

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Katedra aplikované geoinformatiky a územního plánování



**PŘÍTOMNOST PARAZITŮ RODU *LEUCOCYTOZOON* U MLÁDAT A
DOSPĚLCŮ SÝCE ROUSNÉHO (*AEGOLIUS FUNEREUS*) V KRUŠNÝCH
HORÁCH V ROCE 2017**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Autor: Tereza Kučerová

2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Tereza Kučerová

Aplikovaná ekologie

Název práce

Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat a dospělců sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách v roce 2017

Název anglicky

The presence of *Leucocytozoon* parasites in nestlings and adults of Tengmalm's owl (*Aegolius funereus*) in the Ore mountains in 2017

Cíle práce

Cílem studie je:

1. Zjistit přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat sýce rousného v roce 2017.
2. Zjistit přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u dospělců sýce rousného odchycených v hnízdech v roce 2017.
3. Porovnat četnosti výskytu parazitů rodu *Leucocytozoon* v závislosti na věku a pohlaví hnízdících jedinců.

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 studentky. 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.

Studentka se bude účastnit terénních prací a zároveň si osvojí laboratorní činnosti (DNA analýzy), které po zaučení bude vykonávat samostatně.

Doporučený rozsah práce

30-40 stran

Klíčová slova

sýc rousný, pohlaví, parazit, mládě, hnízdo, Krušné hory

Doporučené zdroje informací

- Drdáková M. 2003. Hnízdní biologie sýce rousného (*Aegolius funereus*) v imisních oblastech Krušných hor. *Sylvia* 39: 35-51.
- Kloubec, B. 2003. Breeding of Tengmalm's Owls (*Aegolius funereus*) in nest-boxes in Šumava Mts.: a summary from the years 1978˗2002 *Buteo* 13: 75˗86.
- Korpimäki, E., and H. Hakkarainen. 2012. *The Boreal Owl: ecology, behaviour and conservation of a forest-dwelling predator*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Mahlerová, K. 2017. Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat a dospělců sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách. DP, ČZU, Praha
- Zárybnická-Drdáková M. 2005. Growth of Tengmalm's Owl offsprings (*Aegolius funereus*) in Krušné hory Mountains. *Buteo* 14: 37–50.
-

Předběžný termín obhajoby

2017/18 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Markéta Zárybnická, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra aplikované geoinformatiky a územního plánování

Konzultant

Mgr. Jiří Šindelář

Elektronicky schváleno dne 17. 3. 2018

doc. Ing. Petra Šímová, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 18. 3. 2018

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 27. 03. 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama pod vedením Ing. Markéty Zárybnické, Ph.D., a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

Prohlašuji, že tištěná verze se shoduje s verzí odevzdanou přes Univerzitní informační systém.

V Praze 18. 4. 2018

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala Ing. Markétě Zárybnické Ph.D. za vstřícnost a věcné rady během konzultací a vypracovávání této bakalářské práce. Dále mé poděkování patří Ing. Karolině Mahlerové za ochotu, pomoc a poskytnutí cenných praktických rad při práci v laboratoři a Mgr. Jiřímu Šindelářovi za pomoc při sběru dat.

V Praze 18. 4. 2018

.....

Abstrakt

Parazité rodu *Leucocytozoon* patří do skupiny hemosporid. Jedná se o krevní parazity využívající jako mezihostitele těla obratlovců. Tato bakalářská práce zjišťuje přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mlád'at a dospělců sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách v hnízdní sezóně 2017. Přítomnost parazitů byla zjišťována pomocí dvoufázové nested PCR analýzy DNA (Hellgren et al., 2004), která byla izolována z krevních vzorků odebíraných v terénu. Dále byl zjišťován vliv věku a pohlaví na přítomnost parazitů. Pohlaví bylo určeno PCR analýzou DNA. Krev byla odebrána celkem 25 dospělým jedincům a 71 mlád'atům. Přítomnost parazitů byla prokázána u 13 dospělců (52%) a 12 mlád'at (17%).

Klíčová slova: sýc rousný, pohlaví, parazit, mládě, hnízdo, Krušné hory

Abstract

The parasites of the genus *Leucocytozoon* belong to the *Haemosporida* order. Vertebrates (birds) are used as hosts of this group of blood parasites. The present study finds out the presence of *Leucocytozoon* parasites in juveniles and adults of the Tengmalm's owl (*Aegolius funereus*) in the Ore Mountains during the nesting season 2017. The presence of parasites was detected by a two-phase nested PCR analysis of DNA (Hellgren et al. 2004) which was isolated from blood samples taken in the field. The influence of age and gender on the presence of parasites was also investigated. Gender was determined by PCR analysis of DNA. Blood was collected from a total of 25 adult individuals and 71 juveniles. The presence of *Leucocytozoon* parasites was confirmed in 13 of adults (52 %) and 12 of juveniles (17 %).

Key words: The Tengmalm's owl, gender, parasite, juvenil, nest, The Ore Mountains

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Cíle práce	11
3. Sýc rousný.....	12
3.1 Taxonomické zařazení.....	12
3.2 Popis druhu.....	12
3.3 Výskyt a ochrana druhu.....	13
3.4 Hnízdní biologie a potrava	15
4. Endoparazité ptáků řádu Haemosporida	16
4.1 Taxonomické zařazení.....	16
4.2 Řád Haemosporida	16
4.2.1 Vektory řádu Haemosporida	16
4.3 Rod <i>Leucocytozoon</i>	17
4.4 Rod <i>Plasmodium</i>	17
4.5 Rod <i>Haemoproteus</i>	18
5. Přítomnost parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i> u sýce rousného	19
6. Metodika	20
6.1 Charakteristika studijního území.....	20
6.2 Sběr dat.....	20
6.3 Odchyty drobných savců	21
6.4 Laboratorní zpracování.....	22
6.4.1 Izolace DNA ze vzorků metodou Hot Shot.....	22
6.4.2 Zjištění pohlaví	22
6.4.3 Zjištění přítomnosti parazitů	24
6.5 Statistické analýzy	27
7. Výsledky práce.....	28
7.1 Potravní nabídka.....	28
7.2 Přítomnost parazitů.....	28
8. Diskuse.....	33
9. Závěr a přínos práce	35
10. Přehled literatury a použitých zdrojů.....	36
11. Seznam obrázků a tabulek	39
12. Přílohy	40

1. Úvod

Hemosporida jsou krevní paraziti patřící do skupiny protist. Početně největší skupinou tohoto řádu jsou rody parazitující na ptácích. Některé rody parazitů patřící do řádu Hemosporida jsou nositeli právě ptačí malárie. Proto je většina pozornosti věnována právě studiu rodu *Plasmodium*, který slouží jako modelový organismus pro studium lidské malárie (Valkiunas 2005). Hemosporida parazitující na ptácích byly v tomto ohledu využívány od 90. let 19. století do 40. let 20. století, kdy se ukázali vhodnějšími modely plasmodia parazitující na drobných savcích (Slater 2005). Ptačí hemosporida však mají ve výzkumu lidské malárie stále své místo. Náklady na experimenty jsou v jejich případě nižší, proto jsou do dnes využívány k mnoha modelovým studiím (Nagao et al. 2008).

Největší rozvoj zaznamenal výzkum hemosporid na přelomu 20. a 21. století, kdy došlo ke zdokonalení metod PCR, které umožňují identifikaci parazitů až na úroveň druhu. Nejčastěji používaným je v současné době protokol pro nested PCR dle Hellgrena et al. (2004), který je využit i v této bakalářské práci.

Studium jednotlivých taxonů hemosporid však neprobíhá rovnoměrně. Poznatky o rodu *Leucocytozoon* proto nejsou zdaleka tak rozsáhlé, jako o rodech přenášejících pravou ptačí malárii (Valkiunas 2005).

Detekcí hemosporid a jejich vektorů se v České republice (konkrétně v Krušných horách) věnoval Synek et al. (2015). Ve své studii zkoumal parazity na sýci rousném (*Aegolius funereus*), který je vhodný především dlouhým obdobím hnízdění, díky kterému mohou parazité infikovat hnízda. Nejčastěji byl detekován rod *Leucocytozoon*, a sice ve 3 druzích. U rodů *Plasmodium* a *Hameoproteus* byl rozpoznán jeden druh u každého. Nebylo však výjimkou, že jeden jedinec byl parazitován více druhy najednou. Právě studie Synka et al. (2015) se věnuje mimo jiné zjištění věku, kdy byla mláďata nakažena a tento věk považuje za klíčový faktor ovlivňující přítomnost parazitů.

Tato bakalářská práce se zabývá zjištěním přítomnosti parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat a dospělců sýce rousného (*Aegolius funereus*)

v Krušných horách v hnízdní sezóně 2017. Hlavním přínosem této práce by mělo být rozšíření poznatků o parazitech tohoto rodu v České republice a dále rozvíjet tuto metodu v laboratořích Fakulty životního prostředí ČZU v Praze.

2. Cíle práce

- a) Zjistit přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat sýce rousného v roce 2017.
- b) Zjistit přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u dospělců sýce rousného odchycených v hnízdech v roce 2017.
- c) Porovnat četnosti výskytu parazitů rodu *Leucocytozoon* v závislosti na věku a pohlaví hnízdících jedinců.

3. Sýc rousný

3.1 Taxonomické zařazení

Třída: ptáci (Aves)

Podtřída: letci (Neognathae)

Řád: sovy (Strigiformes)

Čeleď: puštíkovití (Strigidae)

Rod: sýc (*Aegolius*)

3.2 Popis druhu

Sýc rousný (*Aegolius funereus*) je menší sova podobná sýčkovi (*Athene* sp.), o velikosti 22-27 cm a rozpětím křídel 50-62 cm (Bejček et al. 2006). Průměrná váha během hnízdění je 170 g (samice), 102 g (samci) (Korpimäki 1981).

Peří je svrchu hnědé s bílým skvrněním, při kořenu křídla s bílým pruhem. Zespodu těla je barva světlejší, bělavá s hnědými pruhy, nohy jsou bíle zbarvené (Hudec et al. 2005). Oproti sýčkovi se vyznačuje větší zakulacenou hlavou s černohnědě ohraničeným šedobílým závojem kolem očí, posazenými blízko k sobě. Žlutý zobák, spolu se stejně zbarvenýma očima tvoří typický trojúhelník (Bejček et al. 2006).



Obrázek 1: Samice sýce rousného (*Aegolius funereus*) na hnízdě (foto: Jiří Šindelář 2017).



Obrázek 2: Mláďata sýce rousného (Aegolius funereus) (foto: Jiří Šindelář 2017).

3.3 Výskyt a ochrana druhu

Sýc rousný je sova s cirkumpolárním rozšířením v holarktické oblasti. Přírodním areálem jsou tedy jehličnaté lesy Eurasie a Severní Ameriky (Korpimäki et al. 2012). Populace ve střední a jižní Evropě jsou vázány na smrkové porosty (*Picea abies*), smíšené lesy smrku s bukem lesním (*Fagus sylvatica*), či nepůvodní porosty smrku pichlavého (*Picea pungens*) (Šťastný et al. 2009).



Obrázek 3: Mapa rozšíření sýce rousného (*Aegolius funereus*) ve světě (<http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=22689362>, 2018)

V současnosti se populace sýce rousného vyskytuje ve všech pohořích České republiky (na Šumavě, v Krkonoších, Krušných a Jizerských horách, Jeseníkách, Beskydech, ale také ve vnitrozemí v Českomoravské vrchovině) (Šťastný et al. 2009). Dnes tento druh poměrně snadno proniká také do nižších poloh, například na Znojensko, či do jižních a západních Čech (Hudec et al. 2005). V letech 2001-2003 byla populace sýce rousného v České republice odhadnuta na 1500-2000 párů (Šťastný et al. 2009).

Sýc rousný je v České republice chráněn dle zákona o ochraně přírody a krajiny 114/1992 Sb. a prováděcí vyhlášky 395/1992 Sb., ve kterých je řazen mezi zvláště chráněné druhy, kategorie silně ohrožený. Na Červeném seznamu ČR je veden jako druh zranitelný (Plesník et al. 2003), v Červeném seznamu IUCN spadá do kategorie málo dotčený (LC) (www.iucnredlist.org, 2017). Na území Evropské unie je tento druh chráněn směrnicí o ptácích č. 2009/147/ES (celým názvem Směrnice Evropského parlamentu a rady č. 2009/147/ES z 30. listopadu 2009 o ochraně volně žijících ptáků), v níž je uveden v příloze I.

3.4 Hnízdní biologie a potrava

Přirozená hnízda sýce rousného se nachází většinou v dutinách stromů vytvořených například datlem černým (*Dryocopus martius*), ale ochotně obsazuje také umělé ptačí budky (Zárybnická et al. 2015). V hnízdech shromažďuje kromě trusu také zbytky potravy a vývržky (Hudec et al. 2005). Hnízda jsou příležitostně predována kunou lesní (*Martes martes*) (Zárybnická et al. 2015).

Snůšky o velikosti 3-6 vajec bývají kladeny v období od března do května. Rodičovské úlohy samců a samic jsou v tomto případě striktně rozděleny (Korpimäki 1981). Úlohou samic je setrvat na hnízdě po celou dobu inkubace vajec a po vylíhnutí zahřívát mláďata cca další tři týdny (Drdáková - Zárybnická 2003). Samci v období hnízdění obstarávají a donášejí potravu samicím a mláďatům do hnízd (Drdáková - Zárybnická et al. 2003). Hnízdní páry nebývají stálé, samci většinou zůstávají v jednom okrsku několik let. Jejich přítomnost je pravděpodobně podmíněna množstvím kořisti v daném okrsku (Hakkarienen et al. 1998). Samice přitom částečně migrují (Drdáková - Zárybnická 2005). Zpravidla páry zahnízdí jednou za sezónu, při vhodných podmínkách však mohou zahnízdit i vícekrát (Zárybnická 2009).

Sýc rousný je druh sovy s noční aktivitou, v podmínkách střední Evropy má během noci dva vrcholy aktivity, první při stmívání a druhý při rozednávání (Korpimäki 1981, Kouba et al. 2014).

Mláďata se líhnou asynchronně v rozmezí dvou dnů. Na hnízdě poté zůstávají 27-38 dní od vylíhnutí (Kouba et al. 2015).

Jeho hlavní potravu tvoří drobní hlodavci, především hraboši (*Microtus* sp.), norníci (*Myodes*) a myšice (*Apodemus* sp.) (Korpimäki 1988). Pokud jsou stavy hlavní kořisti nízké, zvětšuje se význam alternativní kořisti, kterou jsou většinou rejsci (*Sorex* sp.) a drobní ptáci (Zárybnická et al. 2015).

4. Endoparazité ptáků řádu Haemosporida

4.1 Taxonomické zařazení

Kmen: výtrusovci (Apicomplexa)

Třída: krvinkovky (Haematozoa)

Řád: Haemosporida

4.2 Řád Haemosporida

Hemosporida jsou globálně rozšířeným řádem endoparazitů obratlovců řadících se mezi prvoky (Synek et al. 2015).

Fylogeneticky se jedná o zvláštní, oddělenou skupinu obligátních heterogenních parazitů. Tento řád je zkoumán především proto, že se v něm vyskytují původci malárie, která i v dnešní době zužuje některé země s teplejším klimatem (Valkiunas 2005).

Merogonie a tvorba gametocytů probíhá v těle obratlovčích hostitelů. Sexuální fáze života hemosporid (přeměna gametocytů v gamety a sporogynie) je vázána na krev sající hmyz řádu dvoukřídlí (Diptera). Zástupci tohoto řádu slouží jako vektory přenosu těchto parazitů. Gametogeneze probíhá vně buněk (Valkiunas 2005).

Řád Haemosporida se skládá ze čtyř čeledí, Plasmodiidae, Garniidae, Haemoproteidae a Leucocytozoidae (Valkiunas 2005). Třemi nejběžnějšími rody hemosporid parazitujících na ptácích jsou rody *Plasmodium* (čeleď: Plasmodiidae), *Haemoproteus* (čeleď: Haemoproteidae) a *Leucocytozoon* (čeleď: Leucocytozoidae) (Hellgren 2004).

4.2.1 Vektory řádu Haemosporida

Identifikace vektorů ptačích hemosporid ve volné přírodě je do dnešní doby velmi komplikovaná, především kvůli migracím ptáků (Valkiunas 2005). Novou éru v této oblasti otevřely molekulární metody PCR (Hellgren 2004).

Studiem vektorů hemosporid v České republice se zabýval Synek et al. (2013). Nejfrekventovanějším detekovaným hmyzem byl rod *Culicoides*, patřící do čeledi Ceratopogonidae, která je považována za vektor rodu *Haemoproteus*. U tohoto vektoru byla zjištěna přítomnost až 5 druhů parazitů. Bylo zjištěno, že ptáci jsou tímto rodem napadáni i přímo v ptačích budkách, a to i před opeřením (Synek et al. 2015). U rodu *Plasmodium* byli hlavními vektory zjištěni komáři čeledi Culicidae. Hlavním vektorem rodu *Leucocytozoon* byla určena čeleď Simuliidae. Na jednom jedinci byly detekovány až tři druhy parazitů (Synek et al. 2013).

4.3 Rod *Leucocytozoon*

Rod *Leucocytozoon* je, s výjimkou Antarktidy, celosvětově rozšířená skupina parazitů řádu Haemosporida, která infikuje širokou škálu ptáků (Valkiunas 2005).

Parazité rodu *Leucocytozoon* parazitují výhradně v pevných tkáních obratlovců, nikoli v krevních buňkách. Jsou úzce příbuzné rodům *Plasmodium* a *Haemoproteus*, což jsou původci pravé ptačí malárie. Rod *Leucocytozoon* však nevytváří krevní pigment hemozoin, který je ukazatelem pravé ptačí malárie (Valkiunas 2005).

Sexuální fáze života těchto parazitů je vázána na vektory, kterými jsou v případě rodu *Leucocytozoon* téměř výhradně dvoukřídlí čeledi muchničkovití (Simuliidae) a pakomárcovití (Ceratopogonidae) (Morii 1992).

4.4 Rod *Plasmodium*

Rod *Plasmodium* je, spolu s rodem *Haemoproteus*, původcem pravé ptačí malárie. Asexuální fáze čeledi Plasmodiidae napadá kromě pevných tkání i krevní buňky zvířat. Pigment hemozoin, hromadící se v maláriových parazitech, je u tohoto rodu přítomen.

Vektory rodu *Plasmodium* patří do řádu dvoukřídlí (Diptera). Konkrétně se jedná o čeledi komárovití (Culicidae), pakomárcovití (Ceratopogonidae) a „písečné mušky“ (Phlebotomidae) (Valkiunas 2005).

4.5 Rod *Haemoproteus*

Rod *Haemoproteus* je další z původců pravé ptačí malárie. Tento rod napadá buňky pevných tkání, jakými jsou například játra, či krevní buňky hostitele. K rozvoji gametocyt dochází v červených krvinkách obratlovců. V gametocytech je přítomen pigment hemozoin.

Sexuální proces a sporogonie probíhá v zástupcích dvoukřídlého hmyzu z čeledí Hyppoboscidae a Ceratopogonidae (Valkiunas 2005).

5. Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u sýce rousného

Přítomností parazitů rodu *Leucocytozoon* u sýce rousného (*Aegolius funereus*) v západní části Finska v letech 1991 a 1992 se zabýval Korpimäki et. al (1993). Přítomnost parazitů byla v této studii zjišťována mikroskopickými metodami. Tento výzkum prokázal přítomnost parazitů u dospělých jedinců sýce rousného. Celkem byla zjištěna přítomnost u 97 % dospělých samic (n=97) a 94 % dospělých samců (n=85). V sezóně 1992 byla krev odebrána také 12 mládřatům (průměrný věk 4 týdny, přítomnost parazitů však nebyla zaznamenána u žádného z nich (Korpimäki et. al 1993).

V České republice se přítomností parazitů rodu *Leucocytozoon* zabýval Synek et. al (2015). Výzkum probíhal v letech 2008-2011 v Krušných horách. Přítomnost parazitů byla zjišťována metodou PCR, konkrétně byl použit protokol pro nested PCR dle Hellgrena et. al (2004). Krev byla odebrána celkem 28 dospělým samicím, 29 dospělým samcům a 113 mládřatům. Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* byla prokázána u 71 % dospělých (n=57) a 41 % mládřat (n=113) (Synek et. al 2015).

Ve své diplomové práci použila, stejně jako Synek et. al (2015), ke zjištění přítomnosti parazitů rodu *Leucocytozoon* protokol pro nested PCR dle Hellgrena et. al (2004) také Mahlerová (2017). V této práci byla zjišťována přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u sýce rousného v Krušných horách v sezónách 2015 a 2016. V roce 2015 byla krev odebrána 118 mládřatům a přítomnost parazitů byla prokázána u 2,36 % mládřat. V sezóně 2016 byla přítomnost prokázána u 44 % dospělých samic (n=9) a 67 % dospělých samců (n=6). Celkově bylo tedy parazitováno 53 % dospělých jedinců (n=15). V roce 2016 byla krev odebrána také 20 mládřatům, u žádného z nich však nebyla přítomnost parazitů prokázána (Mahlerová 2017).

6. Metodika

6.1 Charakteristika studijního území

Studijní území se nachází ve východní části Krušných hor, v okolí vodní nádrže Fláje, v nadmořské výšce 735-765 m. Toto území bylo dlouhodobě vystaveno emisím z tepelných elektráren a chemických továren v podhůří (Drdková-Zárybnická 2004). Kromě toho nástup průmyslu způsobil také vytěžení většiny původních porostů buku lesního (*Fagus sylvatica*), jedle bělokoré (*Abies alba*) a smrku ztepilého (*Picea abies*). Dnes je krajina studovaného území tvořena mozaikou rozvolněných ploch. Jedná se o vzrostlé porosty smrku ztepilého, náhradní porosty smrku pichlavého (*Picea pungens*), bříz (*Betulas sp.*), modřínu opadavého (*Larix decidua*) a jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia*), se solitérními dřevinami, především buky. Na pasekách, kterých v této oblasti v poslední době přibývá, je převažujícím druhem třtina chloupkatá (*Calamagrostis villosa*) (Zárybnická 2008). Tyto biotopy se ukázaly vhodným prostředím pro hnízdění sýce rousného.

Na studijní ploše o rozloze cca 120 km² bylo v roce 2017 rozmístěno 246 hnízdních budek pro sýce rousné.

6.2 Sběr dat

Analyzována byla data z roku 2017. V průběhu hnízdní sezóny 2017 (březen-srpen) probíhaly pravidelné kontroly obsazených budek a byla dohledávána hnízda. Obsazená hnízda byla kontrolována každých 7-10 dní a byla u nich zaznamenávána velikost snůšky, počet vylíhlých a vylétlých mláďat, informace o nalezené kořisti na hnízdech a případné predaci hnízda. Odchyt samic probíhal přímo na hnízdě, za pomoci podběráku a žebříku. Samci byli odchytáváni v noci pomocí ornitologické sítě při přiletu s kořistí do hnízda. Dále byl u mláďat při opakovaných kontrolách dokumentován jejich růst (tj. délka křídla a váha) od vylíhnutí do opuštění hnízda.

Mláďatům i dospělcům byla při odchycích odebírána krev z brachiální žíly. Nejprve byla brachiální žíla narušena jehlou (1², 0,5 x 25 mm). Kapilárou (průměr cca 0,8 mm, objem 50 µl) bylo poté každému jedinci odebráno 50 µl krve (Obr. 4). Odebrané vzorky byly zakonzervovány ve zkumavkách Eppendorf (dále jen

ependorfka) s 96 % etanolem, o objemu 1,5 ml a následně zamraženy při teplotě -20 °C. Při této teplotě zůstaly až do doby zpracování v laboratoři.

Krev mláďat byla odebírána jednou až čtyřikrát v různém věku. Krev byla v sezóně 2017 takto odebrána celkem 25 adultním jedincům a 71 mláďatům, průměrně byla každému mláděti odebrána 2,06 krát.



Obrázek 4: Odběr krve z brachiální žíly sýce rousného (*Aegolius funereus*) (foto: Zárybnická 2014)

6.3 Odchyty drobných savců

Potravní nabídka sýce rousného byla zjišťována pomocí odchytů drobných savců ve studijním území. Odchyty proběhly v roce 2017 dvakrát (v červnu a říjnu). K odchytům byly použity sklapovací pasti, které byly pokládány do kvadrátů o ploše 1 ha (vždy 11x11 pastí na 1 kvadrát). Pasti byly položeny po dobu 3 dnů a každé ráno pravidelně kontrolovány. Jako návnada byly použity kousky knotu potřené rozpuštěným tukem smíchaným s moukou. Na jaře bylo takto položeno celkem 726 pastí na dvou kvadrátech. Na podzim bylo položeno 1089 pastí na 3 kvadrátech. Odchycení jedinci byli zařazeni do druhu a výsledky dále přepočítány na počet odchycených jedinců/100 pastíonocí.

6.4 Laboratorní zpracování

Během laboratorního zpracování se vycházelo především z protokolů uvedených v přílohách diplomové práce Mahlerové (2017).

Nejprve byla v laboratoři ze vzorků krve, které byly po odběrech zakonzervovány v 96 % etanolu a uloženy v mrazáku, izolována DNA metodou Hot Shot. Dále bylo pomocí metody PCR a gelové elektroforézy zjištěno pohlaví mláďat a poté také přítomnost parazitů u vzorků mláďat i dospělců.

6.4.1 Izolace DNA ze vzorků metodou Hot Shot

Při izolaci DNA metodou Hot Shot se využívá roztoků A (NaOH, 0.2 mM EDTA) a B (TRIS – MCl, pH=5,0). Nejprve bylo ze vzorků s ethanolem odebráno 50 μ l směsi krve s ethanolem (bez větších kusů krve) a přendáno do předem připravených nadepsaných eppendorfek. Ty byly stočeny na centrifuze (T=5 minut, otáčky: RPM=3000-5000) a poté z nich byl odsán přebytečný etanol. Do každé eppendorfky bylo přidáno 40 μ l roztoku A. Dále došlo k jejich zahřátí na teplotu 95°C po dobu 12 minut, následnému prudkému zchlazení na 4°C a okamžitému přidání roztoku B, který zde má funkci neutralizačního činidla.

6.4.2 Zjištění pohlaví

Pohlaví bylo zjišťováno pomocí metody PCR. Každý vzorek byl testován nejméně dvakrát a vždy byla testována také negativní (dH₂O) a pozitivní kontrola (DNA dospělého samce/samice).

6.4.2.1 Metoda PCR

Ke zjištění pohlaví pomocí metody PCR byly použity primery cílící na určité úseky DNA, forward primer 2550 F, cílící na úsek [5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3'], a reverse primer 2718 R, cílící na úsek [5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3']. Tyto primery slouží k namnožení daných úseků DNA v termocykleru (Fridolfsson et al. 1999).

Nejprve byl namíchán premix, skládající se z následujících chemikálií: Dream Taq Buffer (výživa pro polymerázu), dH₂O (deionizovaná voda), primery 2550 F a 2718 R (neředěné, skladované v mrazáku), dNTP (stavební kameny pro utváření nového řetězce), polymeráza (skladována v mrazáku, přidává se až na konec) v poměru 2:16,3:0,2:0,2:0,25:0,04. Takto připravený premix byl nepipetován do stripů, 16,8 µl do každé eppendorfky. K premixu bylo následně přidáno 1,5 µl již vyizolované DNA ze vzorků. Takto připravené stripy byly vloženy do nastaveného termocyklieru.

Nastavení termocyklieru pro zjištění pohlaví sýce rousného je následující:

1. Denaturace (94°C, 30s, opakování 29x)
2. Annealing (60,5°C, 40s, opakování 29x)
3. Amplifikace - primer extension (72°C, 1min 10s, opakování 29x)
4. Final extension (72°C, 10 minut)

6.4.2.2 Vyhodnocení pomocí elektroforézy

K vyhodnocení výsledků byla použita horizontální gelová elektroforéza. Při ní probíhá agarozovým gelem elektrický proud a tím se jím, ve směru proudu, posouvají úseky DNA, podle jejich hmotnosti, která koresponduje s jejich délkou.

Nejprve je namíchán 0,8 % agarozový gel. K jeho přípravě je nutné nejprve rozpustit v mikrovlnné troubě (T=cca 100 s, P=80 W) agar s příslušným množstvím TBE (Tris-borát-EDTA) pufru. Poté je gel zchlazen pod proudem studené vody a je do něj přidán ethidium bromid (1,5 µl do malé vany, 3 µl do velké vany). Takto namíchaný roztok je nalit do vany, do které jsou následně vloženy hřebeny pro vytvoření rovnoměrných jamek.

Po ztuhnutí gelu jsou hřebeny odebrány a gel i s vanou vložen do elektroforegramu, do kterého je následně dolit running buffer po značku FULL. Do jamek jsou napipetovány vzorky DNA vyndané z termocyklieru (3 µl), smíchané vždy s 1 µl bromfenolové sledovací barvy. Do jedné z jamek je napipetováno 2,5 µl „žebříku“ (DNA standard pro srovnání) a do dalších dvou až třech jamek jsou napipetovány kontroly, jedna negativní (dH₂O) a nejlépe dvě pozitivní (jeden samec a jedna samice). Elektroforegram je zavřen, zapojen a spuštěn (T=35 min, U=110 V).

Po ukončení elektroforézy je gel vyndán z elektroforegramu a opatrně předán do čtecího zařízení, kde jsou pomocí UV světla zobrazeny výsledky. Právě prosvícení gelu UV světlem a přítomnost ethidium bromidu, který se dostane do struktury DNA, nám umožní vidět rozřídění úseků DNA podle velikosti (Jones et al. 1998).

Pohlaví bylo rozpoznáno na základě amplifikace jednoho z intronů genu CDH1. Ten se u ptáků liší velikostí chromozomů W a Z. U samic se zobrazují CDH1W fragmenty ve velikosti 1,2 kb a CDH1Z fragmenty o velikosti 0,7 kb. Samci jsou charakterističtí zobrazením pouze kratšího fragmentu CDH1Z (Hipkiss et al. 2004).

Samička se pod UV světlem ukázala jako dva viditelné proužky, u samečků byl rozpoznán pouze jeden proužek (Příloha 1).

6.4.3 Zjištění přítomnosti parazitů

Parazité jsou stejně, jako pohlaví zjišťováni pomocí PCR analýzy. Pro zjištění parazitů jsou však třeba dvě fáze. První je iniciální PCR a další reakcí je nested PCR.

Testovány byly vzorky s izolovanou DNA. Každý vzorek byl testován nejméně dvakrát a vždy byla testována jedna negativní kontrola (dH₂O) a jedna pozitivní.

Výsledky byly vyhodnoceny za použití horizontální gelové elektroforézy a následného prosvícení gelu pod UV světlem.

6.4.3.1 Iniciální PCR

V této fázi analýzy se postupuje dle pokynů v návodu k QIAGEN Multiplex PCR kitu, který obsahuje HotStarTaq DNA polymerázu a PCR pufr.

K iniciální PCR jsou využity vnější primery Haem NF1 a Haem NR3, amplifikující počáteční bázový úsek genu pro cytochrom b u všech tří rodů řádu hemosporid (rod *Plasmodium*, *Haemoproteus* a *Leucocytozoon*). Primer Haem NF1

amplifikuje úsek [5'- CATATATTAAGAGAAITATGGAG-3'] a primer Haem NR3 úsek [5'- ATAGAAAGATAAGAAATACCATTC-3'] (Hellgren 2004).

Nejprve je namíchán premix z následujících chemikálií: QIAGEN MM multiplex MIX (mastermix), primer Haem NF1 a primer Haem NF3. Chemikálie jsou v premixu obsaženy v poměru 50:5:5. Do předem označených stripů je nepipetováno vždy 6 μ l premixu a 4 μ l izolované DNA. Pro některé vzorky se ukázalo vhodnější testovat také směs 6 μ l premixu + 2 μ l DNA +2 μ l dH₂O. Takto nepipetované stripy jsou vloženy do nastaveného termocykleru.

Fáze iniciální PCR analýzy (nastavení termocykleru) :

1. Hot start (95 °C, 15 min)
2. Denaturace (94 °C, 30 s)
3. Annealing (50 °C, 90 s)
4. Amplifikace - extension (72 °C, 45 s)
5. Návrat ke 2. kroku a opakování 19x
6. Konečná amplifikace - final extension(72 °C, 10 min)
7. Zchlazení na cca 15 °C, čas neomezený...

Po skončení iniciální PCR do stripů přidáme 90 μ l dH₂O (naředíme v poměru 1:9).

6.4.3.2 Nested PCR

Pro nested analýzu se využívá vnitřních primerů Haem FL a Haem R2L, amplifikujících konkrétně bázevé úseky mitochondriální DNA rodu *Leucocytozoon*. Primer Haem FL cílí na úsek [5'- ATGGTGTTTTAGATACTT ACATT-3'] a primer Haem R2L na úsek [5'-CATTATCTGGATGAGATAATGGIG C-3'] (Hellgren 2004).

Pro namíchání premixu pro nested analýzu jsou třeba následující chemikálie: PCR pufr, dNTP (naředěná v poměru 1:49), primery Haem FL a Haem R2L (naředěné v poměru 1:9), Tq (polymeráza) a dH₂O. Tyto chemikálie jsou v premixu obsaženy v poměru 3:3:2:2:0,1:9,9. Polymeráza se přidává až na konec, poté už se premix nevertexuje, jen mírně promíchá.

Do označených stripů se nepipetuje vždy 20 μ l premixu a 10 μ l templátu (naředěný produkt iniciální PCR). Takto připravené stripy se vkládají do připraveného termocykleru.

Fáze nested PCR (nastavení termocykleru):

1. 94 °C, 3 min
2. Denaturace (94 °C, 30 s)
3. Annealing (50 °C, 30 s)
4. Amplifikace - extension (72 °C, 45 s)
5. Návrat ke 2. kroku a opakování 34x
6. Konečná amplifikace - final extension (72 °C, 10 min)
7. Zchlazení na 15 °C na neomezenou dobu

Po vyjmutí z termocykleru jsou vzorky uloženy do lednice a následně do mrazáku.

6.4.3.3 Vyhodnocení pomocí elektroforézy

K vyhodnocení produktů PCR analýzy byla použita horizontální gelová elektroforéza, která proběhla v 0,8 % agarozovém gelu. Do každé jamky byly napipetovány 3 μ l DNA (produkt po nested PCR) smíchané s 1 μ l loading bufferu (bromfenolová sledovací barva). Do jedné z jamek bylo napipetováno 2,5 μ l žebříku (DNA standard pro srovnání) a do dalších dvou negativní (dH₂O) a pozitivní kontroly.

Po naplnění gelu byl elektroforegram zapnut na 110 V na 35 minut. Po proběhnutí elektroforézy byl gel opatrně přendán pod UV světlo a prosvícen. Pozitivní výsledek se pod UV světlem ukázal v podobě jednoho proužku, u negativního výsledku nebyl vidět proužek žádný (Příloha 2).

6.5 Statistické analýzy

Všichni jedinci, kterým byla odebrána krev, byli rozřazeni podle příslušnosti k budce a jednotlivým kategoriím (mládě/dospělec, dospělý samec/dospělá samice, juvenilní samec/juvenilní samice). Míra parazitace na každé budce byla poté vyjádřena, jako podíl parazitovaných jedinců ke všem jedincům (v dané kategorii) na budce vyjádřený v procentech (Příloha 3).

Data byla statisticky zpracována v programu R Studio. Nejprve byla otestována normalita dat. K testu normality dat byl použit Shapiro-Wilk test (funkce `shapiro.test`). Rozdělení dat bylo odlišné od normálního, k testování hypotéz byl tedy použit neparametrický Mann-Whitney test (funkce `wilcox.test`), který testuje nulovou hypotézu, že rozdělení pravděpodobností je u obou testovaných vzorků stejné. Přitom zde nepředpokládáme normální rozdělení dat. Konkrétně byly testovány tyto nulové hypotézy: H_0 : přítomnost parazitů nezávisí na věku jedince, H_0 : přítomnost parazitů u dospělců nezávisí na pohlaví jedince a H_0 : přítomnost parazitů u mláďat nezávisí na pohlaví jedince.

7. Výsledky práce

7.1 Potravní nabídka

Celkem bylo v roce 2017 odchyceno 133 drobných zemních savců (7,32 exponátů/100 past'onocí). Nejčastější výskyt byl zaznamenán u myšice lesní (*Apodemus flavicollis*). Celkem bylo odchyceno 68 kusů tohoto druhu (tj. 51,1 % z celkového množství odchycených jedinců). Dále byl hojně zastoupen norník rudý (*Clethrionomys glareolus*) (47 ks, 35,3 %). Mezi odchycenými druhy byl také rejsek malý (*Sorex minutus*) (6ks, 4,5 %) a hraboš mokřadní (*Microtus agrestis*) (2ks, 1,5 %) (Tab. 1).

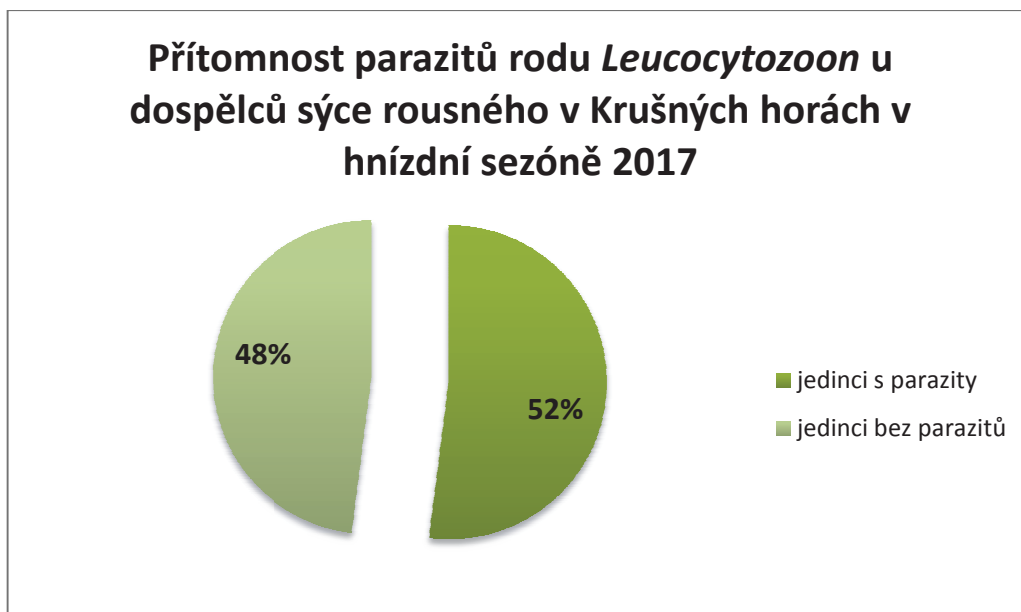
ROK	Hraboš mokřadní	Norník rudý	Myšice lesní	Rejsek obecný	Rejsek malý	celkem
2017	<i>Microtus agrestis</i>	<i>Clethrionomys glareolus</i>	<i>Apodemus flavicollis</i>	<i>Sorex araneus</i>	<i>Sorex minutus</i>	
Jarní odchyty	1	14	40	1	0	56
Podzimní odchyty	1	33	28	9	6	77
Celkový součet	2	47	68	10	6	133
Podíl v %	1,5	35,33	51,12	7,51	4,51	100

Tabulka 1: Potravní nabídka sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách v roce 2017

7.2 Přítomnost parazitů

Celkem byla krev v sezóně 2017 odebrána 25 dospělým jedincům a 71 mlád'atům sýce rousného (13 mlád'atům jedenkrát, 42 mlád'atům dvakrát, 15 mlád'atům třikrát, 1 mláděti čtyřikrát). Průměrně byla krev mlád'atům odebírána 2,06 krát (SD = 0,67).

Analýza prokázala, že u dospělců se parazité rodu *Leucocytozoon* vyskytují častěji, než u mlád'at (dosažená hladina významnosti testu = 0,04474). Přítomnost parazitů byla prokázána u 16,9 % mlád'at (Obr. 6) a u 52,0 % dospělých jedinců (Obr. 5).



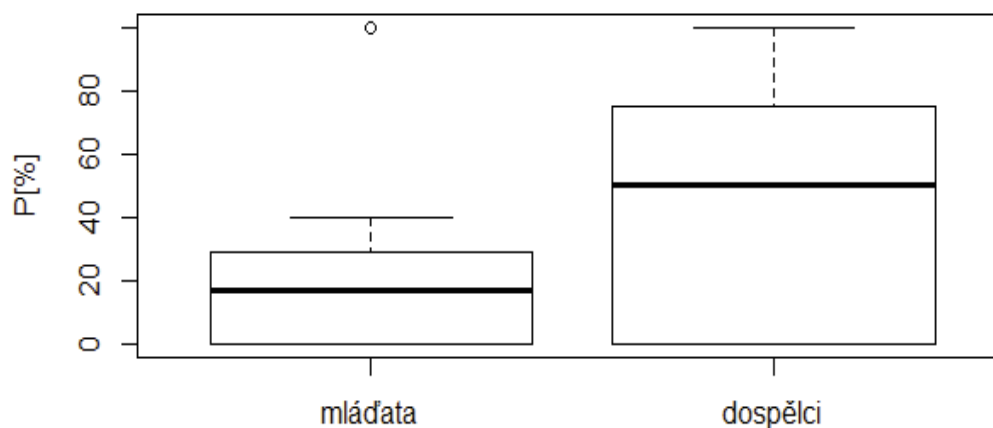
*Obrázek 5: Procentuální zastoupení dospělců, u kterých se potvrdila přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon**



*Obrázek 6: Procentuální zastoupení mláďat, u kterých se potvrdila přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon**

Porovnání míry parazitace u dospělců a mláďat je zobrazeno také na krabicovém grafu (Obr. 7). Střední silnější linie zobrazuje medián (u dospělců = 50 %, u mláďat = 16,7 %) dále jsou na grafu zobrazeny jednotlivé kvartily. Střední „krabicová“ část je zespodu ohraničená 1. kvartilem a shora 3. kvartilem. „Vousy“ vycházející ze středních částí grafu zobrazují rozptyly a samostatné body na okrajích zobrazují odlehlé body.

Přítomnost parazitů u mláďat a dospělců sýce rousného



Obrázek 7: Krabicové grafy porovnávající přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat a dospělců sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách v hnízdní sezóně 2017

Přítomnost parazitů dospělých jedinců nebyla závislá na pohlaví jedince (dosažená hladina významnosti testu = 0,7353). U dospělých jedinců byla přítomnost parazitů detekována u 58,3 % samců (Obr. 8) a 46,2 % samic (Obr. 9).

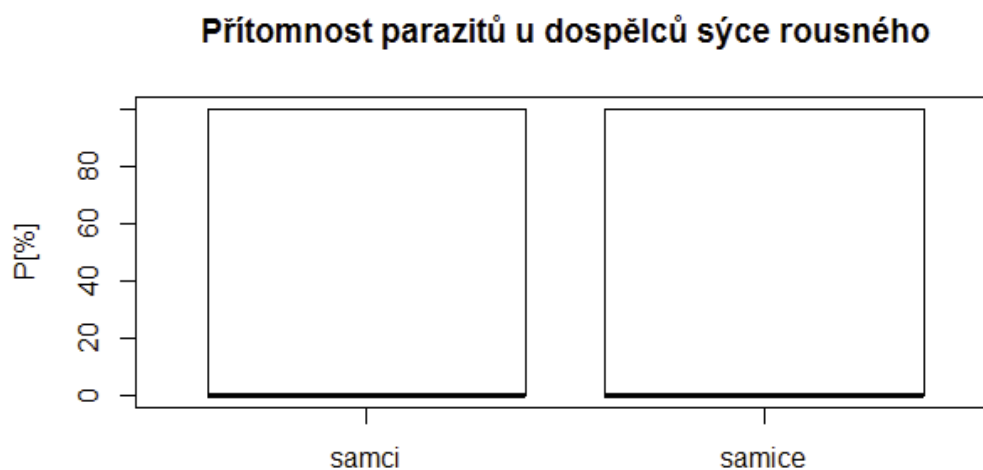


Obrázek 8: Procentuální zastoupení dospělých samců, u kterých se potvrdila přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon*



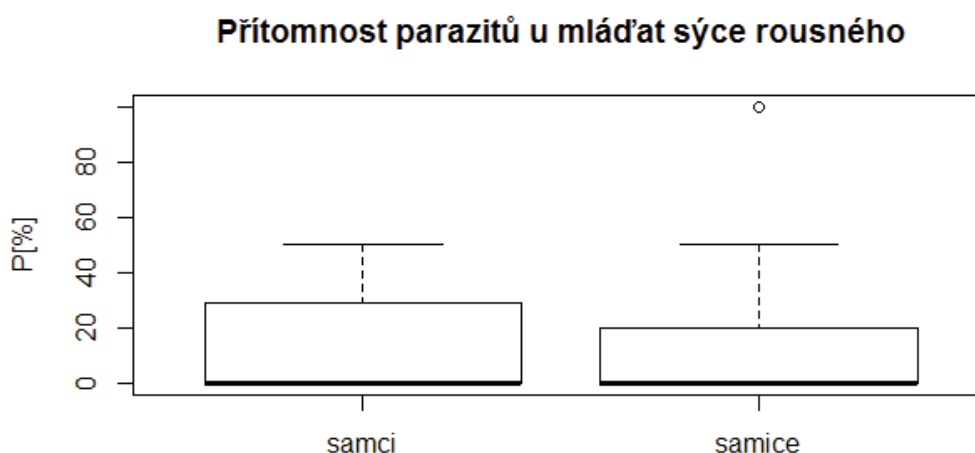
Obrázek 9: Procentuální zastoupení dospělých samic, u kterých se potvrdila přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon*

Na krabicovém grafu jsou zobrazeny mediány (u dospělých samic i samců = 0), rovněž tak rozptyly jsou téměř shodné (Obr. 10).



Obrázek 10: Krabicové grafy porovnávající přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u dospělých samců a samic sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách v hnízdní sezóně 2017

Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* nebyla závislá na pohlaví ani u mlád'at (dosažená hladina významnosti = 0,9591). U mlád'at byla přítomnost parazitů zjištěna u 16,7 % samců a 20,7 % samic. Na krabicovém grafu jsou zobrazeny mediány (opět u obou pohlaví = 0), jednotlivé kvartily a rozptyly (Obr. 11). Nejmladšímu mláděti s parazity bylo v době odběru krve 12 dnů, nejstaršímu 30 dnů. Průměrný věk mlád'at při odběrech byl 19,9 dní (SD = 7,0 dní).



Obrázek 11: Krabicové grafy porovnávající přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u juvenilních samců a samic sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách v hnízdní sezóně 2017

8. Diskuse

Tato bakalářská práce nepotvrdila závislost přítomnosti parazitů rodu *Leucocytozoon* na pohlaví sýce rousného (*Aegolius funereus*). Samci však vykazovali vyšší tendenci k napadení parazity rodu *Leucocytozoon* než samice (58,3 % vs. 46,2 %). Naopak byla zjištěna závislost výskytu parazitů na věku hostitele. Celkem bylo zkoumáno 25 dospělců, z nichž u 13 (52,0 %) byla zjištěna přítomnost parazitů. U mláďat byla prokázána pouze u 12 (16,9 %) z celkového množství 71 jedinců. Mláďatům byla krev odebírána vícekrát, přičemž v 7 případech (9,9 %) byla přítomnost parazitů zjištěna až při druhém, tedy pozdějším, odběru.

Výsledky této práce se shodují s diplomovou prací Mahlerové (2017), ve které byla zkoumána přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách v hnízdních sezónách 2015, 2016. Výsledky této práce zjistily přítomnost parazitů u 53 % dospělců a 1,5 % mláďat sýce rousného. Patrná odlišnost ve zjištěných procentech u mláďat může být způsobena tím, že v práci Mahlerové (2017) byla krev mláďatům odebírána dvakrát pouze 26 jedincům, z celkového počtu $n=138$. Další odlišností také je, že mláďata v práci Mahlerové (2017) byla při odběrech celkově mladší, než v této práci (průměrný věk při prvním odběru 11,7 dní, $SD = 3,4$). V mé práci byl průměrný věk mláďat při odběru 19,9 dní ($SD = 7,0$ dní). Výsledky obou prací se shodují také v nepotvrzení závislosti přítomnosti parazitů na pohlaví hostitele.

Studie Synka et al. (2015) zjistila přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* v 71 % případů adultních jedinců. U mláďat byla v této studii zjištěna přítomnost parazitů u 41 % zkoumaných juvenilních jedinců. V článku Synka et al. (2015) bylo nejmladšímu infikovanému mláděti 16 dní. V mé práci však bylo mláďatům při prvních odběrech průměrně 14 dní a nejmladšímu infikovanému mláděti bylo 12 dní. Věk parazitovaných mláďat se pohyboval pod hranicí 16 dní ve dvou případech (pouze 2,8 % z celkového počtu 71 mláďat). Průměrně pak bylo infikovaným mláďatům 22,5 dne, což je ve shodě se studií Synka et al. (2015).

Naopak Korpimäki et al. (1993), který se zabýval studiem sýce rousného a jeho parazitů ve Finsku, neshledává věk nakažení mláděte rozhodujícím faktorem. V jeho studii bylo však zkoumáno velmi malé množství jedinců ($n =$

12) a u žádného z nich nebyla přítomnost parazitů prokázána. Korpimäkiho et al. (1993) studie však prokázala přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u některých dospělců. Tím také dokazuje rozdíl v přítomnosti parazitů u juvenilních a adultních jedinců, stejně jako tato bakalářská práce.

Navzdory tomu, co víme o vztazích mezi ptačími hostiteli a hmyzem, jsou vektory malárie ptáků mnohem méně studovány než jejich ptačí protějšky (Larson et al. 2017). Většina studií zabývajících se ptačí malárií je zaměřena na jejich hostitele, velmi málo se jich ale věnuje jejich vektorům, tedy hmyzu (Kim et al. 2009). Do budoucna je tedy třeba prohlubovat znalosti o parazitech a především jejich vektorech a hostitelích. A sledovat také možný vliv environmentálních faktorů, především množství dostupné potravy a doby zahnízdění, na výskyt parazitů.

9. Závěr a přínos práce

Tato bakalářská práce měla za cíl zjistit přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u dospělců a mlád'at sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách a závislost jejich přítomnosti na věku a pohlaví jedinců. Pohlaví mlád'at bylo určeno analýzou krevních vzorků v laboratoři za použití metody PCR. Pro zjištění přítomnosti parazitů byla použita metodika dle Hellgrena et al. (2004) pro nested PCR. V práci je také uvedena podrobná metodika, podle které je možné postup kdykoli zopakovat.

Z analyzovaných výsledků byla zjištěna přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u 13 dospělců ($n = 25$) a 12 mlád'at ($n = 71$). U dospělců byla zjištěná přítomnost parazitů (52,0 %) vyšší, než u mlád'at (16,9 %). Provedené analýzy prokázaly vliv věku na přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u sýce rousného. Naopak nebyla zjištěna závislost na pohlaví jedinců.

Tato bakalářská práce mi poskytla velké množství nových znalostí a zkušeností v práci v laboratoři, ale také v terénu. Do budoucna bych tyto poznatky ráda rozšířila. Především bych se ráda zabývala vlivem okolního prostředí na přítomnost parazitů.

10. Přehled literatury a použitých zdrojů

- Bejček V., Šťastný K., 2006:** Encyklopedie ptáci. Rebo productions. Dobřejovice.
- Drdáková - Zárybnická M., Zárybnický J., 2003:** Noční aktivita samice sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách: předběžné výsledky. Zoologické dny Brno 2003, Sborník abstraktů z konference 13.-14. února 2003: 137-138.
- Drdáková - Zárybnická M., 2003:** Hnízdní biologie sýce rousného (*Aegolius funereus*) v imisních oblastech Krušných hor. *Sylvia* 39: 35-51.
- Drdáková - Zárybnická M., 2005:** Růst mlád'at sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách. *BUTEO* 14: 37-50.
- Drdková-Zárybnická M., 2004:** Sýc rousný-úspěšný druh imisních holin. *Živa* 3: 128-130.
- Fridolfsson A. K., Ellegren H., 1999:** A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *Journal of avian biology* 30: 116-12. 1999.
- Hakkarienen 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.
- 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.
- Hudec K., Šťastný K., 2005:** Fauna ČR Ptáci 2/II. Akademie věd České republiky. Praha.
- Jones A., Reed R., Weyers J., 1998:** Practical skills in biology. Longman. Harlow.
- 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., Hakkarainen H., 2012:** The Boreal Owl. Ecology, Behaviour and conservation of a Forest-Dwelling predator. Cambridge University Press, Cambridge.
- Korpimäki, E., 1988:** Diet of breeding Tengmalm's Owls *Aegolius funereus*: long-term changes and year-to-year variation under cyclic food conditions. *Ornis Fenn* 65:21-30.

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., 1981: On the ecology and biology of Tengmalm's Owl *Aegolius funereus* in southern Ostrobothnia and Soumenselkä, western Finland. *Biol* 13: 1-84.

Kouba M., Bartoš L., Šťastný K., 2015. Factors Affecting the Duration of Nestling Period and Fledging Order in Tengmalm's Owl (*Aegolius funereus*): Effect of Wing Length and Hatching Sequence. *PLoS ONE* 10(3): e0121641. doi:10.0121371/journal.pone.0121641.

Kouba M., Bartoš L., Zárybnická M., 2014: Perching of Tengmalm's Owl (*Aegolius funereus*) Nestlings at the Nest Box Entrance: Effect of Time of the Day, Age, Wing Length and Body Weight. *PLoS ONE* 9(5): e97504. doi:10.1371/journal.pone.0097504.

Larson D. A., Goddard J., Outlow D. C., 2017: Mosquito Vectors of Avian Malaria in Mississippi: A First Look. *Journal of Parasitology*: 683-691.

Mahlerová K., 2017: Přítomnost parazitů rodu *Leucocytozoon* u mláďat a dospělců sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách."nepublikováno". Diplomová práce FŽP ČZU v Praze: "Dep.: Česká zemědělská universita"

Morii T., 1992: A review of *Leucocytozoon caulleryi* infection in chickens. *Journal of protozoology research*. Říjen 1992, stránky 128-133.

Nagao E., Arie T., Dorward D. W., Fairhurst R. M., Dvorak J. A., 2008: The avian malaria parasite *Plasmodium gallinaceum* causes marked structural changes on the surface of its host erythrocyte. *Journal of Structural Biology* 162: 460-467. 2008.

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

R Core Team 2017: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Slater L. B., 2005: Malarial Birds: Modeling Infectious Human Disease in Animals. *Bulletin of the History of Medicine* 79: 261-294.

Směrnice Evropského parlamentu a rady č. 2009/147/ES z 30. listopadu 2009 o ochraně volně žijících ptáků (kodifikované znění).

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.

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 2017-3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 18 April 2018

Valkiunas G., 2005: Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press. New York.

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.

Zárybnická M. 2008: Cirkadiánní aktivita sýce rousného (*Aegolius funereus*) v Krušných horách: efekt rozdílných rodičovských rolí. *Sylvia* 44: 51-61.

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.

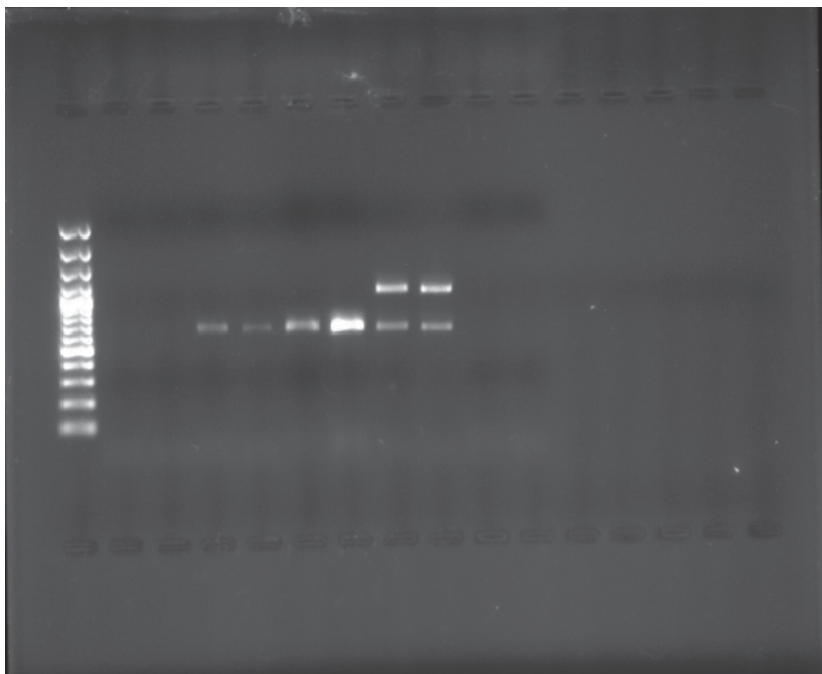
Zárybnická M., a další. 2015: Fledgling Productivity in Relation to Diet Composition of Tengmalm's Owl *Aegolius funereus* in Central Europe. *Ardeola* 62: 163-171.

Zárybnická M., Reigert J., Kouba M., 2015: Indirect food web interactions affect predation of Tengmalm's Owls *Aegolius funereus* nests by PineMartens *Martes martes* according to the alternativeprey hypothesis. *International journal of avian science* 157: 459-467.

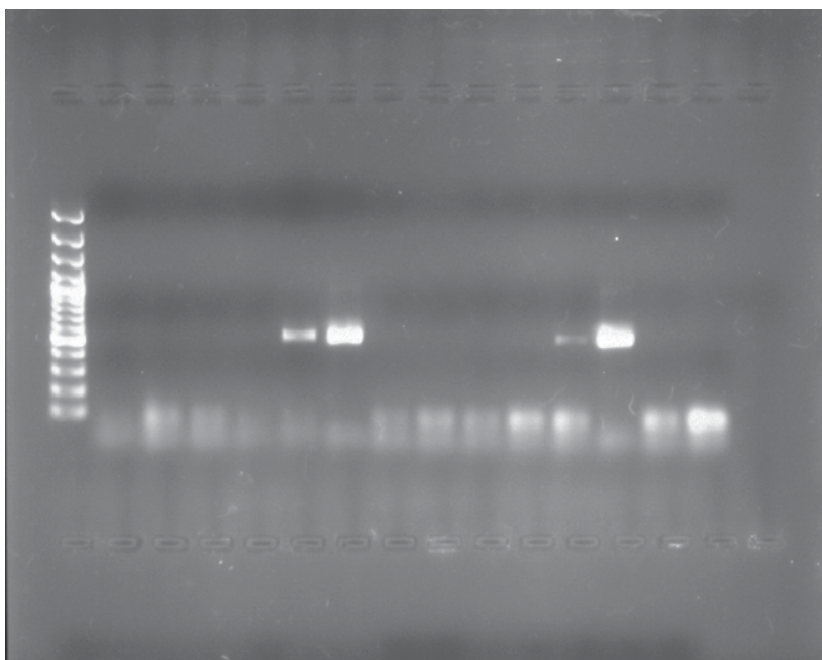
11. Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Samice sýce rousného (<i>Aegolius funereus</i>) na hnízdě (foto: Jiří Šindelář 2017).	12
Obrázek 2: Mláďata sýce rousného (<i>Aegolius funereus</i>) (foto: Jiří Šindelář 2017). 13	
Obrázek 3: Mapa rozšíření sýce rousného (<i>Aegolius funereus</i>) ve světě (http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=22689362 , 2018)	14
Obrázek 4: Odběr krve z brachiální žíly sýce rousného (<i>Aegolius funereus</i>) (foto: Zárybnická 2014)	21
Obrázek 5: Procentuální zastoupení dospělců, u kterých se potvrdila přítomnost parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i>	29
Obrázek 6: Procentuální zastoupení mláďat, u kterých se potvrdila přítomnost parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i>	29
Obrázek 7: Krabicové grafy porovnávající přítomnost parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i> u mláďat a dospělců sýce rousného (<i>Aegolius funereus</i>) v Krušných horách v hnízdní sezóně 2017	30
Obrázek 8: Procentuální zastoupení dospělých samců, u kterých se potvrdila přítomnost parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i>	30
Obrázek 9: Procentuální zastoupení dospělých samic, u kterých se potvrdila přítomnost parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i>	31
Obrázek 10: Krabicové grafy porovnávající přítomnost parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i> u dospělých samců a samic sýce rousného (<i>Aegolius funereus</i>) v Krušných horách v hnízdní sezóně 2017	31
Obrázek 11: Krabicové grafy porovnávající přítomnost parazitů rodu <i>Leucocytozoon</i> u juvenilních samců a samic sýce rousného (<i>Aegolius funereus</i>) v Krušných horách v hnízdní sezóně 2017	32
Tabulka 1: Potravní nabídka sýce rousného (<i>Aegolius funereus</i>) v Krušných horách v roce 2017	28

12. Přílohy



Příloha 1: Elektrogram ukazující pohlaví mlád'at (foto: Kučerová 2017)



Příloha 2: Výsledný elektrogram ukazující přítomnost parazitů (foto: Kučerová 2017)

budka	juvenil	adult	male	female	male_juv	female_juv	male_adult	female_adult
59	40,00	0,00	33,33	0,00	50,00	0,00	0,00	0,00
848	16,67	50,00	25,00	0,00	33,33	0,00	100,00	0,00
1309	0,00	100,00	11,11	11,11	0,00	0,00	100,00	100,00
1325	33,33	100,00	12,50	37,50	0,00	40,00	100,00	100,00
1340	0,00	100,00	16,67	16,67	0,00	0,00	100,00	100,00
1346	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1381	16,67	50,00	12,50	12,50	0,00	50,00	100,00	0,00
1386	25,00	50,00	20,00	20,00	50,00	0,00	0,00	100,00
1408	0,00	50,00	0,00	20,00	0,00	0,00	0,00	100,00
1413	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1414	25,00	50,00	33,33	0,00	25,00	0,00	100,00	0,00
13107	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
13139	0,00	50,00	16,67	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00
13142	40,00	0,00	16,67	16,67	33,33	50,00	0,00	0,00
13144	100,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00

Příloha 3: Tabulka míry parazitace [%] sýce rousného (*Aegolius funereus*) parazity rodu *Leucocytozoon* v Krušných horách v roce 2017.