

**Haemogregariny parazitující u želv rodu *Pelusios*:
fylogenetické vztahy, morfologie a hostitelská specifita**

Diplomová práce

Bc. Aneta Maršíková

Školitel: MVDr. Jana Kvičerová, Ph.D.

Školitel specialista: doc. MVDr. Pavel Široký, Ph.D.

České Budějovice

2016

Maršíková A., 2016: Haemogregariny parazitující u želv rodu *Pelusios*: fylogenetické vztahy, morfologie a hostitelská specifita. [Haemogregarines in *Pelusios* turtles: phylogenetic relationships, morphology, and host specificity, MSc. Thesis, in Czech] – 68 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The study deals with phylogenetic relationships, morphology and host specificity of blood parasites *Haemogregarina* sp. infecting freshwater turtles of the genus *Pelusios* from Africa. Results of phylogenetic analyses are also used for clarification of phylogenetic relationships between "haemogregarines sensu lato" and genus *Haemogregarina*.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Českých Budějovicích dne 21. 4. 2016

Aneta Maršíková

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat Pavlu Širokému za poskytnutí krevních vzorků a pomoc při mikroskopických analýzách. Děkuji především své školitelce Janě Kvičerové za odborné vedení, cenné rady a přátelský přístup. Nele Dvořákové děkuji za komentáře k morfologickým analýzám. Ráda bych také poděkovala rodině za morální a psychickou podporu a nejlepšímu kamarádovi Jirkovi za jeho ochotu a pomoc v nesnázích.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GA ČR P506/11/1738.

Obsah

1. Úvod	1
1. 1. Využití molekulárních metod, fylogenetické analýzy a jejich úskalí	1
1. 2. Haemogregariny sensu lato	2
1. 3. Rod <i>Haemogregarina</i>	4
1. 3. 1. Historie	5
1. 3. 2. Taxonomie	6
1. 3. 3. Fylogenetické postavení	8
1. 3. 4. Vývojový cyklus a mechanismy přenosu	11
1. 3. 5. Morfologie vývojových stádií	17
1. 4. Vodní želvy rodu <i>Pelusios</i>	18
1. 4. 1. Systematické zařazení, fylogenetické vztahy, rozšíření a ekologie	18
1. 4. 2. Krevní paraziti želv	22
2. Cíle práce	23
3. Materiál a Metodika	24
3. 1. Původ vzorků studovaných haemogregarin	24
3. 2. Molekulární analýzy	27
3. 2. 1. Izolace DNA	27
3. 2. 2. PCR, primery, zpracování PCR produktů	28
3. 2. 3. Sekvence, úprava a zpracování sekvencí	30
3. 2. 4. Alignment, fylogenetické analýzy	31
3. 3. Morfologická analýza	32

4. Výsledky	33
4. 1. Molekulární analýzy	33
4. 1. 1. PCR, sekvenace a alignment	33
4. 1. 2. Fylogenetické analýzy	33
4. 2. Morfologická analýza	39
4. 3. Korelace morfologie a fylogeneze	44
5. Diskuse	46
5. 1. Molekulární metody a fylogenetické analýzy	46
5. 2. Morfologická analýza	47
5. 3. Korelace morfologie a fylogeneze	50
6. Závěr	53
7. Použitá literatura	54
8. Přílohy	

1. Úvod

1. 1. Využití molekulárních metod, fylogenetické analýzy a jejich úskalí

V důsledku změny životního prostředí a selekčních tlaků dochází u parazitů k různým adaptivním modifikacím a redukcím, jejichž význam je často neznámý; často tak dochází k nejasnostem v jejich evolučních vztazích a taxonomickém postavení. Před nástupem molekulárních metod byly jako spolehlivý taxonomický marker používány morfologické a biologické charakteristiky daného parazita. Metody molekulární fylogenetiky a genomiky však přinesly nové a často překvapivé informace o evolučním scénáři a vzájemných vztazích i dosud dobře prostudovaných skupin parazitů (např. Carreno a kol. 1999, Siddall a kol. 2007, Valkiūnas a kol. 2008, Adl a kol. 2012, Barta a kol. 2012, Kvičerová a kol. 2013).

Četné DNA sekvence, které byly během posledních deseti let vloženy do databáze GenBank, představují důležitá data pro studium organismů. Nicméně velké množství sekvencí parazitů, zejména z volně žijících živočichů, bylo identifikováno pouze na úrovni rodu, navíc často bez dostupnosti relevantních morfologických dat. V databázi GenBank tak existuje nespočet druhů, popsanych jako „sp.“, a to většinou na základě sekvencí jediného genu. Fylogenetické analýzy založené na chybných identifikacích taxonů, stejně tak jako morfologické popisy nepodložené molekulárními daty, mohou být zavádějící, a vést tak k chybným závěrům. Tato úskalí výstižně popsal Valkiūnas a kol. (2008). Recentním příkladem zdrojů takto zavádějících dat, nebo sekvencí, které nelze použít pro relevantní fylogenetické analýzy, jsou publikace Harrise a kol. (2011) či Maia a kol. (2012), založené na analýzách sekvencí 18S rDNA o délce pouhých 530 bp ze značného množství různých hostitelů, a označených jako *Hepatozoon* sp. či pouze kódy vzorků; k těmto vzorkům bohužel neexistují žádná morfologická data. Podobně Haklová-Kočíková a kol. (2014) vložili do databáze GenBank pouhých 584 bp dlouhé sekvence 18S rDNA rodu *Karyolysus*. Karadjian a kol. (2015) zase na základě analýz jediného genu (18S rRNA) a obecných vývojových cyklů, uvedených v původní literatuře, přejmenoval *Hepatozoon* infikující široké spektrum hostitelů (savce, ptáky, obojživelníky a plazy) na zcela nový rod *Bartazoon*, a to i přes absenci molekulárních dat pro typový druh rodu *Hepatozoon*, *H. perniciosum*; navíc se ukázalo, že nově pojmenovaný rod *Bartazoon* není jednoznačně monofyletický.

Většina fylogenetických a populačně-genetických studií parazitů skupiny Apicomplexa byla doposud zaměřena zejména na lékařsky a veterinárně významné taxony (např. Barta a kol. 1997, Hughes a Verra 2002, Altay a kol. 2008, Kvičerová a kol. 2008). Klinicky málo významné, avšak biologicky a evolučně zajímavé skupiny tak zůstávají do jisté míry opomíjené. Biologicky unikátní paraziti rodu *Haemogregarina* patří k těmto opomíjeným, avšak zajímavým skupinám.

1. 2. Haemogregariny sensu lato

Jako haemogregariny sensu lato jsou označovány kokcidie s heteroxenním vývojovým cyklem, řazené mezi Adeleorina, Apicomplexa (Adl a kol. 2012). Tito intracelulární parazité infikují široké spektrum bezobratlých a obratlovců. Jejich vývojová stádia (meronti a gamonti) se vyskytují v krvi a tkáních mezihostitelů, kterými jsou savci, ptáci, ryby, krokodýli, hadi, ještěrky a želvy (Telford 1984, Dessler 1993, Smith 1996, Perkins a Keller 2001). Definitivními hostiteli a zároveň vektory jsou bezobratlí živočichové, především klíšťata a jiní roztoči, hmyz, a pijavky (Dessler 1993, Smith 1996, Davies a Johnston 2000). Vývoj infekčních stádií (sporozoitů) se odehrává ve střevním epitelu, hemocoelu či reprodukční soustavě definitivního hostitele (Dessler 1993).

Taxonomické postavení v rámci kmene Apicomplexa bylo původně založeno na morfologických znacích jednotlivých vývojových stádií, a na spektrech hostitelů. S nástupem molekulárních metod bylo možné získat některá data, potřebná pro nastínění fylogeneze této skupiny (Barta 1989, Siddall a Dessler 1991, Dessler 1993, Siddall 1995). Barta (2000) rozdělil haemogregariny do tří čeledí a šesti rodů.

Čeď Haemogregarinidae zahrnuje rody *Haemogregarina*, *Dessleria* a *Cyrlia*, lišící se morfologií gamontů a oocyst. Kompletní vývojový cyklus rodu *Haemogregarina* (viz také kapitola 1. 3.) byl popsán z vodních želv a pijavek. První generace merogonie (probíhající ve vnitřních orgánech obratlovce) je typická přítomností merontů, kteří obsahují 13-25 merozoitů (Paterson a Dessler 1976). Další generace merogonie probíhá v erythrocytech obratlovců za tvorby gametocytů. Následně je krev společně s vývojovými stádii nasáta pijavkou, v jejímž střevě probíhá syzygie gamontů, gametogeneze a vznik čtyř mikrogamet. Oocysty se objevují na povrchu střevního epitelu, přičemž každá obsahuje 8 sporozoitů. Sporozoiti penetrují střevní stěnu a v endotelových buňkách oběhového systému pijavky

se mění na meronty, obsahující infekční merozoity. Merozoiti následně invadují proboscis pijavky, a do dalšího obratlovce jsou poté přenášeni inokulativně během sání (Paterson a Desser 1976, Siddall a Desser 1991, 1992, 2001, Desser 1993).

U rodu *Cyrlia* se mohou nepohlavní stádia vyskytovat i v lymfocytech, neutrofilech či monocytech. Merogonie rodu *Desseria* naopak probíhá výhradně ve vnitřních orgánech, nikoli v krevních buňkách. Oocysty obou rodů obsahují více než 16 sporozoitů (v porovnání s 8 u rodu *Haemogregarina*) (Siddall 1995, Mihalca a kol. 2002).

Čeď Hepatozoidae je reprezentována jediným rodem, *Hepatozoon*. Zástupci tohoto rodu byli popsáni u savců, plazů, ptáků a obojživelníků (Paperna 2006). Přenašečem a zároveň definitivním hostitelem jsou zde roztoči (zejména klíšťata) a různý hmyz (Telford 1984), u druhů infikujících studenokrevné obratlovce jsou to především komáři (Smith 1996). K přenosu na mezihostitele (obratlovce) dochází v tomto případě pozřením infikovaného definitivního hostitele. V mezihostiteli probíhá počáteční fáze merogonie. Poslední generace merozoitů proniká u obojživelníků a plazů do erytrocytů, u ptáků a savců do leukocytů, a dochází ke vzniku gametocytů (Smith 1996). Po sání na infikovaném obratlovci se ve střevě definitivního hostitele z natrávených krevních buněk uvolní gametocyty, skrze střevní stěnu migrují do různých buněk uvnitř těla, kde proběhne syzygie. Typickým morfologickým znakem tohoto rodu je tvorba polysporocystických oocyst. Každá sporocysta obsahuje 4 až 16 (či více) sporozoitů (Smith 1996, Telford 1984, 2009, Telford a kol. 2002).

Čeď Karyolysidae je tvořena rody *Karyolysus* a *Hemolivia*. Rod *Karyolysus* parazituje u evropských plazů a je přenášen roztoči. Vývojový cyklus typového druhu *Karyolysus lacertae* zahrnuje merogonii v endotelových buňkách tkání mezihostitele (ještěrky), gametocyty jsou lokalizovány v erytrocytech. Po sání samičky klíštěte na infikovaných ještěrkách probíhá v jejím střevě syzygie a sporogonie, sporozoiti pak migrují do jejích vajíček. U ostatních haemogregarin sensu lato nebyl transovariální přenos prokázán. V larvách (nymfách) roztočů pak probíhá merogonie a vznik merozoitů. Ještěrky se nakazí těmito stádií při požití larev roztočů (Smallridge a Bull 1997, Telford 2009, Haklová-Kočíková a kol. 2014).

Rod *Hemolivia* představuje haemogregariny napadající plazy a obojživelníky. Vývojový cyklus zahrnuje erytrocytární gamogonii, erytrocytární a extra-erytrocytární merogonii a tvorbu cyst. Sporogonie probíhá ve střevním epitelu definitivního hostitele (klíštěte) ve dvou fázích. V první fázi dochází ke tvorbě oocyst s pohyblivými sporozoity

(netvoří se sporocysty). Ve druhé fázi sporozoiti opouštějí oocystu a napadají další epitelové buňky, vytvoří sporocysty se sporozoity, již infekčními pro obratlovce (Petit a kol. 1990, Smallridge a Bull 1997, Boulard a kol. 2001).

Většina infekcí způsobených haemogregarinami sensu lato probíhá asymptomaticky. Paraziti jsou nejčastěji detekováni na základě mikroskopického vyšetření barvených krevních nátěrů a průkazu gametocytů v krevních buňkách (Smith 1996). Pro molekulární průkaz se nejvíce využívá metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) se specificky navrženými primery (Wozniak a kol. 1994, 1996, Perkins a Keller 2001, Kvičerová a kol. 2008). Patogenita krevních parazitů je spíše známa a popsána u druhů infikujících člověka nebo domácí zvířata. Psí druhy rodu *Hepatozoon* mohou kromě leukocytózy a anémie (Gavazza a kol. 2003) způsobovat vážné histopatologické změny na vnitřních orgánech, ve kterých probíhá merogonie (tj. slezina, kostní dřeň, lymfatické uzliny, kosterní a srdeční svalovina) (Panciera a kol. 2000; Baneth a kol. 2003). Haemogregariny parazitující u plazů vykazují celkově spíše nízkou patogenitu, jakou je slabá zánětlivá reakce a anémie (Smith 1996, Telford a kol. 2002, 2004, Wozniak a kol. 1994, 1996).

1. 3. Rod *Haemogregarina*

Rod *Haemogregarina* zahrnuje intracelulární krevní Apicomplexa s heteroxenním vývojovým cyklem, s nižšími studenokrevnými obratlovci (plazi, ryby) jako mezihostiteli, a pijavkami figurujícími jako předpokládaný definitivní hostitel (Wilford 1977, Siddall a Dessler 1992). Většina zástupců rodu byla popsána ze sladkovodních želv (např. Acholonu 1974, Paterson a Dessler 1976, Siddall a Dessler 1992, Mihalca a kol. 2002, Telford a kol. 2009, Davis a Sterrett 2011, Dvořáková a kol. 2014, 2015, Soares a kol. 2014). Dosud není znám případ infekce u želv mořských (Soares a kol. 2014). Paraziti, dříve nalezení u savců, ptáků, ještěrek, hadů a krokodýlů, a popsání jako *Haemogregarina* (Khan a kol. 1980, Elwasila 1989), byli na základě rozdílů ve vývojových cyklech a morfologie oocyst přeřazeni Siddallem (1995) do rodu *Hepatozoon*.

1. 3. 1. Historie

Druhy haemogregarin byly tradičně charakterizovány a určovány na základě morfologie jednotlivých vývojových stádií, především gamontů a merontů v krevních buňkách želv (Desser 1993, Siddall 1995, Telford 2009). Sporogoniální stádia, vyskytující se v přenašečích, nebyla dosud detailně prostudována za účelem taxonomie. Životní cyklus rybích haemogregarin rovněž není dobře znám. Kromě předpokládaných vektorů – pijavek - se objevily i záznamy o přenosu parazita larvami krevsajících korýšů (Isopoda: *Gnathia africana*), infikujících mořské ryby. Takový případ přenosu popsali v roce 1976 Davies a Johnston u druhu *Haemogregarina bigemina*. Stádia *H. bigemina* byla nalezena v buňkách ryb i korýše, zda však tento systém parazit - vektor (korýš) - hostitel (ryba) tvoří komplexní vývojový cyklus, nebylo dosud jednoznačně potvrzeno (Davies a kol. 2004). Kompletní vývojový cyklus je znám pouze u několika zástupců (Reichenow 1910, Paterson a Desser 1976). Dřívější předpoklad vysoké hostitelské specifity těchto parazitů vedl často k popisu mnoha nových druhů, které byly s nástupem molekulárních dat zrušeny, či přerazeny do jiných rodů krevních kokcií (např. Dvořáková a kol. 2014). Smith (1996) označil zástupce rodu *Haemogregarina* za níže hostitelsky specifické.

Modelovým organismem rodu je *Haemogregarina stepanowi*, popsaná z evropské sladkovodní želvy *Emys orbicularis* a pijavek *Placobdella costata* Danilewskym v roce 1885. Kompletní průběh pohlavního i nepohlavního vývoje tohoto parazita u této želvy, a navíc také u pijavek *Placobdella catenigera* a *Haementeria costata*, jako první publikoval Reichenow (1910). Ball (1958) překvapivě našel schizogoniální stádia haemogregarin v plicních kapilárách vodního hada *Natrix piscator* (přenašeč pijavka *Hirudinaria granulosa*), a nový druh pojmenoval jako *Haemogregarina mirabilis*. V roce 1976 proběhla rozsáhlá studie dalšího nově objeveného druhu, *Haemogregarina balli*, u vodní želvy *Chelydra serpentina*. Gametocyty *H. balli* byly nalezeny v pijavkách *Placobdella ornata* a *P. parasitica*, nicméně mechanismus přenosu nebyl objasněn (Paterson a Desser 1976).

Haemogregarina mauritanica, původně popsaná ze suchozemských želv (Sergent a Sergent 1904), byla zprvu Michelelem (1973) na základě charakteristické merogonie a sporogonie přejmenována na *Hepatozoon mauritanicum*. V roce 1997 ji Landau a Paperna přeradili do rodu *Hemolivia*, což potvrdily i recentní molekulární analýzy (Kvičarová a kol. 2014).

Dva další druhy haemogregarin, *Haemogregarina fitzsimonsi* a *Haemogregarina parvula*, byly také popsány ze suchozemských želv (Dias 1953); to však bylo v posledních letech na základě znalostí vývojových cyklů rodu *Haemogregarina* zpochybněno (Cook a kol. 2009). Na základě klíčových znaků v morfologii, životním cyklu těchto dvou druhů, a následné fylogenetické analýzy sekvencí genu 18S rRNA byla *H. fitzsimonsi* přearžena do rodu *Hepatozoon* (Cook a kol. 2014), a *H. parvula* o rok později do rodu *Hemolivia* (Cook a kol. 2015).

V současné době je známo přibližně padesát zástupců rodu *Haemogregarina*, infikujících široké spektrum sladkovodních želv. Zatím však neexistuje žádná ucelená revize, která by se zabývala počtem a platností jednotlivých druhů tohoto rodu. Informací o definitivních hostitelích (vektorech) a průběhu vývoje, který se v nich odehrává, je rovněž jen velice málo.

1. 3. 2. Taxonomie

Pro rod *Haemogregarina* je charakteristická přítomnost konoidu u pohyblivých stádií - zoitů (skupina Conoidasida), syzygie gamontů (skupina Adeleorina) a heteroxenní životní cyklus (skupina Haemogregarinidae). Tito paraziti jsou řazeni do monofyletického kmene Apicomplexa (Barta 1989, Barta a kol. 1991, Adl a kol. 2005, 2012). Poslední taxonomická revize eukaryot (Adl a kol. 2012) klasifikuje rod následovně:

Super-group: Sar (Burki a kol. 2007)

- monofyletická skupina, název odvozen od skupin Stramenopila, Alveolata a Rhizaria.

Alveolata Cavalier-Smith, 1991

- skupina charakteristická přítomností kortikálních alveolů (sekundárně mohou chybět), a mitochondriemi s tubulárními nebo ampulovitými kristami.

Apicomplexa Levine, 1970; emend. Adl a kol. 2005

- zahrnuje obligátní parazity s přítomností apikálního komplexu u pohyblivých zoitů, a dále s přítomností apikoplastu a subpelikulárních alveol.

Conoidasida Levine, 1988

- zástupci s kompletním apikálním komplexem včetně konoidu; mikrogamety s ciliemi či bez nich; pohyb plachtěním (tzv. gliding); vývojové cykly heteroxenní i monoxenní.

Coccidia Leuckart, 1879

- intracelulární vývoj gamet, které vznikají syzygií gamontů; zygota zřídka pohyblivá, tvoří oocystu obsahující sporocystu.

Adeleorina Léger, 1911

- mikrogamonti tvoří jednu až čtyři mikrogamety, které procesem syzygie splývají s makrogametami.

Haemogregarinidae Neveu-Lemaire, 1901

- paraziti studenokrevných obratlovců (kteří v životním cyklu figurují jako mezihostitel), v jejichž krevních buňkách či tkáních probíhá merogonie; v bezobratlých (definitivních hostitelích) probíhá syzygie gamontů, vznik zygoty, a dále vznik monosporoblastické oocysty s 8 až 16 infekčními sporozoity.

Haemogregarina Danilewsky, 1885

- merogonie probíhá výhradně v erytrocytech sladkovodních želv, k pohlavnímu množení dochází v pijavce; oocysta obsahuje 8 sporozoitů.

1. 3. 3. Fylogenetické postavení

Dříve byly vztahy haemogregarin posuzovány na základě morfologie či hostitelské specifity. S objevem nového mezihostitele (obratlovce) a vývojových stádií v jeho krevních buňkách byl tak zpravidla spojen i popis nového druhu haemogregariny. K dispozici je poměrně velké množství především kusých informací, zejména z minulého století.

S nástupem molekulárních metod se začaly objevovat pokusy o reklasifikaci haemogregarin, nicméně stále není k dispozici dostatek dat pro rozsáhlejší fylogenetické analýzy, které by jednoznačně vyvrátily, nebo naopak potvrdily dosavadní členění (založené především na spektrech hostitelů).

Doposud byly fylogenetické studie haemogregarin sensu lato založeny výhradně na analýzách genu pro malou ribosomální podjednotku 18S rRNA (např. Barta a kol. 2012, Dvořáková a kol. 2014, 2015). Výjimku tvoří rod *Hepatozoon* s kompletně osekvenovaným mitochondriálním genomem (Leveille a kol. 2014), a několika sekvencemi vnitřního přepisovaného mezerníku (internal transcribed spacer, ITS1) (Boulianne a kol. 2007). Pro některé rody (*Cyrtia*, *Desseria*) molekulární data zcela chybí, pro jiné (*Karyolysus*) jsou sekvence jen velice krátké a nelze je použít pro robustní a věrohodné analýzy. Fylogenetické analýzy založené na sekvencích genu 18S rRNA nenesou dostatečnou informaci pro interpretaci vnitrodruhových vztahů, ani pro analýzu populační struktury parazitů. K lepšímu objasnění těchto vztahů slouží multigenové analýzy, například kombinace často používaných jaderných a mitochondriálních markerů.

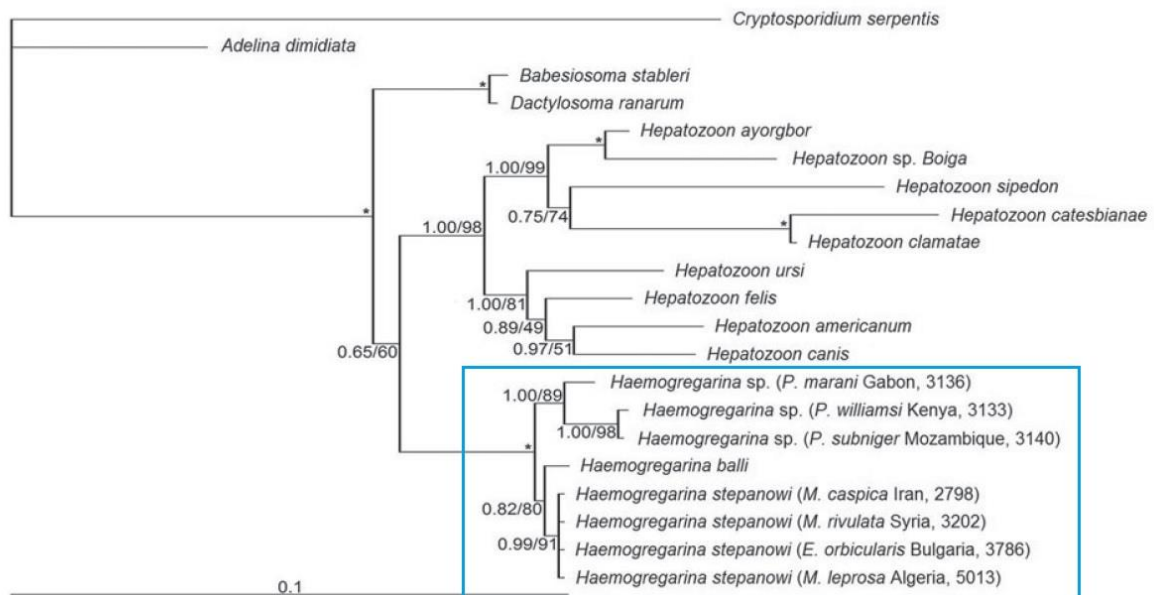
Molekulární analýzy za účelem zařadit rod *Haemogregarina* (sensu stricto) v rámci skupiny Adeleorina potvrdily jeho zařazení mezi haemogregariny sensu lato (viz kapitola 1. 2.) a do čeledi Haemogregarinidae (Siddall 1995, Barta 2000, Barta a kol. 2012, Davies a Smit 2001).

Barta a kol. (2012) použili sekvenci 18S rDNA haemogregariny (konkrétně *H. balli*) k analýze fylogenetických vztahů kokcií skupiny Adeleorina v rámci kmene Apicomplexa. Analýzy prokázaly monofylii skupiny Adeleorina, a její jednotlivé čeledi vytvořily zřetelně oddělené klastry.

18S rDNA sekvence *H. balli* byla od roku 2012 jediným dostupným exemplářem daného rodu v genové databázi. V roce 2014 získali Dvořáková a kol. několik dalších sekvencí *H. stepanowi* ze čtyř druhů želv a 3 sekvence *Haemogregarina* spp. z želv rodu

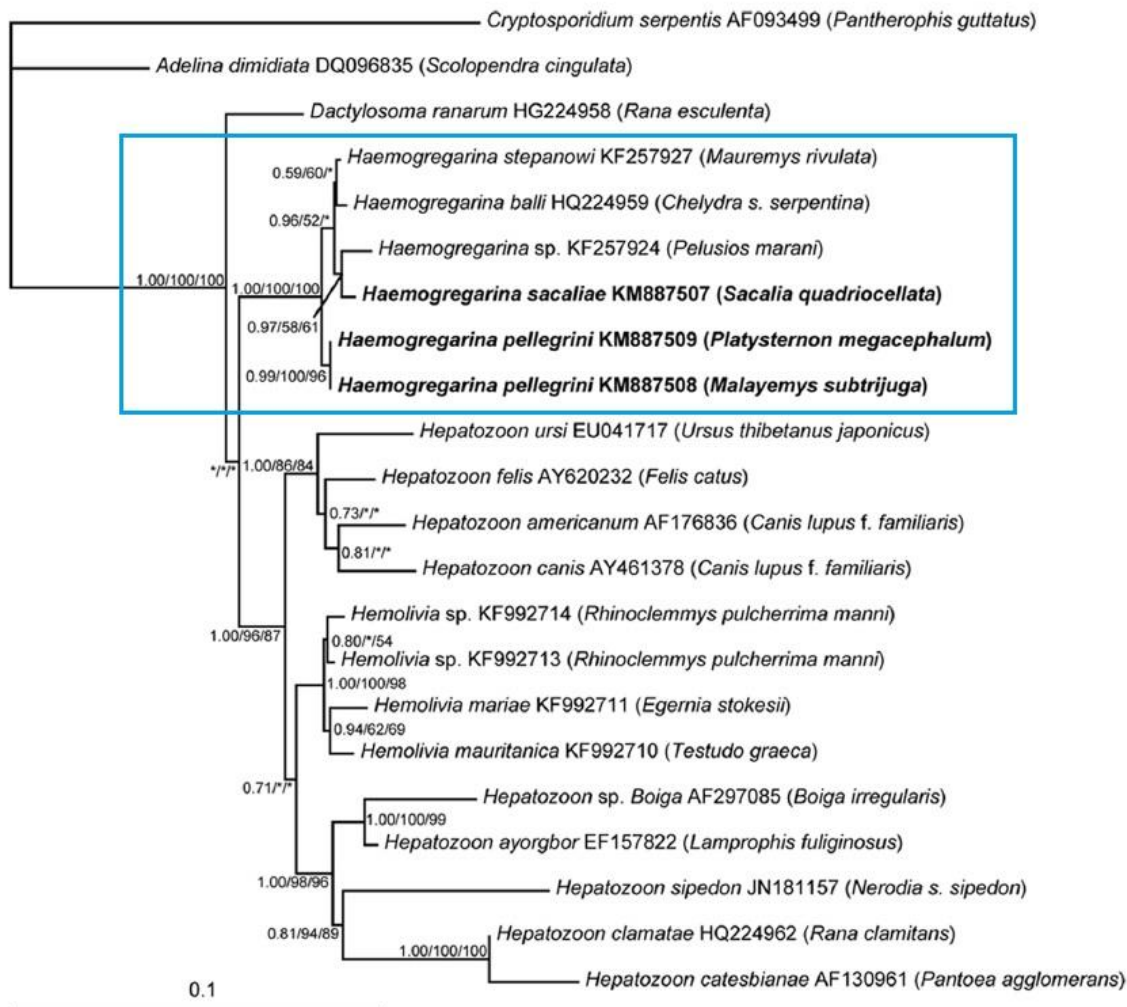
Pelusios, a mohli tak porovnat jejich vzájemnou genetickou příbuznost a fylogenetické vztahy. Analyzované sekvence prokázaly monofylii rodu *Haemogregarina*; sesterskou skupinu tvořil rod *Hepatozoon* (Obr. 1.).

Cook a kol. (2014) využili sekvence z této studie za účelem reklasifikovat zástupce nalezeného u suchozemských želv, *H. fitsimonsi*. Analýzy metodami Maximum likelihood a Maximum parsimony opět potvrdily monofylii rodu *Haemogregarina*. *H. fitsimonsi* byla překlasifikována do rodu *Hepatozoon*, tato pozice byla podpořena vysokými hodnotami bootstrapu.



Obr. 1. Fylogenetický strom získaný BI analýzou genu 18S rRNA, znázorňující pozici *Haemogregarina* spp. v rámci haemogregarin sensu lato (Dvořáková a kol. 2014).

Následující rok obohatili Dvořáková a kol. (2015) dataset o další 3 zástupce, dva geneticky identické *H. pellegrini* a nově popsany druh *H. sacaliae*. Analýzy prokázaly stejnou topologii haemogregarin sensu lato, a nově analyzované druhy se zařadily mezi taxony rodu *Haemogregarina* (Obr. 2.).



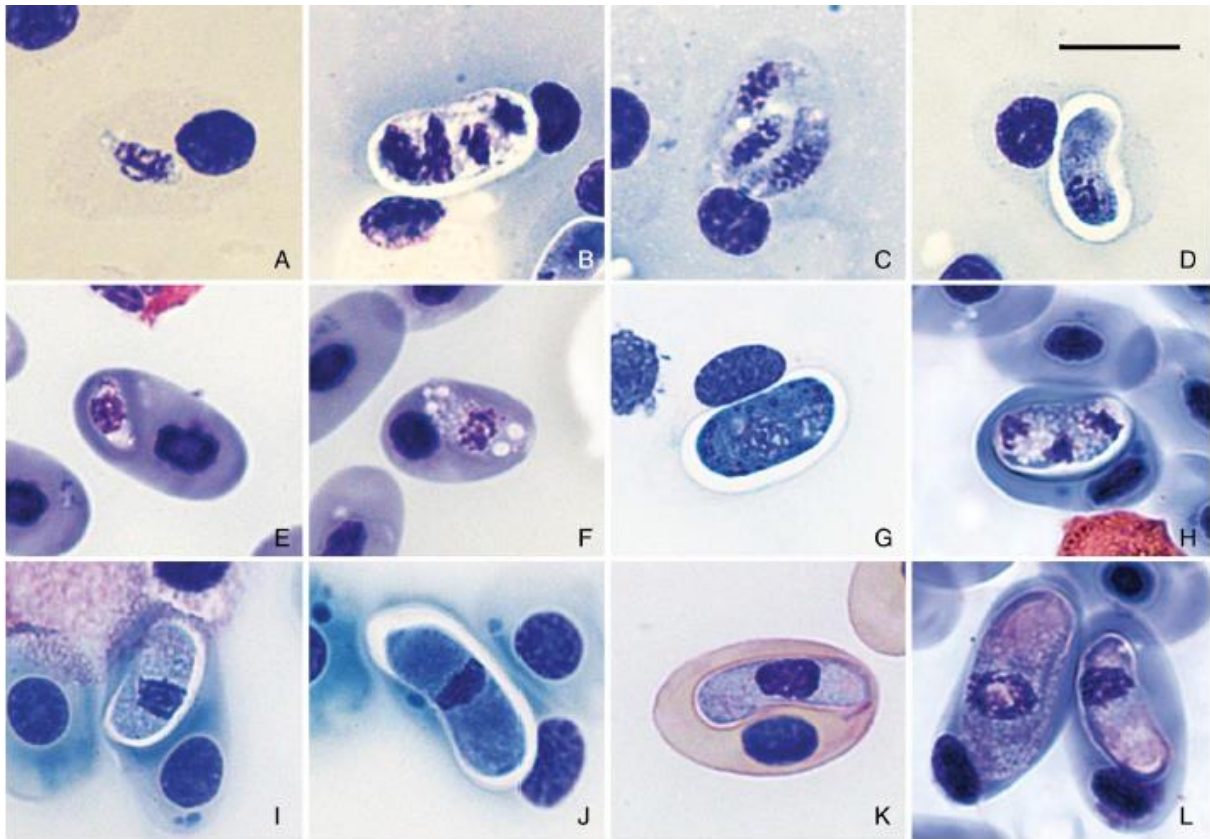
Obr. 2. Fylogenetický strom získaný BI analýzou sekvencí 18S rDNA, znázorňující fylogenetické vztahy zástupců rodu *Haemogregarina* (Dvořáková a kol. 2015; upraveno).

Pro zástupce rodu *Haemogregarina*, kteří infikují africké želvy rodu *Pelusios*, jsou dnes v databázi GenBank dostupné pouze 3 sekvence 18S rDNA (Dvořáková a kol. 2014, Obr. 1.). Od původní monografie o druhu *Haemogregarina pelusiensi* (Pienaar 1962) přibylo jen několik málo popisů dalších druhů ze stejného želvího mezihostitele.

1. 3. 4. Vývojový cyklus a mechanismy přenosu

Životní cyklus rodu *Haemogregarina* zahrnuje gamogonii a sporogonii v definitivním hostiteli (bezobratlém), a erytrocytární a extra-erytrocytární merogonii v mezihostiteli (obratlovci) (Desser 1993, Siddall 1995).

Obecně vývoj haemogregarin infikujících sladkovodní želvy začíná v pijavce (definitivním hostiteli), v jejímž zadním střevě se z natrávené krve uvolňují gamonti. Makrogamonti a mikrogamonti ve střevním epitelu produkují makrogametu a čtyři nepohyblivé mikrogamety; jejich spojením (syzygií) vzniká zygota. V buňkách střevního epitelu se zygota mění v monosporoblastickou oocystu s osmi sporozoity, kteří penetrují střevní stěnu, následně migrují krevním oběhem a mění se na meronty se stovkami infekčních merozoitů (Siddall 1995). Ti míří do slinných žláz pijavky. Při sání na mezihostiteli (želvě) se merozoiti dostávají do krevního řečiště želvy a mění se v trofozoity (Reichenow 1910). Vývoj pokračuje formováním pre-erytrocytárních merontů ve vnitřních orgánech želvy (především v játrech, slezině a plicích). Dělením merontů vznikají pohybliví merozoiti infikující červené krvinky za vzniku parazitoformní vakuoly, v níž se tvoří stádium premeronta. Dalším merogoniálním dělením hostitelská buňka praská, nová generace merozoitů opakovaně napadá další krvinky a znovu se mění na meronty, nebo již přímo na gamonty, a celý cyklus se tak může opakovat (Reichenow 1910, Desser 1993) (Obr. 3.).



Obr. 3. Mikrofotografie vývojových stádií *Haemogregarina sacaliae* v erythrocytech želvy *Malayemys subtrijuga* (A-D), a *Haemogregarina pellegrini* (E-J, L) v erythrocytech *Malayemys subtrijuga* a *Platysternon megacephalum* (K) pro srovnání (měřítko 10 μ m u všech snímků; převzato z Dvořáková a kol. 2015, upraveno).

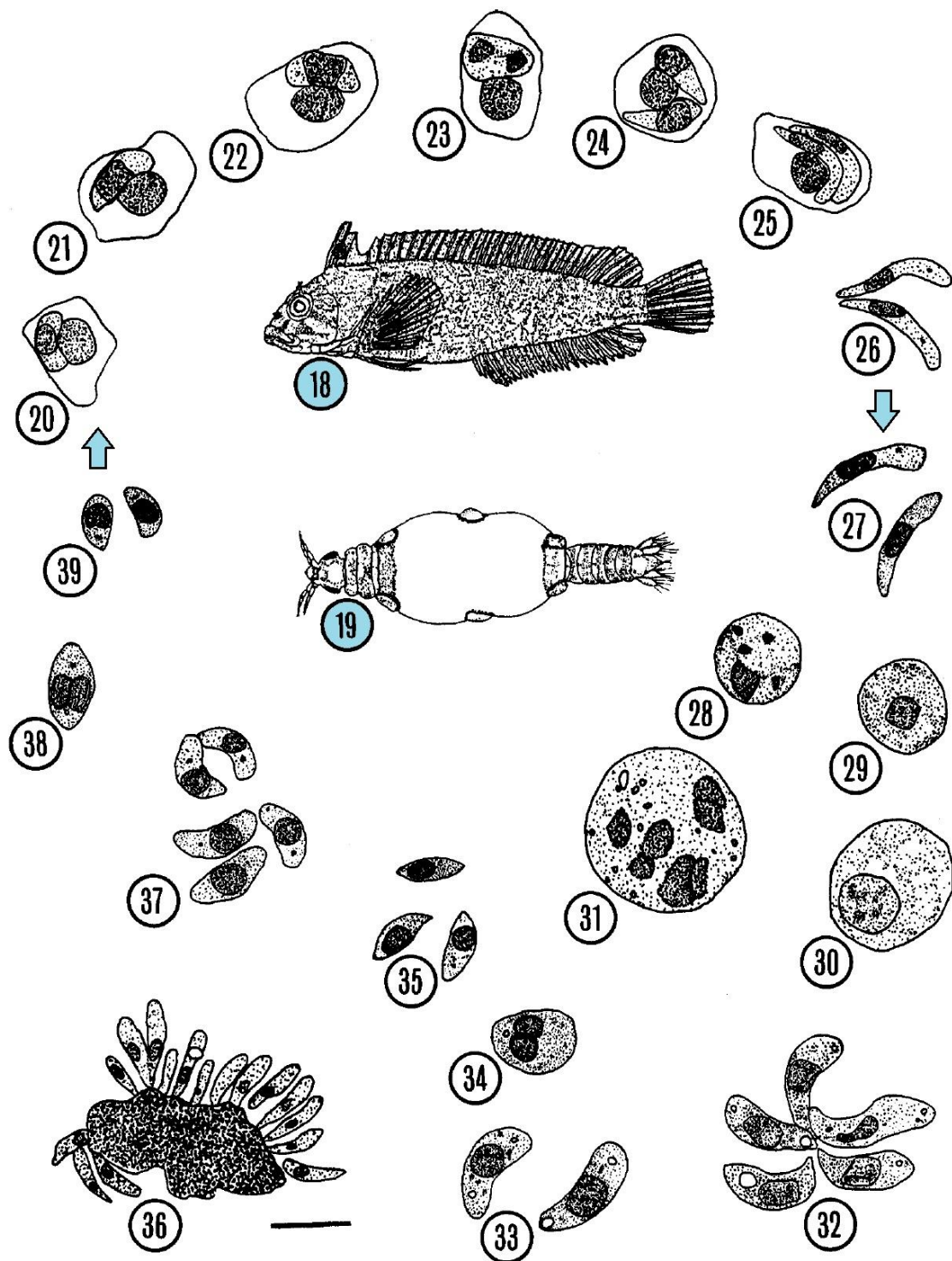
- A trofozoit
- B meront
- C vznikající merozoiti
- D gamont
- E trofozoit
- F premeront
- G raný meront
- H meront
- I mikrogamont
- J makrogamont (*M. subtrijuga*)
- K makrogamont (*P. megacephalum*)
- L mikrogamont a makrogamont (*M. subtrijuga*)

Široké spektrum sladkovodních želv, geograficky rozšířených po celém světě, může sloužit jako mezihostitelé parazitů rodu *Haemogregarina* (Telford 2009). Nejčastějšími ektoparazity sladkovodních želv jsou pijavky. Jejich prevalence na hostiteli závisí na několika faktorech, jako je například velikost želvy, pohlaví želvy, nebo její reprodukční období (Brooks a kol. 1990, Tucker a kol. 2005, McCoy a kol. 2007, Davis a Sterret 2011). Některé pijavky preferují sání na měkkých tkáních, některé se dokáží přisát i na krunýř (Siddall a Gaffney 2004). Pijavky, které figurují v cyklu parazit-vektor-hostitel jako přenašeči infekčních stádií rodu *Haemogregarina*, jsou zástupci rodů *Placobdella* (Danilewsky 1885, Paterson a Desser 1976, Telford a kol. 2009) *Glossiphonia* (Robertson 1908), *Helobdella* (Ray a Bhattacharjee 1984), *Haementeria* (Reichenow 1910) (Annelida: Rhynchobdellida: Glossiphoniidae), *Mooretorix* (Chai a Chen 1990), a *Ozobranchus* (Annelida: Rhynchobdellida: Ozobranchidae) (Chai a Chen 1990).

Komplexní vývojový cyklus zahrnující vodní želvu jako mezihostitele a pijavku jako vektora (definitivního hostitele) byl popsán pouze u dvou zástupců rodu *Haemogregarina*. Modelový organismus *H. stepanowi* je na želvu *Emys orbicularis* (Cryptodira: Testudinoidea: Emydidae) přenášen pijavkou *Placobdella costata* (Danilewsky 1885). U stejné želvy byly jako vektorů *H. stepanowi* potvrzeny též pijavky *Placobdella catenigera* a *Haementeria costata* (Reichenow 1910). Druhy *Placobdella ornata* a *Placobdella parasitica* byly popsány jako přenašeči *H. stepanowi* a *H. balli* (Paterson a Desser 1976). *H. balli* je navíc schopna infikovat i želvy rodů *Chelydra* (Cryptodira: Testudinoidea: Chelydridae), *Chrysemys* (Cryptodira: Testudinoidea: Deirochelyinae) a *Clemmys* (Cryptodira: Testudinoidea: Emydidae) (Paterson a Desser 1976, Desser 1993, Siddall a Desser 2001).

Existuje však i odlišný systém, nezahrnující běžné hostitele; *Haemogregarina bigemina* byla pozorována u mořských ryb a larev korýše *Gnathia africana* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae). Larvy korýše sají obvykle třikrát, přičemž při každém sání nejprve nabývají na objemu, nasycené opustí hostitele a poté se znovu přichytí (Smit a kol. 2003), jsou tedy schopny nasávat vývojová stádia *H. bigemina* z infikovaných ryb. Tito stejnonožci jsou hojně rozšířeni v mořském prostředí a stávají se i potenciální potravou ryb, což představuje další z možných způsobů přenosu (Davies a Johnston 1976, Davies a Smit 2001, Davies a kol. 2004). Důkaz, že *H. bigemina* je schopna prodělat vývoj v larvách stejnonožců *G. africana*, podali při studiu ryby *Lipophrys pholis* Davies a Johnston (1976). Další případ takové infekce byl experimentálně potvrzen u ryby *Clinus superciliosus* (Davies a Smit 2001).

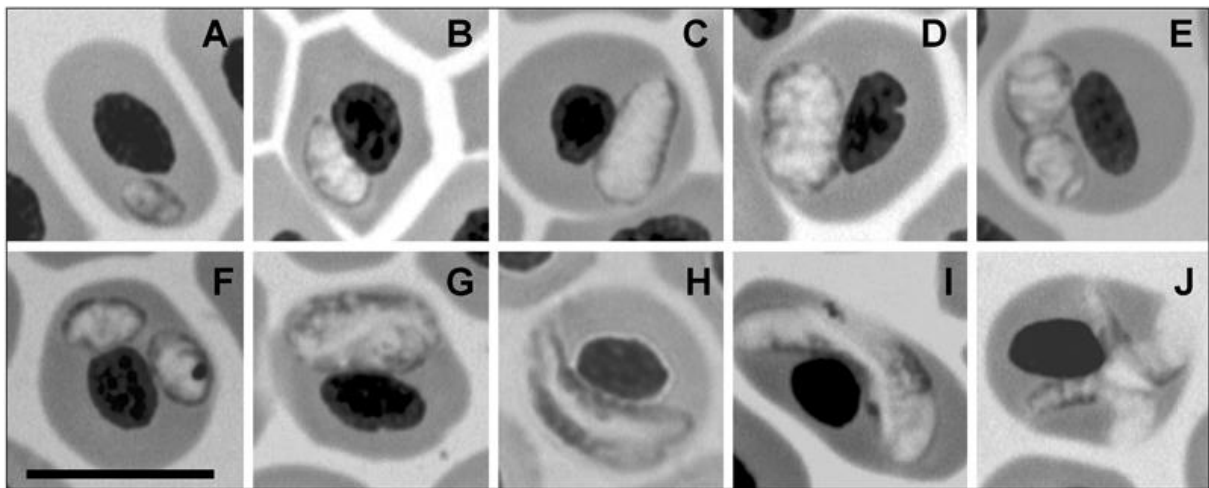
Larvy *G. africana* obsahovaly po zhruba měsíčním krmení stádia syzygie, nezralé i zralé oocysty (obsahující většinou pět sporozoitů), a nejméně tři typy merozoitů. První generace merozoitů byla málo početná, vzniklá ze zaoblených merontů. Druhá generace formovala velké klastry ve střevní tkáni. Binárním štěpením merontů druhé generace vznikala třetí generace merozoitů. Vývoj *H. bigemina* v členovci vykazuje určitou podobnost s parazity rodů *Hemolivia*, *Hepatozoon* a *Karyolysus*, nicméně se liší absencí sporokinet a sporocyst. Počet produkovaných sporozoitů a existence binárního štěpení merontů v rámci erytrocytu odlišuje *H. bigemina* také od ostatních, typicky rybích haemogregarin (sensu lato) – rodů *Desseria* a *Cyrlia*. Tento mechanismus přenosu nese navzdory opakovaným studiím mnoho pochybností, především ohledně přesné lokalizace *H. bigemina* v definitivním hostiteli (stejnonožci). Do budoucna tedy zůstává otázkou, zda se merozoiti parazita dokáží usadit ve slinných žlázách korýše (Davies a kol. 2004). Obrázky znázorňují předpokládané schéma cyklu (Obr. 4.) a vývojová stádia v erytrocytech ryb (Obr. 5.).



Obr. 4. Ilustrace životního cyklu *H. bigemina* (převzato z Davies a Smit 2001; upraveno).

18 Mezihostitel, *C. superciliosus*; **19** Definitivní hostitel, larva korýše *G. africana*; **20-39** Ilustrace vývojových stádií *H. bigemina* (měřítko = 10 μ m pro všechny obrázky); **20-26** Stádia v periferní krvi *C. superciliosus*; **27-39** Stádia v *G. africana* (šipky označují přenos *H. bigemina* z jednoho hostitele na druhého); **20** Trofozoit v erytrocytu; **21, 22** Meronti v erytrocytu; **23** Binární dělení merontů; **24** Párování nezralých gamontů;

25 Párování zralých gamontů; 26 Spárování gamonti opouštějí hostitelský erytrocyt; 27 Volní gamonti; 28 Syzygie (makrogamont a připojený mikrogamont se třemi odlišnými jádry mikrogamet); 29, 30 Nezralé oocysty v různých stádiích vývoje; 31 Zrající oocysta; 32 Sporogonie – formace pěti sporozoitů; 33 Volní, zralí sporozoiti; 34 Dělení první generace merontů; 35 První generace merozoitů; 36 Druhá generace merontů a vznik užších, nezralých merozoitů; 37 Zralí merozoiti druhé generace; 38 Dělení třetí generace merontů; 39 Třetí generace merozoitů.



Obr. 5. Erythrocyty ryby *L. pholis* obsahující vývojová stádia *H. bigemina*, Giemsovo barvení (měřítko = 10 μ m u všech snímků; převzato z Davies a kol. 2004; upraveno).

- A Trofozoit
- B, C Meronti
- D - F Binární štěpení merontů - transverzální
- G - I Binární štěpení merontů - longitudinální
- J Zralí, párující se gamonti

1.3.5. Morfologie vývojových stádií

V krevních nátěrech vodních želv lze pozorovat extra- i intraerytrocytární stádia parazitů rodu *Haemogregarina*. Morfologické charakteristiky a postupy měření jednotlivých stádií parazita i hostitelského erytrocytu se v literatuře často liší. Následující popis sleduje metodiku podle Telforda (2009).

V erythrocytech mezihostitele (vodní želvy) lze detekovat tato vývojová stádia haemogregarin: trofozoity, premeronty, meronty, merozoity a gamonty. Trofozoit vzniká ze sporozoitů, inokulovaných do želv infekční pijavkou, bývá malých rozměrů a nachází se většinou v polární části erythrocytu. Pokud je viditelné jádro, leží centrálně, a cytoplasma zoita obsahuje četné vakuoly a granula. V následném premerontu vakuoly zanikají a centrálně uložené jádro se začíná dělit. Erythrocytární meronti nabývají na velikosti a obsahují různý počet menších jader (v závislosti na rodu až druhu hostitele). Z jader merontů se formují pohybliví merozoiti, infikující další erythrocyty za vzniku dalších merontů, či gamontů. Časní gamonti leží v erythrocytu stočení do dvou „ramen“, jejichž splynutím vzniká pozdní forma gamonta, obecně kratší a širší, s centrálně uloženým jádrem. V některých případech lze podle tvaru a rozměrů odlišit samčí mikrogamonty a samičí makrogamonty.

Při morfologické analýze je sledována maximální délka (L) a maximální šířka (W) parazita v erythrocytu, a max. délka (L_n) a max. šířka (W_n) jeho jádra v mikrometrech (μm) a jeho poloha, pokud je vytvořeno. U gamontů je často počítána hodnota LW (max. délka \times max. šířka v μm^2) a L_nW_n (délka jádra \times šířka jádra v μm^2), a tzv. shape index, tedy poměr L/W (max. délka/max. šířka). Při měření parazitů či jader nepravidelných tvarů se používá lomená čára. Z naměřených hodnot délek a šířek parazitů, jader u všech stádií, a hodnot LW, L_nW_n a L/W u gamontů se vypočítává aritmetický průměr a směrodatná odchylka, která určuje míru variability rozměrů jednotlivých stádií.

Kromě rozměrů bývá sledován tvar a zakřivení parazita v erythrocytu, tvar, barva, a poloha jádra, (u merontů i počet jader), přítomnost vakuol či granulí v cytoplasmě parazita.

U erythrocytů, infikovaných rodem *Haemogregarina* pozorujeme kromě rozměrů (podobně jako u parazitů) polohu jejich jádra, které je často vytlačováno na okraj buňky laterálním, či polárním směrem. Tvar buňky i jejího jádra se vlivem infekce obvykle mění.

Napadené erythrocyty a jejich jádra bývají větší (delší nebo širší než zdravý erythrocyt), často mají deformovaný tvar nebo zcela lyzují.

1. 4. Vodní želvy rodu *Pelusios*

Želvy (Reptilia: Testudines) jsou plazi s unikátní morfologií, jejichž evoluční historie se datuje do doby triasu (Li a kol. 2008, Reisz a Head 2008). Více než 300 druhů, rozšířených po celém světě, je rozděleno podle způsobu zatahování krku do krunýře do dvou podřádů - skrytohrdlých (Cryptodira) a skrytohlavých (Pleurodira). Během posledního desetiletí byly intenzivně studovány genealogické vztahy želv, díky čemuž želvy představují vhodný model pro studium koevoluce s jejich častými parazity rodu *Haemogregarina* (Fritz a Havaš 2007, Vargas-Ramírez a kol. 2010, Mikulíček a kol. 2013, Fritz a Havaš 2013).

1. 4. 1. Systematické zařazení, fylogenetické vztahy, rozšíření a ekologie

V současné době je známo 317 druhů želv (mořských, sladkovodních i suchozemských), řazených do 96 rodů a 15 čeledí. Recentní taxonomie (Fritz a Havaš 2013) vypadá následovně:

Řád **Testudines** Batsch, 1788

Podřád **Cryptodira** Cope, 1868

12 čeledí:

Carettochelyidae Boulenger, 1887

Cheloniidae Opper, 1811

Chelydridae Gray, 1831

Dermatemydidae Gray, 1870

Dermochelyidae Fitzinger, 1843

Emydidae Rafinesque, 1815

Geoemydidae Theobald, 1868

Kinosternidae Agassiz, 1857

Platysternidae Gray, 1869

Staurotypidae Gray, 1869

Testudinidae Batsch, 1788

Trionychidae Gray, 1825

Podřád **Pleurodira** Cope, 1864

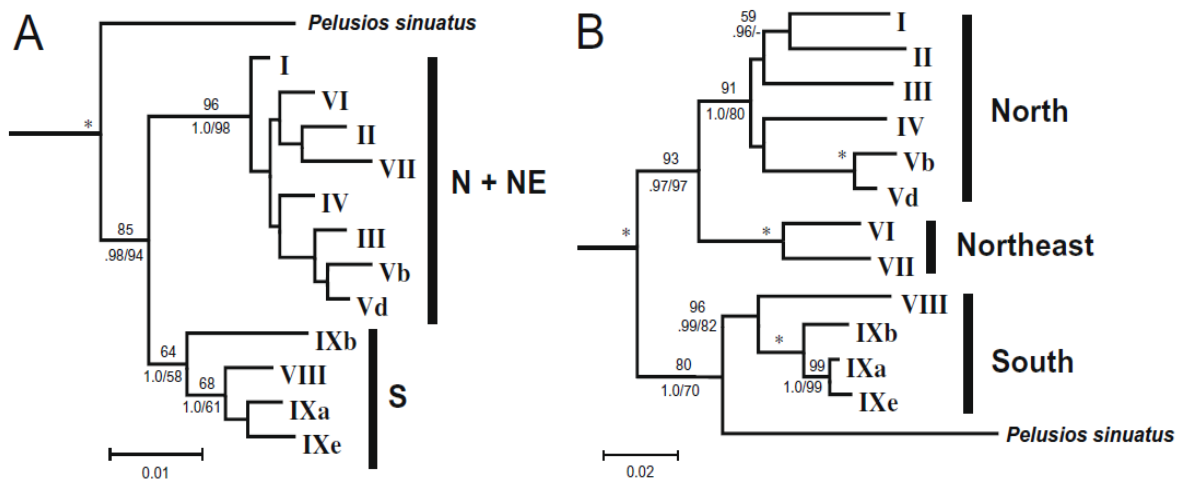
3 čeledi:

Chelidae Gray, 1825

Pelomedusidae Cope, 1868

Podocnemididae Cope, 1868

Želvy rodu *Pelusios* tvoří spolu s výhradně africkým rodem *Pelomedusa* čeleď Pelomedusidae, která je sesterská k čeledi Podocnemididae - želvám z Jižní Ameriky a Madagaskaru (Fritz a kol. 2011). Fylogenetické analýzy prokázaly, že rod *Pelomedusa* může být parafyletický nebo monofyletický, v závislosti na typu použité analýzy (Vargas-Ramirez a kol. 2010) (Obr. 6). V těchto analýzách byl zastoupen jediný druh rodu *Pelusios*, *P. sinuatus*.



Obr. 6. Topologie získané metodou BI. Obrázek A znázorňuje monofylii rodu *Pelomedusa* prokázanou na základě analýz genu 18S rRNA, obrázek B jeho parafylii na základě analýz několika mitochondriálních genů.

Nedávná studie Kindler a kol. (2016) se zabývala fylogeografií šesti druhů želv rodu *Pelusios*, obývajících různá prostředí a majících různou distribuci. Na základě analýz mitochondriálních i jaderných genů autoři prokázali vysoce podpořené monofylie každého z analyzovaných druhů. Korelace mezi fylogeografickou strukturou a typem habitatu prokázána nebyla.

Podle recentní taxonomie zahrnuje rod *Pelusios* 17 popsáných druhů (Stuckas a kol. 2013), vyskytujících se v celé subsaharské Africe, a na ostrovech Madagaskaru, Seychelách a São Tomé. Jeden pravděpodobně importovaný druh (*Pelusios castaneus*) se navíc objevuje i na ostrově Guadeloupe v Malých Antilách (Fritz a Havaš 2007). Dříve uznávaný osmnáctý druh, *P. seychellensis*, se ukázal být synonymem druhu *P. castaneus*, což potvrdila i molekulární analýza muzejního lektotypu *P. seychellensis*, která jej zařadila do společného taxonu s *P. castaneus* (Stuckas a kol. 2013).

Všechny druhy pelusí obývají nejrůznější sladkovodní prostředí - tekoucí, stojaté i dočasné vodní toky, od uzavřených deštných pralesů po rozsáhlé savany. Nejčastěji jsou tyto želvy nalézány v jezerech, močálech a bažinách, někteří zástupci se mohou vyskytovat v brakických vodách. V období sucha se zavrtávají do bláta či vlhké půdy (Fritz a kol. 2011).

Velikost většiny zástupců se pohybuje mezi 20 až 30 centimetry, přičemž nejmenší, *Pelusios nanus*, dosahuje pouhých 12 centimetrů a největší, *Pelusios sinuatus*, může měřit až 46 centimetrů. Morfologická zvláštnost, díky které nesou pelusie svůj název, je pohyblivý přední lalok plastronu. Kloubní závěs mezi hypoplastronem a mesoplastronem umožňuje více či méně uzavřít přední část krunýře. Tento závěs je dobře vyvinutý u téměř všech druhů, výjimku tvoří *Pelusios broadleyi* s poměrně pevným plastronem. Rod *Pelomedusa* má plastron zcela pevný, bez jakékoli stopy závěsu (Bramble a Hutchison 1981, Boycott a Bourquin 2008, Branch 2008, Fritz a kol. 2011). Tabulka č. I shrnuje všech 17 dosud popsáných druhů pelusí.

Tab. I. Zástupci rodu *Pelusios*, autoři popisu a dosud známé geografické rozšíření (Fritz a Havaš 2007; upraveno na základě změn v Stuckas a kol. 2013).

Druh	Geografické rozšíření
<i>P. adansonii</i> Schweigger, 1812	Centrální Afrika - Senegal až Súdán
<i>P. bechuanicus</i> FitzSimons, 1932	Angola, Botswana, Zambie, Zimbabwe
<i>P. broadleyi</i> Bour, 1986	jihovýchodní pobřeží jezera Turkana (Keňa)
<i>P. carinatus</i> Laurent, 1956	Demokratická republika Kongo, Gabon
<i>P. castaneus</i> Schweigger, 1812	Angola, Saõ Tomé, Senegal
<i>P. castanoides</i> Hewitt, 1931	introdukovaný v Malých Antilách
<i>P. chapini</i> Laurent, 1965	Jihoafrická republika, Keňa, Madagaskar, Seychely
<i>P. cupulatta</i> Bour a Maran, 2003	Demokratická republika Kongo, Gabon, Uganda
<i>P. gabonensis</i> Duméril, 1856	Ghana, Libérie, Pobřeží slonoviny
<i>P. marani</i> Bour, 2000	Angola, Libérie, Tanzanie
<i>P. nanus</i> Laurent, 1956	Gabon
<i>P. niger</i> Duméril a Bibron, 1835	Angola, Demokratická republika Kongo, Zambie
<i>P. rhodesianus</i> Hewitt, 1927	Sierra Leone až Gabon
<i>P. seychellensis</i> Siebenrock, 1906	Angola, Demokratická republika Kongo, Jihoafrická republika Uganda
<i>P. sinuatus</i> Smith, 1838	Botswana, Etiopie, Jihoafrická republika, Somálsko
<i>P. subniger</i> Lacépède, 1789	Botswana, Burundi, Jihoafrická republika, Madagaskar, Mauricius, Seychely, Tanzanie
<i>P. upembae</i> Broadley, 1981	Demokratická republika Kongo
<i>P. williamsi</i> Laurent, 1965	Viktoriino jezero v Ugandě, Keni a Tanzanii, jezero Edward a Albert v Demokratické republice Kongo a Ugandě

Jednotlivé druhy želv rodu *Pelusios* mohou být rozděleny do dvou skupin na základě rozdílů v morfologii krunýře. Skupina "*adansonii*" (také známá jako "*gabonensis*" nebo "*adansonii-gabonensis*") zahrnuje *P. adansonii*, *P. broadleyi*, *P. gabonensis*, *P. marani* a *P. nanus*. Druhy této skupiny se vyznačují krátkými břišními štítky oproti podlouhlému přednímu laloku plastronu, a krátkým můstkem, oddělujícím krunýř a plastron. Všechny zbývající druhy jsou charakterizovány relativně dlouhými břišními štítky a delším můstkem, a jsou označovány jako skupina "*subniger*". Druhy skupiny "*subniger*" vykazují ve srovnání se skupinou "*adansonii*" větší pohyblivost předního laloku plastronu (Fritz a kol. 2011).

1. 4. 2. Krevní paraziti želv

Želvy mohou být infikovány širokým spektrem jednobuněčných parazitů. Z krevních parazitů jsou to především haemogregariny sensu lato (*Haemogregarina*, *Hemolivia*), rod *Haemoproteus* (Apicomplexa: Aconoidasida: Haemospororida) a rod *Trypanosoma* (Euglenozoa: Kinetoplastida: Trypanosomatidae) (Telford 2009).

Hemolivia a *Haemoproteus* jsou častými parazity želv rodu *Testudo* (Cryptodira: Testudinidae), a sdílí i stejného definitivního hostitele a zároveň vektora, klíště *Hyalomma aegyptium*. Zatímco rod *Hemolivia* byl dosud prokázán pouze v krvi suchozemských želv *T. graeca* a *T. marginata*, rod *Haemoproteus* se běžně vyskytuje u mnoha jiných suchozemských i vodních želv a jejich ektoparazitů (Široký a kol. 2005, 2007, Cook a kol. 2014).

Trypanosoma a *Haemogregarina* se vyskytují u želv rodu *Pelusios*. V tomto případě jsou společným definitivním hostitelem pijavky (Ray a Bhattacharjee 1984, Chai a Chen 1990, Siddall a Desser 1992, Telford a kol. 2009). Koinfekce obou parazitů v jednom meziphostiteli – želvě - byla rovněž zaznamenána (Robertson 1908, Johnston a Cleland 1912, Paperna 1989).

Údaje o patogenitě haemogregarin sensu lato u želv jsou poměrně vzácné. Nejvýraznější jsou morfologické změny týkající se hostitelských buněk (deformace erytrocytů a leukocytů, zvýšení počtu lymfocytů či snížení počtu eozinofilů) (Jacobson 2007). I přes vysokou míru parazitémie bývá patogenita popisována jako nízká, reprezentovaná zejména anémií a imunosupresí, nebo mírnými patologickými změnami na vnitřních orgánech (nejčastěji játrech a ledvinách) (Telford 1984, 2009, Široký a kol. 2007, Halla a kol. 2014). V nepřirozeném meziphostiteli mohou haemogregariny sensu lato způsobovat klinicky významná zánětlivá onemocnění (Wozniak a kol. 1994, 1996, Maia a kol. 2011). Nedávná studie (Özvegy a kol. 2015) popisuje dosud neznámé, závažné nekrózy krunýře a kožní hemoragie u želv *Emys orbicularis*, infikovaných druhem *Haemogregarina stepanowi*. Patogenní účinky parazitů rodu *Haemoproteus* a *Trypanosoma* nebyly u želv pozorovány, nebo jsou prakticky neznámé (Telford 1995, 2009).

2. Cíle práce

Cílem práce bylo studium nejčastěji se vyskytujících krevních parazitů u sladkovodních želv, parazitů rodu *Haemogregarina*, analýza jejich fylogenetických vztahů a snaha o druhovou determinaci, a tím rozšíření množství dostupných a relevantních informací o tomto opomíjeném a kontroverzním rodu parazita. K dispozici jsem měla unikátní a poměrně rozsáhlý soubor vzorků zahrnující několik druhů sladkovodních želv rodu *Pelusios* z několika afrických zemí.

Pro splnění cílů práce jsem použila metody klasické biologie (mikroskopie, morfologie, morfometrie) v kombinaci s molekulárními metodami a analýzami počítačovým softwarem.

K dosažení cílů práce bylo zvoleno několik dílčích kroků:

- Vyšetření krevních vzorků a krevních nátěrů želv rodu *Pelusios* na přítomnost krevních parazitů.
- Rekonstrukce fylogenetických vztahů krevních haemogregarin u želv rodu *Pelusios*, a vztahů v rámci ostatních parazitů rodu *Haemogregarina*.
- Objasnění fylogenetické pozice rodu *Haemogregarina* v rámci „haemogregarin sensu lato“.
- Snaha o určení vývojových stádií a o druhovou identifikaci nalezených haemogregarin konfrontací s popisy dostupnými v literatuře.
- Posouzení korelace mezi morfologickými znaky a fylogenezí, zhodnocení hostitelské specifity haemogregarin parazitujících u želv rodu *Pelusios*.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GA ČR P506/11/1738.

3. Materiál a Metodika

Následující pasáž o rozsahu devíti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

4. Výsledky

Následující pasáž o rozsahu třinácti stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

5. Diskuse

Následující pasáž o rozsahu sedmi stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

6. Závěr

Následující pasáž o rozsahu jedné atrany obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.

7. Použitá literatura

Acholonu AD, 1974: *Haemogregarina pseudemydis* n. sp. (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and *Pirhemocytion chelonarum* n. sp. in turtles from Louisiana. Journal of Protozoology 21: 659 - 664.

Adl SM, Alastair GB, Simpson B, Lane CHE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Gall LL, Lynn DH, McManus H, Mitchell EAD, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlovski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW, 2012: The revised classification of eukaryotes. Journal of Eukaryotic Microbiology 59: 429 - 493.

Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, Mccourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Stanridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF, 2005: The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. The Journal of Eukaryotic Microbiology 52: 399 - 451.

Altay K, Aydin MF, Dumanli N, Aktas M, 2008: Molecular detection of *Theileria* and *Babesia* infections in cattle. Veterinary Parasitology 158: 295 - 301.

Ball GH, 1958: A haemogregarine from a water Snake, *Natrix piscator* taken in the Vicinity of Bombay, India. The Journal of Eucaryotic Microbiology 5: 274 - 281.

Baneth J, Mathew JS, Shkap V, Macintire DK, Barta JR, Ewing SA, 2003: Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. Trends in Parasitology 19: 27 - 31.

Barta JR, 1989: Phylogenetic analysis of the class Sporozoa (phylum Apicomplexa Levine, 1970): evidence for independent evolution of heteroxenous life cycles. *Journal of Parasitology* 75: 198 - 206.

Barta JR, 2000: Suborder Adeleorina Léger, 1911. In: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (Eds): *An illustrated guide to the Protozoa. Second Edition, vol. 1. Society of Protozoologists. Lawrence, Kansas. pp. 305 - 318.*

Barta JR, Jenkins MC, Danforth HD, 1991: Evolutionary relationships of avian *Eimeria* species among other apicomplexan protozoa: monophyly of the Apicomplexa is supported. *Molecular Biology and Evolution* 8: 345 - 355.

Barta JR, Martin DS, Liberator PA, Dashkevicz M, Anderson JW, Feighner SD, Perkins-Barrow A, Jenkins MC, Danforth HD, Ruff MD, Profous-Juchelka H, 1997: Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *The Journal of Parasitology* 83: 262 - 271.

Barta JR, Ogedengbe JD, Martin DS, Smith TG, 2012: Phylogenetic position of the adeleorinid coccidian (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidea, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59: 171 - 180.

Boulard Y, Paperna I, Petit G, Landau I, 2001: Ultrastructure of developmental stages of the haemogregarine *Hemolivia stellata* in the cane toad *Bufo marinus* and its vector tick *Amblyomma rotundatum*. *Parasitology Research* 87: 598 - 604.

Boulianne B, Evans RC, Smith TG, 2007: Phylogenetic analysis of *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Adeleorina) infecting frogs of Nova Scotia, Canada, determined by ITS-1 sequences. *Journal of Parasitology* 93: 1435 – 1441.

Boycott RC, Bourquin O, 2008: *Pelomedusa subrufa* (Lace'pe`de 1788), helmeted turtle, helmeted terrapin. In: Rhodin AGJ, Pritchard PCH, van Dijk PP, Saumure RA, Buhlmann

KA, Iverson JB (Eds.) Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: A Compilation Project of the IUCN/SSC Tortoise and Freshwater Turtle Specialist Group (pp. 007.1 - 007.6). Lunenburg, MA: Chelonian Research Foundation (Chelonian Research Monographs No. 5).

Bramble DM, Hutchison JH, 1981: A reevaluation of plastral kinesis in African turtles of the genus *Pelusios*. *Herpetologica* 37: 205 - 212.

Branch B, 2008: Tortoises, terrapins and turtles of Africa. Cape Town, South Africa: Struik, 128 pp.

Brooks RJ, Galbraith DA, Layfield JA, 1990: Occurrence of *Placobdella parasitica* (Hirudinea) on snapping turtles, *Chelydra serpentina*, in Southeastern Ontario. *Journal of Parasitology* 76: 190 - 195.

Carreno RA, Martin DS, Barta JR, 1999: Cryptosporidium is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research* 85: 899 - 904.

Castellani A, Willey A, 1905: Observations on haematozoa in Ceylon. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 49: 383 - 402.

Chai JY, Chen CH, 1990: Six new species of *Haemogregarina* from Chinese turtles. *Acta Hydrobiologica Sinica* 14: 129 - 137.

Cook CA, Lawton SP, Davies AJ, Smith NJ, 2014: Reassignment of the land tortoise haemogregarine *Haemogregarina fitzsimonsi* Dias 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to the genus *Hepatozoon* Miller 1908 (Adeleorina: Hepatozoidae) based on parasite morphology, life cycle and phylogenetic analysis of 18S rDNA sequence fragments. *Parasitology* 141: 1611 - 1620.

Cook CA, Netherlands EC, Smit NJ, 2015: First *Hemolivia* from southern Africa: reassigning chelonian *Haemogregarina parvula* Dias, 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to *Hemolivia* (Adeleorina: Karyolysidae). African Zoology 50: 165 - 173.

Cook CA, Smit NJ, Davies AJ, 2009: A redescription of *Haemogregarina fitzsimonsi* Dias, 1953 and some comments on *Haemogregarina parvula* Dias, 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) from southern African tortoises (Cryptodira: Testudinidae), with new host data and distribution records. Folia Parasitologica 56: 173 - 179.

*Danilewsky B, 1885: Die Hämatozoën der Kaltblüter. Archiv für Mikroskopische Anatomie 24: 588 - 598.

Davies AJ, Johnston MRL, 1976: The biology of *Haemogregarina bigemina* Laveran & Mesnil, a parasite of the marine fish *Blennius pholis* Linnaeus. The Journal of Protozoology 23: 313 - 320.

Davies AJ, Johnston MRL, 2000: The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptiles. Advances in Parasitology 45: 1 - 107.

Davies AJ, Smit NJ, 2001: The life cycle of *Haemogregarina bigemina* (Adeleina: Haemogregarinidae) in South African hosts. Folia Parasitologica 48: 169 - 177.

Davies AJ, Smit NJ, Hayes PM, Seddon AM, Wertheim D, 2004: *Haemogregarina bigemina* (Protozoa: Apicomplexa: Adeleorina) – past, present and future. Folia Parasitologica 51: 99 - 108.

Davis AK, Sterrett SC, 2011: Prevalence of Haemogregarine parasites in three freshwater turtle species in a population in Northeast Georgia, USA. International Journal of Zoological Research 7: 156 - 163.

Desser SS, 1993: The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In Parasitic Protozoa, (ed. Kreier JP), pp. 247–272. Vol. 4. 2nd Edn., Academic Press, New York, USA.

*Dias JATS, 1953: Subsídios para o estudo dos hematozoários dos répteis de Moçambique. Boletim da Sociedade de Estudos de Moçambique 23: 41 - 73.

Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS, 1993: General concepts for PCR primer design. PCR Methods and Applications 3: S30 - S37.

*Ducloux, 1904: Sur une Hemogregarine de *Emys leprosa*. Compte Rendu des Seances de la Societe de Biologie. Zoological Record Volume 41: 564 - 565.

Dvořáková N, Kvičerová J, Hostovský M, Široký P, 2015: Haemogregarines of freshwater turtles from southeast Asia with a description of *Haemogregarina sacaliae* sp. n. and a redescription of *Haemogregarina pellegrini* Laveran et Pettit, 1910. Parasitology 142: 816 - 826.

Dvořáková N, Kvičerová J, Papoušek I, Javanbakht H, Tiar G, Kami H, Široký P, 2014: Haemogregarines from western Palaearctic freshwater turtles (genera *Emys*, *Mauremys*) are conspecific with *Haemogregarina stepanowi* Danilewsky, 1885. Parasitology 141: 522 - 530.

Elwasila M, 1989: *Haemogregarina* sp. (Apicomplexa: Adeleorina) from the gecko *Tarentola annularis* in the Sudan: fine structure and life-cycles trials. Parasitology Research 75: 444 - 448.

Fritz, U, Branch WR, Hofmeyr MD, Maran J, Prokop H, Schleicher A, Široký P, Stuckas, H, Vargas-Ramírez M, Vences M, Hundsdörfer AK, 2011: Molecular phylogeny of African hinged and helmeted terrapins (Testudines: Pelomedusidae: *Pelusios* and *Pelomedusa*). Zoologica Scripta 40: 115 - 125.

Fritz U, Havaš P, 2007: Checklist of chelonians of the world at the request of the CITES Nomenclature Committee and the German Agency for Nature Conservation. Funded by German Federal Ministry of Environment, Nature Conservation and Nuclear Safety and Museum of Zoology Dresden. *Vertebrate Zoology* 57: 149 - 368.

Fritz U, Havaš P, 2013: Order testudines: 2013 update. *Zootaxa* 3703: 012 - 014.

Gavazza A, Bizzeti M, Papini R, 2003: Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Revue de Medecine Veterinaire* 154: 565 - 571.

Guindon S, Gascuel O, 2003: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696 - 704.

Hahn CW, 1909: The stages of *Haemogregarina stepanovi* Danilewsky found in the blood of turtles, with special reference to ganges in the nucleus. *Archiv für Protistenkunde* 17: 307 - 376.

Haklová-Kočíková B, Hižňanová A, Majláth I, Račka K, Harris DJ, Földvári G, Tryjanowski P, Kokošová N, Malčeková B, Majláthová V, 2014: Morphological and molecular characterization of *Karyolysus* – a neglected but common parasite infecting some European lizards. *Parasites & Vectors* 7: 555 - 566.

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.

Halla U, Korbel R, Mutschmann F, Rinder R, 2014: Blood parasites in reptiles imported to Germany. *Parasitology Research* 113: 4587 - 4599.

Harris DJ, Maia JPMC, Perera A, 2011: Molecular characterization of Hepatozoon species in reptiles from the Seychelles. *Journal of Parasitology* 97: 106 – 110.

Hughes AL, Verra F, 2002: Extensive polymorphism and ancient origin of *Plasmodium falciparum*. *Trends in Parasitology* 18: 348 – 351.

Jacobson ER, 2007: Infectious diseases and pathology of reptiles: Color atlas and text. CRC Press: Taylor and Francis group, Boca Raton, Florida, 731 pp.

Johnston TH, Cleland JB, 1912: The haematozoa of Australian reptilia. No. 2. *Journal and Proceedings of the Royal Society of New South Wales* 36: 479.

Karadjian G, Chavatte JM, Landau I, 2015: Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* n. g., reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. *Parasite*: 22: 31.

Khan RA, Forrester DJ, Goodwin TM, Ross CA, 1980: A haemogregarine from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Parasitology* 66: 324 - 332.

Kopečná J, Jirků M, Oborník M, Tokarev YS, Lukeš J, Modrý D, 2006: Phylogenetic analysis of coccidian parasites from invertebrates: search for missing links. *Protist* 157: 173 - 183.

Kvičerová J, Hypša V, Dvořáková N, Mikulíček P, Jandzik D, Gardner MG, Javanbakht H, Tiar G, Široký P, 2014: *Hemolivia* and *Hepatozoon*: haemogregarines with tangled evolutionary relationships. *Protist* 165: 688 - 700.

Kvičerová J, Hypša V, Pakandl M, 2008: Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology* 135: 443 - 452.

*Landau I, 1974: Hypothèses sur la phylogénie des Coccidiomorphes de Vertébrés. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 45: 63 - 75.

Landau I, Paperna I, 1997: The assignment of *Hepatozoon mauritanicum*, a tick-transmitted parasite of tortoise, to the genus *Hemolivia*. *Parasite* 4: 365 - 367.

*Laveran A, Mesnil F, 1902: Sur quelques protozoaires parasites d'une tortue d'Asie (*Damonia reevesii*). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 3: 609 - 614.

*Laveran A, Nattan-Larrier LAA, 1912: Sur une hémogregarine de testudo *Emys*. *Comptes Rendus des séances de la Société de Biologie* 72: 134 - 136.

*Laveran A, Pettit A, 1910: Sur une hemogregarine nouvelle de *Damonia subtrijuga* Schlegel. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* 151: 1017 - 1019.

Leveille AM, Ogedengbe ME, Hafeez MA, Tu HA, Barta JR, 2014: The complete mitochondrial genome sequence of *Hepatozoon catesbiana* (Apicomplexa: Coccidia: Adeleorina), a blood parasite of the green frog, *Lithobates* (formerly *Rana*) *clamitans*. *Journal of Parasitology* 100: 651 - 656.

Maia JP, Harris DJ, Perera A, 2011: Molecular survey of *Hepatozoon* species in lizards from North Africa. *Journal of Parasitology* 97: 513 - 517.

Maia JP, Harris DJ, Perera A, 2012: Molecular survey and microscopic examination of *Hepatozoon* Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina) in lacertid lizards from the western Mediterranean. *Folia Parasitologica* 59 : 241 - 248.

McCoy JC, Failey EL, Price SJ, Dorcas ME, 2007: An assessment of leech parasitism on semi-aquatic turtles in the western piedmont of North Carolina. *Southeastern Naturalist* 6: 191 - 202.

*Mello de F, 1932: Contribution à l'étude des hémogrégarinides des tortues indiennes. *Haemogregarina malabarica* n. sp. et son cycle évolutif chez *Emyda granosa*, subspecies *vittata* Peters. *Arquivos da Escola Médico-Cirurgica de Nova Goa – Série A* 8: 1411–1425.

*Michel JC, 1973: *Hepatozoon mauritanicum* (Et. et Ed. Sergent, 1904) n. comb., parasite de *Testudo graeca*: Redescription de la sporogonie chez *Hyalomma aegyptium* et la schizogonie tissulaire d'après le matériel d'E. Brumpt. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 48: 11 - 21.

Mihalca A, Achelaritei D, Popescu P, 2002: Haemoparasites of the genus *Haemogregarina* in a population of European pond turtles (*Emys orbicularis*) from Dragasani, Valcea county, Romania. *Scientia Parasitologica* 2: 22 - 27.

Mikulíček P, Jandzik D, Fritz U, Schneider C, Šíroký P, 2013: AFLP analysis shows high incongruence between genetic differentiation and morphology-based taxonomy in a widely distributed tortoise. *Biological Journal of the Linnean Society* 108: 151 - 160.

Page RDM, 1996: TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357 - 358.

Pancieri RJ, Mathew JS, Ewing SA, Cummings CA, Drost WT, Kocan AA, 2000: Skeletal lesions of canine hepatozoonosis caused by *Hepatozoon americanum*. *Veterinary Pathology* 37: 225 - 230.

Paperna I, 1989: Developmental cycle of chelonian haemogregarines in leeches with extra-intestinal multiple sporozoite oocysts and note on the blood stages in the chelonian hosts. *Diseases of Aquatic Organisms* 7: 149 – 153.

Paterson WB, Desser SS, 1976: Observation on *Haemogregarina balli* sp. n. from the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Journal of Protozoology* 23: 294 - 301.

Perkins SL, Keller AK, 2001: Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. *Journal of Parasitology* 87: 870 - 876.

*Petit G, Landau I, Baccam D, Lainson R, 1990: Description et cycle biologique d'*Hemolivia stellata* n. g., n. sp., hémogrégarine de crapauds brésiliens. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 65: 3 - 15.

Pienaar U de V, 1962: Haematology of some South African reptiles. Witwatersrand University Press, Johannesburg, 299 pp.

Posada D, 2008: jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253 - 1256.

Posada D, 2009: Selection of models of DNA evolution with jModelTest. *Methods in Molecular Biology* 537: 93-112.

*Prowazek S, 1910: Parasitische Protozoen aus Japan, gesammelt von Herrn Dr. Mine in Fukuoka. *Archiv für Schiffs- und Tropen-Hygiene* 14: 296 - 302.

Ray R, Bhattacharjee A, 1984: *Haemogregarina choudhuryi* sp. n. (Apicomplexa: Haemogregarinidae) in common pond water turtle, *Lissemys punctata punctata* (Bonnaterre) from West Bengal. *Acta Protozoologica* 23: 67 - 74.

*Reichenow E, 1910: *Haemogregarina stepanowi*. Die Entwicklungsgeschichte einer Hämogregarine. Archiv für Protistenkunde 20: 251 - 350.

Reisz RR, Head JJ, 2008: Turtle origins out to sea. Nature 456: 450 - 451.

Robertson M, 1908: A preliminary note on haematozoa from Ceylon reptiles. Spolia Zeylanica 5: 178–185.

Robertson M, 1910: Studies on Ceylon haematozoa. No. II – Notes on the life cycle of *Haemogregarina nicoriae*, Cast and Willey. The Quarterly Journal of Microscopical Science 55: 741 - 762.

Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003: MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572 - 1574.

Saratchandra R, 1981: Two new haemogregarines, *Haemogregarina waltairensis* n. sp. from *Caloles versicolor* (Daudin) and *H. ganapalii* n. sp. from *Lissemys punctata granosa* (Sheopff). Proceedings of the Indian Academy of Sciences Animal Sciences 90: 365 - 371.

*Sergent E, Sergent E, 1904: Sur une hémogrégarine, parasite de *Testudo mauritanica*. Comptes rendus de la Société. de Biologie 56: 130–131.

Siddall ME, 1995: Phylogeny of adeleid blood parasites with a partial systematic revision of the haemogregarine complex. Journal of Eukaryotic Microbiology 42: 116 - 125.

Siddall ME, Desser SS, 1991: Merogonic development of *Haemogregarina balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the leech *Placobdella ornata* (Glossiphoniidae), its transmission to a chelonian intermediate host and phylogenetic implications. Journal of Parasitology 77: 426 - 436.

Siddall ME, Desser SS, 1992: Prevalence and intensity of *Haemogregarina balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in three turtle species from Ontario, with observations on intraerythrocytic development. Canadian Journal of Zoology 70: 123 - 128

Siddall ME, Desser SS, 2001: Transmission of *Haemogregarina balli* from painted turtles to snapping turtles through the leech *Placobdella ornata*. Journal of Parasitology 87: 1217 - 1218.

Siddall ME, Gaffney ES, 2004: Observations on the leech *Placobdella ornata* feeding from bony tissue of turtles. Journal of Parasitology 90: 1186 - 1188.

Sinha CK, 1993: A new *Haemogregarina* from a freshwater turtle of west Bengal. Geobios New Reports 12: 5 - 10.

Smallridge CJ, Bull CM, 1997: The tick-transmitted haemogregarinid of the Australian sleepy lizard *Tiliqua rugosa* belongs to the genus *Hemolivia*. Parasite 4: 359 - 363.

Smit N, Basson L, Van AS JG, 2003: Life cycle of the temporary fish parasite, *Gnathia africana* (Crustacea: Isopoda: Gnathiidae). Folia Parasitologica 50: 135 - 142.

Smith TG, 1996: The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adelina). Journal of Parasitology 82: 565 - 585.

Soares P, de Brito ES, Paiva F, Pavan D, Viana LA, 2014: *Haemogregarina* spp. in a wild population from *Podocnemis unifilis* Troschel, 1848 in the Brazilian Amazonia. Parasitology Research 113: 4499 - 4503.

Strohlein DA, BM Christensen, 1984: *Haemogregarina* sp (Apicomplexa, Sporozoea) in aquatic turtles from Murphys Pond, Kentucky. Transactions of the American Microscopical Society 103: 98 - 101.

Stuckas H, Gemel R, Fritz U, 2013: One extinct turtle species Less: *Pelusios seychellensis* is not extinct, it never existed. PLoS ONE 8: e57116.

Swofford DL, 2001: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Široký P, Kamler M, Frye FL, Fictum P, Modrý D, 2007: Endogenous development of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in marginated tortoise *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence from experimental infection. Folia Parasitologica 54: 13 - 18.

Široký P, Kamler M, Modrý D, 2005: Prevalence of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in natural populations of tortoises of the genus *Testudo* in the east Mediterranean region. Folia Parasitologica 52: 359 - 366.

Telford SR Jr., 1984: Haemoparasites of reptiles. In: GL Huff, F Frye, and ER Jacobson (Eds.), Diseases of Amphibians and Reptiles, Plenum Press, New York, 385 - 517.

Telford SR Jr., 1995: The kinetoplastid hemoflagellates of reptiles. In: Kreier JP (Ed.), Parasitic Protozoa, 2nd ed., vol. 10, Academic Press, New York, 161- 223.

Telford SR, 2009: Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text. CRC Press, Boca Raton.

Telford SR Jr., Butler JF, Telford SR, 2002: *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidae) of the corn snake, *Elaphe guttata* (Serpentes: Colubridae) and the pigmy

rattlesnake, *Sistrurus miliarius barbouri* (Serpentes: Viperidae) in south Florida. Journal of Parasitology 88: 778 - 782.

Telford SR, Ernst JA, Clark AM, Butler JF, 2004: *Hepatozoon sauritus*: A polytopic hemogregarine of three genera and four species of snakes in North Florida, with specific identity verified from genome analysis. Journal of Parasitology 90: 352 - 358.

Telford SR, Norton TM, Moler PE, Jensen JB, 2009: A new *Haemogregarina* species of the alligator snapping turtle, *Macrochelys temminckii* (Testudines: Chelydridae), in Georgia and Florida that produces macromeronts in circulating erythrocytes. Journal of Parasitology 95: 208 - 214.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: 1994: ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673 - 4680.

Tucker AD, Fitzsimmons NN, Govedich FR, 2005: Euhirudinea from Australian turtles (*Chelodina burrungandjii* and *Emydura australis*) of the Kimberley Plateau, Western Australia, Australia. Comparative Parasitology 72: 241 - 244.

Valkiūnas G, Atkinson CT, Bensch T, Sehgal RN, Ricklefs RE, 2008: Parasite misidentifications in genbank: how to minimize their number? Trends in Parasitology 24: 247 - 248.

Vargas-Ramírez M, Vences M, Branch WR, Daniels SR, Glaw F, Hofmeyr MD, Kuchling G, Maran J, Papenfuss TJ, Široký P, Vieites DR, Fritz U, 2010: Deep genealogical lineages in the widely distributed African helmeted terrapin: evidence from mitochondrial and nuclear DNA (Testudines: Pelomedusidae: *Pelomedusa subrufa*). Molecular Phylogenetics and Evolution 56: 428 - 440.

Wilford OO, 1977: *Haemogregarina stepanowi*. Parasitologia Animal. pp. 181 - 185.

Wozniak EJ, Kazacos KR, Telford SR Jr., McLaughlin, 1996: Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian hosts. *International Journal for Parasitology* 26: 141 - 146.

Wozniak EJ, Telford SR, McLaughlin GL, 1994: Description of the vertebrate stages of a hemogregarine species naturally infecting Mojave Desert sidewinders (*Crotalus cerastes*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25: 103 - 110.

* Označené zdroje jsou citovány podle současné literatury, nikoli na základě četby původní práce.

8. Přílohy

Následující pasáž o rozsahu sedmi stran obsahuje utajované skutečnosti a je obsažena pouze v archivovaném originále diplomové práce uloženém na Přírodovědecké fakultě JU.