

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Fylogeneze a populační struktura krevních parazitů
suchozemských želv rodu *Testudo***

Bakalářská práce

Aneta Maršíková

Školitel: MVDr. Jana Kvičerová, Ph.D.

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

České Budějovice 2014

Maršíková A., 2014: Fylogeneze a populační struktura krevních parazitů suchozemských želv rodu *Testudo*. [Phylogeny and population structure of blood parasites of *Testudo* tortoises, Bc. Thesis, in Czech] - 43p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The study reconstructs phylogenetic and genealogical relationships of blood parasites *Hemolivia mauritanica* and *Haemoproteus* sp., infecting tortoises of the genus *Testudo* from various geographic localities. Results of phylogenetic analyses are also used for clarification of evolutionary history between "haemogregarines sensu lato" and genus *Hemolivia*.

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

V Českých Budějovicích dne 21. 4. 2014

Aneta Maršíková

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat Pavlu Širokému za sběr a poskytnutí krevních vzorků želv. Svě školitelce Janě Kvičarové za odborné vedení, cenné rady a ohromnou trpělivost. Ráda bych také poděkovala Václavu Hypšovi za cenné připomínky a ostatním lidem laboratoře za příjemnou atmosféru a pomoc při práci. Děkuji rodině za morální a psychickou podporu, také Jirkovi za pomoc v nesnázích.

Tato práce byla podpořena grantem GA ČR, P506/11/1738.

Obsah

1. Úvod	1
1. 1. Obecná charakteristika kmene Apicomplexa	1
1. 2. Fylogeneze a taxonomické členění kmene Apicomplexa	3
1. 3. Haemogregariny sensu lato	6
1. 3. 1. Rod <i>Hemolivia</i>	6
1. 4. Rod <i>Haemoproteus</i>	8
1. 5. Interakce parazit-vektor-hostitel, modelové organismy bakalářské práce	9
1. 5. 1. Parazit, <i>Hemolivia mauritanica</i>	9
1. 5. 2. Parazit, <i>Haemoproteus</i>	10
1. 5. 3. Vektor, klíště <i>Hyalomma aegyptium</i>	10
1. 5. 4. Hostitel, suchozemské želvy rodu <i>Testudo</i>	11
2. Cíle práce	12
3. Materiál a Metodika	13
3. 1. Původ vzorků studovaných haemogregarin	13
3. 2. Izolace DNA	13
3. 3. Geny použité pro fylogenetické analýzy, PCR, primery, zpracování PCR produktů	14
3. 4. Sekvenace, úprava a zpracování sekvencí	16
3. 5. Alignment, fylogenetické analýzy	16
4. Výsledky	20
4. 1. PCR, sekvence a alignmenty	20
4. 2. Fylogenetické analýzy	22
5. Diskuse	27
6. Závěr	31
7. Použitá literatura	32
8. Internetové zdroje	40
9. Přílohy	41

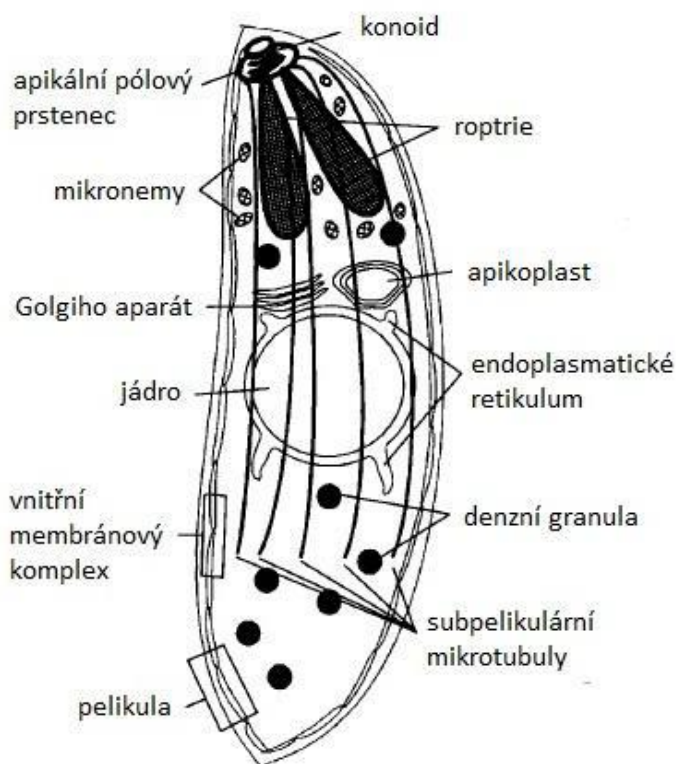
1. Úvod

1. 1. Obecná charakteristika kmene Apicomplexa

Zástupci kmene Apicomplexa jsou jednobuněční intracelulární paraziti, jejichž pohyblivá stadia (zoiti) se vyznačují přítomností unikátního útvaru zvaného apikální komplex (Morrison 2008). Apikální komplex je tvořen spirálovitým konoidem složeným z mikrofibril, polárním prstencem (centrum organizace mikrotubulů) a dvěma typy sekrečních žlázek (rhoptriemi a mikronémami). Tento soubor organel se vyskytuje pouze u zoitů, slouží k pohybu a k pronikání do hostitelské buňky. S organelami apikálního komplexu také funkčně souvisí denzní granula (neprůhledná v elektronovém mikroskopu). Granula jsou kulovitěho tvaru, rozptýlená v cytoplasmě buňky (Perkins et al. 2000, Hausmann a Hülsmann 2003) (Obr. 1.).

Zoiti se přemísťují klouzavým pohybem beze změny tvaru díky aktin-myozinovému komplexu svázanému se substrátem. Mohou tak aktivně vyhledávat cílové buňky hostitele a zanořit se do nich (Gregarinasina), nebo se úplně uzavřít do vnitrobuněčné komůrky, tzv. „parazitoformní vakuoly“ (*Cryptosporidium*, *Coccidia*, Haemospororida). Povrch zoitu tvoří struktura zvaná pelikula složená ze tří membrán, formující plochý měchýřek zvaný alveolus. Funkci buněčných úst plní mikropór, vzniklý vchlípeninou plazmatické membrány. (Morrissette a Sibley 2002, Hausmann a Hülsmann 2003).

V cytoplasmě většiny apikomplex se nachází nefotosyntetizující plastid – apikoplast, obalený třemi až čtyřmi membránami, v závislosti na druhu (Obr. 1.). Vznikl pravděpodobně sekundární endosymbiózou plastidu řasy. Má vlastní kruhový genom o velikosti přibližně 35 kb. Tento plastid má pro buňku zásadní význam (syntéza lipidových komponent buněčných membrán) a jsou pro něj toxické některé chemické látky, např. herbicidy (blokují dělení apikoplastu). Protože je pro život parazita nezbytný, je považován za vhodnou cílovou organelu pro terapii onemocnění, způsobených zástupci kmene Apicomplexa (Lim a McFadden 2010).



Obr. 1. Základní morfologie zoita parazitů kmene Apicomplexa
(dle Morrissette a Sibley 2002, upraveno).

Dalším specifickým rysem kmene jsou tři střídající se fáze vývojového cyklu parazita: sporogonie, merogonie a gamogonie (Leander et al. 2003). K nepohlavní sporogonii a tvorbě sporozoitů dochází v oocystě po vzniku zygoty. Merogonie (nepohlavní množení) probíhá v cytoplazmě buněk hostitele, infikovaných sporozoitem nebo merozoitem. Gamogonie (pohlavní rozmnožování) je tvorba mikro- a makrogamet, které následně splývají v zygotu (jediné diploidní stadium životního cyklu). Zygota se obaluje a mění na oocystu (Perkins et al. 2000, Hausmann a Hülsmann 2003).

1. 2. Fylogeneze a taxonomické členění kmene Apicomplexa

S nástupem a rozvojem metod molekulární biologie a sekvenčních dat se výrazně zvýšil počet znaků vhodných pro analýzy mezidruhových i vnitrodruhových vztahů parazitických protist. Molekulární data nám pomáhají pochopit evoluční historii a sestavit tak taxonomický rámec, který by odrážel historické vztahy těchto parazitů a určil jejich společného předka. Molekulární přístupy jsou používány pro testování evolučních hypotéz, které byly v minulosti formulovány výhradně na základě morfologických znaků (Sogin a Silberman 1998). Zařazování méně známých parazitů do fylogenetických schémat pomáhá určit jejich životní historii a evoluční vztahy k jiným druhům či skupinám parazitů (Barta 2001).

Monofylie kmene Apicomplexa byla opakovaně prokázána (Barta 1989, Barta et al. 1991, Leander et al. 2003). Rekonstrukce mezidruhových vztahů v rámci jednotlivých skupin kmene jsou založeny zejména na sekvencích malé jaderné podjednotky (18S rDNA), která představuje nejčastěji používaný gen pro fylogenetické analýzy většiny zástupců tohoto kmene (Perkins a Keller 2001, Morrison et al. 2004, Kopečná et al. 2006, Leander et al. 2006).

Během posledních desetiletí bylo publikováno několik názorů na klasifikaci kmene (např. Levine et al. 1980, Barta 1989, Ellis et al. 1998, Perkins et al. 2000). Na základě recentní obsáhlé monografie (Adl et al. 2012) je kmen Apicomplexa rozdělen následovně:

Super-group: Sar (Burki et al. 2007)

Alveolata Cavalier-Smith 1991

Apicomplexa Levine 1980, emend. Adl et al. 2005

Aconoidasida Mehlhorn et al. 1980 [= Hematozoa Vivier 1982]

Haemospororida Danilewsky 1885

Piroplasmorida Wenyon 1926

Conoidasida Levine 1988

Coccidia Leuckart 1879

Adeleorina Léger 1911

Eimeriorina Léger 1911

Gregarinasina Dufour 1828

Archigregarinorida Grassé 1953

Eugregarinorida Léger 1900

Neogregarinorida Grassé 1953

Incertae sedis Gregarinasina

Cryptosporidium

Incertae sedis Apicomplexa

Skupina Aconoidasida je charakterizována absencí konoidu v nepohlavních zoitech, samostatně se tvořícími mikro- a makrogametami, a heteroxenním životním cyklem. Krevní paraziti Haemospororida a Piroplasmorida se vyznačují dixenním (dvouhostitelským) životním cyklem s merogonií v obratlovcích a sporogonií v členovcích. Zástupci skupiny Haemospororida využívají jako mezihostitele (vektora) hmyz z řádu Diptera, jehož slinami jsou přenášeni. Jejich zygota je pohyblivá (tzv. ookinet) a ve střevní stěně vektora se mění na oocystu. U skupiny Piroplasmorida tvoří zygota pohyblivé stádium (kinet) k rozmnožování,

ne však oocystu. Vektorem zde není hmyz, ale klíšťata čeledí Ixodidae a Argasidae (Adl et al. 2012).

Paraziti skupiny Conoidasida mají kompletní apikální komplex včetně konoidu u všech nepohlavních fází svého vývoje. Gregariny jsou monoxenními parazity bezobratlých i obratlovců. Dospělí gamonti jsou většinou lokalizováni extracelulárně a k průniku do trávicího traktu hostitele využívají přichytný útvar zvaný mukron, či epimerit (modifikovaná apikální část zoitu). Kokcidie mohou mít životní cykly monoxenní i heteroxenní, intracelulárně lokalizovaní gamonti mukron ani epimerit nemají. Jejich hostiteli bývají zejména obratlovci (Hausmann a Hülsmann 2003, Adl et al. 2012).

Cryptosporidia jsou paraziti gastrointestinálního traktu obratlovců (včetně člověka), ale mohou napadat i epitel dýchací soustavy, či žlučník a žlučovody. Vývojový cyklus, detailně prostudovaný u střevního parazita *Cryptosporidium parvum*, zahrnuje excystaci oocyst (otevření oocysty a uvolnění sporozoitů), invazi hostitelských buněk sporozoity, merogonii (nepohlavní dělení), gametogonii (pohlavní rozmnožování), tvorbu oocyst a sporogonii (Fayer et al. 1998). Na základě morfologie (především podobnosti ve vývojových stádiích) byli dříve zástupci této skupiny řazeni mezi kokcidie (Levine 1984), avšak následné fylogenetické analýzy prokázaly jejich příbuznost ke gregarinám (Carreno 1999). Toto zjištění potvrdilo i výsledky předchozích studií, popisujících epicelulární lokalizaci těchto parazitů (Current a Reese 1986), nebo sdílení antigenních epitopů (Bull et al. 1998).

Taxonomie kmene Apicomplexa byla zpočátku založena na fenotypových vlastnostech (např. morfologie, hostitelská, tkáňová, vektorová specifita), nicméně s nejasnými evolučními vztahy uvnitř kmene (Barta 1989, Ellis et al. 1998). Zvyšující se množství dostupných sekvencí zástupců v rámci kmene poskytuje nové příležitosti k pochopení fylogeneze těchto významných patogenů (Kuo et al. 2008). Taxony s nejasným fylogenetickým postavením jsou nyní prozatím řazeny mezi „Incertae sedis Apicomplexa“ (Adl et al. 2012).

1. 3. Haemogregariny sensu lato

Podskupina Adeleorina zahrnuje kromě monoxenních krevních parazitů také parazity s heteroxenním vývojovým cyklem, z nichž tři čeledi bývají označovány jako „haemogregariny sensu lato“. Čeď Haemogregarinidae je reprezentována rody *Cyrlia*, *Desseria* a *Haemogregarina*. Druhá čeď - Hepatozoidae - obsahuje jediný rod, *Hepatozoon*. Do třetí, Karyolysidae, řadíme rody *Hemolivia* a *Karyolysus*. S výjimkou zástupců rodu *Hepatozoon* existuje pro tuto skupinu pouze omezené množství molekulárních dat, a všechny uvedené rody byly popsány a zařazeny do čeledí na základě rozdílů ve vývojových cyklech a spektra hostitelů (Barta 1989, 2000).

Nepohlavní rozmnožování (merogonie) probíhá v krevních buňkách nebo tkáních mezhospitelů (obratlovců). Zde dochází ke vzniku dvou morfologicky odlišných mnohojaderných merontů vyplněných jednojadernými merozoity. Meronti obsahují v prvním případě velké merozoity, v druhém případě jsou vyplněné menšími merozoity, ze kterých následně vznikají gamonti. Gamonti se v této fázi nacházejí uvnitř krevních buněk mezhospitele, a na základě jejich morfologických znaků rozlišujeme jednotlivé rody a druhy haemogregarin. Gamogonií končí vývoj parazita v mezhospiteli (Barta 1989).

Po merogonii nastává syzygie (tvorba gamet), kdy se gametocyty spojují do dvojic a dochází k jejich oplození. Syzygie je následována nepohlavní sporogonií, přičemž obě probíhají již v definitivních hostitelích - vektorech. Rozdíly v průběhu sporogonie představují další kritérium pro taxonomii haemogregarin (Barta 2000).

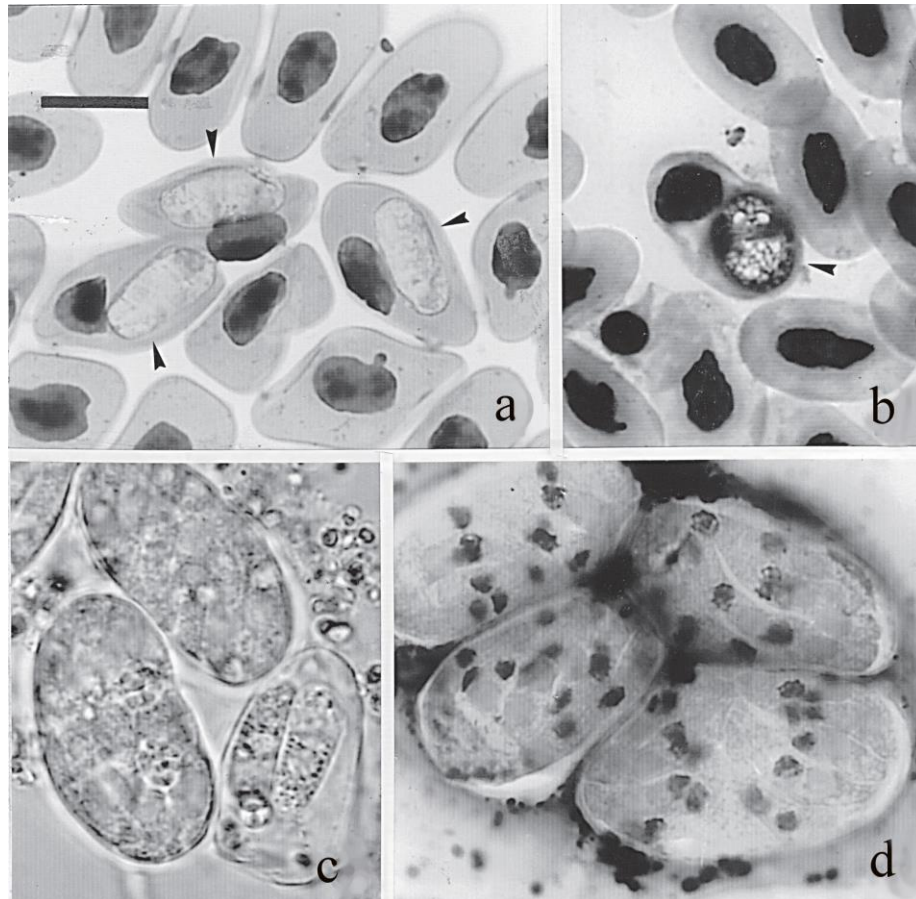
1. 3. 1. Rod *Hemolivia*

Rod *Hemolivia* představuje haemogregariny napadající studenokrevné obratlovce (plazy, obojživelníky). Vývojový cyklus zahrnuje erytrocytární gamogonii, erytrocytární a extra-erytrocytární merogonii a cystogonii. Sporogonie zahrnuje dvě fáze a probíhá v epitelu střev definitivního hostitele a zároveň vektora, kterým jsou klíš'ata čeledi Ixodidae. V první fázi dochází ke spojení makrogamet a oplodnění mikrogametami. Následuje tvorba oocyst s pohyblivými sporozoity (bez tvorby sporocysty). Ve druhé fázi sporozoiti opouštějí oocystu a pronikají do nové buňky, aby vytvořily sporocystu, která později obsahuje sporozoity, infikující mezhospitele (obratlovce) (Obr. 2.). Zatím však neexistuje žádný důkaz o přenosu haemogregarin mezi klíš'aty samotnými (Petit et al. 1990).

Typový druh, *Hemolivia stellata*, napadá ropuchy *Bufo marinus* a klíšťata *Amblyomma rotundatum*. Cirkulující gamonti jsou pozřeni klíšťetem a v jeho střevním epitelu proběhne syzygie. Během tohoto procesu se gamety rozpadnou a zformují do neobvyklých oocyst ve tvaru hvězdy, které obsahují četné sporozoity. Sporozoiti se dostávají ven z buněk a infikují další střevní buňky klíšťete, kde vytváří sporocysty (obsahující další sporozoity). Ropucha se nakazí pozřením klíšťete (obsahujícího sporocystu), či pozřením samotné sporocysty, kterou klíšťe vyloučilo do prostředí. (Barta 2000, Lainson et al. 2007).

Dva z dosud tří popsáných druhů rodu *Hemolivia* parazitují u plazů, ačkoliv jejich hostitelská specifita není patrně striktní. *Hemolivia mariae*, tradičně nacházena u scinka *Tiliqua rugosa*, byla experimentálně přenesena do dvou dalších plazů – scinka *Mabuya vittata* a agamy *Laudakia stellio* (Paperna a Smallridge 2001). *Hemolivia mariae* je také přenášena dvěma různými vektory - klíšťaty *Amblyomma limbatum* a *Bothriocroton hydrosauri* (Smallridge a Bull 1997).

Třetí druh, *Hemolivia mauritanica*, parazituje u suchozemských želv *Testudo graeca* a *Testudo marginata*, vektorem jsou klíšťata *Hyalomma aegyptium* (Paperna 2006). Parazit se vyvíjí především v játrech a ledvinách želv, vývojová stádia se dostanou do sajícího klíšťete krví. Patogenita je nízká a dosud málo prostudovaná, s předpokládaným negativním vlivem na parenchym jater a ledvin (Široký et al. 2007).



Obr. 2. Mikrofotografie vývojových stádií *Hemolivia mauritanica* (měřítko 10 µm u všech mikrofotografií; dle Paperna 2006, upraveno).

- a) gametocyty v krvi *Testudo graeca*.
- b) schizont v krvi *T. graeca*.
- c) sporocysty v roztěru střev klíštěte *Hyalomma aegyptium*.
- d) sporocysty, fixované a obarvené Giemsovým činidlem.

1. 4. Rod *Haemoproteus*

Haemoproteus (Apicomplexa: Aconoidasida: Haemospororida) je parazit, napadající červené krvinky svých hostitelů, v jejichž cytoplasmě štěpením hemoglobinu produkuje charakteristický pigment, tzv. hemozoin. Infekčním stádiem je sporozoit, přítomný po nasátí ve slinných žlázách vektora. V průběhu sání infikuje vektor (krevsajcí hmyz) nového hostitele, sporozoiti se dostávají do krevního řečiště a endotelových buněk. Merogonie probíhá nejčastěji v játrech, plicích, ledvinách a slezině. V endotelových buňkách se sporozoiti nepohlavně množí a mění ve schizonty. Schizonti produkují velké množství

merozoitů, ti pronikají do erytrocytů, kde zrají v samičí a samčí gametocyty. Gametocyty mohou být pozřeny dalším krevsajícím hmyzem, v jehož střevech se pohlavně rozmnoží a vytvoří oocysty. Oocysty následně prasknou a uvolní sporozoity, infikující slinné žlázy, a celý proces se tak může znovu opakovat (Perkins 2000).

Hostiteli tohoto parazita jsou ptáci, plazi a obojživelníci (Lainson a Naiff 1998). Rod *Haemoproteus* je rozdělen podle druhu vektora (krevsající hmyz řádu Diptera) do dvou podrodů, *Parahaemoproteus* (vektorem jsou tiplíci rodu *Culicoides*) a *Haemoproteus* (vektorem jsou kloši čeledi *Hippoboscidae*) (Križanauskiene et al. 2013, Orkun a Güven 2013). Jelikož sporozoiti parazita byli nalezeni i ve slinných žlázách bzikavky *Chrysops callidus* (ovádovití), diskutuje se o existenci třetí vektorové skupiny. Kromě rozdílů ve vektorové specifitě je v posledních letech výzkum zaměřen na vývojová stádia (zejména na rozdíly ve sporogonii a vývoj oocysty v hmyzích přenašečích), a především na nové informace získané prostřednictvím molekulárních metod (Orkun a Güven 2013).

Rod *Haemoproteus* využívá jako svého hostitele také želvy. Tři druhy byly popsány ze želv nalezených v Asii. *Haemoproteus metchnikovi* byl popsán z indické želvy *Chitra indica* (Testudines: Testudinidae). *Haemoproteus caucasica* byl identifikován v Gruzii u želvy *Testudo graeca* (Testudines: Testudinidae). V roce 2009 byl v Turecku objeven a popsán nový druh, *Haemoproteus anatolicum*, parazitující u želv *Testudo graeca* (Orkun a Güven 2013).

1. 5. Interakce parazit-vektor-hostitel, modelové organismy bakalářské práce

1. 5. 1. Parazit, *Hemolivia mauritanica*

Hemolivia mauritanica byla poprvé popsána v roce 1904 z alžírských vzorků želv *Testudo graeca* a původně pojmenována jako *Haemogregarina mauritanica* (Sergent a Sergent 1904). V následujících letech studovali Laveran a Nègre (1905) a Brumpt (1938) vývojový cyklus parazita v klíštěti *Hyalomma aegyptium* a způsob jeho přenosu na želvu *T. graeca*, která byla krmena infikovanými klíšťaty. Michel (1973) přezkoumal původní materiály a na základě merogonie a sporogonie parazita „*Haemogregarina mauritanica*“ zařadil do rodu *Hepatozoon*. V roce 1997 nakonec Landau a Paperna přehodnotili taxonomické postavení do současného rodu *Hemolivia*.

Od doby, kdy byla *Hemolivia mauritanica* popsána, byla s různou prevalencí zjišťována u populací želv *T. graeca* v Bulharsku, Turecku (Široký et al. 2005), Izraeli (Paperna 2006), a také u populací želv *Testudo marginata* v Řecku (Široký et al. 2005). Další studie prokázaly geografickou závislost mezi klíštětem a infekcí, tedy že výskyt této haemogregariny lze předpokládat na celém společném území želv rodu *Testudo* a klíšťat *Hyalomma aegyptium* (Harris et al. 2013).

1. 5. 2. Parazit, *Haemoproteus*

Taxonomie skupiny Haemospororida byla donedávna založena pouze na morfologických znacích. V posledních letech se současně s morfologickými analýzami používají molekulární techniky, založené na analýzách sekvencí vybraných reprezentativních genů. Nový druh, *Haemoproteus anatolicum*, byl izolován z turecké želvy *T. graeca* a popsán na základě morfologie vývojových stádií v krvi hostitele a části sekvence mitochondriálního genu pro cytochrom b (cyt b). Sekvence tohoto genu se dnes využívá pro mezidruhovou identifikaci parazitů celé skupiny Haemospororida. Fylogenetické analýzy prokázaly, že *H. anatolicum* je nejvíce příbuzný druhům *Haemoproteus ptyodactylii* a *Haemoproteus kopki*, parazitujícím u ještěrek (Rich a Xu 2011, Orkun a Güven 2013).

1. 5. 3. Vektor, klíště *Hyalomma aegyptium*

Želvy mohou být infestovány různými rody a druhy klíšťat, přičemž některá klíšťata nemají vyhraněného hostitele (želvu) a některá se naopak vyznačují vysokou hostitelskou specifitou. Želvy rodu *Testudo* mohou být napadeny i klíšťaty, která normálně infikují savce (např. *Haemaphysalis sulcata* či *Haemaphysalis inermis*), ale z velké většiny jde právě o druh *Hyalomma aegyptium*. Vzhledem k tomu, že toto klíště nemá velký hospodářský význam, neexistuje prozatím dostatek informací o jeho biologii; nicméně jeho charakteristická morfologie umožňuje snadné rozpoznání druhu *Hyalomma* (Široký et al. 2006).

Klíště *H. aegyptium* střídá tři hostitele: želvy, plazy a savce. Jeho hlavním hostitelem jsou však palearktické želvy rodu *Testudo*, u ostatních obratlovců se vyskytuje zřídka. Geografická distribuce klíštěte je tedy omezena na rozšíření hlavního hostitele. Nejčastěji bývá popisováno na želvách z oblastí severní Afriky (Maroko, Tunisko, Alžírsko, Libye),

Balkánu, blízkého a středního východu (Libanon, Sýrie, Irák), v kavkazských oblastech a stepích střední Asie (východně od Afghánistánu a Pákistánu) (Široký et al. 2009).

1. 5. 4. Hostitel, suchozemské želvy rodu *Testudo*

Rod *Testudo* zahrnuje 5 druhů suchozemských želv (*T. graeca*, *T. hermanni*, *T. horsfieldii*, *T. kleinmanni*, *T. marginata*), obývajících lesostepi, pouště a polopouště západní palearktické oblasti, včetně jižní Evropy. V posledních letech byla značně diskutována jejich taxonomie. Výsledky založené na morfologických analýzách ale nebyly podpořeny genetickými metodami. Nejpravděpodobnější vztahy vypadají takto: *T. marginata* + *T. kleinmanni* tvoří sesterskou skupinu k *T. graeca*. *T. hermanni* + *T. horsfieldii* jsou považovány za sesterskou skupinu k (*T. marginata* + *T. kleinmanni* + *T. graeca*) (Fritz a Bininda-Emonds 2007).

T. graeca je nejrozšířenějším druhem, vyskytuje se v Africe, Evropě i Asii. *T. horsfieldii* se vyskytuje ve stepích střední Asie. *T. kleinmanni* obývá jihovýchodní oblasti Středozemního moře (Libye, Izrael). Dva druhy žijí pouze v Evropě; *T. hermanni* ve většině zemích jižní Evropy, zatímco *T. marginata* se většinou vyskytuje jen v Řecku. Všichni zástupci rodu *Testudo* jsou výlučně nebo převážně býložravci (Fritz et al. 2009).

2. Cíle práce

- Rekonstrukce fylogenetických vztahů krevního parazita *Hemolivia mauritanica* u suchozemských želv rodu *Testudo*.
- Vyhodnocení populační struktury druhu *H. mauritanica* ve vztahu ke geografickému rozšíření a hostitelské specifitě.
- Objasnění evolučních vztahů mezi „haemogregarinami sensu lato“ a rodem *Hemolivia*; pokus o klasifikaci „haemogregarin“ na základě fylogeneze.
- Rekonstrukce fylogenetických vztahů krevních parazitů rodu *Haemoproteus*.

Práce je v těsné vazbě na grant GA ČR, P506/11/1738 (Václav Hypša).

3. Materiál a metodika

3. 1. Původ vzorků studovaných krevních parazitů

Vzorky krve želv *T. graeca* pocházejí z několika lokalit na území osmi států, *T. marginata* pouze z Řecka. Vzorky krve shromáždil během terénních sběrů v letech 2001-2012 a poskytl doc. MVDr. Pavel Široký, Ph.D. (Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno). Izolaci DNA provedla MVDr. Jana Kvičerová, Ph.D. K dispozici jsem měla DNA ze 168 krevních vzorků želv *T. graeca* (53 vzorků DNA z Alžírsko, 3 z Bulharska, 6 z Iráku, 25 z Íránu, 3 z Libanonu, 3 z Rumunska, 45 ze Sýrie a 24 z Turecka), a 6 vzorků DNA krve želv *T. marginata* z Řecka. U vzorků uvedených v příloze (Tab. I.) byla provedena PCR se specifickými primery pro amplifikaci genů 18S rRNA a cyt b.

Krev želv byla odebírána punkcí hřbetní kokcygeální žíly pomocí tenké injekční jehly. Poté byly želvy vypuštěny zpět do volné přírody, na lokalitu jejich odchyty. Z části odebrané krve byly ihned zhotoveny krevní nátěry na mikroskopická sklíčka, které byly následně vysušeny a fixovány Giemsovým činidlem. V laboratoři byly nátěry vyšetřeny pod světelným mikroskopem na přítomnost krevních parazitů a zhodnocení intenzity parazitémie (provedeno doc. Širokým a jeho studenty v Brně). Zbytek odebrané krve byl smíchán s absolutním ethanolem (v poměru krev:ethanol 1:9) a uchováván při teplotě 4 °C pro následné molekulární analýzy.

3. 2. Izolace DNA

Celková DNA byla extrahována z ethanolem-konzervovaných krevních vzorků pomocí komerčního kitu (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen). Vzorek byl nejprve zbaven ethanolu odsátím pomocí pipety a „vysušením“ přes noc v otevřené mikrozkuhavce. Poté probíhala izolace DNA podle návodu výrobce (zkráceně: lyzování proteinázou K, opakované promývání v komerčně dodávaných pufrech a centrifugace, izolace DNA na Mini spin kolonce). Přehled všech vzorků s vyizolovanou DNA, hostitel a lokalita jsou uvedeny v příloze (Tab. I.).

3.3. Geny použité pro fylogenetické analýzy, PCR, primery, zpracování PCR produktů

Prvním genem testovaným pro využití v následujících analýzách byl mitochondriální gen pro cytochrom b (cytb). Na reprezentativním vzorku bylo ověřeno, že pro tento gen specificky navržené primery amplifikovaly pouze sekvence parazitů rodu *Haemoproteus*. Cytb byl proto využit k rekonstrukci fylogeneze tohoto rodu, zatímco pro rod *Hemolivia* byl ověřen jako vhodný a amplifikovatelný marker gen pro malou jadernou podjednotku (18S rRNA). Tento gen byl proto použit v molekulárně-fylogenetických analýzách parazitů rodu *Hemolivia*.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) 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 (20 pmol/ μ l; Generi Biotech)
- 0,5 μ l reverse primeru (20 pmol/ μ l; Generi Biotech)
- 0,2 μ l HotStarTaq DNA polymerázy (5 U/ μ l; Qiagen)
- 18,3 μ l PCR H₂O

Pro PCR byly použity následující sekvence primerů:

Primery pro amplifikaci genu pro malou jadernou podjednotku (18S rRNA) hemolivií:

- Forward primer: 5'-GAAACTGCGAATGGCTCATT-3'
- Reverse primer: 5'-CTTGCGCCTACTAGGCATTC-3'

Primery pro amplifikaci genu pro cytochrom b (cytb) haemoproteů:

- Forward primer: 5'-TCAACAATGACTTTATTTGG-3'
- Reverse primer: 5'-GGGAGCTGTAATCATAATGTG-3'

Pro správné nastavení PCR programů (především teploty annealingu) byla nejprve provedena metoda gradientové PCR. Oproti standardní PCR došlo ke změně objemu složek pouze u vyizolované DNA (1,0 μ l) a PCR vody (19,3 μ l). Optimální se ukázalo rozpětí teplot

51,8 °C - 53,6 °C pro 18S rRNA a 51,7 °C - 52,8 °C pro cyt. Byly zvoleny hodnoty 53 °C a 52 °C, které se následně osvědčily jako vhodné.

Průběh PCR programu pro amplifikaci 18S rRNA:

<u>1. Denaturace</u>	<u>95 °C</u>	<u>15 min</u>	}	30 cyklů
2. Denaturace	95 °C	45 s		
3. Annealing	53 °C	45 s		
<u>4. Elongace</u>	<u>72 °C</u>	<u>1 min 30s</u>		
5. Extenze	72 °C	10 min		

Průběh PCR programu pro amplifikaci cyt.:

<u>1. Denaturace</u>	<u>95 °C</u>	<u>15 min</u>	}	30 cyklů
2. Denaturace	95 °C	45 s		
3. Annealing	52 °C	45 s		
<u>4. Elongace</u>	<u>72 °C</u>	<u>1 min 30s</u>		
5. Extenze	72 °C	10 min		

Výsledek PCR reakce byl vizualizován elektroforézou na 1% agarózovém gelu při napětí 100 V, s použitím barviva Sybr Green a 1 kb ladderu (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Pozitivní PCR produkty o požadované velikosti byly následně enzymaticky přečištěny pomocí enzymů FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) a Exo I (Exonuclease I z *E. coli*) (Thermo Scientific). Ke každému pozitivnímu PCR produktu bylo přidáno 0,2 µl každého enzymu a vlastní přečišťování probíhalo na termocycleru za následujících podmínek:

37 °C	15 min
80 °C	15 min

3. 4. Sekvence, úprava a zpracování sekvencí

Pozitivní, enzymaticky přečištěné PCR produkty o požadované velikosti byly osekvenovány na automatickém kapilárním sekvenátoru ABI PRISM 3730XL DNA analyzér v rámci servisního pracoviště MacroGen v Amsterdamu (http://www.macrogen.com/eng/business/seq_service.html). Získané sekvence jsem kontrolovala a upravovala v programu Sequence Scanner v. 1.0 (<https://products.appliedbiosystems.com>). Pomocí algoritmu BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), který je součástí databáze GenBank, jsem identifikovala získané sekvence, a zde je také porovnávala s ostatními dostupnými sekvencemi. Program SeqMan (DNASTAR, Inc.) byl použit pro zkompletování/skládání sekvencí. Pomocí programu EditSeq (DNASTAR, Inc.) jsem zkontrolovala a případně upravila čtecí rámce protein-kódujících sekvencí cyt b. Se sekvencemi genu 18S rRNA jsem pracovala jako s nukleotidy.

3. 5. Alignment, fylogenetické analýzy

Získané sekvence genu pro 18S rRNA parazitů rodu *Hemolivia* z želv rodu *Testudo*, spolu s několika dalšími sekvencemi 18S rRNA jiných krevních protist, dostupných z databáze GenBank (Tab. 1.), byly zkopírovány ve formátu FASTA do společného textového souboru. Tím byl vytvořen dataset pro fylogenetické analýzy. Dataset byl vložen do programu BioEdit (Hall 1999), a sekvence byly alignovány jako nukleotidy algoritmem ClustalW Multiple Alignment (Thompson et al. 1994). Výsledný alignment byl manuálně ořezán na jednotnou délku.

Tab. 1. Získané sekvence genu 18S rRNA (tučně) a sekvence vybrané z databáze GenBank, použité pro fylogenetické analýzy.

Označení vzorku /Přístupový kód z GenBank	Parazit	Mezihostitel	Lokalita
IQ-1-10	<i>Hemolivia mauritanica</i>	<i>Testudo graeca</i>	Irák
IQ-4-10	<i>H. mauritanica</i>	<i>T. graeca</i>	Irák
IR-20-11	<i>H. mauritanica</i>	<i>T. graeca</i>	Írán
IR-32-11	<i>H. mauritanica</i>	<i>T. graeca</i>	Írán
TR-21-08	<i>H. mauritanica</i>	<i>T. graeca</i>	Turecko
TR-25-08	<i>H. mauritanica</i>	<i>T. graeca</i>	Turecko
SY-10-10	<i>H. mauritanica</i>	<i>T. graeca</i>	Sýrie
SY-45-10	<i>H. mauritanica</i>	<i>T. graeca</i>	Sýrie
SY-68-10	<i>H. mauritanica</i>	<i>T. graeca</i>	Sýrie
SY-41-07	<i>H. mauritanica</i>	<i>T. graeca</i>	Sýrie
GR-9-04	<i>H. mauritanica</i>	<i>Testudo marginata</i>	Řecko
KC512766	<i>Hemolivia</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
JN211118	<i>Hemolivia mariaae</i>	<i>Tiliqua rugosa</i>	Austrálie
EF157822	<i>Hepatozoon ayorgbor</i>	<i>Python regius</i>	Ghana
AY600626	<i>Hepatozoon</i> sp.	<i>Clethrionomys glareolus</i>	Španělsko
DQ439540	<i>Hepatozoon canis</i>	<i>Canis familiaris</i>	Venezuela
AY628681	<i>Hepatozoon felis</i>	<i>Felis catus</i>	Španělsko
HQ224954	<i>Hepatozoon</i> cf. <i>catesbiana</i>	<i>Rana catesbeiana</i>	Kanada (Ontario)
JN181157	<i>Hepatozoon sipedon</i>	<i>Nerodia sipedon sipedon</i>	Kanada (Ontario)
KF257925	<i>Haemogregarina</i> sp.	<i>Pelusios subniger</i>	Mosambik
KF257929	<i>Haemogregarina stepanowi</i>	<i>Mauremys leprosa</i>	Alžírsko
HQ224959	<i>Haemogregarina balli</i>	<i>Chelydra serpentina serpentina</i>	Kanada (Ontario)
HQ224957	<i>Dactylosoma ranarum</i>	<i>Pelophylax esculentus</i>	Francie (Korsika)
KF499115	<i>Babesia canis canis</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	Turecko

Stejným způsobem byl vytvořen také dataset ze sekvencí cytb parazitů rodu *Haemoproteus* z želv rodu *Testudo* a sekvencí cytb příbuzných krevních parazitů dostupných z databáze GenBank (Tab. 2.). Sekvence zde byly alignovány jako aminokyseliny a výsledný alignment ořezán na jednotnou délku.

Tab. 2. Získané sekvence genu cytb (tučně) a sekvence vybrané z databáze GenBank, použité pro fylogenetické analýzy.

Označení vzorku /Přístupový kód z GenBank	Parazit	Mezihostitel	Lokalita
IQ-6-10	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>Testudo graeca</i>	Írák
IR-4-11	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Írán
IR-15-11	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Írán
IR-16-11	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Írán
IR-20-11	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Írán
IR-21-11	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Írán
IR-24-11	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Írán
TR-8-08	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Turecko
TR-15-08	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Turecko
TR-22-08	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Turecko
TR-28-08	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Turecko
TR-30-08	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>T. graeca</i>	Turecko
KF049495	unidentified Haemosporida	<i>Podocnemis expansa</i>	Peru
KF049502	unidentified Haemosporida	<i>Podocnemis unifilis</i>	Peru
KF049503	unidentified Haemosporida	<i>Podocnemis unifilis</i>	Peru
GQ141560	<i>Plasmodium</i> sp.	<i>Bubo virginianus</i>	USA
GU252011	<i>Plasmodium</i> sp.	<i>Bubo virginianus</i>	?
DQ659572	<i>Plasmodium</i> sp.	<i>Foudia madagascariensis</i>	Madagaskar
JN164734	<i>Plasmodium circumflexum</i>	<i>Sylvia atricapilla</i>	?
EU834703	<i>Plasmodium minuoviride</i>	<i>Prasinohaema prehensicauda</i>	Papua Nová Guinea
AF069611	<i>Plasmodium elongatum</i>	<i>Passer domesticus</i>	Severní Amerika
GQ141583	<i>Parahaemoproteus</i> sp.	<i>Dumetella carolinensis</i>	USA
GU252002	<i>Parahaemoproteus</i> sp.	<i>Dumetella carolinensis</i>	?
AF465572	<i>Haemoproteus</i> sp.	<i>Margarops fuscus</i>	Indie
DQ630013	<i>Haemoproteus minutus</i>	<i>Turdus merula</i>	Litva
DQ630004	<i>Haemoproteus pallidus</i>	<i>Ficedula hypoleuca</i>	Evropa
AY099045	<i>Haemoproteus majoris</i>	<i>Parus caeruleus</i>	Švédsko
HM142922	<i>Leucocytozoon buteonis</i>	?	?
AY762077	<i>Leucocytozoon</i> sp.	?	Madagaskar

Pro rekonstrukci fylogenetických vztahů uvedených taxonů jsem použila tři různé metody; maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) a Bayesian inference (BI). MP byla vypočtena v programu PAUP v. 4b10 (Swofford 2002). Matice byla analyzována heuristickým algoritmem TBR a ze získaných stromů byl následně vytvořen konsensus. Bootstrapová podpora větví byla vypočtena z 1000 opakování. ML byla provedena programem PhyML v. 2.4.3s (Guindon a Gascuel 2003) s použitím modelu GTR a bootstrap byl opět vypočten z 1000 opakování. BI byla spočtena v programu MrBayes v. 3.2. (Huelsenbeck et al. 2001) pro 10 milionů generací. Výsledné stromy byly vizualizovány programem TreeView v. 1.6.6. (Page 1996) a graficky upraveny v programu Adobe Illustrator CS5 (Adobe Systems Inc.).

4. Výsledky

4. 1. PCR, sekvence a alignmenty

Celkem jsem získala 18 PCR produktů pro gen 18S rRNA parazitů rodu *Hemolivia*. Jejich označení, původ a lokalita jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 3.). Ze vzorků z Bulharska, Libanonu a Rumunska vycházela PCR vždy opakovaně negativní. Z uvedených PCR produktů jsem získala 11 sekvencí genu pro 18S rRNA. Dataset jsem doplnila o dalších 13 sekvencí z databáze GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), zalignovala a výsledný alignment byl po úpravě dlouhý 1197 bp. Přehled všech sekvencí tohoto datasetu je uveden v předchozí kapitole (Tab. 1.).

Tab. 3. Přehled vzorků DNA z Iráku, Turecka, Íránu, Sýrie, Řecka a Alžírsko, ze kterých vyšla pozitivně PCR.

Označení vzorku	Původ vzorku (krev meziphostitele)	Lokalita
IQ-1-10	<i>T. graeca</i>	Irák (Sulajmanija)
IQ-4-10	<i>T. graeca</i>	Irák (Sulajmanija)
TR-21-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Hakkâri)
TR-25-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Şemdinli)
IR-20-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Sultanabad)
IR-32-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Ourumyieh-Sera)
SY-10-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie (Qalat Samaan)
SY-45-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie (Ayn Dara)
SY-68-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie (Krak des Chevaliers)
SY-41-07	<i>T. graeca</i>	Sýrie (Cirrus)
GR-9-04	<i>T. marginata</i>	Řecko (Volos)
AL-154-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
AL-168-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
AL-174-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
AL-131-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
AL-187-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
AL-195-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
AL-198-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko

Pozn.: Přesné lokality vzorků pocházejících z Alžírsko nejsou známy (P. Široký, osobní sdělení).

Amplifikace genu *cytb* proběhla úspěšně u 23 vzorků. Jejich označení, původ a lokalita jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 4.). Ze vzorků z Alžírsko, Bulharsko, Libanonu, Rumunsko, Řecko a Sýrie vyšla PCR vždy negativně. Z uvedených PCR produktů jsem získala 12 sekvencí *cytb*. Dataset jsem doplnila o dalších 17 sekvencí z databáze GenBank, výsledný alignment byl po úpravě dlouhý 735 bp. Přehled sekvencí tohoto datasetu je uveden v předchozí kapitole (Tab. 2.).

Tab. 4. Přehled vzorků DNA z Iráku, Turecka a Íránu, ze kterých vyšla pozitivně PCR.

Označení vzorku	Původ vzorku (krev meziphostitele)	Lokalita
IQ-6-10	<i>T. graeca</i>	Irák (Sulajmanija)
TR-2-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Van)
TR-3-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Van)
TR-5-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Van)
TR-7-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Mus)
TR-8-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Mus)
TR-9-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Iğdir)
TR-15-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Iğdir)
TR-22-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Hakkari)
TR-28-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Van)
TR-30-08	<i>T. graeca</i>	Turecko (Van)
IR-4-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Kermanshah)
IR-15-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Siah Dare)
IR-16-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Siah Dare)
IR-18-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Sultanabad)
IR-20-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Sultanabad)
IR-21-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Sultanabad)
IR-24-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Sultanabad)
IR-29-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Sultanabad)
IR-30-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Sultanabad)
IR-34-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Kuzeh Rash)
IR-36-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Kuzeh Rash)
IR-37-11	<i>T. graeca</i>	Írán (Kuzeh Rash)

4. 2. Fylogenetické analýzy

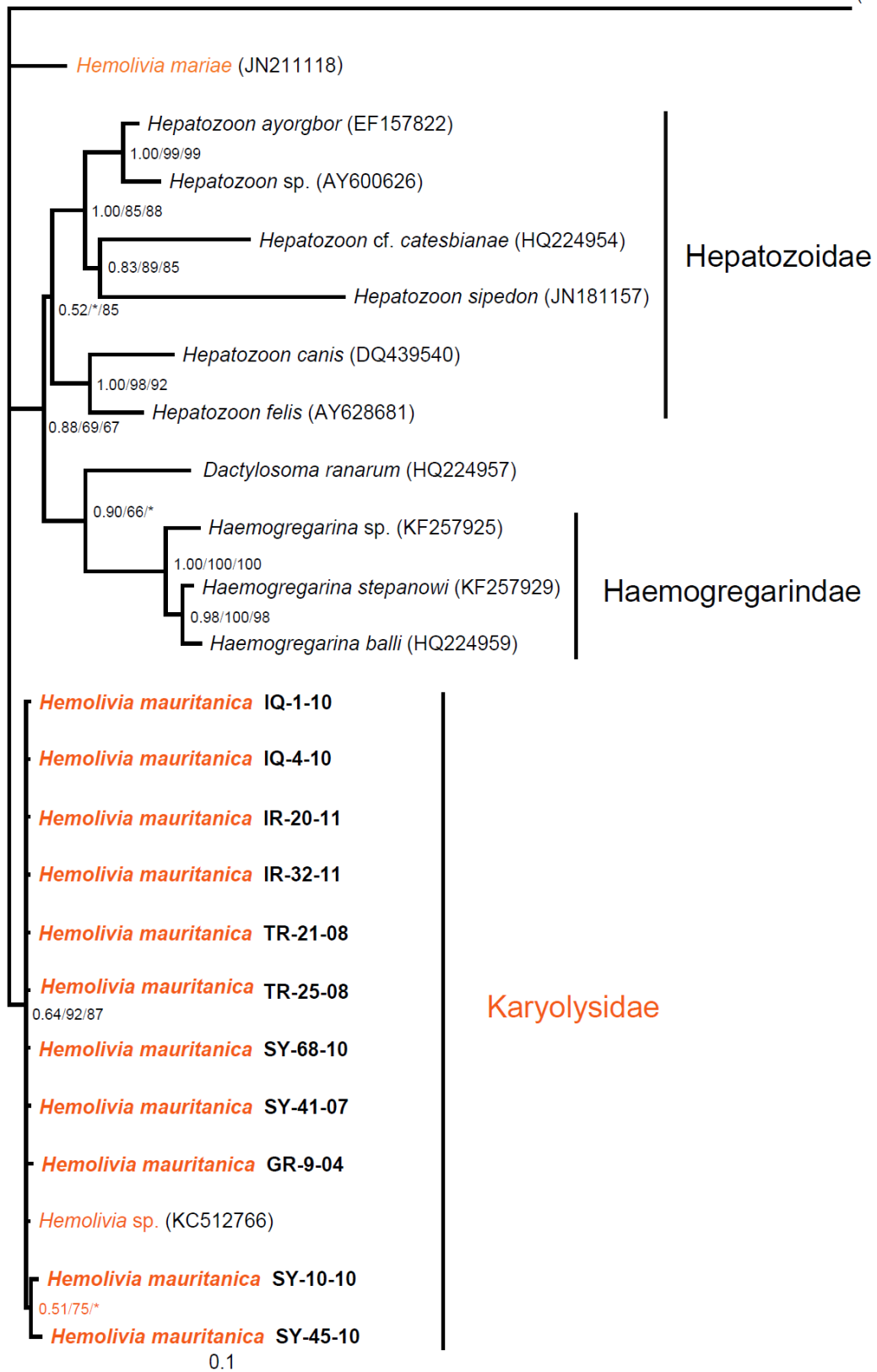
V tabulce č. 5 jsou uvedeny detaily a parametry jednotlivých analýz, které jsem použila pro rekonstrukci fylogeneze studovaných krevních parazitů na základě genů 18S rRNA a cyt b.

Tab. 5. Informace o fylogenetických analýzách a použitých parametrech.

Maticce	MP (PAUP)	ML (PhyML)	BI (MrBayes)
<i>Hemolivia</i> 18S rRNA 24 sekvencí, délka alignmentu 1197 bp	hsearch TBR bootstrap = 1000 replikací, nejlepší strom = 394 kroků, konsensus ze 100 stromů CI = 0,8325	GTR + Γ + I bootstrap = 1000 replikací, lnL = -3654.329270	GTR + Γ + I mcmc = 10 000 000 burn-in = 25 %
<i>Haemoproteus</i> cytb 29 sekvencí, délka alignmentu 735 bp	hsearch TBR bootstrap = 1000 replikací, nejlepší strom = 409 kroků, konsensus ze 42 stromů CI = 0,6675	GTR + Γ + I bootstrap = 1000 replikací, lnL = -2939.745151	GTR + Γ + I mcmc = 10 000 000 burn-in = 25 %

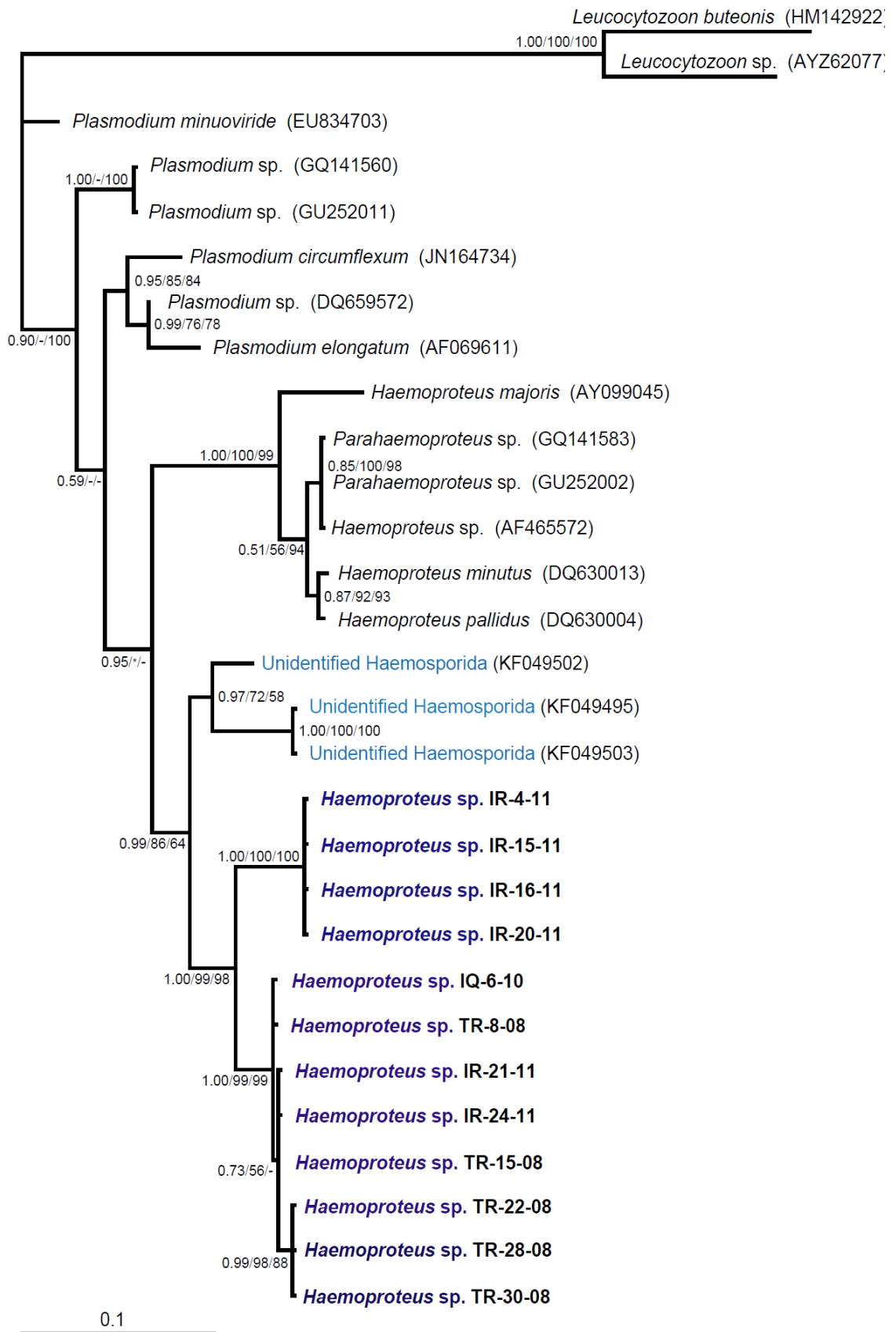
Výsledkem fylogenetických analýz genu pro 18S rRNA s použitím všech tří přístupů (MP, ML a BI) je monofyletická skupina tvořená sekvencemi *Hemolivia mauritanica* a *Hemolivia* sp., získanými z želv rodu *Testudo* z 5 zemí (Iráku, Íránu, Řecka, Sýrie a Turecka). Tito zástupci tvoří sesterskou skupinu k monofyletickým rodům *Hepatozoon* a *Haemogregarina*. Taxon *Babesia canis canis* se osvědčil jako vhodně zvolený outgroup.

Molekulárně-fylogenetické analýzy genu cytb prokázaly, že *Haemoproteus* sp., izolovaný z želv rodu *Testudo* ze 3 zemí (Iráku, Íránu a Turecka), tvoří monofyletickou skupinu. Ta je nejvíce příbuzná blíže nespecifikované skupině „Haemosporida“ (takto je název uveden v GenBanku; patrně je míněna skupina Haemospororida) a rodům *Parahaemoproteus* a *Haemoproteus*, izolovaných z ptáků. Sesterskou skupinou všech výše zmíněných jsou zástupci rodu *Plasmodium*. Zvolený outgroup (*Leucocytozoon buteonis* a *Leucocytozoon* sp.) se rovněž osvědčil jako vhodný.



Obr. 3. Kladogram fylogenetických vztahů parazitů rodu *Hemolivia* na základě analýzy sekvencí pro 18S rRNA metodou BI. U uzlů jsou uvedeny hodnoty posterior probabilities (PP) vyšší než 0.50, a při větvení zachovaném rovněž v analýzách MP a ML hodnoty bootstrapů vyšší než 50 % (v pořadí BI/ML/MP). Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny tučně.

*, PP/bootstrap je nižší než 0.50/50 %.



Obr. 4. Kladogram fylogenetických vztahů parazitů rodu *Haemoproteus* na základě analýzy sekvencí pro cyt b metodou BI. U uzlů jsou uvedeny hodnoty posterior probabilities (PP) vyšší než 0.50, a při větvení zachovaném rovněž v analýzách MP a ML hodnoty bootstrapů vyšší než 50 % (v pořadí BI/ML/MP). Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny tučně.

*, PP/bootstrap je nižší než 0.50/50 %.

-, větvení v MP nebo ML analýze je jiné než v BI.

5. Diskuse

Želvy *Testudo graeca*, jejichž krev byla použita k analýzám, byly odchyceny na území osmi států; jejich areál je však mnohem širší. Kromě zmíněných zemí byl výskyt těchto želv prokázán např. v Maroku, Tunisku, Libyi, Izraeli, Palestině, Pákistánu, Afghánistánu (Široký et al. 2009), Albánii (Bruno 1989), nebo Itálii (Vamberger 2011). Želvy *T. marginata*, nalezené v Řecku, se v hojném počtu vyskytují především na území Řecka, ale několik jedinců bylo zjištěno i v Turecku. Pokud porovnáme geografické rozšíření těchto dvou druhů želv, vychází jako areál jejich společného výskytu Turecko (Fritz et al. 2009). Tento společný areál tak lze považovat za vhodný pro sběr krevních vzorků a jejich následné srovnávací analýzy. Nicméně krevní vzorky *T. marginata* z Turecka nebyly dosud získány.

Geografické rozšíření vektora (klíštěte *Hyalomma aegyptium*) je úzce spjato s rozšířením suchozemských želv rodu *Testudo* (Široký et al. 2009). Dá se předpokládat, že důvodem tohoto jevu je snadná interakce s hostitelem (nízký vzrůst želvy, pomalý pohyb v travnatých plochách). Výskyt v jiných oblastech a výběr jiného hostitele (plazi, savci) je pravděpodobně způsoben tím, že klíště narozdíl od želv hůře snáší sucho; extrémně suché oblasti představují nepříznivé podmínky pro životní cyklus klíštěte (Paperna 2006). Nicméně nižší vývojová stádia vektora (larva, nymfa) nemají specifického hostitele (želvy) a živí se krví různých druhů obratlovců (ještěrky, ptáci, malí savci a lidé). Naproti tomu mohou být želvy rodu *Testudo* infikovány i jinými druhy klíšťat, která jinak napadají savce (např. *Haemaphysalis sulcata* či *Haemaphysalis inermis*). Z toho vyplývá, že interakce klíštěte a želvy není druhově specifická.

Lze se tedy domnívat, že oba studovaní krevní paraziti (*Hemolivia mauritanica* a *Haemoproteus* sp.) preferují jako mezihostitele želvy rodu *Testudo*. Na vyšetřovaných lokalitách byli výše uvedení paraziti detekováni, vůči celkovému počtu vyšetřených vzorků, v poměru 41:168, z čehož 18 tvořili paraziti rodu *Hemolivia* a 23 *Haemoproteus*. Tyto dva rody parazitů zaujímají společné areály (Turecko, Irák, Írán), nicméně jejich výskyt se lišil u lokalit Sýrie, Řecka a Alžírsko, které byly pozitivní pouze pro rod *Hemolivia*. Z hlediska koevoluce komplexu parazit – vektor – hostitel (*Hemolivia mauritanica* – *Hyalomma aegyptium* – *Testudo graeca*), lze potvrdit prozatímní hypotézu, která předpokládá výskyt rodu *Hemolivia* na celém společném území želv rodu *Testudo* a vektora *Hyalomma*

aegyptium (Harris et al. 2013). Tuto hypotézu nejspíš nelze aplikovat pro rod *Haemoproteus*, na základě odlišných lokalit sběru želv, ze kterých byli izolováni.

V rámci parazitů skupiny „haemogregarina sensu lato“ infikuje rod *Hemolivia* kromě želv (*H. mauritanica*) také scinky, agamy (*H. mariae*) a ropuchy (*H. stellata*), nicméně vektorem pro tento rod jsou vždy klíšťata čeledi Ixodidae. Klíšťata jsou také vektorem parazitů rodu *Hepatozoon*. Rod *Hepatozoon* napadá kromě studenokrevných plazů také savce, ptáky a obojživelníky (Paperna 2006), tudíž má v porovnání s rodem *Hemolivia* širší spektrum hostitelů. Dalšími parazity skupiny „haemogregarina sensu lato“, kteří byli podobně jako *Hemolivia* popsáni z želv, jsou např. *Haemogregarina stepanowi* (ze želvy bahenní) a *Haemogregarina balli* (z kajmanky dravé), jejichž definitivním hostitelem jsou pijavice (Danilewsky 1885). Pijavice jsou také definitivními hostiteli dalších „haemogregarina sensu lato“, a to rodů *Cyrilia* a *Desseria*, popsaných z ryb (Siddall 1995, Smit et al. 2003, Smit a Davies 2006, Dvořáková et al. 2014). Z toho vyplývá, že jednotlivé rody celé skupiny „haemogregarina sensu lato“ vykazují vysokou míru specifity vůči definitivnímu hostiteli.

Haemoproteus využívá jako svého hostitele kromě želv také plazy, obojživelníky a ptáky (Lainson a Naiff 1998). Podrod *Parahaemoproteus* byl vyčleněn na základě své vektorové specifity, a morfologických rozdílů ve stádiích sporogonie (Bennett et al. 1965), přestože fylogeneticky padá mezi rod *Haemoproteus* (Martinsen et al. 2008, Orkun a Güven 2013). Narozdíl od zástupců rodu *Haemoproteus* (jehož mezihostitelem jsou holubi a vektorem kloši čeledi *Hippoboscidae*) je *Parahaemoproteus* přenášen tiplíky rodu *Culicoides* a je schopen infikovat širokou škálu ptačích mezihostitelů (Valkiunas 2005).

Fylogenetické analýzy pro gen 18S rRNA potvrdily dosavadní členění skupiny „haemogregarina sensu lato“ do tří čeledí (Barta 1989, 2000, Barta et al. 2012); čeleď Hepatozoidae, obsahující zástupce rodu *Hepatozoon*, tvoří sesterskou skupinu k čeledím Karyolysidae, zahrnující rod *Hemolivia*, a Haemogregarinidae (Obr. 3.). Taxon *Dactylosoma ranarum* (Adeleorina: Dactylosomatidae) představuje fylogeneticky nejpříbuznějšího zástupce skupiny „haemogregarina sensu lato“ v rámci nadskupiny Adeleorina. Pro přesnější klasifikaci uvnitř skupiny „haemogregarina sensu lato“ by bylo třeba přidat do analýz ještě zbylé zástupce této skupiny (*Cyrilia*, *Desseria*, *Karyolysus*), jejichž sekvence zatím nejsou k dispozici. Chybějící sekvence mohou tvořit zásadní uzly, nebo naopak propojit jednotlivé skupiny. Pozice *Hemolivia mauritanica* ve fylogenetickém stromu je podpořena vysokými hodnotami bootstrapů (v MP i ML), přestože posterior probability (BI) je o něco nižší (0,64) (Obr. 3.). *Hemolivia* sp., která sdílí s *H. mauritanica* stejného mezihostitele,

se pravděpodobně z tohoto důvodu zařadila do stejného taxonu. *H. mariae* (ze scinka *Tiliqua rugosa*) se vyčlenila samostatně na bázi stromu (Obr. 3.), můžeme tedy předpokládat, že rod *Hemolivia* klastruje v závislosti na typu meziphostitele.

Na základě fylogenetických analýz mitochondriálního genu *cytb* se ukazuje, že topologie v rámci skupiny Haemospororida (Apicomplexa: Aconoidasida) je relativně kongruentní s předchozími studii (Perkins a Schall 2002, Outlaw a Ricklefs 2009). Tyto studie však nezahrnují zástupce rodu *Haemoproteus* parazitující u želv. Hlavním rozdílem mezi námi získanými výsledky a předchozími analýzami, provedenými taktéž na základě *cytb*, je postavení a větvení rodu *Plasmodium*. Výše uvedené studie tento rod řadí buď jako sesterský k rodu *Haemoproteus* (Perkins a Schall 2002), nebo jako monofyletický, tvořící zároveň předka rodu *Haemoproteus* (Outlaw a Ricklefs 2009). Na základě výsledků našich fylogenetických analýz (Obr. 4.) lze celkově skupinu plasmodií definovat jako primitivně odvozený taxon v rámci celé skupiny Haemospororida. Tuto ancestrální pozici lze zároveň podpořit hypotézou pravděpodobné divergentní evoluce jedné z kopií mitochondriálního genu plasmodií, vůči které byl námi amplifikovaný gen pro *cytb* vysoce homologický.

Sekvence *cytb* zástupců rodu *Haemoproteus* parazitujících u želv jsou na základě našich analýz v sesterské pozici vůči neidentifikovaným druhům čeledi Haemospororida (v databázi GenBank uvedené jako Unidentified Haemospororida) (viz kapitola 3). Tato pozice je navíc podpořena vysokými hodnotami bootstrapů i posterior probability. Klastrování těchto dvou skupin je z hlediska fylogeneze založené na základě stejného druhu hostitele, kterým byly želvy. V porovnání s předchozími studii není *Haemoproteus* sp. infikující želvy v přímém sesterském vztahu k rodům *Haemoproteus* a *Parahaemoproteus* z ptačích hostitelů. Tyto dva rody (*Haemoproteus*, *Parahaemoproteus*) jsou podle výsledků našich analýz ve stejné skupině, což odráží homologické systematické členění na základě morfologických dat, které tyto dva podrody klasifikují jako jediný rod, *Haemoproteus* (Bennett et al. 1965). Na reprezentativním vzorku taxonů bylo ověřeno, že pro mitochondriální gen *cytb* amplifikovaly specificky navržené primery pouze sekvence parazitů rodu *Haemoproteus*; *cytb* byl proto využit k rekonstrukci fylogeneze tohoto rodu. Výhodou použití tohoto genu je zároveň jeho vysoká variabilita oproti genu 18S rRNA. Dataset byl doplněn sekvencemi všech příbuzných krevních parazitů, pro něž byl *cytb* v GenBank k dispozici. V této databázi nejsou žádné sekvence 18S rRNA pro rod *Haemoproteus*, a zároveň žádné sekvence *cytb* pro rod *Hemolivia*. Z tohoto důvodu nebylo možné porovnat vzájemné vztahy parazitů *Hemolivia mauritanica* a *Haemoproteus* sp. v rámci kmene Apicomplexa.

Pouze na základě analýz genu pro 18S rRNA nelze popsat populační strukturu *H. mauritanica*, jelikož variabilita tohoto genu je velice nízká. Ačkoliv jsem měla k dispozici vzorky *H. mauritanica* z různých lokalit i hostitelů, z výsledného kladogramu není patrný žádný pattern (Obr. 3.). Pro objasnění populační struktury a genealogie tohoto parazita je zapotřebí navrhnout fungující primery pro jiný gen/jiné geny, s vyšší variabilitou. Nicméně výhoda použití genu pro 18S rRNA spočívá v množství jeho dostupných sekvencí pro většinu organismů v databázi GenBank.

6. Závěr

V této práci byla studována fylogeneze a populační struktura krevních parazitů želv rodu *Testudo*. Podařilo se mi získat 11 sekvencí genu 18S rRNA zástupců *Hemolivia mauritanica* a 12 sekvencí genu *cytb* pro *Haemoproteus* sp., na kterém jsem úspěšně testovala specificky navržené primery. Analýzy genu 18S RNA zčásti objasnily fylogenezi tzv. „haemogregarin sensu lato“ a potvrdily jejich dosavadní členění, ale protože získané množství sekvencí je zatím malé, nelze tyto výsledky považovat za konečné. Analýzy *cytb* odhalily monofylii dalšího krevního parazita suchozemských želv, *Haemoproteus* sp., a to v rámci celé skupiny Haemospororida. Pro budoucí studium „haemogregarin sensu lato“ by bylo vhodné nasbírat/získat a osekvenovat chybějící zástupce skupiny (*Cyralia*, *Desseria*, *Karyolysus*), a získat také více sekvencí rodu *Haemogregarina* z různých hostitelů. Pro objasnění vzájemného vztahu dvou studovaných krevních parazitů (*H. mauritanica*, *Haemoproteus* sp.) je třeba navrhnout nové primery, amplifikující společný/né gen/y pro oba organismy, a vytvořit tak společný dataset pro fylogenetické analýzy.

7. Použitá literatura

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

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

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

Barta JR, 2001: Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. *Veterinary Parasitology* 101: 175-186.

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

Bennett GF, Garnham PCC, Fallis AM, 1965: On the status of the genera *Leucocytozoon* Ziemann, 1893 and *Haemoproteus* Kruse, 1890 (Haemosporidiida: Leucocytozoidae and Haemoproteidae). *Canadian Journal of Zoology* 43: 927–932.

Bruno S, 1989: Introduction to a study of the herpetofauna of Albania. *British Herpetological Society Bulletin* 29: 16-41.

Brumpt E, 1938: Formes évolutives d'*Haemogregarina mauritanica* chez la tique *Hyalomma syriacum*. *Annales de Parasitologie* 16: 350–361.

Bull S, Chalmers R, Sturdee AP, Curry A, Kennaugh J, 1998: Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoclonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Veterinary Parasitology* 15: 195–197.

Burki F, Shalchian-Tabrizi K, Minge M, Skjaveland A, Nikolaev SI, Jakobsen KS, Pawlowski J, 2007: Phylogenomics reshuffles the eukaryotic supergroups. *PLoS ONE* 2: e790.

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.

Current WL, Reese NC, 1986: A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *Journal of Protozoology* 33: 98–108.

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

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

Ellis JT, Morrison DA, Jeffries AC, 1998: The phylum Apicomplexa: an update on the molecular phylogeny. *Evolutionary Relationships Among Protozoa*: 255-274.

Fayer R, Trout J, Jenkins MC, 1998: Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology* 84: 1165-1169.

Fritz U, Bininda-Emonds ORP, 2007: When genes meet nomenclature: Tortoise phylogeny and the shifting generic concepts of *Testudo* and *Geochelone*. *Zoology* 110: 298-307.

Fritz U, Harris DJ, Fahd S, Rouag R, Graciá ME, Giménez CA, Široký P, Kalboussi M, Jdeidi TB, Hundsdörfer AK, 2009: Mitochondrial phylogeography of *Testudo graeca* in the Western Mediterranean: Old complex divergence in North Africa and recent arrival in Europe. *Amphibia-Reptilia* 30: 63-80.

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

Hall TA, 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Harris DJ, Graciá E, Jorge F, Maia JPMC, Perera A, Carretero MA, Giménez A, 2013: Molecular detection of *Hemolivia* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) from ticks of North African *Testudo graeca* (Testudines: Testudinidae) and an estimation of their phylogenetic relationships using 18S rRNA sequences. *Comparative Parasitology* 80: 292–296.

Hausmann K, Hülsmann N, 2003: Protozoologie. Academia Praha.

Huelsenbeck JP, Ronquist F, 2001: MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754 – 755.

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

Križanauskiene A, Iezhova TA, Sehgal RNM, Carlson JS, Vaidas P, Staffan B, Gediminas V, 2013: Molecular characterization of *Haemoproteus sacharovi* Haemosporida, Haemoproteidae, a common parasite of columbiform birds, with remarks on classification of haemoproteids of doves and pigeons. *Zootaxa* 3616.1: 85-94.

- Kuo CH, Wares JP, Kissinger JC, 2008: The Apicomplexan whole-genome phylogeny: an analysis of incongruence among gene trees. *Molecular Biology and Evolution* 25: 2689-2698.
- Lainson R, De Souza MC, Franco CM, 2007: Natural and experimental infection of the lizard *Ameiva ameiva* with *Hemolivia stellata* (Adeleina: Haemogregarinidae) of the toad *Bufo marinus*. *Parasite* 14: 323–328.
- Lainson R, Naiff RD, 1998: *Haemoproteus* (Apicomplexa: Haemoproteidae) of tortoises and turtles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*: 941-949.
- Landau I, Paperna I, 1997: The assignment of *Hepatozoon mauritanicum*, a tick-transmitted parasite of tortoise, to the genus *Hemolivia*. *Parasite* 4: 365-367.
- Laveran I, Nègre L, 1905: Sur un protozoaire parasite de *Hyalomma aegyptium*. *Compte Rendu de la Societe de Biologie Paris* 57: 964–966.
- Leander BS, Clopton RE, Keeling PJ, 2003: Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from small subunit rDNA and beta-tubulin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 345-354.
- Leander BS, Lloyd SAJ, Marshall W , Landers SC, 2006: Phylogeny of marine gregarines (Apicomplexa) – *Pterospora*, *Lithocystis* and *Lankesteria* – and the origin(s) of coelomic parasitism. *Protist* 157: 45-60.
- Levine ND, 1984: Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (Protozoa, Apicomplexa). *Journal of Protozoology* 31: 94–98.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG, 1980. A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology* 27: 37-58.
- Lim L, McFadden G, 2010: The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 365: 749–763.

Martinsen ES, Perkins SL, Schall JJ, 2008. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): Evolution of life-history traits and host switches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 261-273.

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

Morrison DA, 2008: Prospects for elucidating the phylogeny of the Apicomplexa. *Parasite* 15: 191-196.

Morrison DA, Bornstein S, Thebo P, Wernery U, Kinne J, Mattsson JG, 2004: The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the Coccidia (Sporozoa). *International Journal for Parasitology* 34: 501-514.

Morrisette NS, Sibley LD, 2002: Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 21-38.

Orkun Ö, Güven E, 2013: A new species of *Haemoproteus* from a tortoise (*Testudo graeca*) in Turkey, with remarks on molecular phylogenetic and morphological analysis. *Journal of Parasitology* 99: 112-117.

Outlaw DC, Ricklefs RE, 2009): On the Phylogenetic relationships of haemosporidian parasites from raptorial birds (Falconiformes and Strigiformes). *Journal of Parasitology* 95: 1171-1176.

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

Paperna I, 2006: *Hemolivia mauritanica* (Haemogregarinidae: Apicomplexa) infection in the tortoise *Testudo graeca* in the Near East with data on sporogonous development in the tick vector *Hyalomma aegyptium*. *Parasite* 13: 267-273.

- Paperna I, Smallridge CJ, 2001: Ultrastructure of developmental stages of *Hemolivia mariae* (Apicomplexa: Haemogregarinidae), natural parasite of the Australan sleepy lizard, in experimentally infected deviant hosts. *Folia Parasitologica* 48: 255-262.
- Perkins FO, Barta JR, Clopton RE, Peirce MA., Upton SJ, 2000: Phylum Apicomplexa. In: Lee JJ, Leedale GF, and Bradbury P (Eds): *An illustrated guide to the Protozoa*. Second Edition, vol. 1. Society of Protozoologists. Lawrence, Kansas. pp. 190-369.
- Perkins SL, Keller AK, 2001: Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. *Journal of Parasitology* 87: 870-876.
- Petit G, Landau I, Baccam D, Lainson R, 1990: Description et cycle biologique d'*Hemolivia stellata* n. g., n. sp., hémogrégarine de crapauds brésiliens. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 65: 3–15.
- Perkins SL, Schall JJ, 2002: A molecular phylogeny of malarial parasites recovered from cytochrom b gene sequences. *Journal of Parasitology* 88: 972-978.
- Rich SM, Xu G, 2011: Resolving the phylogeny of malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 32: 12973–12974.
- Sergent E, Sergent E, 1904: Sur une hémogrégarine, parasite de *Testudo mauritanica*. *Comptes rendus de la Société. de Biologie* 56: 130–131.
- Siddall ME, 1995: Phylogeny of adeleid blood parasites with a partial systematic revision of the haemogregarine complex. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 42: 116-125.
- Smallridge CJ, Bull CM, 1997: The tick-transmitted haemogregarinid of the Australian sleepy lizard *Tiliqua rugosa* belongs to the genus *Hemolivia*. *Parasite* 4: 359–363.
- Smit NJ, Van As JG, Davies AJ, 2003: Taxonomic re-evaluation of the South African fish haemogregarine, *Desseria fragilis*. *Journal of Parasitology* 89: 151-153.

Smit NJ, Grutter AS, Adlard RD, Davies AJ, 2006: Hematozoa of teleosts from Lizard Island, Australia, with some comments on their possible mode of transmission and the description of a new hemogregarine species. *The Journal of Parasitology* 92: 778-88.

Sogin ML, Silberman JD, 1998: Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *International Journal for Parasitology* 28: 11–20.

Swofford DL, 2002: „Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4.“ Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

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

Široký P, Kamler M, Modrý D, 2005: Prevalence of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in natural populations of tortoises of the genus *Testudo* in the East Mediterranean region. *Folia Parasitologica* 52: 359-361.

Široký P, Mikulíček P, Jandzík D, Kami H, Mihalca AD, Rouag R, Kamler M, Schneider C, Záruba M, Modrý D, 2009: Co-distribution pattern of a haemogregarine *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and its vector *Hyalomma aegyptium* (Metastigmata: Ixodidae). *Journal of Parasitology* 95: 728-733.

Široký P, Petrželková KJ, Kamler M, Mihalca AD, Modrý D, 2006: *Hyalomma aegyptium* as dominant tick in tortoises of the genus *Testudo* in Balkan countries, with notes on its host preference. *Experimental and Applied Acarology* 40: 279–290.

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.

Valkiunas G, 2005: Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Vamberger M, Corti C, Stuckas H, Fritz U, 2011: Is the imperilled spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*) native in Sardinia? Implications from population genetics and for conservation. *Amphibia-Reptilia* 32: 9-25.

8. Internetové zdroje

http://www.macrogen.com/eng/business/seq_service.html

<https://products.appliedbiosystems.com/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

9. Přílohy

Tab. I. Přehled všech vzorků DNA, které jsem použila pro PCR analýzy, jejich mezihostitel a lokalita.

Označení vzorku	Mezihostitel	Lokalita	Označení vzorku	Mezihostitel	Lokalita
IQ-1-10	<i>T. graeca</i>	Irák	AL-101-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IQ-2-10	<i>T. graeca</i>	Irák	AL-104-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IQ-3-10	<i>T. graeca</i>	Irák	AL-111-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IQ-4-10	<i>T. graeca</i>	Irák	AL-113-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IQ-5-10	<i>T. graeca</i>	Irák	AL-116-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IQ-6-10	<i>T. graeca</i>	Irák	AL-132-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-1-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-140-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-2-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-142-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-3-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-147-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-5-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-154-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-7-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-156-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-9-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-168-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-11-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-174-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-13-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-179-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-14-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-131-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-17-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-187-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-22-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-188-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-26-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-190-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-28-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-192-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-29-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-195-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-30-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-196-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-1-09	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-198-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-2-09	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-201-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-3-09	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-206-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-5-09	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-207-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
TR-13-09	<i>T. graeca</i>	Turecko	AL-214-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-1-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-215-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-2-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-217-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-4-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-219-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko

Označení vzorku	Mezihostitel	Lokalita	Označení vzorku	Mezihostitel	Lokalita
IR-8-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-221-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-14-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-223-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-15-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-226-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-16-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-227-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-18-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-228-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-20-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-229-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-21-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-236-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-22-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-238-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-23-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-243-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-24-11	<i>T. graeca</i>	Írán	AL-244-10	<i>T. graeca</i>	Alžírsko
IR-25-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-01-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
IR-26-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-03-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
IR-27-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-05-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
IR-28-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-08-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
IR-29-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-10-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
IR-30-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-12-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
IR-31-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-15-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
IR-32-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-16-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
IR-34-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-17-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
IR-35-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-18-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
IR-36-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-20-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
IR-37-11	<i>T. graeca</i>	Írán	SY-25-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
B 24/02	<i>T. graeca</i>	Bulharsko	SY-26-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
B 53/02	<i>T. graeca</i>	Bulharsko	SY-28-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
BG-27-05	<i>T. graeca</i>	Bulharsko	SY-29-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
RO 12/05	<i>T. graeca</i>	Rumunsko	SY-31-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
RO 16/05	<i>T. graeca</i>	Rumunsko	SY-33-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
RO 40/05	<i>T. graeca</i>	Rumunsko	SY-37-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
GR-8-04	<i>T. marginata</i>	Řecko	SY-42-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
GR-9-04	<i>T. marginata</i>	Řecko	SY-44-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
GR-16-04	<i>T. marginata</i>	Řecko	SY-45-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
GR-27-04	<i>T. marginata</i>	Řecko	SY-46-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
GR-28-04	<i>T. marginata</i>	Řecko	SY-47-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
GR-32-04	<i>T. marginata</i>	Řecko	SY-49-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie

Označení vzorku	Mezihostitel	Lokalita	Označení vzorku	Mezihostitel	Lokalita
LB-383	<i>T. graeca</i>	Libanon	SY-52-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
LB-385	<i>T. graeca</i>	Libanon	SY-53-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
LB-388	<i>T. graeca</i>	Libanon	SY-56-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
TR-8-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	SY-57-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
TR-15-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	SY-59-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
TR-21-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	SY-65-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
TR-25-08	<i>T. graeca</i>	Turecko	SY-67-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-58-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-68-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-59-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-70-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-62-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-72-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-64-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-73-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-66-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-76-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-67-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-80-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-73-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-81-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-75-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-83-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-76-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-86-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-83-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-89-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-84-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-90-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-89-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-91-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-90-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-92-10	<i>T. graeca</i>	Sýrie
AL-95-09	<i>T. graeca</i>	Alžírsko	SY-41-07	<i>T. graeca</i>	Sýrie