

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Katedra aplikované geoinformatiky a územního plánování



**Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat a dospělců
sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách**

The presence of *Leucocytozoon* parasites in nestlings and adults of Boreal Owl
(*Aegolius funereus*) in the Ore mountains

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Bc. Karolina Mahlerová

Vedoucí práce: Ing. Markéta Zárybnická, Ph.D.

2017

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Karolina Mahlerová

Ochrana přírody

Název práce

Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat a dospělců sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách

Název anglicky

The presence of *Leucocytozoon* parasites in nestlings and adults of Boreal Owl (*Aegolius funereus*) in the Ore mountains

Cíle práce

Cílem studie je:

1. Zjistit přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat sýce rousného.
2. Zjistit přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u dospělců sýce rousného.
3. Porovnat četnosti výskytu parazitů rodu *Leucocytozoon* v závislosti na pohlaví, věku a mezi studovanými roky (2015 a 2016).

Metodika

Krevní vzorky budou odebírány mláďatům a dospělcům v hnízdech sýce rousného ve studijní oblasti v Krušných horách. Odběr krve bude prováděn odborným pracovníkem za účasti studenta. Pohlaví mláďat bude stanoveno metodou analýzy DNA. Pro zjištění přítomnosti parazitů v krevních vzorcích bude použita molekulární metoda nested PCR dle Hellgren et al. (2004). Analýzy budou vykonány v laboratoři FŽP.

Doporučený rozsah práce

30-40 stran

Klíčová slova

Leucocytozoon, blood parasites, Tengmalm's owl, Aegolius funereus, owl

Doporučené zdroje informací

- Korpimäki E., Hakkarainen H., Bennett G.F., 1993: Blood parasites and reproductive success of Tengmalm's owls: detrimental effects on females but not on males? *Funct Ecol* 7:420–426.
- Synek P., Munclinger P., Albrecht T., Votýpka J., 2013: Avian haemosporidians in haematophagous insects in the Czech Republic. *Parasitol Research* 112:839–845
- Synek P., Popelková A., Koubínová D., Šťastný K., Langrová I., Votýpka J., Munclinger P., 2015: Haemosporidian infections in the Tengmalm's Owl (*Aegolius funereus*) and potential insect vectors of their transmission. *Parasitology Research* 115:291–298.
- Valkiunas G., 2005: *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. CRC Press, Florida: 932.
- Valkiunas G., 2011: Haemosporidian vector research: marriage of molecular and microscopical approaches is essential. *Molecular Ecology* 20: 3084–3086.

Předběžný termín obhajoby

2016/17 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Markéta Zárybnická, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra aplikované geoinformatiky a územního plánování

Konzultant

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Elektronicky schváleno dne 5. 4. 2017

doc. Ing. Petra Šímová, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 5. 4. 2017

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 16. 04. 2017

Prohlášení: Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala sama s použitím citované literatury, pod vedením Ing. Markéty Zárybnické, Ph.D.

V Praze 18. 4. 2017

.....

Poděkování: Ráda bych poděkovala Ing. Markétě Zárybnické, Ph.D. za její ochotu, trpělivost a vstřícnost po celou dobu vypracovávání diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Petru Synkovi za poskytnutí podkladů k laboratorní metodice, Ing. Lucie Markové za ochotu konzultovat všechny problémy, které v průběhu laboratorních prací nastaly a prof. Ing. Jankovské Ph.D. za poskytnutí odborné konzultace v oblasti parazitologie.

Abstrakt

Endoparazité rodu *Leucocytozoon* jsou globálně rozšířenou skupinou obligátních parazitů využívajících ptáky jako meziphostitele. Jejich přítomnost v organismu je zjistitelná z krevních vzorků pomocí molekulárních metod. Předložená studie shrnuje poznatky o přítomnosti parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat a dospělců sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách v hnízdních sezónách 2015 a 2016. Krevní vzorky byly odebrány 138 mláďatům a 15 adultním jedincům. Z krve byla izolována DNA, z které bylo určeno pohlaví mláďat. Izolovaná DNA byla dále využita jako templát pro dvoufázovou nested PCR (Hellgren et al. 2004), pro zjištění přítomnosti parazitů. Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* byla prokázána celkem u 53 % dospělců (n = 8) a pouze u 1,5 % mláďat (n = 2).

Klíčová slova: *Leucocytozoon*, krevní parazité, Tengmalm's owl, *Aegolius funereus*, sova

Abstract

The endoparasites of the genus *Leucocytozoon* are a globally distributed group of obligatory parasites using birds as hosts. Their presence in the organism is detectable from blood samples using molecular methods. The present study summarizes the findings of the presence of *Leucocytozoon* parasites in juveniles and adults of the Boreal Owl (*Aegolius funereus*) in the Ore Mountains during the nesting seasons 2015 and 2016. Blood samples were collected from 138 fledglings and 15 adults. DNA was isolated from the blood, and used as template for determination of the sex of the offspring. Further, isolated DNA was used as a template for two-phase nested PCR (Hellgren et al. 2004) to detect the presence of parasites in fledglings and adults. The presence of *Leucocytozoon* parasites was confirmed in 53.0% of adults (n = 8) and only in 1.5% of the fledglings (n = 2).

Key words: *Leucocytozoon*, blood parasites, Tengmalm's owl, *Aegolius funereus*, owl

Obsah

1.	Úvod.....	10
1.1.	Cíle práce.....	11
2.	Sýc rousný (<i>Aegolius funereus</i>)	12
2.1.	Taxonomické zařazení.....	12
2.2.	Popis druhu.....	12
3.	Výskyt.....	13
3.1.	Výskyt v ČR.....	14
3.1.1.	Ochrana sýce rousného v ČR.....	15
4.	Hnízdní biologie.....	15
4.1.	Role pohlaví	16
4.2.	Poměr pohlaví mláďat na hnízdě.....	17
4.3.	Přežívání mláďat	17
5.	Endoparazité ptáků řádu Haemosporida	19
5.1.	Taxonomické zařazení.....	19
5.2.	Charakteristika řádu Haemosporida	19
5.3.	Vektory	20
5.4.	Rozšíření.....	22
5.5.	Rod <i>Haemoproteus</i>	23
5.6.	Rod <i>Plasmodium</i>	23
5.7.	Rod <i>Leucocytozoon</i>	23
5.7.1.	Vektory rodu <i>Leucocytozoon</i>	24
5.7.2.	Cyklus.....	24
5.8.	Symptomy parazitů řádu Haemosporida a příklady nákazy.....	25
6.	Metodika	26
6.1.	Charakteristika území	26
6.2.	Sběr dat.....	26
6.3.	Laboratorní analýzy.....	28

6.3.1. Extrakce DNA.....	28
6.3.2. Zjištění pohlaví mlád'at.....	28
6.3.3. Zjištění přítomnosti parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i>	29
7. Výsledky	31
7.1. Přítomnost parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i> u mlád'at v roce 2015	31
7.2. Přítomnost parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i> u mlád'at a dospělců v roce 2016	32
7.3. Přítomnost parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i> u mlád'at v roce 2015 a 2016	34
8. Diskuse	35
9. Závěr	37
10. Seznam zdrojů.....	38
11. Seznam obrázků a tabulek.....	42
12. Přílohy:	44

1. Úvod

Haemosporida (hemosporida) jsou řádem obligátních parazitů, kteří se dají považovat za nejlépe prozkoumanou skupinu protist, jelikož obsahují agenty malárie, která je stále častou lidskou nemocí v tropických oblastech. Determinace parazitů řádu Haemosporida je od 80. let 19. století na vzestupu, avšak determinace neprobíhala v rámci řádu stejnoměrně. Nejvíce se soustředila na rod *Plasmodium*, který obsahuje pravou ptačí malárii. Boom výzkumu ptačí malárie trval až do doby, kdy byla malárie objevena také u drobných savců. S tímto novým objevem se hlavní pozornost přesunula právě tímto směrem. Z tohoto důvodu v současné době máme velmi nesouměrný soubor informací o jednotlivých rodech řádu Haemosporida (Valkiunas 2005). Komplexní koevoluční vztahy hemosporid a jejich obratlovčích hostitelů jsou předmětem mnoha studií, avšak až do nedávné doby nebylo možné sledovat parazity jinak než pomocí mikroskopických metod. Od 80. let 20. století docházelo k vývoji a zdokonalování PCR metod, avšak až na přelomu 20. a 21. století byly molekulární metody zdokonaleny na úroveň umožňující identifikaci hemosporid do čeledí, rodů, druhů a dále až do úrovně jednotlivých genetických haplotypů. V současné době je nejpoužívanější metodou pro zjištění přítomnosti hemosporid protokol pro nested PCR dle Hellgrena et al. (2004).

V České republice byl stěžejní článek týkající se hemosporid a jejich vektorů u sýce rousného publikovaný v roce 2015 (Synek et al. 2015). Synek et al. (2015) se ve své práci zabývá nejen přítomností infekce v ptačích hostitelích, ale také determinací vektorů. Synek et al. (2015) identifikoval jako nejvíce zastoupený rod hemosporidií v Krušných horách rod *Leucocytozoon*. Dále pak provedl určení doby nákazy, kterou lze provádět u mlád'at, jelikož jsou u nich možné opakované odběry krve. Zjištěním přítomností parazitů u mlád'at lze tedy určit přibližně čas nákazy. Jelikož parazité přetrvávají v těle hostitelů několik let až po dobu celého života (Valkiunas 2005), je prakticky nemožné zjistit dobu nákazy u dospělců. Synek et al. (2015) identifikoval věk mláděte jako rozhodující faktor, který ovlivňuje přítomnost nákazy. Nejmladšímu infikovanému mláděti parazity rodu *Leucocytozoon* bylo 16 dní. V Evropě se přítomností hemosporid u ptáků zabýval například Korpimäki et al. (1993), který zjišťoval zejména vliv parazitů na adultní samice a vliv jejich přítomnosti na velikost snůšky.

Rozvojem molekulárních metod se naskýtá šance rozšířit znalosti o jednotlivých rodech hemosporid, které mohou sloužit jako cenné informace o populacích ex situ, jejich vektorech a šíření mezi populacemi. Tato diplomová práce se zabývá zjištěním přítomnosti parazitů rodu *Leucocytozoon* z řádu Haemosporida v letech 2015 a 2016 v Krušných horách v České republice pomocí molekulárních metod dle Hellgrena et al. (2004). Hlavním cílem této práce je přinést poznatky na úrovni druhu, tedy objektivně určit přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* v populaci sýce rousného, a rozšířit vědomosti o rodu *Leucocytozoon* na našem území, a dále pak umožnit provádění této metody v laboratořích Fakulty životního prostředí ČZU v Praze.

1.1. Cíle práce

- a) Zjistit přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat sýce rousného.
- b) Zjistit přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u dospělců sýce rousného.
- c) Porovnat četnosti výskytu parazitů rodu *Leucocytozoon* v závislosti na pohlaví, věku a mezi studovanými roky (2015 a 2016).

2. Sýc rousný (*Aegolius funereus*)

2.1. Taxonomické zařazení (Bejček & Šťastný 2001)

Třída: ptáci (Aves)

Podtřída: letci (Neognathae)

Řád: sovy (Strigiformes)

Čeleď: puštíkovití (Strigidae)

Rod: sýc (*Aegolius*)

2.2. Popis druhu

Sýc rousný (*Aegolius funereus*) je menší sova z čeledi puštíkovitých (Strigidae) (Bejček & Šťastný 2001), která dosahuje velikosti 24–26 cm (Cramp & Simmons 1985) a s rozpětím křídel až 54 cm (Witt et al. 1995). Typickým znakem je šedobílý obličejový závoj, který je černohnědě ohraničen (Korpimäki & Hakkarainen 2012) (Obr. 1). Blízké posazení očí s výraznou žlutou duhovkou tvoří spolu se zobákem charakteristický rovnostranný trojúhelník (Bejček & Šťastný 2001). Horní strana per je zbarvena tmavohnědě s kropenatým bílým vzorem (Korpimäki & Hakkarainen 2012). Světlé zabarvení je patrné zejména na hlavě a může tvořit na zátylku světlejší skvrnu ve tvaru písmene V (Bejček & Šťastný 2001) (Obr. 2).



Obrázek 2: Samice sýce rousného (*Aegolius funereus*) (foto: Šindelář 2016)



Obrázek 1: Samice sýce rousného (*Aegolius funereus*) (foto: Šindelář 2016)

3. Výskyt

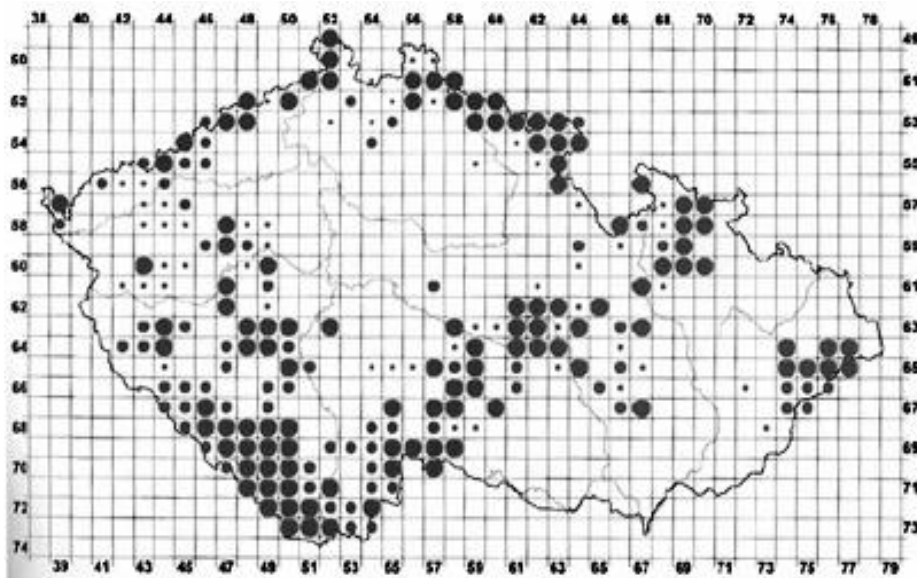
Sýc rousný se přirozeně vyskytuje v biotopu severského tajgového lesa, který se rozkládá v Severní Americe a Eurasii. Skandinávie je považována za centrum výskytu tohoto druhu (Hoyo et al. 1999) (Obr. 3). V oblasti Střední a Jižní Evropy se sýc rousný, navzdory preferenci vzrostlého jehličnatého lesa, vyskytuje i ve smíšených a listnatých porostech (Bejček & Šťastný 2001). Předpokládá se, že tyto ostrůvkovitě se vyskytující populace jsou relikty z doby poledové (Voous 1962 in Hudec & Šťastný 2005). Evropská populace tvoří přibližně 26 % celkové globální populace sýce rousného a je odhadována na 90 900 – 309 000 párů (BirdLife International 2015 in BirdLifeInternational 2017).



Obrázek 3: Distribuce sýce rousného v Evropě (zelená barva – výskyt sýce rousného, šedá barva – nepřítomnost sýce rousného) (www.ec.europa.eu 2016).

3.1. Výskyt v ČR

Již v 19. století byl sýc rousný zaznamenán jako hnízdní druh na území České republiky, a to zejména v pohraničních oblastech. Během 80. let 20. století bylo zjištěno, že sýc rousný poměrně snadno proniká do nižších poloh a do vnitrozemí a výskyt se začal také udávat v jižních a západních Čechách, například na Českomoravské vrchovině, v Moravském krasu nebo na Znojemsku (Hudec & Šťastný 2005). Některé studie považovaly sýce rousného ještě v 60. letech 20. století za vzácnou horskou sovu (Vacík 1991). Avšak díky zvýšenému zájmu ornitologů a přirozenému šíření sýce rousného se poznatky o této sově značně rozrostly (Drdáková-Zárybnická 2005). Mezi lety 2001–2003 byla v rámci České republiky početnost sýce rousného odhadnuta na 1500–2000 párů (Šťastný et al. 2009). V současné době se jeho výskyt uvádí na přibližně 49 % území České republiky (Bejček & Šťastný 2006). Sýc rousný se obvykle vyskytuje v nadmořských výškách od 380 m n. m. (jižní Čechy) až do 1360 m n. m. (Krkonoše) (Obr. 4). V nižších oblastech pod 800 m n. m. je jeho výskyt limitován přítomností konkurenčního puštíka obecného (*Strix aluco*) (Hudec & Šťastný 2005).



Obrázek 4: Současné rozšíření sýce rousného v ČR (Šťastný et al. 2009).

3.1.1. Ochrana sýce rousného v ČR

V České republice je sýc rousný podle zákona o ochraně přírody a krajiny 114/1992 Sb. a zaváděcí vyhlášky 395/1992 Sb. řazen mezi zvláště chráněné druhy, do kategorie silně ohrožené druhy. V Červeném seznamu je zařazen mezi zranitelné druhy (Plesnik et al. 2003), podle IUCN seznamu do kategorie LC – málo dotčené druhy (www.iucnredlist.org, 2016). V Evropské unii je chráněn směrnicí Evropského parlamentu a rady č. 79/409/EEC a je uveden v Příloze I této směrnice.

4. Hnízdní biologie

Sýc rousný je typickým druhem sovy, která hnízdí v dutinách stromů vyhloubených šplhavci, jako je například datel černý (*Dryocopus martius*) (Mikkola 1983) nebo strakapoud (*Dendrocopos* sp.) (Witt et al. 1995). Hloubka dutiny vhodné pro hnízdění je 45 cm a vletový otvor o průměru nejméně 5,4 cm. Sýc rousný zahnízdí poměrně snadno také v budce. V dutinách i budkách hromadí trus, zbytky potravy a vývržky (Hudec & Šťastný 2005).

Hnízdní páry nebývají stálé (Hudec & Šťastný 2005). Samci jsou většinou věrní svému okrsku několik let (Drdáková-Zárybnická 2005), což je pravděpodobně vyvoláno výhodnou potravní nabídkou daného území a znalostí teritoria (Hakkarainen et al. 1998). Samice, na rozdíl od samců, částečně migrují (Drdáková-Zárybnická 2005) a zpravidla nehnízdí ve stejných budkách více let po sobě (Zárybnická in verb). Páry hnízdí typicky jednou za sezónu, avšak pokud jsou příznivé potravní podmínky, mohou zahnízdit i vícekrát (Hudec & Šťastný 2005, Zárybnická 2009, Šindelář et al. 2015). Samice klade obvykle snůšky o 3–6 vejcích (Bejček & Šťastný 2001) ve dvoudenních intervalech (Korpimäki 1981), inkubace snůšky trvá 26–31 dní (Bejček & Šťastný 2001).

Ve studijní oblasti v Krušných horách sýc rousný hnízdí zpravidla od konce března do června (Drdáková-Zárybnická 2005). Samec se začíná ozývat od půlky března a v této době se zdržuje v blízkosti vybrané dutiny nebo budky, kam nosí potravu (Hudec & Šťastný 2005). Samci mohou také nabízet více dutin, ze kterých si samice jednu vybere a zdržuje se v ní několik dní před snesením prvního vejce (Zárybnická in verb., Vacík 1991). Úspěšnost hnízdění je ovlivněna řadou faktorů, jako je například predace (Drdáková-Zárybnická 2002) či dostupnost potravní nabídky. Typickou

kořistí sýce rousného v oblasti Krušných hor jsou hraboši (*Microtus* sp.) a myšice (*Apodemus* sp.). Z proběhlé studie (Zárybnická et al. 2013) vyplývá, že početnost myšic prokazatelně pozitivně koreluje s množstvím zastoupení v potravě a pozitivně ovlivňuje hnízdní úspěšnost sov, avšak tato korelace nebyla prokázána pro hraboše.

4.1. Role pohlaví

Samci a samice mají velmi odlišnou rodičovskou roli v období hnízdění. Samec zpravidla obstarává veškerou potravu pro samici a mláďata po celou dobu hnízdění (Zárybnická 2009). Samice setrvává na hnízdě po celou dobu inkubace (Obr. 5) a opouští hnízdo pouze krátce 1–3krát za noc (Korpimäki 1981, Zárybnická 2009). Doba inkubace vajec je 26–31 dní (Bejček & Šťastný 2001), avšak inkubace posledního vejce je průměrně o 2,6 dne kratší (Korpimäki 1981). Po vylíhnutí mláďat samice zpravidla pomáhá samci se sháněním potravy, ale jsou zaznamenány i případy, kdy mláďata opustí (Zárybnická 2009, Eldegard & Sonerud 2009). V tomto případě samec sám pokračuje v krmení mláďat do doby, kdy se mláďata stanou samostatnými (Korpimäki 1981, Zárybnická 2009, Šindelář et al. 2015).



Obrázek 5: Samice v budce na hnízdě s potravou (foto: Šindelář 2016).

4.2. Poměr pohlaví mlád'at na hnízdě

Předpokládá se, že podmínky prostředí, zejména dostupnost potravy, ovlivňují produkci mlád'at (Zárybnická et al. 2015), ale mohou mít vliv také na pohlaví mlád'at (Hipkiss & Hörnfeldt 2004, Mahlerová 2014). Toto se předpokládá zejména u druhů ptáků, kteří disponují takzvaným sexuálním dimorfismem, projevujícím se nepoměrnou velikostí obou pohlaví (Trivers & Willard 1973, Hipkiss & Hörnfeldt, 2004). Studie Hipkisse & Hörnfeldta (2004) zabývající se poměrem pohlaví mlád'at na hnízdě naznačuje, že rodiče adaptivně upravují poměr pohlaví mlád'at dle očekávané dostupnosti potravy. Během období, kdy je potravy méně, se zdá, že jsou schopni dospělci ovlivnit poměr pohlaví mlád'at na hnízdě ve prospěch samců. Jiné výsledky přináší například Schwerdtfeger & Wink (2014), který hodnotil 176 mlád'at během sezón 2001–2010 v Německu. V této studii nebyla nalezena přímá korelace mezi poměrem pohlaví mlád'at a potravou uskladněnou ve hnízdě.

4.3. Přežívání mlád'at

Sexuální dimorfismus se projevuje již v raném věku, v období líhnutí mlád'at na hnízdě. Tuto teorii potvrdili Hipkiss & Hörnfeldt (2004), kteří ve své práci uvedli, že úmrtnost menších samců sýce rousného na hnízdě je pravděpodobnější v období nedostatku potravy, jelikož větší samice jsou schopnější v konkurenčním boji o potravu. Tyto závěry však vyvrací výsledky dřívější studie z roku 2000 (Hörnfeldt et al. 2000), kdy toto chování nebylo prokázáno.

U sov se poměrně často vyskytuje takzvané asynchronní líhnutí mlád'at (Stoleson & Beissinger 1995). Asynchronní líhnutí znamená, že samice zahájí inkubaci po snesení prvního vejce a mlád'ata se líhnou postupně v 1–2denních intervalech. Toto chování je charakteristické také pro sýce rousného (Korpimäki 1981). Asynchronní líhnutí je vysvětleno několika hypotézami. Lack (1954) uvádí, že se jedná o adaptaci na omezenou dostupnost potravy. V případě, že by došlo k limitaci potravy, přežila by jen nejstarší mlád'ata, a tím by bylo zajištěno přežití alespoň části mlád'at. Z výsledků studie Valkama et al. (2002) vyplývá, že s rostoucí velikostí snůšky, roste pravděpodobnost asynchronního líhnutí. Dle této studie má na asynchronní líhnutí také vliv velikost samice a její stáří, přičemž čím starší a větší je samice, tím se zvyšuje pravděpodobnost asynchronního líhnutí mlád'at.

Přežívání mlád'at sýce rousného může být, podobně jako u jiných dravců, také ovlivněno takzvaným kainismem, případně agresivním chováním rodiče, kronismem. Kainismus je druh sourozenecké agrese, která se vyskytuje zejména u druhů, které disponují asynchronním líhnutím (Newton 1979), což umožňuje předcházení agrese mezi mlád'aty stejné velikosti (Hahn 1981). Například Simmons (1988) uvádí, že více než 90 % nejmladších mlád'at je usmrceno sourozencem. Zárybnická a Vojar (2013) dokumentovali, že pokud samec nedostatečně zásobuje samici a mlád'ata potravou, pak samice může svá mlád'ata zabít, některá z nich zkrmit, a hnízdo opustit.

5. Endoparazité ptáků řádu Haemosporida

5.1. Taxonomické zařazení

Kmen: Sporozoa (Apicomplexa) (Výtrusovci)

Třída: Coccidae (Kokcidie)

Řád: Haemosporida (Hemosporida)

Čeleď: Haemoproteidae

Rod: *Haemoproteus*

Čeleď: Plasmodiidae

Rod: *Plasmodium*

Čeleď: Garniidae

Čeleď: Leucocytozoidae

Rod: *Leucocytozoon*

Řád Haemosporida spadá do kmene výtrusovci (Apicomplexa). Hemosporida se dále dělí do základních čeledí – Haemoproteidae, Plasmodiidae, Garniidae, Leucocytozoidae (Valkiunas 2005).

5.2. Charakteristika řádu Haemosporida

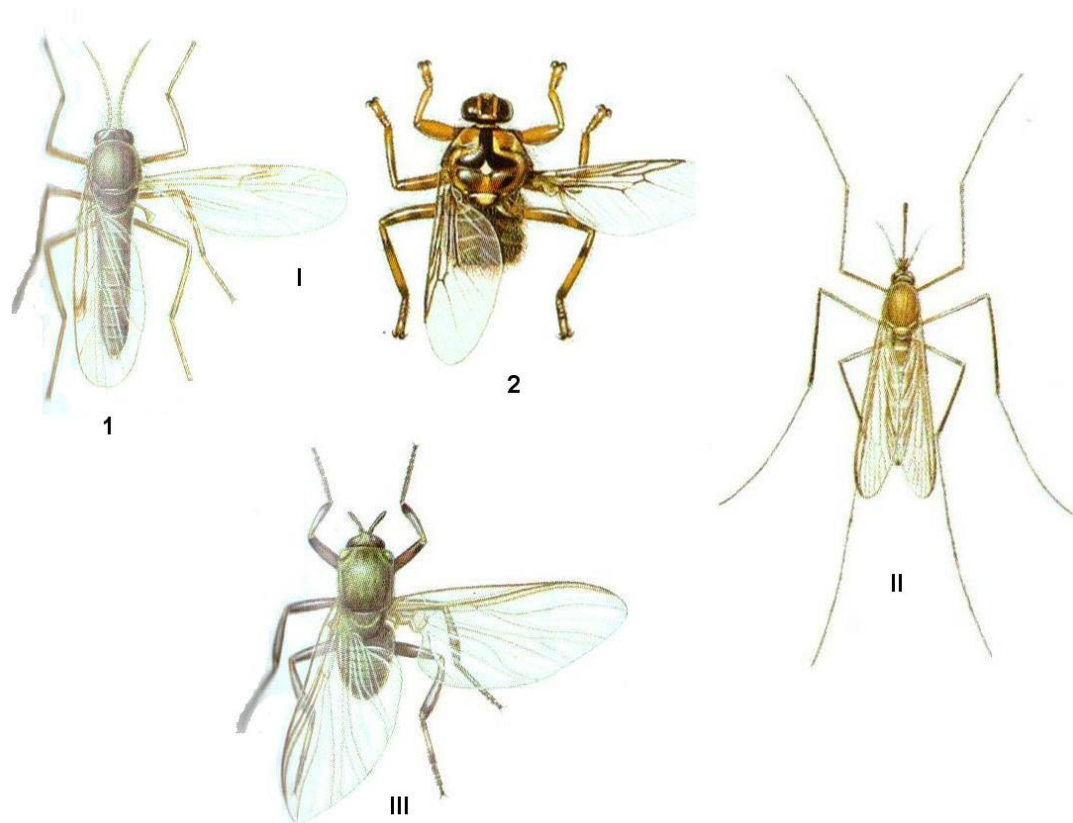
V roce 1884 V. Ya. Daniewsky publikoval článek v ruštině o krevních parazitech a tímto krátkým článkem připravil půdu pro budoucnost medicínské parazitologie. Jeho studie hemosporidií a jejich přesné nákresy byly základem pro jejich následné detailní studie (Valkiunas 2005).

Hemosporida jsou fylogeneticky definovaná skupina obligátních parazitů s více hostiteli a byli pozorováni u savců, ptáků, plazů a obojživelníků. Jejich vektorem jsou Diptera (dvoukřídlí). Do řádu Haemosporida spadají čtyři čeledi – Plasmodiidae (rod: *Plasmodium*), Leucocytozoideae (rod: *Leucocytozoon*), Haemoproteidae (rod: *Haemoproteus*) a Garniidae, z nichž čeledi Plasmodiidae, Leucocytozoidae a Haemoproteidae využívají ptačí mezihostitele. Hemosporida se dají také dělit dle toho, zda tvoří pigment hemozoin, který se akumuluje v elongovaných částech buněk. Čeledi tvořící hemozoin jsou Plasmodiidae (= pravá ptačí malárie) a Haemoproteidae (Valkiunas 2005).

Životní cyklus zástupců řádu Haemosporida je velmi komplexní. Hemosporida se vyvíjejí ve dvou typech organismů – obratlovcích (např. ptáci) a vektorech (krev sající dvoukřídlí – Diptera) a jsou schopni vytvářet druhově specifická stádia. Pohlavní rozmnožování probíhá v trávicí soustavě vektoru, konečným produktem této fáze jsou sporozoity, které se akumulují v glandulárních žlázách vektoru a během krmení jsou přeneseny do organismu hostitele. Uvnitř hostitele pak probíhá nepohlavní rozmnožování, které končí produkcí mikrogametocytů a makrogametocytů, které se během krmení vektoru na hostiteli opět dostávají z krevního řečiště hostitele do trávicího traktu vektoru, a následně se celý cyklus opakuje. Obratlovci, jež jsou hostiteli (ptáci), zůstávají po infikování zdrojem mikrogametocytů a makrogametocytů po několik let až po zbytek života (Valkiunas 2005).

5.3. Vektory

Od identifikování parazitů řádu Haemosporida v 80. letech 19. století trvalo téměř 70 let identifikovat jejich vektory a do současné doby zůstává velmi obtížné je identifikovat ve volné přírodě (Valkiunas 2005). Studium vektorů je klíčové pro upřesnění rozšiřování nákazy ve volné přírodě, kde se studium nedá provádět tak jednoduše, jako v *ex situ* podmínkách (Valkiunas 2011). Avšak studium vektorů ve volné přírodě komplikuje mobilita ptačích hostitelů. Mnoho ptáků, kteří byli studováni *ex situ*, patří mezi migrující druhy, dá se u nich tedy ve volné přírodě předpokládat kontakt s daleko větší škálou vektorů a parazitů. A proto se jeví výhodnější studovat vektory sedentárních druhů ptáků než migrujících. Ke studiu jsou vhodné například sovy, jak uvádí Synek et al. (2015), který se zabýval identifikací vektorů hemosporidií u sýce rousného v Krušných horách. V jeho práci byly v budkách nastraženy lepící pasti pro odchyt vektorů, které byly posléze testovány na přítomnost parazitů řádu Hemosporida a determinovány do druhů. Další studie (Synek et al. 2011), zabývající se identifikací vektorů parazitů řádu Haemosporida v České republice, identifikovala předpokládané hlavní vektory jednotlivých rodů řádu Haemosporida z 2858 jedinců z různých taxonomických skupin bezobratlých. U rodu *Culicoides* byla zjištěna přítomnost až pěti různých druhů parazitů rodu *Haemoproteus* v jediném vektoru. Jako hlavním vektorem rodu *Plasmodium* byli determinováni komáři čeledi Culicidae. Čeleď Simuliidae byla identifikována jako hlavní vektor rodu *Leucocytozoon*. Tyto dvě práce přinesly důležité poznatky o vektorech hemosporidií ve volné přírodě (Obr. 6).



Obrázek 6: Přenašeči ptačích hemosporid. I – přenašeči rodu *Haemoproteus*, 1 – *Culicoides* spp., 2 - *Hippoboscidae*; II – přenašeč rodu *Plasmodium*, *Culex* spp.; III – přenašeč rodu *Leucocytozoon*, *Simulium* spp. (Chinery 2007).

V současné době identifikace vektorů probíhá pomocí molekulárních metod. Jejich nevýhodou však je, že dochází k amplifikaci DNA hemosporidií bez ohledu na to, v jaké fázi vývojového cyklu se nacházejí (Valkiunas 2011). Například, i když je identifikována přítomnost parazitů uvnitř vektoru, nejedná se nutně o infekční formu (sporozoity), tak jak to demonstroval například Kim et al. (2009).

5.4. Rozšíření

Je uváděno, že řád Haemosporida je rozšířen na všech kontinentech kromě Antarktidy (Valkiunas 2011) a bylo prokázáno, že se vyskytuje v nadmořské výšce až 3000 m n. m. Distribuce hemosporidií je poměrně dobře prozkoumána v rámci palearktické a holarktické zoogeografické oblasti, avšak když se zaměříme na oblasti Sibíře či Dálného východu jsou poznatky značně limitované (Valkiunas 2005). V současné době bylo studováno přibližně 45 % druhů ptáků na přítomnost hemosporidií, avšak rozložení studovaných hostitelských druhů není v zoogeografických regionech rovnoměrné. Například v holarktické oblasti bylo studováno podstatně více ptáků ve srovnání s neotropickými oblastmi, jak shrnuje Valkiunas (2005). Holarktická oblast představuje hlavní centrum výskytu parazitů rodu *Leucocytozoon*. Uvádí se, že ve středních a vyšších zeměpisných šířkách této oblasti prevalence čeledi Leucocytozoidae v ptačích populacích dosahuje až 25 % (Valkiunas & Iezhova 1990 in Valkiunas 2005).

Klíčovými druhy ptáků pro studium hemosporidií se zdají být sedentární druhy, které nemigrují. Migrace jedinců má za následek přenos parazitů mezi různými oblastmi. Hemosporida nemusí vždy dokončit vývojový cyklus na místě rozmnožování hostitelského druhu, a tak mohou být parazité v populaci přítomni jako jakási rezerva v dormantní fázi, dokud se hostitel opětovně nedostane do místa rozmnožování, kde se nachází jejich vektor, a parazité zde mohou dokončit svůj vývoj. Studie naznačují komplexnost vztahu parazita s hostitelem, jejich vztah je natolik vyvinut, že v mnohých případech může být parazit v hostiteli benigní (Valkiunas 2005). Problém však nastává ve chvíli, kdy se parazit rozšíří do populací, u kterých není běžný a neprobíhal zde paralelní vývoj tohoto komplexního vztahu. Tento přenos může mít až latentní důsledky, tak jak naznačují poznatky z *ex situ* studií (zoologické zahrady) (např. Ferrell et al. 2007) a z volné přírody v Evropě (např. Olias et al. 2011).

5.5. Rod *Haemoproteus*

Rod *Haemoproteus*, spadající do čeledi Haemoproteidae, tvoří skupinu obligátních parazitů, jejichž asexuální fáze životního cyklu je vázána na pevnou tkáň či krevní buňky obratlovčího hostitele. Sexuální rozmnožování probíhá v trávicím traktu řádu dvoukřídlých (Diptera). Hlavním vektorem parazitů rodu *Haemoproteus* jsou dvoukřídlí rodu *Culicoides* (Tiplíci), ale výjimečně byli jako vektory identifikováni také dvoukřídlí čeledi Hippoboscidae (Kloši) (Garnham 1966; Valkiunas 2005). Parazité rodu *Haemoproteus* jsou druhově velmi bohatou endoparazitickou skupinou parazitů, a z tohoto důvodu je identifikace jejich konkrétních vektorů velmi komplikovaná (Martínez de la Puente 2011, Valkiunas 2005).

5.6. Rod *Plasmodium*

Rod *Plasmodium* je souhrnně s rodem *Haemoproteus* označován za pravou ptačí malárii (Garnham 1966, Valkiunas 2005). Pravá ptačí malárie je charakteristická tvorbou pigmentu hemozoinu. Asexuální fáze cyklu zástupců čeledi Plasmodiidae je vázána nejen na pevné tkáně hostitele (slezina, játra), ale i na krevní buňky. Sexuální rozmnožování probíhá v zástupcích čeledi řádu Diptera; Komárovití (Culicidae) a Pakomárcovití (Ceratopogonidae) (Valkiunas 2005, Synek et al. 2013).

5.7. Rod *Leucocytozoon*

Rod *Leucocytozoon* (*Leukocytozoon*) je globálně rozšířená skupina parazitů ptáků řádu Haemosporida, někdy je nesprávně řazen do skupiny parazitů pravé ptačí malárie, do které patří pouze rody *Plasmodium* a *Haemoproteus*, vyznačující se tvorbou krevního pigmentu hemozoinu, který řád *Leucocytozoon* nevytváří (Valkiunas 2005).

V současné době je v rámci tohoto řádu popsáno přibližně 35 druhů, ale molekulární studie naznačují, že skutečná diverzita druhů rodu *Leucocytozoon* je vyšší. Obecně platí, že morfologie jednotlivých druhů tohoto rodu je velmi podobná, a proto je jejich determinace obtížná (Valkiunas 2005, Hellgren et al. 2004, Hellgren et al. 2007). Navíc lze očekávat, že se v populaci mohou vyskytovat i kryptické druhy (Sehgal et al. 2006).

Jednotlivé druhy spadající do rodu *Leucocytozoon* se liší jejich specifickou ekologií a vektory. Některé druhy byly nalezeny a popsány pouze v jediném druhu hostitele (jediném ptačím druhu), jiné byly objeveny v hostitelích široké škály různých

druhů a taxonomických skupin (Hellgren et al. 2005, Hellgren et al. 2007). Rozšíření rodu *Leucocytozoon* je tedy přímo spojeno s distribucí jejich vektorů a hostitelů, a dále je ovlivněno schopností parazitů infikovat daného hostitele. Jedním z předpokladů úspěšné infekce je tedy soužití vektoru a hostitele ve stejném areálu (Valkiunas 2005, Hellgren et al. 2008).

5.7.1. Vektory rodu *Leucocytozoon*

Hlavním vektorem jsou dvoukřídlí z čeledi muchničkovití (Simuliidae) a u jednoho druhu rodu *Leucocytozoon* (*Leucocytozoon caulleryi*) byli jako vektor identifikováni také dvoukřídlí čeledi Pakomárcovití (*Culicoides*) (Valkiunas 2005, Synek et al. 2013) (Obr. 6).

5.7.2. Cyklus

Základními fázemi životního cyklu kmene Apicomplexa (výtrusovci) jsou – merogonie (fáze asexuální) a gametogonie (sexuální fáze). Apicomplexa mají dva hostitele – obratlovce a hmyz (vektor). Konkrétně u rodu *Leucocytozoon* probíhá gametogonie uvnitř trávicí soustavy vektoru a merogonie v játrech a krevním řečišti hostitele. Životní cyklus rodu *Leucocytozoon* je poměrně komplexní a je podrobně popsán přibližně u jedné třetiny známých druhů tohoto rodu (Valkiunas 2005).

Sexuální fáze životního cyklu probíhá v definitivním hostiteli, vektoru. Splynutím pohlavních buněk (makrogametocytů a mikrogametocytů) vzniká oocysta (zygota). Zygota neodchází z těla bezobratlého, ale přesouvá se ve formě pohyblivé ookinety trávicím traktem vektoru až do vývoje sporozoitu, ten poté putuje do jeho slinných žláz. Sporozoit je infekčním stádiem, které je přenosné na mezihostitele, ptáka (obratlovce). Při krmení vektoru na hostiteli dojde k přesunu infekčního stádia do organismu hostitele. Sporozoity se nepohlavně rozmnožují v pevných tkáních, jako jsou játra, a také v krevním řečišti hostitele. Během nepohlavního množení v hostiteli, začnou z části sporozoitů vznikat pohlavní buňky (mikrogametocyty a makrogametocyty), které se pohybují v krevním řečišti. Během krmení vektoru na hostiteli jsou mikrogametocyty a makrogametocyty transportovány opět do trávicího traktu vektoru, který je současně finálním hostitelem. Tam po jejich splynutí dochází k tvorbě oocysty (zygoty) a cyklus se opakuje (Jankovská in verb, Valkiunas 2005) (Příloha 1).

5.8. Symptomy parazitů řádu Haemosporida a příklady nákazy

Patogenita řádu Haemosporida je rodově a druhově velmi specifická. Pro hlubší porozumění je nutné studovat nejen vztah hostitele s parazitem či parazita s vektorem, ale obecně studovat komplexní působení parazitů ve společenstvu, což bývá poměrně často přehlížené.

Popis symptomů nákazy parazity řádu Haemosporida u ptáků byl z počátku studován zejména u domestikovaných druhů, jako jsou kachny, husy, slepice či krocani. V rámci řádu Hemosporida byli identifikováni zástupci rodu *Leucocytozoon* jako nejvíce nebezpečné u drůbeže (Valkiunas 2005). Wickwate (1915) a další autoři (např. Jones et al. 1938, Morii 1992), uvádějí, že nejcitlivější k nákaze jsou mladí jedinci, kteří velmi často umírají. Parazité rodu *Leucocytozoon* často u ptáků vyvolávají letargii, nechutenství, problémy s dýcháním, anemii a oslabení organismu obecně (Valkiunas 2005). Například *L. sabrazesi* či *L. andrewsi* jsou významní parazité domestikovaných ptáků, avšak tyto parazité pro ně mají jen výjimečně smrtelné následky (Lee et al. 1969).

Vzájemná interakce hemosporida a volně žijících ptáků je ovlivňováno jejich dlouhodobou koevolucí. Avšak individuální vlastnosti jednotlivých jedinců a druhů, jako jsou například genetické predispozice, imunita, věk, potravní zdroje či stres hostitele, může ovlivňovat vývoj parazitů a jejich šíření ve volné přírodě. Specifika života ve volné přírodě mohou mít tedy za následek velmi odlišné chování parazita v prostředí a v hostiteli, oproti sledování *ex situ* (Valkiunas 2005). Cenným zdrojem informací o vlivu parazitů na volně žijící ptáky mohou být zoologické zahrady. V zoologických zahradách jsou případy úmrtí ptáků zkoumány a ze závěrů těchto zpráv vychází, že hemosporida mají na těchto ztrátách velký podíl (Griner 1974). V zoologických zahradách bylo prokázáno, že hemosporida mají větší vliv na druhy exotických ptáků, které se do té doby s hemosporidii neseťkaly. Z čehož vyplývá, že ptáci, kteří neprodělali koevoluci s parazity na jejich původních stanovištích, jsou více náchylní k nákaze (Valkiunas 2005).

6. Metodika

Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* byla zjišťována pomocí molekulárních metod dle protokolu pro nested PCR Hellgrena et al. (2004).

6.1. *Charakteristika území*

Studijní plocha se nachází ve východních Krušných horách v nadmořské výšce 735–765 m, v oblasti, která je již od 13. století významně ovlivněna člověkem (Holý 2002). V současné době studované území o rozloze 70 km² poskytuje bohatou škálu biotopů. Krajina je charakteristická zejména mozaikovitými pozůstatky vzrostlých porostů smrku ztepilého (*Picea abies*), rozvolněnými porosty třtiny chloupkaté (*Calamagrostis villosa*), náhradními porosty smrku pichlavého (*Picea pungens*), bříz (*Betula* sp.) a modřínu opadavého (*Larix decidua*) (Zárybnická et al. 2015). Takto rozmanité biotopy tvoří vhodné prostředí pro výskyt sýce rousného, který zde nachází vhodné hnízdní prostředí a dostatek potravy (Drdáková-Zárybnická 2004). Od roku 1999 je v oblasti podporováno hnízdění sýce rousného distribucí vhodně designovaných budek, které kompenzují nedostatek přirozených dutin. Sýc rousný tyto budky využívá pro svá hnízdění. Systém instalovaných budek také poskytuje cenná data o ekologii a chování sýce rousného (např. Drdáková-Zárybnická 2002, Zárybnická et al. 2013, Zárybnická et al. 2015) V roce 2015 bylo ve studijní oblasti k dispozici celkem 233 budek a v roce 2016 245.

6.2. *Sběr dat*

V průběhu hnízdní sezóny (březen–červenec) byly budky pravidelně kontrolovány a byla dohledávána hnízda. Nalezená hnízda byla kontrolována v intervalech 5-10 dní ke zjištění informací o velikosti snůšky, počtu vylíhlých a vylétlých mlád'at, množství zásobované kořisti a příp. výskytu hnízdní predace kunou lesní. Samice byly odchytávány přímo na hnízdě pomocí podběráku, samci pak během noci pomocí sítě, když přinášeli potravu do hnízda (Zárybnická et al. 2015). Při kontrolách hnízda byl dokumentován růst mlád'at (délka křídla, hmotnost) až do jejich vylétnutí z hnízda. Dospělcům i mlád'atům byla odebírána krev z brachiální žíly. Brachiální žíla je narušena vpichem jehly 1", 0,5 x 25 mm, a pomocí kapiláry o průměru cca 0,8 mm a objemu 50 µl je každému jedinci odebráno 50 µl krve (Obr. 7). Vzorky krve byly zakonzervovány v 96 % etanolu v ependorfce (V = 1,5 ml) a

následně zamraženy (-20 °C) do doby, než byly zpracovány v laboratoři. Krev mláďat byla odebírána jednou až dvakrát v různém věku.



Obrázek 7: Odběry krve z brachiální žíly (foto: Zárybnická 2014).

Data využitá v této diplomové práci jsou z hnízdní sezóny 2015 a 2016. V roce 2016 byla krev odebrána celkem 15 dospělcům (9 samic, 6 samců) a 20 mláďatům (každému mláděti byla krev odebrána průměrně 1,4krát). V roce 2015 byla krev odebírána celkem 118 mláďatům (každému mláděti byla krev odebrána průměrně 1,14krát).

Pro účely této práce byl určován věk hnízdicích jedinců. Věk jedinců byl určen podle zbarvení a opotřebení ručních i loketních letek (Hörnfeldt et al. 1988, Laryšová 2014). Na základě přepelichání a zbarvení ručních letek byli ptáci určeni jako 1-letí, 2-letí, 3-letí a starší než 3 roky (3+). Průměrný věk jedinců se počítal z těchto stanovených let, přičemž jedinec věkové kategorie 3+ se počítal jako 3-letý.

6.3. Laboratorní analýzy

Krevní vzorky byly uchovány v mrazáku při teplotě -20 °C. V laboratořích byla následně provedena extrakce DNA. Z extrahované DNA bylo zjištěno pohlaví mlád'at pomocí PCR dle protokolu Fridolfssona & Ellegrena (1999), vyhodnocení proběhlo dle metodiky Hipkisse (2002). Dále byla extrahovaná DNA použita pro zjištění přítomnosti rodu *Leucocytozoon* dle protokolu pro nested PCR dle Hellgrena et al. (2004).

6.3.1. Extrakce DNA

DNA byla z krve izolována pomocí metody Hot Shot. Metoda Hot Shot je poměrně levná a rychlá metoda, vhodná ke zpracování velkého množství vzorků. K extrakci DNA je využíván neutralizační roztok (roztok B - TRIS - MCl; pH = 5,0) a reakční roztok (roztok A - NaOH; 0.2 mM EDTA). Pro extrakci DNA se krev smísí se 40 µl roztoku A, tato směs je zahřívána na teplotu 95 °C po dobu 10 min, následně je teplota směsi prudce snížena na 4 °C a ke směsi se přidá 40 µl neutralizačního činidla (roztok B) (Truett 2000) (Příloha 2).

6.3.2. Zjištění pohlaví mlád'at

6.3.2.1. PCR

Pohlaví mlád'at bylo zjištěno na základě protokolu pro PCR Fridolfssona & Ellegrena (1999). V tomto kroku došlo v termocykleru k namnožení vybraných úseků DNA pomocí primerů cílících na vybrané úseky DNA. Byl použit forward primer 2550 F, cílící na úsek [5' - GTTACTGATTCGTCTACGAGA - '3] a reverse primer 2718 R, cílící na [5' - ATTGAAATGATCCAGTGCTTG - '3], jako templát DNA byla využita izolovaná DNA od jednotlivých jedinců (Příloha 3).

6.3.2.2. Elektroforéza

Po vyjmutí vzorků z termocykleru (cycleru) po provedení PCR, byla provedena elektroforéza za použití horizontální elektroforézy. V elektroforéze probíhá elektrický proud agarozovým gelem, tím se posouvají úseky DNA gelem dle jejich hmotnosti (délky) ve směru proudu. Pro korektní proběhnutí elektroforézy pro zjištění pohlaví u sýce rousného je vhodný 0,8 % - 2 % agarozový gel (např. SeaKem®LE Agarose, gel for electrophoresis, LONZA). Obecně platí, že 0,8 % gel je vhodný pro většinu použití, 2 % gel je vhodný pro krátké úseky DNA (kolem 300 párů bazí) (Brejšková in verb., Příloha 4).

6.3.2.3. Vyhodnocení výsledků

Po proběhnutí elektroforézy, byl gel přesunut pod UV lampu a bylo determinováno pohlaví z gelu na základě odlišné délky intronů na chromozomech Z a W. Samice byly detekovány na základě zobrazení CHD1W (gen CHD na chromozómu W) fragmentů, ve vzdálenosti 1,2 kb od začátku elektroforézy a zároveň se zobrazily i kratší fragmenty CHD1Z (gen CHD na chromozómu Z) ve vzdálenosti 0,7 kb. Samci byli charakterističtí zobrazením pouze kratších fragmentů CHD1Z (Hipkiss 2002) (Příloha 3).

6.3.3. **Zjištění přítomnosti parazitů rodu *Leucocytozoon***

K detekci přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* byl použit dvoufázový protokol pro tzv. nested PCR sestávající ze dvou po sobě jdoucích PCR reakcí (Hellgren et al. 2004). Tento protokol je v současné době nejužívanějším protokolem pro detekci parazitů řádu Haemosporida. Každý vzorek byl testován minimálně dvakrát a vždy byla testována také pozitivní kontrola (prokazatelně pozitivní vzorek) a negativní kontrola (dH₂O místo vzorku DNA). K vyhodnocení výsledků je využita horizontální elektroforéza.

6.3.3.1. Iniciální PCR

První fází amplifikace je iniciální PCR, kdy se postupuje dle návodu QIAGEN Multiplex PCR kitu. K iniciální PCR jsou použity vnější primery HaemNF1 amplifikující úsek [5'-CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3'] a HaemNR amplifikující úsek [5'-ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3']. V iniciální PCR dojde k amplifikaci částí DNA řádu Haemosporida (566 bázové úseky mitochondriální DNA genu cytochromu b všech tří rodů) (Příloha 4)

6.3.3.2. Nested PCR

V druhém kroku probíhá nested PCR. Při nested PCR dojde k amplifikaci částí DNA vybraného rodu s využitím vnitřních primerů HaemFL a HaemR₂L, cílících na amplifikaci 527 bázových úseků mitochondriální DNA rodu *Leucocytozoon*. Templátem pro nested PCR je použit produkt iniciální PCR (Hellgren et al. 2004, Synek et al. 2015, Synek in verb) (Příloha 5).

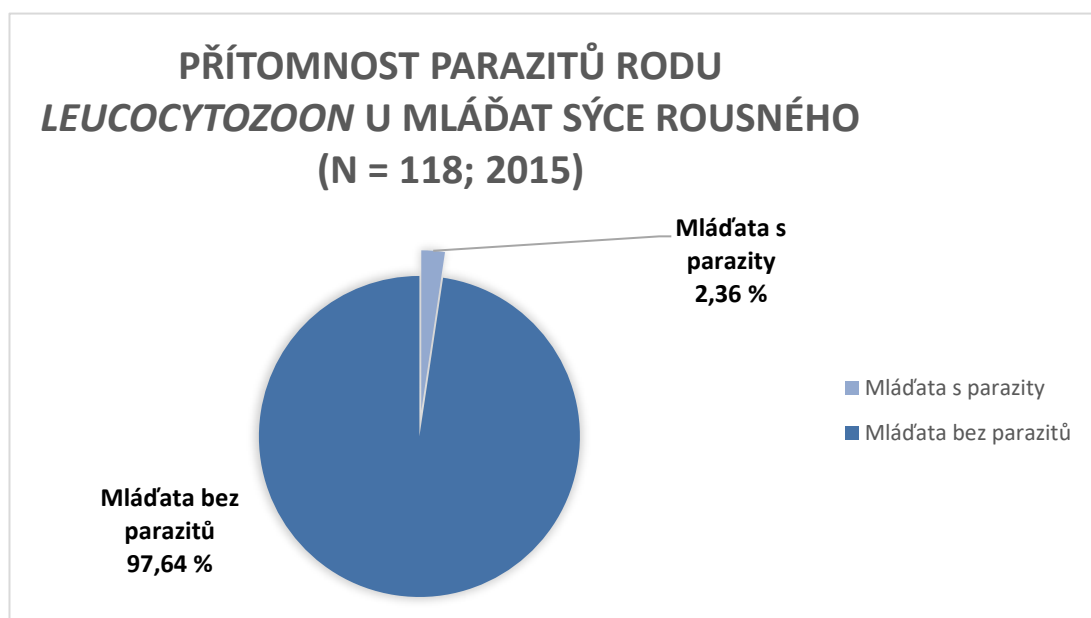
6.3.3.3. Elektroforéza a vyhodnocení

Produkty nested PCR byly dále vyhodnocovány pomocí elektroforegramu. Elektroforéza proběhla v 2 % agarovém gelu s příměsí etidium bromidu, který se váže do struktury DNA. Do jednotlivých jamek byla napipetována směs 3 μ l produktu nested PCR a 1 μ l loading bufferu. Elektroforéza proběhla pod napětím 100 V, po dobu 40 min. Po uplynutí 40 min byl gel vložen do boxu a osvětlen UV zářením pro vyhodnocení. Za pozitivní vzorek byl označen takový vzorek, který vyšel pozitivně při dvou opakováních, aby nedošlo k chybnému určení, například z důvodu kontaminace (Příloha 6).

7. Výsledky

7.1. Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat v roce 2015

V roce 2015 byla krev odebírána pouze u mláďat, celkem byla krev odebrána u 118 mláďat. U 100 jedinců proběhl odběr jedenkrát, u 18 jedinců proběhl odběr krve dvakrát. Mezi mláďaty bylo zjištěno 60 samic a 58 samců. Nejmladšímu mláděti byly při prvních odběrech 3 dny a nejstaršímu 36 dní, průměrně byl první odběr krve proveden ve věku 14,4 dní (SD ± 4,1 dny). U mláďat, kterým byla krev odebírána dvakrát (n = 17 mláďat), byl první odběr učiněn průměrně ve věku 13,6 dní (SD ± 3,9 dní) a druhý odběr ve věku 21,1 dní (SD ± 5,1 dní). Z celkového počtu 118 mláďat byla prokázána přítomnost parazitů u dvou mláďat, ve věku 19 a 21 dní. Obě mláďata byla samice a pocházela z jedné budky (Obr. 8).



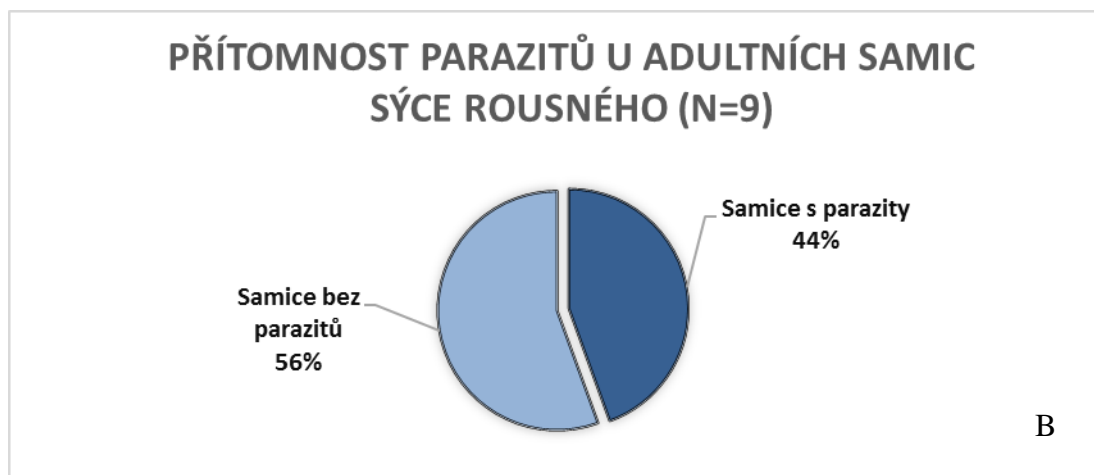
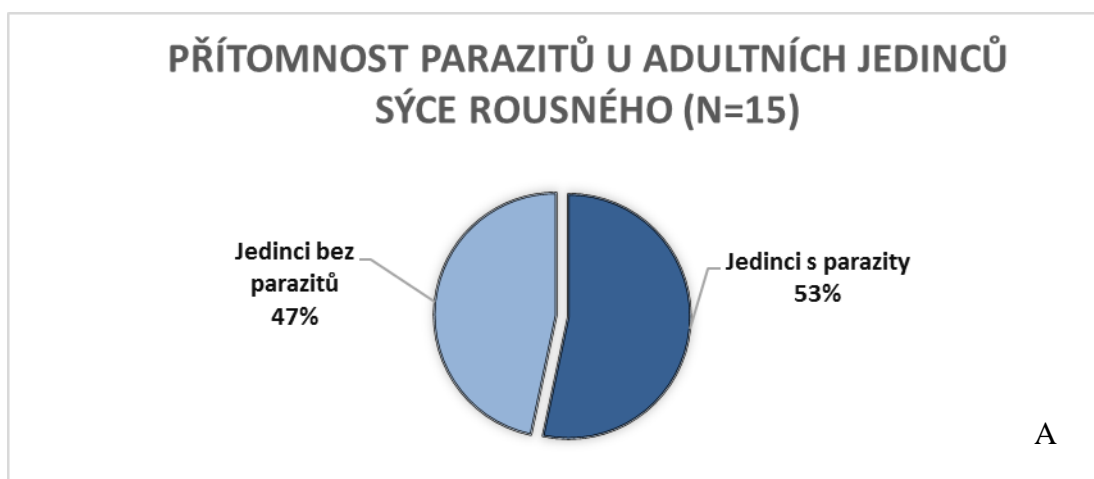
Obrázek 8: Procentuální přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat sýce rousného v roce 2015.

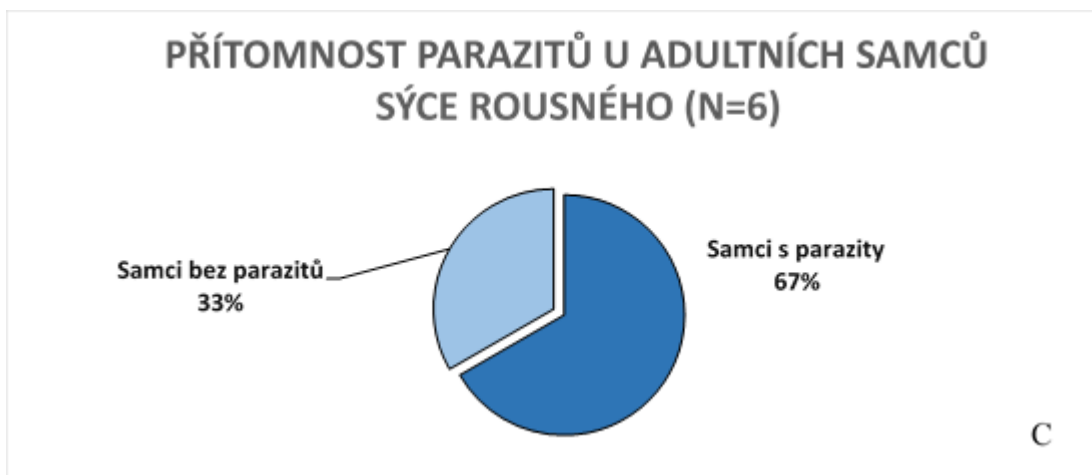
7.2. Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat a dospělců v roce 2016

V roce 2016 byla krev odebírána dospělcům i mláďatům, celkem byla krev odebrána 20 mláďatům a 15 dospělcům.

Odběr krve proběhl u 12 mláďat jedenkrát, u 8 mláďat dvakrát. Z celkového počtu 20 mláďat bylo zjištěno 10 samic a 10 samců. Nejmladšímu mláděti bylo při prvních odběrech 6 dní a nejstaršímu 22 dní. V průměru byl první odběr krve proveden ve věku 11,7 dní (SD \pm 3,4 dní). U mláďat, kterým byla krev odebírána dvakrát (n = 8), byl první odběr učiněn průměrně ve věku 13,4 dní (SD \pm 3,9 dní) a druhý odběr ve věku 24 dní (SD \pm 5,4 dní). Z celkového počtu 28 vzorků, nebyl žádný pozitivní na přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon*.

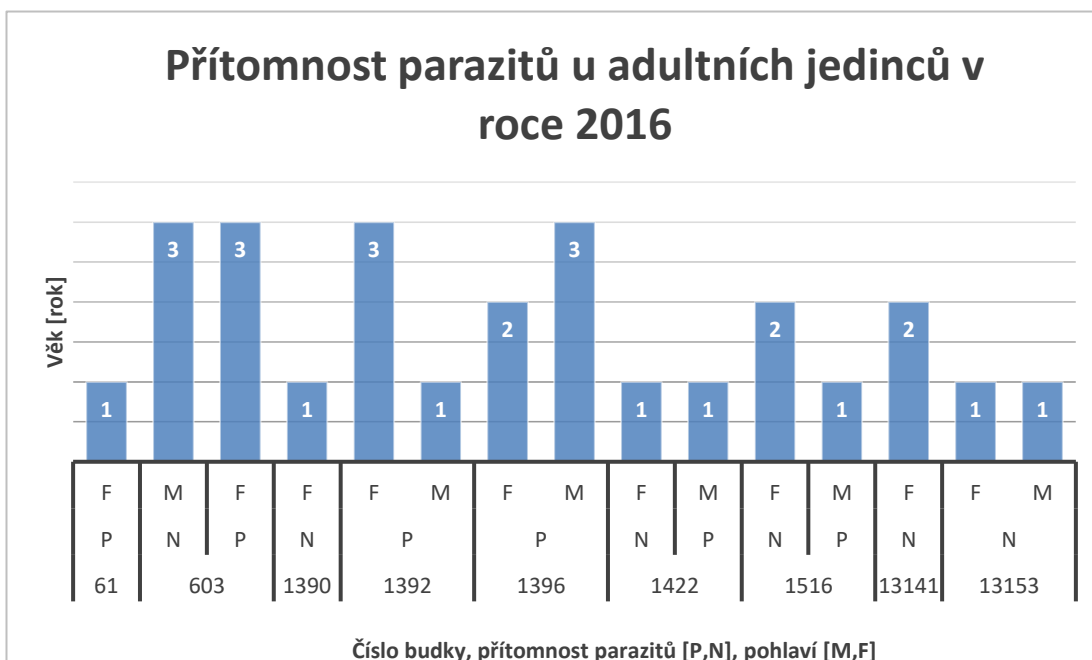
V roce 2016 bylo z celkového počtu 15 testovaných adultních jedinců (9 samic, 6 samců) 8 jedinců (53 %) pozitivních na přítomnost rodu *Leucocytozoon* (Obr. 9A). Z 9 samic byly infikovány 4 (44 %, Obr. 9B), z 6 samců byla infekce zjištěna u 4 (67 %, Obr. 9C)





Obrázek 9: 9A – procentuální zastoupení parazitů u adultních jedinců, 9B - procentuální zastoupení parazitů u adultních samic, 9C - procentuální zastoupení parazitů u adultních samců v roce 2016.

Adultní jedinci byli v roce 2016 odchyceni celkem v 9 hnízdech. V 6 hnízdech byli odchyceni oba dva rodiče (samice a samec), ve 3 hnízdech byla odchycena pouze samice. Ve dvou budkách byli parazité zjištěni u obou adultních jedinců ve věku od 1 roku do 3 + let. V jedné budce nebyli zjištěni paraziti ani u jednoho adultního jedince. Ve třech hnízdech byli parazité prokázáni jen u jednoho adultního jedince – ve dvou případech u samce a jednou u samice (Obr. 10).



Obrázek 10: Souhrnné informace o pohlaví, věku, budkách a přítomnosti parazitů rodu *Leucocytozoon* u adultních jedinců v roce 2016 (P = přítomnost parazitů, N = nepřítomnost).

V roce 2016 byli odchyceni dospělci ve věkovém rozmezí 1–3 roky, samice (n = 9) byly staré průměrně 1,8 let (SD ± 0,8 roku) a samci (n = 6) 1,7 let (SD ± 0,7 roku). Samice, u kterých byla zjištěna přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* byly ve věku 1, 2 a 3 roky, v průměru 2,25 roku (SD ± 0,75 roku) (n = 4). Samci, u kterých byla zjištěna infekce, byli ve věku 1 a 3 roky, v průměru 1,5 let (SD ± 0,75 roku) (n = 4). Infikované samice byly průměrně starší (2,25 roku) než infikovaní samci (1,5 roku).

7.3. Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mlád'at v roce 2015 a 2016

V roce 2015 a 2016 bylo celkem testováno 138 mlád'at na přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon*. Celkový průměrný věk mlád'at při prvním odběru byl 14 dní (SD ± 4,1 dne) (n = 138), při druhém odběru 22,5 dne (SD ± 5,3 dne) (n = 25) Přítomnost parazitů vyšla pozitivně u 1,5 % všech testovaných mlád'at (n = 2). 30 % mlád'at bylo při prvním odběru starších 16 dní (n = 42), při druhém odběru bylo 81 % mlád'at starších 16 dní (n = 21).

8. Diskuse

Zjišťování parazitů pomocí molekulárních metod a PCR se ukázalo jako přesná a rychlá metoda detekce přítomnosti krevních parazitů. Avšak v některých případech může být nevýhodná, jelikož v této metodě dochází k amplifikaci všech přítomných úseků DNA parazita, a nelze rozlišit, v jakém vývojovém stádiu se parazit nachází (Kim et al. 2009). Pro potřeby naplnění cílů této práce je tato metoda vyhovující.

V předložené práci nebyl zjištěn rozdíl mezi sezónami 2015 a 2016 v přítomnosti parazitů u mláďat. Zároveň se nepotvrdila stanovená hypotéza, že přítomnost parazitů závisí na pohlaví, avšak se zdá, že věk jedinců hraje významnou roli. Z celkového počtu 15 adultních jedinců (starší než 1 rok) byla prokázána přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u 53 % (n = 8), avšak ze 138 mláďat (do jednoho roku) byla přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* zjištěna pouze u dvou jedinců (1,5 %) ve věku 19 a 21 dní.

Závěry této práce se shodují s poznatky práce Synka et al. (2015), který testoval přítomnost 3 rodů řádu hemosporida (*Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*). Výsledky jeho čtyřleté studie potvrdily přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u 71 % dospělců (n = 57). Avšak přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat dosahující dle Synka et al. (2015) až 41 %, nebyla v této diplomové práci prokázána. Tento závěr může být zapříčiněn několika faktory. Synek et al. (2015) ve své studii uvádí, že nejmladšímu mláděti infikovanému *Leucocytozoon* sp. bylo 16 dní, avšak v mé diplomové práci bylo mláďatům v době prvních krevních odběrů v průměru 14 dní (SD ± 4,1 dne) (n = 138) a při druhém odběru 22,5 dne (SD ± 5,3 dne) (n = 25). V roce 2016 byly opakované odběry provedeny u 8 mláďat a v roce 2015 u 17. V roce 2015 se krev odebírala mláďatům převážně jednou, jelikož studie přítomnosti parazitů doposud v našich laboratořích neprobíhaly a vzorky krve měly sloužit jen ke zjištění pohlaví mláďat. V mé práci byla v roce 2015 prokázána přítomnost parazitů u dvou mláďat ve věku 19 a 21 dní, což se shoduje s výsledkem práce Synka et al. (2015), který určil věkovou hranici minimálně 16 dní. Z celkem 138 analyzovaných mláďat bylo při prvním odběru 30 % mláďat starších 16 dnů (n = 42), při druhém odběru bylo 81 % mláďat starších 16 dnů (n = 21). Avšak z celkem 138 mláďat však bylo pozitivních pouze 1,5 % (n = 2). V předložené studii bylo tedy infikováno významně nižší procento mláďat starších 16 dní, než tomu bylo ve studii Synka et al. (2015).

Na druhou stranu, výsledky mé práce se shodují s prací Korpimäkiho et al. (1993), který během sezón 1991 a 1992 studoval ve Finsku přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mlád'at (n = 12). Přítomnost parazitů nebyla v jeho studii u mlád'at prokázána, a dále autor uvádí, že věk mlád'at není rozhodující. Avšak jeho závěry mohou být ovlivněny malým počtem testovaných jedinců. Na druhou stranu, Korpimäki et al. (1993) prokázal přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u adultních jedinců, a tedy prokázal rozdíl mezi přítomností parazitů u mlád'at a dospělců tak, jak je prokázáno v této práci. Korpimäki et al (1993) však neprokázal zásadní vliv parazitů na adultní jedince v době hnízdění. Korpimäki et al (1993) také uvádí, že pomocí stěrů, byli ve vzorcích nalezeni paraziti jiných taxonomických jednotek – Nematoda (hlístice), či řád Trypanosomatida (trypanosomy) *Trypanosma avium*. Těmto poznatkům by bylo vhodné se dále věnovat. V České republice byl rod *Leucocytozoon* prokázán jako nejčastější rod parazitů, což nevylučuje kombinovanou infekci více rodů a druhů parazitů, jak uvádí Synek et al. (2015).

V mnoha studiích je dokumentováno, že dostupnost potravní nabídky drobných zemních savců významně ovlivňuje celý proces hnízdění sýce rousného, včetně doby zahnízdění, početnosti hnízdící populace, velikosti snůšky a úspěšnosti reprodukce (např. Korpimäki and Hakkarainen 2012, Zárybnická et al. 2015 – IBIS). V průběhu studijního období 2015-2016 v Krušných horách značně kolísala početnost potravní nabídky drobných zemních savců. Rok 2015 byl charakteristický vysokou početností drobných zemních savců, zatímco rok 2016 byl extrémně špatný z hlediska dostupnosti této potravy (Zárybnická unpublik. data). Dostupnost potravy tedy mohla ovlivnit také přítomnost parazitů u sýce rousného. Tuto domněnku nepřímo podporuje studie Korpimäkiho et al. (1993), který uvádí, že dostupnost potravy může negativně korelovat s množstvím infikovaných jedinců. Vztah mezi dostupností potravy a výskytem infekce by tedy měl být předmětem dalších studií.

Parazité rodu *Leucocytozoon* se vyvíjejí v poměrně velké škále hostitelů, například přítomnost těchto parazitů byla studována ve Švédsku v populacích sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*). Přítomnost parazitů byla v populaci prokázána, avšak jako dominantní se ukázal rod *Haemoproteus*, který se vykytoval až u 80 % populace. Rod *Leucocytozoon*, *Plasmodium* a řád Trypanosomatida se ve švédské populaci prokázal jen okrajově.

Je zřejmé, že pro hlubší pochopení faktorů ovlivňujících přítomnost a abundanci parazitů rodu *Leucocytozoon* v populacích sýce rousného je stále potřeba prohlubovat. Zejména je nutné dále studovat znalosti o vektorech a hostitelích a jejich výskyt dávat do souvislosti s environmentálními faktory. Především dostupnost potravy, teplota či efekt doby zahnízdění mohou hrát významnou roli ve výskytu parazitů v populacích ptačích hostitelů.

9. Závěr

Hlavním cílem této práce bylo zjištění přítomnosti parazitů rodu *Leucocytozoon* u dospělců a mláďat sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách v závislosti na jejich věku a pohlaví. Určení pohlaví bylo stanoveno na základě analýzy DNA a přítomnost parazitů byla stanovena dle protokolu pro nested PCR podle Hellgren et al. (2004). V práci byl také podrobně popsán metodický postup umožňující opakování postupů použitých v této práci.

Z celkového počtu 15 dospělců a 138 mláďat, byla přítomnost parazitů zjištěna u 53 % dospělců ($n = 8$) a 1,5 % mláďat ($n = 2$). Z výsledků provedených analýz nebyl zjištěn patrný rozdíl mezi přítomností parazitů u mláďat mezi jednotlivými sezónami a zároveň nebyl prokázán vliv pohlaví na přítomnost parazitů. Nicméně, přítomnost parazitů byla vyšší u dospělců (starších než 1 rok) než u mláďat (do 1 roku), což naznačuje vliv věku na přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon*.

Tato práce mi poskytla velké množství nových informací a zkušeností, zejména v praktické části, jak v terénu, tak v laboratoři. Tímto tématem bych se ráda dále zabývala, zejména bych pak chtěla analyzovat vyšší počet vzorků i druhů hostitelů, případně se dále ráda věnovala vlivu prostředí na přítomnost parazitů. Prohlubování znalostí o parazitech, jejich hostitelích a vektorech přináší nové informace do stále nedostačujících poznatků týkajících se přítomnosti parazitů ve volně žijících populacích ptáků.

10. Seznam zdrojů

- Bejček V., Šťastný K., 2001:** Encyklopedie ptáků. Rebo productions, Dobřejovice.
- Bejček V., Šťastný K., 2006:** Encyklopedie ptáci. Rebo productions, Dobřejovice.
- BirdLife International 2017:** Species factsheet: *Aegolius funereus*. IUCN Red List for birds. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 16/02/2017.
- Cramp S., Simmons K. [eds], 1985:** Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa. The Birds of the Western Palearctic Vol. IV. Oxford University Press, Oxford & New York.
- Drdáková – Zárybnická M., 2002:** Hnízdní biologie sýce rousného (*Aegolius funereus*) v imisních oblastech Krušných hor, „nepublikováno“. Diplomová práce FŽP ČZU v Praze: „Dep.: Česká Zemědělská Universita“.
- Drdáková – Zárybnická M., 2004:** Sýce rousný - úspěšný druh imisních holin. Živa 3: 128 – 130.
- Drdáková - Zárybnická M., 2005:** Růst mládřat sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách. BUTEO 14: 37-50.
- Eldegard K., Sonerud G. A., 2009:** Female offspring desertion and male-only care increase with natural and experimental increase in food abundance. Proc R Soc B 276: 1713-1721.
- European Commission, 2016:** Environment, Online: http://ec.europa.eu/environment/nature/conservation/wildbirds/threatened/a/aegolius_funereus_en.htm, cit. 3/3/2017.
- Ferrell S. T., Snowden K., Marlar A., Garner M., Lung N. P., 2007:** Fatal hemoprotozoal infections in multiple avian species in a zoological park. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 38:309–316.
- Fridolfsson A. K., Ellegren H., 1999:** A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. Journal of Avian Biology 30: 116–121.
- Garnham P. C. C., 1966:** Malaria parasites and other Haemosporidia. Oxford. Blackwell.
- Schmidt D. G., Roberts S. L., 2009:** Foundations of parasitology. McGraw-Hill. New York.
- Griner L., 1974:** Avian malaria in penguins. Adv. Vet. Sco. Comp. Med: 18:263-271.
- Hahn D. C., 1981:** Asynchronous hatching in the laughing gull: cutting losses and reducing rivalry. Anim Behav 29: 421±427.
- Hakkarainen H., Korpimäki E., 1998:** Why do territorial male Tengmalm's owls fail to obtain a mate? Oecologia 114: 578– 582.
- Hellgren O., Waldenström J., Bensch S., 2004:** A new PCR assay for simultaneous studies of Leucocytozoon, Plasmodium, and Haemoproteus from avian blood. J Parasitol 90:797–802.
- Hellgren O., Waldenstrom J., Perez-Tris J., Szollosi E., Hasselquist D, Krizanauskiene A., 2007:** Detecting shifts of transmission areas in avian blood parasites - a phylogenetic approach. Mol Ecol. 16: 1281–90.

- Hellgren O., Bensch S., Malmqvist B., 2008:** Bird hosts, blood parasites and their vectors - associations uncovered by molecular analyses of blackfly blood meals. *Mol Ecol.* 17:1605–13.
- Hipkiss T., 2002:** Brood sex ratio and sex differences in Tengmalm's owl (*Aegolius funereus*), „nepublikováno“. Diplomová práce Ecology and Environmental Science Umeå University, Sweden: „Dep.: Umeå University“.
- Hipkiss T., Hörnfeldt B., 2004:** High interannual variation in the hatching sex ratio of Tengmalm's owl broods during a vole cycle. *Popul Ecol* 46: 263 – 268.
- Holý P., 2002:** Potravní ekologie sýce rousného (*Aegolius funereus* L.) v imisních oblastech Krušných hor, "nepublikováno“. Diplomová práce LF ČZU v Praze: „Dep.: Česká Zemědělská Universita“.
- Hörnfeldt B., Carlsson B-G., Nordström A., 1988:** Molt of primaries and age determination in Tengmalm's Owl (*Aegolius funereus*). *Auk* 105: 783–789.
- Hörnfeldt B., Hipkiss T., Fridolfsson A.-K., Ekolund U., Ellegren H., 2000:** Sex ratio and fledging success of supplementary-fed Tengmalm's owl broods. *Molecular Ecology* 9: 187 – 192.
- Hoyo del J., Elliott A., Sargatal J. [eds], 1999:** Handbook of the Birds of the World. Vol.5. Barn-owls to Hummingbirds. Lynx Edicions, Barcelona.
- Hudec K., Št'astný K., 2005:** Fauna ČR Ptáci 2/II. Akademie věd České Republiky, Praha.
- Chinery M., 2007:** Insects of Britain and Western Europe. A & C Black Publishers Ltd. London, 320 p.
- Jones J. E., Barnett D. B., Solis J., 1972:** The Effect of Leucocytozoon Smithi Infection on Production, Fertility, and Hatchability of Broad Breasted White Turkey Hens. *Poultry Science* 51:1543 – 1545.
- Kim K. S., Tsuda Y., Sasaki T., Kobayashi M., Hirota Y., 2009:** Mosquito blood-meal analysis for avian malaria study in wild bird communities: laboratory verification and application to *Culex sasai* (Diptera: Culicidae) collected in Tokyo, Japan. *Parasitol Res* 105:1351–1357
- Korpimäki E., 1981:** On the ecology and biology of Tengmalm's Owl *Aegolius funereus* in southern Ostrobothnia and Soumenselkä, western Finland. *Biol* 13: 1–84.
- Korpimäki E., Hakkarainen H., Bennett G., F., 1993:** Blood parasites and reproductive success of Tengmalm's owls: detrimental effects on females but not on males? *Funct Ecol* 7:420–426.
- Korpimäki E., Hakkarainen H., 2012:** The Boreal Owl. Ecology, Behaviour and conservation of a Forest-Dwelling predator. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lack D., 1954:** The natural regulation of animal numbers. Clarendon Press, Oxford.
- Laryšová V., 2014:** Věková struktura hnízdní populace sýce rousného v Krušných horách v letech 2002 – 2006. „nepublikováno“. Bakalářská práce FŽP ČZU v Praze: „Dep.: Česká Zemědělská Universita“.
- Lee Y. C., Change C. H., Fu T. H., 1969:** Studies on the leucocytozoonosis of chickens. V. Symptoms and damages caused by the infection of *Leucocytozoon* sp. *Mem Coll Agr. (Taiwan Univ.)* 10:16-23.

Mahlerová K., 2014: Vliv pohlaví mláďat sýce rousného na jejich růst v období pobytu na hnízdě. „nepublikováno“. Bakalářská práce FŽP ČZU v Praze: „Dep.: Česká Zemědělská Universita“.

Martínez-de la Puente J., Martínez J., Rivero-de Aguilar J., Herrero J., Merino S., 2011: On the specificity of avian blood parasites: revealing specific and generalist relationships between haemosporidians and biting midges. *Mol Ecol* 20:3275–3287

Mikkola H., 1983: *Owls of Europe*. T. & A. D. Poyser, Calton.

Morii T., 1992: A review of *Leucocytozoon caulleryi* infection in chickens. *J. Protozool. Res.* 2:128–133.

Newton I., 1979: *Population ecology of raptors*. T. & A. D. Poyser, London.

Olias P., Wegelin M., Zenker W., Freter S., Gruber A. D., Kopfleisch R. 2011: Avian malaria deaths in parrots, Europe. *Emerging Infectious Diseases* 17: 950–952.

Plesník J., Hanzal V., Brejšková L. [eds], 2003: Červený seznam ohrožených druhů České Republiky Obratlovci. *Příroda* 22: 1-184.

Research instruments: Nucleic Acid Electrophoresis. Online: <http://www.ri.com.my/#!nucleic-acid-electrophoresis/cwed> cit. 10.4.2017.

Schwerdtfeger O., Wink M., 2014: Lack of correlation between sex ratio and food supply or other biotic variables in nestlings of Tengmalm's Owl *Aegolius funereus*. *Journal of Ornithology* 155: 497-505.

Sehgal M. N. R., Angus H. C., Nancy L. A., Valkiunas G., Markovets J. M., Kawamura S., Tell A. L., 2006: Evidence for cryptic speciation of *Leucocytozoon* spp. (Haemosporida, Leucocytozoidae) in diurnal raptors.

Simmons R. E., 1988: Offspring quality and the evolution of cainism. *Ibis* 130: 339 ± 357.

Směrnice EU 79/409/EEC, O ochraně volně žijících ptáků.

Stoleson S. H., Beissinger S. R., 1995: Hatching asynchrony and the onset of incubation in birds, revisited. *Curr Ornithol* 12: 191–270.

Synek P., Munclinger P., Albrecht T., Votýpka J., 2013: Avian haemosporidians in haematophagous insects in the Czech Republic. *Parasitol Res* 112:839–845.

Synek P., Popelková A., Koubínová D., Šťastný K., Langrová I., Votýpka J., Munclinger P., 2015: Haemosporidian infections in the Tengmalm's Owl (*Aegolius funereus*) and potential insect vectors of their transmission. *Parasitol Res* 115: 291 – 298.

Šindelář J., Kubizňák P., Zárybnický M., 2015: Sequential polyandry in female Tengmalm's owl (*Aegolius funereus*) during a poor rodent year. *Folia Zoologica*. 64: 123-128.

Šťastný K., Bejček V., Hudec K., 2009: Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice 2001–2003. Aventinum s. r. o., Praha.

The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 26 February 2017.

Trivers R. L., Willard D. E., 1973: Natural selection of parental ability to vary sex ratio of offspring. *Science* 179: 90–92.)

- Truett G. E., 2000:** Preparation of PCR - Quality Mouse Genomic DNA with Hot Sodium Hydroxide and Tris (HotSHOT). *BioTechniques* 29: 52-54.
- Vacík R., 1991:** Hnízdní biologie sýce rousného, *Aegolius funereus*, v Čechách a na Moravě. *Sylvia* 28: 95–113.
- Valkama J., Korpimäki E., Holm A., Hakkarainen H., 2002:** Hatching asynchrony and brood reduction in Tengmalm's Owl *Aegolius funereus*: the role of temporal and spatial variation in food abundance. *Oecologia* 133: 334–341.
- Valkiunas G., Iezhova T., 1990:** The peculiarities of infection of sparrowhawks from West- European and Indian-Asiatic flyways with haemosporidian (Protozoa: Haemosporida). *Parasitology (St. Petersburg)* 24: 113 – 120.
- Valkiunas G., 2005:** Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press. New York.
- Valkiunas G., 2011:** Haemosporidian vector research: marriage of molecular and microscopical approaches is essential. *Mol Ecol* 20:3084– 3086
- Voous K. H., 1962:** Die Vogelwelt Europas und ihre Verbreitung. Ein tiergeographischer Atlas über die Lebensweise aller in Europa brütenden Vögel. Verlag Paul Parey Hamburg – Berlin.
- Vyhláška č. 395/1992 Sb. ministerstva životního prostředí České republiky,** kterou se provádějí některá ustanovení zákona České národní rady č. 114/1992 Sb, v platném znění.
- Wickwate A. B., 1915:** Is Leucocytozoon anatis the cause of a new disease in ducs? *Parasitology* 8: 17-21.
- Witt R. [eds], 1995:** Steinbachův velký průvodce přírodou PTÁCI, GeoCenter, Praha.
- Zákon č. 114 / 1992 Sb.,** o ochraně přírody a krajiny, v platném znění
- Zárybnická M., 2009:** Parental investment of female Tengmalm's Owls *Aegolius funereus*: correlation with varying food abundance and reproductive success. *Acta Ornithol.* 44: 81–88.
- Zarybnická M., Riegert J., Šťastný K., 2013:** The role of Apodemus mice and Microtus voles in the diet of the Tengmalm's Owl in Central Europe. *Pop. Ecol.* 55: 353 - 361.
- Zárybnická M., Vojar J., 2013:** Effect of male provisioning on the parental behavior of female Boreal Owls *Aegolius funereus*. *Zoological Studies* 52:36.
- Zárybnická M., Sedláček O., Salo P., Šťastný K., Korpimäki E. 2015:** Reproductive responses of temperate and boreal Tengmalm's Owl *Aegolius funereus* populations to spatial and temporal variation in prey availability. *Ibis* 157: 369–383.

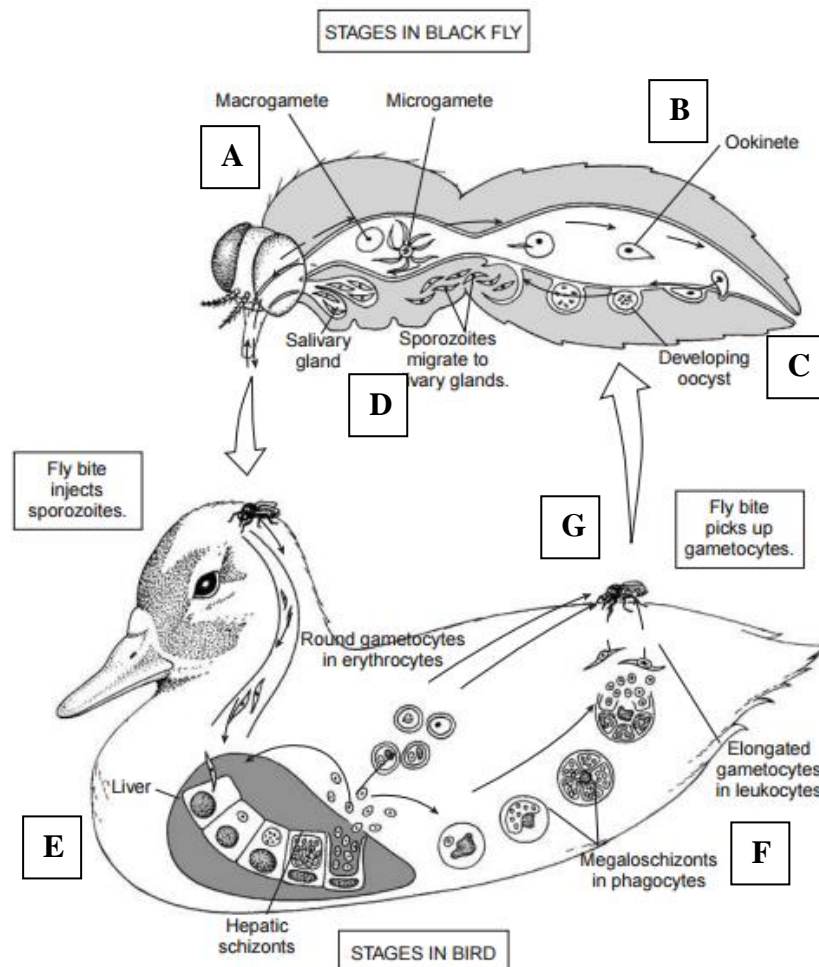
11. Seznam obrázků a tabulek

OBRÁZEK 1: SAMICE SÝCE ROUSNÉHO (<i>AEGOLIUS FUNEREUS</i>) (FOTO: ŠINDELÁŘ 2016).....	12
OBRÁZEK 2: SAMICE SÝCE ROUSNÉHO (<i>AEGOLIUS FUNEREUS</i>) (FOTO: ŠINDELÁŘ 2016).....	12
OBRÁZEK 3: DISTRIBUCE SÝCE ROUSNÉHO V EVROPĚ (ZELENÁ BARVA – VÝSKYT SÝCE ROUSNÉHO, ŠEDÁ BARVA – NEPŘÍTOMNOST SÝCE ROUSNÉHO) (WWW.EC.EUROPA.EU 2016).	13
OBRÁZEK 4: SOUČASNÉ ROZŠÍŘENÍ SÝCE ROUSNÉHO V ČR (ŠŤASTNÝ ET AL. 2009).	14
OBRÁZEK 5: SAMICE V BUDCE NA HNÍZDĚ S POTRAVOU (FOTO: ŠINDELÁŘ 2016).....	16
OBRÁZEK 6: PŘENAŠEČI PTAČÍCH HEMOSPORID. I – PŘENAŠEČI RODU HAEMOPROTEUS, 1 – CULICOIDES SPP., 2 - HIPPOBOSCIDAE; II – PŘENAŠEČ RODU PLASMODIUM, CULEX SPP.; III – PŘENAŠEČ RODU LEUCOCYTOZON, SIMILIUM SPP. (CHINERY 2007).....	21
OBRÁZEK 7: ODBĚRY KRVE Z BRACHIÁLNÍ ŽÍLY (FOTO: ZÁRYBNICKÁ 2014).	27
OBRÁZEK 8: PROCENTUÁLNÍ PŘÍTOMNOST PARAZITŮ RODU LEUCOCYTOZON U MLÁDAT SÝCE ROUSNÉHO V ROCE 2015.....	31
OBRÁZEK 9: 9A – PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ PARAZITŮ U ADULTNÍCH JEDINCŮ, 9B - PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ PARAZITŮ U ADULTNÍCH SAMIC, 9C - PROCENTUÁLNÍ ZASTOUPENÍ PARAZITŮ U ADULTNÍCH SAMCŮ V ROCE 2016.....	33
OBRÁZEK 10: SOUHRNNÉ INFORMACE O POHLAVÍ, VĚKU, BUDKÁCH A PŘÍTOMNOSTI PARAZITŮ RODU LEUCOCYTOZON U ADULTNÍCH JEDINCŮ V ROCE 2016 (P = PŘÍTOMNOST PARAZITŮ, N = NEPŘÍTOMNOST).	33
OBRÁZEK 11: CENTRIFUGA (FOTO: ZÁRYBNICKÁ 2014).....	46
OBRÁZEK 12: NAHŘÍVACÍ BLOČEK (FOTO: MAHLEROVÁ 2017)	46
OBRÁZEK 13: TERMOCYCLER (FOTO: ZÁRYBNICKÁ 2014).	48
OBRÁZEK 14: HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZA (FOTO: MAHLEROVÁ 2017).	50
OBRÁZEK 15: ILUSTRAČNÍ FOTO, VÁHA, AGAR (FOTO: MAHLEROVÁ 2017).	50

OBRÁZEK 16: PŘIPRAVENÝ GEL NA ELEKTROFORÉZU (FOTO: MAHLEROVÁ 2017).	51
OBRÁZEK 17: VÝSLEDNÝ ELEKTROFOREGRAM (FOTO: BREJŠKOVÁ 2014).	51
OBRÁZEK 18: BOX S UV PRO VYHODNOCENÍ (FOTO: MAHLEROVÁ 2017).	51
OBRÁZEK 19: STANDARD PRO URČENÍ DÉLKY FRAGMENTŮ (ŽEBŘÍK, MARKER) (HTTP://WWW.RI.COM.MY).	52
OBRÁZEK 20: CHEMIKÁLIE POTŘEBNÉ K INICIÁLNÍ PCR.	53
OBRÁZEK 21: OZNAČENÉ STRIPY (FOTO: MAHLEROVÁ, 2017).	54
OBRÁZEK 22: VORTEX (FOTO: MAHLEROVÁ 2017).	56
OBRÁZEK 23: VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ Z PCR (FOTO: MAHLEROVÁ 2017)	58
TABULKA 1: POMŮCKY A PŘÍSTROJE K IZOLACI DNA	45
TABULKA 2: METODA HOTSHOT - CHEMIKÁLIE A MNOŽSTVÍ.	46
TABULKA 3: POMŮCKY A PŘÍSTROJE PRO DETERMINACI POHLAVÍ	47
TABULKA 4: CHEMIKÁLIE POTŘEBNÉ PRO PCR	47
TABULKA 5: NASTAVENÍ CYCLERU	47
TABULKA 6: POMŮCKY A PŘÍSTROJE PRO ELEKTROFORÉZU PRO URČENÍ POHLAVÍ SÝCE ROUSNÉHO	49
TABULKA 7: CHEMIKÁLIE PRO ELEKTROFORÉZU	49
TABULKA 8: NASTAVENÍ HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZY	50
TABULKA 9: POMŮCKY A PŘÍSTROJE - DETERMINACE PARAZITŮ	53
TABULKA 10: CHEMIKÁLIE PRO INICIÁLNÍ PCR.	53
TABULKA 11: NASTAVENÍ TERMOCYCLERU - INICIÁLNÍ PCR	54
TABULKA 12: POMŮCKY A PŘÍSTROJE PRO NESTED PCR	55
TABULKA 13: CHEMIKÁLIE PRO NESTED PCR.	55
TABULKA 14: NASTAVENÍ CYCLERU PRO NESTED PCR	56
TABULKA 15: POMŮCKY A PŘÍSTROJE PRO VYHODNOCENÍ PŘÍTOMNOSTI PARAZITŮ (ELEKTROFORÉZU)	57
TABULKA 16: CHEMIKÁLIE PRO ELEKTROFORÉZU	57
TABULKA 17: NASTAVENÍ HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZY	57

12. Přílohy:

Příloha 1: Reprodukční cyklus rodu *Leucocytozoon*



Příloha 1: A, B, C, D – vývoj parazitů rodu *Leucocytozoon* (*Leucocytozoon simondi*) na zástupci čeledi Simuliidae. E, F, G – vývoj parazitů rodu *Leucocytozoon* (*Leucocytozoon simondi*) v ptačím hostiteli. Pohlavní rozmnožování: A – vstup makrogamet a mikrogamet do trávicího traktu vektoru, B – vývoj ookinety, C – z ookinety se vyvine oocysta a z ní sporozoity, které putují do slinných žláz vektoru (D). Nepohlavní rozmnožování: E – Sporozoity se dostanou do pevných tkání hostitele a postupně se množí, F – Ze sporozoitů vznikají makrogametocyty a mikrogametocyty, které se pohybují v krevním řečišti, G – z krevního řečiště se dostanou zpět do vektoru (obrázek převzat z Schmidt & Roberts 2009).

Příloha 2: Extrakce DNA z krve

- 1) Izolace DNA
- 2) Určení pohlaví – PCR
- 3) Elektroforéza
- 4) Iniciální PCR
- 5) Nested PCR
- 6) Elektroforéza

→ Pro korektní určení vhodné provádět 2x – 3x

Tabulka 1: Pomůcky a přístroje k izolaci DNA

IZOLACE DNA		
<u>Pomůcky</u>		<u>Přístroje</u>
Pipety		Centrifuga (Obr. 12)
Špičky		Nahřívací bloček (Obr. 11)
Rukavice		Vortex
Ependorfka	V = 1.5ml	
Drátítko		
Vanička na led		
Led		
Stojánek	Na ependorfky	

Postup:

- (1) Připravíme si pomůcky, které budeme používat (Tab. 1)
- (2) Ependorfky o V = 1,5 ml; řádně označíme
- (3) Z ependorfech s krví odebereme 50 μ l, s malými kousky krve
- (4) Pomocí drátítka promícháme a rozbijeme velké kousky krve v ependorfkách
- (5) Systematicky vkládáme do stojánku
- (6) Nahřejeme bloček na **95 °C**
- (7) Stočit etanol na centrifuze (Obr. 12)
 - a. **Čas: T=5 min**
 - b. **Otáčky: RPM = 3000–5000**
 - c. **Teplota: libovolně**
- (8) Odsát etanol z povrchu, po ukončení rotací centrifugy (v centrifuze dojde k oddělení krve od etanolu)
- (9) Nechat ependorfky otevřené, aby se odpařil zbytek etanolu / dát na pár sekund do bločku (Obr. 11) s otevřeným víčkem
- (10) Dále pokračujeme s ependorfkami, kde je na dně sedimentovaná krev



Obrázek 11: Centrifuga (foto: Zárybnická 2014).



Obrázek 12: Nahřívací bloček (foto: Mahlerová 2017)

METODA HOTSHOT

Tabulka 2: Metoda HotShot - chemikálie a množství.

HOTSHOT			
Chemikálie			
Roztok A:	NaOH EDTA	(alkalický)	40μl
Roztok B:	TRIS -MCl	(pH = 5; neutralizační)	40μl

- Roztok A: 25mM NaOH; 0.2 mM EDTA
 - Roztok B: TRIS -MCl; pH = 5,0
- (11) Do každé ependorfky s krví přidáme 40 μl roztoku A (Tab. 2)
 - (12) Ependorfku uzavřeme a po dobu 10 s pomalu vortexujeme
 - (13) Zvortexované vzorky vložíme do nahřátého bločku (95 °C) na 12min
 - (14) Připravíme si led do nádoby na led
 - (15) Nahřáté vzorky jdou rovnou na led
 - (16) Okamžitě přidáváme roztok B (40 μl) (Tab. 2)
 - (17) Z ledu jdou vzorky rovnou do lednice se zchladit

Příloha 2: Určení pohlaví sýce rousného (PCR)

- 1) Izolace DNA
- 2) Určení pohlaví – PCR**
- 3) Elektroforéza
- 4) Iniciální PCR
- 5) Nested PCR
- 6) Elektroforéza

→ Pro korektní určení vhodné provádět 2x – 3x

Tabulka 3: Pomůcky a přístroje pro determinaci pohlaví

Pomůcky		Přístroje
Rukavice		Cycler (Obr. 13)
Pipety		
Ependorfka	V = 1,5ml	
Stripy		
Led		
Box na led		

Tabulka 4: Chemikálie potřebné pro PCR

PCR	Počet vzorků			
Chemikálie	5x	10x	20x	30x
dH ₂ O [μl]	81,5	163	326	489
Dream Taq buffer [μl]	10	20	40	60
Primer Forward (F) [μl]	1	2	4	6
Primer Reverse (R) [μl]	1	2	4	6
dNTP[μl]	1,25	2,5	5	7,5
Polymeráz[μl]a	0,2 - 0,3	0,4	0,8	1,20
DNA	1 - 1,5 μl			

Tabulka 5: Nastavení cycleru

Nastavení cycleru: Pohlaví		T [°C]	Čas	Cykly
První krok	Denaturace	94	30 s	29x
Druhý krok	Anneling	60,5	40 s	29x
Třetí krok	Amplifikace (primer extension)	72	1 min 10 s	29x
Závěr	Finální extenkce	72	10 min	

Postup:

- (1) Do ependorfky ($V = 1,5\text{ml}$) napipetujeme buffer + dH_2O + primery (1 primer: $9\text{ dH}_2\text{O}$) + dNTP (Tab. 3, 4).
- (2) Homogenizace pomocí vortexu, následné stočení pomocí centrifugy
- (3) Přidáme polymerázu
- (4) **VZNIKL PREMIX** – zavřít víčko, ependorfku označím a lehce protřepu
- (5) Do každé ependorfky stripu napipetuji **16,8 μl** PREMIXU
- (6) Z ependrofeek s izolovanou DNA napipetuji **1,5 - 2 μl** vyizolované DNA do každého oddílu stripu
- (7) Premix + DNA ve stripech zavřu a lehce proklepu v ruce
- (8) Takto uzavřené a popsané stripy jsou vloženy do **cycleru** (= termocykléru) (Obr. 13) na vhodný program (Tab. 5)
- (9) Po vyjmutí ze cycleru stočit sraženou vodu
- (10) Uložit do lednice / mrazáku



Obrázek 13: Termocycler (foto: Zárybnická 2014).

Příloha 3: Vyhodnocení pohlaví sýce rousného (elektroforéza)

Kroky:

- 1) Izolace DNA
- 2) Určení pohlaví – PCR
- 3) Elektroforéza**
- 4) Iniciální PCR
- 5) Nested PCR
- 6) Elektroforéza

→ Pro korektní určení vhodné provádět 2x – 3x

Tabulka 6: Pomůcky a přístroje pro elektroforézu pro určení pohlaví sýce rousného

Pomůcky a přístroje
Rukavice
Pipety
Vana
Hřeben
Horizontální elektroforéza
Box s UV světlem
Centrifuga
Lepenka
Silikonová chňapka

Tabulka 7: Chemikálie pro elektroforézu

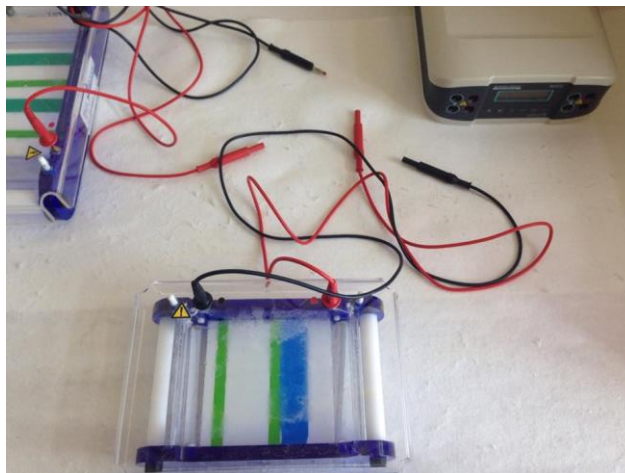
Chemikálie: elektroforéza	Vana	
<u>Chemikálie</u>	Malá (56 vzorků)	Velká (více než 100 vzorků)
Agaróza [g]	0,8	1,6
Running buffer [ml]	80	160
Ethidium bromid [μl]	1,5	3
Produkt PCR [μl]	3	3
Loading buffer [μl]	1	1
Marker	2	2

Tabulka 8: Nastavení horizontální elektroforézy

Nastavení elektroforézy	
Volty	Čas [min]
110	35
100	40



Obrázek 15: Ilustrační foto, váha, agar (foto: Mahlerová 2017).



Obrázek 14: Horizontální elektroforéza (foto: Mahlerová 2017).

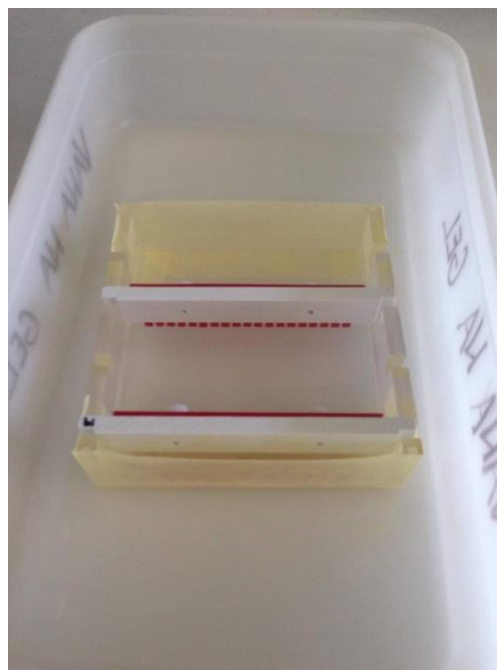
Postup:

- (1) Příprava gelu (Tab. 6, 7)
 - a. Vanu olepíme lepenkou, tak aby se do ní dal nalít gel
 - b. Do kádinky odměříme potřebné množství running bufferu (Tab. 7)
 - c. Pomocí váhy naměříme potřebné množství agarózy (Obr. 15)
 - d. Smícháme agarózu s bufferem a vložíme do mikrovlnky
 - i. P (Výkon) = 80
 - ii. T (Čas) = 80 s
 - e. Z mikrovlnky vyjmeme převařenou agarózu pomocí silikonové rukavice a pod proudem přes sklo kádinky chladíme až na teplotu, kdy jsme schopni kádinku udržet na hřbetu ruky
 - f. Přidáme odměřené množství ethidium bromidu a promícháme krouživými pohyby
 - g. Gel nalijeme do vany
 - h. Přidáme hřebeny a necháme ztuhnout po dobu 25 min (Obr. 16)
- (2) Po vyndání vzorků z cycleru je krátce stočíme na malé centrifuze (aby došlo k uvolnění sražené vody)
- (3) Připravíme si parafilm, na který napipetujeme množství kapiček loading bufferu (1 kapka = 1 μ l) dle počtu vzorků

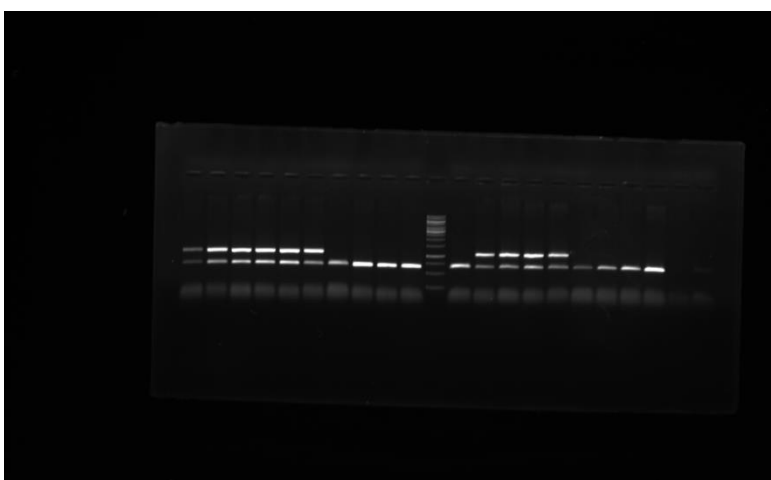
- (4) Ke každé kapce loading bufferu přidáme 3 μl produktu z PCR
- (5) Do první jamky přijde marker (Obr. 19), který umožní číst délku vzniklých bendů.
- (6) Do jamek ve ztuhlém gelu přepipetováváme 4 μl pro každý vzorek (1 μl loading bufferu + 3 μl PCR produktu)
- (7) Zaklopíme víčko elektroforézy a nastavíme program dle potřeby (110 V na 35 min nebo 100 V na 40 min – rozdíl 10 V nerozhoduje o kvalitě výsledku) (Tab. 8) (Obr. 14)
- (8) Po uplynutí doby potřebné k proběhnutí elektroforézy vyndáme opatrně gel (pomocí rukavic!) a přendáme ho do boxu (Obr. 17)
- (9) Gel osvítíme UV světlem a čteme výsledek (Obr. 18)



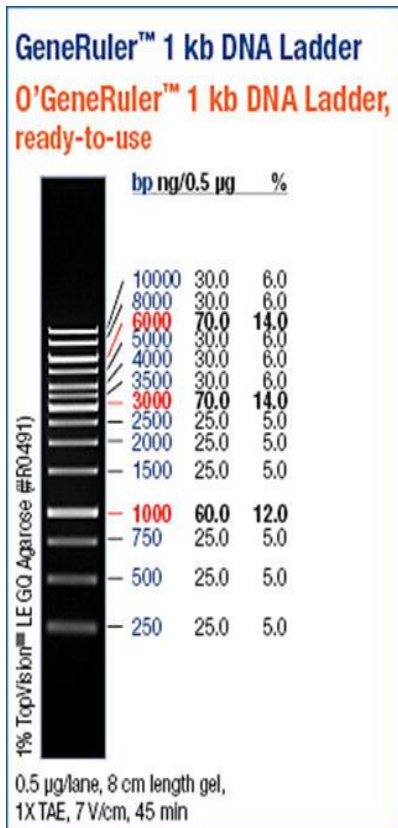
Obrázek 18: Box s UV pro vyhodnocení
(foto: Mahlerová 2017).



Obrázek 16: Připravený gel na elektroforézu
(foto: Mahlerová 2017).



Obrázek 17: Výsledný elektroforegram (foto: Brejšková 2014).



Obrázek 19: Standard pro určení délky fragmentů (žebřík, marker)
 (<http://www.ri.com.my>).

Příloha 4: Molekulární detekce rodu *Leucocytozoon* – Iniciální PCR

Kroky:

- 1) Izolace DNA
- 2) Určení pohlaví – PCR
- 3) Elektroforéza
- 4) Iniciální PCR**
- 5) Nested PCR
- 6) Elektroforéza

→ Pro korektní určení vhodné provádět 2x – 3x

Tabulka 9: Pomůcky a přístroje - determinace parazitů

Pomůcky	Přístroje
Rukavice	Cycler (Obr. 2a)
Pipety	Vortex
Stripy	Centrifuga

Tabulka 10: Chemikálie pro iniciální PCR.

Chemikálie: Iniciální PCR (Obr. 20)	Počet vzorků		
	1x	10x	20x
Chemikálie			
MM Mix[μ l]	5	50	100
NF1 (F) [μ l]	0,5	5	10
NR3 (R) [μ l]	0,5	5	10
DNA [μ l]	4	4	4



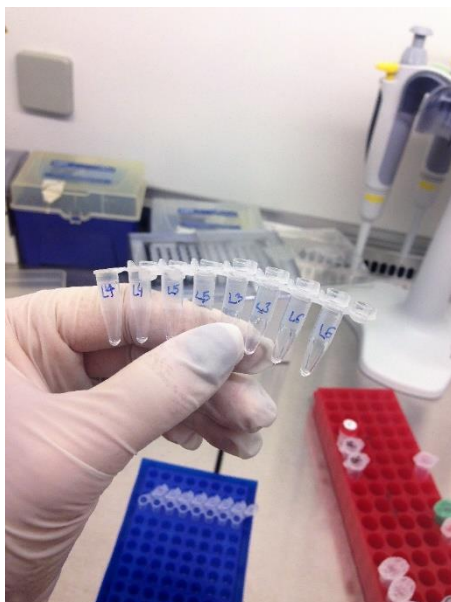
Obrázek 20: Chemikálie potřebné k iniciální PCR.

Tabulka 11: Nastavení termocycleru - iniciální PCR

Nastavení cycleru: Iniciální PCR			
	T [°C]	Čas	Cykly
1	95	15 min	1x
2	94	30 s	19x
3	50	90 s	
4	72	45 s	
5	72	10 min	1x
6	15	∞	

Postup

- (1) Příprava premixu (Tab. 10, 9)
- (2) Lehce promíchat
- (3) Do označených stripů (Obr. 21) napipetujeme 6 μ l premixu do každého oddílu
- (4) Izolace DNA – Pomocí Hot Shot s A a B roztokem (Příloha 2) – izolovaná DNA slouží jako templát pro iniciální PCR
- (5) Z každého izolovaného vzorku napipetujeme 4 μ l DNA do označených stripů tak, aby v každém oddíle bylo 6 μ l premixu a 4 μ l izolované DNA
- (6) Po proběhnutí iniciální PCR naředíme produkt 10x (přidáme 90 μ l dH₂O do každé části stripu)
- (7) Skladujeme v mrazáku (po dobu delší než jeden den) / v lednici (přes noc)



Obrázek 21: Označené stripy (foto: Mahlerová, 2017).

Příloha 5: Zjištění přítomnosti parazitů rodu *Leucocytozoon* – Nested PCR

Kroky:

- 1) Izolace DNA
- 2) Určení pohlaví – PCR
- 3) Elektroforéza
- 4) Iniciální PCR
- 5) Nested PCR**
- 6) Elektroforéza

→ Pro korektní určení vhodné provádět 2x – 3x

Tabulka 12: Pomůcky a přístroje pro nested PCR

Pomůcky	Přístroje
Rukavice	Cycler
Pipety	Vortex
Stripy	Centrifuga

Tabulka 13: Chemikálie pro nested PCR.

Chemikálie: Nested PCR	Počet vzorků			Ředit
<u>Chemikálie</u>	1x	10x	20x	
Buf. Dream Tq [μ l]	3	30	60	
dNTP [μ l]	3	30	60	1: 49
R2(L) [μ l]	2	20	40	1: 9
F (L) [μ l]	2	20	40	1: 9
Dream Taq Polymeráza [μ l]	0,1	1	2	
dH ₂ O [μ l]	9,9	99	198	
Produkt iniciální PCR [μ l]	10	10	10	

Tabulka 14: Nastavení cycleru pro nested PCR

Nastavení cycleru: Nested PCR			
	T [°C]	Čas	Cykly
1	94	3 min	1x
2	94	30 s	35x
3	50	30 s	
4	72	45 s	
5	72	10 min	1x
6	15	∞	



Obrázek 22: Vortex (foto: Mahlerová 2017).

Postup:

- (1) Příprava premixu dle potřebného množství (Tab. 12, 13) (Bez polymerázy)
- (2) Zvortexujeme a stočíme na malé centrifuze
 - a. Polymerázu přidáváme rychle a zcela na konci, aby nebyla dlouho mimo mrazák
- (3) Produkt iniciální PCR 10 x naředíme (10 μ l: 90 μ l dH₂O) a po dobu 10 zvortexujeme
- (4) Premix rozpipetujeme do nových, připravených, označených stripů - 20 μ l do každého oddílu
- (5) Do stripů k premixu přidáme 10 μ l z naředěného produktu z iniciální PCR
- (6) Takto namíchané roztoky stočíme na centrifuze a vkládáme do cycleru na program pro **nested PCR** (Tab. 14).

Příloha 6: Vyhodnocení přítomnosti parazitů rodu *Leucocytozoon* (elektroforéza)

Kroky:

- 1) Izolace DNA
- 2) Určení pohlaví – PCR
- 3) Elektroforéza
- 4) Iniciální PCR
- 5) Nested PCR
- 6) Elektroforéza**

→ Pro korektní určení vhodné provádět 2x – 3x

Tabulka 15: Pomůcky a přístroje pro vyhodnocení přítomnosti parazitů (elektroforézu)

Pomůcky a přístroje
Rukavice
Pipety
Vana
Hřeben
Horizontální elektroforéza
Box s UV světlem
Centrifuga
Lepenka
Silikonová chňapka

Tabulka 16: Chemikálie pro elektroforézu

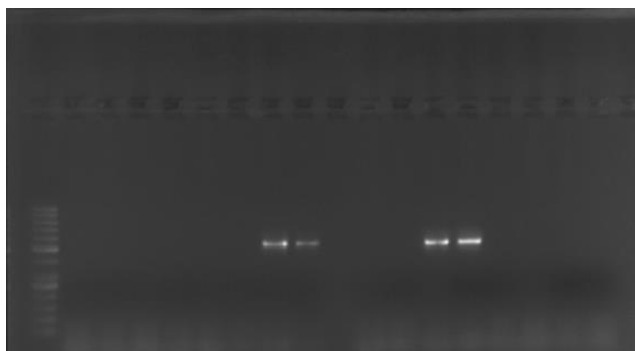
Chemikálie: elektroforéza	Vana	
<u>Chemikálie</u>	Malá (56 vzorků)	Velká (více než 100 vzorků)
Agaróza [g]	0,8	1,6
Running buffer [ml]	80	160
Ethidium bromid [μl]	1,5	3
Produkt PCR [μl]	3	3
Loading buffer [μl]	1	1
Marker	2	2

Tabulka 17: Nastavení horizontální elektroforézy

Nastavení elektroforézy	
Volty	Čas [min]
110	35
100	40

Postup:

- (1) Příprava pomůcek (Tab. 15)
- (2) Příprava gelu
 - a. Vanu olepíme lepenkou, tak aby se do ní dal nalít gel
 - b. Do kádinky odměříme potřebné množství running bufferu (Tab. 16)
 - c. Pomocí váhy naměříme potřebné množství agarózy
 - d. Smícháme agarózu s bufferem a vložíme do mikrovlnky
 - i. P (Výkon) = 80
 - ii. T (Čas) = 80 s
 - e. Z mikrovlnky vyjmeme převařenou agarózu pomocí silikonové rukavice a pod proudem přes sklo kádinky chladíme až na teplotu, kdy jsme schopni kádinku udržet na hřbetu ruky
 - f. Přidáme odměřené množství ethidium bromidu a promícháme krouživými pohyby
 - g. Gel nalijeme do vany
 - h. Přidáme hřebeny a necháme ztuhnout po dobu 25 min
- (3) Po vyndání vzorků z cycleru je krátce stočíme na malé centrifuze (aby došlo k uvolnění sražené vody)
- (4) Připravíme si parafilm, na který napipetujeme množství kapiček loading bufferu (1 kapka = 1 μ l) dle počtu vzorků
- (5) Ke každé kapce loading bufferu přidáme 3 μ l produktu z PCR
- (6) Do první jamky přijde marker (Obr. 19, který umožní číst délku vzniklých bendů.
- (7) Do jamek ve ztuhlém gelu přepipetováváme 4 μ l pro každý vzorek (1 μ l loading bufferu + 3 μ l PCR produktu
- (8) Zaklopíme víčko elektroforézy a nastavíme program dle potřeby (110 V na 35 min nebo 100 V na 40 min – rozdíl 10 V nerozhoduje o kvalitě výsledku) (Tab. 17)
- (9) Po uplynutí doby potřebné k proběhnutí elektroforézy vyndáme opatrně gel (pomocí rukavic!) a přendáme ho do boxu
- (10) Gel osvítíme UV světlem a čteme výsledek (Obr. 23) – zobrazí-li se bend, jedná se o infikovaného jedince, nezobrazí-li se, paraziti nejsou v jedinci přítomni.



Obrázek 23: Vyhodnocení výsledků z PCR (foto: Mahlerová 2017)