

Muzeum i Instytut Zoologii PAN



Mgr Adam Krupski

Współwystępowanie pasożytów krwi oraz
jego wpływ na dostosowanie dziuplaków

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem
dr hab. Tomasza Mazgajskiego,
oraz promotora pomocniczego dr Anny Dubiec
w Muzeum i Instytucie Zoologii Polskiej Akademii Nauk

Warszawa 2023

Recenzenci:

Dr hab. Adam Kaliński

Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Uniwersytet Łódzki

Dr hab. Katarzyna Wojczulanis-Jakubas

Wydział Biologii

Uniwersytet Gdański

Finansowanie badań:

Badania prezentowane w niniejszej rozprawie zostały sfinansowane w ramach grantu Opus 2 nr 2011/03/B/NZ8/03051 przyznanego dr Annie Dubiec przez Narodowe Centrum Nauki (okres realizacji: 2012–2015) oraz grantów wewnętrznych Muzeum i Instytutu Zoologii PAN (okres realizacji: 2014–2017).



Niniejszą pracę dedykuję Moim Rodzicom – za stworzenie możliwości rozwoju oraz nieustanne wsparcie przez wszystkie lata mojego życia

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE	7
ABSTRACT (streszczenie w języku angielskim).....	10
WSTĘP.....	13
1. WPROWADZENIE W TEMATYKĘ ROZPRAWY	15
1.1. Zjawisko pasożytnictwa i współpasożytnictwa.....	15
1.2. Oddziaływania pomiędzy współwystępującymi pasożytami	17
1.3. Pasożyty krwi	19
1.4. Histopatologiczne objawy inwazji pasożytów krwi u ptaków	25
1.5. Współwystępowanie pasożytów krwi u ptaków.....	27
2. CELE BADAŃ	34
3. MATERIAŁY I METODY	35
3.1. Gatunki żywicieli.....	35
3.2. Teren badań	36
3.3. Badania terenowe	39
3.4. Badania laboratoryjne.....	45
3.5. Analiza danych	48
4. LITERATURA.....	52
ROZDZIAŁ I: Oddziaływania w obrębie zespołu pasożytów krwi u modraszki <i>Cyanistes caeruleus</i> w warunkach eksperymentalnie manipulowanego dobrostanu żywiciela	65
1. WSTĘP.....	67
2. METODY.....	72
3. WYNIKI	78
4. DYSKUSJA	85
5. LITERATURA.....	91
ROZDZIAŁ II: Wpływ współwystępowania pasożytów krwi na elementy biologii rozrodu modraszki <i>Cyanistes caeruleus</i> w warunkach eksperymentalnie manipulowanego dobrostanu żywiciela.....	99
1. WSTĘP.....	101
2. METODY	105

3. WYNIKI.....	110
4. DYSKUSJA.....	119
5. LITERATURA	124
ROZDZIAŁ III: Czynniki wpływające na zarażenie oraz współwystępowanie	
 Pasożytów krwi u młodocianych bogatek <i>Parus major</i>	131
1. WSTĘP	133
2. METODY	140
3. WYNIKI.....	149
4. DYSKUSJA.....	159
5. LITERATURA	165
PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....	175
PODZIĘKOWANIA	181
DODATKI	185
APENDYKS 1.....	187
APENDYKS 2.....	193
APENDYKS 3.....	195
APENDYKS 4.....	196
APENDYKS 5.....	217

STRESZCZENIE

Zjawisku pasożytnictwa i zależności między dwoma organizmami w układzie pasożyt–żywiciel poświęcono wiele badań zarówno obserwacyjnych, jak i eksperymentalnych. Jednak zwierzęta często są w tym samym czasie zarażone przez pasożyty reprezentujące różne taksony. Zjawisko to nosi nazwę współpasożytnictwa. Pasożyty z różnych taksonów mogą wpływać zarówno na organizm żywiciela, jak i na siebie nawzajem. Kształtujący się w ten sposób układ żywiciel–społeczność pasożytów stanowi środowisko, w obrębie którego zachodzą różne procesy wpływające zarówno na przebieg zarażenia przez pasożyty z poszczególnych taksonów, jak i na dostosowanie żywiciela. Charakter zależności między współwystępującymi pasożytami w obecnie dostępnej literaturze był określany przeważnie na podstawie danych z jednego punktu czasowego, co utrudniało określenie kierunku zależności między pasożytami oraz mechanizmów odpowiedzialnych za inwazje kolejnych pasożytów w obrębie jednego żywiciela. Natomiast wpływ pasożytnictwa na dostosowanie żywiciela często badany był w układach, w których rozpatrywano zarażenie przez pasożyty z jednego taksonu, pomimo powszechnego współpasożytnictwa w warunkach naturalnych. Szczególnie interesujący i istotny może być wpływ współpasożytnictwa w kluczowym etapie życia żywiciela, jakim jest okres rozrodczy, ze względu na fakt, że rozród jest kosztowny energetycznie. Współwystępujące pasożyty mogą wpływać na sukces rozrodczy zarażonych żywicieli, jednakże obecnie dostępne informacje dotyczą przede wszystkim wpływu pasożytów tylko z pojedynczych taksonów pasożytniczych. Jednocześnie niewiele jest danych na temat momentu zarażenia osobników na początkowych etapach życia, przez co również informacje na temat współpasożytnictwa w tym okresie są znikome.

Celem niniejszych badań było zbadanie zależności zachodzących między pasożytami wewnętrznymi występującymi powszechnie we krwi ptaków gnieźdzących się w dziuplach – modraszki *Cyanistes caeruleus* i bogatki *Parus major*, a także określenie wpływu tych pasożytów na elementy biologii lęgowej żywiciela od początkowych etapów cyklu gniazdowego po pierwsze tygodnie po wylocie młodych osobników z gniazda. Badania były przeprowadzone na dwóch populacjach sikor – populacji modraszki występującej na Gotlandii (Szwecja) oraz populacji bogatki występującej w Lesie Sękocińskim (Polska).

Populacja modraszki została poddana zabiegowi eksperymentalnemu, który miał na celu zróżnicowanie kondycji samic w okresie lęgowym. Miało to na celu uwypuklenie zależności pomiędzy współwystępującymi pasożytami jak również wzmocnienie różnic w parametrach sukcesu rozrodczego pomiędzy samicami zarażonymi pasożytami reprezentującymi minimum dwa taksony oraz samicami niezarażonymi i zarażonymi pasożytami reprezentującymi jeden takson. W tym celu określono status zarażenia pasożytami krwi w dwóch punktach czasowych – podczas inkubacji oraz 14 dni po wykluciu się piskląt.

Populacja bogatki była monitorowana w celu uzyskania podstawowych informacji dotyczących lęgu oraz zaobrączkowania piskląt na etapie gniazdowym. Następnie przeprowadzono chwytanie młodocianych osobników kilka tygodni po opuszczeniu przez nie gniazda w celu określenia statusu zarażenia pasożytami krwi, czynników związanych z rozwojem zarażenia a także zbadanie zależności między współwystępującymi pasożytami w tym okresie życia żywiciela.

Otrzymane wyniki potwierdzają występowanie różnych zależności wśród współwystępujących pasożytów krwi: synergistycznych, antagonistycznych i neutralnych na których charakter wpływają przede wszystkim rodzaje pasożytów dokonujących inwazji. Jednak nie stwierdzono wpływu zróżnicowanej kondycji żywiciela na inwazje pasożytów krwi, jak i charakter zależności występujących między nimi. Współpasożytnictwo nie wpływało w znaczącym stopniu na poszczególne parametry biologii lęgowej z wyjątkiem sukcesu klucia, który był istotnie niższy w przypadku koinwazji pasożytów reprezentujących trzy taksony. Zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson miało istotny wpływ tylko w dwóch przypadkach: szybsze przystępowanie do lęgu samic zarażonych *Trypanosoma* oraz mniejszą wielkość zniesienia u samic zarażonych *Haemoproteus*. Eksperymentalna manipulacja infestacji gniazd przez pchły nie wpłynęła w istotnym stopniu na kondycję samic. Natomiast analiza zarażenia młodocianych bogatek wykazała, że w przypadku pasożytów z rodzajów *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* do zarażenia dochodzi prawdopodobnie już po wylocie piskląt z gniazda, ponieważ prawdopodobieństwo zarażenia wzrastało u osobników schwytanych później w sezonie lęgowym. Zaobserwowano również zależności między współwystępującymi pasożytami podobne do tych obserwowanych u osobników dorosłych i u modraszek.

Streszczenie

Przeprowadzone badania określają zależności pomiędzy jednymi z najpospolitszych pasożytów wewnętrznych występujących u dorosłych i młodocianych dziuplaków. Ponadto, przedstawiają wpływ współpasożytnictwa na parametry biologii lęgowej żywiciela, poczynając od wczesnych etapów okresu gniazdowego, oraz wskazują, jakie czynniki są powiązane z prawdopodobieństwem wystąpienia inwazji na wczesnych etapach życia żywiciela.

ABSTRACT (streszczenie w języku angielskim)

The parasitism and interactions between organisms in the parasite-host system have been the subject of many studies, both observational and experimental. Importantly, animals are often simultaneously infected with parasites from different taxa, and this phenomenon is known as co-parasitism. Parasites representing different taxa may influence the host organism and each other. The host and the parasite community form a microenvironment within which various processes occur, affecting both infection by parasites from different taxa and host fitness. Up until now, the type of interactions between co-existing parasites was mostly determined by data from a single time point. This made it difficult to reliably determine how parasites from different taxa interact as well as the mechanisms behind the outcome of infection with new parasites invading an already parasitized host. On the other hand, the influence of parasitism on host fitness has often been studied in systems where infection by parasites from only one taxon was considered, despite the common presence of co-parasitism in nature. Particularly interesting and important may be the impact of co-parasitism during the crucial stage of the host's life – the breeding period – due to the high energetic costs of reproduction. Co-existing parasites may affect the reproductive success of infected hosts. However, the currently available information mostly relates to the impact of single parasitic infections. At the same time, there is little data on the occurrence of infection at the early stages of the host's life, and therefore, data on co-parasitism in this period is also scarce.

The aim of this study was to examine the type of interactions between endoparasites commonly found in the blood of hole-nesting birds – the blue tit *Cyanistes caeruleus* and the great tit *Parus major* – as well as to determine the impact of these parasites on the parameters of breeding biology of the host beginning from the early stages of the nesting period, as well as patterns of infection during the first weeks post-fledging. The research was carried out on two populations of tits: the blue tit population in Gotland, Sweden, and the great tit population in the Sękocin Forest, Poland.

The blue tit population was subjected to an experimental treatment aimed at diversifying the condition of females during the breeding season. This treatment aimed to highlight the relationship between co-existing parasites and enhance differences in the parameters of breeding biology between females infected with parasites representing

several taxa and females uninfected or infected with parasites representing a single taxon. To accomplish this, the infection status with blood parasites was determined at two time points – during incubation and 14 days after hatching.

The great tit population was monitored to collect data on parameters of breeding biology and to mark nestlings for identification during the post-fledging period. Juveniles were captured a few weeks after fledging to determine their blood parasite infection status, factors associated with the occurrence of infection, and to identify the type of interactions between co-existing parasites during this phase of the host's life.

The results of presented studies show that blood parasites from four different taxa may interact with each other either synergistically, antagonistically, or neutrally. The type of the interaction is primarily driven by the genus of infecting parasites. No effect of the experimentally manipulated host condition on the probability of parasite infection or on the type of interactions between the co-existing parasites was found. However, experimental manipulation of nest infestation by fleas did not significantly affect the condition of females. Co-infecting parasites did not significantly affect the parameters of breeding biology, except for hatching success, which was significantly lower in the case of co-infection with parasites representing three taxa. Females carrying a single infection differed from uninfected females only in two cases: infection with *Trypanosoma* resulted in a delayed onset of egg-laying and infection with *Haemoproteus* led to the laying of fewer eggs. The study on blood parasite infection in juvenile great tits showed that in the case of parasites from the genera *Plasmodium*, *Leucocytozoon* and *Trypanosoma*, individuals become infected after they leave the nest, as the probability of infection increased in individuals caught later in the breeding season. The types of interactions between parasites from different taxa infecting great tit juveniles were the same as those identified in adult great tits and blue tits.

The presented research determines the type of interactions between some of the most common endoparasites of adult and juvenile hole-nesting birds. Additionally, it examines the effect of co-parasitism on the parameters of the host's reproductive biology, beginning from the early stages of the nesting period, and identifies the factors associated with the probability of parasitic infection in the early stage of the host's life.

WSTEP

1. WPROWADZENIE W TEMATYKĘ ROZPRAWY

1.1. Zjawisko pasożytnictwa i współpasożytnictwa

Wszystkie organizmy eukariotyczne posiadają zdolność rozpoznawania obcych komórek i organizmów wnikaających do ich wnętrza, bądź korzystających w inny sposób z ich zasobów, co umożliwia określenie dwóch strategii przeżycia – pasożyta i żywiciela (Goater i wsp. 2014). Z jednej strony znajdują się organizmy pasożytnicze, które starają się skutecznie pozyskać zasoby konieczne do przetrwania. Natomiast z drugiej jest organizm żywiciela, który stara się obronić przed niepożądaną utratą zasobów. Na przestrzeni lat definicja pasożytnictwa ulegała zmianom. Według „Słownika Parazytologicznego” pasożytnictwo oznacza zjawisko bytowania jednego organizmu (pasożyta) na/w organizmie innego gatunku (żywiciela) oraz wykorzystywania go jako środowisko życia i pozyskiwania pokarmu (Złotorzycka 1998). Podobna definicja jest przedstawiona w „Dictionary of Parasitology”: „Bliska zależność między dwoma organizmami, w ramach której jeden (pasożyt) osiąga korzyść kosztem drugiego (żywiciel), zazwyczaj w postaci pokarmu lub miejsca bytowania” (z ang. „Intimate relationship between two organisms in which one (the parasite) derives benefit from the other (the host), usually to obtain food or physical support”; Gosling 2005). Pomimo pewnych różnic w definiowaniu pasożytnictwa, wszystkie definicje pozostają zbliżone do zaproponowanej przez Leuckarta w 1852r., mówiącej, że pasożyt – organizm „słabszy” nie mogąc zabić swej ofiary, żyje jej kosztem (Kazubski 2000).

Ze względu na przeciwstawne cele organizmów tworzących układ pasożyt–żywiciel, dochodzi między nimi do „wyścigu zbrojeń”. Siła i przebieg inwazji pasożytniczej oraz jakość obrony żywiciela przed zarażeniem leżą u podstaw ogromnej zmienności w poziomie patogeniczności oraz kształtują proces koewolucji w tym układzie (Goater i wsp. 2014).

Główną cechą pasożytnictwa jest generowanie kosztów ponoszonych przez żywiciela, co z jego perspektywy kształtuje charakter oddziaływań w układzie pasożyt–żywiciel jako negatywny. Koszty mogą powstawać w wyniku bezpośredniego negatywnego oddziaływania pasożyta na żywiciela, jak i w wyniku działań jakie podejmuje żywiciel w celu zniwelowania skutków obecności pasożyta (Atkinson i wsp. 2009). Do

podstawowych mechanizmów powstawania negatywnych skutków obecności pasożyta należą: 1) uszkodzenie tkanek i narządów oraz koszty z tym związane, które mogą prowadzić do nieprawidłowego funkcjonowania innych układów w organizmie, np. zmniejszając wydolność układu trawiennego lub moczowego, lub powodując problemy lokomocyjne, 2) rywalizacja o zasoby pomiędzy pasożytem i żywicielem (ma miejsce kiedy pasożyt pochłania część pokarmu żywiciela), 3) koszty inwestycji w obronę przed pasożytami, np. inwestycja w układ odpornościowy (Atkinson i wsp. 2009).

Według metafory zaproponowanej przez Wobesera (2009), organizm żywiciela stanowi wyspę składającą się z nisz dostarczających zasoby dla przybywających pasożytów. Pasożyty dokonując inwazji na taką „wyspę” zasobów mogą napotkać opór środowiska – w tym wypadku strategie obronne żywiciela np. odpowiednie zachowanie lub działanie układu odpornościowego. W takim środowisku może dochodzić również do oddziaływania i tworzenia się sieci zależności pomiędzy samymi pasożytami.

Pasożytnictwo jest w naturze powszechne. Według szacunków połowę wszystkich taksonów zwierzęcych można sklasyfikować jako pasożytnicze (Price 1980). Grupą kręgowców, której poświęcono dużo uwagi jako żywicielom różnego rodzaju pasożytów są ptaki. Biorąc pod uwagę liczbę opisanych gatunków ptaków oszacowano, że mogą być one żywicielami co najmniej 58 000 gatunków pasożytów (Crompton 1997). Jednak te oszacowanie sporządzono zakładając, że każdy gatunek ptaka (pod uwagę wzięto 9 672 gatunki według Sibley i Monroe (1990)) jest żywicielem co najmniej 6 różnych taksonów pasożytniczych. Liczby te mogą być znacznie niedoszacowane zwłaszcza biorąc pod uwagę różnorodność gatunkową pasożytów w klimacie tropikalnym oraz samą liczbę gatunków ptaków. Obecnie wyodrębnia się ponad 11 000 gatunków ptaków, ale przypuszcza się, że liczba ta może sięgać 18 000 (Barrowclough i wsp. 2016, Lees i wsp. 2022).

W przypadku pasożytów ptaków większość taksonów nie została jeszcze opisana (Moore i Clayton 1997). Rozwój badań parazytologicznych i taksonomicznych poszczególnych pasożytów jest znacznie szybszy, jeżeli dany pasożyt lub gatunki z nim blisko spokrewnione występują także u ludzi, powodując dużą zachorowalność lub śmiertelność. Wiąże się to z dążeniem do opracowania środków przeciwdziałających lub zapobiegających takim inwazjom pasożytniczym u ludzi (Valkiūnas 2005). Z tego względu

szeroko badaną grupą pasożytów u ptaków są Protozoa, których część stadiów rozwojowych przebywa we krwi żywiciela (Atkinson i wsp. 2009).

Zwierzęta mogą być w tym samym czasie żywicielami pasożytów z wielu różnych taksonów (Petney i Andrews 1998, Cox 2001, Telfer i wsp. 2008, Bordes i Morand 2011). Takie jednocześnie zarażenie przez pasożyty z więcej niż jednego taksonu nosi miano współpasożytnictwa, współwystępowania pasożytów lub koinwazji (Złotorzycka 1998). Współwystępowanie w jednym organizmie żywiciela różnych pasożytów jest u zwierząt zjawiskiem powszechnym i nierzadko obserwuje się, że brak inwazji pasożytniczej lub inwazja przez pasożyty reprezentujące jeden takson występują w populacji żywiciela rzadziej niż współpasożytnictwo (Petney i Andrews 1998). Współwystępujące pasożyty mogą wpływać na swoją wirulencję, oddziaływanie na dostosowanie żywiciela, czy też rozprzestrzenianie się w populacji żywiciela (Cox 2001, Read i Taylor 2001, Cattadori i wsp. 2008, Bordes i Morand 2011), przy czym stopień skomplikowania zależności występujących między pasożytami wzrasta wraz ze wzrostem liczby pasożytów w organizmie żywiciela (Dobson 1985). W związku z tym badania nad pasożytnictwem powinny być prowadzone w układzie zgrupowanie pasożytów–żywiciel a nie pasożyt–żywiciel, przy czym zawsze należy brać pod uwagę indywidualny charakter rozpatrywanego układu, czyli jakie taksony zalicza się do pasożytów danego gatunku żywiciela. Wynika to z faktu, że nawet blisko spokrewnione gatunki mogą pełnić rolę żywiciela dla organizmów reprezentujących odległe taksony oraz różne strategie pozyskiwania zasobów żywiciela.

1.2. Oddziaływania pomiędzy współwystępującymi pasożytami

Oddziaływania pomiędzy współwystępującymi pasożytami można zaklasyfikować do jednej z trzech kategorii: 1) synergistyczne, 2) antagonistyczne lub 3) neutralne, przy czym charakter oddziaływań nie musi być dwukierunkowy, w związku z czym skutki współwystępowania pasożytów mogą być widoczne tylko u jednego z nich. Do powstawania określonego charakteru oddziaływania pomiędzy pasożytami z dwóch taksonów może dochodzić bezpośrednio lub pośrednio (Pedersen i Fenton 2007). Do pierwszej kategorii zalicza się m.in. konkurencję o przestrzeń, a drugiej – konkurencję o zasoby oraz immunosupresję. Poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za powstawanie

oddziaływań między pasożytami oraz charakteru tych oddziaływań może mieć znaczenie dla przewidywania oddziaływań pomiędzy taksonami pasożytów (Rynkiewicz i wsp. 2015).

Oddziaływania synergistyczne występują w przypadku, gdy obecność pasożytów z jednego taksonu wpływa pozytywnie na przebieg inwazji przez pasożyty z innego taksonu. Może to prowadzić do zwiększenia patogeniczności jednego lub obydwu pasożytów i tym samym zwiększenia negatywnego wpływu na żywiciela. Synergistyczna zależność może być również spowodowana oportunistyczną strategią jednego z pasożytów, w której zarażenie rozwija się w przypadku, gdy u żywiciela występuje już inny gatunek pasożyta. Układ odpornościowy żywiciela jest obciążony odpowiedzią immunologiczną na pierwszego z pasożytów, wobec czego nie może wytworzyć silnej odpowiedzi na inwazję drugiego z nich (Van Rooyen i wsp. 2013).

Oddziaływania antagonistyczne występują, gdy obecność jednego pasożyta wpływa negatywnie na przebieg inwazji innego pasożyta. Taki efekt może powstać w wyniku oddziaływania bezpośredniego, gdy np. jeden pasożyt zabija innego pasożyta lub oddziaływania pośredniego – w wyniku konkurencji o zasoby pomiędzy pasożytami. McQueen i McKenzie (2006) zasugerowali, że antagonistyczna zależność między pasożytami reprezentującymi różne taksony może być również spowodowana silniejszą reakcją obronną organizmu żywiciela na zarażenie jednym ze współwystępujących pasożytów. W takiej sytuacji drugi pasożyt, nie charakteryzujący się wysoką wirulencją, również staje się celem odpowiedzi immunologicznej, podczas gdy występując bez współpasożytów, nie wzbudza jej.

Jeżeli nie zaobserwowano bezpośrednich lub pośrednich oddziaływań pomiędzy pasożytami reprezentującymi różne taksony to charakter zależności zachodzących pomiędzy nimi jest neutralny – w takim przypadku pasożyty współwystępujące u jednego żywiciela nie wpływają na siebie w żaden sposób. Może to wynikać z niewielkiej patogeniczności poszczególnych pasożytów lub rozbieżnych nisz.

Poznanie charakteru oddziaływań między pasożytami wymaga podejścia eksperymentalnego. Jednak większość badań określająca prevalencję, czyli częstość występowania koinwazji oraz oddziaływania między współwystępującymi pasożytami, ma charakter opisowy i skupia się na jednym punkcie czasowym (Pedersen i Fenton 2007).

Zbadanie zagadnienia współpasożytnictwa i charakteru oddziaływań międzypasożytniczych w różnych punktach czasowych, zwiększa szanse zrozumienia tego zjawiska.

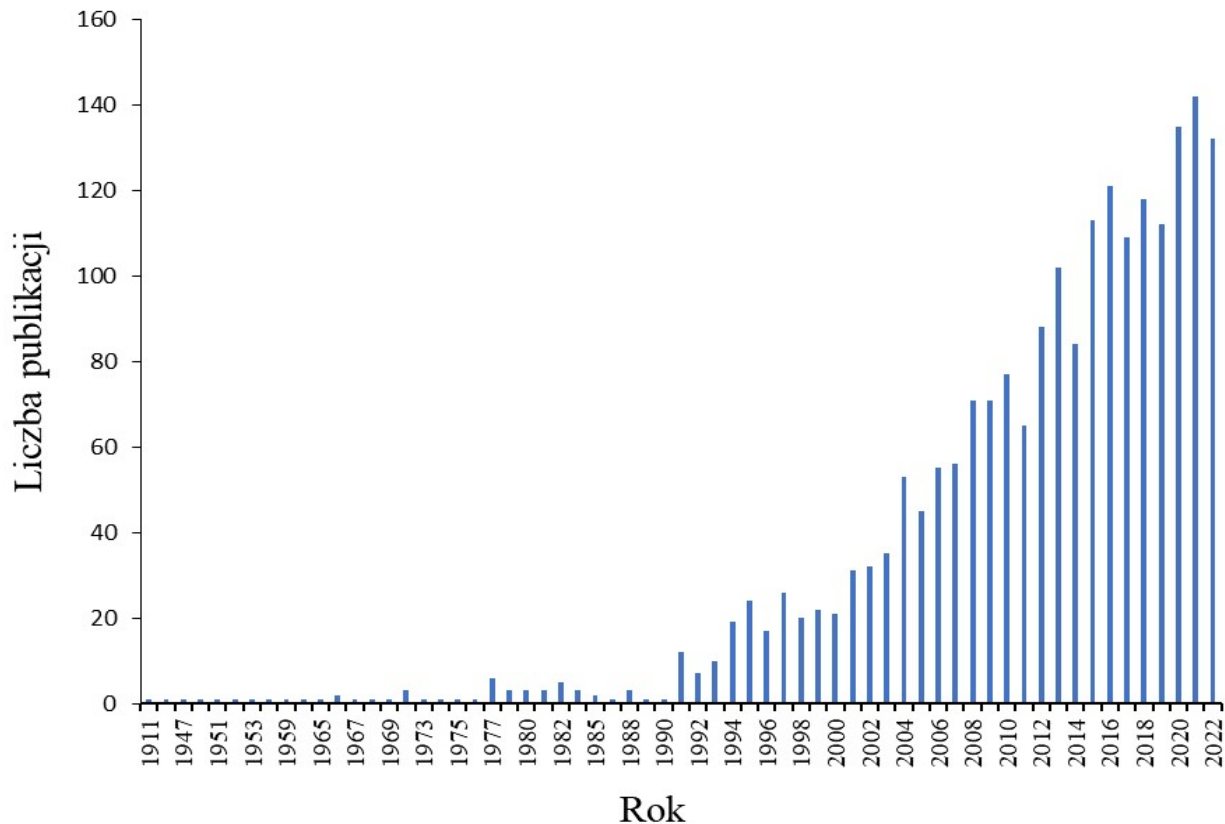
1.3. Pasożyty krwi

Pasożyty wewnętrzne z taksonu Protozoa występują u różnych grup zwierząt, w tym również u ptaków (Atkinson i wsp. 2009, Goater i wsp. 2014). W niniejszych badaniach skupiono się na pasożytach należących do rodzajów: *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon*; grupa Haemosporidia, typ Apikompleksa oraz *Trypanosoma*; typ Euglenozoa (Adl i wsp. 2019). Ze względu na fakt, że większość swojego cyklu życiowego organizmy te spędzają w układzie krwionośnym żywiciela, nazywa się je powszechnie pasożytami krwi (Gosling 2005) i pod tym terminem będą opisywane w dalszej części rozprawy. Na wzrost liczby prac poświęconych pasożytom krwi u ptaków (Rycina 1) i dynamiczny rozwój tej dziedziny miał wpływ rozwój technik molekularnych oraz opracowanie starterów namnażających sekwencje DNA tych pasożytów (Bensch i wsp. 2000, Sehgal i wsp. 2001, Hellgren i wsp. 2004, Waldenström i wsp. 2004).

W następnych podrozdziałach (1.3.1. i 1.3.2.) przedstawiono opis cykli życiowych pasożytów z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma*. Szczegółowy opis ma na celu przybliżenie istotnych różnic między tymi rodzajami pasożytów. Mogą one tłumaczyć różnice w przebiegu zarażenia oraz różnice we wpływie na żywiciela.

1.3.1. Cykle życiowe Haemosporidia (na podstawie Valkiūnas 2005)

Do grupy Haemosporidia należą obligatoryjne pasożyty z czterech rodzin Haemoproteidae, Plasmodiidae, Garniidae oraz Leucocytozoidae. Pasożyty z tej grupy charakteryzują się brakiem organelli zewnętrznych umożliwiających poruszanie się, z wyjątkiem części stadiów płciowych (Goater i wsp. 2014). Haemosporidia występują u dwóch grup żywicieli – kręgowych i bezkręgowych. Do rozmnażania bezpłciowego dochodzi podczas obecności w żywicielu pośrednim (ptaki), natomiast rozmnażanie płciowe ma miejsce w żywicielu ostatecznym (muchówki), który pełni jednocześnie rolę wektora pasożytów.



Rycina 1. Liczba publikacji o pasożytach krwi u ptaków w latach 1911–2022 według wyszukiwania w Web of Science Core Collection hasła „blood parasite* AND bird*”.

Podczas żerowania wektorów stadia inwazyjne pasożytów (tzw. sporozoity) przedostają się do organizmu ptaka, gdzie dochodzi do namnażania stadiów bezpłciowych, występujących poza erytrocytami (merontów) w komórkach żywiciela. W wyniku wielokrotnego podziału tych stadiów powstają stadia jednojądrowe (merozoity), które rozprzestrzeniają się w organizmie żywiciela. Zazwyczaj kilka pokoleń po kolejnych podziałach powoduje nagły wzrost zarażenia w porównaniu do początkowego etapu. Występujące poza erytrocytami meronty indukują nowy cykl podziałów lub prowadzą do rozwoju stadiów, z których powstanie gameta (gametocytów) w komórkach krwi. Gametocyty po wnikięciu do organizmu wektora przekształcają się w gamety.

W przebiegu zarażenia ptasiego żywiciela można wyodrębnić następujące etapy: 1 – prepatentny, kiedy pasożyty występują poza krwioobiegami, 2 – ostry – charakteryzuje się pojawieniem się pasożytów we krwi i ostrym wzrostem parazytemii, 3 – szczyt

parazytemii, 4 – chroniczny, 5 – ukryty, gdy liczba pasożytów zmniejsza się, a zarażenie może zostać wyeliminowane pod wpływem odpowiedzi immunologicznej żywiciela.

Najczęściej po pierwszym zarażeniu pasożyty utrzymują się w żywicielu pośrednim przez wiele sezonów lub całe jego życie, jednocześnie będąc źródłem zarażenia wektorów żerujących na żywicielu, które mogą przenieść pasożyty na inne osobniki w populacji żywiciela. Nawroty parazytemii występują podczas okresu lęgowego żywiciela, co sprzyja dalszemu zarażeniu innych osobników, zwłaszcza młodych, gdy wektory mogą przenieść pasożyty z osobników dorosłych na pisklęta. Podczas żerowania wektora na zarażonym ptaku, gametocyty pasożytów przedostają się do organizmu wektora razem z pobraną krwią. W żołądku wektora (żywiciela ostatecznego) rozpoczyna się gametogeneza (proces powstawania gamet), która prowadzi do płciowego procesu oogamii. Dochodzi do flagellacji (produkcji form wiciowych), podczas której makrogametocyty i mikrogametocyty produkują odpowiednio makrogamety i mikrogamety. Utworzona zygota przekształca się w ruchliwe stadium ookinety, która później penetruje ścianę żołądka wektora. Następnie ookineta zagnieżdża się pod blaszkami podstawnymi nabłonka i nieruchomieje (stadium oocysty). Następuje wtedy podział, podczas którego tworzone są jednojądrowe formy inwazyjne – sporozoity, które następnie przemieszczają się do hemocelu i penetrują ślinianki wektora. Transmisja następuje podczas żerowania wektora, gdy sporozoity przenikają do krwioobiegu ptaka razem z wydzielinami ślinianek wektora.

W poszczególnych rodzinach w obrębie grupy Haemosporidia cykle życiowe różnią się, więc poniżej dokładniej omówione są cykle życiowe rodzin, do których należą rodzaje pasożytów krwi badane w niniejszej pracy.

Haemoproteidae (na podstawie Valkiūnas 2005)

Pasożyty z rodzaju *Haemoproteus* są przenoszone przez muchówki z rodzin kuczmanowatych Ceratopogonidae i narzępikowatych Hippoboscidae. Po wnikięciu sporozoitów do organizmu kręgowca rozwój stadiów bezpłciowych (merontów) występuje najczęściej w płucach, śledzionie, wątrobie i nerkach, a czasami (megalomeronty) także w miofibroblastach mięśni szkieletowych oraz mięśniu sercowym. Jedynym stadium występującym wewnątrz erytrocytów są gametocyty, które rozwijają się po wnikięciu do tych komórek poprzedniego stadium – merozoitów. Okres prepatencji u większości

gatunków *Haemoproteus* wynosi od 11 dni do kilku tygodni. Po wnikięciu do erytrocytu gametocyty zdolne to gametogenezy pojawiają się w ciągu 2–6 dni.

Gametocyty w żołądku wektora wydostają się z erytrocytów już po kilku minutach od żerowania. Gametogeneza, zapłodnienie, a następnie rozwój zygot i ookinet następuje według wspólnego schematu dla wszystkich *Haemosporidia*, natomiast sporogonia w zależności od wektora (kuczmanowate lub narzępikowate) jest różna. Większość gatunków *Haemoproteus* o poznanym przebiegu cyku rozwojowego jest przenoszona przez kuczmanowate. Tworzenie sporozoitów przeważnie trwa około 10 dni, co odpowiada krótkiemu cyklowi gonotroficznemu u wektorów – dojrzewaniu jajników zgodnie z procesem trawienia pokarmu. Do czasu następnego żerowania wektora sporozoity przemieszczają się do ślinianek. Sporogonia u gatunków rozwijających się u narzępikowatych jest dłuższa. Ten niesynchronizowany z żywicielem typ rozwoju wynika ze sposobu żerowania wektora, który często spędza na swoim żywicielu dłuższy czas.

Plasmodiidae (na podstawie Valkiūnas 2005)

Krwio pijne komary Culicidae są wektorami pasożytów z tej rodziny występujących u ptaków. Jedynie samice żerują na kręgowcach i w związku z tym tylko one biorą udział w przenoszeniu pasożytów. Sporozoity wnikające do krwioobiegu kręgowców dają początek pierwszemu stadium (tzw. kryptozoity), rozwijającemu się w wielu różnych narządach, np. śledzionie, ale również w skórze. W kryptozoitach dochodzi do tworzenia kolejnych stadiów, które mają na celu rozpowszechnienie pasożyta w organizmie żywiciela, gdzie po następnych podziałach pasożyty uzyskują zdolność wnikania do erytrocytów. Na tym etapie liczba pasożytów występujących we krwi jest niewielka. W czerwonych krwinkach dochodzi do rozmnażania bezpłciowego. Obecność stadiów bezpłciowych – merontów – ma wpływ na łatwość zarażenia kręgowców przez inokulację zarażoną krwią. Podczas gdy niektóre stadia bezpłciowe tworzą w erytrocytach gametocyty, pozostałe z nich wnikają do różnych narządów, co powoduje ostry wzrost parazytemii. Obecność pasożytów w różnych częściach organizmu żywiciela ma znaczenie podczas chronicznego stadium zarażenia i jest odpowiedzialna za nawroty zarażenia. Okres, kiedy wykrywalna jest zwiększona liczba pasożytów we krwi (stadium ostrego zarażenia) wynosi od tygodnia do kilku tygodni. Po czym następuje spadek parazytemii prowadząc do stadium chronicznego, gdy tylko kilka

pasożytów występuje we krwi. Chroniczne stadium często poprzedza stadium ukryte, kiedy to pasożyty całkowicie znikają z krwioobiegu. W takich przypadkach pasożyty przeważnie przebywają w narządach wewnętrznych. Warto zauważyć, że nawroty są zbieżne z okresem lęgowym ptaków, co jest ważne dla zarażenia potomstwa żywiciela (przenoszenie pasożytów przez wektory z osobników dorosłych na pisklęta) i utrzymaniu występowania *Plasmodium* w środowisku.

Po żerowaniu wektora na zarażonym ptaku, w jego żołądku dojrzałe gametocyty wydostają się z erytrocytów. Po utworzeniu gamet następuje zapłodnienie i rozwija się ookineta. Ookineta przemieszcza się do blaszek podstawnych nabłonka, gdzie przekształca się w oocystę. W niej rozwijają się sporozoity podczas sporogonii. Po pęknięciu dojrzałej oocysty sporozoity przemieszczają się do ślinianek.

Leucocytozoidae (na podstawie Valkiūnas 2005)

Pasożyty z rodzaju *Leucocytozoon* są przenoszone przez muchówki z rodziny meszkowatych Simuliidae, chociaż stwierdzono, że gatunek *Leucocytozoon caulleryi* jest przenoszony przez kuczmanowate (El-Azm i wsp. 2022). Po wnikięciu sporozoitów do organizmu ptaka, rozmnażanie bezpłciowe zachodzi w hepatocytach w wątrobie, w makrofagach oraz komórkach tkanki łącznej. Gametocyty rozwijają się w erytroblastach, erytrocytach oraz w jednojądrowych leukocytach. Stopniowa penetracja sporozoitów w hepatocytach jest jednym z powodów asynchronicznej merogonii (podziału merontu na merozoity) w wątrobie, natomiast nie jest w ogóle stwierdzana w erytrocytach. Merozoity po przedostaniu się do krwi penetrują niedojrzałe i dojrzałe erytrocyty, gdzie tworzą gametocyty. Młode gametocyty powodują hipertrofię i deformację komórek żywiciela. Scyntia (fragment hepatocytowego merontu z kilkoma nukleusami) dostaje się do krwi i rozprzestrzenia do różnych narządów, gdzie jest pochłaniana przez makrofagi i inne komórki dając początek drugiemu pokoleniu merontów – megalomerontom. Merozoity pochodzące z megalomerontów penetrują limfocyty i inne jednojądrowe leukocyty dając początek gametocytom. Gametocyty zostają pochłonięte przez wektora razem z krwią żywiciela. Następnie w żołądku wektora cykl przybiera charakter typowy dla całej grupy Haemosporidia – powstała z połączenia gamet zygota tworzy ookinetę, a następnie oocystę.

W wyniku podziałów powstają inwazyjne sporozoity, które po przemieszczeniu do ślinianek (lub hemocelu) oczekują na żerowanie wektora na kolejnym ptaku.

1.3.2. Cykl życiowy *Trypanosoma*

Trypanosoma – rodzaj pasożytniczych świdrowców z gromady Kinetoplastidia – skupia organizmy jednokomórkowe posiadające wici, które charakteryzują się dużą różnorodnością względem żywicieli oraz dróg zarażenia (Goater i wsp. 2014). Obligatoryjnie posiadają one dwa rodzaje żywicieli – kręgowce i bezkręgowce. Jednakże wciąż jest wiele niejasności dotyczących biologii tych pasożytów, a także przenoszenia poszczególnych gatunków między żywicielami. Cykle życiowe i charakterystyka zarażenia są opisane tylko w kilku pracach (Baker 1956, Bennett 1970, Baker 1976, Votýpka i Svobodová 2004, Votýpka i wsp. 2012). Wektorami *Trypanosoma* mogą być muchówki z rodzin narzępikowatych, kuczmanowatych, meszkowatych, komarowatych, a także roztocza z rodziny Dermanyssidae. Do zarażenia ptaków najczęściej dochodzi poprzez odchody wektora, wydalone w okolicach śluzówki lub naruszonej skóry podczas żerowania, w których znajdują się inwazyjne formy pasożyta (metacykliczne). Innymi potwierdzonymi drogami transmisji są: zjedzenie wektora oraz wstrzyknięcie pasożytów przez wektora podczas żerowania (razem z wydzielinami ślinianki; Bennett 1961, Baker 1976, Votýpka i Svobodová 2004, Votýpka i wsp. 2012). W cyklu rozwojowym występuje przemiana pokoleń bezpłciowych o zmiennych formach morfologicznych, co wiąże się z przystosowaniem do pasożytowania w różnych środowiskach. Może wystąpić pięć form morfologicznych pasożyta: 1 – trypomastigota, 2 – epimastigota, 3 – amastigota, 4 – promastigota oraz 5 – sferomastigota, które różnią się kształtem lub obecnością poszczególnych organelli (Kurnatowska i Kurnatowski 2002). W przypadku zarażenia wektora pasożyty wydostają się z przerwanej błony peritroficznej w odźwierniku, po czym następuje intensywne namnażanie. Utworzone zostają mniejsze epimastigoty, które przyczepiają się do oskórka w jelitach. Następnie kontynuują namnażanie dając początek krótkim, pękatym inwazyjnym (metacyklicznym) trypomastigotom. Pasożyty wykształcają długie wici i przemieszczają się pomiędzy mikrokosmkami wnikając w zagłębienia jelita. Liczne podziały w jelitach powodują znaczny wzrost liczebności pasożytów w wektorze. Pasożyty są następnie wydalone razem z odchodami. Proces namnażania w wektorze trwa

do 48 h i pierwsze trypomastigoty – inwazyjne dla ptaka, są obecne 60–72 h od zarażenia wektora. Taki okres rozwoju związany jest z czasem żerowania wektora, podczas którego wydalone są formy inwazyjne. Cykl życiowy charakteryzuje się intensywnym namnażaniem pasożytów w organizmie wektora oraz nielicznym namnażaniu w organizmie ptaka (Bennett 1970). Po zarażeniu ptaka okres prepatencji (występowania poza krwiobiegami) wynosi 24–48 h. Po wnikięciu do organizmu ptaka pasożyty przenikają do naczyń limfatycznych, gdzie rozwijają się większe formy (Baker 1956). Pasożyty w okresie zimowym wycofują się z krwioobiegu. Występują wtedy głównie w szpiku kostnym, ale można je również spotkać w innych narządach żywiciela (Baker 1956). Podczas przebywania w krwiobiegu pasożyty przemieszczają się w osoczu, co odróżnia je od pasożytów z grupy *Haemosporidia*, przebywających w komórkach krwi.

1.4. Histopatologiczne objawy inwazji pasożytów krwi u ptaków

Zmiany patologiczne mogą wystąpić zarówno na skutek obecności stadiów pasożyta w komórkach krwi, jak i w różnych narządach organizmu żywiciela (Valkiūnas 2005). W początkowej fazie zarażenia kręgowego żywiciela negatywny wpływ pierwszego pokolenia bezpłciowych stadiów (tzw. merontów), które rozwijają się poza komórkami krwi, jest niewielki (poza kilkoma wyjątkami), a większe zmiany patologiczne mogą powodować dopiero kolejne pokolenia (Valkiūnas 2005). Jednak charakter tych zmian może znacznie różnić się pomiędzy taksonami pasożytów w obrębie *Haemosporidia*. W przypadku *Haemoproteus mansonii* już pierwsze pokolenie merontów może powodować nekrozę sąsiednich włókien mięśniowych. Niektóre stadia w cyklu rozwojowym *Plasmodium* mogą zmniejszać przepustowość naczyń włosowatych i prowadzić do niedotlenienia komórek w różnych narządach, co w szerszej perspektywie prowadzi do nekroz lub porażenia mózgowego (ang. cerebral paralysis) w przypadku zablokowania naczyń włosowatych mózgu (Valkiūnas 2005). Zmiany patologiczne wywołane przez *Leucocytozoon* są związane z obecnością jednego ze stadiów pasożyta w różnych narządach, np. wątrobie, śledzionie, płucach, sercu, mózgu i innych i mogą się objawiać powiększeniem tych narządów oraz występowaniem nekroz. Powiększenie narządów oraz nekrozy wynikają z dużego nagromadzenia stadiów pasożyta, które po uwolnieniu z komórek żywiciela powodują krwotok (Valkiūnas 2005).

Jednak najpoważniejsze zmiany patologiczne wywołane są przez stadia pasożytów występujące w krwi obwodowej, ze względu na niszczenie komórek krwi oraz anemię (Valkiūnas 2005). Anemia wynika z likwidacji zarażanych komórek krwi żywiciela przez układ fagocytarny m.in. w wątrobie i śledzionie, co w przypadku ostrego etapu zarażenia powoduje przewagę w ubytku erytrocytów nad produkcją nowych erytroblastów (Valkiūnas 2005). W przypadku zarażenia *Plasmodium* zaobserwowano zmiany w składzie chemicznym krwi, które mogą przyspieszać niszczenie erytrocytów. Wzrost parazytemii skutkuje obniżeniem pH osocza i wzrostem stężenia białek we krwi, co powoduje obniżenie zdolności hemoglobiny do wiązania tlenu i zmniejszenie efektywności krążenia w naczyniach włosowatych. Zarażenie *Leucocytozoon* prowadzi również do zwiększonego niszczenia erytrocytów, które nie zawierają pasożyta oraz hemolizy (przechodzenie hemoglobiny do osocza krwi na skutek niszczenia erytrocytów), co jest częstsze niż w przypadku zarażenia innymi rodzajami Haemosporidia (Valkiūnas 2005).

Pomimo opisanie blisko 100 gatunków *Trypanosoma* występujących u ptaków, cykle życiowe, wektory czy patogeniczność tych pasożytów pozostają słabo poznane (Votýpka i wsp. 2012). W pracy przeglądowej na temat biologii ptasich *Trypanosoma* Baker (1976) wskazuje na wysoką śmiertelność ptaków, u których stwierdzono wysoką intensywność zarażenia (liczba pasożytów dorównywała liczbie erytrocytów). Niewiele jest prac opisujących zmiany patologiczne wywoływane przez *Trypanosoma* u ptaków (Joshua 1983, Molyneux i wsp. 1983). U eksperymentalnie zarażonych kur domowych nie stwierdzono powiększenia śledziony i innych organów, natomiast zauważono znaczny wzrost liczby tzw. ośrodków rozmnażania (skupisk proliferujących limfocytów) w śledzionie u zarażonych osobników (Joshua 1983). Zmiany histopatologiczne stwierdzono u eksperymentalnie zarażonych kanarków *Serinus canaria* w śledzionie i sercu. U osobników zarażonych śledziona była trzykrotnie większa niż u osobników zdrowych, co wynikało z licznych nagromadzeń limfocytów w guzkach limfatycznych. Stwierdzono również uszkodzenia tkanki w mięśniu sercowym i nasierdziu, co odpowiada zmianom patologicznym obserwowanym u ssaków (Molyneux i wsp. 1983).

1.5. Współwystępowanie pasożytów krwi u ptaków

1.5.1. Oddziaływania między pasożytami krwi

Większość prac dotyczących zależności między pasożytami krwi dotyczy gatunków występujących u człowieka i innych ssaków (Richie 1988, Cox 2001, de Roode i wsp. 2005, Bell i wsp. 2006), natomiast prace poświęcone tej grupie pasożytów u ptaków przeważnie skupione są na wpływie pasożytów na organizm żywiciela, a nie na charakterze samych zależności/oddziaływań między pasożytami (Davidar i Morton 2006, Marzal i wsp. 2008, Palinauskas i wsp. 2011, van Rooyen i wsp. 2013, Meixell i wsp. 2016, Reis i wsp. 2021, Pigeault i wsp. 2022, Svobodová i wsp. 2023).

Dane dotyczące współpasożytnictwa u ptaków pochodzą przeważnie z jednego punktu czasowego, co oznacza, że brak jest informacji o tym, który pasożyt jako pierwszy wniknął do organizmu żywiciela i jaki wpływ miała jego obecność na prawdopodobieństwo wystąpienia inwazji innych pasożytów (Palinauskas i wsp. 2011, Oakgrove i wsp. 2014, Svobodová i wsp. 2015, Clark i wsp. 2016). Wyniki badań wykonanych w jednym punkcie czasowym, wskazują, że pomiędzy określonymi taksonami pasożytów można wyróżnić dominujący charakter zależności. Oakgrove i wsp. (2014) w badaniach na 47 gatunkach ptaków występujących na Alasce stwierdzili, że zarażenie *Leucocytozoon* jest pozytywnie skorelowane z zarażeniem *Trypanosoma*, negatywnie z *Haemoproteus*, natomiast brak jest zależności tych pasożytów z *Plasmodium*. Synergistyczna zależność między *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* została również stwierdzona u piskląt i dorosłych myszołowów *Buteo buteo* i piskląt krogulca zwyczajnego *Accipiter nissus* (Svobodová i wsp. 2015), krzyżodzioba modrzewiowego *Loxia leucoptera* (Deviche i wsp. 2010), krogulca zmiennego *Accipiter striatus* (Kirkpatrick i Lauer 1985) oraz potwierdzona w metaanalizie (Arriero i Møller 2008).

Antagonistyczne interakcje między *Leucocytozoon* i *Haemoproteus* stwierdzone przez Oakgrove i wsp. (2014) nie zostały potwierdzone w innych pracach. Svobodová i wsp. (2015) stwierdziła pozytywną zależność między tymi pasożytami u piskląt krogulca zwyczajnego i myszołowa. W części prac nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy *Leucocytozoon* i *Haemoproteus* (Wiehn i wsp. 1999, Deviche i wsp. 2010) lub była to słaba zależność antagonistyczna (Arriero i Møller 2008). Smith i wsp. (2016) w badaniach na kurakach Galliformes stwierdzili 32 przypadki współpasożytnictwa u 342 zarażonych

ptaków. Stwierdzono współwystępowanie *Leucocytozoon* i *Haemoproteus* (18 przypadków), *Leucocytozoon* i *Plasmodium* (14 przypadków) oraz brak współpasożytnictwa *Haemoproteus* i *Plasmodium*. Podobne zjawisko zaobserwowano w badaniach na 5 gatunkach blaszkodziobych Anseriformes, gdzie u 775 zarażonych ptaków stwierdzono 196 przypadków współwystępowania *Leucocytozoon* i *Haemoproteus*, 78 – *Leucocytozoon* i *Plasmodium* i tylko dwa przypadki współpasożytnictwa *Haemoproteus* i *Plasmodium* (Meixell i wsp. 2016).

U kosa *Turdus merula*, u którego stwierdzono wysoką prevalencję zarówno *Haemoproteus* jak i *Plasmodium*, nie zaobserwowano występowania tych pasożytów jednocześnie (Hatchwell i wsp. 2000). Mała liczba przypadków współpasożytnictwa między tymi taksonami może po części wynikać z niedoskonałości technik wykorzystywanych w analizie zapasożycenia. Zarażenie *Haemoproteus* charakteryzuje się przeważnie wyższą intensywnością niż *Plasmodium*, przez co może być łatwiej wykrywalne (Valkiūnas 2005). Częstość współwystępowania poszczególnych pasożytów może wynikać m.in z przenoszenia pasożytów przez wspólnego wektora (Svobodová i wsp. 2015), odpowiednich warunków klimatycznych (Sehgal i wsp. 2011, Oakgrove i wsp. 2014), ewentualnej konkurencji między pasożytami lub rozwojem odpowiedzi immunologicznej żywiciela (Hatchwell i wsp. 2000).

1.5.2. Wpływ pasożytów krwi na parametry rozrodu

Wpływ zarażenia pasożytami z grupy Haemosporidia na rozród ptaków był przez długi czas uważany za nieistotny. Jednak badania na populacjach żywicieli nie mających wcześniej kontaktu z takimi pasożytami oraz takie, w których podawano ptakom leki usuwające pasożyty lub obniżające parazytemię, wykazały negatywny wpływ inwazji pasożytów z tej grupy (Bennett 1993, Atkinson i wsp. 2000, Valkiūnas 2005, Knowles i wsp. 2010). Poniżej opisano udokumentowany dotychczas wpływ pasożytów krwi, zwykle rozpatrywany jako wpływ pojedynczych taksonów, na parametry rozrodu u ptaków.

Termin przystąpienia do lęgu. Zarażenie pasożytami krwi może opóźniać czas przystąpienia do lęgu. W przypadku zarażenia przez *Trypanosoma* stwierdzono taki wpływ u samców muchołówki żałobnej *Ficedula hypoleuca* (Rätti i wsp. 1993). Również samice bogatki *Parus major* zarażone różnymi pasożytami krwi (głównie *Haemoproteus*) znosiły

pierwsze jaja później od samic niezarażonych (Allander i Bennett 1995). Podobne obserwacje poczyniono u gąsiorka *Lanius collurio* zarażonego *Haemoproteus*, jednak odwrotna zależność została zaobserwowana w przypadku tego pasożyta u muchołówki żałobnej (Sanz i wsp. 2001b, Votýpka i wsp. 2003).

Wielkość zniesienia. Oppliger i wsp. (1997) zaobserwowali, że samice bogatki, u których stwierdzono *Plasmodium* w dniu 14 po wykluciu piskląt miały większe lęgi niż samice niezarażone tym pasożytem. Taki wzorzec może być związany z faktem, że potencjalnie tylko ptaki charakteryzujące się dobrą kondycją przetrwały ostre stadium infekcji. Negatywny wpływ zarażenia przez *Haemoproteus* na liczbę jaj został zaobserwowany u oknówki *Delichon urbicum* i muchołówki żałobnej (Dale i wsp. 1996, Marzal i wsp. 2005), natomiast nie stwierdzono takiej zależności u jaskółczaka modrego *Progne subis* i bogatki (Davidar i Morton 1993, Allander i Bennett 1995). W innych badaniach stwierdzono, że prawdopodobieństwo zarażenia przez *Haemoproteus* i *Leucocytozoon* jest niższe u samic bogatki składających większe lęgi (Norte i wsp. 2009). Natomiast negatywny wpływ zarażenia przez *Leucocytozoon* na liczbę jaj zaobserwowano u włochatki *Aegolius funereus*, ale jedynie w sezonie z mniejszą ilością dostępnego pokarmu (Korpimäki i wsp. 1993).

Wielkość jaj. Informacje dostępne na temat wpływu pasożytów krwi na wielkość jaj są znikome. Norte i wsp. (2009) wykazali większe prawdopodobieństwo wykrycia zarażenia *Plasmodium* u samic bogatki składających większe jaja. Autorzy tej pracy sugerują, że może to wynikać z kompromisu między wydatkami zasobów na reprodukcję i układ odpornościowy – zwiększone inwestowanie w rozród może zwiększać szanse nawrotu infekcji bądź zwiększać podatność na nowe zarażenia. Negatywny wpływ zarażenia pasożytami krwi u bogatki został stwierdzony dla *Trypanosoma*, jednak na niewielkiej próbie (Dufva 1996). Co ciekawe w tych badaniach nie zaobserwowano związku pozostałych pasożytów krwi (*Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, *Hepatozoon*) z wielkością jaj.

Więcej jest dostępnych informacji na temat wpływu pasożytów na elementy biologii lęgu na późniejszym etapie cyklu lęgowego.

Wykluwalność jaj i sukces wylotu. Stwierdzono, że lęgi samic bogatki zarażonych *Trypanosoma* charakteryzowały się niższą wykluwalnością oraz gorszą kondycją piskląt

(Dufva 1996). Niższą wykluwalność zaobserwowano również w lęgach muchołówki żałobnej i oknówki, gdy samica była zarażona *Haemoproteus* (Sanz i wsp. 2001a, Marzal i wsp. 2005). Niższy sukces wylotu (rozumiany jako procent wykłutych osobników, które osiągnęły wiek 13 dni lub procent wykłutych osobników, które opuściły gniazdo) zaobserwowano w lęgach modraszki *Cyanistes caeruleus* i oknówki, którym nie podano leku przeciwmalarycznego (Merino i wsp. 2000, Marzal i wsp. 2005). Również w lęgach trzciniaaka *Acrocephalus arundinaceus* stwierdzono niższy sukces wylotu, jeżeli ptaki dorosłe były zarażone *Haemoproteus* (Asghar i wsp. 2011). Negatywny wpływ *Plasmodium* na sukces wylotu zaobserwowano również u wrony amerykańskiej (*Corvus brachyrhynchos*; Townsend i wsp. 2018). Norte i wsp. (2009) zaobserwowali z drugiej strony, że samce, w których lęgach sukces wylotu był wyższy, miały większe prawdopodobieństwo bycia zarażonym *Haemoproteus*. Może to mieć związek z wysokimi kosztami ponoszonymi przez samce w okresie karmienia piskląt i jedynie osobniki w najlepszej kondycji wyprowadzają lęgi charakteryzujące się większym sukcesem.

Pomimo powszechnego współwystępowania pasożytów krwi (Valkiūnas 2005, van Rooyen i wsp. 2013), niewiele jest informacji o wpływie tego zjawiska na rozród ptaków. W nielicznych pracach stwierdzono m.in. śmiertelność piskląt puchacza śnieżnego *Bubo scandiacus* w przypadku współpasożytnictwa *Haemoproteus* i *Leucocytozoon* czy też wcześniejsze składanie jaj przez samice oknówki zarażone *Haemoproteus* i *Plasmodium* lub dwoma liniami genetycznymi *Haemoproteus* (Evans i Otter 1998, Marzal i wsp. 2008). We wspomnianych badaniach na oknówce, współpasożytnictwo było dodatnio skorelowane z wielkością lęgu u zarażonych osobników. Natomiast w badaniach na muchołówce żałobnej nie stwierdzono wpływu współpasożytnictwa *Haemoproteus* i *Trypanosoma* zarówno na objętość jaj, wielkość zniesienia, jak i na datę przystąpienia do lęgu (Sanz i wsp. 2001b). Niewielka ilość dostępnych informacji może częściowo wynikać z faktu, że w większości badań skupiono się na wpływie pojedynczych taksonów pasożytów, pomijając fakt, czy dany żywiciel był jednocześnie zarażony przez inne pasożyty. Inną istotną kwestią jest dostępność danych przeważnie z jednego punktu czasowego, kiedy brakuje informacji czy zarażenie danym pasożytem nastąpiło w bieżącym sezonie rozrodczym, czy też wcześniej, oraz jak zmieniają się poszczególne parametry rozrodu jeżeli w organizmie żywiciela pojawia się kolejny rodzaj pasożyta. Zmienność w charakterze wpływu

poszczególnych pasożytów na siebie nawzajem może zależeć od gatunku żywiciela i specyfiki konkretnego układu pasożyt–żywiciel. Z tego względu zbadanie zależności pomiędzy współpasożytnictwem a poszczególnymi parametrami biologii lęgowej żywiciela zwiększa szanse zrozumienia zależności występujących w układach zgrupowanie pasożytów–żywiciel. Przykładowo negatywny wpływ jednego z pasożytów może pojawiać się, jeżeli organizm żywiciela jest już obciążony inną infekcją pasożytniczą.

1.5.3. Rozwój zarażenia u młodocianych ptaków

Wiek żywiciela jest jednym z kluczowym czynników związanych z występowaniem zapasożycenia. Dotychczasowe badania nad częstością zarażenia oraz bogactwem zespołu pasożytów prowadzone były przede wszystkim na osobnikach, które osiągnęły dojrzałość płciową (Clayton i Moore 1997, McCrudy i wsp. 1998, Petney i Andrews 1998). Znacznie słabiej zagadnienie to jest poznane u osobników na wcześniejszych etapach życia. Tymczasem, biorąc pod uwagę różnice fizjologiczne i behawioralne między osobnikami młodymi i dojrzałymi płciowo zarażenie przez pasożyty może kształtować się odmiennie, przy czym na te różnice może mieć wpływ sposób transmisji pasożytów oraz ich zjadliwość (Frank 1996, Petney i Andrews 1998). Wraz z wiekiem wydłuża się czas ekspozycji żywiciela na wektory pasożytów krwi, przez co zwiększają się szanse zarażenia, czy też akumulacji kolejnych pasożytniczych taksonów w jednym organizmie (Seutin i wsp. 1994, Bennett i wsp. 1995, Dale i wsp. 1996, Deviche i wsp. 2001). Z drugiej strony u osobników młodocianych może wystąpić wyższa prewalencja pasożytów krwi, ponieważ układ odpornościowy nie jest jeszcze w pełni wykształcony (Godfrey i wsp. 1994, Munro i wsp. 2009, van Oers i wsp. 2010).

Ze względu na fakt, że niektóre pasożyty krwi charakteryzują się długim okresem prepatencji, tzn. czasem od momentu wnिकnięcia pasożytów do organizmu żywiciela do ich pojawienia się w krwi obwodowej, wykrywalność inwazji szczególnie w okresie pisklęcym może być ograniczona. Dotyczy to przede wszystkim pasożytów z rodzajów *Haemoproteus* i *Plasmodium*, u których okres prepatencji wynosi średnio między 11 dni a trzema tygodniami, ale może wahać się w zakresie od 2 dni do nawet kilku miesięcy w zależności od gatunku żywiciela oraz gatunku/linii genetycznej pasożyta (Valkiūnas 2005, Palinauskas i wsp. 2008). U pasożytów z rodzaju *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* okres ten jest krótszy

(wynosi ok. 5 dni, Fallis i Bennett 1961, Baker 1976), w związku z czym wykrywanie inwazji możliwe jest już w niedługim czasie po wykluciu się piskląt. Ograniczona wykrywalność inwazji niektórych pasożytów krwi występuje zwłaszcza u gatunków ptaków o krótkim okresie gniazdowym, do których zalicza się duża część ptaków wróblowych, które są najliczniej reprezentowaną grupą w badaniach dotyczących ptasich pasożytów krwi. Okres przebywania piskląt w gnieździe w tej grupie często wynosi tylko kilkanaście dni (Cramp i Perrins 1993). Dotychczasowe badania wskazują, że w populacjach ptaków wróblowych, w których znaczna część ptaków dorosłych jest zarażona, częstość zarażenia piskląt, szczególnie przez rodzaje *Haemoproteus* i *Plasmodium*, jest bardzo niska lub inwazje w ogóle nie są stwierdzane.

Tylko sporadycznie przewalencja pasożytów z rodzaju *Plasmodium* i *Haemoproteus* osiąga u piskląt wartości zbliżone do tych obserwowanych u ptaków dorosłych (Calero–Riestra i Garcia 2016). Ogólnie, podloty i osobniki młodociane są częściej zarażone niż pisklęta. Przykładowo, u namorzynka seszelskiego *Acrocephalus sechellensis*, przewalencja *Haemoproteus*, jedyne wykryte u tego gatunku żywiciela rodzaju pasożyta z grupy Haemosporidia, była ponad 11 razy wyższa u podlotów i prawie 17 razy wyższa u osobników młodocianych w porównaniu z pisklętami (Hammers i wsp. 2016). Z powodu ograniczonej wykrywalności inwazji wywołanych przez pasożyty z rodzajów *Plasmodium* i *Haemoproteus* u piskląt drobnych ptaków wróblowych należałoby prowadzić detekcję zarażenia, gdy ptaki są starsze, czyli w okresie po opuszczeniu przez nie gniazda. Ponieważ ich chwytywanie w tym okresie jest problematyczne i wiąże się z dużymi nakładami czasowymi, badania tego typu należą do rzadkości (Hunter i wsp. 1997, Krams i wsp. 2013, Hammers i wsp. 2016). U większości gatunków ptaki dorosłe są znacznie częściej zarażone przez pasożyty krwi niż osobniki młode. Przykładowo, wyższe zarażenie u ptaków dorosłych zaobserwowano u trzcinniczka *Acrocephalus scirpaceus* i rokitniczki *Acrocephalus schoenobaenus* – odpowiednio 32% dorosłych vs 3% młodocianych i 24% dorosłych vs 5% młodocianych (Wojczulanis–Jakubas i wsp. 2012). Brak zależności z wiekiem został z kolei stwierdzony dla zarażenia *Plasmodium* w badaniach na świergotku polnym *Anthus campestris* (Calero–Riestra i Garcia 2016).

Na obecność inwazji pasożytniczych u żywicieli może mieć wpływ wiele czynników, zarówno tych nie związanych bezpośrednio z żywicielem (np. wysokość nad

poziomem morza i odległość od zbiorników wodnych; Ortego i Cordero 2010, Krama i wsp. 2015, Carlson i wsp. 2018), jak i tych, które są ściśle związane z jego cechami. Do jednych z najważniejszych cech żywiciela, które mogą wpływać na rozwój inwazji pasożytniczych należy jego płeć. U wielu gatunków ptaków stwierdzono, że dorosłe samce są częściej zarażone przez pasożyty niż samice. Przyjmuje się, że za taki wzorzec zapasożycenia odpowiada gorzej funkcjonujący u samców układ odpornościowy, co wiąże się z immunosupresyjnym działaniem androgenów (Folstad i Karter 1992). Różnice w częstości zarażenia stwierdzane są jednak tylko w części przypadków. Meta–analiza wyników 33 badań wykazała, że ogólnie u dorosłych ptaków częstość zarażenia przez pasożyty krwi nie różni się między samcami i samicami. Jednak inwazje *Haemoproteus* (najpowszechniej występującego rodzaju pasożyta w grupie badanych gatunków żywicieli) podczas okresu rozrodczego były znacznie częstsze u samic niż samców (McCurdy i wsp. 1998). Podobnie w meta–analizie na 96 gatunkach ptaków Valdebenito i wsp. (2020) stwierdzili, że brak różnic w prewalencji między płciami w przypadku zarażenia 5 rodzajami pasożytów krwi (m.in. *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma*). W odróżnieniu od ptaków, które osiągnęły dojrzałość płciową, niewiele jest danych na temat częstości zarażenia przez pasożyty w zależności od płci u piskląt, podlotów i młodocianych ptaków. Biorąc pod uwagę fakt, że przed osiągnięciem dojrzałości płciowej nie ma różnic między samcami i samicami w wielkości narządów związanych z układem odpornościowym (Møller i wsp. 1997, Fargallo i wsp. 2002), można byłoby oczekiwać podobnej częstości zarażenia u ptaków na wczesnym etapie życia. Część badań wykazała jednak, że u pewnych gatunków mogą występować różnice między płciami w poziomie immunokompetencji już w stosunkowo krótkim czasie od momentu wyklucia (Tschirren i wsp. 2003, Dubiec i wsp. 2006). Takie różnice mogą potencjalnie prowadzić do zróżnicowania częstości inwazji pasożytniczych.

Kolejnym czynnikiem, który może odgrywać istotną rolę w kształtowaniu prawdopodobieństwa rozwoju inwazji pasożytniczych jest aktualne lub przeszłe zarażenie przez inne patogeny (Millott i Cox 1985, Christensen i wsp. 1987, Telfer i wsp. 2010, Knowles 2011). Badania, w których analizowano charakter zależności między różnymi patogenami, w tym pasożytami krwi, u dziko żyjących ptaków dotyczyły prawie wyłącznie ptaków dorosłych. Tymczasem ze względu na różnice w fizjologii, w tym funkcjonowaniu

układu odpornościowego, między ptakami dorosłymi i na wczesnych etapach życia można oczekiwać, że u bardzo młodych organizmów oddziaływania między pasożytami krwi mogą kształtować się odmiennie niż u ptaków dorosłych. Zagadnienie to jest w chwili obecnej jednak bardzo słabo poznane. Svobodová i wsp. (2015) wykazali, że u krogulca zwyczajnego zależność między *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* miała charakter pozytywny u piskląt i neutralny u ptaków dorosłych, podczas gdy u myszołowa różnice w charakterze zależności między grupami wiekowymi (pozytywna u piskląt i neutralna u ptaków dorosłych) stwierdzono dla *Haemoproteus* i *Leucocytozoon*. Różnice między ptakami młodymi i dorosłymi stwierdzono także w przypadku zależności między pasożytami krwi a innymi patogenami. Medeiros i wsp. (2014) wykazali, że dorosłe ptaki posiadające przeciwciała przeciw wirusowi Zachodniego Nilu, były rzadziej zarażone przez *Plasmodium* niż te, które przeciwciał nie posiadały, podczas gdy taka zależność nie istniała u ptaków młodocianych. O różnicach w charakterze zależności między pasożytami u młodych i dorosłych żywicieli może przede wszystkim decydować mechanizm, który leży u podstaw powstawania nielosowego współwystępowania pasożytów. Przykładowo, jeśli negatywna zależność wynika z odporności krzyżowej, biorąc pod uwagę nie w pełni rozwinięty układ odpornościowy u bardzo młodych ptaków, można oczekiwać częstszego współwystępowania pasożytów, a więc słabiej wyrażonej negatywnej zależności u młodych niż dorosłych ptaków.

2. CELE BADAŃ

Obecnie wiele dostępnych prac poświęconych pasożytom krwi dotyczy pojedynczych układów pasożyt–żywicieli, a jeżeli nawet brane są pod uwagę współwystępujące pasożyty to dane pochodzą z jednego punktu czasowego, co ogranicza możliwość zrozumienia zależności występujących między pasożytami. Informacje dostępne na temat wpływu współpasożytnictwa na rozród są znikome, a większość opublikowanych prac przedstawia dane z inwazji pojedynczych pasożytów. W przypadku prac dotyczących pasożytów krwi u osobników młodocianych, w wielu nie ma informacji na temat charakteru zależności między współwystępującymi pasożytami ani porównania tych danych z informacjami dostępnymi dla osobników dorosłych. W związku z powyższym badania zaprezentowane w niniejszej rozprawie miały następujące cele:

- I. Określenie charakteru oddziaływań między pasożytami krwi w populacji modraszki z uwzględnieniem ewentualnych różnic mogących wynikać z odmiennej kondycji samic. Jako czynnik różnicujący kondycję samic wykorzystano kontrolowaną eksperymentalnie obecność pcheł w gnieździe.
- II. Określenie wpływu współwystępujących pasożytów krwi na elementy biologii lęgowej modraszki w kontekście różnego poziomu infestacji materiału gniazdowego przez pchły.
- III. Określenie różnic pomiędzy zespołami pasożytów krwi występującymi u dorosłych i młodocianych bogatek oraz określenie czynników odpowiedzialnych za rozwój poszczególnych inwazji pasożytniczych i występowanie współpasożytnictwa.

Badania zostały przeprowadzone na dwóch blisko spokrewnionych gatunkach ptaków w dwóch różnych populacjach. Niniejsza praca została podzielona na trzy rozdziały odpowiadające postawionym w pracy trzem celom. W związku z tym, że rozdziały I, II i III mają strukturę prac naukowych, część informacji w nich zawartych powtarza się. Szczegółowy opis terenu badań, sposobu prowadzenia badań oraz metod statystycznych, zawarto w kolejnych podrozdziałach *Wstępu*. Na końcu pracy znajdują się apendyksy, w których prezentowane są dodatkowe dane dotyczące poszczególnych rozdziałów.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Gatunki żywicieli

Badania przeprowadzono na dwóch układach pasożyty krwi–żywicieli. W obu przypadkach badane pasożyty należały do rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma*, natomiast żywicielami były dwa gatunki ptaków wróblowych z rodziny Paridae: bogatka i modraszka. Oba gatunki ptaków są gatunkami modelowymi w badaniach z zakresu biologii ewolucyjnej i prac poświęconych dziuplakom (Lambrechts i wsp. 2010). Badane rodzaje pasożytów krwi zostały dokładnie scharakteryzowane wcześniej (podrozdziały 1.3.1 i 1.3.2), więc informacje te nie są już tutaj powtarzane.

Bogatka i modraszka należą do dziuplaków wtórnych, tzn. gatunków, które gnieźdzą się w dziuplach, ale same ich nie wykuwają. Bardzo chętnie zasiedlają skrzynki lęgowe (Cramp i Perrins 1993). Oba gatunki występują powszechnie w zachodniej Palearktyce. Preferują środowiska leśne, ale często spotykane są także w środowisku miejskim (Cramp i Perrins 1993). Bogatka jest gatunkiem osiadłym w większości

południowej i centralnej części zasięgu występowania, z pojawiającymi się nieregularnie migracjami z północnej części zasięgu (Cramp i Perrins 1993). Podobne gwałtowne, nieregularne migracje z północnych części zasięgu są obserwowane również u modraszki, natomiast w południowej części zdarzają się przemieszczenia z wyżej położonych miejsc lęgowych (Cramp i Perrins 1993).

U obu gatunków brak jest wyraźnego dymorfizmu w wielkości ciała, występuje natomiast dymorfizm w charakterystyce upierzenia. U bogatki główną cechą odróżniającą samce od samic jest szerokość i intensywność wybarwienia pasa czarnych piór odchodzącego od gardła aż do podbrzusza (u samic jest on znacznie węższy), natomiast u modraszki – wielkość i intensywność ubarwienia czapeczki (u samic jest mniejsza i mniej intensywnie wybarwiona).

U obu gatunków tylko samice uczestniczą w budowie gniazda. Na większości zasięgu palearktycznego składanie jaj rozpoczyna się w kwietniu, w tempie jednego jaja dziennie (Cramp i Perrins 1993). Średnia liczba jaj w lęgu wynosi 10 u bogatki i 12 u modraszki (Cramp i Perrins 1993). W populacjach, w których prowadzono badania prezentowane w niniejszej rozprawie wartości te wynoszą odpowiednio 10 (Harnist 2017) i 11 jaj (dane własne). Inkubacja trwa u obu gatunków ok. 12–15 dni i uczestniczy w niej tylko samica (Cramp i Perrins 1993). W karmieniu piskląt uczestniczą oboje rodzice. Głównym źródłem pokarmu dla piskląt są larwy motyli (Cramp i Perrins 1993). Piskląta opuszczają gniazdo po kilkunastu dniach, zwykle 18–20 u bogatki i 17–18 u modraszki (Cramp i Perrins 1993). Po opuszczeniu gniazda młode ptaki dokarmiane są przez rodziców jeszcze przez 6–8 dni – modraszki lub do 25 dni po opuszczeniu gniazda – bogatki (Cramp i Perrins 1993, Gosler i Clement 2007). Część bogatek przystępuje do drugich lęgów, w których z reguły jest mniej piskląt, natomiast modraszki składają drugie lęgi sporadycznie (Cramp i Perrins 1993).

3.2. Teren badań

Badania zostały przeprowadzone w dwóch lokalizacjach: w południowej części szwedzkiej wyspy Gotlandia (57°10'N, 18°20'E) oraz w Lesie Sękocińskim, ok. 10 km na południowy zachód od Warszawy (52°05'N; 20°52'E). W pierwszej lokalizacji przeprowadzono badania dotyczące zależności między współwystępującymi pasożytami krwi oraz ich wpływu na

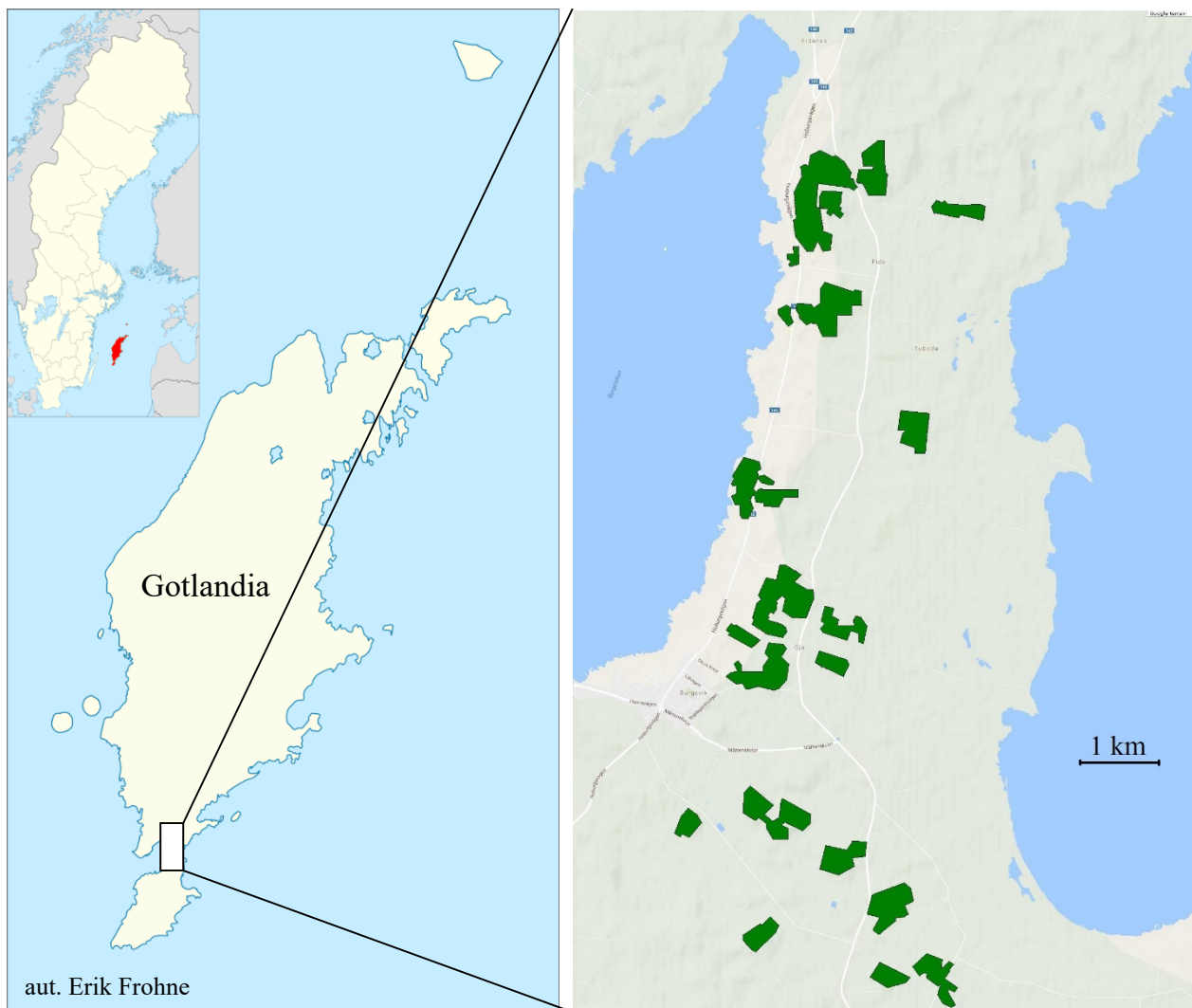
rozmród modraszki (Rozdział I i II), a w drugiej badania dotyczące czynników wpływających na zarażenie oraz współwystępowanie pasożytów krwi u młodocianych bogatek (rozdział III).

Na Gotlandii badania przeprowadzono na 23 powierzchniach badawczych o wielkości od ok. 1 do 20 ha (łącznie ok. 215 ha, Rycina 2). W sumie, na monitorowanych powierzchniach znajduje się ok. 1800 skrzynek. Są one zawieszone na wysokości 1,5 m. Skrzynki są drewniane, z otwieranym dachem i mają następujące wymiary: dno (wewnątrz) 11 × 11 cm, odległość od dna do otworu wlotowego – 21 cm, średnica otworu wlotowego – 3,2 cm. Większość powierzchni została utworzona na początku lat 80. XX wieku. Większość wydzielonych powierzchni badawczych stanowią zadrzewienie zdominowane przez dąb szypułkowy *Quercus robur* oraz jesion wyniosły *Fraxinus excelsior*, natomiast podszyt składa się głównie z leszczyny pospolitej *Corylus avellana* i głogu *Crataegus sp.* Na kilku powierzchniach dużą część zadrzewienie stanowi sosna zwyczajna *Pinus sylvestris* oraz brzoza omszona *Betula pubescens*.

W skrzynkach lęgowych gnieźdzą się głównie bogatki, modraszki i muchołówki białoszyje *Ficedula albicollis*. Sporadycznie skrzynki lęgowe zajmowane są również przez sosnowki *Periparus ater*, kowaliki *Sitta europaea* i muchołówki żałobne.

Las Sękociński (52°05'N; 20°52'E) wchodzi w skład Warszawskiego Obszaru Chronionego Krajobrazu (Pawlak i Teisseyre–Sierpińska 2006), łącząc się od wschodu z Lasami Chojnowskim i od zachodu z Lasami Młochowskimi. Na terenie badań zostało wydzielonych pięć powierzchni, na których w latach 2010–2013 zostały zawieszone skrzynki lęgowe (Rycina 3). Na czterech z pięciu wydzielonych powierzchni dominującym gatunkiem jest sosna zwyczajna, z domieszką dębu szypułkowego i bezszypułkowego *Quercus petraea*, brzozy brodawkowatej *Betula verrucosa* oraz grabu pospolitego *Carpinus betulus*. Na jednej z powierzchni znaczną część drzewostanu stanowią dęby oraz graby.

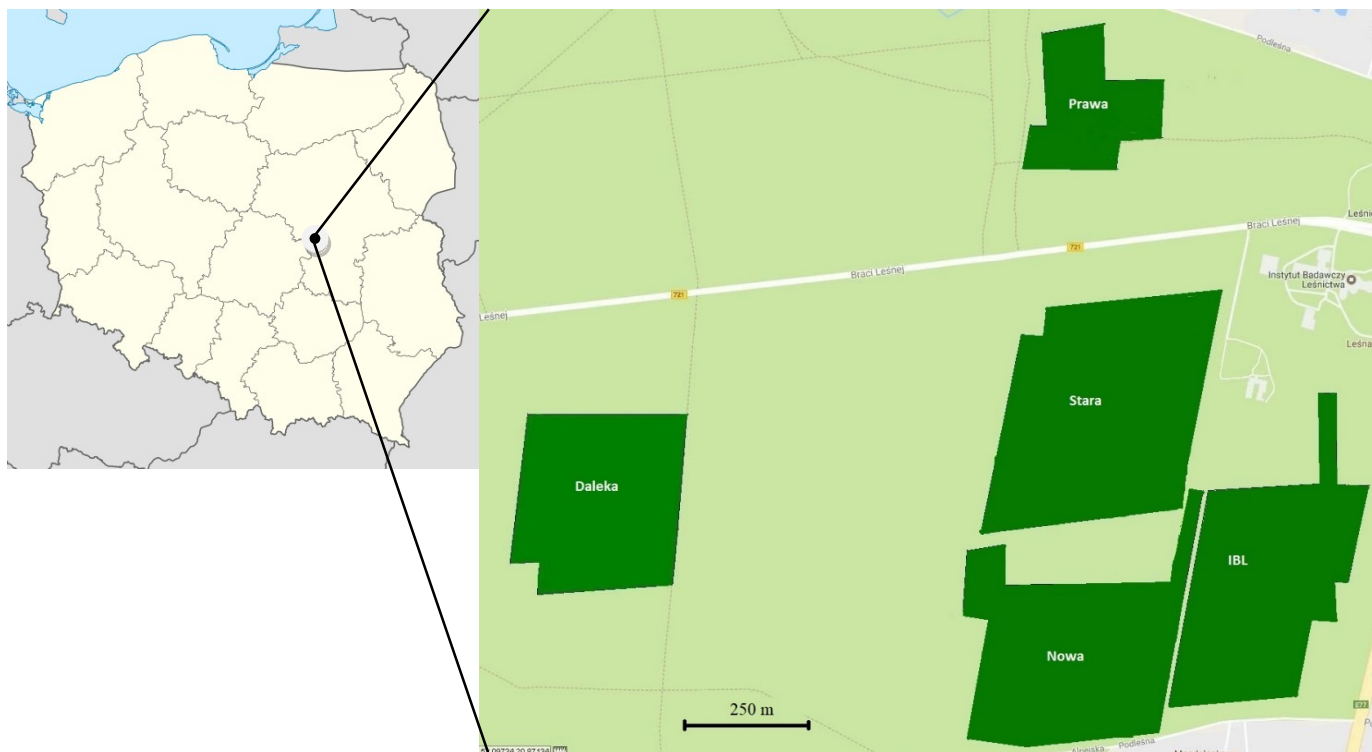
Skrzynki rozwieszone są na wysokości około 2,5 m w węzłach sieci co 50 m. Łącznie, w sezonach lęgowych 2015–2016, na terenie badań dostępnych dla ptaków było ok. 250 skrzynek. Skrzynki są drewniane, z otwieraną przednią ścianką i mają następujące



Rycina 2. Lokalizacja powierzchni badań w południowej części Gotlandii.

wymiary: dno (wewnątrz) 11×11 cm, odległość od dna do otworu wlotowego – 21 cm, średnica otworu wlotowego – 3,2 cm. Wszystkie skrzynki posiadały zamontowaną na wysokości otworu wlotowego dodatkową deseczkę, która wydłużała tunel otworu wlotowego do 3 cm. Ponadto wejście do otworu wlotowego zabezpieczone było metalową płytką. Te dodatkowe wzmocnienia miały na celu zmniejszenie ryzyka drapieżnictwa.

W skrzynkach lęgowych gnieźdzą się głównie bogatki, modraszki i mucholówki żałobne.



Rycina 3. Położenie powierzchni badań w Lesie Sękocińskim.

3.3. Badania terenowe

3.3.1. Układ pasożyty krwi–modraszka

Badania przeprowadzono w latach 2013–2015. Prace rozpoczynały się od zebrania starego materiału gniazdowego zawierającego pchły (do wykorzystania w eksperymencie mającym na celu zróżnicowanie kondycji samic poprzez manipulacje poziomu infestacji gniazd przez pchły) oraz czyszczenia skrzynek lęgowych, które przeprowadzane były w marcu. W większości skrzynek materiał gniazdowy usuwany był w poprzednim sezonie lęgowym po wylocie piskląt z gniazda, jednak w przypadku drugich lęgów pozostawał on do wiosny kolejnego roku, kiedy to był zbierany. Zebrany stary materiał gniazdowy był umieszczany w plastikowych torebkach strunowych, które były nakłuwane w celu zapewnienia dostępu powietrza, a następnie umieszczane w niskiej temperaturze. Skrzynki były czyszczone przy pomocy druczanych szczotek, w miarę możliwości w szczelinach między ścianami, aby usunąć pchły przebywające wewnątrz skrzynki. Pchły kurze *Ceratophyllus gallinae*

przeczekują okres zimowy zamknięte w kokonach w starym materiale gniazdowym. Na wiosnę wydostają się z kokonów i wędrują do otworu wejściowego skrzynki lęgowej, w którego okolicy lub na dachu skrzynki oczekują na ptaki wlatujące do środka (Krasnov 2008). Czyszczenie skrzynek było prowadzone, aby uniknąć infestacji ptaków przez pchły na początku okresu gniazdowego.

Kontrole skrzynek rozpoczynały się w połowie kwietnia (w badanej populacji samice modraszek zaczynają składać jaja w drugiej połowie kwietnia) i były prowadzone regularnie w celu określenia momentu zakończenia budowy gniazda, daty złożenia pierwszego jaja, wielkości lęgu, dnia klucia (dzień 0 życia piskląt) oraz liczby piskląt. W drugim dniu inkubacji wszystkie jaja w lęgu były fotografowane w celu określenia ich wielkości. Po wyjęciu z gniazda jaja były umieszczane na stojaku składającym się z podstawy oraz ramy, do której przymocowany był, w odległości ok. 25 cm, aparat fotograficzny. Jaja umieszczane były na podstawie na czarnych podkładkach na tle papieru milimetrowego (Rycina 4). Zdjęcia zawsze wykonywano w zacienionym miejscu, żeby w miarę możliwości ujednolicić oświetlenie jaj. Zdjęcia zostały poddane obróbce w programie ImageJ (wersja 1.47v) w celu określenia wielkości jaj wyrażonej jako powierzchnia w mm² (Abramoff i wsp. 2004). Oczekiwany dzień klucia wyznaczano na podstawie długości okresu wysiadywania, który u tego gatunku wynosi ok 13–14 dni (Cramp i Perrins 1993). Kontrole klucia zaczynało dzień przed wyliczonym dniem klucia i prowadzono codziennie, aż do potwierdzenia wyklucia się piskląt.

W celu zróżnicowania dobrostanu samic przeprowadzono zabieg zmiany liczby pcheł w materiale gniazdowym. Pchły są pospolicie występującymi pasożytami ptaków (Krasnov 2008). Prawdopodobnie najpowszechniejszym gatunkiem żerującym na ptakach w zachodniej Palearktyce jest pchła kurza (Tripet i Richner 1997). Bardzo często jest on spotykany u ptaków gnieźdzących się w dziuplach, zwłaszcza z rodziny Paridae (Harper i wsp. 1992). W gniazdach ptaków ma miejsce składanie jaj oraz dojrzewanie stadiów larwalnych i poczwerek. Dorosłe pchły są pasożytami hematofagicznymi.



Rycina 4. Zdjęcie pełnego zniesienia modraszki wykonane do analiz wielkości jaj.

Poza negatywnym wpływem na żywiciela wynikającym ze sposobu ich odżywiania się (mogą powodować anemię, Marshall 1981), żywiciel może ponosić dodatkowe koszty związane ze wzbudzeniem odpowiedzi immunologicznej na antygeny obecne w ich ślinie. Wykazano negatywny wpływ pcheł na wiele parametrów związanych z sukcesem rozrodczym ptaków, w tym zwiększenie szansy porzucenia lęgu, zmniejszenie wielkości lęgu i wykluwalności, obniżenie jakości potomstwa i jego przeżywalności (Richner i wsp. 1993, Oppliger i wsp. 1994, Merila i Allander 1995). Pchły wpływają także na zachowanie ptaków – zwiększając częstość dostarczania pokarmu pisklętom oraz zmniejszając czas snu ptaków, co może prowadzić do obniżonej immunokompetencji (Christe i wsp. 1996a, 1996b).

Monitorowane lęgi modraszki zostały przypisane do jednej z dwóch grup: a) lęgów, w których materiał gniazdowy został pozbawiony pcheł (grupa kontrolna) oraz b) lęgów, w których materiał gniazdowy został celowo infestowany przez pchły (grupa eksperymentalna, w której zakładano, że kondycja samic będzie pogorszona). W początkowym etapie składania jaj (zwykle, gdy w gnieździe były 1–3 jaja) wszystkie gniazda były zbierane w celu usunięcia pcheł i innych bezkręgowców występujących w materiale gniazdowym przy pomocy wysokiej temperatury. Odbywało się to poprzez poddawanie gniazda działaniu mikrofal (700W przez 3 minuty). W celu skompensowania

strat wody spowodowanych przez jej parowanie podczas tego zabiegu, każde gniazdo uprzednio spryskano 4 ml wody. Ze względów logistycznych gniazda były umieszczane w innych skrzynkach niż te, w których zostały wybudowane. W każdym sezonie lęgowym w kilku pierwszych lęgach umieszczano „sztuczne” gniazda, do których budowy wykorzystano torfowce *Sphagnum*. W grupie lęgów eksperymentalnych, drugiego dnia inkubacji dodawano do materiału gniazdowego 40 dorosłych pcheł, a drugiego dnia po wykluciu piskląt – dalsze 60 pcheł. Pchły były losowo wybierane ze starego materiału gniazdowego. Ograniczenie liczby pcheł do 40 na etapie inkubacji wynikało z faktu, że umieszczenie zbyt dużej liczby pcheł mogłoby spowodować porzucenie lęgu przez samicę (Oppliger i wsp. 1994). Aby utrzymać jak najniższy poziom infestacji gniazd przez pchły w grupie kontrolnej, gniazda były ponownie poddawane działaniu wysokiej temperatury w drugim dniu inkubacji i drugim dniu życia piskląt. Lęgi były przypisywane do grup wraz z rozwojem sezonu naprzemiennie w celu kontrolowania zmienności środowiskowej i fenotypowej ptaków. Aby potwierdzić skuteczność zabiegu eksperymentalnego, w 14 dniu po wykluciu piskląt, gniazda były zbierane w celu określenia liczby pcheł. Gniazda były umieszczane w temp. ok. -20°C przez co najmniej 24 h, a następnie materiał był dokładnie przeszukiwany pod kątem obecności dorosłych pcheł.

Drugiego dnia po wykluciu pisklęta były ważone oraz pobierano od nich krew do analizy płci. Krew (ok. 20–30 μl) była pobierana z żyły na skoku poprzez nakłucie sterylną igłą (wymiary $0,45 \times 23 \text{ mm}$), a następnie zebranie wypływającej krwi do kapilary, którą następnie umieszczano w probówce z 99,8% alkoholem etylowym. W 14. dniu życia pisklęta były ponownie ważone oraz mierzono im długość skoku (Svensson 1992).

W celu określenia statusu i intensywności zarażenia przez pasożyty krwi dorosłych ptaków w przypadku samic krew pobierano dwukrotnie – w 10 dniu inkubacji i 14 dniu po wykluciu piskląt. W związku z trudnościami w schwytaniu samców na etapie inkubacji, krew pobrano od nich tylko jeden raz – w 14 dniu po wykluciu piskląt (dane nie prezentowane). Podczas inkubacji ptaki chwymano na gnieździe zbliżając się do skrzynki w sposób minimalizujący hałas, który mógłby spowodować ucieczkę samicy, a następnie zatykając otwór wlotowy. Modraszki mogą być bezpiecznie chwymane na późnym etapie inkubacji, w związku z niewielką liczbą porzuceń lęgów u tego gatunku (Merila i Andersson 1999). Pod koniec okresu gniazdowego ptaki chwymano za pomocą sieci

ornitologicznych rozstawionych przed skrzynką lub pułapek z zapadką umieszczanych wewnątrz skrzynki. Po schwytaniu oprócz pobrania krwi ptaki były ważone oraz mierzono im długość skoku, a także określono ich wiek, na podstawie cech ubarwienia upierzenia, jako jednoroczne lub co najmniej drugoroczne (Svensson 1992). Zarówno u ptaków dorosłych, jak i piskląt, masę określano z dokładnością do 0,1 g, a długość skoku – z dokładnością do 0,1 mm (Svensson 1992). Dwukrotny pobór krwi u samic umożliwił prześledzenie ewentualnych zmian w statusie i intensywności zarażenia ptaka w ciągu okresu gniazdowego, ponieważ na etapie inkubacji wektory pasożytów krwi nie są jeszcze obecne w środowisku. W związku z tym osobniki, u których stwierdzono zarażenie na etapie inkubacji, zostały zarażone w poprzednim roku. Natomiast stwierdzenie zarażenia jedynie pod koniec okresu gniazdowego oznacza nowo nabytą infekcję. Krew (ok. 50 µl) pobierana była z żyły skrzydłowej po nakłuciu igłą do szklanej bezheparynowej kapilary. Przed włożeniem kapilary z krwią do 99,8% alkoholu etylowego, kroplę krwi umieszczano na szkiełku podstawowym i wykonywano rozmaz (2 rozmazy na osobnika). Rozmazy krwi były w dniu ich wykonania utrwalane metanolem oraz barwione przy pomocy zestawu Hemacolor (Merck Millipore) zgodnie z instrukcją producenta.

3.3.2. Układ pasożyty krwi–bogotka

Badania przeprowadzono w latach 2015–2016. Od połowy kwietnia wszystkie skrzynki były regularnie kontrolowane w celu wyznaczenia daty rozpoczęcia lęgu (data złożenia pierwszego jaja), liczby jaj w zniesieniu, daty klucia (dzień 0) oraz liczby podlotów. Dane te zostały zebrane zarówno dla pierwszych, jak i drugich lęgów. Niektóre lęgi były najprawdopodobniej lęgami powtarzanymi, czyli złożonymi po porzuceniu pierwszego lęgu (na terenie badań nie zaobserwowano przypadków strat lęgów spowodowanych przez drapieżniki). Ponieważ we wszystkich przypadkach do porzucenia lęgu doszło przed schwytaniem ptaków dorosłych, nie było możliwe jednoznaczne przyporządkowanie lęgów do kategorii lęgów porzuconych. W 2015 r. za datę klucia przyjęto dzień, w którym w momencie kontroli gniazda pisklęta wykluły się z ponad 50% jaj, natomiast w 2016 r. – dzień, w którym w momencie kontroli w gnieździe znajdowało się co najmniej jedno pisklę. W 14 dniu po wykluciu pisklęta ważono (dokładność 0,1 g), mierzono długość skoku (dokładność 0,1 mm) i długość skrzydła (dokładność 0,1 cm). W tym samym dniu,

lub w przypadku chwytania zakończonego niepowodzeniem także w kolejnych dniach, chwymano ptaki dorosłe. Do chwytania używano dwóch metod: siatki ornitologicznej ustawionej w bliskiej odległości od skrzynki lub pułapki zapadkowej umieszczanej wewnątrz skrzynki. U schwytanych ptaków oznaczano płeć, wiek (na podstawie różnicy w wybarwieniu pierwszo- i drugorzędowych lotek, Svensson 1992), dokonywano pomiarów biometrycznych (rodzaj i sposób wykonania pomiarów, jak u 14-dniowych piskląt modraszki) oraz pobierano próbkę krwi. Krew (ok. 20–30 μ l) była pobierana do kapilary po nakłuciu igłą żyły skrzydłowej. Niewielka ilość krwi została wykorzystana do przygotowania rozmazów (po dwa na osobnika), a pozostała ilość została umieszczona w 99,8% alkoholu etylowym do późniejszych analiz molekularnych zarażenia przez pasożyty krwi. W dniu ich wykonania rozmazy krwi były utrwalane za pomocą metanolu, a następnie barwione, zgodnie z instrukcją producenta, z wykorzystaniem zestawu barwników Hemacolor (Merck Millipore).

W każdym z sezonów został przeprowadzony zabieg eksperymentalny: w 2015 r. zabieg zmiany poziomu inwestycji ptaków dorosłych (samic) w budowę gniazda, a w 2016 r. zabieg dokarmiania części piskląt w lęgu mający na celu zmianę ich stanu odżywienia. Ze względu na fakt, że obydwie zabiegi nie miały wpływu na prawdopodobieństwo wystąpienia inwazji lub wielkość próby uniemożliwiała wiarygodną ocenę jego wpływu (dane nie prezentowane), zabieg eksperymentalny nie został wzięty pod uwagę przy tworzeniu modeli statystycznych. Z tego też względu pominięto szczegółowy opis, w jaki sposób każdy z tych zabiegów został przeprowadzony.

Osobniki młodociane były chwymane przez okres 4–5 tygodni rozpoczynając odłowy ok. 3 tygodnie od wylotu piskląt z najwcześniejszych lęgów. U bogatki podloty przebywają z rodzicami jeszcze przez okres do 25 dni po opuszczeniu gniazda (Gosler i Clement 2007). W tym czasie przemieszczają się wraz z dorosłymi na obszarze średnio 8 ha wokół skrzynki lęgowej (Naef-Daenzer i Grüebler 2008). W celu ułatwienia chwytania ptaków młodocianych wyznaczono kilka stanowisk, na których w połowie czerwca zostały zawieszone karmniki (automatyczny, napełniany od góry, z szybką na przedniej ścianie, wys. 40 cm szer. 20 cm, model KA1 producent Ptasie Ogrody). Stanowiska zostały dobrane tak, aby były zlokalizowane w pobliżu skrzynek, z których wyleciały już podloty bogatki. Jednocześnie unikano wieszania karmników w pobliżu skrzynek, w których wciąż

przebywały pisklęta. W 2015 roku zawieszono łącznie 5 karmników, a w 2016 – 8 karmników. Karmniki rozwieszono tak, aby przypadły w miarę równomiernie na powierzchnie badań. Karmniki zostały przymocowane do pni na wysokości 2,5–3 m. Do napełnienia karmników użyto nasion słonecznika, które z powodzeniem wykorzystywane były w dotychczasowych badaniach uwzględniających odłow młodych bogatek (Dhondt 1979, Dingemanse i wsp. 2002, Krams i wsp. 2013). Jednorazowo wsypywano do karmników ok. 0,5 kg łuskanych nasion. W przypadku ubywania, nasiona były regularnie dosypywane. Miejsca chwytania wyznaczono w pobliżu karmników, a dodatkowo chwytanie prowadzono w kilku stałych miejscach, w okolicy których przebywały młode bogatki. W ciągu jednego dnia prowadzono chwytanie w kilku z wyznaczonych miejsc. Na jednym stanowisku przebywano około godziny lub dłużej, jeżeli w pobliżu przebywały podloty. Na wyznaczonym miejscu rozstawiano sieć ornitologiczną o wymiarach $2,5 \times 7$ m (Ecotone), najczęściej około 50 cm przed karmnikiem lub przy zakrzaczeniach na ewentualnej trasie przelotu, którą poznano po kilkukrotnym rozstawieniu sieci. W celu dodatkowego zwabienia ptaków pod siecią umieszczano głośnik, z którego odtwarzano głosy piskląt, podlotów i dorosłych bogatek. W przypadku schwytania ptaki były wyciągane z sieci i umieszczane w workach ornitologicznych, by następnie przeprowadzić pomiary biometryczne i pobrać krew, która została następnie wykorzystana jako źródło materiału do molekularnej analizy zarażenia przez pasożyty krwi i oznaczenia płci. W tym czasie nagranie głosów było zatrzymywane. Pobranie pomiarów biometrycznych oraz pobranie krwi przebiegało tak, jak zostało to opisane dla piskląt modraszki.

3.4. Badania laboratoryjne

3.4.1. Molekularna analiza zarażenia przez pasożyty krwi

Do oznaczenia statusu zarażenia oraz identyfikacji linii genetycznych pasożytów krwi wykorzystano metodę molekularną. Jest ona bardziej czuła od tradycyjnej mikroskopii świetlnej, ponieważ jest w stanie wykryć jeden zarażony erytrocyt (w przypadku *Plasmodium/Haemoproteus*) na 100 000 (Fallon i wsp. 2003).

Próbki krwi umieszczone w etanolu do czasu analiz były przechowywane w temperaturze pokojowej. Izolacja DNA z krwi została przeprowadzona przy użyciu octanu

amoni (Burke i wsp. 1998). Status zarażenia został określony na podstawie amplifikacji materiału DNA z genomu pasożytów wykorzystując do tego celu zagnieżdżoną łańcuchową reakcję polimerazy – PCR. Do wykrycia zarażenia poszczególnymi rodzajami pasożytów wykorzystano następujące rodzaje markerów (szczegółowy opis warunków poszczególnych reakcji PCR znajduje się w Apendyksie 1):

- *Plasmodium* i *Haemoproteus*: fragment (o długości 479 pz) mitochondrialnego cytochromu b; startery, skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne PCR wg protokołu Waldenströma i wsp. (2004),
- *Leucocytozoon*: fragment (o długości 480 pz) mitochondrialnego cytochromu b; startery, skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne PCR wg protokołu Hellgrena i wsp. (2004),
- *Trypanosoma*: fragment genu (o długości 326 pz) kodującego mniejszą podjednostkę rybosomalną RNA (SSU RNA) pasożyta; startery i skład mieszaniny reakcyjnej wg protokołu Sehgal i wsp. (2001), a warunki termiczne PCR wg protokołu Zamory–Vilchis i wsp. (2012).

Produkty PCR zostały przeniesione na żel agarozowy (2%) i poddane elektroforezie w buforze 1×TBE w następujących warunkach: 5,5 V/cm przez 30 min. Jeśli produkt PCR nie został dla danej próbki namnożony, analiza była powtarzana. Jeśli ponownie uzyskano wynik ujemny, uznawano, że ptak nie był zarażony, a jeśli dodatni, analiza była powtarzana po raz trzeci. W takim wypadku za końcowy wynik uznawano ten, który został stwierdzony dwukrotnie. Jakość izolatu DNA w przypadku próbek, dla których jako końcowy uzyskano wynik ujemny, sprawdzano na podstawie wyniku reakcji PCR wykorzystującej startery do oznaczania płci (Griffiths i wsp. 1998, szczegółowy opis warunków reakcji znajduje się w podpunkcie pt. „Molekularna analiza płci”). Jeśli produkt PCR został w tej reakcji uzyskany, uznawano, że izolacja DNA przebiegła prawidłowo.

W przypadku stwierdzenia namnożonego materiału DNA, został on zsekwencjonowany w celu: 1) identyfikacji rodzaju pasożyta (*Plasmodium* vs *Haemoproteus*) w przypadku zestawu starterów opracowanych przez Waldenströma i wsp. (2004) oraz 2) potwierdzenia, że namnożony materiał DNA reprezentuje rodzaj *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* w przypadku zestawu starterów opracowanych przez Hellgrena i wsp. (2004) oraz Sehgal i wsp. (2001). Przed sekwencjonowaniem produkty

PCR były oczyszczane przy pomocy zestawu dwóch enzymów: egzonukleazy i fosfatazy zgodnie z instrukcją producenta (ExoBAP, Eurx, Gdańsk, Polska). Dwustronne sekwencjonowanie było przeprowadzane metodą Sangera z wykorzystaniem aparatów ABI 3730/3730xl w systemie płytkowym na płytce 96-dołkowej (analizy zlecone do wykonania w Serwisie Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN).

Chromatogramy otrzymane po sekwencjonowaniu były analizowane w programie BioEdit (wersja 7.2.5) (Hall 1999). W celu identyfikacji linii genetycznej pasożytów z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon* odczytana sekwencja nukleotydów była porównywana z sekwencjami zdeponowanymi w internetowej bazie MalAvi (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/about.html>, Bensch i wsp. 2009). Jeśli uzyskana sekwencja nie wykazała 100% zgodności z żadną linią w bazie MalAvi była ona przyporządkowywana do rodzaju pasożyta na podstawie tego, z jaką linią genetyczną wykazywała najwyższe podobieństwo. Współwystępowanie jednocześnie co najmniej dwóch linii genetycznych pasożytów było rozpoznawane na podstawie obecności podwójnych odczytów zasad w chromatogramie. W przypadku *Trypanosoma* sekwencje standardowo identyfikowane były do gatunku lub rodzaju, na podstawie sekwencji zdeponowanych w bazie GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). We wszystkich próbkach, dla których startery opracowane przez Sehgal i wsp. (2001) namnożyły produkt, został on zidentyfikowany jako materiał genetyczny *Trypanosoma*.

3.4.2. Molekularna analiza płci

Analiza płci z wykorzystaniem metod molekularnych jest w przypadku młodocianych bogatek konieczna, ponieważ u tego gatunku nie można tej cechy w takim wieku oznaczyć na podstawie cech morfologicznych oraz ubarwienia upierzenia (Cramp i Perrins 1993). Metoda ta polega na amplifikacji za pomocą reakcji PCR dwóch zlokalizowanych na chromosomach płci homologicznych fragmentów genu CHD (ang. chromodomain helicase) różniących się długością. U ptaków płcią heterogametyczną są samice (WZ), a homogametyczną – samce (ZZ). W związku z tym oznaczenie płci następuje na podstawie liczby stwierdzanych produktów PCR: dwóch w przypadku samic i jednego w przypadku samców.

Izolacja DNA z krwi osobników młodocianych była wykonywana przy użyciu octanu amonu (Burke i wsp. 1998). Fragmenty genu CHD zostały namnożone przy użyciu starterów P2 i P8 (Griffiths i wsp. 1998). Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne PCR były zgodne z tymi opisanymi przez Griffiths i wsp. (1998). Rozdział produktów PCR przeprowadzano na 2% żelu agarozowym stosując napięcie 7V/cm przez 40 min. Płeć młodocianych bogatek oznaczono na podstawie obecności na żelu produktów PCR: fragmentu CHD–Z o długości 380 par zasad (obecny u obu płci) i fragmentu CHD–W o długości 455 par zasad (obecny tylko u samic) (Griffiths i wsp. 1998).

3.4.3. Analiza rozmazów krwi

Intensywność zarażenia przez pasożyty krwi była określana na podstawie przeglądania rozmazów krwi przy użyciu mikroskopu świetlnego (Carl Zeiss Jena JENAVAL). Liczenie pasożytów z rodzajów *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* odbywało się przy 400–krotnym powiększeniu, natomiast *Haemoproteus* i *Plasmodium* przy 1000–krotnym powiększeniu, przy użyciu olejku immersyjnego. Intensywność zarażenia była szacowana poprzez określenie liczby zarażonych erytrocytów przypadających na 10 000 erytrocytów (Godfrey i wsp. 1987). W celu określenia liczby pól widzenia koniecznych do przejrzenia, aby uzyskać łączną sumę 10 000 erytrocytów zliczono dokładną liczbę erytrocytów w kilku polach i wyliczono średnią liczbę erytrocytów przypadających na pole widzenia. Ze względu na zbliżoną jakość rozmazów oraz podobną liczbę erytrocytów w polu widzenia (najczęściej ok. 200) w większości przypadków zliczano pasożyty w 50 polach widzenia. Analiza rozmazów krwi dodatkowo pełniła rolę krzyżowego sprawdzenia wyników analiz molekularnych zarażenia pasożytami.

3.5. Analiza danych

3.5.1. Układ pasożyty krwi–modraszka

Pochodzące z trzech sezonów lęgowych łącznie 193 lęgi modraszki zostały przyporządkowane do jednej z grup (grupa kontrolna – samice w lepszej kondycji; grupa eksperymentalna – samice w gorszej kondycji). Ze względu na brak danych wynikający z następujących powodów: porzucenie lęgu, atak drapieżnika, niezaplodnione jaja, brak próbki krwi z jednego lub obu schwytań lub trudności z oznaczeniem pasożytów, z

końcowych analiz wykluczono 45 lęgów. Dodatkowo, w celu uniknięcia problemu pseudoreplikacji (dane nie są całkowicie niezależne od siebie), w przypadku samic, które zostały wykorzystane w eksperymencie w dwóch sezonach lęgowych ($n = 10$), do analiz użyto zestawu danych tylko z jednego sezonu: jeśli w pierwszym z dwóch sezonów samica została przyporządkowana do grupy eksperymentalnej, do analiz włączano zestaw danych z pierwszego sezonu, jeśli do grupy kontrolnej – zestaw danych wybierany był losowo (z wykorzystaniem generatora liczb losowych w programie MS Excel, funkcja randbetween). W sumie, analizy statystyczne przeprowadzono na zestawie danych dla 139 lęgów: 71 z grupy kontrolnej i 68 z grupy eksperymentalnej.

Do zbadania charakteru oddziaływania między różnymi rodzajami pasożytów zastosowano uogólnione modele liniowe (ang. generalized linear models, GLMs) z dwumianowym typem rozkładu oraz funkcją łączenia typu logit. Jako zmienną zależną wprowadzano kolejno status zarażenia (kodowany jako 0 dla osobników, u których nie stwierdzono inwazji oraz 1, gdy taką inwazję stwierdzono) przez każdy z rodzajów pasożytów pod koniec okresu pisklęcego. Jako predyktory wprowadzono rok, wiek samicy, zabieg eksperymentalny oraz status zarażenia pozostałych rodzajów pasożytów na etapie inkubacji. Początkowy model oprócz efektów głównych zawierał interakcje drugiego rzędu pomiędzy poszczególnymi predyktorami. Interakcje były krokowo usuwane z modelu, jeśli wartość $P \geq 0,05$.

Wszystkie modele zostały sprawdzone pod kątem zgodności z założeniem uogólnionych modeli liniowych, czyli, że dane wprowadzone do modelu stanowią zbiór niezależnych obserwacji. Ponadto, sprawdzono, czy wśród predyktorów nie występuje zjawisko współliniowości (ang. multicollinearity). Ocena współliniowości została przeprowadzona na podstawie wartości współczynnika współliniowości VIF (ang. variance inflation factor), przyjmując, że wartości $VIF < 5$ wskazują na brak współliniowości. Analizy zostały wykonane w programie IBM SPSS ver. 19 (IBM Corp. 2010).

3.5.2. Układ pasożyty krwi–bogotka

W sumie w dwóch sezonach lęgowych schwytano 112 młodocianych bogatek, w tym siedem osobników dwukrotnie. Materiał biologiczny (krew) do analizy zarażenia przez pasożyty krwi i oznaczenia płci dostępny był dla 111 osobników. Wśród 111 ptaków 45,0%

stanowiły zaobrączkowane na terenie badań jako pisklęta (42 osobniki z pierwszych lęgów oraz 8 osobników z drugich lęgów), a więc takie, dla których dostępne były dane o dacie klucia oraz długości życia w momencie schwytania.

W grupie ptaków zaobrączkowanych jako pisklęta 61,2% pochodziło z lęgów, w których schwytano co najmniej dwa ptaki (od dwóch do czterech). Biorąc pod uwagę fakt, że między lęgami różnych samic mogą istnieć różnice w presji ze strony wektorów, a tym samym różnice w prawdopodobieństwie transmisji pasożytów, aby uniknąć błędu pseudoreplikacji (dane nie są całkowicie niezależne od siebie), do analiz statystycznych włączono dane, wybrane losowo, tylko z jednego osobnika na lęg. Podobnie, w przypadku osobników schwytanych dwukrotnie wykorzystano dane, wybrane losowo, tylko z jednego schwytania. W przypadku ptaków dorosłych w sezonach lęgowych 2015 i 2016 zebrano 144 próbki materiału biologicznego od 110 ptaków. Od 28 osobników pobrano materiał co najmniej dwukrotnie, po jednym razie w każdym z sezonów lub/i w obrębie tego samego sezonu, na etapie pierwszego oraz drugiego lęgu. W celu uniknięcia błędu pseudoreplikacji do analiz włączono dane, wybrane losowo, tylko z jednego schwytania. Ponadto dane uzyskane ze schwytań dwóch osobników zostały wykluczone z analiz z powodu braku pełnych informacji o statusie zarażenia (m.in. z powodu złej jakości chromatogramu, który uniemożliwiał jednoznaczną identyfikację linii genetycznej).

Do zbadania wpływu rozpatrywanych czynników na prawdopodobieństwo wystąpienia inwazji oraz określenia charakteru oddziaływania między różnymi rodzajami pasożytów zastosowano uogólnione modele liniowe z dwumianowym typem rozkładu oraz funkcją łączenia typu logit. We wszystkich modelach zmienną zależną był status zarażenia kodowany jako 0 dla osobników, u których nie stwierdzono inwazji danego rodzaju pasożyta oraz 1, gdy taką inwazję stwierdzono. W przypadku wpływu czynników analizy przeprowadzono na dwóch zbiorach danych różniących się zakresem dostępnych informacji: 1) obejmujących wyłącznie ptaki zaobrączkowane jako pisklęta w monitorowanych skrzynkach lęgowych ($n = 30$) oraz 2) ptakach zaobrączkowanych jako pisklęta i tych zaobrączkowanych po raz pierwszy jako osobniki młodociane ($n = 91$, wykluczono jednego osobnika, dla którego nie były dostępne dane o dacie schwytania). Biorąc pod uwagę fakt, że dla części ptaków z drugiego zbioru danych (zaobrączkowanych po raz pierwszy jako osobniki młodociane) nie były dostępne informacje z okresu

gniazdowego, niemożliwe było określenie wpływu wieku oraz daty klucia na prawdopodobieństwo inwazji. W analizach uwzględniających wyłącznie ptaki zaobraczkowane jako pisklęta, jako zmienne niezależne wprowadzono: rok, płeć, wiek (mierzony jako liczba dni od daty klucia do daty schwytania) oraz datę klucia. W analizach uwzględniających wszystkie młodociane bogatki jako zmienne niezależne wprowadzono: rok, płeć oraz datę schwytania. Ze względu na możliwe różnice w fenologii rozrodu między latami oraz różnice w terminie przeprowadzania odłowów młodocianych bogatek, dane dotyczące dat poddano standaryzacji. Standaryzacja polegała na wyliczeniu odchylenia rzeczywistej daty od mediany dat w obrębie sezonu, oddzielnie dla dat klucia i dat chwytania. Model początkowy zawierał wszystkie efekty główne oraz interakcje drugiego rzędu z wyjątkiem interakcji pomiędzy predyktorami ciągłymi. Interakcje statystycznie nieistotne były usuwane z modelu krokowo, zaczynając od interakcji o najwyższej wartości P . Model końcowy zawierał wszystkie efekty główne oraz interakcje o $P \leq 0,05$. W przypadku modeli, dla których na etapie testowania istotności interakcji, pojawiał się problem tzw. quasi całkowitego rozdzielenia (ang. quasi-complete separation) a oszacowania współczynników i/lub ich błędów standardowych były obarczone błędem (wskazują na to bardzo wysokie wartości), przetestowany został tylko model zawierający efekty główne. Wyjątek stanowił model dotyczący prawdopodobieństwa zarażenia przez *Leucocytozoon*, w którym niewiarygodne oszacowania błędu standardowego współczynnika dotyczyły również predyktora „płeć”.

Charakter zależności między pasożytami został przetestowany na dwóch zbiorach danych: 1) dotyczących osobników młodocianych i dorosłych (osobniki młodociane: $n = 92$, osobniki dorosłe: $n = 109$) oraz 2) wyłącznie osobników młodocianych ($n = 92$). Taki sposób przeprowadzenia analiz podyktowany był bardzo niską prevalencją *Trypanosoma* u osobników dorosłych (cztery osobniki w jednym z dwóch sezonów lęgowych), co miało wpływ na wiarygodność oszacowań współczynników i ich błędów standardowych. W związku z powyższym zależności między pasożytami w odniesieniu do grupy wiekowej przeprowadzono wyłącznie dla pasożytów z grupy Haemosporidia. Jako predyktory każdy model zawierał rok, wiek (osobnik młodociany vs dorosły), status zarażenia każdego z pozostałych rodzajów pasożytów oraz interakcje wieku ze statusem zarażenia przez

poszczególne rodzaje pasożytów. Interakcje statystycznie nieistotne były usuwane z modelu krokowo, zaczynając od interakcji o najwyższej wartości P .

Wszystkie modele zostały sprawdzone pod kątem zgodności z założeniem uogólnionych modeli liniowych, czyli, że dane wprowadzone do modelu stanowią zbiór niezależnych obserwacji. W przypadku modeli zawierających zbiór danych dotyczących ptaków młodocianych zaobraczkowanych jako pisklęta i tych zaobraczkowanych po raz pierwszy jako osobniki młodociane, warunek ten może być w pewnym stopniu naruszony, ponieważ wśród ptaków, które nie zostały zaobraczkowane jako pisklęta, tylko schwyte po raz pierwszy jako osobniki młodociane, mogą znajdować się ptaki pochodzące z tego samego lęgu, a tym samym prawdopodobnie wystawione na podobną presję ze strony wektorów. Ponadto, sprawdzono, czy wśród predyktorów nie występuje zjawisko współliniowości. Ocena współliniowości została przeprowadzona na podstawie wartości współczynnika współliniowości VIF, przyjmując, że wartości $VIF < 5$ wskazują na brak współliniowości. Analizy zostały wykonane w programie IBM SPSS ver. 19 (IBM Corp. 2010).

4. LITERATURA

- Abràmoff M. D., Magalhães P. J., Ram S. J. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36-42.
- Adl S. M., Bass D., Lane C. E. i in. 2019. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66: 4-119.
- Allander K., Bennett G. F. 1995. Retardation of breeding onset in great tits (*Parus major*) by blood parasites. *Functional Ecology* 9: 677-682.
- Arriero E., Møller A. P. 2008. Host ecology and life-history traits associated with blood parasite species richness in birds. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1504-1513.
- Asghar M., Hasselquist D., Bensch S. 2011. Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds?. *Journal of Avian Biology* 42: 530-537.
- Atkinson C. T., Dusek R. J., Woods K. L., Iko W. M. 2000. Pathogenicity of avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* 36: 197-201.

- Atkinson C. T., Thomas N. J., Hunter D. B. 2009. Parasitic diseases of wild birds. John Wiley and Sons. Ames.
- Baker J. R. 1956. Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885. III. Life cycle in vertebrate and invertebrate hosts. *Parasitology* 46: 335–352.
- Baker J. R. 1976. Biology of the trypanosomes of birds. W: Lumsden W. H. R., Evans D. A. (red.). Biology of the Kinetoplastida. Vol. 2. Academic Press Inc. London, s. 131-174.
- Barrowclough G. F., Cracraft J., Klicka J., Zink R. M. 2016. How many kinds of birds are there and why does it matter?. *PloS One* 11: e0166307.
- Bell A. S., De Roode J. C., Sim D., Read A. F. 2006. Within-host competition in genetically diverse malaria infections: parasite virulence and competitive success. *Evolution* 60: 1358-1371.
- Bennett G. F. 1961. On the specificity and transmission of some trypanosomes. *Canadian Journal of Zoology* 39: 17-33.
- Bennett G. F. 1970. Development of trypanosomes of the *T. avium* complex in the invertebrate host. *Canadian Journal of Zoology* 48: 945-957.
- Bennett G. F., Peirce M. A., Ashford R. W. 1993. Avian haematozoa: mortality and pathogenicity. *Journal of Natural History* 27: 993-1001.
- Bennett G. F., Squires-Parsons D., Siikamäki P., Huhta E., Allander K., Hillström L. 1995. A comparison of the blood parasites of three Fenno-Scandian populations of the pied flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *Journal of Avian Biology* 26: 33-38.
- Bensch S., Hellgren O., Pérez-Tris J. 2009. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* 9: 1353-1358.
- Bensch S., Stjernman M., Hasselquist D., Hansson B., Westerdahl H., Pinheiro R. T. 2000. Host specificity in avian blood parasites: a study of Plasmodium and Haemoproteus mitochondrial DNA amplified from birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 267: 1583-1589.
- Bordes F., Morand S. 2011. The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infection Ecology and Epidemiology* 1: 7346.

- Burke T., Bruford M.W., Hanotte O., Brookfield J. F. Y. 1998. Multilocus and single-locus DNA fingerprinting. W: Hoelzel A.R. (red.) *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press. Oxford, s. 287-336.
- Calero-Riestra M., García J. T. 2016. Sex-dependent differences in avian malaria prevalence and consequences of infections on nestling growth and adult condition in the Tawny pipit, *Anthus campestris*. *Malaria Journal* 15: 178.
- Carlson M. L., Proudfoot G. A., Gentile K., Dispoto J., Weckstein J. D. 2018. Haemosporidian prevalence in northern saw-whet owls *Aegolius acadicus* is predicted by host age and average annual temperature at breeding grounds. *Journal of Avian Biology* 49: e01817.
- Cattadori I. M., Boag B., Hudson P. J. 2008. Parasite co-infection and interaction as drivers of host heterogeneity. *International Journal for Parasitology* 38: 371-380.
- Christe P., Richner H., Oppliger A. 1996a. Begging, food provisioning, and nestling competition in great tit broods infested with ectoparasites. *Behavioral Ecology* 7: 127-131.
- Christe P., Richner H., Oppliger A. 1996b. Of great tits and fleas: sleep baby sleep... . *Animal Behaviour* 52: 1087-1092.
- Christensen N. Ø., Nansen P., Fagbemi B. O., Monrad J. 1987. Heterologous antagonistic and synergistic interactions between helminths and between helminths and protozoans in concurrent experimental infection of mammalian hosts. *Parasitology Research* 73: 387-410.
- Clayton D. H., Moore J. 1997. Host-parasite evolution: general principles and avian models. Oxford University Press, Oxford.
- Clark N. J., Wells K., Dimitrov D., Clegg S. M. 2016. Co-infections and environmental conditions drive the distributions of blood parasites in wild birds. *Journal of Animal Ecology* 85: 1461-1470.
- Cox F. E. 2001. Concomitant infections, parasites and responses. *Parasitology* 122 (Supplement): S23-S38.
- Cramp S., Perrins C. M. 1993. Paridae. Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa 7. Oxford University Press. Oxford, s. 145-281.

- Crompton D. W. T. 1997. Birds as habitat for parasites. W: Clayton D. H., Moore J. (red.). Host-parasite evolution: general principles and avian models. Oxford University Press. Oxford, s. 253-270.
- Dale S., Kruszewicz A., Slagsvold T. 1996. Effects of blood parasites on sexual and natural selection in the pied flycatcher. *Journal of Zoology* 238: 373-393.
- Davidar P., Morton E. S. 1993. Living with parasites: Prevalence of a blood parasite and its effect on survivorship in the Purple Martin. *Auk* 110: 109-116.
- Davidar P., Morton E. S. 2006. Are multiple infections more severe for Purple Martins (*Progne subis*) than single infections?. *Auk* 123: 141-147.
- de Roode J. C., Helinski M. E., Anwar M. A., Read A. F. 2005. Dynamics of multiple infection and within-host competition in genetically diverse malaria infections. *The American Naturalist* 166: 531-542.
- Deviche P., Fokidis H. B., Lerbour B., Greiner E. 2010. Blood parasitaemia in a high latitude flexible breeder, the white-winged crossbill, *Loxia leucoptera*: contribution of seasonal relapse versus new inoculations. *Parasitology* 137: 261-273.
- Deviche P., Greiner E. C., Manteca X. 2001. Seasonal and age-related changes in blood parasite prevalence in dark-eyed juncos (*Junco hyemalis*, Aves, Passeriformes). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 289: 456-466.
- Dhondt A. A. 1979. Summer dispersal and survival of juvenile great tits in southern Sweden. *Oecologia* 42: 139-157.
- Dingemanse N. J., Both C., Drent P. J., Van Oers K., Van Noordwijk A. J. 2002. Repeatability and heritability of exploratory behaviour in great tits from the wild. *Animal Behaviour* 64: 929-938.
- Dobson A. P. 1985. The population dynamics of competition between parasites. *Parasitology* 91: 317-347.
- Dubiec A., Cichoń M., Deptuch K. 2006. Sex-specific development of cell-mediated immunity under experimentally altered rearing conditions in blue tit nestlings. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273: 1759-1764.
- Dufva R. 1996. Blood parasites, health, reproductive success, and egg volume in female Great Tits *Parus major*. *Journal of Avian Biology* 27: 83-87.

- El-Azm K. I. A., Hamed M. F., Matter A. i in. 2022. Molecular and pathological characterization of natural co-infection of poultry farms with the recently emerged *Leucocytozoon caulleryi* and chicken anemia virus in Egypt. *Tropical Animal Health and Production* 54: 91.
- Evans M., Otter A. 1998. Fatal combined infection with *Haemoproteus noctuae* and *Leucocytozoon ziemanni* in juvenile snowy owls (*Nyctea scandiaca*). *The Veterinary Record* 143: 72-76.
- Fallis A. M., Bennett G. F. 1961. Sporogony of *Leucocytozoon* and *Haemoproteus* in simuliids and ceratopogonids and a revised classification of the Haemosporidiida. *Canadian Journal of Zoology* 39: 215-228.
- Fallon S. M., Ricklefs R. E., Swanson B. L., Bermingham E. 2003. Detecting avian malaria: an improved polymerase chain reaction diagnostic. *Journal of Parasitology* 89: 1044-1047.
- Fargallo J. A., Laaksonen T., Pöyri V., Korpimäki E. 2002. Inter-sexual differences in the immune response of Eurasian kestrel nestlings under food shortage. *Ecology Letters* 5: 95-101.
- Folstad I., Karter A. J. 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *The American Naturalist* 139: 603-622.
- Frank S. A. 1996. Models of parasite virulence. *The Quarterly Review of Biology* 71: 37-78.
- Goater T. M., Goater C. P., Esch G. W. 2014. Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press. Cambridge.
- Godfrey Jr R. D., Fedynich A. M., Pence D. B. 1987. Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases* 23: 558-565.
- Godfrey Jr R. D., Pence D. B., Fedynich A. M. 1990. Effects of host and spatial factors on a haemoproteid community in mourning doves from western Texas. *Journal of Wildlife Diseases* 26: 435-441.
- Gosler A. G., Clement P. 2007. Family Paridae (tits and chickadees). W: del Hoyo J., Elliott A., Christie D. (red.). Handbook of the Birds of the World 12. Lynx Edicions. Barcelona, s. 662-750.
- Gosling P. J. 2005. Dictionary of parasitology. CRC press. Boca Raton.

- Griffiths R., Double M. C., Orr K., Dawson R. J. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hammers M., Komdeur J., Kingma S. A., Hutchings K., Fairfield E. A., Gilroy D. L., Richardson D. S. 2016. Age-specific haemosporidian infection dynamics and survival in Seychelles warblers. *Scientific Reports* 6: 29720.
- Harnist I. 2017. Wpływ inwestycji w budowę gniazda na dostosowanie bogatki *Parus major*. Rozprawa doktorska. Muzeum i Instytut Zoologii PAN. Warszawa.
- Harper G. H., Marchant A., Boddington D. G. 1992. The ecology of the hen flea *Ceratophyllus gallinae* and the moorhen flea *Dasypsyllus gallinulae* in nestboxes. *Journal of Animal Ecology* 61: 317-327.
- Hatchwell B. J., Wood M. J., Anwar M., Perrins C. M. 2000. The prevalence and ecology of the haematozoan parasites of European blackbirds, *Turdus merula*. *Canadian Journal of Zoology* 78: 684-687.
- Hellgren O., Waldenström J., Bensch S. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90: 797-802.
- Hunter D. B., Rohner C., Currie D. C. 1997. Mortality in fledgling great horned owls from black fly hematophaga and leucocytozoonosis. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 486-491.
- Joshua R. A. 1983. Massive increase in splenic germinal centre of chickens experimentally-infected with *Trypanosoma brucei brucei*. *Veterinary Parasitology* 13: 101-108.
- Kazubski S. L. 2000. Pierwotniaki pasożytnicze. *Kosmos* 49: 627-657.
- Kirkpatrick C. E., Lauer D. M. 1985. Hematozoa of raptors from southern New Jersey and adjacent areas. *Journal of Wildlife Diseases* 21: 1-6.
- Knowles S. C. 2011. The effect of helminth co-infection on malaria in mice: a meta-analysis. *International Journal for Parasitology* 41: 1041-1051.
- Knowles S. C., Wood M. J., Sheldon B. C. 2010. Context-dependent effects of parental effort on malaria infection in a wild bird population, and their role in reproductive trade-offs. *Oecologia* 164: 87-97.

- Korpimäki E., Hakkarainen H., Bennett G. F. 1993. Blood parasites and reproductive success of Tengmalm's Owls: Detrimental effects on females but not on males?. *Functional Ecology* 7: 420-426.
- Krama T., Krams R., Cīrulis D., Moore F. R., Rantala M. J., Krams I. A. 2015. Intensity of haemosporidian infection of parids positively correlates with proximity to water bodies, but negatively with host survival. *Journal of Ornithology* 156: 1075-1084.
- Krams I. A., Suraka V., Rantala M. J., Sepp T., Mierauskas P., Vrublevska J., Krama T. 2013. Acute infection of avian malaria impairs concentration of haemoglobin and survival in juvenile altricial birds. *Journal of Zoology* 291: 34-41.
- Krasnov B. R. 2008. Functional and evolutionary ecology of fleas: a model for ecological parasitology. Cambridge University Press. Cambridge.
- Kurnatowska A., Kurnatowski P. 2002. Podkrólestwo: Pierwotniaki. W: Deryło A. (red.). Parazytologia i akarologiya medyczna. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa, s. 63-102.
- Lambrechts M. M., Adriaensen F., Ardia D. R., Artemyev A. V., Atienza, F., Bañbura J. i in. 2010. The design of artificial nestboxes for the study of secondary hole-nesting birds: a review of methodological inconsistencies and potential biases. *Acta Ornithologica* 45: 1-26.
- Lees A. C., Haskell L., Allinson T. i in. 2022. State of the World's Birds. *Annual Review of Environment and Resources* 47: 231-260.
- Marshall A. G. 1981. The Ecology of Ectoparasitic Insects. Academic Press. London.
- Marzal A., Bensch S., Reviriego M., Balbontin J., De Lope F. 2008. Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 979-987.
- Marzal A., De Lope F., Navarro C., Møller A. P. 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* 142: 541-545.
- McCurdy D. G., Shutler D., Mullie A., Forbes M. R. 1998. Sex-biased parasitism of avian hosts: relations to blood parasite taxon and mating system. *Oikos* 82: 303-312.

- McQueen P. G., McKenzie F. E. 2006. Competition for red blood cells can enhance *Plasmodium vivax* parasitemia in mixed-species malaria infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 112-125.
- Medeiros M. C., Anderson T. K., Higashiguchi J. M., Kitron U. D., Walker E. D., Brawn J. D., Krebs B. L., Ruiz M. O., Goldberg T. L., Ricklefs R. E., Hamer G. L. 2014. An inverse association between West Nile virus serostatus and avian malaria infection status. *Parasites and Vectors* 7: 415.
- Meixell B. W., Arnold T. W., Lindberg M. S., Smith M. M., Runstadler J. A., Ramey A. M. 2016. Detection, prevalence, and transmission of avian hematozoa in waterfowl at the Arctic/sub-Arctic interface: co-infections, viral interactions, and sources of variation. *Parasites and Vectors* 9: 390.
- Merilä J., Allander K. 1995. Do great tits (*Parus major*) prefer ectoparasite-free roost sites? An experiment. *Ethology* 99: 53-60.
- Merilä J., Andersson M. 1999. Reproductive effort and success are related to haematozoan infections in blue tits. *Ecoscience* 6: 421-428.
- Merino S., Moreno J., Sanz J. J., Arriero E. 2000. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 267: 2507-2510.
- Millott S. M., Cox F. E. G. 1985. Interactions between *Trypanosoma brucei* and *Babesia* spp. and *Plasmodium* spp. in mice. *Parasitology* 90: 241-254.
- Molyneux D. H., Cooper J. E., Smith W. J. 1983. Studies on the pathology of an avian trypanosome (*T. bouffardi*) infection in experimentally infected canaries. *Parasitology* 87: 49-54.
- Moore J., Clayton D. H. 1997. Conclusion: Evolution of host-parasite interactions. W: Clayton D. H., Moore J. (red). *Host-Parasite Evolution: General Principles and Avian Models*. Oxford University Press, Oxford, s. 370-376.
- Møller A. P. 1997. Parasitism and the evolution of host life history. W: Clayton D. H., Moore J. (red.). *Host-parasite evolution. General principles and avian models*. Oxford University Press, Oxford, s. 105-127.
- Munro H. J., Martin P. R., Moore I. T., Bonier F. 2009. Blood parasites in adult and nestling birds in the Ecuadorian Andes. *Ornitologia Neotropical* 20: 461-465.

- Naef-Daenzer B., Gruebler M. U. 2008. Post-fledging range use of Great Tit *Parus major* families in relation to chick body condition. *Ardea* 96: 181-190.
- Norte A. C., Araujo P. M., Sampaio H. L., Sousa J. P., Ramos J. A. 2009. Haematozoa infections in a Great Tit *Parus major* population in Central Portugal: relationships with breeding effort and health. *Ibis* 151: 677-688.
- Oakgrove K. S., Harrigan R. J., Loiseau C., Guers S., Seppi B., Sehgal R. N. 2014. Distribution, diversity and drivers of blood-borne parasite co-infections in Alaskan bird populations. *International Journal for Parasitology* 44: 717-727.
- Oppliger A., Christe P., Richner H. 1997. Clutch size and malarial parasites in female great tits. *Behavioral Ecology* 8: 148-152.
- Oppliger A., Richner H., Christe P. 1994. Effect of an ectoparasite on lay date, nest-site choice, desertion, and hatching success in the great tit (*Parus major*). *Behavioral Ecology* 5: 130-134.
- Ortego J., Cordero P. J. 2010. Factors associated with the geographic distribution of leucocytozoa parasitizing nestling eagle owls (*Bubo bubo*): a local spatial-scale analysis. *Conservation Genetics* 11: 1479-1487.
- Palinauskas V., Valkiūnas G., Bolshakov C. V., Bensch S. 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* 120: 372-380.
- Palinauskas V., Valkiūnas G., Bolshakov C. V., Bensch S. 2011. *Plasmodium relictum* (lineage SGS1) and *Plasmodium ashfordi* (lineage GRW2): the effects of the co-infection on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* 127: 527-533.
- Pawlak J., Teisseyre-Sierpińska M. (Red.) 2006. Opracowanie ekofizjograficzne do Studium Uwarunkowań i Kierunków Zagospodarowania Przestrzennego M. St. Warszawy. Biuro naczelnego Architekta Miasta. Warszawa.
- Pedersen A. B., Fenton A. 2007. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 133-139.
- Petney T. N., Andrews R. H. 1998. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *International Journal for Parasitology* 28: 377-393.

- Pigeault R., Chevalier M., Cozzarolo C. S., Baur M., Arlettaz M., Cibois A. i in. 2022. Determinants of haemosporidian single-and co-infection risks in western Palearctic birds. *International Journal for Parasitology* 52: 617-627.
- Price P. W. 1980. Evolutionary biology of parasites. Princeton University Press. Princeton.
- Rätti O., Dufva R., Alatalo R. V. 1993. Blood parasites and male fitness in the pied flycatcher. *Oecologia* 96: 410-414.
- Read A. F., Taylor L. H. 2001. The ecology of genetically diverse infections. *Science* 292: 1099-1102.
- Reis S., Melo M., Covas R., Doutrelant C., Pereira H., de Lima R., Loiseau C. 2021. Influence of land use and host species on parasite richness, prevalence and co-infection patterns. *International Journal for Parasitology* 51: 83-94.
- Richie T. L. 1988. Interactions between malaria parasites infecting the same vertebrate host. *Parasitology* 96: 607-639.
- Richner H., Oppliger A., Christe P. 1993. Effect of an ectoparasite on reproduction in great tits. *Journal of Animal Ecology* 62: 703-710.
- Rynkiewicz E. C., Pedersen A. B., Fenton A. 2015. An ecosystem approach to understanding and managing within-host parasite community dynamics. *Trends in Parasitology* 31: 212-221.
- Sanz J. J., Arriero E., Moreno J., Merino S. 2001a. Female hematozoan infection reduces hatching success but not fledging success in Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Auk* 118: 750-755.
- Sanz J. J., Arriero E., Moreno J., Merino S. 2001b. Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. *Oecologia* 126: 339-344.
- Sehgal R. N., Buermann W., Harrigan R. J., Bonneaud C., Loiseau C., Chasar A., Sepil I., Valkiūnas G., Iezhova T., Saatchi S., Smith T. B. 2011. Spatially explicit predictions of blood parasites in a widely distributed African rainforest bird. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 278: 1025-1033.
- Sehgal R. N., Jones H. I., Smith T. B. 2001. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology* 10: 2319-2327.

- Seutin G. 1994. Plumage redness in redpoll finches does not reflect hemoparasitic infection. *Oikos* 70: 280-286.
- Sibley C. G., Monroe B. L. 1990. Distribution and Taxonomy of Birds of the World. Yale University Press. New Haven.
- Smith M. M., Van Hemert C., Merizon R. 2016. Haemosporidian parasite infections in grouse and ptarmigan: Prevalence and genetic diversity of blood parasites in resident Alaskan birds. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5: 229-239.
- Svensson L. 1992. Identification guide to European passerines. Svensson. Stockholm.
- Svobodová M., Čepička I., Zídková L., Kassahun A., Votýpka J., Peške L. i in. 2023. Blood parasites (*Trypanosoma*, *Leucocytozoon*, *Haemoproteus*) in the Eurasian sparrowhawk (*Accipiter nisus*): diversity, incidence and persistence of infection at the individual level. *Parasites and Vectors* 16: 1-16.
- Svobodová M., Weidinger K., Peške L., Volf P., Votýpka J., Voříšek P. 2015. Trypanosomes and haemosporidia in the buzzard (*Buteo buteo*) and sparrowhawk (*Accipiter nisus*): factors affecting the prevalence of parasites. *Parasitology Research* 114: 551-560.
- Telfer S., Birtles R., Bennett M., Lambin X., Paterson S., Begon M. 2008. Parasite interactions in natural populations: insights from longitudinal data. *Parasitology* 135: 767-781.
- Telfer S., Lambin X., Birtles R., Beldomenico P., Burthe S., Paterson S., Begon M. 2010. Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* 330: 243-246.
- Townsend A. K., Wheeler S. S., Freund D., Sehgal R. N., Boyce W. M. 2018. Links between blood parasites, blood chemistry, and the survival of nestling American crows. *Ecology and Evolution* 8: 8779-8790.
- Tripet F., Richner H. 1997. The coevolutionary potential of a 'generalist' parasite, the hen flea *Ceratophyllus gallinae*. *Parasitology* 115: 419-427.
- Tschirren B., Fitze P. S., Richner H. 2003. Sexual dimorphism in susceptibility to parasites and cell-mediated immunity in great tit nestlings. *Journal of Animal Ecology* 72: 839-845.

- Valdebenito J. O., Liker A., Halimubieke N., Figuerola J., Székely T. 2020. Mortality cost of sex-specific parasitism in wild bird populations. *Scientific Reports* 10: 1-10.
- Valkiūnas G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC press. Boca Raton.
- Van Oers K., Richardson D. S., Sæther S. A., Komdeur J. 2010. Reduced blood parasite prevalence with age in the Seychelles Warbler: selective mortality or suppression of infection?. *Journal of Ornithology* 151: 69-77.
- Van Rooyen J., Lalubin F., Glaizot O., Christe P. 2013. Avian haemosporidian persistence and co-infection in great tits at the individual level. *Malaria Journal* 12: 40.
- Votýpka J., Šimek J., Tryjanowski P. 2003. Blood parasites, reproduction and sexual selection in the red-backed shrike (*Lanius collurio*). *Annales Zoologici Fennici* 40: 431-439.
- Votýpka J., Svobodová M. 2004. *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitology Research* 92: 147-151.
- Votýpka J., Szabová J., Rádrová J., Zídková L., Svobodová M. 2012. *Trypanosoma culicavium* sp. nov., an avian trypanosome transmitted by *Culex* mosquitoes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 745-754.
- Waldenström J., Bensch S., Hasselquist D., Östman Ö. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90: 191-194.
- Wiehn J., Korpimäki E., Pen I. 1999. Haematozoan infections in the Eurasian kestrel: effects of fluctuating food supply and experimental manipulation of parental effort. *Oikos* 84: 87-98.
- Wobeser G.A. 2009. Parasitism: Cost and Effects. W: Atkinson C. T., Thomas N. J., Hunter D. B. (red.). 2009. Parasitic diseases of wild birds. John Wiley and Sons. Ames, s. 3-9.
- Wojczulanis-Jakubas K., Jakubas D., Czujkowska A., Kulaszewicz I., Kruszewicz A. G. 2012. Blood parasite infestation and the leukocyte profiles in adult and immature reed warblers (*Acrocephalus scirpaceus*) and sedge warblers (*Acrocephalus schoenobaenus*) during autumn migration. *Annales Zoologici Fennici* 49: 341-349.

Zamora-Vilchis I., Williams S. E., Johnson C. N. 2012. Environmental temperature affects prevalence of blood parasites of birds on an elevation gradient: implications for disease in a warming climate. *PLoS One* 7: e39208.

Złotorzycka J. (red.). 1998. Słownik parazytologiczny. Polskie Towarzystwo Parazytologiczne. Warszawa

ROZDZIAŁ I

**Oddziaływania w obrębie zespołu pasożytów krwi u
modraszki *Cyanistes caeruleus* w warunkach
eksperymentalnie manipulowanego dobrostanu żywiciela**

1. WSTĘP

W świecie zwierząt inwazje pasożytnicze są zjawiskiem powszechnym, przy czym bardzo często dany organizm pełni rolę żywiciela jednocześnie dla co najmniej kilku typów (rozumianych jako wyodrębniona jednostka pod względem taksonomicznym, np. rodzaj, gatunek, czy też linia genetyczna) pasożytów (Petney i Andrews 1998, Cox 2001, Lello i wsp. 2004, Palinauskas i wsp. 2005). Większość dotychczasowych badań dotyczących układu pasożyt–żywiciel pomijała jednak zjawisko współpasożytnictwa skupiając się tylko na jednym typie organizmu. Tymczasem współwystępujące taksony mogą na siebie oddziaływać, co może prowadzić do poważnych konsekwencji zarówno dla samych pasożytów, jak i żywiciela (Cox 2001, Bordes i Morand 2011). W przypadku pasożytów oddziaływania między nimi mogą powodować zwiększenie podatności na inwazję lub nasilenie (rozumiane jako wzrost intensywności) już istniejącej inwazji wywoływanej przez inny rodzaj (oddziaływania synergistyczne) lub zmniejszenie podatności i/lub osłabienie lub wręcz całkowitą eliminację inwazji (oddziaływania antagonistyczne). Z kolei w przypadku żywiciela oddziaływania między pasożytami mogą przekładać się na silniejsze bądź słabsze objawy wywoływanych przez nie chorób. W ekstremalnych przypadkach, w wyniku oddziaływań między pasożytami, może dojść do tak silnej zmiany zjadliwości, że pasożyt, który występując pojedynczo nie powoduje śmierci żywiciela, w koinwazji z innym rodzajem pasożyta staje się letalny (Cox i wsp. 1974).

O charakterze oddziaływań między pasożytami może decydować wiele czynników, wśród których najważniejsze to przynależność taksonomiczna pasożytów (rodzaj, gatunek, szczep/linia genetyczna) oraz przynależność taksonomiczna żywiciela (Dobson 1985, Ilmonen i wsp. 1999, van Rooyen i wsp. 2013). Oddziaływania pomiędzy różnymi gatunkami pasożytów należących do tego samego rodzaju czy też pomiędzy różnymi liniami genetycznymi lub szczepami reprezentującymi ten sam gatunek występują częściej, niż między organizmami z odległych taksonów. Wynika to ze zbliżonych u organizmów blisko spokrewnionych nisz ekologicznych i odpowiedzi immunologicznej żywiciela (Mideo 2009). Istnieje jednak również duża liczba przykładów silnego oddziaływania między organizmami odległymi filogenetycznie (Petney i Andrews 1998, Cox 2001, Bordes i Morand 2011).

U zwierząt zjawisko oddziaływań między pasożytami oraz jego konsekwencje dla żywicieli i pasożytów były dotychczas badane przede wszystkim u ssaków, głównie w warunkach eksperymentalnych na gatunkach modelowych, tj. myszach i szczurach (Cox 2001). Inne grupy zwierząt oraz zwierzęta dziko żyjące są pod tym względem znacznie słabiej poznane (Telfer i wsp. 2010). Zasadniczo, poza nielicznymi badaniami, wszystkie informacje na temat zależności między różnymi pasożytami, pochodzą z badań przekrojowych, tzn. odnoszą się one do danych o zgrupowaniu pasożytów występujących u poszczególnych żywicieli w populacji w jednym punkcie czasowym. Natomiast status zarażenia pasożytem może się zmieniać w ciągu roku, w związku ze zmiennymi warunkami środowiskowymi, a także zwiększonymi wydatkami energetycznymi, np. w trakcie rozrodu.

Jednymi z najczęstszych pasożytów występujących u ptaków są pasożyty wewnętrzne należące do pierwotniaków (Valkiūnas 2005, Atkinson i wsp. 2009). W niniejszych badaniach skupiono się na 3 rodzajach pierwotniaków z typu Apikompleksa, które należą do grupy Haemosporidia – *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon* oraz jednego rodzaju z typu Euglenozoa – *Trypanosoma*. Większość gatunków tych pierwotniaków posiada żywiciela kręgowego i bezkręgowego, a sposób zarażenia jest charakterystyczny dla danego gatunku (Goater i wsp. 2014). Powszechnie zespół takich organizmów, które większość swojego cyklu życiowego spędza w układzie krwionośnym nazywa się pasożytami krwi (Gosling 2005) i pod tym terminem będą opisywane w dalszej części tekstu. W przypadku pasożytów z obu typów (Apikompleksa i Euglenozoa) do zarażenia ptaków dochodzi za pośrednictwem wektorów. Pasożyty z grupy Haemosporidia przenoszone są przez krwio pijne muchówki z rodzin kuczmanowatych Ceratopogonidae i narzępikowatych Hippoboscidae (rodzaj *Haemoproteus*), komarowatych Culicidae (rodzaj *Plasmodium*) oraz meszkowatych Simuliidae (rodzaj *Leucocytozoon*) (Valkiūnas 2005). Z kolei *Trypanosoma* przekazywana jest przez krwio pijne muchówki z ww. rodzin oraz roztocza z rodziny Dermanyssidae (Baker 1976). Haemosporidia przenikają do żywiciela podczas żerowania wektorów, natomiast *Trypanosoma* wnika poprzez połknięcie stadiów zakaźnych razem z wektorem lub poprzez spojówkę lub uszkodzoną skórę w wyniku zanieczyszczenia odchodami wektorów (Baker 1976, Goater i wsp. 2014).

Dotychczasowe badania dotyczące charakteru oddziaływań między rozpatrywanymi w niniejszym rozdziale rodzajami pasożytniczych pierwotniaków dotyczą przede wszystkim *Plasmodium* i *Trypanosoma*, co wiąże się z faktem, że wywołują one groźne dla człowieka choroby (Richie 1988, Cox 2001). Przykładowo, w badaniach z wykorzystaniem modelowych organizmów, takich jak myszy i szczury, wielokrotnie wykazano synergistyczne oddziaływania między tymi dwoma rodzajami pasożytów. Ze względu na fakt, że pasożyty z rodzajów *Haemoproteus* i *Leucocytozoon* występują głównie u ptaków, charakter oddziaływań z udziałem tych pasożytów jest znacznie słabiej poznany niż w przypadku *Plasmodium* i *Trypanosoma*.

U ptaków charakter oddziaływań między różnymi patogenami był badany prawie wyłącznie u gatunków hodowlanych (Wright i wsp. 2005, Silveira i wsp. 2013). Przykładowo, u kurcząt intensywność inwazji *Plasmodium juxtanucleare* była wyższa, jeśli eksperymentalne zarażenie przez pierwotniaka zostało poprzedzone eksperymentalnym zarażeniem przez wirusa anemii kurcząt (Silveira i wsp. 2013). Według mojej wiedzy jedyny gatunek nie hodowlany, na którym przeprowadzono tego typu badania, to dziwonია ogrodowa *Haemorrhous mexicanus* (Dhondt i wsp. 2017). Stwierdzono, że po przeprowadzeniu zabiegu zarażenia ptaków tego gatunku przez bakterię *Mycoplasma gallisepticum*, liczba bakterii była wyższa u osobników, które w momencie schwytania były zarażone przez *Plasmodium* niż u tych, które nie były zarażone.

Wszystkie dostępne informacje o wpływie pasożytów krwi na siebie nawzajem w przypadku ptaków dziko żyjących pochodzą z jednego punktu czasowego (Hatchwell i wsp. 2000, Oakgrove i wsp. 2014). Dane te wskazują, że dla pewnych par pasożytów charakter zależności jest w znacznym stopniu powtarzalny. Przykładowo, w wielu badaniach, czy to na poziomie gatunku żywiciela, czy zgrupowania gatunków, stwierdzono negatywną zależność między pasożytami z rodzajów *Haemoproteus* i *Plasmodium* lub wręcz nie stwierdzano współwystępowania tych pasożytów pomimo wysokiej prevalencji obu rodzajów (Hatchwell i wsp. 2000, van Rooyen i wsp. 2013, Meixell i wsp. 2016, Smith i wsp. 2016). W przypadku pozostałych par pasożytów tylko dla niektórych można wyłonić dominujący charakter zależności. I tak, pasożyty z rodzaju *Trypanosoma* częściej niż wynikałoby to z prevalencji poszczególnych rodzajów pasożytów, współwystępują z innymi pasożytami krwi, przede wszystkim *Leucocytozoon* oraz, chociaż znacznie rzadziej,

z *Haemoproteus* (*Leucocytozoon*: Kirkpatrick i Lauer 1985, Møller i Nielsen 2007, Deviche i wsp. 2010, Oakgrove i wsp. 2014, Svobodová i wsp. 2015; *Haemoproteus*: Deviche i wsp. 2010, ale brak zależności w Kirkpatrick i Lauer 1985, Oakgrove i wsp. 2014, Svobodová i wsp. 2015). Z kolei w przypadku *Haemoproteus* i *Leucocytozoon* stwierdzono zarówno zależność pozytywną (Svobodová i wsp. 2015), negatywną (Oakgrove i wsp. 2014), jak i jej brak (Deviche i wsp. 2010).

Na oddziaływanie między pasożytami potencjalnie mogą mieć wpływ czynniki, które wpływają na ogólnie zdefiniowany dobrostan żywiciela. W przypadku, gdy dobrostan ulega pogorszeniu, mogą następować zmiany fizjologiczne, w tym zmiany w funkcjonowaniu układu odpornościowego, które mogą prowadzić do sytuacji, gdy inwazje jednego lub obu pasożytów mogą być trudniejsze do kontrolowania przez organizm żywiciela. Zmiany w funkcjonowaniu układu odpornościowego mogą powstawać m.in. za pośrednictwem zmian w stanie odżywienia organizmu oraz zarażenia żywiciela przez nowe rodzaje pasożytów (Ardia i Schat 2008). Istotną rolę w powstawaniu zależności między pasożytami odgrywa kompromis pomiędzy limfocytami pomocniczymi Th1 i Th2. Odpowiedź immunologiczna angażująca limfocyty pomocnicze Th1 jest kluczowa dla zwalczania wewnątrzkomórkowych infekcji pasożytniczych, przy jednoczesnym działaniu limfocytów pomocniczych Th2 chroniących przed szkodliwymi skutkami odpowiedzi Th1 dla organizmu żywiciela (Infante–Duarte i Kamradt 1999). Szczególnie problematyczne są chroniczne infekcje pasożytnicze, gdy odpowiedź immunologiczna powinna utrzymywać infekcję pod kontrolą, przy odpowiednio niskiej szkodliwości dla żywiciela. Występowanie infekcji chronicznej może wpływać na rodzaj odpowiedzi immunologicznej, która wystąpi w przypadku inwazji innego pasożyta. W takiej sytuacji przeciwdziałanie nowemu pasożytowi może być bardziej lub mniej sprawne – u myszy zarażonych helmintami wirus ospy krowiej był wolniej eliminowany z organizmu. Natomiast szczep myszy AKR, który nie jest w stanie zwalczyć inwazji nicienia *Trichuris muris*, nie ma z tym problemu, jeżeli jednocześnie jest zarażony przywrą żylną *Schistosoma mansoni* (Infante–Duarte i Kamradt 1999).

Niniejsze badania miały dwa główne cele. Po pierwsze, określenie charakteru oddziaływań (synergistyczne, antagonistyczne, neutralne) między pasożytniczymi pierwotniakami z rodzajów *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma*

wykorzystując do tego celu dane z dwóch punktów czasowych, a więc uwzględniając dynamikę zmian w statusie zarażenia przez poszczególne rodzaje pasożytów. Po drugie, określenie czy dobrostan żywiciela wpływa na charakter oddziaływań między pasożytami krwi. W tym celu w jednej z dwóch grup żywiciela obniżono jego dobrostan wystawiając go na presję ze strony pchły kurzej *Ceratophyllus gallinae*. Ten powszechny ektopasożyt ptaków niekorzystnie wpływa na żywiciela powodując m.in. spadek masy ciała oraz anemię (Brown i wsp. 1995, Tomás i wsp. 2008). Żerowanie pcheł może wiązać się z podwyższeniem metabolizmu żywiciela powodując większe zapotrzebowania pokarmowe, a także wzbudzać odpowiedź immunologiczną żywiciela (przegląd w Krasnov 2008).

Badania przeprowadzono na niewielkim gatunku ptaka wróblowego z grupy dziuplaków — modraszce *Cyanistes caeruleus*. Dane o zarażeniu dorosłych samic modraszek przez pasożyty krwi zebrano w dwóch punktach czasowych w obrębie okresu gniazdowego: w 10. dniu inkubacji oraz pod koniec okresu piskłowego.

Do określenia charakteru zależności przyjęto założenie, że jeżeli dwa rodzaje pasożytów współwystępują ze sobą częściej niż wynika to z częstości ich występowania w populacji mamy do czynienia z zależnością synergistyczną; jeżeli rzadziej – antagonistyczną lub jeżeli zgodnie z częstością występowania w populacji – nie stwierdzono zależności lub jest ona neutralna (Combes 1999; więcej informacji w Apendyksie 3). Bazując na dotychczasowych wynikach badań zarówno na ssakach, jak i ptakach, oraz wiedzy o cyklu życiowym pasożytów oraz reakcji układu odpornościowego na pasożytnicze inwazje wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkowe oczekiwano:

- Antagonistycznej zależności w układzie *Haemoproteus*+*Plasmodium* oraz synergistycznej w układach zawierających *Trypanosoma*; w przypadku par *Haemoproteus*+*Leucocytozoon*, *Plasmodium*+*Leucocytozoon* oczekiwano neutralnych bądź synergistycznych oddziaływań.
- Oddziaływania między poszczególnymi parami rodzajów pasożytów będą silniej (większa częstość współwystępowania w przypadku oddziaływań synergistycznych) lub słabiej (mniejsza częstość współwystępowania w przypadku oddziaływań antagonistycznych) wyrażone u ptaków poddanych presji ze strony pchły kurzej.

2. METODY

2.1. Teren badań

Badania były prowadzone w południowej części szwedzkiej wyspy Gotlandia (57°10'N, 18°20'E) w latach 2013–2015. Na 23 powierzchniach (łącznie ok. 215 ha), na których prowadzono badania, zawieszonych jest łącznie około 1800 skrzynek lęgowych. Skrzynki zawieszone są na wysokości ok. 1,5 m, zwykle w odległości ok. 50 m od siebie. Na części terenów odległość ta jest mniejsza. Większość wydzielonych powierzchni badawczych stanowią zadrzewienie zdominowane przez dąb szypułkowy *Quercus robur* oraz jesion wyniosły *Fraxinus excelsior* z podszytem składającym się głównie z leszczyny *Corylus avellana* i głogu *Crataegus* spp. Na pozostałych powierzchniach występuje również sosna zwyczajna *Pinus sylvestris* oraz brzoza *Betula* spp. (Przybyło i wsp. 2000).

W skrzynkach lęgowych gnieźdzą się głównie bogatki *Parus major*, modraszki i muchołówki białoszyje *Ficedula albicollis*.

2.2. Badania terenowe

Prace rozpoczynały się od zebrania starego materiału gniazdowego sikor zawierającego pchły (do wykorzystania w eksperymencie mającym na celu zróżnicowanie dobrostanu gospodarza poprzez tę infestację gniazda) oraz czyszczenia skrzynek lęgowych, które przeprowadzane były w marcu. W większości skrzynek materiał gniazdowy usuwany był w poprzednim sezonie lęgowym po wylocie piskląt z gniazda, jednak w przypadku drugich lęgów sikor w danej skrzynce pozostawał on do wiosny kolejnego roku, kiedy to był zbierany. Zebrany stary materiał gniazdowy był umieszczany w plastikowych torebkach strunowych, które były nakłuwane w celu zapewnienia dostępu powietrza, a następnie umieszczane w niskiej temperaturze. Skrzynki były czyszczone przy pomocy drucianych szczotek, w miarę możliwości w szczelinach między ścianami, aby usunąć pchły przebywające wewnątrz skrzynki. Czyszczenie skrzynek było prowadzone, aby uniknąć infestacji ptaków przez pchły na początku okresu gniazdowego.

Kontrole skrzynek rozpoczynały się w połowie kwietnia (w badanej populacji samice modraszek zaczynają składać jaja w drugiej połowie kwietnia) i były prowadzone regularnie w celu określenia momentu zakończenia budowy gniazda, daty złożenia pierwszego jaja, wielkości lęgu, dnia klucia (dzień 0 życia piskląt) oraz liczby piskląt.

Oczekiwany dzień klucia wyznaczano na podstawie długości okresu wysiadywania, który u tego gatunku wynosi ok 13–14 dni (Cramp i Perrins 1993). Kontrole klucia zaczynano dzień przed wyliczonym dniem klucia i prowadzono codziennie, aż do potwierdzenia wykluć się piskląt.

W celu zróżnicowania dobrostanu samic przeprowadzono zabieg zmiany liczby pcheł w materiale gniazdowym. Utworzono dwie grupy lęgów: a) lęgi, w których materiał gniazdowy został pozbawiony pcheł (określane w dalszej części tekstu jako grupa kontrolna) oraz b) lęgi, w których materiał gniazdowy został celowo infestowany przez pchły (określane w dalszej części tekstu jako grupa eksperymentalna). W początkowym etapie składania jaj (zwykle, gdy w gnieździe były 1–3 jaja) wszystkie gniazda były zbierane w celu usunięcia pcheł i innych bezkręgowców występujących w materiale gniazdowym. Odbywało się to poprzez poddawanie gniazda działaniu wysokiej temperatury (mikrofalowanie 700W przez 3 minuty). W celu skompensowania strat wody spowodowanych przez jej parowanie podczas tego zabiegu, każde gniazdo uprzednio spryskano 4 ml wody. Ze względów logistycznych gniazda były umieszczane w innych skrzynkach niż te, w których zostały wybudowane. W każdym sezonie lęgowym w kilku pierwszych lęgach umieszczano „sztuczne” gniazda, do których budowy wykorzystano torfowce *Sphagnum*. W grupie lęgów eksperymentalnych, drugiego dnia inkubacji dodawano do materiału gniazdowego 40 dorosłych pcheł, a drugiego dnia po wykluć piskląt – dalsze 60 pcheł. Pchły były losowo wybierane ze starego materiału gniazdowego. Ograniczenie liczby pcheł do 40 na etapie inkubacji wynikało z faktu, że umieszczenie zbyt dużej liczby pcheł mogłoby spowodować porzucenie lęgu przez samicę (Oppliger i wsp. 1994). Aby utrzymać jak najniższy poziom infestacji gniazd przez pchły w grupie kontrolnej, gniazda były ponownie poddawane działaniu wysokiej temperatury w drugim dniu inkubacji i drugim dniu życia piskląt. Lęgi były przypisywane do grup wraz z postępem sezonu naprzemiennie w celu kontrolowania zmienności środowiskowej i fenotypowej ptaków. Aby potwierdzić skuteczność zabiegu eksperymentalnego, w 14. dniu po wykluć piskląt, gniazda były zbierane w celu określenia liczby pcheł. Gniazda były umieszczane w temp. ok. –20 °C przez co najmniej 24 h, a następnie materiał był dokładnie przeszukiwany pod kątem obecności dorosłych pcheł.

W celu określenia statusu i intensywności zarażenia przez pasożyty krwi w przypadku samic krew pobrano dwukrotnie – w 10 dniu inkubacji i 14 dniu po wykluciu piskląt. W związku z trudnościami w schwytaniu samców na etapie inkubacji, krew pobrano od nich tylko jeden raz – w 14 dniu po wykluciu piskląt (dane nie prezentowane). Podczas inkubacji ptaki chwymano na gnieździe zbliżając się do skrzynki w sposób minimalizujący hałas, który mógłby spowodować ucieczkę samicy, a następnie zatykając otwór wlotowy. Pod koniec okresu gniazdowego ptaki chwymano za pomocą sieci ornitologicznych rozstawionych przed skrzynką lub pułapek z zapadką umieszczanych wewnątrz skrzynki. Po schwytaniu oprócz pobrania krwi ptaki były ważone oraz określono ich wiek jako jednoroczne lub co najmniej 2-letnie (Svensson 1992). Dwukrotny pobór krwi u samic umożliwił prześledzenie ewentualnych zmian w statusie i intensywności zarażenia ptaka w ciągu okresu gniazdowego, ponieważ na etapie inkubacji wektory pasożytów krwi nie są jeszcze obecne w środowisku. W związku z tym osobniki, u których stwierdzono zarażenie na etapie inkubacji, zostały zarażone w poprzednim roku. Natomiast stwierdzenie zarażenia jedynie pod koniec okresu gniazdowego oznacza nowo nabytą infekcję. Krew (ok. 50 µl) pobierana była z żyły skrzydłowej po nakłuciu igłą do szklanej bezheparynowej kapilary. Przed włożeniem kapilary z krwią do 99,8% alkoholu etylowego, kroplę krwi umieszczano na szkiełku podstawowym i wykonywano rozmaz krwi (2 rozmazy na osobnika). Rozmazy krwi były w dniu ich wykonania utrwalane metanolem oraz barwione przy pomocy zestawu Hemacolor (Merck Millipore).

2.3. Molekularna analiza zarażenia przez pasożyty krwi

Próbki krwi do czasu analiz były przechowywane w temperaturze pokojowej. Izolacja DNA z krwi została przeprowadzona przy użyciu octanu amonu (Burke i wsp. 1998). Status zarażenia został określony na podstawie amplifikacji materiału DNA z genomu pasożytów wykorzystując do tego celu zagnieżdżoną łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). Do wykrycia zarażenia poszczególnymi rodzajami pasożytów wykorzystano następujące rodzaje markerów (szczegółowy opis warunków poszczególnych reakcji PCR znajduje się w Apendyksie 1):

- *Plasmodium* i *Haemoproteus*: fragment (o długości 479 pz) mitochondrialnego cytochromu b; startery, skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne PCR wg protokołu Waldenströma i wsp. (2004),
- *Leucocytozoon*: fragment (o długości 480 pz) mitochondrialnego cytochromu b; startery, skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne PCR wg protokołu Hellgrena i wsp. (2004),
- *Trypanosoma*: fragment genu (o długości 326 pz) kodującego mniejszą podjednostkę rybosomalną RNA (SSU RNA) pasożyta; startery i skład mieszaniny reakcyjnej wg protokołu Sehgała i wsp. (2001), a warunki termiczne PCR wg protokołu Zamory–Vilchis i wsp. (2012).

Produkty PCR zostały przeniesione na żel agarozowy (2%) i poddane elektroforezie w buforze 1×TBE w warunkach 5,5 V/cm przez 30 min. Jeśli produkt PCR nie został dla danej próbki namnożony, analiza była powtarzana. Jeśli ponownie uzyskano wynik ujemny, uznawano, że ptak nie był zarażony, a jeśli dodatni, analiza była powtarzana po raz trzeci. W takim wypadku za końcowy wynik uznawano ten, który został stwierdzony dwukrotnie. Jakość izolatu DNA w przypadku próbek, dla których jako końcowy uzyskano wynik ujemny, sprawdzano na podstawie wyniku reakcji PCR wykorzystującej startery do oznaczania płci (Griffiths i wsp. 1998). Jeśli produkt PCR został w tej reakcji uzyskany, uznawano, że izolacja DNA przebiegła prawidłowo.

W przypadku stwierdzenia namnożonego materiału DNA, został on zsekwencjonowany w celu: 1) identyfikacji rodzaju pasożyta (*Plasmodium* lub *Haemoproteus*) w przypadku zestawu starterów opracowanych przez Waldenströma i wsp. (2004) oraz 2) potwierdzenia, że namnożony materiał DNA reprezentuje rodzaj *Leucocytozoon* lub *Trypanosoma* w przypadku zestawu starterów opracowanych przez Hellgrena i wsp. (2004) oraz Sehgała i wsp. (2001). Przed sekwencjonowaniem produkty PCR były oczyszczane przy pomocy zestawu dwóch enzymów: egzonukleazy i fosfatazy zgodnie z instrukcją producenta (ExoBAP, Eurx, Gdańsk, Polska). Dwustronne sekwencjonowanie było przeprowadzane metodą Sangera z wykorzystaniem aparatów ABI 3730/3730xl w systemie płytkowym na płytce 96–dołkowej (analizy zlecone do wykonania w Serwisie Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN).

Chromatogramy otrzymane po sekwencjonowaniu były analizowane w programie BioEdit (wersja 7.2.5) (Hall 1999). W celu identyfikacji linii genetycznej pasożytów z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon* odczytana sekwencja nukleotydów była porównywana z sekwencjami zdeponowanymi w internetowej bazie MalAvi (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/about.html>, Bensch i wsp. 2009). Jeśli uzyskana sekwencja nie wykazała 100% zgodności z żadną linią w bazie MalAvi była ona przyporządkowywana do rodzaju pasożyta na podstawie tego, z jaką linią genetyczną wykazywała najwyższe podobieństwo. Współwystępowanie jednocześnie co najmniej dwóch linii genetycznych pasożytów było rozpoznawane na podstawie obecności podwójnych odczytów zasad w chromatogramie. W przypadku *Trypanosoma* sekwencje standardowo identyfikowane były do gatunku lub rodzaju, na podstawie sekwencji zdeponowanych w bazie GeneBank. We wszystkich próbkach, dla których startery opracowane przez Sehgal i wsp. (2001) namnożyły produkt, został on zidentyfikowany jako materiał genetyczny *Trypanosoma*.

2.4. Analiza rozmazów krwi

Intensywność zarażenia przez pasożyty krwi była określana na podstawie przeglądania rozmazów krwi przy użyciu mikroskopu świetlnego (Carl Zeiss Jena JENAVAL). Liczenie pasożytów z rodzajów *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* odbywało się przy 400–krotnym powiększeniu, natomiast *Haemoproteus* i *Plasmodium* przy 1000–krotnym powiększeniu, przy użyciu olejku immersyjnego. Intensywność zarażenia była szacowana poprzez określenie liczby zarażonych erytrocytów przypadających na 10 000 erytrocytów (Godfrey i wsp. 1987). W celu określenia liczby pól widzenia koniecznych do przejrzenia, aby uzyskać łączną sumę 10 000 erytrocytów zliczono dokładną liczbę erytrocytów w kilku polach i wyliczono średnią liczbę erytrocytów przypadających na pole widzenia. Ze względu na zbliżoną jakość rozmazów oraz podobną liczbę erytrocytów w polu widzenia (najczęściej ok. 200) w większości przypadków zliczano pasożyty w 50 polach widzenia. Analiza rozmazów krwi dodatkowo pełniła rolę krzyżowego sprawdzenia wyników analiz molekularnych zarażenia pasożytami.

2.5. Wielkość próby oraz analizy statystyczne

W trzech sezonach lęgowych łącznie 193 lęgi modraszki zostały przyporządkowane do jednej z grup. Ze względu na brak danych wynikający z następujących powodów: porzucenie lęgu, atak drapieżnika, niezapłodnione jaja, brak próbki krwi z jednego lub obu schwytań lub trudności z oznaczeniem pasożytów, z końcowych analiz wykluczono 44 lęgi. Dodatkowo, w celu uniknięcia pseudoreplikacji (dane nie są całkowicie niezależne od siebie), w przypadku samic, które zostały wykorzystane w eksperymencie w dwóch sezonach lęgowych ($n = 10$), do analiz użyto zestawu danych tylko z jednego sezonu: jeśli w pierwszym z dwóch sezonów samica została przyporządkowana do grupy eksperymentalnej, do analiz włączano zestaw danych z pierwszego sezonu, jeśli do grupy kontrolnej – zestaw danych wybierany był losowo (z wykorzystaniem generatora liczb losowych w programie MS Excel, funkcja randbetween). W sumie, analizy statystyczne przeprowadzono na zestawie danych dla 139 lęgów: 71 z grupy kontrolnej i 68 z grupy eksperymentalnej. Grupy te nie różniły się pod względem elementów biologii lęgowej (Tabela 1).

Do zbadania charakteru oddziaływania między różnymi rodzajami pasożytów zastosowano uogólnione modele liniowe (ang. generalized linear models, GLMs) z dwumianowym typem rozkładu oraz funkcją łączenia typu logit. Jako zmienną zależną wprowadzano kolejno status zarażenia (kodowany jako 0 dla osobników, u których nie stwierdzono inwazji oraz 1, gdy taką inwazję stwierdzono) przez każdy z rodzajów pasożytów pod koniec okresu pisklęcego. Jako predyktory wprowadzono rok, wiek samicy, zabieg eksperymentalny oraz status zarażenia pozostałymi rodzajami pasożytów na etapie inkubacji. Początkowy model oprócz efektów głównych zawierał interakcje drugiego rzędu pomiędzy poszczególnymi predyktorami. Interakcje były krokowo usuwane z modelu, jeśli wartość prawdopodobieństwa była mniejsza lub równa 0,05 ($P \geq 0,05$).

Wszystkie modele zostały sprawdzone pod kątem zgodności z założeniami uogólnionych modeli liniowych, w tym czy dane wprowadzone do modelu stanowią zbiór niezależnych obserwacji oraz czy wśród predyktorów nie występuje zjawisko współliniowości (ang. multicollinearity). Ocena współliniowości została przeprowadzona na podstawie wartości współczynnika współliniowości VIF (ang. variance inflation factor),

przyjmując, że wartości $VIF < 5$ wskazują na brak współliniowości. Analizy zostały wykonane w programie IBM SPSS ver. 19 (IBM Corp. 2010).

Tabela 1. Porównanie podstawowych elementów biologii lęgowej modraszki w grupie kontrolnej i eksperymentalnej. Test – jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA); $\bar{x}$ – średnia; Me – mediana, D14 – dzień 14. życia piskląt.

	Grupa kontrolna (N=71)			Grupa eksperymentalna (N=68)			Statystyka
	$\bar{x}$	Me	Zakres	$\bar{x}$	Me	Zakres	
Data złożenia pierwszego jaja	01.05	30.04	18–47	01.05	30.04	17–45	F=0,03, df=1, P=0,872
Wielkość zniesienia	10,67	11	7–14	10,70	11	6–14	F=0,83, df=1, P=0,363
Data wyklucia	24.05	24.05	42–68	54	24.05	43–66	F=0,60, df=1, P=0,441
Liczba wyklułych piskląt	9,55	10	6–14	9,58	10	5–14	F=0,42, df=1, P=0,516
Liczba piskląt w D14	9,05	9	5–14	9,07	9	3–13	F=0,51, df=1, P=0,476
Śmiertelność piskląt	6,08%	0%	0–38%	6,26%	0%	0–63%	F=0,23, df=1, P=0,635

3. WYNIKI

3.1. Wpływ zabiegu eksperymentalnego na kondycję samic

Zabieg eksperymentalny istotnie wpłynął na liczbę pcheł (określoną w 14 dniu życia piskląt) w gniazdach modraszek. W grupie kontrolnej liczba pcheł w gnieździe była średnio sześciokrotnie niższa niż w grupie eksperymentalnej (grupa kontrolna: $19,3 \pm 68,0$, zakres 0–123, grupa eksperymentalna: $118,7 \pm 68,5$, zakres 11–312, jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA: F=151,49, df=1, P<0,001).

Zabieg eksperymentalny polegający na zmianie poziomu presji ze strony pcheł nie wpłynął na kondycję samic ani w końcowym okresie inkubacji ani pod koniec okresu pisklęcego (Tabela 2).

Tabela 2. Wpływ eksperymentalnej zmiany liczby pcheł w gnieździe na kondycję samic wyrażoną jako masa/długość skoku w 10 dniu inkubacji i gdy pisklęta osiągnęły wiek 14 dni. Test Kruskala–Wallisa; $\bar{x}$ – średnia; SE – błąd standardowy; D14 – dzień 14. życia piskląt.

	Grupa kontrolna (N=71)		Grupa eksperymentalna (N=68)		Statystyka
	$\bar{x}$	SE	$\bar{x}$	SE	
Kondycja samicy* podczas inkubacji	0,782	0,04	0,781	0,04	$\chi^2=0,09$, df=1, $P=0,766$
Kondycja samicy* w D14	0,655	0,03	0,649	0,03	$\chi^2=1,24$, df=1, $P=0,266$

* masa/długość skoku

3.2. Prewalencja pasożytów krwi oraz zmiany w statusie zarażenia

W 10. dniu inkubacji łącznie 88,4% samic, w tym 90,0% w grupie kontrolnej i 86,8% w grupie eksperymentalnej było zarażonych przez co najmniej jeden rodzaj pasożytów krwi (skład zgrupowania pasożytów na poziomie linii genetycznych lub gatunku prezentuje Apendyks 2 Tabele A2.1. i A2.2.). Wśród zarażonych samic ($n = 122$), pojedyncze inwazje stwierdzono u 54,1%, podwójne – u 35,2%, a potrójne – u 10,7%. Żadna samica nie była zarażona przez wszystkie cztery rodzaje pasożytów. Pomimo losowego przyporządkowywania lęgów do grupy kontrolnej i eksperymentalnej, w 10. dniu inkubacji samice z obu grup różniły się prewalencją pasożytów z rodzajów *Plasmodium* i *Trypanosoma* (Tabela 3).

Tabela 3. Prewalencja pasożytów krwi (%) u samic modraszki w dniu 10 inkubacji w zależności od typu lęgu (kontrolny, eksperymentalny) oraz sezonu lęgowego. $\bar{x}$ – średnia.

Rodzaj	Grupa kontrolna				Grupa eksperymentalna				Statystyka
	2013	2014	2015	$\bar{x}$	2013	2014	2015	$\bar{x}$	
<i>Haemoproteus</i>	31,6	42,4	31,6	36,6	42,1	55,2	65,0	54,4	$\chi^2=3,48$, df=1, P=0,062
<i>Plasmodium</i>	47,4	54,5	47,4	50,7	36,8	37,9	20,0	32,3	$\chi^2=4,37$, df=1, P=0,037
<i>Leucocytozoon</i>	31,6	15,1	10,5	18,3	26,3	10,3	40,0	23,5	$\chi^2=0,26$, df=1, P=0,611
<i>Trypanosoma</i>	31,6	21,2	10,5	21,1	52,6	37,9	35,0	41,2	$\chi^2=5,44$, df=1, P=0,020

Łącznie w trzech sezonach lęgowych status zarażenia (z negatywnego na pozytywny lub z pozytywnego na negatywny) pomiędzy pierwszym a drugim schwytaniem zmieniło odpowiednio: *Haemoproteus* – 24 samice ($\chi^2=0,14$, df=1, P=0,706), *Plasmodium* – 5 samic ($\chi^2=0,21$, df=1, P=0,647), *Leucocytozoon* – 1 samica ($\chi^2=1,05$, df=1, P=0,304) i *Trypanosoma* – 33 samice ($\chi^2=1,85$, df=1 P=0,174). Samice z grupy kontrolnej i eksperymentalnej nie różniły się pod względem częstości zmian w statusie zarażenia (Tabela 4).

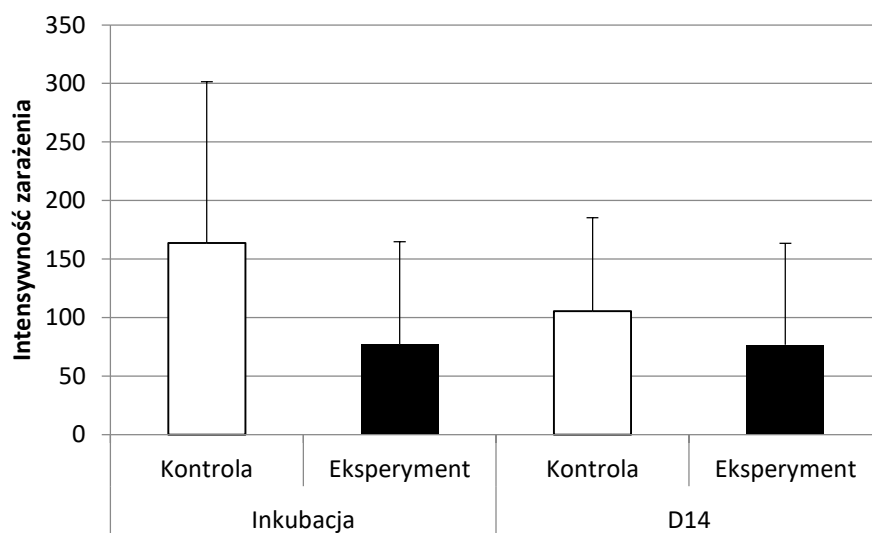
Tabela 4. Zmiany w statusie zarażenia przez pasożyty krwi u samic modraszki w grupie eksperymentalnej i kontrolnej pomiędzy dniem 10. inkubacji a dniem 14. po wykluciu piskląt (D14). + — zmiana statusu z negatywnego na pozytywny, 0 — brak zmiany w statusie zarażenia, - — zmiana statusu zarażenia z pozytywnego na negatywny

Rodzaj	Zmiana w statusie zarażenia na etapie inkubacja – D14					
	Grupa kontrolna			Grupa eksperymentalna		
	+	0	-	+	0	-
<i>Haemoproteus</i>	9	58	4	7	57	4
<i>Plasmodium</i>	0	71	0	3	63	2
<i>Leucocytozoon</i>	0	71	0	0	67	1
<i>Trypanosoma</i>	11	55	4	8	50	10

3.3. Intensywność zarażenia

Intensywność zarażenia jest przedstawiona tylko dla rodzaju *Haemoproteus*. Wynika to z faktu, że pozostałe pasożyty krwi były stwierdzane na rozmazach bardzo rzadko (intensywność od 0 do kilku pasożytów /10 000 erytrocytów). Dla statusu zarażenia *Haemoproteus*, wyższą prevalencję stwierdzono podczas analiz molekularnych, co może być związane z dokładnością tej metody. Na inkubacji stwierdzono zarażenie *Haemoproteus* na poziomie 36,5% za pomocą mikroskopii świetlnej wobec 37,9% metodami molekularnymi (zbieżność wyników 89,6%, N=135, $r=0,799$, $P<0,001$). Natomiast w dniu 14. życia piskląt stwierdzono prevalencję *Haemoproteus* na poziomie 44,4 % za pomocą mikroskopii świetlnej i 51,1% za pomocą metod molekularnych (zbieżność wyników 86,9%, N=137, $r=0,765$, $P=0,001$).

Intensywność zarażenia *Haemoproteus* była istotnie niższa w grupie z pchłami na etapie inkubacji (test Kruskala–Wallisa, $\chi^2=6,58$, $df=1$, $P=0,010$; Rycina 1.) oraz w dniu 14. życia piskląt (test Kruskala–Wallisa, $\chi^2=4,76$, $df=1$, $P=0,029$).



Rycina 1. Porównanie intensywności zarażenia *Haemoproteus* między gniazdami z pchłami (eksperyment) i bez pcheł (kontrola) na etapie inkubacji i w dniu 14. po wykluciu piskląt (D14). Wąsy na wykresie przedstawiają odchylenie standardowe od średniej. Ujęto dane jedynie dla samic, u których wykryto *Haemoproteus* na rozmazach krwi. Intensywność zarażenia podano jako liczbę pasożytów/10 000 erytrocytów.

Pomiędzy dniem 10. inkubacji a 14. dniem życia piskląt intensywność (liczba pasożytów/10 000 erytrocytów) w grupie bez pcheł uległa znacznemu obniżeniu ($-58,3 \pm 166,2$), natomiast w grupie z pchłami pozostała na zbliżonym poziomie ($-0,17 \pm 68,7$; jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA $\chi^2=2,59$, $df=1$, $P=0,114$).

3.4. Oddziaływania między pasożytami krwi

Dla każdego z rozpatrywanych rodzajów pasożytów krwi, prawdopodobieństwo zarażenia samic w 14. po wykluciu piskląt zależało od statusu zarażenia przez jeden lub dwa inne rodzaje pasożytów w 10. dniu inkubacji (Tabela 5).

Prawdopodobieństwo zarażenia przez *Haemoproteus* było antagonistycznie powiązane z *Plasmodium* i synergistycznie z *Leucocytozoon*. Zależność synergistyczną stwierdzono pomiędzy *Leucocytozoon* i *Trypanosoma*. W przypadku stwierdzenia zarażenia *Trypanosoma* na inkubacji istniało większe prawdopodobieństwo rozwoju zarażenia *Leucocytozoon* w dniu 14. życia piskląt. Zależność ta miała charakter dwukierunkowy, ponieważ w sytuacji odwrotnej – stwierdzenia zarażenia *Leucocytozoon* podczas inkubacji prawdopodobieństwo zarażenia *Trypanosoma* było istotnie wyższe. Dwustronną antagonistyczną zależność stwierdzono pomiędzy *Haemoproteus* i *Plasmodium* – w przypadku stwierdzenia jednego z tych pasożytów podczas inkubacji prawdopodobieństwo inwazji pasożytniczej drugiego rodzaju było istotnie niższe.

Zabieg eksperymentalny nie miał wpływu na prawdopodobieństwo zarażenia żadnym z badanych pasożytów krwi. Jednak zaobserwowano, że u ptaków co najmniej dwuletnich istniało niższe prawdopodobieństwo rozwoju zarażenia *Plasmodium*, jeżeli gnieździły się one w skrzynkach, w których przeprowadzono zabieg infestacji materiału gniazdowego przez pchły. Wiek żywiciela miał istotne znaczenie również w przypadku zarażenia *Haemoproteus* i *Trypanosoma*. U osobników starszych prawdopodobieństwo zarażenia *Haemoproteus* było wyższe, natomiast prawdopodobieństwo rozwoju zarażenia *Trypanosoma* było niższe.

Tabela 5. Czynniki z etapu inkubacji, które mogą wpływać na prawdopodobieństwo wystąpienia zarażenia pasożytem w dniu 14. życia piskląt

Pasożyt stwierdzony w D14		df	współczynnik ± SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	Rok ¹	2		19,57	<0,001
	2014	1	2,38±0,59		
	2015	1	1,61±0,60		
	Wiek ²	1	0,96±0,46	4,47	0,035
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,41±0,44	0,87	0,350
	Pasożyty stwierdzone podczas inkubacji				
	<i>Plasmodium</i> ⁴	1	-2,53±0,48	35,14	<0,001
	<i>Leucocytozoon</i> ⁴	1	1,23±0,58	4,77	0,029
	<i>Trypanosoma</i> ⁴	1	-0,58±0,49	0,01	0,905
<i>Plasmodium</i>	Rok ¹	2		7,77	0,021
	2014	1	1,72±0,67		
	2015	1	0,72±0,67		
	Wiek ²	1	1,51±0,74	0,48	0,488
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,32±0,64	2,40	0,121
	Pasożyty stwierdzone podczas inkubacji				
	<i>Haemoproteus</i> ⁴	1	-4,07±0,66	69,17	<0,001
	<i>Leucocytozoon</i> ⁴	1	-0,13±0,70	0,03	0,851
	<i>Trypanosoma</i> ⁴	1	0,87±0,62	2,07	0,151
	Wiek*zabieg eksperymentalny	1	-2,30±1,14	4,39	0,036

Ciąg dalszy na kolejnej stronie

<i>Leucocytozoon</i>	Rok ¹	2		3,19	0,203
	2014	1	-0,91±0,56		
	2015	1	-0,15±0,56		
	Wiek ²	1	0,51±0,46	1,20	0,272
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,13±0,47	0,08	0,782
	Pasożyty stwierdzone podczas inkubacji				
	<i>Haemoproteus</i> ⁴	1	0,78±0,62	1,69	0,193
	<i>Plasmodium</i> ⁴	1	0,06±0,63	0,01	0,918
	<i>Trypanosoma</i> ⁴	1	1,04±0,48	4,68	0,030
<i>Trypanosoma</i>	Rok ¹	2		6,76	0,034
	2014	1	-0,99±0,48		
	2015	1	-1,22±0,52		
	Wiek ²	1	-0,75±0,41	3,45	0,063
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,26±0,39	0,47	0,494
	Pasożyty stwierdzone podczas inkubacji				
	<i>Haemoproteus</i> ⁴	1	0,79±0,53	2,34	0,126
	<i>Plasmodium</i> ⁴	1	0,77±0,53	2,26	0,133
	<i>Leucocytozoon</i> ⁴	1	0,93±0,46	4,06	0,044

¹Poziom referencyjny: 2013

²Poziom referencyjny: 2

³Poziom referencyjny: grupa kontrolna

⁴Poziom referencyjny: brak zarażenia pasożytem

4. DYSKUSJA

Przedstawione badania jako pierwsze określają charakter oddziaływania między czterema rodzajami powszechnych ptasich pasożytów krwi na podstawie zmian w statusie zarażenia między dwoma punktami czasowymi. Dotychczasowe badania określały ten parametr wyłącznie na podstawie informacji o statusie zarażenia w jednym punkcie czasowym. Badania w populacji modraszki wykazały, że w 58% rozpatrywanych powiązań między parami rodzajów pasożytów oddziaływania są neutralne (7 z 12 zależności pasożyt–pasożyt), a w 42% przyjmują charakter synergistyczny (3 z 12) bądź antagonistyczny (2 z 12). W szczególności, stwierdzono, że zarażenie przez *Leucocytozoon* zwiększa szanse rozwoju zarażenia przez *Haemoproteus*, natomiast obecność *Trypanosoma* zwiększa szanse zarażenia przez *Leucocytozoon*. Z kolei *Haemoproteus* i *Plasmodium* były dwustronnie powiązane antagonistycznie. Co istotne, w żadnym z rozpatrywanych układów charakter oddziaływania nie zmieniał się w wyniku zabiegu eksperymentalnego, który miał na celu zróżnicowanie dobrostanu żywiciela.

Synergistyczna zależność we współpasożytnictwie *Leucocytozoon* i *Haemoproteus* została wcześniej zaobserwowana u piskląt myszołowa *Buteo buteo* i krogulca *Accipiter nisus* (Svobodová i wsp. 2015). Oba pasożyty są przenoszone przez różne wektory: *Leucocytozoon* przez meszkowate, natomiast *Haemoproteus* przez kuczmanowate, co oznacza, że żywiciel zostaje zarażony niezależnie (Synek et al. 2013). Svobodová i wsp. (2015) zasugerowali, że taki wynik może być przypadkowy w związku z niewielką prewalencją *Haemoproteus* w badanej populacji. Jednak w przypadku danych z modraszki prewalencja obu pasożytów była znacząca (na etapie inkubacji: *Haemoproteus* – 45,3%, *Leucocytozoon* – 20,9%). Takiej zależności natomiast nie stwierdzono u krzyżodzioba modrzewiowego *Loxia leucoptera* pomiędzy *Haemoproteus fringillae* i *Leucocytozoon fringillinarum* (Deviche i wsp. 2010). U modraszki dominującym morfogatunkiem był *Haemoproteus majoris*, co może mieć przełożenie na odmienny charakter oddziaływań z innymi pasożytami. Negatywna zależność pomiędzy *Haemoproteus* i *Leucocytozoon* została natomiast stwierdzona w badaniach na grupie 47 gatunków ptaków schwytanych na Alasce w trakcie sezonu lęgowego (Oakgrove i wsp. 2014). Prewalencja *Leucocytozoon* była we wspomnianych badaniach najwyższa spośród stwierdzonych pasożytów krwi, co autorzy tłumaczą ewentualną niską wirulencją tego pasożyta, umożliwiającą występowanie

niezależnie od innych taksonów. *Haemoproteus* uznawany jest za rodzaj o niskim stopniu patogeniczności (Atkinson i van Riper 1991, Bennett i wsp. 1993). Z kolei o poziomie wirulencji *Leucocytozoon* u dziko żyjących wróblowych niewiele jest wiadomo, a doniesienia o wyższej śmiertelności pochodzą głównie z badań na blaszkodziobych i grzebiących lub na taksonach nie mających na wolności kontaktu z tym pasożytem (Donovan i wsp. 2008, Atkinson i wsp. 2009). Częstsze występowanie *Haemoproteus* u modraszek już zarażonych przez *Leucocytozoon* może wynikać z zaangażowania układu immunologicznego w kontrolowanie zarażenia *Leucocytozoon*.

Stwierdzono, że *Leucocytozoon* był też częścią synergistycznej zależności z innym rodzajem pasożyta – *Trypanosoma*. Pomimo stosunkowo niewysokiej prewalencji na poziomie 20,9% (inkubacja) i 20,1% (dzień 14. życia piskląt), w większości przypadków *Leucocytozoon* występował jednocześnie z przynajmniej jeszcze jednym rodzajem pasożyta. Może to sugerować, że zarażenie przez *Leucocytozoon* rozwija się częściej, jeżeli żywiciel jest już zarażony innym pasożytem. Synergistyczna zależność, w niektórych przypadkach obustronna, pomiędzy *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* została już stwierdzona u kilku innych gatunków ptaków, w tym krogulca zwyczajnego i krogulca zmiennego *Accipiter striatus*, myszołowa i krzyżodzioba modrzewiowego, a także w badaniach, w których analizę przeprowadzano nie na poziomie gatunku żywiciela, ale grupy gatunków (Kirkpatrick i Lauer 1985, Arriero i Moller 2008, Deviche i wsp. 2010, Oakgrove i wsp. 2014, Svobodová i wsp. 2015). Tak liczne doniesienia o współwystępowaniu tych dwóch rodzajów pasożytów mogą być częściowo tłumaczone posiadaniem wspólnego wektora – meszkowatych (Svobodová i wsp. 2015), chociaż sytuacja taka nie dotyczy wszystkich gatunków pasożytów z obu rodzajów. Pasożyty z rodzaju *Trypanosoma* mogą być również przenoszone przez krwio pijne muchówki z innych rodzin, a także przez roztocza (Baker 1976). Oakgrove i wsp. (2014) stwierdzili, że na synergistyczną zależność pomiędzy tymi dwoma pasożytami ma wpływ przede wszystkim pierwsze zarażenie *Trypanosoma*. Podobne wnioski dotyczące współwystępowania *Leucocytozoon* z innymi pasożytami zasugerowano również w badaniach na bogatce, gdzie stwierdzono że 81,5% zarażonych osobników wykazało współpasożytnictwo *Leucocytozoon* z *Haemoproteus* lub *Plasmodium* (van Rooyen i wsp. 2013).

Zależność między *Haemoproteus* i *Plasmodium* miała dwustronny charakter antagonistyczny. W przypadku występowania jednego z tych pasożytów w okresie inkubacji prawdopodobieństwo wykrycia drugiego w dniu 14. życia piskląt było znacznie niższe. Negatywną zależność pomiędzy tymi rodzajami pasożytów zaobserwowano również u kosa *Turdus merula*, nawet w okresach, gdy prewalencja obu pasożytów była wysoka (Hatchwell i wsp. 2000). Meixell i wsp. (2016) u przebadanych 1347 blaszkodziobych stwierdzili prewalencję *Haemoproteus* na poziomie 20,9% i *Plasmodium* – 9,7%. Biorąc pod uwagę częstość występowania tych pasożytów w populacji powinny one współwystępować u ok. 2% ptaków, czyli w 27 przypadkach (Apendyks 3). Natomiast we wspomnianych badaniach stwierdzono tylko 2 przypadki współwystępowania tych pasożytów, co sugeruje oddziaływania antagonistyczne. Przy zbliżonych poziomach prewalencji nie wykryto współpasożytnictwa *Plasmodium* i *Haemoproteus* u ptaków grzebiących (Smith i wsp. 2016). Nie zaobserwowano również współwystępowania pasożytów z tych dwóch rodzajów u bogatki (van Rooyen i wsp. 2013), modraszki (Cosgrove i wsp. 2006; 2008) ani w pracy na 47 gatunkach ptaków występujących na Alasce (Oakgrove i wsp. 2014), co po części może wynikać z niskiej prewalencji jednego z pasożytów. Jednak zdarzają się również przypadki częstego współwystępowania pasożytów z tych dwóch rodzajów – u bursztyнки *Protonotaria citrea* z 187 przebadanych ptaków 34% było zarażone jednocześnie *Haemoproteus* i *Plasmodium* (prewalencja *Haemoproteus* – 36%, *Plasmodium* – 44%; Grillo i wsp. 2012).

Niska prewalencja współpasożytnictwa *Plasmodium* i *Haemoproteus* może potencjalnie, przynajmniej częściowo, wynikać z niedoskonałości technik wykrywania pasożytów, ponieważ infekcja *Haemoproteus* charakteryzuje się znacznie wyższą intensywnością zarażenia niż *Plasmodium*, w wyniku czego ten rodzaj pasożyta może być łatwiej wykrywalny zarówno na rozmazach, jak i za pomocą technik molekularnych (Valkiūnas 2005). Z drugiej strony zauważono, że niektóre z powszechnie wykorzystywanych starterów do namnażania sekwencji z genomu *Plasmodium* i *Haemoproteus* mogą powodować wybiórczość polimerazy DNA w zależności od linii genetycznej i w przypadku mieszanych inwazji selektywne amplifikowanie DNA jednego z pasożytów (Pérez-Tris i Bensch 2005, Valkiūnas i wsp. 2006, Martínez i wsp. 2009). Przeprowadzone analizy rozmazów krwi ze względu na bardzo niską wykrywalność

Plasmodium (brak lub pojedyncze pasożyty na rozmazie) uniemożliwiły potwierdzenie tej zależności za pomocą mikroskopii świetlnej, gdyż prewalencja stwierdzona za pomocą mikroskopii świetlnej była znikoma w porównaniu do prewalencji stwierdzonej metodami molekularnymi (38,9% podczas inkubacji, 39,6% w D14. życia piskląt). Antagonistyczna zależność pomiędzy dwoma pasożytami może wynikać także np. z większej skuteczności układu immunologicznego żywiciela względem jednego z pasożytów, warunków środowiskowych wewnątrz żywiciela, które mogą być bardziej optymalne dla jednego z pasożytów lub jeden z pasożytów może być bardziej konkurencyjny (Oakgrove i wsp. 2014). Negatywna zależność pomiędzy ww. pasożytami w przypadku modraszki ma charakter dwustronny, tzn. oba pasożyty wpływają antagonistycznie na rozwój drugiego taksonu. W takim wypadku istotne jest, który z pasożytów pojawi się pierwszy w organizmie żywiciela, co może zależeć od terminu, w którym pojawiają się wektory poszczególnych pasożytów.

Za charakter oddziaływań między pasożytami krwi może odpowiadać kilka mechanizmów, które można sklasyfikować jako pośrednie lub bezpośrednie (Pedersen i Fenton 2007). Do pierwszej kategorii zalicza się konkurencję o zasoby żywiciela pomiędzy współwystępującymi pasożytami (Wotton 1994) oraz reakcję układu odpornościowego na poszczególne rodzaje pasożytów (Pedersen i Fenton 2007). Z oddziaływaniami bezpośrednimi mamy do czynienia, gdy fizyczna obecność jednego pasożyta wpływa na innego pasożyta, gdy oba organizmy przebywają w tym samym miejscu w żywicielu. Takie oddziaływanie zachodzą przeważnie w przypadku pasożytów z jednej gildii pasożytniczej – zgrupowania taksonów na podstawie zbliżonego sposobu pasożytowania (Pedersen i Fenton 2007). Może to oznaczać, że oddziaływanie pomiędzy badanymi przeze mnie pasożytami krwi mają w pewnych przypadkach charakter bezpośredni. Zmiany w charakterze zależności pomiędzy współwystępującymi pasożytami w niektórych przypadkach mogą wynikać z odmiennych gatunków w zgrupowaniu pasożytów, czy też gatunku żywiciela. Jednak, żeby lepiej poznać zjawisko współpasożytnictwa w szerszym ujęciu na wyższych jednostkach taksonomicznych konieczne jest kontynuowanie badań zgrupowań pasożytów na poziomie pojedynczych gatunków żywicieli. Istotne jest ujęcie w analizach możliwie jak największej liczby taksonów współwystępujących pasożytów, ze względu na skomplikowaną sieć zależności pomiędzy nimi. Warte uwagi jest podejście

opisane przez Rynkiewicz i wsp. (2015), w którym traktuje się żywicieli jako ekosystemy, w których bada się zgrupowanie pasożytów. W takich ekosystemach można badać wpływ poszczególnych pasożytów według koncepcji stosowanych w badaniach ekosystemów z wolno żyjącymi organizmami. Autorzy ww. pracy proponują badanie zgrupowania pasożytów na podstawie czterech ekologicznych koncepcji: 1) stabilność środowiska w obrębie organizmu żywiciela, 2) ograniczonych zasobów dostępnych dla pasożytów, 3) czynników działających w obrębie zgrupowania pasożytów, jak modyfikacja działania układu odpornościowego żywiciela, czy też wpływ pasożytów, które wnikają do żywiciela jako pierwsze oraz 4) zestawienie oddziaływań międzypasożytniczych w obrębie jednego żywiciela i w całej populacji. Rynkiewicz i wsp. (2015) sugerują, że takie podejście umożliwi lepsze poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za oddziaływanie w zgrupowaniu pasożytów. Innymi słowy poprzez poznanie poszczególnych czynników kształtujących zgrupowanie pasożytów będzie możliwe przewidywanie kierunku oddziaływań między pasożytami z konkretnych taksonów. Z drugiej strony badania nad zgrupowaniami pasożytniczych helmintów u ssaków i ptaków wykazały, że kształtowanie się zgrupowania jest raczej wypadkową losowych czynników niż procesem przewidywalnym i powtarzalnym (Poulin 1996). Dodatkowym aspektem pozostaje analizowanie zarażenia pasożytami w różnych punktach czasowych, ponieważ zwiększa to szanse na określenie kierunku oddziaływań między pasożytami, tzn. na ile istotna jest kolejność zarażania pasożytami. Dysponując takimi danymi zwiększamy szanse na wyjaśnienie mechanizmów rozwoju zarażenia przez pasożyty oraz kształtowania się zależności pomiędzy nimi.

Obecne badania wykazały, że czynnik, który potencjalnie może silnie wpływać na kondycję żywiciela oraz na funkcjonowanie jego układu immunologicznego (Richner i wsp. 1993, Oppliger i wsp. 1994, Christe i wsp. 1996) – obecność pcheł w gnieździe – nie wpływał ani na siłę, ani na charakter oddziaływań pomiędzy pasożytami krwi. Zarówno w grupie eksperymentalnej, jak i kontrolnej zależności pomiędzy pasożytami z różnych taksonów były podobne i dodatkowe obciążenie organizmu żywiciela presją ze strony ektopasożytów nie spowodowało istotnego wzmocnienia zależności. Zabieg eksperymentalny nie zróżnicował kondycji samic rozumianej jako nagromadzone zapasy energetyczne, chociaż negatywny wpływ ektopasożytów (w tym pcheł) na masę samicy

został zaobserwowany w innych badaniach na modraszce (Tomás i wsp. 2008). Być może zabieg eksperymentalny mógł wpłynąć na układ immunologiczny żywiciela, bez widocznego wpływu na kondycję. Ukąszenia ektopasożytów powodują stan zapalny w skórze oraz odpowiedź immunologiczną nieswoistą, a następnie swoistą, ponieważ powodują uszkodzenie skóry oraz wprowadzenie antygenów do organizmu żywiciela (Owen i wsp. 2010). Jednak część badań nie wykazała powiązań między odpowiedzią immunologiczną żywiciela i obroną przed konkretnymi ektopasożytami (Ardia i Schat 2008). Ptaki również posiadają szereg różnych odpowiedzi obronnych przeciw ektopasożytom nie związanych z układem odpornościowym. Przykładowo mogą inwestować zasoby w specyficzną strukturę upierzenia i jego toksyczne właściwości lub też w ramach zmian behawioralnych więcej czasu poświęcać na higienę ciała i czyszczenie gniazda (przegląd w Clayton i wsp. 2010). Tomás i wsp. (2008) pomimo stwierdzenia negatywnego wpływu pcheł na masę samic modraszki oraz pozytywnego na obecność pasożytów krwi, nie wykazali zależności pomiędzy masą ciała samic a prevalencją pasożytów krwi. Autorzy ci sugerują, że na różnice w prevalencji endopasożytów mogą wpływać też inne czynniki, np. wysiłek ptaków podczas rozrodu, które mogą modyfikować wpływ obecności ektopasożytów. Istotne znaczenie może mieć fakt, że większość stwierdzonych infekcji pasożytów krwi była już obecna na etapie inkubacji, to znaczy, że zarażenie pasożytami musiało nastąpić w poprzednich sezonach lęgowych, ponieważ na etapie inkubacji wektory dopiero pojawiają się w środowisku, więc wykrycie nowej infekcji nie jest możliwe. W przypadkach, gdy zarażenie pasożytem nastąpiło w poprzednich latach należy mówić o chronicznym stadium zarażenia, gdy żywiciel utrzymuje infekcję pasożytniczą na kontrolowanym niskim poziomie, ponieważ całkowite wyeliminowanie pasożyta może być zbyt kosztowne energetycznie (Atkinson i wsp. 2001, Valkiūnas 2005). Być może wpływ ektopasożytów na kształtowanie się współzależności pomiędzy endopasożytami może być istotny w początkowej fazie inwazji pasożytniczej, gdy organizm przechodzi przez ostre stadium infekcji. Jednak w przypadku prezentowanych badań, pomiędzy inkubacją a końcem okresu piskłego zaobserwowano tylko nieliczne przypadki inwazji, które można zakwalifikować jako nowe, więc ewentualny wpływ ektopasożytów na zgrupowanie endopasożytów może być trudny do zaobserwowania.

W badaniach na modraszce dzięki zastosowaniu pomiarów w dwóch punktach czasowych określono nie tylko charakter (synergistyczny, antagonistyczny lub neutralny), ale i kierunek zależności między pasożytami (jedno- lub dwukierunkowa). W przypadku zależności w parze *Haemoproteus* – *Leucocytozoon* synergistyczny charakter jest zbieżny tylko z częścią wyników innych prac. Może to wynikać z wpływu morfogatunków pasożytów – różnice w przebiegu współpasożytnictwa pomiędzy różnymi morfogatunkami zostały stwierdzone nawet w obrębie jednego rodzaju (Richie 1988). Synergistyczny charakter zarażenia *Leucocytozoon* potwierdzony także podczas współwystępowania z *Trypanosoma* pokrywa się z większością danych literaturowych, gdzie ten takson opisywany jest jako częściej występujący w koinwazjach. Natomiast silna negatywna zależność pomiędzy *Haemoproteus* i *Plasmodium*, obserwowana wcześniej w wielu innych pracach, może wynikać zarówno z konkurencji między tymi pasożytami, jak i niedoskonałości technik molekularnych. W celu lepszego zrozumienia sieci zależności pomiędzy pasożytami krwi ptaków kluczowe jest prowadzenie badań na wielu rodzajach współwystępujących pasożytów biorąc pod uwagę dane z różnych punktów czasowych, co zwiększy szanse zrozumienia przebiegu koinwazji.

5. LITERATURA

- Ardia D.R., Schat K.A. 2008. Ecoimmunology. W: Davidson F., Kaspers B., Schat K.A. (red.). Avian Immunology. Academic Press. London, s. 421-441.
- Arriero E., Møller A. P. 2008. Host ecology and life-history traits associated with blood parasite species richness in birds. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1504-1513.
- Atkinson C. T., Dusek R. J., Lease J. K. 2001. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. *Journal of Wildlife Diseases* 37: 20-27.
- Atkinson C. T., Thomas N. J., Hunter D. B. 2009. Parasitic diseases of wild birds. John Wiley and Sons. Ames.
- Atkinson C. T., van Riper III C. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. Bird-parasite interactions. W: Loye J. T., Zuk M. (red.). Oxford University Press. Oxford, s. 19-48.

- Baker J. R. 1976. Biology of the trypanosomes of birds. W: Lumsden W. H. R., Evans D. A. (red.). Biology of the Kinetoplastida. Vol. 2. Academic Press Inc. London, s. 131-174.
- Bennett G. F., Peirce M. A., Ashford R. W. 1993. Avian haematozoa: mortality and pathogenicity. *Journal of Natural History* 27: 993-1001.
- Bensch S., Hellgren O., Pérez-Tris J. 2009. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* 9: 1353-1358.
- Bordes F., Morand S. 2011. The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infection Ecology and Epidemiology* 1: 7346.
- Brown C. R., Brown M. B., Rannala B. 1995. Ectoparasites reduce long-term survival of their avian host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 262: 313-319.
- Burke T., Bruford M.W., Hanotte O., Brookfield J. F. Y. 1998. Multilocus and single-locus DNA fingerprinting. W: Hoelzel A.R. (red.) Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. IRL Press. Oxford, s. 287-336.
- Christe P., Richner H., Oppliger A. 1996. Of great tits and fleas: sleep baby sleep... . *Animal Behaviour* 52: 1087-1092.
- Clayton D. H., Koop J. A., Harbison C. W., Moyer B. R., Bush S. E. 2010. How birds combat ectoparasites. *The Open Ornithology Journal* 3: 41-71.
- Combes C. 1999. Ekologia i ewolucja pasożytnictwa: długotrwałe wzajemne oddziaływania. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Cosgrove C. L., Knowles S. C., Day K. P., Sheldon B. C. 2006. No evidence for avian malaria infection during the nestling phase in a passerine bird. *Journal of Parasitology* 92: 1302-1304.
- Cosgrove C. L., Wood M. J., Day K. P., Sheldon B. C. 2008. Seasonal variation in *Plasmodium* prevalence in a population of blue tits *Cyanistes caeruleus*. *Journal of Animal Ecology* 77: 540-548.
- Cox F. E. G. 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* 122 (Supplement): S23-S38.

- Cox F. E. G., Wedderburn N., Salaman M. H. 1974. The effect of Rowson-Parr virus on the severity of malaria in mice. *Microbiology* 85: 358-364.
- Cramp S., Perrins C. M. 1993. Paridae. Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa 7. Oxford University Press. Oxford, s. 145-281.
- Deviche P., Fokidis H. B., Lerbour B., Greiner E. 2010. Blood parasitaemia in a high latitude flexible breeder, the white-winged crossbill, *Loxia leucoptera*: contribution of seasonal relapse versus new inoculations. *Parasitology* 137: 261-273.
- Dhondt A. A., Dhondt K. V., Nazeri S. 2017. Apparent effect of chronic *Plasmodium* infections on disease severity caused by experimental infections with *Mycoplasma gallisepticum* in house finches. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 6: 49-53.
- Dobson A. P. 1985. The population dynamics of competition between parasites. *Parasitology* 91: 317-347.
- Donovan T. A., Schrenzel M., Tucker T. A., Pessier A. P., Stalis I. H. 2008. Hepatic hemorrhage, hemocoelom, and sudden death due to *Haemoproteus* infection in passerine birds: eleven cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20: 304-313.
- Goater T. M., Goater C. P., Esch G. W. 2014. Parasitism. The Diversity and Ecology of Animal Parasites. Cambridge University Press. Cambridge.
- Godfrey Jr R. D., Fedynich A. M., Pence D. B. 1987. Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases* 23: 558-565.
- Gosling P. J. 2005. Dictionary of Parasitology. CRC Press. Boca Raton
- Griffiths R., Double M. C., Orr K., Dawson R. J. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Grillo E. L., Fithian R. C., Cross H., Wallace C., Viverette C., Reilly R., Mayer D. G. 2012. Presence of *Plasmodium* and *Haemoproteus* in breeding prothonotary warblers (*Protonotaria citrea*: Parulidae): temporal and spatial trends in infection prevalence. *Journal of Parasitology* 98: 93-102.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

- Hatchwell B. J., Wood M. J., Anwar M., Perrins C. M. 2000. The prevalence and ecology of the haematozoan parasites of European blackbirds, *Turdus merula*. *Canadian Journal of Zoology* 78: 684-687.
- Hellgren O., Waldenström J., Bensch S. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90: 797-802.
- Ilmonen P., Hakkarainen H., Koivunen V., Korpimäki E., Mullie A., Shutler D. 1999. Parental effort and blood parasitism in Tengmalm's owl: effects of natural and experimental variation in food abundance. *Oikos* 86: 79-86.
- Infante-Duarte C., Kamradt T. 1999. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Seminars in Immunopathology* 21: 317-338.
- Kirkpatrick C. E., Lauer D. M. 1985. Hematozoa of raptors from southern New Jersey and adjacent areas. *Journal of Wildlife Diseases* 21: 1-6.
- Krasnov B. R. 2008. Functional and Evolutionary Ecology of Fleas: a model for ecological parasitology. Cambridge University Press. Cambridge.
- Lello J., Boag B., Fenton A., Stevenson I. R., Hudson P. J. 2004. Competition and mutualism among the gut helminths of a mammalian host. *Nature* 428: 840-844.
- Martínez J., Martínez-De La Puente J., Herrero J., Del Cerro S., Lobato E., Rivero-de Aguilar J., Vásquez R. A., Merino, S. 2009. A restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: on the inefficiency of general primers for detection of mixed infections. *Parasitology* 136: 713-722.
- Meixell B. W., Arnold T. W., Lindberg M. S., Smith M. M., Runstadler J. A., Ramey A. M. 2016. Detection, prevalence, and transmission of avian hematozoa in waterfowl at the Arctic/sub-Arctic interface: co-infections, viral interactions, and sources of variation. *Parasites and Vectors* 9: 390.
- Mideo N. 2009. Parasite adaptations to within-host competition. *Trends in Parasitology* 25: 261-268.
- Møller A. P., Nielsen J. T. 2007. Malaria and risk of predation: a comparative study of birds. *Ecology* 88: 871-881.

- Oakgrove K. S., Harrigan R. J., Loiseau C., Guers S., Seppi B., Sehgal R. N. 2014. Distribution, diversity and drivers of blood-borne parasite co-infections in Alaskan bird populations. *International Journal for Parasitology* 44: 717-727.
- Oppliger A., Richner H., Christe P. 1994. Effect of an ectoparasite on lay date, nest-site choice, desertion, and hatching success in the great tit (*Parus major*). *Behavioral Ecology* 5: 130-134.
- Owen J. P., Nelson A. C., Clayton D. H. 2010. Ecological immunology of bird-ectoparasite systems. *Trends in Parasitology* 26: 530-539.
- Palinauskas V., Markovets M. Y., Kosarev V. V., Efremov V. D., Sokolov L. V., Valkiūnas G. 2005. Occurrence of avian haematozoa in Ekaterinburg and Irkutsk districts of Russia. *Ekologija* 4: 8-12.
- Pedersen A. B., Fenton A. 2007. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 133-139.
- Petney T. N., Andrews R. H. 1998. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *International Journal for Parasitology* 28: 377-393.
- Pérez-Tris J., Bensch S. 2005. Diagnosing genetically diverse avian malarial infections using mixed-sequence analysis and TA-cloning. *Parasitology* 131: 15-23.
- Poulin R. 1996. Richness, nestedness, and randomness in parasite infracommunity structure. *Oecologia* 105: 545-551.
- Przybylo R., Sheldon B. C., Merilä J. 2000. Climatic effects on breeding and morphology: evidence for phenotypic plasticity. *Journal of Animal Ecology* 69: 395-403.
- Richie T. L. 1988. Interactions between malaria parasites infecting the same vertebrate host. *Parasitology* 96: 607-639.
- Richner H., Oppliger A., Christe P. 1993. Effect of an ectoparasite on reproduction in great tits. *Journal of Animal Ecology* 62: 703-710.
- Rynkiewicz E. C., Pedersen A. B., Fenton A. 2015. An ecosystem approach to understanding and managing within-host parasite community dynamics. *Trends in Parasitology* 31: 212-221.

- Sehgal R. N., Jones H. I., Smith T. B. 2001. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology* 10: 2319-2327.
- Silveira P., Marin S. Y., Moreira P. A., Tocantins B. B., Lacorte G., Paixao T. A., Martins N. R., Braga E. M. 2013. Interactions of *Plasmodium juxtanucleare* and chicken anaemia virus: establishing a model. *Parasitology* 140: 1777-1788.
- Smith M. M., Van Hemert C., Merizon R. 2016. Haemosporidian parasite infections in grouse and ptarmigan: Prevalence and genetic diversity of blood parasites in resident Alaskan birds. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5: 229-239.
- Svensson L. 1992. Identification guide to European passerines. Svensson, Stockholm.
- Svobodová M., Weidinger K., Peške L., Volf P., Votýpka J., Voříšek P. 2015. Trypanosomes and haemosporidia in the buzzard (*Buteo buteo*) and sparrowhawk (*Accipiter nisus*): factors affecting the prevalence of parasites. *Parasitology Research* 114: 551-560.
- Synek P., Munclinger P., Albrecht T., Votýpka J. 2013. Avian haemosporidians in haematophagous insects in the Czech Republic. *Parasitology Research* 112: 839-845.
- Telfer S., Lambin X., Birtles R., Beldomenico P., Burthe S., Paterson S., Begon M. 2010. Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* 330: 243-246.
- Tomás G., Merino S., Martínez-de la Puente J., Moreno J., Morales J., Lobato E. 2008. Determinants of abundance and effects of blood-sucking flying insects in the nest of a hole-nesting bird. *Oecologia* 156: 305-312.
- Valkiūnas G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC press. Boca Raton.
- Valkiūnas G., Bensch S., Iezhova T. A., Križanauskienė A., Hellgren O., Bolshakov C. V. 2006. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. *Journal of Parasitology* 92: 418-422.

- Van Rooyen J., Lalubin F., Glaizot O., Christe P. 2013. Avian haemosporidian persistence and co-infection in great tits at the individual level. *Malaria Journal* 12: 40.
- Waldenström J., Bensch S., Hasselquist D., Östman Ö. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90: 191-194.
- Wootton J. T. 1994. Predicting direct and indirect effects: an integrated approach using experiments and path analysis. *Ecology* 75: 151-165.
- Wright E. J., Nayar J. K., Forrester D. J. 2005. Interactive effects of turkeypox virus and *Plasmodium hermani* on turkey poults. *Journal of Wildlife Diseases* 41: 141-148.
- Zamora-Vilchis I., Williams S. E., Johnson C. N. 2012. Environmental temperature affects prevalence of blood parasites of birds on an elevation gradient: implications for disease in a warming climate. *PLoS One* 7: e39208.

ROZDZIAŁ II

Wpływ współwystępowania pasożytów krwi na elementy biologii rozrodu modraszki *Cyanistes caeruleus* w warunkach eksperymentalnie manipulowanego dobrostanu żywiciela

1. WSTĘP

Rozmnażanie wiąże się z dużym zapotrzebowaniem energetycznym (Møller 1997). Jednak w środowisku naturalnym wiele czynników biotycznych i abiotycznych limituje ilość zasobów, które organizm może przyswoić i zainwestować w rozród (Møller i wsp. 1990, Arlettaz i wsp. 2017). Jednym z takich czynników są pasożyty. Pasożyty mogą oddziaływać na kondycję żywiciela, a takie oddziaływanie może być wręcz nasilone w przypadku jednoczesnego wpływu wielu różnych pasożytów (Møller i wsp. 1990, Petney i Andrews 1998, Bordes i Morand 2011). Wpływ zgrupowania pasożytów na dobrostan i rozród żywiciela może być jednak trudny do określenia w warunkach naturalnych ze względu na kompromisy pomiędzy różnymi funkcjami organizmu. Dotychczasowe badania wskazują, że niektóre zależności ujawniają się tylko w warunkach, które negatywnie oddziałują na kondycję, czy też szeroko rozumiany dobrostan organizmu, np. gdy ograniczona jest dostępność pokarmu (Korpimäki i wsp. 1993). W takiej sytuacji zastosowanie kontrolowanego czynnika wpływającego negatywnie na żywiciela może ujawnić wpływ pasożytów na rozród. Samice przystępujące do rozrodu i poddane oddziaływaniu pasożytów reprezentujących różne taksony będą dysponowały odmiennymi poziomami zasobów, które mogą przeznaczać w funkcje związane z dobrostanem oraz rozród.

Wpływ pasożytów może zależeć od tego, jaki reprezentują rodzaj, gatunek czy linię genetyczną (Palinauskas i wsp. 2008), a także od tego, czy występują w żywicielu jako jedyny takson, czy też z innymi taksonami pasożytów. Inwazje pasożytnicze mogą wpływać na poszczególne etapy okresu lęgowego ptaków, m.in. termin przystąpienia do lęgu, liczbę i wielkość jaj, przeżywalność piskląt i liczbę podlotów, które opuściły gniazdo (Møller 1997, Pigeault i wsp. 2018, Fletcher i wsp. 2019, Pigeault i wsp. 2020). Choć powstało wiele prac na temat wpływu pasożytów na elementy biologii lęgowej, często dotyczyły one inwazji pasożytów reprezentujących jeden takson z pominięciem wpływu współpasożytnictwa. Møller (1997) w pracy przeglądowej wykazał negatywny wpływ pasożytów na następujące parametry: czas przystąpienia do rozrodu przez żywiciela (stwierdzone opóźnienie w 67% spośród 9 prac na różnych gatunkach), wielkość zniesienia (zmniejszona w 38% spośród 13 prac na różnych gatunkach), wielkość lęgu (obniżona w 61% spośród 44 prac na różnych gatunkach), masę piskląt (obniżona w 63% spośród 30

prac na różnych gatunkach). Jednak w pracach wziętych pod uwagę w tym opracowaniu był analizowany głównie wpływ ektopasożytów, a ponadto większość danych dotyczyła wpływu pasożytów reprezentujących jeden takson (Møller 1997).

Jednymi z powszechnie występujących pasożytów ptaków są endopasożyty z królestwa Protozoa (Atkinson i wsp. 2009, Goater i wsp. 2014). W niniejszej pracy skupiono się na pasożytach należących do rodzajów: *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon*; grupa Haemosporidia, typ Apikompleksa oraz *Trypanosoma*; typ Euglenozoa (Adl i wsp. 2019). Wybrane rodzaje pasożytów spędzają większość swojego cyklu życiowego w układzie krwionośnym żywiciela i w związku z tym nazywa się je pasożytami krwi (Gosling 2005). Wpływ pasożytów krwi na rozród ptaków jest szczególnie interesujący ze względu na fakt występowania zjawiska współobecności pasożytów z tej grupy w organizmie jednego żywiciela (Gryczynska i wsp. 2000, Valkiūnas 2005, Grillo i wsp. 2012, Van Rooyen i wsp. 2013, Dubiec i wsp. 2016). Dotychczasowe dane dotyczące tego zagadnienia ograniczają się do kilku badań (Evans i Otter 1998, Sanz i wsp. 2001b, Davidar i Morton 2006, Gilman i wsp. 2006, Marzal i wsp. 2008, 2013, Marinov i wsp. 2017). W badaniach na muchołowiec żałobnej *Ficedula hypoleuca* nie wykazano istotnego wpływu współpasożytnictwa *Haemoproteus* i *Trypanosoma* na objętość jaj, liczbę jaj czy też datę przystąpienia do lęgu (brak zarażenia vs zarażenie pasożytami tylko z jednego taksonu vs zarażenie pasożytami z dwóch taksonów; Sanz i wsp. 2001b). Natomiast w badaniach dotyczących wpływu współpasożytnictwa na rozród u oknówki *Delichon urbicum*, stwierdzono wcześniejsze składanie jaj oraz większe zniesienia u samic zarażonych jednocześnie dwiema liniami genetycznymi (w większości przypadków dwiema liniami genetycznymi *Haemoproteus*) w porównaniu z samicami niezarażonymi lub zarażonymi pasożytami reprezentującymi jedną linię genetyczną (Marzal i wsp. 2008). Tak niewielka ilość zebranych dotychczas danych na temat wpływu współpasożytnictwa na elementy biologii lęgowej wynika po części z analizowania jedynie wpływu pasożytów z pojedynczych taksonów. Ponadto, nawet jeżeli badany jest stan zarażenia pasożytami z różnych taksonów, to przypadki współpasożytnictwa mogą być nieliczne (Sundberg 1995, Van Rooyen i wsp. 2014).

Dane dotyczące wpływu pasożytów krwi reprezentujących pojedyncze taksony na elementy biologii lęgowej ptaków są stosunkowo liczne (Tab. 1). Jednak na ich podstawie

trudno jest określić dominujący charakter wpływu pasożytów na poszczególne elementy biologii rozrodu. Obserwowane zróżnicowanie we wpływie pasożytów reprezentujących jeden takson na elementy biologii lęgu zależy od różnic między badanymi gatunkami żywicieli i rodzajami pasożytów. Prawdopodobnie z tego względu również ilość danych o wpływie współpasożytnictwa jest niewielka, podobnie jak liczba badań na populacjach o wysokim stopniu współpasożytnictwa. Wykorzystanie w badaniach populacji żywiciela, w której występują z dużą częstością inwazje pasożytów reprezentujących różne taksony, zwiększa szanse na występowanie współpasożytnictwa.

Tabela 1. Zestawienie wyników badań dotyczących wpływu inwazji pasożytów krwi reprezentujących jeden takson na elementy biologii lęgowej ptaków. + – wpływ pozytywny; - – wpływ negatywny, 0 – brak wpływu; sukces wylotu – % piskląt, które opuściły gniazdo.

Element biologii lęgowej	Żywiciel	Takson pasożyta	Wpływ	Literatura
Data zniesienia	bogatka <i>Parus major</i>	<i>Haemoproteus</i>	-	Allander i Bennett 1995
	gąsiorek <i>Lanius collurio</i>	<i>Haemoproteus</i>	-	Votypka i wsp. 2003
	mucholówka żałobna	<i>Haemoproteus</i>	+	Sanz i wsp. 2001b
	<i>Ficedula hypoleuca</i>	<i>Haemoproteus</i>	0	Sanz i wsp. 2001a
		<i>Trypanosoma</i>	0	Sanz i wsp. 2001b
	oknówka <i>Delichon urbicum</i>	<i>Plasmodium</i>	-	Marzal i wsp. 2008
Wielkość zniesienia	mucholówka żałobna	<i>Haemoproteus</i>	+	Sanz i wsp. 2001a
	bogotka	<i>Plasmodium</i>	+	Oppliger i wsp. 1997
		<i>Plasmodium</i>	0	Pigeault i wsp. 2018
		<i>Haemoproteus</i>	0	Pigeault i wsp. 2018
		<i>Leucocytozoon</i>	0	Pigeault i wsp. 2018
	modraszka	<i>Haemoproteus</i>	-	Merila i Andersson 1999
	<i>Cyanistes caeruleus</i>			
	oknówka <i>Delichon urbicum</i>	<i>Haemoproteus</i>	-	Marzal i wsp. 2005
		<i>Plasmodium</i>	0	Marzal i wsp. 2008
	bogatka	<i>Haemoproteus</i>	-	Norte i wsp. 2009
	włochatka <i>Aegolius funereus</i> ¹	<i>Leucocytozoon</i>	-	Korpimäki i wsp. 1993

Rozdział II

Wielkość jaj	bogatka	<i>Trypanosoma</i>	-	Dufva 1996
		<i>Plasmodium</i>	-	Norte i wsp. 2009
Sukces klucia	bogatka	<i>Trypanosoma</i>	-	Dufva 1996
		<i>Plasmodium</i>	0	Pigeault i wsp. 2018
		<i>Haemoproteus</i>	0	Pigeault i wsp. 2018
		<i>Leucocytozoon</i>	0	Pigeault i wsp. 2018
	mucholówka żałobna	<i>Haemoproteus</i>	-	Sanz i wsp. 2001a
		<i>Trypanosoma</i>	0	Sanz i wsp. 2001a
	oknówka	<i>Haemoproteus</i>	-	Marzal i wsp. 2005
Kondycja piskląt	bogatka	<i>Trypanosoma</i>	-	Dufva 1996
	modraszka	<i>Haemoproteus</i>	-	Merila i Andersson 1999
Sukces wylotu	bogatka ²	<i>Haemoproteus</i>	+	Norte i wsp. 2009
	bogatk	<i>Haemoproteus</i>	0	Pigeault i wsp. 2018
		<i>Plasmodium</i>	+	Pigeault i wsp. 2018
		<i>Leucocytozoon</i>	+	Pigeault i wsp. 2018
	oknówka	<i>Haemoproteus</i>	-	Marzal i wsp. 2005
	trzciniak	<i>Haemoproteus</i>	-	Asghar i wsp. 2011
	<i>Acrocephalus arundinaceus</i>			
	wrona amerykańska	<i>Plasmodium</i>	-	Townsend i wsp.
	<i>Corvus brachyrhynchos</i>			2018

¹w przypadku mniejszej ilości dostępnego pokarmu

²same

Celem badań było określenie wpływu współwystępowania pasożytniczych pierwotniaków z rodzajów *Plasmodium*, *Haemoproteus*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* na elementy biologii rozrodu modraszki *Cyanistes caeruleus* w warunkach eksperymentalnie manipulowanego dobrostanu żywiciela. W tym celu przeprowadzono zabieg zmiany liczby ektopasożytów – pcheł kurzych *Ceratophyllus gallinae* – w materiale gniazdowym, tworząc dwie grupy lęgów: takie, w których samice były poddane oraz takie, w których samice nie były poddane ekspozycji na pchłę kurzą. Wybór pcheł jako czynnika różnicującego dobrostan żywiciela wiąże się z ich wpływem na kondycję osobników, na których żerują. Te powszechnie występujące ektopasożyty mogą powodować anemię, obniżenie masy ciała lub zwiększoną śmiertelność (Brown i wsp. 1995, Krasnov 2008, Tomás i wsp. 2008).

Przewidywano, że:

1. samice poddane ekspozycji na pchlę kurzą będą w gorszej kondycji;
2. u samic zarażonych pasożytami krwi reprezentującymi co najmniej dwa taksony zostanie zaobserwowany negatywny wpływ na biologię rozrodu, tj. późniejsze przystępowanie do składania jaj, mniejsze zniesienie i średnia wielkość lęgu, obniżony sukces klucia, mniej piskląt oraz piskląt w gorszej kondycji oraz obniżony sukces wylotu (% piskląt, które opuściły gniazdo);
3. w lęgach, w których w trakcie inkubacji samice modraszki zostały poddane ekspozycji na pchlę kurzą, negatywny wpływ współwystępowania pasożytów krwi na elementy biologii lęgowej będzie silniejszy.

2. METODY

2.1. Teren badań

Badania zostały przeprowadzone w populacji modraszki gniazdującej w skrzynkach lęgowych w południowej części Gotlandii (Szwecja; 57°10'N, 18°20'E) w latach 2013–2015. Na 23 powierzchniach (razem ok. 215 ha), na których prowadzono badania, zawieszonych jest łącznie około 1800 skrzynek lęgowych. Skrzynki zawieszone są na wysokości ok. 1,5 m, zwykle w odległości ok. 50 m od siebie. Na niektórych terenach ta odległość jest mniejsza. Większość wydzielonych powierzchni badawczych stanowią zadrzewienie zdominowane przez dąb szypułkowy *Quercus robur* oraz jesion wyniosły *Fraxinus excelsior* z podszytem składającym się głównie z leszczyny *Corylus avellana* i głogów *Crataegus* spp. Na pozostałych powierzchniach występuje również sosna zwyczajna *Pinus sylvestris* oraz brzoza *Betula* spp. (Przybyło i wsp. 2000).

W skrzynkach lęgowych gnieźdzą się głównie bogatki *Parus major*, modraszki i muchołówki białoszyje *Ficedula albicollis*.

2.2. Badania terenowe

Badania rozpoczynały się w marcu od zebrania materiału gniazdowego z poprzedniego sezonu lęgowego (w celu pozyskania pcheł wykorzystanych do zabiegu mającego na celu zróżnicowanie dobrostanu żywiciela) oraz czyszczenia skrzynek lęgowych. W większości

skrzynek materiał gniazdowy usuwany był w poprzednim sezonie lęgowym po wylocie piskląt z gniazda, jednak w przypadku drugich lęgów pozostawał on do wiosny kolejnego roku, kiedy to był zbierany. Zebrany stary materiał gniazdowy był umieszczany w plastikowych torebkach strunowych, które były nakłuwane w celu zapewnienia dostępu powietrza, a następnie umieszczane w niskiej temperaturze. Skrzynki były czyszczone przy pomocy drucianych szczotek, w miarę możliwości w szczelinach między ścianami, aby usunąć pchły przebywające wewnątrz skrzynki. Czyszczenie skrzynek było prowadzone, aby uniknąć infestacji ptaków przez pchły na początku okresu lęgowego.

Kontrole skrzynek rozpoczynały się w połowie kwietnia (w badanej populacji samice modraszek zaczynają składać jaja w drugiej połowie kwietnia) i były prowadzone regularnie w celu określenia momentu zakończenia budowy gniazda, daty złożenia pierwszego jaja, daty rozpoczęcia inkubacji, wielkości zniesienia, daty klucia (dzień 0 życia piskląt) oraz liczby piskląt.

W drugim dniu inkubacji wszystkie jaja w lęgu były fotografowane w celu określenia ich wielkości (pozwoliło to ograniczyć czas przebywania jaj poza gniazdem do minimum). Po wyjęciu z gniazda jaja były umieszczane na stojaku składającym się z podstawy oraz ramy, do której przymocowany był, w odległości ok. 25 cm, aparat fotograficzny. Jaja umieszczane były na podstawie na czarnych podkładkach na tle papieru milimetrowego. Zdjęcia zawsze wykonywano w zacienionym miejscu, żeby w miarę możliwości zapewnić zbliżone warunki oświetlenia jaj. Zdjęcia zostały poddane obróbce w celu określenia wielkości jaj wyrażonej jako powierzchnia w mm² w programie ImageJ (wersja 1.47v, Abramoff i wsp. 2004). Wielkość jaj jest parametrem wykorzystywanym często w badaniach poświęconych reprodukcji ptaków i wykazano, że jest związana z kondycją samicy oraz piskląt (Galbraith 1988, Blomqvist i Johansson 2008, Krist 2011). W większości prac wielkość jaja jest wyrażona przy pomocy jego masy lub objętości obliczanej na podstawie długości i szerokości jaja według wzoru zaproponowanego przez Hoyta (1979). Wysoka korelacja między masą jaj a ich powierzchnią określoną na podstawie zdjęć wskazuje, że wykorzystanie powierzchni jaj określonej przy pomocy zdjęć jest wiarygodną metodą oceny ich wielkości (Dubiec i wsp., dane niepublikowane).

W celu zróżnicowania dobrostanu samic przeprowadzono zabieg polegający na zmianie poziomu infestacji materiału gniazdowego przez pchły. Utworzono dwie grupy

lęgów: a) lęgi, w których materiał gniazdowy został pozbawiony pcheł (określane w dalszej części tekstu jako grupa kontrolna) oraz b) lęgi, w których materiał gniazdowy został infestowany przez pchły (określane w dalszej części tekstu jako grupa eksperymentalna). W początkowym etapie składania jaj (zwykle, gdy w gnieździe były 1–3 jaja) wszystkie gniazda były zbierane w celu usunięcia pcheł i innych bezkręgowców za pomocą wysokiej temperatury. Odbywało się to poprzez włożenie gniazda do kuchenki mikrofalowej (700W) na 3 minuty. W celu przeciwdziałania stratom wody spowodowanych przez parowanie, każde gniazdo najpierw spryskiwano 4 ml wody. Ze względów logistycznych gniazda były następnie umieszczane w innych skrzynkach niż te, z których je zebrano. W każdym sezonie lęgowym w kilku pierwszych lęgach umieszczano „sztuczne” gniazda, do których budowy wykorzystano torfowce *Sphagnum*. W grupie lęgów eksperymentalnych, drugiego dnia inkubacji dodawano do materiału gniazdowego 40 dorosłych pcheł, a drugiego dnia po wykluciu piskląt dalsze 60 pcheł. Ograniczenie liczby pcheł do 40 na etapie inkubacji wynikało z faktu, że jednoczesne umieszczenie zbyt dużej ich liczby w gnieździe mogłoby spowodować porzucenie lęgu przez samicę (Oppliger i wsp. 1994). W celu utrzymania jak najniższego poziomu infestacji gniazd przez pchły w grupie kontrolnej, gniazda były ponownie poddawane działaniu wysokiej temperatury w drugim dniu inkubacji i drugim dniu życia piskląt. Lęgi były przypisywane do grup wraz z postępem sezonu naprzemiennie w celu kontrolowania wpływu zmieniających się w sezonie warunków środowiskowych oraz jakości fenotypowej ptaków. Aby potwierdzić skuteczność zabiegu eksperymentalnego, w 14 dniu po wykluciu piskląt, gniazda były zabierane w celu określenia liczby dorosłych pcheł. Gniazda były umieszczane w temp. ok. -20 °C przez co najmniej 24 h, a następnie materiał był dokładnie przeszukiwany pod kątem obecności i liczby dorosłych pcheł.

W 14. dniu życia pisklęta były ważone (z dokładnością do 0,1 g) za pomocą elektronicznej wagi oraz mierzono im długość skoku (z dokładnością do 0,1 mm) za pomocą suwmiarki (Svensson 1992). Masa i długość skoku piskląt z jednego gniazda była uśredniana do dalszych analiz statystycznych.

W celu określenia statusu zarażenia przez pasożyty krwi, krew od samic pobrano dwukrotnie – w 10 dniu inkubacji i 14 dniu po wykluciu piskląt. Podczas inkubacji ptaki chwymano na gnieździe zbliżając się do skrzynki w sposób minimalizujący hałas, który

mógłby spowodować ucieczkę samicy, a następnie zatykając otwór wlotowy skrzynki. Pod koniec okresu gniazdowego ptaki chwymano za pomocą sieci ornitologicznych rozstawionych przed skrzynką lub pułapek z zapadką umieszczanych wewnątrz skrzynki. Dwukrotny pobór krwi u samic umożliwił prześledzenie ewentualnych zmian w statusie i intensywności zarażenia ptaka w ciągu okresu gniazdowego, ponieważ na etapie inkubacji wektory pasożytów krwi nie są jeszcze obecne. W związku z tym osobniki, u których stwierdzono zarażenie na etapie inkubacji, zostały zarażone w poprzednim roku. Z kolei stwierdzenie zarażenia jedynie pod koniec okresu gniazdowego oznacza nowo nabytą infekcję. Krew (ok. 50 µl) pobierana była z żyły skrzydłowej po nakłuciu igłą do szklanej bezheparynowej kapilary i umieszczana w 99,8% alkoholu etylowym. Krew do momentu izolacji DNA była przechowywana w temperaturze pokojowej. Ponadto, ptaki dorosłe ważono oraz mierzono długość ich prawego skoku i prawego skrzydła, a także określano ich wiek (według Svensson 1992).

Po przewidywanym terminie wylotu piskląt z gniazda (17–18 dni po wykłuciu; Cramp i Perrins 1993), materiał gniazdowy został skontrolowany w poszukiwaniu martwych osobników w celu określenia sukcesu wylotu.

2.3. Analizy molekularne

Molekularna analiza zarażenia przez pasożyty krwi

Izolacja DNA z krwi została przeprowadzona przy użyciu octanu amonu według protokołu Bruford i wsp. (1998). Status zarażenia został określony na podstawie amplifikacji materiału DNA z genomu pasożytów wykorzystując do tego celu zagnieżdżoną łańcuchową reakcję polimerazy (ang. nested PCR). Do wykrycia zarażenia przez poszczególne rodzaje pasożytów wykorzystano następujące rodzaje markerów (szczegółowy opis warunków poszczególnych reakcji PCR znajduje się w Apendyksie 1):

- *Plasmodium* i *Haemoproteus*: fragment (o długości 479 pz) mitochondrialnego cytochromu b pasożytów; startery, skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne PCR wg protokołu Waldenströma i wsp. (2004),
- *Leucocytozoon*: fragment (o długości 480 pz) mitochondrialnego cytochromu b pasożyta; startery, skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne PCR wg protokołu Hellgrena i wsp. (2004),

- *Trypanosoma*: fragment genu (o długości 326 pz) kodującego mniejszą podjednostkę rybosomalną RNA (SSU RNA) pasożyta; startery i skład mieszaniny reakcyjnej wg protokołu Sehgała i wsp. (2001), a warunki termiczne PCR wg protokołu Zamory–Vilchis i wsp. (2012).

Produkty PCR zostały przeniesione na żel agarozowy (2%) i poddane elektroforezie w buforze 1xTBE w następujących warunkach: 5,5 V/cm przez 30 min. W przypadku stwierdzenia zarażenia przez dany rodzaj pasożyta, w celu oznaczenia linii genetycznej (pasożyty z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon*) lub gatunku (pasożyty z rodzaju *Trypanosoma*) produkt PCR był sekwencjonowany. Przed sekwencjonowaniem produkty PCR były oczyszczane przy pomocy zestawu dwóch enzymów: egzonukleazy i fosfatazy zgodnie z instrukcją producenta (ExoBAP, Eurx). Dwustronne sekwencjonowanie było przeprowadzane metodą Sangera z wykorzystaniem aparatów ABI 3730/3730xl w systemie płytkowym na płytce 96–dołkowej (analizy zlecone do wykonania w Serwisie Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN).

Chromatogramy otrzymane po sekwencjonowaniu były analizowane w programie BioEdit (wersja 7.2.5) (Hall 1999). W celu identyfikacji linii genetycznej pasożytów (za osobną linię genetyczną pasożyta uważa się sekwencję, która wykazuje różnicę co najmniej 1 nukleotydu w namnażanym fragmencie DNA, Bensch i wsp. 2009) z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon* odczytana sekwencja nukleotydów była porównywana z sekwencjami znajdującymi się w internetowej bazie MalAvi (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/about.html>, Bensch i wsp. 2009). Jeśli uzyskana sekwencja nie wykazała 100% zgodności z żadną linią w bazie MalAvi, była ona przyporządkowywana do rodzaju pasożyta na podstawie tego, z jaką linią genetyczną wykazywała najwyższe podobieństwo. Współwystępowanie jednocześnie co najmniej dwóch linii genetycznych pasożytów było rozpoznawane na podstawie obecności podwójnych odczytów zasad w chromatogramie. W przypadku *Trypanosoma* sekwencje standardowo identyfikowane są do gatunku lub rodzaju na podstawie sekwencji zdeponowanych w bazie GenBank. We wszystkich próbkach poza jedną, dla których startery opracowane przez Sehgała i wsp. (2001) namnożyły produkt, został on zidentyfikowany jako materiał genetyczny *Trypanosoma*. Osobnik, dla którego uzyskany produkt został przypisany do innego rodzaju, został oznaczony jako niezarażony przez *Trypanosoma*.

2.4. Analizy statystyczne i wielkość próby

Analizy statystyczne wykonano w programie SPSS (wersja 19; IBM Corp. 2010).

W analizach statystycznych zastosowano uogólnione modele liniowe (GLMs) z różnymi typami rozkładu danych w zależności od badanego parametru: 1) data zniesienia pierwszego jaja, wielkość zniesienia, średnia wielkość jaj, liczba wyklutych piskląt, liczba piskląt w dniu 14., średnia masa piskląt w dniu 14., średnia długość skoku piskląt w dniu 14. – rozkład normalny; 2) sukces klucia oraz sukces wylotu – rozkład dwumianowy. W analizach dotyczących daty zniesienia pierwszego jaja, wielkości zniesienia, średniej wielkości jaj, liczby wyklutych piskląt oraz sukcesu klucia wykorzystano dane dotyczące zarażenia samicy podczas inkubacji. Natomiast w analizach dotyczących liczby piskląt w dniu 14., średniej masy piskląt w dniu 14., średniej długości skoku piskląt w dniu 14. oraz sukcesu wylotu wykorzystano dane dotyczące zarażenia samicy w 14. dniu życia piskląt (dalej D14).

Zastosowano dwa rodzaje modeli w analizach każdego z parametrów biologii lęgowej: 1) model sprawdzający wpływ współpasożytnictwa w zależności od stopnia zarażenia: brak współpasożytnictwa, koinwazja pasożytów reprezentujących dwa taksony, koinwazja pasożytów reprezentujących trzy taksony oraz koinwazja pasożytów reprezentujących cztery taksony 2) model sprawdzający wpływ pasożytów z poszczególnych taksonów, w którym czynnik główny „układ pasożytów” obejmował następujące kategorie: brak zarażenia, zarażenie wyłącznie pasożytami z danego taksonu oraz koinwazje pasożytów z danego taksonu z pasożytami z każdego z trzech pozostałych taksonów. Pod uwagę wzięto tylko przypadki, gdy koinwazja wywołana była przez pasożyty z maksymalnie dwóch taksonów. W każdym modelu umieszczano jako czynniki główne rok badań, wiek samicy i odpowiednio stopień współpasożytnictwa (model 1) lub układ współpasożytniczy z poszczególnymi rodzajami pasożytów (*Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leucocytozoon*) (model 2). Pchły dodawane były do gniazd w 2. dniu inkubacji, więc nie mogły mieć wpływu na elementy biologii lęgu takie jak data złożenia pierwszego jaja, wielkość zniesienia i wielkość jaj. W związku z tym zabieg eksperymentalny jako czynnik główny był dodawany do modelu w analizach elementów biologii lęgowej z późniejszych etapów lęgowych tj. sukces klucia, liczba wyklutych piskląt, liczba piskląt w dniu 14., średnia masa piskląt w dniu 14., średnia długość skoku

piskląt w dniu 14., sukces wylotu. Model początkowy zawierał wszystkie efekty główne oraz interakcje drugiego rzędu. Interakcje statystycznie nieistotne były usuwane z modelu krokowo, zaczynając od interakcji o najwyższej wartości P . Model końcowy zawierał wszystkie efekty główne oraz interakcje o $P \leq 0,05$.

W latach 2013–2015 eksperyment przeprowadzono łącznie na 193 lęgach modraszki. Z analiz statystycznych usunięto lęgi: porzucone, zniszczone przez drapieżniki oraz wyprowadzane w kolejnych latach przez tę samą samicę. W analizach statystycznych wzięto pod uwagę tylko lęgi, dla których dostępne były dane o zarażeniu samicy zarówno w dniu 10 inkubacji, jak i w 14 dniu po wykluciu piskląt. Łącznie w analizach statystycznych wykorzystano dane dla 139 lęgów: 71 w grupie kontrolnej i 68 w grupie eksperymentalnej.

3. WYNIKI

Charakterystyka parametrów biologii lęgowej modraszki w grupie kontrolnej i eksperymentalnej znajduje się w Tabeli 2.

W kolejnych podrozdziałach zaprezentowano wyniki poszczególnych modeli z uwzględnieniem typu koinwazji (brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson, współwystępowanie pasożytów reprezentujących dwa taksony, współwystępowanie pasożytów reprezentujących trzy taksony, współwystępowanie pasożytów reprezentujących cztery taksony). Natomiast wyniki dotyczące wpływu poszczególnych rodzajów pasożytów (*Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma*) w kontekście współwystępowania z pasożytami z innych taksonów zostały zaprezentowane w Apendyksie 4.

Tabela 2. Elementy biologii lęgowej modraszek w grupie kontrolnej (bez pcheł) i eksperymentalnej (z pchłami) oraz dane dotyczące liczby pcheł pod koniec okresu gniazdowego w obu grupach. Sukces wylotu był liczony jako stosunek liczby piskląt, które opuściły gniazdo względem liczby piskląt w drugim dniu po wykluciu. Różnice między grupami testowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) lub wielomianowej regresji logistycznej (sukces klucia i sukces wylotu). $\bar{x}$ – średnia; Me – mediana.

	Grupa kontrolna (N=71)			Grupa eksperymentalna (N=68)			Statystyka
	$\bar{x}$	Me	Zakres	$\bar{x}$	Me	Zakres	
Data złożenia 1 jaja	01.05	01.05	18.04– 17.05	01.05	30.04	17.04– 15.05	F=0,03, df=1, P=0,872
Wielkość zniesienia	10,58	11	7–14	10,82	11	6–14	F=0,83, df=1, P=0,363
Średnia wielkość jaj (mm ²)	155,0	153,9	139,1– 178,9	155,0	154,9	136,8– 174,4	F=0,01, df=1, P=0,965
Sukces klucia	89,8%	92%	54,5– 100%	89,3%	92%	55,5– 100%	$\chi^2=0,01$, df=1, P=0,962
Liczba wyklutych piskląt	9,48	10	6–14	9,69	10	5–14	F=0,42, df=1, P=0,516
Liczba piskląt w D14	8,96	9	5–14	9,20	9	3–13	F=0,51, df=1, P=0,476
Masa piskląt w D14 (g)	11,21	11,34	8,96– 12,56	10,94	11,03	8,71– 12,70	F=3,73, df=1, P=0,055
Długość skoku w D14 (mm)	16,8	16,8	15,5–17,8	16,7	16,8	15,4– 17,5	F=0,78, df=1, P=0,378
Sukces wylotu	93%	100%	50–100%	93%	100%	38– 100%	$\chi^2=0,13$, df=1, P=0,594
Liczba pcheł w D14	19,3	15	0–123	118,7	116	11–312	F=151,49, df=1, P<0,001

3.1. Kondycja samicy

Nie stwierdzono wpływu współwystępowania pasożytów krwi na kondycję samicy w dniu 14. życia piskląt. Ponadto, czynnik biologiczny potencjalnie wpływający na dobrostan żywiciela – ekspozycja na pchłę kurzą – także nie wpływał w istotny sposób na kondycję samicy (Tabela 3). Dane przedstawiające masę samic umieszczono w Apendyksie 4 w Tabelach A4.1, A4.2 i A4.3.

3.2. Data zniesienia

Stwierdzono, że co najmniej dwuletnie samice modraszek przystępowały do składania jaj wcześniej niż samice jednoroczne (Tabela 4). Zaobserwowano, że stopień współpasożytnictwa nie miał wpływu na datę zniesienia pierwszego jaja, natomiast zarażenie tylko rodzajem *Trypanosoma* powodowało późniejsze przystępowanie do lęgów (Apendyks 4, Tabela A4.4.). Dodatkowo stwierdzono, że samice zarażone tylko *Plasmodium* wykazywały tendencję do wcześniejszego przystępowania do składania jaj (Apendyks 4, Tabela A4.4.).

Tabela 3. Wpływ badanych czynników na kondycję (stosunek masy/długości skoku w dniu 14. życia piskląt) samicy modraszki.

Czynniki	df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
Rok ¹	2		2,56	0,278
Wiek ²	1	0,01 $\pm$ 0,01	2,28	0,130
Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,01 $\pm$ 0,01	1,40	0,236
Typ koinwazji w D14 ⁴	3		1,50	0,681
dwa taksony	1	-0,01 $\pm$ 0,01	0,07	0,787
trzy taksony	1	0,01 $\pm$ 0,01	0,02	0,880
cztery taksony	1	0,02 $\pm$ 0,02	1,33	0,249

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: kontrola

⁴poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

Tabela 4. Wpływ współwystępowania pasożytów krwi, wieku samicy oraz roku na termin przystępowania do lęgu w populacji modraszki.

Czynniki	df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
Rok ¹	2		0,46	0,794
Wiek ²	1	-1,83 $\pm$ 0,64	8,06	0,005
Typ koinwazji	2		1,13	0,569
dwa taksony	1	-0,17 $\pm$ 0,70	0,06	0,801
trzy taksony	1	1,01 $\pm$ 1,07	0,89	0,345

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

3.3. Wielkość zniesienia i średnia wielkość jaj

Wielkość zniesienia nie była zależna od poziomu współpasożytnictwa wykrytego u samic (Tabela 5). Analiza poszczególnych układów pasożytniczych wykazała negatywny wpływ zarażenia tylko rodzajem *Haemoproteus* na liczbę jaj (Apendyks 4, Tabela A4.5.). Natomiast odmienny, choć nieistotny statystycznie trend ku większym lęgom, został stwierdzony w przypadku zarażenia *Trypanosoma* (Apendyks 4, Tabela A4.5.).

Nie stwierdzono związku pomiędzy średnią wielkością jaja i liczbą współwystępujących rodzajów pasożytów samicy podczas inkubacji (Tabela 5). Zaobserwowano jednak negatywny trend w przypadku współwystępowania dwóch rodzajów pasożytów na średnią wielkość jaj w porównaniu do samic bez stwierdzonego współpasożytnictwa. Nie stwierdzono również wpływu poszczególnych pasożytów w różnych układach współpasożytnictwa na średnią wielkość jaj modraszki. Jednak samice zarażone tylko pasożytami z rodzaju *Haemoproteus* miały tendencję do składania większych jaj (P=0,068; Apendyks 4, Tabela A4.6.). Podobny trend stwierdzono w przypadku jednoczesnego zarażenia pasożytami z rodzajów *Leucocytozoon* i *Plasmodium* (P=0,052; Apendyks 4, Tabela A4.6.).

Tabela 5. Wpływ badanych czynników na wielkość zniesienia i wielkość jaj modraszki.

Element biologii lęgowej	Czynniki	df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
Wielkość zniesienia	Rok ¹	2		49,95	<0,001
	2014	1	0,26 $\pm$ 0,28		
	2015	1	-1,76 $\pm$ 0,30		
	Wiek ²	1	0,11 $\pm$ 0,23	0,25	0,620
	Typ koinwazji	2		0,33	0,849
	dwa taksony	1	0,14 $\pm$ 0,25	0,31	0,575
	trzy taksony	1	0,09 $\pm$ 0,38	0,06	0,809
Wielkość jaj	Rok ¹	2		3,01	0,222
	2014	1	-1,35 $\pm$ 1,60		
	2015	1	-3,09 $\pm$ 1,77		
	Wiek ²	1	0,86 $\pm$ 1,34	0,43	0,519
	Typ koinwazji	2		3,46	0,177
	dwa taksony	1	-2,74 $\pm$ 1,47	3,50	0,061
	trzy taksony	1	-1,11 $\pm$ 2,21	0,25	0,615

¹poziom referencyjny: 2013²poziom referencyjny: samice jednoroczne³poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

3.4. Sukces klucia i liczba wyklutych piskląt

W analizach ujęte zostały tylko samice, w których lęgach nie było przypadków zbitych jaj lub jaj zagrzebanych w materiale gniazdowym. Zaobserwowano, że samice zarażone pasożytami reprezentującymi trzy taksony miały obniżony sukces klucia (Tabela 6). Nie stwierdzono wpływu poszczególnych układów współpasożytniczych na sukces klucia (Apendyks 4, Tabela A4.7.). Również zabieg eksperymentalny nie wpływał na ten parametr.

Nie stwierdzono związku między liczbą wyklutych piskląt i liczbą współwystępujących rodzajów pasożytów samicy podczas inkubacji (Tabela 6). Nie stwierdzono również wpływu poszczególnych pasożytów w różnych układach współpasożytnictwa na liczbę wyklutych piskląt. Jednak samice zarażone tylko pasożytami

z rodzaju *Haemoproteus* lub jednocześnie *Haemoproteus* i *Trypanosoma* miały tendencję do mniejszej liczby wyklutych piskląt (odpowiednio $P=0,063$ i $P=0,065$; Apendyks 4, Tabela A4.8.). Odwrotny trend stwierdzono w przypadku zarażenia tylko pasożytami z rodzaju *Trypanosoma* ($P=0,060$; Apendyks 4, Tabela A4.8.).

Tabela. 6. Wpływ badanych czynników na sukces klucia i liczbę wyklutych piskląt modraszki.

Element biologii lęgowej	Czynniki	df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
Sukces klucia	Rok ¹	2		1,33	0,514
	2014	1	-0,22 $\pm$ 0,21		
	2015	1	-0,06 $\pm$ 0,25		
	Wiek ²	1	0,09 $\pm$ 0,18	0,26	0,607
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,07 $\pm$ 0,17	0,17	0,681
	Typ koinwazji ⁴	2		6,95	0,031
	dwa taksony	1	-0,31 $\pm$ 0,19	2,69	0,101
	trzy taksony	1	-0,67 $\pm$ 0,26	6,49	0,011
Liczba wyklutych piskląt	Rok ¹	2		23,31	<0,001
	2014	1	0,01 $\pm$ 0,37		
	2015	1	-1,67 $\pm$ 0,40		
	Wiek ²	1	0,19 $\pm$ 0,31	0,38	0,540
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,35 $\pm$ 0,30	1,30	0,255
	Typ koinwazji ⁴	3		2,12	0,346
	dwa taksony	1	-0,22 $\pm$ 0,34	0,43	0,510
	trzy taksony	1	-0,74 $\pm$ 0,52	2,05	0,153

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: kontrola

⁴poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

3.5. Liczba i rozmiar ciała piskląt w 14. dniu życia oraz sukces wylotu

Nie stwierdzono wpływu współpasożytnictwa na liczbę piskląt w 14. dniu po wykluciu (Tabela 7), jak również nie zaobserwowano wpływu poszczególnych układów współpasożytniczych na ten parametr (Apendyks 4, Tabela A4.9.). Przeprowadzony zabieg eksperymentalny również nie wpłynął na liczbę piskląt w dniu 14 (Tabela 7).

W wieku 14 dni pisklęta z lęgów poddanych infestacji pchłami miały tendencję do niższej masy niż pisklęta z lęgów kontrolnych (Tabela 7). W analizie uwzględniono jako zmienną towarzyszącą liczbę piskląt w dniu 2. życia piskląt i stwierdzono, że była negatywnie skorelowana ze średnią masą piskląt w dniu 14. W przypadku analiz z wybranymi układami pasożytów nie stwierdzono związku z masą piskląt (Apendyks 4, Tabela A4.10.). Jednak w lęgach poddanych infestacji pchłami zaobserwowano nieistotny statystycznie trend ($P=0,078$) ku mniejszej masie ciała piskląt, jeżeli samica była zarażona wyłącznie *Plasmodium*. Nie stwierdzono wpływu współpasożytnictwa u samic na długość skoku piskląt 14 dni po wykluciu ani na sukces wylotu (Tabela 7). Również poszczególne układy współpasożytnicze nie wpływały na średnią długość skoku w dniu 14. życia piskląt. Istniał jednak negatywny wpływ na granicy istotności statystycznej w przypadku koinwazji *Plasmodium* i *Haemoproteus* na sukces wylotu piskląt (Apendyks 4, Tabela A4.11.).

Tabela 7. Wpływ badanych czynników na liczbę piskląt w dniu 14., średnią masę piskląt w dniu 14., średnią długość skoku piskląt w dniu 14 oraz sukces wylotu. Liczbę piskląt w dniu 2. po wykluciu zastosowano w analizie dotyczącej masy piskląt w dniu 14. jako zmienną towarzyszącą. D14 – dzień 14. życia piskląt.

Element biologii lęgowej	Czynniki	df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
Liczba piskląt w D14	Rok ¹	2		30,35	<0,001
	2014	1	-2,30 $\pm$ 0,42		
	2015	1	-0,59 $\pm$ 0,38		
	Wiek ²	1	0,34 $\pm$ 0,32	1,14	0,286
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,30 $\pm$ 0,31	0,93	0,334
	Typ koinwazji w D14 ⁴	3		1,11	0,776
	dwa taksony	1	-0,09 $\pm$ 0,34	0,07	0,796
	trzy taksony	1	-0,21 $\pm$ 0,53	0,16	0,689
	cztery taksony	1	1,21 $\pm$ 1,31	0,85	0,356
Średnia masa piskląt w D14	Rok ¹	2		19,46	<0,001
	2014	1	-0,36 $\pm$ 0,16		
	2015	1	-0,83 $\pm$ 0,18		
	Wiek ²	1	0,17 $\pm$ 0,13	1,58	0,209
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,22 $\pm$ 0,13	3,07	0,080
	Typ koinwazji w D14 ⁴	3		4,69	0,196
	dwa taksony	1	-0,12 $\pm$ 0,14	0,72	0,396
	trzy taksony	1	-0,27 $\pm$ 0,22	1,51	0,219
	cztery taksony	1	0,87 $\pm$ 0,54	2,58	0,108
	Liczba piskląt w D2	1	-0,12 $\pm$ 0,04	11,77	0,001

Ciąg dalszy na kolejnej stronie

Średnia długość skoku piskląt w D14	Rok ¹	2		18,64	<0,001
	2014	1	-0,33±0,09		
	2015	1	-0,43±0,10		
	Wiek ²	1	0,10±0,08	1,59	0,207
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,05±0,07	0,53	0,464
	Typ koinwazji w D14 ⁴	3		0,37	0,946
	dwa taksony	1	-0,04±0,08	0,21	0,649
	trzy taksony	1	-0,02±0,13	0,03	0,870
	cztery taksony	1	0,11±0,31	0,13	0,719
	Liczba piskląt w D2	1	-0,07±0,02	11,31	0,001
Sukces wylotu	Rok ¹	2		12,63	0,002
	2014	1	-0,08±0,03		
	2015	1	-0,11±0,03		
	Wiek ²	1	0,01±0,02	0,04	0,836
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,01±0,02	0,02	0,876
	Typ koinwazji w D14 ⁴	3		1,91	0,590
	dwa taksony	1	-0,01±0,02	0,06	0,800
	trzy taksony	1	0,03±0,04	0,80	0,371
	cztery taksony	1	0,09±0,09	0,85	0,350

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: kontrola

⁴poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

4. DYSKUSJA

W przeprowadzonych badaniach analizowano jaki jest wpływ współwystępujących pasożytów krwi na poszczególne elementy biologii rozrodu w dwóch grupach samic modraszki różnicowanych pod kątem ich kondycji na etapie wysiadywania. Jako czynnik wpływający na dobrostan żywiciela zastosowano presję ektopasożytów – pcheł kurzych.

Spośród 9 elementów biologii lęgowej tylko w przypadku sukcesu klucia stwierdzono wpływ koinwazji pasożytów krwi. Co istotne, eksperymentalna zmiana poziomu ekspozycji samic na pchły nie miała wpływu na to, jak współwystępowanie pasożytów krwi oddziałuje na parametry rozrodu.

Współpasożytnictwo nie miało istotnego wpływu na datę złożenia pierwszego jaja. Podczas analiz poszczególnych układów współwystępujących pasożytów stwierdzono istotny wpływ w układzie pasożytniczym z *Trypanosoma* – w przypadku zarażenia pasożytami wyłącznie z tego taksonu samice przystępowały do lęgów znacznie później (3 dni względem samic niezarażonych). Podobnie w analizach dotyczących współpasożytnictwa z *Plasmodium* układ, w jakim pasożyty współwystępowały, nie miał istotnego wpływu na datę zniesienia pierwszego jaja przez modraszki. Jednak stwierdzono, że w przypadku zarażenia tylko *Plasmodium* samice przystępowały do składania jaj wcześniej (2 dni względem samic niezarażonych). Związek między liczbą współwystępujących pasożytów a datą zniesienia nie został jednoznacznie określony w innych pracach: albo stwierdzono wcześniejsze przystępowanie do lęgu tylko u osobników niezarażonych lub zarażonych dwoma pasożytami, albo nie stwierdzano takich zależności (Allander i Bennett 1995, Sanz i wsp. 2001a, Marzal i wsp. 2008). Natomiast w wielu pracach nie stwierdzono wpływu zarażenia pasożytami reprezentującymi jeden takson na termin przystępowania do lęgu (Korpimäki i wsp. 1993, Dufva 1996, Siikamäki i wsp. 1997, Hakkarainen i wsp. 1998, Hatchwell i wsp. 2000, Fargallo i Merino 2004). W niektórych pracach zaobserwowano jednakże, że zarażenie *Haemoproteus* wiązało się z wcześniejszą datą zniesienia (Merila i Andersson 1999, Sanz i wsp. 2001a), co nie zostało zaobserwowane w moich badaniach. Kolejna rozbieżność względem innych prac została zaobserwowana w przypadku *Plasmodium* – w obecnych badaniach samice zarażone wykazywały bliski istotności statystycznej trend ku przystępowaniu do składania jaj wcześniej, natomiast u oknówki wpływ zarażenia tylko pasożytami z tego rodzaju był odwrotny (Marzal i wsp. 2008). Zaobserwowany w innych pracach negatywny wpływ *Trypanosoma* (Dufva 1996, Siikamäki i wsp. 1997, Hakkarainen i wsp. 1998) nie został stwierdzony. Natomiast badania, w których eksperymentalnie usuwano pasożyty krwi, nie analizowały wpływu na datę zniesienia (Merino i wsp. 2000, Marzal i wsp. 2005, Knowles i wsp. 2010). Brak wpływu lub jego odmienny charakter w zależności od rodzaju pasożyta

może być związany z różnymi czynnikami. Późniejsze składanie jaj przez zarażone ptaki może wynikać z konkurencji o zasoby pomiędzy pasożytami i żywicielem, tym samym opóźnienie zniesienia wynika z mniejszej ilości zasobów dostępnych dla zarażonych samic na wytworzenie jaj (Korpimäki i wsp. 1993, Allander i Bennett 1995). Natomiast w przypadku szybszego przystępowania do lęgów przez zarażone samice Sanz i wsp. (2001a) sugerują, że może być to związane z lepszymi terytoriami zajmowanymi przez zarażone samice i posiadaniem lepszych partnerów. Brak zależności między współpasożytnictwem a datą zniesienia nie pokrywa się z moimi wstępnymi przewidywaniami. Przypuszczalnie może to być spowodowane odmiennym wpływem poszczególnych pasożytów (zaobserwowanym w przypadku zarażenia pasożytami tylko z jednego taksonu) i przykładowo, jeśli jeden rodzaj pasożyta związany jest z wcześniejszym przystępowaniem do rozrodu, a drugi typ – z późniejszym, to w przypadku ich koinwazji wpływ na datę zniesienia nie będzie zauważalny.

W obecnych badaniach nie stwierdzono istotnego wpływu liczby współwystępujących pasożytów na średnią wielkość jaj w lęgach modraszki. Również w przypadku uwzględnienia w analizach rodzajów współwystępujących pasożytów nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic. Zaobserwowano nieistotnie statystycznie trend – osobniki zarażone pasożytami krwi z dwóch różnych taksonów wykazywały tendencję do składania mniejszych jaj. Natomiast analizując wpływ poszczególnych układów pasożytniczych nie stwierdzono wpływu żadnego z tych układów na wielkość jaj w lęgu. W literaturze jest niewiele informacji o wpływie pasożytów na wielkość jaj, tym bardziej o wpływie współwystępujących pasożytów, a stwierdzany charakter wpływu zależy od rodzaju badanych pasożytów. W badaniach na muchołówce żałobnej nie stwierdzono związku pomiędzy pasożytami krwi a objętością jaj – zarówno w przypadku zarażenia tylko *Haemoproteus* lub tylko *Trypanosoma*, a także gdy pasożyty z tych taksonów współwystępowały ze sobą (Sanz i wsp. 2001b). W obecnej pracy stwierdzono, że osobniki zarażone tylko *Haemoproteus* wykazywały nieistotny statystycznie trend ku większej średniej wielkości jaj. Może to sugerować, że osobniki zarażone jedynie pasożytami z tego taksonu są w stosunkowo dobrej kondycji. W badaniach na gąsiorku *Lanius collurio*, krakwie *Anas strepera* i krzyżówce *Anas platyrhynchos*, gdzie najczęściej stwierdzanym pasożytem krwi był *Haemoproteus* nie stwierdzono związku pomiędzy

statusem zarażenia a objętością jaj w lęgu (Shutler i wsp. 1999, Votypka i wsp. 2003). Analizując wpływ zarażenia pasożytami z różnych taksonów na wielkość jaja Dufva (1996) stwierdziła, że samice zarażone *Trypanosoma* składały mniejsze jaja, jednak próba w tych badaniach była niewielka. W obecnej pracy zaobserwowano odwrotny, nieistotny trend ku większej średniej wielkości jaj w legach samic zarażonych jedynie *Trypanosoma*. Takie wyniki odbiegają od przewidywań tej pracy zakładających składanie mniejszych jaj przez samice ze stwierdzonym współpasożytnictwem.

Analiza współpasożytnictwa wykazała negatywny wpływ koinwazji pasożytów reprezentujących trzy taksony na sukces klucia, przy czym efekt ten był podobny w obu grupach lęgów (różnicowanych pod kątem ekspozycji samic na pchłę kurzą). Jednak nie stwierdzono tego efektu w modelach analizujących poszczególne układy pasożytów. W tym wypadku potwierdza się przyjęta hipoteza dotycząca negatywnego wpływu współwystępowania pasożytów, gdy dochodzi do skumulowania ich negatywnego oddziaływania. Negatywny wpływ zarażenia pasożytami tylko z jednego taksonu na sukces klucia został stwierdzony kilkakrotnie (Dufva 1996, Sanz i wsp. 2001a, Marzal i wsp. 2005). Wpływ współpasożytnictwa na sukces klucia może być związany z kompromisem w użyciu karotenoidów i innych antyoksydantów podczas produkcji jaja (Saino i wsp. 2003, Blount i wsp. 2004). Osobniki zarażone pasożytami krwi dysponują niższym poziomem karotenoidów, przez co podczas składania jaj mniej antyoksydantów trafia do żółtka, co może prowadzić do ich obniżonej wykluwalności (Horak i wsp. 2001, Marzal i wsp. 2005). Wykazano również, że samice zarażone pasożytami krwi mogą mieć obniżoną zdolność termoregulacji, co może wpływać negatywnie na skuteczność inkubacji (Hayworth i wsp. 1987, Sanz i wsp. 2001a). Z drugiej strony badania na pasówce białobrewej *Zonotrichia leucophrys oriantha* wykazały większą wykluwalność w lęgach osobników zarażonych *Haemoproteus* (Zylberberg i wsp. 2015).

W przypadku elementów biologii rozrodu z etapu pisklęcego nie stwierdzono istotnego wpływu współpasożytnictwa zarówno na liczbę piskląt w 14 dni po wykluciu, jak i na ich masę ciała, długość skoku oraz sukces wylotu. Takie wyniki nie są zgodne z przewidywaniami niniejszej pracy, co może wynikać ze zbyt słabego wpływu czynnika różnicującego kondycję samicy na powyższe parametry. Natomiast w modelach analizujących układy współpasożytnictwa z *Haemoproteus* zabieg eksperymentalny

wykazywał negatywny trend ($p=0,087$). W przypadku zarażenia *Plasmodium* również zaobserwowano nieistotny statystycznie trend ($p=0,078$) ku niższej masie ciała piskląt w gniazdach poddanych infestacji pchłami. Negatywny wpływ *Plasmodium* u samic, na których kondycję oddziałuje dodatkowy negatywny czynnik, wynikać może z mniejszych zasobów jakimi dysponuje dana samica, przez co nie poświęca ona tyle czasu na dostarczanie pożywienia i dbanie o pisklęta (m.in. likwidowanie ektopasożytów). Wcześniejsze badania na modraszce wykazały wyższy sukces wylotu w lęgach, w których osobnikom dorosłym podano środek przeciw pasożytom krwi (Merino i wsp. 2000). Autorzy wspomnianej pracy sugerują, że było to związane z lepszą opieką rodzicielską osobników, które otrzymały lek przeciwmalaryczny. W badaniach na bogatkach wykazano, że w przypadku obecności pcheł w gnieździe samice więcej czasu poświęcają pielęgnacji gniazda i piskląt, jednak nie wpływa to na dostarczanie pokarmu (Christe i wsp. 1996). Być może dopiero obecność dwóch czynników: zarażenie *Plasmodium* i ekspozycja na pchły wywiera negatywny efekt. Jednak w mojej pracy, wbrew przewidywaniom, wpływ ten nie został wykazany jako istotny.

Występowanie pcheł w gniazdach modraszek poprzez wzmożenie działania układu odpornościowego ptaków i tym samym inwestowanie zasobów we własny dobrostan powinno spowodować obniżenie parametrów rozrodu, ponieważ część zasobów powinna być relokowana w odpowiedź immunologiczną. Układ odpornościowy obciążony obecnością ektopasożytów nie tylko może nie być w stanie utrzymywać na kontrolowanym poziomie inwazji chronicznych, ale i skutecznie bronić organizmu żywiciela przed inwazjami nowych pasożytów. W przypadku współwystępujących kilku inwazji chronicznych dodatkowy czynnik zewnętrzny może uwidocznić ich negatywny wpływ. Zarówno współwystępowanie kilku pasożytów, jak i poszczególne ich rodzaje, mogą oddziaływać na siebie nawzajem i żywiciela w zależności od jego kondycji, a tym samym na kluczowy okres, jakim jest rozród. Jednakże nie zaobserwowano istotnego wpływu zabiegu eksperymentalnego na kondycję samic. Tak więc, czynnik biologiczny, którego potencjalny wpływ na kondycję i funkcjonowanie układu immunologicznego żywiciela został wykazany w innych badaniach (Richner i wsp. 1993, Oppliger i wsp. 1994, Christe i wsp. 1996), w prezentowanym eksperymencie nie spowodował oczekiwanego zróżnicowania w kondycji samic. Jednak, pomimo tego, że nie stwierdzono wpływu na

kondycję samic, to nie można wykluczyć, że występowały różnice w parametrach fizjologicznych między obiema grupy samic. Brak obserwowanego wpływu może wynikać z innych odpowiedzi obronnych stosowanych przez ptaki przeciw ektopasożytom, nie związanych z układem odpornościowym, np. dbanie o higienę upierzenia czy też czyszczenie gniazda (przegląd w Clayton i wsp. 2010).

Podsumowując, w niniejszej pracy nie zaobserwowano związku między współwystępowaniem pasożytów krwi a większością badanych elementów biologii lęgowej modraszki, także w warunkach, które powinny negatywnie wpływać na dobrostan samicy. Zaobserwowano natomiast wpływ lub trendy zależności w przypadku zarażeń pasożytami z jednego z objętych badaniami taksonów a niektórymi elementami biologii lęgowej, np. wielkością jaj. Współwystępowanie pasożytów krwi miało jedynie wpływ na sukces klucia. Był on obniżony w lęgach samic z trzema współwystępującymi pasożytami w porównaniu z samicami niezarażonymi. W związku z niewielką liczbą badań dotyczących wpływu współwystępowania pasożytów krwi na biologię lęgową ptaków, konieczne są dalsze badania tego typu. Pozwoliłyby one określić dominujący wzorzec tych zależności. Ma to duże znaczenie w świetle zmian zasięgu występowania pasożytów krwi związanych ze zmieniającymi się warunkami klimatycznymi. Zmiany w zasięgu występowania pasożytów mogą potencjalnie prowadzić do wzrostu częstości współpasożytnictwa. Biorąc pod uwagę, że współwystępowanie pasożytów krwi może obniżać sukces klucia, wzrost częstości współpasożytnictwa może potencjalnie przekładać się na dynamikę liczebności populacji.

5. LITERATURA

- Abràmoff M. D., Magalhães P. J., Ram S. J. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11: 36-42.
- Adl S. M., Bass D., Lane C. E. i in. 2019. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66: 4-119.
- Allander K., Bennett G. F. 1995. Retardation of breeding onset in Great Tits (*Parus major*) by blood parasites. *Functional Ecology* 9: 677-682.
- Arlettaz R., Christe P., Schaub M. 2017. Food availability as a major driver in the evolution of life-history strategies of sibling species. *Ecology and Evolution* 7: 4163–4172.

- Asghar M., Hasselquist D., Bensch S. 2011. Are chronic avian haemosporidian infections costly in wild birds?. *Journal of Avian Biology* 42: 530-537.
- Atkinson C. T., Thomas N. J., Hunter D. B. 2009. Parasitic diseases of wild birds. John Wiley and Sons. Ames.
- Bensch S., Hellgren O., Perez-Tris J. 2009. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* 9: 1353-1358.
- Blomqvist D., Johansson O. C. 1995. Trade-offs in nest site selection in coastal populations of Lapwings *Vanellus vanellus*. *Ibis* 137: 550-558.
- Blount J. D., Houston D. C., Surai P. F., Møller A. P. 2004. Egg-laying capacity is limited by carotenoid pigment availability in wild gulls *Larus fuscus*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 271: S79-S81.
- Bordes F., Morand S. 2011. The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infection Ecology and Epidemiology* 1: 7346.
- Brown C. R., Brown M. B., Rannala B. 1995. Ectoparasites reduce long-term survival of their avian host. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 262: 313-319.
- Bruford M.W., Hanotte O., Brookfield J. F. Y., Burke T. 1998. Multilocus and single-locus DNA fingerprinting. In: *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, s. 287-336
- Christe P., Richner H., Oppliger A. 1996. Of great tits and fleas: sleep baby sleep... . *Animal Behaviour* 52: 1087-1092.
- Clayton D. H., Koop J. A., Harbison C. W., Moyer B. R., Bush S. E. 2010. How birds combat ectoparasites. *The Open Ornithology Journal* 3: 41-71.
- Cramp S., Perrins C. M. 1993. Paridae. *Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa* 7. Oxford University Press. Oxford, s. 145-281.
- Davidar P., Morton E. S. 2006. Are multiple infections more severe for Purple Martins (*Progne subis*) than single infections? *Auk* 123:141-147.
- Dubiec A., Podmokła E., Zagalska-Neubauer M., Drobnik S. M., Arct A., Gustafsson L., Cichoń M. 2016. Differential prevalence and diversity of haemosporidian parasites

- in two sympatric closely related non-migratory passerines. *Parasitology* 143: 1320-1329.
- Dufva R. 1996. Blood parasites, health, reproductive success, and egg volume in female Great Tits *Parus major*. *Journal of Avian Biology* 27: 83-87.
- Evans M., Otter A. 1998. Fatal combined infection with *Haemoproteus noctuae* and *Leucocytozoon ziemanni* in juvenile snowy owls (*Nyctea scandiaca*). *The Veterinary Record* 143: 72-76.
- Fargallo J. A., Merino S. 2004. Clutch size and haemoparasite species richness in adult and nestling blue tits. *Ecoscience* 11: 168-174.
- Fletcher K., Träff J., Gustafsson L. 2019. Importance of infection of haemosporidia blood parasites during different life history stages for long-term reproductive fitness of collared flycatchers. *Journal of Avian Biology* 2019: e02118.
- Galbraith H. 1988. Effects of egg size and composition on the size, quality and survival of lapwing *Vanellus vanellus* chicks. *Journal of Zoology* 214: 383-398.
- Gilman S., Blumstein D. T., Foufopoulos J. 2007. The effect of hemosporidian infections on white-crowned sparrow singing behavior. *Ethology* 113: 437-445.
- Goater T. M., Goater C. P., Esch G. W. 2014. Parasitism. The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press. Cambridge.
- Gosling P. J. 2005. Dictionary of parasitology. CRC press. Boca Raton.
- Grillo E. L., Fithian R. C., Cross H., Wallace C., Viverette C., Reilly R., Mayer D. G. 2012. Presence of *Plasmodium* and *Haemoproteus* in breeding prothonotary warblers (*Protonotaria citrea*: Parulidae): temporal and spatial trends in infection prevalence. *Journal of Parasitology* 98: 93-102.
- Gryczynska A., Dolnik O., Pawelczyk A., Mazgajski T. D., Siemiakowski M. 2000. Parasites and pathogens in population of Chaffinch *Fringilla coelebs* from Masurian Lakeland, NE Poland. *Acta Ornithologica* 35: 79-83.
- Hakkarainen H., Ilmonen P., Koivunen V., Korpimäki E. 1998. Blood parasites and nest defense behaviour of Tengmalm's owls. *Oecologia* 114: 574-577.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

- Hatchwell B. J., Wood M. J., Anwar M., Perrins C. M. 2000. The prevalence and ecology of the haematozoan parasites of European blackbirds, *Turdus merula*. *Canadian Journal of Zoology* 78: 684-687.
- Hayworth A. M., van Riper, III, Weathers W. W. 1987. Effects of *Plasmodium relictum* on the metabolic rate and body temperature in canaries (*Serinus canarius*). *The Journal of Parasitology* 73: 850-853.
- Hellgren O., Waldenström J., Bensch S. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90: 797-802.
- Hoyt D. F. 1979. Practical methods of estimating volume and fresh weight of bird eggs. *Auk* 96: 73-77.
- Hörak P., Ots I., Vellau H., Spottiswoode C., Möller, A. P. 2001. Carotenoid-based plumage coloration reflects hemoparasite infection and local survival in breeding great tits. *Oecologia* 126: 166-173.
- Korpimäki E., Hakkarainen H., Bennett G. F. 1993. Blood parasites and reproductive success of Tengmalm's Owls: Detrimental effects on females but not on males?. *Functional Ecology* 7: 420-426.
- Knowles S. C., Wood M. J., Sheldon B. C. 2010. Context-dependent effects of parental effort on malaria infection in a wild bird population, and their role in reproductive trade-offs. *Oecologia* 164: 87-97.
- Krasnov B. R. 2008. Functional and Evolutionary Ecology of Fleas: a model for ecological parasitology. Cambridge University Press. Cambridge.
- Krist M. 2011. Egg size and offspring quality: a meta-analysis in birds. *Biological Reviews* 86: 692-716.
- Marinov M. P., Marchetti C., Dimitrov D., Ilieva M., Zehindjiev P. 2017. Mixed haemosporidian infections are associated with higher fearfulness in Yellow Wagtail, *Motacilla flava*. *Canadian Journal of Zoology* 95: 405-410.
- Marzal A., Asghar M., Rodríguez L., Reviriego M., Hermosell I. G., Balbontín J., Garcia-Longoria L., De Lope F., Bensch S. 2013. Co-infections by malaria parasites decrease feather growth but not feather quality in house martin. *Journal of Avian Biology* 44: 437-444.

- Marzal A., Bensch S., Reviriego M., Balbontin J., De Lope F. 2008. Effects of malaria double infection in birds: one plus one is not two. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 979-987.
- Marzal A., De Lope F., Navarro C., Møller A. P. 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* 142: 541-545.
- Merilä J., Andersson M. 1999. Reproductive effort and success are related to haematozoan infections in blue tits. *Ecoscience* 6: 421-428.
- Merino S., Moreno J., Sanz J. J., Arriero E. 2000. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267: 2507-2510.
- Møller A. P. 1997. Parasitism and the evolution of host life history. W: Clayton D. H., Moore J. (red.). Host-parasite evolution. General principles and avian models. Oxford University Press, Oxford, s. 105-127.
- Møller A.P., Allander K., Dufva R., 1990. Fitness effects of parasites on passerine birds: a review. W: Blondel J., Gosler A., Lebreton J. D., McCleery R. (red.). Population Biology of Passerine Birds: An Integrated Approach. Springer, Berlin, s. 269-280.
- Norte A. C., Araujo P. M., Sampaio H. L., Sousa J. P., Ramos J. A. 2009. Haematozoa infections in a Great Tit *Parus major* population in Central Portugal: relationships with breeding effort and health. *Ibis* 151: 677-688.
- Oppliger A., Christe P., Richner H. 1997. Clutch size and malarial parasites in female great tits. *Behavioral Ecology* 8: 148-152.
- Oppliger A., Richner H., Christe P. 1994. Effect of an ectoparasite on lay date, nest-site choice, desertion, and hatching success in the great tit (*Parus major*). *Behavioral Ecology* 5: 130-134.
- Palinauskas V., Valkiūnas G., Bolshakov C.V., Bensch S., 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* 120: 372-380.
- Petney T. N., Andrews R. H. 1998. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *International Journal for Parasitology* 28: 377-393.

- Pigeault R., Cozzarolo C. S., Choquet R., Strehler M., Jenkins T., Delhaye J., Bovet J., Wassef O., Glaizot O., Christe P. 2018. Haemosporidian infection and co-infection affect host survival and reproduction in wild populations of great tits. *International Journal for Parasitology* 48: 1079-1087.
- Pigeault R., Cozzarolo C. S., Glaizot O., Christe P. 2020. Effect of age, haemosporidian infection and body condition on pair composition and reproductive success in Great Tits *Parus major*. *Ibis* 162: 613-626.
- Przybylo R., Sheldon B. C., Merilä J. 2000. Climatic effects on breeding and morphology: evidence for phenotypic plasticity. *Journal of Animal Ecology* 69: 395-403.
- Richner H., Oppliger A., Christe P. 1993. Effect of an ectoparasite on reproduction in great tits. *Journal of Animal Ecology* 62: 703-710.
- Saino N., Ferrari R., Romano M., Martinelli R., Møller A. P. 2003. Experimental manipulation of egg carotenoids affects immunity of barn swallow nestlings. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270: 2485-2489.
- Sanz J. J., Arriero E., Moreno J., Merino S. 2001a. Female hematozoan infection reduces hatching success but not fledging success in Pied Flycatchers *Ficedula hypoleuca*. *Auk* 118: 750-755.
- Sanz J. J., Arriero E., Moreno J., Merino S. 2001b. Interactions between hemoparasite status and female age in the primary reproductive output of pied flycatchers. *Oecologia* 126: 339-344.
- Sehgal R. N., Jones H. I., Smith T. B. 2001. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology* 10: 2319-2327.
- Shutler D., Clark R.G., Rutherford S., Mullie A. 1999. Blood parasites and clutch volumes of gadwalls and mallards. *Journal of Avian Biology* 30: 295-301.
- Siikamäki P., Rätti O., Hovi M., Bennett G. F. 1997. Association between haematozoan infections and reproduction in the pied flycatcher. *Functional Ecology* 11: 176-183.
- Stearns S. C. 1992. The Evolution of Life Histories. Oxford University Press. London.
- Svensson L. 1992. Identification guide to European passerines. Svensson. Stockholm.

- Sundberg J. 1995. Parasites, plumage coloration and reproductive success in the yellowhammer, *Emberiza citrinella*. *Oikos* 74: 331-339.
- Tomás G., Merino S., Martínez-de la Puente J., Moreno J., Morales J., Lobato E. 2008. Determinants of abundance and effects of blood-sucking flying insects in the nest of a hole-nesting bird. *Oecologia* 156: 305-312.
- Townsend A. K., Wheeler S. S., Freund D., Sehgal R. N., Boyce W. M. 2018. Links between blood parasites, blood chemistry, and the survival of nestling American crows. *Ecology and Evolution* 8: 8779-8790.
- Valkiūnas G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC press. Boca Raton.
- Van Rooyen J., Jenkins T., Lahlah N., Christe P. 2014. North-African house martins endure greater haemosporidian infection than their European counterparts. *Journal of Avian Biology* 45: 450-456.
- Van Rooyen J., Lalubin F., Glaizot O., Christe P. 2013. Avian haemosporidian persistence and co-infection in great tits at the individual level. *Malaria Journal* 12: 40.
- Votýpka J., Šimek J., Tryjanowski P. 2003. Blood parasites, reproduction and sexual selection in the red-backed shrike (*Lanius collurio*). *Annales Zoologici Fennici* 40: 431-439
- Waldenström J., Bensch S., Hasselquist D., Östman Ö. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90: 191-194.
- Zamora-Vilchis I., Williams S. E., Johnson C. N. 2012. Environmental temperature affects prevalence of blood parasites of birds on an elevation gradient: implications for disease in a warming climate. *PLoS One* 7: e39208.
- Zylberberg M., Derryberry E. P., Breuner C. W., Macdougall-Shackleton E. A., Cornelius J. M., Hahn T. P. 2015. *Haemoproteus* infected birds have increased lifetime reproductive success. *Parasitology* 142: 1033.

ROZDZIAŁ III

Czynniki wpływające na zarażenie oraz współwystępowanie pasożytów krwi u młodocianych bogatek *Parus major*

1. WSTĘP

Poznanie zależności istniejących w układzie pasożyt–żywiciel pozwala na lepsze zrozumienie wpływu pasożytów na ewolucję i ekologię organizmów żywicielskich. Szczególnie istotna jest identyfikacja czynników związanych ze zmiennością w częstotliwości występowania zarażenia oraz różnorodności zespołu pasożytów. Na oba te parametry mogą wpływać czynniki abiotyczne (np. wysokość n.p.m.) oraz biotyczne, w tym charakterystyka żywiciela (np. wiek) (Dobson i Hudson 1986, Sol i wsp. 2003, Carlson i wsp. 2018). Dotychczasowe badania nad częstotliwością zarażenia oraz bogactwem zespołu pasożytów prowadzone były przede wszystkim na osobnikach, które osiągnęły dojrzałość płciową (Clayton i Moore 1997, McCrudy i wsp. 1998, Petney i Andrews 1998). Znacznie słabiej zagadnienie to jest poznane u osobników na wcześniejszych etapach życia. Tymczasem, biorąc pod uwagę różnice fizjologiczne i behawioralne między osobnikami młodymi i dojrzałymi płciowo zarażenie przez pasożyty może kształtować się odmiennie, przy czym na te różnice może mieć wpływ sposób transmisji pasożytów oraz ich zjadliwość (Frank 1996, Petney i Andrews 1998). Do jednych z najlepiej poznanych w tym zakresie układów należą: ssaki–ektopasożyty oraz ssaki–helminthy (Schalk i Forbes 1997, Morand i Poulin 1998, Petney i Andrews 1998, Bordes i Morand 2011). Schalk i Forbes (1997) wykorzystując meta–analizę danych z 38 publikacji wykazali, że u ssaków częstotliwość zarażenia przez ektopasożyty różni się między dorosłymi samcami i samicami, podczas gdy takich różnic nie stwierdza się u osobników młodocianych. Z kolei w przypadku helminthów zarówno u osobników młodocianych, jak i dorosłych nie wykazano różnic w częstotliwości zarażenia między płciami.

U ptaków jednymi z najczęstszych pasożytów są tzw. pasożyty krwi, tzn. takie których część lub wszystkie etapy cyklu życiowego w organizmie żywiciela przebiegają w krwiobiegu (Atkinson i van Riper 1991). Do grupy tej należą m.in. przedstawiciele rodzajów: *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* (grupa Haemosporidia) i *Trypanosoma*. Żywiciel zaraża się tymi pasożytami za pośrednictwem wektorów, które stanowią głównie krwio pijne muchówki (Diptera). Pasożyty przedostają się do organizmu ptaka przede wszystkim podczas żerowania wektora (Valkiūnas 2005). Tylko w przypadku *Trypanosoma* do zarażenia może dodatkowo dojść drogą pokarmową lub w wyniku zanieczyszczenia spojówki i uszkodzonej skóry odchodami wektorów (Baker 1976,

Votýpka i Svobodová 2004, Votýpka i wsp. 2012). Pasożyty krwi mogą wpływać na sukces rozrodczy oraz przeżywalność żywiciela, na co wskazują zwłaszcza badania, w których inwazja była kontrolowana eksperymentalnie (Merino i wsp. 2000, Marzał i wsp. 2005, Knowles i wsp. 2010).

Standardową przyżyciową metodą określania statusu zarażenia przez pasożyty krwi jest ich wykrywanie w krwi obwodowej. Ze względu na fakt, że niektóre pasożyty krwi charakteryzują się długim okresem prepatencji, tzn. czasem od momentu wnikięcia pasożytów do organizmu żywiciela do ich pojawienia się w krwi obwodowej, wykrywalność inwazji szczególnie w okresie pisklęcym może być ograniczona. Dotyczy to przede wszystkim pasożytów z rodzajów *Haemoproteus* i *Plasmodium*, u których okres prepatencji może wynosić średnio między 11 dniami a trzema tygodniami (Valkiūnas 2005). Jednak w zależności od gatunku żywiciela oraz gatunku/linii genetycznej pasożyta może się wahać się w zakresie od 2 dni do nawet kilku miesięcy (Palinauskas i wsp. 2008). U pasożytów z rodzaju *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* okres ten jest krótszy (wynosi ok. 5 dni, Baker 1956, Fallis i Bennett 1961), w związku z czym wykrywanie inwazji możliwe jest już w niedługim czasie po wykluciu się piskląt. Ograniczona wykrywalność inwazji niektórych pasożytów krwi występuje zwłaszcza u gatunków ptaków o krótkim okresie gniazdowym, do których zalicza się duża część ptaków wróblowych, które są najliczniej reprezentowaną grupą w badaniach dotyczących ptasich pasożytów krwi. Okres przebywania piskląt w gnieździe w tej grupie często wynosi tylko kilkanaście dni (Cramp i Perrins 1993). Dotychczasowe badania wskazują, że w populacjach ptaków wróblowych, w których znaczna część ptaków dorosłych jest zarażona, częstość zarażenia piskląt, szczególnie przez rodzaje *Haemoproteus* i *Plasmodium*, jest bardzo niska lub inwazje w ogóle nie są stwierdzane (Tabela 1).

Tabela 1. Prewalencja zarażenia przez pasożyty krwi u młodych (z podziałem na pisklęta, podloty oraz osobniki młodociane) oraz dorosłych (tzn. drugorocznych i starszych) ptaków wróblowych. Wiek piskląt podany jest w dniach życia (d). Kolumna „Metoda” zawiera informacje o rodzaju metody wykorzystanej do uzyskania danych o prewalencji: M – techniki molekularne, R – rozmazy krwi. Oszacowania uzyskane za pomocą technik molekularnych są zwykle wyższe od tych uzyskanych na podstawie rozmazów krwi.

Żywiciel	Rodzaj pasożyta	Prewalencja (%)		Metoda	Literatura
		pisklęta/podloty/osobniki młodociane	dorośle		
świergotek polny <i>Anthus campestris</i>	<i>Haemoproteus</i> <i>Plasmodium</i>	pisklęta (7–11d)	0 46,3	0,9 44,8	M Calero–Riestra i Garcia 2016
muchołówka żałobna <i>Ficedula hypoleuca</i>	<i>Trypanosoma</i> <i>Leucocytozoon</i> <i>Haemoproteus</i>	pisklęta (13d)	20,8 1 0	20,5 0,9 15,7	R Merino i Potti 1995
bogatka <i>Parus major</i> *	<i>Haemoproteus</i> <i>Plasmodium</i> <i>Leucocytozoon</i>	pisklęta (14 d)	0 0 0,6	18,9 24,8 7,5	R Norte i wsp. 2009
szpak jednobarwny <i>Strunus unicolor</i>	<i>Plasmodium</i> / <i>Haemoproteus</i>	pisklęta (14 d)	1,1	12,8	M Muriel i wsp. 2018
modraszka <i>Cyanistes caeruleus</i>	<i>Trypanosoma</i> <i>Leucocytozoon</i> <i>Haemoproteus</i> <i>Hepatozoon</i>	pisklęta (15d)	37,0 67,0 0 0	48,9 64,4 71,1 28,9	R Fargallo i Merino 2004
jaskółczak modry <i>Progne subis</i>	<i>Haemoproteus</i>	pisklęta (25–28d)	0	28,1	R Davidar i Morton 1993
oknówka <i>Delichon urbicum</i>	<i>Haemoproteus</i> <i>Plasmodium</i>	podloty	0 0	70,1 9,5	M Piersma i van der Velde 2012
oknówka	<i>Haemoproteus</i> <i>Plasmodium</i>	młodociane (2–3 miesiące)	0 1,0	57,1 14,3	M Garcia–Longoria i wsp. 2015
czarnogłówka <i>Poecile montanus</i>	<i>Haemoproteus</i> / <i>Plasmodium</i>	młodociane	30,9	32,5	R Krama i wsp. 2015
rokitniczka <i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	<i>Leucocytozoon</i> / <i>Haemoproteus</i> / <i>Hepatozoon</i>	młodociane	5,0	24,0	R Wojczulanis–Jakubas i wsp. 2012
trzcinniczek <i>Acrocephalus scirpaceus</i>	<i>Leucocytozoon</i> / <i>Haemoproteus</i> / <i>Hepatozoon</i>	młodociane	3,0	32,0	R Wojczulanis–Jakubas i wsp. 2012

Ciąg dalszy na kolejnej stronie.

namorzynek seszelski <i>Acrocephalus sechellensis</i>	<i>Haemoproteus</i>	młodociane	42,8	13,8	R	van Oers i wsp. 2010
namorzynek seszelski	<i>Haemoproteus</i>	pisklęta (<21d)	4,8	43,8	M	Hammers i wsp. 2016
		podloty (21–90d)	58,2			
		młodociany	83,9			

*W tabeli zaprezentowano podzbiór danych dla lat 2005–2006, w których zebrano informację o prevalencji zarówno u ptaków dorosłych, jak i piskląt, dane tylko dla piskląt z pierwszych lęgów

Tylko sporadycznie prevalencja pasożytów z rodzaju *Plasmodium* i *Haemoproteus* osiąga u piskląt wartości zbliżone do tych obserwowanych u ptaków dorosłych (Calero–Riestra i Garcia 2016). Ogólnie, podloty i osobniki młodociane są częściej zarażone niż pisklęta. Przykładowo, u namorzynka seszelskiego *Acrocephalus sechellensis*, prevalencja *Haemoproteus*, jedyne wykrytego u tego gatunku żywiciela rodzaju pasożyta z grupy Haemosporidia, była ponad 11 razy wyższa u podlotów i prawie 17 razy wyższa u osobników młodocianych w porównaniu z pisklętami (Hammers i wsp. 2016). Z powodu ograniczonej wykrywalności inwazji wywołanych przez pasożyty z rodzajów *Plasmodium* i *Haemoproteus* u piskląt drobnych ptaków wróblowych należałoby prowadzić detekcję zarażenia, gdy ptaki są starsze, czyli w okresie po opuszczeniu przez nie gniazda. Ponieważ ich chwytywanie w tym okresie jest problematyczne i wiąże się z dużymi nakładami czasowymi, badania tego typu należą do rzadkości (Hunter i wsp. 1997, Krams i wsp. 2013, Hammers i wsp. 2016).

Na obecność inwazji pasożytniczych u żywicieli może mieć wpływ wiele czynników, zarówno tych nie związanych bezpośrednio z żywicielem (np. wysokość nad poziomem morza i odległość od zbiorników wodnych; Ortego i Cordero 2010, Krama i wsp. 2015, Carlson i wsp. 2018), jak i tych, które są ściśle związane z jego cechami. Do jednych z najważniejszych cech żywiciela, które mogą wpływać na rozwój inwazji pasożytniczych należy jego płeć. U wielu gatunków ptaków stwierdzono, że dorosłe samce są częściej zarażone przez pasożyty niż samice. Przyjmuje się, że za taki wzorec zapasożycenia odpowiada gorzej funkcjonujący u samców układ odpornościowy, co wiąże się z immunosupresyjnym działaniem androgenów (Folstad i Karter 1992). Różnice w częstości zarażenia stwierdzane są jednak tylko w części przypadków. Meta–analiza wyników 33 badań wykazała, że ogólnie u dorosłych ptaków częstość zarażenia przez

pasożyty krwi nie różni się między samcami i samicami. Jednak inwazje *Haemoproteus* (najpowszechniej występującego rodzaju pasożyta w grupie badanych gatunków żywicieli) podczas okresu lęgowego były znacznie częstsze u samic niż samców (McCurdy i wsp. 1998). Natomiast w metaanalizie uwzględniającej wyniki badań na 96 gatunkach ptaków zarażonych pasożytami krwi nie stwierdzono różnic w prevalencji (m.in. *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma*; Valdebenito i wsp. 2020). W odróżnieniu od ptaków, które osiągnęły dojrzałość płciową, niewiele jest danych na temat częstości zarażenia przez pasożyty w zależności od płci u piskląt, podlotów i młodocianych ptaków. Biorąc pod uwagę fakt, że przed osiągnięciem dojrzałości płciowej nie ma różnic między samcami i samicami w wielkości narządów związanych z układem odpornościowym (Møller i wsp. 1998, Fargallo i wsp. 2002), można byłoby oczekiwać podobnej częstości zarażenia u ptaków obu płci na wczesnym etapie życia. Część badań wykazała jednak, że u pewnych gatunków mogą występować różnice między płciami w poziomie immunokompetencji już w stosunkowo krótkim czasie po wykluciu (Tschirren i wsp. 2003, Dubiec i wsp. 2006). Takie różnice mogą potencjalnie prowadzić do zróżnicowania częstości inwazji pasożytniczych.

Kolejnym czynnikiem, który może odgrywać istotną rolę w kształtowaniu prawdopodobieństwa rozwoju inwazji pasożytniczych jest aktualne lub przeszłe zarażenie przez inne patogeny (Milotl i Cox 1985, Christensen i wsp. 1987, Telfer i wsp. 2010, Knowles 2011). W pewnych układach patogenów następuje, jedno– lub dwukierunkowo, wzmocnienie infekcji/inwazji (oddziaływania synergistyczne), podczas, gdy w innych – jej osłabienie lub całkowite usunięcie (oddziaływania antagonistyczne). Do powstawania oddziaływań między patogenami może dochodzić bezpośrednio, np. w wyniku konkurencji o zasoby, oraz pośrednio, w wyniku reakcji układu odpornościowego, w tym immunosupresji lub odporności krzyżowej (Pedersen i Fenton 2007). Zjawisko oddziaływań zostało najlepiej poznane dla patogenów ssaków, zwłaszcza na przykładzie modelowych organizmów, tj. myszy i szczurów. Przykładowo, dobrze poznany jest, w dużym stopniu na podstawie badań eksperymentalnych, charakter oddziaływań dla pasożytów z rodzaju *Plasmodium* i *Trypanosoma* (Cox 2001). U ssaków oba rodzaje pasożytów oddziałują z licznymi patogenami należącymi m.in. do bakterii, helmintów, wirusów oraz innych pierwotniaków (Cox 2001). Wykazano, że pasożyty z obu rodzajów

mogą też wpływać (synergistycznie) na siebie nawzajem (Shmeul i wsp. 1975, Krettli 1977). U ptaków zależności między patogenami są znacznie słabiej poznane i w większości przypadków dane na temat tego zjawiska pochodzą z badań obserwacyjnych (Medeiros i wsp. 2014, Oakgrove i wsp. 2014). Badania eksperymentalne poświęcone temu zagadnieniu, w ramach których ptaki zarażane są w kontrolowanych warunkach należą, poza tymi przeprowadzanymi na gatunkach hodowlanych (Wright i wsp. 2005, Silveira i wsp. 2013), do rzadkości (Dhondt i wsp. 2017). Na podstawie dostępnych informacji można stwierdzić, że dla pewnych par pasożytów krwi charakter zależności jest w znacznym stopniu powtarzalny. Przykładowo, w wielu badaniach, czy to na poziomie gatunku żywiciela, czy zgrupowania gatunków, stwierdzono negatywną zależność między pasożytami z rodzajów *Haemoproteus* i *Plasmodium* (Meixell i wsp. 2016, Smith i wsp. 2016). Jest jednak możliwe, że w przypadku tych konkretnych rodzajów pasożytów, obserwowany charakter zależności związany jest z niedoskonałością wykrywania obu rodzajów pasożytów, za pomocą powszechnie stosowanych technik molekularnych, gdy pasożyty te występują w żywicielu jednocześnie (Pérez-Tris i Bensch 2005, Valkiūnas i wsp. 2006, Martínez i wsp. 2009). W przypadku pozostałych par pasożytów tylko dla niektórych można wyłonić dominujący charakter zależności. Pasożyty z rodzaju *Trypanosoma* częściej niż wynikałoby to z przewalencji poszczególnych rodzajów pasożytów współwystępują z innymi pasożytami krwi, przede wszystkim *Leucocytozoon* oraz, chociaż znacznie rzadziej, z *Haemoproteus* (*Leucocytozoon*: Kirkpatrick i Lauer 1985, Møller i Nielsen 2007, Deviche i wsp. 2010, Oakgrove i wsp. 2014, Svobodová i wsp. 2015; *Haemoproteus*: Deviche i wsp. 2010, ale brak zależności w Kirkpatrick i Lauer 1985, Oakgrove i wsp. 2014, Svobodová i wsp. 2015). Z kolei w przypadku *Haemoproteus* i *Leucocytozoon* stwierdzono zarówno zależność pozytywną (Svobodová i wsp. 2015), negatywną (Oakgrove i wsp. 2014), jak i brak zależności (Deviche i wsp. 2010).

Badania, w których analizowano charakter zależności między różnymi patogenami, w tym pasożytami krwi, u dziko żyjących ptaków dotyczyły prawie wyłącznie ptaków dorosłych. Tymczasem ze względu na różnice w fizjologii, w tym funkcjonowaniu układu odpornościowego, między ptakami dorosłymi i na wczesnych etapach życia można oczekiwać, że u bardzo młodych osobników oddziaływania między pasożytami krwi mogą kształtować się odmiennie niż u ptaków dorosłych. Zagadnienie to jest w chwili obecnej

jednak bardzo słabo poznane. Svobodová i wsp. (2015) wykazali, że u krogulca zwyczajnego *Accipiter nisus* zależność między *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* miała charakter pozytywny u piskląt i neutralny u ptaków dorosłych, podczas gdy u myszołowa zwyczajnego *Buteo buteo* różnice w charakterze zależności między grupami wiekowymi (pozytywna u piskląt i neutralna u ptaków dorosłych) stwierdzono dla *Haemoproteus* i *Leucocytozoon*. Różnice między ptakami młodymi i dorosłymi stwierdzono także w przypadku zależności między pasożytami krwi a innymi patogenami. Medeiros i wsp. (2014) wykazali, że dorosłe ptaki posiadające przeciwciała przeciw wirusowi Zachodniego Nilu, były rzadziej zarażone przez *Plasmodium* niż te, które przeciwciał nie posiadały, podczas gdy taka zależność nie istniała u ptaków młodocianych. O różnicach w charakterze zależności między pasożytami u młodych i dorosłych żywicieli może przede wszystkim decydować mechanizm, który leży u podstaw powstawania nielosowego współwystępowania pasożytów. Przykładowo, jeśli negatywna zależność wynika z odporności krzyżowej, biorąc pod uwagę nie w pełni rozwinięty układ odpornościowy u bardzo młodych ptaków, można oczekiwać częstszego współwystępowania pasożytów, a więc słabiej wyrażonej negatywnej zależności u młodych niż dorosłych ptaków.

Prezentowane badania miały dwa główne cele. Po pierwsze, identyfikację czynników, które związane są z prawdopodobieństwem wystąpienia inwazji pasożytniczych pierwotniaków z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* na wczesnych etapach życia. Po drugie, określenie czy charakter zależności (neutralny, negatywny, pozytywny) między pasożytami z poszczególnych rodzajów zmienia się w zależności od wieku żywiciela (osobniki młodociane vs dojrzałe płciowo). Badania przeprowadzono na drobnym ptaku wróblowym z grupy dziuplaków – bogatce *Parus major*. Ze względu na długość okresu prepatencji u pasożytów z rodzajów *Haemoproteus* i *Plasmodium*, w analizach mających na celu określenie statusu i intensywności zarażenia na wczesnych etapach życia wykorzystano materiał biologiczny pobrany od kilkutygodniowych ptaków, średnio ok. 53 dni od daty wyklucia (zakres 31–86 dni). Dla celów prezentowanych badań ptaki te będą w dalszej części tekstu określane jako młodociane (określa się tak ptaki, które stały się samodzielne), pomimo tego, że biorąc pod uwagę długość czasu, przez jaki młode bogatki pozostają pod opieką rodziców po

opuszczeniu gniazda (do ponad 3 tygodni, Gosler i Clement 2007), w grupie tej znajdowały się także podloty.

Jako potencjalne czynniki, które u młodocianych bogatek mogą być związane z prawdopodobieństwem wystąpienia inwazji wzięte zostały pod uwagę: wiek określany jako liczba dni od daty wyklucia, płeć, data klucia oraz data schwytania. Przewidywano, że u młodocianych bogatek:

- prawdopodobieństwo wystąpienia inwazji każdego z rodzajów pasożytów wzrasta wraz z długością życia ze względu na wzrastające prawdopodobieństwo kontaktu z wektorami oraz pojawienia się pasożytów w krwi obwodowej,
- prawdopodobieństwo zarażenia nie różni się między samcami i samicami lub samce są częściej zarażone; pierwsze przewidywanie wynika z faktu, że u młodocianych ptaków nie występują różnice w rozwoju narządów układu odpornościowego, a drugie z faktu, że pisklęta bogatki płci męskiej w niektórych populacjach odznaczają się niższym poziomem immunokompetencji (Tschirren i wsp. 2003),
- prawdopodobieństwo wystąpienia inwazji wzrasta z postępem sezonu, a więc jest wyższe u później wykłutych oraz później schwytanych ptaków, co ma związek z fenologią pojawu wektorów.

W przypadku zjawiska zależności między pasożytami reprezentującymi różne rodzaje, bazując na dotychczasowych wynikach badań zarówno na ssakach, jak i ptakach, oraz wiedzy o ich cyklu życiowym oraz reakcji układu odpornościowego na pasożytnicze inwazje wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkowe oczekiwano negatywnej zależności w układzie *Haemoproteus-Plasmodium* oraz pozytywnej w układach zawierających *Trypanosoma*.

2. METODY

2.1. Teren badań

Badania zostały przeprowadzone w latach 2015–2016 w populacji bogatki gnieźdzącej się w skrzynkach lęgowych. Teren badań znajduje się ok. 10 km na południowy zachód od granic Warszawy (52°05'N; 20°52'E) w obrębie Lasów Sękocińskich. W latach 2010–2013 na terenie badań wydzielono pięć powierzchni badawczych (Stara (S), Nowa (N), IBL (I),

Daleka (D) oraz Prawa (P)), na których rozwieszono skrzynki lęgowe (N – 2010; I, S – 2011; D, P – 2013). Powierzchnia terenu jest mało urozmaicona, głównie płaska, z niewielkimi wzniesieniami na dwóch z wydzielonych powierzchni badawczych, jednak wysokości względne nie przekraczają tam 2 m (Popławska 2014). Na czterech z pięciu powierzchni dominującym gatunkiem jest sosna zwyczajna *Pinus sylvestris*, z domieszką dębu szypułkowego *Quercus robur* i bezszypułkowego *Quercus petraea*, brzozy brodawkowatej *Betula verrucosa* oraz grabu *Carpinus betulus*. Wyjątek stanowi powierzchnia D, na której domieszka dębów oraz grabów jest większa. Skrzynki znajdują się na wysokości ok. 2,5 m w węzłach sieci co 50 m. Łącznie, w sezonach lęgowych 2015–2016, na terenie badań dostępnych dla ptaków było ok. 250 skrzynek. Skrzynki są drewniane, z otwieraną przednią ścianką i mają następujące wymiary: dno (wewnątrz) 11 × 11 cm, odległość od dna od otworu wlotowego – 21 cm, średnica otworu wlotowego – 3,2 cm. Wszystkie skrzynki posiadały zamontowaną na wysokości otworu wlotowego dodatkową deseczkę, która wydłużała tunel otworu wlotowego do 3 cm. Ponadto wejście do otworu wlotowego zabezpieczone było metalową płytką. Te dodatkowe wzmocnienia miały na celu zmniejszenie ryzyka drapieżnictwa.

W skrzynkach lęgowych na powierzchniach badań gnieźdzą się głównie bogatki, modraszki i muchołówki żałobne.

2.2. Badania terenowe

Od połowy kwietnia wszystkie skrzynki były regularnie kontrolowane w celu wyznaczenia daty rozpoczęcia lęgu (data złożenia pierwszego jaja), liczby jaj w zniesieniu, daty klucia (dzień 0) oraz liczby podlotów. Dane te zostały zebrane zarówno dla pierwszych, jak i drugich lęgów. Niektóre lęgi były najprawdopodobniej lęgami powtarzanymi, czyli złożonymi po porzuceniu pierwszego lęgu (na terenie badań nie zaobserwowano przypadków strat lęgów spowodowanych przez drapieżniki). Ponieważ we wszystkich przypadkach do porzucenia lęgu doszło przed schwyтaniem ptaków dorosłych, nie było możliwe jednoznaczne przyporządkowanie lęgów do kategorii lęgów porzuconych. W 2015 r. za datę klucia przyjęto dzień, w którym w momencie kontroli gniazda pisklęta wykluły się z ponad 50% jaj, natomiast w 2016 r. – dzień, w którym w momencie kontroli w gnieździe znajdowało się co najmniej jedno pisklę. W 14 dniu po wykluciu pisklęta wazono

(dokładność 0,1 g), mierzono długość skoku (dokładność 0,01 mm) i długość skrzydła (dokładność 0,1 cm). W tym samym dniu, lub w przypadku chwytania zakończonego niepowodzeniem także w kolejnych dniach, chwymano ptaki dorosłe. Do chwytania używano dwóch metod: siatki ornitologicznej ustawionej w bliskiej odległości od skrzynki lub pułapki zapadkowej umieszczanej wewnątrz skrzynki. U schwytanych ptaków oznaczano płeć, wiek (na podstawie różnicy w wybarwieniu pierwszo- i drugorzędowych lotek, Svensson 1992), dokonywano pomiarów biometrycznych (rodzaj i sposób wykonania pomiarów, jak u 14-dniowych piskląt) oraz pobierano próbkę krwi. Krew (ok. 20–30 μ l) była pobierana do kapilary po nakłuciu igłą żyły skrzydłowej. Niewielka ilość krwi została wykorzystana do przygotowania rozmazów (po dwa na osobnika), a pozostała ilość została umieszczona w 99,8% alkoholu etylowym do późniejszych analiz molekularnych zarażenia przez pasożyty krwi. W dniu wykonania rozmazy krwi były utrwalane za pomocą metanolu, a następnie barwione, zgodnie z instrukcją producenta, z wykorzystaniem zestawu barwników Hemacolor (Merck Millipore).

W każdym z sezonów został przeprowadzony zabieg eksperymentalny: w 2015 r. zabieg zmiany poziomu inwestycji w budowę gniazda, a w 2016 r. zabieg dokarmiania części piskląt w lęgu mający na celu zmianę ich stanu odżywienia. Ze względu na fakt, że obydwa zabiegi nie miały wpływu na prawdopodobieństwo wystąpienia inwazji lub wielkość próby uniemożliwiała wiarygodną ocenę jego wpływu (dane nie prezentowane, Harnist 2017), zabieg eksperymentalny nie został wzięty pod uwagę przy tworzeniu modeli statystycznych. Z tego też względu pominięto szczegółowy opis, w jaki sposób każdy z tych zabiegów został przeprowadzony.

Osobniki młodociane były chwymane przez okres 4–5 tygodni rozpoczynając odłowy ok. 3 tygodnie od wylotu piskląt z najwcześniejszych lęgów. U bogatki podloty przebywają z rodzicami jeszcze przez okres do 25 dni po opuszczeniu gniazda (Gosler i Clement 2007). W tym czasie przemieszczają się wraz z dorosłymi na obszarze średnio 8 ha wokół miejsca lęgu (Naef-Daenzer i Gruebler 2008). W celu ułatwienia chwytania ptaków młodocianych wyznaczono kilka stanowisk, na których w połowie czerwca zostały zawieszone karmniki (automatyczny, napełniany od góry, z szybką na przedniej ścianie, wys.–szer. 40 × 20 cm, model KA1 producent Ptasię Ogrody). Stanowiska zostały dobrane tak, aby były zlokalizowane w pobliżu skrzynek, z których wyleciały już podloty bogatki. Jednocześnie

unikano wieszania karmników w pobliżu skrzynek, w których wciąż przebywały pisklęta. W 2015 roku zawieszono łącznie 5 karmników, a w 2016 – 8 karmników. Karmniki rozwieszono tak, aby przypadały w miarę równomiernie na powierzchnie badawcze. Karmniki zostały przymocowane do pni na wysokości 2,5–3 m. Jako przynęty użyto nasion słonecznika, które z powodzeniem wykorzystywane były w dotychczasowych badaniach uwzględniających odłowy młodocianych bogatek (Dhondt, 1979, Dingemanse i wsp. 2002, Krams i wsp. 2013). Jednorazowo wsypywano do karmników ok. 0,5 kg łuskanych nasion. W przypadku ubywania, nasiona były regularnie dosypywane. Miejsca chwytania wyznaczono w pobliżu karmników, a dodatkowo chwytanie prowadzono w kilku stałych miejscach, w okolicy których przebywały młodociane bogatki. W ciągu jednego dnia prowadzono chwytanie w kilku z wyznaczonych miejsc. Na jednym stanowisku przebywano około godziny lub dłużej, jeżeli w pobliżu przebywały podloty. Na wyznaczonym miejscu rozstawiano sieć ornitologiczną o wymiarach $2,5 \times 7$ m (Ecotone), najczęściej około 50 cm przed karmnikiem lub przy zakrzaczeniach na ewentualnej trasie przelotu, którą poznano po kilkukrotnym rozstawieniu sieci. W celu dodatkowego zwabienia ptaków pod siecią umieszczano głośnik, z którego odtwarzano odgłosy piskląt, podlotów i dorosłych bogatek. W przypadku schwytania ptaki były wyciągane z sieci i umieszczane w workach ornitologicznych, by następnie przeprowadzić pomiary biometryczne i pobrać krew, która została następnie wykorzystana jako źródło materiału do molekularnej analizy zarażenia przez pasożyty krwi i oznaczenia płci. W tym czasie nagranie odgłosów było zatrzymywane. Pobranie pomiarów biometrycznych przebiegało tak, jak zostało to opisane dla piskląt, natomiast krew tak jak opisano dla ptaków dorosłych.

Wszystkie pisklęta oraz wcześniej niezaobrączkowane ptaki młodociane i dorosłe zostały zaobrączkowane przy użyciu standardowej obrączki aluminiowej (Stacja Ornitologiczna Muzeum i Instytutu Zoologii PAN).

2.3. Molekularna analiza zarażenia przez pasożyty krwi

Izolacja DNA z krwi została przeprowadzona przy użyciu octanu amonu (Burke i wsp. 1998). Status zarażenia został określony na podstawie amplifikacji materiału DNA z genomu pasożytów wykorzystując do tego celu zagnieżdżoną łańcuchową reakcję polimerazy (PCR). Do wykrycia zarażenia przez poszczególne rodzaje pasożytów

wykorzystano następujące rodzaje markerów (szczegółowy opis warunków poszczególnych reakcji PCR znajduje się w Apendyksie 1):

- *Plasmodium* i *Haemoproteus*: fragment (o długości 479 pz) mitochondrialnego cytochromu b; startery, skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne PCR wg protokołu Waldenströma i wsp. (2004),
- *Leucocytozoon*: fragment (o długości 480 pz) mitochondrialnego cytochromu b; startery, skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne PCR wg protokołu Hellgrena i wsp. (2004),
- *Trypanosoma*: fragment genu (o długości 326 pz) kodującego mniejszą podjednostkę rybosomalną RNA (SSU RNA) pasożyta; startery i skład mieszaniny reakcyjnej wg protokołu Sehgała i wsp. (2001), a warunki termiczne PCR wg protokołu Zamory–Vilchis i wsp. (2012).

Produkty PCR zostały przeniesione na żel agarozowy (2%) i poddane elektroforezie w buforze 1xTBE w następujących warunkach: 5,5V/cm przez 30 min. W przypadku stwierdzenia zarażenia przez dany rodzaj pasożyta, w celu oznaczenia linii genetycznej (pasożyty z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon*) lub gatunku (pasożyty z rodzaju *Trypanosoma*) produkt PCR był sekwencjonowany. Przed sekwencjonowaniem produkty PCR były oczyszczane przy pomocy zestawu dwóch enzymów: egzonukleazy i fosfatazy zgodnie z instrukcją producenta (ExoBAP, Eurx). Dwustronne sekwencjonowanie było przeprowadzane metodą Sanger z wykorzystaniem aparatów ABI 3730/3730xl w systemie płytkowym na płycie 96-dołkowej (analizy zlecone do wykonania w Serwisie Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN).

Chromatogramy otrzymane po sekwencjonowaniu były analizowane w programie BioEdit (wersja 7.2.5) (Hall 1999). W celu identyfikacji linii genetycznej pasożytów z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon* odczytana sekwencja nukleotydów była porównywana z sekwencjami zdeponowanymi w internetowej bazie MalAvi (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/Malavi/about.html>, Bensch i wsp. 2009). Jeśli uzyskana sekwencja nie wykazała 100% zgodności z żadną linią w bazie MalAvi była ona przyporządkowywana do rodzaju pasożyta na podstawie tego, z jaką linią genetyczną wykazywała najwyższe podobieństwo. Współwystępowanie jednocześnie co najmniej dwóch linii genetycznych pasożytów było rozpoznawane na podstawie obecności

podwójnych odczytów zasad w chromatogramie. W przypadku *Trypanosoma* sekwencje standardowo identyfikowane są do gatunku lub rodzaju na podstawie sekwencji zdeponowanych w bazie GeneBank. We wszystkich próbkach poza jedną, dla których startery opracowane przez Sehgała i wsp. (2001) namnożyły produkt, został on zidentyfikowany jako materiał genetyczny *Trypanosoma*. Osobnik, dla którego uzyskany produkt został przypisany do innego rodzaju, został oznaczony jako niezarażony przez *Trypanosoma*.

2.4. Molekularna analiza płci osobników młodocianych

Analiza płci z wykorzystaniem metod molekularnych jest w przypadku młodocianych bogatek konieczna, ponieważ u tego gatunku nie można tej cechy w takim wieku oznaczyć na podstawie cech morfologicznych oraz ubarwienia upierzenia (Cramp i Perrins 1993). Metoda ta polega na amplifikacji za pomocą reakcji PCR dwóch zlokalizowanych na chromosomach płci homologicznych fragmentów genu CHD (ang. chromodomain helicase) różniących się długością. U ptaków płcią heterogametyczną są samice (WZ), a homogametyczną – samce (ZZ). W związku z tym oznaczenie płci następuje na podstawie liczby stwierdzanych produktów PCR: dwóch w przypadku samic i jednego w przypadku samców.

Do molekularnej analizy płci wykorzystano DNA wyizolowane wcześniej przy użyciu octanu amonu (Burke i wsp. 1998). Fragmenty genu CHD zostały namnożone przy użyciu starterów P2 i P8 (Griffiths i wsp. 1998). Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki termiczne PCR były zgodne z tymi opisanymi przez Griffiths i wsp. (1998). Rozdział produktów PCR przeprowadzano na 2% żelu agarozowym stosując napięcie 7V/cm przez 40 min. Płeć młodocianych bogatek oznaczono na podstawie obecności na żelu produktów PCR: fragmentu CHD–Z o długości 380 par zasad (obecny u obu płci) i fragmentu CHD–W o długości 455 par zasad (obecny tylko u samic) (Griffiths i wsp. 1998).

2.5. Analiza rozmazów krwi

Intensywność zarażenia przez pasożyty krwi była określana na podstawie przeglądania rozmazów krwi przy użyciu mikroskopu świetlnego (Carl Zeiss Jena JENAVAL). Liczenie pasożytów z rodzajów *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* odbywało się przy 400–krotnym

powiększeniu, natomiast *Haemoproteus* i *Plasmodium* przy 1000–krotnym powiększeniu, przy użyciu olejku immersyjnego. Intensywność zarażenia była szacowana poprzez określenie liczby zarażonych erytrocytów przypadających na 10 000 erytrocytów (Godfrey i wsp. 1987). W celu określenia liczby pól widzenia koniecznych do przejrzania, aby uzyskać łączną sumę 10 000 erytrocytów zliczono dokładną liczbę erytrocytów w kilku polach i wyliczono średnią liczbę erytrocytów przypadających na pole widzenia. Ze względu na zbliżoną jakość rozmazów oraz podobną liczbę erytrocytów w polu widzenia (najczęściej ok. 200) w większości przypadków zliczano pasożyty w 50 polach widzenia.

2.6. Wielkość próby oraz analizy statystyczne

W sumie w dwóch sezonach lęgowych schwytano 112 młodocianych bogatek, w tym siedem osobników dwukrotnie. Materiał biologiczny (krew) do analizy zarażenia przez pasożyty krwi i oznaczenia płci pobrany był dla 111 osobników. Wśród 111 ptaków 45,0% stanowiły zaobrączkowane na terenie badań jako pisklęta (42 osobniki z pierwszych lęgów oraz 8 osobników z drugich lęgów), a więc takie, dla których dostępne były dane o dacie klucia oraz długości życia w momencie schwytania (Tabela 2).

Tabela 2. Liczba, termin chwytania, wiek oraz płeć młodocianych bogatek schwytanych w sezonach lęgowych 2015 i 2016.

	Sezon lęgowy	
	2015	2016
Całkowita liczba schwytanych młodocianych ptaków	64	48*
Liczba młodocianych ptaków zaobrączkowanych jako pisklęta	30	20
Liczba ptaków schwytanych dwukrotnie	7	0
Zakres dat chwytania	26.06–31.07	16.06–22.07
Mediana dat schwytania	18.07	11.07
Mediana i zakres wieku ptaków (liczba dni)	58 (31–86)	49,5 (34–67)
Liczba samiec	34	29
Liczba samców	30	18

*Materiał DNA dostępny dla 47 ptaków

W grupie ptaków zaobrączkowanych jako pisklęta 61,2% pochodziło z lęgów, w których schwytano co najmniej dwa ptaki (od dwóch do czterech). Biorąc pod uwagę fakt,

że między lęgami mogą istnieć różnice w presji ze strony wektorów, a tym samym różnice w prawdopodobieństwie transmisji pasożytów, aby uniknąć błędu pseudoreplikacji (dane nie są całkowicie niezależne od siebie), do analiz statystycznych włączono dane, wybrane losowo, tylko z jednego osobnika na lęg. Podobnie, w przypadku osobników schwytanych dwukrotnie wykorzystano dane, wybrane losowo, tylko z jednego schwytania. W przypadku ptaków dorosłych w sezonach lęgowych 2015 i 2016 zebrano 144 próbki materiału biologicznego od 110 ptaków. Od 28 osobników pobrano materiał co najmniej dwukrotnie, po jednym razie w każdym z sezonów lub/i w obrębie tego samego sezonu, na etapie pierwszego oraz drugiego lęgu. W celu uniknięcia błędu pseudoreplikacji do analiz włączono dane, wybrane losowo, tylko z jednego schwytania. Ponadto dane uzyskane ze schwytań dwóch osobników zostały wykluczone z analiz z powodu braku pełnych informacji o statusie zarażenia (m.in. z powodu złej jakości chromatogramu, który uniemożliwiał jednoznaczną identyfikację linii genetycznej).

Do zbadania wpływu rozpatrywanych czynników na prawdopodobieństwo wystąpienia inwazji oraz określenia charakteru oddziaływania między różnymi rodzajami pasożytów zastosowano uogólnione modele liniowe z dwumianowym typem rozkładu oraz funkcją łączenia typu logit. We wszystkich modelach zmienną zależną był status zarażenia kodowany jako 0 dla osobników, u których nie stwierdzono inwazji danego rodzaju pasożyta oraz 1, gdy taką inwazję stwierdzono. Analizy przeprowadzono na dwóch zbiorach danych różniących się zakresem dostępnych informacji: 1) obejmujących wyłącznie ptaki zaobrączkowane jako pisklęta w monitorowanych skrzynkach lęgowych ($n = 30$) oraz 2) ptakach zaobrączkowanych jako pisklęta i tych zaobrączkowanych po raz pierwszy jako osobniki młodociane ($n = 91$, wykluczono jednego osobnika, dla którego nie były dostępne dane o dacie schwytania). Biorąc pod uwagę fakt, że dla części ptaków z drugiego zbioru danych (zaobrączkowanych po raz pierwszy jako osobniki młodociane) nie były dostępne informacje z okresu gniazdowego, niemożliwe było określenie wpływu wieku oraz daty klucia na prawdopodobieństwo inwazji. W analizach uwzględniających wyłącznie ptaki zaobrączkowane jako pisklęta, jako zmienne niezależne wprowadzono: rok, płeć, wiek (mierzony jako liczba dni od daty klucia do daty schwytania) oraz datę klucia. W analizach uwzględniających wszystkie młodociane bogatki jako zmienne niezależne wprowadzono: rok, płeć oraz datę schwytania. Ze względu na możliwe różnice

w fenologii rozrodu między latami oraz różnice w terminie przeprowadzania odłowów młodocianych bogatek, dane dotyczące dat poddano standaryzacji. Standaryzacja polegała na wyliczeniu odchylenia rzeczywistej daty od mediany dat w obrębie sezonu, oddzielnie dla dat klucia i dat chwytania. Model początkowy zawierał wszystkie efekty główne oraz interakcje drugiego rzędu z wyjątkiem interakcji pomiędzy predyktorami ciągłymi. Interakcje statystycznie nieistotne były usuwane z modelu krokowo, zaczynając od interakcji o najwyższej wartości prawdopodobieństwa (P). Model końcowy zawierał wszystkie efekty główne oraz interakcje o $P \leq 0,05$. W przypadku modeli, dla których na etapie testowania istotności interakcji, pojawiał się problem tzw. quasi całkowitego rozdzielenia (ang. quasi-complete separation) a oszacowania współczynników i/lub ich błędów standardowych były obarczone błędem (wskazują na to bardzo wysokie wartości), przetestowany został tylko model zawierający efekty główne. Wyjątek stanowił model dotyczący prawdopodobieństwa zarażenia przez *Leucocytozoon*, w którym niewiarygodne oszacowania błędu standardowego współczynnika dotyczyły również predyktora „płeć”.

Charakter zależności między pasożytami został przetestowany na dwóch zbiorach danych: 1) dotyczących osobników młodocianych i dorosłych (osobniki młodociane: $n = 92$, osobniki dorosłe: $n = 109$) oraz 2) wyłącznie osobników młodocianych ($n = 92$). Taki sposób przeprowadzenia analiz podyktowany był bardzo niską prevalencją *Trypanosoma* u osobników dorosłych (cztery osobniki w jednym z dwóch sezonów lęgowych), co miało wpływ na wiarygodność oszacowań współczynników i ich błędów standardowych. W związku z powyższym, zależności między pasożytami w odniesieniu do grupy wiekowej przeprowadzono wyłącznie dla pasożytów z grupy Haemosporidia. Jako predyktory każdy model zawierał rok, wiek (osobnik młodociany vs dorosły), status zarażenia każdego z pozostałych rodzajów pasożytów oraz interakcje wieku ze statusem zarażenia przez poszczególne rodzaje pasożytów. Interakcje statystycznie nieistotne były usuwane z modelu krokowo, zaczynając od interakcji o najwyższej wartości P .

Wszystkie modele zostały sprawdzone pod kątem zgodności z założeniem uogólnionych modeli liniowych, czyli, że dane wprowadzone do modelu stanowią zbiór niezależnych obserwacji. W przypadku modeli zawierających zbiór danych dotyczących ptaków młodocianych zaobrączkowanych jako pisklęta i tych zaobrączkowanych po raz pierwszy jako osobniki młodociane, warunek ten może być w pewnym stopniu naruszony,

ponieważ wśród ptaków, które nie zostały zaobrączkowane jako pisklęta, tylko schwytane po raz pierwszy jako osobniki młodociane, mogą znajdować się ptaki pochodzące z tego samego lęgu, a tym samym prawdopodobnie wystawione na podobną presję ze strony wektorów. Ponadto, sprawdzono, czy wśród predyktorów nie występuje zjawisko współliniowości (ang. multicollinearity). Ocena współliniowości została przeprowadzona na podstawie wartości współczynnika współliniowości VIF (ang. variance inflation factor), przyjmując, że wartości $VIF < 5$ wskazują na brak współliniowości. Analizy zostały wykonane w programie IBM SPSS ver. 19 (IBM Corp. 2010).

3. WYNIKI

3.1. Częstość i intensywność zarażenia oraz skład zespołu pasożytniczych pierwotniaków u młodocianych bogatek

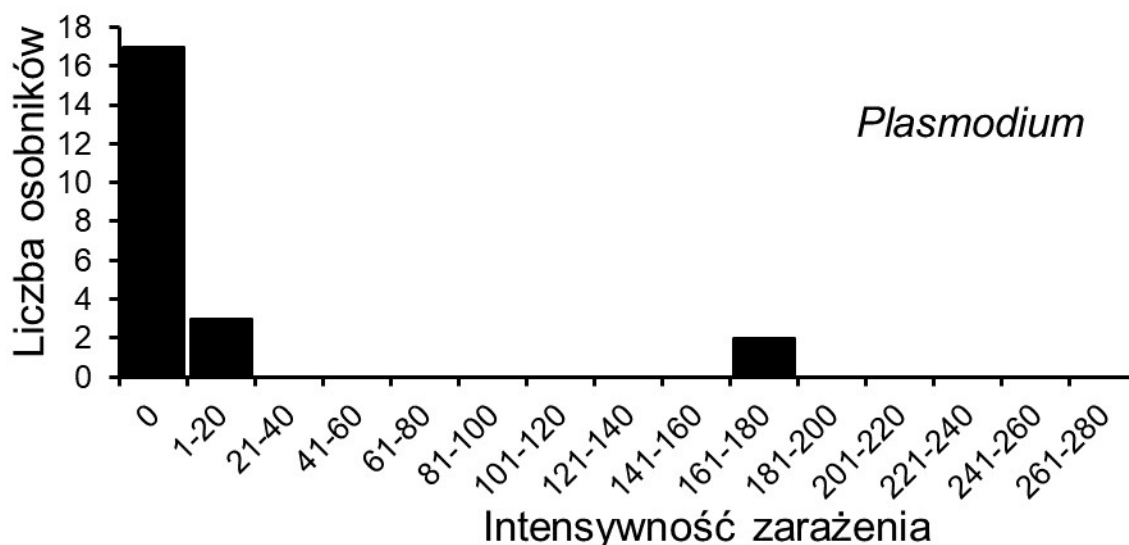
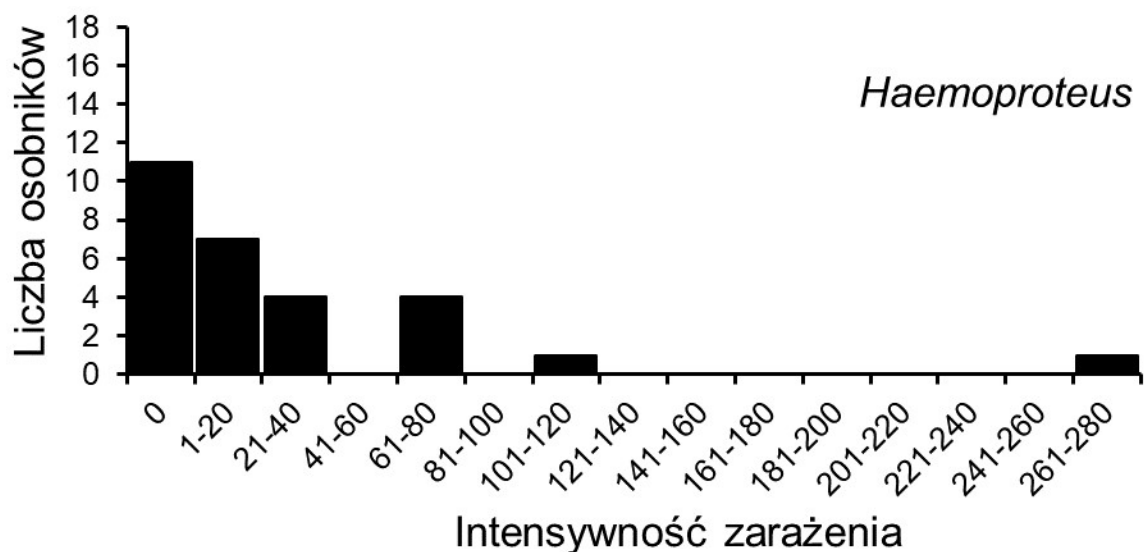
W grupie 92 młodocianych bogatek (podzbiór danych, w którym wśród osobników zaobrączkowanych jako pisklęta w tym samym gnieździe został losowo wybrany jeden osobnik na lęg) średnio 64,1% (2015: 55,8%, 2016: 72,5) było zarażonych co najmniej jednym rodzajem pasożyta. Najczęściej występowały inwazje *Haemoproteus*, a najrzadziej *Leucocytozoon* (Tabela 3).

Tabela 3. Prewalencja pasożytów z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* u młodocianych bogatek w latach 2015–2016. $\bar{x}$ – średnia

Rodzaj pasożyta	Prewalencja (%)		$\bar{x}$
	2015 n = 52	2016 n = 40	
<i>Haemoproteus</i>	38,5	22,5	30,5
<i>Plasmodium</i>	7,7	45,0	26,3
<i>Leucocytozoon</i>	3,8	12,5	8,2
<i>Trypanosoma</i>	19,2	17,5	18,4

Dla osobników oznaczonych za pomocą technik molekularnych jako zarażone intensywność zarażenia wahała się w zakresie 0–261 zarażonych komórek/10 000 erytrocytów dla *Haemoproteus* (zgodność statusu zarażenia określonego na podstawie metod molekularnych i rozmazów: 87,9%) oraz 0–170 dla *Plasmodium* (zgodność statusu zarażenia określonego na podstawie metod molekularnych i rozmazów: 81,3%) (Rycina 1). Mediana intensywności zarażenia wynosiła 7,5 dla *Haemoproteus* i 0 dla *Plasmodium*. W

przypadku *Leucocytozoon* zakres i mediana intensywności zarażenia wynosiły odpowiednio 0–13,5 i 0 (zgodność statusu zarażenia określonego na podstawie metod molekularnych i rozmazów: 94,5%). Nie stwierdzono ani jednego przypadku zarażenia przez *Trypanosoma* na podstawie rozmazów krwi.



Rycina 1. Rozkład intensywności zarażenia (liczba zarażonych erytrocytów/10 000 erytrocytów) przez pasożyty z rodzajów *Haemoproteus* i *Plasmodium* u młodocianych bogatek, u których potwierdzono inwazję za pomocą metod molekularnych. Intensywność zarażenia została określona na podstawie rozmazów krwi.

Rodzaj *Haemoproteus* reprezentowany był przez 5 linii genetycznych (w tym 2 dotychczas nieopisane) z dominującą linią PARUS1, rodzaj *Plasmodium* – przez dwie linie

z dominującą linią SGS1, a rodzaj *Leucocytozoon* przez 3 linie genetyczne (Tabela 4). W odniesieniu do pasożytów z rodzaju *Trypanosoma* w większości przypadków oznaczenie możliwe było tylko do rodzaju.

Tabela 4. Skład zespołu pasożytów krwi z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon* u młodocianych bogatek. Dane dla grupy 92 osobników, w której w przypadku ptaków zaobrączkowanych jako pisklęta w tym samym gnieździe został losowo wybrany tylko jeden osobnik na lęg. $\bar{x}$ – średnia

Linia genetyczna	Gatunek	Prewalencja inwazji (%)		
		2015 n = 52	2016 n = 40	$\bar{x}$
hPARUS1	<i>Haemoproteus majoris</i>	26,9	15,0	20,9
hPHSIB1	<i>Haemoproteus majoris</i>	3,8	2,5	3,1
hWW2	<i>Haemoproteus majoris</i>	5,8	5,0	5,4
pSGS1	<i>Plasmodium relictum</i>	7,7	42,5	25,1
pGRW11	<i>Plasmodium relictum</i>	0,0	2,5	1,2
lPARUS4	<i>Leucocytozoon</i> sp.	1,9	2,5	2,2
lPARUS18	<i>Leucocytozoon</i> sp.	1,9	7,5	4,7
lPARUS19	<i>Leucocytozoon</i> sp.	0,0	2,5	1,2
sekwencje nieoznaczone*	<i>Haemoproteus</i> sp.	3,8	0,0	1,9

* sekwencje nie wykazujące 100% zgodności z żadną linią genetyczną w bazie MalAvi, przyporządkowane do rodzaju *Haemoproteus* na podstawie najwyższej zgodności

3.2. Czynniki wpływające na prawdopodobieństwo inwazji u młodocianych bogatek

Ze względu na bardzo małą liczbę ptaków zarażonych przez pasożyty z rodzajów *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* (*Plasmodium* – 4, *Leucocytozoon* – 3 i *Trypanosoma* – 3) w grupie ptaków, dla których dysponowano danymi z okresu pisklęcego (30 osobników, jeden osobnik na lęg), analizę wpływu rozważanych czynników na prawdopodobieństwo inwazji przeprowadzono wyłącznie dla rodzaju *Haemoproteus* (13 zarażonych ptaków). Analiza wykazała, że zarówno płeć, wiek, jak i data klucia nie wpływały na prawdopodobieństwo zarażenia młodocianych bogatek przez pasożyty z tego rodzaju (Tabela 5). Dane dotyczące prewalencji poszczególnych pasożytów ze względu na płeć zaprezentowano w Apendyksie 5.

Tabela 5. Wpływ płci, daty klucia (odchylenie od mediany) oraz wieku (mierzonego jako liczba dni od daty klucia do daty schwytania) na prawdopodobieństwo zarażenia przez pasożyty z rodzaju *Haemoproteus* u młodocianych bogatek. W modelu jako predyktor uwzględniono również rok. Analizy wykonane na grupie ptaków zaobrączkowanych jako pisklęta na terenie badań ($n = 30$). W przypadku ptaków pochodzących z tego samego lęgu, do analiz włączono dane tylko jednego, wybranego losowo, osobnika.

Predyktor	df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	<i>P</i>
rok ¹	1	-1,24 $\pm$ 1,09	1,37	0,242
płeć ²	1	0,28 $\pm$ 0,89	0,10	0,757
wiek	1	-0,04 $\pm$ 0,04	1,06	0,302
data klucia	1	-0,00 $\pm$ 0,04	0,00	0,991

¹poziom referencyjny: 2015;

²poziom referencyjny: samice

Analizy wykonane na grupie ptaków obejmującej obie kategorie, tzn. zaobrączkowanych w skrzynkach lęgowych jako pisklęta oraz zaobrączkowanych po raz pierwszy jako osobniki młodociane wykazały, że płeć nie wpływa na prawdopodobieństwo wystąpienia inwazji żadnym z badanych rodzajów pasożytów krwi poza rodzajem *Leucocytozoon* (Tabela 6). W tym ostatnim przypadku samice miały większą szansę, aby być zarażone niż samce (test Fishera, $P = 0,019$). Ponadto, w przypadku trzech z czterech badanych rodzajów pasożytów krwi – *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* – prawdopodobieństwo zarażenia było silnie uzależnione od daty schwytania: było ono tym wyższe im później osobnik został schwytany w sezonie (Tabela 6, Rycina 2).

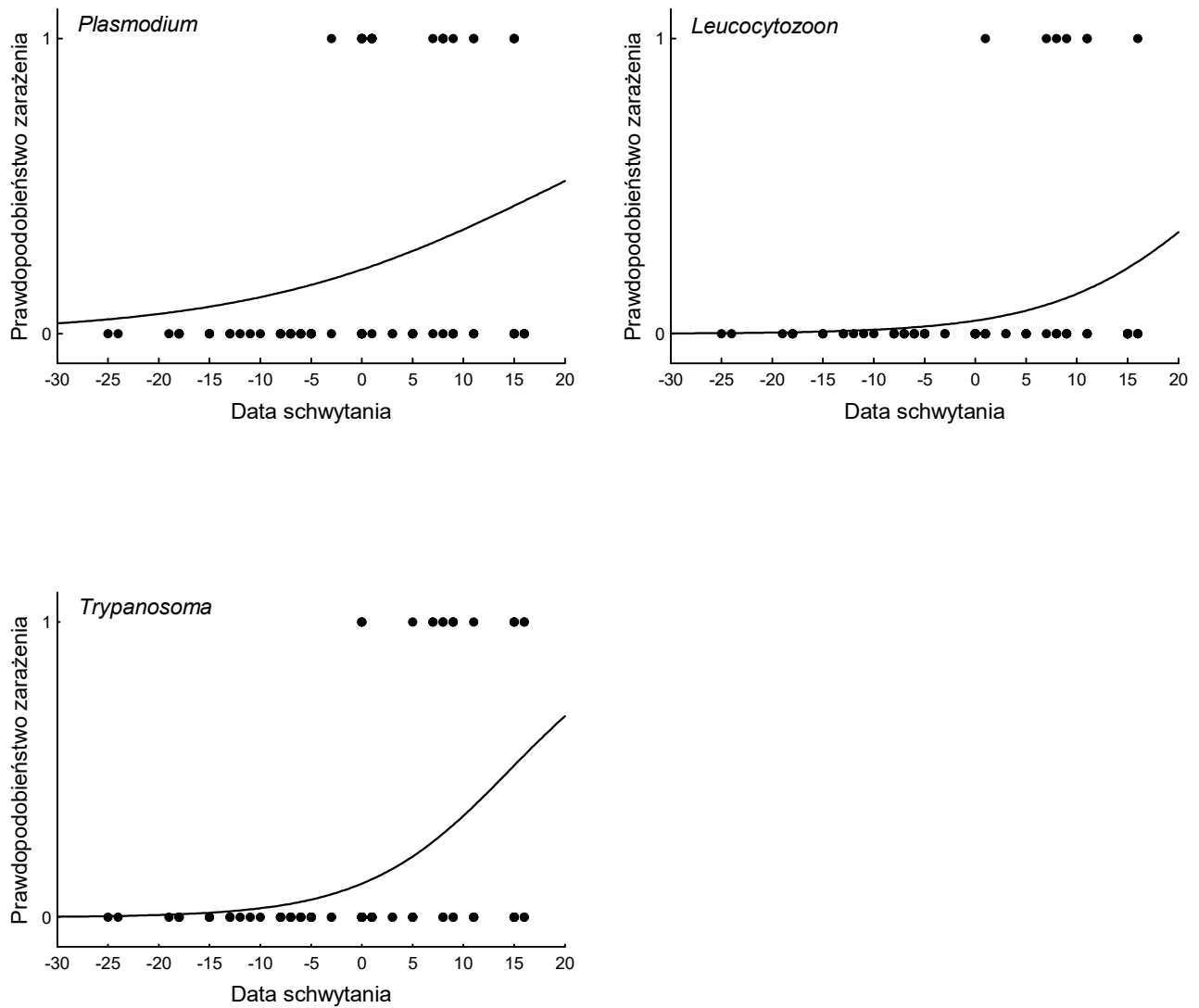
Tabela 6. Wpływ płci oraz daty schwytania (odchylenie od mediany) na prawdopodobieństwo zarażenia przez pasożyty z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* u młodocianych bogatek. W modelu jako predyktor uwzględniono również rok. Analizy wykonane na grupie ptaków zaobrazkowanych jako pisklęta oraz schwytanych po raz pierwszy jako osobniki młodociane (n = 91). W przypadku ptaków pochodzących z tego samego lęgu, do analiz włączono dane tylko jednego, wybranego losowo, osobnika.

^aZe względu na fakt, że w przypadku *Leucocytozoon* zarażone przez tego pasożyta były tylko samice, w modelu uwzględniono dane wyłącznie dla tej płci (n = 53).

Rodzaj pasożyta	Predyktor	df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	rok ¹	1	-0,67 $\pm$ 0,50	1,87	0,172
	płeć ²	1	0,82 $\pm$ 0,48	2,99	0,084
	data schwytania	1	-0,01 $\pm$ 0,02	0,13	0,721
<i>Plasmodium</i>	rok ¹	1	3,32 $\pm$ 0,82	25,53	<0,001
	płeć ²	1	-0,43 $\pm$ 0,66	0,42	0,514
	data schwytania	1	0,14 $\pm$ 0,05	14,71	<0,001
<i>Leucocytozoon</i> ^a	rok ¹	1	2,71 $\pm$ 1,28	5,90	0,015
	data schwytania	1	0,23 $\pm$ 0,10	9,66	0,002
<i>Trypanosoma</i>	rok ¹	1	0,45 $\pm$ 0,65	0,49	0,483
	płeć ²	1	-0,38 $\pm$ 0,65	0,35	0,556
	data schwytania	1	0,15 $\pm$ 0,04	16,94	<0,001

¹poziom referencyjny: 2015

²poziom referencyjny: samice



Rycina 2. Zależność pomiędzy prawdopodobieństwem zarażenia przez pasożyty z rodzajów *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* a datą schwytania (jako odchylenie od mediany) u młodych bogatek.

3.3. Charakter zależności między pasożytniczymi pierwotniakami w zależności od grupy wiekowej żywiciela

U osobników młodocianych średnio 47,4% było zarażonych przez jeden rodzaj pasożyta, 14,2% przez dwa rodzaje, a 2,5% przez trzy rodzaje. Natomiast u osobników dorosłych prewalencja zarażenia przez jeden, dwa, trzy oraz cztery rodzaje pasożytów wynosiła średnio odpowiednio: 29,1%, 52,21%, 15,4% i 2,2%.

Tabela 7. Prewalencja zarażenia różną liczbą rodzajów pasożytów u młodocianych i dorosłych bogatek w latach 2015–2016.

Liczba stwierdzonych rodzajów	Prewalencja (%)			
	Młodociane		Dorośle	
	2015	2016	2015	2016
1	42,3	52,5	35,7	22,4
2	13,5	15	47,6	56,7
3	0	5	14,3	16,4
4	0	0	0	4,5

Charakter zależności między poszczególnymi rodzajami pasożytów nie różnił się w zależności od grupy wiekowej. We wszystkich modelach interakcja wiek*status zarażenia przez dany rodzaj pasożyta była statystycznie nieistotna (wszystkie przypadki $P > 0,3$). Ogólnie, stwierdzono silną negatywną zależność między inwazjami *Haemoproteus* i *Plasmodium* (Tabela 8, Rycina 3). W pozostałych przypadkach zależności miały charakter neutralny. U wszystkich rodzajów pasożytów istniały duże różnice w częstości zarażenia między osobnikami młodocianymi i dorosłymi (Tabela 6, *Trypanosoma*: rok: $LR\chi^2 = 0,31$, $P = 0,580$, wiek: $LR\chi^2 = 12,54$, $P < 0,001$). Częstość zarażenia przez *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon* była wyższa u ptaków dorosłych, a częstość zarażenia przez *Trypanosoma* – u ptaków młodocianych (Tabele 3, 8 i 9).

Tabela 8. Wpływ współwystępujących pasożytów krwi oraz wieku (osobniki młodociane vs dorosłe) na prawdopodobieństwo zarażenia przez dany rodzaj pasożyta (*Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon*) u bogatki.

Rodzaj pasożyta	Predyktor	df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	rok ¹	1	0,96 $\pm$ 0,38	6,52	0,011
	wiek ²	1	3,98 $\pm$ 0,78	52,90	<0,001
	<i>Plasmodium</i> ³	1	-3,46 $\pm$ 0,75	48,79	<0,001
	<i>Leucocytozoon</i> ³	1	-0,35 $\pm$ 0,47	0,57	0,449
<i>Plasmodium</i>	rok ¹	1	-0,21 $\pm$ 0,36	0,35	0,552
	wiek ²	1	3,45 $\pm$ 0,78	39,49	<0,001
	<i>Haemoproteus</i> ³	1	-3,42 $\pm$ 0,75	48,17	<0,001
	<i>Leucocytozoon</i> ³	1	0,40 $\pm$ 0,43	0,85	0,357
<i>Leucocytozoon</i>	rok ¹	1	1,20 $\pm$ 0,38	10,61	0,001
	wiek ²	1	2,83 $\pm$ 0,51	41,57	<0,001
	<i>Haemoproteus</i> ³	1	-0,10 $\pm$ 0,45	0,05	0,816
	<i>Plasmodium</i> ³	1	0,43 $\pm$ 0,44	0,98	0,321

¹poziom referencyjny: 2015

²poziom referencyjny: ptaki młodociane

³poziom referencyjny: osobniki niezarażone przez dany rodzaj pasożyta

Tabela 9. Prewalencja pasożytów z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* u dorosłych bogatek w latach 2015–2016.

Rodzaj pasożyta	Prewalencja (%)		
	2015	2016	Średnia roczna
<i>Haemoproteus</i>	61,9	62,7	62,3
<i>Plasmodium</i>	66,7	62,7	64,7
<i>Leucocytozoon</i>	45,2	71,6	58,4
<i>Trypanosoma</i>	0	6,0	3,0

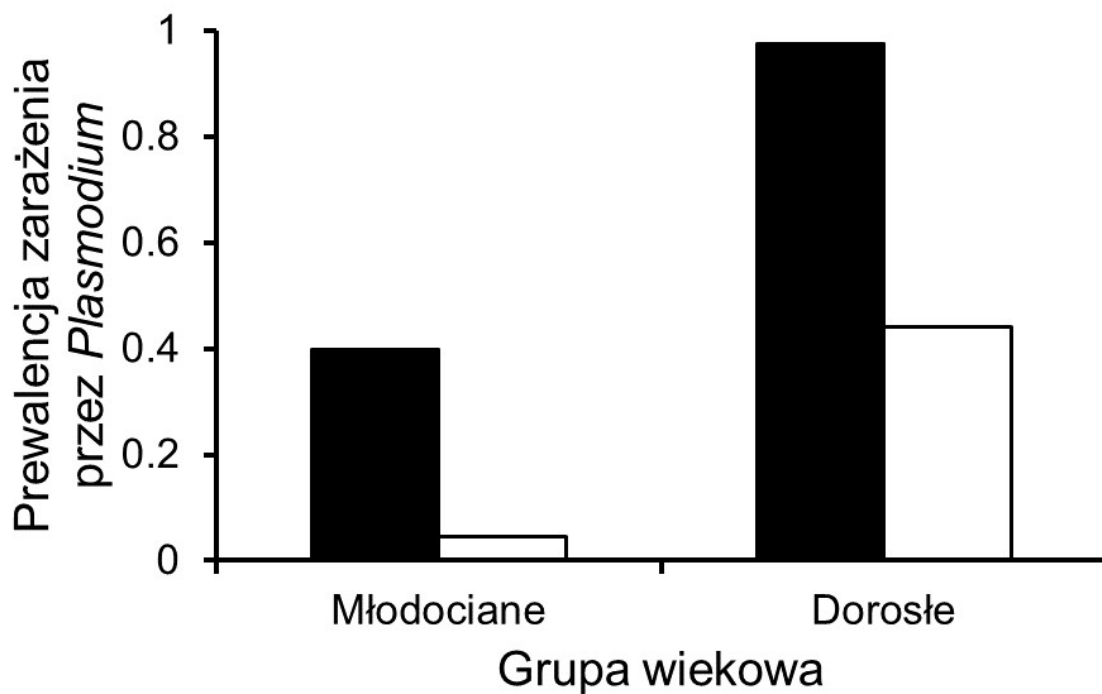
Analizy wykonane na grupie osobników młodocianych z uwzględnieniem zarażenia przez *Trypanosoma* wykazały, że ten rodzaj pasożyta wykazuje pozytywną zależność z *Plasmodium* (Tabela 10, Rycina 4). Ponadto, istniał dosyć silny trend wskazujący na pozytywną zależność między *Trypanosoma* i *Leucocytozoon* (Tabela 10).

Tabela 10. Wpływ współwystępujących pasożytów krwi na prawdopodobieństwo zarażenia przez dany rodzaj pasożyta (*Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma*) u młodocianych bogatek.

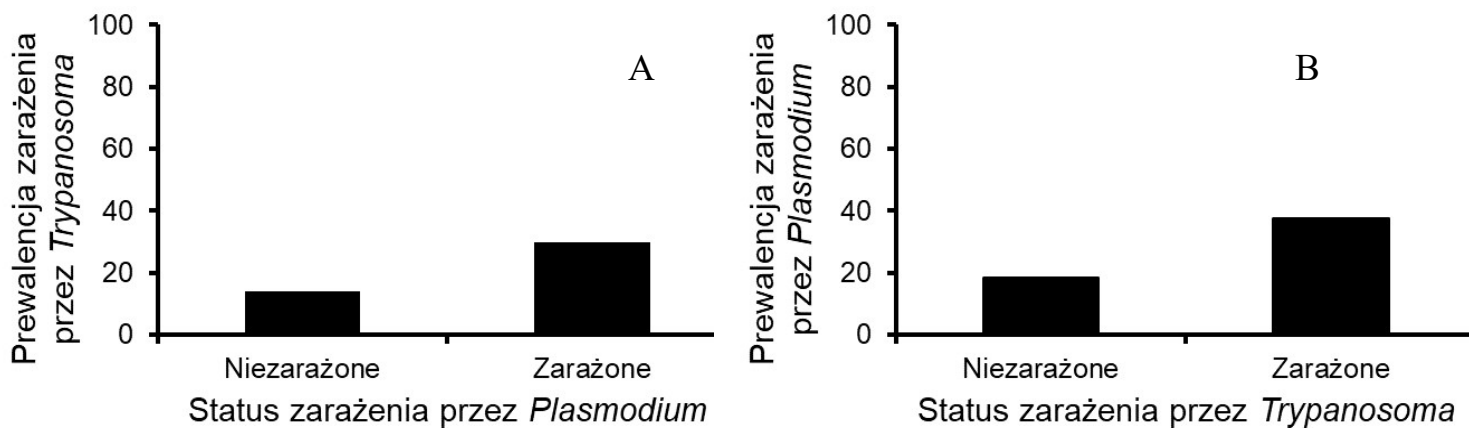
Rodzaj pasożyta	Predyktor	df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	rok ¹	1	-0,18 $\pm$ 0,53	0,12	0,773
	<i>Plasmodium</i> ²	1	-2,52 $\pm$ 1,09	8,97	0,003
	<i>Leucocytozoon</i> ²	1	0,02 $\pm$ 0,96	0,00	0,981
	<i>Trypanosoma</i> ²	1	-0,17 $\pm$ 0,69	0,06	0,805
<i>Plasmodium</i>	rok ¹	1	2,58 $\pm$ 0,71	17,66	<0,001
	<i>Haemoproteus</i> ²	1	-2,63 $\pm$ 1,12	9,35	0,002
	<i>Leucocytozoon</i> ²	1	-1,08 $\pm$ 1,12	0,99	0,319
	<i>Trypanosoma</i> ²	1	1,65 $\pm$ 0,79	4,69	0,030
<i>Leucocytozoon</i>	rok ¹	1	1,68 $\pm$ 0,97	3,33	0,068
	<i>Haemoproteus</i> ²	1	0,08 $\pm$ 0,93	0,01	0,931
	<i>Plasmodium</i> ²	1	-0,80 $\pm$ 1,04	0,63	0,429
	<i>Trypanosoma</i> ²	1	1,67 $\pm$ 0,91	3,22	0,073
<i>Trypanosoma</i>	rok ¹	1	-1,06 $\pm$ 0,72	2,36	0,124
	<i>Haemoproteus</i> ²	1	-0,16 $\pm$ 0,69	0,06	0,813
	<i>Plasmodium</i> ²	1	1,54 $\pm$ 0,76	4,38	0,036
	<i>Leucocytozoon</i> ²	1	1,67 $\pm$ 0,90	3,27	0,071

¹poziom referencyjny: 2015

²poziom referencyjny: osobniki niezarażone przez dany rodzaj pasożyta



Rycina 3. Prewalencja zarażenia przez *Plasmodium* wśród młodocianych i dorosłych bogatek niezarażonych (kolor czarny) oraz zarażonych (kolor biały) jednocześnie przez *Haemoproteus*. Dane z analiz molekularnych.



Rycina 4. Wpływ statusu zarażenia przez *Plasmodium* na występowanie inwazji *Trypanosoma* (A) oraz statusu zarażenia przez *Trypanosoma* na występowanie inwazji *Plasmodium* (B) u młodocianych bogatek.

4. DYSKUSJA

Niniejsze badania wykazały, że ponad połowa młodocianych bogatek kilka tygodni po wykluciu była zarażona przez pasożytnicze pierwotniaki reprezentujące co najmniej jeden rodzaj. Spośród rozpatrywanych czynników tylko data schwytania tłumaczyła prawdopodobieństwo wystąpienia inwazji, przy czym czynnik ten odgrywał rolę u trzech z czterech rozpatrywanych rodzajów pasożytów: *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* – im późniejsza data tym większe prawdopodobieństwo zarażenia. Charakter zależności między pasożytami reprezentującymi różne rodzaje nie różnił się między ptakami młodocianymi i dorosłymi. Stwierdzono silną negatywną zależność między *Haemoproteus* i *Plasmodium*, a dodatkowo, tylko u ptaków młodocianych, które były znacznie częściej zarażone przez *Trypanosoma* niż ptaki dorosłe, pozytywną zależność między *Trypanosoma* i *Plasmodium*.

Częstość zarażenia młodocianych bogatek przez pasożyty krwi na poziomie ponad 50% wskazuje, że u tego gatunku do zarażenia często dochodzi już na wczesnych etapach życia. W badanej populacji stwierdzono jedne z najwyższych częstości zarażenia na tych etapach przez pasożyty z rodzajów *Haemoproteus* i *Plasmodium*. Wyższa prewalencja została odnotowana jedynie u podlotów i osobników młodocianych namorzynka seszelskiego (*Haemoproteus*, Hammers i wsp. 2016) oraz piskląt świergotka polnego *Anthus campestris* (*Plasmodium*, Calero–Riestra i Garcia 2016). Oba te gatunki należą do ptaków budujących gniazda odkryte otwarte. Wyższa prewalencja, zwłaszcza w przypadku pasożytów należących do rodzaju *Plasmodium*, może więc wynikać z większej ekspozycji piskląt na żerowanie wektorów w porównaniu z pisklętami gatunków budujących gniazda ukryte, do których należy bogatka. Różnice w prewalencji między pasożytami z poszczególnych rodzajów u młodocianych bogatek odzwierciedlają najprawdopodobniej różnice w zakresie zachowań endofagicznych (czyli żerowania w zamkniętych przestrzeniach, takich jak skrzynki lęgowe) oraz/lub różnice w fenologii pojawu ich wektorów. Dotychczasowe badania wskazują, że szczególnie chętnie zachowania endofagiczne przejawiają kuczmanowate, czyli wektory *Haemoproteus*. Natomiast komarowate i meszkowate, wektory odpowiednio *Plasmodium* i *Leucocytozoon*, wnikają do skrzynek znacznie rzadziej (Tomás i wsp. 2008, Votypka i wsp. 2009, Krams i wsp.

2013). Ze względu na fakt, że *Trypanosoma* może być przenoszona przez owady reprezentujące różne rodziny, a dodatkowo obecnie brakuje informacji, które owady są wektorami tych pasożytów u bogatki, trudno jest określić w jakim stopniu o częstotści zarażenia przez *Trypanosoma* u młodocianych bogatek decyduje stopień zachowań endofagicznych ich wektorów. Badania Norte i wsp. (2009) w populacji bogatki w środkowej Portugalii wykazały, że inwazje pasożytów z czterech rozpatrywanych rodzajów mogą pojawiać się już u 2–tygodniowych piskląt, przy czym inwazje *Haemoproteus* i *Plasmodium* stwierdzono tylko u piskląt z drugich lęgów. Może to sugerować brak w środowisku wektorów tych pasożytów w czasie trwania pierwszych lęgów lub zarażenie piskląt z późnych lęgów przez gatunki/linie genetyczne charakteryzujące się stosunkowo krótkim okresem prepatencji. Krams i wsp. (2013), którzy eksperymentalnie zmieniali liczbę wektorów w skrzynkach bogatki wykazali, że działania takie silnie wpływają na prevalencję pasożytów u podlotów (w wieku ok. 30 dni). Wśród podlotów z lęgów, w których występowała naturalna liczba wektorów, każdy osobnik był zarażony przez przynajmniej jeden z trzech badanych pasożytów krwi (*Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon*), podczas gdy w lęgach o obniżonej liczbie wektorów prevalencja wśród podlotów wynosiła 8%.

Niniejsze badania wykazały, że prawdopodobieństwo zarażenia przez *Haemoproteus*, który jest pasożytem występującym u młodocianych bogatek w monitorowanej populacji z najwyższą częstością, nie było związane ani z długością życia ani datą klucia ptaków. Z powodu bardzo niskiej prevalencji nie było możliwe przetestowanie wpływu powyższych parametrów na zarażenie przez pozostałe pasożyty. Ważnym czynnikiem, który tłumaczył prawdopodobieństwo inwazji pasożytów z rodzajów *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* była data schwytania: im później w sezonie ptak został schwytany, tym istniała wyższa szansa stwierdzenia u niego inwazji. Taki wzorzec zarażenia jest najprawdopodobniej związany z fenologią pojawu wektorów i ich skłonnością do zachowań endofagicznych, a w przypadku *Plasmodium* także długością okresu prepatencji. Uzyskane wyniki sugerują, że w przypadku tych trzech rodzajów pasożytów do zarażenia ptaków dochodzi po opuszczeniu przez nie gniazda i że prawdopodobieństwo zarażenia wzrasta wraz z postępem sezonu. Dodatkowo, w przypadku *Plasmodium* na te efekty może nakładać się stosunkowo długi okres prepatencji. Badania

eksperymentalne wykazały, że pasożyty reprezentujące linię genetyczną SGS1, która jest dominującą linią *Plasmodium* wśród młodocianych bogatek na terenie badań, mogą pojawiać się w krwi, w zależności od gatunku żywiciela, od 7 do 16,5 dnia od momentu wniknięcia pasożytów do organizmu (Palinauskas i wsp. 2008). Brak zależności między datą schwytania a prawdopodobieństwem zarażenia przez *Haemoproteus* sugeruje z kolei, że pisklęta i podloty niezależnie od daty klucia są w podobnym stopniu narażone na transmisję pierwotniaków przez kuczmanowate. W dużej części przypadków do zarażenia może dochodzić na etapie gniazdowym, na co wskazuje obecność kuczmanowatych w skrzynkach na terenie badań (A. Dubiec, dane własne).

Młodociane samce i samice bogatki nie różniły się prawdopodobieństwem zarażenia przez pasożytnicze pierwotniaki z wyjątkiem rodzaju *Leucocytozoon*. W wypadku tego pasożyta młodociane samice miały znacznie większą szansę na wystąpienie inwazji niż samce. W literaturze jest niewiele informacji o prewalencji pasożytów krwi w odniesieniu do płci żywiciela u ptaków na wczesnych etapach życia. Ogólnie, w większości przypadków nie stwierdzono, aby pisklęta płci męskiej i żeńskiej różniły się częstością zarażenia (puchacz zwyczajny *Bubo bubo*, Ortego i Cordero 2010; jastrząb zwyczajny *Accipiter gentilis*, Jeffries i wsp. 2015; włośchatka zwyczajna *Aegolius funereus*, Synek i wsp. 2016; dzierzba śródziemnomorska *Lanius meridionalis*, Hernández i wsp. 2017). Wyjątek stanowią badania na bogatce i świergotku polnym. U bogatki w dwóch populacjach ze Szwajcarii stwierdzono dwukrotnie wyższą prewalencję *Plasmodium* u młodocianych samców niż samic (osobniki przetrzymywane w awiariusium ze swobodnym dostępem wektorów, Jenkins i wsp. 2015). Podobnie, u piskląt świergotka polnego (wiek: 7–11 dni) w populacji w środkowej Hiszpanii samce były 1,5 raza częściej zarażone przez *Plasmodium* niż samice (Calero–Riestra i García 2016).

Na wzorzec występowania inwazji w zależności od płci mogą mieć wpływ przede wszystkim dwa mechanizmy: zróżnicowanie w funkcjonowaniu układu immunologicznego oraz nielosowy wybór żywiciela przez wektory. W odróżnieniu od osobników dorosłych, u których występuje różnica między samcami i samicami w wielkości śledziony (u samców jest mniejsza) – jednego z dwóch głównych narządów układu odpornościowego u ptaków, u piskląt wielkość tego narządu jest zbliżona (Møller i wsp. 1998). Może to sugerować, że przynajmniej w przypadku funkcji związanych z działaniem śledziony, nie występują

różnice między płciami. Jednocześnie, część dotychczasowych badań wykazała, że w okresie pisklęcym (dane tego typu nie są dostępne dla podlotów i osobników młodocianych) u niektórych gatunków mogą występować różnice między płciami w poziomie immunokompetencji, chociaż często różnice te uwidaczniają się tylko w określonych warunkach lub dotyczą jednego z rodzajów odpowiedzi immunologicznej (Fargallo i wsp. 2002, Chin i wsp. 2005, Dubiec i wsp. 2006, Lobato i wsp. 2008, Thompson i wsp. 2014). W przypadku bogatki, w zależności od populacji, stwierdzono zarówno brak różnic, jaki i niższy poziom immunokompetencji (mierzonej jako odpowiedź na fitohemaglutyninę – niepatogeny antygen) u samców (Tschirren i wsp. 2003, Dubiec i Cichoń 2005). W przypadku nielosowego wyboru żywicieli, jednym z możliwych mechanizmów jest wybór żywiciela w zależności od jego wielkości, co w przypadku gatunków, u których występuje dymorfizm płciowy, jak ma to miejsce u bogatki (Cramp i Perrins 1993), może przekładać się na nielosowy wybór w zależności od jego płci. Krwio pijne organizmy mogą preferować mniejsze pisklęta ze względu na ich słabszą immunokompetencję (hipoteza „tasty chick”, Christie i wsp. 1998). Z drugiej strony mogą częściej wybierać większe osobniki, ponieważ, pomimo tego że charakteryzują się one wyższą immunokompetencją, to jednocześnie stanowią lepsze źródło pokarmu (Lee i Clayton 1995). Taki nielosowy wybór piskląt przez krwio pijne bezkręgowce został m.in. wykazany dla kleszczy i niektórych muchówek (Valera i wsp. 2004, Gallizzi i wsp. 2008, Heylen i Matthysen 2011). Wśród owadów, które mogą być wektorami pasożytów krwi u ptaków, wykazano nielosowy wybór żywiciela względem jego płci u niektórych gatunków komarów (preferowały żerowanie na samcach, Burkett–Cadena i wsp. 2014). Ze względu na brak informacji o poziomie immunokompetencji u młodocianych samców i samic bogatki w badanej populacji oraz wzorcu wyboru żywiciela w zależności od jego płci przez wektory poszczególnych rodzajów pasożytów, nie można określić, czy któryś z tych mechanizmów leży u podstaw obserwowanej różnicy w częstości zarażenia przez *Leucocytozoon*.

W badanej populacji bogatki stwierdzono zależność między niektórymi taksonami pasożytów: silną negatywną między *Haemoproteus* i *Plasmodium* oraz słabą pozytywną między *Plasmodium* i *Trypanosoma*. Istniał też trend wskazujący na pozytywną zależność między *Leucocytozoon* i *Trypanosoma*. Należy podkreślić, że analizy charakteru zależności

między pasożytami uwzględniające rodzaj *Trypanosoma* możliwe były tylko dla osobników młodocianych z powodu bardzo niskiej prevalencji tych pasożytów u dorosłych bogatek. Ogólnie, wbrew przewidywaniom, charakter zależności między pasożytami krwi nie różnił się między młodocianymi i dorosłymi bogatkami. W chwili obecnej trudno jest określić, na ile powszechny jest taki wzorzec, ponieważ według mojej wiedzy, tylko w jednym innym badaniu określono, jak wiek żywiciela wpływa na charakter zależności między pasożytami krwi. Svobodová i wsp. (2015) wykazali, że charakter zależności między tymi pasożytami był odmienny u piskląt i ptaków dorosłych (pozytywny u piskląt i neutralny u ptaków dorosłych) w przypadku *Haemoproteus* i *Leucocytozoon* u myszołowa zwyczajnego oraz *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* u krogulca zwyczajnego.

W przypadku *Haemoproteus* i *Plasmodium*, biorąc pod uwagę częstość ich występowania w każdym z sezonów, należałoby oczekiwać ich współwystępowania w 1–2 przypadkach w 2015 r. i w 4 przypadkach w 2016 r. (na podstawie wzoru z Combes 1999). Tymczasem takie zjawisko stwierdzono tylko u jednego osobnika w 2016 r. Rzadsze niż oczekiwane przy neutralnym charakterze zależności przypadki współwystępowania *Haemoproteus* i *Plasmodium* zostały wcześniej stwierdzone m.in. u kosa *Turdus merula* (Hatchwell i wsp. 2000), bogatki (van Rooyen i wsp. 2013), blaszkodziobych (Meixell i wsp. 2016), grzebiących (Smith i wsp. 2016), a także w przypadku analiz wykonanych na poziomie zgrupowania ptaków (Oakgrove i wsp. 2014). W chwili obecnej nie jest znany mechanizm odpowiadający za powstawanie antagonistycznej zależności między *Haemoproteus* i *Plasmodium*. Biorąc pod uwagę fakt, że rodzaje te są blisko ze sobą spokrewnione, można przewidywać, że kluczową rolę w jej powstaniu odgrywa odporność krzyżowa. Nie można jednak wykluczyć, że pewien wpływ na uzyskanie negatywnej zależności między *Haemoproteus* i *Plasmodium* wywiera niedoskonałość technik używanych do wykrywania pasożytów. Ogólnie, techniki wykorzystujące standardową łańcuchową reakcję polimerazy niedoszacowują często inwazje wielokrotne (Biedrzycka i wsp. 2015, Bernotienė i wsp. 2016). Ograniczona zdolność do wykrywania pasożytów jednocześnie bytujących w żywicielu może wynikać z preferencyjnego namnażania materiału genetycznego pasożytów o wyższej intensywności zarażenia (Pérez-Tris i Bensch 2005, Valkiūnas i wsp. 2006, Martinez i wsp. 2009). Dodatkowo, z powodu ogólnie wyższej intensywności zarażenia w przypadku *Haemoproteus* (Valkiūnas 2005), rodzaj ten

jest znacznie łatwiej wykrywalny na rozmazach niż *Plasmodium* (Waldenström i wsp. 2004). Pozytywna zależność między *Plasmodium* i *Trypanosoma* oraz trend wskazujący na pozytywną zależność między *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* sugerują, że zarażenie przez jeden z pasożytów z rozpatrywanej pary stwarza warunki sprzyjające rozwojowi inwazji drugiego z pasożytów. Potencjalnymi mechanizmami, które mogą prowadzić do powstania takiej zależności jest reakcja układu odpornościowego w odpowiedzi na inwazję oraz przenoszenie pasożytów przez te same wektory. Ze względu na fakt, że dane o statusie zarażenia bogatek dostępne są tylko z jednego punktu czasowego nie ma możliwości jednoznacznego określenia czy stwierdzone zależności są jedno- czy dwukierunkowe.

W badanej populacji bogatki występowały różnice w prevalencji pasożytów krwi między osobnikami młodocianymi i dorosłymi. Pasożyty z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon* występowały znacznie rzadziej, a pasożyty z rodzaju *Trypanosoma* znacznie częściej u osobników młodocianych. W odniesieniu do pasożytów z grupy Haemosporidia wynik ten jest zgodny z badaniami w hiszpańskiej populacji bogatki oraz większości przebadanych pod tym kątem gatunków ptaków (Tabela 1, Norte i wsp. 2009). Za wyższą prevalencję Haemosporidia u dorosłych ptaków prawdopodobnie odpowiada wydłużająca się wraz z wiekiem żywiciela ekspozycja na wektory, a tym samym zwiększająca się szansa na transmisję pasożytów (Davidar i Morton 1993, Sol i wsp. 2003). Nieznany jest natomiast mechanizm, który tłumaczyłby odmienny wzorzec prevalencji *Trypanosoma*. Niewykluczone, że taki wzorzec jest wypadkową dwóch mechanizmów: wyższej wirulencji *Trypanosoma* w porównaniu z *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon*, co przekładałoby się na wyższą śmiertelność, a tym samym eliminację z populacji zarażonych przez tego pasożyta osobników, oraz preferowanie młodocianych osobników w porównaniu z dorosłymi przez wektory *Trypanosoma*. Przykładowo, taki preferencyjny wybór ptaków na wczesnych etapach życia został wykazany w niektórych badaniach na komarach (Blackmore i Dow 1958, ale np. Burkett–Cadena i wsp. 2010).

Niniejsze badania wykazały, że w populacji bogatki o wysokiej częstości inwazji pasożytniczych pierwotniaków do zarażenia większości osobników dochodzi w stosunkowo krótkim czasie od wyklucia. Różnice w wirulencji oraz częstości zarażenia przez poszczególne rodzaje pasożytów między sezonami mogą przekładać się na znaczne międzysезonowe fluktuacje w sile doboru, której podlegają ptaki przed swoją pierwszą

próbą rozrodu. Charakter zależności między pasożytami nie różnił się między osobnikami młodocianymi i dorosłymi, co może sugerować, że różnice fizjologiczne występujące między tymi grupami wiekowymi nie odgrywają większej roli w powstawaniu tego zjawiska. Konieczne są jednak dalsze badania, w innych populacjach oraz na innych gatunkach, w celu stwierdzenia, na ile taki wzorzec jest powszechny. Z kolei do wyjaśnienia, czy wykryte negatywne i pozytywne zależności między pasożytami mają charakter jedno- czy dwukierunkowy, konieczne są badania eksperymentalne polegające na kontrolowanym wywoływaniu inwazji.

5. LITERATURA

- Atkinson C. T., van Riper III C. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: *Plasmodium*, *Leucocytozoon*, and *Haemoproteus*. Bird-parasite interactions. W: Loye J. T., Zuk M. (red.). Oxford University Press. Oxford, s. 19–48.
- Baker J. R. 1956. Studies on *Trypanosoma avium* Danilewsky 1885. III. Life cycle in vertebrate and invertebrate hosts. *Parasitology* 46: 335–352.
- Baker J. R. 1976. Biology of the trypanosomes of birds. Biology of the Kinetoplastida. W: Lumsden W. H. R., Evans, D. A. Biology of the Kinetoplastida. Vol. 2. Academic Press Inc. Ltd.. London.
- Bensch S., Hellgren O., Pérez-Tris J. 2009. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. *Molecular Ecology Resources* 9: 1353–1358.
- Bernotienė R., Palinauskas V., Iezhova T., Murauskaitė D., Valkiūnas G. 2016. Avian haemosporidian parasites (Haemosporida): a comparative analysis of different polymerase chain reaction assays in detection of mixed infections. *Experimental Parasitology* 163: 31–37.
- Biedrzycka A., Migalska M., Bielański W. 2015. A quantitative PCR protocol for detecting specific *Haemoproteus* lineages: molecular characterization of blood parasites in a Sedge Warbler population from southern Poland. *Journal of Ornithology* 156: 201–208.

- Blackmore J. S., Dow R. P. 1958. Differential feeding of *Culex tarsalis* on nestling and adult birds. *Mosquito News* 18: 15-17.
- Bordes F., Morand S. 2011. The impact of multiple infections on wild animal hosts: a review. *Infection Ecology and Epidemiology* 1: 7346.
- Burkett-Cadena N. D., Bingham A. M., Unnasch T. R. 2014. Sex-biased avian host use by arbovirus vectors. *Royal Society Open Science* 1: 140-262.
- Burkett-Cadena N. D., Ligon R. A., Liu M., Hassan H. K., Hill G. E., Eubanks M. D., Unnasch T. R. 2010. Vector–host interactions in avian nests: do mosquitoes prefer nestlings over adults?. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 83: 395-399.
- Burke T., Bruford M.W., Hanotte O., Brookfield J. F. Y. 1998. Multilocus and single-locus DNA fingerprinting. W: Hoelzel A.R. (red.) *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press. Oxford, s. 287-336.
- Calero-Riestra M., García J. T. 2016. Sex-dependent differences in avian malaria prevalence and consequences of infections on nestling growth and adult condition in the Tawny pipit, *Anthus campestris*. *Malaria Journal* 15: 178.
- Carlson M. L., Proudfoot G. A., Gentile K., Dispoto J., Weckstein J. D. 2018. Haemosporidian prevalence in northern saw-whet owls *Aegolius acadicus* is predicted by host age and average annual temperature at breeding grounds. *Journal of Avian Biology* 49: e01817.
- Chin E. H., Love O. P., Clark A. M., Williams T. D. 2005. Brood size and environmental conditions sex-specifically affect nestling immune response in the European starling *Sturnus vulgaris*. *Journal of Avian Biology* 36: 549-554.
- Christe P., Møller A. P., de Lope F. 1998. Immunocompetence and nestling survival in the house martin: the tasty chick hypothesis. *Oikos* 83: 175-179.
- Christensen N. Ø., Nansen P., Fagbemi B. O., Monrad J. 1987. Heterologous antagonistic and synergistic interactions between helminths and between helminths and protozoans in concurrent experimental infection of mammalian hosts. *Parasitology Research* 73: 387-410.
- Clayton D. H., Moore J. 1997. Host-parasite evolution: general principles and avian models. Oxford University Press. Oxford.

- Combes C. 1999. Ekologia i ewolucja pasożytnictwa: długotrwałe wzajemne oddziaływania. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- Cox F. E. G. 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology* 122 (Supplement): S23-S38.
- Cramp S., Perrins C. M. 1993. Paridae. Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa 7. Oxford University Press. Oxford, s. 145-281.
- Davidar P., Morton E. S. 1993. Living with parasites: Prevalence of a blood parasite and its effect on survivorship in the Purple Martin. *Auk* 110: 109-116.
- Deviche P., Fokidis H. B., Lerbour B., Greiner E. 2010. Blood parasitaemia in a high latitude flexible breeder, the white-winged crossbill, *Loxia leucoptera*: contribution of seasonal relapse versus new inoculations. *Parasitology* 137: 261-273.
- Dhondt A. A. 1979. Summer dispersal and survival of juvenile great tits in southern Sweden. *Oecologia* 42: 139-157.
- Dhondt A. A., Dhondt K. V., Nazeri S. 2017. Apparent effect of chronic *Plasmodium* infections on disease severity caused by experimental infections with *Mycoplasma gallisepticum* in house finches. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 6: 49-53.
- Dingemanse N. J., Both C., Drent P. J., Van Oers K., Van Noordwijk A. J. 2002. Repeatability and heritability of exploratory behaviour in great tits from the wild. *Animal Behaviour* 64: 929-938.
- Dobson A. P., Hudson P. J. 1986. Parasites, disease and the structure of ecological communities. *Trends in Ecology and Evolution* 1: 11-15.
- Dubiec A., Cichoń M. 2005. Seasonal decline in nestling cellular immunocompetence results from environmental factors—an experimental study. *Canadian Journal of Zoology* 83: 920-925.
- Dubiec A., Cichoń M., Deptuch K. 2006. Sex-specific development of cell-mediated immunity under experimentally altered rearing conditions in blue tit nestlings. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 273: 1759-1764.

- Fallis A. M., Bennett G. F. 1961. Sporogony of *Leucocytozoon* and *Haemoproteus* in simuliids and ceratopogonids and a revised classification of the Haemosporidiida. *Canadian Journal of Zoology* 39: 215-228.
- Fargallo J. A., Laaksonen T., Pöyri V., Korpimäki E. 2002. Inter-sexual differences in the immune response of Eurasian kestrel nestlings under food shortage. *Ecology Letters* 5: 95-101.
- Fargallo J. A., Merino S. 2004. Clutch size and haemoparasite species richness in adult and nestling blue tits. *Ecoscience* 11: 168-174.
- Folstad I., Karter A. J. 1992. Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *The American Naturalist* 139: 603-622.
- Frank S. A. 1996. Models of parasite virulence. *The Quarterly Review of Biology* 71: 37-78.
- Gallizzi K., Gern L., Richner H. 2008. A flea-induced pre-hatching maternal effect modulates tick feeding behaviour on great tit nestlings. *Functional Ecology* 22: 94-99.
- Garcia-Longoria L., Hellgren O., Bensch S., De Lope F., Marzal A. 2015. Detecting transmission areas of malaria parasites in a migratory bird species. *Parasitology* 142: 1215-1220.
- Godfrey Jr R. D., Fedynich A. M., Pence D. B. 1987. Quantification of hematozoa in blood smears. *Journal of Wildlife Diseases* 23: 558-565.
- Gosler A. G., Clement P. 2007. Family Paridae (tits and chickadees). W: del Hoyo J., Elliott A., Christie D. (red.). Handbook of the Birds of the World 12. Lynx Edicions. Barcelona, s. 662-750.
- Griffiths R., Double M. C., Orr K., Dawson R. J. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hammers M., Komdeur J., Kingma S. A., Hutchings K., Fairfield E. A., Gilroy D. L., Richardson D. S. 2016. Age-specific haemosporidian infection dynamics and survival in Seychelles warblers. *Scientific Reports* 6: 29720.

- Harnist I. 2017. Wpływ inwestycji w budowę gniazda na dostosowanie bogatki *Parus major*. Rozprawa doktorska. Muzeum i Instytut Zoologii PAN. Warszawa.
- Hatchwell B. J., Wood M. J., Anwar M., Perrins C. M. 2000. The prevalence and ecology of the haematozoan parasites of European blackbirds, *Turdus merula*. *Canadian Journal of Zoology* 78: 684-687.
- Hellgren O., Waldenström J., Bensch S. 2004. A new PCR assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology* 90: 797-802.
- Hernández M. Á., Rojo M. Á., Campos F., Gutiérrez-Corchero F., Moreno-Rueda G. 2017. Haemosporidian prevalence in Southern Grey Shrike *Lanius meridionalis* nestlings: impact on body condition and geographic distribution in the Iberian Peninsula. *Bird Study* 64: 362-373.
- Heylen D. J., Matthysen, E. 2011. Experimental evidence for host preference in a tick parasitizing songbird nestlings. *Oikos* 120: 1209-1216.
- Hunter D. B., Rohner C., Currie D. C. 1997. Mortality in fledgling great horned owls from black fly hematophaga and leucocytozoonosis. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 486-491.
- Jeffries M. I., Miller R. A., Laskowski M. D., Carlisle J. D. 2015. High prevalence of *Leucocytozoon* parasites in nestling northern goshawks (*Accipiter gentilis*) in the Northern Great Basin, USA. *Journal of Raptor Research* 49: 294-302.
- Jenkins T., Delhaye J., Christe P. 2015. Testing local adaptation in a natural great tit-malaria system: an experimental approach. *PloS One* 10: e0141391.
- Kirkpatrick C. E., Lauer D. M. 1985. Hematozoa of raptors from southern New Jersey and adjacent areas. *Journal of Wildlife Diseases* 21: 1-6.
- Knowles S. C. 2011. The effect of helminth co-infection on malaria in mice: a meta-analysis. *International Journal for Parasitology* 41: 1041-1051.
- Knowles S. C., Wood M. J., Sheldon B. C. 2010. Context-dependent effects of parental effort on malaria infection in a wild bird population, and their role in reproductive trade-offs. *Oecologia* 164: 87-97.

- Krama T., Krams R., Cīrule D., Moore F. R., Rantala M. J., Krams I. A. 2015. Intensity of haemosporidian infection of parids positively correlates with proximity to water bodies, but negatively with host survival. *Journal of Ornithology* 156: 1075-1084.
- Krams I. A., Suraka V., Rantala M. J., Sepp T., Mierauskas P., Vrublevska J., Krama T. 2013. Acute infection of avian malaria impairs concentration of haemoglobin and survival in juvenile altricial birds. *Journal of Zoology* 291: 34-41.
- Krettli A. U. 1977. Exacerbation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice by concomitant malaria. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 24: 514-518.
- Lee P. L., Clayton D. H. 1995. Population biology of swift (*Apus apus*) ectoparasites in relation to host reproductive success. *Ecological Entomology* 20: 43-50.
- Lobato E., Merino S., Moreno J., Morales J., Tomás G., Martínez-de la Puente J., Osorno J. L., Kuchar A., Möstl E. 2008. Corticosterone metabolites in blue tit and pied flycatcher droppings: effects of brood size, ectoparasites and temperature. *Hormones and Behavior* 53: 295-305.
- Martínez J., Martínez-De La Puente J., Herrero J., Del Cerro S., Lobato E., Rivero-de Aguilar J., Vásquez R. A., Merino S. 2009. A restriction site to differentiate *Plasmodium* and *Haemoproteus* infections in birds: on the inefficiency of general primers for detection of mixed infections. *Parasitology* 136: 713-722.
- Marzal A., De Lope F., Navarro C., Møller A. P. 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* 142: 541-545.
- McCurdy D. G., Shutler D., Mullie A., Forbes M. R. 1998. Sex-biased parasitism of avian hosts: relations to blood parasite taxon and mating system. *Oikos* 82: 303-312.
- Medeiros M. C., Anderson T. K., Higashiguchi J. M., Kitron U. D., Walker E. D., Brawn J. D., Krebs B. L., Ruiz M. O., Goldberg T. L., Ricklefs R. E., Hamer G. L. 2014. An inverse association between West Nile virus serostatus and avian malaria infection status. *Parasites and Vectors* 7: 415.
- Meixell B. W., Arnold T. W., Lindberg M. S., Smith M. M., Runstadler J. A., Ramey A. M. 2016. Detection, prevalence, and transmission of avian hematozoa in waterfowl at the Arctic/sub-Arctic interface: co-infections, viral interactions, and sources of variation. *Parasites and Vectors* 9: 390.

- Merino S., Potti J. 1995. High prevalence of hematozoa in nestlings of a passerine species, the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Auk* 112: 1041-1043.
- Merino S., Seoane J., Martínez-De La Puente J., Bermejo A. 2000. Low prevalence of infection by haemoparasites in Cetti's warblers *Cettia cetti* from central Spain. *Ardeola* 47: 269-271.
- Millott S. M., Cox F. E. G. 1985. Interactions between *Trypanosoma brucei* and *Babesia* spp. and *Plasmodium* spp. in mice. *Parasitology* 90: 241-254.
- Morand S., Poulin R. 1998. Density, body mass and parasite species richness of terrestrial mammals. *Evolutionary Ecology* 12: 717-727.
- Møller A. P., Nielsen J. T. 2007. Malaria and risk of predation: a comparative study of birds. *Ecology* 88: 871-881.
- Møller A. P., Sorci G., Erritzøe J. 1998. Sexual dimorphism in immune defense. *The American Naturalist* 152: 605-619.
- Muriel J., Graves J. A., Gil D., Magallanes S., Salaberria C., Casal-López M., Marzal A. 2018. Molecular characterization of avian malaria in the spotless starling (*Sturnus unicolor*). *Parasitology Research* 117: 1-10.
- Naef-Daenzer B., Gruebler M. U. 2008. Post-fledging range use of Great Tit *Parus major* families in relation to chick body condition. *Ardea* 96: 181-190.
- Norte A. C., Araujo P. M., Sampaio H. L., Sousa J. P., Ramos J. A. 2009. Haematozoa infections in a Great Tit *Parus major* population in Central Portugal: relationships with breeding effort and health. *Ibis* 151: 677-688.
- Oakgrove K. S., Harrigan R. J., Loiseau C., Guers S., Seppi B., Sehgal R. N. 2014. Distribution, diversity and drivers of blood-borne parasite co-infections in Alaskan bird populations. *International Journal for Parasitology* 44: 717-727.
- Ortego J., Cordero P. J. 2010. Factors associated with the geographic distribution of leucocytozoa parasitizing nestling eagle owls (*Bubo bubo*): a local spatial-scale analysis. *Conservation Genetics* 11: 1479-1487.
- Palinauskas V., Valkiūnas G., Bolshakov C. V., Bensch S. 2008. *Plasmodium relictum* (lineage P-SGS1): effects on experimentally infected passerine birds. *Experimental Parasitology* 120: 372-380.

- Pedersen A. B., Fenton A. 2007. Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 133-139.
- Pérez-Tris J., Bensch S. 2005. Diagnosing genetically diverse avian malarial infections using mixed-sequence analysis and TA-cloning. *Parasitology* 131: 15-23.
- Petney T. N., Andrews R. H. 1998. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *International Journal for Parasitology* 28: 377-393.
- Piersma T., van der Velde M. 2012. Dutch House Martins *Delichon urbicum* gain blood parasite infections over their lifetime, but do not seem to suffer. *Journal of Ornithology* 153: 907-912.
- Popławska M. 2014. Prognoza oddziaływania na środowisko. Studium uwarunkowań i kierunków zagospodarowania przestrzennego gminy Raszyn. Warszawa.
- Schalk G., Forbes M. R. 1997. Male biases in parasitism of mammals: effects of study type, host age, and parasite taxon. *Oikos* 78: 67-74.
- Sehgal R. N., Jones H. I., Smith T. B. 2001. Host specificity and incidence of *Trypanosoma* in some African rainforest birds: a molecular approach. *Molecular Ecology* 10: 2319-2327.
- Shmuel Z., Golenser J., Spira D. T. 1975. Mutual influence of infection with *Plasmodium berghei* and *Trypanosoma lewisi* in rats. *Journal of Protozoology* 22: A73-A73.
- Silveira P., Marin S. Y., Moreira P. A., Tocantins B. B., Lacorte G., Paixao T. A., Martins N. R., Braga E. M. 2013. Interactions of *Plasmodium juxtanucleare* and chicken anaemia virus: establishing a model. *Parasitology* 140: 1777-1788.
- Smith M. M., van Hemert C., Merizon R. 2016. Haemosporidian parasite infections in grouse and ptarmigan: Prevalence and genetic diversity of blood parasites in resident Alaskan birds. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5: 229-239.
- Sol D., Jovani R., Torres J. 2003. Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia* 135: 542-547.
- Svensson L. 1992. Identification guide to European passerines. Svensson. Stockholm.
- Svobodová M., Weidinger K., Peške L., Volf P., Votýpka J., Voříšek P. 2015. Trypanosomes and haemosporidia in the buzzard (*Buteo buteo*) and sparrowhawk

- (*Accipiter nisus*): factors affecting the prevalence of parasites. *Parasitology Research* 114: 551-560.
- Synek P., Popelková A., Koubínová D., Šťastný K., Langrová I., Votýpka J., Munclinger P. 2016. Haemosporidian infections in the Tengmalm's Owl (*Aegolius funereus*) and potential insect vectors of their transmission. *Parasitology Research* 115: 291-298.
- Telfer S., Lambin X., Birtles R., Beldomenico P., Burthe S., Paterson S., Begon M. 2010. Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. *Science* 330: 243-246.
- Thompson C. F., Sakaluk S. K., Masters B. S., Johnson B. G. P., Vogel L. A., Forsman A. M., Johnson L. S. 2013. Condition-dependent sex difference in nestling house wren (*Troglodytes aedon*) response to phytohaemagglutinin injection. *Canadian Journal of Zoology* 92: 1-7.
- Tomás G., Merino S., Martínez-de la Puente J., Moreno J., Morales J., Lobato E. 2008. Determinants of abundance and effects of blood-sucking flying insects in the nest of a hole-nesting bird. *Oecologia* 156: 305-312.
- Tschirren B., Fitze P. S., Richner H. 2003. Sexual dimorphism in susceptibility to parasites and cell-mediated immunity in great tit nestlings. *Journal of Animal Ecology* 72: 839-845.
- Valdebenito J. O., Liker A., Halimubieke N., Figuerola J., Székely T. 2020. Mortality cost of sex-specific parasitism in wild bird populations. *Scientific Reports* 10: 1-10.
- Valera F., Hoi H., Darolova A., Kristofik J. 2004. Size versus health as a cue for host choice: a test of the tasty chick hypothesis. *Parasitology* 129: 59-68.
- Valkiūnas G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC press. Boca Raton.
- Valkiūnas G., Bensch S., Iezhova T. A., Križanauskienė A., Hellgren O., Bolshakov C. V. 2006. Nested cytochrome b polymerase chain reaction diagnostics underestimate mixed infections of avian blood haemosporidian parasites: microscopy is still essential. *Journal of Parasitology* 92: 418-422.
- Van Oers K., Richardson D. S., Sæther S. A., Komdeur J. 2010. Reduced blood parasite prevalence with age in the Seychelles Warbler: selective mortality or suppression of infection?. *Journal of Ornithology* 151: 69-77.

- Van Rooyen J., Lalubin F., Glaizot O., Christe, P. 2013. Avian haemosporidian persistence and co-infection in great tits at the individual level. *Malaria Journal* 12: 40.
- Votýpka J., Svobodová M. 2004. Trypanosoma avium: experimental transmission from black flies to canaries. *Parasitology Research* 92: 147-151.
- Votýpka J., Synek P., Svobodová M. 2009. Endophagy of biting midges attacking cavity-nesting birds. *Medical and Veterinary Entomology* 23: 277-280.
- Votýpka J., Szabová J., Rádrová J., Zídková L., Svobodová M. 2012. Trypanosoma culicavium sp. nov., an avian trypanosome transmitted by Culex mosquitoes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 745-754.
- Waldenström J., Bensch S., Hasselquist D., Östman Ö. 2004. A new nested polymerase chain reaction method very efficient in detecting Plasmodium and Haemoproteus infections from avian blood. *Journal of Parasitology* 90: 191-194.
- Wojczulanis-Jakubas K., Jakubas D., Czujkowska A., Kulaszewicz I., Kruszewicz A. G. 2012. Blood parasite infestation and the leukocyte profiles in adult and immature reed warblers (Acrocephalus scirpaceus) and sedge warblers (Acrocephalus schoenobaenus) during autumn migration. *Annales Zoologici Fennici* 49: 341-349.
- Wright E. J., Nayar J. K., Forrester D. J. 2005. Interactive effects of turkeypox virus and Plasmodium hermani on turkey poults. *Journal of Wildlife Diseases* 41: 141-148.
- Zamora-Vilchis I., Williams S. E., Johnson C. N. 2012. Environmental temperature affects prevalence of blood parasites of birds on an elevation gradient: implications for disease in a warming climate. *PLoS One* 7: e39208.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Rozdział I: Oddziaływania w obrębie zespołu pasożytów krwi u modraszki *Cyanistes caeruleus* w warunkach eksperymentalnie manipulowanego dobrostanu żywiciela

- Kondycja samic modraszki nie miała wpływu na charakter zależności występujących między badanymi rodzajami pasożytów krwi. Obecność dodatkowego czynnika biologicznego, potencjalnie wpływającego na dobrostan gospodarza, tj. pcheł w gnieździe nie wpływała również na siłę zależności występujących między pasożytami.
- Współpasożytnictwo pierwotniaków z rodzajów *Haemoproteus* i *Plasmodium* wykazywało silną zależność antagonistyczną w obu kierunkach. Zarówno *Haemoproteus* wpływał negatywnie na prawdopodobieństwo inwazji *Plasmodium*, jak i zarażenie *Plasmodium* obniżało prawdopodobieństwo rozwoju zarażenia *Haemoproteus*.
- Współpasożytnictwo pierwotniaków z rodzajów *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* wykazywało silną, dwukierunkową zależność synergistyczną. Zarażenie jednym rodzajem pasożyta wpływało pozytywnie na prawdopodobieństwo zarażenia drugim rodzajem.

Rozdział II: Wpływ współwystępowania pasożytów krwi na elementy biologii rozrodu modraszki *Cyanistes caeruleus* w warunkach eksperymentalnie manipulowanego dobrostanu żywiciela

- Współwystępowanie pasożytów krwi nie wpływało na większość elementów biologii lęgowej żywiciela, jednak zaobserwowano, że sukces klucia w lęgach samic zarażonych trzema rodzajami pasożytów był niższy. Stwierdzono również, że samice zarażone jedynie rodzajem *Trypanosoma* przystępowały później do składania jaj. Natomiast samice zarażone wyłącznie *Haemoproteus* miały mniejsze zniesienia.
- Nie zaobserwowano różnic w sukcesie rozrodczym samic, w których gniazdach były pchły w porównaniu do gniazd bez pcheł.

- Nie stwierdzono różnic w kondycji piskląt i sukcesie wylotu pomiędzy grupą kontrolną i eksperymentalną.

Rozdział III: Czynniki wpływające na zarażenie oraz współwystępowanie pasożytów krwi u młodocianych bogatek *Parus major*

- Nie stwierdzono związku między długością życia młodocianych bogatek a prawdopodobieństwem ich zarażenia przez pierwotniaki z rodzaju *Haemoproteus*. Ze względu na niską prewalencję pasożytów z rodzaju *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* wśród ptaków zaobraczkowanych na etapie gniazdowym nie można było określić związku długości życia z prawdopodobieństwem zarażenia tymi rodzajami pasożytów.
- Płeć młodocianych bogatek miała związek tylko z prawdopodobieństwem zarażenia *Leucocytozoon* – samice były częściej zarażone niż samce. W przypadku pozostałych rodzajów pasożytów krwi obie płcie były zarażone podobnie często.
- Prawdopodobieństwo wystąpienia inwazji *Plasmodium*, *Leucocytozoon* lub *Trypanosoma* wzrastało wraz z postępem sezonu i było wyższe u później schwytanych ptaków. Prawdopodobieństwo zarażenia *Haemoproteus* nie miało związku z datą schwytania.
- Prewalencja pasożytów krwi była wyższa u osobników dorosłych w przypadku zarażenia rodzajami *Haemoproteus*, *Plasmodium* i *Leucocytozoon*, natomiast w przypadku zarażenia *Trypanosoma* była wyższa u osobników młodocianych.
- Współwystępowanie pasożytów z rodzajów *Haemoproteus* i *Plasmodium* miało charakter antagonistyczny u młodocianych i dorosłych bogatek. U młodocianych bogatek stwierdzono występowanie pozytywnej zależności we współpasożytnictwie *Plasmodium* i *Trypanosoma*.

Wnioski

1. Koinwazje pasożytów krwi u dziuplaków są częste a współwystępujące pasożyty tworzą zbiorowość, w obrębie której występują zależności synergistyczne, antagonistyczne i neutralne. W badanych przeze mnie układach żywiciel–zbiorowość pasożytów zależność synergistyczna występuje w układzie *Leucocytozoon–Trypanosoma*, a antagonistyczna – w układzie *Haemoproteus–Plasmodium*.
2. Warunki, które potencjalnie mogą różnicować dobrostan żywiciela (w wypadku moich badań była to ekspozycja na powszechne ektopasożyty ptaków – pchły) nie mają wpływu na oddziaływania między współwystępującymi pasożytami krwi reprezentującymi różne taksony, jak i na efekt, jaki pasożyty wywierają na biologię lęgową żywiciela.
3. U młodocianych dziuplaków prawdopodobieństwo zarażenia pasożytami krwi z rodzajów *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma* wzrasta wraz z postępem sezonu lęgowego, natomiast zarażenie *Haemoproteus* nie wykazuje takiej zależności.
4. Wiek żywiciela (osobniki młodociane vs dorosłe) nie wpływa na typ oddziaływania między współwystępującymi pasożytami krwi reprezentującymi różne taksony.
5. Dalsze badania na zbiorowościach pasożytów krwi w oparciu o dane z różnych punktów czasowych z życia żywiciela są kluczowe dla zrozumienia zależności w układzie żywiciel–zbiorowość pasożytów, jak i przebiegu samych inwazji pasożytniczych.

PODZIĘKOWANIA

Podziękowania

W tym miejscu chciałbym podziękować wszystkim osobom, która na przestrzeni lat, kiedy powstawała moja rozprawa wspierały mnie w dążeniu do celu.

W pierwszej kolejności pragnę podziękować dr. hab. Tomaszowi Mazgajskiemu i dr Annie Dubiec za przyjęcie mnie do swojego zespołu i możliwość realizacji badań w Pracowni Badań Ornitologicznych. Dziękuję za wspólne naukowe dyskusje, wsparcie merytoryczne, wyrozumiałość i cierpliwość.

Koleżankom i kolegom z Pracowni Badań Ornitologicznych MiIZ PAN, pozostałym doktorantom i pracownikom MiIZ PAN oraz asystentom terenowym za wszelką pomoc udzieloną podczas prac nad rozprawą.

Przyjaciołom i znajomym Kasi i Michałowi Kamińskim, Aśce Wójtowicz i Goście Proboszcz, Asi i Damianowi Strzemeckim, Asi i Przemkowi Wiakom, a także Błażejowi Krupie, Piotrkowi Barańskiemu i Patrykowi Reniewiczowi – za wspólne dyskusje o doktoratach i nie tylko.

Mojej młodszej siostrze Emilce oraz Konradowi Paterek za pomocną dłoń na co dzień.

Mojej cioci Małgorzacie Hydzik za pokazanie jak wygląda bojowe nastawienie.

Moim rodzicom Marii i Marianowi Krupskim za wiarę w moje możliwości i wsparcie w lepszych i gorszych chwilach.

Na końcu chciałbym szczególnie podziękować mojemu „trzeciemu promotorowi” – mojej kochanej żonie Oldze Krupskiej za wszystkie lata wsparcia i mobilizacji oraz za wzmożoną opiekę nad Guciem w końcowym okresie prac – ta rozprawa została ukończona w dużej mierze właśnie dzięki Tobie.

DODATKI

Apendyks 1.

W tym apendyksie przedstawiono szczegóły reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) służącej do amplifikowania DNA pasożytów z rodzajów *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon* i *Trypanosoma*.

Protokół PCR służący do amplifikowania DNA pasożytów z rodzaju *Haemoproteus* i *Plasmodium*

Do amplifikacji DNA wykorzystuje się zagnieżdżoną reakcję łańcuchową polimerazy, w której najpierw amplifikowany jest dłuższy fragment cytochromu b mitochondrialnego DNA pasożyta (534 par zasad) (I reakcja), a następnie otrzymany produkt wykorzystuje się w kolejnej reakcji, która amplifikuje krótszy fragment DNA pasożyta o długości 479 par zasad (reakcja II). W analizach wykorzystano warunki reakcji opisane w Waldenström i wsp. (2004).

I reakcja. Objętość mieszaniny reakcyjnej: 25 µl, skład: nukleotydy dATP, dCTP, dGTP i dTTP w stężeniu 1,25mM każdy, 3mM MgCl₂, 10-krotnie stężony bufor Tris–HCl z KCl, startery HAEMNF i HAEMNR2 w stężeniu 0,2µM, dejonizowana woda, 0,25U polimerazy DNA Taq (Thermo Scienific) oraz 2 µl izolatu DNA.

Proces	Warunki
Wstępna denaturacja	94°C przez 3 min
20 powtórzeń:	
Denaturacja nici	94°C przez 30 sekund
Przyłączanie starterów	50°C przez 30 sekund
Przyłączenie polimerazy do dupleksu starter–matryca i synteza łańcucha DNA	72°C przez 45sekund
Wydłużanie nici DNA	72°C przez 10 min

II reakcja. Objętość mieszaniny reakcyjnej: 25 μ l, skład: nukleotydy dATP, dCTP, dGTP i dTTP w stężeniu 1,25mM każdy, 3mM $MgCl_2$, 10-krotnie stężony bufor Tris-HCl z KCl, 0,4 μ M starterów HAEMF i HAEMR2, dejonizowana woda, 0,5U polimerazy DNA Taq (Thermo Scienific) oraz 2 μ l produktu z reakcji I.

Proces	Warunki
Wstępna denaturacja	94°C przez 3 min
35 powtórzeń:	
Denaturacja nici	94°C przez 30 sekund
Przylączenie starterów	50°C przez 30 sekund
Przylączenie polimerazy do dupleksu starter-matryca i synteza łańcucha DNA	72°C przez 45sekund
Wydłużanie nici DNA	72°C przez 10 min

Protokół PCR służący do amplifikowania DNA *Leucocytozoon*

Do amplifikacji DNA wykorzystuje się zagnieżdżoną reakcję łańcuchową polimerazy, w której najpierw amplifikowany jest dłuższy fragment cytochromu b mitochondrialnego DNA pasożyta, a następnie otrzymany produkt wykorzystuje się w kolejnej reakcji. Druga reakcja amplifikuje krótszy fragment DNA pasożyta o długości 480 par zasad. W analizach wykorzystano warunki reakcji opisane w Hellgren i wsp. (2004).

I reakcja. Objętość mieszaniny reakcyjnej 25 µl, skład: nukleotydy dATP, dCTP, dGTP i dTTP w stężeniu 1,25mM każdy, 1,5mM MgCl₂, 10-krotnie stężony buforu Tris-HCl z KCl, 0,6µM starterów HAEMNFI i HAEMNR3, dejonizowana woda, 0,5U polimerazy DNA Taq (Thermo Scienific) oraz 2 µl izolatu DNA

Proces	Warunki
Wstępna denaturacja	94°C przez 3 min
20 powtórzeń:	
Denaturacja nici	94°C przez 30 sekund
Przyłączanie starterów	50°C przez 30 sekund
Przyłączenie polimerazy do dupleksu starter-matryca i synteza łańcucha DNA	72°C przez 45sekund
Wydłużanie nici DNA	72°C przez 10 min

II reakcja. Objętość mieszaniny reakcyjnej: 25 μ l, skład: nukleotydy dATP, dCTP, dGTP i dTTP w stężeniu 1,25mM każdy, 3mM $MgCl_2$, 10-krotnie stężony bufor Tris-HCl z KCl, 0,6 μ M starterów HAEMFL i HAEMR2L, dejonizowana woda, 0,5U polimerazy DNA Taq (Thermo Scientific) oraz 2 μ l produktu z reakcji I.

Proces	Warunki
Wstępna denaturacja	94°C przez 3 min
35 powtórzeń:	
Denaturacja nici	94°C przez 30 sekund
Przylączenie starterów	50°C przez 30 sekund
Przylączenie polimerazy do dupleksu starter-matryca i synteza łańcucha DNA	72°C przez 45sekund
Wydłużanie nici DNA	72°C przez 10 min

Protokół PCR służący do amplifikowania DNA *Trypanosoma*

Do amplifikacji DNA wykorzystuje się zagnieżdżoną reakcję łańcuchową polimerazy, w której najpierw amplifikowany jest dłuższy fragment genu kodującego mniejszą podjednostkę rybosomalną RNA (SSU RNA) pasożyta, a następnie otrzymany produkt wykorzystuje się w kolejnej reakcji. Druga reakcja amplifikuje krótszy fragment DNA pasożyta o długości 326 par zasad. W analizach wykorzystano warunki reakcji opisane w Sehgal i wsp. (2001). W związku z problemami z otrzymaniem czytelnych wyników, wykorzystano zmodyfikowany protokół opisany przez Zamora–Vilchis i wsp. (2012).

I reakcja. Objętość mieszaniny reakcyjnej: 10 µl, skład: nukleotydy dATP, dCTP, dGTP i dTTP w stężeniu 1,25mM każdy, 3mM MgCl₂, 10–krotnie stężony buforu Tris–HCl z KCl, 0,5µM starterów S–762 i S–763, dejonizowana woda, 0,25U polimerazy DNA Taq (Thermo Scienific) oraz 2 µl izolatu DNA

Proces	Warunki
Wstępna denaturacja	95°C przez 5 min
5 powtórzeń:	
Denaturacja nici	95°C przez 1 min
Przyłączanie starterów	45°C przez 30 sekund
Przyłączenie polimerazy do dupleksu starter–matryca i synteza łańcucha DNA	65°C przez 1 min
35 powtórzeń:	
Denaturacja nici	95°C przez 1min
Przyłączanie starterów do nici DNA	50°C przez 30 sekund
Przyłączenie polimerazy do dupleksu starter–matryca i synteza łańcucha DNA	72°C przez 1min
Wydłużanie nici DNA	65°C przez 10 min

II reakcja. Objętość mieszaniny reakcyjnej: 25 μ l, skład: nukleotydy dATP, dCTP, dGTP i dTTP w stężeniu 1,25mM każdy, 3mM $MgCl_2$, 10-krotnie stężony bufor Tris-HCl z KCl, 1,25 μ M starterów S-755 i S-823, dejonizowana woda, 0,25U polimerazy DNA Taq (Thermo Scienific) oraz 1 μ l produktu z reakcji I.

Proces	Warunki
Wstępna denaturacja	96°C przez 3 min
35 powtórzeń:	
Denaturacja nici	9°C przez 30 sekund
Przylączenie starterów	58°C przez 1 min
Przylączenie polimerazy do dupleksu starter-matryca i synteza łańcucha DNA	72°C przez 30 sekund
Wydłużanie nici DNA	72°C przez 7 min

Apendyks 2.

Tabela A2.1. Prewalencja potwierdzonych linii genetycznych *Haemoproteus* w populacji modraszki w latach 2013–2015 dla dwóch punktów czasowych – inkubacji i dnia 14. życia piskląt. Jeden osobnik może być zarażony różnymi liniami genetycznymi pasożyta jednocześnie.

Linia genetyczna	Okres chwytania samic	
	Inkubacja (zarażone 63/149 osobniki)	D14 (zarażone 71/149 osobników)
hPARUS1	100% (63)	95,8 % (68)
hPHSIB1	1,6% (1)	2,8% (2)
hWW2	- (0)	1,4% (1)
Nieznana linia (4 różnice z hPARUS1)	1,6% (1)	- (0)
Nieznana linia (2 różnice z hPARUS1)	1,6% (1)	- (0)
Nieznana linia	- (0)	1,4% (1)

Tabela A2.2. Prewalencja potwierdzonych linii genetycznych *Plasmodium* w populacji modraszki w latach 2013–2015 dla dwóch punktów czasowych – inkubacji i dnia 14. życia piskląt. Jeden osobnik może być zarażony różnymi liniami genetycznymi pasożyta jednocześnie.

Okres chwytania samic		
Linia genetyczna	Inkubacja (zarażone 58/149 osobników)	D14 (zarażone 59/149 osobników)
pTURDUS1	81,0% (47)	79,7% (47)
pBT7	13,8% (8)	13,6 % (8)
pSGS1	6,9% (4)	6,8 % (4)
pSW2	3,4% (2)	3,4% (2)
pPADOM02	- (0)	1,7 % (1)

Wśród potwierdzonych linii genetycznych *Leucocytozoon* najczęściej występowała linia PARUS4 (32,1%). Ponadto w badanej populacji modraszki stwierdzono następujące linie genetyczne: BT2, PARUS7, PARUS14, PARUS18, PARUS19, PARUS21, PARUS24.

U wszystkich osobników zarażonych *Trypanosoma* oznaczono gatunek jako *Trypanosoma avium*.

Apendyks 3.

Poniżej przedstawiono sposób wyliczeń pozwalających przewidzieć prawdopodobieństwo współwystępowania pasożytów krwi (na podstawie Combes 1999).

W przypadku, gdy w badaniach nie przeprowadzono analiz pod kątem określenia charakteru oddziaływania między pasożytami, można go poznać za pomocą porównania prewalencji poszczególnych pasożytów. Przykładowo, jeżeli *Trypanosoma* ma prewalencję na poziomie np. 20% a *Plasmodium* 30% szanse jednoczesnego występowania będą wynosiły:

$0,20 \times 0,30 = 0,06$, czyli 6% przypadków

W związku z tym, jeżeli obserwowane przypadki współpasożytnictwa są znacznie wyższe niż w wyliczeniach możemy mieć do czynienia z zależnością synergistyczną, a jeżeli są znacznie niższe – z zależnością antagonistyczną. W obecnych badaniach współpasożytnictwo *Haemoproteus* i *Plasmodium* nie występowało lub było ono znikome, chociaż pasożyty były osobno stwierdzane u znacznej liczby ptaków. Może świadczyć o antagonistycznej zależności między tymi pasożytami (również w Meixell i wsp. 2016, Smith i wsp. 2016).

Apendyks 4.

Tabela A4.1. Dane podstawowe dotyczące wpływu pasożytów krwi na elementy biologii lęgowej z podziałem na lata i grupy eksperymentalne; Eksp. – grupa eksperymentalna, Kon. – grupa kontrolna, D14 – dzień 14. życia piskląt.

		Data złożenia 1 jaja	Wielkość zniesienia	Średnia wielkość jaj (mm ²)	Liczba wyklutych piskląt	Liczba piskląt w D14	Liczba pcheł w D14	Sukces wylotu	Masa samicy w D14 (g)
2013	Kon.	10.05	10,9	156,33	9,9	9,9	17	99%	11,01
	Eksp.	10.05	11,3	156,10	10,1	10,1	111	99%	10,85
2014	Kon.	25.04	11,2	155,46	9,8	9,1	23	92%	10,89
	Eksp.	25.04	11,5	154,70	10,3	9,7	124	92%	10,82
2015	Kon.	01.05	9,2	153,03	8,5	7,7	14	89%	10,79
	Eksp.	01.05	9,4	154,31	8,4	7,7	118	89%	10,69

Tabela A4.2. Dane podstawowe dotyczące wpływu pasożytów krwi na elementy biologii lęgowej z uwzględnieniem obecności poszczególnych pasożytów. Eksp. – grupa eksperymentalna, Kon. – grupa kontrolna., D14 – dzień 14. życia piskląt; + – obecność zarażenia; - – brak zarażenia

		Data złożenia 1 jaja	Wielkość zniesienia	Średnia wielkość jaj (mm ²)	Liczba wyklutych piskląt	Liczba piskląt w D14	Sukces wylotu	Masa samicy w D14 (g)
<i>Haemoproteus</i>	+	30.04	10,4	155,86	9,2	8,9	93%	10,90
	-	01.05	10,9	154,33	9,9	9,2	94%	10,79
<i>Plasmodium</i>	+	30.04	10,9	154,84	9,8	9,0	92%	10,82
	-	01.05	10,6	155,14	9,5	9,1	94%	10,87
<i>Trypanosoma</i>	+	03.05	11,0	154,35	9,8	9,1	95%	10,84
	-	30.04	10,6	155,32	9,6	9,1	92%	10,84
<i>Leucocytozoon</i>	+	02.05	10,8	153,13	9,9	9,8	96%	10,87
	-	30.04	10,7	155,50	9,6	9,0	92%	10,84

Tabela A4.3. Dane podstawowe dotyczące wpływu pasożytów krwi na elementy biologii lęgowej z uwzględnieniem typu koinwazji oraz poszczególnych układów pasożytów. Eksp. – grupa eksperymentalna, Kon. – grupa kontrolna, D14 – dzień 14. życia piskląt.

	Data złożenia 1 jaja	Wielkość zniesienia	Średnia wielkość jaj (mm ²)	Liczba wyklutych piskląt	Liczba piskląt w D14	Sukces wylotu	Masa samicy w D14 (g)
Brak koinwazji	30.04	10,6	155,78	9,6	9,0	92%	10,84
2 taksony	02.05	10,9	153,52	9,7	9,2	93%	10,83
3 taksony	03.05	10,7	155,02	9,1	8,9	96%	10,88
4 taksony (tylko w D14)	01.05	11,5	148,54	10,5	10,5	100%	11,25
<i>H+P</i>	23.04	11,3	155,66	9,3	8,0	84%	11,03
<i>H+T</i>	03.05	10,7	154,18	9,2	9,3	91%	10,92
<i>H+L</i>	30.04	10,0	152,92	8,9	9,1	76%	11,16
<i>P+T</i>	02.05	11,3	154,13	9,8	9,0	96%	10,65
<i>P+L</i>	02.05	12,0	150,41	11,2	10,6	95%	10,76
<i>T+L</i>	09.05	11,0	153,57	10,5	10,5	100%	10,60

Tabela A4.4. Wpływ poszczególnych układów pasożytniczych wykrytych u samic na datę rozpoczęcia składania jaj z zastosowaniem uogólnionego modelu liniowego. Zabieg eksperymentalny polegał na dodaniu pcheł do gniazd modraszki w grupie eksperymentalnej oraz eliminację pcheł w gniazdach z grupy kontrolnej.

		df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	Rok ¹	2		0,12	0,942
	2014	1	0,10 $\pm$ 0,80		
	2015	1	-0,18 $\pm$ 0,88		
	Wiek ²	1	-1,44 $\pm$ 0,65	4,84	0,028
	Układ pasożytów ³	4		3,24	0,518
	tylko <i>Haemoproteus</i>	1	0,36 $\pm$ 0,80	0,21	0,648
	tylko para <i>H+P</i>	1	-1,75 $\pm$ 2,14	0,67	0,414
	tylko para <i>H+T</i>	1	0,54 $\pm$ 1,12	0,23	0,630
	tylko para <i>H+L</i>	1	-1,73 $\pm$ 1,30	1,76	0,185
<i>Plasmodium</i>	Rok ¹	2		0,31	0,858
	2014	1	0,35 $\pm$ 0,78		
	2015	1	0,01 $\pm$ 0,86		
	Wiek ²	1	-1,74 $\pm$ 0,65	7,14	0,008
	Układ pasożytów ³	4		5,62	0,229
	tylko <i>Plasmodium</i>	1	-1,48 $\pm$ 0,76	3,79	0,051
	tylko para <i>P+H</i>	1	-2,20 $\pm$ 2,17	1,03	0,310
	tylko para <i>P+T</i>	1	0,38 $\pm$ 1,14	0,11	0,738
	tylko para <i>P+L</i>	1	-0,20 $\pm$ 1,56	0,02	0,900

Ciąg dalszy na kolejnej stronie.

Dodatki

<i>Trypanosoma</i>	Rok ¹	2		0,82	0,665
	2014	1	-0,26±0,79		
	2015	1	-0,77±0,88		
	Wiek ²	1	-1,44±0,65	4,8	0,027
	Układ pasożytów ³	4		12,39	0,015
	tylko <i>Trypanosoma</i>	1	5,73±1,78	10,29	0,001
	tylko para <i>T+H</i>	1	0,99±1,12	0,79	0,374
	tylko para <i>T+P</i>	1	1,10±1,08	1,03	0,310
	tylko para <i>T+L</i>	1	-2,39±2,57	0,87	0,352
<i>Leucocytozoon</i>	Rok ¹	2		0,33	0,850
	2014	1	-0,21±0,81		
	2015	1	-0,51±0,90		
	Wiek ²	1	-1,53±0,68	5,14	0,023
	Układ pasożytów ³	3		3,18	0,364
	tylko para <i>L+H</i>	1	-1,86±1,30	2,07	0,151
	tylko para <i>L+P</i>	1	-0,21±1,54	0,02	0,893
	tylko para <i>L+T</i>	1	-2,92±2,65	1,21	0,271

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

Tabela A4.5. Wpływ poszczególnych układów pasożytniczych wykrytych u samic na wielkość zniesienia z zastosowaniem uogólnionego modelu liniowego. Zabieg eksperymentalny polegał na dodaniu pcheł do gniazd modraszki w grupie eksperymentalnej oraz eliminację pcheł w gniazdach z grupy kontrolnej.

		df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	Rok ¹	2		50,33	<0,001
	2014	1	0,38 $\pm$ 0,29		
	2015	1	-1,81 $\pm$ 0,32		
	Wiek ²	1	0,15 $\pm$ 0,24	0,43	0,511
	Układ pasożytów ³	4		6,22	0,183
	Tylko <i>Haemoproteus</i>	1	-0,70 $\pm$ 0,29	5,87	0,015
	tylko para <i>H+P</i>	1	-0,27 $\pm$ 0,77	0,13	0,723
	tylko para <i>H+T</i>	1	-0,44 $\pm$ 0,40	1,22	0,269
	tylko para <i>H+L</i>	1	-0,12 $\pm$ 0,47	0,06	0,799
<i>Plasmodium</i>	Rok ¹	2		45,77	<0,001
	2014	1	0,23 $\pm$ 0,28		
	2015	1	-1,75 $\pm$ 0,31		
	Wiek ²	1	0,12 $\pm$ 0,23	0,26	0,607
	Układ pasożytów ³	4		2,40	0,663
	tylko <i>Plasmodium</i>	1	-0,13 $\pm$ 0,27	0,23	0,634
	tylko para <i>P+H</i>	1	0,01 $\pm$ 0,78	0,01	0,987
	tylko para <i>P+T</i>	1	0,18 $\pm$ 0,41	0,20	0,656
	tylko para <i>P+L</i>	1	0,76 $\pm$ 0,56	18,80	0,180

Ciąg dalszy na kolejnej stronie.

Dodatki

<i>Trypanosoma</i>	Rok ¹	2		48,36	<0,001
	2014	1	0,17±0,30		
	2015	1	-1,95±0,33		
	Wiek ²	1	0,16±0,25	0,45	0,503
	Układ pasożytów ³	4		4,42	0,352
	tylko <i>Trypanosoma</i>	1	1,29±0,68	3,61	0,057
	tylko para <i>T+H</i>	1	-0,30±0,42	0,50	0,478
	tylko para <i>T+P</i>	1	0,21±0,41	0,26	0,640
	tylko para <i>T+L</i>	1	-0,06±0,97	0,01	0,947
<i>Leucocytozoon</i>	Rok ¹	2		41,71	<0,001
	2014	1	0,30±0,30		
	2015	1	-1,74±0,33		
	Wiek ²	1	0,05±0,25	0,04	0,843
	Układ pasożytów ³	3		2,36	0,502
	tylko para <i>L+H</i>	1	0,15±0,48	0,09	0,761
	tylko para <i>L+P</i>	1	0,87±0,57	2,33	0,127
	tylko para <i>L+T</i>	1	0,05±0,98	0,01	0,956

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

Tabela A4.6. Wpływ poszczególnych układów pasożytniczych wykrytych u samic na średnią wielkość jaj w lęgu z zastosowaniem uogólnionego modelu liniowego. Zabieg eksperymentalny polegał na dodaniu pcheł do gniazd modraszki w grupie eksperymentalnej oraz eliminację pcheł w gniazdach z grupy kontrolnej.

		df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	Rok ¹	2		2,74	0,254
	2014	1	-1,28 $\pm$ 1,73		
	2015	1	-3,12 $\pm$ 1,89		
	Wiek ²	1	1,13 $\pm$ 1,41	0,65	0,421
	Układ pasożytów ³	4		3,92	0,417
	tylko <i>Haemoproteus</i>	1	3,12 $\pm$ 1,71	3,32	0,068
	tylko para <i>H+P</i>	1	1,30 $\pm$ 4,59	0,08	0,776
	tylko para <i>H+T</i>	1	-0,59 $\pm$ 2,40	0,06	0,805
	tylko para <i>H+L</i>	1	-0,94 $\pm$ 2,92	0,10	0,749
<i>Plasmodium</i>	Rok ¹	2		2,59	0,273
	2014	1	-0,94 $\pm$ 1,66		
	2015	1	-2,89 $\pm$ 1,83		
	Wiek ²	1	0,91 $\pm$ 1,38	0,44	0,509
	Układ pasożytów ³	4		4,05	0,399
	tylko <i>Plasmodium</i>	1	0,99 $\pm$ 1,61	0,38	0,540
	tylko para <i>P+H</i>	1	0,24 $\pm$ 4,58	0,01	0,958
	tylko para <i>P+T</i>	1	-1,36 $\pm$ 2,41	0,32	0,573
	tylko para <i>P+L</i>	1	-5,79 $\pm$ 3,30	3,07	0,080

Ciąg dalszy na kolejnej stronie.

Dodatki

<i>Trypanosoma</i>	Rok ¹	2		2,52	0,283
	2014	1	-0,52±1,80		
	2015	1	-2,88±2,00		
	Wiek ²	1	1,02±1,48	0,47	0,492
	Układ pasożytów ³	4		0,89	0,926
	tylko <i>Trypanosoma</i>	1	-1,67±4,03	0,17	0,679
	tylko para <i>T+H</i>	1	-1,34±2,53	0,28	0,595
	tylko para <i>T+P</i>	1	-1,58±2,45	0,41	0,519
	tylko para <i>T+L</i>	1	-2,43±5,81	0,17	0,676
<i>Leucocytozoon</i>	Rok ¹	2		3,02	0,221
	2014	1	-0,85±1,73		
	2015	1	-3,23±1,94		
	Wiek ²	1	1,65±1,45	1,30	0,254
	Układ pasożytów ³	3		4,28	0,233
	tylko para <i>L+H</i>	1	-2,13±2,90	0,54	0,463
	tylko para <i>L+P</i>	1	-6,40±3,29	3,78	0,052
	tylko para <i>L+T</i>	1	-2,56±5,67	0,20	0,651

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

Tabela A4.7. Wpływ poszczególnych układów pasożytniczych wykrytych u samic na sukces klucia wyrażony jako liczba piskląt w dniu 2. z odniesieniem do wielkości lęgu z zastosowaniem uogólnionego modelu liniowego. Zabieg eksperymentalny polegał na dodaniu pcheł do gniazd modraszki w grupie eksperymentalnej oraz eliminację pcheł w gniazdach z grupy kontrolnej.

		df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	Rok ¹	2		0,58	0,746
	2014	1	-0,14 $\pm$ 0,23		
	2015	1	0,02 $\pm$ 0,26		
	Wiek ²	1	0,09 $\pm$ 0,19	0,21	0,643
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,05 $\pm$ 0,18	0,08	0,783
	Układ pasożytów ⁴	4		4,62	0,329
	tylko <i>Haemoproteus</i>	1	-0,03 $\pm$ 0,24	0,01	0,904
	tylko para <i>H+P</i>	1	-0,68 $\pm$ 0,49	1,96	0,162
	tylko para <i>H+T</i>	1	-0,49 $\pm$ 0,28	3,02	0,082
	tylko para <i>H+L</i>	1	-0,29 $\pm$ 0,37	0,59	0,441
<i>Plasmodium</i>	Rok ¹	2		0,97	0,616
	2014	1	-0,05 $\pm$ 0,21		
	2015	1	0,18 $\pm$ 0,25		
	Wiek ²	1	0,07 $\pm$ 0,18	0,16	0,691
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,12 $\pm$ 0,19	0,41	0,519
	Układ pasożytów ⁴	4		3,89	0,421
	tylko <i>Plasmodium</i>	1	0,22 $\pm$ 0,23	0,87	0,351
	tylko para <i>P+H</i>	1	-0,58 $\pm$ 0,48	1,44	0,230
	tylko para <i>P+T</i>	1	-0,17 $\pm$ 0,29	0,35	0,554
	tylko para <i>P+L</i>	1	0,53 $\pm$ 0,49	1,17	0,279

Ciąg dalszy na kolejnej stronie.

Dodatki

<i>Trypanosoma</i>	Rok ¹	2		0,72	0,697
	2014	1	-0,08±0,22		
	2015	1	0,12±0,27		
	Wiek ²	1	0,20±0,19	1,04	0,309
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,06±0,19	0,10	0,754
	Układ pasożytów ⁴	4		4,99	0,288
	tylko <i>Trypanosoma</i>	1	0,83±0,74	1,26	0,262
	tylko para <i>T+H</i>	1	-0,36±0,30	1,43	0,231
	tylko para <i>T+P</i>	1	-0,27±0,29	0,89	0,347
	tylko para <i>T+L</i>	1	0,86±1,05	0,68	0,409
<i>Leucocytozoon</i>	Rok ¹	2		1,85	0,397
	2014	1	-0,05±0,22		
	2015	1	0,28±0,27		
	Wiek ²	1	0,23±0,20	1,32	0,250
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,11±0,18	0,36	0,547
	Układ pasożytów ⁴	3		2,76	0,431
	tylko para <i>L+H</i>	1	-0,31±0,37	0,72	0,396
	tylko para <i>L+P</i>	1	0,43±0,48	0,80	0,372
	tylko para <i>L+T</i>	1	0,97±1,04	0,87	0,352

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: kontrola

⁴poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

Tabela A4.8. Wpływ poszczególnych układów pasożytniczych wykrytych u samic na liczbę wyklutych piskląt z zastosowaniem uogólnionego modelu liniowego. Zabieg eksperymentalny polegał na dodaniu pcheł do gniazd modraszki w grupie eksperymentalnej oraz eliminację pcheł w gniazdach z grupy kontrolnej.

		df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	Rok ¹	2		23,13	<0,001
	2014	1	0,23 $\pm$ 0,39		
	2015	1	-1,61 $\pm$ 0,42		
	Wiek ²	1	0,23 $\pm$ 0,32	0,54	0,464
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,43 $\pm$ 0,32	1,91	0,167
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		6,56	0,161
	tylko <i>Haemoproteus</i>	1	-0,72 $\pm$ 0,39	3,45	0,063
	tylko para <i>H+P</i>	1	-1,38 $\pm$ 1,05	1,73	0,189
	tylko para <i>H+T</i>	1	-0,99 $\pm$ 0,54	3,41	0,065
	tylko para <i>H+L</i>	1	-0,42 $\pm$ 0,63	0,45	0,500
<i>Plasmodium</i>	Rok ¹	2		19,54	<0,001
	2014	1	0,17 $\pm$ 0,37		
	2015	1	-1,45 $\pm$ 0,41		
	Wiek ²	1	0,17 $\pm$ 0,31	0,32	0,573
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,48 $\pm$ 0,32	2,16	0,141
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		4,08	0,395
	tylko <i>Plasmodium</i>	1	0,22 $\pm$ 0,38	0,33	0,565
	tylko para <i>P+H</i>	1	-0,94 $\pm$ 1,04	0,82	0,364
	tylko para <i>P+T</i>	1	-0,08 $\pm$ 0,54	0,02	0,887
	tylko para <i>P+L</i>	1	1,32 $\pm$ 0,75	3,06	0,080

Ciąg dalszy na kolejnej stronie.

Dodatki

<i>Trypanosoma</i>	Rok ¹	2		22,23	<0,001
	2014	1	0,08±0,39		
	2015	1	-1,68±0,43		
	Wiek ²	1	0,33±0,32	1,07	0,302
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,32±0,31	1,01	0,316
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		5,50	0,239
	tylko <i>Trypanosoma</i>	1	1,68±0,89	3,54	0,060
	tylko para <i>T+H</i>	1	-0,67±0,55	1,46	0,227
	tylko para <i>T+P</i>	1	-0,17±0,54	0,10	0,752
	tylko para <i>T+L</i>	1	0,53±1,27	0,18	0,673
<i>Leucocytozoon</i>	Rok ¹	2		15,91	<0,001
	2014	1	0,24±0,39		
	2015	1	-1,31±0,44		
	Wiek ²	1	0,25±0,33	0,59	0,443
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,43±0,31	1,91	0,166
	Układ pasożytów w D14 ⁴	3		3,40	0,334
	tylko para <i>L+H</i>	1	-0,18±0,62	0,08	0,770
	tylko para <i>L+P</i>	1	1,30±0,75	3,02	0,082
	tylko para <i>L+T</i>	1	0,77±1,27	0,37	0,544

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: kontrola

⁴poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

Tabela A4.9. Wpływ poszczególnych układów pasożytniczych wykrytych u samic na liczbę piskląt w dniu 14. z zastosowaniem uogólnionego modelu liniowego. Zabieg eksperymentalny polegał na dodaniu pcheł do gniazd modraszki w grupie eksperymentalnej oraz eliminację pcheł w gniazdach z grupy kontrolnej.

		df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	Rok ¹	2		30,58	<0,001
	2014	1	-0,44 $\pm$ 0,42		
	2015	1	-2,40 $\pm$ 0,45		
	Wiek ²	1	0,52 $\pm$ 0,34	2,36	0,12
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,34 $\pm$ 0,33	1,12	0,291
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		2,19	0,701
	tylko <i>Haemoproteus</i>	1	-0,02 $\pm$ 0,42	0,01	0,956
	tylko para <i>H+P</i>	1	-1,02 $\pm$ 0,77	1,76	0,185
	tylko para <i>H+T</i>	1	-0,22 $\pm$ 0,57	0,15	0,699
	tylko para <i>H+L</i>	1	0,29 $\pm$ 0,68	0,18	0,673
<i>Plasmodium</i>	Rok ¹	2		25,85	<0,001
	2014	1	-0,47 $\pm$ 0,39		
	2015	1	-2,10 $\pm$ 0,42		
	Wiek ²	1	0,38 $\pm$ 0,33	1,39	0,239
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,45 $\pm$ 0,32	2,04	0,154
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		3,17	0,530
	tylko <i>Plasmodium</i>	1	-0,07 $\pm$ 0,41	0,03	0,866
	tylko para <i>P+H</i>	1	-1,03 $\pm$ 0,76	1,86	0,172
	tylko para <i>P+T</i>	1	-0,24 $\pm$ 0,53	0,21	0,645
	tylko para <i>P+L</i>	1	0,83 $\pm$ 0,84	0,97	0,324

Ciąg dalszy na kolejnej stronie.

Dodatki

<i>Trypanosoma</i>	Rok ¹	2		29,00	<0,001
	2014	1	-0,57±0,42		
	2015	1	-2,38±0,45		
	Wiek ²	1	0,49±0,34	2,06	0,151
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,42±0,32	1,70	0,192
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		2,97	0,563
	tylko <i>Trypanosoma</i>	1	-1,43±0,93	2,33	0,127
	tylko para <i>T+H</i>	1	-0,27±0,55	0,23	0,628
	tylko para <i>T+P</i>	1	-0,29±0,52	0,31	0,577
	tylko para <i>T+L</i>	1	0,60±1,32	0,21	0,649
<i>Leucocytozoon</i>	Rok ¹	2		26,07	<0,001
	2014	1	-0,36±0,40		
	2015	1	-2,18±0,45		
	Wiek ²	1	0,48±0,33	2,10	0,147
	Zabieg eksperymentalny ³	1	0,32±0,32	1,00	0,317
	Układ pasożytów w D14 ⁴	3		1,88	0,598
	tylko para <i>L+H</i>	1	0,39±0,66	0,34	0,560
	tylko para <i>L+P</i>	1	0,91±0,83	1,20	0,272
	tylko para <i>L+T</i>	1	0,92±1,31	0,50	0,481

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: kontrola

⁴poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

Tabela A4.10. Wpływ poszczególnych układów pasożytniczych wykrytych u samic na średnią masę piskląt w dniu 14. z zastosowaniem uogólnionego modelu liniowego. Zabieg eksperymentalny polegał na dodaniu pcheł do gniazd modraszki w grupie eksperymentalnej oraz eliminację pcheł w gniazdach z grupy kontrolnej.

		df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	Rok ¹	2		13,41	0,001
	2014	1	-0,38 $\pm$ 0,17		
	2015	1	-0,73 $\pm$ 0,19		
	Wiek ²	1	0,15 $\pm$ 0,14	1,14	0,286
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,23 $\pm$ 0,13	2,93	0,087
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		2,93	0,569
	tylko <i>Haemoproteus</i>	1	0,13 $\pm$ 0,17	0,61	0,433
	tylko para <i>H+P</i>	1	-0,31 $\pm$ 0,31	0,95	0,331
	tylko para <i>H+T</i>	1	0,08 $\pm$ 0,23	0,12	0,726
	tylko para <i>H+L</i>	1	-0,23 $\pm$ 0,28	0,67	0,411
	Liczba piskląt w D2	1	-0,12 $\pm$ 0,04	9,34	0,002
<i>Plasmodium</i>	Rok ¹	2		15,35	<0,001
	2014	1	-0,28 $\pm$ 0,16		
	2015	1	-0,72 $\pm$ 0,18		
	Wiek ²	1	0,16 $\pm$ 0,14	1,30	0,255
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,17 $\pm$ 0,16	1,06	0,304
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		5,11	0,276
	tylko <i>Plasmodium</i>	1	0,05 $\pm$ 0,21	0,03	0,806
	tylko para <i>P+H</i>	1	0,02 $\pm$ 0,44	0,01	0,957
	tylko para <i>P+T</i>	1	-0,48 $\pm$ 0,30	2,42	0,119
	tylko para <i>P+L</i>	1	0,15 $\pm$ 0,45	0,12	0,733
	Liczba piskląt w D2	1	-0,12 $\pm$ 0,04	10,74	0,001
	Zabieg eksperymentalny*				
	układ pasożytów w D14	4		8,96	0,062
	Pchły* <i>Plasmodium</i>	1	-0,62 $\pm$ 0,35	3,11	0,078
<i>Trypanosoma</i>	Rok ¹	2		13,17	0,001

Dodatki

	2014	1	-0,38±0,17		
	2015	1	-0,74±0,20		
	Wiek ²	1	0,12±0,14	0,67	0,415
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,21±0,13	2,33	0,127
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		1,03	0,905
	tylko <i>Trypanosoma</i>	1	-0,27±0,40	0,45	0,502
	tylko para <i>T+H</i>	1	0,04±0,23	0,03	0,870
	tylko para <i>T+P</i>	1	-0,16±0,22	0,53	0,465
	tylko para <i>T+L</i>	1	-0,20±0,55	0,13	0,718
	Liczba piskląt w D2	1	-0,13±0,04	10,11	0,001
<i>Leucocytozoon</i>	Rok ¹	2		11,05	0,004
	2014	1	-0,30±0,17		
	2015	1	-0,66±0,19		
	Wiek ²	1	0,12±0,14	0,77	0,379
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,22±0,13	2,78	0,095
	Układ pasożytów w D14 ⁴	3		2,29	0,513
	tylko para <i>L+H</i>	1	-0,25±0,27	0,85	0,357
	tylko para <i>L+P</i>	1	0,39±0,35	1,29	0,256
	tylko para <i>L+T</i>	1	-0,13±0,54	0,05	0,816
	Liczba piskląt w D2	1	-0,12±0,04	10,24	0,001

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: kontrola

⁴poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

Tabela A4.11. Wpływ poszczególnych układów pasożytniczych wykrytych u samic na średnią długość skoku piskląt w dniu 14. z zastosowaniem uogólnionego modelu liniowego. Zabieg eksperymentalny polegał na dodaniu pcheł do gniazd modraszki w grupie eksperymentalnej oraz eliminację pcheł w gniazdach z grupy kontrolnej.

		df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	Rok ¹	2		14,85	0,001
	2014	1	-0,35 $\pm$ 0,10		
	2015	1	-0,39 $\pm$ 0,11		
	Wiek ²	1	0,07 $\pm$ 0,08	0,64	0,424
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,07 $\pm$ 0,08	0,70	0,401
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		3,49	0,480
	tylko <i>Haemoproteus</i>	1	0,09 $\pm$ 0,10	0,82	0,365
	tylko para <i>H+P</i>	1	-0,08 $\pm$ 0,18	0,19	0,666
	tylko para <i>H+T</i>	1	0,22 $\pm$ 0,14	2,51	0,113
	tylko para <i>H+L</i>	1	0,11 $\pm$ 0,16	0,44	0,506
	Liczba piskląt w D2	1	-0,06 $\pm$ 0,02	8,07	0,005
<i>Plasmodium</i>	Rok ¹	2		18,34	<0,001
	2014	1	-0,34 $\pm$ 0,09		
	2015	1	-0,43 $\pm$ 0,10		
	Wiek ²	1	0,08 $\pm$ 0,08	1,05	0,306
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,06 $\pm$ 0,08	0,69	0,405
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		4,62	0,328
	tylko <i>Plasmodium</i>	1	-0,13 $\pm$ 0,10	1,77	0,181
	tylko para <i>P+H</i>	1	-0,18 $\pm$ 0,18	0,99	0,321
	tylko para <i>P+T</i>	1	-0,19 $\pm$ 0,13	2,38	0,123
	tylko para <i>P+L</i>	1	-0,16 $\pm$ 0,20	0,62	0,432
	Liczba piskląt w D2	1	-0,07 $\pm$ 0,02	10,22	0,001

Ciąg dalszy na kolejnej stronie.

Dodatki

<i>Trypanosoma</i>	Rok ¹	2		14,10	0,001
	2014	1	-0,35±0,10		
	2015	1	-0,39±0,12		
	Wiek ²	1	0,05±0,08	0,40	0,528
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,05±0,08	0,43	0,511
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		3,57	0,467
	tylko <i>Trypanosoma</i>	1	-0,01±0,23	0,01	0,972
	tylko para <i>T+H</i>	1	0,17±0,13	1,50	0,221
	tylko para <i>T+P</i>	1	-0,15±0,13	1,30	0,253
	tylko para <i>T+L</i>	1	-0,20±0,32	0,37	0,542
	Liczba piskląt w D2	1	-0,07±0,02	7,81	0,005
<i>Leucocytozoon</i>	Rok ¹	2		14,22	0,001
	2014	1	-0,33±0,10		
	2015	1	-0,39±0,11		
	Wiek ²	1	0,07±0,08	0,74	0,391
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,06±0,08	0,63	0,427
	Układ pasożytów w D14 ⁴	3		0,80	0,849
	tylko para <i>L+H</i>	1	0,06±0,16	0,15	0,702
	tylko para <i>L+P</i>	1	-0,12±0,20	0,32	0,573
	tylko para <i>L+T</i>	1	-0,19±0,32	0,35	0,553
	Liczba piskląt w D2	1	-0,06±0,02	6,95	0,008

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: kontrola

⁴poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

Tabela A4.12. Wpływ poszczególnych układów pasożytniczych wykrytych u samic na sukces wylotu piskląt wyrażony jako liczba piskląt, które wyleciały z gniazda z odniesieniem do liczby piskląt w dniu 2. z zastosowaniem uogólnionego modelu liniowego. Zabieg eksperymentalny polegał na dodaniu pcheł do gniazd modraszki w grupie eksperymentalnej oraz eliminację pcheł w gniazdach z grupy kontrolnej.

		df	współczynnik $\pm$ SE	LR χ^2	P
<i>Haemoproteus</i>	Rok ¹	2		13,31	0,001
	2014	1	-0,09 $\pm$ 0,03		
	2015	1	-0,12 $\pm$ 0,03		
	Wiek ²	1	0,01 $\pm$ 0,03	0,03	0,864
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,01 $\pm$ 0,02	0,04	0,842
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		6,02	0,197
	tylko <i>Haemoproteus</i>	1	0,03 $\pm$ 0,03	0,92	0,337
	tylko para <i>H+P</i>	1	-0,01 $\pm$ 0,06	2,43	0,119
	tylko para <i>H+T</i>	1	-0,02 $\pm$ 0,04	0,26	0,611
	tylko para <i>H+L</i>	1	0,07 $\pm$ 0,05	1,83	0,176
<i>Plasmodium</i>	Rok ¹	2		11,40	0,003
	2014	1	-0,07 $\pm$ 0,03		
	2015	1	-0,11 $\pm$ 0,03		
	Wiek ²	1	0,01 $\pm$ 0,02	0,15	0,698
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,01 $\pm$ 0,02	0,03	0,872
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		4,88	0,300
	tylko <i>Plasmodium</i>	1	-0,04 $\pm$ 0,03	1,51	0,220
	tylko para <i>P+H</i>	1	-0,11 $\pm$ 0,06	3,83	0,050
	tylko para <i>P+T</i>	1	0,01 $\pm$ 0,04	0,02	0,884
	tylko para <i>P+L</i>	1	-0,03 $\pm$ 0,06	0,25	0,617

Ciąg dalszy na kolejnej stronie.

<i>Trypanosoma</i>	Rok ¹	2		9,36	0,009
	2014	1	-0,07±0,03		
	2015	1	-0,11±0,03		
	Wiek ²	1	0,01±0,03	0,11	0,745
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,01±0,02	0,01	0,904
	Układ pasożytów w D14 ⁴	4		1,04	0,903
	tylko <i>Trypanosoma</i>	1	0,05±0,07	0,39	0,533
	tylko para <i>T+H</i>	1	-0,02±0,04	0,29	0,592
	tylko para <i>T+P</i>	1	0,02±0,04	0,28	0,597
	tylko para <i>T+L</i>	1	0,02±0,10	0,04	0,850
<i>Leucocytozoon</i>	Rok ¹	2		11,65	0,003
	2014	1	-0,08±0,03		
	2015	1	-0,12±0,03		
	Wiek ²	1	0,01±0,03	0,08	0,784
	Zabieg eksperymentalny ³	1	-0,01±0,02	0,09	0,759
	Układ pasożytów w D14 ⁴	3		1,86	0,601
	tylko para <i>L+H</i>	1	0,07±0,05	1,71	0,192
	tylko para <i>L+P</i>	1	-0,02±0,06	0,09	0,761
	tylko para <i>L+T</i>	1	0,01±0,10	0,02	0,896

¹poziom referencyjny: 2013

²poziom referencyjny: samice jednoroczne

³poziom referencyjny: kontrola

⁴poziom referencyjny: brak zarażenia lub zarażenie pasożytami reprezentującymi jeden takson

Apendyks 5.

Tabela A5.1. Prewalencja pasożytów krwi u podlotów bogatki w latach 2015–2016 z podziałem na płeć.

Rodzaj pasożyta	Prewalencja (%)	
	Samice	Samce
<i>Haemoproteus</i>	24,1	42,8
<i>Plasmodium</i>	29,6	11,4
<i>Leucocytozoon</i>	12,7	0
<i>Trypanosoma</i>	21,8	11,4