

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie



Bakalářská práce

Kokcidie u myšovitých hlodavců rodu *Apodemus*

Autor práce: Anna Mácová

Vedoucí práce: MVDr. Jana Kvičerová

Studijní obor: Biologie

Ročník: třetí

2010

Mácová A., 2010: Kokcidie u myšovitých hlodavců rodu *Apodemus*. [Coccidia in Rodents of the genus *Apodemus*, Bc. thesis, in Czech] – 40 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Bylo studováno rozšíření a prevalence kokcií u 4 druhů myšic vyskytujících se na území České republiky. Sekvence mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu c I těchto kokcií byly použity pro fylogenetické analýzy k rekonstrukci evolučních vztahů mezi jednotlivými druhy kokcií.

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.

Datum: 30. 4. 2010

Anna Mácová

Děkuji vedoucí své práce MVDr. Janě Kvičerové za cenné rady, připomínky a trpělivé metodické vedení práce. Také děkuji Prof. RNDr. Václavu Hypšovi CSc. a Mgr. Vojtěchu Kasalickému za poznámky a cenné rady. Rodině děkuji za podporu a trpělivost.

Tato práce byla podpořena grantem GA ČR č. 31-206/08/1019.

Obsah:

1. Úvod	
1. 1. Historie a taxonomie kokcidií	1
1. 2. Životní cyklus čeledi Eimeriidae	2
1. 3. Rodová a druhová determinace kokcidií	3
1. 4. Fylogeneze kokcidií	5
1. 5. Hostitelská specifita kokcidií	7
1. 6. Vybraní hlodavci jako hostitelé kokcidií	7
1. 6. 1. Historie a členění	7
1. 6. 2. Rod <i>Apodemus</i> (Rodentia: Muridae)	8
2. Cíle práce	15
3. Metodika	16
3. 1. Odchyty hlodavců	16
3. 2. Identifikace hlodavců	16
3. 3. Odběr biologických vzorků	16
3. 4. Koprologické vyšetření	17
3. 5. Determinace druhu kokcidií	17
3. 6. Izolace celkové DNA	17
3. 6. 1. Extrakce komerčním kitem	17
3. 6. 2. Fenol-chloroformová extrakce	17
3. 7. Geny použité pro fylogenetické analýzy	18
3. 8. PCR, primery	18
3. 9. Sekvence, úprava a zpracování sekvencí	18
3. 10. Fylogenetické analýzy	19
3. 10. 1. Alignment	19
3. 10. 2. Fylogenetické analýzy	19
4. Výsledky	20
4. 1. Lokality odchyty hlodavců	20
4. 1. 1. Domácí lokality	20
4. 1. 2. Zahraniční lokality	22
4. 2. Parazitologické vyšetření odchycených hlodavců	22
4. 3. Závislost infekce myšic kokcidiemi na nadmořské výšce	25
4. 4. Závislost infekce myšic kokcidiemi na zeměpisné šířce	25
4. 5. Ostatní parazité prokázání v trusu odchycených hlodavců	26
4. 6. Osekvenované kokcidie (gen pro COI 1)	26

4. 7. Sekvenace	27
4. 8. Fylogenetické analýzy	27
5. Diskuse	32
5. 1. Druhy a počet odchycených hlodavců	32
5. 2. Infekce myšic kokcidiemi rodu <i>Eimeria</i> a <i>Isospora</i>	32
5. 3. Fylogenetické analýzy	33
6. Závěr	35
7. Použitá literatura	36
8. Internetové zdroje	40

1. Úvod

1. 1. Historie a taxonomie kokciidií

Pohled na taxonomii protist se neustále vyvíjí a mění. Dříve používaný systém vypracovaný Cavalier-Smithem (1991), kde kokcidie tvořily svou vlastní třídu Coccidea Leuckart, 1879 a řád Eimeriida Léger, 1911 (Hausmann and Hülsmann, 2003), je dnes již překonán a nahrazen níže uvedenou taxonomií. Pro systematické zařazení kokciidií jsem vycházela z Perkins et al. (2000) a Keeling et al. (2005):

Říše: Chromalveolata

Podříše: Alveolata

Kmen: Apicomplexa Levine, 1970

Třída: Conoidasida Levine, 1988

Podtřída: Coccidiasina Leuckart, 1879

Řád: Eucoccidiorida Léger and Duboscq, 1910

Podřád: Eimeriorina Léger, 1911

Čeleď: Eimeriidae Minchin, 1903

Apicomplexa zahrnuje početnou, značně heterogenní skupinu obligátních intracelulárních parazitů. Zástupci tohoto kmene jsou charakterističtí přítomností tzv. apikálního komplexu u jednoho ze svých vývojových stádií - zoitů. Apikální komplex tvoří polární prstenec, rhoptrie, mikronemy, často konoid, subpelikulární mikrotubuly a mikropory. Slouží k usnadnění průniku do hostitelské buňky nebo k fixaci na její povrch. Podle přítomnosti konoidu, organely lokalizované v přední části zoitu, rozeznáváme tři třídy v rámci kmene Apicomplexa (Conoidasida Levine 1988; Aconoidasida Mehlhorn, Peters and Haberkorn, 1980; Blastocystea Cavalier-Smith, 1998). Kokcidie patří mezi Conoidasida, pro které je typická přítomnost kompletního konoidu.

Conoidasida se dělí na 2 podtřídy: Gregarinasina Dufour, 1828 (gregariny) a Coccidiasina Leuckart, 1879 (kokcidie). Gregariny jsou většinou monoxenní, a lokalizované nejčastěji v trávicím traktu nebo tělních dutinách bezobratlých a nižších obratlovců. Dospělí gamonti jsou u většiny druhů extracelulární, apikální konec je často modifikován na přichytné organely nazvané mukrony nebo epimerity.

Gamonty kokciidií se běžně vyvíjejí intracelulárně. Nemají mukron ani epimerit, a nejčastěji parazitují v obratlovcích. Mohou se však vyskytnout i v bezobratlých. Životní cykly jsou monoxenní (čeleď Eimeriidae) i heteroxenní (čeleď Sarcocystidae). Někteří zástupci patří mezi

významné patogeny hospodářských zvířat. Rozmnožovací potenciál kokcií je obrovský – z jedné oocysty mohou vzniknout během jediného životního cyklu až statisíce nových oocyst. Jsou velmi odolné, zničit je lze jen mrazem či teplotami nad 70 °C, nebo působením agresivních chemických (toxických) látek (Levine and Ivens, 1965; Pellérdy, 1974; Perkins et al., 2000).

Čeď Eimeriidae obsahuje podle Perkins et al. (2000) 17 rodů; v současnosti je jejich počet vyšší (např. Jirků et al., 2002; Lainson, 2002, 2008; Jirků et al., 2009). Mezi nejvýznamnější patří tyto tři rody: *Eimeria* Schneider, 1875 (více než 1700 popsáných druhů), *Isospora*, Schneider 1881 (více než 350 druhů) a *Cyclospora* Schneider 1881 (méně než 20 druhů) (Duszynski and Upton, 2001).

1. 2. Životní cyklus čeledi Eimeriidae

Vývojový cyklus monoxenních zástupců probíhá ve 4 hlavních fázích: sporogonie, excystace, merogonie a gametogonie.

Oocysty se dostávají do vnějšího prostředí ve výkalech hostitele, v této fázi obsahují jedinou buňku – sporont. V přítomnosti kyslíku se buňka dělí do sporoblastů, každý z nich tvoří jednovrstevnou sporocystu obsahující určitý počet sporozoitů (viz kap. 1. 3.). Sporozoity mohou ležet i přímo uvnitř oocysty, bez přítomnosti sporocysty (např. rod *Tyzzeria*). Tento proces se nazývá sporulace/sporogonie a trvá několik hodin až dnů. Je jedním z kritérií pro druhovou determinaci kokcií. U čeledi Eimeriidae dochází k exogenní sporulaci - ve vnějším prostředí, za přístupu O₂ a při vhodné teplotě. To znamená, že v trusu jsou vylučovány pouze nezralé, neinfekční oocysty.

Hostitel se nakazí perorálně, pozřením vysporulované oocysty s kontaminovanou vodou či potravou. Oocysta se za pomoci tzv. Stiedova a substiedálního tělíska (*Eimeria*, *Cyclospora*, *Caryospora*) roztrhne a uvolní sporozoity. U některých rodů (*Choleoeimeria*) dochází k rozdělení stěny na 2 ploténky díky jemným švům (Jirků et al., 2002). Stěna oocysty je obvykle dvouvrstevná. U některých druhů kokcií je na jednom pólu ztenčení, tzv. mikropyle (*Eimeria micropiliana*), které může být zevně kryto pólovou čepičkou (*E. arloingi*). Tyto struktury rovněž napomáhají excystaci.

Sporozoit je rohlíčkovitého tvaru s centrálně uloženým jádrem a s apikálním komplexem lokalizovaným v přední části zoitu. Má také 2 refraktilní tělíska, tvořená především glykogenem. Toto vývojové stadium lze najít v lumen tenkého střeva hostitele několik málo hodin po infekci. Poté dochází k penetraci aktivně se pohybujících sporozoitů do buněk trávicího epitelu. Výraznou úlohu v průniku buněčnou membránou enterocyty hrají orgány apikálního komplexu. Zde, v buňkách hostitele, dochází k tvorbě první generace schizontů. Ty rostou, zakulacují se, a po několika hodinách tvoří prvogenerační merozoity pomocí násobného dělení. Merozoity rozbijí

epiteliální buňky a vstupují do dalších buněk, kde tvoří druhou generaci schizontů, rostou a produkují další merozoity během několika dní po infekci. Tento proces se u různých druhů opakuje, např. *E. separata* (krysa) a *E. bovis* (skot) mají 2 merogonní generace, *E. nieschulzi* (krysa) a *E. utahensis* (tarbíkomys, aguti) mají 4 generace merogonie. Z každého sporozoita může být vytvořeno 2 až 100000 merozoitů, v závislosti na druhu kokcidie. První jaderné dělení je meiotické (ve sporoplazmě), následné dělení vedoucí ke tvorbě sporocysty a sporozoitů je mitotické. Jednoduché mitotické dělení jádra se později objevuje v každé sporocystě, poté co se cytoplazma rozdělí na sporozoity.

Na tuto asexuální fázi životního cyklu navazuje fáze sexuální. Merozoity poslední generace vstupují do nových epiteliálních buněk a tvoří mikrogametocyty a makrogamety. Mikrogametocyty produkují násobným dělením velký počet bičíkatých mikrogamet. Makrogamety obsahují velký počet plastických granul dvou typů, tzv. wall forming bodies (WF₁ a WF₂), která se během zrání přesunují k periférii buňky, a po oplození se stávají základem pro vnitřní a vnější stěnu oocysty. Vzniklá oocysta rozbije svou hostitelskou buňku, vstoupí do střevního lumen a odejde s výkaly do vnějšího prostředí.

Prepatentní perioda je definována jako časový interval mezi tím, kdy hostitel přijme vysporulovanou oocystu a kdy první nevysporulovaná oocysta opustí hostitele přes jeho výkaly; obvykle bývá v řádu několika dní (např. u *E. nieschulzi* 7 dní). Oocysty jsou pak dále vylučovány i po další dny (= patentní perioda), protože ne všechny sporozoity vstoupí do hostitelských buněk najednou, ale mohou zůstat v lumenu střeva po několik dní. Délka patentní periody závisí mimo jiné na počtu vysporulovaných oocyst v počáteční infekční dávce a na počtu generací merogonie.

Pokud nedojde k reinfekci, kokcidiová infekce se sama limituje. Asexuální reprodukce nepokračuje neustále, jak tomu je například u rodu *Plasmodium*. Poté, co životní cyklus vstoupil do sexuální fáze a vytvořené oocysty jsou vyloučeny z těla, je konec infekce. K reinfekci může dojít, ale hostitel vyvíjí větší či menší imunitu po primární infekci. K opětovné nákaze dochází nejčastěji v hromadných chovech (hlodavci, králíci, drůbež), při nedostatečné výměně podestýlky. Oocysty zůstávají životaschopné a infekční až po několik měsíců po vyloučení z těla, v závislosti na druhu kokcidie a vlastnostech vnějšího prostředí (např. sluneční záření, stín, vegetace) (Levine and Ivens, 1965; Pellérdy, 1974; Chroust et al., 1998; Duszynski and Upton, 2001).

1. 3. Rodová a druhová determinace kokcií

Pro určení rodu kokcidie je nejdůležitějším znakem počet sporozoitů ve sporocystě (*Eimeria* a *Cyclospora* 2 sporozoity, *Isospora* 4, *Caryospora* 8, *Tyzzeria* 8 bez tvorby sporocysty), a počet sporocyst uvnitř oocysty – žádná (*Cryptosporidium*, *Schellackia*, *Pfeifferinella*, *Tyzzeria*), 1 sporocysta (*Mantonella*, *Caryospora*), 2 sporocysty (*Isospora*, *Dorisiella*), nebo 4 sporocysty

(*Eimeria*, *Wenyonella*, *Angeiocystis*) (Long and Joyner, 1984; Duszynski and Upton, 2001).

Determinace druhu kokcidie závisí na spolehlivé identifikaci hostitele, na vývojovém stádiu, ve kterém se vyskytuje v hostiteli, lokalitě, kde byl infikovaný hostitel nalezen, prevalenci infikovaných jedinců, včetně sezónní prevalence (Levine and Ivens, 1965; Duszynski and Wilber, 1997).

Nejdůležitější znaky však nacházíme na oocystě. K určování je nezbytné používat pouze vysporulované oocysty. Měří se délka a šířka oocysty, délka a šířka sporocysty, poměr délky a šířky u oocysty i sporocysty (tzv. shape-index). Měření je třeba provádět na min. 30-50 oocystách (nejlépe na 100 ks). Liší se také tvar oocysty a vlastnosti stěny oocysty (drsnost či hladkost, přítomnost výběžků, počet vrstev a jejich tloušťka). Stěna oocysty je většinou dvouvrstevná. Někteří autoři však pozorovali i třívrstevnou, starší popisy mohou uvádět i jednovrstevnou.

Vysporulovaná oocysta může obsahovat další struktury s rozdílnou velikostí, tvarem nebo lokací: mikropyle, pólová čepička, reziduum oocysty, polární granula.

K determinaci využíváme i morfologii struktur sporocysty: struktury na povrchu sporocysty, adhezní membrány, hrboly, švy, reziduum sporocysty, Stiedovo tělísko a asociovaná filamenta, substiedální tělísko a/nebo parastiedální tělísko; struktury sporozoitu: refraktilní tělísko a jeho počet, tvar a rozměry, jádro, a další popisující rysy jako přední rýhování, pokud jsou vidět.

Významnou roli hraje i místo výskytu infekce v hostiteli (konkrétní orgány, tkáně) (Long and Joyner, 1984; Duszynski and Wilber, 1997), včetně lokace v buňce (např. *E. media* a *E. neoleporis* se nachází obvykle před jádrem, zatímco schizonty *E. citelli* jsou umístěny za ním).

Velikost oocyst jednoho druhu kokcidie se mění v průběhu patence, je zde přímá korelace mezi časem patence a vzrůstem oocystové délky a šířky. Oocysta dosahuje největší velikosti přibližně v polovině patentní doby. Ačkoliv dochází ke zvětšování velikosti, shape-index zůstává stejný (Gardner and Duszynski, 1990; Long and Joyner, 1984; Parker and Duszynski, 1986).

Oocysty různých druhů kokcidií mohou být od sebe obtížně rozpoznatelné. Bývají polymorfní v příbuzných hostitelích, nebo naopak monomorfní v nepříbuzných hostitelích. (Parker and Duszynski, 1986). Taxonomie a vymezení rodů a druhů kokcidií pochází tedy výlučně z morfologických charakteristik. Je zjevně nepřirozené, protože neodpovídá fylogenetickým vztahům zjištěným molekulárními metodami (Long and Joyner, 1984; Duszynski and Upton, 2001).

Kokcidie rodu *Eimeria* byly pozorovány ve všech druzích hlodavců zmiňovaných v této práci (viz kap. 1. 6.), kromě druhu *Apodemus microps*, zřejmě kvůli jeho nepřilíš častému výskytu. Z *Apodemus agrarius* bylo popsáno celkem 6 druhů kokcidií (*E. agrarii*, *E. apodemi*, *E. arcutinae*, *E. gandobica*, *E. hungaryensis* (syn. *E. muris*) a *E. kaunensis*). Z rodu *Apodemus flavicollis* jsou to: *E. apionodes*, *E. apodemi*, *E. arcutinae*, *E. golemanskii*, *E. hungaryensis* (syn. *E. muris*), *E. prasadi*

(syn. *E. hindley*) a *E. rugosa* (celkem 7 druhů kokcií). Nejvíce druhů kokcií (19) bylo popsáno z *A. sylvaticus* - *E. apodemi*, *E. arcutinae*, *E. badamlinica*, *E. divichinica*, *E. golemanskii*, *E. gomurica*, *E. gumbashica*, *E. hungaryensis* (syn. *E. muris*), *E. jerfinica*, *E. montgomeryae*, *E. muris*, *E. naye*, *E. neerensis*, *E. prasadi* (syn. *E. hindley*), *E. russiensis*, *E. svanbaevi* (syn. *E. kriygsnanni*, *E. krijgsmani*), *E. sylvatici* (syn. *E. sylvatica*), *E. uptoni* a *E. zaurica*. V *Microtus arvalis* může parazitovat těchto 10 druhů - *E. arvicolae* (syn. *Coccidium arvicolae*, *E. arvalis*, *E. musculi*), *E. derenica*, *E. gomurchaica*, *E. iradiensis*, *E. iwanoffi* (syn. *E. ivanovi*), *E. kolanica*, *E. majorici*, *E. monocrustae*, *E. primbelica* a *E. zuvandica*. U *Myodes glareolus* byly popsány pouze 2 druhy kokcií, *E. cernae* a *E. rysavyi* (syn. *E. apodemi*, *E. hindley*). Z důvodu vysoké podobnosti některých oocyst a neúplným popisům byly některé druhy popsány vícekrát (Lewis and Ball, 1983; Higgs and Nowell, 1991; Hůrková et al., 2005; <http://biology.unm.edu/biology/coccidia/rodents.html>).

Kokcidie rodu *Isospora* se u těchto hlodavců nevyskytují příliš často. Dosud byl popsán jediný druh, *Isospora uralicae*, a to z *Apodemus sylvaticus* (Pellérdy, 1974).

1. 4. Fylogeneze kokcií

V současné době je kmen Apicomplexa považován za monofyletický (Barta et al., 1991). Taxony v rámci tohoto kmene jsou molekulárně studovány s různou intenzitou, důraz je kladen na studium lékařsky či veterinárně významných patogenů (Barta et al., 1997; Eberhard et al., 1999; Franzen et al., 2000; Kvičerová et al., 2008).

Molekulárně fylogenetické analýzy prokázaly, že jednotlivé skupiny tvořící kmen Apicomplexa už však monofyletické nejsou (např. rody *Eimeria*, *Isospora*). Monoxenní kokcidie rodu *Eimeria* se rozpadají na několik hostitelsky specifických linií (např. linie králičí, drůbeží, prasečí, apod.), přičemž eimerie hlodavců tvoří 2 oddělené, vzájemně nepříbuzné linie (Morrison et al., 2004; Matsubayashi et al., 2005).

Pro zjištění fylogenetických vztahů hlodavčích eimerií použili Zhao and Duszynski (2001) sekvenace plastidového genu ORF 470 a jaderné 18S rDNA. Sekvenace malé jaderné podjednotky (18S rDNA) je široce užívána pro rekonstrukci fylogenetických vztahů ve skupině Apicomplexa, avšak kvůli své značné konzervativnosti je nevhodná pro analýzu vysoce příbuzných druhů. Molekulární analýzou plastidových genů lze získat více informací o mezidruhových vztazích. Analýzou sekvencí těchto dvou genů autoři zjistili, že jimi zkoumaných 10 druhů eimerií ze severoamerických hlodavců náleží do dvou odlišných linií. Druhy eimerií s morfologicky podobnými oocystami jsou si příbuznější než druhy sdílející stejné hostitelské skupiny. Z toho plyne, že morfologická podobnost vysporulovaných kokcií je více signifikantní v odrazu evoluční

příbuznosti než hostitelská specifita.

Kokcidie byly tedy touto analýzou rozděleny do dvou linií. Linie A se vyznačuje sférickými a subsférickými oocystami podobné velikosti a přítomností residua oocysty. Do této skupiny patří *Eimeria albigulae* (hostitel *Neotoma*, čeleď Cricetidae), *E. arizonensis* (*Peromyscus* a *Reithrodontomys*, Cricetidae), *E. onychomysis* (*Onychomys*, Muridae) a *E. reedi* (*Perognathus*, Heteromyidae).

Oocysty linie B jsou spíše vejčité, elipsoidní či protáhlé, rozmanitých velikostí, bez residua oocysty. Patří sem *E. falciformis* (hostitel *Mus*, čeleď Muridae), *E. langebarteli* (*Reithrodontomys*, Cricetidae), *E. nieschulzi* (*Rattus*, Muridae), *E. papillata* (*Mus*, Muridae), *E. separata* (*Rattus*, Muridae) a *E. sevellensis* (*Onychomys*, Muridae). Residuum oocysty bylo tedy zásadním rozlišovacím znakem, který dělil tyto dvě linie.

Většina kokcií se vyvíjí ve specifických místech trávicího traktu hostitelů. Druhy napadající nespecifická místa, např. orgány a tkáně (např. *E. gruis* nebo *E. reichenowi* u jeřába *Grus monacha* a *G. vipio*) patří do fylogeneticky odlišných linií (Matsubayashi et al., 2005).

Fylogeneze savčích druhů rodu *Isoospora* byla studována analýza malé jaderné podjednotky 18S rDNA *I. belli* v kombinaci s 18S rDNA dalších kokcií. Tato analýza dala vznik 3 skupinám. První skupinu tvoří kokcidie formující cysty (*Toxoplasma* a *Neospora*) a savčí zástupci rodu *Isoospora* (*I. ohioensis*, *I. suis*, *I. belli*).

Druhá skupina reprezentuje sesterskou skupinu k první a obsahuje zástupce rodu *Sarcocystis*.

Třetí skupina zahrnuje zástupce čeledi Eimeriidae, včetně rodů *Eimeria* a *Cycloospora*.

Tyto výsledky ukazují, že *I. belli* a ostatní zástupci rodu *Isoospora* jsou příbuznější čeledi Sarcocystidae, než Eimeriidae. Původní taxonomické zařazení bylo založeno na morfologické podobnosti vysporulovaných oocyst, životních cyklů a místa vývoje v hostiteli (Carreno et al., 1998; Franzen et al., 2000; Samarasinghe et al., 2008).

V současnosti je rod *Isoospora* považován za polyfyletický, tvořící hostitelsky specifické linie. Skupina savčích isospor, obsahující např. *I. suis* (hostitel *Sus*), *I. belli* (*Homo*) nebo *I. ohioensis* (*Canis*), *I. felis* (*Felis*), *I. timoni* (*Suricata*) je nyní řazena do rodu *Cystoisospora* (Frenkel, 1977). Další linii tvoří isospory parazitující u ptáků, například *I. albicolis* (hostitel *Turdus*) nebo *I. anthi* (*Anthus*). Další isospory napadají také plazy a obojživelníky, jako *I. basilisci* u *Basiliscus* nebo *I. delicatus* u *Pseudacris*. Jejich evoluční vztahy k savčím či ptačím isosporám však nejsou dosud známy, molekulární studie tohoto problému neexistují. Dá se očekávat, že v brzké době projde rod *Isoospora* značným množstvím změn. (Schrenzel et al., 2005; <http://biology.unm.edu/biology/coccidia/list.html>).

1. 5. Hostitelská specifita kokcií

Hostitelská specifita je definována jako schopnost parazita infikovat určité omezené množství hostitelů a úspěšně v nich dokončit svůj vývoj. V nejstriktnějších případech může zahrnovat pouze jeden hostitelský druh (Joyner, 1982).

Faktory podílející se na existenci hostitelské specifity eimerií nejsou dosud zcela známy, ale důležitými body jsou excystace (ovlivnění chemickými stimuly solí žlučových kyselin), nescifické imunitní mechanismy hostitele a genetické vlastnosti parazita. Pro většinu monoxenních kokcií je typická vysoká hostitelská specifita; striktní hostitelská specifita (infekce jediného druhu hostitele) však ve skutečných podmínkách existuje zřídka, pokud vůbec (Upton et al., 1992; Chroust et al., 1998; Duszynski and Upton, 2001). Obecně lze říci, že hostitelská specifita kokcií rodu *Eimeria* je užší, jeden druh kokcidie zřídka infikuje více než jeden rod hostitele, zatímco kokcidie rodu *Isospora* mají relativně široké hostitelské spektrum. Např. *Isospora bigemina* byla popsána u psa, kočky, fretky a norka (Levine and Ivens, 1965; Pellérdy, 1974).

Mezi vysoce hostitelsky specifické kokcidie rodu *Eimeria* parazitující u myšic rodu *Apodemus* patří např. *E. agrarii* (*Apodemus agrarius*), *E. naye* (*A. sylvaticus*), *E. rugosa* (*A. flavicollis*) a *E. zaurica* (*A. sylvaticus*).

Naopak nízká hostitelská specifita byla popsána např. u *E. apionodes*, *E. apodemi* a *E. hungaryensis* (všechny tři parazitující u *A. agrarius*, *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*), nebo u *E. uptoni* (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus*) (Lewis and Ball, 1983; Higgs and Nowell, 1991; Hůrková et al., 2005).

1. 6. Vybraní hlodavci jako hostitelé kokcií

1. 6. 1. Historie a členění

Hlodavci patří do skupiny placentálních savců. Jejich taxonomické členění je staré a za nedávnou dobu neprošlo velkým množstvím změn.

Současné taxonomické zařazení hlodavců (Wilson and Reeder, 2005):

Říše: Animalia Linnaeus, 1758

Kmen: Chordata Bateson, 1885

Podkmen: Vertebrata, Cuvier 1812

Třída: Mammalia, Linnaeus, 1758

Podtřída: Theria, McKenna and Bell, 1997

Infratřída: Eutheria, Huxley 1881

Řád: Rodentia, Bowdich 1821

Savci jsou rozděleni do 26 řádů, které obsahují 4629 druhů (z toho 2015, tj. 43,52 %, představují zástupci řádu Rodentia). U 556 z nich byla zjištěna přítomnost kokcií – 869 druhů *Eimeria* spp., 132 *Isospora* spp. a 7 *Cyclospora* spp.

Řád hlodavci obsahuje 2015 druhů, přítomnost kokcií byla dosud zjištěna u 280 druhů (13,9 %). Z toho kokcie rodů *Eimeria* jsou zastoupeny 415 druhy, *Isospora* spp. 40 druhy a *Cyclospora* sp. pouze jedním druhem (Duszynski and Upton, 2001; Wilson a Reeder, 2005).

1. 6. 2. Rod *Apodemus* (Rodentia: Muridae)

Myšice rodu *Apodemus* v současnosti dělíme do dvou podrodů (*Apodemus* a *Sylvaemus*) a 14 druhů. Z myšic studovaných v této práci patří do podrodu *Sylvaemus* druhy *A. flavicollis*, *A. microps* a *A. sylvaticus*, zatímco *A. agrarius* patří do podrodu *Apodemus* (Wilson and Reeder, 2005).

K oddělení podrodů *Apodemus* a *Sylvaemus* došlo nejspíše před 7-8 miliony let. V této době docházelo k významným klimatickým změnám, které vedly k drastické proměně vegetace. V mnoha oblastech, zvláště v Palearktidě, došlo k nahrazení lesů převážně bylinným porostem. Tyto změny vegetace mohly vést k vytlačování živočišných druhů, kdy druhy adaptované na lesní prostředí byly nahrazeny druhy otevřených stanovišť. V daných podrodech je divergenční čas odhadován na 5,4-6 mil. let u *Apodemus*, a 2,2-3,5 mil. let u *Sylvaemus* (Michaux et al., 2002).

Na území České republiky se vyskytují čtyři druhy myšic rodu *Apodemus*, které byly předmětem zájmu této práce (Tab. 1).

Latinský název	Český název	Čeleď
<i>Apodemus agrarius</i> (Pallas, 1771)	Myšice temnopásá	Muridae
<i>Apodemus flavicollis</i> (Melchior, 1834)	Myšice lesní	Muridae
<i>Apodemus microps</i> (Kratochvíl and Rosický, 1952)	Myšice malooká	Muridae
<i>Apodemus sylvaticus</i> (Linnaeus, 1758)	Myšice křovinná	Muridae

Tab. 1: Přehled hlodavců obsažených v této práci

- *Apodemus agrarius* (Pallas, 1771) – Myšice temnopásá

Hmotnost 15-40 g, délka těla 70-125 mm, délka zadního chodidla 17,5-21,0 mm.

Tento druh myšice se vyskytuje na 21,6 % území naší republiky (Obr. 1). Patří mezi zoogeograficky zajímavé druhy. Jeho hranice není na západě ustálená. Dnes lze hranici výskytu označit jako spojnici mezi hřebeny Krušných hor, tokem Labe mezi Děčínem a Ústím nad Labem a povodím Ploučnice i Smědé, dále pokračují zřejmě izolované enklávy ve východním Podkrkonoší a

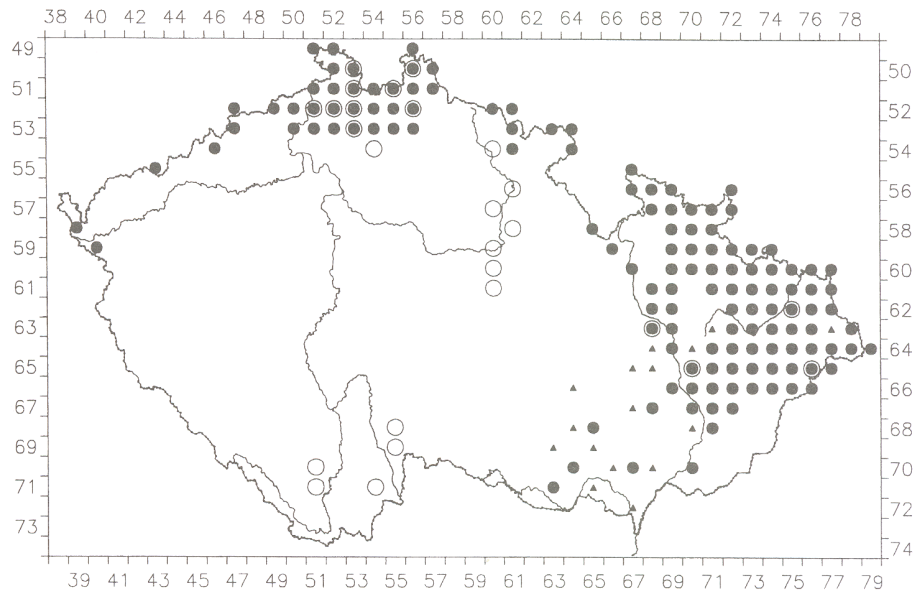
v Broumovské vrchovině. Na Moravě došlo k posunu na jih, takže hranice jejich areálu zasahuje na střední Moravu a nejnověji i ke Znojemsku. Je tedy možné, že na Moravě zvětšila myšice svůj areál za posledních 20 let o více než 100 km, oproti Čechám, kde k posunu došlo maximálně v řádu desítek kilometrů. Možným vysvětlením je mohutná záplavová vlna, která postihla Moravu a Slezsko v roce 1997.

Ve světě se vyskytuje ve dvou izolovaných oblastech – na Dálném východě, Koreji, Číně a Tajwanu, a dále od Střední Evropy po Střední Asii a Kavkaz. Většímu pronikání do vnitrozemí brání zalesněné hory.

Je považována za druh stepního původu. Obývá nejčastěji nížiny a pahorkatiny, tzn. nadmořskou výšku do 300 m n. m.; do 600 m n. m. je už vzácnější. Avšak literatura uvádí některé nálezy i z výšky kolem 1000 m n. m.

Myšice temnopásá je u nás hodnocena jako hygrofilní a eurytermní druh, který žije v křovinatých mezích, stráních, polích, okrajích menších lesů a různých ruderalních plochách. Často se nachází podél vodních toků, kde se ukrývá v břehových porostech a rákosinách, a to i u stojatých vod.

Na podzim se stahuje k lidským sídlům. Myšice temnopásá má na hřbetě nápadný úzký černý pruh, táhnoucí se od hlavy až ke kořeni ocasu. Oproti podobné myšivce horské (*Sicista betulina*) je větší, má kratší ocas a delší zadní chodidlo. Svrchní část těla je rezavohnědá až žlutohnědá, břicho bílé (Dungel, 1993; Anděra and Beneš, 2002; Anděra and Horáček, 2005; Wilson and Reeder, 2005).



Obr. 1: Mapa rozšíření *Apodemus agrarius* v ČR (převzato z Anděra and Beneš, 2002)

Plné kolečko – výskyt potvrzený po roce 1950

Prázdné kolečko – nálezy do roku 1950 včetně

Trojúhelník – údaje Farského 1965

- *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) – Myšice lesní

Hmotnost 18-45 g, délka těla 90-123 mm, délka zadní tlapky 23-27 mm.

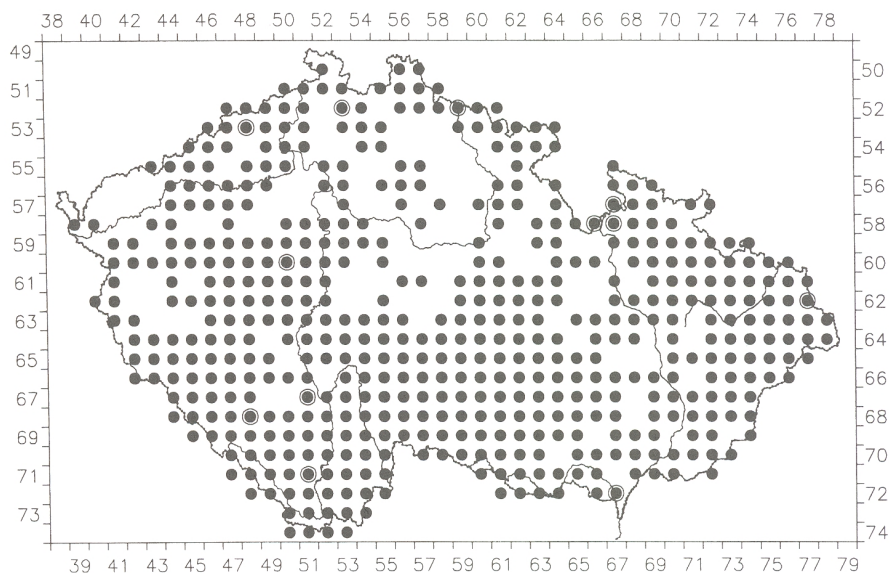
Vyskytuje se na 81,2 % našeho území, tzn. je to velice běžný druh, který osidluje téměř celé území naší republiky (Obr. 2).

V Eurasii se vyskytuje od jihu Francie a Itálie a jihu Skandinávie až po Ural, Kavkaz, Malou Asii a Blízký východ, ostrůvkovitě i v jižní Anglii a Pyrenejích.

Žije nejčastěji v listnatých a smíšených lesích, ale i podél potoků, v mokřadech, na rašeliništích. Podobně jako myšice křovinná osidluje meze, stráně, remízky, sady a vinice. Může se zabydlet i v opuštěné ptačí budce. Na zimu se ve velkých počtech stahuje k lidským sídlům, ale neproniká do aglomerací, spíše se drží na okrajích nebo v parcích či příměstských lesích. Vyskytuje se ve všech nadmořských výškách.

Myšice lesní je velmi podobná ostatním myšicím podrodu *Sylvaemus*, ze všech však bývá největší a spolehlivě se dají odlišit pouze jedinci se zadní tlapkou delší než 24 mm. Má dlouhý ocas, který bývá delší než tělo (u mláďat 90-95 % délky těla) a na kterém lze napočítat 180-230 kroužků zrohovatělé pokožky. Dospělci mají výrazné ryšavě hnědé až kaštanové zbarvení hřbetu, který je

v kontrastu s téměř čistě bílým břichem. Na hrdle často mívá velkou žlutooranžovou skvrnu, táhnoucí se k předním tlapkám a napojující se na boky. Mladí jedinci bývají zabarveni světle šedohnědě, břicho je světleji šedé a není tak jasně ohraničeno. Má nápadné korálkovité oči v průměru měřící asi 5 mm, a velké lysé ušní boltce (Dungel, 1993; Anděra and Beneš, 2002; Anděra and Horáček, 2005; Wilson and Reeder, 2005).



Obr. 2: Mapa rozšíření *Apodemus flavicollis* v ČR (převzato z Anděra and Beneš, 2002)

Plné kolečko – výskyt potvrzený po roce 1950

Prázdné kolečko – nálezy do roku 1950 včetně

- *Apodemus microps* (Kratochvíl et Rosický, 1952) - Myšice malooká
syn. *Apodemus uralensis*

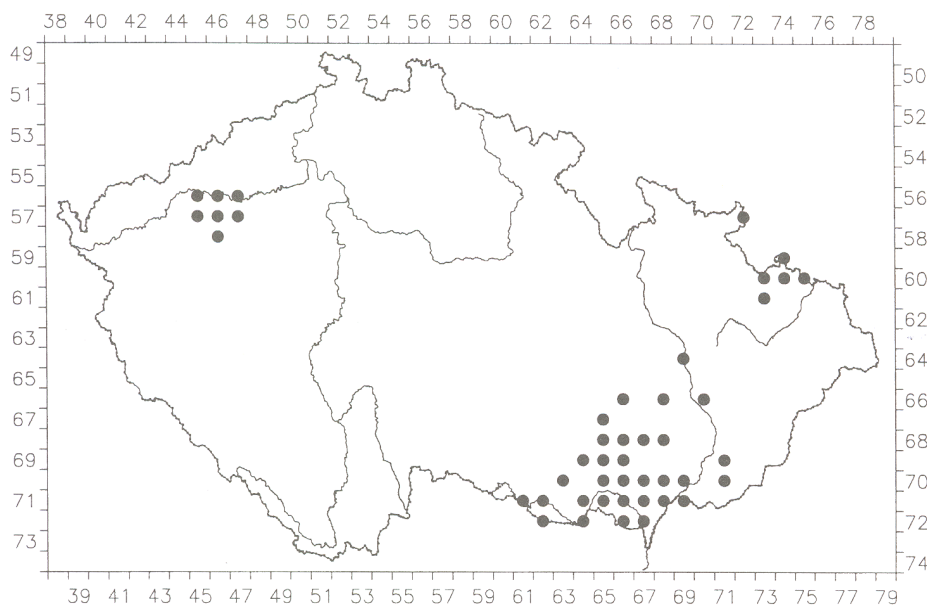
Hmotnost 12-22 g, délka těla 70-96 mm, délka zadní tlapy 17,0-20,5 mm.

Vyskytuje se na 7,2 % území České republiky, patří mezi méně běžné druhy (Obr. 3). Žije v nížinách a pahorkatinách jižní Moravy a Slezska. Izolovaná enkláva je též na Žatecku, rozkládající se na území 500 km² mezi západním okrajem Doupovských hor k řece Ohři, což je nejzápadnější část celého areálu rozšíření druhu. Není znám důvod vzniku tohoto uzavřeného ostrůvku, ale je to jeden z nejzajímavějších jevů v rámci středoevropské savčí fauny. Odtud byl popsán samostatný poddruh *Apodemus microps cimrmani* (Vohralík, 2002), který je českým endemitem. Je možné, že tato myšice se vyskytuje i v jiných oblastech naší republiky a bývá zaměňována s myšicí křovinnou. Nejvýše se vyskytuje v nadmořských výškách do 400 m n. m., na Slovensku ale byla nalezena i v 1450 m n. m.

Kromě naší republiky a Slovenska se vyskytuje i v jižní části Polska, na Ukrajině, a na jihovýchodě Evropy až k Malé Asii.

Je to stepní teplomilný druh obývající nejčastěji otevřené bezlesé prostory. Během roku mění stanoviště od zaplevelených mezí, úhorů a strání na jaře, později se přesouvá na pole, k podzimu obývá strniště a kultury víceletých plodin. Osídlení mění zřejmě kvůli agrotechnickým pracem. Méně se vyskytuje na okrajích řek a loukách, neobdělávaných plochách, v lesících a křovinách; u lidských sídel je nalezneme vzácně. Malé oči a uši ukazují i na častý výskyt pod zemí, o čemž svědčí i krátké smyslové chlupy na čenichu.

Připomíná myšici křovinnou, má ale menší oči (průměr 3,5-3,9 mm), ušní boltce (výška 15 mm) i kratší zadní tlapy, jejichž velikost nepřesahuje 20,5 mm. Ocas je dvoubarevný a vždy kratší než tělo, které je na hřbetu šedohnědé s přechodem k nažloutlému břichu. Hranice zbarvení může být u dospělých jedinců výrazná (Dungel, 1993; Anděra and Beneš, 2002; Anděra and Horáček, 2005; Wilson and Reeder, 2005).



Obr. 3: Mapa rozšíření *Apodemus microps* v ČR (převzato z Anděra and Beneš, 2002)

Plné kolečko – výskyt potvrzený po roce 1950

- *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758) – Myšice křovinná

Hmotnost 13-38 g, délka těla 75-110 mm, délka zadní tlapy 19,5-23,5 mm.

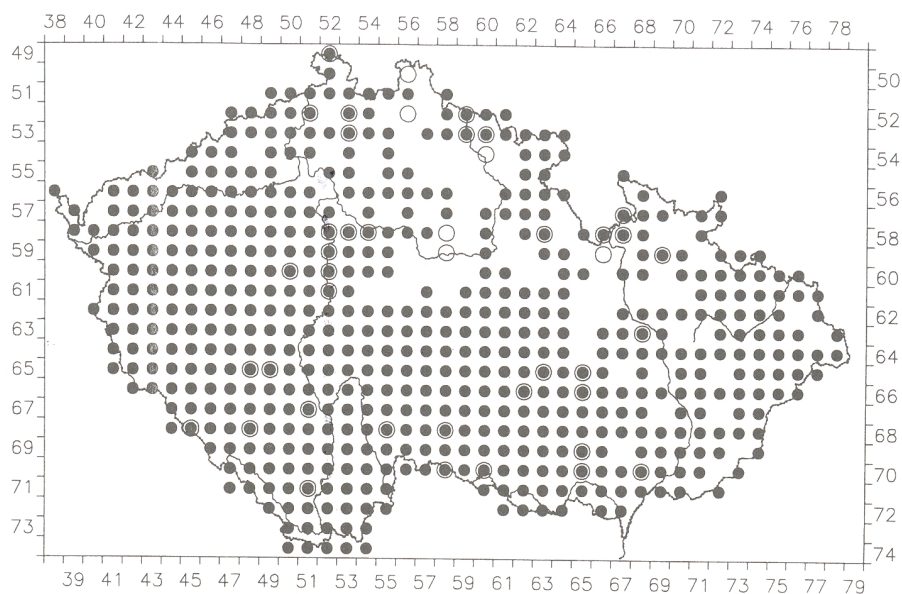
Vyskytuje se na 89,0 % republiky (Obr. 4). Tento údaj je ovšem třeba brát s rezervou, protože odlišení tohoto druhu od ostatních druhů myšic není vždy spolehlivé.

Vyskytuje se v celé Evropě kromě severní Skandinávie a Finska, obývá i severozápadní Afriku a

v Asii zasahuje až do severní Indie, Číny a Mongolska.

Vyskytuje se téměř ve všech biotopech s výjimkou horských smrčín a vrchovišť, do nadmořské výšky 1500 m n. m. Nejčastěji obývá pole, meze, remízky a lesíky, stráně porostlé křovinami, okraje lesů, písčiny, jsou i podél vodních toků, v sutích, vřesovištích, zahradách, podél cest, v průsecích lesů i nad hranicí lesa. Jako jeden z prvních druhů obsazuje raná stadia výsypek povrchových dolů i centra měst, nalezneme ji i na skládkách odpadu nebo ve stozích, či u lidských příbytků, kam se ve velkém množství stahuje na zimu.

Je velmi podobná myšici lesní, ale v průměru je menší. Nejlepším rozpoznávacím znakem je délka zadní tlapy, která se nejčastěji pohybuje mezi 20,5-23,0 mm a nikdy nepřesahuje 24 mm. Ocas je většinou kratší než tělo a má na něm asi 150-180 ocasních kroužků. Nemá příliš patrnou hranici v tmavém zabarvení boků a světlém šedivém bříše. Hřbet má hnědý nebo světle rezavý. Žlutá skvrna na hrdle zpravidla chybí; pokud je přítomná, bývá malá a nezasahuje až na přední končetiny (Dungel, 1993; Anděra and Beneš, 2002; Anděra and Horáček, 2005; Wilson and Reeder, 2005).



Obr. 4: Mapa rozšíření *Apodemus sylvaticus* v ČR (převzato z Anděra and Beneš, 2002)

Plné kolečko – výskyt potvrzený po roce 1950

Prázdné kolečko – nálezy do roku 1950 včetně

Myšice, jako běžně se vyskytující hlodavci s širokým areálem rozšíření, který se u jednotlivých druhů překrývá, představují dobrý a snadno dostupný model pro studium vývoje vztahů parazita a hostitele. Otázka, zda se jednotlivé druhy myšic mohou vzájemně křížit, dosud nebyla zodpovězena. Evoluční vztahy mezi myšicemi jsou velmi dobře prostudovány i na populační a fylogeografické úrovni (Michaux et al., 2002, Hirota et al., 2004, Michaux et al., 2005). Fylogeneze parazitů ve vztahu k tomuto hostiteli byla studována na modelu vši *Polyplax serrata* v Evropě (Štefka and Hypša, 2008). Veš zde tvoří 3 oddělené a geneticky vzdálené linie, částečně závislé na hostitelské specifitě.

Kokcidie parazitující u myšic rodu *Apodemus* byly dosud studovány pouze okrajově. Jedná se většinou o morfologické popisy nových druhů či o prevalenci těchto parazitů (Lewis and Ball, 1983; Higgs and Nowell, 1991, 2000; Hůrková et al, 2005). Dosud žádná studie se nezabývala kokcidiemi na populační úrovni. Jedná se tedy o první práci tohoto typu.

2. Cíle práce

Studium kokcidií u hlodavců rodu *Apodemus*.

- Odchyty hlodavců v terénu a sběr jejich trusu.
- Parazitologické vyšetření trusu, mikroskopie.
- Zjištění prevalence kokcidií u těchto hlodavců v různých oblastech České republiky.
- Analýza vztahů mezi jednotlivými druhy kokcidií parazitujících myšice pomocí molekulárních a fylogenetických metod (izolace DNA, PCR, sekvenace, zpracování dat fylogenetickými programy).

Práce je v těsné vazbě na grant GA ČR č. 31-206/08/1019 (V. Hypša).

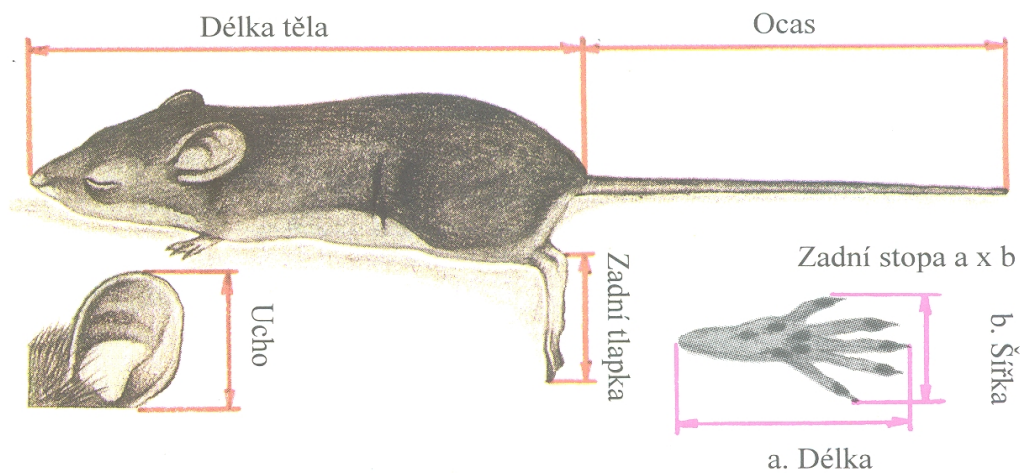
3. Metodika

3. 1. Odchyty hlodavců

Odchyty byly prováděny v období jaro - podzim roku 2009 na různých místech České republiky a na Slovensku, včetně oblastí překryvů výskytu jednotlivých druhů myšic. Byly použity klasické dřevěné sklapovací pasti. Jako návnada sloužila paštika nebo knot napuštěný sádlem.

3. 2. Identifikace hlodavců

Hlodavci byli identifikováni na místě podle literatury (Dungel, 1993; Anděra and Horáček, 2005). Zřetel byl brán zejména na velikost jedince, zbarvení, velikost oka a ušního boltce, délku a poměr těla k ocasu, délku zadní tlapky (měřeno posuvným měřidlem), ale i na charakter stanoviště (Obr. 5).



Obr. 5: Rozměry důležité pro identifikaci hlodavce (převzato z Dungel, 1993)

3. 3. Odběr biologických vzorků

Na místě byl odebrán čerstvý trus z tračníku a uchován ve vzorkovnici s 4% roztokem dichromanu draselného ($K_2Cr_2O_7$). Tyto vzorkovnice byly poté skladovány v lednici. Hlodavci byli také vyšetřeni na přítomnost ektoparazitů (vši, blechy, klíšťata, roztoči) vyčesáním srsti zubním kartáčkem. Vši byly odebrány do absolutního ethanolu pro studium populační genetiky v rámci grantu GA ČR 31-206/08/1019. Z každého jedince byl též odebrán jeden či dva prsty do absolutního ethanolu pro další výzkum v rámci tohoto grantu.

3. 4. Koprologické vyšetření

Část zhomogenizovaného trusu byla přecezena přes sítko do zkumavky, dolita vodou a centrifugována 5 min při 2500 rpm. Po odstranění supernatantu byl sediment promíchán s Sheatherovým cukerným roztokem o hustotě 1.30 (Duszynski and Wilber, 1997; Zajac and Conboy, 2006) a centrifugován za stejných podmínek. Část povrchové blanky byla přenesena na podložní sklíčko a mikroskopována světelným mikroskopem při zvětšení 20×10 a 40×10. Metoda je založena na rozdílné hustotě, kdy lehké oocysty vystoupají na povrch, zatímco nečistoty klesnou na dno.

Pokud byl mikroskopovaný vzorek pozitivní, byl ohodnocen podle množství přítomných oocyst v zorném poli při zvětšení 20×10 (tzv. semikvantitativní metoda stanovení intenzity infekce) (Thienpont et al., 1979).

1 - 5 oocyst	+	slabá infekce
5 - 10 oocyst	++	středně silná infekce
10 - 50 oocyst	+++	silná infekce
více než 50 oocyst	++++	velmi silná infekce

3. 5. Determinace druhu kokcií

Druh příslušné kokcie byl determinován na základě morfologie a morfometrie vysporulovaných oocyst, dle obecně platných pravidel (Duszynski and Wilber, 1997). Měření oocyst byla provedena při zvětšení 100 × 10, na mikroskopu Olympus Provis BX51 vybaveném okulárovým měřítkem. Mikrofotografie oocyst byly zhotoveny fotoaparátem Olympus Camedia C-5060W a upraveny počítačovým programem Quick Photo Pro v. 2.0.

Tento bod prováděla Jana Kvičerová a není součástí mé bakalářské práce.

3. 6. Izolace celkové DNA

3. 6. 1. Extrakce komerčním kitem

K extrakci byl použit FastDNA® SPIN for Soil Kit od firmy MP Biomedicals. Celková DNA byla vyizolována dle návodu výrobce (ve zkratce: opakované promývání vzorku vodou, rozbíjení buněk (oocyst) na bead-beateru pomocí skleněných kuliček o různé velikosti, navázání DNA na Binding Matrix, filtrace a centrifugace vzorku na kolonkách, eluace DNA do deionizované vody).

3. 6. 2. Fenol-chloroformová extrakce

Extrakce komerčním kitem je jednoduchá a rychlá, mívá však nižší výtěžnost. Pro izolaci DNA z problémových vzorků (u kterých extrakce kitem selhala) jsem použila metodu fenol-chloroformové extrakce.

Oocysty byly opakovaně promyty ve sterilním PBS (phosphate buffer saline) za účelem odstranění $K_2Cr_2O_7$ (inhibitor PCR reakce), rozbity metodou „heat shock“ pomocí několika cyklů opakování vysokých teplotních rozdílů (tekutý dusík - horká voda) a třením se skleněným pískem, a následně inkubovány přes noc na ledu spolu s lyzačním pufrem (180 μ l NET 50 + 24 μ l 30% sarkosinu + 4 μ l pronázy E). Po zlyzování proteinů a stěny oocyst byla celková DNA extrahována pomocí standardní fenol - chloroformové metody a následně precipitována přidáním ethanolu (Sambrook and Russell, 2001).

3. 7. Geny použité pro fylogenetické analýzy

Pro amplifikaci jsem použila mitochondriální gen pro cytochrom c oxidázu I (COI 1), neboť je dobrým markerem mezidruhové i vnitrodruhové variability. Geny, které jsou obvykle používány pro rekonstrukci fylogenetických vztahů v rámci kmene Apicomplexa (jaderná 18S rDNA, plastidový ORF 470, plastidová 23S rDNA), nevykazují dostatečnou variabilitu (Kvičerová, osobní sdělení).

3. 8. PCR, primery

Specifické primery pro amplifikaci přibližně 800 bp COI 1 byly navrženy podle publikovaných sekvencí příbuzných druhů kokcií rodu *Eimeria* (forward primer: 5'-GAAACTGCGAATGGCTCATT-3', reverse primer: 5'-CTTGCGCCTACTAGGCATTC-3'). PCR probíhala v objemu 25 μ l za standardních podmínek. Pro většinu PCR reakcí byla použita HotStarTaq DNA Polymeráza (Qiagen), pro amplifikaci problémových vzorků polymeráza High Fidelity PCR Enzyme Mix (HiFi) (Fermentas). Program začínal krokem denaturace při 95 °C po 15 minut (při použití HiFi polymerázy denaturace trvala 2,5 minuty při 94 °C), poté pokračoval 35 cykly denaturace při 95 °C po 45 s (HiFi 33 cyklů, denaturace při 94 °C po 45 s), nasedání primeru (annealing) při 55 °C po 45 s a elongace při 72 °C po 90 s. Amplifikační proces byl zakončen finální extenzí při 72 °C po 10 min. Výsledek PCR reakce byl vizualizován elektroforézou na 1 % agarózovém gelu při 100 V, s použitím barviva Sybr Green a 1 kb ladderu.

3. 9. Sekvence, úprava a zpracování sekvencí

Získané PCR produkty byly enzymaticky přečištěny pomocí 0,2 μ l Exo I (exonuclease I z *E. coli*) a 0,2 μ l CIP (alkaline phosphatase calf intestinal; New England BioLabs®Inc.), případně 0,4 μ l SAP (shrimp alkaline phosphatase; Fermentas). Vzorky byly následně odeslány do firmy Macrogen (Korea) na sekvenaci. K prohlížení a úpravě získaných sekvencí jsem použila program Sequence Scanner, software 1.0 (<https://products.appliedbiosystems.com>). Upravené sekvence byly identifikovány a porovnány s ostatními sekvencemi v GenBank pomocí algoritmu BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) a zkompletovány počítačovým programem SeqMan (DNA STAR, Inc.).

Pomocí programu EditSeq (DNA STAR, Inc.) byl zkontrolován a upraven čtecí rámec sekvencí.

3. 10. **Fylogenetické analýzy**

3. 10. 1. Alignment

Zkopírováním veškerých získaných sekvencí COI 1 kokcií z myšic rodu *Apodemus* a několika dalších sekvencí COI 1 (Tab. 2) do společného textového souboru byl vytvořen dataset. Ten byl převeden do programu BioEdit (Hall, 1999), sekvence byly alignovány jako proteiny algoritmem ClustalW Multiple alignment (Thompson et al., 1994), manuálně zkontrolovány a ořezány přibližně do stejné délky (~ 680 bp).

název kokcidie	hostitel	přístupový kód GenBank
<i>E. acervulina</i>	kur	FJ236428
<i>E. exigua</i>	králík	- (poskytla J. Kvičerová)
<i>E. intestinalis</i>	králík	- (poskytla J. Kvičerová)
<i>E. maxima</i>	kur	FJ236459
<i>E. mivati</i>	kur	EF174185
<i>E. tenella</i>	kur	FJ236458
<i>Haemoproteus sanguinis</i>	bulbul (pěvec)	EU254598
<i>Hepatocystis</i> sp.	kaloň	EU254570

Tab. 2: Přehled sekvencí COI 1 vybraných z GenBank pro tvorbu fylogenetických stromů

3. 10. 2. Fylogenetické analýzy

Upravený alignment sekvencí byl exportován do programu TCS (Clement et al., 2000). Zde byly sekvence zkolabovány do jednotlivých haplotypů.

Programem PAUP v.4b10 (Swofford, 2002) byly sekvence analyzovány heuristickou metodou Maximum parsimony (MP). Ze získaných fylogenetických stromů byl poté vytvořen konsensus. Robustnost stromu byla ověřena hodnotou konzistenčního indexu (c_i) a podpora větvení byla vypočtena jako bootstrap s 1000 opakováními.

Maximum likelihood (ML) byl vypočten v programu PHYML v2.4.3s (Guindon and Gascuel, 2003). Jako outgroup byla pro všechny stromy použita sekvence COI 1 z *Hepatocystis* sp. (EU254570).

Výsledné stromy a haplotypová síť byly vizualizovány programem TreeView v. 1.6.6. (Page, 1996).

4. Výsledky

4. 1. Lokality odchyty hlodavců

V této práci jsou obsaženy výsledky z východních Čech, Vysočiny, severních Čech, jižních Čech, středních Čech a Plzeňska. Samostatně jsem prováděla odchyty ve Východních Čechách, na Vysočině a v jižních Čechách, z ostatních lokalit jsem zpracovala vzorky trusu získané od Jany Kvičtové a Jany Martinů. Protože ne u všech pozitivních vzorků se mi podařilo kvalitně vyizolovat DNA či získat sekvence, je tato práce rozšířena i o sekvence z myšic odchycených na Slovensku a v Anglii. Kromě myšic jsem odchytila i několik normíků (*Myodes glareolus*) a hrabošů (*Microtus* sp.) (Rodentia: Arvicolidae), kterým se tato práce nevěnuje, ale pro úplnost je uvádím v Tab. 3.

4. 1. 1. Domácí lokality

Královéhradecký kraj

Ve východních Čechách byly sběry prováděny u obce Chotěborky, v Deštném v Orlických horách a v Sedloňově. U Chotěborek šlo o okraj smíšeného lesa s nepříliš zapojeným keřovým patrem. V Deštném jsem sbírala vzorky v lese a ostružinových keřích podél málo frekventované cesty. V Sedloňově jsem pasti umístila v zarostlém neudržovaném parku, který se svažoval dolů k řece, byl zde velký podíl buků a velké množství maliníků, ve kterých byla většina odchycených živočichů. Procento infikovaných jedinců je 42,9 % z Chotěborek a 40,0 % z Deštného.

Kraj Vysočina

Na Vysočině jsem hlodavce odchytila u Jimramova, Zajíčkova a v Babicích. Z Jimramova pocházejí vzorky z okraje smíšeného lesa, který lemovala řeka z jedné strany a vysoký svah z druhé strany. V Zajíčkově byly odchyty prováděny v lese s převahou listnáčů, hlodavci se chytali nejlépe v blízkosti hromad navezených větví. V Babicích byly pasti umístěny na okraji smíšeného lesa a v blízkosti pramene lesního potoka. Infikovaných jedinců z Jimramova bylo 25 % a ze Zajíčkova 61,5 %. V Babicích nebyl infikovaný žádný odchycený hlodavec.

Karlovarský kraj

Vzorky z Karlovarska mám od Jany Martinů z odchytů v oblasti Doupovských hor. Odchyty byly prováděny na zarostlých vlhkých loukách. V blízkosti byla cesta a smíšený les. Z vyšetřených vzorků 40,9 % obsahovalo kokcidie.

Jihočeský kraj

Odchyty v této oblasti prováděla Jana Kvičerová v Českých Budějovicích a v Boršově nad Vltavou. V Č. Budějovicích se jedná o lesík za sídlištěm Máj, s hustým travním podrostem a převahou jehličnanů. Pasti byly položeny do travního podrostu. V Boršově nad Vltavou byly odchyty prováděny v křovinatém ruderalu podél řeky Vltavy. Vzorky byly v 57,1 % *Eimeria* pozitivní.

Vzorky z mých odchytů pocházejí z Veselí nad Lužnicí a z Ktiše, na obou místech byla všechna vyšetření na kokcidie negativní. Ve Veselí byly pasti umístěny při okrajích pole, v blízkosti tůňky a ve smíšeném lese. Na Ktiši šlo o myšice odchycené na půdě domu.

Středočeský kraj

Vzorky z této oblasti mám od Jany Kvičerové z Polabí (okolí Poděbrad). Šlo o vlhké oblasti lužních lesů podél Labe, s velkým podílem dubů, buků a travního podrostu. Infikovaných hlodavců bylo 33,3 %.

Plzeňský kraj

Odchyty na Plzeňsku prováděla Jana Martinů, nejčastěji v oblastech podmáčených luk, nebo v křovinách podél cest. Nakažených jedinců bylo 29,4 %.

Ústecký kraj

Odchyty v této oblasti prováděla Jana Kvičerová v Solanech a v okolí Litvínova.

V Solanech se jednalo o vlhkou křovinatou oblast tvořící hranici mezi zemědělskou plochou (polem) a jehličnatým lesem. V blízkosti se nachází malý potok.

V okolí Litvínova byly odchyty prováděny v rámci každoročního monitoringu drobných savců ve stanovených kvadrátech (projekt F. Sedláčka a V. Bejčka). Pasti byly položeny do travního podrostu v zalesněné oblasti mezi obcemi Klíny a vodní nádrží Fláje.

Vzorek z Českosaského Švýcarska pochází od Václava Mikeše. Odchyt zvířat zde prováděl na základě platných povolení k odchytu v této oblasti. Jednalo se o oblast Pastýřské kameny, les s pískovcovými skalami.

Procento myšic *Eimeria* pozitivních bylo 23,3 %. Z této oblasti pochází také vzorek obsahující isosporu.

4. 1. 2. Zahraniční lokality

Slovensko

V Rozhanovcích (Košická kotlina) šlo o areál účelového zařízení pro chov zvěře patřící Univerzitě veterinárního lékařství v Košicích. Odchyty byly prováděny v oboře pro chov daňků a muflonů, kde dominoval dubohabrový les, v podrostu trnka, bez černý, kopřiva a ostružiník.

V Šebastovcích byli hlodavci odchyťováni v 3-4 řadovém topolovém větrolamu v agrocenóze, poblíž košického mezinárodního letiště. V podrostu se vyskytuje trnka, bez a ostružiník.

Dohromady z obou oblastí bylo zjištěno 13,4 % infikovaných hlodavců.

Anglie

Vzorky z Anglie pocházejí od Jana Štefky z roku 2008. Konkrétně se jedná o vlhký listnatý les v lokalitě Ashford (jihovýchodní Anglie). Množství infikovaných hlodavců tvoří 25 %.

4. 2. Parazitologické vyšetření odchycených hlodavců

Vyčesáním odchycených zvířat v terénu jsem zjistila přítomnost ektoparazitů (roztoci, klíšťata, vši, blechy). Vyšetřením trusu flotační metodou jsem detekovala přítomnost kokcií a vajíček helmintů. Prevalenci jsem vypočítala jako poměr počtu *Eimeria* pozitivních jedinců proti celkovému počtu odchycených hlodavců, převedený na procenta (viz Tab. 3).

Často byly diagnostikovány smíšené infekce (tj. infekce jednoho jedince několika druhy eimerií současně). Z celkového počtu 62 infikovaných jedinců mělo 43 nákazu jediným druhem kokcie, zatímco 19 jedinců (30,6 %) mělo smíšenou infekci. Vzorky obsahující smíšenou infekci nebyly použity pro molekulární analýzy.

lokality	hostitel	počet <i>Eimeria</i> pozitivních/celkový počet vyšetřených	prevalence kokcidií (%)	přítomnost ektoparazitů	přítomnost dalších endoparazitů
Veselí n. L.	<i>A. flavicollis</i>	0/1	0	-	-
	<i>M. glareolus</i>	0/2			
Babice	<i>A. flavicollis</i>	0/2	0	-	-
	<i>M. glareolus</i>	0/1			
Chotěborky	<i>A. flavicollis</i>	1/1	42,9	-	-
	<i>A. sylvaticus</i>	2/5			
	<i>M. glareolus</i>	0/1			
Deštné v O. h.	<i>A. flavicollis</i>	0/2	40,0	2x Anoplura (MA)	-
	<i>A. sylvaticus</i>	0/1			
	<i>M. glareolus</i>	1/1			
	<i>M. arvalis</i>	1/1			
Sedloňov	<i>A. flavicollis</i>	2/4	30,8	-	-
	<i>A. sylvaticus</i>	1/5			
	<i>M. glareolus</i>	1/3			
	<i>M. arvalis</i>	0/1			
Jimramov	<i>A. flavicollis</i>	1/2	25,0	-	-
	<i>M. glareolus</i>	0/2			
Zajíčkov	<i>A. flavicollis</i>	3/5	61,5	2x Anoplura (AF, AS)	-
	<i>A. sylvaticus</i>	5/6			
	<i>M. glareolus</i>	0/2			
Ktiš	<i>A. sylvaticus</i>	0/10	0	1 Anoplura (AS)	-
Doupov	<i>A. flavicollis</i>	9/17	40,9	-	Strongylidae (MG), Trichuridae (MG)
	<i>M. glareolus</i>	0/4			
	<i>Microtus</i> sp.	0/1			
Českobudějovicko	<i>A. flavicollis</i>	4/7	57,1	Anoplura (MG),	-

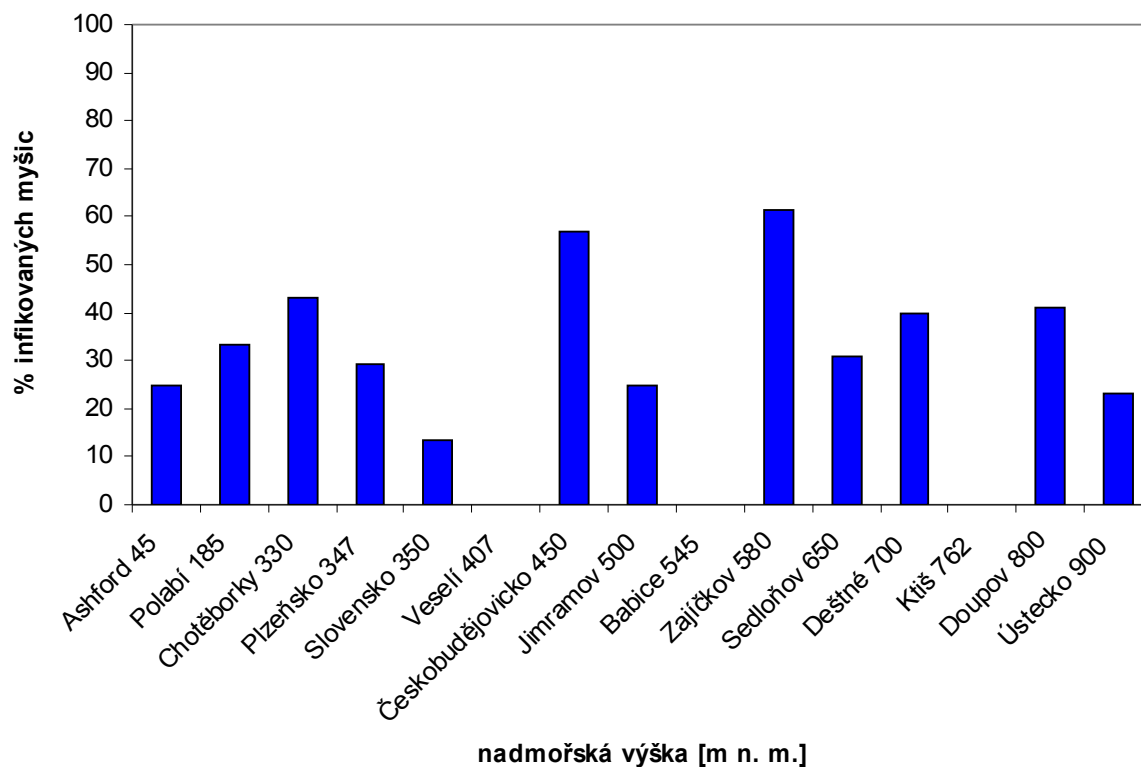
				Siphonaptera (AF), Mesostigmata (AF)	
Polabí	<i>A. flavicollis</i> <i>A. sylvaticus</i> <i>M. glareolus</i>	3/9 0/1 1/2	33,3	Anoplura (AF), Ixodida (AF), Mesostigmata (AF)	Strongylidae (AF)
Plzeňsko	<i>A. flavicollis</i> <i>M. glareolus</i> <i>Microtus</i> sp.	2/12 1/2 2/3	29,4	-	Strongylidae (AF)
Ústecko	<i>A. flavicollis</i> <i>A. sylvaticus</i> <i>M. glareolus</i> <i>M. arvalis</i>	14/53 0/4 2/14 1/2	23,3	Anoplura (MA), Siphonaptera (AF, MG), Mesostigmata (AF)	Trichuridae (AF, MG), Strongylidae (AF), <i>Isospora</i> (AF)
Anglie	<i>A. flavicollis</i> <i>A. sylvaticus</i>	0/3 2/5	25,0	Anoplura (AS), Mesostigmata (AS, AF)	-
Slovensko	<i>A. flavicollis</i> <i>A. agrarius</i> <i>A. microps</i> <i>M. arvalis</i>	1/9 8/27 0/9 0/22	13,4	Siphonaptera (AM, AA, MG, MA), Mesostigmata (MA, AA, AM, MG, AF)	-

Tab. 3: Vyšetřování hlodavci v jednotlivých lokalitách

(AA – *Apodemus agrarius*, AF – *A. flavicollis*, AM – *A. microps*, AS – *A. sylvaticus*, MG – *Myodes glareolus*, MA – *Microtus arvalis*, E – *Eimeria*)

4. 3. Závislost infekce myšic kokcidiemi na nadmořské výšce

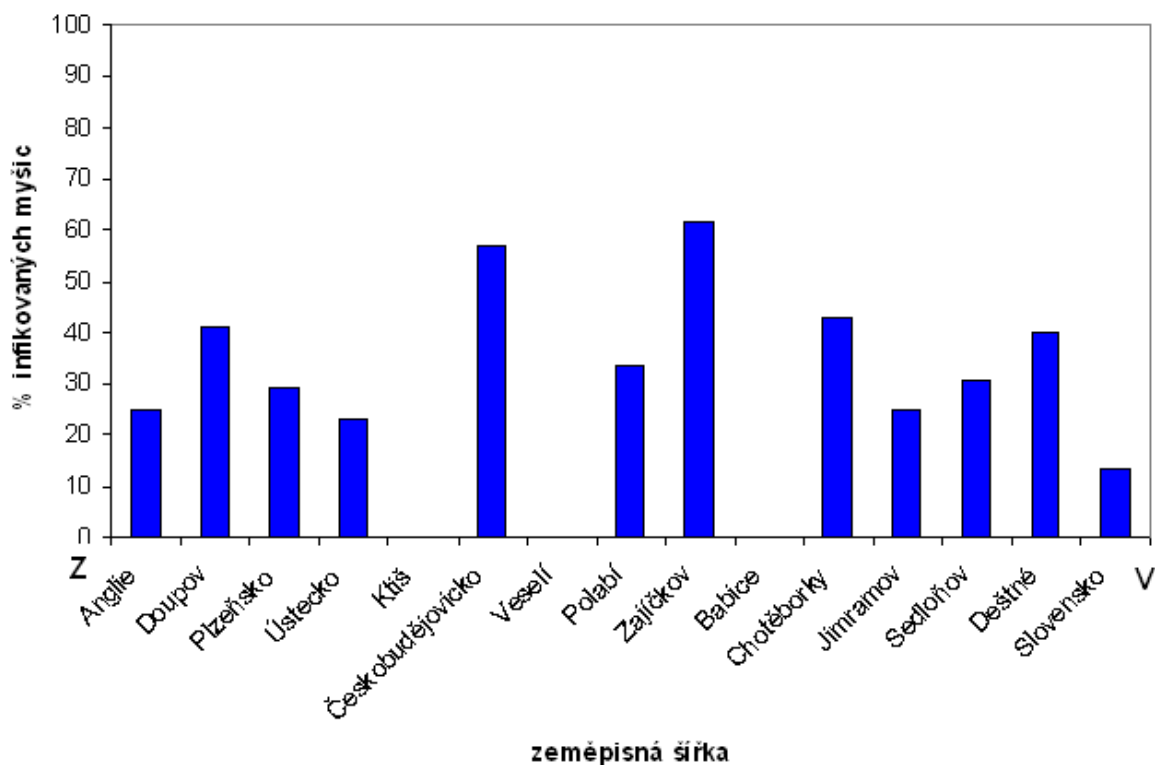
Množství hlodavců infikovaných kokcidiemi nevykazuje přímou korelaci s nadmořskou výškou (Obr. 6). Nejvyšší kokcidiové nákazy pocházely ze středních nadmořských výšek (přibližně 450 - 600 m n. m.). Z těchto oblastí se odchyľuje Veselí nad Lužnicí, Babice (nedostatečně reprezentativní vzorky) a Polabí.



Obr. 6: Závislost infekce myšic kokcidiemi na nadmořské výšce

4. 4. Závislost infekce myšic kokcidiemi na zeměpisné šířce

Zeměpisná šířka patrně nemá významný vliv na výskyt kokcidií (Obr. 7). Největší výskyt kokcidií byl zaznamenán v Zajíčkově na Pelhřimovsku, a na Budějovicku. Obě místa jsou ve vnitrozemí v relativní rovině, takže jsou chráněna před výraznějšími výkyvy podnebí.



Obr. 7: Závislost infekce myšic kokciemi na zeměpisné šířce

4. 5. Ostatní parazité prokázání v trusu odchycených hlodavců

Vyšetřením trusu flotační metodou a následnou mikroskopií jsem u některých vzorků zjistila též přítomnost zástupců nematod čeledí Trichuridae a Strongylidae (Tab. 3). Jednalo se obvykle o vajíčka, výjimečně se vyskytli i dospělci.

4. 6. Osekvenované kokcidie (gen pro COI 1)

Pro sekvenaci kokcií jsem použila vzorky trusu hlodavců odchycených na výše uvedených lokalitách (viz Tab. 3), ale i starší vzorky uchovávané v naší laboratoři. Proto jsou v této práci uvedeny sekvence i z jiných oblastí České republiky i Evropy (Tab. 4).

pracovní název vzorku	hostitel	datum odchytu	intenzita kokcidiové infekce	lokality
AF1	AF	13/8/07	E++	Solany (Ústecko)
AF2	AF	11/8/07	E++	Solany (Ústecko)
AF4	AF	25/6/07	E+++	Boršov n. Vlt. (Českobudějovicko)
AF4-VM	AF	26/5/07	E++	Pastýřské kameny (Ústecko)
AF11	AF	8/8/09	E++	Chotěborky (Královéhradecko)
AF12	AF	10/7/09	E++	Doupov (Karlovarsko)
AF36	AF	30/8/09	E++	Jimramov (Vysočina)
AF 21423	AF	2/12/08	E++	Rozhanovce (SR)
Isospora AF B13	AF	12/10/08	Iso ++	Litvínov (Ústecko)
AS 08-50	AS	25/7/08	E+++	Ashford (Anglie)
AS 08-53	AS	25/7/08	E+++	Ashford (Anglie)
AAGR 21617	AAGR	21/10/09	E++++	Šebastovce (SR)
AAGR 21649	AAGR	25/11/09	E++	Rozhanovce (SR)
AAGR 21650	AAGR	25/11/09	E+++	Rozhanovce (SR)
AAGR 21655	AAGR	25/11/09	E++++	Rozhanovce (SR)
AAGR 21657	AAGR	25/11/09	E+++	Rozhanovce (SR)

Tab. 4: Původ osekvenovaných kokcií

(AF - *Apodemus flavicollis*, AS - *A. sylvaticus*, AAGR - *A. agrarius*; E - *Eimeria*, Iso - *Isospora*)

4. 7. Sekvenace

Pro sekvenaci kokcií z myšic rodu *Apodemus* byl vybrán mitochondriální gen pro cytochromoxidázu c I. Tento gen prokázal dostatečnou variabilitu. Z výše uvedených kokcií (Tab. 4) jsem pomocí specifických primerů získala sekvence COI 1 o délce přibližně 800 bp, s průměrným GC obsahem 40 % (35-46 %).

4. 8. Fylogenetické analýzy

Fylogenetické analýzy byly provedeny pomocí metod MP (v programu PAUP) a ML (v programu PHYML).

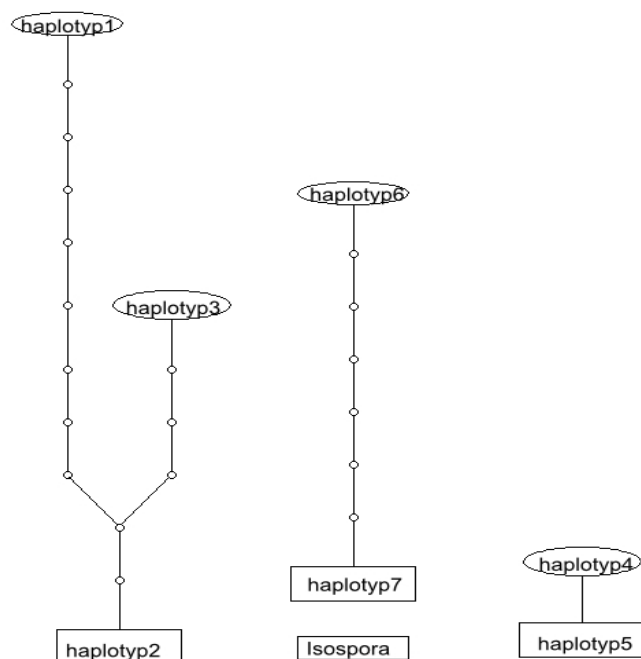
MP metodou bylo získáno 9 maximálně parsimoniálních stromů o délce 611 kroků.

Konzistenční index (c_i) tohoto kladogramu byl vysoký (0,7021), bootstrapy rovněž vykazovaly poměrně vysoké hodnoty (nad 50 %) (obr. 9).

Analýzami v programu PAUP byly eimerie z *Apodemus flavicollis* rozděleny do tří linií a eimerie z *A. agrarius* do dvou. Sekvence obou eimerií z myšic *A. sylvaticus* se rozdělily do dvou samostatných linií. ML analýzou programem PHYML bylo získáno shodné větvení stromu a rozdělení na jednotlivé linie (Obr. 10).

Analýzou programem TCS bylo zjištěno, že každá linie představuje jeden haplotyp (Obr. 8). Všech 15 získaných sekvencí z myšic rodu *Apodemus* se tedy rozdělilo do celkem 7 haplotypů; *Isospora* se vyčlenila zvlášť, jak bylo očekáváno.

Haplotypy 1 (kokcidie z *A. sylvaticus*), 2, 4 (z *A. flavicollis*), 3 a 5 (z *A. agrarius*) tvoří monofyletickou skupinu. Haplotypy 1-5 jsou si velmi blízké, o čemž svědčí i délky jednotlivých větví, haplotypy 1 a 3 jsou zřejmě dokonce odvozené z haplotypu 2 (Obr. 8). Haplotypy 6 (kokcidie z *A. sylvaticus*) a 7 (z *A. flavicollis*) tvoří oddělenou větev. Ačkoliv *A. agrarius* patří do jiného podrodu než ostatní myšice (Wilson and Reeder, 2005), tvoří s ostatními haplotypy bližší skupiny než oba vzorky z *A. sylvaticus* navzájem.

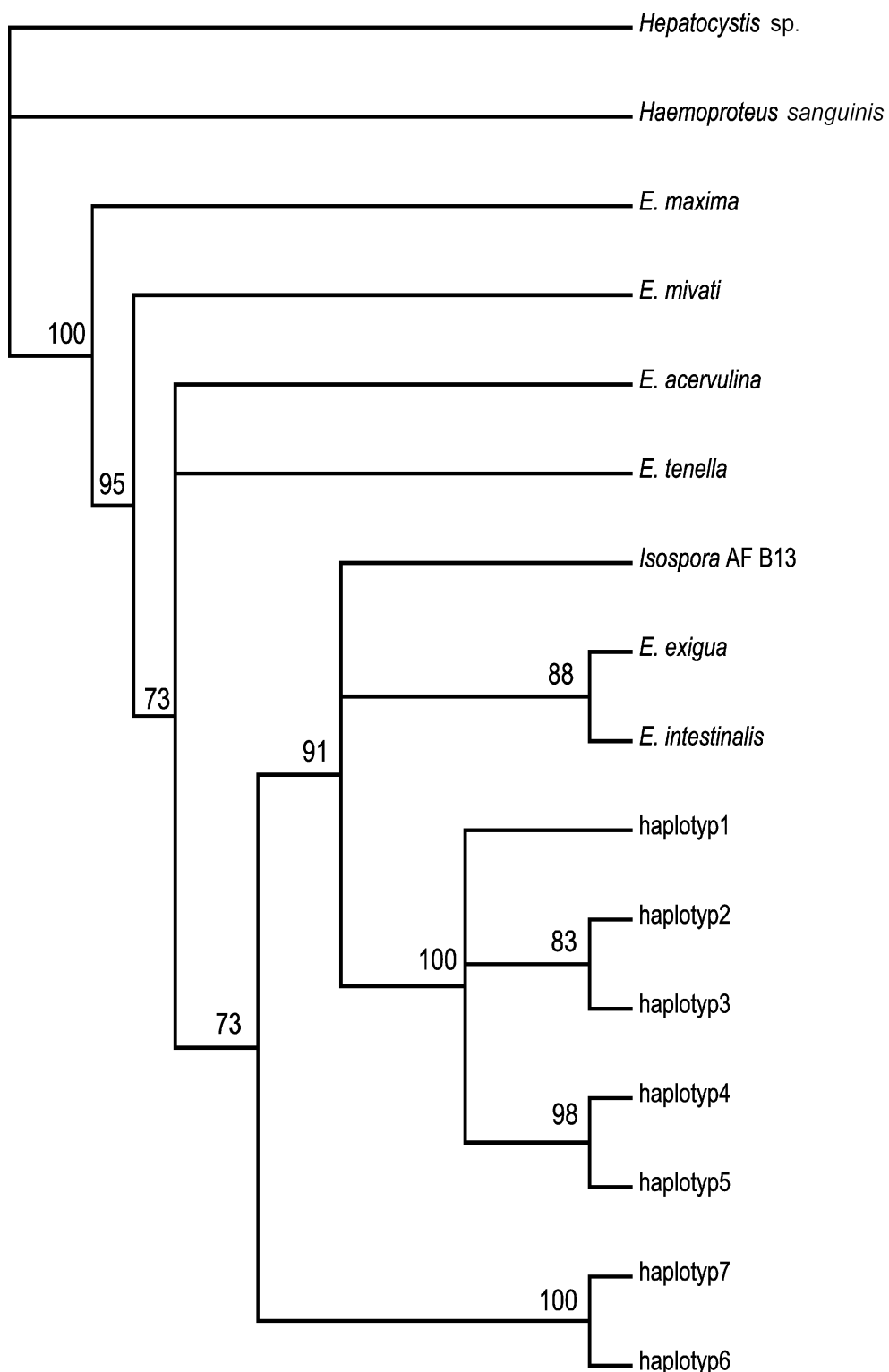


Obr.: 8: Rozdělení do haplotypů v programu TCS

Analýza v programu TCS rozdělila jednotlivé sekvence do 7 haplotypů (Tab. 5):

pracovní název	vzorky obsažené v daném haplotypu	lokality odchytu
haplotyp1	AS 08-53	Anglie
haplotyp2	AF4 AF4-VM AF 21423	Českobudějovicko Ústecko Slovensko
haplotyp3	AAGR 21655 AAGR 21650	Slovensko Slovensko
haplotyp4	AF1 AF11	Ústecko Královéhradecko
haplotyp5	AAGR 21649 AAGR 21617 AAGR 21657	Slovensko Slovensko Slovensko
haplotyp6	AS 08-50	Anglie
haplotyp7	AF12 AF2 AF36	Plzeňsko Ústecko Vysočina

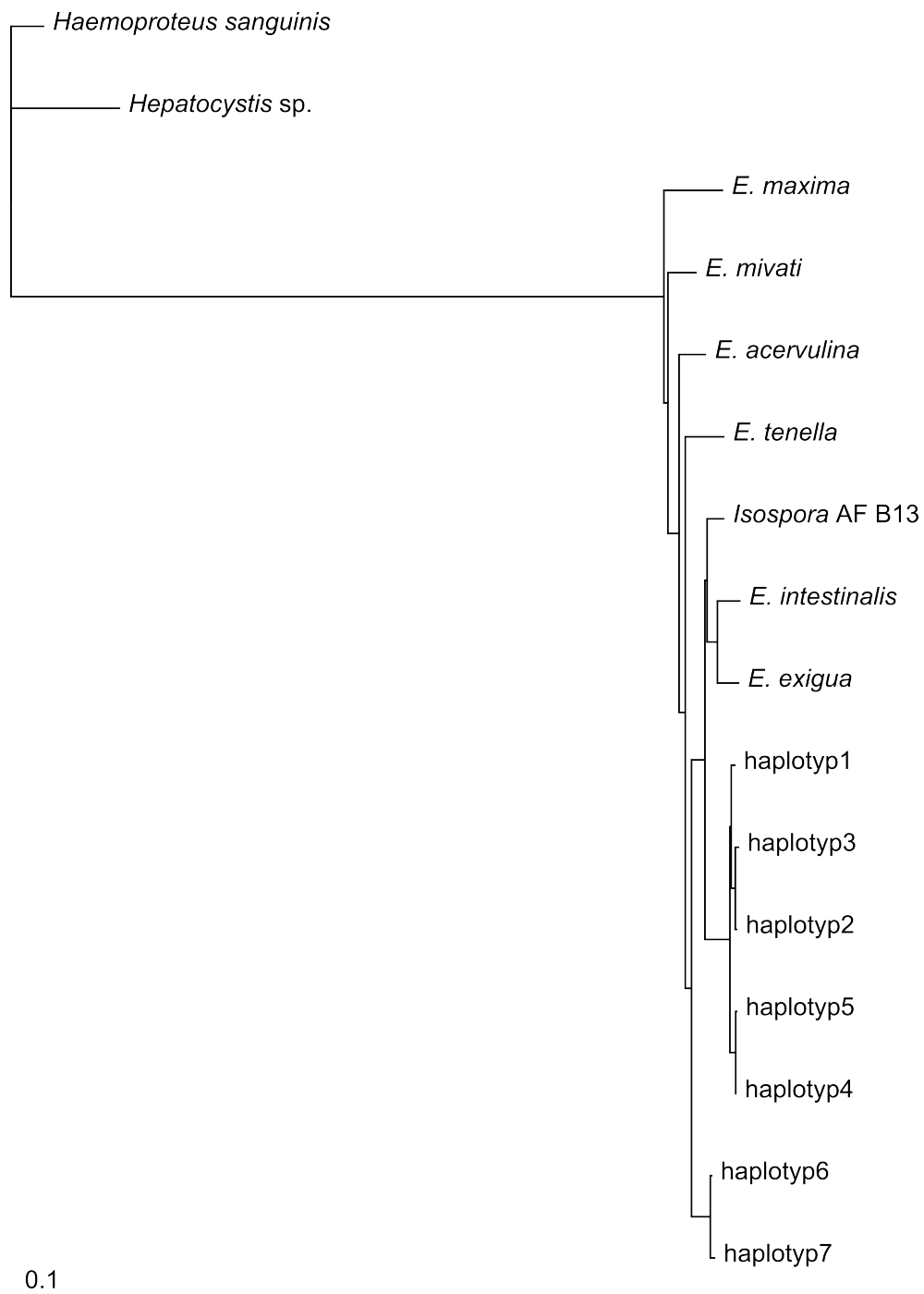
Tab. 5: Rozdělení sekvencí do haplotypů



Obr. 9: Strom získaný metodou Maximum parsimony (PAUP); strom znázorňuje konsensus 9 MP stromů.

Analýza sekvencí genu pro COI 1 o délce ~ 680 bp.

Outgroup *Hepatocystis* sp., bootstrap 1000 (hodnoty uvedeny u jednotlivých uzlů).



Obr. 10: Strom získaný metodou Maximum likelihood (Phyml v2.4.3). GTR + Γ + I model.

Analýza sekvencí genu pro COI 1 o délce ~ 680 bp.

ln= -3541.15655

5. Diskuze

5. 1. Druhy a počet odchycených hlodavců

Odchyty v České republice byly prováděny v oblastech výskytu všech čtyř druhů myšic. Všechny 4 druhy současně se vyskytují pouze v Podyjí a na Opavsku (Anděra and Beneš, 2002), odtud ale nepochází žádný vzorek. Z lokalit uvedených v této práci je největší překryv v oblasti Doupovských hor, kde se kromě *A. agrarius* vyskytují všechny ostatní myšice. Odchycen zde byl ale pouze *A. flavicollis*.

V ČR se nám zatím nepodařilo odchytit žádnou *A. microps*, zřejmě z důvodu její snadné zaměnitelnosti s *A. sylvaticus* a také kvůli jejím vyhraněným nárokům na stanoviště. O populacích myšice malooké v ČR existují pouze kusé informace, většina nálezů těchto myšic pochází z let 1950-1970. K dispozici jsou pouze morfologická data (utváření lebky a chrupu) (Anděra and Beneš, 2002).

Ve vzorcích z ČR také chybí *A. agrarius*, jejíž areál výskytu nemá stabilní hranice, a který se vyskytuje většinou v nížinách. Naopak nejčastěji zastoupen byl *A. flavicollis*. Tento druh má velmi širokou ekologickou valenci, a také bývá často zaměněn s podobným *A. sylvaticus*, se kterým obývá téměř většinu areálu výskytu. Jejich spolehlivé určení je možné pouze molekulárně pomocí diagnostické PCR (Michaux et al., 2005). Navíc se oba druhy nejspíš mohou vzájemně křížit.

Na Slovensku převažoval mezi odchycenými hlodavci *A. agrarius*. Na rozdíl od ČR je hojně zastoupen na území celého Slovenska. Druhým nejčastěji zastoupeným druhem myšice na Slovensku je *A. flavicollis*. Poměrně častý výskyt byl zaznamenán i u *A. microps*. Výskyt *A. sylvaticus* nebyl dosud v SR prokázán (Stanko, osobní sdělení).

5. 2. Infekce myšic kokcidiemi rodu *Eimeria* a *Isospora*

Z výsledků vyplývá, že kokcidie rodu *Eimeria* se u myšic vyskytují téměř na celém území republiky v hojném počtu. Na 3 lokalitách jsem nepotvrdila výskyt ani jedné - zřejmě nešlo o vhodné stanoviště. Jednalo se o Veselí nad Lužnicí a Babice, kde byli odchyceni shodně pouze 3 hlodavci, což nepředstavuje reprezentativní vzorek. Na Ktiši bylo vyšetřeno 10 myšic, kde absenci kokcidiové infekce lze vysvětlit tím, že se jednalo o izolovanou populaci odchycenou na půdě starého domu.

V lokalitách naší republiky, kde byla infekce kokcidiemi přítomná, dosahovala výše nad 20 % (na Slovensku 13,4 %). Průměrná míra infekce ze všech studovaných lokalit, na kterých byla infekce prokázána, je 35,5 %.

V dostupné literatuře je uváděna prevalence dost rozdílná. Hůrková et al. (2005) uvádí prevalenci 22,5 % (k čemuž jsou blízko má pozorování), Higgs and Nowell (1991) prevalenci až 73 % (z čehož 34 % tvořily smíšené infekce). Rozdíly mohou být dány charakterem lokalit, ročním obdobím, četností pozorování, ale zejména počtem odchycených a vyšetřených zvířat.

Při porovnávání prevalence kokcií v populacích hostitele nebyla pozorována zřejmá závislost mezi mírou infekce a vlivem zeměpisné šířky nebo nadmořské výšky (Obr. 6 a 7). Nejvyšší počet nakažených hlodavců (více než polovina) na oblast byl u obce Zajíčkov (okr. Pelhřimov). Zde byli hlodavci odchytáváni ve smíšeném lese, jehož převážnou část tvořily duby. Nejméně infikovaných jedinců (pomineme-li výše uvedené *Eimeria* negativní oblasti) bylo v Ústeckém kraji. Málo nakažených myšic bylo též u obce Jimramov (okr. Žďár nad Sázavou). Zde byly pasti umístěny poblíž řeky a mezi skalami. Byl zde často také vysoký podrost a velké rozdíly ve vlhkosti půdy. Počasí bylo chladnější a některé dny i přšelo. Takové podmínky mohou mít negativní vliv na infekčnost/životaschopnost oocyst, a také hlodavci nebývají tolik aktivní.

Kokcidie rodu *Isospora* se u myšic naopak vyskytují poměrně vzácně. Ze všech dosud vyšetřovaných vzorků byla zjištěna pouze v jediném, a to u *Apodemus flavicollis*. Jedná se pravděpodobně o první nález isospor u *A. flavicollis*, neboť jediná dosud popsána *Isospora* z myšice byla popsána z *A. sylvaticus* (Pellérdy, 1974).

Téměř třetina infikovaných vzorků (30,6 %) obsahovala infekci více druhů kokcií rodu *Eimeria* současně (tzv. smíšenou infekci), což je běžný jev v populacích volně žijících hlodavců. Jelikož diverzita parazitů je vyšší než diverzita hostitelů (Duszynski and Upton, 2001), bylo očekáváno větší procento smíšených nálezů. Vzorky obsahující smíšenou infekci jsem nepoužila pro izolaci DNA a následné molekulární studie, neboť by nebylo možné zjistit, který konkrétní druh se podařilo úspěšně osekvenovat.

5. 3. Fylogenetické analýzy

Fylogenetické studie kokcií (resp. kmene Apicomplexa) využívají v drtivé většině sekvence jaderného genu pro 18S rDNA (Eberhard et al., 1999; Franzen et al., 2000; Matsubayashi et al., 2005; Kvičerová et al., 2008; Jirků et al., 2009), méně častěji sekvence plastidového ORF 470 (Zhao and Duszynski, 2001). V této studii jsem se zaměřila na možnosti využití mitochondriálního genu pro COI 1. Jeho výhodou je jeho velikost (do 1000 bp) a poměrně velká variabilita i na

vnitrodruhové úrovni. Naopak nevýhodou je nízký počet volně dostupných sekvencí COI 1 kokcií v GenBank. Prokázala jsem, že tento gen je vhodným markerem, čím větší variabilitu vykazoval, tím byly v analýzách lépe podpořené větve.

Analýzou v programu TCS došlo k rozdělení 15 sekvencí COI 1 eimerií z myšic do 7 haplotypů (Obr. 8). Na základě výsledků daných analýz se zdá být každý haplotyp hostitelsky specifický. Použité množství sekvencí je však zatím velmi malé, proto výsledek není zcela signifikantní. Z tohoto důvodu je nejisté i rozdělení do 3 linií (Obr. 8), neboť chybějící sekvence mohou tvořit důležité uzly, případně pak může dojít i k propojení jednotlivých linií.

Savčí isospory jsou příbuznější čeledi Sarcocystidae (Franzen et al., 2000; Samarasinghe et al., 2008), proto se také dle očekávání *Isospora* z *A. flavicollis* vyčlenila zcela odděleně od ostatních haplotypů. Ve fylogenetických stromech je příbuznější králíčím kokciím než eimeriím z myšic rodu *Apodemus* (Obr. 9). Původní dataset (není součástí této práce) obsahoval i 2 sekvence COI 1 ptačích isospor (*I. hypoleucae* a *Isospora* iSAT1) z GenBank. Protože tyto sekvence byly velmi krátké (~ 250 bp) a vnášely do analýz zjevné artefakty, bylo nutné je z datasetu odstranit. Fylogenetické analýzy však oddělily isosporu z *A. flavicollis* i od těchto ptačích isospor.

Do analýzy byly přidány i 4 sekvence z drůbežích kokcií, které tvoří samostatné, fylogeneticky původnější linie.

Hepatocystis (spolu s *Haemoproteus*), jako zástupce jiné třídy (Aconoidasida), se osvědčil jako vhodný outgroup, dostatečně fylogeneticky vzdálený od analyzovaných skupin, jak ukazuje Obr. 10.

Výsledek analýz také ukazuje, že druh kokcie nelze primárně určovat na základě hostitelské specifity, protože kokcie ze stejných hostitelů mohou být od sebe fylogeneticky vzdálené, a naopak kokcie z různých hostitelů mohou být vysoce příbuzné či dokonce totožné druhy. Vhodnější metodou je určování podle morfologických znaků a molekulárními metodami.

Do budoucna proto plánuji rozšířit počet sekvencí COI 1 o další kokcie myšic odchycených v ČR i v zahraničí (zejména v oblastech překryvu areálů několika druhů) a výsledky obohatit i o kompletní morfologii vysporulovaných oocyst.

6. Závěr

V této práci byla sledována prevalence kokciidií u myšic rodu *Apodemus* v České republice, na Slovensku a v Anglii. Prevalence kokciidií celkově dosahovala přibližně 40 %, z toho třetina infikovaných jedinců byla nakažena několika druhy kokciidií současně.

Podarilo se mi získat 15 sekvencí COI 1 eimerií ze tří druhů myšic, které jsem analyzovala fylogenetickými metodami. Analýzy rozdělily těchto 15 sekvencí do 7 haplotypů, které tvoří 3 vzájemně oddělené linie. Byla osekvenována také *Isospora* sp., izolovaná z *A. flavicollis*. Ve fylogenetických stromech se jasně vyčlenila odděleně od hlodavčích kokciidií, prozatím do blízkosti druhů pocházejících z králíka. Protože získané množství sekvencí je zatím příliš malé, nelze tyto výsledky považovat za konečné.

V rámci zamýšleného magisterského studia proto plánuji rozšířit sběry a analýzy o další kokcidie z myšic z různých oblastí Evropy, a získané výsledky obohatit i o morfologické a morfometrické analýzy vysporulovaných oocyst.

7. Použitá literatura

- Anděra M., Beneš B., 2002: Atlas rozšíření savců v České republice – Předběžná verze. IV. Hlodavci (*Rodentia*) - část 2. Myšovití (*Muridae*), myšivkovití (*Zapodidae*). Národní muzeum, Praha.
- Anděra M., Horáček I., 2005: Poznáváme naše savce. 2. vydání. Sobotáles, Praha.
- Barta J. R., Jenkins M. C., Danforth H. D., 1991: Evolutionary Relationships of Avian *Eimeria* Species among Other Apicomplexan Protozoa: Monophyly of the Apicomplexa Is Supported. *Mol. Biol. Evol.* 8, pp. 345-355.
- Barta J. R., Martin D. S., Liberator P. A., Dashkevicz M., Anderson J. W., Feighner S. D., Elbrecht A., Perkins-Barrow A., Jenkins M. C., Danforth H. D., Ruff M. D., Profous-Juchelka H., 1997: Phylogenetic Relationships among Eight *Eimeria* Species Infecting Domestic Fowl Inferred Using Complete Small Subunit Ribosomal DNA Sequences. *J. Parasitol.* 83, pp. 262-271.
- Carreno R. A., Schnitzler B. E., Jeffries A. C., Tenter A. M., Johnson A. M., Barta J. R., 1998: Phylogenetic analysis of coccidia based on 18S rDNA sequence comparison indicates that *Isoospora* is most closely related to *Toxoplasma* and *Neospora*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, pp. 184-188.
- Chroust K., Lukešová D., Modrý D., Svobodová V., 1998: Veterinární protozoologie. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno. Skripta.
- Clement M., Posada D., Crandall K. A., 2000: TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9, pp. 1657-1659.
- Dungel J., 1993: Savci střední Evropy. Jota, Brno.
- Duszynski D. W., Upton S. J., 2001: *Cyclospora*, *Eimeria*, *Isoospora*, and *Cryptosporidium* spp. In: Samuel W. M., Pybus M. J., Kocan A. A. (Eds.): Parasitic Diseases of Wild Mammals, 2nd Edition. Iowa State Press, Iowa City, pp. 416-433.
- Duszynski D. W., Wilber P. G., 1997: A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *J. Parasitol.* 83, pp. 333-336.
- Eberhard M. L., da Silva A. J., Lilley B. G., Pieniazek N. J., 1999: Morphologic and Molecular Characterization of New *Cyclospora* Species from Ethiopian Monkeys: *C. cercopithecii* sp.n., *C. colobi* sp.n., and *C. papionis* sp.n. *Emerg. Infect. Dis.* 5, pp. 651-658.

- 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. *Parasitol. Res.* 86, pp. 669-676.
- Gardner S. L., Duszynski D. W., 1990: Polymorphism of Eimerian oocysts can be a problem in naturally infected hosts: An example from subterranean rodents in Bolivia. *J. Parasitol.* 76, pp. 805-811.
- Guindon S., Gascuel O., 2003: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, pp. 696-704.
- Hall T. A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, pp. 95-98.
- Hausmann K., Hülsmann N., 2003: *Protozoologie*. Academia, Praha.
- Higgs S., Nowell F., 1991: A review of the species of *Eimeria* infecting hosts in the genus *Apodemus*. *Syst. Parasitol.* 20, pp. 203-209.
- Hirota T., Hirohata T., Mashima H., Satoh T., Obara Y., 2004: Population structure of large Japanese field mouse, *Apodemus speciosus* (Rodentia: Muridae), in suburban landscape, based on mitochondrial D-loop sequences. *Mol. Ecol.* 13, pp. 3275-3282.
- Hůrková L., Baker M. A., Jirků M., Modrý D., 2005: Two new species of *Eimeria* Schneider 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the broad-toothed field mouse, *Apodemus mystacinus* Danford and Alston 1877 (Rodentia: Muridae) from Jordan. *Parasitol. Res.* 97, pp. 33-40.
- Jirků M., Jirků M., Oborník M., Lukeš J., Modrý D., 2009: *Goussia* Labbé, 1896 (Apicomplexa, Eimeriorina) in Amphibia: diversity, biology, molecular phylogeny and comments on the status of the genus. *Protist* 160, pp. 123-136.
- Jirků M., Modrý D., Šlapeta J. R., Koudela B., Lukeš J., 2002: The Phylogeny of *Goussia* and *Choleoeimeria* (Apicomplexa; Eimeriorina) and the Evolution of Excystation Structures in Coccidia. *Protist* 153, pp. 379-390.
- Joyner L. P., 1982: Host and site specificity. In: Long P. L. (Ed.): *The biology of the coccidia*. University Park Press, Baltimore, pp. 35-62.
- Keeling P. J., Burger G., Durnford D. G., Lang B. F., Lee R. W., Pearlman R. E., Roger A. J., Gray M. W., 2005: The tree of eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* 20, pp. 670-676.
- Kvičerová J., Pakandl M., Hypša V., 2008: Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology* 135, pp. 443-452.

- Lainson R., 2002: Intestinal coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) of Brazilian lizards. *Eimeria carmelinoi* n.sp., from *Kentropyx calcarata* and *Acroeimeria paraensis* n.sp. from *Cnemidophorus lemniscatus lemniscatus* (Lacertlia: Teiidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97, pp. 227-237.
- Lainson R., Da Silva F. M., Franco C. M., De Souza M. C., 2008: New species of *Eimeria* and *Isospora* (Protozoa: Eimeriidae) in *Geochelone* spp. (Chelonia: Testudinidae) from Amazonian Brazil. Parasite 15, pp. 531-538.
- Levine N. D., Ivens V., 1965: The coccidian parasites (Protozoa, Sporozoa) of rodents. Illinois Biological Monographs. The University of Illinois Press, Urbana, pp. 1-365.
- Lewis D. C., Ball S. J., 1983: Species of *Eimeria* of small wild rodents from the British Isles, with descriptions of two new species. Syst. Parasitol. 5, pp. 259-270.
- Long P. L., Joyner L. P., 1984: Problems in the Identification of Species of *Eimeria*. J. Protozool. 31, pp. 535-541.
- 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. Parasitol. Res. 97, pp. 80-83.
- Michaux J. R., Chevret P., Filippucci M. G., Macholan M., 2002: Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis on the subgenus *Sylvaemus* using nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: cytochrome *b* and 12S rRNA. Mol. Phylogenet. Evol. 23, pp. 123-136.
- Michaux J. R., Libois R., Filippucci M. G., 2005: So close and so different: comparative phylogeography of two small mammal species, the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) and the woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the Western Palearctic region. Heredity 94, pp. 52-63.
- Morrison D. A., Bornstein S., Thebo P., Wernery U., Kinne J., Mattson J. G., 2004: The current status of the small subunit rRNA phylogeny of coccidia (Sporozoa). Int. J. Parasitol. 34, pp. 501-514.
- Page R. D. M., 1996: TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput. Appl. Biosci. 12, pp. 357-358.
- Parker B. B., Duszynski D. W., 1986: Polymorphism of Eimerian Oocysts: A Dilemma Posed by Working with Some Naturally Infected Hosts. J. Parasitol. 72, pp. 602-604.
- Pellérdy L., 1974: Coccidia and coccidiosis. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- Perkins F. O., Barta J. R., Clopton R. E., Peirce M. A., Upton S. J., 2000: Phylum Apicomplexa; family Eimeriidae. In: Lee J. J., Leedale G. F., Bradbury P. (Eds.):

- The Illustrated Guide to the Protozoa. 2nd edition. Allen Press Inc., Lawrence, Kansas, pp. 326-332.
- Samarasinghe B., Johnson J., Ryan U., 2008: Phylogenetic analysis of *Cystoisospora* species at the rRNA ITS1 locus and development of a PCR-RFLP assay. *Exp. Parasitol.* 118, pp. 592-595.
- Sambrook J., Russell D. W., 2001: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Volume 1. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 6.9 - 6.11.
- Schrenzel M. D., Maalouf G. A., Gaffney P. M., Tokarz D., Keener L. L., McClure D., Griffey S., McAloose D., Rideout B. A., 2005: Molecular characterization of isosporoid coccidia (*Isospora* and *Atoxoplasma* spp.) in passerine birds. *J. Parasitol.* 91, pp. 635-647.
- Swofford D. L., 2002: „Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4.“ Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Štefka J., Hypša V., 2008: Host specificity and genealogy of the louse *Polyplax serrata* on field mice, *Apodemus* species: a case of duplication or colonisation? *Int. J. Parasitol.* 38, pp. 731-741.
- Thienpont D., Rochette F., Vanparijs O. F. J., 1979: Diagnosing Helminthiasis Through Coprological Examination. Janssen Research Foundation, Beerse, Belgium, pp. 25-34.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J., 1994: CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, pp. 4673-4680.
- Upton S. J., McAllister C. T., Brillhart D. B., Duszynski D. W., Walsh C. D., 1992: Cross-transmission studies with *Eimeria arizonensis*-like oocysts (Apicomplexa) in New World rodents of the genera *Baiomys*, *Neotoma*, *Onychomys*, *Peromyscus*, and *Reithrodontomys* (Muridae). *J. Parasitol.* 78, pp. 406-413.
- Wilson D. E., Reeder D. M., 2005: *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Vol. 2. The John Hopkins University Press, Baltimore.
- Zajac A. M., Conboy G. A., 2006: *Veterinary Clinical Parasitology*. Blackwell Publishing, Iowa, USA, pp. 3-8.
- Zhao X., Duszynski D. W., 2001: Phylogenetic relationships among rodent *Eimeria* species determined by plastid ORF470 and nuclear 18S rDNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 31, pp. 715-719.

8. Internetové zdroje

URL 1: <http://biology.unm.edu/biology/coccidia/rodents.html>

Duszynski D. W., Upton S. J., Couch L., 1998

URL 2: <http://biology.unm.edu/biology/coccidia/list.html>

Duszynski D. W., Upton S. J., Couch L., 1998

URL 3: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

URL 4: <https://products.appliedbiosystems.com>