

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Urban DAJČMAN

**VPLIV KRVNIH PARAZITOV SKUPINE  
HAEMOGREGARINA NA MEDVRSTNE ODNOSE  
KUŠČARIC NA PRIMERU DVEH TEKMUJOČIH VRST:  
*IBEROLACERTA HORVATHI* IN *PODARCIS MURALIS* V  
SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Urban DAJČMAN

**VPLIV KRVNIH PARAZITOV SKUPINE HAEMOGREGARINA NA  
MEDVRSTNE ODNOSE KUŠČARIC NA PRIMERU DVEH  
TEKMUJOČIH VRST: *IBEROLACERTA HORVATHI* IN *PODARCIS  
MURALIS* V SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

**IMPACT OF HAEMOGREGARINES ON INTERSPECIFIC  
INTERACTIONS OF LACERTID LIZARDS IN THE CASE OF TWO  
COMPETING SPECIES: *IBEROLACERTA HORVATHI* AND  
*PODARCIS MURALIS* IN SLOVENIA**

M. SC. THESIS

Master study programmes

Ljubljana, 2020

*... V tistem Cesarstvu je kartografska Umetnost dosegla tolikšno popolnost, da je Zemljevid ene Pokrajine zavzemal celo Mesto in Zemljevid Cesarstva celo Pokrajino. Sčasoma ti čezmerni Zemljevidi niso več zadostovali in Kartografski kolegij je zasnoval Zemljevid Cesarstva, ki je imel površino Cesarstva in se je do zadnje Podrobnosti skladal z njim. Prihodnji Rodovi, manj navdušeni za Preučevanje Kartografije, so doumeli, da je ta širni Zemljevid brez Koristi, in so ga, ne brez Okrutnosti, prepustili Nevšečnostim Sonca in Zim. V zahodnih Puščavah se je ohranilo nekaj klavrnih Ruševin Zemljevida, v katerih živijo Zveri in Berači; v vsej Deželi ni drugega Preostanka geografskih Ved.*

*Suarez Miranda: Potovanja umnih mož, četrta knjiga, XLV. pogl., Lerida, 1658.*

- Jorge Luis Borges

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 2. stopnja Ekologija in biodiverziteta. Opravljeno je bilo na biotehniški fakulteti univerze v Ljubljani, na oddelku za biologijo in katedri za zoologijo. Deloma je delo potekalo tudi v raziskovalnem centru za biodiverziteto in genetske vire CIBIO – InBIO v Portu na Portugalskem.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Roka Kostanjška, za somentorico dr. Anamarijo Žagar in za recenzenta dr. Petra Trontlja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: izr. prof. dr. Ivan KOS, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,  
Oddelek za biologijo, Katedra za ekologijo in varstvo okolja

Član: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,  
Oddelek za biologijo, Katedra za zoologijo

Članica: dr. Anamarija ŽAGAR, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za  
raziskave organizmov in ekosistemov

Član prof. dr. Peter TRONTELJ, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,  
Oddelek za biologijo, Katedra za zoologijo

Datum zagovora:

Urban Dajčman

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
 DK 598.161.212(043.2)  
 KG kuščarice, paraziti, prevalenca, intenziteta, *Iberolacerta horvathi*, *Podarcis muralis*, medvrstni odnosi  
 AV DAJČMAN, Urban, univ. dipl. biol. (UN)  
 SA KOSTANJŠEK, Rok (mentor), ŽAGAR, Anamarija (somentorica), TRONTELJ, Peter (recenzent)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij ekologije in biodiverzitete  
 LI 2020  
 IN VPLIV KRVNIH PARAZITOV SKUPINE HAEMOGREGARINA NA MEDVRSTNE ODOSE KUŠČARIC NA PRIMERU DVEH TEKMUJOČIH VRST: *IBEROLACERTA HORVATHI* IN *PODARCIS MURALIS* V SLOVENIJI  
 TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)  
 OP VII, 66 str., 10 pregl., 11 sl., 2 pril., 184 vir.  
 IJ sl  
 JI sl/en  
 AI Namen naloge je bil prepoznati, kateri znotrajcelični krvni paraziti so prisotni pri dveh slovenskih vrstah kuščaric, pozidni (*Podarcis muralis*) in velebitski (*Iberolacerta horvathi*) kuščarici. Identiteto parazitov smo potrdili z molekularno analizo gena za 18S rRNA. Opaženi osebki pripadajo rodu *Karyolysus*, ki je znan parazit plazilcev in kuščaric specifično. *Karyolysus* je rod enoceličnih evakrionskih parazitov iz skupine haemogregarin. Nadaljnja analiza se je osredotočala na prevalenco in intenziteto okužbe in primerjavo le-teh med vrstama, spoloma, velikostjo, lokacijami, nadmorskimi višinami in sintopičnostjo/alotopičnostjo populacij obeh gostiteljskih vrst kuščaric. Potrdili smo, da so velebitske kuščarice pogostejše in intenzivnejše okužene. Prav tako smo prepoznali pogostejšo okuženost pri večjih osebkih, vendar le na dveh lokacijah. V nasprotju s pričakovanji smo v dveh lokacijah zaznali nižjo intenziteto okužbe pri večjih osebkih. Intenziteta okužbe je bila večja pri samcih. Razlik med populacijami, ko kuščarice živijo v sintopiji (prisotni obe vrsti) ali v alotopiji (prisotna le ena vrsta), nismo uspeli potrditi. Prav tako nismo uspeli potrditi razlik med populacijami, ki poseljujejo različne nadmorske višine. Opaženi rezultati kažejo, da v kompetitivnem odnosu med kuščaricama obstaja asimetrična okužba s paraziti. Velebitska kuščarica je pogostejše in intenzivnejše okužena, kar bi lahko imelo vpliv na medvrstne odnose, kot je kompeticija in sobivanje proučevanih vrst kuščaric.

## KEYWORDS DOCUMENTATION

DN Du2  
DC 598.161.212(043.2)  
CX lacertids, parasites, prevalence, intensity, *Iberolacerta horvathi*, *Podarcis muralis*, interspecies interactions  
AU DAJČMAN, Urban, univ. dipl. biol. (UN)  
AA KOSTANJŠEK, Rok (supervisor), ŽAGAR, Anamarija (co-advisor), TRONTELJ, Peter (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study Programmes of Ecology and biodiversity  
PY 2020  
TI IMPACT OF HAEMOGREGARINES ON INTERSPECIFIC INTERACTIONS OF LACERTID LIZARDS IN THE CASE OF TWO COMPETING SPECIES: IBEROLACERTA HORVATHI AND PODARCIS MURALIS IN SLOVENIA  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
NO VII, 66 p., 10 tab., 11 fig., 2 app., 184 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Our thesis aimed to recognize which intraerythrocytic blood parasites infect two species of Slovene lacertids, common wall lizard (*Podarcis muralis*), and Horvath's rock lizard (*Iberolacerta horvathi*). We confirmed the identity of the parasites using molecular approaches by sequencing a part of the 18S rRNA gene. All observed parasite individuals belong to the genus *Karyolysus*, known by parasitizing reptiles and lacertids specifically. *Karyolysus* is a genus of protozoan hamogreagrines. Further work included the analysis of prevalence and intensity of parasitic infection in both species of lizards. We compared prevalence and intensity between species, sexes, size, locations, altitudes, and whether the populations live in syntopy or alotomy. We confirmed that the prevalence and intensity of blood parasites were significantly higher in Horvath's rock lizards. We also observed a higher prevalence of parasites in larger individuals, but this was found in only two locations. Contrary to expectations, we found in two localities that the intensity of parasites was lower in larger animals. The intensity was also higher in males. We did not confirm any differences in prevalence or intensity between syntopic and alotopic populations. We also did not observe any differences related to altitude. Our results confirm an asymmetric parasitic prevalence and intensity between the two competing lizard species that may have a potential influence on their competitive relationship and coexistence.

## KAZALO VSEBINE

|  |             |
|--|-------------|
| <b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>                 | <b>III</b>  |
| <b>KEYWORDS DOCUMENTATION.....</b>                               | <b>IV</b>   |
| <b>KAZALO VSEBINE .....</b>                                      | <b>V</b>    |
| <b>KAZALO SLIK .....</b>   | <b>VII</b>  |
| <b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>                                   | <b>VIII</b> |
| <b>SLOVARČEK.....</b>  | <b>IX</b>   |
| <b>1 UVOD .....</b>  | <b>1</b>    |
| <b>2 PREGLED OBJAV .....</b>                                     | <b>3</b>    |
| 2.1 PREUČEVANI VRSTI KUŠČARIC .....                              | 3           |
| 2.1.1 Pozidna kuščarica ( <i>Podarcis muralis</i> ) .....        | 3           |
| 2.1.2 Velebitska kuščarica ( <i>Iberolacerta horvathi</i> )..... | 4           |
| 2.1.3 Primerjava vrst in medvrstni odnosi .....                  | 5           |
| 2.2 KRVNI PARAZITI KUŠČARIC .....                                | 7           |
| 2.3.1 Vplivi parazitov na gostitelja.....                        | 7           |
| 2.3.2 Vplivi na medvrstne odnose.....                            | 9           |
| 2.2.3 Lastnosti skupine Hemogregarina .....                      | 11          |
| 2.2.4 Hepatozoon in Karyolysus .....                             | 12          |
| 2.2.4.1 Hepatozoon.....  | 12          |
| 2.2.4.2 Karyolysus.....  | 13          |
| 2.2.5 Vplivi krvnih parazitov na kuščarice .....                 | 13          |
| 2.2.6 Vplivi na medvrstne odnose pri plazilcih .....             | 15          |
| <b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>                                | <b>16</b>   |
| 3.1 IZBIRA OBMOČJA IN OPIS PREUČEVANIH LOKACIJ .....             | 16          |
| 3.2 TERENSKO DELO.....   | 17          |
| 3.2.1 Vzorčenje.....   | 17          |
| 3.3 LABORATORIJSKO DELO .....                                    | 19          |
| 3.3.1 Priprava in pregled krvnih razmazov .....                  | 19          |
| 3.3.2 Molekularne metode.....                                    | 20          |
| 3.3.2.1 Izolacija DNA.....                                       | 20          |
| 3.3.2.2 Molekularna detekcija parazitov in sekvenciranje .....   | 21          |
| 3.4 FILOGENETSKA, STATISTIČNA IN PROSTORSKA ANALIZA .....        | 22          |
| 3.4.1 Urejanje sekvenc in filogenetske analize .....             | 22          |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.4.2 Statistična obdelava podatkov prisotnosti in stopnje parazitizma .....</b> | <b>31</b> |
| <b>3.4.3 Prostorska analiza in predstavitev podatkov .....</b>                      | <b>32</b> |
| <b>4 REZULTATI.....</b>   | <b>33</b> |
| 4.1 IDENTITETA PARAZITOV .....  | 33        |
| 4.2 PRIMERJAVA PREVALENCE IN INTENZITETE PARAZITIZMA .....                          | 35        |
| <b>4.2.1 Prevalenca in intenziteta .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>5 RAZPRAVA.....</b>  | <b>41</b> |
| 5.1 IDENTIFIKACIJA PARAZITOV .....  | 41        |
| 5.2 PREVALENCA IN INTENZITETA PARAZITOV .....                                       | 42        |
| 5.3 VPLIV NA KUŠČARICI .....  | 44        |
| <b>6 SKLEPI .....</b>   | <b>47</b> |
| <b>7 POVZETEK.....</b>  | <b>48</b> |
| <b>8 VIRI .....</b>   | <b>50</b> |



## KAZALO SLIK

|   |    |
|---|----|
| Slika 1: Razširjenost proučevanih vrst kuščaric.....                            | 3  |
| Slika 2: Pozidna kuščarica.....   | 4  |
| Slika 3: Velebitska kuščarica.....  | 5  |
| Slika 4: Shematski prikaz možnih odnosov med paraziti in kompetitorji.....      | 10 |
| Slika 5: Primer vidnega polja krvnega razmaza.....                              | 12 |
| Slika 6: Zemljevid vzorčenih lokacij s številom vzorčenih osebkov po vrsti..... | 17 |
| Slika 7: Zemljevid novo pridobljenih haplotipov po vrstah in lokacijah.....     | 33 |
| Slika 8: Poddrevo celotnega filogenetskega drevesa, rod <i>Karyolysus</i> ..... | 35 |
| Slika 9: Zemljevid vzorčenih lokacij.....                                       | 36 |
| Slika 10: Grafični prikaz rezultatov prevalence krvnih parazitov.....           | 38 |
| Slika 11: Grafični prikaz rezultatov intenzitete okužbe s krvnimi paraziti..... | 40 |

## KAZALO PREGLEDNIC

|  |    |
|--|----|
| Preglednica 1: Preglednica lokacij in terenskega vzorčenja.....  | 16 |
| Preglednica 2: Pridobljeni genetski vzorci .....   | 18 |
| Preglednica 3: Preglednica sestavin za pripravo ene reakcije PCR z AmpliTAQ gold .....                                       | 21 |
| Preglednica 4: Preglednica pogojev za PCR .....  | 22 |
| Preglednica 5: Preglednica vzorcev, vključenih v filogenetsko analizo. ....  | 22 |
| Tabela 6: Delovni pogoji za Mr.Bayes .....   | 30 |
| Preglednica 7: Preglednica novo pridobljenih haplotipov in vir haplotipa .....   | 34 |
| Preglednica 8: Primerjava modelov za prevalenco.....   | 37 |
| Preglednica 9: Rezultati Likelihood-ratio analize vpliva spremenljivk končnega modela na prevalenco krvnih parazitov .....   | 37 |
| Preglednica 10: Primerjava modelov za intenziteto .....  | 39 |
| Preglednica 11: Rezultati Likelihood-ratio analize vpliva spremenljivk končnega modela na intenziteto krvnih parazitov ..... | 39 |

## SLOVARČEK

SVL – Snout vent length – Dolžina od vrha gobca do kloake

GLM – Generalized linear model – Oblika linearne regresije primerna za analizo neparametrično porazdeljenih podatkov z uporabo link funkcije

PCR – Polymerase chain reaction – Verižna reakcija s polimerazo; uporablja se za pomnoževanje želenega fragmenta DNK

Sintopičnost – Pojav, ko dve vrsti poseljujeta isti prostor

Alotopičnost – Nasprotje sintopičnosti; vrsti ne poseljujeta istega prostora

Prevalenca – Delež okuženih osebkov

Intenziteta – Relativni delež osebkov parazita znotraj gostitelja. V našem primeru delež okuženih eritrocitov kuščaric.

Abundanca – Relativni delež osebkov vrste v okolju. Večinoma merjen kot število osebkov v nekem vzorcu.

## 1 UVOD

Vpliv parazitov na medvrstne odnose, predvsem kompeticijo, še ni dovolj raziskan. Paraziti za svoje preživetje izkoriščajo gostitelja in s tem negativno vplivajo na osnovne vidike življenja gostitelja (Garrido in Perrez-Mellado, 2013). Z učinki, ki jih imajo na delovanje gostiteljevega organizma, vplivajo tudi na kompetitivne medvrstne odnose različnih gostiteljev (Poulin, 1999). Znan je primer vpliva plazmodijev na soobstoj več vrst kuščarjev iz rodu *Anolis* s karibskega arhipelaga, kjer je okuženost dominantne, generalistične vrste gostitelja s parazitom zagotavljala prisotnost bolj specializirane vrste gostitelja (Schall, 1992).

Problematika, s katero se v nalogi ukvarjamo v širšem kontekstu, je vpliv krvnih parazitov na medvrstni odnos pri dveh vrstah kuščaric kot gostiteljih. V raziskavo sta bili vključeni dve vrsti kuščaric kot gostiteljici krvnih parazitov, ki sta prisotni v Sloveniji: habitatno generalistična pozidna kuščarica (*Podarcis muralis*) in specializirana velebitska kuščarica (*Iberolacerta horvathi*). Obe vrsti pogosto poseljujeta skupne habitate v jugovzhodni Sloveniji (Žagar in sod., 2016). Znano je, da zaradi ekološke podobnosti med njima prihaja do kompetitivnih interakcij (Žagar in sod., 2016). Obe vrsti sta lahko okuženi s krvnimi paraziti, ki bodo lahko vplivali na njun medvrstni odnos.

V prvi vrsti smo se ukvarjali z detekcijo in identifikacijo krvnih parazitov pri kuščaricah, saj do sedaj v Sloveniji ni znano, kateri krvni paraziti so prisotni pri kuščaricah. Glede na pretekle raziskave evropskih plazilcev pri obeh vrstah kuščaric pričakujemo haemogregarine rodov *Hepatozoon* in *Karyolysus*.

Nadalje smo se ukvarjali s kvantifikacijo parazitov v gostitelju, saj pogostost pojavljanja parazitov v populaciji gostitelja in intenziteta parazitiranosti vplivajo na delovanje gostiteljevega organizma. Možni vplivi prisotnosti parazitov, znani iz objavljene literature, so oslavljen imunski sistem, spremenjen metabolizem, vedenjske spremembe in mnogi drugi.

Z zasnovo vzorčenja populacij obeh gostiteljev, kjer smo vključili alotopične in sintopične populacije, smo si zagotovili možnost vpogleda v prisotnost in kvantifikacijo parazitov pri obeh vrstah v dveh situacijah: ko je vrsta sama in ni pritiska medvrstnega odnosa in ko je prisotna druga kompetitivna vrsta.

Na podlagi obstoječe literature o preučevanih vprašanjih smo oblikovali naslednje hipoteze:

1. Do sedaj nepoznani krvni paraziti pri preučevanih vrstah kuščaric bodo pripadali rodu *Karyolysus* ali *Hepatozoon*.
2. Večji osebki kuščaric bodo imeli višjo prevalenco in intenziteto krvnih parazitov.
3. Samci kuščaric bodo imeli višjo prevalenco in intenziteto krvnih parazitov.
4. Velebitska kuščarica bo zaradi svoje specialistične narave imela višjo prevalenco in intenziteto krvnih parazitov.
5. Na lokacijah, kjer se vrsti pojavljata sintopično, bo zaradi dodatnega negativnega vpliva kompeticije prevalenca in intenziteta krvnih parazitov pri obeh vrstah višja.

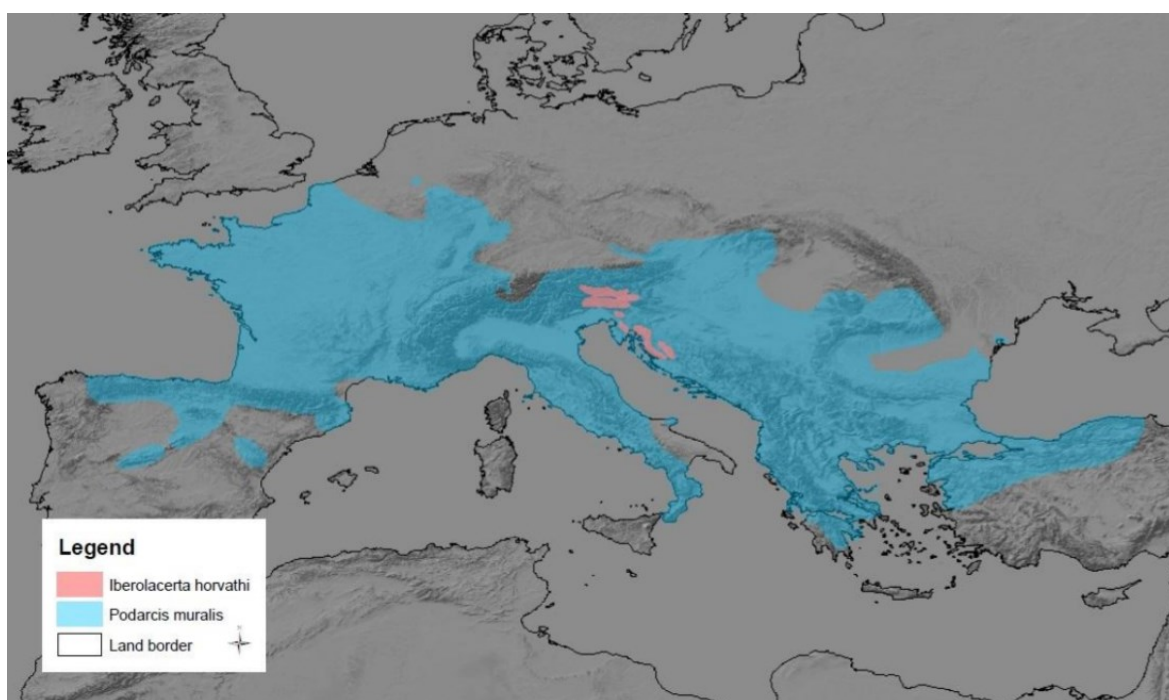
Pričujoča naloga predstavlja prvo strukturirano proučevanje krvnih parazitov kuščaric v Sloveniji. Rezultati so pomembni tako za poznavanje biologije in ekologije kuščaric kot tudi za bolj poglobljeno razumevanje vloge parazitov v ekosistemih in v medvrstnih odnosih. Del pomena je tudi prepoznavanje identitete krvnih parazitov kuščaric v Sloveniji. Rezultati naloge lahko imajo tudi varstven pomen; obe vrsti kuščaric sta v Sloveniji zavarovani. Poseben varstven pomen ima za Velebitsko kuščarico, ki je endemit Alp in dinarskega sveta, ki ga ogroža spreminjanje habitatov in v morda v prihodnosti tudi klimatske spremembe. Natančno poznavanje ekologije te specializirane vrste je torej nujno za zagotovitev njenega preživetja.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PREUČEVANI VRSTI KUŠČARIC

#### 2.1.1 Pozidna kuščarica (*Podarcis muralis*)

Pozidna kuščarica je najbolj razširjena vrsta rodu *Podarcis* (Sillero in sod., 2014) in sodi med najpogostejše vrste plazilcev v Evropi, kjer poseljuje raznolike habitate velikega dela naravnih in antropogenih okolij (Speybroeck in sod., 2016). Taksonomsko sodi v podred kuščarjev (Sauria), družino kuščaric (Lacertidae) in rod skalnih kuščaric (*Podarcis*) (Kryštufek in Janžekovič, 1999). V Sloveniji je vrsta pogosta in splošno razširjena (Tome, 1996; Mršić, 1997; Tome, 2001; Krofel in sod., 2009, Breg in sod., 2010).



Slika 1: Razširjenost pozidne kuščarice, *Podarcis muralis* (modra) in velebitske kuščarice, *Iberolacerta horvathi* (rdeča). Povzeto po Žagar in sod., 2016b.

Poseljuje raznolike življenjske prostore; na severu raje izbira suhe, tople skalnate lokacije; južneje izbira tudi bolj vlažne, senčnate prostore (Breg in sod., 2010). Pogostejša je v območjih z nizko nadmorsko višino (Žagar, 2008; Krofel in sod., 2009). Prepoznanih je bilo več genetskih linij, ki sovpadajo z glaciacijskimi refugiji severno mediteranskih polotokov (Balkanski, Apeninski, Iberijski) (Salvi in sod., 2013).



Slika 2: Pozidna kuščarica (*Podarcis muralis*) foto: Miha Krofel

### **2.1.2 Velebitska kuščarica (*Iberolacerta horvathi*)**

Tako kot pozidna kuščarica je tudi velebitska kuščarica, z drugim imenom Horvatova kuščarica, pripadnik družine kuščaric (Lacertidae). Je edina predstavnica rodu *Iberolacerta* v Alpah in na Balkanu; ostali predstavniki se, kot nakazuje tudi njeno ime, pojavljajo na Iberskem polotoku (Carranza in sod., 2004). Razširjena je od severnih območij hrvaških Dinaridov (De Luca, 1989; Krofel in sod., 2009; Žagar in sod., 2014) do predalpskega in alpskega dela južne Avstrije in severovzhodne Italije (Lapini in sod., 2004; Rassati, 2010; Cábelo in sod., 2007), pri čemer je razširjena tudi v delih Slovenije (Krofel in sod., 2009). V Sloveniji se pojavlja v alpski in dinarski regiji (Krofel in sod., 2009).



Slika 3: Velebitska kuščarica (*Iberolacerta horvathi*) foto: Miha Krofel

Velebitska kuščarica izbira osončena, neporasla in redko porasla območja (Speybroeck in sod., 2016). Je izrazito kamnoljuba vrsta, ki se pojavlja predvsem na karbonatnih skalnatih podlagah (Speybroeck in sod., 2016). Pogostejša je na višjih nadmorskih višinah, vendar so znani tudi primeri pojavljanja do nižin, tudi iz Slovenije (Žagar, 2016a)

### 2.1.3 Primerjava vrst in medvrstni odnosi

Vrsti sta si morfološko podobni; najlažje ju med seboj ločimo po različni razporeditvi nadnosničnih lusk; pri velebitski kuščarici se nadnosnični luski ne stikata (Mršič, 1997). Edina do sedaj opisana morfološka značilnost, ki se je izkazala za različno, je višina glave (Žagar in sod., 2017); prav tako so pozidne kuščarice lahko po telesni masi težje kot velebitske (Žagar in sod., 2012). Razlike v višini glave lahko vplivajo na izbiro skrivališč in moč ugriza; slednji je bil izmerjeno šibkejši pri velebitski kuščarici (Žagar in sod., 2017). Obe kuščarici izkazujeta tudi morfološki spolni dimorfizem (Strijbosch in sod., 1980; Graceveva in sod., 2008; De Luca, 1989, Žagar in sod., 2012).

Simpatrično in sintopično pojavljanje proučevanih vrst je znano tako iz tujine (Bischoff, 1984; Lapini in sod., 1993; Rassati, 2010; De Luca, 1989) kot tudi v Sloveniji (Žagar in sod.,



2007, 2008a; Krofel in sod., 2009). Njuna raba habitata je na območju simpatrije podobna z določenimi razlikami; pozidna kuščarica zaseda bolj raznolike habitate kot velebitska kuščarica, ki je skoraj izključno vezana na skalnate habitate (Cabela in sod., 2007; Žagar, 2016). Analiza razširjenosti v Sloveniji je pokazala, da je pozidna kuščarica pogostejša v nižjih legah, velebitska pa v višjih legah (Žagar, 2016).

Kuščarice iz sintopičnih populacij imajo podobno prehrano (De Luca, 1992; Richard in Lapini, 1993; Capizzi, 1999). Obe vrsti svoj primarni plen, talne in leteče členonožce, lovita s kombinacijo aktivnega lova in čakanja na mestu (De Luca, 1992; Capizzi, 1999). Iz Slovenije je za pozidno kuščarico znan primer kanibalizma in znotrajvrstne oofagije (Žagar in Carretero, 2012; Žagar in sod., 2016).

Temperatura v okolju ima na kuščarice, ki so organizmi z nestalno telesno temperaturo, velik vpliv. Znano je, da med proučevanima vrstama prihaja do razlik v vedenjsko-fiziološkem odzivu na temperaturo v okolju. Velebitska kuščarica je sposobna vedenjsko regulirati svojo telesno temperaturo v ožjem območju telesnih temperatur (je natančnejši termoregulator) (Žagar, 2016b). Zaznane so tudi razlike v metabolizmu, kjer ima velebitska kuščarica višjo encimatsko kapaciteto za metabolizem v mišičnem tkivu, kar omogoča višjo stopnjo metabolizma pri enakih telesnih temperaturah (Žagar in sod., 2015). To sta verjetno prilagoditvi, ki velebitski kuščarici omogočata lažje preživetje v hladnejših visokogorskih območjih, kjer so krajše sezone ugodnih okoljskih temperatur za njihovo aktivnost (Žagar in sod., 2015). Po drugi strani je natančnejša vedenjska termoregulacija lahko energetsko zahtevnejša v smislu, da porabijo več časa za termoregulacijo kot bolj generalistična pozidna kuščarica (Žagar, 2016b). Vrsti se razlikujeta tudi v stopnji izgube vode; ta je nekoliko višja pri pozidni kuščarici (Osojnik in sod., 2013).

Vrsti sta dnevno aktivni med marcem in oktobrom (De Luca, 1992; Lapini in sod., 1993). Ker imata vrsti podobne vzorce aktivnosti, način lova in prehranske zahteve, ju uvrščamo v isti ekološki ceh (Root, 1967, Schoener, 1977), kjer je pričakovana visoka verjetnost medvrstnih odnosov (Schoener, 1977). Torej, verjetnost medvrstnih odnosov v sintopičnih populacijah preučevanih vrst kuščaric je zato pričakovana (Žagar, 2016b). Kljub temu pa velja omeniti, da določene medvrstne razlike (v morfologiji, fiziologiji in vedenju, glej

zgoraj) nakazujejo na določeno razbremenitev pritiska v sintopičnih populacijah, ki omogočajo njun soobstoj (Žagar, 2016b).

Kompeticija kot medvrstni odnos je za organizme dejavnik stresa, ki lahko vodi v delitev ekološke niše (Cody in Diamond, 1975, Arnold 1987, Vrezec in Tome, 2004). Paraziti lahko imajo posreden vpliv na medvrstni odnos gostiteljev, kjer prisotnost parazita eni vrsti bodisi koristi bodisi ji škoduje (Case in Gilpin, 1974). Da pride do interference, mora prisotnost parazita močnejše vplivati na eno od vključenih gostiteljskih vrst (Case in Gilpin, 1974). Takšne interakcije bi lahko bile pomembne za razumevanje populacijskih dinamik med lokalno endemičnimi vrstami in splošno razširjenimi vrstami, kot sta vrsti kuščaric v tej nalogi.

## 2.2 KRVNI PARAZITI KUŠČARIC

Paraziti so organizmi, ki živijo v ali na drugem organizmu, od njega črpajo hranila, ga uporabljajo kot življenjski prostor in imajo nanj negativen vpliv (Lucius in sod., 2017). Parazitizem je ena najuspešnejših in najbolj razširjenih življenjskih strategij; po ocenah nekaterih avtorjev je kar 50 % vseh evkariontskih organizmov parazitov oziroma je vsaj del njihovega življenjskega cikla parazitski (Lucius in sod., 2017). Princip parazitizma, kjer en udeleženec (parazit) izkorišča drugega (gostitelj), se nanaša na viruse, patogene mikroorganizme in večcelične parazite. Po tem principu jih ne ločujemo po taksonomiji, ampak jih združujemo po skupnem parazitskem načinu življenja (Lucius in sod., 2017). Grobo lahko parazite ločimo na ektoparazite, ki živijo na površini gostitelja, in endoparazite, ki živijo v gostitelju (Lucius in sod., 2017). V naši nalogi se ukvarjamo s tipom endoparazitov, ki živijo v celicah gostitelja; imenujemo jih znotrajcelični paraziti (Lucius in sod., 2017). Življenjski krog parazitov lahko vključuje samo enega gostitelja – je monoksen, ali več gostiteljev – heteroksen, kot je v našem primeru (Lucius in sod., 2017).

### 2.3.1 Vplivi parazitov na gostitelja

Paraziti lahko na gostitelje vplivajo na več načinov; spreminjajo lahko abundanco, neposredno vplivajo na fitnes vrste, spremenijo fenotipske lastnosti (Poulin, 1999).

Pri heteroksenih parazitih je sprva treba omeniti razliko med vmesnim in končnim gostiteljem. Vmesni gostitelj je gostitelj, v katerem parazit živi in se nespolno razmnožuje; v končnem gostitelju poteka spolno razmnoževanje parazita (Lucius in sod., 2017).

Pomembna lastnost gostitelja je njegova dovzetnost za okužbo, ki jo opredeljujejo vedenjske, fiziološke in morfološke lastnosti gostitelja in njegovo zdravstveno stanje (Lucius in sod., 2017).

Vpliv parazita na gostitelja ni odvisen samo od lastnosti gostitelja, temveč tudi od okolja, v katerem oba sta (Holt in Pickering., 1985). Možna razlaga za odvisnost vpliva parazita na gostitelja v danem okolju je tudi raznolikost med osebki gostiteljske vrste (velikost, stanje imunskega sistema, prehrana) (Holmes in Zohar. 1990). Munger in Holmes (1988) sta z empirično študijo pokazala, da kvaliteta prehrane in dostopnost vitaminov različno vplivata na rast z tripanosomi okuženih veveric vrste *Sprempophilus richardsonii*, ki so v naravnem okolju sicer vedno okužene. V primeru kakovostne prehrane je bila rast veveric zavrta; ko so jim dostop hrane omejili, so te zrasle do polne velikosti. Okužba torej lahko vodi v negativne ali pozitivne učinke in je odvisna od konteksta (Goater in sod., 2014).

Paraziti s svojo prisotnostjo izrazito vplivajo na gostiteljev metabolizem. Primerjave stopnje metabolizma ob mirovanju (MSP) kažejo, da se ta poveča v okuženih osebkih, bodisi pri rakah, podganah ali ribah, nekaterih sesalcih in pticah (Robar in sod., 2011; Giorgi in sod., 2001). V mnogih primerih ima sprememba stanja metabolizma posreden vpliv tudi na druge življenjske procese, kot so rast, vedenje ali sposobnost termoregulacije gostitelja (Goater in sod., 2014). Hkrati poznamo vrsto primerov, kjer se MSP ne spremeni (Robar in sod., 2011). Kako si naj to razlagamo? Morda laboratorijski poskusi niso zadovoljujoči za razlago dolgo obstoječih odnosov in kroničnih asociacij med paraziti in njihovimi gostitelji (Robar in sod., 2011), kar pa ne pojasni razlik v vplivu na MSP, kjer isti parazit okuži zelo podobna gostitelja (Goater in sod., 2014). Pri postrvih je tako okužba z mikrosporidiji pri eni vrsti MSP spremenila za 90 % pri drugi le za 55 % (Powell in sod., 2005). Alternativna razlaga lahko leži v različnih zmožnostih kompenzacije okužbe med vrstami gostiteljev.

Paraziti imajo negativen vpliv na gostitelja, zato je pričakovano, da bodo imeli negativen vpliv na njihov fitnes, kar je tudi eden od najbolj preučevanih vidikov vplivov parazitov na gostitelje (Goater in sod., 2014). Žabe, ki so kot paglavci izpostavljene sesačem, imajo ob okužbi tudi do 60 % nižjo stopnjo preživetja (Johnson in sod., 1999). Kasnejše raziskave so podobne rezultate potrdile tudi pri osmih drugih vrstah žab (Jonson in sod., 2012). Podobne rezultate poznamo tudi pri ribah (Lemly in Esch, 1984; Heins in sod., 2011), kjer prisotnost

parazita najverjetneje poveča energetski napor gostitelja do te mere, da le-ta pogine (Lemly in Esch, 1984). Tudi pri pticah je prisotnost parazitov in intenziteta okužbe dejavnik, ki vpliva na povišano smrtnost (Hudson in sod., 1998). Znano je tudi, da je stopnja okuženosti naravno uplenjenih osebkov koconogih višja v primerjavi z osebki, ki jih uplenijo lovci ali povozijo vozila (Hudson in sod., 1992). Glede na to, da je pri mnogih organizmih telesna velikost dejavnik, ki pozitivno vpliva na uspešnosti reprodukcije, tudi vpliv na rast posredno vpliva na fitness. Pri vodnih bolhah so znani primeri, kjer okužba vodi v kasnejše razmnoževanje in manjše število potomcev (Ebert, 2005), pri žabah pa upočasnjeno rast mladičev, ki je bila posledica slabšega prehranjevanja in vodi v kasnejšo nižjo stopnjo reprodukcije (Goater in Ward, 1992).

Poleg vplivov na gostitelja v obliki odtegotovanja hranil in neposredne poškodbe tkiv in odzivov obrambnega sistema gostitelja paraziti pogosto vplivajo tudi na metabolne poti gostitelja in posledično na njegovo rast in razmnoževanje (Jong-Brink in sod., 2001). Okužba tako lahko vodi tudi v kastracijo gostitelja (Michalakis, 2009), gigantizem (Minchella, 1985), spremembo reproduktivnega obdobja (Minchella in Loverde, 1981), spremembe v razvoju osebka (Lafferty, 1993; Fredensbourg in Poulin, 2006). Kljub številnim primerom ostaja področje posrednih vplivov na gostitelja slabo raziskano (Goater in sod., 2014).

Ob interakcijah parazita in gostitelja je ključno tudi razumevanje, da so lahko spremembe v gostitelju zgolj odziv na okužbo ali pa okužba izzove specifične spremembe videza, vedenja in imunskega sistema, ki so posledica adaptivne narave parazitov in s katerimi le-ti zagotavljajo svoje preživetje in uspešnejši prenos parazitov med gostitelji (Goater in sod., 2014).

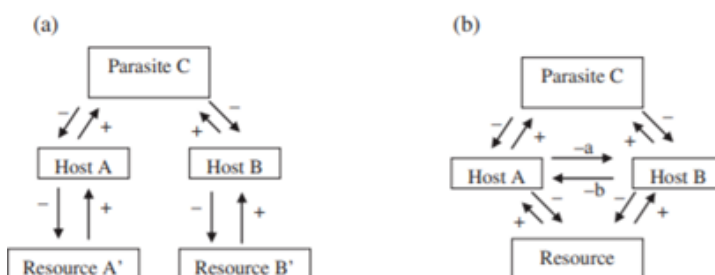
### **2.3.2 Vplivi na medvrstne odnose**

Z znanjem o vplivih parazitov na gostitelje se odpira pomembno vprašanje potencialnih vplivov parazitov na trofične interakcije (MacNeil in sod., 2003; Tompkins in sod., 2003) in procese v združbah (Wilmer in sod., 2006).

Vrsti, ki si delita parazita, sta lahko kompetitorja, drug drugemu plen, plenita iste vrste ali sta v odnosu izključno preko parazita (Hatcher in sod., 2006). Paraziti pa lahko na interakcijo dveh vrst gostiteljev vplivajo tudi, če si ti vrsti ne delita gostitelja (Hatcher in sod., 2006). V

pregledu literature se bomo omejili na del, ki se ukvarja s vplivi parazitskih okužb na kompetitivne vrste, kot sta proučevani vrsti kuščaric.

Klasična raziskava na to temo je že leta 1948 pokazala, da prisotnost parazita lahko spremeni kompetitivni odnos med dvema vrstama hroščev (Park, 1948). V tem kontekstu sta bila v ekologiji vpeljana dva pomembna pojma. Ko dve vrsti nista v kompeticiji neposredno, temveč zgolj preko skupnega parazita, to imenujemo navidezna kompeticija (Holt, 1977). Ta pojav je prepoznan pri parazitih plenilcev (Holt 1977; Holt & Pickering 1985; Holt in Lawton, 1994). Drug pomemben pojem je s paraziti posredovana kompeticija. Gre za odnos, kjer gostiteljski sta vrsti v kompeticiji neposredno, prisotnost parazita v eni ali obeh pa vpliva na razplet kompeticije (Hatcher in sod., 2006). V primeru, če ima parazit različen vpliv na fitnes ali kompetitivno moč kompetitivnih vrst, lahko le-ta bistveno vpliva na medvrstni odnos in s tem na populacije gostiteljev (Price in sod., 1986; Hudson in Greenman, 1998).



Slika 4: Shematski prikaz možnih odnosov med paraziti in kompetitorji. A – navidezna kompeticija, B – parazitsko posredovana kompeticija (Parasite = Parazit, Host = Gostitelj, Resource = Dobrina), povzeto po Hatcher in sod., 2006.

Navidezna kompeticija je bila sprva opisana kot recipročno negativen odnos med vrstama (Holt, 1977), a se ta pogled spreminja z novimi dokazi, da je odnos pogosto izrazito asimetričen (Chapin in Bonsall, 2000). Čeprav prvoten teoretski pristop do razumevanja navidezne kompeticije ne obravnava kompeticije med gostiteljema (Holt, 1977), je lahko sistem kljub temu v pomoč pri razumevanju odnosov med neposrednimi kompetitorji. Kompetitivni vrsti, ki si delita parazita neposredno, sta v kompeticiji preko deljenih dobrin (hrana, prostor) in posredno preko prisotnosti parazita (Slika 4) (Hatcher in sod., 2006). V takšnih primerih, kjer dobrine niso dokončno izkoriščene, lahko gre tako kljub neposredni kompeticiji predvsem za navidezno kompeticijo preko parazita. V primeru, če dobrin prične

primanjkovati, se v sistemu izkaže za pomembnejšo klasična kompeticija med gostiteljema, ki ne vključuje prisotnosti parazita (Hatcher in sod., 2006).

V nasprotju z navidezno kompeticijo gre pri s paraziti posredovani kompeticiji vedno za odnos, kjer sta gostitelja v neposredni kompeticiji za dobrine, prisotnost parazita pa modificira kompetitivno sposobnost enega ali obeh kompetitorjev (Hatcher in sod., 2006). Tovrstni sistemi so kompleksni in je zato v njih pogosto težko definirati relativne vplive posameznih medvrstnih odnosov (Hudson in Greenman, 1998; Chaneton in Bonsall, 2000).

### 2.2.3 Lastnosti skupine Hemogregarina

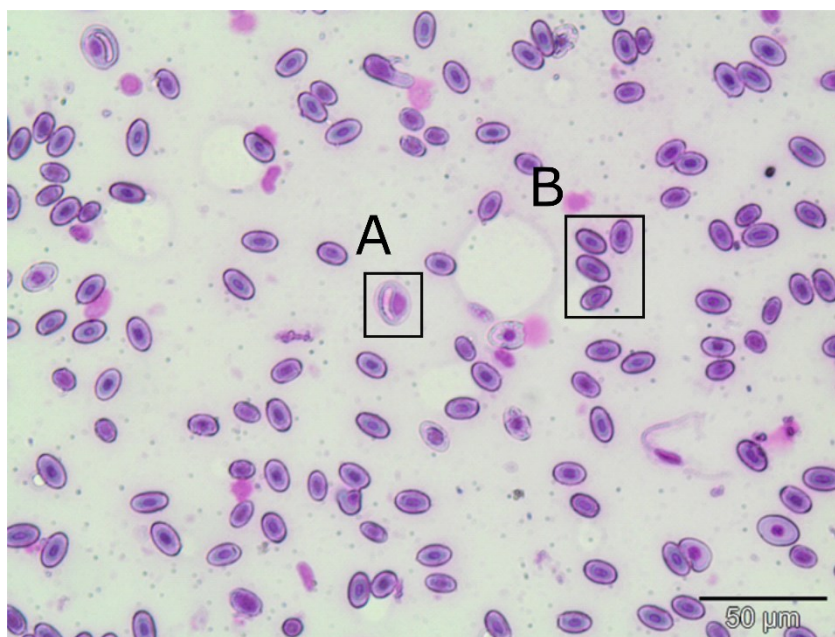
Haemogregarine se taksonomsko uvrščajo v deblo Apicomplexa in podrazred Adeleorina. Pojavljajo se pri ribah, dvoživkah, plazilcih, pticah in mnogih sesalcih. Pri plazilcih so to najpogostejši krvni paraziti in so znani iz vseh razredov živečih plazilcev (Telford, 2016). Imajo posreden življenjski krog; za prenos med gostitelji potrebujejo vektor, v katerem plazilce okužijo preko organizmov, kot so klopi ali pršice (Telford, 2016). V kopenskih okoljih je njihov življenjski cikel sestavljen iz štirih stadijev: merogonijo in gamogonijo v vretenčarskem gostitelju ter oploditvijo in sporogonijo v nevretenčarskem gostitelju (Telford, 2016).

Tradicionalno je skupina razdeljena na štiri družine; Dactylosomatidae, Haemogregarinidae, Hepatozoidae in Karyolysidae (Barta in sod., 2012). Znanih je že mnogo primerov možnih parafiletskih uvrstitev predvsem predstavnikov rodu *Hepatozoon*, ki so jih pokazali sodobnejši molekularni pristopi (Maia in sod., 2011; Tomé in sod., 2012; Tomé in sod., 2013; Karadjian in sod., 2015).

Trenutno so na podlagi življenjskih ciklusov in filogenetskih raziskav predlagane vsaj tri do štiri podskupine hemogregarin (Karadjian in sod., 2015, Maia in sod., 2016), a natančni filogenetski odnosi še niso znani. Avtorji navajajo tudi, da je morfološka identifikacija pogosto zahtevna in lahko zavajajoča. Karadjian in sod., 2015, predvideva štiri skupine: *Hepatozoon*, *Karyolysus*, *Hemolivia* in *Bartazoon*. Sledenje tej razdelitvi je v skladu tudi s tremi predhodno predlaganimi skupinami v Maia in sod., 2014, kjer je dodatna razdelitev skupin omejena le na skupine, ki se ne pojavljajo pri kuščarjih (*Hemolivia*, *Bartazoon*). Skupini, ki sta del naše naloge (*Karyolysus*, *Hepatozoon*) in se pojavljata pri kuščarjih, sta definirani enako kot v Karadjian in sod., 2015.

Primerjava zaznave parazitov te skupine v krvnih vzorcih vretenčarjev je pokazala, da je najzanesljivejša metoda kvantitativna polimerazna verižna reakcija (qPCR) (Maia in sod., 2011, Maia in sod., 2014), ki nam lahko poda tudi podatke o prevalenci in intenziteti okužbe v populaciji. Žal je ta metoda tudi najdražja, zato je lahko alternativa za identifikacijo tudi kombinacija metod z uporabo klasične verižne reakcije s polimerazo in mikroskopskega pregledovanjem krvnih razmazov (Maia in sod., 2014).

#### 2.2.4 Hepatozoon in Karyolysus



Slika 5: Primer vidnega polja krvnega razmaza, na katerem so vidne zdrave in okužene rdeče krvničke pozidne kuščarice (A – okužena rdeča krvnička, B – zdrave rdeče krvničke) foto: Urban Dajčman

##### 2.2.4.1 Hepatozoon

Predstavniki te skupine so med najpogosteje preučevanimi haemogregarinami. Razširjeni so v mnogih vrstah plazilcev, dvoživk in sesalcev (Telford, 2016). Prisotni so tudi v mnogih nevretenčarskih gostiteljih, kot so muhe, klopi, pršice in komarji (Telford, 2016). Prenos med nevretenčarjem in plazilcem se zgodi tako, da plazilec upleni nevretenčarja, v katerem so razviti gamonti parazita (Telford, 2016). Pri kuščaricah je znano, da življenjski cikel parazitov rodu *Hepatozoon* vključuje le dva gostitelja, vmesnega vretenčarskega in končnega nevretenčarskega gostitelja (Smith, 1996; Telford 2009). Pri kačah so znani tudi primeri, kjer je vključen še en vmesni vretenčarski gostitelj. Ker kače ne plenijo okuženih

vektorjev, kot so klopi ali komarji, se okužijo z užitjem manjšega okuženega plazilca ali dvoživke (Smith, 1996; Tome in sod., 2012).

#### 2.2.4.2 Karyolysus

Rod je svoje ime dobil po značilnosti gamontov *Karyolysus*, katerih prisotnost pogosto vodi v morfološke spremembe in razpad jedra eritrocita pri vretenčarskem gostitelju (Telford., 2009). Skupno je v rodu *Karyolysus* trenutno 18 opisanih vrst (Zechmeisterová in sod., 2019). So paraziti palearktičnih kuščarjev; prepoznani so bili predvsem iz srednje in vzhodnoevropskih držav (Álvarez-Calvo, 1975; Haklová-Kočíková in sod., 2014) pa tudi iz Skandinavije (Svahn, 1974; Svahn, 1975). Nedavno je bilo opisanih sedem novih vrst iz Kanarskih otokov (Tomé in sod., 2019). Poznani vretenčarski gostitelji so predvsem kuščarice rodov *Gallotia*, *Lacerta*, *Podarcis* in *Zootoca*, nove objave pa potrjujejo tudi prisotnost pri varanidih, skinkidih in gekonidih (Mutinga in Dipeolu, 1989; Cook in sod., 2016; Tomé in sod., 2019). Na podlagi molekularnih raziskav sodi v to skupino tudi kopica morfološko nepravilno uvrščenih izolatov rodu *Hepatozoon*, prisotnih pri kuščaricah in kačah (Maia in sod., 2011; Tomé in sod., 2012, Tomé in sod., 2013; Karadjian in sod., 2015).

Prenašajo se najverjetneje predvsem s pršicami rodu *Ophionyssus* (Telford, 2016, Gwiazdowicz in Filip, 2009); prenos v vretenčarskega vmesnega gostitelja poteka s hranjenjem. Po prenosu v nevretenčarskega gostitelja hitro zapustijo eritrocite vretenčarja (Svahn, 1975) in tvorijo pare.

#### 2.2.5 Vplivi krvnih parazitov na kuščarice

Informacije o vplivih krvnih parazitov na kuščarice so nasprotujoče. Opisanih je bilo namreč mnogo negativnih vplivov, vključno z anemijo in znižanjem sposobnosti regeneracije repa (Oppliger in Clobert, 1997), znižano gibalno sposobnost (Oppliger in sod., 1996, Garrido in Pérez-Mellado, 2013a), znižano telesno kondicijo (Lazić in sod., 2017) in znižano preživetje reproduktivnih osebkov (Sorci in sod. 1996). Hkrati nekatere raziskave niso pokazale negativnih vplivov tovrstnih parazitov (Ekner-Grzyb in sod. 2013; Damas-Moreira in sod. 2014).

V splošnem so pretekle raziskave pokazale, da na prevalenco in intenziteto okužbe s parazitom pri kuščaricah lahko vplivajo spol in starost (Schall in sod., 1992; Smallridge in Bull, 2000), reproduktivni napor (Veiga in sod., 1998), telesno in fiziološko stanje gostitelja



(Salvador in sod. 1996), habitatni tip (Carbayo in sod., 2018) in gostota populacije gostitelja (Arneberg in sod., 1998). Okuženost lahko vpliva tudi na fenotipske lastnosti kuščarjev, kot je intenzivnost obarvanosti (Megia- Palma in sod., 2018). Pogosto je bil opažen trend višje stopnje okužbe pri večjih osebkih (Amo in sod., 2004, Garrido in Pérez-Mellado 2013b, ampak znani so tudi nasprotni primeri (Damas-Moreira in sod., 2014).

Mnogo virov navaja razlike v okužbi med spoloma (Salvador in sod., 1996). Predlagani sta dve možni razlagi: ekološka – samci so aktivnejši od samic in imajo predvsem v paritvenem obdobju več interakcij z osebki iste vrste (Zuk in McKean, 1996) in fiziološka – samci so zaradi imunosupresivnih lastnosti testosterona bolj podvrženi okužbi (Zuk in McKean, 1996).

S hormonsko terapijo povzročene razlike v reproduktivnem naporu samcev so kot stranski učinek pokazale upad števila limfocitov (Barnes, 1986). Pri teh osebkih je bila smrtnost višja kot v kontrolnih skupinah (Salvador in sod, 1997). Višji reproduktivni napor pa je s seboj prinesel tudi višjo intenziteto okužbe s hemogregarinami (Veiga in sod., 1998).

Fiziološko stanje osebkov je tako preko hormonov in imunskega sistema močan dejavnik vpliva na možnost okužbe in intenziteto okužbe. Vpliva tudi na obarvanost osebkov; samci v slabšem fiziološkem stanju kažejo slabše obarvanje in višjo stopnjo infekcije (Salvador in sod., 1996). Pri teh samcih se je sočasno pokazala tudi povišana prisotnost hemogregarin (Salvador in sod., 1996).

Arneberg in sod. (1998) so pokazali da je tedaj, ko proučujemo samo enega parazita, ki se pojavlja v mnogih gostiteljih, njegova abundanca najvišja v populacijah, kjer je abundanca gostiteljev najvišja. Podobne rezultate so pridobili tudi za prevalenco in intenziteto (Arneberg in sod., 1996).

Ko se okužba pojavi sočasno z drugimi pritiski, kot so na primer pritiski iz okolja (neugodna temperatura, vlažnost ali pomanjkanje hrane), je lahko ogroženo preživetje osebka (Marcogliese in Pietrock, 2011). Povišana prevalenca in intenziteta okužbe s krvnimi paraziti je bila večkrat prepoznana pri plazilcih, ki poseljujejo suboptimalna okolja, kjer je prišlo do degradacije njihovih habitatov zaradi antropogenih vplivov (npr. turizem, uporaba pesticidov, onesnaženje s težkimi kovinami ipd.) (Amo in sod., 2006; Amo in sod., 2007;

Battles in sod., 2013; Lazić in sod., 2017). Znova se v nekaterih primerih ti vplivi niso pokazali kot značilni (French in sod., 2008).

Intenziteta okužbe se spreminja tudi med sezonami, saj vpliv temperature in vlažnosti lahko vpliva na gostoto populacij vektorjev, kar vpliva na intenziteto okužbe plazilcev (Sorci 1995, Garrido in Pérez-Mellado 2013b), vendar pogosto tudi ni odvisna od sezonskih okoljskih sprememb (Schall, 1986).

### **2.2.6 Vplivi na medvrstne odnose pri plazilcih**

Prve raziskave vplivov parazitov na sobivanje kuščarjev so bile izvedene na Karibih, kjer so prepoznali, da obstaja določen vpliv parazitov na sobivanje dveh vrst anolijev (Schall, 1992). Ugotovili so, da v primeru prisotnosti parazita vrsti sobivata. Če je parazit odsoten, se pojavlja le dominantnejša, generalistična vrsta (Schall, 1992). Otoški modeli so tudi naprej služili kot eksperimentalno okolje za tovrsten primerjave; tako je bilo na primeru interakcije med invazivnim (*Hemidactylus frenatus*) in avtohtonim (*Lepidodactylus lugubris*) gekonom na pacifiških otokih. Le-te so pokazale, da vnos tujerodnega parazita vodi v izmenjavo parazitov med gekonoma in v sintopičnih okoljih, kjer se takšna izmenjava zgodi, vodi v znižanje fitesa obeh vrst (Hanley in sod., 1995).

Vpliv parazita na gostitelja in posledično lahko na medvrstni odnos več gostiteljev je le en vidik, ki smo se ga lotili v naši raziskavi. Obstajajo tudi obratni vplivi, kakor tudi vzajemno delovanje več različnih vplivov, kar nakazuje, da je to področje raziskovanja izjemno kompleksno. Morda so ravno zato tovrstne raziskave tudi še vedno zelo redke, kot nakazuje pregled literature. Pomembno je tudi poudariti, da korelacija ne pomeni vzročnosti, kar je eno od izhodišč epidemiologije in parazitologije. Pri interpretacijah tovrstnih rezultatov se bomo opirali tudi na kriterije Bradford Hill (Fedak in sod., 2015). Prav zato bomo v naši nalogi lahko pokazali dobljene rezultate, vendar dejanskih strogih zaključkov o vplivih parazitov ne moremo dokazati. Za to bi potrebovali eksperimentalne poskuse, kjer bi lahko manipulirali krvne parazite in njihovo prisotnost v gostiteljih pod različnimi scenariji (vrsta sama ali skupaj z drugo tekmovalno vrsto). Tovrstne omejitve kljub vsemu ne pomenijo, da bo z nalogo raziskanost krvnih parazitov pri kuščaricah v Sloveniji izboljšana, kakor tudi da se bo nakazal morebitni vpliv parazitov na medvrstni odnos pri preučevanih vrstah kuščaric.

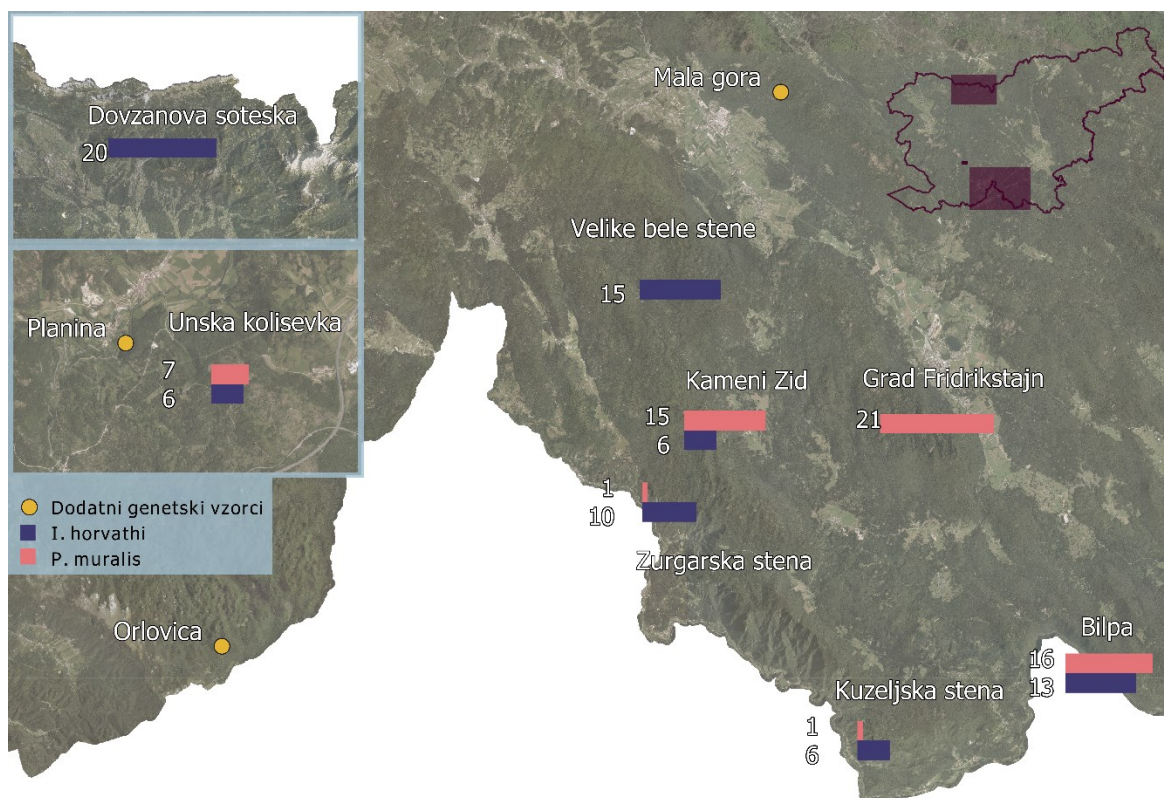
### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 IZBIRA OBMOČJA IN OPIS PREUČEVANIH LOKACIJ

V raziskavo je bilo skupno vključenih 11 lokacij v Sloveniji. Ena (Dovžanova soteska) leži v severozahodnem delu Slovenije, ostalih 10 pa v južnem delu Slovenije med Planinskim poljem in dolino reke Kolpe. Lokacije so bile izbrane glede na znane podatke o razširjenosti proučevanih vrst kuščaric (Krofel in sod., 2009, Žagar A., 2016). Odvzem vzorcev za namene molekularne identifikacije parazitov je potekalo na vseh 11 lokacijah. Krvne vzorce za oceno prisotnosti parazitov smo pridobili na 8 lokacijah, saj krvni razmazi iz nekaterih lokacij žal niso bili uporabni (Preglednica 1). Izmed vseh lokacij se vrsti pojavljata sintopično na petih lokacijah; na po treh lokacijah se pojavlja samo ena vrsta (Slika 6).

Preglednica 1: Preglednica lokacij in terenskega vzorčenja

| Lokacija          | LAT     | LON     | Št. krvnih vzorcev           |                         | Prisotnost vrst    | Vzorčenje |          |
|-------------------|---------|---------|------------------------------|-------------------------|--------------------|-----------|----------|
|                   |         |         | <i>Iberolacerta horvathi</i> | <i>Podarcis muralis</i> |                    | Paraziti  | Genetika |
| Bilpa             | 45,512  | 14,9625 | 13                           | 16                      | Obe                | X         | X        |
| Grad Fridrikštajn | 45,6115 | 14,8603 |                              | 21                      | <i>P. muralis</i>  | X         | X        |
| Kameni Zid        | 45,6127 | 14,7346 | 6                            | 15                      | Obe                | X         | X        |
| Kuželjska stena   | 45,4839 | 14,8228 | 6                            | 1                       | Obe                | X         | X        |
| Unška koliševka   | 45,8164 | 14,266  | 6                            | 7                       | Obe                | X         | X        |
| Velike bele stene | 45,6753 | 14,7082 | 15                           |                         | <i>I. horvathi</i> | X         | X        |
| Žurgarska stena   | 45,583  | 14,7015 | 10                           | 1                       | Obe                | X         | X        |
| Orlovica          | 45,5232 | 14,436  |                              |                         | <i>P. muralis</i>  |           | X        |
| Planina           | 45,8216 | 14,2471 |                              |                         | <i>I. horvathi</i> |           | X        |
| Mala gora         | 45,752  | 14,767  |                              |                         | <i>P. muralis</i>  |           | X        |
| Dovžanova soteska | 46,3827 | 14,328  | 20                           |                         | <i>I. horvathi</i> | X         | X        |



Slika 6: Zemljevid vzorčenih lokacij s številom vzorčenih osebkov po vrsti

Večina lokacij leži v najsevernejšem delu Dinaridov, za katere je značilno kraško površje, pokrito z bukovimi (*Fagus sylvatica*) gozdovi in travniki (Perko in Orožen Adamič, 1998). Klimatsko sodijo lokacije v zmeren podnebni pas s poletnim temperaturnim in padavinskim viškom ter nizkimi zimskimi temperaturami (WorldClim, 2020). Lokacije ležijo v naravnih ali deloma urbanih okoljih. Primarna vegetacija na večini lokacij je mešan gozd, ki prehaja v odprto krajino z grmičevjem in kamnite stene. Stene in druge skalnate površine, na katerih smo vzorčili kuščarice, so naravnega in antropogenega izvora.

## 3.2 TERENSKO DELO

### 3.2.1 Vzorčenje

Vzorčenje kuščaric za odvzem krvnih razmazov in vzorcev za genetske analize je potekalo na vseh izbranih lokacijah med majem 2018 in avgustom 2019. Del vzorcev, namenjenih genetski analizi, je bil pridobljenih iz osebne zbirke A. Žagar, ki jo hrani organizacija CIBIO na Portugalskem. Vzorčenje teh je potekalo pred letom 2018.

Preglednica 2: Pridobljeni genetski vzorci

| Šifra vzorca | Vrsta                        | Lokacija          | Haplotip   | Vir vzorca         |
|--------------|------------------------------|-------------------|------------|--------------------|
| UK4          | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Unška koliševka   | SLO_NOVI 1 | Terensko delo 2019 |
| BP4          | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Bilpa             | SLO_NOVI 1 | Terensko delo 2019 |
| DB20734      | <i>Podarcis muralis</i>      | Mala gora         | SLO_NOVI 2 | Arhiv A. Žagar     |
| BP24         | <i>Podarcis muralis</i>      | Bilpa             | SLO_NOVI 2 | Terensko delo 2019 |
| GF9          | <i>Podarcis muralis</i>      | Grad Fridrikštajn | SLO_NOVI 2 | Terensko delo 2019 |
| PL6          | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Planina           | SLO_NOVI 2 | Terensko delo 2019 |
| KZ3          | <i>Podarcis muralis</i>      | Kameni zid        | SLO_NOVI 3 | Terensko delo 2019 |
| UK2          | <i>Podarcis muralis</i>      | Unška koliševka   | SLO_NOVI 4 | Terensko delo 2019 |
| KZ14         | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Kameni zid        | SLO_NOVI 4 | Terensko delo 2019 |
| DZ9          | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Dovžanova soteska | SLO_NOVI 4 | Terensko delo 2019 |
| ZS9          | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Žurgarska stena   | SLO_NOVI 4 | Terensko delo 2019 |
| 20705        | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Velike bele stene | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| 20708        | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Velike bele stene | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| 20713        | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Velike bele stene | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| 20737        | <i>Podarcis muralis</i>      | Mala gora         | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| DB12475      | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Planina           | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| DB12476      | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Planina           | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| DB12478      | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Planina           | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| DB1247       | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Planina           | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| DB12483      | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Orlovica          | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| DB12486      | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Orlovica          | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| DB12491      | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Orlovica          | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| DB12492      | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Orlovica          | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| DB12494      | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Orlovica          | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| DB20729      | <i>Podarcis muralis</i>      | Mala gora         | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| DB20732      | <i>Podarcis muralis</i>      | Mala gora         | SLO_NOVI 4 | Arhiv A. Žagar     |
| 13926_VBS    | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Velike bele stene | SLO_NOVI 5 | Arhiv A. Žagar     |
| 20706.18     | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Velike bele stene | SLO_NOVI 6 | Arhiv A. Žagar     |
| 20714.18     | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Velike bele stene | SLO_NOVI 6 | Arhiv A. Žagar     |

Kuščarice smo lovili z roko ali po standardni metodi s pomočjo zanke iz sukanca ali tanke najlonske niti, pritrjene na daljši kos žice oziroma krajšo športno ribiško palico. Vrsti smo med seboj ločili na podlagi lusk pileusa oz. natančneje, ali se nadnosnični luski stikata ali ne (Breg in sod., 2010). Spol smo določili glede na obarvanost, prisotnost hemipenisa in velikosti femoralnih por (Kryštufek & Janžekovič, 1999).

Za terensko delo s plazilci smo od Agencije Republike Slovenije za okolje pridobili dovoljenje za ujetje, vznemirjanje, poškodovanje in začasen odvzem iz narave osebkov

zavarovane vrste *Podarcis muralis* in zavarovane vrste *Iberolacerta horvath* za namene odvzema vzorcev; številka dovoljenja 35601-11/2019 – 4.

Vsakemu osebkju smo ob ulovu pripisali unikatno štirimestno šifro, določili spol, starostno kategorijo (juvenil, subadult, adult) in ga pregledali za prisotnost ekto parazitov (klopi, pršice). Ekto parazite smo shranili v označeno mikrocentrifugirko s 70 % alkoholom. Vsakemu osebkju smo s pomočjo kljunastega merila izmerili višino glave (HH), dolžino glave (HL), širino glave (HW), dolžino pileusa (PL), dolžino trupa (TRL) in dolžino med konico gobca in kloake (SVL). Kuščaricam smo odvzeli približno pet milimetrov dolg košček repa, pri čemer smo se zanašali na sposobnost kavdalne avtotomije, ki je prisotna pri obeh vrstah. Iz odvzetega koščka repa smo pridobili kapljo krvi, ki smo jo shranili na filtrirni papir znamke Whitman ter papir shranili v označeno plastično vrečko. Drugo kapljo krvi iz repa smo uporabili za pripravo krvnih razmazov. Kapljo smo nanegli na s šifro osebkja označeno objektno stekelce in jo s pomočjo drugega stekelca tanko razmazali. Tako pridobljene razmaze smo shranili v namenske škatle. Na vsaki lokaciji smo zabeležili GPS koordinate v WGS 84 sistemu.

### 3.3 LABORATORIJSKO DELO

#### 3.3.1 Priprava in pregled krvnih razmazov

Na terenu pridobljene krvne razmaze smo v laboratoriju ponovno označili z diamantnim svinčnikom ter fiksirali v metanolu in po sušenju 45 minut barvali z Giemsa barvilom. Skupno smo tako pripravili 137 vzorcev. Objektna stekla smo pregledovali pod mikroskopom (AxioScope, Zeiss, Nemčija) z vgrajeno kamero za snemanje slike, priključeno na namizni računalnik, opremljen z namensko programsko opremo (LAS 3.2, Leica). Vsak objektnik smo pregledali pri 400-kratni povečavi. Pri tem smo najprej zabeležili kvaliteto krvnega razmaza in objektnik približno pet minut pregledovali glede prisotnosti parazitov v krvi. Če parazitov nismo opazili, smo vzorec označili kot negativen, ob prisotnosti pa kot pozitiven. Za vsak vzorec smo posneli nekaj referenčnih posnetkov. Pozitivne vzorce smo nato natančneje pregledali in na vsakem posneli pet serij slik, ki jih sestavlja po pet sosednjih vidnih polj. Na pridobljenih serijah slik smo za vsak osebek prešteli 2500 eritrocitov in ob tem zabeležili delež eritrocitov, pri katerih smo jasno prepoznali prisotnost parazita. Če na pridobljenih slikah nismo uspeli naštetih 2500 eritrocitov

smo posneli dodatne posnetke. Vidna polja znotraj posameznega objektnika so bila izbrana naključno, pri čemer smo bili pozorni, da ne prihaja do prekrivanja. Tako pridobljene podatki o prisotnosti ali odsotnosti parazitov in o številu okuženih eritrocitov na 2500 eritrocitov smo sproti beležili v preglednico, ki smo jo kasneje uporabili za izračun prevalence in intenzitete parazitizma.

### 3.3.2 Molekularne metode

#### 3.3.2.1 Izolacija DNA

DNK smo izolirali iz 137 na terenu nabranih vzorcev in 78 arhivskih vzorcev. Izolacija iz arhivskih vzorcev je potekala z metodo »high-salt« (Sambrook in sod, 1989). Tkivne vzorce repov kuščaric smo na steriliziranem steklu s steriliziranim skalpelom razrezali na čim manjše koščke in prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko. Dodali smo pufer za lizo celic (0.5M tris; 0.1M EDTA; 2% SDS; pH 8.0) in proteinazo K (25 mg/mL) ter inkubirali preko noči pri 56 °C. Za precipitacijo proteinov smo dodali amonijev acetat (7M; pH 8.0) in vzorce centrifugirali 15 minut pri 20.800 G in 4 °C. Polovico supernatanta smo prenesli v svežo eppendorf mikrocentrifugirko in dodali pod 0 °C ohlajen isopropanol. Ta korak smo ponovili še z drugo polovico vsebine prvotne centrifugirke. Vzorce smo nato znova 15 minut centrifugirali pri 2.0800 G in 4 °C in zavrgli supernatant. DNK nečistoče smo izpirali z ohlajenim 70 % etanolom tako, da smo v centrifugirko dodali etanol in centrifugirko stresali na namiznem mešalu, dokler se DNK pelet ni odlepil od dna. Centrifugiranje smo nato ponovili (15 min, 20.800 G, 4°C) in zavrgli supernatant. Preostanek alkohola smo izhlapevali z inkubacijo pri sobni temperaturi preko noči. Posušene pelete v centrifugirkah smo navlažili s 50 µL ultra-čiste vode in kasneje shranili pri -20 °C.

Iz preostalih 137 novih vzorcev smo DNK izolirali s pomočjo GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep seta kemikalij, vnaprej pripravljenega paketa centrifugirk, pufrov in izolacijskih kolon, po navodilih proizvajalca Sigma-Aldrich. Tkivo smo razrezali na drobne koščke, dodali v sterilno označeno centrifugirko in dodali 180 µL raztopine za lizo T, pomešali na namiznem mešalu in inkubirali pri 55 °C, dokler tkivo ni razpadlo (2-4 ure). Dodali smo 200 µL raztopine za lizo C, stresali na namiznem mešalu in inkubirali pri 70 °C 10 minut. Med inkubacijo smo označili centrifugirke, potrebne za kolono ekstrakcije DNK, in jih sprali s 500 µL raztopine za pripravo kolone. V prvotno centrifugirko smo dodali 200 µL 95 % etanola in ponovno premešali. Lizat smo prenesli v centrifugirko kolone, ki smo jo

predhodno pripravili in centrifugirko vstavili v zbirno centrifugirko. Celotno kolono smo centrifugirali eno minuto pri 3800 g. Zavrgli smo tekočino, nabrano v zbirni centrifugirki, in celoten prejšnji korak ponovili s triminutnim centrifugiranjem pri vsaj 12000 obratih na minuto. Zbirno centrifugirko smo zavrgli in kolono prestavili v čisto eppendorf centrifugirko. V kolono smo nanesti 200 µL elucijske raztopine, kolono 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi in centrifugirali 1 minuto pri 3800 G. Pridobljeno DNK smo shranili pri -20 °C.

### 3.3.2.2 Molekularna detekcija parazitov in sekvenciranje

Prisotnost parazitov skupine *Haemogregarina* smo prepoznavali s parom primerjev, specifičnih za to skupino: HAM-F 600 in Hep R900 (Netherlands in sod., 2017). Primerja ciljata na 600 bp (HAM-F) in 900 bp (Hep R) dolge fragmente 18S rRNA gena, pri čemer smo sledili protokolu, opisanem v Netherlands in sod., 2017. PCR reakcije so potekale na ciklerju Eppendorf Nexus sx1. Ob vsaki reakciji smo izvedli tudi kontrolni reakciji. Pozitiven nadzor smo pridobili iz prvega kroga reakcij na naših vzorcih; negativna kontrola je bila mešanica vseh reagentov brez dodane DNK. PCR reakcije so potekale v končnem volumnu 20 µL z 2 µL DNK izolata. Količina in pogoji za reakcijo so opisani v IME TABELI. PCR produkte smo nanesti na 2 % agarozni gel z 1 µL GelRed barvila na 50 µL agaroze. Nukleinske kisline v gelih smo ločevali približno 25 minut pri 250 voltih in vizualizirali s pomočjo ultravijoličnega transiluminatorja Vilber Lourmat tfx-35M. Gele smo pod ultravijolično svetlobo slikali in pridobljene slike shranili, označili in pregledali za pridobljene fragmente.

Preglednica 3: Preglednica sestavin za pripravo ene reakcije PCR z AmpliTAQ gold

| <b>Master miks protokol za AmpliTAQ gold</b> |                |
|--|----------------|
| <b>Reagent</b>                               | <b>Volumen</b> |
| Voda   | 9              |
| Pufer  | 1,5            |
| dNTP   | 1,5            |
| Barvilo                                      | 1,5            |
| MgCl <sub>2</sub>                            | 1,2            |
| Primer-F                                     | 0,2            |
| Primer-R                                     | 0,2            |
| AmpliTAQ                                     | 0,075          |
| <b>total</b>                                 | <b>15,175</b>  |
| Vzorec                                       | 1              |



Preglednica 4: Preglednica pogojev za PCR (povzeto po Netherlands in sod., 2017 in prilagojeno)

| PCR protokol ciklov in temperatur |               |             |          |                | Količina reagentov |              |
|-----------------------------------|---------------|-------------|----------|----------------|--------------------|--------------|
| Korak                             | Funkcija      | Temperatura | Trajanje | Število ciklov | Reagent            | Volumen (µL) |
| <b>Začetna denaturacija</b>       | Denaturacija  | 95 °C       | 4 min.   | 1              | Voda               | 13           |
| <b>Temperaturno cikanje</b>       | Denaturacija  | 94 °C       | 45 sek.  | 35             | Master miks        | 4            |
|                                   | Vezava        | 57 °C       | 45 sek.  |                | HEP900             | 0,5          |
|                                   | Podaljševanje | 72 °C       | 1,5 min. |                | HAMF               | 0,5          |
| <b>Končno podaljševanje</b>       | Podaljševanje | 72 °C       | 10 min.  | 1              | <b>Skupno</b>      | 20           |
| <b>Shranjevanje</b>               | Shranjevanje  | 10 °C       | Čez noč  | 1              |                    |              |

Pozitivne vzorce smo očistili in pri zunanjem ponudniku storitev (Macrogen Europe (Nizozemska)) z enakim naborom oligonukleotidnih začetkov kot pri PCR izvedli obojesmerno sekvenciranje pomnožkov po Sangerju.

### 3.4 FILOGENETSKA, STATISTIČNA IN PROSTORSKA ANALIZA

#### 3.4.1 Urejanje sekvenc in filogenetske analize

Pridobljene sekvence smo uredili, pregledali njihovo kakovost, jih poravnali ter izvedli filogenetsko analizo v programu Geneious 4.8.5. Urejene sekvence smo nato s spletnim orodjem BLAST primerjali s sekvencami, deponiranimi v podatkovni zbirki NCBI (referenca oz internetni naslov), ter izločili vse sekvence, ki niso pripadale pričakovanim krvnim parazitom. V orodju Geneious smo naredili hitro poravnavo sekvenc in iz poravnave izbrali vse unikatne sekvence; pri tem smo pazili, da smo zabeležili, iz katerih organizmov in lokacij so bile pridobljene identične sekvence. Iz podatkovne zbirke NCBI smo pridobili sekvence, uporabljene v sistematski reviziji odnosov znotraj skupine *Haemogregarina* (Karadjian in sod., 2015) in jih dodali našim pridobljenim sekvencam.

Preglednica 5: Preglednica vzorcev, vključenih v filogenetsko analizo. Vir podatkov označuje začetek za serijo sekvenc do naslednjega vira.

| Dostopna šifra (NCBI) | Parazit                      | Gostitelj                      | Vir izolata | Država | Vir podatkov                           |
|-----------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------|--------|--|
| AF130361              | <i>Hepatozoon catesbiana</i> | <i>Lithobates catesbeianus</i> |             | Kanada | Carreno in sod., 1999;<br>se nadaljuje |

nadaljevanje Preglednica 5: Preglednica vzorcev, vključenih v filogenetsko analizo.

| Dostopna šifra (NCBI) | Parazit                                 | Gostitelj                         | Vir izolata                     | Država     | Vir podatkov                  |
|-----------------------|---|-----------------------------------|---------------------------------|------------|-------------------------------|
| AF176835              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Canis familiaris</i>           | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | Indija     | Mathew in sod., 2000          |
| AF176836              | <i>Hepatozoon americanum</i>            | <i>Canis familiaris</i>           | <i>Amblyomma maculatum</i>      | ZDA        |                               |
| AF176837              | <i>Hepatozoon catesbiana</i>            | <i>Lithobates catesbeianus</i>    | <i>Culex territans</i>          | Kanada     |                               |
| AF494059              | <i>Adelina bambarooniae</i>             | <i>Dermolepida albobhirtum</i>    | Larve gostitelja                | Avstralija |                               |
| AY150067              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Vulpes vulpes</i>              | Vranica gostitelja              | Španija    | Criado-Fornelio in sod., 2006 |
| AY461375              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Cerdocyon thous</i>            | Vranica gostitelja              | Brazilija  |                               |
| AY461376              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Lycalopex gymnocercus</i>      | Vranica gostitelja              | Brazilija  |                               |
| AY461377              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Cerdocyon thous</i>            | Vranica gostitelja              | Brazilija  |                               |
| AY461378              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Canis familiaris</i>           | Kri gostitelja                  | Španija    |                               |
| AY471615              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Lycalopex gymnocercus</i>      | Vranica gostitelja              | Brazilija  |                               |
| AY600625              | <i>Hepatozoon</i> cf. <i>erhardovae</i> | <i>Clethrionomys glareolus</i>    | Kri gostitelja                  | Španija    |                               |
| AY600626              | <i>Hepatozoon</i> cf. <i>erhardovae</i> | <i>Clethrionomys glareolus</i>    | Kri gostitelja                  | Španija    |                               |
| AY620232              | <i>Hepatozoon felis</i>                 | <i>Felis catus</i>                | Kri gostitelja                  | Španija    |                               |
| AY628681              | <i>Hepatozoon felis</i>                 | <i>Felis catus</i>                | Kri gostitelja                  | Španija    |                               |
| AY731062              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Vulpes vulpes</i>              | Vranica gostitelja              | Španija    |                               |
| DQ096835              | <i>Adelina dimidiata</i>                | <i>Scolopendra cingulata</i>      | Feces gostitelja                | Bolgarija  | Kopecna in sod., 2006         |
| DQ096836              | <i>Adelina grylli</i>                   | <i>Gryllus bimaculatus</i>        | Maščobno tkivo gostitelja       |            |                               |
| DQ111754              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Canis familiaris</i>           | Kri gostitelja                  | Sudan      | Oyamada in sod., 2005;        |
| DQ439540              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Canis familiaris</i>           | Kri gostitelja                  | Venezuela  | Criado-Fornelio in sod., 2007 |
| DQ439541              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Vulpes vulpes</i>              | Vranica gostitelja              | Španija    |                               |
| DQ439543              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Canis familiaris</i>           | Kri gostitelja                  | Venezuela  |                               |
| EF157822              | <i>Hepatozoon ayorgbor</i>              | <i>Python regius</i>              | <i>Culex quinquefasciatus</i>   | Gana       | Sloboda in sod., 2007;        |
| EF222257              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Martes martes</i>              | Kri gostitelja                  | Španija    | Criado-Fornelio in sod., 2009 |
| EF222259              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Sciurus vulgaris</i>           | Kri gostitelja                  | Španija    |                               |
| EU041717              | <i>Hepatozoon ursi</i>                  | <i>Ursus thibetanus japonicus</i> | Pljuča in kri gostitelja        | Japonska   | Kubo in sod., 2008            |
| EU041718              | <i>Hepatozoon ursi</i>                  | <i>Ursus thibetanus japonicus</i> | Pljuča gostitelja               | Japonska   |                               |

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 5: Preglednica vzorcev, vključenih v filogenetsko analizo.

| Dostopna šifra (NCBI) | Parazit                                 | Gostitelj                         | Vir izolata                   | Država     | Vir podatkov          |
|-----------------------|---|-----------------------------------|-------------------------------|------------|-----------------------|
| EU430231              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Varanus panoptes</i>           | <i>Amblyomma fimbriatum</i>   | Avstralija | Vilcins in sod., 2009 |
| EU430232              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Varanus panoptes</i>           | <i>Amblyomma fimbriatum</i>   | Avstralija |                       |
| EU430233              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Liasis fuscus</i>              | <i>Amblyomma fimbriatum</i>   | Avstralija |                       |
| EU430234              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Varanus panoptes</i>           | <i>Amblyomma fimbriatum</i>   | Avstralija |                       |
| EU430235              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Varanus panoptes</i>           | <i>Amblyomma fimbriatum</i>   | Avstralija |                       |
| EU430236              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Liasis fuscus</i>              | <i>Amblyomma fimbriatum</i>   | Avstralija |                       |
| EU430237              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Sarcophilus harrisi</i>        | <i>Ixodes tasmani</i>         | Avstralija | Vilcins in sod., 2009 |
| EU430238              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Sarcophilus harrisi</i>        | <i>Ixodes tasmani</i>         | Avstralija |                       |
| FJ719813              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Dromiciops gliroides</i>       | Kri gostitelja                | Čile       | Merino in sod., 2014  |
| FJ719814              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Dromiciops gliroides</i>       | Kri gostitelja                | Čile       |                       |
| FJ719815              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Abrothrix olivaceus</i>        | Kri gostitelja                | Čile       |                       |
| FJ719816              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Abrothrix sanborni</i>         | Kri gostitelja                | Čile       |                       |
| FJ719817              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Abrothrix olivaceus</i>        | Kri gostitelja                | Čile       |                       |
| FJ719818              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Abrothrix olivaceus</i>        | Kri gostitelja                | Čile       |                       |
| FJ719819              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Abrothrix sanborni</i>         | Kri gostitelja                | Čile       |                       |
| HM212625              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Vulpes vulpes</i>              | Vranica gostitelja            | Hrvaška    | Dezdek in sod., 2010  |
| HM212626              | <i>Hepatozoon canis</i>                 | <i>Vulpes vulpes</i>              | Vranica gostitelja            | Hrvaška    |                       |
| HQ224954              | <i>Hepatozoon</i> cf. <i>catesbiana</i> | <i>Lithobates catesbeianus</i>    | Kri gostitelja                | Kanada     | Barta in sod., 2012   |
| HQ224955              | <i>Klossia helicina</i>                 | <i>Cepaea nemoralis</i>           | Repno tkivo in kri gostitelja | Francija   |                       |
| HQ224956              | <i>Klossia helicina</i>                 | <i>Cepaea nemoralis</i>           | Repno tkivo in kri gostitelja | Francija   |                       |
| HQ224957              | <i>Dactylosoma ranarum</i>              | <i>Pelophylax kl. esculentus</i>  | Kri gostitelja                | Francija   |                       |
| HQ224958              | <i>Dactylosoma ranarum</i>              | <i>Pelophylax kl. esculentus</i>  | Kri gostitelja                | Francija   |                       |
| HQ224959              | <i>Haemogregarina balli</i>             | <i>Chelydra serpentina</i>        | Kri gostitelja                | Kanada     |                       |
| HQ224960              | <i>Hepatozoon magna</i>                 | <i>Pelophylax kl. esculentus</i>  | Kri gostitelja                | Francija   |                       |
| HQ224961              | <i>Babesiosoma stableri</i>             | <i>Lithobates septentrionalis</i> | Kri gostitelja                | Kanada     |                       |
| HQ224962              | <i>Hepatozoon</i> cf. <i>clamatae</i>   | <i>Lithobates clamitans</i>       | Kri gostitelja                | Kanada     |                       |
| HQ224963              | <i>Hepatozoon</i> cf. <i>clamatae</i>   | <i>Lithobates clamitans</i>       | Kri gostitelja                | Kanada     |                       |
| HQ292771              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Tachylepis wrightii</i>        | Repno tkivo in kri gostitelja | Sejšeli    | Harris in sod., 2011  |
| HQ292772              | <i>Hepatozoon</i> sp.                   | <i>Tachylepis wrightii</i>        | Repno tkivo in kri gostitelja | Sejšeli    |                       |

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 5: Preglednica vzorcev, vključenih v filogenetsko analizo.

| Dostopna šifra (NCBI) | Parazit                | Gostitelj                           | Vir izolata                   | Država   | Vir podatkov        |
|-----------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|----------|---------------------|
| HQ292773              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Lycognathophis seychellensis</i> | Repno tkivo in kri gostitelja | Sejšeli  |                     |
| HQ292774              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Lycognathophis seychellensis</i> | Repno tkivo in kri gostitelja | Sejšeli  |                     |
| HQ292775              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Lycognathophis seychellensis</i> | Repno tkivo in kri gostitelja | Sejšeli  |                     |
| HQ734787              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Tarentola mauritanica</i>        | Repno tkivo in kri gostitelja | Alžirija | Maia in sod., 2011  |
| HQ734788              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Tarentola mauritanica</i>        | Repno tkivo in kri gostitelja | Alžirija |                     |
| HQ734789              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Quedenfeldtia moerens</i>        | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734790              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Ptyodactylus oudrii</i>          | Repno tkivo in kri gostitelja | Alžirija |                     |
| HQ734791              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Scelarcis perspicillata</i>      | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734792              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Podarcis vaucheri</i>            | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734793              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Podarcis vaucheri</i>            | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734794              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Podarcis vaucheri</i>            | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734795              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Podarcis vaucheri</i>            | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734796              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Eumeces algeriensis</i>          | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734797              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Eumeces algeriensis</i>          | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734798              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Atlantolacerta andreanskyi</i>   | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734799              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Timon tangitanus</i>             | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734800              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Timon tangitanus</i>             | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734801              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Timon tangitanus</i>             | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734802              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Timon tangitanus</i>             | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734803              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Podarcis vaucheri</i>            | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734804              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Podarcis vaucheri</i>            | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734805              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Chalcides polylepis</i>          | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734806              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Tarentola mauritanica</i>        | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734807              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Timon tangitanus</i>             | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734808              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Ptyodactylus oudrii</i>          | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ734809              | <i>Hepatozoon</i> sp.  | <i>Quedenfeldtia moerens</i>        | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko   |                     |
| HQ829430              | <i>Hepatozoon ursi</i> | <i>Melursus ursinus</i>             | Kri gostitelja                | Indija   | Pawar in sod., 2011 |
| HQ829432              | <i>Hepatozoon ursi</i> | <i>Melursus ursinus</i>             | Kri gostitelja                | Indija   |                     |

se nadaljuje

## nadaljevanje Preglednica 5: Preglednica vzorcev, vključenih v filogenetsko analizo.

| Dostopna šifra (NCBI) | Parazit                    | Gostitelj                              | Vir izolata                   | Država          | Vir podatkov              |
|-----------------------|----------------------------|--|-------------------------------|-----------------|---------------------------|
| HQ829434              | <i>Hepatozoon ursi</i>     | <i>Melursus ursinus</i>                | Kri gostitelja                | Indija          |                           |
| HQ829436              | <i>Hepatozoon ursi</i>     | <i>Melursus ursinus</i>                | Kri gostitelja                | Indija          |                           |
| HQ829445              | <i>Hepatozoon felis</i>    | <i>Panthera tigris</i>                 | Kri gostitelja                | Indija          | Pawar in sod., 2012       |
| HQ829446              | <i>Hepatozoon felis</i>    | <i>Panthera tigris</i>                 | Kri gostitelja                | Indija          |                           |
| HQ829447              | <i>Hepatozoon canis</i>    | <i>Cuon alpinus</i>                    | Kri gostitelja                | Indija          |                           |
| HQ829448              | <i>Hepatozoon canis</i>    | <i>Cuon alpinus</i>                    | Kri gostitelja                | Indija          |                           |
| JN181157              | <i>Hepatozoon sipedon</i>  | <i>Rana spp. &amp; Nerodia sipedon</i> | Kri gostitelja                | Kanada          | Barta in sod., 2012;      |
| JN584475              | <i>Hepatozoon felis</i>    | <i>Felis catus</i>                     | Kri gostitelja                | Indija          | Pawar in sod., 2012       |
| JN584476              | <i>Hepatozoon felis</i>    | <i>Felis catus</i>                     | Kri gostitelja                | Indija          |                           |
| JQ080302              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>nepotrjeno</i>                      | <i>Aedes taeniorhynchus</i>   | Ekvador         | Bataille in sod., 2012    |
| JQ080303              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>nepotrjeno</i>                      | <i>Aedes taeniorhynchus</i>   | Ekvador         |                           |
| JQ080304              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>nepotrjeno</i>                      | <i>Aedes taeniorhynchus</i>   | Ekvador         |                           |
| JQ746622              | <i>Hepatozoon garnhami</i> | <i>Psammophis schokari</i>             | Kri gostitelja                | Savdska Arabija | Abdel-Baki in sod., 2014; |
| JX244266              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Malpolon monspessulanus</i>         | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko          | Tome in sod., 2012        |
| JX244267              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Hemorrhoids hippocrepis</i>         | Repno tkivo in kri gostitelja | Španija         |                           |
| JX244268              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Hemorrhoids hippocrepis</i>         | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko          |                           |
| JX244269              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Hemorrhoids hippocrepis</i>         | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko          |                           |
| JX531910              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Podarcis hispanicus</i>             | Repno tkivo in kri gostitelja | Španija         | Maia in sod., 2012        |
| JX531917              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Podarcis hispanicus</i>             | Repno tkivo in kri gostitelja | Španija         |                           |
| JX531920              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Podarcis lilfordi</i>               | Repno tkivo in kri gostitelja | Španija         |                           |
| JX531921              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Podarcis bocagei</i>                | Repno tkivo in kri gostitelja | Portugalska     |                           |
| JX531928              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Podarcis bocagei</i>                | Repno tkivo in kri gostitelja | Portugalska     |                           |
| JX531930              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Podarcis bocagei</i>                | Repno tkivo in kri gostitelja | Portugalska     |                           |
| JX531931              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Podarcis bocagei</i>                | Repno tkivo in kri gostitelja | Portugalska     |                           |
| JX531932              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Podarcis bocagei</i>                | Repno tkivo in kri gostitelja | Portugalska     |                           |
| JX531933              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Algyroides marchi</i>               | Repno tkivo in kri gostitelja | Španija         |                           |
| JX531940              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Algyroides marchi</i>               | Repno tkivo in kri gostitelja | Španija         |                           |
| JX531941              | <i>Hepatozoon sp.</i>      | <i>Algyroides marchi</i>               | Repno tkivo in kri gostitelja | Španija         |                           |

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 5: Preglednica vzorcev, vključenih v filogenetsko analizo.

| Dostopna šifra (NCBI) | Parazit                            | Gostitelj                           | Vir izolata                   | Država       | Vir podatkov                    |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--------------|---------------------------------|
| JX531953              | <i>Hepatozoon</i> sp.              | <i>Podarcis bocagei</i>             | Repno tkivo in kri gostitelja | Španija      |                                 |
| KC342524              | <i>Hepatozoon cuestensi</i>        | <i>Crotalus durissus terrificus</i> | Kri gostitelja                | Brazilija    | O'Dwyer in sod., 2013           |
| KC342525              | <i>Hepatozoon massardii</i>        | <i>Crotalus durissus terrificus</i> | Kri gostitelja                | Brazilija    |                                 |
| KC342526              | <i>Hepatozoon cevapii</i>          | <i>Crotalus durissus terrificus</i> | Kri gostitelja                | Brazilija    |                                 |
| KC342527              | <i>Hepatozoon cuestensi</i>        | <i>Crotalus durissus terrificus</i> | Kri gostitelja                | Brazilija    |                                 |
| KC342528              | <i>Hepatozoon cuestensi</i>        | <i>Crotalus durissus terrificus</i> | Kri gostitelja                | Brazilija    |                                 |
| KC512766              | <i>Hemolivia</i> sp. [mauritanica] | <i>Testudo graeca</i>               | <i>Hyalomma aegyptium</i>     | Alžirija     | Harris in sod., 2013;           |
| KC696564              | <i>Hepatozoon</i> sp.              | <i>Psammophis schokari</i>          | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko       | Tome in sod., 2013              |
| KC696565              | <i>Hepatozoon</i> sp.              | <i>Psammophis schokari</i>          | Repno tkivo in kri gostitelja | Maroko       |                                 |
| KC696566              | <i>Hepatozoon</i> sp.              | <i>Psammophis aegyptius</i>         | Repno tkivo in kri gostitelja | Niger        |                                 |
| KC696567              | <i>Hepatozoon</i> sp.              | <i>Psammophis sibilans</i>          | Repno tkivo in kri gostitelja | Burkina Faso |                                 |
| KC696568              | <i>Hepatozoon</i> sp.              | <i>Psammophis elegans</i>           | Repno tkivo in kri gostitelja | Mali         |                                 |
| KC696569              | <i>Hepatozoon</i> sp.              | <i>Psammophis schokari</i>          | Repno tkivo in kri gostitelja | Alžirija     |                                 |
| KC848055              | <i>Hepatozoon</i> sp.              | <i>Hipposideros cervinus</i>        | Jetra gostitelja              | Malezija     | Pinto in sod., 2013             |
| KC848056              | <i>Hepatozoon</i> sp.              | <i>Hipposideros cervinus</i>        | Jetra gostitelja              | Malezija     |                                 |
| KC848057              | <i>Hepatozoon</i> sp.              | <i>Hipposideros cervinus</i>        | Jetra gostitelja              | Malezija     |                                 |
| KF022102              | <i>Hepatozoon peircei</i>          | <i>Hydrobates melania</i>           | Kri gostitelja                | Mehika       | Merino in sod., 2014;           |
| KF246565              | <i>Hepatozoon seychellensis</i>    | <i>Grandisonia alternans</i>        | Kri gostitelja                | Sejšeli      | Harris in sod., 2014            |
| KF246566              | <i>Hepatozoon seychellensis</i>    | <i>Grandisonia alternans</i>        | Kri gostitelja                | Sejšeli      |                                 |
| KF257924              | <i>Haemogregarina</i> sp.          | <i>Pelusios marani</i>              | Kri gostitelja                | Gabon        | Dvorakova in sod., 2014         |
| KF257926              | <i>Haemogregarina stepanowi</i>    | <i>Mauremys caspica</i>             | Kri gostitelja                | Iran         |                                 |
| KF939620              | <i>Hepatozoon chinensis</i>        | <i>Elaphe carinata</i>              | Kri gostitelja                | Kitajska     | Haklova-Kočikova in sod., 2014; |
| KF992697              | <i>Haemogregarina stepanowi</i>    | <i>Mauremys caspica</i>             | Kri gostitelja                | Turčija      | Kvicerova in sod., 2014         |
| KF992698              | <i>Hemolivia mauritanica</i>       | <i>Testudo graeca</i>               | Kri gostitelja                | Turčija      |                                 |

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 5: Preglednica vzorcev, vključenih v filogenetsko analizo.

| Dostopna šifra (NCBI) | Parazit                               | Gostitelj                               | Vir izolata            | Država      | Vir podatkov                   |
|-----------------------|---------------------------------------|---|------------------------|-------------|--------------------------------|
| KF992699              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo marginata</i>                | Kri gostitelja         | Grčija      |                                |
| KF992700              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo graeca</i>                   | Kri gostitelja         | Irak        |                                |
| KF992701              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo graeca</i>                   | Kri gostitelja         | Sirija      |                                |
| KF992702              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo graeca</i>                   | Kri gostitelja         | Sirija      |                                |
| KF992703              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo graeca</i>                   | Kri gostitelja         | Sirija      |                                |
| KF992704              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo graeca</i>                   | Kri gostitelja         | Sirija      |                                |
| KF992705              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo graeca</i>                   | Kri gostitelja         | Sirija      |                                |
| KF992706              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo graeca</i>                   | Kri gostitelja         | Sirija      |                                |
| KF992707              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo graeca</i>                   | Kri gostitelja         | Sirija      |                                |
| KF992708              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo graeca</i>                   | Kri gostitelja         | Sirija      |                                |
| KF992709              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo graeca</i>                   | Kri gostitelja         | Sirija      |                                |
| KF992710              | <i>Hemolivia mauritanica</i>          | <i>Testudo marginata</i>                | Kri gostitelja         | Grčija      |                                |
| KF992711              | <i>Hemolivia mariae</i>               | <i>Egernia stokesii</i>                 | Kri gostitelja         | Avstralija  |                                |
| KF992712              | <i>Hemolivia mariae</i>               | <i>Egernia stokesii</i>                 | Kri gostitelja         | Avstralija  |                                |
| KF992713              | <i>Hemolivia</i> sp.<br>[pulcherrima] | <i>Rhinoclemmys pulcherrima</i>         | Kri gostitelja         | Nikaragva   |                                |
| KF992714              | <i>Hemolivia</i> sp.<br>[pulcherrima] | <i>Rhinoclemmys pulcherrima</i>         | Kri gostitelja         | Nikaragva   |                                |
| KJ189390              | <i>Hepatozoon</i> sp.                 | <i>Podarcis bocagei &amp; hispanica</i> | Kri gostitelja         | Portugalska | Maia in sod., 2014             |
| KJ189418              | <i>Hepatozoon</i> sp.                 | <i>Podarcis bocagei &amp; hispanica</i> | Kri gostitelja         | Portugalska |                                |
| KJ189426              | <i>Hepatozoon</i> sp.                 | <i>Podarcis bocagei &amp; hispanica</i> | Kri gostitelja         | Portugalska |                                |
| KJ461939              | <i>Karyolysus</i> sp.                 | <i>Podarcis muralis</i>                 | Kri gostitelja         | Slovaška    | Haklova-Kočikova in sod., 2014 |
| KJ461940              | <i>Karyolysus</i> sp.                 | <i>Lacerta agilis</i>                   | Kri gostitelja         | Poljska     |                                |
| KJ461941              | <i>Karyolysus</i> sp.                 | <i>Lacerta viridis</i>                  | <i>Ixodes ricinus</i>  | Madžarska   |                                |
| KJ461942              | <i>Karyolysus</i> sp.                 | <i>Lacerta trilineata</i>               | Kri gostitelja         | Romunija    |                                |
| KJ461943              | <i>Karyolysus</i> sp.                 | <i>Lacerta viridis</i>                  | Kri gostitelja         | Madžarska   |                                |
| KJ461944              | <i>Karyolysus</i> sp.                 | <i>Lacerta viridis</i>                  | <i>Ophionyssus</i> sp. | Madžarska   |                                |
| KJ461945              | <i>Karyolysus</i> sp.                 | <i>Zootoca vivipara</i>                 | <i>Ophionyssus</i> sp. | Poljska     |                                |

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 5: Preglednica vzorcev, vključenih v filogenetsko analizo.

| Dostopna šifra (NCBI) | Parazit                       | Gostitelj                                     | Vir izolata                   | Država                 | Vir podatkov                            |
|-----------------------|-------------------------------|---|-------------------------------|------------------------|---|
| KJ461946              | <i>Karyolysus</i> sp.         | <i>Zootoca vivipara</i>                       | Kri gostitelja                | Poljska                |   |
| KJ702453              | <i>Hepatozoon fitzsimonsi</i> | <i>Chersina angulata</i>                      | Kri gostitelja                | Južnoafriška republika | Cook in sod., 2014;                     |
| KM234646              | <i>Hepatozoon domerguei</i>   | <i>Madagascarophis colubrinus</i>             | Repno tkivo in kri gostitelja | Madagaskar             | Maia in sod., 2014                      |
| KM234647              | <i>Hepatozoon domerguei</i>   | <i>Madagascarophis colubrinus</i>             | Repno tkivo in kri gostitelja | Madagaskar             |   |
| KM234648              | <i>Hepatozoon domerguei</i>   | <i>Ithycyphus oursi</i>                       | Repno tkivo in kri gostitelja | Madagaskar             |   |
| KM234649              | <i>Hepatozoon domerguei</i>   | <i>Furcifer</i> sp.                           | Repno tkivo in kri gostitelja | Madagaskar             |   |
| KP119770              | <i>Hepatozoon ixoxo</i>       | <i>Amietophrynus garmani</i>                  | Kri gostitelja                | Južnoafriška republika | Netherlands in sod., 2014               |
| KP119771              | <i>Hepatozoon ixoxo</i>       | <i>Amietophrynus gutturalis</i>               | Kri gostitelja                | Južnoafriška republika |   |
| KP119772              | <i>Hepatozoon ixoxo</i>       | <i>Amietophrynus maculatus</i>                | Kri gostitelja                | Južnoafriška republika |   |
| KP119773              | <i>Hepatozoon theileri</i>    | <i>Amietia quecketti</i>                      | Kri gostitelja                | Južnoafriška republika |   |
| KR069082              | <i>Hemolivia parvula</i>      | <i>Kinixys zombensis</i>                      | Kri gostitelja                | Južnoafriška republika | Cook in sod., 2015                      |
| KR069083              | <i>Hemolivia parvula</i>      | <i>Kinixys zombensis</i>                      | Kri gostitelja                | Južnoafriška republika |   |
| KR069084              | <i>Hepatozoon fitzsimonsi</i> | <i>Kinixys zombensis</i>                      | Kri gostitelja                | Južnoafriška republika |   |
| (Slo_nova 1)          | <i>Karyolysus</i> sp.         | <i>Iberolacerta horvathi</i>                  | Repno tkivo in kri gostitelja | Slovenija              | Neobjavljeno, pridobljeno v tej nalogi. |
| (Slo_nova 2)          | <i>Karyolysus</i> sp.         | <i>Podarcis muralis Iberolacerta horvathi</i> | Repno tkivo in kri gostitelja | Slovenija              | Neobjavljeno, pridobljeno v tej nalogi. |
| (Slo_nova 3)          | <i>Karyolysus</i> sp.         | <i>Podarcis muralis</i>                       | Repno tkivo in kri gostitelja | Slovenija              | Neobjavljeno, pridobljeno v tej nalogi. |
| (Slo_nova 4)          | <i>Karyolysus</i> sp.         | <i>Podarcis muralis Iberolacerta horvathi</i> | Repno tkivo in kri gostitelja | Slovenija              | Neobjavljeno, pridobljeno v tej nalogi. |
| (Slo_nova 5)          | <i>Karyolysus</i> sp.         | <i>Iberolacerta horvathi</i>                  | Repno tkivo in kri gostitelja | Slovenija              | Neobjavljeno, pridobljeno v tej nalogi. |

se nadaljuje



nadaljevanje Preglednica 5: Preglednica vzorcev, vključenih v filogenetsko analizo.

| Dostopna šifra (NCBI) | Parazit               | Gostitelj                    | Vir izolata                   | Država    | Vir podatkov                           |
|-----------------------|-----------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------|--|
| (Slo_nova 6)          | <i>Karyolysus sp.</i> | <i>Iberolacerta horvathi</i> | Repno tkivo in kri gostitelja | Slovenija | Neobjavljen, pridobljeno v tej nalogi. |

Vse naše sekvence in sekvence iz literature smo poravnali z orodjem MAFFT (Kato in sod., 2002) in poravnavo zagnali v orodju PartitionFinder (Lanfear in sod., 2016) za izbor optimalnega evolucijskega modela, ki smo ga izbrali s pomočjo BIC kriterija (Bayesian Information Criterion). Izbrali smo model z najnižjim BIC. V našem primeru je bil to model GTR+I+G. Filogenetska drevesa smo gradili po dveh metodah. Prvo drevo smo zgradili po metodi maximum likelihood s pomočjo orodja RAxML (Stamatakis, 2014), bootstrap 1000, drugo drevo pa po Bayesovem pristopu s pomočjo orodja MrBayes (Huelsenbeck in Ronquist, 2001, Ronquist in Huelsenbeck, 2003). Parametri za bayesianski pristop so predstavljeni v spodnji preglednici (Enačba 1). Potek bayesianske analize smo grafično preverili z orodjem Tracer (Rambaut in sod., 2018), ki vizualizira in diagnosticira izhodne podatke MCMC verig. Pri analizi smo dosegli priporočeno vrednost ESS (efektivna velikost vzorca) nad 200. Vsa programska oprema je bila zagnana na javno dostopnem strežniku CIPRES (Miller in sod., 2010), ki nudi zahtevano strojno zmogljivost in programsko opremo za tovrstne analize.

Tabela 6: Delovni pogoji za Mr.Bayes

```
begin mrbayes;
  charset Subset1 = 1-2079;
  partition PartitionFinder = 1:Subset1;
  set partition=PartitionFinder;
  lset applyto=(1) nst=6 rates=invgamma;
  mcmc ngen=30000000 printfreq=1000 samplefreq=1000 nruns=2 nchains=4 temp=0.02;
  sump burnin=725000 nruns=2;
  sumt burnin=360000 nruns=2; end;
```

S strežnika CIPRES pridobljene rezultate (RAxML in MrBayes output) smo prvotno vizualizirali s pomočjo programa FigTree (Rambaut, 2009) in dokončno uredili ter vizualizirali s pomočjo programa R (R Core Team, 2020) zagnanega v okolju RStudio in paketi ape (Paradis & Schliep 2018), Biostrings (Pages in sod., 2020), ggtree (Yu in sod.,

2020), ggplot2 (Wickham, 2016), treeio (Wang in sod., 2020) in rphylopic (Chamberlain, 2020). Za ugotavljanje potencialnih odstopanj v njihovi topologiji smo končni drevesi primerjali vizualno.

### 3.4.2 Statistična obdelava podatkov prisotnosti in stopnje parazitizma

Vso statistično analizo smo izvedli v programu R, okolju RStudio s knjižnicami: glmulti (Calcagno, 2020), dplyr (Wickham in sod., 2020), car (Fox in Weisberg, 2019), MuMIn (Bartoń, 2020), MASS (Venables in Ripley, 2002), emmeans (Lenth, 2020), readxl (Wickham in Bryan, 2019), ggplot2 (Wickham, 2016), vcdExtra (Friendly, 2017), lmtest (Zeileis in Hothorn, 2002), effects (Fox in Weisberg, 2019; Fox, 2003), xlsx (Dragulescu in Arendt, 2020) in ggeffects (Lüdecke, 2018).

Podatke za vseh 137 osebkov smo najprej vizualizirali s histogrami in preverili njihovo porazdelitev. Tako podatki za prevalenco kot tudi intenziteto so kazali odstopanje od normalne porazdelitve podatkov; najbližje so bili binomski (prevalenca) in negativno binomski razporeditvi (intenziteta). Podatke za prevalenco smo analizirali s pomočjo GLM modela z binomsko razporeditvijo, zgrajenega po zgledu nedavnih objav s podobnimi analizami podatkov (Lazić in sod., 2017, Arakelyan in sod., 2019). Za intenziteto smo podatke testirali s pomočjo GLM modela z negativno binomsko porazdelitvijo; tudi tukaj smo z izbiro distribucije sledili recentni objavljeni literaturi (Lazić in sod., 2017, Arakelyan in sod., 2019). Pri analizah obeh podatkov smo sledili naslednjim korakom. Uporabili smo šest neodvisnih spremenljivk: vrsta, spol, logSVL, nadmorska višina, sintopičnost in lokacija ter interakcijo spremenljivk lokacija in logSVL. Prvotni model smo zgradili tako, da smo vključili vse spremenljivke in interakcijo spremenljivk; nato smo odvzemali posamezne spremenljivke ter modele med seboj primerjali. Za primerjavo modelov smo porabili metodo »likelihood ratio test« ter informacijske kriterije AIC, BIC in AICc. Na podlagi teh primerjav smo izbrali končni model, ki z največjimi verjetnostmi razloži vplive spremenljivk na testirane podatke o prevalenci in intenziteti parazitov pri kuščaricah.

Rezultati primerjav med modeli in enačbi izbranega končnega modela za prevalenco in intenziteto so predstavljeni v poglavju Rezultati.

Pridobljene rezultate obeh modelov smo testirali z Wald Chi kvadrat testom (Kneib in sod., 2013) in izvedli chi kvadrat post hoc teste marginalnih povprečij (Lenth, 2020) ter tako

pridobili rezultate o signifikantnih vplivih spremenljivk in paroma signifikantne razlike njihovih vplivov (v primeru intenzitete).

Za podatke o intenziteti smo glede na signifikantnost interakcije med dvema spremenljivkama (logSVL in lokacija) izračunali še Spearmanove koeficiente korelacije med logSVL in intenziteto za vsako lokacijo posebej.

Grafe smo izrisali s programom R v okolju RStudio s paketi ggplot2 (Wickham, 2016), ggpubr (Kassambara, 2020) in ggExtra (Attali & Baker, 2019).

### **3.4.3 Prostorska analiza in predstavitev podatkov**

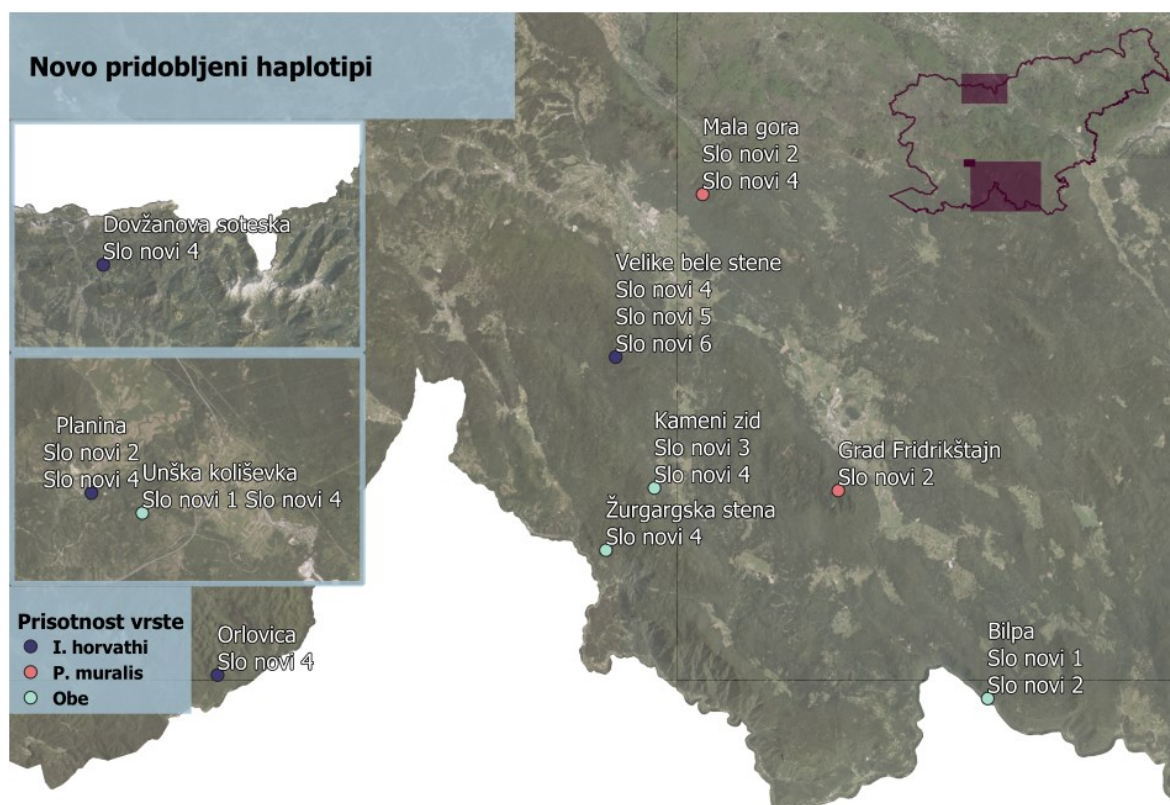
Prostorske podatke smo obdelali v programu QGIS (QGIS.org (2020)). Prisotnost vrste in število vzorčenih osebkov vsake vrste na posamezni lokaciji smo predstavili z vodoravnimi stolpčnimi grafi. Prevalenco smo za vseh 137 osebkov prikazali s pomočjo tortnih grafov po lokacijah; intenziteto smo za vseh 80 okuženih osebkov pokazali z različno intenzivno obarvanimi pikami na vsaki lokaciji. Izdelali smo še zemljevid prisotnosti novih haplotipov po lokacijah.

Sloje uporabljene za podlago smo pridobili iz javno dostopnih strežnikov WMS Geodetske uprave Republike Slovenije (GURS 2020). Končne zemljevide smo izdelali s pomočjo orodja Print Composer v QGIS.

## 4 REZULTATI

### 4.1 IDENTITETA PARAZITOV

Izmed vseh okuženih osebkov ( $n = 80$ ) smo fragment gena za 18S rRNA uspešno pomnožili za 29 parazitov iz okuženih osebkov kuščaric. Pridobljene sekvence so pokazale jasne rezultate PCR reakcij; na gelu smo lahko odčitali fragment prave velikosti glede na naš set primerjev. Vzorce, pri katerih smo pridobili kvaliteten PCR pomnožek, smo uspešno sekvencirali z obeh smeri in sestavili v konsenzno sekvenco. Za vsak vzorčen osebek smo pridobili eno konsenzno sekvenco. Po poravnavi in primerjavi pridobljenih sekvenc s sekvencami v podatkovnih zbirkah smo ugotovili, da sekvence, pridobljene v nalogi predstavljajo šest različnih novih haplotipov. Najpogostejši izmed njih je haplotip SLO\_NOVI 4, ki smo ga izolirali iz parazitov 19 kuščaric (Preglednica 6). Prostorska razporeditev haplotipov je predstavljena na zemljevidu (Slika 7).

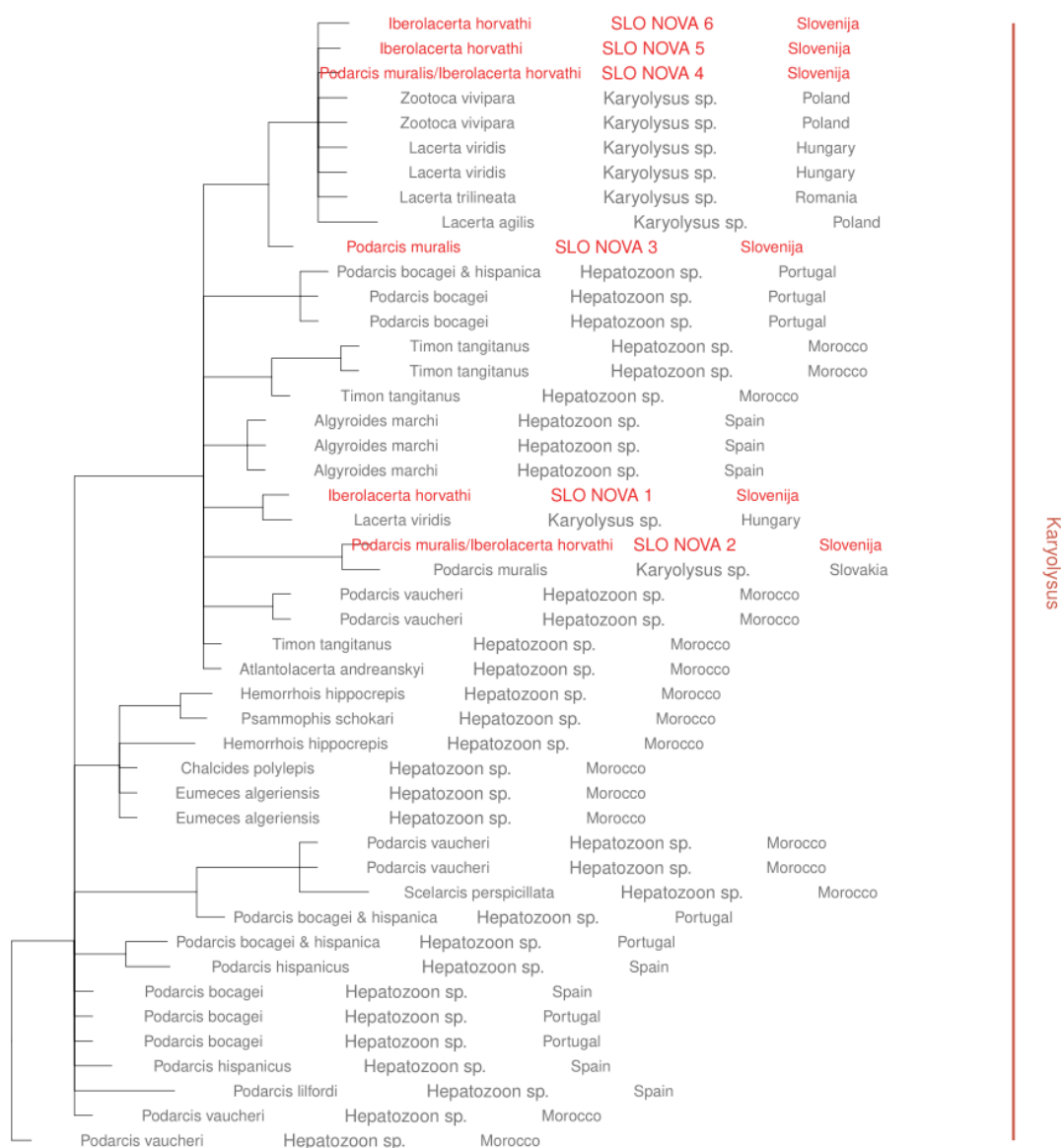


Slika 7: Zemljevid novo pridobljenih haplotipov fragmenta gena 18S rRNA izoliranega iz krvnih parazitov po vrstah kuščaric in lokacijah

Preglednica 7: Preglednica novo pridobljenih haplotipov in vir haplotipa

| Šifra novega haplotipa | Šifra izolata  | Št. izolatov |
|------------------------|--|--------------|
| SLO_NOVI 1             | UK4_IHOR_UK, BP4_IHOR_BP   | 2            |
| SLO_NOVI 2             | DB20734_PMUR, BP24_PMUR_BP, GF9_PMUR_GF, PL6_IHOR_PL   | 4            |
| SLO_NOVI 3             | KZ3_PMUR_KZ  | 1            |
| SLO_NOVI 4             | UK2_PMUR, KZ14_IHOR, DZ9_IHOR, ZS9_IHOR, 20705_IHOR, 20708_IHOR, 20713_IHOR, 20737_PMUR, DB12475_IHOR, DB12476_IHOR, DB12478_IHOR, DB1247_IHOR, DB12483_IHOR, DB12486_IHOR, DB12491_IHOR, DB12492_IHOR, DB12494_IHOR, DB20729_PMUR, DB20732_PMUR | 19           |
| SLO_NOVI 5             | 13926_IHOR_VBS   | 1            |
| SLO_NOVI 6             | 20706.18_IHOR, 20714.18_IHOR   | 2            |

Pridobljene sekvence so bile v pomoč pri identifikaciji parazitov, prisotnih v obeh vrstah kuščaric. Na podlagi drevesa, zgrajenega po Karadjian in sodelavci (2015), v katerega smo vključili tudi naše vzorce, smo ugotovili, da ležijo znotraj polifiletske skupine oziroma rodu *Karyolysus* (Slika 8, Priloga A, Priloga B). To so znani paraziti kuščaric iz družine *Lacerta* in drugih predvsem evropskih kuščaric (Haklova-Kočikova in sod., 2014). Pridobljene sekvence se v drevo umeščajo ob vzorce iz srednje in vzhodne Evrope. V nalogi je predstavljeno poddrevo rodu *Karyolysus* (Slika 8); celotni drevesi (RAxML, MrBayes) sta na voljo kot prilogi A in B.



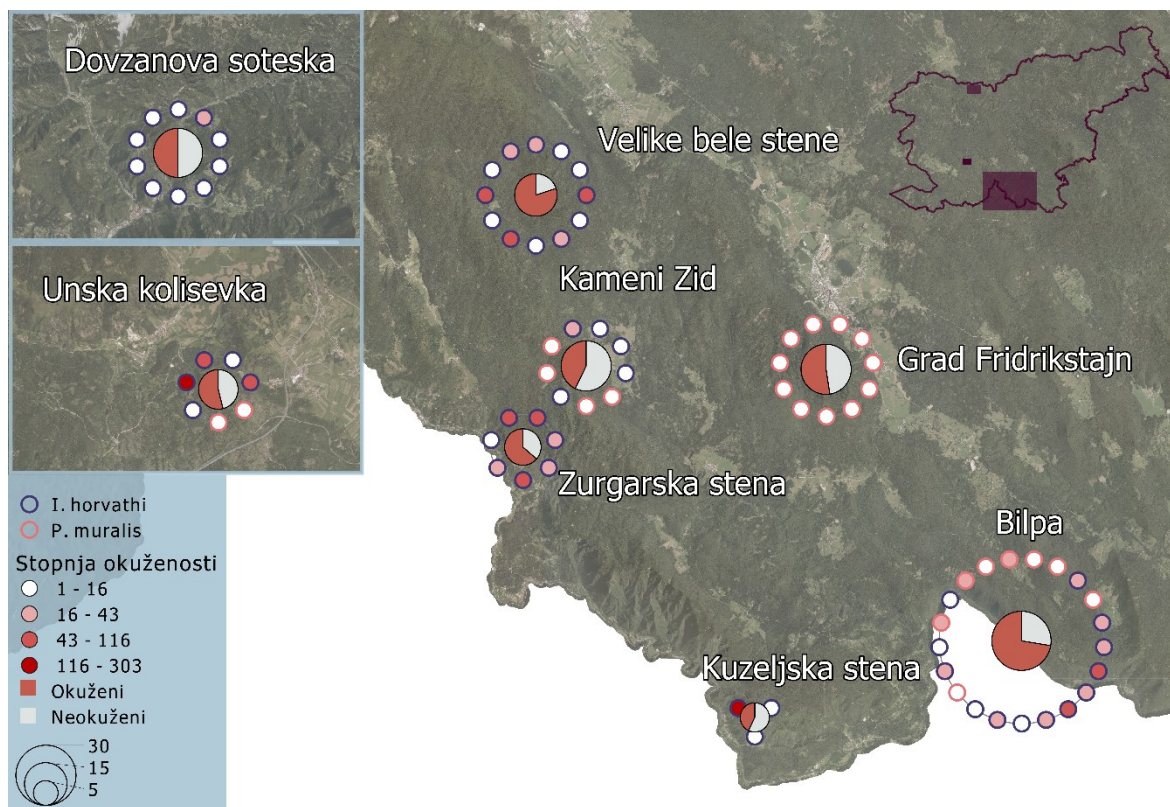
Slika 8: Bayesijski kladogram polifiletskega rodu *Karyolysus*. Veje predstavljajo haplotipe. Tekstovno si v posamezni vrstici iz leve proti desni sledijo parazit, gostitelj in lokacija. Z rdečo so označene novo pridobljene sekvence iz Slovenije.

## 4.2 PRIMERJAVA PREVALENCE IN INTENZITETE PARAZITIZMA

### 4.2.1 Prevalenca in intenziteta

Skupno smo za prevalenco in intenziteto analizirali 137 osebkov, izmed katerih jih je bilo 80 okuženih s paraziti. Na lokacijah, kjer sta bili prisotni obe vrsti, so bili vedno okuženi osebki obeh vrst (Slika 9). Največji delež okuženih osebkov (prevalenca) je bil na lokaciji Velike bele stene, najmanjši delež pa na lokacijah Kuželjska stena in Kameni zid (Slika 9).

Pri osebkih *I. horvathi* je bile zabeležena višja intenziteta kot pri *P. muralis*, tako v alotopičnih kot sintopičnih populacijah (Slika 9).



Slika 9: Zemljevid vzorčenih lokacij z deleži okuženih osebkov (tortni graf) in stopnjo okuženosti posameznega okuženega osebka. Kjer barvna lestvica označuje intenziteto (stopnjo okuženosti) okužbe, temnejša pomeni višjo intenziteto. Barva obrobe določa vrsto kuščarice. Velikost osrednjih krogov označuje število vzorčenih osebkov na lokaciji.

Postavljene modele za prevalenco smo med seboj in z ničelnim modelom primerjali po AICc kriteriju. Za najzanesljivejši model prevalenca krvnih parazitov se je v našem primeru izkazal model, ki vključuje spremenljivke vrsta in interakcijo lokacija\*logSVL (Preglednica 8). Končni izbran model smo testirali z Likelihood-ratio testom (Preglednica 9). Spremenljivke nadmorska višina, spol in sintopičnost niso bile vključene v najzanesljivejši model. Prevalenca je bila višja pri vrsti *I. horvathi* (Slika 10-C). Glede na statistično značilen vpliv interakcije med dejavnikoma logSVL in lokacija lahko iz grafičnega prikaza vidimo, da so bili na Velikih belih stenah in na Žurgarski steni večji osebki bolj pogosto okuženi kot manjši, medtem ko podobnega trenda pri drugih lokacijah ni prepoznati (Slika 10-A). Iz grafičnega prikaza prevalenca krvnih parazitov po lokacijah in logSVL (Slika 10-A) vidimo,

da obstajajo razlike med lokacijami. Različno veliki osebki so različno pogosto okuženi med lokacijami; na nekaterih je več manjših okuženih osebkov, drugje srednje velikih in nekje so najpogosteje okuženi največji osebki.

Prvotni model za prevalenco:

$$\text{prevalenca} \sim \text{spol} + \text{nadmorska višina} + \text{vrsta} + \text{sintopičnost} + \text{logSVL} * \text{lokacija} \dots(1)$$

Po analizi modelov končni okrnjen model za prevalenco:

$$\text{prevalenca} \sim \text{vrsta} + \text{lokacija} * \text{logSVL} \dots(2)$$

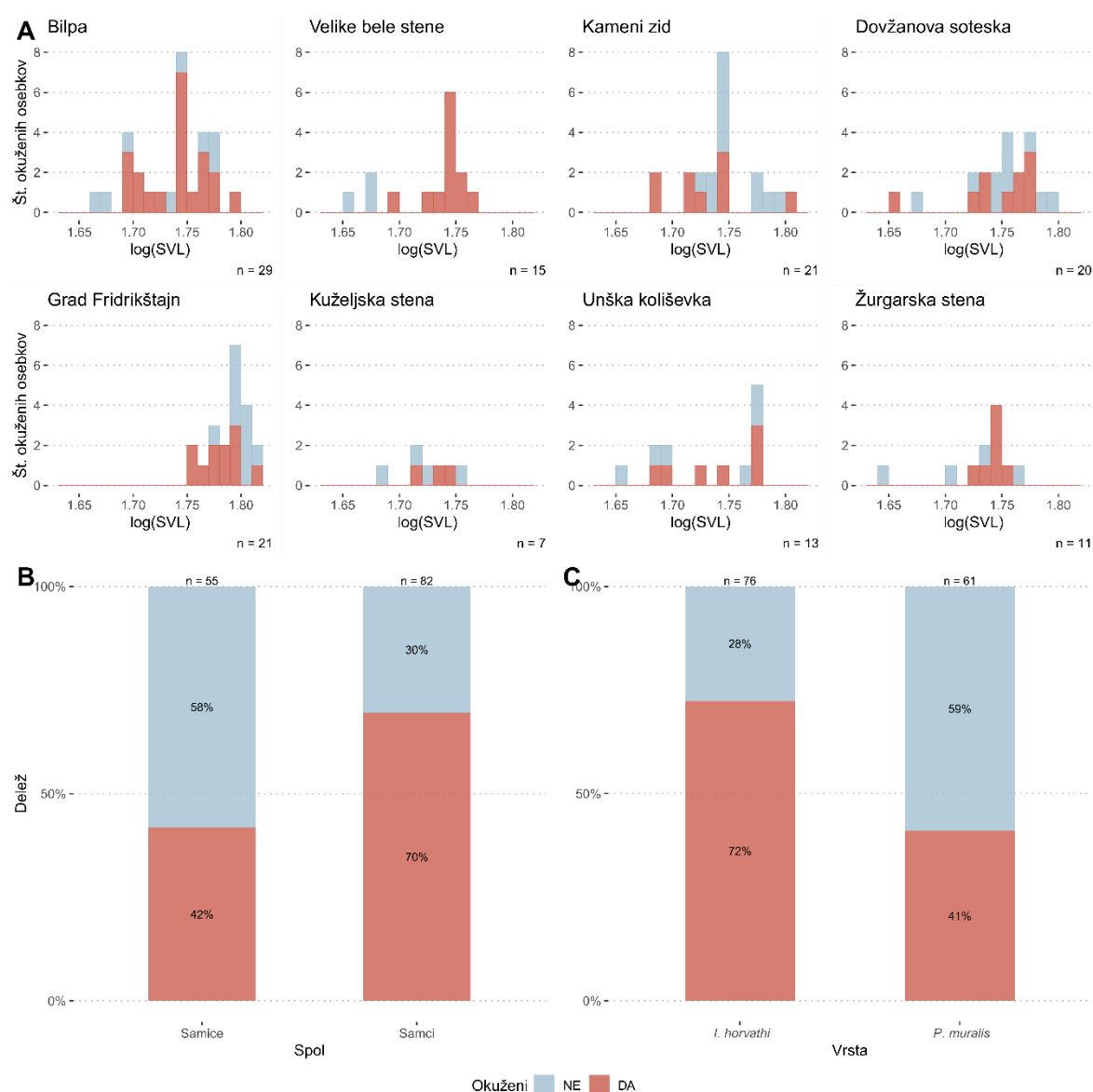
Preglednica 8: Primerjava modelov za prevalenco, razvrščenih po naraščajočih AICc vrednostih. SVL (snout vent length) je dolžina od vrha gobca do kloake kuščarja.

| Model   | Stopinje svobode | AICc   |
|---|------------------|--------|
| Prevalenca ~ Vrsta + logSVL*Lokacija  | 17               | 159,48 |
| Prevalenca ~ Spol + Nadmorska višina + Vrsta + Sintopičnost + logSVL*Lokacija | 18               | 161,06 |
| Prevalenca ~ Spol+Vrsta+logSVL*Lokacija                                       | 18               | 161,06 |
| Prevalenca ~ Spol + logSVL + Vrsta  | 4                | 170,13 |
| Prevalenca ~ Spol + Vrsta   | 3                | 172,33 |
| Prevalenca ~ Vrsta  | 2                | 176,25 |
| Prevalenca ~ Spol   | 2                | 179,71 |
| Prevalenca ~ Spol + logSVL*Lokacija   | 17               | 181,04 |
| Ničelni model   | 1                | 188,07 |

Preglednica 9: Rezultati Likelihood-ratio analize neodvisnih spremenljivk končnega modela na prevalenco krvnih parazitov

|                   | LR Chi <sup>2</sup> | Stopinje svobode | P vrednost    |
|-------------------|---------------------|------------------|---------------|
| Vrsta             | 26.533              | 1                | 2,590E-07 *** |
| log SVL           | 6.064               | 1                | 0,0138 *      |
| Lokacija          | 28.052              | 7                | 0,0002 ***    |
| log SVL* Lokacija | 28.069              | 7                | 0,0002 ***    |





Slika 10: Grafični prikaz rezultatov prevalenca krvnih parazitov. A – prevalenca po lokacijah in velikosti (logSVL), B – Prevalenca po spolu, C – Prevalenca po vrsti

Pri intenziteti okužbe smo v analize vključili vseh 137 osebkov. Najzanesljivejši model intenzitete okužbe je bil tisti, ki je vključeval naslednje spremenljivke: vrsta, spol in interakcija med SVL in lokacijo (Preglednica 9, Preglednica 10). Tudi tukaj smo modele primerjali med seboj in z ničelnim modelom. Model smo izbrali na podlagi primerjave AICc. Ker sta celoten in deloma okrnjen model pokazala enak AICc in s tem nakazala trivialnost dveh spremenljivk, smo se odločili za okrnjen model. Končni izbran model smo testirali še z Likelihood-ratio testom (Preglednica 11). Spremenljivki nadmorska višina in sintopičnost nista bili vključeni v najzanesljivejši model. Intenziteta je bila višja pri samcih in pri vrsti *I.*

*horvathi* (slika 11 – B, C). S testom Spearmanove korelacije med logSVL in intenziteto okužbe po lokacijah smo zaznali statistično značilno negativno korelacijo velikosti in intenzitete pri dveh populacijah: Kameni zid in Grad Fridrikštajn (Slika 11 – A).

Prvotni model za intenziteto:

$$\text{intenziteta} \sim \text{spol} + \text{nadmorska višina} + \text{vrsta} + \text{sintopičnost} + \text{logSVL} * \text{lokacija} \quad \dots(3)$$

Po analizi modelov končni okrnjen model za intenziteto:

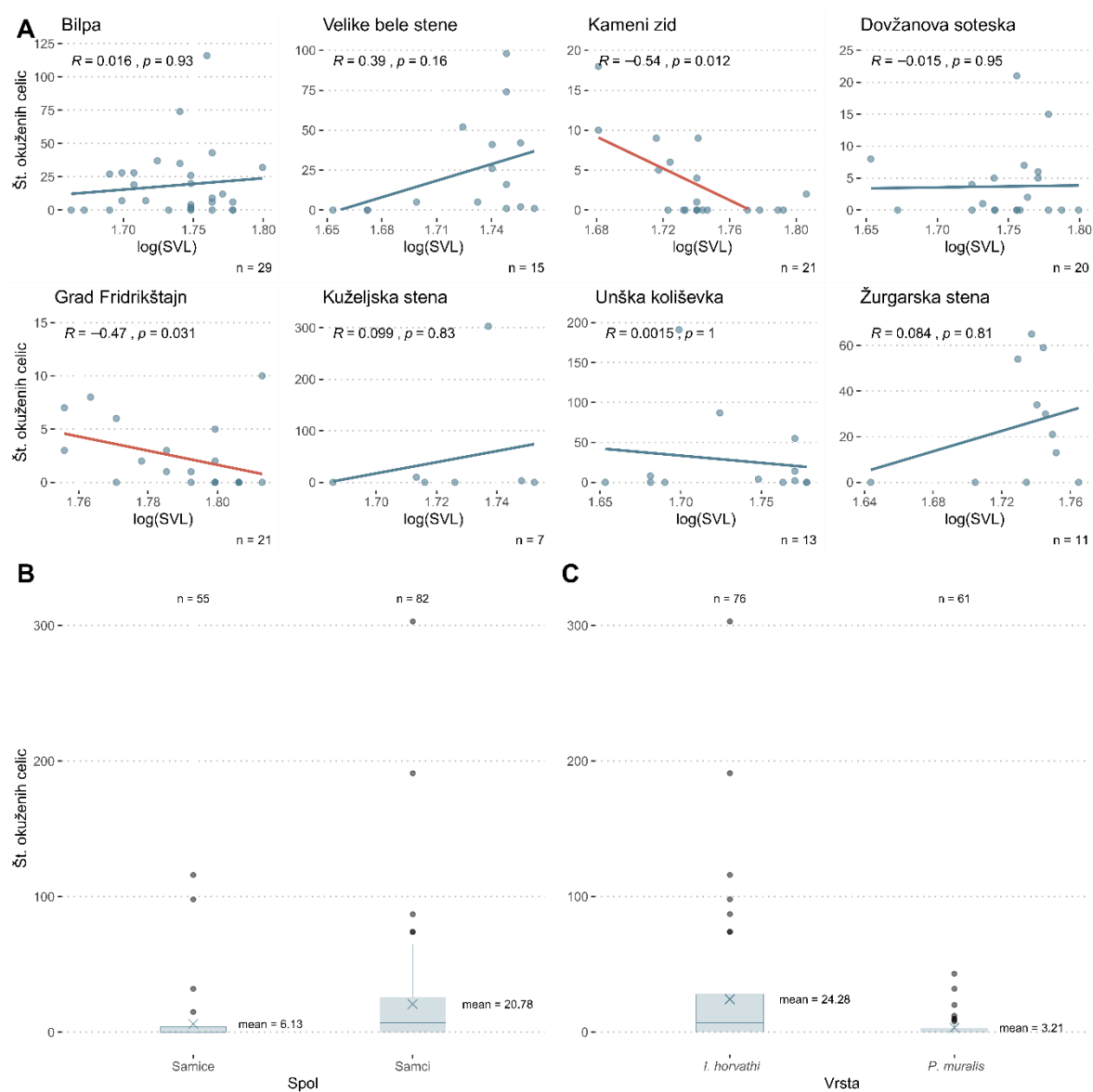
$$\text{intenziteta} \sim \text{vrsta} + \text{spol} + \text{lokacija} * \text{logSVL} \quad \dots(4)$$

Preglednica 10: Primerjava modelov za intenziteto, razvrščenih po naraščajočih AICc vrednostih. SVL (snout vent length) je dolžina od vrha gobca do kloake kuščarja

| Model   | Stopinje svobode | AICc   |
|---|------------------|--------|
| Intenziteta ~ Spol + Nadmorska višina + Vrsta + Sintopičnost + logSVL* Lokacija | 19               | 803,25 |
| Intenziteta ~ Vrsta+Spol+Lokacija*logSVL  | 19               | 803,25 |
| Intenziteta ~Vrsta+logSVL*Lokacija  | 18               | 807,7  |
| Intenziteta ~ Spol+logSVL+Vrsta   | 5                | 809,17 |
| Intenziteta ~ Spol+Vrsta  | 4                | 813,14 |
| Intenziteta ~ Vrsta   | 3                | 817,16 |
| Intenziteta ~ Spol+logSVL*Lokacija  | 18               | 825,66 |
| Intenziteta ~ Spol  | 3                | 833,75 |
| Ničelni model   | 1                | 840,89 |

Preglednica 11: Rezultati Likelihood-ratio analize neodvisnih spremenljivk končnega modela na intenziteto krvnih parazitov

|                  | LR Chi^2 | Stopinje svobode | P vrednost      |
|------------------|----------|------------------|-----------------|
| Vrsta            | 28.308   | 1                | 1,03493E-07 *** |
| Spol             | 7.328    | 1                | 0,0068 **       |
| Lokacija         | 21.164   | 7                | 0,0035 **       |
| log SVL          | 11.105   | 1                | 0,0009 ***      |
| Lokacija: logSVL | 21.658   | 7                | 0,0029 **       |



Slika 11: Grafični prikaz rezultatov intenzitete okužbe s krvnimi paraziti. A – Grafi po lokaciji in velikosti (logSVL), z rdečo označeni grafi, kjer je spermanova korelacija med velikostjo in intenziteto statistično signifikantna, B – Graf po spolu, C – Graf po vrsti. Pri grafih B in C so s pikami označeni osamelci; škatla z brki predstavlja minimum, Q1, Q2, Q3 in maksimum. Z mean označena aritmetična sredina.

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 IDENTIFIKACIJA PARAZITOV

Pred izvedbo naloge smo pričakovali, da bodo pri kuščaricah, vključenih v raziskavo, prisotni paraziti, ki pripadajo rodovoma *Hepatozoon* in *Karyolysus*. Po pregledu filogenetskih rezultatov lahko po eni strani sklepamo, da so znotrajcelični krvni paraziti, prisotni pri pozidni in velebitski kuščarici, predstavniki rodu *Karyolysus*. Vendar pa lahko po drugi strani zaradi nerazjasnjene filogenetske razmejenosti obeh rodov sklepamo tudi, da rodova nista recipročno monofiletska. Zato taksonomska uvrščenost naših vzorcev v rod *Karyolysus* ni povsem gotova. Stadiji, ki so bili najpogosteje opaženi v eritrocitih, so kot pričakovano gamonti, ki so del nespolnega cikla razmnoževanja hemogregarin v vmesnih gostiteljih. *Karyolysus* so znan parazit kuščarjev v centralno in vzhodnoevropski regiji (Haklova-Kočikova in sod., 2014), kar še dodatno potrjuje naše rezultate. Dosedanje znanje o taksonomiji teh organizmov nam omogoča samo določitev do stopnje rodu, saj v tem rodu obstaja še mnogo neopisanih vrst, ki se zadnje čase prepoznavajo s pomočjo naprednejših genetskih analiz. Dodaten zaplet pri identifikaciji so tudi mnoge taksonomske nejasnosti v skupini hemogregarin, saj lahko v objavljeni literaturi opazimo, da so vzorci pogosto uvrščeni v različne rodove in morfološki znaki niso zanesljivi (Kardjian in sod., 2015).

Kljub glavni značilnosti rodu *Karyolysus*, ki je opisana v mnogih primerih, da ta vpliva na obliko jeder eritrocitov (Telford, 2016), v naših vzorcih na prvi pogled nismo opazili omenjenih sprememb v jedrih eritrocitov plazilcev. Glede na slabo opisnost vrst tega rodu to morda ni značilnost celotnega rodu oziroma imajo vrste znotraj rodu različne vplive na gostiteljeve celice, a bi za tovrstne zaključke potrebovali natančnejšo morfološko analizo parazitov in gostiteljevih eritrocitov. Ker si pripadniki rodov *Karyolysus* in *Hepatozoon* delijo mnogo bioloških lastnosti (Telford, 2016), je za potrebe naloge določitev do rodu dovolj natančna, da lahko sklepamo o pomenu prisotnosti parazita za gostitelja, o možnih vmesnih gostiteljih, kar so najverjetneje pršice rodu *Ophionyssus*, in ne nazadnje tudi o možnih vplivih na njuno medvrstno interakcijo (tekmovanje).

Pridobili smo šest novih haplotipov. Vsem šestim novo pridobljenim haplotipom so najbližje sestrške skupine v filogenetskem drevesu vzorci iz srednje in vzhodne Evrope. V prihodnosti bi bilo smiselno natančnejše in mednarodno vzorčenje krvnih parazitov evropskih kuščaric,

kar bi omogočilo poglobljeno razumevanje razširjenosti in raznolikosti skupine v Evropi in morda vodilo v opis evropskih vrst rodu *Karyolysus*, ki je do sedaj še slabo raziskan. Ker smo pridobili relativno majhno število novih haplotipov, žal ne moremo podati geografske interpretacije rezultatov znotraj Slovenije, lahko pa, kot že omenjeno, sklepamo, da gre za predstavnike, ki poseljujejo širše področje Evrope. Iz objavljenih virov je znano, da predstavniki rodu *Karyolysus* okužujejo raznolike predstavnike kuščaric; iz tujine so znani primeri okužbe pri živorodni kuščarici (*Zootoca vivipara*), zelencu (*Lacerta viridis*) in drugih (Haklova-Kočikova in sod., 2014). Pridobljena filogenetska drevesa (Priloga A, Priloga B) so skladna z drevesi izdelanimi v predhodnih objavah (Karadjian in sod., 2015, Maia in sod., 2015). 19 od 29 pridobljenih izolatov pripada enemu haplotipu. Ker filogenija hemogregarin presega okvirje naloge in nam je filogenetska analiza služila le kot orodje identifikacije parazitov, smo se pri diskusiji in interpretaciji tega sklopa rezultatov omejili le na identifikacijo parazitov do rodu.

## 5.2 PREVALENCA IN INTENZITETA PARAZITOV

Izmed 137 analiziranih osebkov jih je bila okužena več kot polovica (N=80). Okuženi so bili tako osebki pozidne kuščarice kot osebki velebitske kuščarice. Čeprav je naša prvotna hipoteza potencialnega vpliva krvnih parazitov na medvrstno interakcijo gostiteljev (kuščaric) temeljila na primerjavi prevalence in intenzitete med sintopičnimi in alotopičnimi lokacijami, bi se le-te morale izkazati kot razlike med obema tipoma populacij. Razlik med alotopičnimi in sintopičnimi populacijami v prevalenci in intenziteti krvnih parazitov v naši raziskavi nismo zaznali.

Na našem vzorcu pa smo odkrili, da se prevalenca in intenziteta krvnih parazitov statistično značilno razlikujeta med vrstama kuščaric. V celotnem vzorcu je bil večji delež okuženih velebitskih kuščaric, ki so imele tudi višjo intenziteto okuženosti v primerjavi s pozidnimi kuščaricami, ki so imele nižji delež okuženih in nižjo intenziteto okuženosti. Glede na to, da je velebitska kuščarica ozko razširjena vrsta in specializirana za specifična okolja, pozidna kuščarica pa je generalistična vrsta, ki se pojavlja široko po Evropi, je rezultat pričakovan, saj bi naj v splošnem imele generalistične vrste bolj prilagojen imunski sistem na potencialne parazitske okužbe z vseprisotnimi paraziti oziroma je parazitiranost vrstno specifična (Barthel in sod., 2014; Pulgarin in sod., 2018). Pojavlja se tudi možnost, da je razširjenost pozidne kuščarice posledica njene odpornosti na vseprisotne parazite, ki jim ožje

specializirane in endemne vrste niso kos oziroma pri njih prihaja do višje prevalence in intenzitete okužbe. Znano je namreč, da obstajajo različne povezave med prevalenco in intenziteto krvnih parazitov in načinom življenja gostitelja (mobilnost, odnosi s predstavniki iste vrste, vedenje ob plenjenju).

Prav tako se je pokazala razlika v intenziteti okužbe v povezavi z velikostjo osebkov glede na lokacijo. V nasprotju s pričakovanim trendom rasti okužbe z velikostjo kuščaric, ki so ga med drugimi opazili Lazič in sod., 2017, smo v naši raziskavi na dveh lokacijah pokazali nasproten trend. Intenziteta okužbe je z velikostjo padala. To sta tudi edini lokaciji, kjer smo s post hoc testi potrdili signifikantno korelacijo med velikostjo in intenziteto okužbe. Možne razloge za tovrstne razlike lahko po eni strani pripišemo razlikam v mikrohabitatnih pogojih in njihovem vplivanju na gostoto parazitov ali njihovih vmesnih gostiteljev, po drugi strani pa vplivu okoljskih pogojev, ki vplivajo na kuščarice. Vpliv velikosti osebkov na stopnjo okuženosti lahko pripišemo manj razvitemu imunskemu sistemu juvenilnih osebkov, povečanemu stresu mladičev zaradi še ne vzpostavljenega teritorija ali zavrti rasti osebkov zaradi okužbe. Zanimivo vprašanje za nadaljnje raziskovanje je, ali in na kakšen način je mogoče tovrstne pogoje prepoznati in definirati.

V analizi prevalence je bil prvotno vključen tudi spol. Ta pa v našem primeru ni izkazal statistično značilne korelacije s prevalenco okužbe, kar je v nasprotju s pričakovanju glede na dosedanje objave predstavljene v pregledu literature (Schall in sod., 1992). Pokazal se je kot pomemben dejavnik pri intenziteti okužbe, kjer so imeli samci višjo intenziteto okužbe kot samice. Razlaga za opaženi vzorec bi bila lahko imunosupresivna lastnost testosterona, ki zlasti v času parjenja slabi aktivnost in moč imunskega odziva (Salvador in sod, 1997). Ker imajo samci v nekaterih obdobjih torej oslavljen imunski sistem na račun investicije energije v hormonske spremembe in v izrazito bolj rizično vedenje, je rezultat pričakovan. Možna razlaga so tudi vedenjske razlike med samci in samicami. Samci med paritvenim obdobjem namenijo velik delež energije iskanju samice, pri čemer se izpostavljajo tveganim vedenjem in sub optimalnim okoljem. Zanimiva nadaljnja analiza, ki bi dodatno razložila pomen večje intenzitete okužbe pri samcih, bi bila primerjava obarvanosti samcev. Znano je, da pri nekaterih vrstah intenziteta okužbe korelira z intenziteto obarvanosti (Megia-Palma in sod., 2018).

V analize smo kot možen dejavnik vključili tudi nadmorsko višino, ki je izrazit element razlik v življenjskih slogih med kuščaricama. Velebitska kuščarica namreč poseljuje višje ležeča okolja in izbira drugačne temperaturne optimume kot pozidna, a se pri nas ta dejavnik ni izkazal kot statistično značilen. Predvidevali smo, da je nadmorska višina kot dejavnik temperature, vlažnosti in drugih okoljskih dejavnikov lahko pomembna kot dejavnik stresa za kuščarice. Specializirana velebitska kuščarica bi tako lahko pri nižjih nadmorskih višinah doživljala večja odstopanja od svojega optimuma. Nasprotno bi generalistični pozidni kuščarici višja okolja z nižjimi temperaturami lahko predstavljala dodaten fiziološki stres in vplivala na prevalenco in intenziteto. Možen razlog, da nismo uspešno potrdili korelacije nadmorske višine in vpliva sintopije, je tudi relativno majhno število lokacij, vključenih v raziskavo, premajhen višinski gradient med lokacijami in dejstvo, da gostota populacije gostitelja in nekateri še neprepoznani dejavniki lahko vplivajo na okuženost s paraziti in lahko »zamaskirajo« vpliv okoljskih dejavnikov, kot je temperatura.

### 5.3 VPLIV NA KUŠČARICI

Na podlagi razlik v prevalenci in intenziteti v kombinacij z rezultati identifikacije parazitov ne moremo izključiti možnosti, da gre pri kompeticiji med pozidno in velebitsko kuščarico v neki meri tudi za parazitsko posredovano kompeticijo. Na to nakazuje rezultat, da si obe vrsti kuščaric delita istega krvnega parazita (pojav identičnih haplotipov pri obeh vrstah). Znano je, da je velebitska kuščarica kot izrazit specialist v kompetitivnem odnosu s pozidno kuščarico v slabšem položaju, saj je pozidna kuščarica kompetitivno močnejša v agonističnih interakcijah (Žagar in sod. 2015), samci pa imajo močnejši ugriz in večjo glavo (Žagar in sod. 2017). Poleg tega je velebitska kuščarica tudi manjša in temperaturno bolj občutljiva vrsta (Osojnik in sod. 2013). Sklepali bi lahko tudi, da je lahko manj kompetitivna vrsta tudi bolj parazitirana, kot se v našem primeru kaže v povečanem deležu osebkov, ki so okuženi s krvnimi paraziti in v višji intenziteti okužbe pri velebitski kuščarici. Vendar pa bi, da bi ugotovili pomen kompeticije za parazitiranost, višjo parazitiranost morali zaznati le v primeru sintopije med vrstama, kjer prihaja do dejanskih interakcij, kar pa z analizami nismo potrdili (sintopija ne razlaga razlik v prevalenci in intenziteti). Najverjetneje gre za kompleksen sistem, kjer kompeticija med gostiteljema definira prisotnost parazita; sočasno prisotnost parazita do neke mere definira kompetitiven odnos. Morda gre tudi za intrinzične

»host-specific« razlike v parazitiranosti, ki so posledica vedenjskih in fizioloških razlik (imunskega sistema) med vrstama kuščaric oziroma kakšen drug, kompleksen ekološki dejavnik, ki ga nismo uspeli prepoznati. Na podlagi znanih objav lahko sklepamo, da v sintopičnih okoljih, kjer prihaja do kompeticije med kuščaricama, paraziti igrajo pomembno vlogo. Čeprav vpliva sintopije nismo statistično zaznali, znani vplivi parazitov na gostitelje, predvsem fiziološki, zagotovo pomembno vplivajo na kompetitivno sposobnost osebkov določene vrste. Sklepamo lahko, da je v sintopični okoljih velebitska kuščarica podrejena pozidni, čemur morda botruje tudi višja prevalenca in intenziteta krvnih parazitov.

Več kot polovica vseh vzorčenih osebkov je bila okuženih. Predvidevamo lahko torej, da so paraziti pomemben del krajine, ki definira selektivne pritiske na obe vrsti. Ker pa so razlike med vrstama jasne, lahko sklepamo, da so v sintopičnih okoljih paraziti močnejši dejavnik selekcije pri velebitski kuščarici.

Glede na to, da so bili samci bolj intenzivno okuženi, je verjetno, da je prisotnost parazitov močan selektivni pritisk, saj imajo močno okuženi osebki pogosto nižji fitness zaradi morfoloških in fizioloških sprememb. Zanimiva primerjava, ki jo naloga odpira, vključuje primerjavo okuženosti samcev med vrstama, analizo katere pa nam naš vzorec žal ne omogoča.

Zaključimo lahko, da so pritiski parazitov različni med lokacijami, a žal zaradi nezadostnih podatkov o lastnostih lokacij teh rezultatov ne moremo komentirati v smislu vpliva na kompeticijo med vrstama.

Čeprav smo v obeh primerih (prevalenca in intenziteta) zavrnili prvotno hipotezo o vplivu sintopičnosti, se med vrstama kaže jasna razlika v interakcij s paraziti. Velebitska kuščarica je tako bolj pogosto okužena in tudi bolj okužena. Ta element zagotovo predstavlja stres, ki se lahko kaže tudi v interakciji s kompetitorjem. Opazili smo tudi izrazito vlogo lokacije in velikosti, katerih interakcija je očitno kompleksen dejavnik verjetnosti okužbe in intenzitete okužbe.

Rezultati, pridobljeni v nalogi, imajo v primeru velebitske kuščarice, ki je endemit Dinaridov in dela Alp, tudi naravovarstven pomen, saj nam dodatno osvetljujejo ekologijo vrste;



sočasno nam nakazujejo tudi nekatere dejavnike ogrožanja. V primeru sprememb v habitatih ali okoljskih spremembah temperature in vlažnosti bo generalistična pozidna kuščarica vse močnejše posegala v življenjski prostor velebitske kuščarice. Kot je lahko razvidno iz naših rezultatov, bo to prineslo tudi večjo verjetnost za okužbe s paraziti; vsi ti dejavniki v sodelovanju lahko za vrsto na neki točki pomenijo resno ogroženost ali izumrtje.

## 6 SKLEPI

- Z molekularnimi metodami smo uspešno potrdili prisotnost in identiteto krvnih parazitov pri obeh vrstah kuščaric. Paraziti prisotni pri proučevanih vrstah kuščaric sodijo v rod *Karyolysus*.
- Velebitska kuščarica je v dvovrstnem sistemu s pozidno kuščarico bolj pogosto okužena in ima višjo intenziteto okužbe s krvnimi paraziti.
- Samci proučevanih vrst kuščaric imajo višjo intenziteto okužbe s krvnimi paraziti kot samice.
- Čeprav nismo potrdili hipoteze razlike v prevalenci in intenziteti okužbe med sintopičnimi in alotopičnimi lokacijami, lahko na podlagi objavljene literature in ob poznavanju vplivov parazitov na plazilce predvidevamo, da paraziti igrajo vlogo v soobstoju obeh vrst kuščaric.
- Na dveh lokacijah smo potrdili negativno korelacijo med velikostjo kuščaric in intenziteto okužbe, kar je v nasprotju s pričakovanji. Potrebne bodo bolj poglobljene analize in intenzivnejše vzorčenje populacij, da pridobimo zanesljivejše podatke.
- Tudi spremenljivka nadmorska višina se v naših rezultatih analiz prevalence in intenzitete krvnih parazitov ni izkazala za statistično značilno kljub pričakovanju, da so lahko nižje temperature v okolju na višjih nadmorskih višinah dodatni stresni dejavnik.

## 7 POVZETEK

Naloga predstavlja prvo delo, ki se v slovenskem prostoru ukvarja s krvnimi, znotrajceličnimi paraziti plazilcev oziroma natančneje kuščaric. Metodološko temelji na razvijajočem se polju raziskovanja krvnih parazitov po svetu, katerih vpliv in prisotnost postajata zanimivo vprašanje tako v smislu biologije parazitov kot tudi v ekološkem kontekstu soobstoja vrst.

Identiteto parazitov, opaženih pri pozidni (*Podarcis muralis*) in velebitski (*Iberolacerta horvathi*) kuščarici, smo preverili s pomočjo molekularnih metod, natančneje z izolacijo in sekvenciranjem dela 18S gena. Vsi izolati pripadajo rodu *Karyolysus*, pogostemu rod hemogregarin, ki okužujejo plazilce. Prisotnost parazitov smo potrdili pri obeh vrstah kuščaric. Skupno smo pridobili 6 novih haplotipov; določitev do vrste žal za zdaj ostaja nerazjasnjena. Novo pridobljeni haplotipi so po filogenetski analizi najbližje drugim evropskim izolatom *Karyolysus*, predvsem izolatom iz srednje in vzhodne Evrope.

Po identifikaciji parazitov smo delo nadaljevali z oceno prevalence in intenzitete parazitske okužbe pri kuščaricah. Prevalenco smo ovrednotili na podlagi krvnih razmazov, odvzetih na terenu. Če smo v razmazu opazili okužene rdeče krvne celice, smo vzorec označili kot pozitiven. Na vsakem razmazu smo prešteli 2500 rdečih krvničk in sočasno prešteli delež rdečih krvničk, ki je bil parazitiran in tako pridobili tudi vrednost o intenziteti okužbe.

Skupno smo analizirali krvne razmaze 137 osebkov; pri 80 smo potrdili okužbo. Osebk, ki so bili namenjeni viru krvi, prihajajo iz 8 lokacij pretežno v jugovzhodni Sloveniji; 5 lokacij je bilo sintopičnih, 3 alotopične.

Pridobljene vrednosti smo analizirali z GLM metodo, kjer smo opazovali pomen vrste, spola in interakcije lokacije z velikostjo na prevalenco in intenziteto okužbe. Analiza je pokazala, da je statistično signifikantno večji del okuženih osebkov vrste velebitska kuščarica. Tudi intenziteta okužbe je višja pri velebitski kuščarici. Intenziteta okužbe je bila višja pri samcih. V nasprotju s pričakovanji smo v dveh lokacijah zaznali, da se intenziteta okužbe manjša z naraščajočo velikostjo.

Žal nismo uspeli potrditi razlik v okuženosti glede na sintopičnost/alotopičnost posamezne populacije. Prav tako nismo potrdili razlike med populacijami, ki poseljujejo različne

nadmorske višine. Predvidevamo, da bi za tovrstno analizo potrebovali zanesljivejši vzorec in bolj poglobljeno poznavanje mikrohabitatnih razlik med lokacijami, ki imajo lahko pomemben vpliv na okuženost.

## 8 VIRI

- Abdel-Baki A. A., Al-Quraishy S., Zhang J. 2014. Redescription of *Haemogregarina garnhami* (Apicomplexa: Adeleorina) from the blood of *Psammophis schokari* (Serpentes: Colubridae) as *Hepatozoon garnhami* n. comb. based on molecular, morphometric and morphologic characters. *Acta parasitologica*, 59, 2: 294-300
- Álvarez-Calvo J. A. 1975. Nuevas especies de hemococcidios en lacértidos españoles. *Cuadernos de Ciencias Biológicas*, 4: 207-222
- Amo L., López P., Martín J. 2004. Prevalence and intensity of haemogregarinid blood parasites in a population of the Iberian rock lizard, *Lacerta monticola*. *Parasitology Research*, 94, 4: 290-293
- Amo L., López P., Martín J. 2006. Nature-based tourism as a form of predation risk affects body condition and health state of *Podarcis muralis* lizards. *Biological Conservation*, 131, 3: 402-409
- Amo L., López P., Martín J. 2007. Natural oak forest vs. ancient pine plantations: lizard microhabitat use may explain the effects of ancient reforestations on distribution and conservation of Iberian lizards. *Biodiversity and Conservation*, 16: 3409–3422
- Arakelyan M., Harutyunyan T., Aghayan S. A., Carretero, M. A. 2019. Infection of parthenogenetic lizards by blood parasites does not support the “Red Queen hypothesis” but reveals the costs of sex. *Zoology*, 136, doi:10.1016/j.zool.2019.125709: 9str.
- Arneberg P., Skorping A., Grenfell B., Read A. F. 1998. Host densities as determinants of abundance in parasite communities. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265, 1403: 1283-1289
- Arnold E. N. 1987. Resource partition among lacertid lizards in southern Europe. *Journal of Zoology*, 1, 4: 739-782
- Attali D., Baker, C. 2016. ggExtra: Add marginal histograms to ‘ggplot2’, and more ‘ggplot2’ enhancements. R package version 0.3, 4.
- Barta J. R., Ogedengbe J. D., Martin D. S., Smith TG. 2012. Phylogenetic position of the adeleorinid coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59, 2: 171–180

- Barthel A., Kopka I., Vogel H., Zipfel P., Heckel D. G., Groot A. T. 2014. Immune defence strategies of generalist and specialist insect herbivores. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281, 1788, doi:10.1098/rspb.2014.0897: 9 str.
- Bartoń K. 2020. MuMIn: Multi-Model Inference. R package version 1.43.17.
- Bataille A., Fournie G., Cruz M., Cedeno V., Parker P. G., Cunningham A. A. Goodman S. J. 2012. Host selection and parasite infection in *Aedes taeniorhynchus*, endemic disease vector in the Galapagos Islands. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 8: 1831–1841
- Battles A. C., Whittle T. K., Stehle C. M., Johnson M. A. 2013. Effects of human land use on prey availability and body condition in the green anole lizard, *Anolis carolinensis*. *Herpetological Conservation and Biology*, 8, 1: 16
- Bischoff W. 1984. *Lacerta horvathi* Méhely 1904—Kroatische Gebirgseidechse. *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*, 2, 1: 265-289
- Breg A., Janota B., Peganc M., Petrovič I., Tome S., Vamberger M. 2010. Slikovni določevalni ključ za plazilce Slovenije. Ljubljana, Societas herpetologica slovenica – društvo za preučevanje plazilcev in dvoživk: 50 str.
- Cabela A., Grillitsch H., Tiedemann F. 2007. Habitat preferences of co-occurring *Podarcis muralis* (Laurenti, 1768) and *Iberolacerta horvathi* (Méhely, 1904) (Squamata: Sauria: Lacertidae). *Herpetozoa*, 19, 3: 149-160
- Calcagno, V. 2013. glmulti: Model selection and multimodel inference made easy. R package version, 1, 7: 67.
- Capizzi D. 1999. Preliminary data on food habits of an Alpine population of Horvath's Rock Lizard *Lacerta horvathi* MÉHELY, 1904. *Herpetozoa*, 1, 1: 117-120
- Carbayo J., Martín J. O. S. E., Civantos E. 2019. Habitat type influences parasite load in Algerian *Psammmodromus* (*Psammmodromus algirus*) lizards. *Canadian Journal of Zoology*, 97, 2: 172-180
- Carranza S., Arnold E. N., Amat F. 2004. DNA phylogeny of *Lacerta* (*Iberolacerta*) and other lacertine lizards (Reptilia: Lacertidae): did competition cause long-term mountain restriction?. *Systematics and Biodiversity*, 2, 1: 57-77

- Carreno R. A., Martin D. S., Barta J. R.. 1999. Cryptosporidium is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, 85, 11: 899–904
- Case T. J., Gilpin M. E. 1974. Interference competition and niche theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71, 8: 3073-3077
- Chamberlain S. 2018. rphylopic: Get 'Silhouettes' of 'Organisms' from 'Phylopic'. R package version 0.2.0.
- Chaneton E. J., Bonsall M. B. 2000. Enemy-mediated apparent competition: empirical patterns and the evidence. *Oikos*, 88: 380–394
- Cody M. L., Diamond J. M. 1975. *Ecology and evolution of communities*. Charlestown, Harvard University Press: 545 str.
- Cook C. A., Lawton S. P., Davies A. J., Smit N. J. 2014. Reassignment of the land tortoise haemogregarine *Haemogregarina fitzsimonsi* Dias 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to the genus *Hepatozoon* Miller 1908 (Adeleorina: Hepatozoidae) based on parasite morphology, life cycle and phylogenetic analysis of 18S rDNA sequence fragments. *Parasitology*, 142, 141: 1611–1620
- Cook C. A., Smit N. J., Davies A. J. 2015. First record of an intraleucocytic Haemogregarine (Adeleorina: Haemogregarinidae) from South African Tortoises of the species *Stigmochelys pardalis* (Cryptodira: Testudinidae). *African Zoology*, 49, 2: 290–294
- Cook C. A., Netherlands E. C., Smit N. J. 2016. Redescription, molecular characterisation and taxonomic re-evaluation of a unique African monitor lizard haemogregarine *Karyolysus paradoxa* (Dias, 1954) n. comb.(Karyolysidae). *Parasites & Vectors*, 9, 1: 347
- Criado-Fornelio A., Buling A., Cunha-Filho N. A., Ruas J. L., Farias N. A. R., Rey-Valeiron C., Barba-Carretero J. C. 2007. Development and evaluation of a quantitative PCR assay for detection of *Hepatozoon* sp.. *Veterinary parasitology*, 150, 4: 352-356

- Criado-Fornelio A, Buling A, Casado N, Gimenez C, Ruas J, Wendt W, Da-Rosa-Farias N, Rey-Valeiron C, Caraba-Carretero J. C. 2009. Molecular characterisation of arthropod-borne hematozoans in wild mammals from Brazil, Venezuela and Spain. *Acta Parasitologica*, 54, 3: 187–193
- Damas-Moreira I., Harris D. J., Rosado D., Tavares I., Maia J., Salvi D., Perera A. 2014. Consequences of haemogregarine infection on the escape distance in the lacertid lizard, *Podarcis vaucheri*. *Acta Herpetologica*, 9, 1: 119-123
- De Luca N. 1989. Taxonomic and biogeographic characteristics of Horvath's rock lizard (*Lacerta horvathi* Mehely, 1904, Lacertidae, Reptilia) in Yugoslavia. *Scopolia*, 18: 1-48
- De Luca N. 1992. Notes on biology and ecology of the Horvath's rock lizard (*Lacerta horvathi* Méhely, 1904, Reptilia: Lacertidae). V: Proceeding of the Sixth Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica, August 19-23, 1993, Budapest, Hungary. Sixth Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica. Korsós Z., Kiss I. (ur.). Budapest, Hungarian Natural History Museum: 129-135
- Dezdek D, Vojta L, Curkovic S, Lipej Z, Mihaljevic Z, Cvetnic Z, Beck R. 2010. Molecular detection of *Theileria annae* and *Hepatozoon canis* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Croatia. *Veterinary Parasitology*, 172, 4: 333–336
- Dragulescu A. A., Arendt C. 2018. Xlsx: Read, Write, Format Excel 2007 and Excel 97/2000/XP/2003 Files. R Package Version 0.6. 1.
- Dvorakova N., Kvicerova J., Papousek I., Javanbakht H., Tiar G., Kami H., Siroky P. 2014. Haemogregarines from western Palaearctic freshwater turtles (genera *Emys*, *Mauremys*) are conspecific with *Haemogregarina stepanowi* Danilewsky, 1885. *Parasitology*, 141, 4: 522–530
- Ebert D. 2005. Experiments with *Daphnia* and Parasites. V: Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. Bethesda, National Center for Biotechnology Information: 110 str.



- Ekner-Grzyb A., Sajkowska Z., Dudek K., Gawalek M., Skórka P., Tryjanowski P. 2013. Locomotor performance of sand lizards (*Lacerta agilis*): effects of predatory pressure and parasite load. *Acta ethologica*, 16, 3: 173-179
- Fedak K. M., Bernal A., Capshaw Z. A., Gross S. 2015. Applying the Bradford Hill criteria in the 21st century: how data integration has changed causal inference in molecular epidemiology. *Emerging themes in epidemiology*, 12, 1:, 14
- Fox J., Weisberg S. 2018. *An R companion to applied regression*. Thousand Oaks, Sage publications: 608 str.
- Fox J. 2003. Effect displays in R for generalised linear models. *Journal of statistical software*, 8, 15: 1-27
- Fredensborg B. L., Poulin R. 2006. Parasitism shaping host life-history evolution: adaptive responses in a marine gastropod to infection by trematodes. *Journal of animal ecology*, 75, 1: 44-53
- French S. S., Moore M. C. 2008. Immune function varies with reproductive stage and context in female and male tree lizards, *Urosaurus ornatus*. *General and comparative endocrinology*, 155, 1: 148-156
- Friendly M. 2013. *vcExtra: vcd extensions and additions*. R package version 0.5-10.
- Garrido M., Pérez-Mellado V. 2013. Prevalence and intensity of blood parasites in insular lizards. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 252, 4: 588-592
- Garrido M., Pérez-Mellado V. 2013. Patterns of parasitism in insular lizards: effects of body size, condition and resource availability. *Zoology*, 116, 2: 106-112
- Giorgi M. S., Arlettaz R., Christe P., Vogel P. 2001. The energetic grooming costs imposed by a parasitic mite (*Spinturnix myoti*) upon its bat host (*Myotis myotis*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268, 1480: 2071-2075
- Bush A. O., Fernández J. C., Esch G. W., Seed J. R., Ndez J. C. F. 2014. *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*. 2. edition. Cambridge, Cambridge university press: 510 str.

- Goater C. P., Ward P. I. 1992. Negative effects of *Rhabdias bufonis* (Nematoda) on the growth and survival of toads (*Bufo bufo*). *Oecologia*, 89, 2: 161-165
- Gracceva G., Bombi P., Luiselli L., Bologna M.A. 2008. Do demographic aspects of neighbouring lizard populations differ? A case study with the common wall lizard, *Podarcis muralis*. *Amphibia-Reptilia*, 29, 3: 443-448
- GURS – Geodetska uprava Republike Slovenije <https://www.e-prostor.gov.si/> (10.3.2020)
- Gwiazdowicz D. J., Filip K. P. 2009. *Ophionyssus saurorum* (Acari, Mesostigmata) infecting *Lacerta agilis* (Reptilia, Lacertidae). *Wiadomości parazytologiczne*, 55, 1: 61-62
- Haklová-Kočíková B., Hižnanová A., Majláth I., Račka K., Harris D. J., Földvári G. Majláthová V. 2014. Morphological and molecular characterization of *Karyolysus*—a neglected but common parasite infecting some European lizards. *Parasites & vectors*, 7, 1: 1-12
- Hanley K. A., Vollmer D. M., Case T. J. 1995. The distribution and prevalence of helminths, coccidia and blood parasites in two competing species of gecko: implications for apparent competition. *Oecologia*, 102, 2: 220-229
- Harris D. J., Maia J. P., Perera A. 2011. Molecular characterization of Hepatozoon species in reptiles from the Seychelles. *Journal of Parasitology*, 97, 1: 106–110
- Harris D. J., Graciá E., Jorge F., Maia J. P. M. C., Perera A., Carretero M. A., Giménez A. 2013. Molecular detection of *Hemolivia* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) from ticks of North African *Testudo graeca* (Testudines: Testudinidae) and an estimation of their phylogenetic relationships using 18S rRNA sequences. *Comparative Parasitology*, 80: 292–296
- Harris D. J., Damas-Moreira I., Maia J. P., Perera A. 2014. First report of Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleorina) in caecilians, with description of a new species. *Journal of Parasitology*, 100, 1: 117–120
- Hatcher M. J., Dick J. T., Dunn A. M. 2006. How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecology Letters*, 9, 11: 1253-1271

- Heins D. C., Baker J. A., Green D. M. 2011. Processes influencing the duration and decline of epizootics in *Schistocephalus solidus*. *Journal of Parasitology*, 97, 3: 371-376
- Holmes J. C., Zohar S. 1990. Pathology and host behaviour. V: Parasitism and host behaviour. Barnard C. F. (ur.). London, Taylor & Francis: 346 str.
- Holt R. D., Pickering J. 1985. Infectious disease and species coexistence: a model of Lotka-Volterra form. *The American Naturalist*, 126, 2: 196-211
- Holt R. D., Lawton J. H. 1993. Apparent competition and enemy-free space in insect host-parasitoid communities. *The American Naturalist*, 142, 4: 623-645
- Holt R. D. 1977. Predation, apparent competition, and the structure of prey communities. *Theoretical population biology*, 12, 2: 197-229
- Hudson P. J., Dobson A. P., Newborn D. 1998. Prevention of population cycles by parasite removal. *Science*, 282, 5397: 2256-2258
- Hudson P., Greenman J. 1998. Competition mediated by parasites: biological and theoretical progress. *Trends in Ecology & Evolution*, 13, 10: 387-390
- Hudson P. J., Dobson A. P., Newborn D. 1992. Do parasites make prey vulnerable to predation? Red grouse and parasites. *Journal of animal ecology*, 61, 3: 681-692
- Huelsenbeck J. P., Ronquist F., Nielsen R., Bollback J. P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 5550: 2310-2314
- Johnson P. T., Lunde K. B., Ritchie E. G., Launer A. E. 1999. The effect of trematode infection on amphibian limb development and survivorship. *Science*, 284, 5415: 802-804
- de Jong-Brink M., Bergamin-Sassen M., Soto M. S. 2001. Multiple strategies of schistosomes to meet their requirements in the intermediate snail host. *Parasitology*, 123, 7: 129-141
- Kaliontzopoulou A., Carretero M. A., Llorente G. A. 2007. Multivariate and geometric morphometrics in the analysis of sexual dimorphism variation in *Podarcis* lizards. *Journal of Morphology*, 268, 2: 152-165

- Karadjian G., Chavatte J. M., Landau I. 2015. Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* ng, reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. *Parasite*, 22: 22-31
- Kassambara A. 2018. ggpubr:“ggplot2” based publication ready plots. R package version 0.1, 7.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K. I., Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30, 14: 3059-3066
- Fahrmeir L., Kneib T., Lang S., Marx B. 2013. *Regression*. Berlin, Heidelberg, Springer: 698 str.
- Kopečná J., Jirků M., Oborník M., Tokarev Y. S., Lukeš J., Modrý D. 2006. Phylogenetic analysis of coccidian parasites from invertebrates: search for missing links. *Protist*, 157, 2: 173-183
- Krofel M., Cafuta V., Planinc G., Sopotnik M., Šalamun A., Tome S., Žagar A. 2009. Razširjenost plazilcev v Sloveniji: pregled podatkov, zbranih do leta 2009. *Natura Sloveniae*, 11, 2: 61-99
- Kryštufek B., Janžekovič F. 1999. Ključ za določanje vretenčarjev Slovenije. Ljubljana, DZS: 544 str.
- Kubo M., Uni S., Agatsuma T., Nagataki M., Panciera R. J., Tsubota T., Yanai T. 2008. *Hepatozoon ursi* n. sp. (Apicomplexa: Hepatozoidae) in Japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *Parasitology International*, 57, 3: 287-294
- Kvičeroová J., Hypša, V., Dvořáková N., Mikulíček P., Jandzik D., Gardner M. G., Široký P. 2014. *Hemolivia* and *Hepatozoon*: haemogregarines with tangled evolutionary relationships. *Protist*, 165, 5: 688-700
- Lafferty K. D. 1993. The marine snail, *Cerithidea californica*, matures at smaller sizes where parasitism is high. *Oikos*, 68, 1: 3-11

- Lanfear R., Frandsen P. B., Wright A. M., Senfeld T., Calcott B. 2017. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 34, 3: 772-773
- Lapini L., Richard J., Dall'Asta A. 1993. Distribution and ecology of *Lacerta horvathi* Mehely, 1904 (Reptilia, Lacertidae) in North-Eastern Italy. *Atti di Museo Civico di Storia Naturale Trieste*, 14, 1992: 213-230
- Lapini L., Dall'Asta A., Luiselli L., Nardi P. 2004. *Lacerta horvathi* in Italy: a review with new data on distribution, spacing strategy and territoriality (Reptilia, Lacertidae). *Bollettino di Zoologia*, 71, 1: 145-151
- Lazić M. M., Carretero M. A., Živković U., Crnobrnja-Isailović J. 2017. City life has fitness costs: reduced body condition and increased parasite load in urban common wall lizards, *Podarcis muralis*. *Salamandra*, 53, 1: 10-17
- Lemly A. D., Esch G. W. 1984. Effects of the trematode *Uvulifer ambloplitis* on juvenile bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*: ecological implications. *The Journal of Parasitology*, 70, 4: 475-492
- Lenth R., Singmann H., Love J., Buerkner P., Herve M. 2018. Emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means. R package version, 1(1), 3.
- Lucius R., Loos-Frank B., Lane R. P., Poulin R., Roberts C., Grensis R. K. 2017. *The biology of parasites*. Weinheim, John Wiley & Sons: 472 str.
- Lüdecke D. 2018. ggeffects: Tidy data frames of marginal effects from regression models. *Journal of Open Source Software*, 3, 26: 772
- MacNeil C., Dick J. T., Hatcher M. J., Terry R. S., Smith J. E., Dunn A. M. 2003. Parasite-mediated predation between native and invasive amphipods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, 1521: 1309-1314
- Maia J. P., Perera A., Harris D. J. 2012. Molecular survey and microscopic examination of Hepatozoon Miller, 1908 (Apicomplexa: Adeleorina) in lacertid lizards from the western Mediterranean. *Folia Parasitologica*, 59, 4: 241

- Maia J. P., Harris D. J., Perera A. 2011. Molecular survey of Hepatozoon species in lizards from North Africa. *Journal of Parasitology*, 97, 3: 513-517
- Maia J. P., Carranza S., Harris D. J. 2016. Comments on the systematic revision of adeleid haemogregarines: Are more data needed?. *Journal of Parasitology*, 102, 5: 549-552
- Maia J. P., Harris D. J., Carranza S., Gómez-Díaz E. 2014. A comparison of multiple methods for estimating parasitemia of hemogregarine hemoparasites (Apicomplexa: Adeleorina) and its application for studying infection in natural populations. *PloS one*, 9, 4, doi:10.1371/journal.pone.0095010: 13 str.
- Marcogliese D. J., Pietroock M. 2011. Combined effects of parasites and contaminants on animal health: parasites do matter. *Trends in parasitology*, 27, 3: 123-130
- Mathew J. S., Van Den Bussche R. A., Ewing S. A., Malaye J. R., Latha B. R., Panciera R. J. 2000. Phylogenetic relationships of Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. *Journal of Parasitology*, 86, 2: 366-372
- Megía-Palma R., Martínez J., Merino S. 2018. Manipulation of parasite load induces significant changes in the structural-based throat color of male Iberian green lizards. *Current Zoology*, 64, 3: 293-302
- Merino S., Martinez J., Masello J. F., Bedolla Y., Quillfeldt P. 2014. First molecular characterization of a Hepatozoon species (Apicomplexa: Hepatozoidae) infecting birds and description of a new species infecting Storm Petrels (Aves: Hydrobatidae). *Journal of Parasitology*, 100: 338–343
- Michalakis Y. 2009. Parasitism and the evolution of life-history traits. V: Ecology and evolution of parasitism. Thomas F., Guégan J. F. Renaud F. (ur.). Oxford, Oxford University Press: 224 str.
- Miller M. A., Pfeiffer W., Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In 2010 gateway computing environments workshop (GCE), doi: 10.1109/GCE.2010.5676129: 8 str.

- Minchella D. J., Loverde P. T. 1981. A cost of increased early reproductive effort in the snail *Biomphalaria glabrata*. *The American Naturalist*, 118, 6: 876-881
- Minchella D. J. 1985. Host life-history variation in response to parasitism. *Parasitology*, 90, 1: 205-216
- Mršić N., Novak T. 1997. Plazilci (Reptilia) Slovenije. Ljubljana, Zavod Republike Slovenije za šolstvo: 167 str.
- Munger J. C., Holmes J. C. 1988. Benefits of parasitic infection: a test using a ground squirrel–trypanosome system. *Canadian journal of zoology*, 66, 1: 222-227
- Mutinga M. J., Dipeolu O. O. 1989. Saurian malaria in Kenya: description of new species of Haemoproteid and Haemogregarine parasites, Anaplasma-like and Pirhemocytion-like organisms in the blood of lizards in West Pokot District. *International Journal of Tropical Insect Science*, 10, 3: 401-412
- Netherlands E. C., Cook C. A., Smit N. J. 2014. Hepatozoon species (Adeleorina: Hepatozoidae) of African bufonids, with morphological description and molecular diagnosis of *Hepatozoon ixoxo* sp. nov. parasitising three *Amietophrynus* species (Anura: Bufonidae). *Parasites & Vectors*, 7, doi:10.1186/s13071-014-0552-0: 12 str.
- Netherlands E. C., Cook C. A., Du Preez L. H., Vanhove M. P., Brendonck L., Smit N. J. 2018. Monophyly of the species of *Hepatozoon* (Adeleorina: Hepatozoidae) parasitizing (African) anurans, with the description of three new species from hyperoliid frogs in South Africa. *Parasitology*, 145, 8: 1039-1050
- O'Dwyer L. H., Moço T. C., dos Santos Paduan K., Spenassatto C., da Silva R. J., Ribolla P. E. M. 2013. Description of three new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa, Hepatozoidae) from Rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) based on molecular, morphometric and morphologic characters. *Experimental parasitology*, 135, 2: 200-207
- Oppliger A., Clobert J. 1997. Reduced tail regeneration in the common lizard, *Lacerta vivipara*, parasitized by blood parasites. *Functional Ecology*, 1, 5: 652-655
- Oppliger A., Celerier M. L., Clobert J. (1996). Physiological and behaviour changes in common lizards parasitized by haemogregarines. *Parasitology*, 113, 5: 433-438

- Osojnik N., Žagar A., Carretero M. A., García-Muñoz E., Vrezec A. 2013. Ecophysiological dissimilarities of two sympatric lizards. *Herpetologica*, 69, 4: 445-454
- Oyamada M., Davoust B., Boni M., Dereure J., Bucheton B., Hammad A., Itamoto K., Okuda M., Inokuma H. 2005. Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in dogs in a village of eastern Sudan by using a screening PCR and sequencing methodologies. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12, 11: 1343–1346
- Pagès H., Aboyou P., Gentleman R., DebRoy S. 2017. Biostrings: Efficient manipulation of biological strings. R package version, 2(0).
- Paradis E. Schliep K. 2018. ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics* 35: 526-528
- Park T. 1948. Interspecies competition in populations of *Trilobium confusum* Duval and *Trilobium castaneum* Herbst. *Ecological Monographs*, 18, 2: 265-307
- Pawar R. M., Poornachandar A., Arun A. S., Manikandan S., Shivaji S. 2011. Molecular prevalence and characterization of *Hepatozoon ursi* infection in Indian sloth bears (*Melursus ursinus*). *Veterinary Parasitology*, 182, 2–4: 329–332
- Pawar R. M., Poornachandar A., Srinivas P., Rao K. R., Lakshmikantan U., Shivaji S. 2012. Molecular characterization of *Hepatozoon* spp. infection in endangered Indian wild felids and canids. *Veterinary Parasitology*, 186, 3–4: 475–479
- Perko D., Adamič M. O. 1998. Slovenija: pokrajine in ljudje. Ljubljana, Založba Mladinska Knjiga: 735 str.
- Pinto C. M., Helgen K. M., Fleischer R. C., Perkins S. L. 2013. *Hepatozoon* parasites (Apicomplexa: Adeleorina) in bats. *Journal of Parasitology*, 99, 4: 722–724
- Poulin R. 1999. The functional importance of parasites in animal communities: many roles at many levels?. *International journal for parasitology*, 29, 6: 903-914
- Powell M. D., Speare D. J., Daley J., Lovy J. 2005. Differences in metabolic response to *Loma salmonae* infection in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brook trout *Salvelinus fontinalis*. *Diseases of aquatic organisms*, 67, 3: 233-237



- Price P. W., Westoby M., Rice B., Atsatt P. R., Fritz R. S., Thompson J. N., Mobley K. 1986. Parasite mediation in ecological interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17, 1: 487-505
- Pulgarín P. C., Gómez J. P., Robinson S., Ricklefs R. E., Cadena, C. D. 2018. Host species, and not environment, predicts variation in blood parasite prevalence, distribution, and diversity along a humidity gradient in northern South America. *Ecology and evolution*, 8, 8: 3800-3814
- QGIS.org 2020. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.org>
- Rambaut A., Drummond A. J., Xie D., Baele G., Suchard M. A. 2018. Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67, 5: 901
- Rambaut A. 2009. FigTree v1. 3.1. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rassati G. 2010. Contributo alla conoscenza della distribuzione della Lucertola di Horvath *Iberolacerta horvathi* e della Lucertola dei muri *Podarcis muralis* in Friuli Venezia Giulia e in Veneto. *Atti di Museo Civico di Storia Naturale Trieste*, 54: 133-146
- Richard J., Lapini L. 1993. Trophic niche overlap in syntopic populations of *Lacerta horvathi* and *Podarcis muralis* (Reptilia, Lacertidae). *Atti di Museo Civico di Storia Naturale Trieste*, 45: 151-157
- Ricklefs R. E. 2015. Intrinsic dynamics of the regional community. *Ecology Letters*, 18, 6: 497–503
- Robar N., Murray D. L., Burness G. 2011. Effects of parasites on host energy expenditure: the resting metabolic rate stalemate. *Canadian Journal of Zoology*, 89, 11: 1146-1155
- Ronquist F., Huelsenbeck J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 12: 1572-1574
- Root R. B. 1967. The niche exploitation pattern of the blue-gray gnatcatcher. *Ecological monographs*, 37, 4: 317-350

- Salvador A., Veiga J. P., Martin J., López P. 1997. Testosterone supplementation in subordinate, small male lizards: consequences for aggressiveness, color development, and parasite load. *Behavioral Ecology*, 8, 2: 135-139
- Salvador A., Veiga J. P., Martin J., Lopez P., Abelenda M., Puertac M. 1996. The cost of producing a sexual signal: testosterone increases the susceptibility of male lizards to ectoparasitic infestation. *Behavioral Ecology*, 7, 2: 145-150
- Salvi D., Harris D. J., Kaliontzopoulou A., Carretero M. A., Pinho C. 2013. Persistence across Pleistocene ice ages in Mediterranean and extra-Mediterranean refugia: phylogeographic insights from the common wall lizard. *BMC Evolutionary Biology*, 13, 147, doi:10.1186/1471-2148-13-147: 18 str.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor, Cold spring harbor laboratory press: 2344 str.
- Schall J. J. 1986. Prevalence and virulence of a haemogregarine parasite of the Aruban whiptail lizard, *Cnemidophorus arubensis*. *Journal of Herpetology*, 20, 3: 318-324
- Schall J. J. 1992. Parasite-mediated competition in *Anolis* lizards. *Oecologia*, 92, 1: 58-64.
- Schoener T. W. 1977. Competition and the niche. *Biology of the Reptilia*, 7: 35-136
- Sillero N., Campos J., Bonardi A., Corti C., Creemers R., Crochet P. A., Kuzmin, S. 2014. Updated distribution and biogeography of amphibians and reptiles of Europe. *Amphibia-Reptilia*, 35, 1: 1-31
- Sloboda M., Kamler M., Bulantova J., Votypka J., Modry D. 2007. A new species of Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. *Journal of Parasitology*, 93, 5: 1189–1198
- Smallridge C. J., Bull C. M. 2000. Prevalence and intensity of the blood parasite *Hemolivia mariae* in a field population of the skink *Tiliqua rugosa*. *Parasitology Research*, 86, 8: 655-660
- Smith T. G. 1996. The genus hepatozoon (apicomplexa: adeleina). *The Journal of parasitology*, 82, 4: 565-585

- Sorci G., Clobert, J., Michalakis Y. 1996. Cost of reproduction and cost of parasitism in the common lizard, *Lacerta vivipara*. *Oikos*, 76, 1: 121-130
- Spearman C. 1987. The proof and measurement of association between two things. *The American journal of psychology*, 100, 3-4: 441-471
- Speybroeck J., Beukema W., Bok B., Van Der Voort J. 2016. Field guide to the amphibians and reptiles of Britain and Europe. London, Bloomsbury publishing: 432 str
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30, 9: 1312-1313
- Strijbosch H., Bonnemayer J., Dietvorst P. 1980. The northernmost population of *Podarcis muralis* (Lacertilia, Lacertidae). *Amphibia-Reptilia*, 1, 2: 161-172
- Svahn K. 1974. Incidence of blood parasites of the genus *Karyolysus* (Coccidia) in Scandinavian lizards. *Oikos*, 25, 1: 43-53
- Svahn K. 1975. Blood parasites of the genus *Karyolysus* (Coccidia, Adeleidae) in Scandinavian lizards. Description and life cycle. *Norwegian journal of Zoology*, 23, 4: 277-295
- Telford Jr. S. R. 2016. Hemoparasites of the Reptilia: Color atlas and text. Boca Raton, CRC Press: 376 str.
- Tome B., Maia J. P., Harris D. J. 2012. Hepatozoon infection prevalence in four snake genera: influence of diet, prey parasitemia levels, or parasite type?. *Journal of Parasitology*, 98, 5: 913-917
- Tomé B., Pereira A., Harris D. J., Carretero M. A., Perera A. 2019. A paradise for parasites? Seven new haemogregarine species infecting lizards from the Canary Islands. *Parasitology*, 146, 6: 728-739
- Tome S. 1996. Pregled razširjenosti plazilcev v Sloveniji. *Annales 9/96 - Anali za istrske in mediteranske študije, Series historia naturalis*, 3: 217-228
- Tome S. 2001. Plazilci. V: Raziskava razširjenosti evropsko pomembnih vrst v Sloveniji. Končno poročilo. Krystufek B. (ur.). Ljubljana, Prirodoslovni muzej Slovenije: 480-545

- Tompkins D. M., White A. R., Boots M. 2003. Ecological replacement of native red squirrels by invasive greys driven by disease. *Ecology Letters*, 6, 3: 189-196
- Veiga J. P., Salvador A., Merino S., Puerta M. 1998. Reproductive effort affects immune response and parasite infection in a lizard: a phenotypic manipulation using testosterone. *Oikos*, 82, 2: 313-318
- Venables W. N. Ripley B. D. 2002 *Modern Applied Statistics with S*. 4th Edition. New York, Springer: 498 str.
- Vilcins I. M., Old J. M., Deane E. 2009. Detection of a Hepatozoon and spotted fever group *Rickettsia* species in the common marsupial tick (*Ixodes tasmani*) collected from wild Tasmanian devils (*Sarcophilus harrisii*), Tasmania. *Veterinary Parasitology*, 162, 1–2: 23–31
- Vrezec A., Tome D. 2004. Altitudinal segregation between Ural Owl *Strix uralensis* and Tawny Owl *S. aluco*: evidence for competitive exclusion in raptorial birds. *Bird Study*, 51, 3: 264-269
- Wang L. G., Lam T. T. Y., Xu S., Dai Z., Zhou L., Feng T., Pingfan G., Dunn W. C., Jones R. B., Bradley T., Zhu, H., Guan Y., Jiang Y. Guangchuang Y. 2020. treeio: an R package for phylogenetic tree input and output with richly annotated and associated data. *Molecular biology and evolution*, 37, 2: 599-603
- Wickham H., Francois R., Henry, L., Müller K. 2015. dplyr: A grammar of data manipulation. R package version 0.4, 3.
- Wickham H., Bryan J. 2017. readxl: Read Excel Files. R package version 1.0. 0.
- Wickham H. 2016. ggplot2: elegant graphics for data analysis. New York, Springer: 182 str.
- Wilmers C. C., Post E., Peterson R. O., Vucetich J. A. 2006. Predator disease out-break modulates top-down, bottom-up and climatic effects on herbivore population dynamics. *Ecology letters*, 9, 4: 383-389

<https://www.worldclim.org/> (8. 8. 2020)

- Yu G. 2020. Using ggtree to Visualize Data on Tree-Like Structures. *Current protocols in bioinformatics*, 69, e96, doi: 10.1002/cpbi.96: 18 str.
- Zechmeisterová K., De Bellocq J. G., Široký P. 2019. Diversity of *Karyolysus* and *Schellackia* from the Iberian lizard *Lacerta schreiberi* with sequence data from engorged ticks. *Parasitology*, 146, 13: 1690-1698
- Zeileis A., Hothorn T. 2002. Diagnostic checking in regression relationships. <https://cran.r-project.org/web/packages/lmtest/vignettes/lmtest-intro.pdf> (10.5.2020)
- Zuk M., McKean K. A. 1996. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *International journal for parasitology*, 26, 10: 1009-1024
- Žagar A., Planinc G., Krofel M. 2007. Records of Horvath's Rock Lizard (*Iberolacerta horvathi*) from the Notranjsko podolje region (central Slovenia). *Natura Sloveniae*, 9, 2: 43-44
- Žagar A. 2008a. Pomen presvetlitev za plazilce (Reptilia) v gozdni krajini. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 80 str.
- Žagar A. 2008b. The lowest altitudinal record of Horvath's Rock Lizard (*Iberolacerta horvathi*) in Slovenia. *Natura Sloveniae*, 10, 2: 59-61
- Žagar A., Carretero M.A. 2012. A record of cannibalism in *Podarcis muralis* (Laurenti, 1768) (Reptilia, Lacertidae) from Slovenia. *Herpetology Notes*, 5: 211-213
- Žagar A., Osojnik N., Carretero MA, Vrezec A 2012. Quantifying the intersexual and interspecific morphometric variation in two resembling sympatric lacertids: *Iberolacerta horvathi* and *Podarcis muralis*. *Acta Herpetologica*, 7:29-39
- Žagar A., Carretero M.A., Krofel M., Lužnik M., Podnar M., Tvrtković N. 2014. Reptile survey in Dinara Mountain (Croatia) revealed the southernmost known population of Horvath's rock lizard (*Iberolacerta horvathi*). *Natura croatica*, 23, 1: 235-240
- Žagar A., Carretero M. A., Osojnik N., Sillero N., Vrezec A. 2015a. A place in the sun: interspecific interference affects thermoregulation in coexisting lizards. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 69, 7: 1127-1137

- Žagar A., Simčič T., Carretero M. A., Vrezec A. 2015b. The role of metabolism in understanding the altitudinal segregation pattern of two potentially interacting lizards. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 179: 1-6
- Žagar A. 2016. Altitudinal distribution and habitat use of the common wall lizard *Podarcis muralis* (Linnaeus, 1768) and the Horvath's rock lizard *Iberolacerta horvathi* (Méhely, 1904) in the Kočevsko region (S Slovenia). *Natura Sloveniae*, 18: 47-62
- Žagar A., Carretero M. A., Vrezec A., Drašler K., Kaliontzopoulou A. 2017. Towards a functional understanding of species coexistence: ecomorphological variation in relation to whole-organism performance in two sympatric lizards. *Functional Ecology*, 31:1780-1791

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju dr. Roku Kostanjšku, ki mi je s svojo potrpežljivostjo in strokovnimi nasveti olajšal delo pri nalogi in me zmeraj skrbno usmerjal na pravo pot. Za strokovni pregled in recenzijo ter vse konstruktivne komentarje se zahvaljujem tudi recenzentu dr. Petru Trontlju.

Največja zahvala in razlog, da naloga obstaja gre somentorici dr. Anamariji Žagar, ki mi je ob delu nenehno nudila nasvete in podporo. Hvala za vso pomoč, pogovore, usmeritve in potrpljenje, za delo na terenu, za vzpostavljanje novih poznanstev in neskončno pogovorov o malenkostih.

Zahvaljujem se tudi vsem drugim, ki so mi pomagali bodisi na terenu, Emilija, Rodrigo in Miha, bodisi glede laboratorijskega dela, Tajda in vsem kolegom iz CIBIO. Za pomoč in nasvete pri statističnih težavah se zahvaljujem Marku in dr. Blejcu.

Posebna zahvala gre prijateljem in kolegom iz Slovenskega herpetološkega društva. Hvala, ker ste me sprejeli medse, mi dali neskončno novih priložnosti in idej in ste mi vedno pripravljene pomagati, strokovno ali kako drugače. Hvala, ker ste me usmerili na herpetološko pot in mi razkrili zanimivosti sveta plazilcev.

Ne nazadnje se zahvaljujem predvsem Ani Reberc za vso vzpodbudo in motivacijo, ko je te nemalokrat primanjkovalo. Za vse polnočne pogovore o statistiki in metodologiji. Za potrpežljivost in prenašanje odsotnosti, ki jo zahteva terensko delo. Hvala ti, da si mi vedno tako ali drugače ob strani.