, protože velká část studií je staršího data, kdy se většina pěvců považovala za striktně monogamní a samčí reprodukční úspěch se považoval za roven reprodukčnímu úspěchu jejich sociálních partnerek. Dnes již víme, že v reprodukčním úspěchu samců mnoha druhů pěvců hrají významnou roli mimopárové paternity a věrnost jejich partnerky, což například ukázali na modelu hýla rudého Albrecht et al. (2007).

Vliv na zbarvení samců pěvců

Častým předmětem studií zabývajících se vlivem ptačích hemosporid na svého hostitele je jejich vliv na zbarvení samců. Jako u všech předchozích studií ale výsledky nevykazují

většinou společný trend, problémem už je jenom se shodnout jak se interakce polarizovaná (výjimkou je absence vlivu infekce hemosporidy na melaninový ornament).

Za zbarvení peří může kromě jeho struktury jeden ze tří typů pigmentů. Strukturální zbarvení způsobuje rozptyl světla na povrchové struktuře peří ptáků. Základní typy pigmentů jsou karoten, melanin a porfyrin (Brush 1978).

Výjimkou v nekonzistentnosti studií o vlivu na ornament se týká melaninového ornamentu. Produkce melaninů není nijak nákladná a jsou jej schopni syntetizovat sami živočichové z tyrozinu, tryptofanu a fenylalaninu a proto tento pigment není vhodným indikátorem kvality či kondice samce (Fox 1976). To jsou zřejmě důvody, proč nebyl v naprosté většině studií zjištěn žádný vliv hemosporid na melaninové ornamente (Dale et al. 1996; Gonzalez et al. 1999; Deviche et al. 2005; Bensch et al. 2007)

Jiná situace je u ornamentace, kterou způsobují karotenoidy. Karotenoidy, například β -karoten a kantaxantin si živočichové nejsou schopni syntetizovat sami a musí je přijímat pouze z potravy (Brush 1978). Úroveň červeného zbarvení je tedy závislá na schopnosti samce obstarat kvalitní potravu a na fyziologických procesech odpovědných za ukládání karotenoidů do peří. Tyto mechanismy nelze oklamat a karotenoidní ornament může být tedy pravdivým indikátorem kondice a kvality samce (Hill 1992).

Vztah karotenoidů a parazitů je značně komplikovaný a nacházíme tu jak pozitivní tak negativní korelaci mezi intenzitou karotenoidního ornamentu a prevalencí hemosporid. Negativní korelace bývá vysvětlována pomocí hypotézy Hamiltona a Zukové o parazity zprostředkované sexuální selekci (Hamilton & Zuk 1982). Paraziti způsobují horší ukládání karotenoidů a imunitní systém parazitovaných samců spotřebovává více karotenoidů (Olson a Owens 1998). Ve světle těchto hypotéz by barevnější samci měli mít méně parazitů a to na příkladu ptačích hemosporid ukázal Sundberg (1995) ve své studii na strnadu obecném (*Emberiza citrinella*).

V jiných studiích ale došli autoři k přesně opačným závěrům. Merila & Sheldon (1999) ve své studii provedené na zvoncích zelených (*Carduelis chloris*), že intenzivněji zbarvení samci vykazují i vyšší prevalenci hemosporid. Stejně tak Horak et al. (2001) prokázal, že vybarvenější samci sýkor modřinek (*Cyanistes caeruleus*) jsou více infikovaní než ti méně barevní. Tito autoři předpokládají, že investice do ukládání karotenoidů do opeření vede k vyšší nákaze hemosporidy, protože karotenoidy nemůže využít k boji s parazitem. To se snažil ukázat ve své další studii Horak et al. (2004). Zjistili sice, že jedinci nakažení hemosporidy mají v krevní plasmě vyšší koncentraci karotenoidů než neinfikovaní, již ale neprokázali žádný vztah mezi hladinou karotenoidů v krvi a vybarvením studovaných jedinců, což situaci značně komplikuje a znepráhledňuje.

Na věc se můžeme dívat i z jiného pohledu: infikovaný jedinec si nemůže dovolit investovat tolik karotenoidů do ornamentu. Je tedy vidět, že vliv hemosporid na karotenoidní ornament tedy zůstává stále problematickou otázkou, především nevíme co je příčina a co je následek.

Navíc někteří autoři spojitost mezi karotenoidním ornamentem a infekcí hemosporidy neprokázali. Příkladem může být studie, která se zabývala faktory ovlivňujícími karotenoidní zbarvení čечetek zimních (*Carduelis flammea*) (Seutin 1994).

III.3.2.5. Faktory ovlivňující pravděpodobnost infekce hemosporidy

Pohlaví

Vliv pohlaví hostitele na prevalenci krevních parazitů bývá často diskutovaným faktorem v mnoha studiích. Existují teorie vysvětlující nepoměr prevalencí jak u samců (imunopresivní vliv testosteronu), tak u samic (vyšší expozice vektorům při sezení na hnízdě), ale většina konkrétních dat tyto hypotézy nepodporuje (McCurdy et al. 1998). Pomocí metaanalýzy souboru dat z 33 studií zjistil McCurdy et al. (1998), že se samci a samice prevalencí signifikantně neliší. Samozřejmě se najdou výjimky, kdy průkazné rozdíly mezi pohlavími v prevalenci či parazitémii vyšly (Bentz et al. 2006; Hasselquist et al. 2007), ale zřejmě půjde o náhodné výkyvy nebo specifické případy, které nelze univerzálně zobecnit. U většiny novějších studií (po roce 1998, kdy byla provedena výše zmíněná metaanalýza) nenalzáme pro pohlavím ovlivněné vychýlení prevalencí podporu (Garvin & Greiner 2003; Votýpka et al. 2003; Valkinuas et al. 2003; Ricklefs et al. 2005; Senlik et al. 2005).

Věk

Krev mládřat na hnízdě je většinou negativní i když v populaci dospělců dosahují parazité vysoké prevalence. Jedním z důvodů je dlouhá prepatentní fáze infekce, kdy nejsme schopni parazity v krvi detekovat. Další možnou příčinou negativity mládřat může být skutečnost, že se daným druhem hemosporida nakazí pouze dospělci na zimovišti například proto, že se v místě hnízdiště nevyskytuje vhodný vektor. V praxi se uplatňují obě možnosti.

Příkladem platnosti první z nich je pokus provedený s mládřaty pěnkavy obecné (*Fringilla coelebs*). 33 mládřat ve věku 6 až 12 dnů bylo odebráno z hnízda a všechna byla při vyšetření krevních roztěrů negativní. Mládřata byla dále chována v kontrolovaných podmínkách v laboratoři. U dvou mládřat ve věku 23 (odebráno ve stáří 10 dnů) a 25 dnů (odebráno ve stáří 12 dnů) byly objeveny gametocyty *Haemoproteus fringillae*. V laboratoři byl přenos vektorem vyloučen, takže k nákaze muselo dojít na hnízdě během prvních 10 (respektive 12 dnů) dnů života. Prepatentní fáze infekce je tedy u daného druhu parazita delší

než 12 dnů (všechna mláďata se jevila při odběru z hnízd negativní), ale není delší než 23 dnů (Valkiunas 2005). Jinou studii provedli Cosgrove et al. (2006), kteří studovali 14-ti denní mláďata sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*). Vyšetřili celkem 195 mláďat a všechna byla negativní na parazity rodu *Plasmodium* a *Haemoproteus*, a to i přesto, že u dospělců ve stejné populaci dosahuje prevalence plasmodií 30 %.

Příkladem druhé možnosti je negativita mláďat rákosníka velkého (*Acrocephalus arundinaceus*) na dvou lokalitách v jižním Švédsku, přitom 20,6 % dospělců je nakaženo parazity druhu *Haemoproteus payewskyi*. O tomto druhu se předpokládá, že se přenáší na zimovišti rákosníků v subsaharské Africe, protože ani juvenilní ptáci na lokalitě před migrací nevykazovali žádnou infekci (Hasselquist et al. 2007).

U juvenilních a adultních jedinců existují dva fenomény vlivu stáří na infekci hemosporidy. Zaprvé bylo několikrát prokázáno, že juvenilové mají vyšší parazitémie, ale často nižší prevalence (Sol 2003; Hasselquist 2007). Existuje několik hypotéz, které tuto skutečnost vysvětlují. První říká, že hostitel si postupem času buduje imunitní odpověď na krevní stadia parazitů, po čase dostane intenzitu infekce pod kontrolu a v benigní fázi zůstává parazitémie na nízké úrovni. Druhá hypotéza počítá s úhynem silně parazitovaných juvenilů; dospělosti se pak dožijí jen ti rezistentnější, s menší intenzitou infekce. Třetí hypotéza vysvětluje rozdíly v parazitémii juvenilů a adultů rozdílným chováním, které vede k menší expozici adultů vůči vektorům. Když byly tyto tři hypotézy testovány, získaná data ukazovala na správnost první hypotézy (Sol et al. 2000; Sol et al. 2003). U adultních jedinců však většina studií již nepotvrdila závislost prevalence hemosporid na věku hostitele (Valkiunas et al. 2003; Deviche et al. 2005; Gibb et al. 2005).

Diverzita a počet alel pro MHC I

MHC I (Major Histocompatibility Complex I) hraje významnou roli v imunitní odpovědi namířené proti vnitrobuněčným parazitům a to prezentací cizorodých peptidů T-lymfocytům. Alely pro MHC I bývají v populacích vysoce polymorfní, což hraje zásadní roli v evolučním zápase s parazity. Asociace mezi počtem *Mhc* alel a jednotlivými protektivními alelami byla studována na celé řadě experimentálních živočišných modelů (Penn et al. 2002; McClelland et al. 2003) i u volně žijících živočichů (Lohm et al. 2002). Existuje i několik studií o asociaci některých *Mhc* alel a infekcí ptačími hemosporidy. Autoři se zabývali především vztahem jednotlivých alel resistencí vůči těmto krevním parazitům, výjimečně i celkovým počtem alel a infekcí.

Westerdahl et al. (2005) studovali asociaci mezi počtem alel pro MHC I a jednotlivými alelami u volně žijící populace rákosníků velkých (*Acrocephalus arundinaceus*).

Zjistili pozitivní korelaci mezi počtem alel pro MHC I a infekcí hemosporidy a rovněž pozitivní asociaci konkrétní alely *B4b* a infekcí kmenech GRW4 rodu *Haemoproteus*. Autoři tuto pozitivní korelaci vysvětlují tím, že ptáci s větší diverzitou *Mhc* alel a nositelé „protektivní“ alely *B4b* mají větší šanci, že udrží infekci pod kontrolou (přežijí akutní fázi), která tak nebude letální a bude se vyskytovat pouze v benigní chronické fázi. Ptáci s méně *Mhc* alelami, kteří se hemosporidy nakazí, jsou rychle odstraněni z populace (podlehnu akutní fázi infekce) a tudíž zachytíme v této skupině pouze neinfikované ptáky. Alternativní vysvětlení, že ptáci s více *Mhc* alelami a nositelé alely *B4b* jsou více náchylní k infekci hemosporidy, autoři považují za nepravděpodobné.

Bonneaud et al. (2006), kteří sledovali pouze přítomnost alel způsobujících rezistenci k infekci, došli k opačným závěrům. V populaci vrabců domácích (*Passer domesticus*) identifikovali dvě alely (*a151*, *a172*), které způsobují rezistenci vůči nákaze konkrétními hemosporidy. Nositelé těchto alel vykazovali výrazně nižší prevalenci nejhojnější linie SGS1 rodu *Plasmodium*. Vliv další alely *a161* by se dal interpretovat ve smyslu hypotézy z předchozí studie, protože její nositelé vykazovali vyšší nákazu linií SGS1. Vztah počtu alel a parazitace autoři bohužel nezkoumali, zřejmě i proto, že se v jejich datasetu vyskytovalo mnoho velmi vzácných alel (40 ze 47) nalezených jen u několika jedinců.

To, že je problematika MHC I pravděpodobně mnohem komplikovanější a že je nutno studovat vždy pouze jednu konkrétní linii, ukázala ve své studii Loiseau et al. (2008). Autoři si jako modelový organismus vybrali opět vrabce domácího (*Passer domesticus*) a ve zkoumané populaci našli alely pro MHC I, které navozovaly jak zvýšenou rezistenci vůči jedné linii, tak naopak zvýšenou náchylnost vůči liniím druhým. Tento antagonistický efekt byl především patrný u alely *pado123*, způsobující rezistenci vůči linií PADOM3 rodu *Haemoproteus* (nositelé mají více jak 6x nižší prevalenci než zbytek populace), ale zvýšenou náchylnost k nákaze linií SGS1 rodu *Plasmodium* (nositelé mají 2,5x vyšší prevalenci).

Vzhledem k vysoké diverzitě linií hemosporid, jejich rozdílné patogenitě a mechanismu účinku ochrany *Mhc* alel (rezistence vůči nákaze či potlačení akutní fáze infekce a přechod do benigní fáze), si vyžaduje studium asociace *Mhc* alel a infekce hemosporidy velmi individuální přístup se zahrnutím maxima informací o liniích parazitů v populaci hostitele.

Genetická variabilita (celková heterozygotnost)

O genetické variabilitě (heterozygotnosti) jedinců se uvažuje jako o jednom z možných mechanismů zvyšujících odolnost vůči parazitům (Hawley et al. 2005)

Na pěvcích doposud nebyla provedena žádná studie vztahu celkové heterozygotnosti na několika lokusech a parazitace hemosporidy. Jediná studie byla provedena pouze na poštolkách jižních (*Falco naumanni*). Autoři zde použili 11 mikrosatelitových lokusů ke zjištění genetické variability u 583 jedinců. Žádný vztah mezi celkovou heterozygotností a parazitací však i přes velikost vzorku nenašli, což mohlo být způsobeno celkově velmi nízkou prevalencí hemosporid v populaci poštolek (pouze 5 %) (Ortego et al. 2007).

III.3.3. Vliv hemosporid na přenašeče

Vztah mezi ptačími hemosporidy a jejich přenašeči byl studován pouze okrajově. Přesné účinky patogenního působení však dosud známé nejsou a k dispozici jsou pouze útržkovitá data. Při experimentálních nálezích vektorů ptačími hemosporidy bylo zjištěno, že zástupci rodu *Plasmodium* aktivně absorbují sacharidy z hemocélu komára, narušují jeho metabolismus aminokyselin a způsobují mechanické poškození epiteliálních buněk střeva (Alekseev 1986, dle Valkiunas 2005). Pohyblivost samic komára *Aedes aegypti* parazitovaných *P. gallinaceum* se snižuje poté, co přenesou infekci na ptačího hostitele a zvyšuje se tak i jejich mortalita (Alekseev et al. 1984, dle Valkiunas 2005). Mortalita slabě infikovaných samic *A. aegypti* (méně než 40 oocyst ve střevě) se však oproti neparazitovaným jedincům nezvyšuje (Freier & Friedmann, 1987).

Délka života muchniček (Simuliidae) při laboratorních pokusech negativně koreluje s intenzitou parazitémie ptáků, na nichž sály (Allison et al. 1978, dle Valkiunas 2005). Stejně tomu bylo i u experimentálního sání tiplíka *Culicoides impuctatus* na pěnkavě obecné (*Fringilla coelebs*) nakažené parazitem *Haemoproteus fringillae*. U tiplíků, kteří sáli na jedincích s vysokou parazitémií, byla prokázána více jak čtyřnásobná mortalita než u tiplíků, kteří sáli na slabě parazitované pěnkavě. Největší mortalita byla zaznamenána první až čtvrtý den po sání, což ukazuje na negativní působení ookinetu a raného vývoje oocysty (Valkiunas a Iezhova, 2004b).

Tak terénní studie, kterou provedli Tomas et al. (2008), naznačuje negativní působení hemosporid na jejich vektory, a to i v přirozených podmínkách, protože samice tiplíků (Ceratopogonidae) a muchniček (Simulidae) při sání preferovaly nenakažené hostitele. O mechanismech rozpoznání infekce přenašečem však není nic známo.

IV METODIKA

Během diplomové práce jsem analyzoval krevní vzorky hýla rudého získaných v letech 2000-2008 v rámci projektů (GAČR 206/06/0851 a GAUK191/2004/B-Bio) na jejichž sběru se podílelo několik studentů a pracovníků katedry zoologie PřF UK a ústavu biologie obratlovců AVČR. Během projektu bylo získáno množství nejrůznějších dat, se kterými dále pracuji ve svých statistických analýzách, ale na jejichž sběru jsem se nepodílel. Jedná se o data o kondici jedince (hmotnost, velikost, velikost růstových proužků, hematologické parametry), o jeho imunogenetických vlastnostech (počtu alel MHC I antigenů), reprodukčním úspěchu (u samců úspěch ve vnitropárových i mimopárových paternitách, u samic velikost snůšky) a sexuálně selektovaných znacích (ornamentace samců).

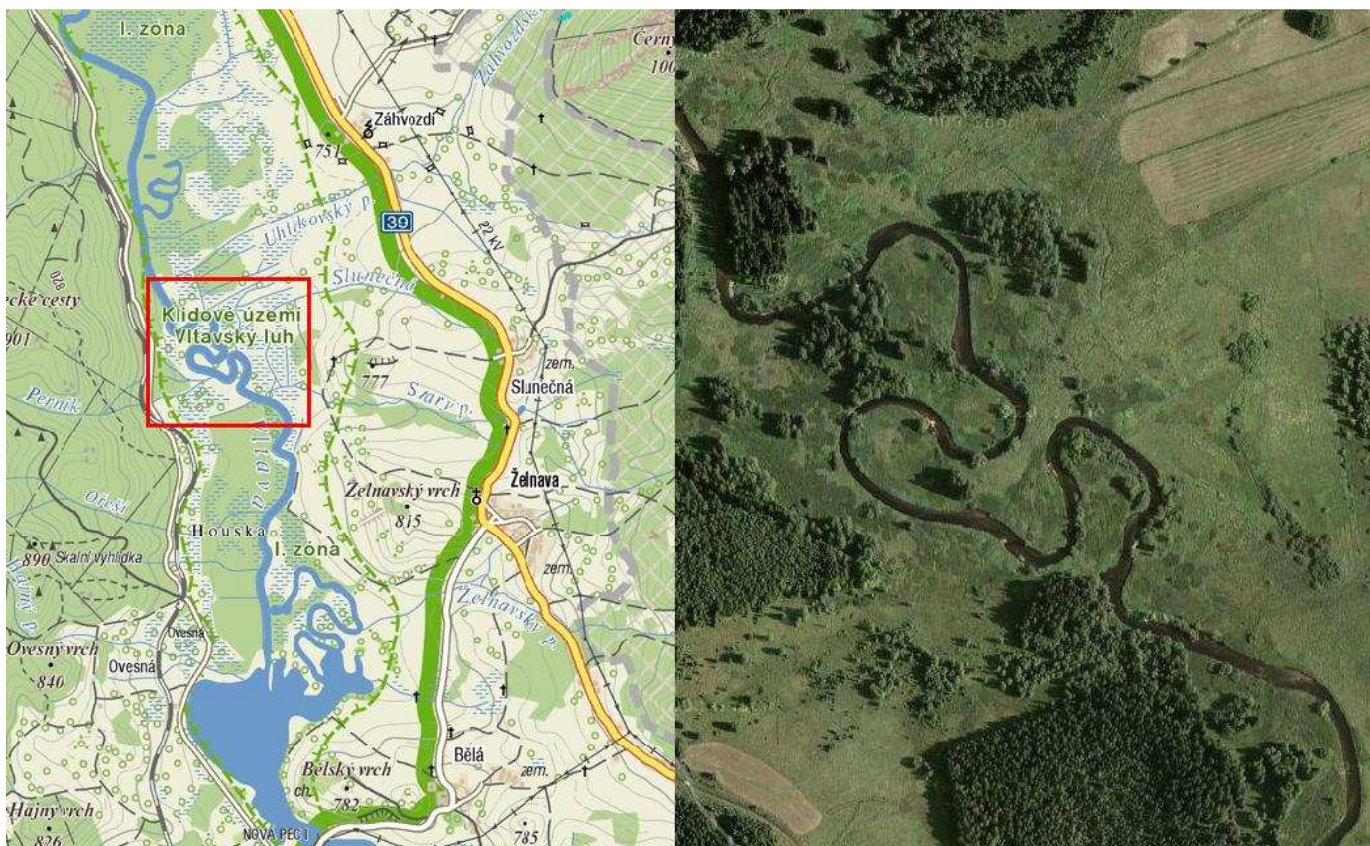
Součástí mojí diplomové práce bylo i studium a sběr vzorků potencionálních přenašečů hemosporid na studované lokalitě.

IV.1. TERÉNNÍ ČÁST PROJEKTU A HOSTITELSKÝ DRUH

IV.1.1. Výzkumná lokalita

Lokalita, na které výzkum probíhal, se nachází v první zóně Národního Parku Šumava, ve Vltavském luhu, poblíž obce Želnavá (48°49' N 13°56' E) (viz obr.4. a 5.) Nadmořská výška se pohybuje okolo 730 m n. m. Rozloha lokality je přibližně 1 km². Subpopulace hýla rudého, která tu hnízdí, je poměrně malá (každoročně tu hnízdí 15 až 20 párů), což umožňuje nalézt během hnízdní sezóny drtivou většinu hnízd. Subpopulace hýla rudého na této lokalitě představuje samý okraj jeho rozšíření a od ostatních populací je alespoň v době hnízdění izolovaná. Samci přilétají na lokalitu v polovině května, samice je následují o tři až čtyři dny později. Ptáci byli odchyťováni a vzorkováni od svého příletu v polovině května zhruba do konce června, kdy končili hnízdění (Schnitzer 2003; Vinkler 2007).

Jedná se o nivní biotop a lokalita je během dubna a května pravidelně zaplavovaná. Křovinné porosty zaujímají zhruba 15 % plochy, převládá tavolník vrbolistý (*Spiraea salicifolia*), v jehož porostech se nachází většina hýlých hnízd (viz obr. 2 a 3). Vegetace volných ploch se skládá především z různých druhů ostřic (*Carex* spp.), tužebníku jilmového (*Filipendula ulmaria*), chrastice rákosovité (*Phalaroides arundinacea*) a zblochanu vodního (*Glyceria maxima*). Stromové porosty se vyskytují spíše sporadicky a tvoří je převážně bříza, vrba, olše, osika, smrk a borovice (Albrecht 2004; Albrecht et al. 2007). Z této lokality pochází celkem 251 krevních vzorků dospělců a 16 vzorků mláďat hýla rudého zahrnutých do studie a všechny vzorky hematofágního hmyzu.



Obr.4. Poloha studijní lokality ve Vltavském luhu poblíž obce Želnavá. Výřez označuje konkrétní umístění lokality. Tato oblast je zobrazena na leteckém snímku vpravo.



Obr. 5. Snímek zobrazující biotop výzkumné lokality

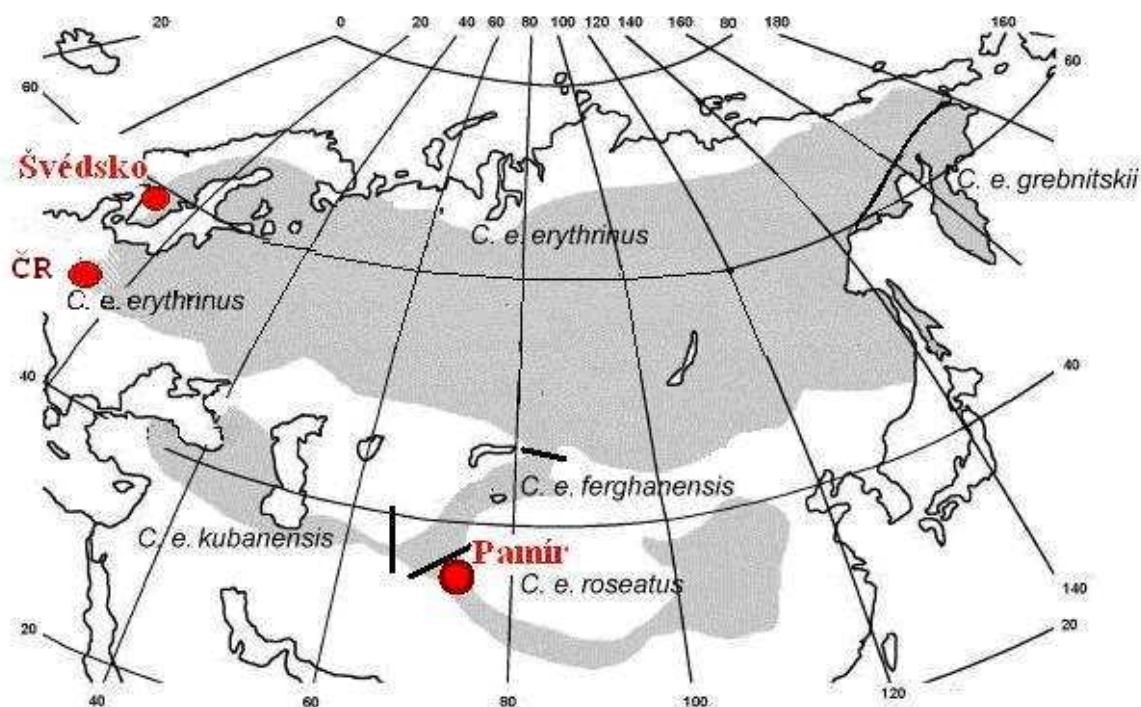
Výrazně menší množství krevních vzorků, které byly použity pouze pro detekci linií (případně určení prevalence), bylo odebráno na následujících lokalitách:

- Rychtářky (49°40' N, 16°5' E), Žďárské vrchy, ČR, 2005-2007, 58 vzorků;
- Götaälv (57°53' N, 12°01' E), Västra Götaland, Švédsko, 2007, 8 vzorků;
- Lyangar (37°47' N 72°41' E) a Dzhaushangoz (37°21' N 72°28' E), Pamír, Tádžikistán, 2008, 4 vzorky.

IV.1.2. Studovaný hostitelský druh: hýl rudý *Carpodacus erythrinus* (Pallas, 1770)

Hýl rudý (*Carpodacus erythrinus*) je malý (20 g), semikoloniální, sociálně monogamní pěvec patřící do čeledi Fringillidae, podčeledi Carduelinae (Cramp et al. 1994).

Hnízdní areál jeho rozšíření zahrnuje mírný pás Palearktu, kde vytváří několik poddruhů. V Evropě se vyskytuje jediný poddruh jediný – *C. e. erythrinus* (viz obr.6.)



Obr. X. Mapa hnízdního areálu (šedě) hýlá rudého (*Carpodacus erythrinus*) s areály jednotlivých poddruhů (upraveno dle Pavlova 2005). Červeně jsou vyznačeny místa původu našich vzorků.

Hýl rudý obývá především houštiny na okrajích lesních porostů, křovité a zmlazující porosty, či izolované skupiny keřů na vlhkých loukách v okolí vodních toků nebo přímo v říčních údolích (Cramp et al. 1994). Česká republika se nachází na samém okraji jeho hnízdního areálu a jedná se o poměrně nový druh v naší fauně. První hnízdění bylo zaznamenáno v roce 1962 a od té doby se zdejší populace pomalu zvětšuje. Podle posledních odhadů u nás hnízdí v současné době okolo 1300-2000 párů, z toho asi 200 na Šumavě (Šťastný et al. 2006). Tento nárůst je v souladu s údaji z jiných částí Evropy, kdy se uvádí, že tento druh expanduje na západ a sever zhruba od 30. let minulého století (Cramp et al. 1994).

Hýl rudý na rozdíl od většiny ostatních pěvců krmí svá mláďata převážně semeny, méně často hmyzem. Jedná se o tažný druh, který je z evropského kontextu netypický místem svého zimoviště – tyto ptáci zimují v jižní Asii (pravděpodobně v Indii a Pákistánu). Extrémně dlouhá tažná vzdálenost také vede k velmi specifickému načasování pelichání. Tito ptáci přepeřují už po příletu na zimoviště (tedy během pozdního podzimu a zimy), ale před migrací

zpět na hnízdiště už znovu nepelichají (Cramp et al. 1994). Na naše území přilétá zhruba v polovině května jako jeden z posledních tažných pěvců. Samci přilétají zhruba pět dní před samicemi. Hnízdní sezóna je extrémně krátká a důsledkem je synchronizované hnízdění. Hýl rudý je neteritoriální a kvalita teritoria tedy nemůže být signálem kvality samce. Poměr pohlaví je u dospělých jedinců vychýlen ve prospěch samců, což mezi nimi vyvolává silnou kompetici (Bjorklund 1990). U hýla rudého byla jako u mnoha jiných pěvců prokázána přítomnost mimopárových paternit (Albrecht et al. 2007).

Zbarvení dvouletých a starších samců kolísá od žluté po rudou a je způsobené karotenoidy. Samci jsou zbarveni zejména na čele, temeni, týlu, hrdle a kostřci. Jednoletí samci jsou olivově hnědí, to znamená zbarvení podobně jako samice. U starších samců bylo ale prokázáno, že samec nezískává stále červenější zbarvení s věkem (Albrecht et al. 2007). Jednotliví samci se ale v reprodukčním úspěchu výrazně liší. Přestože samice při párování nijak více vybarvené samce neupřednostňují, dosahují červenější signifikantně většího reprodukčního úspěchu (červenější samci mají více mimopárových paternit a jsou samicemi i méně podváděni) (Schnitzer 2003).

Hýl rudý hnízdí jednou do roka a výběr místa pro stavbu hnízda provádí samice. Na studované lokalitě ptáci hnízdili převážně v porostech tavolníku vrboлистého (*Spiraea salicifolia*), zhruba 1-1,5 m nad zemí (Albrecht 2004).

IV.1.3. Sběr vzorků v terénu

Tato část terénní práce byla provedena studenty a pracovníky katedry zoologie PřF UK v rámci projektů a jako součást metodiky méj diplomové práce je uvedena především kvůli tomu, že i způsob sběru dat hraje podstatnou roli v následné detekci krevních parazitů (protože se ale nejednalo přímo o moji práci, je zde metodika sběru těchto dat uvedena jen stručně, s důrazem na fakty, které fakta, která by mohly být významná pro detekci parazitů a následné statistické vyhodnocení jejich vlivu na nejrůznější charakteristiky jedinců hostitelského druhu).

Dospělci hýla rudého byli chytáni do sítí po přiletu na lokalitu, to znamená v polovině května. Jedinci, které se nepodařilo chytit v tomto období, byli odchyceni později u hnízd v době krmení (v průběhu června). Každý rok byla během studie nalezena pravděpodobně všechna hnízda na studované lokalitě. Hnízda byla hledána detailním prohledáváním jednotlivých skupin keřů tavolník vrboлистý (*Spiraea salicifolia*) (viz obr.7.).



Obr. 7. Hledání hnízd hýlů v porostech tavolníků na lokalitě v roce 2008

Ihned po odchytení byli ptáci transportováni do polní laboratoře, kde byli zváženi, byla jim změřena délka tarzu a samci byli vyfotografováni pro analýzu intenzity zbarvení (sběr jednotlivých dat stručně komentován na konci metodiky, s uvedením let, pro která byla daná data shromážděna a autory studií). Krev byla odebrána z loketní žíly *vena ulnaris* (přibližně 50-70 μ l) a uložena v 96% etanolu v 1,5 ml mikrozskumavkách pro pozdější izolaci DNA. Z kapky krve byly rovněž vytvořeny krevní roztěry.

Krev mláďat pro izolaci DNA i vytvoření krevních roztěrů byla odebírána ve věku 7 dnů. Během roku 2008 byla rovněž odebírána krev ptáků jiných druhů chycených náhodně do sítí na studované lokalitě (viz tabulka XX. v oddílu výsledky) především pro účely zjištění diverzity genetických linií krevních parazitů.

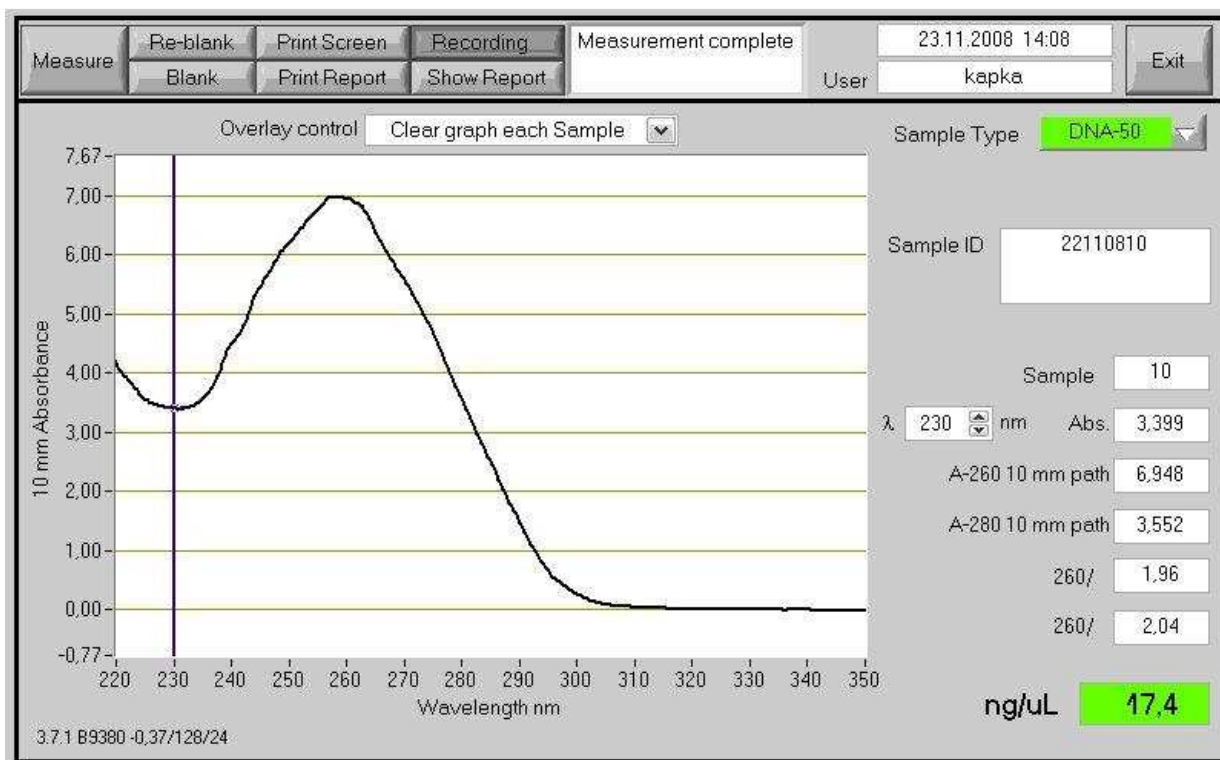
Metodika odchyty a odběru krevních vzorků je podrobněji popsána v původních pracích zabývajících se různými aspekty biologie hýla rudého na studované lokalitě (Schnitzer 2003, Vinkler 2007).

IV.2. LABORATORNÍ A BIOINFORMATICKÉ METODY

IV. 2.1 Izolace DNA a kontrola její kvality

Izolace DNA byla prováděna z krevních vzorků uložených v 96% etanolu skladovaných při -20 °C. Sterilními nástroji bylo odebráno 5-10 mg sražené krve, ta byla důkladně vysušena a DNA z ní poté izolována a purifikována pomocí DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop® ND-1000 (Isogen Life Science, Utrecht, Nizozemí).

Koncentrace se pohybovala mezi 5-20 ng/μl, výjimečně se výrazně odchýlila směrem k vyšším hodnotám. Vzorky s koncentrací 5-20 ng/μl byly použity do PCR reakce přímo bez ředění, vzorky výrazně převyšující tuto koncentraci byly naředěny přibližně na hodnoty 10 ng/μl. U nižších koncentrací se občas vyskytovalo znečištění v oblasti vlnové délky 230 nm způsobené pravděpodobně fenoly či od nich odvozenými sloučeninami a v oblasti vlnové délky 280 nm způsobené peptidy s vysokým podílem aminokyselin s aromatickými jádry. Většina analyzovaných vzorků však prezentovala jasně rozeznatelný peak v oblasti vlnové délky 260 nm, což odpovídá nukleovým kyselinám (viz obr.8.).



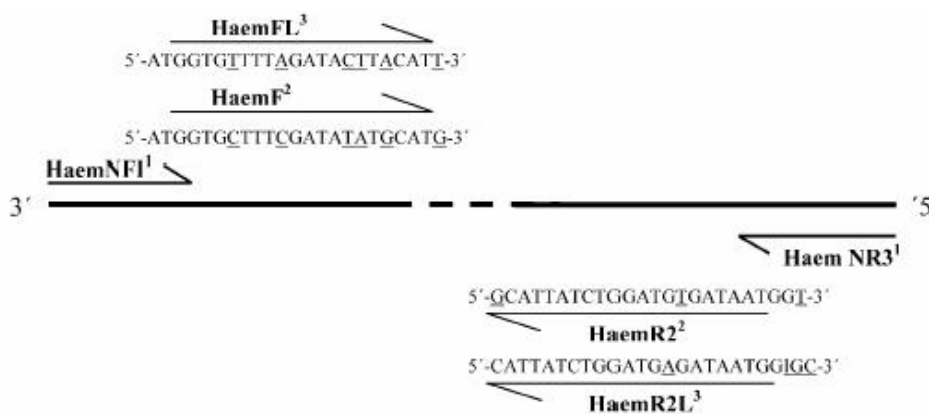
Obr.8. Výstup ze spektrofotometru ukazující na optimální čistotu a koncentraci DNA

Abychom si byli jistí, že naměřené hodnoty okolo 260nm skutečně odpovídají DNA, že vzorek není příliš znečištěn a především, že vyizolovaná DNA patří skutečně cílovému studovanému organismu, byla se všemi vzorky izolované DNA provedena kontrolní PCR s primery L5215 (5'-TATCGGGCCCATACCCCGAAAAT-3') (Hackett 1996) a H1064 (5'-CTTTGAAGGCCTTCGGTTTA-3') (Drovetski et al. 2004) amplifikujícími 1041 bázový úsek hýlí mitochondriální DNA (podjednotka 2 NADH dehydrogenázy) (Pavlova et al. 2005). Podmínky PCR byly nastaveny dle Pavlova et al. (2005). Tam, kde jsme dostali negativní výsledek (méně jak 5 % vzorků), byla DNA naředěna 1:5 (případně lehce jinak, s přihlédnutím k výsledkům ze spektrofotometru) vodou a celá kontrolní procedura se opakovala. V případě opětovného neúspěchu jsme přistoupili k nové izolaci DNA ze zásobní krve (a celý proces kontrolní PCR byl proveden znovu než byly získány pozitivní výsledky na přítomnost hýlí DNA u všech vzorků).

IV.2.2. Molekulární detekce parazitů: Nested PCR

K molekulární detekci parazitů byla použita vysoce citlivá nested PCR umožňující rozlišit mezi nákazami rodem *Leucocytozoon* a zbylými dvěma rody *Plasmodium* a *Haemoproteus*. Vysoká citlivost znamená v tomto případě schopnost spolehlivě zachytit jeden infikovaný erytrocyt na 100 tisíc zdravých (Hellgren et al. 2004).

Jedná se o dvojstupňovou PCR se dvěma sadami primerů. První sadou vnějších primerů HaemNFI (5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3') (I je univerzální báze inosin) a HaemNR3 (5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3') amplifikujeme v počáteční PCR 566 bázový (včetně primerů) úsek genu pro cytochrom *b* všech třech zmíněných rodů hemosporid. Druhou sadu tzv. vnitřních primerů HaemF (5'-ATGGTGCTTTTCGATATATGCATG-3') a HaemR2 (5'-GCATTATCTGGATGTGATAATGGT-3') specifických pro rody *Haemoproteus* a *Plasmodium* použijeme k amplifikaci 527 bázového úseku (včetně primerů, 480 bp bez primerů) v tzv. finální PCR, kdy jako templát použijeme produkt počáteční PCR. Poté stejně v samostatné finální PCR použijeme primery HaemFL (5'-ATGGTGTTTTAGATACTTACATT-3') a HaemR2L (5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIGC-3') specifické pro rod *Leucocytozoon* pro amplifikaci 527 bázového úseku (včetně primerů, 478 bp bez primerů) (viz obr.9).



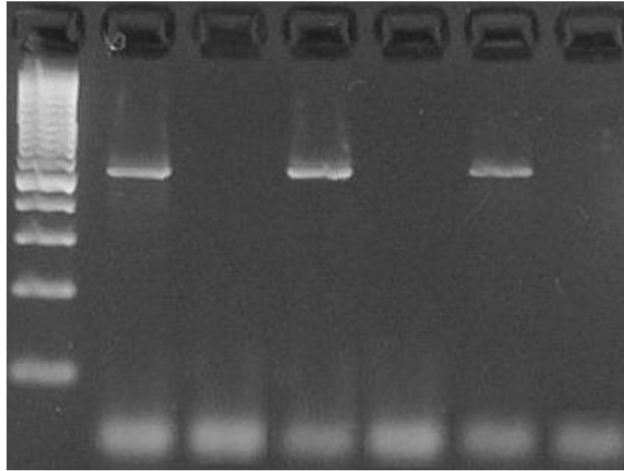
Obr.9. Schématické znázornění kombinace primerů:
 1) primery pro počáteční fázi nested PCR,
 2) kombinace primerů pro amplifikaci linií rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium*
 3) kombinace primerů pro amplifikaci linií rodu *Leucocytozoon*
 (upraveno dle Hellgren 2004)

Počáteční PCR byla provedena v objemu 10 μ l s 4 μ l (20-80 ng) neředěné DNA, 5 μ l Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Německo) a 0,5 μ M každého vnějšího primeru (HaemNFI, HaemNR3).

Podmínky iniciální PCR reakce byly následující: z důvodu použití Qiagen Multiplex PCR Master Mix obsahujícího HotStar *Taq* DNA polymerázu byly na počátku reakce inkubovány 10 minut při teplotě 94 $^{\circ}$ C. Vlastní cyklus sestával z 30 sekund denaturace při 94 $^{\circ}$ C, 30 sekund nasedání primerů (annealingu) při 50 $^{\circ}$ C, a 45 sekund syntézy řetězce DNA (elongace) při 72 $^{\circ}$ C. Počet opakování cyklu byl v počáteční fázi nastaven na 20. Po skončení cyklování byla 10 minut udržována teplota 72 $^{\circ}$ C.

Poté jsme použili 3 μ l produktu z počáteční PCR reakce jako templát pro finální PCR reakce 1,5 μ l bylo použito pro *Leucocytozoon* spp. (HaemFL–HaemR3L) a 1,5 μ l pro *Haemoproteus* spp.–*Plasmodium* spp. (HaemF–HaemR2). Tyto reakce byly provedeny každá samostatně v objemu 30 μ l použitím 3 μ l PCR pufu (Promega, Madison, USA; složení na jednu reakci 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9), 1% Triton® X-100), 0,2 mM od každého deoxyribonukletid trifosfátu (Fermentas, Burlington, Kanada), 1,5 mM MgCl₂ (Promega, Madison, USA), 0,67 μ M od každého vnitřního primeru, 1 U rekombinantně vyrobené DNA polymerázy (poskytnuta laboratoří dr. P. Boursota, Laboratoire Genome et Populations, Universite Montpellier II) a zbytek do objemu 30 μ l byl doplněn vodou pro PCR (Qiagen, Hilden, Německo). Podmínky reakce byly stejné jako u počáteční reakce s tím, že chyběla 10 minutová fáze inkubace při 94 $^{\circ}$ C a počet cyklů byl stanoven na 35. Všechny PCR reakce byly prováděny v termocyklerech iCycler (Biorad, Hercules, USA) a PTC-200 (MJ Research, Waltham, USA).

Pro vyhodnocení přítomnosti parazitů bylo 5 µl konečného PCR produktu nanášeno spolu se standardem (Fermentas, Burlington, Kanada) na 2 % agarózový gel (Invitrogen, Carlsbad, USA) a po 30-40 minutách elektroforézy byla vyhodnocena pozitivita či negativita vzorků na elektroforetogramu (viz obr.10.)



Obr.10. Fotografie gelu se třemi pozitivními a třemi negativními vzorky spolu s nanášeným standardem.

Při molekulární detekci byla na každých 7 vzorků použita negativní kontrola, aby bylo možné opakovat detekci se vzorky, kde by hrozilo nebezpečí výskytu falešně pozitivních určení infekcí v důsledku kontaminace DNA infikovaného jedince v průběhu práce.

Všechny detekce pomocí nested PCR byly provedeny minimálně dvakrát, aby se omezilo nebezpečí výskytu falešně negativních výsledku v důsledku chyby PCR. Při práci s problematickými vzorky (velmi slabý signál, či nekonzistentní opakované výsledky) byly použity i pozitivní kontroly. Detekce u některých vzorků byly provedeny i vícekrát, v rámci zavádění metodiky nested PCR v naší laboratoři a její následné optimalizaci. Podle řady autorů je při molekulární diagnostice poměrně časté, že metody zavedené v konkrétní laboratoři je poměrně náročné adaptovat i podle identického protokolu v laboratoři jiné (Cosgrove et al. 2006; Szollosi et al. 2008). Proto jsme byli také nuceni podmínky našich reakcí oproti původnímu protokolu v průběhu vyladování metodiky mírně upravovat (v uvedené metodice je již popsán upravený protokol, podle něhož probíhala vlastní detekce pro potřeby mé diplomové práce).

IV.2.3. Určení genetických linií parazitů: sekvenace, editace sekvencí, práce s databázemi a tvorba fylogenetických stromů

Všechny pozitivní vzorky z nested PCR (zbylých 25 µl) byly pročištěny pomocí QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Německo) a připraveny na sekvenaci. Do sekvenační reakce bylo přidáno 4 µl pročištěného PCR produktu (40-100ng DNA, koncentrace změněny opět na spektrofotometru NanoDrop, viz výše), 0,01 mM primeru HaemF (v případě rodu *Leucocytozoon* HaemFL) a vše bylo doplněno vodou do PCR do objemu 14 µl. Srážecí reakce a sekvenační reakce (kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Lincoln, USA) byly provedeny v laboratoři sekvenace DNA na PřF UK, kde byla provedena i samotná sekvenace (sekvenátor 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Sekvence byly editovány a alignovány v programu BioEdit (Hall 1999). Všechny unikátní haplotypy lišící se o jednu a více záměn od sekvencí uložených v databázi GenBank (viz dále), byly osekvenovány od 3' konce primerem HaemR2 (respektive HaemR2L pro rod *Leucocytozoon*). Z obou komplementárních sekvencí byly za pomoci programu DNA Baser (HeracleSoftware, Lilienthal, Německo) vytvořeny kontigy, které byly později použity ve fylogenetických analýzách.

Určování a přiřazování linií pomocí databáze GenBank se v poslední době ukázalo pro případ ptačích hemosporid jako značně problematické. Poměrně často se zde vyskytuje chybné přiřazení morfologicky definovaných druhů k jednotlivým liniím (haplotypům, sekvencím genu pro cyt *b*), stejné linie zde figurují často pod několika názvy a kódy (Valkiunas et al. 2008e). Použili jsme proto pro pozdější práci se sekvencemi, alignmenty a určování linií databázi předního odborníka na ptačí hemosporida S. Bensch (Bensch et al. 2009).

V průběhu práce vznikla také nutnost pojmenovat nové linie hemosporid zachycené během studie. Toto pojmenování proběhlo v souladu se současným zvykem pojmenovávat každou unikátní linii, která se liší od známých haplotypů i jedinou záměnou v 480bp sekvenci cytochromu *b* používané pro barcoding. Jako jméno linie slouží dle doporučení zkratka prvních dvou písmen rodového a prvních dvou písmen druhového názvu hostitele a pořadí linie v dané studii, či v návaznosti na práce předešlých autorů. Není však ustáleno, zda z latinského či anglického názvu. Jednotlivé rody hemosporid se v názvu linie nerozlišují (Bensch et al. 2009). Protože autoři, kteří popsali první dvě linie z hýla rudého (Perez-Tris et al. 2007), použili anglický název a tudíž zkratku ROFI (ROse FIInch), rozhodli jsme se v tomto označování pokračovat a značili jsme nové linie ROFI3 až ROFI9. Přestože jednotný

system nebyl doposud oficiálně zaveden, existuje snaha o sjednocení dle výše uvedených pravidel, a proto jsme je od počátku projektu respektovali.

Fylogenetické stromy byly vytvořeny na základě našich sekvencí a sekvencí uložených v databázi MalAvi (Bensch et al. 2009), které jsou zpětně dohádátné i v databázi GenBank. Pro editaci sekvencí a tvorbu alignmentu byl použit program BioEdit v7.0.9 (Hall 1999). Při samotné tvorbě stromů byly využity programy MEGA4 (Tamura et al. 2007) a MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) s využitím metod Neighbour-joinig a Bayesiánská analýza (10 mil. generací, model GTR+I+G, 2 konvergentní běhy, 4 řetězce, burn-in 2,5 mil. stromů). Editace a grafická úprava stromů do finální podoby byla provedena s programem Dendroscope (Huson 2007).

IV.2.4. Detekce smíšených infekcí více liniemi hemosporid

Smíšené infekce rodem *Leucocytozoon* a rody *Plasmodium*/*Haemoproteus* bylo možné rozřešit už na základě nested PCR (Hellgren et al. 2004) pomocí částečně rodově specifických primerů (viz výše).

Určitý problém představují smíšené infekce rody *Haemoproteus* a *Plasmodium*, které výše zmíněný protokol neumí rozlišit, případně smíšené infekce několika liniemi jednoho rodu. Pokud obě linie vyvolávají dostatečně silné parazitémie, je možné smíšené infekce detekovat mikroskopicky na krevních roztěrech. Problémem při tomto přístupu ale je, že jedna linie většinou výrazně převažuje a méně hojná linie nemusí být na skle vůbec detekovatelná (Fallon et al. 2003).

S rozvojem molekulárních technik ve výzkumu ptačích hemosporid se smíšené infekce detekují několika možnými způsoby. Nejjednodušší (a nejlevnější) možnost, ale s vysokou časovou náročností a rizikem chyby, je detekce smíšených infekcí pomocí studia výstupu ze sekvenátoru, porovnáním jednotlivých sekvencí mezi sebou a sledováním dvojitých peaků. Pokud se dvojité peaky vyskytují na pozicích, kde je v našich liniích polymorfismus, případně se jedná o směsné sekvence (někdy je hlavní peak přiřaditelný k jedné linii a jiné pozici k jiné), můžeme z toho usuzovat na přítomnost smíšené infekce (Perez-Tris & Bensch 2005b).

Další možností je zaklonování PCR fragmentů do plazmidů a jejich následná sekvenace, tato alternativa je však finančně dosti nákladná, protože je často nutné osekvenovat velké množství klonů (Perez-Tris & Bensch 2005b).

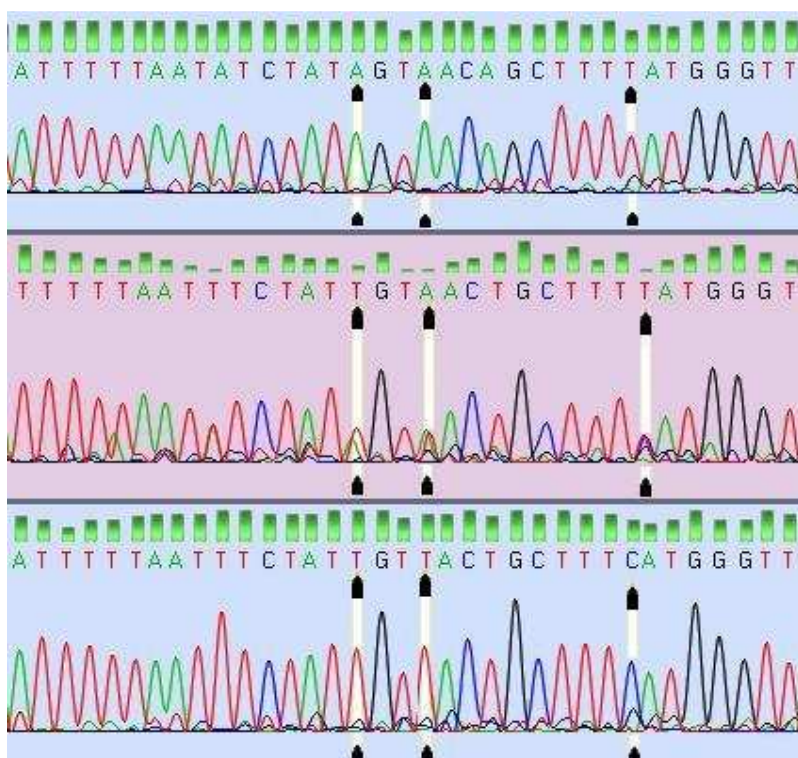
Třetí možností je vytvoření liniově specifických primerů. To je však možné pouze v případě, pokud známe drtivou většinu linií hemosporid v našem vzorku a jednotlivé linie musí být od sebe značně odlišné (Loiseau et al. 2008; Marzal et al. 2008).

V naší studii jsme se vydali cestou navržení specifických primerů, protože po sekvenaci produktů v nested PCR jsme znali jejich diverzitu a mohli jsme očekávat, že jsme zachytili většinu hojných linií. Specifické primery jsme navrhovali především na rozlišení infekcí rodu *Haemoproteus* a *Plasmodium*. U rodu *Leucocytozoon* jsme liniově specifické primery nenavrhovali, protože prevalence byla poměrně nízká a byla zde velmi nízká diverzita linií (jedna linie byla zodpovědná za většinu infekcí). Podle zastoupení sekvencí se rovněž zdálo rozumné vytvořit specifické primery na nejhojnější linii rodu *Haemoproteus* (ROFI2), protože byla značně odlišná od ostatních (méně hojných) linií (viz fylogenetický strom – obr.14). V konečném výsledku se nám podařilo navrhnout specifické primery na rod *Plasmodium*, nejhojnější linii rodu *Haemoproteus*, zbytek linií rodu *Haemoproteus* a jako kontrolu také specifické primery pro rod *Haemoproteus* obecně.

Jako templát pro všechny specifické primery jsme použili produkt z počáteční PCR dle Hellgren 2004 (viz výše) a specifické primery jsme použili jako vnitřní primery pro rodově (a částečně liniově) specifickou nested PCR. Primery specificky amplifikující 271 bp úsek cyt b rodu *Plasmodium* byly SelPlasF (5'-CATGCAACWGGTGCWTCATT-3') a SelPlasR (5'-TTTTTAAGGTTGGGTCACCTTACAAG-3'). Primery specificky amplifikující 150 bp úsek cyt b všech námi zachycených linií rodu *Haemoproteus* byly SelHaemF (5'-ATTGTTACYGCTTTYATGGGTTA-3') a SelHaemR (5'-TCTTTTTAAAGTTGGATCACTWATAGT-3'). Primery amplifikující 477 bp úsek cyt b nejhojnější linie rodu *Haemoproteus* (ROFI2) byly SelH62F (5'-ATATGCATGCTACTGGAGCTA-3') a SelH62R (5'-AATAAACTTTGTGCTAAAAATATA-3') a konečně primery amplifikující 471 bp úsek cyt b ostatních (méně hojných) linií rodu *Haemoproteus* byly SelH392F (5'-TGCTACCGGTGCTACATTTG-3') a SelH392R (5'-AATAAACTTTGTGCTAGAAATAGG-3'). Složení a podmínky PCR reakce byly stejné jako u finální fáze standardní nested PCR dle Hellgren 2004 s tou výjimkou, že reakce probíhala v třetinovém objemu (10 µl). S 5 µl produktu byla provedena elektroforéza (viz výše) a byly vyhodnoceny pozitivní vzorky. Proběhla kontrola na již známou infekci ze sekvenace a bylo ověřeno, zda jsou konzistentní výsledky se specifickými primery amplifikujícími všechny (námi zachycené) linie rodu *Haemoproteus*.

Ačkoliv výše uvedená technika nevylučuje možnost nákazy jednoho jedince několika liniemi rodu *Leucocytozoon* nebo *Plasmodium* nebo méně hojnými liniemi rodu *Haemoproteus*, je vzhledem k jejich prevalenci v populaci toto nebezpečí zanedbatelné (viz kapitola výsledky).

Zachycené smíšené infekce byly poté ještě navíc ověřeny i pomocí dvojitých peaků na sekvenčních datech v programu DNA Baser (viz obr.11.)



Obr.11. Vyšetření třech sekvencí hemosporid v programu DNA Baser. První a poslední sekvence představují infekce jednou linií parazita (unikátním haplotypem). U prostřední sekvence se jedná o smíšenou infekci právě těmito dvěma liniemi (černé šipky označují pozice, ve kterých se dvě původní sekvence liší a kde „smíšená“ sekvence vykazuje dvojité peaky).

IV.2.5. Mikroskopická detekce parazitů: vyšetření krevních roztěrů

Krevní roztěry z kapky krve hostitelů byly vytvořeny v rámci předchozích projektů. Roztěry vytvořené v terénní laboratoři byly fixovány metanolem a barveny Pappenheimovou metodou (3 minuty v koncentrovaném May-Grünvald roztoku, 2 minuty ve stejném roztoku ale naředěném 1:1 destilovanou vodou, poté barveny Giemsou ředěnou 1:40 destilovanou vodou, opláchnuty destilovanou vodou a usušeny). Krevní roztěry jsou k dispozici z let 2004-2008. Roztěry z let 2004-2005 vyšetřoval Jan Votýpka, já jsem v rámci své diplomové práce vyšetřoval roztěry z let 2006-2008.

Všechny roztěry byly vyhodnocovány na světelném mikroskopu Axiophot metodou podle Votýpka 2003. Nejprve byly roztěry vyšetřovány 5 minut při zvětšení 200x (což odpovídá 50 polí). Poté byl každý roztěr pozorován dalších 10 minut při zvětšení 1000x (což odpovídá 100 polím, tj. zhruba 10 000 erytrocytů). Pokud nebyl za tuto dobu zaznamenán žádný parazit ze skupiny Haemosporida, byl vzorek nadále považován za negativní. Určení druhů hemosporid na základě morfologických charakteristik bylo provedeno dle Valkiunas 2005.

IV.2.6. Statistické analýzy a další výpočty

Pro testování vlivu proměnných na pravděpodobnost výskytu malárií v kapitole VI.2. byly využity zobecněné lineární modely (GLM). Analýzy byly provedeny ve statistickém softwaru S-PLUS 8.0 (TIBCO Spotfire, Palo Alto, USA). Podle potřeby byla zvolena logit či log link funkce. Fitován byl vždy plný model včetně smysluplných dvojných interakcí. Jednotlivé členy modelu byly odstraňovány postupně, přičemž modely byly porovnávány za použití likelihood-ratio testů a Chi2 statistiky (Crawley 2007). Zjednodušování modelu bylo zahájeno odstraňováním interakcí a posléze i hlavních efektů (pokud nebyly členem průkazné interakce). Presentovány jsou minimální adekvátní modely (MAM), tj. modely se všemi členy průkaznými (Crawley 2007). Za signifikantní byly považovány hodnoty $\alpha < 0,05$.

Index R_{25} byl získán z kumulativního počtu linií u náhodně seřazeného souboru všech vyšetřovaných hostitelů. Aby se zamezilo vlivu náhody, bylo provedeno 1000 opakování s randomizovaným souborem dat o infekcích jednotlivými liniemi (skript využívající skriptovacího jazyka Perl) a na základě průměrných hodnot vytvořen graf a určen index R_{25} .

IV. 3. METODIKA IDENTIFIKACE POTENCIONÁLNÍCH PŘENAŠEČŮ NA STUDOVANÉ LOKALITĚ

IV.3.1. Odchyt hematofágního hmyzu

Odchyt potencionálních přenašečů probíhal přímo na studijní lokalitě (viz výše) ve dvou termínech a to na počátku (8. -12.) a na konci (26. -27.) června 2008 (během hnízdění hýlů). Použil jsem odchytové CDC pasti (bez světelného zdroje) (BioQuip Products, Rancho Dominguez, USA) na hematofágní hmyz lákaný na sentinelové hostitele. Pro tento účel posloužily v prvním odchytovém termínu zebřičky (*Taeniopygia guttata*) a křepelky japonské (*Coturnix japonica*) pocházející z chovů. V druhém termínu jsme použili pouze zebřičky (viz obr.12). Sentinely jsme použili z toho důvodu, že jsme chtěli odchytit především ornitofilní druhy hematofágního hmyzu. Jako kontrolní past lákající hematofágní hmyz nespecificky, byla použita CDC fotopast s ultrafialovým světelným zdrojem (BioQuip Products, Rancho Dominguez, USA).



Obr.12. Klec se sentinelovými ptáky, zebřičkami (*Taeniopygia guttata*), a CDC past připevněná ke kleci

Pomocí výše zmíněného protokolu nested PCR dle Hellgren et al. 2004 byly vyšetřeny křepelky i zebřičky na přítomnost krevních hemosporid. A to jak před zahájením odchyty, tak i měsíc po ukončení práce v terénu (prodleva kvůli inkubační době infekce a prepatentní periodě – viz níže v úvodu o životních cyklech).

K odchytu na studijní lokalitě jsme si vybrali dva habitaty: okraj smíšeného lesa a zaplavený porost vrb uprostřed volného prostranství v centru lokality (viz obr.13.), kde se vyskytovali dospělí hýlové. V otevřeném křovinném biotopu, kde hýl hnízdí, bylo problematické pasti instalovat a klást pasti přímo k hnízdům není možné kvůli riziku predace.



Obr.13. Odchyt vektorů v zaplaveném vrbovém porostu s využitím křepelek japonských (*Coturnix japonica*) jako sentinelů a dvěma CDC pastmi připevněnými ke kleci

Klece se sentinelovými hostiteli byly instalovány do výšky 1 – 1,5 m a okolo každé klece byly pověšeny dvě (při druhém termín čtyři) CDC pasti (viz obr.12). Na každé stanoviště byly umístěny v prvním odchytovému termínu dvě klece se sentinelami (jedna se zebříčkami, druhá s křepečkami). V druhém odchytovému termínu jsme použili na každé stanoviště pouze jednu klec, a to se zebříčkami. Pasti byly instalovány večer (mezi 18-20 hodinou) a nacytaný hmyz byl odebíráán následující ráno v 8 hodin.

IV.3.2. Určování hematofágního hmyzu

Hmyz lapaný do CDC pastí byl přímo na lokalitě umístěn do 70% lihu, kde byl uchován pro následné určení. K determinaci hmyzu jsme používali stereo lupou a pro ověření správného určení tiplíků jsme zhotovili trvalé preparáty – vždy několika zástupců od každého druhu (zamontováním do media CMCP-9 a CMCP-10, Polyscience, Warrington, USA). Určení bylo provedeno dle klíče Chvála 1980. Pod stereo lupou byly rovněž odděleny zadečky u nasátých samic tiplíků, abychom vyloučili možnou kontaminaci při molekulární detekci parazitů nasátou krví, protože naší snahou bylo zachytit infekční sporozoity ze slinných žláz. U ostatních rodů nebyly nasáté samice pro molekulární detekci parazitů použity vůbec, a to

z důvodu jejich větší velikosti a teoreticky většího nebezpečí kontaminace krví z jiných částí trávicí soustavy (nasátých samic bylo ale v případě všech studovaných rodů hematofágního hmyzu jen mizivé procento, viz výsledky). I pokud by k náhodné kontaminaci nasátou krví došlo, lze předpokládat, že by se jednalo o krev sentinelů, kteří byli při všech vyšetřeních negativní.

IV.3.3. Detekce hemosporid v odchyceném hematofágních hmyzu

Odchycené samice rodu *Culicoides* byly rozděleny do skupin po 50 jedincích, pokud některý druh v rámci daného odchytového termínu zahrnoval méně než 50 jedinců, byly vytvořeny menší skupiny. Samice ostatních rodů (*Culex*, *Aedes* a *Eusimulium*) byly rozděleny do skupin po 10 jedincích. Samice byly vysušeny od zbytků líhu a v mikrozkuřkách rozdrceny. Poté z nich byla standardní metodou (viz výše) vyizolována DNA. Molekulární detekce parazitů byla provedena metodou nested PCR (dle Hellgren a viz výše) dle identického protokolu (jako by se jednalo o hýlí DNA). Stejným způsobem tak proběhlo i vyhodnocení pozitivních výsledků. Vyhodnocení smíšených sekvencí proběhlo jen na základě dvojitých peaků v programu DNA Baser (viz výše), protože na linie detekované u tiplíků jsme neměli vytvořené specifické primery (v případě malého počtu sekvencí to však nebylo problematické a otázka diverzity linií byla značně přehledná).

IV.4. ZÍSKÁVÁNÍ DAT O HOSTITELSKÉM DRUHU

Zde uvádím stručnou metodiku získávání základních informací o hostitelském druhu hýlivi rudém (*Carpodacus erythrinus*).

Váha, tělesné rozměry a odhad celkové velikosti – všichni jedinci byli zváženi pomocí váhy Pesola (MicroLine) a byla jim změřena délka levého tarzu pomocí digitálního měřidla Kinex (6040.2; přesnost 0,01 mm). Váha jedince byla posléze vydělena délkou jeho tarsu a tato standardizovaná hodnota použita v analýzách jako indikátor kondice daného jedince (Vinkler 2007).

Reprodukční úspěch samců (zjišťování paternity v hnízdech) – paternity byly určovány pomocí 3 vysoce variabilních mikrosatelitových lokusů (LOX2, LOX7 a LOX8) (Piertney et al. 1998). Každý studovaný jedinec měl v těchto lokusech unikátní genotyp. Genotypy mláďat byly poté porovnány s genotypem předpokládaného otce (sociálního partnera matky mláďat) a tento byl potvrzen nebo vyloučen jako biologický otec mláďat (Schnitzer 2003, Albrecht 2007).

Reprodukční úspěch samic – díky pravidelným kontrolám a dobré znalosti biologie studovaného druhu hostitele byl určen počet vajec krátce po snesení posledního z nich. Načasování hnízdění bylo rovněž určeno s přesností na jeden den díky pravidelným kontrolám (Vinkler 2007).

Úroveň červeného zbarvení samců – všichni zkoumaní samci byli fotografováni v polní laboratoři digitálním fotoaparátem Olympus C-765 za stejných podmínek (osvětlení, vzdálenost, nastavení fotoaparátu) na šedém pozadí s použitím barevných standardů (profesionální set od firmy Kodak). Z fotografií byla následně analyzována barva hrudi. Její barva byla standardizována v programu Adobe Photoshop 10.0 CS.3 vzhledem k barevné škále a pozadí na fotografii. Barva byla poté analyzována z 12 bodů na hrudi se stejným rozmístěním u všech studovaných samců. Hodnoty z 12 bodů byly zprůměrnovány a výsledkem byly tři průměrné hodnoty H (hue – „odstín“), S (saturation – „sytost“) a B (brightness – „jas“) (Schnitzer 2003, Schnitzer nepubl. data).

Zjištění počtu alel MHC I – počet alel MHC I byl zjištěn pomocí metody SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) využívající variability alel exonu 3 genu pro MHC I. SSCP byla provedena na kapilárovém sekvenátoru ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems (Promerová M. 2007).

Celková heterozygotnost – pro zjištění celkové heterozygotnosti u vybraných jedinců bylo použito 17 polymorfních mikrosatelitových lokusů (Poláková et al. 2007).

V VÝSLEDKY

V.1. EPIZOOTOLOGIE PTAČÍCH HEMOSPORID U HÝLA RUDÉHO NA ZÁKLADĚ PCR DETEKCE

V.1.1. Celkový počet vyšetřovaných vzorků, celková prevalence a smíšené infekce

Molekulárními metodami bylo vyhodnoceno celkem 321 krevních vzorků adultů, což odpovídá 279 jedincům (někteří ptáci z šumavské lokality byli chyceni víc sezón po sobě) a 24 vzorků mládřat ve věku 7 dní.

Celková prevalence všech hemosporid u dospělců hýla rudého dosahovala 61,7 %. Z toho bylo 74,2 % infekcí způsobeno pouze jednou linií parazita a 25,8 % bylo smíšených (22,2 % způsobeno 2 liniemi; 3,0 % způsobeno třemi liniemi a u jednoho jedince (0,5 %) byla zjištěna nákaza 4 liniemi).

U mládřat nebyla žádná infekce dle předpokladů zachycena (viz III. 3.2.4), proto jsme již v analýze většího počtu vzorků mládřat nepokračovali a ve výpočtech nejsou vyšetřovaná mládřata do celkového počtu jedinců zahrnuta.

V.1.2. Detekované rody ptačích hemosporid, počty unikátních linií a jejich prevalence

Během studie jsme u hýla rudého detekovali všechny tři rody ptačích hemosporid (*Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*) a v jejich rámci jsme určili celkem 24 unikátních linií. Z toho 12 linií patřilo k rodu *Plasmodium*, 6 linií k rodu *Haemoproteus* a 6 linií k rodu *Leucocytozoon*.

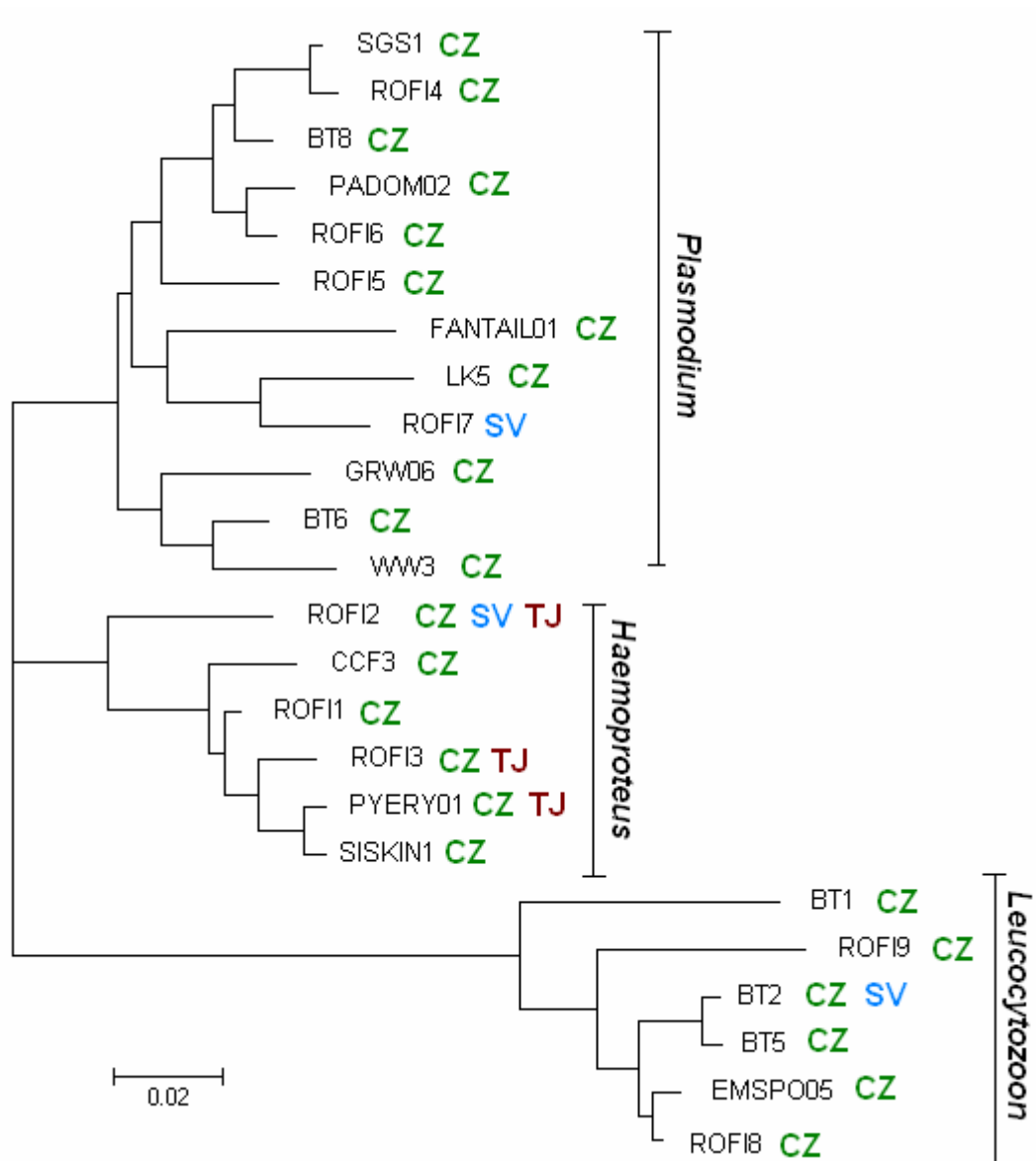
Nejvyšší prevalenci, a to 55,1 %, vykazovali zástupci rodu *Haemoproteus* (zejména díky velmi hojné linii ROFI2), prevalence rodu *Plasmodium* dosahovala 15,0 % a rodu *Leucocytozoon* 10,0 % (součet prevalencí je vyšší než celková prevalence a to vzhledem ke smíšeným infekcím).

Přehled detekovaných linií nabízí následující tabulka 2. Pokud byly sekvence našich linií naprosto identické se sekvencemi již známých linií, je uveden název linie z databáze MalAvi. Linie, které se lišili alespoň v jedné pozici, jsou považovány (v souladu se současnými zvyklostmi) za nové linie a jsou pojmenovány dle návrhu autorů databáze MalAvi (viz kapitola V.6.).

Tabulka 2. Přehled všech detekovaných linií s uvedením celkových prevalencí a podílem jednotlivých linií na infekci v rámci daného rodu. Plas. sp. a Haem. sp. představují pozitivní infekce, u nichž se nepodařilo určit přesné zařazení ke konkrétní linii (většinou slabé infekce neumožňující sekvenaci nebo infekce určené na základě rodově specifických primerů nevykazující však dvojité peaky na sekvenačním diagramu).

název linie	rod parazita	počet infekcí	prevalence	podíl na infekcích v rámci rodu
SGS1	<i>Plasmodium</i>	17	5,3%	35,4%
Plas.sp.	<i>Plasmodium</i>	9	2,8%	18,8%
WW3	<i>Plasmodium</i>	5	1,6%	10,4%
PADOM02	<i>Plasmodium</i>	5	1,6%	10,4%
FANTAIL01	<i>Plasmodium</i>	3	0,9%	6,3%
BT6	<i>Plasmodium</i>	2	0,6%	4,2%
BT8	<i>Plasmodium</i>	1	0,3%	2,1%
ROFI4	<i>Plasmodium</i>	1	0,3%	2,1%
LK05	<i>Plasmodium</i>	1	0,3%	2,1%
ROFI5	<i>Plasmodium</i>	1	0,3%	2,1%
ROFI6	<i>Plasmodium</i>	1	0,3%	2,1%
GRW06	<i>Plasmodium</i>	1	0,3%	2,1%
ROFI7	<i>Plasmodium</i>	1	0,3%	2,1%
ROFI2	<i>Haemoproteus</i>	154	48,0%	87,0%
CCF3	<i>Haemoproteus</i>	5	1,6%	2,8%
Haem.sp.	<i>Haemoproteus</i>	5	1,6%	2,8%
ROFI1	<i>Haemoproteus</i>	4	1,2%	2,3%
SISKIN1	<i>Haemoproteus</i>	4	1,2%	2,3%
ROFI3	<i>Haemoproteus</i>	3	0,9%	1,7%
PYER1	<i>Haemoproteus</i>	2	0,6%	1,1%
BT2	<i>Leucocytozoon</i>	25	7,8%	78,1%
ROFI8	<i>Leucocytozoon</i>	2	0,6%	6,3%
ROFI9	<i>Leucocytozoon</i>	2	0,6%	6,3%
BT1	<i>Leucocytozoon</i>	1	0,3%	3,1%
BT5	<i>Leucocytozoon</i>	1	0,3%	3,1%
EMSPO05	<i>Leucocytozoon</i>	1	0,3%	3,1%

Fylogenetické vztahy mezi liniemi stručně ilustruje následující fylogenetický strom (obr.14). Ve stromu jsou znázorněny jen linie zachycené v naší studii. Za názvem linie je uvedena lokalita, ze které pocházel pták, u kterého byla daná linie detekována. Strom je pouze ilustrační a byl vytvořen metodou neighbour-joining. Jeho účelem je jen přehledně informovat o přibližné genetické vzdálenosti mezi liniemi v rámci studovaného druhu, jejich diverzitě a geografickém rozšíření. Stromy se zahrnutím více taxonů a použitím sofistikovanějších metod jsou v kapitole Specifity (viz VI.3.).



Obr.14. Ilustrační fylogenetický strom (NJ) s liniemi hemosporid detekovanými v hýlovy rudém (*Carpodacus erythrinus*) s vyznačením rodů parazitů a uvedením místa původu vzorku (CZ – lokality Vltavský luh a Rychtářky; SV – vzorky ze Švédska, TJ – vzorky z Pamíru, Tádžikistán).

V.1.3. Epizootologie na jednotlivých lokalitách

V.1.3.1. Lokalita Vltavský luh (Šumava viz V.1.) z let 2000 - 2008

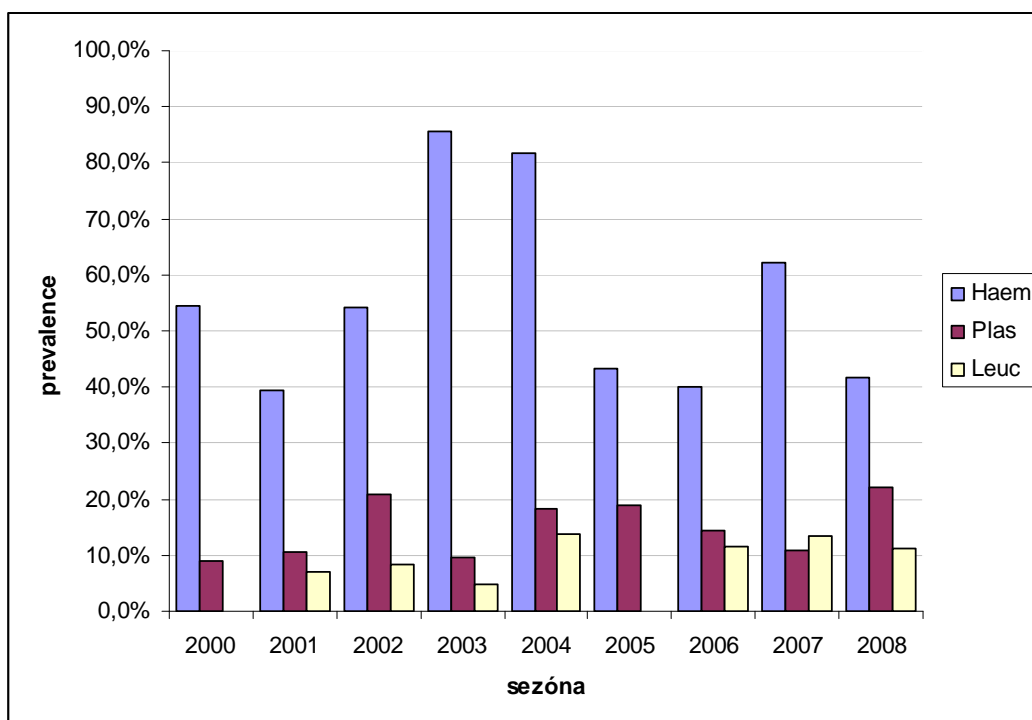
Prevalence a linie

Molekulárními metodami bylo vyšetřeno 251 krevních vzorků odpovídajících 208 jedincům (někteří ptáci byli chyceni víc sezón po sobě) (viz příloha 1). Z toho bylo 155 vzorků samců (134 jedinců), 96 vzorků samic (74 jedinců) a 16 vzorků z mlád'at. Mlád'ata nebyla ve výpočtech dále uvažována, protože nebyla infikována hemosporidy. Celková prevalence ptačích hemosporid u adultů dosahovala v letech 2000 - 2008 na lokalitě 61,4 %; 57,4 % pro samce, 67,7 % pro samice. Prevalence jednotlivých rodů hemosporid je zachycena na grafu

2., počty smíšených infekcí a jejich podíl na celkové prevalenci jsou shrnuty v tabulce 4. a na grafu 3.. Na této lokalitě jsme našli 22 linií hemosporid, tedy všechny linie zachycené u studovaného druhu s výjimkou jedné linie rodu *Plasmodium* (ROFI7) a jedné linie rodu *Haemoproteus* (PYERY1). Tabulka 3. uvádí celkové prevalence a prevalence jednotlivých linií pro konkrétní roky na šumavské lokalitě.

Tabulka 3. Přehled počtu vyšetřovaných jedinců z lokality Vltavský luh z let 2000-2008, celkové prevalence pro daný rok, prevalence nejhojnějších linií a rodů a podíl linií na celkové prevalenci.

sezóna	celkem jedinců	prevalence	ROFI2	Haem ostatní	Haem sp.	SGS1	Plas ostatní	Plas. sp.	BT2	Leuc ostatní
2000	11	54,5%	6	0	0	0	1	0	0	0
2001	28	50,0%	10	0	1	2	1	0	2	0
2002	24	62,5%	11	1	1	1	3	1	1	1
2003	21	90,5%	16	2	0	1	1	0	1	0
2004	22	81,8%	16	2	0	2	0	2	2	1
2005	37	54,1%	14	2	0	1	5	1	0	0
2006	35	54,3%	14	0	0	2	3	0	2	2
2007	37	67,6%	22	1	0	1	2	1	4	1
2008	36	50,0%	13	2	0	3	5	0	2	2
2000-2008	251	61,4%	122	10	2	13	21	5	14	7
prevalence linií			48,6%	4,0%	0,8%	5,2%	8,4%	2,0%	5,6%	2,8%
prevalence rodů			53,4%			15,5%			8,4%	
podíl linií na celkové prevalenci			62,9%	5,2%	1,0%	6,7%	10,8%	2,6%	7,2%	3,6%

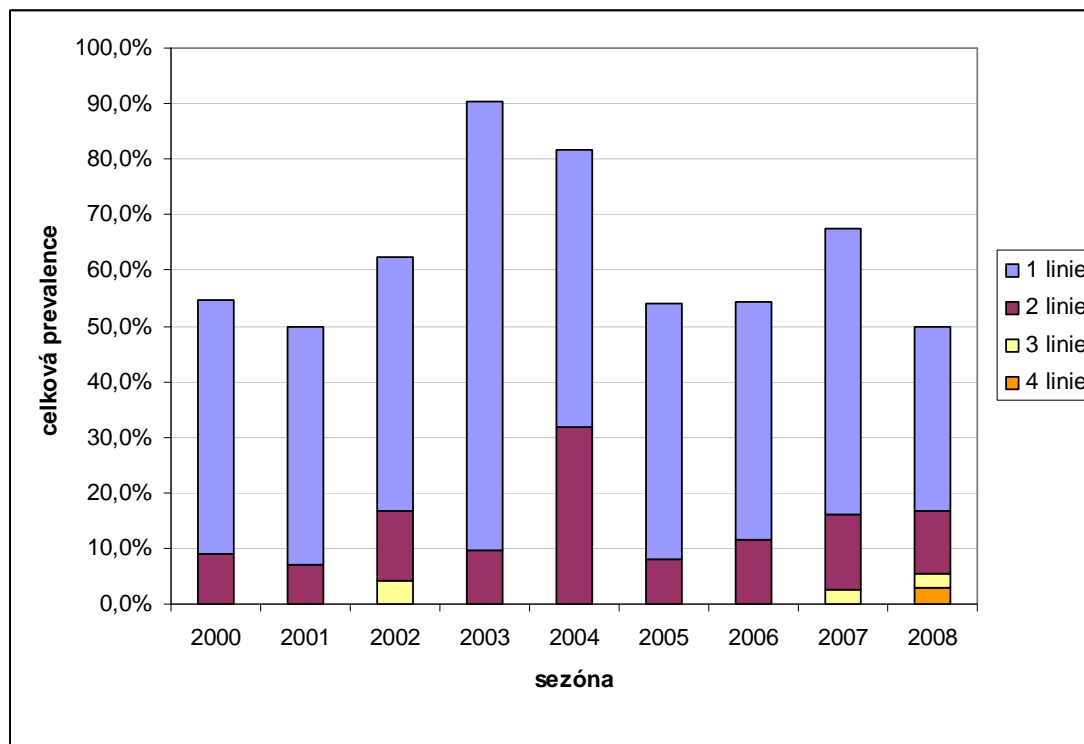


Graf 2. Graf prevalence jednotlivých rodů hemosporid na lokalitě Vltavský luh v letech 2000-2008

Tabulka 4. Počty vyšetřovaných jedinců z lokality Vltavský luh z jednotlivých let, počty pozitivních a negativních jedinců pro jednotlivé roky, počty infekcí působených jednou linií a smíšených infekcí, celkový výskyt jednotlivých typů infekcí v populaci a podíl jednoduchých a smíšených infekcí na celkové prevalenci.

Tab.4. Počty vyšetřovaných jedinců z lokality Vltavský luh v letech 2000-2008, počty pozitivních a negativních jedinců pro jednotlivé roky a počty infekcí působených jednou linií a počty smíšených infekcí. Dále ukazuje celkový výskyt jednotlivých typů infekcí v populaci a podíl jednoduchých a smíšených infekcí na celkové prevalenci

sezóna	celkem jedinců	+	-	počty smíšených infekcí			
				1 linie	2 linie	3 linie	4 linie
2000	11	6	5	5	1	0	0
2001	28	14	14	12	2	0	0
2002	24	15	9	11	3	1	0
2003	21	19	2	17	2	0	0
2004	22	18	4	11	7	0	0
2005	37	20	17	17	3	0	0
2006	35	19	16	15	4	0	0
2007	37	25	12	19	5	1	0
2008	36	18	18	12	4	1	1
2000-2008	251	154	97	119	31	3	1
výskyt v populaci		61,4%	38,6%	47,4%	12,4%	1,2%	0,4%
procento z infekcí				77,3%	20,1%	1,9%	0,6%



Graf 3. Celková prevalence hemosporid na lokalitě Vltavský luh v letech 2000-2008 a podíl smíšených infekcí více liniemi hemosporid na celkové prevalenci

Rozdíly prevalence v závislosti na pohlaví

Celkem bylo ve Vltavském luhu odchyceno 134 samců a 74 samic hýla rudého (při opakovaném odchyty více let po sobě je započítán pouze první odchyt). Infikováno bylo 66 samců (49,3 %) a 44 samic (59,3 %). Prevalence se liší od celkové prevalence na lokalitě v letech 2000-2008 vzhledem k tomu, že byl každý jedinec započítán právě jednou, a to v prvním roce, kdy byl odchycen. Rozdíly v prevalenci mezi samci a samicemi nejsou signifikantní (X-square = 0.4285, df = 1, p-value = 0.5127).

Jiné hostitelské druhy pěvců odchycené na lokalitě a jejich hemosporida

V roce 2008 byli na lokalitě odchyceni i ptáci jiných druhů a byli vyšetřeni na přítomnost ptačích hemosporid. Bylo u nich nalezeno 5 linií rodu *Haemoproteus* a dvě linie rodu *Leucocytozoon*, rod *Plasmodium* nebyl zaznamenán (tabulka 5.). Linie rodu *Leucocytozoon* byly zachyceny u čtyř ptačích druhů. Slavík modráček (*Luscinia svecica*), ťuhýk obecný (*Lanius collurio*) a sýkora lužní (*Parus montanus*) hostili linii BT2, která byla rovněž nejhojnější linií u studovaného druhu hýla rudého, a jiříčka obecná (*Delichon urbica*) hostila linii SYBOR18, která nebyla u hýla zaznamenána. Žádná z pěti detekovaných linií rodu *Haemoproteus* se u hýlů nevyskytovala.

Tabulka 5. Přehled zachycených linií s názvem linie a druhem hostitele. Data o prevalencích nejsou k dispozici, bylo odchyceno vždy pouze několik jedinců daného druhu (jeden až tři).

hostitel	Haem.	Leuc.
kos černý (<i>Turdus merula</i>)	TURDUS2	0
slavík modráček (<i>Luscinia svecica</i>)	0	BT2
sýkora lužní (<i>Parus montanus</i>)	0	BT2
pěnice hnědokřídla (<i>Sylvia communis</i>)	CWT3	0
pěnice pokřovní (<i>Sylvia curruca</i>)	0	0
pěnice slavíková (<i>Sylvia borin</i>)	0	0
jiříčka obecná (<i>Delichon urbica</i>)	0	SYBOR8
pěnkava obecná (<i>Fringilla coelebs</i>)	CCF1	0
pěvuška modrá (<i>Prunella modularis</i>)	TURDUS2, RB1	0
ťuhýk obecný (<i>Lanius collurio</i>)	RB1	BT2
šoupálek dlouhoprstý (<i>Certhia familiaris</i>)	0	0
budníček menší (<i>Phylloscopus collybita</i>)	0	0
budníček větší (<i>Phylloscopus trochilus</i>)	0	0

V.1.3.2. Lokalita Rychtářky (Žďárské vrchy – viz V.1.) z let 2005-2007

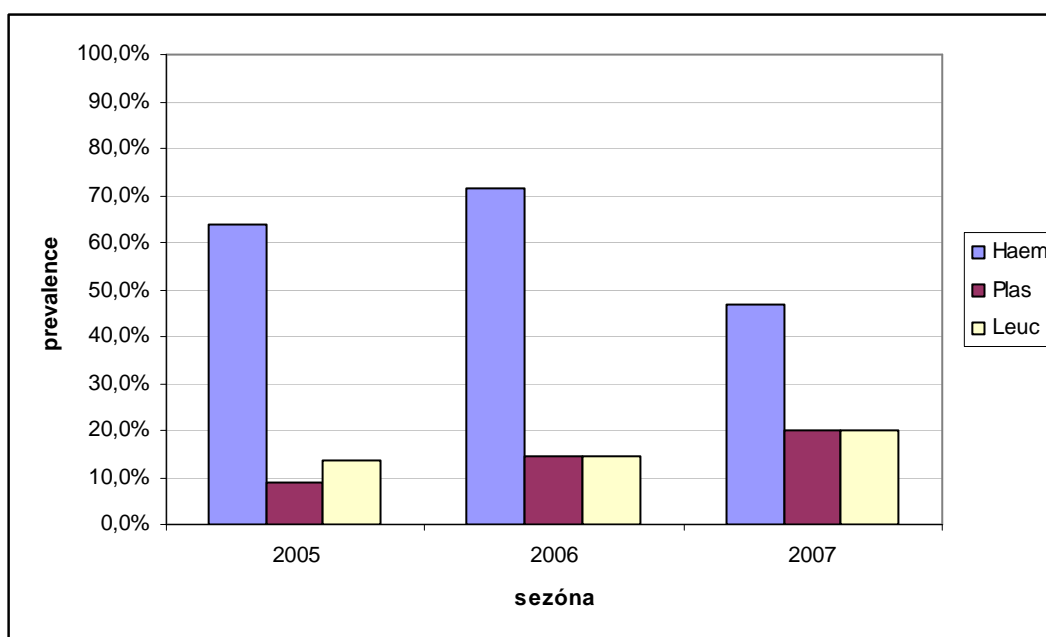
Během tří hnízdních sezón bylo odebráno 58 krevních vzorků adultů (viz příloha 2.). Z toho bylo 34 samců a 24 samic. Vyšetřeno bylo i 8 vzorků mláďat.

Celková prevalence u dospělců dosahovala 65,5 %, 76,5 % pro samce a 50,0 % pro samice (rozdíly v prevalenci mezi samci a samicemi nejsou signifikantní: X-square = 0.5691, df = 1,

p-value = 0.4506). Všechna mláďata byla opět negativní. Celkově bylo diagnostikováno 7 unikátních linií tzn. podstatně nižší než u šumavské lokality (díky menšímu počtu vyšetřovaných jedinců). Nejhojnější linií byla opět linie rodu *Haemoproteus* ROFI2 s prevalencí 46,6 %, jedinou diagnostikovanou linií rodu *Plasmodium* byla SGS1 s prevalencí a jedinou linií rodu *Leucocytozoon* BT2 s 15,5 %. Další zachycené linie patřily tedy k rodu *Haemoproteus*: SISKIN1 (5,2 %), CCF3 (1,7 %) a ROFI1 a na rozdíl od šumavské lokality zde byla detekována linie PYER1 (viz tab.6.). Prevalenci pro rody v jednotlivých letech a počty smíšených infekcí uvádí následující tabulky a grafy (viz tab.6 a 7., graf 4. a 5.)

Tab.6. Počty vyšetřovaných jedinců z lokality Rychtářky z jednotlivých let, celkovou prevalencí pro daný rok a prevalence všech zachycených linií. Dále ukazuje prevalence jednotlivých linií, prevalence jednotlivých rodů a podíl uvedených linií na celkové prevalenci: jaké procento nakažených ptáků hostilo linii (součet není 100 % díky výskytu smíšených infekcí).

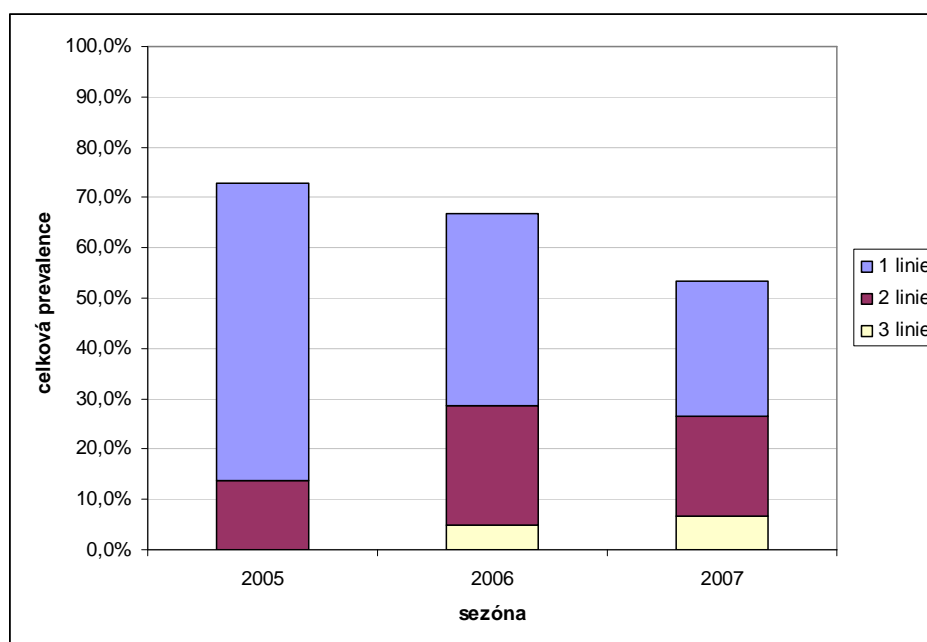
sezóna	celkem jedinců	prevalence	ROFI2	SISKIN1	CCF3	ROFI1	PYER1	Haem sp.	SGS1	Plas. sp.	BT2
2005	22	72,7%	8	1	1	1	0	3	1	1	3
2006	21	66,7%	13	2	0	0	0	0	2	1	3
2007	15	53,3%	6	0	0	0	1	0	1	2	3
2005-2007	58	65,5%	27	3	1	1	1	3	4	4	9
prevalence linií			46,6%	5,2%	1,7%	1,7%	1,7%	5,2%	6,9%	6,9%	15,5%
prevalence rodů			56,9%						13,8%		15,5%
podíl linií na celkové prevalenci			50,9%	5,7%	1,9%	1,9%	1,9%	5,7%	7,5%	7,5%	17,0%



Graf 4. Graf prevalence jednotlivých rodů hemosporid na lokalitě Rychtářky v letech 2005-2007

Tab.7. Počty vyšetřovaných jedinců z lokality Rychtářky z let 2005-2007, počty pozitivních a negativních jedinců pro jednotlivé roky a počty infekcí působených jednou linií a počty smíšených infekcí. Dále ukazuje celkový výskyt jednotlivých typů infekcí v populaci a podíl jednoduchých a smíšených infekcí na celkové prevalenci

sezóna	celkem jedinců	+	-	1 linie	2linie	3linie
2005	22	16	6	13	3	0
2006	21	14	7	8	5	1
2007	15	8	7	4	3	1
2005-2007	58	38	20	25	11	2
výskyt v populaci		65,5%	34,5%	43,1%	19,0%	3,4%
procento z infekcí				65,8%	28,9%	5,3%



Graf 5. Celková prevalence hemosporid na lokalitě Rychtářky v letech 2005-2007 a podíl smíšených infekcí více liniemi hemosporid na celkové prevalenci

V.1.3.3. Lokality Lyangar a Dzhaushangoz, Pamír

Byli vyšetřeni 2 samci a 2 samice odchycení v srpnu 2008 (viz příloha 3.). Dva samci a jedna samice byli pozitivní, jedna samice negativní. Všichni pozitivní jedinci byli nakaženi linií ROFI2, jeden samec navíc linií novou, neznámou z dřívějších studií – linií rodu *Haemoproteus* ROFI3 a samice linií stejného rodu PYER1. Jiné rody nebyly detekovány.

V.1.3.4. Lokalita Götaälv Švédsko

Bylo vyšetřeno 5 samců a 3 samice odchycení na jaře 2007 (viz příloha 4.). Infikovaní byli dva samci a jedna samice. Samice byla nakažena linií rodu *Haemoproteus* ROFI2. Jeden ze samců rovněž, navíc hostil novou linii rodu *Plasmodium* ROFI7, která nebyla zachycena též na lokalitách v naší studii a linii rodu *Leucocytozoon* BT2. Linií BT2 byl nakažen i druhý samec.

V.1.3.5. Rozdíly v prevalencích mezi lokalitami

Pro statistické určení rozdílu mezi různými lokalitami, kde hýl rudy hnízdí, byly použity pouze vzorky z Vltavského luhu a Rychtárek (z jiných lokalit byl velmi malý vzorek jedinců), a to pouze z let 2005 až 2007, kdy jsou údaje pro lokalitu Rychtářka. Celková prevalence se signifikantně nelišila ($X\text{-square} = 0.4784$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0.4892$). Pro statistické zpracování prevalence jednotlivých linií byl vzorek z jednotlivých let u lokality Rychtářky příliš malý, můžeme ale konstatovat, že na obou lokalitách jasně převládala linie rodu *Haemoproteus* ROFI2, a relativně hojné byly linie rodu *Plasmodium* SGS1 a rodu *Leucocytozoon* BT2. V zastoupení vzácných linií jednotlivých rodů se lokality lišily, ale těmito liniemi byl vždy infikován pouze malý počet jedinců.

V.2. MIKROSKOPICKÁ DETEKCE A JEJÍ POROVNÁNÍ S PCR DIAGNOSTIKOU

Mikroskopická detekce hemosporid byla možná jen u některých jedinců Vltavského luhu, u jedinců z jiných lokalit nebyly k dispozici krevní roztěry.

V.2.1. Prevalence, parazitémie a determinace druhů

Celkem bylo mikroskopicky vyšetřeno 165 roztěrů z adultních jedinců z let 2004-2008.

Vyšetřeno bylo rovněž 24 mláďat ve věku 7 dní, která byla všechna negativní (mikroskopická detekce probíhala před PCR detekcí, proto byl vyšetřen poměrně vysoký počet mláďat pro ověření jejich negativity). Do celkových prevalencí jsou opět započítáni pouze dospělci.

Celková prevalence určená na základě mikroskopického vyšetření dosahovala 36,4 % pro všechny rody. Prevalence pro rod *Haemoproteus* dosahovala 32,7 %, rod *Plasmodium* byl detekován pouze u 6 jedinců (3,6 %) a rod *Leucocytozoon* nebyl mikroskopicky zachycen vůbec. Zjištěné parazitémie u pozitivních vzorků byly v drtivé většině velmi nízké (0,01 – 0,04 %, tzn. 1 až 4 infikované erythrocyty na 10 000), jen několik jedinců vykazovalo vyšší parazitémie. U sedmi jedinců dosahovala parazitémie 0,05-1 % (5 až 100 infikovaných erythrocytů na 10 000) a pouze 4 jedinci měli parazitémii vyšší než 1 % infikovaných erythrocytů.

Velmi nízké parazitémie (a zároveň velmi nízké prevalence většiny linií) nám umožnili určit na základě morfologických znaků druh pouze u zástupce několika linií. Nejhojnější zástupce rodu *Haemoproteus* (molekulárními metodami určená linie ROFI2) byl morfologicky určen jako druh *Haemoproteus coatneyi*, nejhojnější zástupce rodu *Plasmodium* (SGS1) jako druh *Plasmodium relictum*. Dalším zachyceným a určeným druhem byl v jednom případě *Haemoproteus fringillae*. Pomocí mikroskopické diagnostiky nebyly rovněž zachyceny žádné smíšené infekce.

V.2.2. Porovnání mikroskopické a PCR detekce

Všechny vzorky vyšetřené mikroskopicky byly rovněž vyšetřeny pomocí nested PCR. Prevalence určená mikroskopicky byla 36,4 % a na základě PCR 61,2 %. Celková prevalence s kombinací výsledků z obou metod byla 64,2 %. Mikroskopická detekce odhalila pouze 5 infekcí, které neodhalilo PCR, zatímco PCR odhalilo 46 infekcí, které nebyly detekovány mikroskopicky (viz tabulka 8).

Pokud bychom považovali kombinované určení prevalence za velmi blízké realitě, potom by úspěšnost detekce infekce pomocí PCR byla 95,3 % a pomocí mikroskopického vyšetření pouze 56,6 %.

Tabulka 8. Porovnání počtu infekcí pro všechny rody hemosporid zachycených pomocí mikroskopické detekce i PCR.

Infekce všemi rody	kombinované výsledky, mikroskop i PCR	mikroskop	PCR	stejná data pro mikroskop i PCR
+	106	60	101	55
-	59	105	64	59

Všech 5 infekcí, které nebyly zachyceny PCR ale jen mikroskopicky, bylo způsobeno rodem *Haemoproteus* (viz tab. 9) a tyto infekce dosahovaly velmi nízkých parazitemií (0,01-0,02 %).

U zbylých dvou rodů hemosporid byly rozdíly v detekci oběma metodami ještě výraznější (viz tab. 10 a 11, graf 6).

Tabulka 9. Porovnání počtu infekcí pro rod *Haemoproteus* zachycených pomocí mikroskopické detekce i PCR a uvedením počtu shodných určení

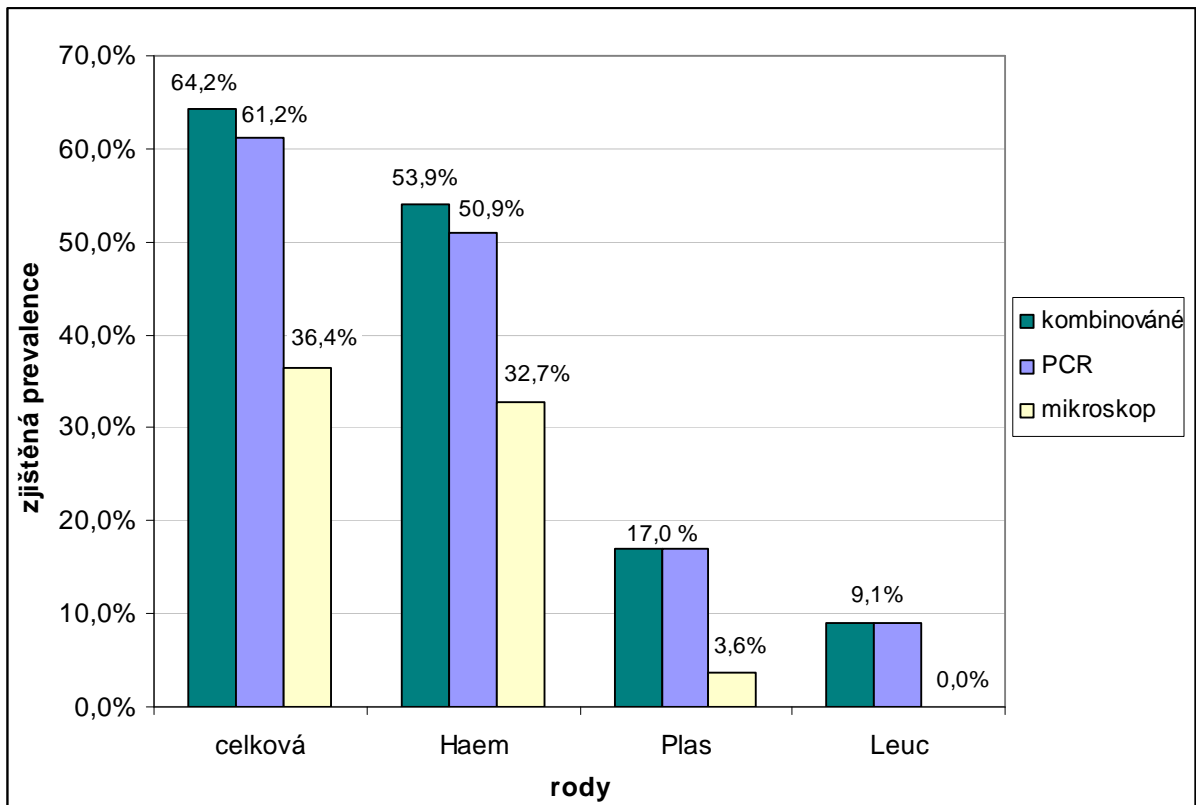
Infekce rodem <i>Haemoproteus</i>	kombinované výsledky, mikroskop i PCR	mikroskop	PCR	stejná data pro mikroskop i PCR
+	89	54	84	49
-	76	111	81	76

Tabulka 10. Porovnání počtu infekcí pro rod *Plasmodium* zachycených pomocí mikroskopické detekce i PCR a uvedením počtu shodných určení

Infekce rodem <i>Plasmodium</i>	kombinované výsledky, mikroskop i PCR	mikroskop	PCR	stejná data pro mikroskop i PCR
+	28	6	28	6
-	137	159	137	137

Tabulka 10. Porovnání počtu infekcí pro rod *Leucocytozoon* zachycených pomocí mikroskopické detekce i PCR a uvedením počtu shodných určení

Infekce rodem <i>Leucocytozoon</i>	kombinované výsledky, mikroskop i PCR	mikroskop	PCR	stejná data pro mikroskop i PCR
+	15	0	15	0
-	150	165	150	150



Graf 6. Graf celková prevalence a prevalence různých rodů hemosporid u 165 vyšetřovaných jedinců určené na základě PCR detekce a mikroskopického vyšetření krevních roztěrů a jejich kombinace.



V.3. HOSTITELSKÁ SPECIFITA A DIVERZITA DETEKOVANÝCH LINIÍ

V.3.1. Hostitelské specifity linií hemosporid

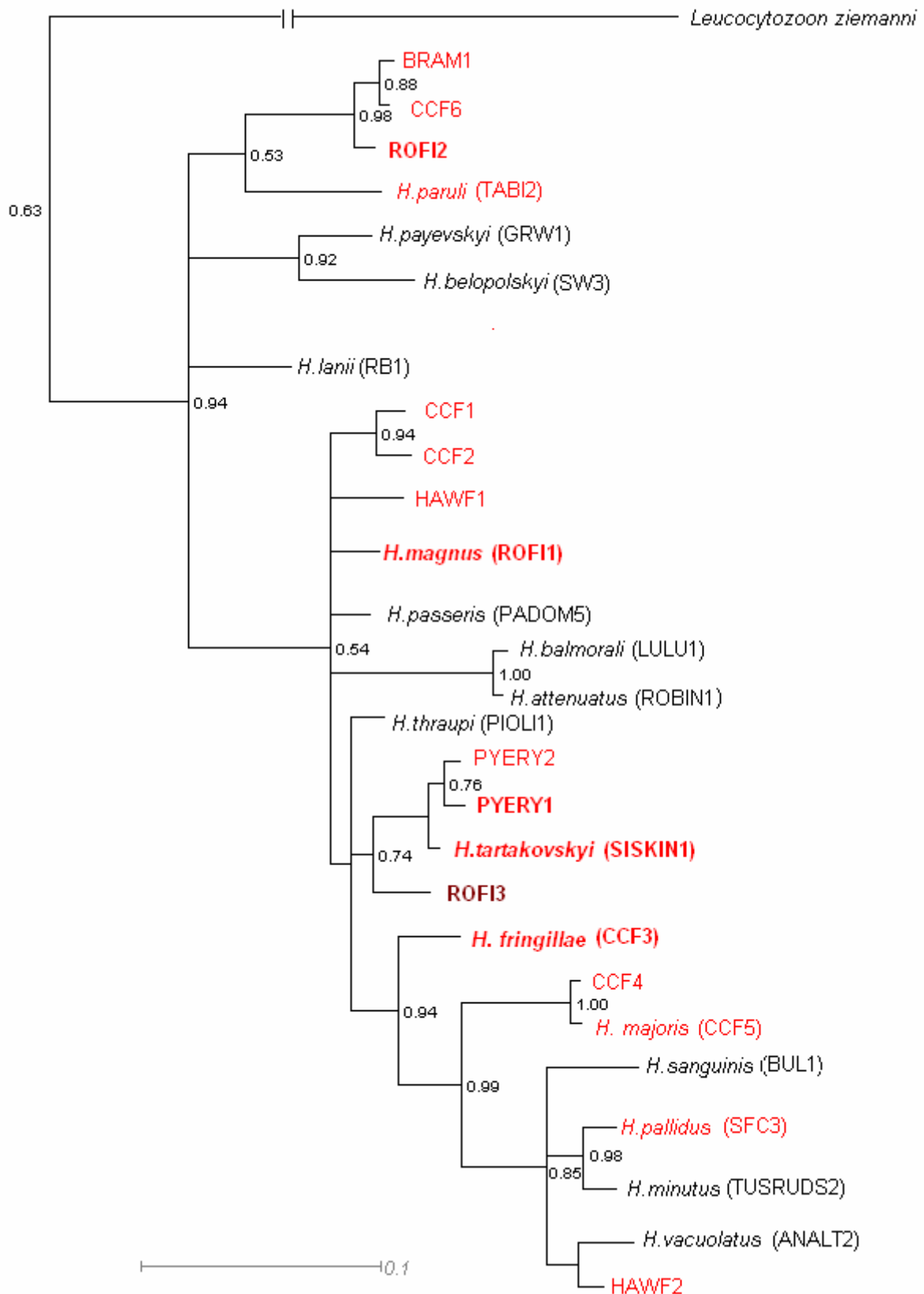
Následující tabulka uvádí přehled námi detekovaných linií hemosporid u modelového druhu hýlu rudém (*Carpodacus erythrinus*) s uvedením informace o ptačích hostitelích, ve kterých byly linie detekovány (druhy, čeledě a řády) a s uvedením území, na kterém byli infikováni hostitelé odchyceni. Tabulka neuvádí přehled linií ROFI3-ROFI9, které byly poprvé zachyceny právě v naší studii, tzn. jsou detekovány pouze v jednom druhu hostitele – v hýlovi rudém.

Tab.12. V tabulce je název linie detekované v našem hostitelském druhu, druh parazita určený na základě morfologie a spojený s danou genetickou linií, v kolonce hostitel jsou uvedeni doposud známí ptačí hostitelé dané linie (z předchozích studií), dále čeledě a řády, ze kterých hostitelé pochází a geografické rozšíření linie. Údaje vychází z databáze MalAvi (Bensch et al. 2009).

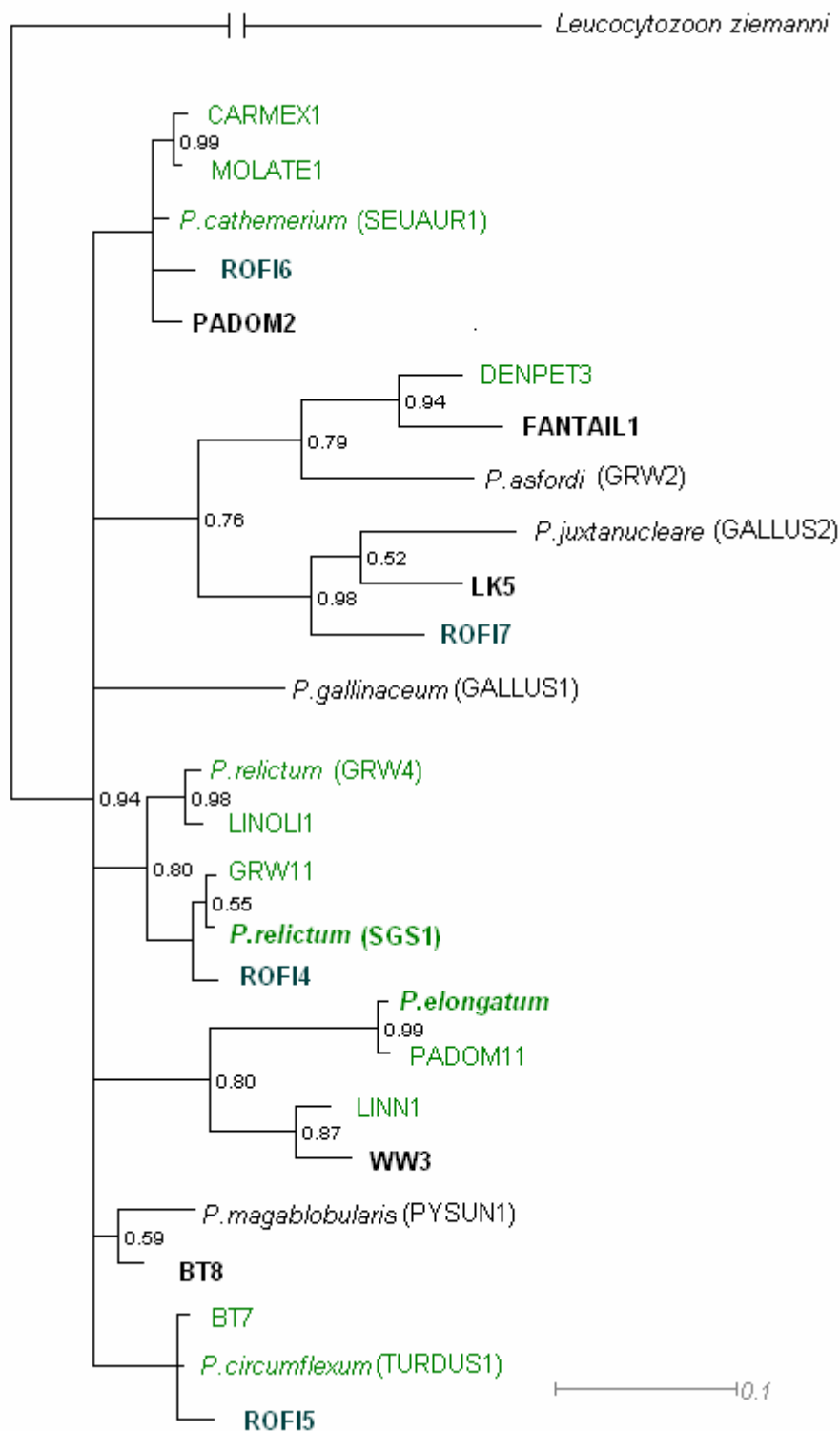
název linie	morfospecies	hostitel	čeleď	řád	geografie
ROFI1	<i>H. magnus</i>	hýl rudý (<i>Carpodacus erythrinus</i>) dlask tlustozobý (<i>Coccothraustes coccothraustes</i>) pěnkava obecná (<i>Fringilla coelebs</i>) zvonek zelený (<i>Carduelis chloris</i>)	Fringillidae	Passeriformes	Evropa
ROFI2	<i>H. spp.</i>	hýl rudý (<i>Carpodacus erythrinus</i>)	Fringillidae	Passeriformes	Evropa
PYER1	<i>H. spp.</i>	hýl škraboškový (<i>Pyrrhula erythaca</i>)	Fringillidae	Passeriformes	USA (ZOO)
CCF3	<i>H. fringillae</i>	pěnkava obecná (<i>Fringilla coelebs</i>)	Fringillidae	Passeriformes	Evropa
SISKIN1	<i>H. spp.</i>	hýl mexický (<i>Carpodacus mexicanus</i>) stehlík obecný (<i>Carduelis spinus</i>) křivka obecná (<i>Loxia curvirostra</i>)	Fringillidae	Passeriformes	USA, Evropa
BT8	<i>P.spp.</i>	slavík modráček (<i>Luscinia svecica</i>) 2 druhy snovačů (<i>Ploceus sp.</i>) lejskovec (<i>Hypothymis azurea</i>) 4 druhy astrildů a šám (<i>Estrilda sp.</i> a <i>Copsychus sp.</i>)	Muscicapidae Ploceidae Monarchidae Estrildidae	Passeriformes	Evropa, rovníková Afrika, Indie a Barma
BT6	<i>P.spp.</i>	slavík modráček (<i>Luscinia svecica</i>)	Muscicapidae	Passeriformes	Evropa
FANTAIL 1	<i>P.spp.</i>	husička malá (<i>Dendrocygna javanica</i>) pávik (<i>Rhipidura rufifrons</i>)	Anatidae Rhipiduridae	Anseriformes Passeriformes	Austrálie, jihovýchodní Asie
GRW06	<i>P.elongatum</i>	18 druhů hostitelů	13 čeledí	Passeriformes Strigiformes Columbiformes Ciconiiformes Coraciiformes	Evropa, USA, Karibik, Afrika, jihovýchodní Asie, Austrálie
LK05	<i>P.spp.</i>	poštolka jižní (<i>Falco naumanni</i>)	Falconidae	Falconiformes	Evropa

PADOM2	<i>P.spp.</i>	vrabec domácí (<i>Passer domesticus</i>) linduška zelená (<i>Anthus hodgsoni</i>) vrána obecná (<i>Corvus corone</i>) slavík modráček (<i>Luscinia svecica</i>) konipas luční (<i>Motacilla flava</i>) bažant obecný (<i>Phasianus colchicus</i>)	Passeridae Motacillidae Corvidae Muscicapidae Phasianidae	Passeriformes Galliformes	Evropa, východní Asie
SGS1	<i>P.relictum</i>	33 druhů hostitelů	11 čeledí	Passeriformes Gruiformes	celosvětově
WW3	<i>P.spp.</i>	7 druhů hostitelů	7 čeledí	Passeriformes	Evropa, USA, Afrika
EMSPO5	<i>L.spp.</i>	strnad olivový (<i>Emberiza spodocephala</i>)	Emberizidae	Passeriformes	Rusko
BT1	<i>L.spp.</i>	rehek zahradní (<i>Phoenicurus phoenicurus</i>) slavík modráček (<i>Luscinia svecica</i>)	Muscicapidae	Passeriformes	Evropa
BT2	<i>L.spp.</i>	9 druhů hostitelů	Muscicapidae Laniidae Sylviidae	Passeriformes	Evropa, Afrika
BT5	<i>L.spp.</i>	slavík modráček (<i>Luscinia svecica</i>) ťuhýk obecný (<i>Lanius collurio</i>)	Muscicapidae Laniidae	Passeriformes	Evropa

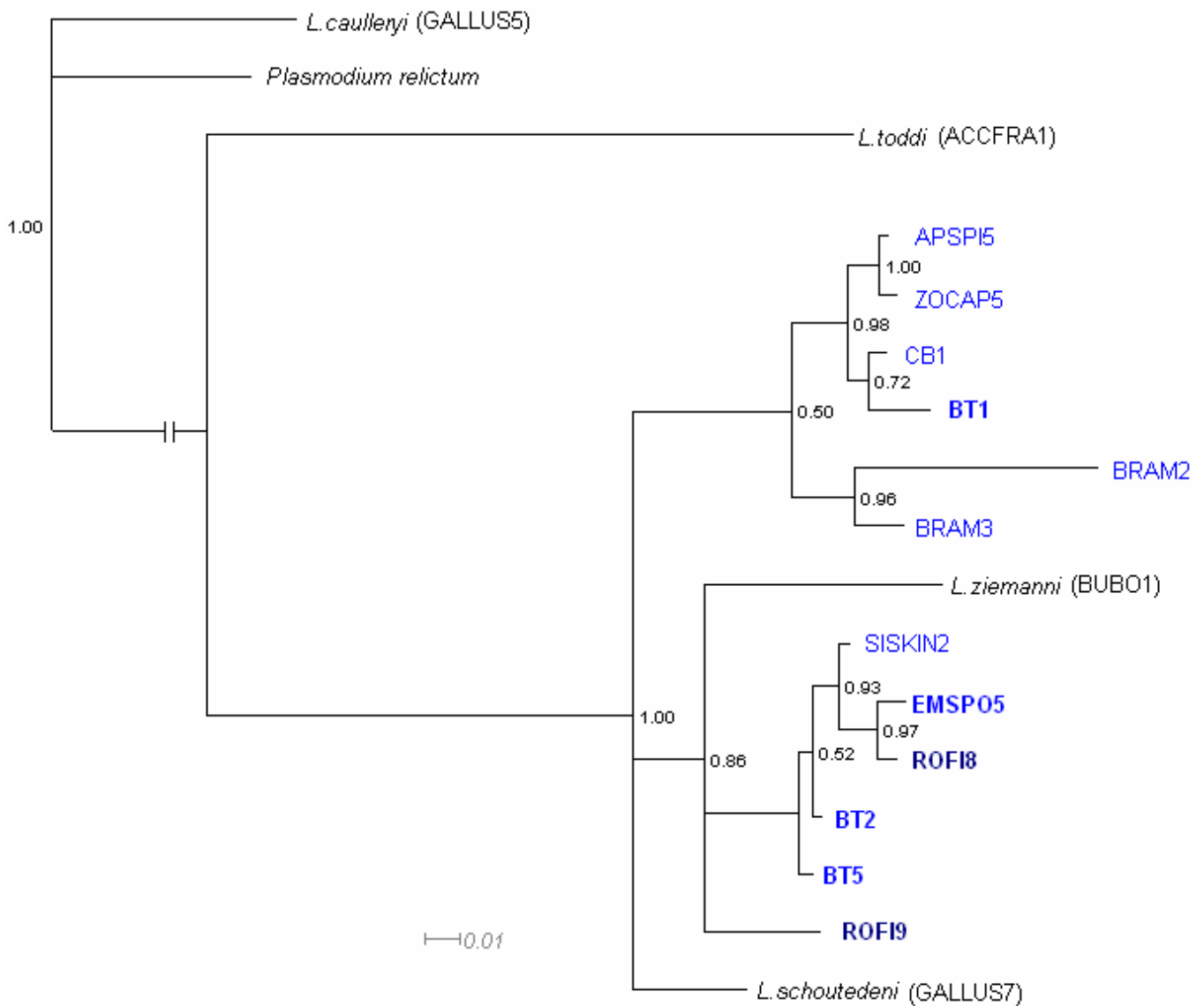
Následují fylogenetické stromy pro jednotlivé rody ptačích hemosporid vytvořené pomocí Bayesiánských metod (viz obr.15.-17.). Do stromů byly zahrnuty vždy známé morfologické druhy přiřazené ke konkrétní genetické linii, poté všichni zástupci hemosporid daného rodu detekovaní v předchozích studiích v pěnkavovitých pěvcích (Fringillidae) a námi zachycené linie v hýlovi rudém (*Carpodacus erythrinus*).



Obr.15. Fylogenetický strom pro rod *Haemoproteus* se zahrnutím známých morfologických druhů (přiřazených ke konkrétní genetické linii), zástupců rodu *Haemoproteus* z pěvců čeledi Fringillidae a námi zachycené linie v hýlovi rudém. Linie a druhy známé z předchozích studií z pěnkavovitých ptáků jsou označeny červeně, námi zachycené linie v hýlovi tučně (nové linie tmavě červeně). Celkové procento záměn mezi sekvencí linie druhu *H. paruli* TABI2 (nejbližší určený morfologický druh) a ROFI2 je 3,4 % (procento záměn uvádím pouze pro ROFI2, protože pouze u této linie máme konkrétní informace o její morfologii).



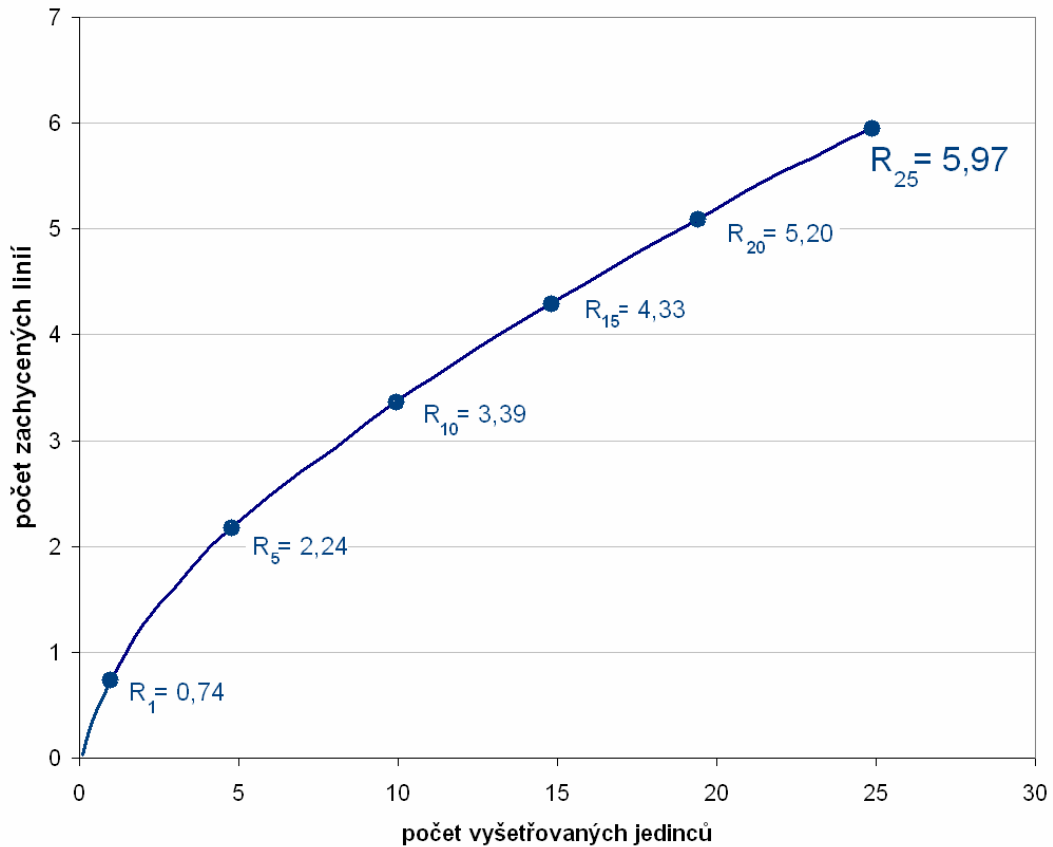
Obr.16. Fylogenetický strom pro rod *Plasmodium* se zahrnutím známých morfologických druhů (přiřazených ke konkrétní genetické linii), zástupců rodu *Plasmodium* z pěvců čeledi Fringillidae a námi zachycené linie v hýlvi rudém. Linie a druhy známé z předchozích studií z pěnkaovitých ptáků jsou označeny zeleně, námi zachycené linie v hýlvi tučně (nové linie tmavě zeleně).



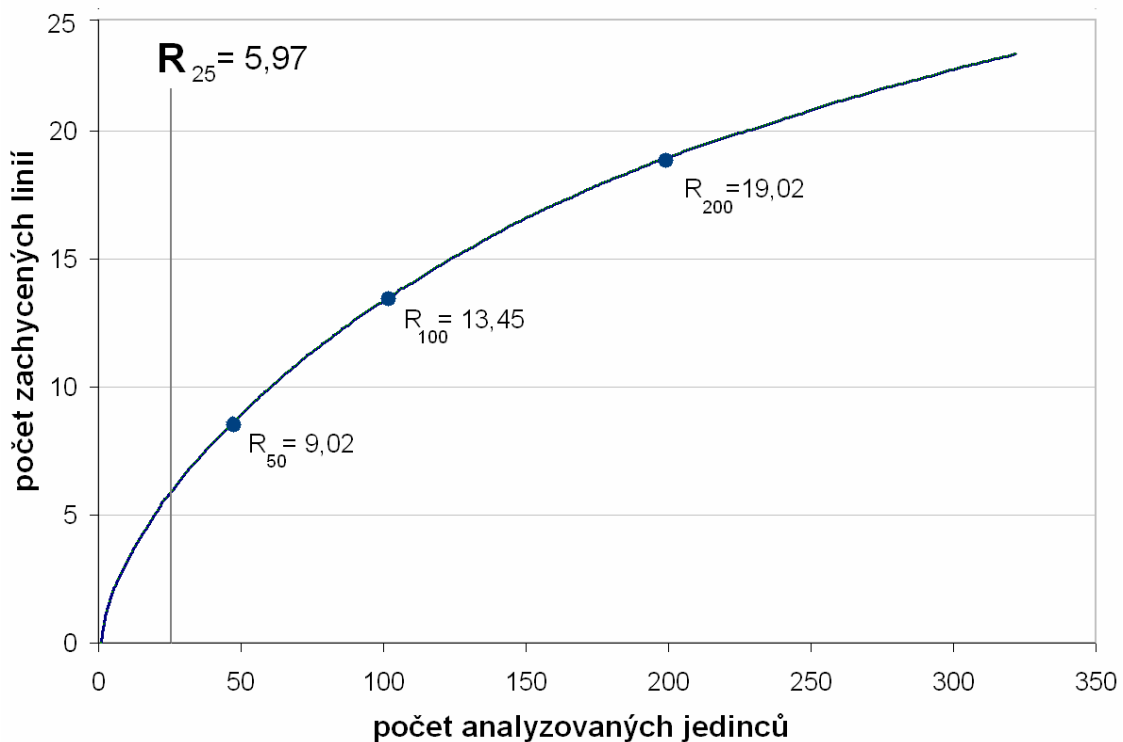
Obr.17. Fylogenetický strom pro rod *Leucocytozoon* se zahrnutím známých morfologických druhů (přiřazených ke konkrétní genetické linii), zástupců rodu *Leucocytozoon* z pěvců čeledi Fringillidae a námi zachycené linie v hýlovi rudém. Linie a druhy známé z předchozích studií z pěnkavovitých ptáků jsou označeny modře, námi zachycené linie v hýlovi tučně (nové linie tmavě modře).

V.3.2. Diverzita linií v rámci hostitelského druhu – stanovení indexu R_{25}

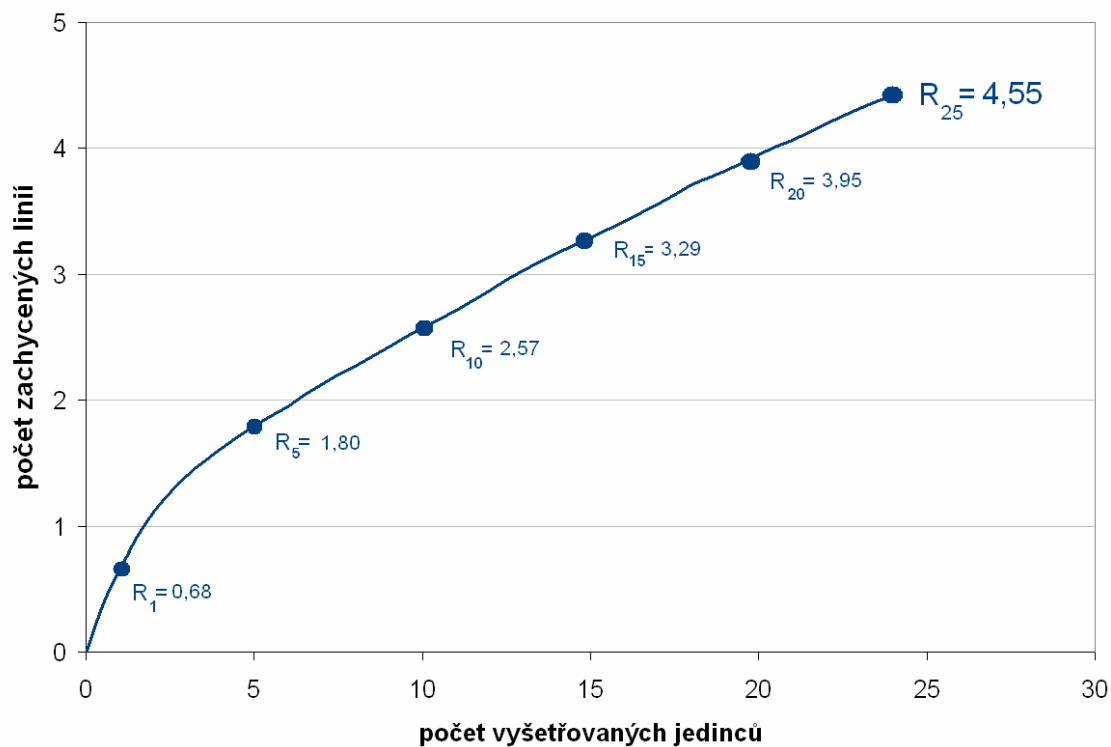
Pro studovaný soubor jedinců hýla rudého byly určeny průměrné kumulativní počty zachycených linií dle výše uvedené metodiky (viz V.11.) a na jejich základě byl určen index R_{25} , který odpovídá 5,97 linie. Následující grafy ukazují průměrné kumulativní počty linií hemosporid nejprve pro 25 jedinců (graf 7.) a pro soubor všech vyšetřovaných jedinců hýla rudého (graf 8.). První dva grafy pracují s celkovým počtem linií (tedy i s rodem *Leucocytozoon*). Další dva grafy (graf 9. a 10.) uvádějí počty linií pouze rodu *Plasmodium* a *Haemoproteus* a to z důvodů možnosti porovnání s ostatními studii, protože mnozí autoři často s rodem *Leucocytozoon* nepracují.



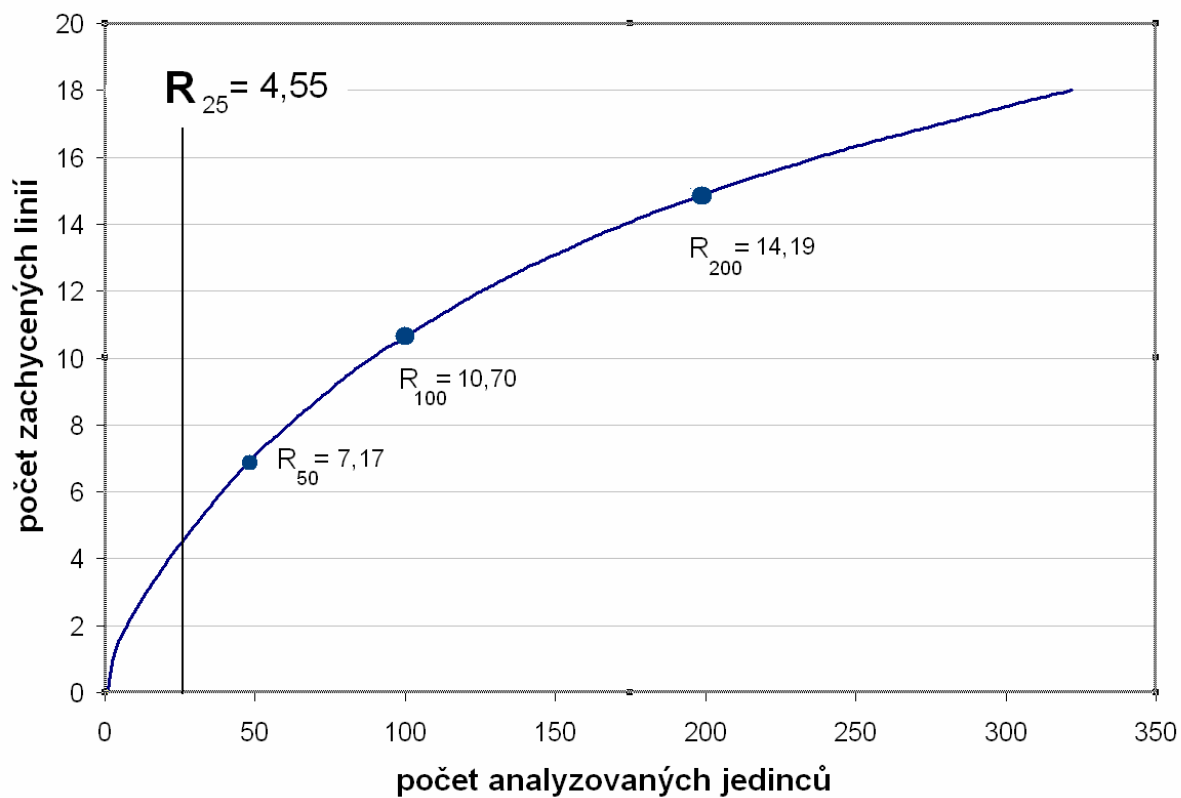
Graf 7. Graf průměrných kumulativních počtů zachycených linií všech rodů s uvedením konkrétních hodnot pro 1, 5, 10, 15, 20 a 25 jedinců (indexy $R_1 - R_{25}$).



Graf 8. Graf průměrných kumulativních počtů zachycených linií všech rodů pro celý soubor vyšetřených jedinců. Uveden je index R_{25} a konkrétní hodnoty pro 50, 100 a 200 jedinců (indexy $R_{50} - R_{200}$).



Graf 9. Graf průměrných kumulativních počtů zachycených linií rodů *Plasmodium* a *Haemoproteus* s uvedením konkrétních hodnot pro 1, 5, 10, 15, 20 a 25 jedinců (indexy $R_1 - R_{25}$).



Graf 10. Graf průměrných kumulativních počtů zachycených linií rodů *Plasmodium* a *Haemoproteus* pro celý soubor vyšetřených jedinců. Uveden je index R_{25} a konkrétní hodnoty pro 50, 100 a 200 jedinců (indexy $R_{50} - R_{200}$).

V.4. VZTAH PREVALENCE A CHARAKTERISTIK HOSTITELSKÉHO DRUHU

V.4.1. Faktory ovlivňující pravděpodobnost infekce hemosporidy: pohlaví, věk, počet alel *Mhc* a celková heterozygotnost

V.4.1.1. Data z PCR detekce

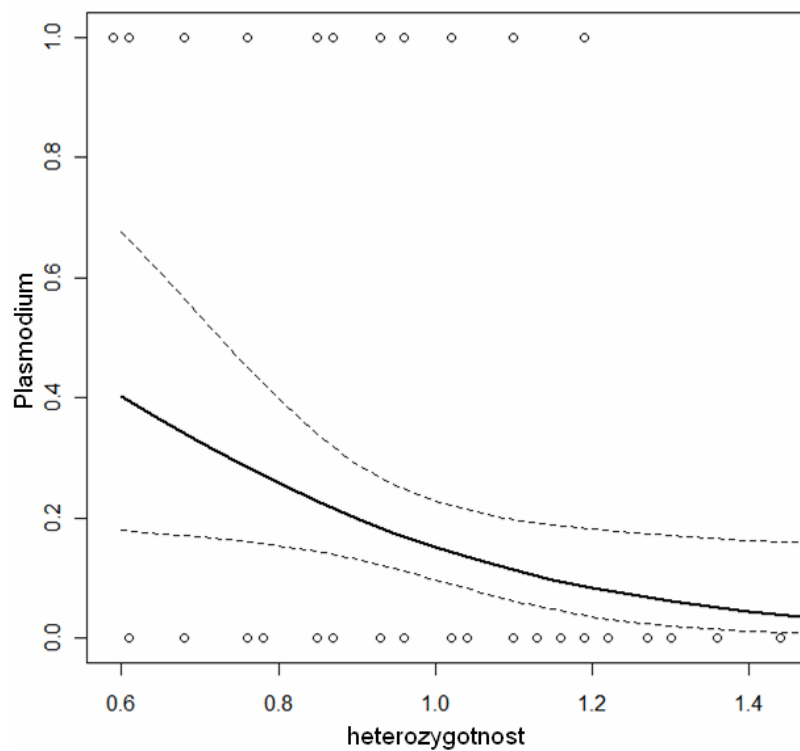
V modelu zahrnujícím věk jedince, jeho pohlaví, celkový počet alel *Mhc* a celkovou heterozygotnost a testujícím jejich vliv na prevalenci pro jednotlivé rody hemosporid a počet linií bylo využito dat ze 136 jedinců. Každý jedinec byl použit pouze jednou (u jedinců odchycených více let po sobě pouze data z prvního roku).

rod *Haemoproteus*

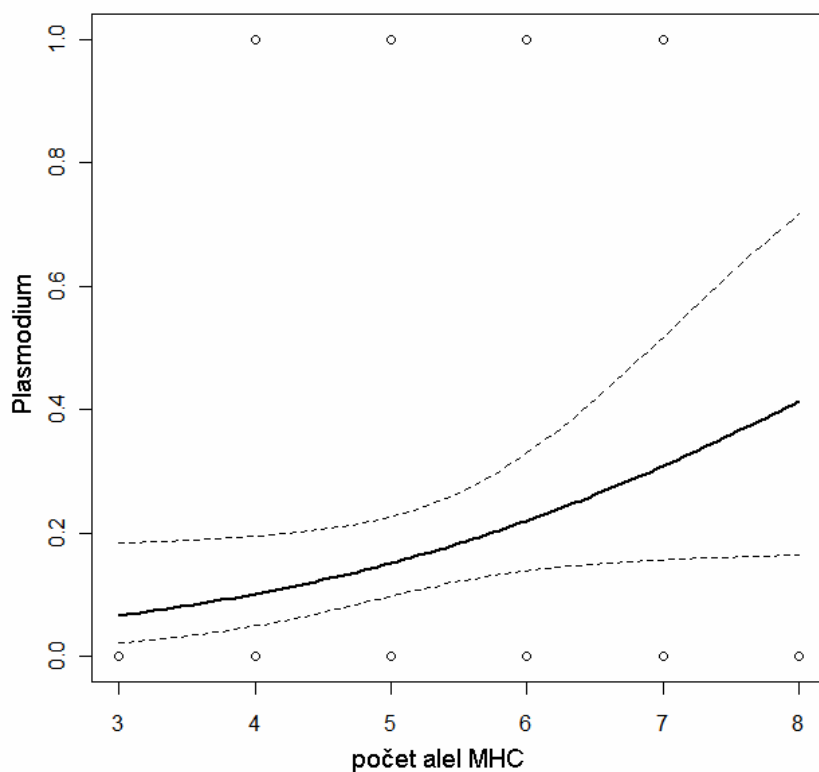
V iniciálním modelu byla testována závislost prevalence rodu *Haemoproteus* na pohlaví, věku, počtu alel MHC, celkové heterozygotnosti a jejich smysluplných interakcí. Po zjednodušení minimální adekvátní model obsahoval věk a pohlaví, ale byl marginálně nesignifikantní ($\chi^2=5.376$, $df=2$, $p=0.068$). Samostatný vliv pohlaví či věku jedince (při kontrole efektu druhé proměnné) na prevalenci parazitů rodu *Haemoproteus* byl signifikantní (věk : $\chi^2 = 4.764$, $df = 1$, $p = 0.029$; pohlaví: $\chi^2= 5.198$, $df = 1$, $p = 0.023$). Signifikantní vliv počtu alel *Mhc* a celkové heterozygotnosti ve výše uvedeném modelu na prevalenci rodu *Haemoproteus* nebyl prokázán.

rod *Plasmodium*

Stejný iniciální model byl použit i pro testování vlivu těchto proměnných na prevalenci rodu *Plasmodium*. Výsledný minimální adekvátní model obsahoval počet alel *Mhc* a celkovou heterozygotnost a byl signifikantní ($\chi^2 = 10.313$, $df = 2$, $p = 0.006$). Vliv těchto proměnných byl signifikantní i při jejich samostatném testování (kontrolováno na efekt druhé proměnné) (heterozygotnost: $\chi^2 = 6.02$, $df = 1$, $p = 0.014$; počet alel *Mhc*: $\chi^2 = 5.043$, $df= 1$, $p = 0.025$). Byl prokázán signifikantní vliv počtu alel *Mhc* (graf 11.) a celkové heterozygotnosti (graf 12.) na prevalenci rodu *Plasmodium*. Vliv věku ani pohlaví signifikantní nebyl.



Graf 11. Vztah heterozygotnosti a infekce rodem *Plasmodium*. Na ose y je znázorněna predikovaná proporce jedinců infikovaných rodem *Plasmodium* v závislosti na jejich celkové heterozygotnosti na ose x.



Graf 12. Vztah počtu alel MHC I a infekce rodem *Plasmodium*. Na ose y je znázorněna predikovaná proporce jedinců infikovaných rodem *Plasmodium* v závislosti na počtu alel pro *Mhc* vynesném na ose x.

rod *Leucocytozoon*

Využití stejného iniciálního modelu pro testování vlivu věku, pohlaví, počtu alel *Mhc* a celkové heterozygotnosti ukázalo, že se tento model neliší od modelu nulového. Znamená to, že vliv žádné proměnné na prevalenci *Leucocytozoon* zaznamenán nebyl.

počet linií hemosporid

Pokud byl testován výše zmíněným modelem vliv proměnných a jejich interakcí na celkový počet linií, obsahoval minimální adekvátní model pouze celkovou heterozygotnost. Tento model byl však marginálně nesignifikantní ($\chi^2=3.667$, $df=1$, $p = 0.055$). Signifikantní vliv žádné proměnné na celkový počet linií hemosporid nebyl tedy prokázán.

V.4.1.2. Data z mikroskopické detekce

V modelu zahrnujícím věk jedince, jeho pohlaví, celkový počet alel *Mhc* a celkovou heterozygotnost a testujícím jejich vliv celkovou prevalenci zjištěnou mikroskopickým vyšetřováním krevních roztěrů bylo využito dat z 65 jedinců. Každý jedinec byl použit pouze jednou (u jedinců odchycených více let po sobě, pouze data z prvního roku). V iniciálního modelu byla testována závislost mikroskopicky určené prevalence na pohlaví, věku, počtu alel *Mhc*, celkové heterozygotnosti a jejich smysluplných interakcí. Tento model se však nelišil od modelu nulového, to znamená, že vliv žádné z analyzovaných proměnné na mikroskopicky určenou prevalenci zaznamenán nebyl.

V.4.2. Vliv hemosporid na hmotnost a reprodukční úspěch a samčí ornament

V.4.2.1. PCR detekce

Hmotnost

V modelu zahrnujícím věk jedince, prevalenci pro jednotlivé rody hemosporid a celkový počet linií a testujícím jejich vliv na hmotnostní parametry jedince bylo využito dat z 195 jedinců. V iniciálním modelu byl testován vliv věku, celkového počtu linií a prevalence jednotlivých rodů hemosporid na hmotnost zkoumaných jedinců. Iničiální model se nelišil od modelu nulového to znamená, že vliv prevalence jednotlivých rodů ani celkového počtu linií hemosporid na hmotnost parametry hostitele nebyl zaznamenán.

Reprodukční úspěch

V modelu zahrnujícím věk jedince, prevalenci pro jednotlivé rody hemosporid a celkový počet linií a testujícím jejich vliv na reprodukční úspěch samců (celkový počet mláďat=počet vnitropárových a mimopárových paternit) a samic (počet vajec a počet vysezených mláďat) bylo využito dat ze 125 jedinců. V iniciálním modelu byl testován vliv věku, celkového počtu linií a prevalencí jednotlivých rodů hemosporid na reprodukční úspěch samců a samic. Iničiální model se nelišil od modelu nulového, to znamená, že vliv prevalencí jednotlivých rodů ani celkového počtu linií hemosporid na hmotnost parametry hostitele nebyl zaznamenán.

Ornamentace samců

V modelu zahrnujícím věk jedince, prevalenci pro jednotlivé rody hemosporid a celkový počet linií a testujícím jejich vliv ornamentaci samců bylo využito dat z 99 jedinců. Jako míra zbarvení byla použita PC1 z analýzy hlavních komponent se třemi charakteristikami zbarvení (H,S,B – viz IV.4.). První osa (PC1) vysvětlovala 68,8 % variability v datech (eigenvalue=1.645).V iniciálním modelu byl testován vliv věku, celkového počtu linií a prevalencí jednotlivých rodů hemosporid na ornamentaci samců. Iničiální model se nelišil od modelu nulového, to znamená, že vliv prevalencí jednotlivých rodů ani celkového počtu linií hemosporid na hmotnost parametry hostitele nebyl zaznamenán.

V.4.2.2. Mikroskopická detekce

Iničiální modely pracující s prevalencí určené na základě mikroskopické detekce a daty o hmotnosti, reprodukčním úspěchu a ornamentaci samců se nelišily od modelu nulového. Vliv mikroskopicky určené prevalence na uvedené charakteristiky nebyl tedy nikde zaznamenán. Data pro hmotnost byla ze 124 jedinců, pro reprodukční úspěch ze 68 jedinců a pro ornamentaci ze 73 jedinců.

V.5. URČOVÁNÍ POTENCIONÁLNÍHO PŘENAŠEČE NA LOKALITĚ

Celkem bylo na studované lokalitě (Vltavský luh viz V.X.) odchyceno 3 618 samic hematofágního hmyzu. Z toho bylo 3 356 tiplíků rodu *Culicoides*, 198 komárů rodu *Culex* a *Aedes* a 58 jedinců muchniček rodu *Eusimulium*. Determinovat do druhu se podařilo všechny samice hematofágních Dipter (příloha 5. a 6.).

V.5.1. Odchycené druhy hematofágních Dipter

VI.5.1.1. Odchyt do CDC pastí pomocí sentinelů

Do CDC pastí se chytilo celkem 2 858 samic hematofágního hmyzu. Rod *Culicoides* zahrnoval 2 602 jedinců (91,0 % všeho hematofágního hmyzu), komáři rodu *Culex* a *Aedes* 193 jedinců (6,9 %) a muchničky rodu *Eusimulium* 58 jedinců (2,0 %).

Nejhojnějším druhem rodu *Culicoides* byl *C. kibunensis*, který představoval 61,2 % všech tiplíků. Další hojněji zastoupené druhy byly *C. segnis* s 20,9 %, *C. festivipennis* s 14,7 % a *C. spfagnuminsis* s 2,1 %. Druhy *C. impunctatus*, *C. minutissimus* a *C. pictipennis* byly zastoupeny pouze okrajově (< 1%).

Nejhojnějším představitelem čeledi Culicidae byl *Culex pipiens* 85,4 %, ostatní druhy komárů patřily do rodu *Aedes* a byly zastoupeny podstatně méně (*A. cinereus* 7,1 %, *A. sticticus* 4,0 %, *A. communis* 2,5 % a *A. cantans* 1 %).

Všechny odchycené muchničky patřily do druhu *Eusimulium securiforme*.

Nasátá byla pouze malá část odchycených samic komárů (3,0 %) a ještě méně tiplíků (0,4 %), samice muchniček byly všechny nenasáté.

V.5.1.2. Odchyt do CDC fotopasti

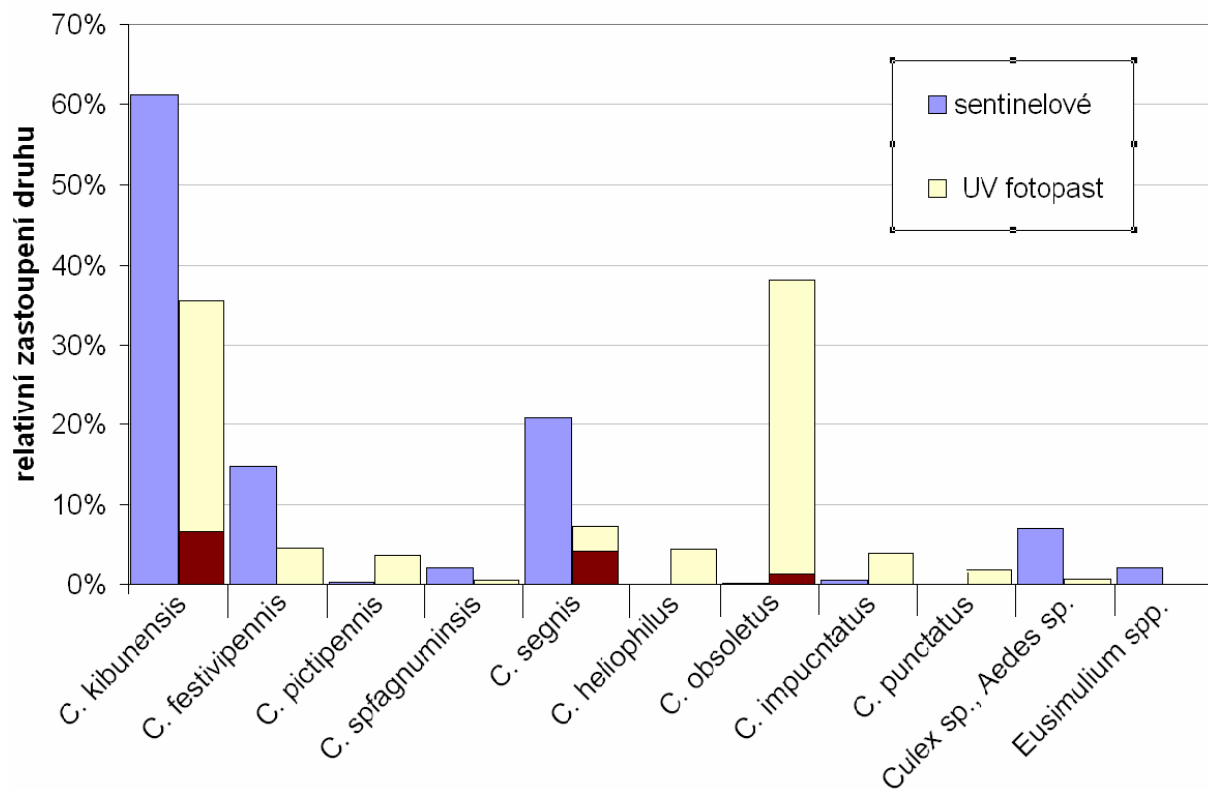
Do UV pasti se odchytilo celkem 759 samic hematofágního hmyzu. Rod *Culicoides* zahrnoval 754 jedinců (99,3 % všeho hematofágního hmyzu), komáři rodu *Culex* a *Aedes* pět jedinců (0,7 %), a muchničky nebyly odchyceny vůbec.

Nejhojnějším druhem rodu *Culicoides* byl *C. obsoletus* (38,4 %), následovaný *C. kibunensis* (35,7 %). Další hojněji zastoupené druhy byly *C. segnis* s 7,3 %, *C. festivipennis* s 4,5 %, *C. heliophilus* 4,4 %, *C. impunctatus* 3,9 %, *C. pictipennis* 3,6 % a *C. punctatus* 1,9 %. Druhy *C. spfagnuminsis* a *C. pulicaris* byly zastoupeny pouze okrajově (< 1%).

Nasátá byla významnější část odchycených samic tiplíků než u CDC pastí (10,2 %), u komárů dokonce 20,0 % ale z malého počtu jedinců (srovnání viz následující kapitola).

V.5.1.3. Porovnání selektivity odchyty

Relativní zastoupení jednotlivých druhů tiplíků rodu *Culicoides* se u obou způsobů odchyty velmi liší (X-square = 1566.6, df = 8, p-value = 0). Tuto skutečnost ukazuje i následující graf (viz graf 13.). V relativním zastoupení se pastí nejvíce lišily u samic *C. kibunensis* (X-square = 155.0, df = 1, p-value = 0) a *C. segnis* (X-square = 72.6, df = 1, p-value = 0), které byly podstatně více zastoupeny u CDC pastí se sentinely a samic *C. obsoletus*, který byl podstatně početnější ve vzorku z fotopasti (X-square = 1060.3, df = 1, p-value = 0). Výrazně se lišila rovněž proporce nasátých jedinců, signifikantně víc nasátých samic bylo odchyceno na UV světlo (X-square = 212.1, df = 1, p-value = 0).



Graf 13. Relativní zastoupení odchycených druhů tiplíků rodu *Culicoides* a dalších zástupců hematofágního hmyzu lákaných na ptačí sentinely (modře) a na UV světlo (žlutě). Červenou barvou je naznačený podíl nasátých samic tiplíků.

V.5.2. Detekované linie hemosporid v přenašečích

V.5.2.1. Tiplíci rodu *Culicoides*

Pro PCR detekci hemosporid bylo použito celkem 2602 tiplíků rodu *Culicoides* rozdělených do skupin po 50 jedincích (případně méně, viz kapitola V.3.3.). Použity byly pouze samice odchycené do CDC pastí lákané se sentinely. Pozitivní výsledky vykázaly pouze skupiny

samic druhů *C. kibunensis*, *C. segnis* a *C. festivipennis*, což byly zároveň nejhojněji zastoupené druhy (viz výše). Odhadnutá prevalence ptačích hemosporid (pouze pro skupiny o přibližně 50 jedincích) byla asi 1,2 % (27 pozitivních skupin z 52). Celkem bylo v tiplících detekováno 5 linií hemosporid (viz tab.13.) a všechny linie patřily k rodu *Haemoproteus*.

Celkem bylo vyšetřeno 1593 samic druhu *C. kibunensis*. Tento druh hostil celkem tři linie hemoproteů, dvě nové linie CUKI1 (odhadnutá prevalence v rámci druhu *C. kibunensis* 0,8 %) a CUKI2 (0,1 %) (viz obr.18.).

Třetí ze zachycených linií, TURDUS2 (0,2 %) byla identická s linií detekovanou u kosa černého (*Turdus merula*) a pěvušky modré (*Prunella modularis*) odchycených na studijní lokalitě. Tato linie patří ke druhu *Haemoproteus minutus*.

U druhu *C. segnis* byly identifikovány čtyři linie hemoproteů (vyšetřeno 543 samic). Stejně jako předchozí druh hostil linie CUKI1 (odhadnutá prevalence 0,9 %) a CUKI2 (0,2 %). Třetí linií byla CCF4 (0,4 %), která byla dříve identifikována v pěnkavě obecné (*Fringilla coelebs*), ale na naší studijní lokalitě nebyla zaznamenána. Čtvrtou linií byla ROFI1 (0,6 %) patřící ke druhu *Haemoproteus magnus* a která je identická s linií detekovanou u hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) na naší studijní lokalitě. Linie CCF4 a ROFI1 se nevyskytovaly v tiplících jiných druhů.

Posledním druhem, který vykazoval pozitivní výsledky na přítomnost hemosporid, byl druh *C. festivipennis* (analyzováno 383 samic). U tohoto druhu byla detekována pouze jedna linie hemosporid (TURDUS2) a to jen v jedné skupině samic (odhadnutá prevalence 0,3 %).

Tabulka č.X Linie rodu *Haemoproteus* detekované v tiplících rodu *Culicoides* na lokalitě ve Vltavském luhu. Uvedeny jsou celkové prevalence linií v rámci všech vyšetřených tiplíků a zastoupení linií u jednotlivých druhů tiplíků. Poslední sloupec ukazuje, zda byla linie detekována v ptačím hostiteli přímo na studijní lokalitě, s případným uvedením druhu.

Linie	prevalence	<i>C. kibun.</i>	<i>C. segnis</i>	<i>C. festiv.</i>	ptačí hostitel z lokality
CUKI1	0,69%	1	1	0	0
CUKI2	0,12%	1	1	0	0
TURDUS2	0,15%	1	0	1	kos černý, pěvuška modrá
ROFI1	0,12%	0	1	0	hýl rudý
CCF4	0,08%	0	1	0	0

Přenašeče hemosporid u našeho modelového druhu hýla rudého na lokalitě ve Vltavském luhu se nám podařilo identifikovat pro jednu linii rodu *Haemoproteus* (ROFI1) a je jím tiplík druhu *Culicoides segnis*.

V.5.2.2. Komáři rodů *Culex* a *Aedes*

Pro PCR detekci hemosporid bylo použito celkem 187 komárů druhů *Culex pipiens* (159 samic) a *Aedes* spp. (28 samic) rozdělených do skupin po 10 jedincích (případně méně viz V.3.3.). Použity byly pouze nenasáté samice odchycené do CDC pastí se sentinelou. Pozitivní výsledky vykazaly skupiny samic druhu *Culicoides pipiens*. Odhadnutá prevalence ptačích hemosporid byla asi 3,1 % (5 pozitivních skupin z 16). V samicích druhu *Culex pipiens* byly detekovány dvě linie hemosporid. Jedna linie rodu *Plasmodium* (SYAT05) a jedna linie rodu *Haemoproteus* – TURDUS2 (viz obr.18.). Zmíněná linie rodu *Plasmodium* nebyla detekována v žádném hostiteli na lokalitě, odhadnutá prevalence ve vektorech byla 0,6 %. Linie TURDUS2, patřící k druhu *Haemoproteus minutus*, byla detekována v ptačích hostitelích z lokality (viz výše) a rovněž v tiplících druhů *Culicoides kibunensis* a *C. festivipennis*. Její odhadnutá prevalence v rámci druhu *C. pipiens* byla 2,5 %.

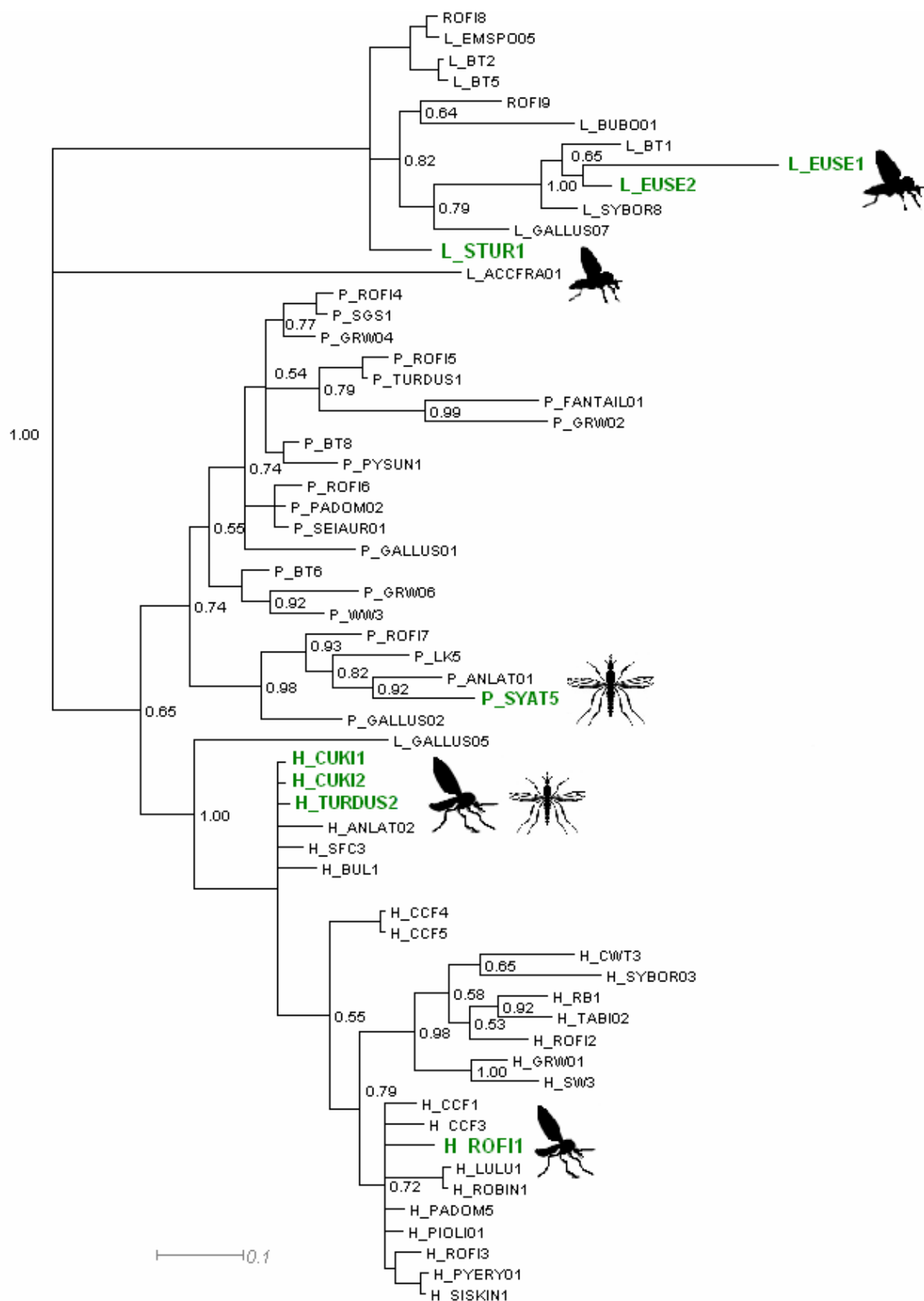
V.5.2.3. Muchničky druhu *Eusimulium securiforme*

Pro PCR detekci hemosporid bylo použito celkem 58 muchniček druhu *Eusimulium securiforme* rozdělených do skupin po 10 jedincích. Použity byly pouze nenasáté samice odchycené do CDC pastí se sentinelou. Všechny skupiny samic muchniček vykazaly pozitivní výsledky na přítomnost rodu *Leucocytozoon* sp., prevalence v rámci tohoto druhu muchniček byla velmi pravděpodobně vyšší jak 10%. V samicích muchniček byly detekovány tři linie leukocytozoonů – dvě nové linie EUSE1 a EUSE2 a již známá linie STUR1 (viz obr.18.). V žádném ptačím ani hmyzím hostiteli na lokalitě nebyly tyto linie detekovány.

VI.5.3. Vyšetření sentinelů

V rámci této části projektu byly vyšetřeny na přítomnost parazitů i zebříčky a křepelky, které sloužily jako sentinelové hostitelé pro přilákání hematofágního hmyzu (viz kapitola V.3.1). Přítomnost hemosporid však nebyly zaznamenána, a to ani před umístěním na studované lokalitě, ani po něm.

Následující fylogenetický strom vytvořený pomocí Bayesiánských metod ukazuje pozici linií hemosporid detekovaných v hematofágním hmyzu. Strom obsahuje všechny linie detekované v krevsajícím hmyzu, ve všech ptácích na lokalitě a všechny linie spojené s určitým morfologickým druhem ve studiích ostatních autorů.



Obr.18. Fylogenetický strom se znázorněním linií hemosporid zachycených v hematofágních dvoukřídlých během naší studie. Do stromu jsou zahrnuty všechny linie z hematofágních dvoukřídlých (zeleně), linie z hýla rudého z naší studie, linie z ostatních ptáků ze studijní lokality a linie doposud přiřazené ke konkrétnímu morfologickému druhu.

VI DISKUZE

VI.1. EPIZOOTOLOGIE PTAČÍCH HEMOSPORID HÝLA RUDÉHO

VI.1.1. Prevalence a diverzita linií v rámci hostitelského druhu

V naší studii jsme vyšetřovali na přítomnost hemosporid dospělé i mláďata hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*). Zjištěná celková prevalence ptačích hemosporid dosahovala u adultů hýla rudého téměř 62 %. V porovnání s ostatními studiemi na jednotlivých hostitelských druzích je to hodnota poměrně vysoká (i když nebereme v úvahu prevalenci rodu *Leukocytozoon*) (Bensch & Akesson 2003; Kimura et al. 2006; Durrant et al. 2008; Wood et al. 2007). Prevalence u jednotlivých druhů je ale údaj velmi variabilní a může nabývat prakticky všech hodnot od 0 do 100 % (Scheuerlein & Ricklefs 2006). Rozdíly způsobuje především expozice hostitelů vektorům (Yohannes et al. 2009), proto se může velmi lišit i v rámci jednoho hostitelského druhu (Bentz et al. 2006) či dokonce v rámci jedné populace obývajících různé habitaty (Wood et al. 2007).

Zajímavější informací je celkový počet zjištěných linií, který pro hýla rudého dosahoval 24 linií. Předpokládá se, že tažní ptáci obvykle hostí více linií než ptáci stálí (Smith et al. 2004), protože se u nich mohou vyskytovat jak linie přenášené na zimovišti či na zastávkách během tahu, tak i linie přenášené na hnízdišti. To ukázali na různých příkladech mnozí autoři (Waldenström et al. 2002; Krizanauskiene et al. 2006; Bensch et al. 2007; Hellgren et al. 2007b; Perez-Tris et al. 2007). U sedentárních druhů jsou počty linií většinou nižší (Krizanauskiene et al. 2006; Hellgren et al. 2007b, Wood et al. 2007; Loiseau et al. 2008). Srovnání sedentárních druhů a migrantů nejlépe vynikne na srovnání stálého hýla mexického (*Carpodacus mexicanus*), který hostil ve studii provedené u srovnatelně velkého vzorku jedinců jako v naší studii a navíc z osmi různých lokalit po celých USA pouze pět linií (Kimura et al. 2006).

Srovnatelné údaje z našeho území o prevalenci zjištěné pomocí molekulárních metod téměř chybí. Výjimkou jsou výsledky probíhajícího výzkumu na vrabcích domácích (*Passer domesticus*) z jižních Čech. U 50 jedinců byly nalezeny pouze dvě linie hemosporid (*Plasmodium* SGS1 a PADOM12) (Marzal A, osobní komunikace), což je v souladu s nižším počtem linií hemosporid u sedentárních druhů pěvců.

Relativně vysoký počet linií u hýla rudého není překvapivý, protože se jedná o migranta na dlouhé vzdálenosti. Většina zachycených linií byla však extrémně vzácná, což se projevilo na hodnotě indexu R_{25} , který pro rody *Plasmodium* a *Haemoproteus* dosahoval

pouze hodnoty 4,6. V porovnání s ostatními druhy evropských migrantů se jedná o hodnotu poměrně nízkou (Perez-Tris et al. 2007). Například pěnice (*Sylvia* spp.), konipasové (*Motacilla* spp.) či lejsci (*Muscicapa* spp.) dosahují hodnot okolo 7 až 9, což odráží především vyrovnanější poměr mezi prevalencemi jednotlivých linií, případně celkově vyšší prevalence a větší celkový počet linií.

Jak jsme očekávali, všechna mláďata byla vzhledem k jejich stáří (7 dní) negativní. Důvodem negativity je dlouhá prepatentní fáze infekce, která trvá minimálně 12 dnů (Valkiunas 2005). Proto se mláďata při dalších analýzách našeho výzkumu nebrala v úvahu a vždy se počítalo pouze s dospělci.

VI.1.2. Variace zastoupení linií v místě a čase

Prevalence jednotlivých linií v čase sice na studijních lokalitách mírně kolísala, ale zastoupení jednotlivých linií se v průběhu let nijak zásadně neměnilo. To je v souladu se závěry, ke kterým došli ve své dlouholeté studii na rákosníku velkém (*Acrocephalus arundinaceus*) Bensch et al. (2007). Prevalence sice klesala a rostla ve 4-letých cyklech (toto kolísání nejsme schopni na našich datech ověřit, protože studie probíhala výrazně kratší dobu), ale proporce jednotlivých linií se neměnila. Kolísání prevalence v čase se autorům nepodařilo jednoznačně vysvětlit, ale je pravděpodobné, že odráželo změny v abundanci vektorů (Bensch et al. 2007). K velice rozdílným výsledkům dospěli autoři v jiné víceleté studii provedené na budníčcích větších (*Phylloscopus trochilus*) (Bensch & Akesson 2003). Proporce nejvíce zastoupených linií se v čase výrazně měnila, jednoznačné vysvětlení pro tyto změny však autoři také nepředložili. Z výsledků je však zřejmé, že se během let měnily i lokality sběru vzorků, takže uvedené kolísání zastoupení linií v čase může odrážet i geografickou variaci ve výskytu těchto linií.

Geografickou variaci v počtu linií a prevalencích jsme mohli studovat pouze omezeně, protože dostatečný vzorek dospělých jedinců pocházel pouze z lokality ve Vltavském luhu. Další lokalita v Rychtářkách byla ve vzorcích zastoupena méně a vzdálené lokality ve Švédsku a Tádžikistánu téměř zanedbatelně (vzorky z obou posledně zmíněných lokalit lze použít pouze k ilustračnímu dokreslení výskytu jednotlivých linií). Výrazné změny v prevalenci a zastoupení hojných linií jsme u obou českých lokalit nezaznamenali. Lišili se pouze v zastoupení extrémně vzácných linií. Rovněž ptáci ze dvou zbývajících lokalit hostili často linie, které se vyskytovaly i u českých jedinců. To je v souladu s poznatkami o nevýrazné populační struktuře hýla rudého (Pavlova et al. 2005; Munclinger & Šašková nepublikovaná data). Dospělí ptáci hýla rudého se sice vrací na lokalitu, kde poprvé úspěšně zahnízdili (Albrecht et al. 2007), ale mladí jedinci se při tahu ze zimovišť zřejmě nevrací vždy na místo,

kde se narodili, ale putují náhodně s hejny dospělců ze zimoviště na různá hnízdiště. Tuto hypotézu podporují především provedené populační studie (část haplotypů dvou genů mtDNA popsanych z okolí Moskvy byla současně nalezena na lokalitě ve Vltavském luhu (Munclinger & Šašková nepublikovaná data)) a rovněž naše výsledky o výskytu jednotlivých linií hemosporid s ní nejsou v rozporu.

VI.1.3. Specifita linií jednotlivých rodů a charakteristika linií

Obecně se předpokládá, že parazité rodu *Haemoproteus* mají nejužší hostitelskou specifitu ze všech hemosporid. Méně hostitelsky specifický je rod *Leucocytozoon* a nejméně rod *Plasmodium* (Valkiunas 2005) Samozřejmě existují četné výjimky z tohoto schématu (Krizanauskiene et al. 2006; Ishtiaq et al 2007; Beadell et al. 2009).

Již známé linie patřící k rodu *Haemoproteus*, které byly v naší studii detekovány u hýla rudého, vždy pocházely pouze z pěvců z čeledi pěnkavovitých (Fringillidae). Všechny linie pocházející z čeledi pěnkavovitých tvoří na fylogenetickém stromu jasné klastry a nevyskytují se mezi nimi linie z jiných ptáků. Z fylogenetického stromu je ale také zřejmé, že různé linie hemoproteů pronikly do pěnkavovitých ptáků několikrát po sobě, v rámci jednotlivých klastrů si ale uchovaly hostitelskou specifitu v rámci čeledě.

Nejhojnější linie ROFI2 byla doposud zaznamenána pouze u hýla rudého (Krizanauskiene et al. 2006), což ukazuje na její striktní hostitelskou specifitu. Velmi nízké parazitémie této linie na hnízdní lokalitě hýla mohou naznačovat přenos na zimovišti (Bensch et al. 2007). Pro tuto skutečnost by svědčil i fakt, že linie ROFI2 byla zaznamenána u jedinců hýla rudého ze všech studovaných lokalit a i přes vysokou prevalenci nebyla tato linie zachycena ve vektorech odchycených na hnízdišti. Jiným vysvětlením by byla možnost jejího šíření v obrovském areálu, což však příliš nenaznačují data z vektorů na lokalitě, ve kterých tato linie i přes vysokou prevalenci v ptačím hostiteli nebyla zachycena. Jedná se samozřejmě pouze o hypotézu, protože absenci linie ve vektorech mohly způsobit i jiné faktory (načasování přenosu, absence specifického přenašeče v našem vzorku vektorů aj.). Možností jak přenos na hnízdišti potvrdit by bylo v budoucnu vyšetřit juvenilní jedince, kteří ještě nenavštívili zimoviště, ale jsou již dostatečně staří na to, aby se u nich vyvinula infekce (Hasselquist et al. 2007).

Méně častá linie SISKIN1 patří k druhu *Haemoproteus tartakovskiyi* (Valkiunas et al. 2008b) a je známá z několika evropských sedentárních druhů pěnkavovitých pěvců (Hellgren et al. 2007b, Valkiunas et al 2008b), což ukazuje na možný přenos v našich podmínkách. Tato linie byla rovněž detekována v hýlovi mexickém (*Carpodacus mexicanus*) v USA (Kimura et

al. 2006), což může ukazovat na její velké geografické rozšíření, případně recentní zavlečení této linie do Ameriky s evropskými pěvci.

Linie ROFI1 patřící k druhu *Haemoproteus magnus* (Krizanauskiene et al. 2006) je známá z předchozích studií ze stálých i tažných pěnkavovitých ptáků včetně hýla rudého (Krizanauskiene et al. 2006; Hellgren et al. 2007b). Nález této linie u přenašečů odchycených na hnízdní lokalitě hýlů bude diskutován v kapitole VI.4.2.

Linie CCF3 (*H. fringillae*) se zdála doposud být exkluzivní linií pro pěnkavu obecnou (*Fringilla coelebs*) (Krizanauskiene et al. 2006; Hellgren et al. 2007b; Valkiunas et al. 2008b), až v naší studii byla potvrzena u jiného hostitelského druhu. Linie PYER1 byla doposud zachycena pouze jednou a to u hýla škraboškového (*Pyrrhula erythaca*) v ZOO v San Diegu (Schrenzel et al. 2003). Nově zachycená linie ROFI3 tvoří klastr s liniemi pocházejících z pěnkavovitých ptáků a je blízce příbuzná linii druhu *Haemoproteus tartakovskiyi* (SISKIN1).

U parazitů rodu *Plasmodium* je poněkud jiná situace, v naší studii jsme zaznamenali u hýla rudého linie se širokou hostitelskou specifitou přesahující úroveň řádů (linie SGS1, GRW6, PADOM2 a FANTAIL1). Rovněž fylogenetický strom ukazuje, že zachycená plasmodia nevykazují žádnou vazbu na čeleď Fringillidae a že jejich specifita dosahuje nejvýše úrovně řádů (Passeriformes).

Nejhojnější linie SGS1 patří k druhu *Plasmodium relictum* (Palinauskas et al. 2007) a vyskytuje se ve velkém množství hostitelů po celém světě, byla rovněž zachycena u hýla mexického (Kimura et al. 2006). K morfologickému druhu *P. elongatum* patří linie GRW6 (Valkiunas et al. 2008a) opět s celosvětovým rozšířením. Některé z linií (FANTAIL1) byly doposud zjištěny pouze u ptáků z Asie a Austrálie (Beadell et al. 2004), což naznačuje přenos na zimovišti hýla rudého. Vzhledem k širokým hostitelským specifitám a velkým areálům rozšíření je u většiny ostatních linií obtížné odhadnout, kde se přenáší. Námi zachycené linie ROFI4 patří do příbuzenstva *P. relictum*, ROFI6 do příbuzenstva *P. cathemerium* a ROFI 7 do okolí druhu *P. juxtanuclaere*. Jediná linie doposud zaznamenaná u hýla rudého v jiných studiích, která nebyla zachycena v naší studii, je linie rodu *Plasmodium* BT7. Detekovali jsme ale novou linii ROFI5, která je linii BT7 blízce příbuzná, a obě patří do okolí druhu *Plasmodium circumflexum*.

Paraziti rodu *Leucocytozoon* zachycení u hýla v naší studii vykazovali specifitu pouze v rámci řádu pěvců (Passeriformes), ale napadají ptáky z různých čeledí, což jsme potvrdili i v rámci odchytů dalších druhů pěvců na studované lokalitě.

Nejhojnější linie BT2 je z předchozích studií známá z pěvců tří čeledí (lejskovití (Muscicapida, ťuhýkovití (Laniidae) a pěnicovití (Sylviidae)) a v naší studii byla rovněž detekována u slavíka modráčka (*Luscinia svecica*) a ťuhýka obecného (*Lanius collurio*) z prvních dvou čeledí a dokonce u sýkory lužní (*Parus montanus*) z čeledi sýkorovití Paridae. Sýkora lužní je na lokalitě stálý druh, proto můžeme očekávat přenos této linie i na lokalitě. Další linie tohoto rodu (BT1, BT5 a EMSPO5) z hýla rudého jsou známé z tažných evropských pěvců migrujících do Afriky, což naznačuje opět přenos v Evropě, nebo velké geografické rozšíření těchto linií. Nově zachycena linie ROFI8 má velmi blízko k linii EMSPO5 a druhá nová linie ROFI9 nevykazuje blízkou příbuznost se žádným morfologickým druhem a bude zřejmě příbuzná s liniemi z jiných čeledí pěvců, které nebyly zahrnuty do analýzy.

Do fylogenetického stromu rodu *Leucocytozoon* byla zahrnuta i linie (L_GALLUS05) přiřazená autory Omori et al. (2008) ke druhu *L. caulleryi*. Tato linie se však ukázala být více příbuzná s druhem *Plasmodium relictum* použitým ve stromu kvůli jeho zakořenění než se zbytkem leukocytozoonů. Rovněž v dalším fylogenetickém stromu s liniemi z přenašečů (viz obr.18) se sekvence nachází mezi rody *Plasmodium* a *Haemoproteus*, neodpovídá však žádné známé linii. Při porovnání se sekvencemi z databáze GenBank naznačuje podobnost spíše se sekvencemi rodu *Plasmodium*. Pro vysvětlení této skutečnosti můžeme navrhnout několik hypotéz: *L. caulleryi* patří do samostatného podrodu *Akiba* v rámci rodu *Leucocytozoon* (Bennett et al. 1965), proto je možné, že má velmi aberantní sekvenci. V úvahu připadá například možnost konvergence s rodem *Haemoproteus*, protože cytochrom *b* je kódující gen a *L. cyulleryi* je také přenášen tiplíky rodu *Culicoides* (Valkiunas 2005). Možné také je, že se jedná o chybu a jde o sekvenci novou linie rodu *Plasmodium* nebo *Haemoproteus* či ještě pravděpodobněji o směsnou sekvenci získanou z hostitele se smíšenou infekcí.

VI.2. MIKROSKOPICKÁ DETEKCE KREVNÍCH PARAZITŮ A JEJÍ POROVNÁNÍ S PCR DIAGNOSTIKOU

Mikroskopická detekce krevních hemosporid na krevních roztěrech ukázala výrazně nižší prevalence než PCR diagnostika. K tomuto závěru dospěla i řada dalších autorů (Fallon et al. 2003; Bentz 2006 et al.) a prozatím se zdá, že vyšší úspěšnost detekce těchto parazitů pomocí PCR bude způsobena vysokou citlivostí molekulárních metod při zachycování chronických infekcí (Ishtiaq et al. 2007). Hellgren (2004) provedl experimentální ředění diagnostikovaných vzorků a ukázal, že některé metody PCR (především nested PCR) jsou schopny zachytit i pouze jediný infikovaný erytrocyt ze 100 000. Při mikroskopickém vyšetření krevních roztěrů jsme schopni efektivně vyšetřit zhruba 10 000 erytrocytů (Votýpka et al. 2003), což vede k tomu, že velmi nízké parazitémie, které PCR zachytí, nejsme schopni mikroskopicky detekovat.

Mikroskopická detekce krevních parazitů byla obzvláště neúspěšná při odhalování infekcí rodem *Leucocytozoon* a odhalování smíšených infekcí. Kromě velmi nízké parazitémie, zde mohl hrát roli i fakt, že krevní roztěry nebyly vytvářeny k účelům parazitologického vyšetření, ale vznikly v rámci jiného projektu, který kladl důraz především na barvení různých typů leukocytů. Rovněž kvalita krevních roztěrů byla často diskutabilní, protože byly vytvářeny ve velice obtížných podmínkách přímo v terénu u ptáků chytaných na hnízdech a vše muselo být zvládnuto ve velmi krátkém čase. U neúspěšné detekce smíšených infekcí mohl hrát roli také fakt, že jeden z účastníků smíšené infekce má často mnohem nižší parazitémie než ten druhý (Perez-Tris & Bensch 2005b), což mohlo při celkově kriticky nízkých parazitemiích přispět k neúspěchu jejich detekcí při vyšetřování krevních roztěrů.

PCR má samozřejmě také své limity. Pokud se při smíšené infekci vyskytují velmi vysoké prevalence parazita jednoho druhu (linie), PCR často zachytí pouze tuto linii a smíšenou infekci podle dvojitých peaků již neodhalíme (Valkiunas et al. 2008d). Jediným řešením při odhalování takovýchto smíšených infekcí je použití specifických primerů (Loiseau et al. 2008) nebo klonování (Perez-Tris & Bensch 2005b). V naší studii však byla PCR spolehlivou metodou a neodhalila pouze pět infekcí detekovaných mikroskopickou diagnostikou. Ve všech případech se jednalo o velmi nízké parazitémie. Při detekci několika zaznamenaných vyšších parazitemií byla PCR detekce 100 % úspěšná.

PCR má tedy celkově vyšší úspěšnost detekce druhu a získáme informaci o příslušnosti parazita k určité linii (unikátnímu haplotypu cyt *b*). Hlavní výhodou mikroskopické detekce oproti PCR je možnost určit příslušnost parazita k morfologickému

druhu a také možnost určení parazitémie. Ve studiích zabývajících se ptačími hemosporidy je tedy výhodou spojit oba přístupy.

V naší studii jsme určili nejhojnějšího zástupce rodu *Haemoproteus* (linie ROFI2) jako druh *Haemoproteus coatneyi*. Sekvence cyt *b* však pro tento druh prozatím není spojená s morfologickým druhem. Na základě fylogenetického stromu se ukázala jako nejbližší linie spojená s morfospecies linie TABI2 (druh *H. paruli*). Studii spojující tuto linii s morfologickým druhem provedli američtí autoři Ricklefs & Fallon (2002). Valkiunas (2005) však uvádí, že nebyly zjištěny žádné morfologické rozdíly mezi *H. paruli* (popsaném původně u amerických pěvců) a *H. coatneyi* (z evropských pěvců). *H. paruli* je tudíž považován za mladší synonymum *H. coatneyi* (Valkiunas 2005). Celkové procento záměn mezi sekvencí linie TABI2 a ROFI2 (určeného v naší studii jako *H. coatneyi*) je 3,4 %, což umožňuje považovat tyto parazity za zástupce morfologického druhu *H. coatneyi*. Současní autoři totiž považují za zástupce stejného druhu linie parazitů nevykazující morfologické rozdíly a lišící se maximálně 5 % záměn v sekvenci cytochromu *b* (Hellgren 2007a).

Další dva druhy (*Plasmodium relictum* a *Haemoproteus fringillae*), které byly v naší studii na základě mikroskopické detekce určeny, odpovídají sekvencím, které již byly přiřazeny k určitému morfologickému druhu (Palinauskas et al. 2007; Krizanauskiene et al. 2006), proto můžeme naše určení považovat za správné.

VI.3. VZTAH PREVALENCE A CHARAKTERISTIK HOSTITELSKÉHO DRUHU

VI.3.1. Vliv prevalence hemosporid na hmotnost adultních jedinců, jejich reprodukční úspěch a ornamentaci samců

V naší práci jsme se pokusili určit vliv prevalence hemosporid a jejich linií v hostiteli na jeho nejrůznější charakteristiky, konkrétně na hmotnost a reprodukční úspěch hostitelů a na ornamentaci samců. Žádný z modelů však nebyl signifikantní a vliv prevalence parazitů a jednotlivých linií na tyto charakteristiky se nám nepodařilo prokázat.

Vliv samotné prevalence hemosporid na hmotnost studovaných pěvců bude zřejmě minimální. V naší studii jsme žádnýžádné vliv nezaznamenali a to je v souladu jak s dalšími terénními studii (Sanz et al. 2002; Gibb et al. 2005; Deviche et al. 2005), tak i experimentálními studii provedenými v laboratoři (Palinauskas et al. 2008). Je to zřejmě vliv nízké parazitémie u chronických infekcí; úbytek hmotnosti může být pouze krátkodobý, a to po nástupu akutní fáze infekce a rapidního zvýšení parazitémie, po skončení akutní fáze se však hmotnost rychle vrací do původního stavu (Valkiunas et al. 2005). V našem vzorku

hostitelů jsme aktuální výše parazitémie pomocí molekulárních metod nestudovali a vysoké parazitémie zjištěné mikroskopicky byly tak vzácné, že znemožňovaly znemožňovali jakékoli statistické vyhodnocení.

Absence vlivu prevalence na reprodukční úspěch si vysvětlujeme především tím, že jsme nepracovali s aktuální parazitemií, ale pouze s prevalencemi a počty linií hemosporid. Vysoké parazitémie v době akutních infekcí a relapsů se zřejmě podílejí na snížení rodičovských investic (Knowles at al. 2009). Knowles at al. (2009) provedli rozsáhlou metaanalýzu studií zabývajících se reprodukčním úspěchem a ukázali až třikrát větší vliv aktuálních parazitemií než celkových prevalencech chronických infekcí. Pokud jsou parazitémie během období hnízdění obecně vysoké (díky relapsům pod vlivem stresových a pohlavních hormonů (Garvin & Schoech 2006)) může být vliv prevalence na reprodukční úspěch poměrně snadno prokázán (Merila & Anderson 1999; Sanz et al. 2001). To ale nebyl případ našeho modelového druhu, kdy byla úroveň většiny parazitemií nízká.

Nejlepší cestou ke zjištění vlivu hemosporid na reprodukční úspěch hostitelů je tedy přesné vyšetření parazitémie v době hnízdění či provádění manipulovaných experimentů s léčenou a kontrolní skupinou, jako to ukázali např. Marzal et al. 2005 či Merino et al. 2000.

Ani ornament samců nevykazoval v naší studii žádnou závislost na infekci ptačími hemosporidy či počtu jejich linií. Absenci vztahu mezi intenzitou karotenoidního ornamentu a infekcí si vysvětlujeme specifickým načasováním pelichání a přepeřování hýla rudého. Díky extrémně dlouhé tažné vzdálenosti totiž tyto ptáky pelichají pouze jednou, a to již krátce po přiletu na zimoviště (během brzkého podzimu a zimy). Právě tento časový aspekt může vést k tomu, že při vzorkování po přiletu na hnízdiště nemáme žádnou informaci o tom, že tento pták mohl prodělat akutní fáze infekcí v době přepeřování a vysoké parazitémie mohly mít vliv na ukládání karotenoidů do peří.

Studie o vlivu hemosporid na zbarvení samců doposud vycházejí značně nekonzistentně a vyskytují se všechny varianty možného působení. Stejně jako v našem případě u hýla rudého, nezjistil žádný efekt prevalence hemosporid na karotenoidní ornament čечetek zimních (*Carduelis flammea*) ani Seutin (1994). Stejný autor ale prokázal negativní korelaci mezi prevalencech hemosporid a intenzitou karotenoidního zbarvení samců strnadů obecných (*Emberiza citrinella*) (Sunberg 1995). Přesně k opačné závislosti (tj. k pozitivní korelaci intenzity zbarvení a parazitace) dospěli Merila & Sheldon (1999) či Horak et al. (2001) u zvonků zelených (*Carduelis chloris*), respektive sýkor modřinek (*Cyanistes caeruleus*). Jasnějších závěrů v této problematice se možná dočkáme po širším zavedení metod umožňujících přesné stanovení parazitémie (například kvantitativní PCR) v přesně

stanovenou dobu. Tato doba by měla pokrývat období, kdy dochází k přepeřování samce tj. kdy zvýšená parazitémie může ovlivňovat proces ukládání karotenoidů do opeření.

VI.3.2. Vliv věku, pohlaví, počtu alel *Mhc* a celkové heterozygotnosti adultních jedinců na prevalenci hemosporid

V modelech testujících vliv věku, pohlaví počtu alel *Mhc* a celkové heterozygotnosti adultních hostitelů na prevalenci jednotlivých rodů hemosporid jsme prokázali pouze vliv věku a pohlaví na prevalenci rodu *Haemoproteus* a vliv počtu alel *Mhc* a celkové heterozygotnosti na prevalenci rodu *Plasmodium*.

Vliv pohlaví a věku na prevalenci hemosporid byl prokázán pouze u rodu *Haemoproteus*. Pro žádné další rody ani pro celkovou prevalenci nebyly průkazné rozdíly v prevalenci mezi pohlavími a věkovými skupinami zaznamenány, což odpovídá závěrům většiny ostatních autorů (Votýpka et al. 2003; Valkinuas et al. 2003; Deviche et al. 2005; Gibb et al. 2005; Ricklefs et al. 2005; Senlik et al. 2005) a v případě pohlaví i výsledku rozsáhlé metaanalýzy 33 studií zabývajících se vlivem pohlaví na prevalenci hemosporid (McCurdy et al. 1998).

Protože nemáme žádný důvod se domnívat, že by tomu mělo u parazitů rodu *Haemoproteus* jinak, vysvětlujeme si vliv pohlaví na prevalenci v našem modelu především zahrnutím dat z protahujících samců, kteří na lokalitě hnízdili. Jednalo o se poměrně velký soubor dat, který byl do modelu zahrnut především z toho důvodu, že jsme u těchto samců znali počet alel *MHC* a celkovou heterozygotnost a jejich zahrnutí se výrazně zvětšil analyzovaný vzorek. Žádné protahující samice však nebyly na lokalitě zaznamenány, a proto máme důvod se domnívat, že byly vzorkovány jen samice hnízdící na lokalitě. Protahující samci se mohli dlouhodoběji zdržovat na lokalitě s jinou epizootologií parazitů rodu *Haemoproteus* a absence protahujících samic, tudíž mohla způsobit signál v datech, který byl způsoben jiným faktorem než pohlavím. V případě věku, kdy byl rovněž jediný signifikantní vliv na prevalenci zaznamenán u rodu *Haemoproteus*, se nabízí vysvětlení, že protahující samci se lišili ve věkovém složení od zbytku jedinců hnízdících na lokalitě. Na ostatní proměnné by nemělo mít zahrnutí protahujících samců vliv, protože nemáme důvod se domnívat, že by se lišili v počtu alel *Mhc* či v celkové heterozygotnosti od samců hnízdících na lokalitě.

Počet alel *Mhc* měl vliv pouze na prevalenci u rodu *Plasmodium*. Tato korelace byla pozitivní – čím vyšší byl počet alel pro *Mhc*, tím větší byla pravděpodobnost, že daný jedinec bude hostit linii rodu *Plasmodium*. Toto zjištění podporuje hypotézu, že jedinci s větším počtem alel snáze přežijí akutní fázi infekce rodem *Plasmodium*, zatímco jedinci s menším

počtem alel *Mhc* v akutní fázi infekci podlehnou. To pak vede k nerovnováze mezi přeživšími jedinci s chronickou infekcí, kterou u nich později detekujeme. K tomuto závěru dospěli např. autoři studující vztah *Mhc* a prevalence hemosporid u rákosníků velkých (*Acrocephalus arundinaceus*) (Westerdahl et al. (2005)).

O tom, proč neměl počet alel vliv na prevalenci u ostatních rodů hemosporid, můžeme jen spekulovat. Je možné, že rody *Haemoproteus* a *Leucocytozoon* nejsou pro hostitele tolik patogenní a nakažení jedinci s méně alelami nejsou z populace odstraňováni. Dalším možným důvodem může být skutečnost, že liniová diverzita u hýla v rámci rodů *Haemoproteus* a *Leucocytozoon* je nižší (vyskytují se tu především hojné linie ROFI2 a BT2 a prevalence zbytku linií je zanedbatelná) v porovnání s rodem *Plasmodium*, a proto k přežití akutní infekce postačí i menší počet alel *Mhc*.

Stejně tak byl vliv celkové heterozygotnosti jehona prevalenci parazitů potvrzen pouze u rodu *Plasmodium*. Závislost byla tentokrát negativní, čím větší byla celková heterozygotnost hostitele, tím menší měl pravděpodobnost, že bude nakažen parazity rodu *Plasmodium*. Jedná se o první studii, která zjistila vliv heterozygotnosti ve vztahu k ptačím hemosporidům. Vztah celkové heterozygotnosti byl v souvislosti s ptačími hemosporidy studován pouze jednou. Ve studii provedené s velkým souborem poštolek jižních (*Falco naumanni*) však autoři nezjistili žádnou korelaci mezi celkovou heterozygotností a parazitací (Ortego et al. 2007). Vysvětlují si to především nízkou prevalencí hemosporid, která nedosahovala ani 5 %. O výhodách větší heterozygotnosti můžeme opět pouze spekulovat, v úvahu připadá vliv konkrétních lokusů.

VI.3.3. Vliv mikroskopicky určené prevalence na charakteristiky hostitele

U mikroskopicky zjištěné prevalence (u níž jsme mohli teoreticky předpokládat alespoň o něco vyšší úroveň parazitémie (Bentz et al. 2006)) jsme vliv krevních parazitů na hmotnost, reprodukční úspěch a ornamentaci samců hostitele neprokázali. Navíc se tato metoda určení prevalence ukázala jako neúspěšná při zjišťování vlivu charakteristik hostitele na prevalenci hemosporid, a to i tam, kde prevalence určená na základě PCR nějaký vztah prokázala. Na základě našich výsledků můžeme konstatovat, že ačkoli mikroskopicky zjištěná prevalence zřejmě může být interpretovatelná ve smyslu vyšší parazitémie (Bentz et al. 2006), tak v modelech zkoumajících vztah prevalence parazitů a charakteristik hostitele se neosvědčila lépe než prevalence stanovená PCR detekcí. Pravdou však je, že pro modely pracující s mikroskopickou prevalencí bylo k dispozici většinou menší množství dat než pro modely pracující v prevalenci určenou na základě PCR. Další příčinou mohly být obecně velmi nízké parazitémie hemosporid u většiny jedinců hýla rudého. Je možné, že kdyby se tu

vyskytovaly velké rozdíly v parazitémii a nezanedbatelná část hostitelů by měla vysoké parazitémie, tak by byla mikroskopická detekce v modelech úspěšnější.

Cestou, jak v budoucnu ověřit působení krevních hemosporid na náš modelový druh hostitele, může být přesné stanovení úrovně parazitémie pomocí kvantitativní PCR u velkého počtu vzorků a s tou pak počítat v modelech.

VI. 4. URČOVÁNÍ POTENCIONÁLNÍHO PŘENAŠEČE NA LOKALITĚ

VI.4.1. Odchycené druhy hematofágního hmyzu a selektivita odchyty

Porovnání odchycených druhů v obou typech pastí (CDC past se sentinely versus CDC fotopast s UV světlem) jednoznačně dokazuje, že odchyt hematofágního hmyzu lákaného na sentinely byl velice specifický, a proto se nám podařilo touto metodou odchytit především ornitofilní druhy hematofágního hmyzu. Obě pasti byly použity ve stejném termínu a ve stejných habitatech (nedaleko od sebe), takže rozdíl ve druhovém složení byl způsoben rozdílnou atraktivitou sentinelů pro různé druhy hematofágního hmyzu.

Ve vzorku odchyceném na sentinely výrazně převažují zástupci druhu *Culicoides kibunensis*, zatímco ve vzorku odchyceném na UV světlo není jejich relativní zastoupení zdaleka tak vysoké, což nás vede k závěru, že se jedná spíše o ornitofilní druh. Ornitofilii u druhu *C. kibunensis* zjistil též Černý (2006), při studiu hostitelských preferencí tiplíků na jižní Moravě. Na druhé straně nejvíce zastoupený druh ve vzorku odchyceném na UV světlo byl *C. obsoletus*, který se mezi tiplíky z CDC pastí se sentinely téměř nevyskytoval. To nás vede k závěru, že tento druh nebude ornitofilní nevykytoval, což je dáno jeho mamalofilií (Chvála 1980).

U fotopasti je velmi malé zastoupení komárů a muchniček (pouze pět jedinců) a nulové zastoupení muchniček, což však může být způsobeno zejména tím, že UV past byla vyvinuta především pro odchyt tiplíků (proto jsme při určování selektivity odchyty počítali pouze se druhy tiplíku *Culicoides* spp.).

Dalším významným rozdílem selektivity odchyty byla proporce nasátých a nenasátých samic, která byla u fotopasti výrazně větší. Do CDC pastí se chytaly chytali především nenasáté samice lákané na sentinely, což odpovídá skutečnosti, že pouze hladové samice jsou lákány ke krmení sání na hostiteli (CDC pasti musely navíc odchytávat většinu samic před samotným sáním na sentinelech). Samice, které se již na setinelovém hostiteli nasály opouští většinou klec v její dolní části, a proto nejsou do CDC pasti odchyceny.

VI.4.2. Zachycené linie

VI.4.2.1. Detekce hemosporid v tiplících rodu *Culicoides*

Náš projekt je první studií, která vyšetřovala tiplíky na přítomnost ptačích hemosporid pomocí molekulárních metod. Tiplíci jsou u pěvců považováni za přenašeče hemosporid rodu *Haemoproteus* (Martinsen et al. 2008). Právě linie tohoto parazita byly identifikovány v tiplících odchycených na lokalitě ve Vltavském luhu. Některé ze zachycených linií hemoproteů bylybyly detekovány u více druhů tiplíků, což potvrzuje nepříliš úzkou vektorovou specifitu těchto parazitů. Tyto závěry jsou v souladu s předešlými studiemi (Atkinson 1988; Garvin & Greiner 2003), které sice pracují pouze s konceptem morfologického druhu, ale jsou jedinou literaturou, se kterou se je možné naše výsledky diskutovat. Naše výsledky potvrzují, že tato široká hostitelská specifita není zřejmě způsobena tím, že by byl zkoumaný morfologický druh komplexem kryptických druhů, kde má každý kryptický druh svého vektora, ale je dána pouze nízkou vektorovou specifitu na úrovni linií.

Z našich dat také vyplývá, že více linií rodu *Haemoproteus* může být přenášeno jedním druhem tiplíka, což prokázali v několika publikacích i ostatní autoři, a to celkem u pěti druhů hemoproteů (Valkiunas et al. 2002; Valkiunas & Iezhova 2004a).

Mezi detekovanými liniemi jsou tři linie známé již z jiných hostitelů (TURDUS2, ROFI1 a CCF4) a dvě nové linie (CUKI1 a CUKI2). Linie TURDUS2 zachycená v *C. kibunensis* a *C. festivipennis* patří k morfologickému druhu *Haemoproteus minutus* a je poměrně hojnou linií u evropských druhů ptáků. Byl prozatím zaznamenán u 6 druhů evropských pěvců – kosa černého (*Turdus merula*), sedmihláska hajního (*Hippolais icterina*), ůhýka obecného (*Lanius collurio*), sýkořice vousaté (*Panurus biarmicus*), rákosníka obecného (*Acrocephalus scirpaceus*) a sýkory modřinky (*Parus caeruleus*) (Bentz et al. 2006; Hellgren et al. 2007a; Hellgren et al. 2007b; Wood et al. 2007). Tato linie byla detekována rovněž u sedentárních druhů ptáků z naší studijní lokality a její přenos na lokalitě je tedy velmi pravděpodobný.

Další linie ROFI1 z *C. segnis* patří ke druhu *H. magnus* a na naší lokalitě byla zachycena přímo u studovaného hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*). U evropských pěvců je tato linie známá i ze stálých ptáků (Krizanauskiene et al. 2006; Hellgren et al. 2007b), proto se zdá pravděpodobné, že se tiplík druhu *C. segnis* bude podílet na jejím přenosu i u ostatních ptačích druhů. Ostatní linie zachycené v tiplících nebyly detekovány v ptácích odchycených na lokalitě, ale hlavní příčinou bude zřejmě velmi nízký počet jedinců jiných ptačích druhů (v dostatečném počtu byl vzorkován pouze hýl rudý). Dá se předpokládat, že při ovzorkování

velkého počtu hostitelů z maximálního počtu druhů budou i tyto linie zachyceny, což může být výzvou při pokračování projektu. Poslední ze známých linií CCF4 byla doposud zachycena pouze u pěnkavy obecné (*Fringilla coelebs*), a to v Litvě (Hellgren 2007b).

Nově detekované linie CUKI1 a CUKI2 jsou si navzájem blízce příbuzné a obě spadají do okolí druhu *H. minutus* (TURDUS2).

Zjištěná prevalence hemoproteů ve vektorech na lokalitě byla poměrně nízká (1,2 %), což je však v souladu s ostatními studiemi provedenými na dostatečně velkém vzorku tiplíků v Evropě (Valkiunas 1997) i v Americe (Atkinson 1988). Prevalence u těchto studií se pohybovala od 0,6 do 2,5 %.

VI.4.2.2. Detekce hemosporid v komárech (Culicidae)

Komáři z čeledi Culicidae jsou u pěvců považováni za přenašeče hemosporid rodu *Plasmodium* (Martinsen et al. 2008). V naší studii jsme analyzovali vzorky z pěti druhů komárů (rod *Culex* a *Aedes*). Velikost vzorku byla však velmi omezená, dostatečný počet jedinců jsme měli pouze u druhu *Culex pipiens*, čtyři druhy rodu *Aedes* sp. bylybyli zastoupeny pouze okrajově, a což může být i důvod, proč v nich žádná ptačí hemosporida nebyla zachycena. Hlavním důvodem kvůa bude mamaliofilie většiny druhů rodu *Aedes*. Naopak naše populace komárů druhu *Culex pipiens* jsou z větší části ornitofilní (Šeblová 2008).

V komárech *C. pipiens* jsme detekovali dvě linie ptačích hemosporid. Linie rodu *Plasmodium* SYAT05 je známa již z pěnic (*Sylvia* sp.) a kosů (*Turdus* sp.) z Evropy i USA (Hellgren et al. 2007b; Bentz et al. 2006; Martinsen et al. 2008). Poněkud překvapivě byla však detekována linie rodu *Haemoproteus* TURDUS2. Vzhledem k tomu, že byly použity pouze nenasáté samice, kde nehrozila kontaminace nasátou krví a můžeme vyloučit i kontaminaci během molekulární detekce (negativní kontroly, opakování detekce), musíme vzít možnost potencionálního přenosu hemoproteů komáry v úvahu. Navíc se nejednalo o ojedinělý pozitivní vzorek a linie rodu *Haemoproteus* byla celkem zjištěna v 4 skupinách komárů druhu *Culex pipiens*. Zmíněná linie TURDUS2 byla zachycena i v jiných hostitelích na lokalitě, a to jak ve vektorech rodu *Culicoides*, tak i u ptačích hostitelů (viz výše). Hypotézu o přenosu některých linií či druhů hemoproteů komáry podporují i data ze studie, kterou provedla Ishtiaq et al. (2008). U komárů několika rodů (*Aedes* spp., *Culex* spp., *Anopheles* spp., *Coquillettidia* spp., *Verrallina* spp.) byly pomocí PCR detekovány dvě linie rodu *Haemoproteus*. Tento rod měl dokonce vyšší prevalenci ve vyšetřovaných vektorech než zástupci rodu *Plasmodium*. Autoři použili při detekci pouze hrudi komárů se slinnými žlázami, proto je kontaminace nasátou krví rovněž nepravděpodobná. V žádné jiné studii však

prozatím nebyl přenos hemoproteů komáry popsán (studii zabývajících se danou problematikou je však málo). Hypotézu o možném přenosu lze však potvrdit pouze experimentálním přenosem v laboratoři. Stejně tak je tomu i v případě definitivního potvrzení ostatních druhů Dipter jako možných přenašečů ptačích hemosporid. Data z PCR detekce mohou být dobrým podkladem pro určení přenašeče, ale potvrzení přenosu je možné provést pouze pitvou přenašečů a pokusy v laboratorních podmínkách (Ishtiaq 2008).

Celková prevalence ptačích hemosporid u komárů na naší studijní lokalitě byla 3,1 %. Rozsah prevalencí v pracích jiných autorů kolísá od relativně nízkých 1,1% (Ejiri et al. 2008) až po 15 % (Kimura 2008).

VI.4.2.2. Detekce hemosporid v muchničkách druhu *Eusimulium securiforme*

Muchničky z čeledi Simuliidae jsou u pěvců považovány za přenašeče hemosporid rodu *Leucocytozoon* (Martinsen et al. 2008). Během naší studie bylo odchyceno 58 muchniček druhu *Eusimulium securiforme*. U stejného druhu prokázal ornitofilii na našem území ve své studii už Černý (2006).

Všechny 10-členné skupiny vykazaly pozitivní výsledky při PCR, což nás vedlo k odhadu minimální prevalence na 10 %. Zachytili jsme celkem 3 linie rodu *Leucocytozoon*. K podobným závěrům dospěli i autoři zabývající se specifitou a druhovou diverzitou v rámci vektorů rodu *Leucocytozoon* (Desser & Bennett 1993). Experimentálně prokázali, že jeden druh muchničky může hostit minimálně pět druhů leukocytozoony. Jediná práce studující muchničky jako vektory hemosporid molekulárními metodami (Sato et al. 2009)), však ukazuje, že několik druhů muchniček hostí pouze jednu linii rodu *Leucocytozoon*. Žádné studie však nenaznačují příliš těsnou vazbu mezi leukocytozoony a jejich vektory, tyto závěry se však zdají být typické pro všechny vektory ptačích hemosporid (viz výše), což potvrzují i naše data ze studijní lokality.

Obě nově detekované linie (EUSI1, EUSI2) patří do příbuzenstva linií BT1 a SYBOR8, které byly detekovány v ptácích odchycených na studijní lokalitě. Mezi liniemi leukocytozoony zachycenými v naší studia byla jedna již známá linie STUR01 detekovaná zatím pouze u drozda zpěvného (*Turdus philomelos*) ochyceného v Litvě (Hellgren 2007b).

Linie zcela identické s těmi zachycenými v muchničkách nebyly v ptácích na lokalitě detekovány (především vlivem velmi malého počtu jedinců jiných ptačích druhů než hýla rudého). Stejně tak linie běžné u ptáků z lokality nebyly u vektorů zjištěny. Vysvětlujeme si to jednak omezenou velikostí vzorku muchniček. Vliv mohla mít i vysoká prevalence, která zřejmě vedla ke smíšeným infekcím ve smíšeném vzorku a některé linie tak nemusely být odhaleny.

VII ZÁVĚRY

1. Celková prevalence ptačích hemosporid u studovaného modelového druhu hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) byla u dospělců 62 %. U žádného mláděte ve věku sedmi dní nebyla infekce hemosporidy prokázána, prevalence . Prevalence se nešilanelišila u samců a samic. Prevalence v jednotlivých sezónách sice mírně kolísala, ale proporce nejhojnějších linií se nijak zásadně neměnily.

2. Celkově jsme detekovali u hýla rudého 24 linií ptačích hemosporid (12 linií rodu *Plasmodium*, po šesti liniích pro rody *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*). Jedna z linií (ROFI2) byla zcela dominantní a byla určena jako druh *Haemoproteus coatneyi*. Většina infekcí byla tvořena jednou linií parazita, čtvrtina infekcí byla smíšených. Většinou se jednalo o infekci působenou dvěma liniemi parazitů, v několika případech třemi a v jeden jedinec hostil čtyři linie hemosporid.

3. Zjistili jsme rozdíly v účinnosti zjišťování prevalence pomocí molekulárních metod (nested PCR) a mikroskopické detekce parazitů pomocí vyšetřování krevních roztěrů. Mikroskopická detekce nebyla schopna diagnostikovat více jak 40 % infekcí zjištěných pomocí PCR. PCR byla v tomto ohledu spolehlivější a neodhalila pouze pět (4,8 %) infekcí určených mikroskopicky. Mikroskopické vyšetření krevních roztěrů je ale nezbytné k určení morfologického druhu parazita a celkové parazitémie, a proto je určitě výhodou oba tyto přístupy zjišťování prevalence kombinovat.

4. Ptačí hemosporida se v naší studii ukázala jako nepatogenní parazit, žádný vliv na kondici a další charakteristiky hostitele nebyl prokázán, a to ani na základě dat z PCR detekce, ani na základě mikroskopického vyšetření. Prevalence hemosporid však může být ovlivněna některými charakteristikami hostitele. U prevalence parazitů rodu *Plasmodium* jsme zjistili pozitivní korelaci s počtem alel *Mhc* a negativní korelaci k celkové heterozygotnosti hostile.

5. Nejhojnější ornitofilní druhy hematofágních Dipter na lokalitě byly *Culicoides kibunensis* a *C. segnis* pro tiplíky, *Culex pipiens* pro komáry a jediný zaznamenaný druhem muchniček byl druh *Eusimulium securiforme*. Ve vektorech jsme zaznamenali několik linií hemosporid. Pět linií rodu *Haemoproteus* (z toho dvě nové) bylo detekováno v tiplících rodu *Culicoides*. Dvě

z těchto linií byly zjištěny i u ptáků odchycených na lokalitě a jedna z nich (ROFI1) dokonce v samotném modelovém druhu. Linie ROFI1 byla detekována v tiplících druhu *Culicoides segnis* a tento druh je tedy pravděpodobně přenašečem v místě hnízdiště hýla rudého. Tři linie rodu *Leucocytozoon* (z toho dvě nové) byly zachyceny v muchničkách rodu *Eusimulium securiforme*. Jedna linie rodu *Plasmodium* a překvapivě i jedna linie rodu *Heamoproteus* byly detekovány v komárech druhu *Culex pipiens*. K samotnému potvrzení přenosu rodu *Heamoproteus* komářími vektory je však nutné provést další experimenty.



VIII PŘÍLOHY

Příloha 1. Celková tabulka vyšetřených jedinců hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) z lokality Vltavský luh z let 2000-2008 uvádí kód (označení) ptáka, jeho pohlaví, sezónu odebrání krevního vzorku, přítomnost linie parazita rozdělených dle rodu, celkový počet linií diagnostikovaný molekulárními metodami a pozitivitu či negativitu při mikroskopickém vyšetření krevních roztěrů. Světle modrou barvou jsou označeni ptáci pozitivní při PCR detekci, žlutou při mikroskopické detekci a zeleně jsou ptáci vykazující nákazu jak při molekulární tak při mikroskopické detekci.

	kód	sex	rok	Haem.	Plas.	Leuc.	počet linií dle PCR	mikroskop
1.	12	M	2000	ROFI2			1	NA
2.	18	F	2000	ROFI2			1	NA
3.	19	M	2000	ROFI2	GRW06		2	NA
4.	24	F	2000				0	NA
5.	25	M	2000	ROFI2			1	NA
6.	31	F	2000				0	NA
7.	37	M	2000	ROFI2			1	NA
8.	43	F	2000	ROFI2			1	NA
9.	49	F	2000				0	NA
10.	101	M	2000				0	NA
11.	108	M	2000				0	NA
12.	18	F	2001	ROFI2			1	NA
13.	25	M	2001	ROFI2			1	NA
14.	55	M	2001				0	NA
15.	56	F	2001	ROFI2			1	NA
16.	61	M	2001	ROFI2			1	NA
17.	62	F	2001	ROFI2			1	NA
18.	69	F	2001				0	NA
19.	73	F	2001	ROFI2			1	NA
20.	80	M	2001				0	NA
21.	81	F	2001	ROFI2			1	NA
22.	86	M	2001			BT2	1	NA
23.	87	F	2001				0	NA
24.	94	M	2001				0	NA
25.	95	F	2001	ROFI2		BT2	2	NA
26.	101	M	2001				0	NA
27.	102	F	2001	ROFI2			1	NA
28.	108	M	2001				0	NA
29.	115	M	2001		WW3		1	NA
30.	116	F	2001	Haem. sp.	SGS1		2	NA
31.	121	M	2001				0	NA
32.	122	F	2001	ROFI2			1	NA
33.	127	M	2001				0	NA
34.	128	F	2001				0	NA
35.	131	M	2001				0	NA
36.	132	F	2001				0	NA
37.	1001	M	2001				0	NA
38.	1003	M	2001		SGS1		1	NA
39.	1101	M	2001				0	NA
40.	144	F	2002		SGS1		1	NA
41.	149	M	2002	ROFI2			1	NA
42.	150	F	2002	Haem. sp.		BT2	2	NA
43.	156	M	2002	ROFI2			1	NA

44.	157	F	2002				0	NA
45.	179	M	2002	ROFI2			1	NA
46.	185	F	2002	ROFI2, CCF3			2	NA
47.	193	F	2002	ROFI2	Plas. sp.		2	NA
48.	198	M	2002				0	NA
49.	199	F	2002				0	NA
50.	204	M	2002	ROFI2	ROFI4	BT5	3	NA
51.	205	F	2002	ROFI2			1	NA
52.	211	M	2002	ROFI2			1	NA
53.	219	F	2002				0	NA
54.	225	M	2002				0	NA
55.	232	M	2002				0	NA
56.	233	F	2002		FANTAIL1		1	NA
57.	1004	M	2002		WW3		1	NA
58.	1005	M	2002	ROFI2			1	NA
59.	1006	M	2002	ROFI2			1	NA
60.	1007	M	2002	ROFI2			1	NA
61.	1009	M	2002				0	NA
62.	1010	M	2002				0	NA
63.	1102	M	2002				0	NA
64.	24	F	2003	ROFI2			1	NA
65.	102	F	2003	ROFI2		BT2	2	NA
66.	185	F	2003	ROFI2, CCF3			2	NA
67.	241	F	2003		FANTAIL1		1	NA
68.	247	F	2003		SGS1		1	2
69.	254	F	2003				0	NA
70.	260	M	2003	ROFI2			1	NA
71.	261	F	2003	ROFI2			1	NA
72.	279	M	2003	ROFI2			1	1
73.	280	F	2003	ROFI2			1	NA
74.	287	F	2003	ROFI2			1	NA
75.	294	F	2003	ROFI2			1	NA
76.	300	M	2003				0	NA
77.	301	F	2003	ROFI2			1	NA
78.	306	M	2003	ROFI2			1	NA
79.	307	F	2003	ROFI1			1	NA
80.	312	M	2003	ROFI2			1	NA
81.	313	M	2003	ROFI2			1	NA
82.	318	M	2003	ROFI2			1	NA
83.	319	F	2003	ROFI2			1	NA
84.	325	M	2003	ROFI2			1	NA
85.	86	M	2004	ROFI2		BT2	2	0
86.	94	M	2004	ROFI2			1	0
87.	131	M	2004	ROFI2			1	0
88.	205	F	2004	ROFI2			1	1
89.	211	M	2004	ROFI2			1	1
90.	232	M	2004	ROFI2			1	0
91.	246	M	2004	ROFI2	SGS1		2	1
92.	294	F	2004	ROFI2		BT2	2	0
93.	312	M	2004	ROFI2			1	1
94.	318	M	2004	ROFI2			1	1
95.	350	M	2004	ROFI2	SGS1		2	0
96.	351	F	2004				0	0
97.	369	F	2004	ROFI2			1	0

98.	374	M	2004	SISKIN1	Plas. sp.		2	0
99.	375	F	2004	ROFI2			1	1
100.	392	M	2004	CCF3	Plas. sp.		2	1
101.	393	F	2004				0	0
102.	410	F	2004				0	0
103.	422	F	2004	ROFI2		ROFI8	2	1
104.	434	M	2004				0	0
105.	435	F	2004	ROFI2			1	0
106.	450	M	2004	ROFI2			1	1
107.	24	F	2005	ROFI2			1	0
108.	94	M	2005	ROFI2			1	0
109.	211	M	2005	ROFI2			1	0
110.	241	F	2005	ROFI2	FANTAIL1		2	0
111.	280	F	2005	ROFI2			1	1
112.	375	F	2005	ROFI2			1	1
113.	462	M	2005	ROFI2			1	1
114.	463	F	2005				0	0
115.	469	M	2005		SGS1		1	0
116.	470	F	2005		WW3		1	0
117.	475	M	2005		PADOM02		1	0
118.	476	F	2005				0	0
119.	481	M	2005				0	0
120.	489	M	2005				0	0
121.	496	F	2005				0	0
122.	504	M	2005		PADOM02		1	0
123.	505	F	2005				0	0
124.	509	M	2005	ROFI2			1	1
125.	510	F	2005				0	0
126.	514	M	2005				0	0
127.	515	F	2005	ROFI2			1	1
128.	527	M	2005	CCF3			1	0
129.	534	M	2005				0	0
130.	535	F	2005	ROFI2			1	1
131.	540	M	2005	ROFI2			1	1
132.	541	M	2005	ROFI2, ROFI3			2	1
133.	542	F	2005				0	NA
134.	549	F	2005				0	NA
135.	1201	M	2005				0	0
136.	1202	M	2005		BT8		1	0
137.	1203	M	2005				0	0
138.	1204	M	2005				0	0
139.	1205	M	2005				0	1
140.	1206	M	2005	ROFI2			1	1
141.	1207	M	2005				0	0
142.	1208	M	2005	ROFI2	Plas. sp.		2	1
143.	1209	M	2005				0	0
144.	246	M	2006	ROFI2	SGS1		2	1
145.	253	M	2006				0	1
146.	312	M	2006	ROFI2			1	0
147.	375	F	2006	ROFI2			1	1
148.	469	M	2006		SGS1		1	2
149.	470	F	2006	ROFI2	WW3		2	1
150.	476	F	2006	ROFI2			1	0
151.	515	F	2006	ROFI2			1	1

152.	576	F	2006	ROFI2		BT2	2	1
153.	581	M	2006	ROFI2			1	0
154.	582	F	2006	ROFI2			1	1
155.	589	M	2006				0	1
156.	590	F	2006				0	0
157.	597	F	2006				0	0
158.	602	M	2006				0	0
159.	603	F	2006				0	0
160.	608	M	2006				0	1
161.	613	M	2006				0	0
162.	614	F	2006	ROFI2			1	1
163.	623	M	2006				0	0
164.	624	F	2006			BT1	1	0
165.	630	F	2006				0	1
166.	1210	M	2006				0	0
167.	1211	M	2006		PADOM02		1	2
168.	1212	M	2006	ROFI2	LK5		2	0
169.	1213	M	2006			EMSP005	1	0
170.	1214	M	2006	ROFI2			1	0
171.	1215	M	2006				0	0
172.	1216	M	2006			BT2	1	0
173.	1217	M	2006				0	0
174.	1218	M	2006				0	0
175.	1219	M	2006				0	0
176.	1220	M	2006	ROFI2			1	1
177.	1221	M	2006				0	0
178.	205	F	2007	ROFI2	SGS1	BT2	3	2
179.	375	F	2007	ROFI2			1	1
180.	476	F	2007	ROFI2		BT2	2	0
181.	528	M	2007	ROFI2			1	0
182.	541	M	2007	ROFI2, ROFI3			2	1
183.	602	M	2007	ROFI2			1	0
184.	608	M	2007			BT2	1	0
185.	640	M	2007				0	NA
186.	641	F	2007				0	0
187.	647	M	2007				0	0
188.	648	F	2007	ROFI2			1	1
189.	652	M	2007		PADOM02		1	2
190.	666	M	2007	ROFI2			1	0
191.	667	F	2007	ROFI2			1	1
192.	673	M	2007				0	0
193.	674	F	2007	ROFI2	Plas. sp.		2	0
194.	692	M	2007	ROFI2	PADOM02		2	1
195.	693	F	2007	ROFI2			1	1
196.	699	M	2007	ROFI2			1	0
197.	700	F	2007	ROFI2			1	0
198.	705	M	2007	ROFI2		ROFI9	2	1
199.	706	F	2007	ROFI2			1	0
200.	712	M	2007	ROFI2			1	1
201.	713	M	2007	ROFI2			1	0
202.	715	F	2007	ROFI2			1	1
203.	1222	M	2007				0	0
204.	1223	M	2007				0	0
205.	1224	M	2007				0	0

206.	1225	M	2007				0	0
207.	1226	M	2007				0	0
208.	1227	M	2007	ROFI2			1	0
209.	1228	M	2007				0	0
210.	1229	M	2007	ROFI2			1	1
211.	1230	M	2007	ROFI2			1	1
212.	1231	M	2007			BT2	1	0
213.	1232	M	2007				0	0
214.	1233	M	2007				0	0
215.	205	F	2008	ROFI2, ROFI1	SGS1	BT2	4	NA
216.	253	M	2008				0	0
217.	375	F	2008	ROFI2		ROFI8	2	1
218.	476	F	2008				0	0
219.	589	M	2008				0	0
220.	592	M	2008	ROFI2			1	1
221.	603	F	2008				0	0
222.	608	M	2008			BT2	1	0
223.	640	M	2008				0	0
224.	693	F	2008	ROFI2	ROFI5	ROFI9	3	1
225.	715	F	2008	ROFI2			1	1
226.	734	M	2008	ROFI2			1	1
227.	742	M	2008				0	0
228.	749	M	2008	ROFI2			1	1
229.	750	F	2008				0	0
230.	755	M	2008				0	0
231.	761	M	2008		ROFI6		1	0
232.	762	F	2008	ROFI2	BT6		2	0
233.	763	M	2008	ROFI2	BT6		2	1
234.	764	M	2008				0	0
235.	765	F	2008				0	0
236.	766	F	2008				0	0
237.	1214	M	2008	ROFI2			1	1
238.	1234	M	2008				0	0
239.	1235	M	2008				0	0
240.	1236	M	2008				0	0
241.	1237	M	2008				0	0
242.	1238	M	2008	ROFI2			1	0
243.	1239	M	2008		WW3		1	0
244.	1240	M	2008				0	0
245.	1241	M	2008		SGS1		1	2
246.	1242	M	2008	ROFI1			1	0
247.	1243	M	2008	ROFI2			1	1
248.	1244	M	2008	ROFI2	SGS1		2	0
249.	1245	M	2008				0	0
250.	1246	M	2008	ROFI2			1	1
251.	1247	M	2008				0	0

Příloha 2. Celková tabulka vyšetřených jedinců hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) z lokality Rychtářky z let 2005-2007 uvádí kód (označení) ptáka, jeho pohlaví, sezónu odebrání krevního vzorku, přítomnost linie parazita rozdělených dle rodu, celkový počet linií diagnostikovaný molekulárními metodami. Světle modrou barvou jsou označeni ptáci pozitivní při PCR detekci.

	kód	sex	rok	Haem.	Plas.	Leuc.	počet linií
1.	01A	M	2005	ROFI2			1
2.	02A	F	2005	ROFI2	Plas. sp.		2
3.	03A	M	2005	ROFI2			1
4.	04A	M	2005	ROFI1			1
5.	05A	F	2005				0
6.	06A	F	2005	ROFI2			1
7.	07A	M	2005	ROFI2		BT2	2
8.	08A	M	2005				0
9.	23A	M	2005				0
10.	24A	F	2005				0
11.	25A	F	2005			BT2	1
12.	26A	M	2005	ROFI2			1
13.	27A	F	2005	Haem sp.		BT2	2
14.	28A	M	2005	ROFI2			1
15.	34A	F	2005		SGS1		1
16.	40A	M	2005				0
17.	41A	M	2005	ROFI2			1
18.	42A	M	2005	CCF3			1
19.	43A	M	2005	SISKIN1			1
20.	44A	M	2005	Haem.sp.			1
21.	45A	F	2005				0
22.	46A	M	2005	Haem.sp.			1
23.	01B	M	2006				0
24.	02B	F	2006				0
25.	03B	M	2006	ROFI2, SISKIN1			2
26.	04B	M	2006				0
27.	05B	F	2006				0
28.	06B	M	2006	ROFI2			1
29.	07B	F	2006				0
30.	08B	M	2006	ROFI2		BT2	2
31.	09B	M	2006	ROFI2		BT2	2
32.	10B	M	2006	ROFI2	Plas. sp.		2
33.	11B	F	2006	ROFI2			1
34.	12B	F	2006				0
35.	13B	F	2006	ROFI2, SISKIN1		BT2	3
36.	14B	M	2006		SGS1		1
37.	15B	M	2006	ROFI2			1
38.	16B	M	2006	ROFI2			1
39.	23B	M	2006	ROFI2			1
40.	24B	F	2006	ROFI2	SGS1		2
41.	26B	F	2006	ROFI2			1
42.	27B	M	2006	ROFI2			1
43.	32B	F	2006				0
44.	02C	M	2007	ROFI2	Plas. sp.		2
45.	03C	M	2007			BT2	1
46.	04C	F	2007				0
47.	05C	F	2007	PYER1	Plas. sp.		2
48.	06C	M	2007				0

49.	07C	F	2007				0
50.	08C	M	2007				0
51.	09C	F	2007	ROFI2			1
52.	10C	F	2007				0
53.	11C	M	2007	ROFI2			1
54.	12C	F	2007	ROFI2		BT2	2
55.	13C	M	2007	ROFI2			1
56.	14C	M	2007	ROFI2	SGS1	BT2	3
57.	15C	F	2007				0
58.	16C	M	2007				0

Příloha 3. Tabulka vyšetřených jedinců hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) z lokalit Lyangar a Dzhaushangoz, Pamír z roku 2008 uvádí kód (označení) ptáka, jeho pohlaví, sezónu odebrání krevního vzorku, přítomnost linie parazita rozdělených dle rodu, celkový počet linií diagnostikovaný molekulárními metodami. Světle modrou barvou jsou označeni ptáci pozitivní při PCR detekci.

	kód	sex	rok	Haem.	Plas.	Leuc.	počet linií
1.	MU107	M	2008	ROFI2			1
2.	MU108	M	2008	ROFI2, ROFI3			2
3.	MU109	F	2008	ROFI2, PYER1			2
4.	MU110	F	2008				0

Příloha 4. Tabulka vyšetřených jedinců hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) z lokality Götaälv, Švédsko z roku 2007 uvádí kód (označení) ptáka, jeho pohlaví, sezónu odebrání krevního vzorku, přítomnost linie parazita rozdělených dle rodu, celkový počet linií diagnostikovaný molekulárními metodami. Světle modrou barvou jsou označeni ptáci pozitivní při PCR detekci.

	kód	sex	rok	Haem.	Plas.	Leuc.	počet linií
1.	S1	M	2007				0
2.	S2	F	2007	ROFI2			1
3.	S3	M	2007	ROFI2	ROFI7	BT2	3
4.	S4	M	2007			BT2	1
5.	S5	F	2007				0
6.	S6	M	2007				0
7.	S7	M	2007				0
8.	S8	F	2007				0

Příloha 5. Tabulka uvádí počty komárů (Culicidae) a muchniček (*Eusimulium* spp.) odchytených na sentinely a na UV světlo. Čísla v závorkách u celkových součtů uvádí počet nasátých samic

		<i>Culex pipiens</i>	<i>Aedes cinereus</i>	<i>Ae. communis</i>	<i>Ae. sticticus</i>	<i>Ae. cantans</i>	Culicidae celkem	<i>Eusimulium</i> spp.
Past.č 1	8.6.2008	3	1				4	0
(křepelky,les)	9.6.2008	11	1				12	1
	10.6.2008	11	2		2		15	1
	11.6.2008	16			3	1	20	2
	12.6.2008	11			1		12	0
Past.č 2	8.6.2008						0	0
(zebřičky,les)	9.6.2008						0	1
	10.6.2008						0	17
	11.6.2008						0	25
	12.6.2008	3					3	4
Past č. 3	8.6.2008	0					0	0
(zebřičky,bažina)	9.6.2008	3					3	0
	10.6.2008	2					2	1
	11.6.2008	2					2	1
	12.6.2008	3		1			4	1
Past č. 4	8.6.2008	2	1	1			4	1
(křepelky,bažina)	9.6.2008	10	1				11	0
	10.6.2008	4	1		1		6	0
	11.6.2008	3					3	0
	12.6.2008	4	1	1			6	0
Past.č 1	26.7.2008	22	1			1	24	1
(zebřičky,les)	27.7.2008	27		1			28	0
Past.č 2	26.7.2008	16	3	0	1		20	0
(zebřičky,bažina)	27.7.2008	11	2	1			14	2
celkem sentinel		164 (5)	14	5	8 (1)	2	193 (6)	58
Fotopast- Bažina	9.6.2008	0					0	0
Fotopast- Bažina	27.6.2008	2		1		1	4	0
Fotopast- Les	10.6.2008	0	1				1	0
Fotopast-Les	26.6.2008	0					0	0
celkem fotopast		2 (1)	1	1	0	1	5	0

IX CITOVANÁ LITERATURA

- Albrecht T. 2004.** Edge effect in wetland-arable land boundary determines nesting success of scarlet rosefinches (*Carpodacus erythrinus*) in the Czech Republic. *AUK* 121, 361-371.
- Albrecht T, Schnitzer J, Kreisinger J, Exnerová A, Bryja J, Munclinger P, 2007.** Extrapair paternity and the opportunity for sexual selection in long-distant migratory passerines. *Behavioral Ecology* 18, 477-486.
- Arriero E, Moller AP. 2008.** Host ecology and life-history traits associated with blood parasite species richness in birds. *Journal of Evolutionary Biology* 21, 1504-1513.
- Atkinson CT, Greiner 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. 1988.** Epizootiology of *Haemoproteus meleagridis* (Protozoa: Haemosporina) in Florida: potential vectors and prevalence in naturally infected *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology* 74, 228-239.
- Atkinson CT, Greiner EC, Forrester DJ. 1988.** Pathogenicity of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in experimentally infected domestic turkeys. *Journal of Parasitology* 74, 228-239.
- Atkinson CT. 1991.** Sporogonic development of *Haemoproteus meleagridis* (Haemosporina: Haemoproteidae) in *Culicoides edeni* (Diptera: Ceratopogonidae). *Canadian Journal of Zoology* 69, 1880-1888.
- 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, 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.
- Bennett GF, Garnham PCC, Fallis AM. 1965.** On Status of Genera *Leucocytozoon* Ziemann, 1898 and *Haemoproteus* Kruse, 1890 (Haemosporidiida: Leucocytozoidae and Haemoproteidae). *Canadian Journal of Zoology* 43, 927-932.
- Bennett GF, Okia NO, Ashford RW, Campbell AG. 1972.** Avian Haemoproteidae. II. *Haemoproteus enucleator* sp. n. from Kingfisher, *Ispidina picta* (Boddaert). *Journal of Parasitology* 58, 1143-1147.
- Bennett GF, Peirce MA, Ashford RW. 1993.** Avian Haematozoa – mortality and pathogenicity. *Journal of Natural History* 27, 993-1001.
- Bensch S, Akesson A. 2003.** Temporal and spatial variation of hematozoans in Scandinavian willow warblers. *Journal of Parasitology* 89, 388-391.
- Bensch S, Perez-Tris J, Waldenstrom J, Hellgren O. 2004.** Linkage between nuclear and mitochondrial DNA sequences in avian malaria parasites: Multiple cases of cryptic speciation? *Evolution* 58, 1617-1621.
- Bensch S, Waldenstrom 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.
- Bensch S, Hellgren O, Pérez-Tris 2009.** MalAvi: A public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* (in press).
- Bentz S, Rigaud T, Barroca M, Martin-Laurent F, Bru D, Moreau J, Faivre B. 2004.** 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.
- Bjorklund M. 1990.** Mate choice is not important for female reproductive success in the Common Rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). *AUK* 107, 35-44.

- Bonneaud C, Perez-Tris J, Federici P, Chastel O, Sorci G. 2006.** Major histocompatibility alleles associated with local resistance to malaria in a passerine. *Evolution* 60, 383-389.
- Brush AH. 1978.** *Avian pigmentation*. Academic Press, New York, New York State, 580 p.
- Cosgrove CL, Day KP, Sheldon BC. 2006.** Coamplification of *Leucocytozoon* by PCR diagnostic tests for avian malaria: A cautionary note. *Journal of Parasitology* 92, 1362-1365.
- Cramp P, Perrins CM, Brooks DJ. 1994.** The birds of Western Palearctic. Oxford University Press, Oxford, 557 p.
- Crawley MJ. 2007.** *The R Book*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 942 p.
- Černý O. 2006.** Hostitelé a vektorů trypanosom pěvců. *Diplomová práce katedry Parazitologie PřF UK*, 96 p.
- Dale S, Kruszewicz A, Slagsvold T. 1996.** Effects of blood parasites on sexual and natural selection in the pied flycatcher. *Journal of Zoology* 238, 373-393.
- Davidar P, Morton ES. 1993.** Living with parasites: prevalence of a blood parasite and its effect on survivorship in the purple martin. *AUK* 110, 109-116.
- Desser SS, Yang YJ. 1973.** Sporogony of *Leucocytozoon* spp. in mammalophilic simuliids. *Canadian Journal of Zoology* 51, 793.
- Deviche P, McGraw K, Greiner EC. 2005.** Interspecific differences in hematozoan infection in sonoran desert *Aimophila* sparrows. *Journal of Wildlife diseases* 41, 532-541.
- Donovan TA, Schrenzel M, Tucker TA, Pessier AP, Stalis IH. 2008.** Hepatic hemorrhage, hemocoelom, and sudden death due to *Haemoproteus* infection in passerine birds: eleven cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 304-313.
- Drovetski SV, Zink RM, Rohwer S, Fadeev IV, Nesterov EV, Karagodin I, Koblik EA Redkin YA. 2004.** Complex biogeographic history of a Holarctic passerine. *Proceedings of the Royal Society of London series B* 271, 545-551.
- Dufva R. 1996.** Blood parasites health reproductive success and egg volume in female Great Tits *Parus major*. *Journal Avian Biology* 27, 83-87.
- Durrant, Marra PP, Fallon SM, Colbeck GJ, Gibbs, Hobson, Norris DR, Bernik B, Lloyd VL, Fleischer RC. 2008.** Parasite assemblages distinguish populations of a migratory passerine on its breeding grounds. *Journal of Zoology* 274, 3218-3226.
- Ejiri H, Sato Y, Sasaki E, Sumiyama D, Tsuda Y, Sawabe K, Matsui S, Horie S, Akatani K, Takagi M, Omori S, Murata K, Yukawa M. 2008.** Detection of Avian *Plasmodium* spp. DNA Sequences from Mosquitoes Captured in Minami Daito Island of Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 70, 1205-1210.
- 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. *PNAS* 95, 8124-8129.
- Fallis AM. 1964.** Feeding and related behaviour of female Simuliidae (Diptera). *Experimental Parasitology* 15, 439-470.
- Fallon SM, Ricklefs RE, Swanson BL, Bermingham E. 2003.** Detecting avian malaria: An improved polymerase chain reaction diagnostic. *Journal of Parasitology* 89, 1044-1047.
- Freed LA, Cann RL. 2006.** DNA quality and accuracy of avian malaria parasites: A review. *Condor* 108, 459-473.
- Fargallo JA, Merino S. 2004.** Clutch size and haemoparasite species richness in adult and nestling blue tits. *Ecoscience* 11, 168-174.
- Fargallo JA, Merino S. 2004.** Clutch size and haemoparasite species richness in adult and nestling blue tits. *Ecoscience* 11, 168-174.
- Fox DL. 1976.** *Animal biochromes and structural colors*. University of California Press, Berkeley, California, 845 p.
- Freier JE, Friedman S. 1987.** Effect of *Plasmodium gallinaceum* infection on the mortality and body weight of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 24, 6-10.

- Garvin MC. 2003.** Pathogenicity of *Haemoproteus danilewskyi*, Kruse, 1890, in blue jays (*Cyanocitta cristata*). *Journal of Wildlife Diseases* 39, 161-169.
- Garvin MC, Greiner EC. 2003a.** Epizootiology of *Haemoproteus danilewskyi* (Haemosporina : Haemoproteidae) in blue jays (*Cyanocitta cristata*) in Southcentral Florida. *Journal of Wildlife Diseases* 39, 1-9.
- Garvin MC, Greiner EC. 2003b.** Ecology of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in southcentral Florida and experimental *Culicoides* vectors of the avian hematozoan *Haemoproteus danilewskyi* Kruse. *Journal of Wildlife Diseases* 39, 170-178.
- Garvin MC, Schoech SJ. 2006.** Hormone levels and infection of *Haemoproteus danilewskyi* in free-ranging blue jays (*Cyanocitta cristata*). *Journal of Parasitology* 92, 659-662.
- Gibb CE, Jones J, Girvan MK. 2005.** Geographic variation in prevalence and parasitemia of *Haemoproteus paruli* in the cerulean warbler (*Dendroica cerulea*). *Canadian Journal of Zoology* 83, 626-629.
- Gonzalez G, Sorci G, Moller AP, Ninni P, Haussy C, de Lope F. 1999.** Immunocompetence and condition-dependent sexual advertisement in male house sparrows (*Passer domesticus*). *Journal of Animal Ecology* 68, 1225-1234.
- Hackett SJ. 1996.** Molecular phylogenetics and biogeography of Tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5, 368-382
- 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.
- Hamilton WD, Zuk M. 1982.** Heritable true fitness and bright birds: a role for parasites. *Science* 218, 384-387.
- Hasselquist D, Ostman O, Waldenstrom J, Bensch S. 2007.** Temporal patterns of occurrence and transmission of the blood parasite *Haemoproteus payevskyi* in the great reed warbler *Acocephalus arundinaceus*. *Journal of Ornithology* 148, 401-409.
- Hatchwell BJ, Wood MJ, Anwar MA, Chamberlain DE, Perrins CM. 2001.** The haematozoan parasites of Common Blackbirds *Turdus merula*: associations with host condition. *Ibis* 143, 420-426.
- Hawley DM, Sydenstricker KV, Kollias GV, Dhondt AA. 2005.** Genetic diversity predicts pathogen resistance and cell-mediated immunocompetence in house finches. *Biology Letters* 1, 326-329.
- Hellgren O, Waldenstrom 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, Krizanauskiene A, Valkiunas G, Bensch S. 2007a.** Diversity and phylogeny of mitochondrial cytochrome B lineages from six morphospecies of avian *Haemoproteus* (Haemosporida: Haemoproteidae). *Journal of Parasitology* 93, 889-896.
- Hellgren O, Waldenstrom J, Perez-Tris J, Szollosi E, Hasselquist D, Krizanauskiene A, Ottosson U, Bensch S. 2007b.** Detecting shifts of transmission areas in avian blood parasites - a phylogenetic approach. *Molecular Ecology* 16, 1281-1290.
- Hill GE. 1992.** Proximate basis of variation in carotenoid pigmentation in male house finches. *AUK* 109, 1-12.
- Horak P, Surai PF, Ots I, Moller AP. 2004.** Fat soluble antioxidants in brood-rearing great tits *Parus major*: relations to health and appearance. *Journal of Avian Biology* 35, 63-70.
- Horak P, Ots I, Vellau H, Spottiswoode C, Moller AP. 2001.** Carotenoid-based plumage coloration reflects hemoparasite infection and local survival in breeding great tits. *Oecologia* 126, 166-173.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F. 2001.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.

- Hunninen AV. 1958.** Comparative development of *Plasmodium relictum* oocysts in *Anopheles quadrimaculatus*, *A. albimanus*, and *Culex pipiens*. *Journal of Parasitology* 39, 28-32.
- Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp T. 2007.** Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics* 8, 460.
- Chvála M. 1980.** *Fauna ČSSR 22. Hematofágní mouchy a střečci*. Academia, Praha, 538 p.
- 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.
- Ishtiaq F, Guillaumot L, Clegg SM, Phillimore AB, Black RA, Owens IPF, Mundy NI, Sheldon BC. 2008.** Avian haematozoan parasites and their associations with mosquitoes across Southwest Pacific Islands. *Molecular Ecology* 17: 4545-4555.
- Isobe T, Yoshihara S, Shimura K. 1993.** Resistance of chicks against refection with *Leucocytozoon caulleryi*. *Avian Diseases* 37, 27-30.
- Ito A, Gotanda T. 2005.** A rapid assay for detecting antibody against leucocytozoonosis in chickens with a latex agglutination test using recombinant R7 antigen. *Avian Pathology* 34, 15-19.
- Khan RA, Fallis AM. 1970.** Life cycles of *Leucocytozoon dubreuii* Mathis and Léger, 1911 and *L. fringillinarum* Woodcock 1910 (Haemosporidia: Haemoproteidae). *Journal of Protozoology* 17, 642-658.
- Khan RA, Fallis AM. 1971.** Speciation, transmission, and schizogony of *Leucocytozoon* in corvid birds. *Canadian Journal of Zoology* 49, 1363-1367.
- 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.
- Kimura M, 2008.** Avian malaria parasites share congeneric mosquito vectors. *IV. Avian Malaria Workshop*, Bajadoz, Spain.
- Klei TR, Degiusti DL, Herath PRJ. 1968.** Field and laboratory studies of *Haemoproteus columbae* and its vector *Pseudolynchia canariensis* in pigeon population of Detroit, Michigan. *American Zoologist* 8, 823-831.
- Knowles SCL, Nakagawa S, Sheldon BC. 2009.** Elevated reproductive effort increases blood parasitaemia and decreases immune function in birds: a meta-regression approach. *Functional Ecology* 23, 405-415.
- Kocan RM. 1968.** Anemia and mechanisms of erythrocytic destruction in ducks with acute *Leucocytozoon* infections. *Journal of Protozoology* 15, 455-462.
- Krizanauskiene A, Hellgren O, Kosatec V, Sokolov L, Bensch S, Valkinuas G. 2006.** Variation in host specificity between species of avian haemosporidian parasites: evidence from parasite morphology and cytochrome b gene sequences. *Journal of Parasitology* 92, 1319-1324.
- Krone O, Waldenstrom J, Valkinuas G, Lessow O, Muller K, Iezhova TA, Fickel J, Bensch S. 2008.** Haemosporidian blood parasites in European birds of prey and owls. *Journal of Parasitology* 94, 709-715.
- LaPointe DA, Goff ML, Atkinson CT. 2005.** Comparative susceptibility of introduced forest dwelling mosquitoes in Hawai'i to avian malaria, *Plasmodium relictum*. *Journal of Parasitology* 91, 843-849.
- Lohm J, Grahn M, Langefors A, Andersen O, Storset A, von Schantz. 2002.** Experimental evidence for major histocompatibility complex-allele-specific resistance to a bacterial infection. *Proceedings of the Royal Society of London series B* 269, 2029-2033.
- Loiseau C, Zoorob R, Garnier S, Birard J, Federici P, Julliard R, Sorci G. 2008.** Antagonistic effects of a Mhc class I allele on malaria-infected house sparrows. *Ecology letters* 11, 258-265.

- Lovette IJ. 2004.** Mitochondrial dating and mixed-support for the "2% rule" in birds. *AUK* 121, 1-6.
- 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.
- Marzal A, de Lope F, Navarro C, Moller AP. 2005.** Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* 142, 541-545.
- Marzal A, Bensch S, Reviriego M, Balbontin J, de Lope F 2008.** Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. *Journal of Evolutionary Biology* 21, 978-987.
- McClelland EE, Penn DJ, Potts WK. 2003.** Major histocompatibility complex heterozygote superiority during coinfection. *Infection and Immunity* 71, 2079-2086.
- McCurdy DG, Shutler D, Mullie A, Frobes MR. 1998.** Sex-biased parasitism of avian hosts: relations to blood parasite taxon and mating system. *Oikos* 82, 303-312.
- Merila J, Anderson M. 1999.** Reproductive effort and success are related to haematozoan infections in blue tits. *Ecoscience* 6, 421-428.
- Merila J, Sheldon BC. 1999.** Testis size variation in the greenfinch *Carduelis chloris*: relevance for some recent models of sexual selection. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 45, 115-123.
- Merino S, Moreno J, Sanz JJ, Arriero E. 2000.** Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society of London series B* 267, 2507-2510.
- Miller RE, Trampel DW, Desser SS, Boever WJ. 1983.** *Leucocytozoon simondi* infection in European and American eider. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 183, 1241-1244.
- Morii T. 1992.** A review of *Leucocytozoon caulleryi* infection in chickens. *Journal of Protozoology Research* 2, 128-133.
- Nagao E, Arie T, Dorward DW. 2008.** The avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* causes marked structural changes on the surface of its host erythrocyte. *Journal of Structural Biology* 162, 460-467.
- Olson VA, Owens IPF. 1998.** Costly sexual signals: are carotenoids rare risky or required? *Trends in Ecology and Evolution* 13, 510-514.
- Omori S, Sato Y, Hirakawa S, Isobe T, Yukawa M, Murata K. 2008.** Two extra chromosomal genomes of *Leucocytozoon caulleryi*; complete nucleotide sequences of the mitochondrial genome and existence of the apicoplast genome. *Parasitology Research* 103, 953-957.
- Ortego J, Cordero PJ, Aparicio JM. 2007.** No relationship between individual genetic diversity and prevalence of avian malaria in a migratory kestrel. *Molecular Ecology* 16, 4858-4866.
- Ortego J, Cordero PJ, Aparicio JM, Calabuig G. 2008.** Consequences of chronic infections with three different avian malaria lineages on reproductive performance of Lesser Kestrels (*Falco naumanni*). *Journal of Ornithology* 149, 337-343.
- 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.
- Palinauskas V, Kosarev V, Shapoval A, Valkinuas G, Bensch S. 2007.** Comparison of mitochondrial cytochrome b lineages and morphospecies of two avian malaria parasites of the subgenera *Haemamoeba* and *Giovannolaia* (Haemosporida : Plasmodiidae). *Zootaxa* 1626, 39-50.
- Palinauskas V, Valkinuas GN, Bolshakov CV, Bensch S. 2008.** *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): Effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* 120, 372-380.

- Paperna I, Martelli P. 2008.** Haemosporidian infections in captive exotic glossy starling *Lamprotornis chalybaeus* in Hong Kong. *Folia Parasitologica* 55, 7-12.
- Pavlova A, Zink RM, Rohwer S. 2005.** Evolutionary history population genetics and gene flow in the common rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36, 669-681.
- Peirce MA. 1984.** Haematozoa of Zambian birds. I. General survey. *Journal of Natural History* 18, 105-122.
- Penn DJ, Damjanovich K, Potts WK. 2002.** MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *PNAS* 99, 11260-11264.
- Perez-Tris J, Bensch S. 2005a.** Dispersal increases local transmission of avian malarial parasites. *Ecology Letters* 8, 838-845.
- Perez-Tris J, Bensch S. 2005.** Diagnosing genetically diverse avian malarial infections using mixed-sequence analysis and TA-cloning. *Parasitology* 131, 15-23.
- Perez-Tris J, Hellgren O, Krizanauskiene A, Waldenstrom 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.
- Poláková R, Vyskočilová M, Martin JF, Mays HL, Hill GE, Bryja J, Albrecht T. 2007.** A multiplex of microsatellite markers for the Scarlet Rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). *Molecular Ecology Notes* (in press).
- Promerová M. 2007.** The role of MHC genes in the mate choice in the Scarlet Rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). *Diplomová práce Ústavu botaniky a zoologie PřF MU*, 80 p.
- Ricklefs RE, Fallon SM. 2002.** Diversification and host switching in avian malaria parasites. *Proceedings of the Royal Society of London series B* 269, 885-892.
- Sanz JJ, Arriero E, Moreno J, Merino S. 2001.** Female hematozoan infection reduces hatching success but not fledging success in Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *AUK* 118, 750-755.
- Sanz JJ, Moreno J, Arriero E, Merino S. 2002.** Reproductive effort and blood parasites of breeding pied flycatchers: the need to control for interannual variation and initial health state. *Oikos* 96, 299-306.
- Sato Y, Tamada A, Mochizuki Y, Nakamura S, Okano E, Yoshida C, Ejiri H, Omori S, Yukawa M, Murata K. 2009.** Molecular detection of *Leucocytozoon lovati* from probable vectors, black flies (Simuliidae) collected in the alpine regions of Japan. *Parasitology Research* 109, 251-255.
- Sehgal RNM, Hull AC, Anderson NL, Valkiunas G, Markovets MJ, Kawamura S, Tell LA. 2006.** Evidence for cryptic speciation of *Leucocytozoon* spp. (Haemosporida, Leucocytozoidae) in diurnal raptors. *Journal of Parasitology* 92, 375-379.
- Senlik B, Gulegen E, Akyol V. 2005.** Prevalance and intensity of *Haemoproteus columbae* in domestic pigeons. *Indian Veterinary Journal* 82, 998-999.
- Seutin G. 1994.** Plumage redness in redpoll finches does not reflect hemoparasitic infection. *Oikos* 70, 280-286.
- Siikamaki P, Ratti O, Hovi M, Bennett GF. 1997.** Association between haematozoan infections and reproduction in the Pied Flycatcher. *Functional Ecology* 11, 176-183.
- Scheuerlein A, Ricklefs RE. 2004.** Prevalence of blood parasites in European passeriform birds. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271, 1363-1370.
- Schnitzer J. 2003.** Signalizace rodičovských investic samců sociálně monogamních pěvců. *Diplomová práce katedry Zoologie PřF UK*, 51 p.
- Schrenzel MD, Maalouf GA, Keener LL. 2003.** Molecular characterization of malarial parasites in captive passerine birds. *Journal of Parasitology* 89, 1025-1033.

- Smith RB, Greiner EC, Wolf BO. 2004.** Migratory movements of Sharp-shinned hawks (*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.
- Sol D, Jovani R, Torres J. 2003.** Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia* 135, 542-547.
- Sullivan DJ. 2002.** Theories on malarial pigment formation and quinoline action. *International Journal for Parasitology* 32, 1645-1653.
- Sundberg J. 1995.** Parasites plumage coloration and reproductive success in the yellowhammer *Emberiza citrinella*. *Oikos* 74, 331-339.
- Steele EJ, Noblet GP. 2001.** Gametogenesis, fertilization and ookinete differentiation of *Leucocytozoon smithi*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48, 118-125.
- Swofford DL. 2002.** PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Version 4, Sinauer Associates, Sunderland.
- Szollosi E, Hellgren O, Hassequist D. 2008.** A cautionary note on the use of nested PCR for parasite screening - An example from avian blood parasites. *Journal of Parasitology* 94, 562-564.
- 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.
- Šeblová V. 2008.** Hostitelské preference přenašečů West Nile viru v ČR a leishmanií v Turecku. *Diplomová práce katedry Parazitologie PřF UK*, 110 p.
- Šťastný K, Bejček V, Hudec K (2006).** Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice. Aventinum, Praha, 463 p.
- 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.
- Tomas G, Merino S, Martínez-de la Puente J, Moreno J, Morales J, Lobato E. 2008.** Determinants of abundance and effects of blood-sucking flying insects in the nest of a hole-nesting bird. *Oecologia* 156, 305-312.
- Valkiunas G, Liutkevicius G, Iezhova TA. 2002.** Complete development of three species of *Haemoproteus* (Haemosporida, Haemoproteidae) in the biting midge *Culicoides impunctatus* (Diptera, Ceratopogonidae). *Journal of Parasitology* 88, 864-868.
- Valkiunas G, Iezhova TA, Shapoval AP. 2003.** High prevalence of blood parasites in hawfinch *Coccothraustes coccothraustes*. *Journal of Natural History* 37, 2647-2652.
- Valkiunas G, Iezhova TA. 2004a.** The transmission of *Haemoproteus* infections on the survival of blackcap by *Culicoides impunctatus* (Diptera : Ceratopogonidae). *Journal of Parasitology* 90, 196-198.
- Valkiunas G, Iezhova TA. 2004b.** Detrimental effects of *Haemoproteus* infections on the survival of biting midge *Culicoides impunctatus* (Diptera : Ceratopogonidae). *Journal of Parasitology* 90, 194-196.
- Valkiunas G. 2005.** *Avian malaria parasites and other haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 946 p.
- Valkiunas G, Zickus T, Shapoval AP, Iezhova TA. 2006.** Effect of *Haemoproteus belopolskyi* (Haemosporida : Haemoproteidae) on body mass of the blackcap *Sylvia atricapilla*. *Journal of Parasitology* 92, 1123-1125.
- Valkiunas G, Bensch S, Iezhova TA, Krizanauskiene A, Hellgren O, Bolshakov CV. 2006.** Nested cytochrome B polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: Microscopy is still essential. *Journal of Parasitology* 92, 418-422.
- Valkiunas G, Krizanauskiene A, Iezhova TA, Hellgren O, Bensch S. 2007a.** Molecular phylogenetic analysis of circumnuclear hemoproteids (Haemosporida : haemoproteidae)

- of sylviid birds, with a description of *Haemoproteus parabelopolskyi* sp nov. *Journal of Parasitology* 93, 680-687.
- Valkiunas G, Zehtindjiev P, Hellgren O, Iezhova, Ilieva M, TA, Bensch S. 2007b.** 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, Zehtindjiev P, Dimitrov D, Krizanauskiene A, Iezhova TA, Bensch S. 2008a.** Polymerase chain reaction-based identification of *Plasmodium (Huffia) elongatum*, with remarks on species identity of haemosporidian lineages deposited in GenBank. *Parasitology Research* 102, 1185-1193
- Valkiunas G, Iezhova TA, Krizanauskiene A, Palinauskas V, Bensch S. 2008b.** 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, Chasar A, Smith TB, Sehgal RNM. 2008c.** New species of haemosporidian parasites (Haemosporida) from African rainforest birds, with remarks on their classification. *Parasitology Research* 103, 1213-1228.
- Valkiunas G, Iezhova TA, Krizanauskiene A, Palinauskas V, Sehgal RNM, Bensch S 2008d.** A comparative analysis of microscopy and PCR-based detection methods for blood parasites. *Journal of Parasitology* 94, 1395-1401.
- Valkiunas G Atkinson CT, Bensch S, Sehgal RN, Ricklefs RE 2008e.** Parasite misidentifications in GenBank: how to minimize their number? *Trends in Parasitology* 24, 247-8.
- van Riper C , van Riper SG, Goff ML, Laird M. 1986.** The epizootiology and ecological significance of malaria in Hawaiian land birds. *Ecological Monographs* 56, 327-344.
- Vikler M. 2007.** Mate choice in Scarlet Rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). *Diplomová práce katedry Zoologie PřF UK*, 71 p.
- Votypka J, Simek J, Tryjanowski P. 2003.** Blood parasites reproduction and sexual selection in the red-backed shrike (*Lanius collurio*). *Annales Zoologici Fennici* 40, 431-439.
- Waldenstrom J, Bensch S, Kiboi S, Hasselquist D, Ottosson U. 2002.** Cross-species infection of blood parasites between resident and migratory songbirds in Africa. *Molecular Ecology* 11, 1545-1554.
- Westerdahl H, Waldenstrom J, Hansson B, Hasselquist D, von Schantz T, Bensch S. 2005.** Associations between malaria and MHC genes in a migratory songbird. *Proceedings of the Royal Society of London series B* 272, 1511-1518.
- 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.
- Work TM, Washino RK, van Riper C. 1990.** Comparative susceptibility of *Culex tarsalis*, *Anopheles franciscanus*, and *Culiseta inornata* (Diptera : Culicidae) to *Plasmodium relictum* (Haemosporidia : Plasmodiidae). *Journal of Medical Entomology* 27, 68-71.
- Yohannes E, Krizanauskiene 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.