

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a ochrany životního prostředí



Vztah mezi krev-sajícími koutulemi (rodu *Sycorax*) a ropuchami
(rodu *Ansonia*) v prostředí tropického deštného pralesa na Borneu

Elen Herzogová

Bakalářská práce

předložená

na Katedře ekologie a ochrany životního prostředí
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků
na získání titulu Bc. v oboru
Ekologie a ochrana životního prostředí

Vedoucí práce: Mgr. Zdeněk Mačát

Olomouc 2018

Herzogová. 2018. Vztah mezi krev sajícími koutulemi (rodu *Sycorax*) a ropuchami (rodu *Ansonina*) v prostředí tropického deštného pralesa na Borneu. [bakalářská práce]. Olomouc: Katedra ekologie a ŽP PřF UP v Olomouci. 27 s. Česky

Abstrakt

Práce se zabývá ektoparazitickým vztahem mezi krev-sajícími koutulemi r. *Sycorax* a ropuchami r. *Ansonia*. První část práce obsahuje literární rešerši, která se zabývá obojživelníky a jejich bezobratlými parazity, především způsobu vyhledávání a lokalizace hostitele. Přestože je vztah mezi výše uvedenými druhy popsán pouze na základě pozorování, jsou v práci diskutovány možné podrobnosti ze vztahu mezi koutulemi a žábami. V praktické části byla provedena analýza mitochondriální DNA z žabí krve obsažené v těle koutulí odebraných na Borneu. V rámci analýz se nepodařilo amplifikovat kvalitní DNA z krve získané z těla ektoparazitujících koutulí a tak nebylo možné provést srovnání se získanou žabí DNA a tedy potvrdit přímo pozorované parazitování.

Klíčová slova: parazitismus, krev-sající mouchy, obojživelníci, *Sycorax*, *Ansonia*, Borneo, mDNA

Herzogová E. 2018. Relationship between blood-sucking flies (genus *Sycorax*) and toads (genus *Ansonia*) in lowland tropical rain forest in Borneo [bachelor's thesis]. Olomouc: Department of Ecology and Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky University of Olomouc. 27 pp. Czech.

Abstract

The thesis deals with ectoparasite relationship between blood-sucking flies (genus *Sycorax*) and toads (genus *Ansonia*). The first part follows up with the theoretical background as amphibians and their invertebrate parasites and way of locating and searching the host. Although the relationship between the above species is described only by observation, we discussed possible particulars of this relationship. In practical part we analysed mitochondrial DNA of blood, which was found in body of blood-sucking flies. We could not directly confirm this parasitic relationship due to lack of high quality blood in flies body.

Key words: parasitism, blood-sucking flies, amphibians, *Sycorax*, *Ansonina*, Borneo, mDNA

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením pana Mgr. Zdeňka Mačáta a že jsem použila jen citované literární prameny.

V Olomouci dne 3. 5. 2018

.....

Obsah

Seznam obrázků	vii
Poděkování.....	viii
1. Úvod.....	1
2. Cíle.....	2
3. Literární přehled	3
3.1. Parazitismus.....	3
3.1.1. Predátoři a parazité žab	4
3.1.2. Endoparazité žab	5
3.1.3. Ektoparazité žab.....	5
3.1.4. Diptera jako parazité žab	6
3.1.5. Vektory trypanozomy.....	7
3.2. Způsoby lokalizace obojživelníků u krev-sajících much	7
3.2.1. Vnímání zvuku.....	8
3.2.2. Akustická lokalizace	9
3.3. Rod Ansonia	11
3.4. Rod Sycorax.....	13
3.5. Metody analýzy DNA	14
3.5.1. Izolace DNA.....	14
3.5.2. Polymerázová řetězová reakce	14
3.5.3. Elektroforéza	16
3.5.4. Sekvenování	16
3.5.5. Program BLAST.....	17
4. Metodika a materiály	18
4.1. Metodika sběru vzorků.....	18
4.2. Metodika analýzy DNA.....	18
5. Výsledky a diskuse	20
6. Závěr	22
7. Literatura.....	23

Seznam obrázků

OBRÁZEK 1 - DRUH ANSONIA LONGIDIGITA Z NP ULU TEMBURONG, BRUNEJ	12
OBRÁZEK 2 DRUH ANSONIA LONGIDIGITA S DRUHEM KOUTULE SYCORAX KONOPIKI Z NP ULU TEMBURONG, BRUNEJ	14
OBRÁZEK 3 VÝSLEDEK PCR, ILUSTRÁČNÍ OBRÁZEK	16

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Zdeňku Mačátovi za odborné vedení mé práce, především za trpělivost a za čas, který mi věnoval. Dále mé poděkování patří Dr. Danielu Jablonskimu z Komesnkého Univerzity v Bratislavě za vedení při práci v laboratoři, za poskytování množství informací a konzultace. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Mgr. Evě Boháčkové za podnětné připomínky a nápady k mé práci.

1. Úvod

Borneo je známé svým přírodním bohatstvím. Nachází se zde celá řada endemitů, nově popsanych druhů a také druhy, které na popsání stále čekají. Nížinný tropický prales poskytuje díky svému klimatu obrovskou škálu podmínek pro široké spektrum fauny a flóry. Především kombinací tepla a vlhka se stává tropický prales právě pro žáby vhodným biotopem. Nachází se zde ale také velké množství jejich predátorů a parazitů, kteří na ně vyvíjejí tlak.

Pro dobré pochopení ekosystému není důležité znát pouze jednotlivé druhy, ale také vztahy mezi nimi a vztahy mezi organismy a neživým prostředím. Například predace a parazitismus jsou biotické procesy, které mají významný vliv na ekologická společenství. Znalost těchto vztahů je zásadní pro zodpovězení otázek v oblasti ekologie a evoluce (Gambale et al. 2014).

Parazitování bezobratlých na obojživelnících je relativně častý úkaz mezi volně žijícími druhy. Samotné poznatky o principech a průběhu těchto vztahů jsou však známy poměrně roztráštěně. Některým skupinám (např. krevní parazité) byla věnována značná pozornost. Avšak většina skupin zůstává v oblasti teoretických znalostí. Bakalářská práce se pokouší poodhalit část vztahu mezi bornejskými ropuchami rodu *Ansonia* a na nich parazitujícími koutulí z rodu *Sycorax*.

2. Cíle

Bakalářská práce má dva hlavní cíle. Prvním byla literární rešerše dosavadních poznatků o parazitismu obecně, dále o vztahu mezi obojživelníky a bezobratlými ektoparazity a v neposlední řadě hlubší revize literatury zabývající se parazitismem mezi dvoukřídłym hmyzem (Diptera) a žábami.

Druhý cíl byl stanoven jako pokusně výzkumný. V rámci cest na Borneo bylo v deštných nížinných lesích sebráno několik jedinců krev sajících much z ropuchy dlouhoprsté (*Ansonia longidigita*) a mezi tímto sebraným materiálem byly identifikovány jedinci s pravděpodobným krevním obsahem v trávicí soustavě. Tito jedinci byli podrobeni analýze mitochondriální DNA, aby byl prokázán přímý parazitický vztah koutulí a žab.

3. Literární přehled

3.1. Parazitismus

Jedním z nejsložitějších vztahů mezi organismy je parazitismus. V přírodě se jedná o velmi rozšířený biologický jev, který pomáhá udržovat ekologickou rovnováhu (Ryšavý 1989). Parazit je organismus, který získává živiny od jednoho, nebo velmi malého počtu hostitelů. Nezpůsobuje jim bezprostředně smrt, ale obvykle dochází k určitému poškození hostitele, čímž se tento vztah liší od komensalismu, při kterém má spolu žijící organismus prospěch, ale hostitel není v zásadě ovlivněn (Begon et al. 1997). Parazit žije na úkor jiného živočicha a je s ním svým životním cyklem po delší nebo kratší dobu těsně svázán (Ryšavý 1989). Působí mu přitom škodu například snížením růstové rychlosti hostitele nebo jeho populací (Begon et al. 1997). Hostitel si během společného vývoje vyvinul způsoby obrany, příkladem je imunitní systém, kterým se snaží parazitovi vyhnout, odstranit ho nebo parazita tolerovat, zatímco parazit přichází s novými způsoby nalezení a využití hostitele (Poulin 1995). Z hlediska životní strategie můžeme parazity dělit na mikroparazity, kteří se rozmnožují přímo v těle hostitele, kam řadíme hlavně bakterie, viry, houby a prvoky (např. *Trypanosoma*; Begon et al. 2007) a na makroparazity. Ti, na rozdíl od mikroparazitů, nezvyšují svůj počet v hostiteli, ale produkují infekční stádia, která se přenášejí na další hostitele (Volf & Horák 2007). Mezi makroparazity patří například cizopasní hlísti, tasemnice nebo krevnička (Begon et al. 1997).

Parazity také můžeme dělit na základě vztahu k hostiteli. Jednou skupinou jsou fakultativní parazité, kteří žijí obvykle volně, ale za určitých podmínek se mohou chovat jako praví parazité. Jedná se pravděpodobně o mezistupeň při vzniku cizopasnictví. Druhou skupinou jsou obligátní parazité. V tomto případě není parazit schopen bez svého hostitele přežít nebo se množit a určitou část života musí bezpodmínečně žít jako parazit, aby mohl dokončit svůj vývoj (Volf & Horák 2007). Podle lokalizace parazitů na hostiteli dělíme parazity na endoparazity a ektoparazity. Ektoparazité žijí na povrchu těla hostitele nebo na jeho povrchových orgánech. Endoparazité žijí uvnitř těla hostitele (Ryšavý 1989). U permanentních ektoparazitů dochází k dlouhodobému využití hostitele, čímž se liší od ektoparazitů dočasných, kteří vyhledávají nového hostitele několikrát za život (Volf & Horák 2007).

Přítomnost parazita má bezesporu vliv na fitness hostitele. Ačkoli se projev zdát být nepatrným, v důsledku může poškodit růst a reprodukci hostitele (Polak 1998). V některých případech ovlivňuje parazit hostitele přímo, neletálním způsobem, tím, že mění jeho chování (Gambale et al. 2014). Parazitickému způsobu života se přizpůsobily organizmy na všech úrovních, od virů přes bakterie až po mnohobuněčné organizmy (Volf & Horák 2007). Paraziti ovlivňují dynamiku populace hostitele a tok živin v ekosystému, mění konkurenci mezi jednotlivými druhy a jsou významným činitelem biodiverzity (Hudson 2006).

3.1.1. Predátoři a parazité žab

Za predátory obojživelníků jsou považovány tisíce druhů bezobratlých (Wells 2007). Mezi nejvýznamnější predátory však patří pijavice, krabi, raci, krabovci (Formanowicz et al. 1981), larvy chrostíků a vážek, larvy a dospělí jedinci vodních brouků, několik druhů much (Wells 2007) a pavouci (Hayes 1983). Případy predace volně žijících ploštěnců, larev komárů, vos, kudlanek nebo cvrčků nejsou příliš časté, dopad na obojživelníky je přesto významný. Téměř žádný z těchto bezobratlých, který se živí na obojživelnících, není potravním specialistou, většina druhů jsou potravní generalisté a typ potravy mění podle dostupnosti zdrojů. Největší podíl predace není ovšem na dospělých jedincích, ale na vajíčkách a pulcích žab. V mnoha dočasných tůňích, kde se nevyskytují ryby, jsou bezobratlí nejvýznamnější predátory vajíček a pulců obojživelníků obecně. Množství bezobratlých přítomných v konkrétní tůni může být jeden z nejdůležitějších determinantů struktury a dynamiky populace obojživelníků (Wells 2007). Některé druhy obojživelníků nekladou vajíčka přímo do vody, ale kladou je například do pěny na vodě, na převislé listy nad hladinou nebo do vlhké země. Snižuje se tak možnost predace vodními živočichy, na druhou stranu jsou vajíčka vystavena jiným predátorům, jako jsou pavouci, krabi, střevlíkovití brouci, cvrčci nebo vosy (Hayes 1983). Počet predovaných mladých jedinců je sice nižší než počet predovaných pulců a vajíček, přesto může mít významný vliv na populaci (Wells 2007). Zajímavým rysem při predaci bezobratlých na obojživelnících je vytvoření různých trofických smyček, kdy obojživelník může být kořistí (hostitelem) i predátorem daného bezobratlého druhu (Polis & Myer 1985).

Parazitičtí potravní generalisté mají významný až dramatický vliv na strukturu společenstva. Mohou mezi druhy přenášet nejruznější onemocnění, jejichž dopad na

druhy může být výrazně odlišný. Zvláště náchylné na podlehnutí jsou citlivější druhy, které se těmto patogenům neumí bránit. Na druhou stranu, specializovaní parazité mohou přispět k navýšení biodiverzity (Hudson 2006).

3.1.2. Endoparazité žab

Mezi vnitřní parazity obojživelníků řadíme mnoho druhů prvoků, zejména trypanosomy, a některé parazitické červy (Wells 2007). Jedná se například o tasemnice, škrkavky, hlístice, které infikují plíce a viscerální orgány, různé druhy žábrohlistů a motolic, které napadají plíce, svalovinu, močový měchýř a trávicí ústrojí (Tinesly & Earle 1983). Mezi nejpočetnější skupinu živočichů patří členovci, není proto divu, že mnozí přešli na parazitický způsob života. Životu uvnitř těla hostitele se dokázal přizpůsobit jen malý počet druhů, mezi které řadíme některé druhy roztočů, jazyčnatky a larvy některých much, které parazitují na obojživelnících v různých stadiích vývoje (Wells 2007).

3.1.3. Ektoparazité žab

Vztahy predátor/parazit a kořist/hostitel mohou být složitější a navzájem se prolínat. Jako příklad můžeme uvést severoamerickou pijavici *Macrobdella decora* Say, 1824, která je zároveň parazitem i predátorem pulců některých skokanů. Dále pijavice *Desserobdella picta* (Verrill, 1872) je známá jako parazit ropuchy americké a zároveň je i predátorem jejich pulců. Zajímavé je také, že tato pijavice se velmi výrazně specializuje pouze na ropuchu americkou a to i v přítomnosti jiných druhů (Blais 2016). Také o pijavicích podtřídy Hirudinea je známé, že se živí krví žab, ale tento způsob potravní strategie se může měnit s ohledem na reprodukční cykly hostitele, kdy i pulci žab jsou pro pijavice přijatelným zdrojem potravy. Některé pijavice z čeledi Glossiphoniidae často napadají rozmnožující se obojživelníky, kteří žijí v blátivých lesních tůních. Tyto druhy pijavic mohou dospělého jedince žáby zabít, nebo mohou mít významný vliv na fitness jedince (Blais 2016). Přestože mnoho skupin pijavic jsou typickými ektoparazity, některé druhy mohou žít v těle obojživelníků také jako endoparazité (Wells 2007).

Mezi ektoparazity dále řadíme klíšťata (Anthony et al. 1994) nebo parazitické klanonožce. Larvy masařek, bzučivek a zelenuškovitých much parazitují na dospělých žabách, z nichž o několika druzích můžeme hovořit jako o obligátních parazitech.

Některé druhy bezobratlých využívají obojživelníky k tomu, aby byli přeneseni mezi jednotlivými vodními útvary. Jedná se například o lasturnatky nebo o některé druhy škeblí. Není ovšem zcela jasné, jestli se jedná o ektoparazitismus nebo spíše o komenzalismus, jelikož dopad na obojživelníky nebyl protazím zkoumán (Wells 2007).

3.1.4. Diptera jako parazité žab

Dalšími ektoparazity obojživelníků jsou komáři a krev-sající mušky (Wells 2007). Významným je rod *Corethrella*, zahrnující asi 107 druhů, které se vyskytují v tropických a subtropických regionech (Caldar et al. 2016). Samičky se živí krví, a podobně jako pro samičky komárů je tato potrava nezbytná pro produkci vajíček. (Bernal et al. 2006). V práci Grafe et al. (2008) uvádí například druh *Corethrella edwardsi*, který je velmi hojný v Panamě. Na Borneu bylo odchyceno přes 11 druhů *Corethrell*, které sály na různých druzích žab, mezi které patřily i *Ansoina leptopus* a *A. longidigita* (Grafe et al. 2008).

Skupiny much, například bzučivkovití, masařkovití, mouchovití nebo zelenuškovití produkují myiázy. Jedná se o invazivní larvy v tkáních obratlovců, a tyto larvy jsou pro žáby letální. Parazitující mouchy mohou být tedy významným zdrojem mortality v populaci žab. Například moucha z čeledi kuklicovitých, *Lucilia bufonivora* Moniez, 1876, je schopná zamořit populace ropuchy krátkonohe či jiných druhů žab, a způsobit mortalitu podstatné části populace. Dvě studie se zabývaly vlivem přítomnosti hlístic v plicích čerstvě přeměněných žab, konkrétně u ropuchy obecné a skokana lesního. Výsledky sice neukázaly žádný signifikantní dopad hlístic na mladé jedince žab (Wells 2007), oproti tomu Goater & Ward (1992) během výzkumu na ropuše obecné prokázali negativní vliv těchto myiáz na růst a lokomoci přeměněných mlád'at, což má za následek nižší přežívání jedinců. Lze předpokládat, že kvůli zhoršené lokomoci jsou tyto jedinci častou kořistí predátorů, například vodních ptáků, jejichž pozornost je přilákána zvláštními pohyby nakažených žab.

Zástupci z čeledi koutulovití (*Psychodidae*) řadíme spíše k přechodným krev-sajícím druhům než k pravým parazitům. Tento přístup by se mohl změnit, pokud by se prokázal přenos filarií a infikování žab (Bernal et al. 2006). Biologická interakce mezi koutulemi (r. *Sycorax*) a ropuchami se však od ostatních much liší, jelikož jejich larvy nejsou invazivní.

3.1.5. Vektory trypanozomy

Nejčastěji dokumentovanými vektory jsou pijavice, které přenášejí endoparazity na žáby žijící v tůních, nebo na ocasaté obojživelníky. Způsob života dospělých jedinců stromových žab výrazně snižuje potenciální možnost kontaktu s pijavicemi, dospělci se na delší dobu dostanou do vodního prostředí jen v období rozmnožování. Je pravděpodobné, že vektorem trypanosomy jsou i zástupci některých druhů dvoukřídlých, jako jsou komáři nebo krev-sající mušky (Johnson et al. 1993). Na Floridě jsou známy druhy komárů, které se živí krví obojživelníků, v Georgii pak byly nalezeny mušky rodu *Corethrella* parazitující stromové žáby (McKeever 1997). Při výzkumech, zdali jsou tito zástupci dvoukřídlých také přenašeči trypanozomy, byla zjištěna přítomnost trypanozomy například ve střevě *Corethrella wirthi* Stone, 1968 (Johnson et al. 1993), což potvrzuje domněnku, že i dvoukřídlí mohou být přenašeči trypanozom.

Mušky z rodu *Corethrella* vyhledávají své hostitele podle volání samců žab při vábení samic. Jelikož samec ztichne při navázání fyzického kontaktu se samicí, dostanou se samičky jen zřídka do kontaktu s krev-sající muškou. Byla zjištěna téměř nulová přirozená nákaza samic stromových žab trypanozomou (Johnson et al. 1993) a tím byla také prokázána interakce mezi samci žab a krev-sajícími muškami r. *Corethrella* (Borkent & Belton 2006). Nepřítomnost trypanozomy v těle samic jen potvrzuje, že nakažení samci žab byli infikováni až v dospělosti (Johnson et al. 1993).

3.2. Způsoby lokalizace obojživelníků u krev-sajících much

Adaptace, které zvyšují detekci hostitele na větší vzdálenost, jsou vyvinuté napříč všemi druhy u krev sajícího hmyzu a umožňují efektivněji najít hostitele (Bernal & Silva 2015). Většina krev-sajících mušek a komárů vyhledává své hostitele pomocí látek, které hostitel vylučuje, jako je oxid uhličitý, vodní pára nebo jiné složitější molekuly (Grafe et al. 2008). Například komár *Anopheles gambiae* Giles, 1902, vykazuje silnou preferenci pro lidské hostitele, z tohoto důvodu má receptory, které detekují jednotlivé pachy lidských nohou, způsobené bakterií rodu *Corynebacterium* (Bernal & Silva 2015). Samičky mušek rodu *Corethrella* využívají, kromě těchto chemických stop, převážně jiný způsob. Pachové vjemy mohou být významné až při bližším kontaktu s hostitelem. Mušky vyhledávají svého hostitele především pomocí hlasových projevů samců žab při vábení samic (Grafe et al. 2008).

3.2.1. Vnímání zvuku

Hmyz je schopný vnímat zvuk buď netympanální nebo tympanální recepcí. Tympanální receptce je zajištěna tympanálními orgány, které se skládají z bubínku, rezonátoru, a sluchových buněk. Tyto orgány se vyskytují v hrudi, předních párech nohou, abdomenu, nebo křídlech. Tympanální orgány se vyskytují u hmyzu, který je schopen sám vydávat zvuk, např. Orthoptera (Kodrík 2004). Netympanální receptce využívá vibrace způsobené zvukem, které jsou vnímány trochoidními senzily. Specializované útvary schopné vnímat zvuk jsou tzv. chordotonální orgány a jsou uloženy pod kutikulou. Nejčastěji se vyskytují v člancích tykadel, končetin nebo u báze křídel. Jedná se o strunovité útvary napnuté napříč tělními dutinami, které jsou svými konci připevněny na vnitřní plochu ohebných částí kutikuly. Kromě vlastních smyslových buněk obsahují řadu podpůrných a krycích buněk, které zajišťují a zefektivňují činnost ústrojí. Celá tato struktura se nazývá skolopidium. To se v základní formě skládá ze tří typů lineárně uspořádaných buněk: subtympanální buňky umístěné na skolopální buňce spojené s dendrity nervové senzorkové buňky. Toto základní schéma bývá často modifikováno. Všechna imága mají modifikovaný chordotonální ústrojí ve formě Johnstonova orgánu, který leží v druhém článku tykadel (pedicules). Slouží k zajišťování pasivních pohybů tykadel při letu, tedy jako gyroskopický smysl. Po určité modifikaci může Johnstonův orgán sloužit i ke vnímání zvuku. (Kodrík 2004). U komárů a pakomárů reaguje na frekvence vzduchem přenášených zvuků tak, že vnímá rezonující vibrace chloupků na tykadlech (kratší chloupky na konci tykadel reagují na vyšší frekvence než delší chloupky u kořenů (Pechlát 2007). Je pravděpodobné, že právě Johnstonův orgán využívají krev-sající mušky r. *Corethrella* k akustické lokalizaci hostitele (Grafe et al. 2008), otázkou prozatím zůstává, jestli stejný systém používají i koutule r. *Sycorax*. Ačkoli se *Corethrelly* pravděpodobně nespecifikují na konkrétní druh žáby, je zřejmé, že volání určitých druhů žab jsou pro ně více atraktivní (Grafe et al. 2008). Při pokusech, kdy vědci vábili *Corethrelly* na nahrané volání osmi různých druhů žab, byly mušky nejvíce přitahovány hlasovým projevem rosničky štěkavé (*Hyla gratiosa* LeConte, 1856). Zajímavé je, že tento druh žáby je původní na severovýchodě Spojených států, ale na její volání bylo nalákáno velké množství druhů *Corethrell* pocházejících ze západu Spojených států, Mexika a Kostariky, kde s touto rosničkou prakticky nemohli přijít do kontaktu ani nemohli slyšet její volání. Je tedy pravděpodobné, že volání rosničky

štěkavé je specifické, prozatím není ale jasné, jaká složka volání žab mušky vábí (Borkent & Belton 2006).

3.2.2. Akustická lokalizace

Samci některých druhů živočichů se při hledání samic shromažďují a vytvářejí různě velké agregace. U žab se tyto agregace nazývají „chóry“. Samci v takovémto shromáždění využívají větší pravděpodobnosti přilákání samic. Hlasový projev je výraznější a hlasitější při větším počtu jedinců. Snižují tím také možnost, že budou ukořistěni predátorem. Některé skupiny živočichů jsou jen neúmyslnými příjemci daného akustického signálu, jiný tento signál cíleně odposlouchávají. Tento příjemce akustického signálu může být buď neúmyslně jedinec stejného druhu, predátor, parazitoid nebo krev se živící mušky (Caldart et al. 2016).

Jsou známy případy u některých druhů žab, kdy samec synchronizuje svůj hlasový projev se sousedícím samcem, čímž snižuje možnost napadení predátorem. Například samci rosničky r. *Smilisca* odpovídají s velmi krátkou dobou zpoždění na volání sousedících samců a tím dochází k výraznému překrývání zvuků. Tato strategie založená na synchronizovaném volání vznikla pravděpodobně jako důsledek selektivního tlaku způsobeným netopýry, kteří jsou potravními specialisty právě na těchto žábách (Aihara et al. 2016). Interakce mezi jedinci, kdy jeden vysílá signál a jiný ho přijímá (odposlouchává), byla zkoumána pro celou řadu organizmů. Výhody hromadného volání žabích samců ale mohou být relativní, jelikož zároveň dochází k zesílení kompetice o samičky. Signální akustické znaky, které se určitým způsobem liší od průměrné hodnoty, jsou samičkami stejného druhu zpravidla preferovány. Výskyt ve skupině je zřejmě důsledkem toho, že vedle souseda může hlas jednoho jedince vyniknout a být tedy pro samičku atraktivnější. Například rákosnička mramorovaná (*Hyperolius marmoratus* Rapp, 1842), která je velmi rozšířená v oblasti subsaharské Afriky, preferuje nižší frekvence samčího volání než vyšší. Individuální strategie, jak maximalizovat atraktivnost pro samičku je ve skupině běžná. Pokusy o zvýšení atraktivnosti pro samičku může ale také zvýšit pravděpodobnost napadení predátorem nebo parazitem, který vyhledává hostitele akustickou lokalizací, právě kvůli jeho nápadnosti. Tyto signální strategie jsou, vzhledem ke konkurujícím si samcům, v jádru konfliktem mezi sexuálním a přírodním výběrem (Aihara et al. 2016).

Preference samic mohou vést k vývoji až přehnaných samčích signálů (výraznější volání), čímž se zvyšuje riziko odposlechnutí predátory. Vnímání akustického signálu je také ovlivněno tím, jak tento signál kontrastuje se zvuky okolí a také jakým způsobem je informace zpracována (přesněji řečeno, jakým senzorem a jakým druhem živočicha). Výrazné, až přehnané signály mohou být pro jednoho živočicha, který tyto signály přijímá, vysoce atraktivní, zatímco pro jiného jedince se může jednat o signály nepodstatné nebo nemusejí být přijímány vůbec. Mnoho studií uvádí, že velké množství živočichů, které přijímají tyto sexuální signály, je využívá k ukořisťení oběti (Bernal et al. 2006). V některých případech se ukazuje, že tito predátoři/paraziti preferují v rámci jednoho druhu kořisti/hostitele jen některé varianty signálů (Moodie 1972). Otázkou je, proč je pro predátory nebo parazity, kteří vyhledávají kořist pomocí akustické lokalizace, důležitá rozdílnost mezi jednotlivými signály, nejen přítomnost signálu samotného. Je buď možné, že tito odposlouchávači hodnotí na základě signálu kvalitu kořisti, preferují například větší a hlasitější samce. Další možností je, že některé signály jsou jednodušeji detekovány než jiné. Z výzkumu na středoamerické hvízdalce *Engystomops pustulosus* (Cope, 1864) totiž vyplývá, že zatímco samice žab preferují složitější hlasové projevy samců, krev-sající mušky a netopýři, kteří se specializují na žáby, to mají naopak a preferují volání jednodušší (Bernal et al. 2006).

I když existuje množství much, které se živí na žábách a k jejich vyhledávání používá akustickou lokalizaci, je tato problematika jen velmi málo zkoumaná, a to zejména v oblasti Neotropiku (Caldart et al. 2016). V současné době je tedy známé, že mušky r. *Corethrella* umí lokalizovat hostitele podle zvuku, podobně se ví o některých druzích r. *Uranotaenia*. Neznáme ale, jakým způsobem vyhledávají hostitele ostatní druhy krev-sajících mušek. Například u rodu *Forcypomia* bylo pozorováno napadení dvou druhů žab v Argentině (Caldar et al. 2016), podobně způsob vyhledávání není znám u koutulí r. *Sycorax*.
2.3.3 Výběr místa sání na hostiteli

Při shánění potravy je pro hematofágní hmyz velmi důležitý výběr vhodného hostitele. Proto se u krev-sajícího hmyzu vyvinuly znaky, které optimalizují chování při vyhledávání hostitele a při sání krve. Kromě lokalizace hostitele samotného je nutný také výběr správného místa k sání krve na těle oběti. Předpokládá se, že se krev-sající hmyz krmí na tom místě na hostiteli, kde je maximální zisk krve s minimálními náklady, jako je například riskování zranění hostitelem. Například komár rodu *Eretmapodites* saje na stojícím člověku, a to v místě pod koleno (Haddow 1956), zatímco komár *Aedes simpsoni* (Theobald 19XX) preferuje oblast hlavy. Podobně jako

u komárů je i u krev-sajících mušek očekáván selektivní výběr místa, které maximalizuje získání krve z hostitele. Výběr místa u dočasných ektoparazitů je ovlivněn různými faktory zahrnující různorodost mikroklimatu, tloušťka kůže na různých částech těla hostitele nebo stupeň pokryvu pokožky (de Silva et al. 2014).

U většiny známých druhů komárů a krev-sajících mušek je výběr správného místa sání založen na teplotním gradientu, oxidu uhličitým a vlhkosti vycházející z hostitele. Vzhledem k nízkým teplotním rozdílům na těle žab je oxid uhličitý výrazným faktorem jak při lokalizaci hostitele, tak při vybírání místa pro sání krve (de Silva et al. 2014). Předpokládalo se, že z toho důvodu si krev-sající mušky vybírají např. na již zmiňované hvízdalce, oblast nozder, kde je vyšší koncentrace emitovaného oxidu uhličitého. Největší množství oxidu uhličitého je ale vylučováno přes kůži. Je tedy zřejmé, že oxid uhličitý hraje tedy minimální roli při výběru místa na těle hostitele (Wells 2007). Nozdry jsou v blízkosti vokálního vaku, odkud nejvýrazněji vychází zvuky při volání samičky, pravděpodobnější je tedy, že mušky jen následují intenzitu zvuku, která je u vokálního vaku, potažmo nozder, nejvyšší. Krev-sající mušky, které se živí na hvízdalce, nejvíce preferují oblast nozder, tedy místo s vyšší abundancí větších cév než v hrudní oblasti, kde jsou cévy uloženy hlouběji a mušky se k těmto kapilárám nemusí dostat. Z předešlých studií vychází, že se samičky r. *Corethrella* krmí z různých částí těla žáby, od nohou po dorsální část. U stromových žab je naopak rozdíl v abundanci cév na různých částech těla minimální, proto o místu krmení rozhoduje spíše charakteristika a funkce kůže (de Silvia et al. 2014).

3.3. Rod Ansonia

Žáby rodu *Ansoinia* řadíme do čeledi ropuchovití (Bufonidae) (Wood et al. 2008). Tato čeleď zahrnuje 38 rodů a 485 druhů (Frost et al. 2006). Rod *Ansonia* zahrnuje 27 druhů (Wood et al. 2008), ale minimálně 5 taxonů čeká na oficiální popis (Matsui et al. 2010).

Ansonie mají disjunktivní areál rozšíření, dva druhy se vyskytují na Indickém subkontinentu, zbylé druhy pak obývají oblast jihovýchodní Asie a přilehlé ostrovy s nepočtenějším zastoupením na Borneu (Matsui et al. 1998, Grismer 2006, Matsui et al. 2010). Právě na Borneu prošel ansonie mírnou radiací a vyskytuje se zde minimálně 12 druhů. Z těchto dvanácti druhů je pro Borneo 11 druhů endemických (Grismer 2006). Na Malajském poloostrově se nachází sedm druhů, z toho šest druhů žije izolovaně

v horách. Pouze jeden druh, *Ansonia endauensis* Grismer, 2006, se vyskytuje v nížinném lese ve státě Johor (Wood et al. 2008).

Obecně se jedná o žáby menšího vzrůstu se štíhlými končetinami (Grismer 2006). Většina ansonií má zlatohnědou duhovku (Wilkinson et al. 2012). Obývají areál lesů od nížin po hory, s vyšší abundancí v horských oblastech s nadmořskou výškou do 3000 metrů. Jen některé druhy se ojediněle vyskytují pouze v nížinách. Ačkoli byli dospělci některých druhů nalezeni v lese na zemi, většina druhů byla běžně pozorovaná na kamenech a vegetaci v blízkosti rychle tekoucích potoků. V nich dochází k metamorfóze pulců, kteří jsou specializováni na život v bystřinách (Grismer 2006). Ansonie nemají parotidální žlázy (Wilkinson et al. 2012). K životu na kamenech a vegetaci jsou přizpůsobeni dlouhými prsty, které jim pomáhají při lezení.

Vzhledem k jejich malému vzrůstu a nenápadnému způsobu života jsou ansonie oproti jiným žábám poměrně málo prostudovaným rodem a stále dochází k popisování nových druhů. Hrozbou pro tuto skupiny žab je úbytek přirozeného prostředí. Příkladem může být stát Johor, v jižní části Malajského poloostrova. Stále se zde nachází velká oblast primárního pralesa, který ale rapidně ubývá kvůli plantážím palmového oleje a možnost objevení nového druhu se tedy výrazně snižuje (Grismer 2006).

Námi studované mušky rodu *Sycorax* byly odebrány z těla ropuchy ansonie dlouhoprsté (*Ansonia longidigita* Inger, 1960), pro kterou je typické bylinné patro deštných pralesu. Vyskytuje se v místech čistých, kamenitých potoků, které využívá k rozmnožování.



Obrázek 1 - Druh *Ansonia longidigita* z NP Ulu Temburong, Brunej

3.4. Rod *Sycorax*

Sycorax je malý rod much, které patří do podčeledi Sycoracinae, čeledi koutulovití (Psychodidae), řád dvoukřídlí (Diptera) (Curler et al. 2015). Čeleď koutulovití je velmi rozšířenou a rozmanitou skupinou much čítající přibližně 3 000 druhů rozdělených do šesti podčeledí – Horaiellinae, Sycoracinae, Trichomyiinae, Bruchomyiinae, Psychodinae a Phlebotominae, která je známým vektorem lidských onemocnění.

Dodnes je popsáno 45 existujících druhů koutulí r. *Sycorax* (Curler et al. 2015) a 4 fosilní. Stále ale dochází k popisování druhů nových (Ježek et al. 2015). Výskyt druhů podčeledi Sycoracinae byl zaznamenán po celém světě s výjimkou Antarktidy a Severní Ameriky. Alespoň dvě třetiny druhů pocházejí převážně z regionů Palearktu (12 druhů) a Neotropů (17 druhů). Právě v této oblasti je známá největší morfologická rozmanitost druhů. Podčeleď Sycoracinae je zde rozdělena do tří rodů – *Sycorax*, *Parasycorax* a *Aposycorax* (Curler et al. 2015).

Koutulovití jsou malé mouchy, některé druhy jsou pokryty drobnými chloupky, takže mohou připomínat můry. Larvy obývají čistá prostředí bystřin, potoků a fytoelem, dále vlhká místa na zemi, jako je tlející dřevo nebo listí. Pouze některé duhy jsou výskytem vázány na méně čistá prostředí, například kanalizaci a odpadní vody. Živí se detritofágně, tzn. odumřelými rostlinami a živočichy (Curler & Moulton 2012). Ježek et al. (2015) ve své práci popisuje larvy koutulí *Sycorax konopiki* a *S. tomkineane*. Tělo larvy je dorsoventrálně zploštělé, vejčitého tvaru. Larvy koutulí byly nalezeny v mechovém podrostu v blízkosti vodních toků, kde byly ukryté v napadaném listí. Dospělí jedinci jsou 1–3 mm dlouzí, křídla s charakteristickou žilnatinou drží horizontálně na zadečku. Kousací ústní ústrojí, které je důležité pro získání krve z obratlovců, je plně vyvinuto pouze u samiček. Krev je pro samičky nezbytná z důvodu produkce vajíček (Ježek et al. 2015). Druhy zkoumané v rámci bakalářské práce patří mezi nedávno popsané. Jsou to zástupci asijských druhů rodu *Sycorax*. Oba druhy byly popsány současně v práci Ježek et al. (2015). Vzorky těchto jedinců byly v průběhu několika let sbírány výzkumníky v tropických lesích na Borneu. Takto sebraná zvířata byla transportována do České republiky, kde byla popsána českým odborníkem na skupinu *Psychodidae* Dr. Janem Ježkem z Entomologického oddělení Národního muzea v Praze. Oba druhy byly sebrány z hřbetu žab druhů *Ansonia leptopus* Günzher, 1872 a *Ansonia longidigita* Inger, 1960, v oblasti nížinného

dipterokarpového deštného lesa v Národním parku Ulu Temburong v Brunejském sultanátu. První druh *Sycorax konopiki* je pojmenován na počest Dr. Olivera Konopika, který jako první zaznamenal tyto koutule parazitovat na ansoniích na Borneu. Druhý druh, *S. tomkineana*, nese jméno po příjmení autorovy dcery, Věře Tomkové (Ježek et al. 2015).



Obrázek 2 Druh Ansonia longidigita s druhem koutule Sycorax konopiki z NP Ulu Temburong, Brunej

3.5. Metody analýzy DNA

3.5.1. Izolace DNA

V dnešní době je nejčastější metodou izolace genomové DNA izolace DNA pomocí gravitačních kolonek. Na trhu je velké množství kolonkových kitů, pomocí kterých můžeme izolovat DNA o dostatečné čistotě pro většinu aplikací .

Rozrušením tkání buněk a působením proteázy získáme lyzát, který nanese do speciální kolonky. V kolonce je přítomná matrix, na kterou se dodaná DNA naváže. Následně kolonku centrifugujeme a roztok bez DNA odplavíme. Matrix s DNA promyjeme promývacím roztokem, který následně centrifugací také odstraníme. Po promytí se DNA z matrix vyváže do sběrné zkumavky centrifugací vodou nebo elučním pufrem (Biofyzika.Upol 2011) .

3.5.2. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (*Polymerase chain reaction*, PCR) je biochemická reakce, která je založená na enzymatické amplifikaci specifického úseku nukleové kyseliny (Erlich 1989). Celý proces můžeme rozdělit na 3 základní fáze: denaturaci,

annealing (hybridizaci) a syntézu. V cyklické reakci o těchto třech teplotně odlišných fázích dochází k syntéze milionu kopií určité sekvence DNA (McPherson & Moller 2000).

V dnešní době má PCR řadu variant a modifikací, základní princip zůstává ovšem stejný. PCR metoda využívá enzym DNA polymerázu *in vitro* (bez použití živých organismů) ke kopírování cílového úseku DNA tak, že produkty hromadí geometrickou řadou (Erlich 1989). Ke zmnožení určité části genomu je zapotřebí dvou malých úseků DNA, které jsou komplementární k jejím koncovým oblastem. Tyto úseky o známé sekvenci nazýváme primery. Ty jsou tvořeny zpravidla 20–25 nukleotidy. K PCR je dále zapotřebí DNA-polymeráza (Kočárek 2008).

Každá PCR reakce začíná denaturací templátu, tím vznikne vazebné místo pro primery. Následuje nasednutí primerů a syntetická fáze. Základní jednotkou je jeden cyklus, ve kterém se opakují fáze denaturace, annealing, extenze a každý cyklus se opakuje 25–60 x (Hatina & Sykes 1999).

- Denaturace

Teplota denaturační fáze se pohybuje mezi 92–96 °C (Kočárek 2008). Dochází u rozvolnění vodíkových vazeb mezi bázemi a vznikají dvě samostatná vlákna DNA (McPherson & Moller 2000).

- Annealing

Probíhá při teplotě 45–65 °C. Během annealingu dochází ke komplementárnímu navázání primerů na cílové sekvence vyšetřované DNA. Místa, kde se primery naváží, vymezují oblast genomu, která bude dále amplifikována (Kočárek 2008).

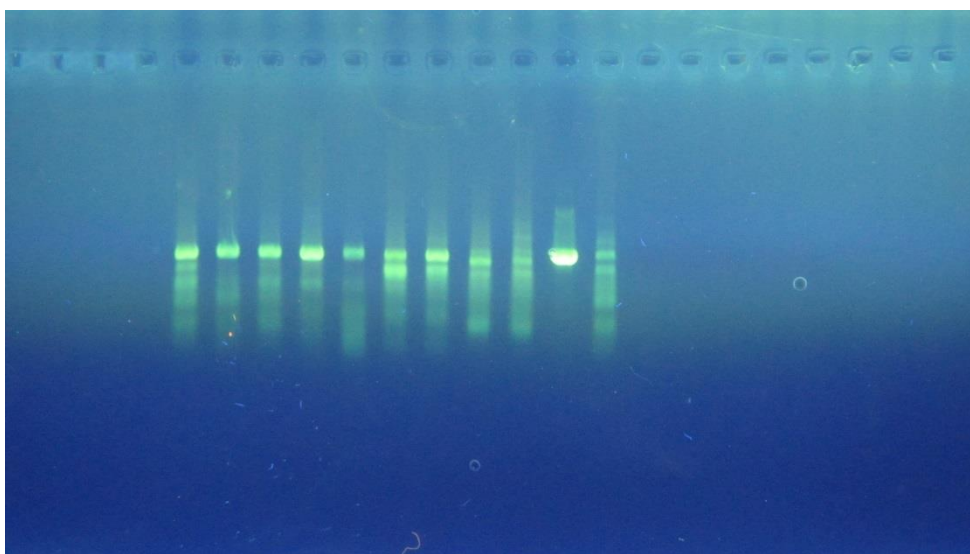
- Extenze

V poslední fázi každého cyklu dochází k aktivaci DNA polymerázy, ta prodlužuje 3' konce primerů a tím vytváří nové komplementární řetězce. Extenze (elongace) probíhá při teplotě 72 °C (Kočárek 2008).

Jedním ze společných rysů téměř všech modifikací PCR je detekce výsledného produktu na konci reakce, kdy amplifikovaný produkt vizualizujeme nejčastěji pomocí gelové elektroforézy nebo hybridizací se značenými sondami (McPherson & Moller 2000).

3.5.3. Elektroforéza

V závěru PCR získáme směs obsahující velké množství amplifikovaných fragmentů. K oddělení těchto fragmentů od zbytku DNA se nejčastěji používá elektroforéza. Tato metoda je založená na izolaci molekul o rozdílné hmotnosti, popřípadě na odlišném elektrickém náboji. Roztok obsahující fragmenty DNA se převede do jamek v elektroforetickém gelu, který se vytvoř rozpuštěním agarózy v horké vodě. Tento roztok je nalit na povrch elektroforetické desky a poté se zchladí. Destičku poté umístíme do aparatury, která je připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Z jamek na okraji elektroforetického gelu jsou pak záporně nabitě fragmenty DNA přitahovány ke kladné elektrodě. Původní neamplifikovaná DNA zůstává v jamce, protože její molekuly jsou příliš dlouhé. Po skončení elektroforézy zviditelníme fragmenty v gelu přidáním fluorescenčního barviva, které se váže na DNA a v ultrafialovém světle jasně září. Pro vizualizace DNA se používá látka ethidium bromid, která se přidává do agarózového gelu. Naváže se na DNA a pod ultrafialovým světlem emituje světlo (Kočárek 2008).



Obrázek 3 Výsledek PCR, ilustrační obrázek

3.5.4. Sekvenování

Sekvenování DNA znamená určení sekvence nukleotidů dané molekuly DNA. Ještě na začátku 70. let 20. století bylo sekvenování DNA velmi obtížné a provádělo se nepřímým sekvenováním RNA molekul. Dnes známe hned dvě metody DNA sekvenování. První metodu vynalezli Maxam a Gilbert, je založena na chemické

modifikaci DNA a následném rozštěpení řetězce v místech modifikovaných nukleotidů. Druhá se nazývá Sangerovo sekvenování. Tato metoda je známa jako enzymatická metoda sekvenování a využívá specifických vlastností DNA polymerázy při syntéze nového řetězce. Technologie enzymového sekvenování byla „první generací“ komerčně dostupného sekvenování a navzdory její pracnosti i časové náročnosti se Sangerovo sekvenování stalo velmi rozšířeným v laboratořích po celém světě.

Technika sekvenování DNA zaznamenala během posledních let velký posun kupředu díky novým sekvenátorům tzv. druhé generace. Sekvenátory první generace detekovaly DNA báze v řadě jednu po druhé, zatímco sekvenátory druhé generace umožňují masivní paralelní sekvenování až tisíců molekul DNA současně. Díky technologii masivního paralelního sekvenování se významně snížila doba potřebná k přečtení dlouhých DNA sekvencí. Sangerovo sekvenování se v současnosti stále využívá např. pro sekvenování PCR produktů nebo pro malé sekvenační projekty. Pro náročnější aplikace se ale používají sekvenátory druhé generace (Koubková et al. 2014).

3.5.5. Program BLAST

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) je nástroj pro porovnávání podobností sekvencí DNA a nukleotidů se sekvencemi uloženými v databázi. Tento program dokáže srovnat podobnost zadané sekvence se sekvencemi v databázi a zároveň dokáže rozeznat sekvence podobné (Altschul et al. 1997).

4. Metodika a materiály

4.1. Metodika sběru vzorků

Odchyt a sběr jedinců koutulí a ansonií byl prováděn v roce 2015 v nížinném dipterokarpovém lese v oblasti severního Bornea ve státě Brunej. Lokality odchytu jsou součástí Národního parku Ulu Temburong a jednalo se o koryto potoka Sungai Mata Ikan (4.547N, 115.156E), který se nachází nedaleko výzkumné stanice Brunejské univerzity (KBFSC). Během nočních pochůzek korytem potoků byli pomocí svítilny vyhledáváni všichni jedinci obojživelníků, kteří byli postupně revidováni na výskyt ektoparazitů. Při zjištění výskytu parazitů byli parazitující jedinci opatrně odebráni pomocí exhaustoru a následně fixováni 96% ethanolem. Hostitelské druhy žab byli určeni do druhu (popř. do rodu) a bylo zjištěno pohlaví jedince. Dále byl z hostitelských žab odebrán tkáňový vzorek (poslední článek prstu zadní končetiny) a byl rovněž fixován 96% ethanolem.

4.2. Metodika analýzy DNA

Analýza DNA probíhala v laboratořích na Přírodovědecké fakultě Univerzity Komenského v Bratislavě pod vedením Dr. Daniela Jablonského. Vstupním materiálem byly koutule *Sycorax konopiki* a *Sycorax tomkineana*, celková DNA byla extrahována z tkáňového materiálu pomocí různých komerčních kitů (NucleoSpin® FFPE DNA, Macherey-Nagel; DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen). Postup byl proveden podle doporučeného postupu výrobce.

DNA mitochondriální geny a 12S rRNA a 16 byly amplifikovány pomocí PCR za použití univerzálních primerů 12Sa (5'-AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3') a 12Sb (5'-TGAGGAGGGTGACGGGCGGT-3'), 16SaR (5'-GCCTGTTTATCAAAAACAT-3') 16SbR (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3') publikovaných v pracích Kocher et al. (1989) a Palumbi et al. (1996).

Amplifikována byla celá část fragmentu obou genů. Objem PCR reakce byl následující:

- polymeráza (PPP Master Mix, Top-Bio s.r.o.) 7,5 µl
- H₂O 3,72 µl
- primery po 0,39 µl
- DNA 3 µl = 15 µl /1 vzorku

Amplifikace genu probíhala dle následujícího programu (Kocher et al. 1989, Palumbi 1996):

- počáteční cyklus denaturace při 94°C po 2 min
- následoval 35x opakovaný cyklus při 94 °C po 35 s
- dále cykly 50 °C 35 s, 72 °C 1 minuta a finální 72 °C dlouhý 10 minut

Kvalita PCR fragmentu byla kontrolována pomocí agarózové elektroforézy. PCR produkty s dostatečnou koncentrací byly sekvenovány pomocí amplifikačních primerů komerčním servisem v biotechnologickém centru BITCET (Přírodovědecká fakulta UK, Bratislava) a firmou Macrogen Inc. (Soul, Jižní Korea; Amsterdam, Nizozemí). Sekvenováno bylo celkem 10 vzorků na oba páry i dvojice primerů.

5. Výsledky a diskuse

Během sběrů vzorků se podařilo nashromáždit zajímavý materiál. Dohromady bylo na 24 jedincích (22 samců a 2 samice) ropuchy *Ansonia logidigita* odchyceno 98 ektoparazitů. Ektoparazité byli sbíráni z celého povrchu těla žab, nebyla pozorována žádná preference pozice na obojživelníkovi. Pět z toho bylo při determinaci zařazeno mezi komáry a nebylo s nimi následně pracováno. Dále bylo odchyceno 93 jedinců koutulí z rodu *Sycorax*, kteří byli odchyceni pouze na sedmi samcích ansonií. Determinaci koutulí provedl Dr. Jan Ježek (Národní muzeum Praha). V sebraném vzorku se vyskytovali dva zástupci nově popsáných druhů koutulí *Sycorax konopiki* (43 jedinců) a *Sycorax tomkineana* (50 jedinců). Poměr pohlaví ve vzorku koutulí byl 90 samců a 3 samice. V žaludku samic byly zjištěny zbytky krve, které byly podrobeny analýze mitochondriální DNA. Z výše referovaných výsledků lze vyzorovat zajímavou preferenci koutulí, které byli výhradně chytány na žabích samcích. Pro exaktní vysvětlení této patnosti by bylo důležité sebrat větší vzorek samic ansonií. Avšak předpokladem pro toto pozorování je, že samice koutulí jsou vábeny na žabího samce pomocí hlasových projevů (vokalizace), které samec pravidelně vydává. Během vokalizace se žabí samec zdržuje na vyvýšených místech v těsné blízkosti vodního toku (do 2 m), kde láká žabí samici (Inger et al. 2017). Během této behaviorální aktivity jsou pravděpodobně také vábeni ektoparazitické koutule. Podobný jev je známý např. u krev sajících much rodu *Corethrella*, kde tato skutečnost byla testována pomocí akustického odchytávacího zařízení (Grafe et al. 2008). Otevřenou otázkou zůstává motivace samců se shromažďovat na žabích samcích bez přítomnosti muší samic. Z tohoto je lze usuzovat, že nejsou vábeni pouze muší samicí, ale pravděpodobně reagují rovněž na vokalizaci žabího samce. Nemalou zajímavostí je také zjištění a přímé pozorování kopulace páru koutulí přímo na hřbetu samce ansonii dlouhoprsté (Grafe pers. comm.).

Potravní návyky většiny dospělých jedinců těchto krev-sajících koutulí jsou poměrně málo prozkoumané. Prozatím je prokázáno jen to, že samičky rodu *Sycorax* a *Aposycorax* mají ústní ústrojí adaptované k sání (Curler & Jacobson 2012). Je známo jen několik případů, kdy byla asociace mezi koutulemi r. *Sycorax* a žabami potvrzena jinak, než pozorováním. Můžeme uvést například druh *Sycorax silacea* Curtis, 1839. Tento druh známý z Evropy byl sebrán při sání krve na skokanovi zeleném (*Pelophylax esculentus*) a prokázalo se, že je také schopný přenášet filarie (Ježek et al. 2015). Dalším příkladem je druh *Sycorax wampukrum*, druh známý z ekvádorských And.

Několik jedinců bylo odebráno při kontaktu s pralesničkami (Ježek et al. 2015). V žaludku jedné samice koutule byly při popisu druhu také nalezeny zbytky krve, avšak nebyly nijak analyzovány (Ježek et al. 2015). Naopak v práci kolektivu autorů Curler et al. (2015) zabývající se muškou *Aposycorax chilensis*, bylo analýzou DNA zjištěno, že koutule skutečně sálí na žábách rodu *Batrachyla*. Z těchto několika málo příkladů je zřejmé, že i přes různá pozorování o potravních návycích a typu potravy koutulí rodu *Sycorax* není prozatím dostatečné množství údajů.

Při našem pokusu o analýzu tkání koutulí *S. konopiki* a *S. tomkineana* se pomocí PCR podařilo amplifikovat všechny vzorky s různou úrovní kvality. Následná sekvenace amplikonů se však nezdařila, pravděpodobně z důvodu nedostatečně kvalitní žabí DNA v zažívacím traktu koutulí. Programem BLAST bylo zjištěno, že došlo sice k amplifikaci DNA zástupců Diptera, nikoli však zástupců obojživelníků, takže v další analýze nemohly být zmíněné sekvenace použity.

Tento výsledek mohl být způsoben časovou prodlevou mezi sběrem vzorků a jejich zpracováním. V těle koutulí dochází pravděpodobně k rychlým metabolickým procesům, které narušují DNA žabí krve v těle mušky a mohou tak znemožnit její analýzu. Účinnější by zřejmě bylo, kdyby analýza DNA proběhla přímo v místě sběru vzorku, popřípadě co nejdříve po sběru. Dalším možným zlepšením pokusu je použití jiných primerů. Například v práci Curler et al. (2015) autoři používají k analýze DNA primery: „forward primer“ (5'-CTGTTTACCAAAAACATCG-3') specifický pro obojživelníky a reverzní primer (5'-CTGATCCAACATCGAGGTCGT-3'), který je univerzální pro obratlovce. Optimalizace pokusu bude předmětem dalších analýz. Součástí této práce měla být dále srovnávací studie jaderné DNA mezi vzorky obojživelníků a koutulí. Tuto kapitolu by bylo možné zařadit do mé práce v případě, že by analýza DNA vyšla podle našich předpokladů. Interakce mezi ektoparazitickými muškami a obojživelníky má významný dopad na jedince žab, je proto důležitým předmětem budoucího zkoumání (Bravo & Salazar-Valenzuela 2009).

6. Závěr

Mezi významné ektoparazity obojživelníků řadíme například pijavice, larvy much, klíšťata, komáry a krev-sající mušky. Ve své práci se zaměřuji především právě na ektoparazitické mušky, konkrétně se zabývá vztahem mezi dvěma organismy, krev-sající mouchou r. *Sycorax* a ropuchou r. *Ansonia*. Tyto dvě skupiny živočichů jsou v interakci nejméně 190 miliónů let a v současné době žijí pravděpodobně na většině areálu společně. Krev-sající mušky potřebují krev hostitele k produkci vajíček, jsou možnými přenašeči trypanozomy a k vyhledávání hostitele jsou dobře adaptovány. Je tedy patrné, že hrají důležitou roli v historii evoluce žab. Interakce mezi žábami a krev-sajícími muškami byly dobře popsány pro různé druhy žab a mušek na území Severní Ameriky, Střední Ameriky a v oblasti tropické a subtropické Asie. V oblasti Jižní Ameriky jsou tyto studie teprve na počátku a evidence interakcí akusticky se orientujících hematofágních mušek a samců žab nejsou příliš častá.

Součástí této práce je pokus o analýzu tkání mušek odebraných na Borneu a z tohoto důvodu jsem zde také popsala metody, které jsme k analýze využívali. Sběr materiálu proběhl na Borneu v roce 2015. Celkem bylo odebráno z těla ropuchy *Ansonina longidigita* 93 koutulí, z toho 3 byly určeny jako samice. Zajímavé je, že tyto koutule byly odebrány pouze na samcích žab, předpokládá se tedy, že mušky vyhledávají žáby podle hlasových projevů samců žab při vábení samic, podobně jako tomu je u *Corethrell*.

Jelikož byly v žaludku odebraných samic koutulí nalezeny zbytky krve, provedli jsme analýzu mitochondriální DNA. Jelikož se následná sekvenace amplikonů nezdařila, budou v následných analýzách použity jiné postupy, jako je například použití specifických primerů.

7. Literatura

Aihara I, de Silva P, Bernal XE. 2016. Acoustic Preference of Frog-Biting Midges (*Corethrella* spp.) Attacking Túngara Frogs in their natural Habitat. *Ethology*. 122:105–113.

Altschul FS, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Oxford University Press*. 25(17): 3389–3402.

Anthony CD, Mendelson III JR, Simons RR. 1994. Differential Parasitism by Sex on Plethodontid Salamanders and Histological Evidence for Structural Damage to the Nasolabial Groove. *The American Midland Naturalist*. 132: 302–307.

Begon, M, Harper JL, Townsend CR. 1997. *Ekologie: jedinci, populace a společenstva*. 1st ed. Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci. 390–394.

Bernal XE, de Silva P. 2015. Cues used in host-seeking behavior by frog-biting midges (*Certhrella* spp. Coquillet). *Journal of Vector Ecology*. 40(1):122–128.

Bernal XE, Rand AS, Ryan MJ. 2006. Acoustic preference and localization performance of blood-sucking flies (*Corethrella* Coquillet) to túngara frogs calls. *Behavioral Ecology*. 17:709–715.

Blais B. 2016. Natural History notes: *Anaxyrus americanus*, Ectoparasites. *Herpetological Review*. 47(3):435–436.

Borkent A, Belton P. 2006. Attraction of female *Uranotaenia lowii* (Diptera: Culicidae) to frog calls in Costa Rica. *The Canadian Entomologist*. 198:91–94.

Bravo F, Salazar-Valenzuela D. 2009. A new species of *Sycorax* Curtis (Diptera, Psychodidae, Sycoracinae) collected on harlequin frogs (Anura: Bufonidae, *Atelopus*) in Ecuadorian Andes. *Zootaxa*. 2093:37–42.

Caldart VM, dos Santos MB, Iop S, Pinho LC, Cechin SZ. 2016. Hemaphysalid Flies Attracted to Frog Calls in a Preserved Seasonal Forest of the Austral Neotropics, with a Description of a New Species of *Corehrella* (Diptera: Corethrellidae). *Zoological Science*. 33:527–536.

Curler GR, Moulton JK. 2012. Phylogeny of psychodid subfamilies (Diptera: Psychodidae) inferred from nuclear DNA sequences with a review of morphological evidence for relationship. *Systematic Entomology*. 37:603–616.

Curler GR, Moulton JK, Madriz RI. 2015. Redescription of *Aposyrocarx* (Tonni) (Diptera: Psychodidae, Sycoracinae) with the first identification of a blood meal host for this species. *Zootaxa*. 4048 (1):114–126.

de Silva P, Jaramillo C, Bernal EX. 2014. Feeding Site Selection by Frog-Biting Midges (Diptera: Corethrellidae) on Anuran Hosts. *Journal of Insect Behaviour*. 27:302–316.

Erlich EA. 1989. PCR technology. Principles and Applications for DNA Amplification. New York: Stockton Press.

Formanowicz DR Jr., Stewart MM, Townsend K, Pough FH, Brussard PF. 1981. Predation by Giant Spiders Crab on the Puerto Rican Frog *Eleutherodactylus coqui*. *Herpetologica*. 37(3):125–129.

Frost DR, Grant T, Faivovich JN, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, de Sa RO, Channing A, Wilkinson M, Donnellan SC, Raxworthy CJ, Campbell JA, Blotto BL, Moler P, Drewes RC, Nussbaum RA, Lynch JL, Green DM, Wheeler WC. 2006. The Amphibian Tree of Life. American Museum of Natural History.

Gambale PG, Batista VG, Oda FH, Campos RM, Takemoto RM, Bastos RP. 2014. Anuran larvae as a prey and host in invertebrates in Neotropical aquatic habitats. *Revista Chilena de Historia Natural*. 87(1):31.

Goater CP, Ward PI. 1992. Negative effects of *Rhabdiasbufonis* (Nematoda) on the growth and survival of toads (*Bufo bufo*). *Oecologia*. 89: 161–165.

Grafe TU, Saat HBM, Hagen N, Kaluza B, Berudin ZBJ, Wahab MABA. 2008. Acoustic localisation of frog hosts by blood-sucking flies *Corethrella Coquillet* (Diptera: Corethrellidae) in Borneo. *Australian Journal of Entomology*. 47:350–354.

Grismer LL. 2006. A new species of *Ansonia* Stoliczka, 1870 (Anura: Bufonidae) from a Lowland Rainforest in Southern Peninsular Malaysia. *Herpetologica*. 62(4):466–475.

Haddow AJ. 1946 Observations on the biting-habits of African Mosquitos on the Genus *Eretmopodites* Theobald. *Bulletin of Entomological Research*. 46:761–772.

Hatina J, Sykes B. 1999. *Lékařská genetika: problémy a přístupy*. Praha: Academia.

Hays MP. 1983. Predation on the Adults and Prehatching Stages of Glass Frog (Centrolenidae). *Biotropica*. 15(1):74–75.

Hudson PJ, Dobson AP, Laffery KD. 2006. Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology and Evolution*. 21(7):381–385.

Inger RF, Stuebing RB, Grafe TU, Dehling M. 2017. *A Field Guide to the Frogs of Borneo*. Third Edition. Natural History Publication (Kota Kinabalu, Borneo).

Ježek J, Wahab RA, Ševčík J. 2015. Two new species of *Sycorax* (Diptera: Psychodidae: Sycoracinae) from the Oriental Region. *Zootaxa*. 4057(4):539–550.

Johnson RN, Young GD, Butler JF. 1993. Trypanosome Transmission by *Corethrella wirthi* (Diptera: Chaboridae) of the Green Tree frog, *Hylacinerea* (Anuran: Hylidae). *Journal of Medical Entomology*. 30(5):918–921.

Kočárek E. 2008. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 2. vyd. Praha: Scientia.

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals. Amplification and sequencing with conserved primers. *Evolution*. 86: 6196–6200.

Kodrík D. 2004. Fyziologie hmyzu. Učební texty. České Budějovice. Entomologický ústav Akademie věd České republiky a Biologická fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. 147–148.

Koubková L, Vojtěšek B, Vyzula R. 2014. Sekvenování nové generace a možnosti jeho využití v onkologické praxi. *Klinická onkologie*. 27 (1): 61–68.

Matsui M, Nabhitabhata J, Panna S. 1998. A new *Ansonia* from Northern Thailand (Anura: Bufonidae). *Herpetologica*. 54(4): 448–454.

Matsui M, Tominaga A, Liu W, Khonsue W, Grismer LL, Diesmos AC, Das I, Sudin A, Yambun P, Yong H, Sukumaran J, Brown RM. 2010. Phylogenetic relationships of *Ansonia* from Southeast Asia inferred from mitochondrial DNA sequences: Systematic and biogeographic implications (Anura: Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 54:561–570.

McKeever S. 1997. Observations of *Corethrella* feeding on tree frogs (Hyla). *Mosquito News*. 37: 522 – 523.

Moodie GEE. 1972. Predation, natural selection, and adaption in an unusual threespine stickleback. *Heredity*. 28:155–167.

McPherson MJ, Moller SG. 2000. PCR. Oxford: BIOS Scientific Publishers.

Palumbi SR. 1996. What can molecular genetics contribute to marine biogeography? An urchin's tale. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 203: 75–92.

Polak M. 1998. Effect of Ectparasitism on host condition in the *Drosophila*–*Macrocheles* system. *Ecology*. 79(5):1807–1817.

Poulin R, 1995. „Adaptive“ changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. *International Journal of Parasitology*. 25(12): 1371–1383.

Polis GA, Myers CA. 1985. A Survey of Intrapesific Predation among Reptiles and Amphibians. *Journal of Herpetology*. 19(1):99–107.

Ryšavý B. 1989. *Základy parazitologie: vysokoškolská učebnice pro studenty přírodovědecké fakulty*. 1st ed. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. Učebnice pro vysoké školy (Státní pedagogické nakladatelství).

Tinsley RC, Earle CM. 1983. Invasion of vertebrate lungs by polystomatid monogeneans *Pseudodiplorchis americanus* and *Neodiplorchis scaphiopodis*. *Parasitology*. 86: 501–5017.

Volf P, Horák P. 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton. 1st ed.

Wells KD. 2007. *The Ecology and Behaviour of Amphibians*. The University of Chicago Press, 2007. 647, 655–656.

Wilkinson JA, Sellas AB, Vindum JV. 2012. A new species of *Ansonia* (Anura: Bufonidae) from northern Tanintharyi Division, Myanmar. *Zootaxa*. 3163:54–68.

Wood PL Jr., Grismer LL, Ahmad N, Senawi J. 2008. Twonew species of torrent-dwelling toads *Ansonia* Stoliczka, 1870 (Anura: Bufnidae) From Peninsular Malaysia. *Herpetologica*. 64(3):321–340.

Internetové zdroje

Hmyz. Net. Smysly hmyzu. © Jakub Pechlát 2007 [Internet]. [cit. 14. 10. 2017].

Dostupné z: http://www.hmyz.net/smysly_hmyzu.html

Biofyzika.Upol. Izolace genomové DNA ze savčích buněk, stanovení koncentrace DNA pomocí absorpční spektrofotometr. © 2011. [cit. 15. 4. 2018] [Internet]. Dostupné z: <http://biofyzika.upol.cz/userfiles/file/Izolace%20genomov%C3%A9%20DNA.pdf>