

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Phylogeny, diversity, distribution, and host specificity
of *Haemoproteus* spp. (Apicomplexa: Haemosporida:
Haemoproteidae) of Palearctic tortoises**

RNDr. Thesis

Bc. Aneta Maršíková

České Budějovice

2016

Maršíková A., 2016: Phylogeny, diversity, distribution, and host specificity of *Haemoproteus* spp. (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) of Palearctic tortoises. RNDr. Thesis, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 9 pp.

Annotation:

This study provides unique data on distribution, prevalence, host specificity, phylogeny, and intraspecific variability of two *Haemoproteus* species of Palearctic tortoises. Analyses based on cytochrome b sequences confirm the existence of two monophyletic lineages/species of *Haemoproteus* infecting *Testudo* tortoises. Microscopically, the species corresponding to *H. anaticum* was revealed in blood smears of *T. graeca*, and *H. caucasica* was detected in two tortoise species, *T. graeca* and *T. horsfieldii*.

Declaration [in Czech]

Prohlašuji, že svoji rigorózní práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

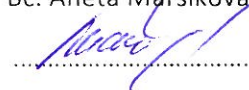
Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své rigorózní práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 21. 4. 2016

.....
Aneta Maršíková

Prohlašuji, že jsem se významně podílela na zpracování materiálu metodami molekulární biologie, získání výsledků a přípravě předloženého rukopisu: Javanbakht H., Kvičerová J., Dvořáková N., Mikulíček P., Sharifi M., Kautman M., Maršíková A., Široký P. 2015. Phylogeny, diversity, distribution and host specificity of *Haemoproteus* spp. (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) of Palearctic tortoises. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62: 670-678.

Bc. Aneta Maršíková



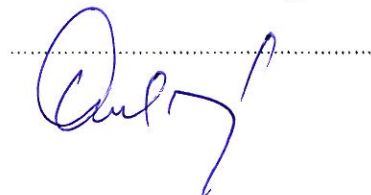
Souhlasím s uvedeným prohlášením

V Českých Budějovicích, dne 7. 4. 2016

MVDr. Jana Kvičerová, Ph.D.



doc. MVDr. Pavel Široký, Ph.D.



Maršíková A., 2016: Fylogeneze, diverzita, distribuce a hostitelská specifita parazitů *Haemoproteus* spp. (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) u suchozemských želv Palearktu.

Abstrakt:

Tato studie, zahrnující rozsáhlý soubor parazitů rodu *Haemoproteus* u suchozemských želv, je první svého druhu. Kombinací mikroskopických a molekulárně genetických metod bylo analyzováno celkem 811 vzorků ze čtyř druhů želv, pocházejících z rozsáhlé oblasti mezi západním Marokem a východním Afghánistánem, a mezi Rumunskem a jižní Sýrií. Celkem 160 vzorků, pozitivních na parazity rodu *Haemoproteus*, bylo shromážděno z oblasti mezi centrální Anatolií a východním Afghánistánem. Na základě variability genu cytochromu b byly odlišeny dvě monofyletické linie těchto parazitů, a mikroskopickou analýzou bylo zjištěno, že odpovídají dvěma dříve popsaným druhům - *Haemoproteus anatolicum* a *Haemoproteus caucasica*. Jejich distribuce se překrývají pouze v úzkém pruhu podél pohoří Zagros v Íránu. Tato skutečnost naznačuje vývoj dvou různých druhů vektorů těchto parazitů, s navzájem oddělenými distribucemi, nicméně přítomnost těchto vektorů zatím nebyla potvrzena. Na základě fylogenetických analýz tvořili *H. caucasica* a *H. anatolicum* sesterské skupiny. Ty byly nejvíce příbuzné s *H. pacayae* a *H. peltoccephali*, popsanými z jihoamerických říčních želv. Byly odhaleny celkem čtyři unikátní haplotypy v populaci *H. caucasica*, ve srovnání se sedmi haplotypy *H. anatolicum*. *H. caucasica* byl navíc nalezen u dvou druhů želv, *Testudo graeca* a *Testudo horsfieldii*, což naznačuje, že rod *Haemoproteus* nevykazuje striktní hostitelskou specifitu vůči svému želvímu mezihostiteli.

ORIGINAL ARTICLE

Phylogeny, Diversity, Distribution, and Host Specificity of *Haemoproteus* spp. (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) of Palaearctic Tortoises

Hossein Javanbakht^{a,1}, Jana Kvičerová^{b,c,1}, Nela Dvořáková^{d,e,1}, Peter Mikulíček^f, Mozafar Sharifi^a, Matej Kautman^d, Aneta Maršíková^{b,c} & Pavel Široký^{d,e}

a Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Baghabrsham, 67149 Kermanshah, Iran

b Biology Centre, Institute of Parasitology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

c Department of Parasitology, Faculty of Science, University of South Bohemia, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

d Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

e CEITEC-Central European Institute of Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

f Department of Zoology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina B-1, 842 15 Bratislava, Slovak Republic

Keywords

Barcoding; cytochrome *b*; intraspecific variability; *Leptoconops*; morphology; *Testudo*.

Correspondence

P. Široký, Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic
Telephone number: +420 541 562 635;
FAX number: +420541 562 631;
e-mail: siroky@vfu.cz

¹These authors contributed equally to the work.

Received: 12 September 2014; revised 2 January 2015; accepted February 9, 2015.

doi:10.1111/jeu.12227

ABSTRACT

A complex wide-range study on the haemoproteid parasites of chelonians was carried out for the first time. Altogether, 811 samples from four tortoise species from an extensive area between western Morocco and eastern Afghanistan and between Romania and southern Syria were studied by a combination of microscopic and molecular-genetic methods. Altogether 160 *Haemoproteus*-positive samples were gathered in the area between central Anatolia and eastern Afghanistan. According to variability in the cytochrome *b* gene, two monophyletic evolutionary lineages were distinguished; by means of microscopic analysis it was revealed that they corresponded to two previously described species—*Haemoproteus anatolicum* and *Haemoproteus caucasica*. Their distribution areas overlap only in a narrow strip along the Zagros Mts. range in Iran. This fact suggests the involvement of two different vector species with separated distribution. Nevertheless, no vectors were confirmed. According to phylogenetic analyses, *H. caucasica* represented a sister group to *H. anatolicum*, and both of them were most closely related to *H. pacayae* and *H. peltoccephali*, described from South American river turtles. Four unique haplotypes were revealed in the population of *H. caucasica*, compared with seven haplotypes in *H. anatolicum*. Furthermore, *H. caucasica* was detected in two tortoise species, *Testudo graeca* and *Testudo horsfieldii*, providing evidence that *Haemoproteus* is not strictly host-specific to the tortoise host species.

HAEMOSPORIDIANS, the blood protists, are common parasites of animals and man; *Plasmodium* species of medical and veterinary importance are among the best studied protists worldwide. However, the majority of closely related taxa have been much less well studied or even, we might say, neglected. The *Haemoproteus* species of reptiles represent such a typically neglected group in comparison to the number of studies on haemoproteids infecting birds (e.g. [Bennett et al. 1965](#); [Levin et al. 2011](#); [Levine and Campbell 1971](#); [Martinsen et al. 2008](#)). The majority of

research done so far on chelonian *Haemoproteus* has been descriptive and taxonomic, based solely on the morphology of their blood stages ([Cook et al. 2010](#); [Lainson and Naiff 1998](#); [Telford 2009](#)). The application of molecular-genetic methods, providing a powerful tool for a comprehensive insight into the classification, alpha-taxonomy, population structure, and evolutionary relationships of haemoproteids ([Iezhova et al. 2011](#); [Levin et al. 2012](#); [Martinsen et al. 2006](#); [Valkiūnas et al. 2007](#)), is yet to be routinely employed in reptilian parasites. Studies on chelonian *Hae-*