

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Fylogenetické vztahy kokcidií rodu *Eimeria*
a *Isospora* u hlodavců z podčeledi Arvicolinae**

Bakalářská práce

Aneta Hoblíková

Školitel: MVDr. Jana Kvičerová, Ph.D.

Školitel specialista: prof. RNDr. Václav Hypša, CSc.

České Budějovice 2015

Hoblíková, A., 2015: Fylogenetické vztahy kokcidií rodu *Eimeria* a *Isospora* u hlodavců z podčeledi Arvicolinae. [Phylogenetic relationships of *Eimeria* and *Isospora* parasitizing rodents of subfamily Arvicolinae. Bc. Thesis, in Czech.] – 66p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Phylogenetic relationships of *Eimeria* and *Isospora* infecting rodents of subfamily Arvicolinae were analysed. The study was based on the nuclear SSU and mitochondrial COI genes. Field collections, parasitological examination of samples, microscopy, DNA extraction, PCR and computational analyses were employed in the course of this study.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 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.

V Českých Budějovicích dne 23. 4. 2015

Největší poděkování patří mé školitelce MVDr. Janě Kvičarové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce. Také děkuji prof. RNDr. Václavu Hypšovi, CSc. za poznámky a cenné rady. Dále děkuji Mgr. Jakubu Vlčkovi, Mgr. Anně Mácové a Mgr. Emě Hrouzkové, Ph.D. za velice přínosné vzorky z Ruska, Francie a Bulharska. Rodině a přátelům děkuji za podporu a trpělivost.

Tato práce byla podpořena grantem GA ČR, P505/12/1620.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
1.1. Fylogeneze kokcií	1
1.2. Hostitelská specifita kokcií.....	3
1.3. Biologie a taxonomie kokcií.....	4
1.4. Životní cyklus kokcií.....	5
1.4.1. Merogonie.....	5
1.4.2. Gametogonie.....	6
1.4.3. Sporogonie.....	6
1.4.4. Excystace	6
1.5. Determinace kokcií	7
1.5.1. Rod <i>Eimeria</i> Schneider, 1875.....	9
1.5.2. Rod <i>Isospora</i> Schneider, 1881 a <i>Cystoisospora</i> Frenkel, 1977.....	11
1.6. Vybraní hlodavci jako hostitelé kokcií.....	11
1.6.1. Podčeleď Arvicolinae (hrabošoviti).....	12
2. CÍLE PRÁCE.....	22
3. METODIKA	23
3.1. Odchyty hlodavců	23
3.2. Identifikace hlodavců	23
3.3. Odběr biologického materiálu.....	23
3.4. Koprologické vyšetření	23
3.5. Izolace DNA kokcií.....	24
3.5.1. Příprava vzorku před izolací.....	24
3.5.2. Izolace DNA	24
3.6. Molekulární identifikace hostitelů	25
3.7. Geny použité pro fylogenetické analýzy kokcií, primery, PCR	25

3.8.	Sekvenace, úprava a zpracování sekvencí	26
3.9.	Fylogenetické analýzy	27
3.9.1.	Alignment	27
3.9.2.	Rekonstrukce fylogenetických vztahů.....	27
4.	VÝSLEDKY	28
4.1.	Lokality odchyty hlodavců	28
4.1.1.	Odchyty v ČR	28
4.1.2.	Odchyty v zahraničí	30
4.1.3.	Molekulární identifikace hlodavců	33
4.1.4.	Vyšetření trusu hrabošovitých hlodavců	33
4.2.	Sekvenace	34
4.3.	Fylogenetické analýzy	36
4.3.1.	Gen pro malou jadernou podjednotku	36
4.3.2.	Mitochondriální gen pro cytochrom c oxidázu I.....	39
5.	DISKUZE	41
5.1.	Odchycení hlodavci z podčeledi Arvicolinae	41
5.2.	Infekce odchycených hlodavců kokciemi.....	41
5.3.	Fylogenetické analýzy	42
6.	ZÁVĚR.....	44
7.	POUŽITÉ ZDROJE	45
7.1.	Odborné publikace	45
7.2.	Internetové zdroje.....	52
8.	PŘÍLOHY	54

1. ÚVOD

S nástupem molekulární fylogenetiky musela být přehodnocena taxonomie řady parazitických skupin. Do té doby byla taxonomie založena především na morfologických znacích, případně životních cyklech parazitů, a spektru jejich hostitelů. Molekulární studie však prokázaly zjevnou flexibilitu biologických vlastností, které byly dříve běžně využívány jako taxonomické markery (Relman a kol., 1996; Barta a kol., 2005; Kvičerová a kol., 2008). Většina studií je navíc dosud stále zaměřena na hospodářsky a lékařsky významné skupiny, a tak velké množství méně významných, avšak zajímavých druhů a rodů, zůstává opomíjeno. Důsledkem těchto nových poznatků jsou nejen provedené a očekávané taxonomické revize, ale také v mnoha případech zcela nový pohled na původ a evoluční historii některých skupin (včetně reinterpretace koevolučních vztahů a významu hostitelské specifity) (Carreno a kol., 1999; Tenter a kol., 2002; Moore a kol., 2008; Adl a kol., 2012; Kvičerová a Hypša, 2013; Kvičerová a kol., 2014).

První molekulárně-fylogenetické studie v oblasti parazitologie byly založeny především na fylogenetických analýzách jediného genu, nejčastěji se jednalo o malou jadernou podjednotku. Další analýzy ale prokázaly, že tento gen je značně konzervativní, a nehodí se proto pro rekonstrukci fylogenetických vztahů blízké příbuzných druhů. Naopak protein-kódující geny prokázaly mnohem větší variabilitu. Nicméně analýza jediného genu nemusí poskytnout dostatek informací. Kombinované analýzy několika genů ukázaly více informací o evoluční historii či vnitřní genetické struktuře parazitů (Tenter a kol., 2002).

1.1. Fylogeneze kokcií

Apicomplexa jsou v současné době považována za monofyletickou skupinu (Barta a kol., 1991; Jablonski a kol., 1996). Molekulární studie této skupiny jsou zaměřeny především na lékařsky a veterinárně významné patogeny (Morrison a kol., 2004; Kvičerová a kol., 2008). Poté, co bylo prokázáno, že rod *Cryptosporidium* je blízké příbuzný gregarinám (Carreno a kol., 1999), můžeme říci, že i skupina Coccidia je monofyletická (Morrison a Ellis, 1997). Čeleď Eimeriidae už však monofyletická není, jak dokazují molekulárně-fylogenetické studie. Kokcidie rodu *Eimeria* klastrují do několika hostitelsky specifických linií (např. drůbeží linie, králičí linie, či linie eimerií parazitujících u skotu) (Barta a kol., 1997; Morrison a kol., 2004; Kvičerová a kol., 2008). Navíc se mezi tyto linie řadí i rod *Cyclospora*, který je morfologicky zcela odlišný (oocysta obsahuje pouze 2 sporocysty, v každé 2 sporozoity), a parazituje

zejména u primátů a člověka (Relman a kol., 1996; Pieniazek a Herwaldt, 1997; Morrison a kol., 2004; Matsubayashi a kol., 2005).

Dlouho se předpokládalo, že hlodavčí eimerie tvoří dvě oddělené, vzájemně nepřibuzné linie (Duszynski, 2001a, b; Morrison a kol., 2004; Matsubayashi a kol., 2005). Zhao a Duszynski (2000a, b) fylogeneticky analyzovali několik druhů hlodavčích eimerií. Pro první studii (2001a) použili plastidový gen pro ORF470 a jaderný gen pro 18S rRNA. Zjistili, že zkoumané hlodavčí eimerie se rozdělily do dvou samostatných linií. Zdálo se, že morfologická podobnost vysporulovaných oocyst kokcií významněji odráží jejich evoluční příbuznost než hostitelská specifita. V případě druhé studie (2001b) použili plastidový gen pro 23S rRNA a opět gen pro 18S rRNA. Tato studie však již předchozí hypotézu nepotvrdila, jelikož v ní bylo použito více druhů hlodavčích eimerií, které již ve tvaru a velikosti oocysty vykazovaly jistou variabilitu. V obou studiích byly tedy kokcie rozděleny na základě molekulárně-fylogenetických analýz do dvou linií. Eimerie z linie A vykazovaly menší variabilitu ve tvaru i velikosti oocyst, než eimerie z linie B. Obsahovaly reziduum oocysty a 1-2 polární granula. Oocysty eimerií linie B byly velmi variabilní, co se týče tvaru a velikosti, a především postrádaly reziduum. Přítomnost rezidua oocysty byla tedy klíčovým znakem, který rozdělil tyto dvě linie. Podobný fenomén byl pozorován i u eimerií králíků. Kvičarová a kol. (2008) analyzovali sekvence malé jaderné podjednotky všech dosud popsáných druhů králíčních eimerií. Fylogenetická analýza tyto eimerie rozdělila do dvou sesterských linií na základě přítomnosti či absence rezidua oocysty. Korelace ostatních morfologických či biologických charakteristik s výslednou fylogenezí nebyla prokázána. Existence pouhých dvou linií hlodavčích eimerií však byla později přehodnocena rozšířením datasetu analyzovaných sekvencí o další druhy eimerií parazitující u různých rodů a čeledí hlodavců (Kvičarová a kol., 2011; Kvičarová a Hypša, 2013).

Fylogenetické postavení isospor bylo původně založeno především na morfologii oocyst a životním cyklu, a tak byl tento taxon tradičně řazen do skupiny Eimeriidae. Nedávné studie však ukázaly, že rod *Isospora* není monofyletický, ale parafyletický. Četné fylogenetické analýzy odhalily, že všechny dosud osekvenované isospory parazitující u savců (*Cystoisospora belli*, *C. felis*, *C. ohioensis*, *C. orlovi*, *C. rivolta*, *C. suis*, *C. timoni*) jsou blízce příbuzné rodům *Toxoplasma*, *Neospora*, *Hammondia*, *Besnoitia* a *Sarcocystis*, tedy rodům zastupujícím čel' Sarcocystidae. Na základě těchto výsledků byly všechny savčí isospory (tj. i ty, které dosud nebyly osekvenovány) přesunuty mezi Sarcocystidae a přejmenovány na rod *Cystoisospora*

(Carreno a kol., 1998; Carreno a Barta, 1999; Morrison a kol., 2004; Barta a kol., 2005; Samarasinghe a kol., 2008). Carreno a kol. (1998) původně navrhovali přeřadit celý rod *Isospora* mezi Sarcocystidae, a to na základě molekulární analýzy pouhých 3 savčích isospor. Další studie ale prokázaly, že isospory parazitující u ptáků jsou naopak blíže příbuzné kokcidiím rodu *Eimeria*. Proto Barta a kol. (2005) navrhli rozdělit rod *Isospora* na rod *Cystoisospora* patřící mezi Sarcocystidae, a rod *Isospora* náležící ke skupině Eimeriidae (Carreno a kol., 1998; Carreno a Barta, 1999; Franzen a kol., 2000; Duszynski a Upton, 2001; Morrison a kol., 2004; Volf a kol., 2007; Samarasinghe a kol., 2008).

1.2. Hostitelská specifita kokcií

Hostitelskou specifitou se rozumí schopnost parazita infikovat určité spektrum hostitelů a úspěšně v nich dokončit svůj vývoj. Rozlišujeme úzkou (stenoxenní) a širokou (euryxenní) specifitu. Kokcidie s monoxenním životním cyklem jsou zpravidla vysoce hostitelsky specifické. U heteroxenních kokcií tomu bývá naopak, jelikož životní cyklus zahrnuje i mezihostitele, čímž se hostitelská specifita může značně rozšiřovat. Například *Toxoplasma gondii* disponuje velmi širokou hostitelskou specifitou, neboť spektrum mezihostitelů zahrnuje téměř všechny savce včetně člověka, a dokonce i některé druhy ptáků. Nejstriktnější případy hostitelské specifity, kdy parazit infikuje pouze jeden hostitelský druh, se ale vyskytují jen velmi vzácně. Hostitelská specifita u rodu *Eimeria* je poměrně úzká. Jeden druh eimerie zpravidla parazituje v rámci jednoho hostitelského rodu. Existují samozřejmě výjimky; např. *Eimeria chinchillae* je schopna infikovat až 14 druhů hlodavců 4 čeledí (De Vos, 1970; Čížková, 2003), *Eimeria arizonensis* 10 druhů hlodavců 2 čeledí (Upton a kol., 1992; Duszynski a Upton, 2001). Kokcidie rodu *Isospora* jsou oproti eimeriím méně hostitelsky specifické. Např. *Cystoisospora rivolta* (syn. *Isospora bigemina*) byla popsána u psovitých, kočkovitých i lasicovitých šelem (Pellérdy, 1974; Levine a Ivens, 1990). Kokcidie rodu *Eimeria* i *Isospora* parazitující u hrabošovitých hlodavců vykazují spíše vyšší hostitelskou specifitu. Nižší hostitelskou specifitou disponuje např. *Eimeria arvicolae*, která parazituje u hryzce vodního (*Arvicola amphibius*), hraboše polního (*Microtus arvalis*) a hraboše sněžného (*Chionomys nivalis*) (Pellérdy, 1974). Mezi další druhy s nižší hostitelskou specifitou patří *E. ochrogasteri*, *E. wenrichi* a *E. saxei*. Tyto druhy parazitují u převážně severoamerických hrabošů (*Microtus californicus*, *M. longicaudus*, *M. mexicanus*, *M. miurus*, *M. oeconomicus*, *M. oregoni*, *M. pennsylvanicus* a *M. xanthognathus*) (Vance a Duszynski, 1985; Duszynski a kol., 2007). Studií týkajících se hostitelské specifity eimerií a isospor u hrabošovitých

hlodavců je velmi málo, proto tvrzení, že jsou tyto kokcidie úzce hostitelsky specifické, nemusí být pravdivé (Pellérdy, 1974; Levine a Ivens, 1990; Duszynski a kol., 2007; Volf a kol., 2007).

Úroveň hostitelské specifity ovlivňuje životaschopnost, fekundita a způsob přenosu parazita. Dále velikost, věk, pohlaví, výživová kondice, chování, nespecifické imunitní mechanismy a genetická výbava hostitele. Dalším faktorem může být prostředí, ve kterém hostitel žije (Joyner, 1982; Duszynski, 1986; Poulin, 2007). Hostitelská specifita eimerií může být také ovlivněna způsobem excystace. Například, obecně se uvádělo, že oocysty eimerií jsou rezistentní vůči působení proteáz. Studie Wiedmera a kol. (2011) ale poukázala na to, že některé eimerie parazitující u hlodavců (*E. falciformis*, *E. nieschulzi*, *E. separata*) nejsou proti trávicím enzymům rezistentní. Pepsin dokáže u těchto druhů narušit stěnu oocysty během několika hodin.

1.3. Biologie a taxonomie kokcidií

Kokcidie jsou jednobuněční parazité patřící mezi výtrusovce (Apicomplexa). Apicomplexa představují významnou heterogenní skupinu obligátních intracelulárních parazitů zahrnující kokcidie, gregariny, hemosporidie, pirospasmy a kryptosporidie (Duszynski a Upton, 2001; Adl a kol., 2012). Charakteristickým znakem této skupiny je přítomnost tzv. apikálního komplexu u jednoho z vývojových stádií, zoitů. Tento komplex je tvořen polárním prstencem, rhopriemi, mikronemy, subpelikulárními mikrotubuly a mikropory. V případě gregarin a kokcidií je charakteristická přítomnost kompletního konoidu, organely lokalizované v přední části zoitu. Struktury apikálního komplexu slouží k usnadnění průniku parazita do hostitelské buňky nebo k fixaci na její povrch.

Kokcidie infikují ve většině případů obratlovce, méně často však i bezobratlé živočichy. Mají ohromný reprodukční potenciál, z jedné oocysty se může vytvořit a vyvinout více než 1 milion nových oocyst (Long, 1982; Volf a kol., 2007). Kromě toho jsou oocysty kokcidií velmi odolné, zničit je lze jen velmi nízkými či naopak velmi vysokými teplotami, nebo působením agresivních chemických látek (Pellérdy, 1974; Levine a Ivens, 1990).

Kokcidie byly jedny z prvních prvoků pozorovaných mikroskopem. Antonie van Leeuwenhoek již v roce 1674 pozoroval oocysty kokcidie jaterní (*E. stiedai*) ve žluči králíka (Duszynski a Upton, 2001). Taxonomie kokcidií prošla v posledních letech řadou změn. Apicomplexa řadíme mezi Alveolata. Alveolata tvoří spolu se skupinami Rhizaria a Stramenopila skupinu SAR (Burki a kol., 2008). Je však nutné zdůraznit, že současné taxonomické zařazení kokcidií (podle Adl a kol., 2012), uvedené níže, je provizorní, neboť

některé skupiny (např. Conoidasida) jsou parafyletické – v budoucnu lze tedy opět očekávat změny:

Eukaryota (Whittaker a Margulis, 1978)

SAR (Burki a kol., 2008)

Alveolata (Cavalier-Smith, 1991)

Apicomplexa (Levine, 1980)

Conoidasida (Levine, 1988)

Coccidia (Leuckart, 1879)

Eucoccidiorida (Leger a Duboscq, 1910)

Eimeriorina (Leger, 1911)

Eimeriidae (Minchin, 1903)

V rámci skupiny Coccidia bylo popsáno velké množství rodů, nejvíce jsou však prostudovány rody *Eimeria*, *Isospora*, *Sarcocystis* a *Toxoplasma*, a to z důvodu svého hospodářského a medicínského významu. Významná je skupina Eimeriidae, kam se řadí 16 rodů. V této skupině bylo dosud popsáno více než 2050 druhů, z toho přes 1700 druhů bylo popsáno jako *Eimeria* a 350 druhů jako *Isospora* (Long, 1982; Duszynski a Upton, 2001).

1.4. Životní cyklus kokcií

Životní cyklus kokcií je založen na střídání pohlavních a nepohlavních generací. Může být homoxenní (Eimeriidae), nebo heteroxenní (Sarcocystidae). Vždy vzniká zygota, ze které se následně vyvíjí oocysta. U homoxenních kokcií čeledi Eimeriidae dělíme vývojový cyklus na 4 fáze: merogonie, gametogonie, sporogonie a excystace (Pellérdy, 1974) (Obr. 1).

1.4.1. Merogonie

Ve stádiu merogonie dochází k nepohlavnímu množení kokcií v parazitoforních vakuolách. Sporozoity se v hostitelské buňce dělí na meronty, ze kterých následně vznikají merozoity napadající další buňky hostitelského organismu. Proces začíná zvětšováním buňky kokcie v parazitoforní vakuole buňky hostitelského organismu, kde dochází k mnohonásobnému dělení jádra parazita. Jádra se následně pohybují směrem k povrchu merontu a vytvářejí se orgány nových parazitů (Černá, 1983). K merogonii dochází zpravidla vícekrát, než dojde k tvorbě pohlavních buněk – gamontů. Každá oocysta může teoreticky

vyprodukovat až 2 520 000 merozoitů, přičemž každý z nich je schopen se vyvinout v makrogametitu či mikrogametitu. Toto číslo ale bývá zpravidla nižší (Long, 1982).

1.4.2. Gametogonie

Tato fáze probíhá, stejně jako merogonie, v trávicím traktu hostitele. V parazitoforních vakuolách v buňkách hostitele dochází k tvorbě makrogametocytů a mikrogametocytů, ze kterých vznikají samičí makro- a samčí mikrogamety. Počet vyvíjejících se mikrogametů převyšuje počet makrogametů. Mikro- a makrogamety se vyvíjejí zvlášť a do kontaktu přicházejí jen v průběhu fekundace. Jakmile dojde k fekundaci, vzniká diploidní zygota, ze které se následně vyvíjí oocysta. Ta poté vypadne z hostitelské buňky, a prostřednictvím exkrementů opouští tělo hostitele. Oocysta je vývojové stadium, které poskytuje ochranu proti mechanickému poškození a dovoluje kokcidiím přežít a zůstat infekční po dlouhou dobu (Pellérdy, 1974; Černá, 1983; Duszynski a Upton, 2001).

1.4.3. Sporogonie

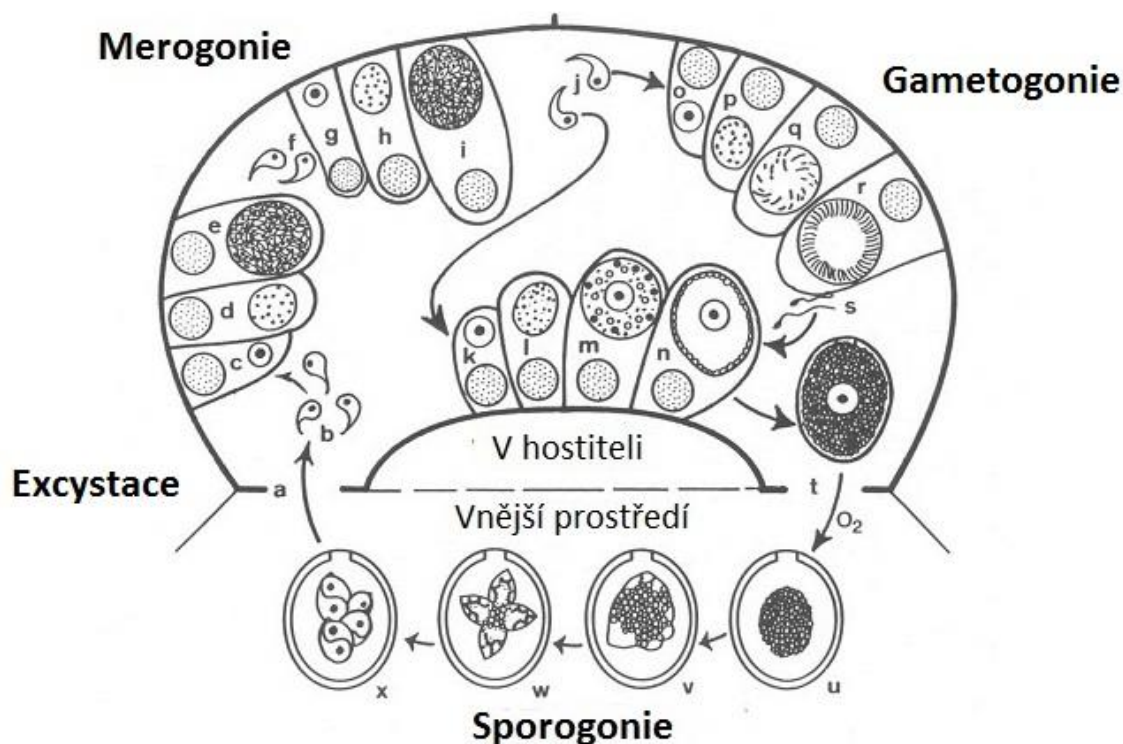
Ke sporogonii (sporulaci), tedy ke tvorbě sporocyst, dochází v oocystě po ukončení gametogonie. Obsah oocysty vyplňuje zprvu celý její vnitřní prostor. Později se obsah oocysty shlukuje do kulovitého útvaru, tzv. sporontu. V další fázi se obsah rozděluje na sporocysty obsahující sporozoity. Počet sporocyst a sporozoitů v oocystě je základním determinacním znakem rodů kokcidií (viz kap. 1.3. Determinace kokcidií). Kokcidie rodu *Eimeria* i *Isospora* vždy sporulují ve vnějším prostředí, mimo hostitelský organismus (Pellérdy, 1974; Long, 1982; Černá, 1983; Duszynski a Upton, 2001) (Obr. 1).

1.4.4. Excystace

V trávicím traktu vhodného hostitele dochází k uvolňování infekčních sporozoitů ze sporocyst, tzv. excystaci. Na uvolňování sporozoitů působí zejména dva faktory, oxid uhličitý a trypsin se žlučí. Oxid uhličitý aktivuje enzymy, které způsobují narušení vnější i vnitřní stěny oocysty. Další látky, trypsin a žluč, ovlivňují především pohyblivost sporozoitů a jejich aktivní únik ze sporocysty. Podstatnými fyzikálními faktory pro úspěšnou excystaci jsou vhodná teplota prostředí (37 - 40 °C) a pH v rozmezí 7,5 – 8,5.

Většina kokcidií je vybavena Stiedovými tělísky, která působí jako zátky na zúžených částech sporocyst. Při excystaci dochází k uvolnění těchto zátek, a sporozoiti se tak dostávají ven ze sporocysty. Jakmile sporozoiti opustí sporocystu a následně i oocystu (prostřednictvím

mikropyle nebo švů na oocystě), penetrují pomocí organel apikálního komplexu (rhoptrie, konoid, mikronemy) do střevních buněk hostitele (většina zástupců rodů *Eimeria* a *Isospora*), nebo jsou dopravováni lymfatickou cestou či krevním řečištěm mimo střevo (např. *Eimeria stiedai*). Poté dochází k merogonii a celý cyklus se opakuje (Pellérdy, 1974; Long, 1982; Černá, 1983; Duszynski a Upton, 2001; Wiedmer a kol., 2011).



Obr. 1: Životní cyklus kokcií rodu *Eimeria* (Duszynski a Upton, 2001).

1.5. Determinace kokcií

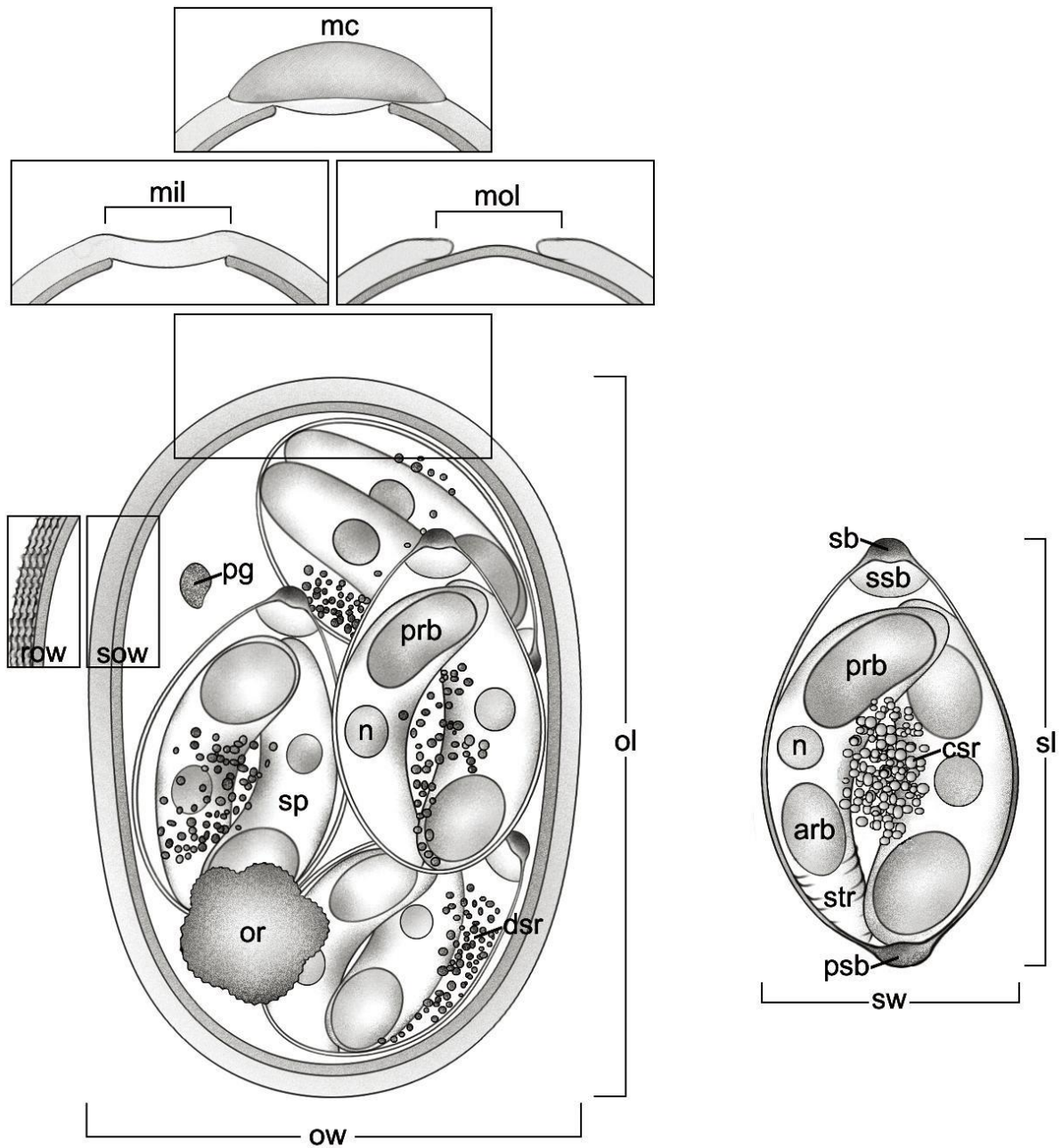
Pro determinaci rodů kokcií je zásadní určení počtu sporocyst v oocystě a počtu sporozoitů v jednotlivých sporocystách. Z toho vyplývá, že pro determinaci používáme jen vysporulované oocysty. Například rod *Eimeria* má 4 sporocysty, přičemž v každé sporocystě jsou 2 sporozoity. U rodu *Isospora* je tomu naopak; v oocystě se nacházejí 2 sporocysty, z nichž každá obsahuje 4 sporozoity. Rod *Cyclospora* má 2 sporocysty, v každé 2 sporozoity. *Caryospora* obsahuje pouze 1 sporocystu s 8 sporozoity. Některé rody (např. *Pfeifferinella*, *Schellackia*, *Tyzzeria*) netvoří sporocystu, ale sporozoiti jsou uvnitř oocysty lokalizováni volně. Rody *Atoxoplasma*, *Besnoitia*, *Cystoisospora*, *Hammondia*, *Hyaloklossia*, *Isospora*, *Neospora*, *Nephroisosporea*, *Sarcocystis* a *Toxoplasma*, tvoří vždy 2 sporocysty po 4 sporozoitech. Rody

Acroeimeria, *Calyptospora* a *Choleoeimeria* tvoří 4 sporocysty po 2 sporozoitech (Long a Joyner, 1984; Duszynski a Upton, 2001; Berto a kol., 2014). Pro determinaci kokcií je také důležitá správná identifikace hostitele. Dále záleží na fázi vývojového cyklu kokcie v hostiteli, lokalitě, kde byl hostitel odchycen, či prevalenci infikovaných jedinců (Levine a Ivens, 1990; Duszynski a Wilber, 1997).

Pro identifikaci druhu kokcie jsou velmi důležité struktury oocysty (morfologie oocysty): Měří se délka a šířka oocysty, délka a šířka sporocysty, a také poměr délky a šířky oocysty (tzv. shape-index ratio, SI) i sporocysty. Měření se provádí minimálně u 30 – 50 vycpovaných oocyst. Tvar oocysty není vždy spolehlivým znakem. Některé oocysty se pod světelným mikroskopem mohou jevit jako kulaté, což může být způsobeno pouze natočením oocysty v zorném poli (Kvičarová a Hypša, 2013). Nicméně některé tvary oocyst jsou specifické, jako např. hruškovitý, cylindrický či lahvovitý. Nejčastější jsou oocysty elipsoidního a ovoidního tvaru. Oocysta může mít hladkou nebo drsnou stěnu, přičemž důležitá je také tloušťka stěny. Některé oocysty mohou mít na stěně i různé výběžky. Stěna oocysty je dvouvrstevná, u nezralých oocyst může být obklopená vnější membránou. Dříve se uvádělo, že stěna oocysty může být i jednovrstevná, nebo tří- či čtyřvrstevná (Duszynski a Wilber, 1997). V současné době je přijímán názor, že „jednovrstevné“ stěny oocyst některých kokcií jsou ve skutečnosti dvouvrstevné, přičemž jedna z vrstev je velmi tenká, že pod světelným mikroskopem nemusí být patrná. Dalším znakem, který může přispět k determinaci kokcií, je barva stěny oocysty. Nicméně, barva může být zkreslena v závislosti na použitém konzervačním činidle, intenzitě světla či výběru filtru použitého při mikroskopování. Důležitou determinační strukturou je přítomnost mikropyle. Mikropyle se může nacházet na vnitřní nebo vnější vrstvě stěny oocysty, může být kryto tzv. pólovou čepičkou, nebo zcela chybět (Obr. 2). Reziduum oocysty představuje poměrně nápadnou strukturu, nacházející se uvnitř oocysty mezi sporocystami. Tato struktura může být kompaktní nebo rozvolněná v podobě granul různého počtu i velikosti. Dalším klíčovým znakem je přítomnost Stiedových a substiedálních tělísek, jejich rozměr a tvar. Vzácnou strukturou u kokcií je parastiedální tělísko. Další determinační strukturou je reziduum sporocysty, které může být opět kompaktní nebo rozvolněné. A nakonec i na sporozoitech je možné pozorovat struktury, které nám mohou usnadnit determinaci kokcií, například refraktilní tělíska, jejich tvar a velikost, umístění jádra či rýhy na sporozoitu (Kheysin, 1972; Pellérdy, 1974; Duszynski a Wilber, 1997; Berto a kol., 2014).

1.5.1. Rod *Eimeria* Schneider, 1875

Je nejpočetnějším rodem celé skupiny Apicomplexa. Zahrnuje více než 1700 popsáných druhů, přičemž se předpokládá, že jejich skutečný počet je daleko vyšší (Duszynski a Upton, 2001). Některé z nich mají velký ekonomický a veterinární význam u hospodářských zvířat. Velmi významné jsou například eimerie drůbeže (*E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. mivati*, *E. necatrix*, *E. tenella*), králíků (*E. stiedai*), prasat (*E. deblickei*) či skotu (*E. zuernii*) (Pellérdy, 1974).



Obr. 2: Vysporulovaná oocysta kokcidie rodu *Eimeria*: ow – šířka oocysty; ol – délka oocysty; pg – polární granulum; or – reziduum oocysty; row – drsná vnější stěna oocysty; sow – hladká vnější stěna oocysty; mil – mikropyle na vnější stěně oocysty; mol – mikropyle na vnitřní stěně oocysty; mc – pólová čepička; sw – šířka sporocysty; sl – délka sporocysty; sb – Stiedovo tělísko; ssb – substiedální tělísko; psb – parastiedální tělísko; csr – kompaktní reziduum sporocysty; dsr – difuzní (rozvolněné) reziduum sporocysty; sp – sporozoit; prb – posteriorní refraktilní tělísko sporozoitu; arb – anteriorní refraktilní tělísko sporozoitu; n – jádro sporozoitu; str – rýhy na sporozoitu (převzato z Berto a kol., 2014).

1.5.2. Rod *Isoospora* Schneider, 1881 a *Cystoisospora* Frenkel, 1977

U kokciíí rodů *Isoospora* bylo popsáno více než 350 druhů, přičemž nejvíce druhů bylo popsáno u ptáků (Duszynski a Upton, 2001). Taxonomie tohoto rodu ještě není zcela objasněna. Dosud byla založena na morfologii oocyst. Na základě fylogenetických analýz však bylo zjištěno, že isosporý parazitující u ptáků jsou blízce příbuzné rodu *Eimeria*, kdežto savčí isosporý jsou blízce příbuzné kokciíím čeledi Sarcocystidae. Proto byl „vzkříšen“ rod *Cystoisospora*, patřící do čeledi Sarcocystidae, kam byly následně přesunuty všechny savčí isosporý (Carreno a kol., 1998; Carreno a Barta, 1999; Morrison a kol., 2004; Barta a kol., 2005; Samarasinghe a kol., 2008).

1.6. Vybraní hlodavci jako hostitelé kokciíí

Hlodavce řadíme mezi placentální savce. Taxonomické členění savců včetně hlodavců prochází neustále řadou změn. Nejvíce změn proběhlo v posledních desítkách let díky rozvoji molekulárních metod a fylogenetiky. V současnosti je popsáno více než 5500 druhů savců. Nejpočetnější skupinou savců jsou hlodavci (Rodentia) (Anděra a Gaisler, 2012).

Taxonomické zařazení hlodavců (Meredith a kol., 2011; www.itis.gov ¹):

Eukaryota (Whittaker a Margulis, 1978)

Unikonta (Cavalier-Smith, 2003)

Opisthokonta (Cavalier-Smith, 1987)

Animalia (Linnaeus, 1758)

Eumetazoa (Butschli, 1910)

Bilateria (Hatschek, 1888)

Deuterostomia (Miller a Harley, 1996)

Chordata (Bateson, 1885)

Vertebrata (Cuvier 1812)

Gnathostomata (Zittel, 1879)

Teleostomi (Bonaparte, 1836)

Sarcopterygii (Romer, 1955)

Tetrapodomorpha (Ahlberg, 1991)

Tetrapoda (Gaffney, 1979)

Amniota (Haeckel, 1866)

Synapsida (Osborn, 1903)

Therapsida (Broom, 1905)

Mammalia (Linnaeus, 1758)

Theria (McKenna a Bell, 1997)

Eutheria (Huxley 1881)

Boreoeutheria (Luo a kol., 2001)

Euarchontoglires (Murphy, 2001)

Glires (Linnaeus, 1758)

Rodentia (Bowdich 1821)

S výjimkou bobra a kapybary se jedná zpravidla o živočichy malé velikosti. Díky tomu, krátké generační době, a relativně velkému počtu mláďat v jednom vrhu jsou hlodavci dobrými modelovými organismy například pro ekologické, populační a fylogenetické studie.

Mezi hlodavce patří 2015 dosud popsáných druhů, přítomnost kokcií byla dosud zjištěna u 280 druhů (13,9 %). Z toho kokcie rodu *Eimeria* jsou zastoupeny 415 druhy, kokcie rodu *Isospora* 40 druhy a kokcie rodu *Cyclospora* pouze jedním druhem (Duszynski a Upton, 2001; Wilson a Reeder, 2005).

1.6.1. Podčeleď Arvicolinae (hrabošovítí)

Tato skupina hlodavců prošla v posledních letech mnoha taxonomickými změnami. Někdy se jako vyšší taxon zahrnující všechny hraboše uvádí čeleď Cricetidae (křečkovítí), například dle Anděra a Gaisler (2012). V jiných publikacích jsou hraboši řazeni do samostatné čeledi Arvicolidae (hrabošovítí) (např. Chaline a Graf, 1988). Shenbrot a Krasnov (2005) řadí podčeleď Arvicolinae do čeledi Muridae (myšovítí). V této práci jsou hraboši zařazeni

do podčeledi Arvicolinae a čeledi Cricetidae, a to na základě posledních zveřejněných publikací (Li a kol., 2015; Lopez-Garcia a kol., 2015).

Hrabošovité hlodavci jsou rozšířeni na celé severní polokouli. V současné době je popsáno přes 150 druhů hrabošů celkem z 28 rodů (*Alticola*, *Arborimus*, *Arvicola*, *Blanfordimys*, *Caryomys*, *Chionomys*, *Clethrionomys*, *Dicrostonyx*, *Dinaromys*, *Ellobius*, *Eothenomys*, *Hyperacrius*, *Lagurus*, *Lasiopodomys*, *Lemmiscus*, *Lemmus*, *Microtus*, *Myopus*, *Neodon*, *Neofiber*, *Ondatra*, *Phaiomys*, *Phaulomys*, *Phenacomys*, *Proedromys*, *Prometheomys*, *Synaptomys* a *Volemys*) (www.iucnredlist.org²). Na území České republiky se vyskytují pouze hraboši rodů *Arvicola*, *Clethrionomys*, *Microtus* a *Ondatra* (Anděra a Gaisler, 2012).

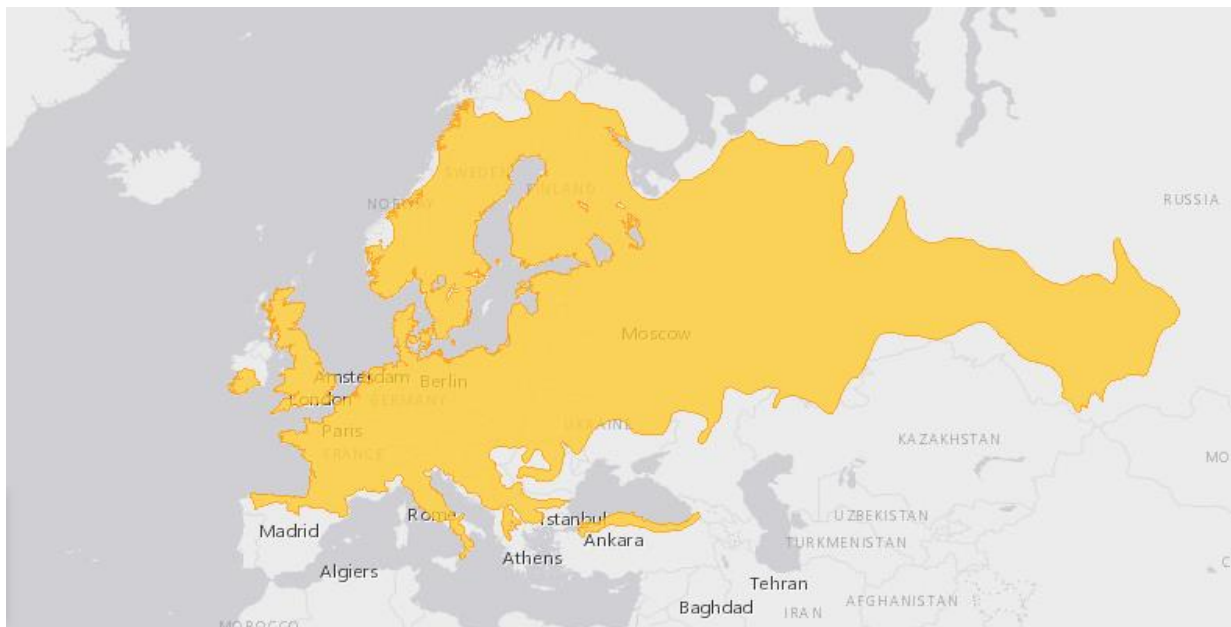
V této práci uvádím pouze druhy, které byly předmětem mého studia.

1.6.1.1. Rod *Clethrionomys* Tilesius, 1850

U rodu *Clethrionomys* bylo popsáno 7 druhů kokcidií rodu *Eimeria* (*E. cernae*, *E. clethrionomyis*, *E. gallatii*, *E. marconii*, *E. pileata*, *E. rysavyi*, *E. schiwicki*) a 2 druhy rodu *Isospora* (*I. clethrionomydis*, *I. clethrionomyis*, *I. flateca*) (Levine a Ivens, 1990; Duszynski a kol., 2007).

Norník rudý *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780)

Tento druh je rozšířen v Evropě a západní Asii, od Velké Británie až po povodí řeky Ob v Rusku. Chybí například v jižní části Pyrenejského a Balkánského poloostrova, v severní části Skandinávského poloostrova a při severním pobřeží Černého moře (Obr. 3). U nás se vyskytuje na celém území republiky (Anděra a Gaisler, 2012; www.iucnredlist.org³).



Obr. 3: Areál rozšíření norníka rudého (www.iucnredlist.org³).

Nejhojnější výskyt tohoto druhu je v listnatých či smíšených lesích s bohatým podrostem, na březích tekoucích vod, polních remízcích, v parcích a rákosinách. Jeho potrava je velmi pestrá. Živí se převážně rostlinnou potravou (výhonky rostlin, semena, bukvice, žaludy), ale v určitém období konzumuje i větší množství živočišné složky (larvy hmyzu, brouky, pavouky, zdechliny) (Anděra a Gaisler, 2012).

Norník rudý se od ostatních hrabošů liší především zbarvením, dále pak délkou ocasu a velikostí ušních boltců. Norníci mívají ušní boltce větší a výraznější, zbarvení hřbetu je od šedorezavé až po sytě rezavou barvu a ocas je výrazně delší (odpovídá asi polovině délky těla). Celková délka těla se pohybuje mezi 80 – 122 mm, délka ocasu 38 – 65 mm a délka zadního chodidla 16 – 19 mm (Anděra a Gaisler, 2012).

Latinský název norníka rudého byl v minulosti opakovaně měněn. Druh byl popsán jako *Clethrionomys* (Tilesius, 1850), později byl nazýván *Evotomys* (Coues, 1874), *Craseomys* (Miller, 1900), *Phaulomys* (Thomas, 1905), *Neoaschizomys* (Tokuda, 1935), *Glareomys* (Rasorenova, 1952), a nakonec byl přejmenován na *Myodes* (Pallas, 1811) (Wilson a Reeder, 2005). Název *Myodes* byl původně používán pouze jako neformální označení pro hrabošovité hlodavce až do zveřejnění publikací Pavlina (2003, 2006) a Mussera a Carletona (2005). Latinský název *Myodes* se následně velmi rozšířil, ačkoliv nebyl důvod pro přejmenování rodu *Clethrionomys*. Navíc toto přejmenování způsobilo ve vědecké sféře zmatek, protože *Myodes* podle Pallase (1811) zahrnuje různé druhy hrabošů, norníků i lumíků. V současné době je *Myodes* považován za mladší synonymum pro rod *Lemmus* a označení *Clethrionomys* je opět používáno jako rodový název pro norníka rudého. Platnost tohoto názvosloví je potvrzena komisí ICZN (International Commission on Zoological Nomenclature) (Tesakov a kol., 2010).

S tímto prohlášením ale nesouhlasí Carleton a kol. (2014). Ve své studii zdůvodňují, proč by jediným platným rodovým názvem pro norníka měl být *Myodes*. Je tedy možné, že název *Clethrionomys* bude v následujících letech opět nahrazován názvem *Myodes*.

1.6.1.2. Rod *Microtus* Schrank, 1798

U rodu *Microtus* bylo dosud popsáno 37 druhů kokcidií rodu *Eimeria* (*E. abuschevi*, *E. arvicolae*, *E. bicrustae*, *E. chetae*, *E. chudatica*, *E. coahulliensis*, *E. correptionis*, *E. cubinica*, *E. cusarica*, *E. derenica*, *E. dzulfaensis*, *E. gomurchaica*, *E. gregalica*, *E. guentherii*, *E. hadrutica*, *E. iradiensis*, *E. iwanoffi*, *E. kolabski*, *E. kolanica*, *E. kotuji*, *E. luteola*, *E. majorici*, *E. micropiliana*, *E. microtina*, *E. middendorfi*, *E. monocrustae*, *E. ochrogasteri*, *E. pitymydis*, *E. primbelica*, *E. saxei*, *E. schelkovnikovi*, *E. strakonicensis*, *E. subsimi*, *E. taimyrica*, *E. tamiasciuri*, *E. tolu candensis*, *E. wenrichi*, *E. zuvandica*), 3 druhy rodu *Iso spora* (*I. arvalis*, *I. mcdowellii*, *I. mexicanasubsimi*) a 1 druh rodu *Caryospora* (*C. microti*) (Levine a Ivens, 1990; Koudela a Vítovec, 1994).

Hraboš polní *Microtus arvalis* (Pallas, 1778)

Tento druh je rozšířen v celé Evropě kromě Anglie, Skandinávie a části Středomoří. Jeho areál nepřekračuje pohoří Ural (Obr. 4). U nás se vyskytuje na celém území republiky (Anděra a Gaisler, 2012; www.iucnredlist.org⁴).



Obr. 4: Areál rozšíření hraboše polního (www.iucnredlist.org⁴).

Typickou lokalitou hraboše polního je kulturní step. Obecně obývá suchá stanoviště v otevřené krajině či polních remízcích. Potrava je hlavně rostlinná a zahrnuje převážně obiloviny a další polní plodiny. Výjimečně se živí drobnými bezobratlými živočichy (Anděra a Gaisler, 2012).

Hraboš polní má šedavé zbarvení těla a přiléhavé, malé ušní boltce. Ve srovnání s normíkem má kratší ocas (21 – 50 mm), a s hrabošíkem podzemním má větší oči (cca 3 mm). Hraboš polní má navíc nepigmentovaná zadní chodidla, čímž se liší od hraboše mokřadního. Celková délka těla se pohybuje od 80 do 130 mm a délka zadního chodidla je 13 – 18 mm (Anděra a Gaisler, 2012).

Hraboš mokřadní *Microtus agrestis* (Linnaeus, 1761)

Tento hraboš je rozšířen od západní Evropy po Bajkal. Na rozdíl od hraboše polního se vyskytuje ve Velké Británii i na Skandinávském poloostrově. Nevyskytuje se ve Středomoří ani na pobřeží Černého moře (Obr. 5). V České republice se vyskytuje v hojné míře, ačkoliv byl u nás dříve považován za vzácný druh (Anděra a Gaisler, 2012; www.iucnredlist.org⁵).



Obr. 5: Areál rozšíření hraboše mokřadního (www.iucnredlist.org⁵).

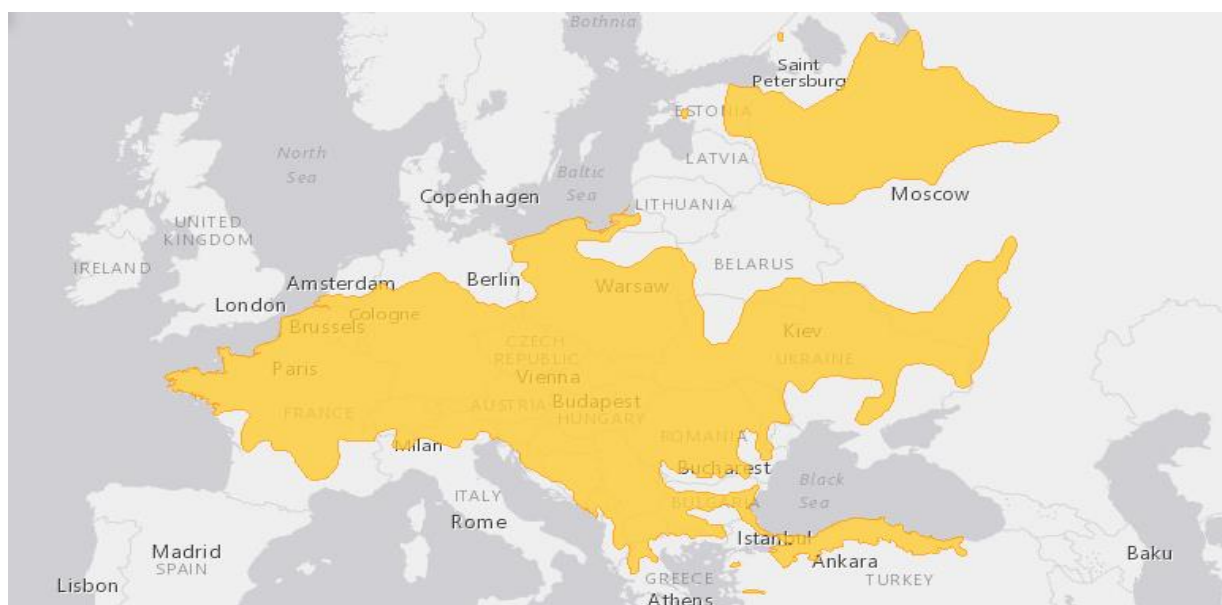
Jeho hlavním biotopem jsou podmáčené, nekosené louky, rašeliniště, bažiny, vlhké lesní paseky či břehy stojatých a tekoucích vod. Vyhledává chladnější mikroklima. Hraboš mokřadní konzumuje traviny, výhonky rostlin, lesní plody, a výjimečně také larvy dvoukřídlého hmyzu (Anděra a Gaisler, 2012).

Hraboš mokřadní se od hraboše polního liší zejména ušními boltci, které jsou řídké ochlupené dlouhými chlupy, a tmavě pigmentovanými zadními chodidly. Zbarvení bývá šedavé s příměsí černých chlupů. Celková délka těla se pohybuje mezi 95 – 134 mm. Délka ocasu

odpovídá 32 – 51 mm a délka zadního chodidla je přibližně 16,8 – 20,2 mm (Anděra a Gaisler, 2012).

Hrabošík podzemní *Microtus subterraneus* (de Selys-Longchamps, 1836)

Hrabošík podzemní je rozšířen od severozápadní Francie po Ukrajinu. V Estonsku a západní části Ruska se vyskytuje izolovaná populace. Tento druh se prakticky nevyskytuje ve Středomoří, ve Velké Británii a Skandinávii (Obr. 6). Na území České republiky je rozšířen spíše mozaikovitě, na některých lokalitách zcela chybí (Anděra a Gaisler, 2012; www.iucnredlist.org⁶).



Obr. 6: Areál rozšíření hrabošíka podzemního (www.iucnredlist.org⁶).

Tento hraboš obývá nejrůznější stanoviště. Od zarostlých břehů vodních toků i nádrží až po horské louky, pastviny, lužní lesy a bučiny, příkopy podél cest, rumišť, zahrady, sady i pole. Základní složkou potravy jsou zelené části rostlin, dále pak květy, semena, plody, kořeny a oddenky (záleží na ročním období) (Anděra a Gaisler, 2012).

Jedná se o malého hraboše šedavé barvy, který se vyznačuje drobnými očima (1 – 2 mm). Na zadním chodidle mívá pouze 5 mozolů, na rozdíl od ostatních hrabošů, kteří mají mozolů zpravidla 6. Celková velikost dospělého jedince je 82 – 105 mm. Délka ocasu se pohybuje mezi 24 – 32 mm a délka zadního chodidla zpravidla nepřesahuje 15,5 mm (Anděra a Gaisler, 2012).

Hraboš pospolitý *Microtus socialis* (Pallas, 1773)

Jedná se převážně o asijský druh hraboše. Na území Evropy se nachází pouze v oblasti poloostrova Krym. Na asijském území je rozšířen v oblasti Blízkého a Středního východu (Turecko, Irák, Írán). Dále se pak vyskytuje při pobřeží Kaspického moře (Ázerbajdžán) a v Kazachstánu (Obr. 7). V České republice se tento druh nevyskytuje (Anděra a Gaisler, 2012; www.iucnredlist.org⁷).



Obr. 7: Areál rozšíření hraboše pospolitého (www.iucnredlist.org⁷).

Obývá louky, paseky, okraje lesů a polí. Hlavním zdrojem potravy hraboše pospolitého jsou obiloviny a luštěniny, příležitostně se živí hmyzem a měkkýši (www.ecosystema.ru⁸).

Hraboš pospolitý je zbarven šedavě až žlutavě. Celková délka těla činí 80 – 120 mm. Délka ocasu odpovídá přibližně čtvrtině délky těla (www.ecosystema.ru⁸).

Hraboš hospodárný *Microtus oeconomus* (Pallas, 1776)

Hraboš hospodárný má velmi rozsáhlý areál. Vyskytuje se od severovýchodního Německa až po Kamčatku. Dále je rozšířen na Aljašce a v severozápadní Kanadě (Obr. 8). V Evropě navíc existuje několik izolovaných populací, a to na území Nizozemí, Maďarska, jižního Norska a jižního Finska. V České republice nebyl výskyt tohoto druhu dosud zaznamenán (www.iucnredlist.org⁹).



Obr. 8: Areál rozšíření hraboše hospodárného (www.iucnredlist.org⁹).

Tento hraboš obývá široké spektrum stanovišť, nejčastěji však tundru a tajgu. Dále se vyskytuje v lesostepních oblastech a v blízkosti jezer, potoků a řek. Tito hraboši jsou striktními herbivory. V jejich jídelníčku převládají traviny (ostřice, třtina), dále pak konzumují mechy, lišejníky a zakrslé dřeviny (vrba) (www.animaldiversity.org¹⁰).

Zbarvení tohoto hraboše se pohybuje od šedavé do sytě hnědé. Svrchu bývá tmavý a zespodu výrazně světlý. Celková délka těla je 118 – 226 mm. Délka ocasu odpovídá přibližně 30 % celkové délky těla (www.animaldiversity.org¹⁰).

Hraboš východoevropský *Microtus levis* (Miller, 1908)

Druh je rozšířen na jihu Finska, Balkánském poloostrově, v Bělorusku, Ukrajině, Turecku, severní části Íránu, při pobřeží Černého moře a v evropské části Ruska až po Bajkal (Obr. 9). Mezi lety 1920 – 1960 byl zavlečen na souostroví Špicberky zřejmě zásobovací lodí ruské těžební společnosti. V současné době je jediným zástupcem drobných savců žijících na tomto souostroví. Na území České republiky se tento druh hraboše nevyskytuje (www.npolar.no¹¹; www.iucnredlist.org¹²).



Obr. 9: Areál rozšíření hraboše východoevropského (www.iucnredlist.org¹²).

Tento hraboš preferuje louky či kulturní step. Obecně obývá oblasti s hustou vegetací. V jižních částech areálu se vyskytuje na vlhkých stanovištích v blízkosti řek a jezer. Strava se příliš neliší od stravy ostatních hrabošů. Vždy závisí na typu lokality či stanoviště (www.npolar.no¹¹).

Hraboš východoevropský má šedohnědé zbarvení a dříve byl mylně považován za hraboše polního. Délka jeho těla se pohybuje mezi 100 – 160 mm. Ocas odpovídá přibližně třetině celkové délky těla (www.npolar.no¹¹).

Druhový název tohoto hraboše se v odborné literatuře často liší. Nejvíce je rozšířen název *M. levis* (Miller, 1908) a *M. rossiaemerdionalis* (Ognev, 1924). Dalšími synonymy jsou *M. subarvalis* (Meyer, Orlov a Skholl, 1972), *M. epiroticus* (Ondrias, 1966), *M. caspicus* (Ognev, 1950), *M. ghalgai* (Krassovsky, 1929), *M. muhlisi* (Neuhäuser, 1936), *M. relictus* (Neuhäuser, 1936) a *M. rhodopensis* (Heinrich, 1936) (Wilson a Reeder, 2005).

1.6.1.3. Rod *Arvicola* Lacépède, 1799

U rodu *Arvicola* byly dosud popsány 4 druhy kokcidií rodu *Eimeria* (*E. batabatensis*, *E. bohémica*, *E. talischaensis*, *E. terrestris*), a 1 druh rodu *Isospora* (*I. batabatica*) (Levine a Ivens, 1990).

Hryzec vodní *Arvicola amphibius* (Linnaeus, 1758)

Hryzec vodní je rozšířen od západní Evropy, vyjma Irska a Pyrenejského poloostrova, až po Bajkal. Areál výskytu zasahuje i do Malé Asie (Obr. 10). U nás se vyskytuje na celém území republiky (Anděra a Gaisler, 2012; www.iucnredlist.org¹³).



Obr. 10: Areál rozšíření hryzce vodního (www.iucnredlist.org¹³).

Dominantním biotopem tohoto hlodavce jsou zarostlé břehy rybníků, potoků či řek. Dalším stanovištěm jsou mokřady, případně rašeliniště. Z toho vyplývá, že je vázán na vodní prostředí. Hlavním zdrojem potravy jsou zelené části rostlin, kořeny, cibule a oddenky (v závislosti na ročním období). O podílu živočišné složky se vedou diskuse (Anděra a Gaisler, 2012).

Hryzec vodní je zbarven do sytě hnědé až tmavě hnědé. Ve srovnání s ostatními hraboši má delší tmavý ocas (65 – 110 mm) a na zadních chodidlech má zpravidla 5 mozolů (stejně jako hrabošík podzemní). Na bocích má tento hraboš velké pachové žlázy. Celková délka těla dospělého jedince se pohybuje okolo 140 – 190 mm, délka zadního chodidla dosahuje až 31 mm (Anděra a Gaisler, 2012).

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této práce bylo studium kokcií a jejich fylogenetických vztahů u hlodavců z podčeledi Arvicolinae. Poměrně rozsáhlá studie tohoto typu (rozsáhlé sběry dat) by měla prokázat, zda se ve fylogenetických vztazích kokcií u hrabošovitých hlodavců vyskytuje podobný trend jako u kokcií hlodavců rodu *Apodemus*, tj. zda eimerie hrabošovitých tvoří několik na sobě nezávislých linií.

Pro splnění cílů práce jsem použila širokou škálu metod, a to od samostatné práce v terénu, zásad odběru vzorků a parazitologického vyšetření v laboratoři, přes mikroskopii a molekulární metody až po analýzy počítačovým softwarem.

K dosažení cílů práce bylo zvoleno několik dílčích kroků:

- ❖ Provést odchyty hrabošovitých hlodavců, identifikovat odchycené jedince, provést jejich pitvu a odběr vzorků trusu.
- ❖ Parazitologicky vyšetřit trus pomocí flotační metody a mikroskopie, detekovat přítomnost kokcií (především rodů *Eimeria* a *Isospora*).
- ❖ Zhodnotit výskyt kokcií u odchycených hlodavců.
- ❖ Izolovat DNA kokcií z pozitivních vzorků trusu, PCR amplifikovat vybrané geny, připravit vzorky k odeslání na sekvenaci.
- ❖ Zpracovat získaná data molekulárními a fylogenetickými programy.
- ❖ Rekonstruovat fylogenetické vztahy kokcií získaných z hrabošovitých hlodavců, interpretovat tyto vztahy a jejich závislost na druhu hostitele či geografii.

3. METODIKA

3.1. Odchyty hlodavců

Odchyty byly uskutečněny v 11 zemích Evropy a Asie v letech 2013 – 2014. Hlodavci byli chytáni do dřevěných sklápovacích pastí kladených ve volné přírodě. Návnadou byl nejčastěji kousek hadru napuštěný olejem z rybí konzervy, případně sádlo, paštika či kousek salámu.

3.2. Identifikace hlodavců

Hlodavci byli určováni přímo v terénu podle určovacího klíče (Dungel a Gaisler, 2002). Pro správnou determinaci je zapotřebí všimnout si velikosti ušního boltce (v případě hrabošů i osrstění ušního boltce), délky zadního chodidla, počtu mozolů na zadním chodidle, délky ocasu ve vztahu k délce těla, velikosti oka a zbarvení srsti. V neposlední řadě je vhodné brát zřetel i na charakter stanoviště.

3.3. Odběr biologického materiálu

Každému odchycenému jedinci bylo odstříhnuto několik prstů, případně část ocasu, pro izolaci genomové DNA a následné molekulární analýzy. Materiál byl uchován v absolutním etanolu. Každý odchycený hlodavec byl také vyšetřen na přítomnost ektoparazitů (vši, roztoči, blechy, klíšřata) vyčesáním srsti zubním kartáčkem.

U odchycených hlodavců byla provedena pitva, při níž bylo z těla vyjmuto slepé střevo a část tračníku s formovanými bobky. Tento biologický materiál byl vložen do vzorkovnice se 4% vodným roztokem dichromanu draselného ($K_2Cr_2O_7$). Tento roztok slouží jako konzervační činidlo. Oocysty jsou schopny v roztoku sporulovat, jsou-li splněny i další podmínky – pokojová teplota a přítomnost kyslíku. Oocysty vydrží v dichromanu životaschopné a infekční i několik let (Duszynski a Wilber, 1997).

3.4. Koprologické vyšetření

Vyšetření trusu a částí střeva odchycených hlodavců jsem prováděla standardní parazitologickou metodou, flotační metodou. Nejprve jsem sestrojila flotační aparaturu složenou ze stojanu, kuchyňského sítka a trychtýře. Trus jsem zhomogenizovala, a část jsem přelila přes sítko do zkumavky. Zkumavku jsem následně dolila vodou a centrifugovala 10 minut při 2500 rpm. Po odstranění supernatantu jsem sediment promíchala se Sheatherovým cukerným roztokem o hustotě 1,30 a opět centrifugovala za stejných podmínek. Díky rozdílné

hustotě a vlastnostem Sheatherova cukerného roztoku byly po centrifugaci lehké oocysty vyneseny (vyflotovány) na povrch roztoku, zatímco nečistoty klesly na dno (Sheather, 1923). Část povrchové blanky jsem přenesla na podložní sklo a mikroskopovala světelným mikroskopem Olympus CX31 při zvětšení 20×10 a 40×10 . V případě, že byl vyšetřovaný vzorek pozitivní na kokcidie, byla klasifikována intenzita infekce na základě množství oocyst v zorném poli při zvětšení 20×10 . Jedná se o tzv. semikvantitativní metodu stanovení intenzity infekce (Thienpont a kol., 1979):

1 – 5 oocyst	+	slabá infekce
6 – 10 oocyst	++	středně silná infekce
11 – 50 oocyst	+++	silná infekce
více než 50 oocyst	++++	velmi silná infekce

3.5. Izolace DNA kokcií

3.5.1. Příprava vzorku před izolací

Před samotnou izolací DNA kokcií bylo nutné vzorek trusu zhomogenizovat a odstranit dichroman draselný, který působí jako inhibitor PCR. Přibližně 250 μ l vzorku bylo přepipetováno do mikrozkušavky a centrifugováno 5 minut při rychlosti 13 300 rpm. Supernatant byl následně odstraněn a k peletu na dně zkumavky bylo přidáno 250 μ l kohoutkové vody. Obsah zkumavky byl následně důkladně promíchán. Vzorek byl poté opět centrifugován za stejných podmínek, následně odstraněn supernatant, k peletu opět přidáno 250 μ l kohoutkové vody, vzorek promíchán a znovu centrifugován. Toto promývání vzorku se opakovalo tak dlouho, dokud nebyl dichroman draselný odstraněn (tj. dokud supernatant nezůstal bezbarvý).

3.5.2. Izolace DNA

Genomová DNA kokcií byla izolována komerčním kitem FastDNA SPIN Kit for Soil od firmy MP Biomedicals, podle přiloženého návodu výrobce. Zjednodušeně se jednalo o rozbití oocyst pomocí bead-beateru (homogenizátoru FastPrep od firmy MP Biomedicals) za pomoci skleněných kuliček o různé velikosti, a navázání uvolněné DNA na tzv. Binding Matrix. Vzorek byl dále filtrován a centrifugován na kolonkách. Na takto připravený vzorek byla napipetována DES (ultračistá voda), do které se po následné centrifugaci uvolnila vyizolovaná DNA.

3.6. Molekulární identifikace hostitelů

Některé z odchycených hrabošovitých hlodavců bylo možné v terénu určit pouze do rodu, jelikož druhová determinace byla obtížná (např. u juvenilních či subadultních jedinců, zmoklých jedinců apod.). Proto jsem u takových zvířat provedla molekulární determinaci; komerčním kitem DNeasy Blood & Tissue Kit od firmy QIAGEN jsem izolovala genomovou DNA z odstřižených prstů, a pomocí primerů specifických pro hrabošovité hlodavce (Tab. 1) jsem amplifikovala mitochondriální gen pro cytochrom b oxidázu (CYB) (Jaarola a Searle, 2002). Vzorčky jsem poté enzymaticky přečistila a odeslala do komerční laboratoře SEQme s.r.o. na sekvenaci. Výsledné sekvence jsem poté porovnála pomocí algoritmu BLAST se sekvencemi v databázi GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov¹⁴).

Některé vzorky nebyly určeny ani touto metodou, a to z důvodu absence biologického materiálu.

Tab. 1: Sekvence primerů použitých pro amplifikaci mitochondriálního genu pro CYB.

Gen	Primery	
	Forward (L14727-SP)	Reverse (H15915-SP)
CYB	5'-GACAGGAAAAATCATCGTTG-3'	5'-AACTGCAGTCATCTCCGGTTACAAGAC-3'

3.7. Geny použité pro fylogenetické analýzy kokcií, primery, PCR

Pro amplifikaci jsem použila gen pro malou jadernou podjednotku (dále jen SSU) a mitochondriální gen pro cytochrom c oxidázu I (dále jen COI). SSU je hojně využívána pro rekonstrukce fylogenetických vztahů, ale na rozdíl od mitochondriálních genů nevykazuje tento gen dostatečnou variabilitu – je více konzervativní, a tak není vhodný pro blízké příbuzné druhy (Tenter a kol., 2002). Pro PCR jsem použila specifické primery (Tab. 2) určené pro amplifikaci ~1800 bp SSU a ~800 bp COI apikomplex.

Tab. 2: Sekvence primerů použitých pro rekonstrukci fylogenetických vztahů kokcií.

Gen	Primery	
	Forward	Reverse
SSU	5'-GAAACTGCGAATGGCTCATT-3'	5'-CTTGCGCCTACTAGGCATTC-3'
COI	5'-GGTTCAGGTGTTGGTTGGAC-3'	5'-ATCCAATAACCGCACCAAGAG-3'

Polymerázová řetězová reakce probíhala v celkovém objemu 25 μ l za standardních podmínek, s následujícím objemem jednotlivých složek:

- 2,5 μ l pufru (10 \times PCR buffer, 15mM MgCl₂; Qiagen)
- 2,0 μ l vyizolované DNA
- 1,0 μ l nukleotidů (dNTPs; 10 mM roztok - 2,5 mM každé báze)
- 0,5 μ l forward primeru (25 pmol/ μ l; Generi Biotech)
- 0,5 μ l reverse primeru (25 pmol/ μ l; Generi Biotech)
- 0,2 μ l HotStarTaq DNA polymerázy (5 U/ μ l; Qiagen)
- 18,3 μ l PCR H₂O

Za pomoci termocycleru byla následně amplifikována DNA. Program pro amplifikaci DNA fragmentů SSU byl zahájen krokem denaturace při 95 °C po dobu 15 minut. Poté program pokračoval 30 cykly, kdy každý cyklus začínal procesem denaturace při 92 °C po 45 sekund, následoval annealing (nasedání primeru) při 53 °C po 45 sekund a cyklus končil elongací při 72 °C po 90 sekund. Amplifikační proces byl zakončen finální extenzí při 72 °C po dobu 10 minut. Iniciační fáze denaturace programu pro amplifikaci DNA fragmentů COI probíhala při 95 °C po dobu 15 minut. Poté program pokračoval 35 cykly, kdy byl každý cyklus zahájen procesem denaturace při 94 °C po dobu 45 sekund, následoval annealing při 55 °C po 45 sekund a cyklus končil elongací při 72 °C po dobu 60 sekund. Amplifikační proces byl zakončen finální extenzí při 72 °C po dobu 10 minut. Výsledek PCR reakce byl vizualizován elektroforézou na 1% agarózovém gelu při napětí 100 V, s použitím barviva Sybr Green, a 1kb markeru (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Výsledek elektroforézy na agarózovém gelu byl vizualizován pomocí UV transiluminátoru.

3.8. Sekvence, úprava a zpracování sekvencí

PCR produkty o požadované velikosti jsem enzymaticky přečistila pomocí 0,2 μ l Exo I (exonucleáza I získaná z *E. coli*) a 0,2 μ l FastUp (alkalická fosfatáza). Následně byly takto přečištěné produkty zaslány na sekvenaci do komerčních laboratoří Macrogen Inc. nebo SEQme s.r.o. Výstupní data ze sekvenátoru jsem kontrolovala a ořezávala v programu Sequence Scanner, software 2.0 (www.appliedbiosystems.com¹⁵). Identifikace získaných sekvencí probíhala na základě porovnávání se sekvencemi uloženými v databázi GenBank pomocí algoritmu BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov¹⁴). Sekvence vzorku získané pomocí forward primeru a reverse primeru byly poté zkompletovány (složeny v jednu sekvenci daného

vzorku) programem SeqMan (DNA STAR, Inc.). V programu EditSeq (DNA STAR, Inc.) byl protein-kódujícím sekvencím (tj. COI sekvencím) zkontrolován a případně upraven čtecí rámeček.

3.9. Fylogenetické analýzy

3.9.1. Alignment

Z databáze GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov¹⁴) byly vybrány sekvence SSU kokcidií rodů *Besnoitia*, *Caryospora*, *Cyclospora*, *Cystoisospora*, *Eimeria*, *Hammondia* a *Isospora* z plazů, ptáků, obojživelníků a savců (Tab. 5 v Příloze), a sekvence COI kokcidií rodů *Eimeria* a *Isospora* z ptáků, obojživelníků a savců (Tab. 6 v Příloze). Z těchto sekvencí byly vytvořeny datasety ve formě textových souborů (tzv. FASTA formát). Ty byly alignovány programem BioEdit (Hall, 1999) pomocí algoritmu ClustalW (Thompson a kol., 1994), případně programem MAFFT (Katoh a kol., 2005) za použití metody G-INS-i (algoritmus Needleman-Wunsch). SSU sekvence byly alignovány jako nukleotidy, COI sekvence byly alignovány jako proteiny. Výsledný alignment byl manuálně zkontrolován a ořezán přibližně do délky 900 bp u SSU a 680 bp u COI.

3.9.2. Rekonstrukce fylogenetických vztahů

Finální alignmenty sekvencí SSU a COI byly uloženy ve formátech fasta (Bioedit v7.2.5: Hall, 1999) a nexus (SeaView v4.3.5: Gouy a kol., 2010). Soubor ve formátu nexus byl následně exportován do programu MrBayes v3.2 (Ronquist a kol., 2012), ve kterém byl spočítán výsledný fylogenetický strom. Pro analýzu byl použit evoluční model GTR + Γ + I. Mcmc byl specifikován pro 10 milionů generací s frekvencí sběru každých 500 generací, burn-in byl nastaven na 25 %. Výsledné stromy byly vizualizovány programem TreeView v1.6.6 (Page, 1996).

4. VÝSLEDKY

4.1. Lokality odchyту hlodavců

Vzorky analyzované v této práci pocházejí z několika lokalit České republiky a dalších 10 zemí Evropy a Asie. Na území České republiky jsem prováděla odchyty na Plzeňsku a Českobudějovicku. Dále jsem prováděla odchyty spolu s Annou Mácovou na 3 lokalitách v Srbsku. Kromě hrabošů a norníků (Tab. 3) bylo odchyceno i mnoho myšic, které však nejsou předmětem mého studia.

Tab. 3: Přehled hlodavců studovaných v rámci této práce.

Český název	Latinský název
Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>
Hraboš polní	<i>Microtus arvalis</i>
Hraboš mokřadní	<i>Microtus agrestis</i>
Hrabošík podzemní	<i>Microtus subterraneus</i>
Hraboš pospolitý	<i>Microtus socialis</i>
Hraboš hospodárný	<i>Microtus oeconomus</i>
Hraboš východoevropský	<i>Microtus levis</i>
Hryzec vodní	<i>Arvicola amphibius</i>

4.1.1. Odchyty v ČR

V České republice bylo odchyceno celkem 117 norníků, 40 hrabošů a 1 hryzec. Odchyty probíhaly v Plzeňském, Jihočeském, Zlínském, Pardubickém, Ústeckém a Karlovarském kraji, a v kraji Vysočina (Obr. 14 v Příloze).

Plzeňský kraj

V Plzeňském kraji jsem prováděla odchyty na 5 lokalitách, a to mezi obcemi Plešnice a Jezná u vodní nádrže Hracholusky, dále u obce Bdeněves, v okolí obce Tymákov a Štěnovice, a v Pošumaví v blízkosti vodní nádrže Nýrsko. Pasti jsem kladla do křovin podél polí

s kulturními plodinami, podél vodních toků a na okraj listnatého lesa (Obr. 16 v Příloze). Celkem jsem v tomto kraji odchytila 81 norníků rudých (*C. glareolus*), 11 hrabošů polních (*M. arvalis*) a 1 hraboše mokřadního (*M. agrestis*). Prevalence kokciidií u hrabošovitých hlodavců zde činila 33 %.

Jihočeský kraj

Odchyty v Jihočeském kraji jsem prováděla na 3 lokalitách: v Českých Budějovicích, u obce Ličov mezi Kaplicí a Benešovem nad Černou, a na terénní stanici Botanického ústavu AV ČR v Třeboni u obce Lužnice. V Českých Budějovicích jsem pokládala pasti v oblasti bývalé skládky nedaleko Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity. U Ličova jsem prováděla odchyty na břehu řeky Černé a na okraji přilehlého listnatého lesa. Na terénní stanici Botanického ústavu AV ČR jsme prováděli odchyty pod vedením Jany Kvičtové v rámci kurzu terénní parazitologie. Pasti byly kladeny na okraji listnatého lesa, v polních remízcích, v křovinách na okraji luk a na břehu řeky Lužnice. Další lokalitou byl přímo areál Jihočeské univerzity v Č. Budějovicích a přilehlé okolí. Do živochytných pastí, které zde pokládala Anna Mácová za účelem odchyty živých myšic, se občas chytil i hraboš. Na stejné lokalitě chytala Tereza Dikošová do živochytných pastí hraboše. Hraboši, kteří nepřežili tyto odchyty, se stali součástí mé bakalářské práce. Odchyty pak ještě prováděla Anna Mácová u Veselí nad Lužnicí a Jan Štefka u obce Dubičné. V tomto kraji bylo celkem odchyceno 26 norníků rudých (*C. glareolus*), 11 hrabošů polních (*M. arvalis*), 3 blíže neurčení hraboši (*Microtus* sp.) a 1 hryzec vodní (*Arvicola amphibius*). Prevalence kokciidií u hrabošovitých hlodavců v tomto kraji byla 42 %.

Zlínský kraj

Ve Zlínském kraji sběry prováděla Anna Mácová u Bystřice pod Lopeníkem. Podařilo se jí odchytil 4 hraboše polní (*M. arvalis*). Odchyty probíhaly na okraji podmáčené louky v blízkosti smíšeného lesa. Hrabošů infikovaných kokciidiemi zde bylo 75 %.

Pardubický kraj

V tomto kraji prováděla odchyty Jana Říhová. Odchyty probíhaly v blízkosti vodní nádrže Hamry u obce Hlinsko. Odchycen byl 1 hraboš polní (*M. arvalis*). Trus tohoto hraboše nebyl pozitivní na kokcidie.

Ústecký kraj

Vzorky z Ústeckého kraje pocházejí z každoročního monitoringu drobných savců ve stanovených kvadrátech v okolí Litvínova (projekt F. Sedláčka a V. Bejčka). Podařilo se odchytit 5 norníků rudých (*C. glareolus*) a 3 hraboše mokřadní (*M. agrestis*). Všechny vzorky odchycených hrabošovitých hlodavců byly pozitivní na kokcidie.

Karlovarský kraj

V Karlovarském kraji prováděla odchyty Jana Kvičerová, a to v křovinách nad lázeňským hotelem Běhounek v Jáchymově, a na okraji pole za vesnicí Horní Žďár. Odchycen byl 1 hraboš polní (*M. arvalis*) a 1 norník rudý (*C. glareolus*). Pouze jeden z odchycených hrabošovitých hlodavců byl *Eimeria*-pozitivní.

Kraj Vysočina

Vzorky z tohoto kraje mám od Jany Kvičerové, která prováděla odchyty v okolí Ptáčova podél Klapovského potoka na Třebíčsku, a v Třebíči v okolí bývalé továrny u železnice. Na těchto dvou lokalitách byli odchyceni 4 norníci rudí (*C. glareolus*) a 1 hrabošík podzemní (*M. subterraneus*). Z vyšetřených vzorků hrabošovitých hlodavců bylo 40 % pozitivních na kokcidie.

4.1.2. Odchyty v zahraničí

Zahraniční vzorky analyzované v rámci této práce pocházejí z Ázerbajdžánu, Bulharska, Finska, Francie, Maďarska, Německa, Ruska, Slovenska, Srbska a Švédska (Obr. 13 v Příloze).

Rusko

Vzorky z Ruska přivezl Jakub Vlček. Všechny vzorky pocházejí z okolí města Pskov v západním Rusku nedaleko hranic s Estonskem. Celkem bylo odchyceno 36 norníků rudých (*C. glareolus*), 6 hrabošů mokřadních (*M. agrestis*) a 3 hraboši hospodární (*M. oeconomus*). Procento hrabošovitých hlodavců infikovaných kokcidiemi činilo 84 %.

Francie

Odchyty ve Francii prováděla Anna Mácová na 6 lokalitách: Beaugency, Braucourt, Briare, Douchy, Greux a St-Pere-sur-Loire. Odchyceno bylo 18 norníků rudých (*C. glareolus*),

9 hrabošů mokřadních (*M. agrestis*) a 1 hraboš polní (*M. arvalis*). Celková prevalence kokcií u odchycených hrabošovitých hlodavců byla 86 %.

Finsko

Finské vzorky nasbírali Anna Mácová, Michaela Matějková a Roman Hrdlička. Odchyty probíhaly na jihu Finska na lokalitách Hujala, Isojärvi, Kuusisto, Salo a Ylönjärvi. Celkem bylo odchyceno 7 normíků rudých (*C. glareolus*). Prevalence kokcií u odchycených normíků odpovídala 43 %.

Bulharsko

Vzorky z Bulharska mám od Emy a Pavla Hrouzkových. Odchyty probíhaly na lokalitách Letnitsa, Shipka, podél řeky Yantra mezi Tsenovo a Starmen, Kamen Bryag, Nesebar, Rezovo a Kabile. V okolí města Letnitsa byly pasti pokládány na okraj obilného pole a do travního porostu u zahrádkářské kolonie. V blízkosti města Shipka byly pasti položeny na okraj sklizeného obilného pole. Další pasti byly položeny podél řeky Yantra, a na okraj slunečnicového pole mezi městy Tsenovo a Starmen. Na lokalitě Kamen Bryag byly hlodavci chytáni v okolí skládky a na kraji útesu vybíhajícího do Černého moře. U města Nesebar na pobřeží Černého moře byly pasti kladeny na kraj slunečnicového pole a pole s jetelovinami. V okolí města Rezovo u hranic s Tureckem bylo chytáno podél opuštěného a podél zoraného pole. Na poslední lokalitě u města Kabile byly pasti pokládány na okraj slunečnicového pole, sklizeného obilného pole a na kraj zavlažovacího kanálu. Na všech zmíněných lokalitách bylo odchyceno 22 hrabošů mokřadních (*M. agrestis*), 6 hrabošů východoevropských (*M. levis*) a 2 hraboši polní (*M. arvalis*). Infikováno kokciemi rodu *Eimeria* bylo 43 % z odchycených hrabošovitých hlodavců.

Srbsko

Odchyty v Srbsku jsem prováděla spolu s Annou Mácovou v rámci kurzu Mezioborová exkurze pořádaného Přírodovědeckou fakultou JU. Sběry probíhaly na 3 lokalitách: v pohoří Stara Planina pod skalním útvarem Babin zub, v NP Kopaonik, a u města Sjenica nedaleko kaňonu řeky Uvac. Útvar Babin zub leží blízko hranic s Bulharskem. Část pastí jsme kladli do bukového lesa, většinu pastí jsme pokládali do otevřeného prostoru pod Babiným zubem, kde dominoval jalovec obecný. Z této lokality pochází nejvíce vzorků přivezených ze Srbska. V NP Kopaonik nedaleko hranic s Kosovem jsme provedli odchyty podél horského potoka

v travnatém porostu na okraji smíšeného lesa. Na poslední lokalitě u města Sjenica jsme položili nástrahy na okraj louky podél ohrady pro pasoucí se dobytek a podél malé strouhy do travnatého podrostu mezi břízami. Ze Srbska jsme přivezli vzorky z 5 norníků rudých (*C. glareolus*), 2 hrabošů podzemních (*M. subterraneus*) a 1 blíže neurčeného hraboše (*Microtus* sp.). Polovina odchycených hrabošovitých hlodavců byla infikována kokcidiemi rodu *Eimeria*.

Slovensko

Na Slovensku prováděla odchyty Mária Kazimírová ze SAV v Bratislavě. Odchyty probíhaly na 2 lokalitách u Bratislavy, a to v oblasti Železná studienka a v obci Dubová u chaty Fúgelka. Železná studienka je součástí bratislavského lesního parku v Malých Karpatech. Pasti byly kladeny v podrostu listnatého lesa v blízkosti léčebně-výchovného sanatoria a podél malého jezera Železná studienka. Celkově bylo odchyceno, 56 norníků rudých (*C. glareolus*), 4 hraboši polní (*M. arvalis*) a 2 hrabošiči podzemní (*M. subterraneus*). Prevalence kokcidií u hrabošovitých hlodavců odchycených na Slovensku byla 26 %.

Švédsko

Švédské vzorky pocházejí od Kateřiny Tichátkové, která prováděla odchyty v jižním Švédsku, a to na lokalitách Näbbebodavägen (Vilshult), Harasjömala Fiskecamp AB (Olofström) a Gillesnäs (Blekinge). V oblasti jižního Švédska bylo odchyceno 5 norníků rudých (*C. glareolus*). Žádný z odchycených norníků nebyl infikován kokcidiemi.

Německo

Vzorky z Německa přivezla Jana Kvičerová, která prováděla odchyty v okolí obce Neuglobsow v Braniborsku. Pasti byly kladeny do křovinato-travnatého zárůstu podél fotbalového hřiště, na okraji podmáčené louky, a na rumišťě podél parku. Celkem bylo odchyceno 5 norníků rudých (*C. glareolus*). Žádný z odchycených norníků nebyl infikován kokcidiemi rodu *Eimeria* či *Isospora*.

Maďarsko

Odchyty v Maďarsku prováděly Ema Hrouzková a Jana Martinů. Ema Hrouzková prováděla odchyty v září roku 2013 na lokalitách Bábolna, Debrecen, Korosladány, Mád, Medgyesegyháza, Morahalom a Nyírbogát. Podařilo se odchytit 14 hrabošů polních

(*M. arvalis*). Jana Martinů prováděla odchyty v listopadu roku 2014 na lokalitách Alsonémedi, Bugyi, Kecskeméti Utca a Sári. Vzorky z těchto lokalit pocházely z 9 hrabošů polních (*M. arvalis*), a 1 norníka rudého (*C. glareolus*). Procento hrabošovitých hlodavců infikovaných kokciemi činilo z obou odchytů 39 %.

Ázerbajdžán

Vzorky z Ázerbajdžánu poskytla Turkan Gurbanova. Sběry prováděla poblíž vesnice Musviq v oblasti Khachmaz v severovýchodní části Ázerbajdžánu při pobřeží Kaspického moře. V této oblasti byli odchyceni 2 hraboši pospolití (*M. socialis*). Kokcidie nebyly přítomny v žádném z těchto hrabošů.

4.1.3. Molekulární identifikace hlodavců

Molekulární identifikaci hrabošovitých hlodavců jsem provedla celkem u 10 vzorků; z toho 7 vzorků z Bulharska bylo v terénu určeno na základě morfologie jako *M. agrestis*, 1 vzorek z Francie jako *Microtus* sp., a 2 vzorky ze Srbska jako *M. subterraneus*. Molekulární analýzy prokázaly přítomnost 1 hraboše polního (*M. arvalis*), 4 hrabošů východoevropských (*M. levis*) a 2 hrabošů mokřadních (*M. agrestis*) z Bulharska, 1 hraboše mokřadního (*M. agrestis*) z Francie a 2 hrabošů podzemních (*M. subterraneus*) ze Srbska.

4.1.4. Vyšetření trusu hrabošovitých hlodavců

V laboratoři jsem vzorky trusu vyšetřila flotační metodou na přítomnost kokcií a dalších endoparazitů. V několika případech jsem diagnostikovala smíšenou infekci, tedy infekci více druhů/morfotypů kokcií současně u jednoho odchyceného hlodavce. Nejčastěji se jednalo o infekce různými druhy/morfotypy rodu *Eimeria* (Obr. 15 v Příloze). U jednoho jedince byla zjištěna infekce kokciemi rodu *Eimeria* (Eimeriidae) a zároveň kokciemi rodu *Hammondia* (Sarcocystidae). U několika dalších jedinců pak byla zjištěna smíšená infekce eimeriemi a isosporami. Z důvodu nejasné taxonomie bude nadále termín „isospora“ používán jako označení morfotypu, nikoliv taxonomické jednotky.

4.1.4.1. Prevalence kokcií u nakažených hlodavců

Na základě počtu infikovaných jedinců jsem vypočítala prevalenci kokcií (poměr počtu kokcií-positivních proti celkovému počtu odchycených hrabošovitých hlodavců převedený

na procenta u jednotlivých druhů hlodavců na jednotlivých lokalitách (viz Tab. 7 v Příloze). Průměrná prevalence kokcií činila 42 % (105/251) u *C. glareolus*, 62 % (26/42) u *M. agrestis*, 51 % (31/61) u *M. arvalis*, 67% (4/6) u *M. levis*, 67 % (2/3) u *M. oeconomus* a 80 % (4/5) u *M. subterraneus*. U *A. amphibius* a *M. socialis* byla prevalence nulová.

4.1.4.2. Infekce jinými parazity

Vyšetřením trusu flotační metodou a následnou mikroskopií jsem u některých vzorků prokázala přítomnost hlístic z čeledí Strongylidae, Capillariidae (rod *Capillaria*) a Oxyuridae (rody *Aspiculuris* a *Syphacia*). Dále se ve vzorcích vyskytovalygregariny z čeledi Monocystidae a tasemnice z čeledí Hymenolepididae a Mesocestoididae (Tab. 7 v Příloze). Převážně se jednalo o vajíčka, zřídka byli ve vzorku přítomni i dospělci.

4.2. Sekvenace

Z celkového počtu 159 kokcidia-positivních vzorků se mi podařilo získat kvalitní sekvence pro fylogenetickou analýzu pouze pro 64 vzorků. Ze vzorků kokcií v níže uvedené tabulce (Tab. 4) jsem pomocí specifických primerů získala 46 sekvencí SSU o přibližné délce 1800 bp s průměrným GC obsahem 46,74 %, a 44 sekvencí COI o přibližné délce 800 bp s průměrným GC obsahem 34,62 %.

Tab. 4: Osekvenované kokcidie z hrabošovitých hlodavců.

Pracovní vzorku	Hostitel	Datum odchyty	Intenzita kokcidiové infekce	Lokalita	SSU	COI
2_5ML_BG	<i>M. levis</i>	28/8/14	E++++	Shipka, Bulharsko	-	x
2_7MAGR_BG	<i>M. agrestis</i>	28/8/14	E+++	Shipka, Bulharsko	x	x
4_5MA_BG	<i>M. arvalis</i>	30/8/14	E++++	Kamen Brjag, Bulharsko	x	x
7_2ML_BG	<i>M. levis</i>	2/9/14	E++++	Kabile, Bulharsko	x	x
7_7ML_BG	<i>M. levis</i>	2/9/14	E++++	Kabile, Bulharsko	x	-
2MA_CB	<i>M. arvalis</i>	3/10/14	E+++	České Budějovice, ČR	-	x
6MA_CB	<i>M. arvalis</i>	3/10/14	E++++	České Budějovice, ČR	-	x
7MA_CB	<i>M. arvalis</i>	3/10/14	E++++	České Budějovice, ČR	x	-
8MA_CB	<i>M. arvalis</i>	3/10/14	E++++	České Budějovice, ČR	x	-
7CG_JA	<i>C. glareolus</i>	17/8/14	E+++	Jáchymov, ČR	-	x

1L_MAGR_LI	<i>M. agrestis</i>	8/10/14	E++++	Litvínov, ČR	x	
B115_MAGR_LI	<i>M. agrestis</i>	8/10/14	E+++	Litvínov, ČR	-	x
C40_CG_LI	<i>C. glareolus</i>	8/10/14	E++++	Litvínov, ČR	x	-
D28_MAGR_LI	<i>M. agrestis</i>	8/10/14	E+++	Litvínov, ČR	x	-
P_CG_LI	<i>C. glareolus</i>	8/10/14	I++++	Litvínov, ČR	-	x
PPL2_CG_LI	<i>C. glareolus</i>	8/10/14	E+++	Litvínov, ČR	-	x
5CG_LUZ	<i>C. glareolus</i>	13/6/14	E++++	Lužnice, ČR	x	x
6CG_LUZ	<i>C. glareolus</i>	13/6/14	I++++	Lužnice, ČR	-	x
22CG_LUZ	<i>C. glareolus</i>	13/6/14	E+++	Lužnice, ČR	x	-
35CG_LUZ	<i>C. glareolus</i>	14/6/14	E++++	Lužnice, ČR	x	-
10CG_PLE	<i>C. glareolus</i>	12/9/13	E++	Plešnice, ČR	x	-
48CG_PLE	<i>C. glareolus</i>	21/9/13	E+++	Plešnice, ČR	x	-
50CG_PLE	<i>C. glareolus</i>	21/9/13	I++	Plešnice, ČR	x	x
6MS_TR	<i>M. subterraneus</i>	26/4/14	E++	Třebíč – Ptáčov, ČR	x	-
49CG_TYM	<i>C. glareolus</i>	8/3/14	I+++	Tymákov, ČR	x	x
57CG_TYM	<i>C. glareolus</i>	8/3/14	I++++	Tymákov, ČR	x	x
60CG_TYM	<i>C. glareolus</i>	13/3/14	I++	Tymákov, ČR	-	x
89CG_TYM	<i>C. glareolus</i>	21/5/14	I++++	Tymákov, ČR	x	x
98MA_TYM	<i>M. arvalis</i>	22/5/14	E+++	Tymákov, ČR	x	x
101MA_TYM	<i>M. arvalis</i>	22/5/14	E+++	Tymákov, ČR	x	-
116CG_TYM	<i>C. glareolus</i>	19/9/14	E+++	Tymákov, ČR	-	x
120MA_TYM	<i>M. arvalis</i>	19/9/14	E++++	Tymákov, ČR	x	x
121CG_TYM	<i>C. glareolus</i>	19/9/14	E++++	Tymákov, ČR	x	-
F29CG_FI	<i>C. glareolus</i>	20/9/13	E+	Isojärvi, Finsko	-	x
80CG_FR	<i>C. glareolus</i>	22/10/14	E+++	Beaugency, Francie	x	x
92CG_FR	<i>C. glareolus</i>	22/10/14	E++++	Beaugency, Francie	x	x
93MAGR_FR	<i>M. agrestis</i>	22/10/14	E+++	Beaugency, Francie	x	x
31MAGR_FR	<i>M. agrestis</i>	18/10/14	E++++	Braucourt, Francie	x	-
34CG_FR	<i>C. glareolus</i>	18/10/14	E++++	Braucourt, Francie	-	x
60MAGR_FR	<i>M. agrestis</i>	20/10/14	E++++	Briare, Francie	x	x
53CG_FR	<i>C. glareolus</i>	19/10/14	E++/+++	Douchy, Francie	-	x
17MAGR_FR	<i>M. agrestis</i>	17/10/14	E++++	Greux, Francie	x	x

18CG_FR	<i>C. glareolus</i>	17/10/14	E+++	Greux, Francie	x	-
64CG_FR	<i>C. glareolus</i>	21/10/14	E+++	St-Pere-sur-Loire, Francie	x	x
74MAGR_FR	<i>M. agrestis</i>	21/10/14	E++++	St-Pere-sur-Loire, Francie	x	x
6_3MA_HU	<i>M. arvalis</i>	18/9/13	E+++	Medgyesegyháza, Maďarsko	x	-
5_14CG_RU	<i>C. glareolus</i>	12/8/14	E+++	Pskov, Rusko	-	x
11_14MAGR_RU	<i>M. agrestis</i>	13/8/14	E++++	Pskov, Rusko	x	-
15_14CG_RU	<i>C. glareolus</i>	13/8/14	E+++	Pskov, Rusko	-	x
18_14CG_RU	<i>C. glareolus</i>	13/8/14	E/H++++	Pskov, Rusko	x	x
21_14MAGR_RU	<i>M. agrestis</i>	14/8/14	E++++	Pskov, Rusko	-	x
22_14CG_RU	<i>C. glareolus</i>	14/8/14	H++++	Pskov, Rusko	x	-
26_14CG_RU	<i>C. glareolus</i>	15/8/14	E/I++++	Pskov, Rusko	x	x
32_14CG_RU	<i>C. glareolus</i>	16/8/14	E++++	Pskov, Rusko	x	-
11CG_RU	<i>C. glareolus</i>	24/9/13	E+++	Pskov, Rusko	-	x
18CG_RU	<i>C. glareolus</i>	26/9/13	E++++	Pskov, Rusko	x	x
22CG_RU	<i>C. glareolus</i>	26/9/13	E++++	Pskov, Rusko	x	x
23CG_RU	<i>C. glareolus</i>	26/9/13	E+	Pskov, Rusko	-	x
25CG_RU	<i>C. glareolus</i>	27/9/13	E++++	Pskov, Rusko	x	x
32CG_RU	<i>C. glareolus</i>	28/9/13	E++++	Pskov, Rusko	x	-
238CG_SK	<i>C. glareolus</i>	5/6/14	E+++	Bratislava, Slovensko	x	x
239CG_SK	<i>C. glareolus</i>	5/6/14	E+++	Bratislava, Slovensko	x	x
243CG_SK	<i>C. glareolus</i>	5/6/14	E++++	Bratislava, Slovensko	x	x
245CG_SK	<i>C. glareolus</i>	5/6/14	E++++	Bratislava, Slovensko	x	x

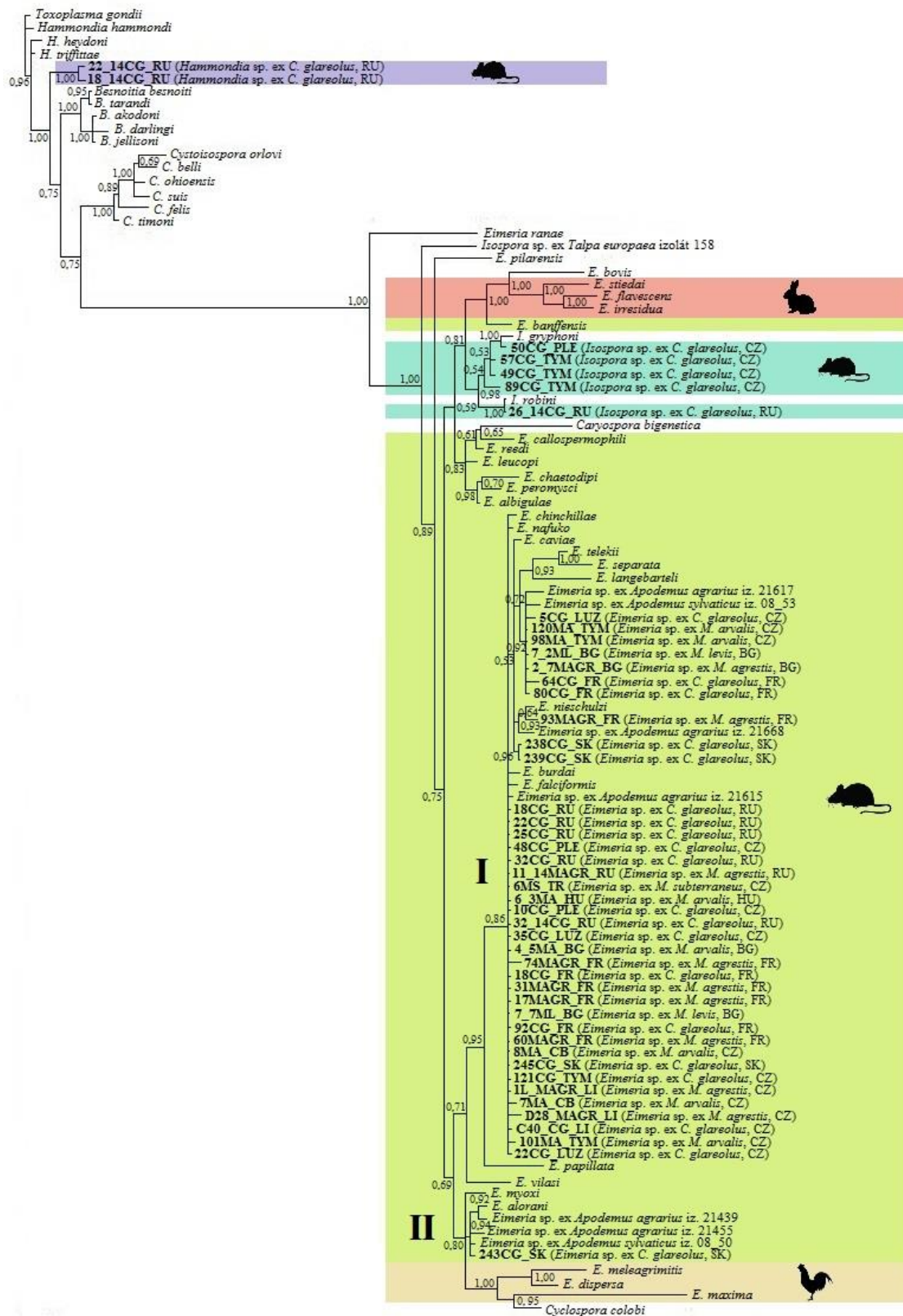
E, *Eimeria*; I, *Isospora*; H, *Hammondia*; x, sekvence je; -, sekvence není.

4.3. Fylogenetické analýzy

4.3.1. Gen pro malou jadernou podjednotku

Pro fylogenetickou analýzu genu pro SSU jsem použila 56 sekvencí kokcií vybraných z databáze GenBank (jednalo se zejména o králíčí, drůbeží a hlodavčí eimerie) a 46 sekvencí kokcií, které jsem získala z hrabošovitých hlodavců, převážně norníků rudých (*C. glareolus*). Z těchto sekvencí jsem pomocí bayesovské analýzy spočítala fylogenetický strom. Jako outgroup jsem použila sekvenci *T. gondii*. Hodnoty posteriorní pravděpodobnosti se

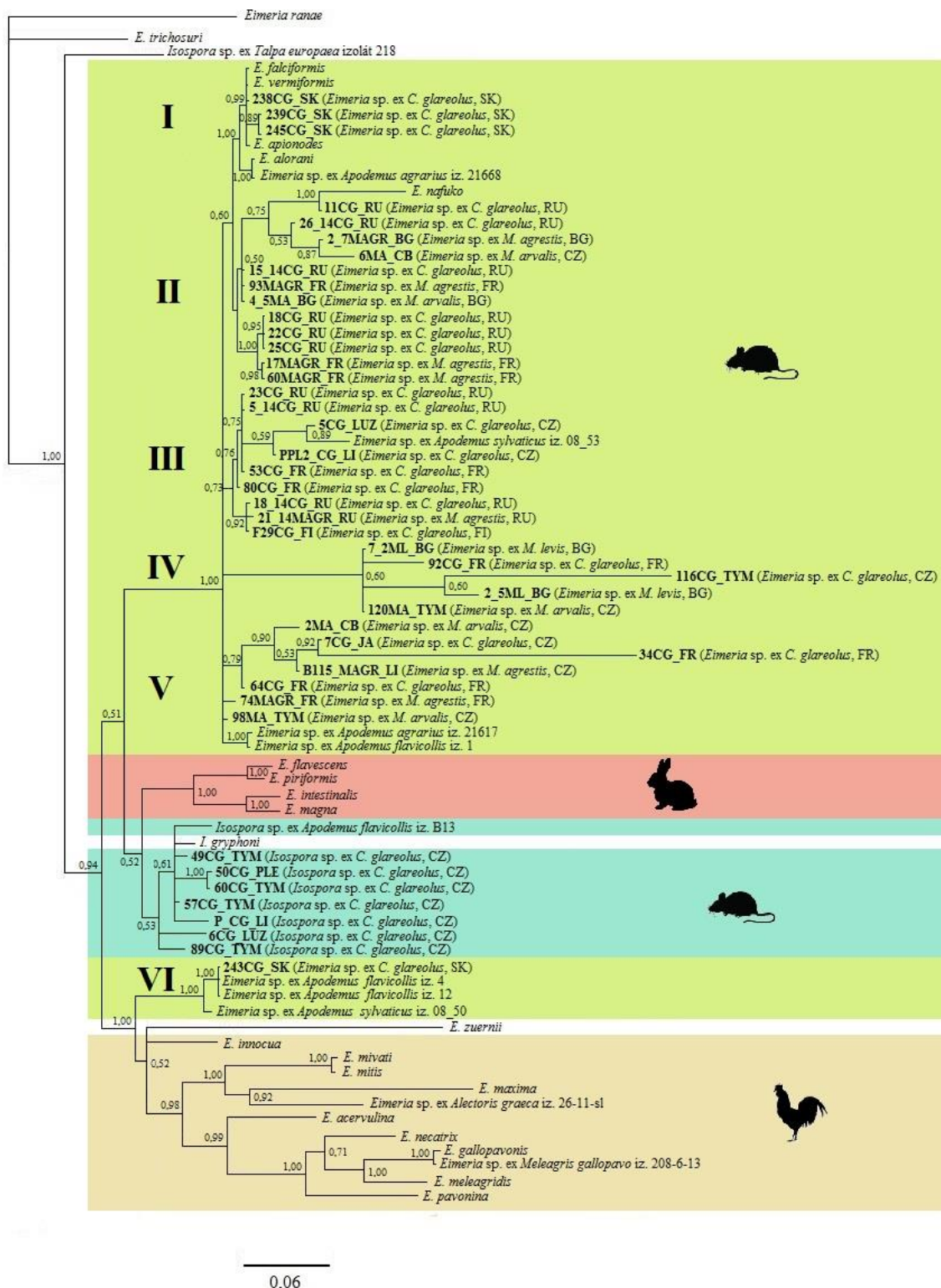
pohybovaly od 0,51 do 1,00. Fylogenetické analýzy rozdělily sekvence eimerií z hrabošovitých hlodavců na 2 linie (I, II). Sekvence isospor z hrabošovitých hlodavců vytvořily jedinou linii (Obr. 11).



Obr. 11: Fylogenetická analýza sekvencí SSU.

4.3.2. Mitochondriální gen pro cytochrom c oxidázu I

Pro fylogenetickou analýzu mitochondriálního genu pro COI jsem použila 33 sekvencí kokcií z databáze GenBank (převážně králičí, drůbeží a hlodavčí eimerie) a 44 sekvencí kokcií, které jsem získala z hrabošovitých hlodavců. Z těchto sekvencí jsem pomocí bayesovské analýzy spočítala fylogenetický strom. Jako outgroup jsem použila sekvenci *E. ranae*. Hodnoty posteriorní pravděpodobnosti se pohybovaly od 0,50 do 1,00. Fylogenetické analýzy rozdělily sekvence eimerií z hrabošovitých hlodavců na 6 linií (I – VI). Sekvence isospor z hrabošovitých hlodavců vytvořily jedinou linii (Obr. 12). Linie byly vymezeny na základě vzájemné fylogenetické blízkosti uvnitř stromu, a zároveň jasné izolace od ostatních linií.



Obr. 12: Fylogenetická analýza sekvencí COI.

5. DISKUZE

5.1. Odchycení hlodavci z podčeledi Arvicolinae

Původním záměrem bylo odchytit běžné druhy hrabošovitých hlodavců vyskytující se na území České republiky (*A. amphibius*, *M. agrestis*, *M. arvalis*, *M. subterraneus* a *C. glareolus*). Jelikož odchyty probíhaly i v zahraničí, podařilo se získat a zařadit do analýz i méně známé druhy hrabošů (*M. levis*, *M. oeconomus* a *M. socialis*). Na některých lokalitách bylo odchyceno velmi málo hrabošovitých hlodavců. To mohlo být způsobeno především výběrem lokality či sezónním výskytem hlodavců. Některé druhy hrabošů (např. hraboš polní) se vyznačují velkou populační dynamikou, kdy dochází periodicky jednou za cca 3-4 roky k prudkému nárůstu a následně prudkému poklesu populace (Kratochvíl, 1959). Tento fenomén může být příčinou, proč jsem v okolí obce Tymákov, kde jsem chytala opakovaně, v prvním roce nechytala žádného hraboše, zatímco ve druhém roce byli na stejném místě v polovině případů odchyceni právě hraboši. Počty odchycených hlodavců mohly být také ovlivněny délkou odchyty (na některých lokalitách se chytalo pouze jednu noc) či počasím (déšť, mráz, přízemní mrazíky).

5.2. Infekce odchycených hlodavců kokcidiemi

V trusu hrabošovitých hlodavců se nejčastěji vyskytují kokcidie rodu *Eimeria*. Vzácněji lze najít oocysty kokcidií rodu *Isospora*, případně *Caryospora* (Saxe a kol., 1960; Pellérdy, 1974; Levine a Ivens, 1990). Kokcidie rodu *Caryospora* se v trusu savců běžně nevyskytují. V roce 1960 však byla popsána *Caryospora microti* z trusu hraboše pensylvánského (*M. pennsylvanicus*) (Saxe a kol., 1960). Jelikož její sporulace probíhala abnormálně, lze se domnívat, že se mohlo jednat pouze o pseudoinfekci (tj. pasáž oocyst caryospor z jiného hostitele trávicím traktem hraboše) (www.biology.unm.edu¹⁶). Například u kokcidiie *Caryospora bigenetica* byla takto prokázána možnost přenosu z chřestýše na prasata a hlodavce, včetně hrabošovitých (Koudela, 1993). S pseudoinfekcemi se u kokcidií můžeme setkat poměrně často, je však téměř nemožné je bez použití experimentů prokázat, a odlišit je tak od pravých infekcí. Na základě parazitologického vyšetření, případně molekulární identifikace, jsem ve vzorcích, které jsem analyzovala, prokázala zejména přítomnost kokcidií rodu *Eimeria*, méně často *Isospora*, a ve dvou případech též *Hammondia*. Kokcidie rodu *Hammondia* nebyly u hrabošovitých hlodavců dosud popsány. Může se tedy jednat o pseudoinfekci, o jinou kokcidiu blízkou hammondii, nebo o pravou infekci.

Fylogenetickou analýzou dvou různých genů (jaderného SSU a mitochondriálního COI) jsem zjistila, že některé sekvence ve fylogenetickém stromě SSU kladou do jiné linie kokcií, než tytéž vzorky ve fylogenetickém stromě COI, a naopak. Například vzorek 18_14CG_RU je na základě fylogenetické analýzy SSU řazen mezi hammondie, avšak fylogenetická analýza genu pro COI tento vzorek zařadila mezi eimerie. Podobný případ byl pozorován u vzorku 26_14CG_RU řazeného v případě analýzy SSU mezi isospory, ale v případě analýzy COI mezi eimerie. Tyto případy lze vysvětlit tím, že se jednalo o smíšenou infekci hostitele dvěma různými rody kokcií; ta byla prokázána i mikroskopickým vyšetřením.

Jak již bylo uvedeno v první kapitole této práce, rod *Isospora* byl na základě výsledků fylogenetických analýz, hostitelské specifity a přítomnosti/absenci Stiedova tělíska rozdělen na rod *Isospora* (se Stiedovým tělískem) zastupující čeleď Eimeriidae, a rod *Cystoisospora* (bez Stiedova tělíska) náležící do čeledi Sarcocystidae (Carreno a Barta, 1999). Do rodu *Cystoisospora* byly přeřazeny všechny savčí isospory, a rod *Isospora* byl ponechán ptačím zástupcům (Barta a kol., 2005). Několik studií včetně mých výsledků však naznačuje, že kokcie morfotypu „*Isospora*“, nalezené v trusu hlodavčích hostitelů, jsou blíže příbuzné ptačím „isosporám“ čeledi Eimeriidae. Navíc „isospora“ osekvenovaná z krtka obecného se zdá být sice fylogeneticky vzdálenější hlodavčím a ptačím „isosporám“, ale přesto se nachází mezi eimeriemi (Kvičarová a Hypša, 2013). V případě hlodavčích „isospor“ se nabízí vysvětlení, že se jedná o pseudoinfekci ptačími „isosporami“ (hlodavci mohli oocysty pozřít spolu s potravou). Je však rovněž možné, že se skutečně jedná o savčí „isospory“, které jsou fylogeneticky nepřibuzné savčím „isosporám“, patřícím nyní do rodu *Cystoisospora*. Tuto hypotézu ale bude nutné ověřit infekcí živých kokcidia-negativních hlodavců jednou oocystou „isospory“ a zjistit, zda následně dojde k vylučování nevysporulovaných oocyst trusem takto infikovaného jedince, a poté k jejich sporulaci.

5.3. Fylogenetické analýzy

Fylogenetické analýzy genů SSU a COI potvrzují, že rody *Eimeria* a *Isospora* nejsou monofyletické (např. rod *Isospora* v rámci čeledi Eimeriidae je v současné době považován za polyfyletický). Kokcie rodu *Cyclospora* i *Caryospora* patřící mezi Eimeriidae kladou s kokciemi rodu *Eimeria*. Tento fakt potvrzuje i má studie; *Cyclospora colobi* parazitující u guerézy pláštikové (*Colobus guereza*) se na základě analýzy malé jaderné podjednotky zařadila jako kokcie blíže příbuzná drůbežím eimeriím. Heteroxenní kokcie *Caryospora*

bigenetica, jejímž definitivním hostitelem je chřestýš lesní (*Crotalus horridus*), je na základě analýzy malé jaderné podjednotky příbuzná hlodavčím eimeriím.

Mé výsledky naznačují, že stejně jako u eimerií hlodavců rodu *Apodemus* (Kvičarová a Hypša, 2013), dochází i u eimerií z hrabošovitých hlodavců k rozpadu na několik linií. U fylogenetické analýzy SSU se eimerie z hrabošovitých hlodavců rozdělily pouze na 2 linie (I – II). Linie II je tvořena pouze 1 vzorkem, zatímco linii I tvoří zbytek získaných eimerií z hrabošovitých hlodavců. Proto zde nemohu prokázat žádnou hostitelskou či geografickou závislost; tento výsledek není překvapivý, jelikož je známo, že tento gen je značně konzervativní. Isospory v tomto fylogenetickém stromě tvoří jednu monofyletickou, hostitelsky specifickou linii. Ve fylogenetické analýze COI se eimerie z hrabošovitých hlodavců rozdělily na 6 linií (I - VI). Linii I lze považovat za hostitelsky i geograficky specifickou, jelikož se v ní nacházejí pouze eimerie z *C. glareolus* pocházející z jedné lokality na Slovensku. U ostatních linií (II – V) není patrná hostitelská či geografická závislost. Linie VI je zastoupena pouze jedním vzorkem, proto ani zde nemohu hovořit o hostitelské či geografické specifitě. Naopak isospory z hrabošovitých hlodavců tvoří jednu monofyletickou, hostitelsky specifickou linii (všechny vzorky pocházejí z *C. glareolus*). Je zajímavé, že některé linie (I, III, V a VI; Obr. 12) klastrují s eimeriemi z myšic (*Apodemus* sp.). Tuto skutečnost lze vysvětlit například tím, že normíci rudí (*C. glareolus*) obývají stejné biotopy jako myšice rodu *Apodemus*. Eimerie z myšic nemusejí být striktně hostitelsky specifické, a mohou tedy infikovat i hrabošovité hlodavce, a naopak.

Fylogenetické analýzy potvrdily, že mitochondriální gen pro COI vykazuje mnohem větší variabilitu než gen pro SSU. Zatímco u COI se eimerie z hrabošovitých hlodavců rozdělily do 6 linií, u SSU se tyto eimerie rozdělily pouze do 2 linií, kde linie II, zastoupená jediným vzorkem, je fylogeneticky vzdálenější ostatním eimeriím z hrabošovitých hlodavců, zatímco v linii I splývají fylogeneticky blízce příbuzné druhy. Isospory se u obou analýz zřetelně oddělily od hlodavčích eimerií, a vytvořily tak samostatnou, fylogeneticky vzdálenou linii.

6. ZÁVĚR

V této práci jsem se zabývala rekonstrukcí fylogenetických vztahů kokcií u hrabošovitých hlodavců na základě materiálu získaného odchyty hlodavců z podčeledi Arvicolinae na území České republiky a dalších 10 zemí Evropy i Asie. Podařilo se mi získat celkem 39 sekvencí SSU eimerií z pěti druhů hrabošovitých hlodavců (*C. glareolus*, *M. agrestis*, *M. arvalis*, *M. levis* a *M. subterraneus*), 5 sekvencí SSU isospor z norníků rudých (*C. glareolus*) a 2 sekvence SSU hammondí z norníků rudých (*C. glareolus*). Dále se mi podařilo získat 37 sekvencí COI eimerií ze 4 druhů hrabošovitých hlodavců (*C. glareolus*, *M. agrestis*, *M. arvalis* a *M. levis*) a 7 sekvencí COI isospor z *C. glareolus*. Fylogenetické analýzy rozdělily eimerie získané z hrabošovitých hlodavců na několik hostitelsky i geograficky nesespecifických linií. V některých liniích klastrovaly eimerie z hrabošovitých hlodavců společně s eimeriemi z myšic rodu *Apodemus*. Isospory získané z hrabošovitých hlodavců vytvořily pouze 1 hostitelsky specifickou linii, a to blízkou příbuznou ptačím isosporám. U eimerií z hlodavců rodu *Clethrionomys* a *Microtus* můžeme pozorovat podobný trend klastrování jako u eimerií z hlodavců rodu *Apodemus*.

Tuto práci bych ráda v budoucnu rozšířila o další vzorky hlodavců infikovaných především kokciemi rodu *Isospora*. Ráda bych pomocí experimentálních infekcí potvrdila fylogenetickou pozici hlodavčích (tj. savčích) isospor, zda se opravdu jedná o kokcie blízké příbuzné eimeriím, jak nyní naznačují fylogenetické analýzy, a případně tak vyvrátila hypotézu, že jde pouze o pseudoinfekci ptačími isosporami. Dále bych se kromě fylogenetických analýz chtěla zaměřit na morfologické a morfometrické analýzy vysporulovaných oocyst, fylogenetické vztahy a populačně-genetickou strukturu jejich hlodavčích hostitelů, a koevoluci parazita s hostitelem.

7. POUŽITÉ ZDROJE

7.1. Odborné publikace

- Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EAD, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW (2012) The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59: 429-493.
- Anděra M, Gaisler J (2012) Savci České republiky: Popis, rozšíření, ekologie, ochrana. Academia, Praha.
- 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, Elbrecht A, Perkins-Barrow A, Jenkins MC, Danforth HH, Ruff MD, Profous-Juchelka H (1997) Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology* 83: 262-271.
- Barta JR, Schrenzel MD, Carreno RA, Rideout BA (2005) The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isoospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isoospora* species infecting mammals. *Journal of Parasitology* 91: 726-727.
- Berto BP, McIntosh D, Lopez CWG (2014) Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 23: 1-15.
- Burki F, Shalchian-Tabrizi K, Pawlowski J (2008) Phylogenomics reveals a new “megagroup” including most photosynthetic eukaryotes. *Biology Letters* 4:366 - 369.
- Carleton MD, Gardner AL, Pavlinov IY, Musser GG (2014) The valid generic name for red-backed voles (Muroidea: Cricetidae: Arvicolinae): restatement of the case for *Myodes* Pallas, 1811. *Journal of Mammalogy* 95: 943–959.

- Carreno RA, Barta JR (1999) An eimeriid origin of isosporoid coccidia with stieda bodies as shown by phylogenetic analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Parasitology* 85: 77-83.
- 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.
- Carreno RA, Schnitzler BE, Jeffries AC, Tenter AM, Johnson AM, Barta JR (1998) Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 45: 184-188.
- Černá Ž (1983) Kokcidie některých domácích a užitkových zvířat a kokcidie člověka. Academia, Praha.
- Čížkovská B (2003) Biology and pathogenicity of two *Eimeria* species from *Mastomys natalensis*. Diploma thesis. Department of Parasitology, VFU Brno.
- De Vos AJ (1970) Studies on the host range of *Eimeria chinchillae* de Vos & van der Westhuizen. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 37: 29-36.
- Dungel J, Gaisler J (2002) Atlas savců České a Slovenské republiky. Academia, Praha.
- Duszynski DW (1986) Host specificity in the coccidia of small mammals: fact or fiction? In: *Advances in protozoological research* (ed. Bereczky M). *Symposia Biologica Hungarica*. Akademiai Kiadó, Budapest 33: 325–337.
- Duszynski DW, Lynch AJ, Cook JA (2007) Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) infecting cricetid rodents from Alaska, U.S.A., and northeastern Siberia, Russia, and description of a new *Eimeria* species from *Myodes rutilus*, the northern red-backed vole. *Comparative Parasitology* 74: 294-311.
- Duszynski DW, Upton SJ (2001) *Cyclospora*, *Eimeria*, *Isospora* and *Cryptosporidium* spp. In: *Parasitic diseases of wild mammals* (ed. Samuel WM, Pybus MJ, Kocan AA). Iowa State University Press, IA.

- Duszynski DW, Wilber PG (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology* 83: 333-336.
- Franzen C, Müller A, Bialek R, Diehl V, Salzberger B, Fätkenheuer G (2000) Taxonomic position of the human intestinal protozoan parasite *Isospora belli* as based on ribosomal RNA sequences. *Parasitology Research* 86: 669-676.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O (2010) SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27: 221-224.
- 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.
- Chaline J, Graf JD (1988) Phylogeny of the Arvicolidae (Rodentia): Biochemical and paleontological evidence. *Journal of Mammalogy* 69: 22-33.
- Jaarola M, Searle JB (2002) Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasia inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 11: 2613-2621.
- Jablonski D, Erwin DH, Lipps JH (1996) *Evolutionary paleobiology*. University of Chicago Press. Chicago, IL.
- Joyner LP (1982) Host and site specificity. In: *The biology of the coccidia* (ed. Long PL). University Park Press, Baltimore, MD.
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research* 33: 511-518.
- Kheysin YM (1972) *Life cycles of coccidia of domestic animals*. William Heinemann Medical Books, London.
- Koudela B (1993) Experimental transmission of *Caryospora bigenetica* Wacha et Christiansen, 1982 (Apicomplexa: Eimeriidae) from a rattlesnake, *Crotalus atrox*, to rodents and pigs. *Folia Parasitologica* 40: 81-84.

- Koudela B, Vítovec J (1994) Life cycle and pathogenicity of *Eimeria strakonicensis* n.sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in experimentally infected common voles (*Microtus arvalis*). Canadian Journal of Zoology 72: 239-246.
- Kratochvíl J (1959) Hřaboř polnı́ – *Microtus arvalis*. ĀSAV, Praha.
- Kviĉerov J, Hypřa V (2013) Host-parasite incongruences in rodent *Eimeria* suggest significant role of adaptation rather than cophylogeny in maintenance of host specificity. PLoS ONE 8: e63601.
- Kviĉerov J, Hypřa V, Dvořkov N, Mikulı́ĉek P, Jandzik D, Gardner MG, Javanbakht H, Tiar G, řirok P (2014) *Hemolivia* and *Hepatozoon*: Haemogregarines with tangled evolutionary relationships. Protist 165: 688-700.
- Kviĉerov J, Mikeř V, Hypřa V (2011) Third lineage of rodent eimerians: morphology, phylogeny and re-description of *Eimeria myoxi* (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Eliomys quercinus* (Rodentia: Gliridae). Parasitology 138: 1217–1223.
- Kviĉerov J, Pakandl M, Hypřa V (2008) Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. Parasitology 135: 443–452.
- Levine ND, Ivens V (1990) The coccidian parasites of rodents. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Li J, Zheng X, Cai YS, Zhang XY, Yang M, Yue BS, Li J (2015) DNA barcoding of Murinae (Rodentia: Muridae) and Arvicolinae (Rodentia: Cricetidae) distributed in China. Molecular Ecology Resources 15: 153-167.
- Long P (1982) The biology of the coccidia. University Park Press, Baltimore, MD.
- Long PL, Joyner LP (1984) Problems in the identification of species of *Eimeria*. Journal of Protozoology 31: 535-541.
- Lopez-Garcia JM, Luzi E, Berto C, Peretto C, Arzarello M (2015) Chronological context of the first hominin occurrence in Southern Europe: the *Allophaiomys ruffoi* (Arvicolinae, Rodentia, Mammalia) from Pirro 13 (Pirro Nord, Apulia, southwestern Italy). Quaternary Science Review 107: 260-266.

- Matsubayashi M, Takami K, Abe N, Kimata I, Tani H, Sasai K, Baba E (2005) Molecular characterization of crane coccidia, *Eimeria gruis* and *E. reichenowi*, found in feces of migratory cranes. *Parasitology Research* 97: 80-83.
- Meredith RW, Janečka JE, Gatesy J, Ryder OA, Fisher CA, Teeling EC, Goodbla A, Eizirik E, Simão TLL, Stadler T, Rabosky DL, Honeycutt RL, Flynn JJ, Ingram CM, Steiner C, Williams TL, Robinson TJ, Burk-Herrick A, Westerman M, Ayoub NA, Springer MS, Murphy WJ (2011) Impacts of the cretaceous terrestrial revolution and KPg extinction on mammal diversification. *Science* 334: 521-524.
- Morrison DA, Bornstein S, Thebo P, Wernery U, Kinne J, Mattson JG (2004) The current status of the small subunit rRNA phylogeny of coccidia (Sporozoa). *International Journal for Parasitology* 34: 501-514.
- Morrison DA, Ellis JT (1997) Effects of nucleotide sequence alignment on phylogeny estimation: A case study of 18S rDNAs of Apicomplexa. *Molecular Biology and Evolution* 14: 428-441.
- Musser GG, Carleton MD (2005) Superfamily Muroidea. In: *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (ed. Wilson DE a Reeder DAM). Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Moore RB, Oborník M, Janouškovec J, Chrudimský T, Vancová M, Green DH, Wright SW, Davies NW, Bolch CJS, Heimann K, Šlapeta J, Hoegh-Guldberg O, Logsdon JM, Carter DA (2008) A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* 451: 959-963.
- Page RDM (1996) TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Pallas PS (1811) *Zoographia Rosso-Asiatica, sistens omnium animalium in extenso Imperio Rossico et adjacentibus maribus observatorum recensionem, domicilia, mores et descriptiones, anatomen atque icones plurimorum*. Officina Caes. Academiae Scientiarum, Petropoli, Russia.
- Pavlinov IY (2003) *Sistematika sovremennykh mlekopitayushchikh*. Archives of the Zoological Museum of Moscow State University 46:3–297.

- Pavlinov IY (2006) *Myodes Pallas 1811*, is the valid name for the genus of red-backed voles (Cricetidae). *Zoologicheskii Zhurnal* 85: 667 – 669.
- Pellérdy L (1974) *Coccidia and coccidiosis*. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary.
- Pieniazek NJ, Herwaldt BL (1997) Reevaluating the molecular taxonomy: is human-associated *Cyclospora* a mammalian *Eimeria* species? *Emerging Infectious Diseases* 3: 381-383.
- Poulin R (2007) Host specificity. In: *Evolutionary ecology of parasites* (ed. Poulin R). Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Relman DA, Schmidt TM, Gajadhar A, Sogin M, Cross J, Yoder K, Sethabutr O, Echeverria P (1996) Molecular phylogenetic analysis of *Cyclospora*, the human intestinal pathogen, suggests that it is closely related to *Eimeria* species. *The Journal of Infectious Diseases* 173: 440-445.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539-542.
- Samarasinghe B, Johnson J, Ryan U (2008) Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCR-RFLP assay. *Experimental Parasitology* 118: 592-595.
- Saxe LH, Levine ND, Ivens V (1960) New species of coccidia from the meadow mouse, *Microtus pennsylvanicus*. *Journal of Protozoology* 7: 61-63. Sheather AL (1923) The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Pathology* 36: 266-275.
- Shenbrot GI, Krasnov BR (2005) *An Atlas of the Geographic Distribution of the Arvicoline Rodents of the World (Rodentia, Muridae: Arvicolinae)*. Pensoft Publishers, Sofia, Bulgaria.
- Tenter AM, Barta JR, Beveridge I, Duszynski DW, Mehlhorn H, Morrison DA, Thompson RCA, Conrad PA (2002) The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal for Parasitology* 32: 595–616.

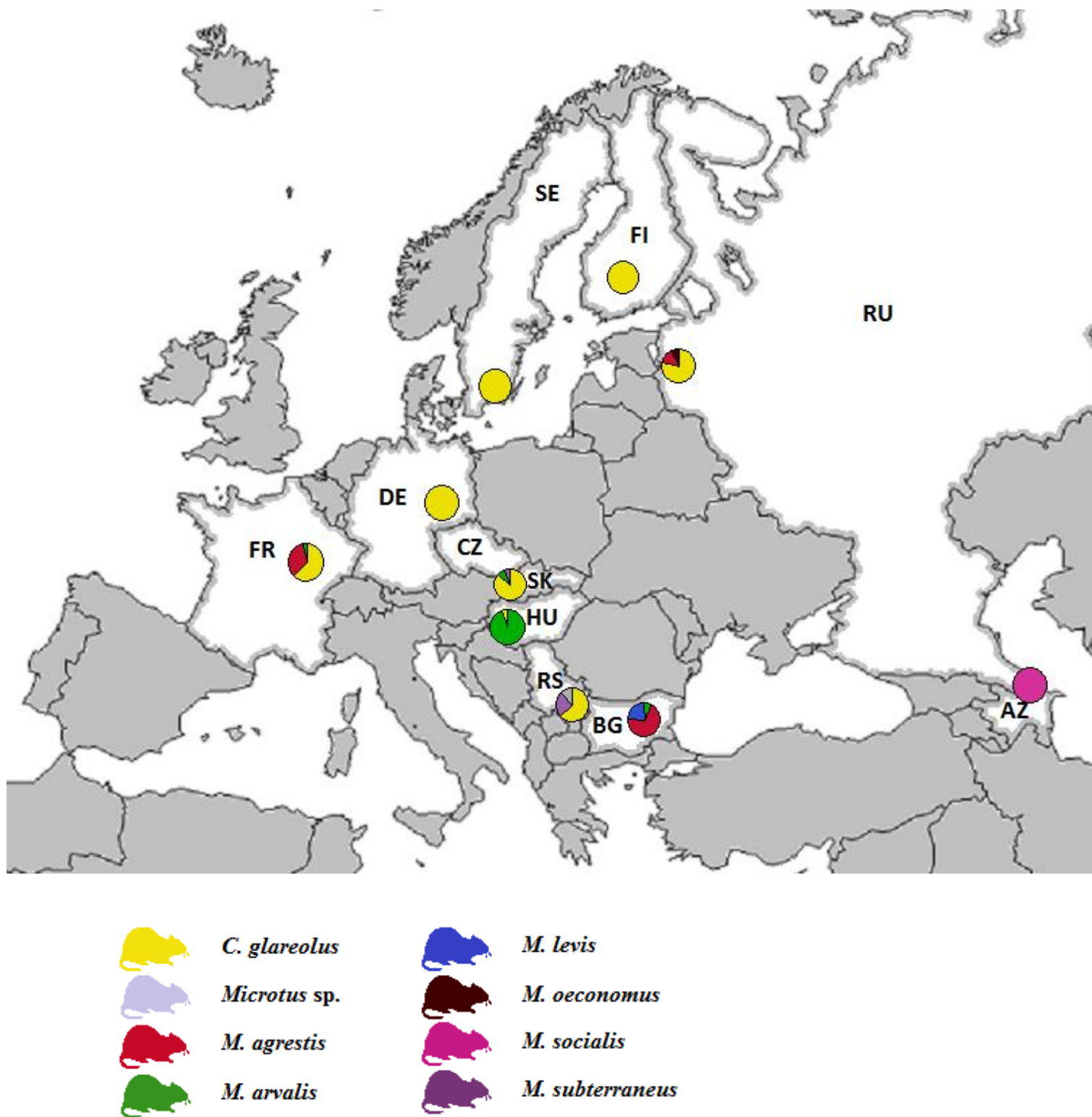
- Tesakov AS, Lebedev VS, Bannikova AA, Abramson NI (2010) *Clethrionomys* Tilesius, 1850 is the valid generic name for red-backed voles and *Myodes* Pallas, 1811 is a junior synonym of *Lemmus* Link, 1795. Russian Journal of Theriology 9: 83-86.
- Thienpont D, Rochette F, Vanparijs OFJ (1979) Diagnosing helminthiasis through coprological examination. Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: 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.
- Upton SJ, McAllister CT, Brillhart DB, Duszynski DW, Wash CD (1992) Cross-transmission studies with *Eimeria arizonensis*-like oocysts (Apicomplexa) in New World rodents of the genera *Baiomys*, *Neotoma*, *Onychomys*, *Peromyscus* and *Reithrodontomys* (Muridae). Journal of Parasitology 78: 406-413.
- Vance TL, Duszynski DW (1985) Coccidian parasites (Apicomplexa: Eimeriidae) of *Microtus* spp. (Rodentia: Arvicolidae) from the United States, Mexico and Japan, with descriptions of five new species. Journal of Parasitology 71: 302-311.
- Volf P, Horák P a kol. (2007) Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha.
- Wiedmer S, Stange J, Kurth T, Bleiss W, Entzeroth R, Kurth M (2011) New insights into the exystation process and oocyst morphology of rodent *Eimeria* species. Protistology 162: 668-678.
- Wilson DE, Reeder DAM (2005) Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference. Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Zhao X, Duszynski DW (2001a) Phylogenetic relationships among rodent *Eimeria* species determined by plastid ORF470 and nuclear 18S rDNA sequences. International Journal for Parasitology 31: 715-719.
- Zhao X, Duszynski DW (2001b) Molecular phylogenies suggest the oocyst residuum can be used to distinguish two independent lineages of *Eimeria* spp. in rodents. Parasitology Research 87: 638-643.

7.2. Internetové zdroje

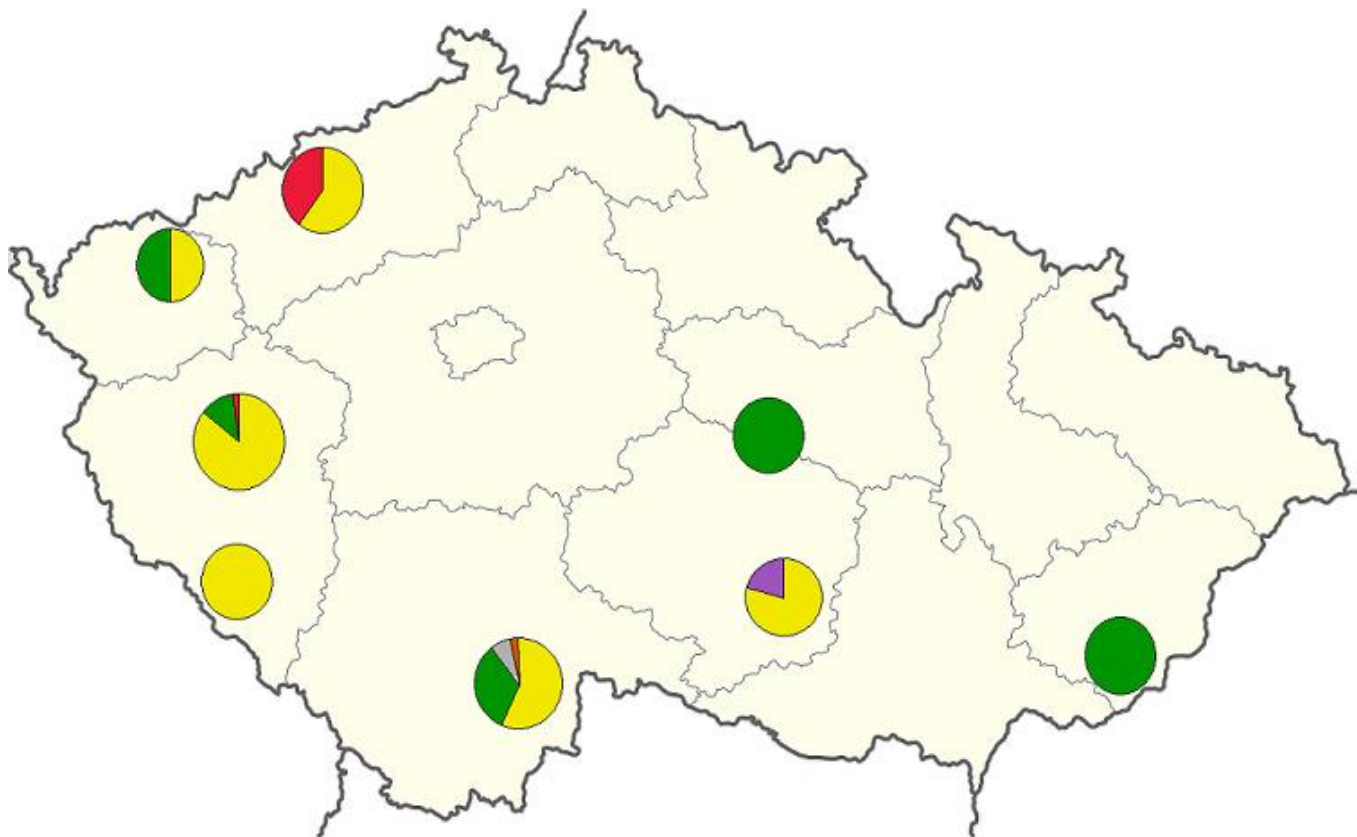
1. Rodentia. In: Integrated Taxonomic Information System (ITIS) [online]. © 2014 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=180130.
2. Voles. In: The IUCN red list of threatened species [online]. © 2014 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/search/>.
3. *Myodes glareolus*. In: The IUCN Red List of Threatened Species [online]. © 2008 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/4973/0>.
4. *Microtus arvalis*. In: The IUCN Red List of Threatened Species [online]. © 2008 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/13488/0>.
5. *Microtus agrestis*. In: The IUCN Red List of Threatened Species [online]. © 2008 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/13426/0>.
6. *Microtus subterraneus*. In: The IUCN Red List of Threatened Species [online]. © 2008 [cit. 2015-02-15]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/13489/0>.
7. *Microtus socialis*. In: The IUCN Red List of Threatened Species [online]. © 2008 [cit. 2015-02-15]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/13458/0>.
8. Общественная полевка — *Microtus socialis*. In: ecosystema.ru [online]. © 2001-2013 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: <http://www.ecosystema.ru/08nature/mamm/126.htm>.
9. *Microtus oeconomus*. In: The IUCN Red List of Threatened Species [online]. © 2008 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/13451/0>.
10. *Microtus oeconomus*, tundra vole. In: Animal Diversity Web [online]. © 2008 [cit. 2015-03-20]. Dostupné z: http://animaldiversity.org/accounts/Microtus_oeconomus/.
11. Sibling vole (*Microtus levis*). In: Norwegian Polar Institute [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.npolar.no/en/species/sibling-vole.html>.







12. *Microtus levis*. In: The IUCN Red List of Threatened Species [online]. © 2008 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/13454/0>.
13. *Arvicola amphibius*. In: The IUCN Red List of Threatened Species [online]. © 2008 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.iucnredlist.org/details/2149/0>.
14. GenBank: BLAST. In: National Center for Biotechnology Information (NCBI) [online]. © 2009 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
15. Free Applied Biosystems Software: Sequence Scanner 2.0. In: Applied Biosystems [online]. © 2013 [cit. 2015-02-18]. Dostupné z: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/support/software-community/free-ab-software.html>.
16. The coccidian genus *Caryospora* [online]. © 2003 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia/CARYOSPORA>.

8. PŘÍLOHY

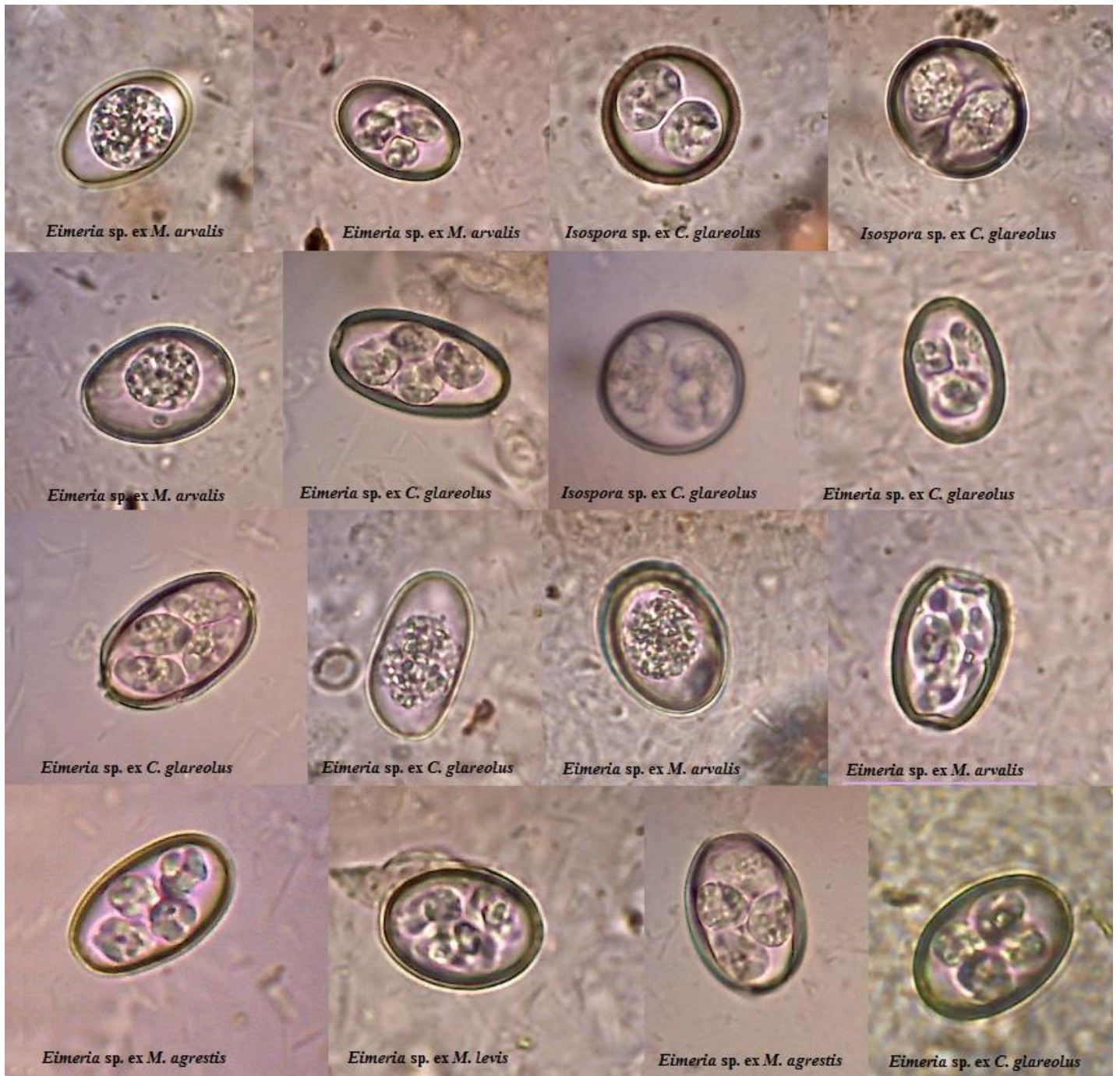


Obr. 13: Zastoupení odchytených hrabošovitých hlodavců na lokalitách v zahraničí.



-  *A. amphibius*
-  *C. glareolus*
-  *Microtus sp.*
-  *M. agrestis*
-  *M. arvalis*
-  *M. subterraneus*

Obr. 14: Zastoupení odchytených hrabošovitých hlodavců na území České republiky.



Obr. 15: Oocysty kokciidií rodu *Eimeria* a *Isospora* z odchycených hlodavců z podčeledi Arvicolinae. Oocysty byly pozorovány světelným mikroskopem Olympus CX31 při zvětšení 40×10 . Fotografie byly pořízeny digitální kamerou AM4023X Dino-Eye (USB) v PC programu DinoCapture 2.0.



Obr. 16: Dokumentace odchyťů na Plzeňsku (březen 2014). Foto: Zuzana Zemanová

Tab. 5: Přehled sekvencí SSU vybraných z databáze GenBank pro fylogenetické analýzy (u heteroxenních kokcií je uveden pouze definitivní hostitel).

Kokcidie	Hostitel	Přístupový kód sekvence v databázi GenBank
<i>Besnoitia akodoni</i>	<i>Akodon montensis</i> (křeček)	AY623624
<i>B. besnoiti</i>	<i>Bos taurus</i> (tur domácí)	AF109678
<i>B. darlingi</i>	<i>Didelphis virginiana</i> (vačice virginská)	GU060623
<i>B. jellisoni</i>	<i>Bos taurus</i> (tur domácí)	AF291426
<i>B. tarandi</i>	<i>Rangifer tarandus</i> (sob evropský)	AY616163
<i>Caryospora bigenetica</i>	<i>Crotalus horridus</i> (chřestýš lesní)	AF060975
<i>Cyclospora colobi</i>	<i>Colobus guereza</i> (gueréza pláštiková)	AF111186
<i>Cystoisospora belli</i>	<i>Homo sapiens sapiens</i> (člověk)	U94787
<i>C. felis</i>	<i>Felis silvestris catus</i> (kočka domácí)	L76471
<i>C. ohioensis</i>	<i>Canis lupus familiaris</i> (pes domácí)	AF029303
<i>C. orlovi</i>	<i>Camelus dromedarius</i> (velbloud jednohřbý)	AY365026
<i>C. suis</i>	<i>Sus scrofa</i> f. <i>domestica</i> (prase domácí)	U97523
<i>C. timoni</i>	<i>Suricata suricatta</i> (surikata)	AY279205
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus agrarius</i> izolát 21439	<i>Apodemus agrarius</i> (myšice temnopásá)	JQ993655
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus agrarius</i> iz. 21455	<i>Apodemus agrarius</i> (myšice temnopásá)	JQ993656

<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus agrarius</i> iz. 21615	<i>Apodemus agrarius</i> (myšice temnopásá)	JQ993657
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus agrarius</i> iz. 21617	<i>Apodemus agrarius</i> (myšice temnopásá)	JQ993658
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus agrarius</i> iz. 21668	<i>Apodemus agrarius</i> (myšice temnopásá)	JQ993660
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus sylvaticus</i> iz. 08_50	<i>Apodemus sylvaticus</i> (myšice křovinná)	JQ993661
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus sylvaticus</i> iz. 08_53	<i>Apodemus sylvaticus</i> (myšice křovinná)	JQ993662
<i>E. albigulae</i>	<i>Neotoma albigula</i> (křeček bělohrdlý)	AF307880
<i>E. alorani</i>	<i>Apodemus agrarius</i> (myšice temnopásá)	JQ993659
<i>E. banffensis</i>	<i>Ochotona hyperborea</i> (pišťucha severní)	JQ993644
<i>E. bovis</i>	<i>Bos taurus</i> (tur domácí)	U77084
<i>E. burdai</i>	<i>Heliophobius argenteocinereus</i> (rypoš stříbřitý)	JQ993666
<i>E. callospermophili</i>	<i>Spermophilus citellus</i> (sysel obecný)	JQ993648
<i>E. caviae</i>	<i>Cavia porcellus</i> (morče domácí)	JQ993649
<i>E. dispersa</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan domácí)	HG793041
<i>E. falciformis</i>	<i>Mus musculus</i> (myš domácí)	AF080614
<i>E. flavescens</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	HQ173830
<i>E. chaetodipi</i>	<i>Dipodomys agilis</i> (tarbíkomyš čilá)	AF339489

<i>E. chinchillae</i>	<i>Chinchilla lanigera</i> (činčila vlnatá)	JQ993650
<i>E. irresidua</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	HQ173832
<i>E. langebarteli</i>	<i>Peromyscus leucopus</i> (křeček bělonohý)	AF311640
<i>E. leucopi</i>	<i>Peromyscus leucopus</i> (křeček bělonohý)	AF339491
<i>E. maxima</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	U67117
<i>E. meleagrimitis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan domácí)	AF041437
<i>E. myoxi</i>	<i>Eliomys quercinus</i> (plch zahradní)	JF304148
<i>E. nafuko</i>	<i>Heliophobius</i> <i>argenteocinereus</i> (rypoš stříbřitý)	JQ993665
<i>E. nieschulzi</i>	<i>Rattus norvegicus</i> (potkan obecný)	U40263
<i>E. papillata</i>	<i>Mus musculus</i> (myš domácí)	AF311641
<i>E. peromysci</i>	<i>Peromyscus truei</i> (křeček mayský)	AF339492
<i>E. pilarensis</i>	<i>Myotis ciliolabrum</i> (netopýr)	AF324215
<i>E. ranae</i>	<i>Rana temporaria</i> (skokan hnědý)	EU717219
<i>E. reedi</i>	<i>Chaetodipus formosus</i> (pytlouš dlouhoocasý)	AF311642
<i>E. separata</i>	<i>Rattus norvegicus</i> (potkan obecný)	AF311643

<i>E. stiedai</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	HQ173837
<i>E. telekii</i>	<i>Lemniscomys striatus</i> (myš páskovaná)	AF246717
<i>E. vilasi</i>	<i>Spermophilus elegans</i> (sysel wyomingský)	JQ993653
<i>Hammondia hammondi</i>	<i>Felis silvestris catus</i> (kočka domácí)	AF096498
<i>H. heydorni</i>	<i>Canis lupus familiaris</i> (pes domácí)	JX220987
<i>H. truffittae</i>	<i>Vulpes vulpes</i> (liška obecná)	GQ984223
<i>Isospora</i> sp. ex <i>Talpa europaea</i> iz. 158	<i>Talpa europaea</i> (krtek obecný)	JQ993671
<i>I. gryphoni</i>	<i>Carduelis tristis</i> (čížek žlutý)	AF080613
<i>I. robini</i>	<i>Turdus migratorius</i> (drozd stěhovavý)	AF080612
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Felis silvestris catus</i> (kočka domácí)	EF472967

Tab. 6: Přehled sekvencí COI vybraných z databáze GenBank pro fylogenetické analýzy.

Kokcidie	Hostitel	Přístupový kód sekvence z databáze GenBank
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Alectoris graeca</i> izolát 26-11-s1	<i>Alectoris graeca</i> (orebice horská)	HM117020
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus agrarius</i> iz. 21617	<i>Apodemus agrarius</i> (myšice temnopásá)	JQ993700
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus agrarius</i> iz. 21668	<i>Apodemus agrarius</i> (myšice temnopásá)	JQ993702
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus flavicollis</i> iz. 4	<i>Apodemus flavicollis</i> (myšice lesní)	JQ993704
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus flavicollis</i> iz. 1	<i>Apodemus flavicollis</i> (myšice lesní)	JQ993703
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus flavicollis</i> iz. 12	<i>Apodemus flavicollis</i> (myšice lesní)	JQ993705
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus sylvaticus</i> iz. 08_50	<i>Apodemus sylvaticus</i> (myšice křovinná)	JQ993706
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Apodemus sylvaticus</i> iz. 08_53	<i>Apodemus sylvaticus</i> (myšice křovinná)	JQ993707
<i>Eimeria</i> sp. ex <i>Meleagris gallopavo</i> iz. 208-6.13	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan domácí)	HM117018
<i>E. acervulina</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	EF158855
<i>E. alorani</i>	<i>Apodemus agrarius</i> (myšice temnopásá)	JQ993701
<i>E. apionodes</i>	<i>Apodemus flavicollis</i> (myšice lesní)	JX464221
<i>E. falciiformis</i>	<i>Mus musculus</i> (myš domácí)	HM771682
<i>E. flavescens</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	JQ993692

<i>E. gallopavonis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan domácí)	HG793051
<i>E. innocua</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan domácí)	HG793049
<i>E. intestinalis</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	JQ993693
<i>E. magna</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	JQ993695
<i>E. maxima</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	EU025107
<i>E. meleagridis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan domácí)	HG793047
<i>E. mitis</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	HM771681
<i>E. mivati</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	EF174185
<i>E. nafuko</i>	<i>Heliophobius argenteocinereus</i> (rypoš stříbřitý)	JQ993708
<i>E. necatrix</i>	<i>Gallus gallus</i> f. <i>domestica</i> (kur domácí)	EU025108
<i>E. pavonina</i>	<i>Pavo cristatus</i> (páv korunkatý)	JN596590
<i>E. piriformis</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> f. <i>domesticus</i> (králík domácí)	JQ993698
<i>E. ranae</i>	<i>Rana temporaria</i> (skokan hnědý)	poskytla J. Kvičerová
<i>E. trichosuri</i>	<i>Trichosurus cunninghami</i> (kusu horský)	JN192136
<i>E. vermiformis</i>	<i>Mus musculus</i> (myš domácí)	JN205071
<i>E. zuernii</i>	<i>Bos taurus</i> (tur domácí)	HM771687

<i>Isospora</i> sp. ex <i>Apodemus flavicollis</i> iz. B13	<i>Apodemus flavicollis</i> (myšice lesní)	JQ993711
<i>Isospora</i> sp. ex <i>Talpa europaea</i> iz. 218	<i>Talpa europaea</i> (krtek obecný)	JQ993714
<i>I. gryphoni</i>	<i>Carduelis tristis</i> (čížek žlutý)	KC346355

Tab. 7: Přehled všech odchycených a vyšetřených hrabošovitých hlodavců a jejich parazitace.

Lokalita	Hostitel	Počet <i>Eimeria</i> či <i>Isospora</i> pozitivních / počet odchycených	Prevalence kokciidií (%)	Zjištění ektoparazitů	Zjištění endoparazitů
Jihočeský kraj (České Budějovice, Dubičné, Ličov, Lužnice, Veselí nad Lužnicí)	<i>C. glareolus</i> <i>M. arvalis</i> <i>Microtus</i> sp. <i>A. amphibius</i>	9/26 10/15 0/3 0/1	42%	Klíšťata, blechy, roztoči, vši	<i>Capillaria</i> , <i>Monocystis</i> , <i>Syphacia</i> , <i>Strongyloides</i>
Plzeňský kraj (Bdeněves, Nýrsko, Plešnice, Šťáhlavice, Tymákov)	<i>C. glareolus</i> <i>M. arvalis</i> <i>M. agrestis</i>	22/81 8/11 1/1	33%	Roztoči, klíšťata, blechy, vši	<i>Capillaria</i> , <i>Strongyloides</i> , <i>Monocystis</i> , Cestoda (<i>Hymenolepis</i>), <i>Syphacia</i>
Zlínský kraj (Bystřice pod Lopeníkem)	<i>M. arvalis</i>	3/4	75%	Roztoči	<i>Monocystis</i> , Cestoda
kraj Vysočina (Třebíč)	<i>C. glareolus</i> <i>M. subterraneus</i>	1/4 1/1	40%	Roztoči, blechy	<i>Strongyloides</i>
Karlovarský kraj (Jáchymov)	<i>M. arvalis</i> <i>C. glareolus</i>	0/1 1/1	50%	-	<i>Capillaria</i> , <i>Aspicularis</i>
Pardubický kraj (Hlinsko)	<i>M. arvalis</i>	0/1	0%	Roztoči	Cestoda
Ústecký kraj (Litvínov)	<i>C. glareolus</i> <i>M. agrestis</i>	5/5 3/3	100%	Roztoči, blechy, klíšťata, vši	<i>Capillaria</i>

Rusko	<i>C. glareolus</i> <i>M. agrestis</i> <i>M. oeconomus</i>	32/36 4/6 2/3	84%	Roztoči, klíšťata, blechy, vši	<i>Monocystis</i> , <i>Syphacia</i> , <i>Cestoda</i> , <i>Capillaria</i>
Německo	<i>C. glareolus</i>	0/5	0%	Roztoči, blechy	<i>Monocystis</i> , <i>Capillaria</i>
Švédsko	<i>C. glareolus</i>	0/5	0%	Klíšťata, blechy	<i>Monocystis</i>
Fínsko	<i>C. glareolus</i>	3/7	43%	Vši	<i>Mesocestoides</i>
Maďarsko	<i>M. arvalis</i> <i>C. glareolus</i>	8/22 1/1	39%	Vši, roztoči, blechy	<i>Capillaria</i> , <i>Aspiculuris</i> , <i>Syphacia</i>
Slovensko	<i>C. glareolus</i> <i>M. arvalis</i> <i>M. subterraneus</i>	14/56 1/4 1/2	26%	-	<i>Capillaria</i> , <i>Strongyloides</i>
Srbsko	<i>C. glareolus</i> <i>M. subterraneus</i> <i>Microtus</i> sp.	2/5 2/2 0/1	50%	Roztoči, vši, blechy, klíšťe	<i>Capillaria</i>
Bulharsko	<i>M. arvalis</i> <i>M. agrestis</i> <i>M. levis</i>	1/2 8/22 4/6	43%	Roztoči, vši, klíšťata	<i>Aspiculuris</i> , <i>Syphacia</i>
Francie	<i>C. glareolus</i> <i>M. agrestis</i> <i>M. arvalis</i>	15/19 10/10 0/1	86%	-	<i>Capillaria</i> , <i>Monocystis</i>
Ázerbajdžán	<i>M. socialis</i>	0/2	0%	-	-