

INSTITUTE OF ECOLOGY OF NATURE RESEARCH CENTRE
VILNIUS UNIVERSITY

Petras Prakas

**DIVERSITY AND ECOLOGY OF *SARCOCYSTIS* IN LITHUANIAN GAME
FAUNA**

Summary of doctoral dissertation
Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Science (03 B)

Vilnius, 2011

The dissertation was prepared during the years 2007–2011 at the Institute of Ecology of Nature Research Centre.

Scientific Supervisor:

Dr. Dalius Butkauskas (Institute of Ecology, Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Science – 03 B)

Consultant Supervisor:

Prof. Dr Habil. Aniolas Sruoga (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

The defense of the doctoral dissertation is held at the Vilnius University Ecology and Environmental Research Council:

Chairman:

Dr Habil. Gediminas Valkiūnas (Institute of Ecology, Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Science – 03 B)

Members:

Dr Habil. Mečislovas Žalakevičius (Institute of Ecology, Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Science – 03 B)

Prof. Dr Habil. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Prof. Dr Habil. Jonas Rimantas Stonis (Vilnius Pedagogical University, Biomedical Sciences, Biology – 01B)

Prof. Dr Habil. Algimantas Paulauskas (Vytautas Magnus University, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Science – 03 B)

Opponents:

Prof. Dr Habil. Saulius Petkevičius (Lithuanian University of Health Science, Academy of Veterinary, Biomedical Sciences, Veterinary Medicine – 12B)

Dr. Vaidas Palinauskas (Institute of Ecology, Nature Research Centre, Biomedical Sciences, Ecology and Environmental Science – 03 B)

Defence of the dissertation will be held at the public meeting of the Ecology and Environmental Research Council on 21 December 2011 at 2 p. m. in the Meeting Room of the Institute of Ecology of Nature Research Centre.

Address: Akademijos 2, LT-08412, Vilnius, Lithuania

Tel. +370 5 2729257, fax +370 5 2729352

The summary of the dissertation is distributed on _____ of November 2011.

The dissertation is available at the libraries of Institute of Ecology of Nature Research Centre and Vilnius University.

**GAMTOS TYRIMŲ CENTRO EKOLOGIJOS INSTITUTAS
VILNIAUS UNIVERSITETAS**

Petras Prakas

**LIETUVOS MEDŽIOJAMOSIOS FAUNOS SARKOSPORIDIJŲ
(*SARCOCYSTIS*) ĮVAIROVĖ IR EKOLOGIJA**

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra (03 B)

Vilnius, 2011

Disertacija rengta 2007 – 2011 metais Gamtos tyrimų centro Ekologijos institute.

Mokslinis vadovas:

Dr. Dalius Butkauskas (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Konsultantas:

Prof. habil. dr. Aniolas Sruoga (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

Disertacija ginama Vilniau universiteto Ekologijos ir aplinkotyros krypties taryboje:

Pirmininkas:

Habil. dr. Gediminas Valkiūnas (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Nariai:

Habil.dr. Mečislovas Žalakevičius (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B)

Prof. habil. dr. Jonas Rimantas Stonis (Vilniaus pedagoginis universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05B)

Prof. habil. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra – 03B)

Oponentai:

Prof. habil. dr. Saulius Petkevičius (Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12B)

Dr. Vaidas Palinauskas (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, ekologija ir aplinkotyra 03B)

Disertacija bus ginama viešame Ekologijos ir aplinkotyros mokslo krypties tarybos posėdyje 2011 m. gruodžio 21 d. 14 val. Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto salėje.

Adresas: Akademijos 2, LT-08412, Vilnius, Lietuva

Tel. +370 5 2729257, fax. + 370 5 2729352

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2011 m. lapkričio mėn. d.

Disertaciją galima peržiūrėti Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto ir Vilniaus universiteto bibliotekose.

INTRODUCTION

Relevance of the study. Representatives of the genus *Sarcocystis* (Lankester, 1882) are cyst-forming coccidian protozoa parasites widespread in mammals, birds and reptiles. At the present time this genus is estimated to contain over 200 species. Some *Sarcocystis* species are pathogenic organisms dangerous to humans and domestic animals (Dubey et al., 1989). *Sarcocystis* parasites are characterized by an obligatory heteroxenous prey-predator two-host life cycle. The intermediate host becomes infected through the ingestion of sporocysts/oocysts found in the faeces of the definitive host and after merogony sarcocysts in muscle tissues finally are formed. Sexual multiplication occurs in the small intestine of the definitive host (Mehlhorn, Heydorn, 1978). *Sarcocystis* species found in economically important domestic animals are comprehensively investigated. On the contrary, *Sarcocystis* infection prevalence, the species composition, pathogenicity in different wild fauna species are studied less. Investigations of the wild animal *Sarcocystis* are relevant when assessing the prevalence, pathogenesis of *Sarcocystis*, its host specificity, inter and intra-specific genetic diversity, when deepening knowledge of infection mechanisms, life cycle models, host-parasite evolutionary relationships. Nowadays, the identification of the *Sarcocystis* species is complicated and is usually based on morphological and DNA investigations. Different DNA markers, mainly 18S rRNA gene, 28S rRNA gene and ITS-1 region are successfully used to separate morphologically similar *Sarcocystis* species, to determine host specificity, in phylogenetic and other research (Dahlgren, Gjerde 2010a; Olias et al., 2010b).

This work deals with the *Sarcocystis* species parasitizing in Lithuanian game fauna. Investigations into *Sarcocystis* in game animals are relevant, because of potential threat to humans. Up till now ecology and diversity of the *Sarcocystis* species in game fauna in Lithuania have been investigated using only traditional morphological methods (Griekienienė et al., 2001; Malakauskas, Griekienienė 2002; Kutkienė, 2001; 2002; 2003; Kutkienė, Sruoga, 2004). The *Sarcocystis* species were identified in game mammals and *Sarcocystis* spp. morphological cysts types were determined in game birds by light microscopy analysis. In this study of the game fauna *Sarcocystis* diversity, *Sarcocystis* infection prevalence, intensity, the species composition, specificity to the intermediate host and phylogeny are examined. Traditional morphological and DNA analysis methods are used for the *Sarcocystis* species identification. The data obtained by means of different methods are related to each other in providing answers to ecological and phylogenetic issues.

Objective and tasks of the study. The objective of this study was to evaluate distribution, morphological and genetic diversity of *Sarcocystis* obtained in the Lithuanian game fauna species. The following tasks were set to achieve this objective:

1. To compare *Sarcocystis* infection prevalence and intensity in different wild mammal and bird species using a stained muscle section analysis in a glass compressor under light microscopy;
2. To divide sarcocysts found in birds into morphological cyst types according to morphometric characteristics of sarcocysts and to attribute sarcocysts obtained from mammals to a certain species of *Sarcocystis*;

3. To identify *Sarcocystis* species parasitizing in game fauna using sarcocyst wall ultrastructure and DNA analysis;
4. To establish the phylogenetic position of the *Sarcocystis* species in the family Sarcocystidae using sequences of 18S rRNA gene, 28S rRNA gene and ITS–1 region analysis;
5. To evaluate the level of the host specificity to the intermediate host of the *Sarcocystis* species parasitizing in cervids and the investigated bird species.

Statements to be defended:

1. Combined morphological and DNA analysis investigations are necessary to identify the *Sarcocystis* species found in the game fauna.
2. To separate closely related *Sarcocystis* species from birds, sequence analysis of the ITS–1 region is necessary.
3. Four new *Sarcocystis* species from birds were named and described.
4. Not all the *Sarcocystis* species parasitizing in Lithuanian game animals are highly specific to the intermediate host.

Scientific novelty of the study. Investigations into *Sarcocystis* infection prevalence, intensity, the *Sarcocystis* species composition in a certain intermediate host in Lithuania were based only on morphological methods. In this study, when identifying the *Sarcocystis* species in game mammals and birds, electron microscopy and the DNA analysis were used alongside light microscopy. Different molecular markers, i.e. 18S rRNA gene, 28S rRNA gene and ITS–1 region, were used in assessing the phylogenetic relationships of the *Sarcocystis* species under investigation. It was for the first time that sarcocysts were found in the barnacle goose, in the greylag goose, in the rook, in the hooded crow, the jay, in the wood pigeon, and the herring gull in Lithuania. When carrying out the investigation the following four *Sarcocystis* species that have not been identified in Lithuania before were detected: *S. columbae* from the wood pigeon, *S. oviformis* from the roe deer, *S. hjorti*, whose intermediate hosts are the red deer and the moose and *S. silva*, whose intermediate hosts are the roe deer and the moose. On the basis of the DNA sequences analysis it was elucidated that two different species of *Sarcocystis* sp. exists in the roe deer and the red deer, which earlier were identified as a single *S. hofmanni*-like species. That was the first time that the *Sarcocystis* sp. (cyst type I) from the jackdaw has been genetically characterized. This study is the first well-documented case of *S. rileyi* infection in Europe. On the basis of the cyst wall ultrastructure and the results of DNA investigations four new *Sarcocystis* species were described: *S. albifronsi* from the white-fronted goose, *S. wobeseri* from the barnacle goose, *S. anasi* from the mallard and *S. cornixi* from the hooded crow.

Scientific and practical significance. The results obtained during the study of *Sarcocystis* infection prevalence and intensity in Lithuanian game fauna are important to further parasitological and veterinary research. Macrocysts detected in mallards in Lithuania were identified as *S. rileyi*, and these data change understanding of the prevalence of this species, because so far *S. rileyi* infection has been confirmed only in North America. The assessment of the phylogenetic relationships of the species investigated using 18S rRNA gene, 28S rRNA gene and ITS–1 region sequences are of significance to identifying possible definitive hosts. DNA investigation results showed

that *S. wobeseri*, *S. silva*, *S. hofmanni*-like and *S. hjorti* are not highly host specific to the intermediate host. This, in its turn, provides valuable information in assessing the host specificity of the genus *Sarcocystis*. In this study four new *Sarcocystis* species from birds that are new to science were described. Likewise, several *Sarcocystis* species have been detected in Lithuania for the first time. Therefore, these results are relevant to developing *Sarcocystis* research and extending knowledge of biodiversity.

Presentation and approbation of results. The results of this study have been published in 8 articles and 6 abstracts of scientific conference reports. 5 oral and 3 poster presentations have also been made on the subject of the dissertation at conferences.

Structure of the dissertation. The dissertation consists of the following chapters: Abbreviations, Introduction, Literature review, Material and methods, Results and Discussion (consisting of 7 subchapters), Conclusions, References and the List of the author's publications. All the material is presented on 152 pages. The list of references includes 216 sources. The dissertation is written in the Lithuanian language with its summary both in English and Lithuanian.

Acknowledgements. I would like to express my gratitude to the scientific advisor of this study Dr (Hb.) Dalius Butkauskas for his valuable guidance and constructive advice, his encouragement and full support, his profound understanding, optimism and determination to make me pursue the goal; the consultant Prof. Dr Habil. Aniolas Sruoga for his assistance in planning and organizing collection of materials and research work, for his professional and practical advice. My greatest gratitude is to Dr Liuda Kutkienė for her help in carrying out morphological investigations, for her warm friendship, for sharing her practical and theoretical knowledge. My thanks go to Dr Jitender P. Dubey from the Animal and Natural Resources Institute, USA and Dr Jan Votýpka from Charles University, the Czech Republic for their valuable advice on the assessment results. A special thank-you to Irena Žalakevičienė for her assistance in carrying out investigations into electron microscopy. I must thank Valentinas Pabrinkis from the Nature Research Centre, the game processing plant Viltlit manager Jonas Vyšniauskas, the State Food and Veterinary Service, the Head of the Molecular Biology and Genetically Modified Organisms Research Unit Dr Vaclovas Jurgelevičius for their help in collecting samples. I am thankful to the staff of Laboratory of Molecular Ecology, Institute of Ecology, Nature Research Centre for fellowship and support.

I am also deeply grateful to the Lithuanian State Science and Studies Foundation for providing financial support for a part of my research.

LITERATURE REVIEW

This chapter deals with main biological features of the genus *Sarcocystis* and parasitism in different groups of organisms. *Sarcocystis* infection prevalence and intensity, *Sarcocystis* species identification, parasites host specificity, phylogenetic surveys are discussed. Undivided attention is given to considering *Sarcocystis* investigations in game mammals and birds in Lithuania and the world. The chapter "Literature Review" consists of ten parts.

MATERIAL AND METHODS

Material. A total of 384 birds and 177 mammals were analysed in this research of game fauna *Sarcocystis* (Table 1). Between 2005 and 2011, muscle samples of wild mammals were received from the game processing plant “Viltlit”, samples of birds were collected from the State Food and Veterinary Service, participating in expeditions, cooperating with hunters. When looking for the cysts of *Sarcocystis*, the diaphragm muscle tissues of the roe deer, the wild boar, the red deer and the moose, likewise neck, leg and breast muscles of birds were investigated.

Methods. Prevalence and intensity of *Sarcocystis* infection in the animals analysed were evaluated using a light microscopy analysis. 28 oath-size pieces of muscles were cut off, stained with water (1:500) methylene blue solution, lightened with 1.5% water acetic acid solution, pressed into a glass compressor and examined by the light microscope Nikon ECLIPSE 80i. Intensity of sarcosyst infection was differentiated into three categories: low infection – 1-10 cysts; moderate infection – 11-40 cysts; intense infection – 41 and more cysts. The type of sarcocysts and species of *Sarcocystis* were preliminary identified according to the thickness of cysts, the shape and length of protrusions and the morphometric parameters of cystozoites. Morphometric investigations into sarcocysts and cystozoites were carried out using the flexible microscopy imaging tool INFINITY3 in fresh preparations.

For a transmission electron microscopy analysis, in each case a single mature sarcocyst isolated from the muscles was fixed in Karnovsky’s fixative, postfixed in 1% osmium tetroxide and dehydrated and embedded in Epon. Ultrathin sections were stained with 2% uranyl acetate, lead citrate and examined under JEOL JEM-100B transmission electron microscope.

Having established the morphological features of sarcocysts, several cysts of the same sample were placed in 1.5 Eppendorf tubes containing 75% ethanol and were prepared for further DNA manipulations. Genomic DNA was extracted from sarcocysts using the Macherey-Nagel NucleoSpin[®] tissue kit or using the Aljanabi and Martinez (1997) method. 7 primer pairs for ITS–1 region, 18S rRNA gene and variable fragment of 28S rRNA gene were designed using Primer3 program (Rozen, Skaletsky, 2000). Polymerase chain reactions (PCRs) were performed in the final 25- μ l volume consisting of 1 \times PCR buffer (50 mM KCl), 0.2 mM dNTP, 0.2 μ M each primer, 1 u Taq polymerase, 2.5 mM MgCl₂, 0.04 μ g template DNA and the remaining quantity of H₂O. PCRs were carried out with initial denaturing at 94°C for 5 min, 5 cycles at 94°C for 45 s, at 64°C for 60 s, at 72°C for 70 s, followed by 30 cycles at 94°C for 45 s, at 58°C for 60 s, at 72°C for 70 s and ended with the final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were visualized using 1.7% agarose gel electrophoresis and purified with the help of array of exonucleases. The PCR products were sequenced directly with the ABI Prism 377 automatic DNA sequencer (Sequencing Centre, Institute of Biotechnology, Vilnius) using the same primers as for PCR reactions.

The indicators of *Sarcocystis* infection prevalence and intensity in the investigated game animals were assessed using Quantitative Parasitology 3.0 program (Rozsa et al., 2000). Aggregation of parasites, i.e. an uneven distribution of parasites among the hosts, was assessed using discrepancy index D, which quantifies the difference between the

observed and hypothetical distribution (Poulin, 1993). Differences in variables are considered to be statistically significant when $p < 0.05$.

The sequences identity values were determined on the EMBOSS (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>) using the default options. Sequences were aligned using the MUSCLE algorithm implemented in MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011). The phylogenetic analysis was performed using the Bayesian method and MrBayes 3. 1. 2 program (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). *Besnoitia besnoiti* was set as outgroup of 18S rRNA gene and 28S rRNA gene phylogenetic analysis and *S. tarandi* was set as outgroup of ITS–1 region phylogenetic analysis. Phylogenetic trees were drawn by TreeView 1.6.6 (Page, 1996).

RESULTS AND DISCUSSION

Prevalence and intensity of *Sarcocystis* infection in analysed animals. Sarcocysts were found in 18 out of 26 animal species investigated (Table 1). Statistically significant higher *Sarcocystis* infection prevalence and intensity rates ($p < 0.05$) were determined in mammals as compared to the birds. The prevalence of infection in birds was 27.6% (106 infected of 384 investigated); the mean and media of infection intensity were 11.1 and 4.0, respectively. Meantime in mammals prevalence of infection reached 89.8% (159 infected out of 177 investigated ones); the mean and media of infection intensity were 62.0 and 23.0, respectively.

Table 1. Sarcocysts detection rate in the examined animal species.

1 lentelė. Sarkocistų aptinkamumas tirtose gyvūnų rūšyse.

Species	Number of animals infected/ investigated	Species	Number of animals infected/ investigated
White-fronted goose	41/95	Common golden eye	2/5
Greylag goose	5/11	Herring gull	4/11
Bean goose	0/1	Hooded crow	14/39
Barnacle goose	1/3	Rook	1/20
Mallard	26/130	Jackdaw	2/8
Garganey	0/9	Common raven	0/2
Common teal	1/11	Magpie	0/4
Wigeon	4/7	Jaw	1/1
Pintail	0/1	Wood pigeon	2/18
Shoveler	0/3	Wild boar	45/51
Gadwall	0/1	Roe deer	80/82
Tufted duck	2/3	Red deer	29/36
Ferruginous duck	0/1	Moose	5/8

Six species with the largest number of sample of the individuals studied were chosen for a detailed *Sarcocystis* infection prevalence and intensity comparison between the game fauna species (Table 2). Infection intensity in the game birds varied from 20.0% (in the mallard) to 43.2% (in hooded crow). The highest 97.6% infection intensity among the analysed game mammals was observed in the roe deer. Statistically significant ($p < 0.05$) differences of infection intensity were established between bird and mammal species, also between the mallard and the hooded crow, the mallard and the white-fronted goose, the roe deer and the wild boar, the roe deer and the red deer sample pairs. The highest infection intensity values were found in the roe deer. Statistically significant ($p < 0.05$) differences of infection intensity were established between the roe

deer and the wild boar, the roe deer and the red deer pairs. Values of index D showing aggregation of parasites were higher in birds as compared with those in mammal species. The highest values of coefficient D were established in the white-fronted goose, the mallard and the hooded crow, where many individuals had a relatively small number of sarcocysts and only in some specimens a relatively large number of sarcocysts was found. The lowest index D values were calculated for the roe deer and the wild boar, which testifies to the fact that in all animal species analysed, the sarcocysts are distributed most evenly in these species.

Table 2. Prevalence and intensity parameters of *Sarcocystis* infection in six animal species.

2 lentelė. *Sarcocystis* rūšių ekstensyvumo ir intensyvumo parametrai šešiose gyvūnų rūšyse.

Species	n	Prevalence of infection, %	Mean of infection intensity	Media of infection intensity	D index
White-fronted goose	95	35.9%	13.44	5.00	0.86
Mallard	130	20.0%	5.36	2.00	0.92
Hooded crow	39	43.2%	14.21	7.50	0.80
Wild boar	51	88.2%	7.71	5.00	0.49
Roe deer	82	97.6%	112.56	100.50	0.45
Red deer	36	80.6%	14.79	4.00	0.70

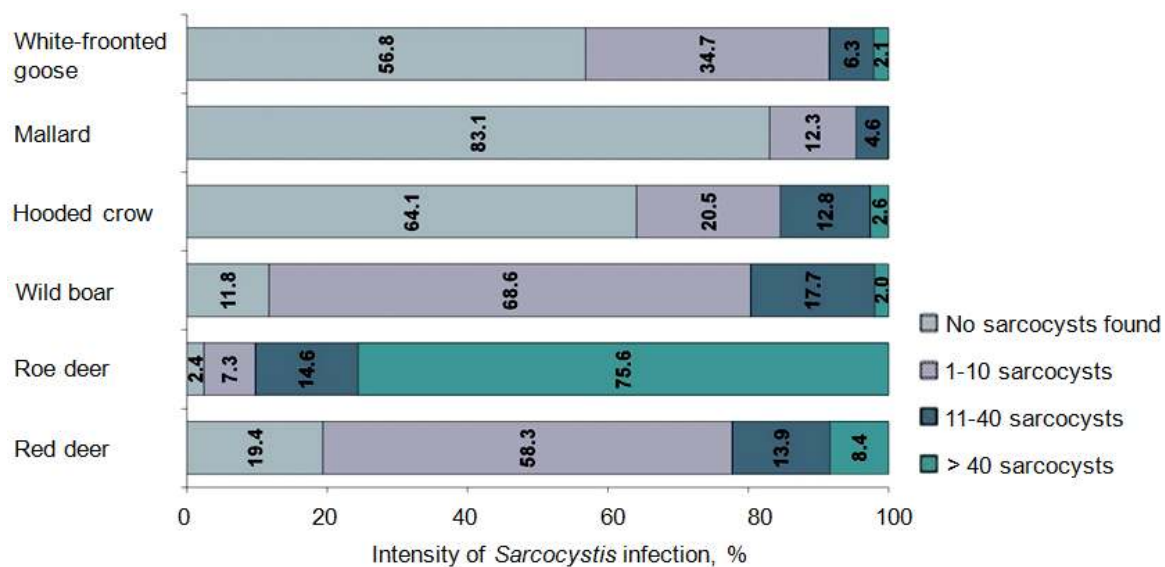


Fig. 1. Intensity of *Sarcocystis* infection in six animal species. Low infection – 1-10 cysts; moderate infection – 11-40 cysts; intense infection – 41 and more cysts.

1 pav. *Sarcocystis* parazitų infekcijos intensyvumas šešiose gyvūnų rūšyse. 1-10 cistų – silpna infekcija; 11-40 cistų – vidutinė infekcija; daugiau kaip 40 cistų – intensyvi infekcija.

Having grouped *Sarcocystis* infection intensity into three categories, cases of intense infection (more than 40 cysts in 28 oath-size sections) were detected in five out of six analysed animal species (Fig. 1). Intense infection ($p < 0.05$) prevailed in the roe deer, while in other species cases of intense infection were rare or single. Meanwhile the highest values of moderate infection (11-40 cysts in 28 oath-size sections) in mammals

were determined in the wild boar (17.7%) and in birds in hooded crow (12.8%) respectively, however differences were insignificant.

Morphological results of sarcocysts found in bird species. Having studied 22 bird species, *Sarcocystis* macrocysts were detected only in four male mallards. Cysts were yellowish white, in the size of 1.5–2.0×4.2–7.0 mm and resembled a grain of rice (Fig. 2A). By light microscopy, the cyst wall structure seemed to be complicated and reached up to 5.6 μm. Cystozoites were straight and 15.3–16.8 μm in length. Ultrastructurally, the shape of the cyst wall protrusions resembled a cauliflower and according to the Dubey and Odening (2001) classification system, sarcocyst had a type-23 tissue cyst wall (Fig. 2B). This type of cyst wall was established only for *S. rileyi* parasitizing in the shoveler and the mallard (Dubey et al., 2003; 2010). Therefore, according to the morphological features, the examined macrocysts from the mallard belong to the *S. rileyi* species.

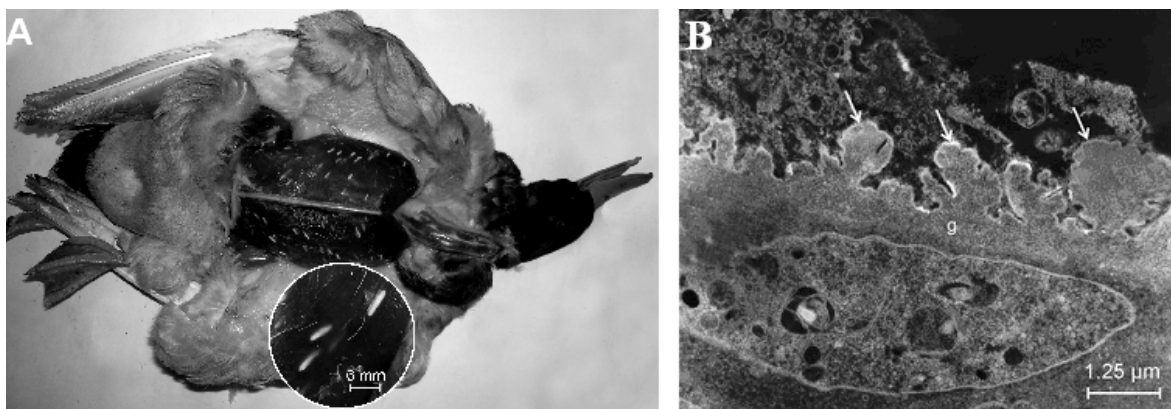


Fig. 2. Morphology of *Sarcocystis rileyi* from the mallard: **A** is macrocyst in the breast muscles of the mallard; **B** is electron micrographs of the cyst wall, arrows pointed at the protrusions that differ in size and shape, **g** is ground substance.

2 pav. *Sarcocystis rileyi* rastos didžiojoje antyje morfologija: **A** – makroskopinės cistos didžiosios anties krūtinės raumenyse; **B** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotrauka, rodyklėmis pažymėtos skirtingos formos ir dydžio išaugos, **g** – grūdėtasis sluoksniš.

When analysing by light microscopy, microcysts found in the muscles of birds were classified into four types (I, II, III and IV) according to the thickness of cysts, the shape and length of protrusions and morphometric characteristics of cystozoites. Type I sarcocysts had a thin (~ 1.0 μm) smooth or slightly wavy cyst wall without clearly visible protrusions; cystozoites were lancet- or banana-shaped and small (6.3–8.1 μm in length). Type II distinguished itself by palisade-like protrusions (cyst wall up to 1.5 μm) and 13.0–16.1 μm length cystozoites, which were slightly bent, broader at one end. Type III cysts had a relatively thick (up to 2.4 μm) wall with teat- or finger-like protrusions; cystozoites were straight (10.0–13.5 μm long) and resembled a shuttle. Type V was characterized by striated, up to 2.5 μm long cyst wall and small (6.1–7.9 μm long) cystozoites (Fig. 3). Sarcocysts of type I were found in all infected bird species – white-fronted goose, greylag goose, barnacle goose, mallard, common teal, wigeon, tufted duck, common goldeneye, herring gull, hooded crow, rook, jackdaw, jaw and wood

pigeon. Cysts of II type were identified in the mallard and the common goldeneye; cysts of type III were found in the white-fronted goose, the greylag goose and the wigeon; cysts of type V were determined exclusively in the hooded crow. Cases of mixed infection were recorded when more than one morphological type of sarcocysts were found in the same specimen of a bird.

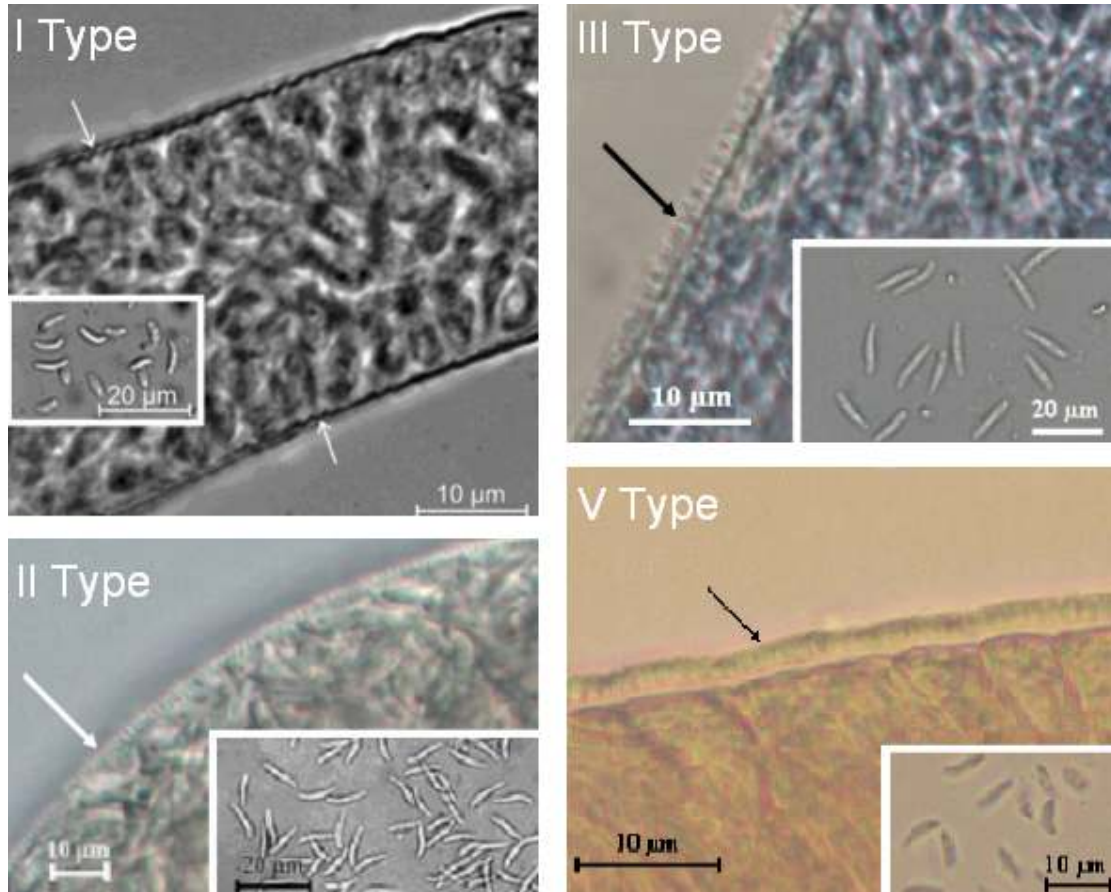


Fig. 3. Four types of microcysts (I, II, III and V) distinguished using the light microscopy analysis. Arrows pointed at the sarcocyst wall, cistozoites are represented in rectangles.

3 pav. Keturi paukščių mikrocistų morfologiniai tipai (I, II, III, V) išskirti tiriant šviesiniu mikroskopu. Rodyklėmis pažymėtos sarkocistų sienelės, stačiakampiuose pavaizduoti cistozoitai.

The microcyst wall structure of seven *Sarcocystis* spp. from birds: *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Branta leucopsis*, *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Columba palumbus*, *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Larus argentatus*, *Sarcocystis* sp. (cyst type II) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp. (cyst type III) ex *Anser albifrons* and *Sarcocystis* sp. (cyst type V) ex *Corvus cornix* were investigated using the electron microscopy analysis. According to the Dubey and Odening (2001) classification, the most primitive sarcocyst wall type-1 was determined for *Sarcocystis* species extracted from four different species of birds, i.e. from the barnacle goose, the mallard, the wood pigeon and the herring gull. When analysed by light and electron microscopy, *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Branta leucopsis*, *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Columba palumbus*, *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Larus argentatus* showed no

significant morphological differences. *Sarcocystis* sp. (cyst type III) ex *Anser albifrons* had cyst wall type-9; sarcocyst wall of *Sarcocystis* sp. (cyst type II) ex *Anas platyrhynchos* resembled a type-9 cyst wall, however, it differed from the latter in shape and a shorter length of protrusions; cyst wall of *Sarcocystis* sp (cyst type V) ex *Corvus cornix* ultrastructurally differed from all those described thus far.

Morphological results of sarcocysts found in mammal species. Based on morphological characteristics, four morphological types of sarcocysts were established in roe deer, three of them were identified as belonging to *S. capreolicanis*, *S. gracilis* and *S. hofmanni*-like. These three *Sarcocystis* species have previously been found in Lithuania and their morphology by light microscopy has been described in detail (Kutkienė, 2001). Furthermore, sarcocysts of a new morphological type have been detected in Lithuania for the first time. These cysts were ovoid, reached up to 0.9×0.4 mm in size, were enclosed by a fibrous layer (about 6 mm thick), which could not be removed from the surface of the cyst and the cyst wall seemed to be smooth. Sarcocysts of this type were morphologically identical to sarcocysts of *S. hardangeri*, *S. ovalis* and *S. oviformis*. One type of sarcocysts was found in the wild boar and they belonged to *S. miescheriana*. According to the morphological features, three types of cysts were distinguished in red deer and were attributed to *S. hofmanni*-like, *S. capreolicanis*-like and *S. grueneri*-like ones. Besides, according to the morphological characteristics, *S. capreolicanis*-like and *S. hofmanni*-like from the red deer were identical to *S. capreolicanis* and *S. hofmanni*-like parasitizing in the roe deer. The same types of sarcocysts were found previously in the red deer in Lithuania (Kutkienė, 2003). Cases of mixed infection were observed in the roe deer and the red deer.

One type of sarcocysts was found in the moose, they were ribbon shaped, up to 1.5×0.1 mm in size, had up to 12 µm long hair-like protrusions (Fig. 4A). Cystozoites were large (12.8–14.1×3.8–4.5 µm, n=25), banana-shaped (Fig. 4B). Sarcocysts that had this morphology has not been found in the moose in Lithuania earlier. By electron microscopy, the surface of the cyst had 10-12 µm long hair-like bent protrusions, which were flattened at their bases and distances between bases were almost the same (Fig. 4C). Protrusions were characterized by an irregular shape and varying size (Fig. 4D). The parasitophorous vacuolar membrane had many small invaginations. Numerous fibrillar elements and microgranules (Fig. 4E) were visible in the protrusions. According to Dubey and Odening classification, sarcocyst had a type 6-7 cyst wall.

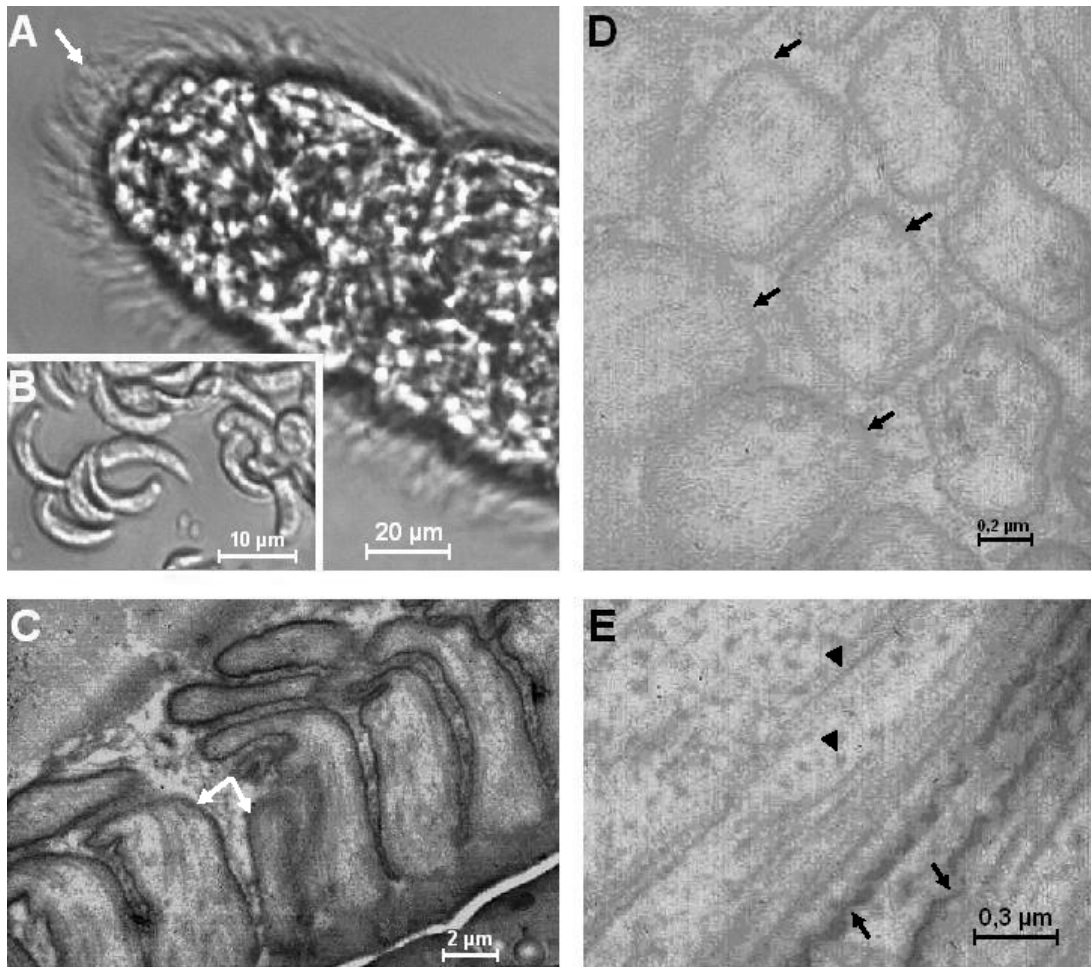


Fig. 4. Morphology of *Sarcocystis* sp. from the moose: A, B is light micrographs, fresh preparations; A is fragment of the cyst; the arrow points at hair-like protrusions; B is cystozoites; C-E is electron micrographs of the cyst wall; C is a section of the fragment of the cyst wall, the arrows show protrusions; D is a diagonal section of the fragment of the cyst wall, the arrows pointed at protrusions; E is an increased magnification of the fragment of the cyst wall, arrows show minute invaginations of the parasitophorous vacuolar membrane, arrowheads pointed at fibrillar elements and microgranules.

4 pav. *Sarcocystis* sp. rastos briedyje morfologija: **A, B** – natyviųjų preparatų šviesinės mikroskopijos nuotraukos; **A** – cistos fragmentas, rodyklė parodo plauko formos sienelės išaugas; **B** – cistozoitai; **C-E** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotraukos; **C** – cistos sienelės fragmento pjūvis, rodyklėmis pažymėtos išaugos; **D** – įstrižas cistos sienelės fragmento pjūvis, rodyklėmis parodytos išaugos; **E** – padidintas cistos sienelės fragmentas, rodyklėmis pažymėti parazitoforinės vakuolės membranos įlinkimai, strėlytės parodo fibrilinius elementus ir mikrogranules.

Results of genetic investigations into the game fauna *Sarcocystis*. *Sarcocystis* species isolated from birds were genetically characterized using the 18S rRNA gene sequences, 28S rRNA gene partial sequences and ITS-1 region analysis, while *Sarcocystis* from mammals were analysed using 18S rRNA gene. It was genetically confirmed that sarcocysts extracted from the wild boar belonged to *S. miescheriana*. The sequence of 18S rRNA gene of *Sarcocystis* sp. from the moose had 100% identity to the sequences of *S. hjorti* from the red deer (GQ250990) and from the moose (EU282017). *Sarcocystis* sp. from roe deer distinguished by ovoid cysts, based on the sequences of 18S rRNA gene was identified as *S. oviformis*. Sequences of 18S rRNA gene of *S.*

capreolicanis have been determined for the first time. *S. gracilis* sequences obtained from all six isolates were identical to each other and to *S. gracilis* (FJ196261) from Norway. Six different sequences were obtained from ten isolates of *S. hofmanni*-like extracted from roe deer and a later comparison of sequences showed interspecific genetic differences. Therefore, three isolates were assigned to *S. hofmanni*-like1 and the other seven were assigned to *S. hofmanni*-like2 without giving them specific species names, because the cyst wall ultrastructure analyses were not performed. Differences of sequences identity between *S. hofmanni*-like1 and *S. hofmanni*-like2 varied from 3.8 to 4.0%. Genetic investigations showed that morphologically identified *S. hofmanni*-like and *S. capreolicanis*-like in the red deer belonged to *S. hofmanni*-like2 and *S. hjorti*, respectively. Furthermore, comparing sequences of 18S rRNA gene *S. grueneri*-like from the red deer, differences in the sequences identity exceeded 3.5%. Therefore, *S. grueneri*-like could not be attributed to any *Sarcocystis* species. Hence, *S. grueneri*-like was temporarily named *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus*, without giving it a specific name of the species, because there was a lack of cyst wall ultrastructure examinations. In conclusion, based on the 18S rRNA gene sequences analysis, eight *Sarcocystis* species from game mammals were identified, i.e. *S. miescheriana* in the wild boar, *S. hjorti* in the moose, *S. capreolicanis*, *S. gracilis*, *S. hofmanni*-like1, *S. hofmanni*-like2, *S. oviformis* in the roe deer, *S. hjorti*, *S. hofmanni*-like2, *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* in the red deer. *S. hjorti* and *S. oviformis* were detected for the first time in Lithuania.

The intraspecific genetic diversity of *Sarcocystis* from wild mammals was insignificant when analysing 18S rRNA gene sequences, and the percentage sequence differences were less than 0.4%. Different sequences of the investigated isolates were established analysing *S. hofmanni*-like2 and *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus*. Meanwhile, the sequences identity values of the examined *Sarcocystis* species from mammals ranged from 87.3% (*S. oviformis* as compared with *S. capreolicanis*) to 96.9% (*S. hjorti* as compared with *S. capreolicanis*). According to 18S rRNA gene sequences, *S. miescheriana* was the most closely related to *S. suihominis* from the pig, *S. hirsuta* and *S. buffalonis* from the cattle. The investigated *Sarcocystis* species from the roe deer, the red deer and the moose had the highest sequences identity values to other *Sarcocystis* species from cervids. Intraspecific genetic differences (< 0.4%) of the analysed *Sarcocystis* species from mammals were less significant than the lowest interspecific genetic differences (1%).

The highest sequence similarity was detected between the *Sarcocystis* species from birds. Differences of sequences identity of 18S rRNA gene of the analysed *Sarcocystis* species parasitizing in birds were less than 1%. Comparing with 18S rRNA gene, the sequences identity values within 28S rRNA gene of the analysed species were smaller (95.2–99.7%), however, interspecific genetic differences in most cases were not significant. The highest variability was observed when comparing sequences of ITS–1 region. The lowest detected interspecific sequences identity difference of the examined *Sarcocystis* species from birds was as much as 6.4%, while the intraspecific genetic difference was significantly lower, less than 0.4%. Therefore, ITS–1 region was used in separating closely related *Sarcocystis* species parasitizing in birds.

Comparing ITS–1 region sequences, *S. rileyi* morphologically identified in the mallard differed genetically only by one nucleotide from *S. rileyi* isolated from the mallard in the USA. This is the first genetically proved case of *S. rileyi* infection in Europe. On the basis of the results of the DNA analysis, the first *Sarcocystis* species, i.e.

S. columbae, was identified in the wood pigeon in Lithuania. All other *Sarcocystis* species isolated from birds have been genetically characterized for the first time. *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Corvus monedula*, *Sarcocystis* sp. (cyst type II) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp. (cyst type III) ex *Anser albifrons*, *Sarcocystis* sp. (cyst type V) ex *Corvus cornix* were assessed as four different species. Sequences identity values within ITS–1 region of *Sarcocystis* isolates that distinguished themselves by cyst wall type-1 from the barnacle goose, the mallard and the herring gull ranged from 99.8 to 100%. Thus, the DNA investigation results show that these *Sarcocystis* isolated from three different intermediate host species belong to the same species.

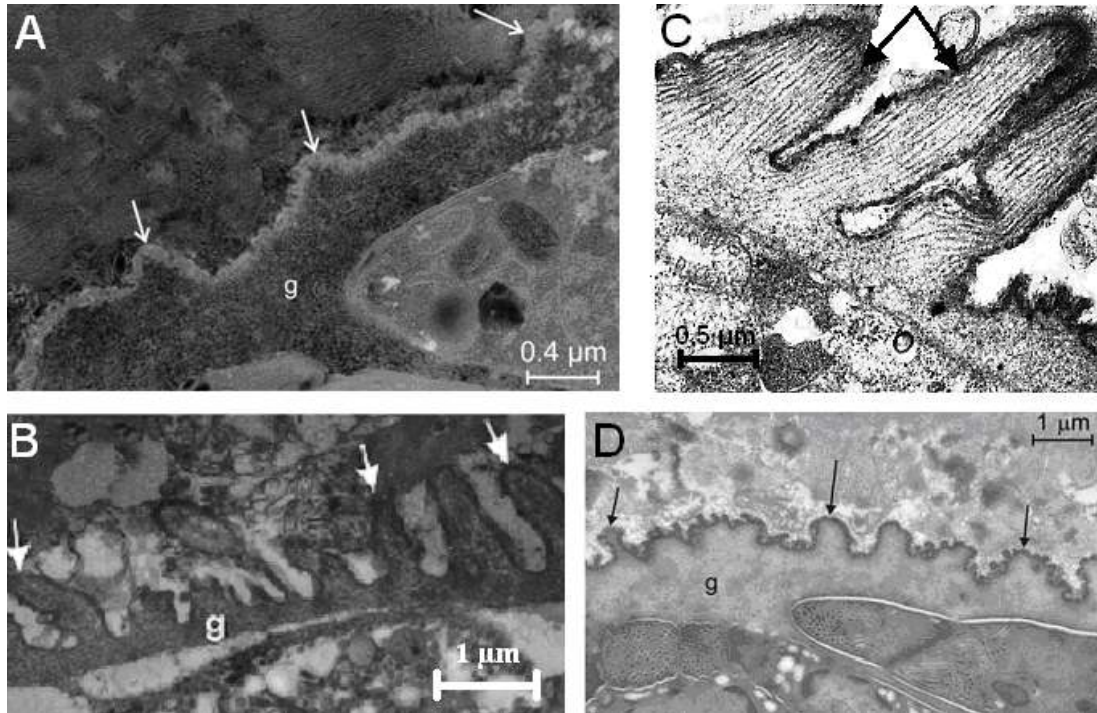


Fig. 5. Morphology of newly described *Sarcocystis* species: **A-D** is electron micrographs of the cyst walls; **A** is *S. wobeseri*, the arrows pointed at a slightly wavy cyst wall; **B** is *S. anasi*, the arrows show protrusions on the surface of the cyst wall that differ in size and shape; **C** is *S. albifrons*, the arrows pointed at finger-like protrusions; **D** is *S. cornix*, arrows show the cyst wall with stump-like protrusions; **g** is ground substance.

5 pav. Naujai aprašytų *Sarcocystis* rūšių morfologija: **A-D** – cistos sienelės elektroninės mikroskopijos nuotraukos; **A** – *S. wobeseri*, sienelės pabangavimai parodyti rodyklėmis; **B** – *S. anasi*, rodyklėmis pažymėtos išaugos, viena nuo kitos besiskiriančios forma ir dydžiu; **C** – *S. albifrons*, rodyklės parodo piršto formos išaugas; **D** – *S. cornix*, rodyklės pažymi kelmo formos išaugas; **g** – grūdėtasis sluoksnis.

Description of new *Sarcocystis* species. According to the results of the cyst wall ultrastructure and the DNA analysis, using 18S rRNA gene, 28S rRNA gene and ITS–1 region genetic markers, four new *Sarcocystis* species forming cysts in the muscles of birds were described (Fig. 5). *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Branta leucopsis* and *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Anas platyrhynchos* were named *Sarcocystis wobeseri*; *Sarcocystis* sp. (cyst type II) ex *Anas platyrhynchos* was named *Sarcocystis anasi*; *Sarcocystis* sp. (cyst type III) ex *Anser albifrons* was named *Sarcocystis albifrons*; *Sarcocystis* sp. (cyst type V) ex *Corvus cornix* was named *Sarcocystis cornix*. Based on the results of morphological and genetic investigations, *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex

Larus argentatus (oder Charadriiformes) was not distinguishable from *S. wobeseri*, whose intermediate hosts are the barnacle goose and the mallard (oder Anseriformes). So far, only two *Sarcocystis* species, i.e. *S. neurona* and *S. falcatula* are known, whose intermediate hosts belong to different orders or a higher taxonomic unit. Before cross-transmission experiments have not been performed, *Sarcocystis* sp. from the herring gull was named as *S. wobeseri*-like.

Sarcocystis wobeseri Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2010

Type intermediate host: the barnacle goose (*Branta leucopsis*), other intermediate host – the mallard (*Anas platyrhynchos*).

Definitive host: unknown.

Locality: Šilutė district, western Lithuania.

GenBank accession numbers: GQ922885, GQ922886 (18S rDNA); GQ922887, GQ922888 (28S rDNA); GU475111, GU475112, JN256121 (ITS–1 region).

Specimens stored: material of transmission electron microscopy is stored at the Laboratory of Molecular Ecology of the Institute of Ecology, the Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania.

Etymology: the species has been named in honour of the famous Canadian scientist of veterinary pathology Gary Wobeser who (together with his co-workers) was the first to have determined this type of cyst wall in *Sarcocystis* of geese.

Sarcocystis anasi Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2011

Type intermediate host: the mallard (*Anas platyrhynchos*).

Definitive host: unknown.

Locality: Šilutė district, western Lithuania.

GenBank accession numbers: EU553477 (18S rDNA); EF079887 (28S rDNA); JF520779 (ITS–1 region).

Specimens stored: material of transmission electron microscopy is stored at the Laboratory of Molecular Ecology of the Institute of Ecology, the Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania.

Etymology: the Latin name of the mallard duck is used for a species name.

Sarcocystis albifrons Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2011

Type intermediate host: the white-fronted goose (*Anser albifrons*).

Definitive host: the arctic fox (*Alopex lagopus*) is one of the definitive hosts.

Locality: Šilutė district, western Lithuania.

GenBank accession numbers: EU502868 (18S rDNA); EF079885 (28S rDNA); JF520780, JN256122 (ITS–1 region).

Specimens stored: material of transmission electron microscopy and histological preparations are stored at the Laboratory of Molecular Ecology of the Institute of Ecology, the Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania.

Etymology: the Latin name of the white-fronted goose is used for a species name.

Sarcocystis cornixi (Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2009)

Type intermediate host: the hooded crow (*Corvus cornixi*).

Definitive host: unknown.

Locality: Šilutė district, western Lithuania.

GenBank accession numbers: EU553478 (18S rDNA); EF079884 (28S rDNA); JF520781, JN256120 (ITS-1 region).

Specimens stored: material of transmission electron microscopy and histological preparations are stored at the Laboratory of Molecular Ecology of the Institute of Ecology, the Nature Research Centre, Vilnius, Lithuania.

Etymology: the Latin name of the hooded crow is used for a species name.

Results of phylogenetic investigations of the *Sarcocystis* species. 18S rRNA gene sequences alignment consisted of 55 taxa and 1858 nucleotide positions with gaps; whereas 28S rRNA gene alignment consisted of 23 taxa and 1625 nucleotide positions with gaps. Four main groups (I, II, III and IV) with high support were distinguished in the phylogenetic tree of 18S rRNA gene sequences (Fig. 6). The largest number of the analysed *Sarcocystis* species whose intermediate hosts are even-toed ungulates, was put into group IV of phylogenetic tree. This group was divided into three subgroups (IVA, IVB and IVC) according to the definitive hosts, although IVB and IVC separation is supported by a small value (0.61). The *Sarcocystis* species whose definitive hosts are feline formed subgroup IVB; the *Sarcocystis* species, whose definitive hosts are canine form subgroup IVC; subgroup IVA comprises three *Sarcocystis* species and the life cycle has been disclosed for only one of them, *S. ovalis* whose intermediate hosts are birds. *S. aucheniae* formed an exclusively separate branch. The third phylogenetic group unites *Sarcocystis* species distinguished themselves by a rodent-snake life cycle and *Sarcocystis* species with a rodent-feline life cycle were put into the second group. Eventually, 15 *Sarcocystis* species, including the investigated *Sarcocystis* species from birds and two representatives of the genus *Frenkelia*, comprise the first group of the phylogram. A distinctive resolution of 18S rRNA gene proved to be inadequate to draw reliable conclusions about the phylogenetic relationships between the species of the first group. The analysed eight *Sarcocystis* species from the even-toed ungulates were put into three separate phylogenetic groups. *S. oviformis* from the roe deer grouped together with morphologically indistinguishable *S. ovalis* and *S. hardangeri* parasitizing in cervids. *S. hjorti*, *S. capreolicanis*, *S. gracilis* and *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* were phylogenetically most closely related to *Sarcocystis* species that have an even-toed ungulates-canine life cycle. *S. hofmanni-like1* from the roe deer and *S. hofmanni-like2* parasitizing in the roe deer and the red deer were united with the species of subgroup IVB that distinguishes itself in an even-toed ungulates-feline life cycle. *S. hofmanni-like1* and *S. hofmanni-like2* were phylogenetically most closely related to *Sarcocystis* species from cervids, i.e. *S. tarandi*, *S. rangiferi* (parasitizing in the red deer and the reindeer) and *Sarcocystis* sp. VI (parasitizing in the sika deer).

Phylogenetic relationships of *Sarcocystis* species from birds were assessed using 28S rRNA gene sequences analysis (Fig. 7). *S. anasi*, *S. albifronsi* and *S. rileyi* comprise one separate phylogenetic group. Meanwhile *S. cornixi*, *S. columbae*, *S. wobeseri*, *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Corvus monedula* were grouped together with *S. calchasi*, *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus* and two species of genus *Frenkelia*. In this cluster *Frenkelia* species, *S. cornixi* and *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus*, *S. calchasi* and *S. wobeseri*, *S. columbae* and *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Corvus monedula* were paired together. It should be noted that definitive hosts of *S. calchasi*, *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus*, *F. glareoli* and *F. microti* are birds of prey, whereas definitive hosts of *S. rileyi* and *S. albifronsi* are predatory mammals. Thus, *Sarcocystis* species, which use

birds as intermediate hosts were divided into two groups of the phylogenetic tree according to definitive hosts, birds or mammals.

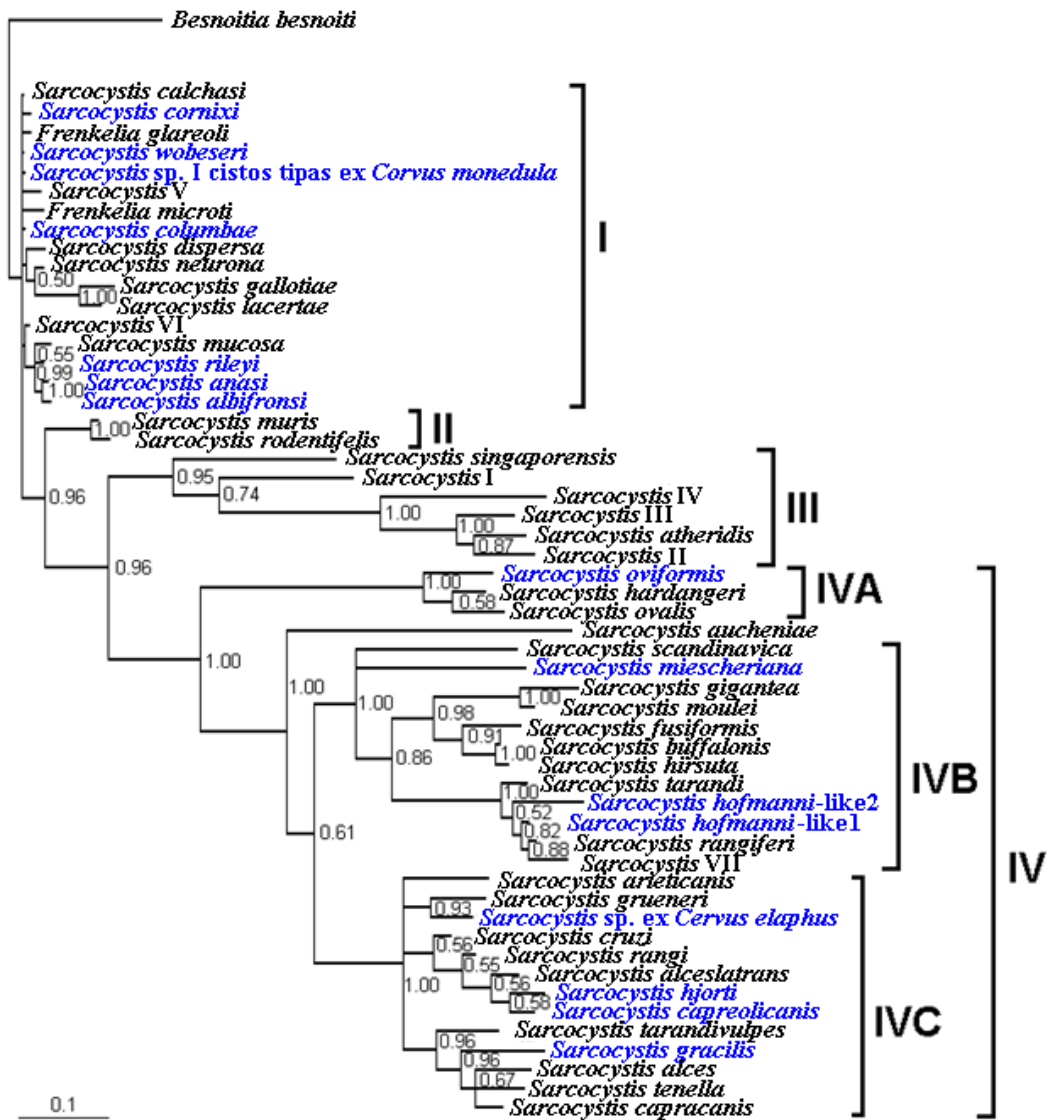


Fig. 6. The phylogram of the genus *Sarcocystis* species based on 18S rRNA gene sequences. The phylogenetic tree was constructed using the Bayesian methods, rooted on *Besnoitia besnoiti* and scaled according to the branch length. The numbers in the figure show the posterior probability support values. Investigated species are blue coloured. Four phylogenetic groups (I-IV) were distinguished in the phylogram and the fourth group was divided into three subgroups (IVA, IVB and IVC).

6 pav. 18S rRNR geno *Sarcocystis* genties rūšių filograma. Filogenetinis medis sukonstruotas naudojant Bayesian metodus. Išorinė grupė – *Besnoitia besnoiti*. Šakų ilgai proporcingi evoliuciniam sekų nukleotidų pakitimų mastui. Skaičiai parodo tikimybinės vertės paremiančias atitinkamą šakų susigrupavimą. Mėlynai pažymėtos šiame darbe tirtos rūšys. Filogramoje išskirtos keturios filogenetinės grupės (I-IV), ketvirtoji suskaidyta į tris smulkesnes (IVA, IVB, IVC).

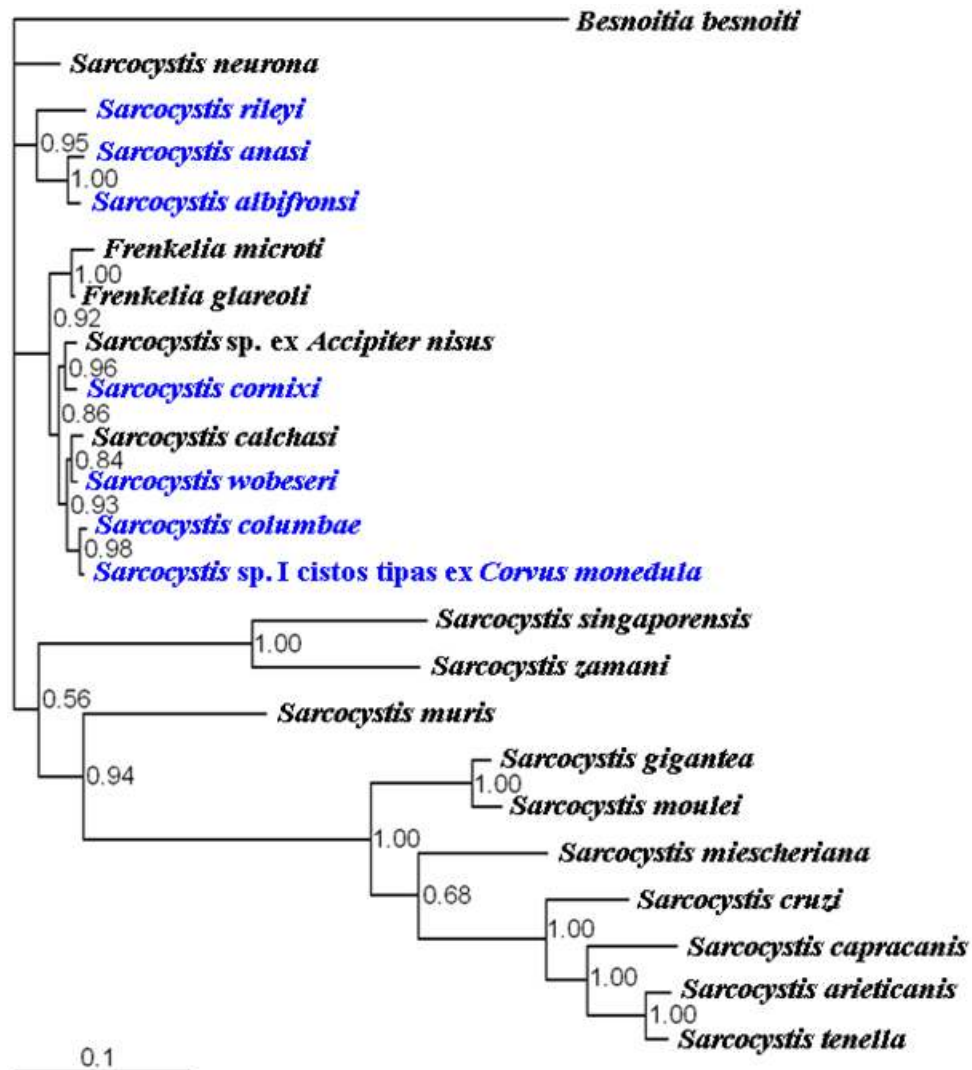


Fig. 7. The phylogenetic tree of the genus *Sarcocystis* species based on 28S rRNA gene sequences. The phylogenetic tree was constructed using the Bayesian methods, rooted on *Besnoitia besnoiti* and scaled according to the branch length. The numbers in the figure show the posterior probability support values. Investigated species are blue coloured.

7 pav. 28S rRNR geno *Sarcocystis* genties rūšių filogenetinis medis. Filogenetinis medis nubraižytas naudojant Bayesian metodus. Išorinė grupė – *Besnoitia besnoiti*. Šakų ilgiai proporcingi evoliuciniam sekų nukleotidų pakeitimų mastui. Skaičiai parodo tikimybinės vertės paremiančias atitinkamą šakų susigrupavimą. Mėlynai pažymėtos šiame darbe tirtos rūšys.

Discussion. *Sarcocystis* sarcocysts have been found in birds of the family Corvidae, order Columbiformes and Charadriiformes (the rook, the jackdaw, the hooded crow, the jaw, the woodpigeon, the herring gull) and two representatives of the order Anseriformes (the barnacle goose, the greylag goose) for the first time in Lithuania. Sources of literature, in which the same species of birds as in the present work are mentioned, less than 40% of *Sarcocystis* infection prevalence in certain bird species is recorded in most cases (Dylko, 1962; Chabreck et al., 1965; Hoppe, 1976; Drouin, Mahrt, 1979; Canaris et al., 1981; Pak, Eshtokina, 1984; Fedynich, Pense, 1992; Kutkienė, Sruoga, 2004). In this work prevalence of infection in the white-fronted goose was 43.2%, in the hooded crow – 35.9% and in the mallard – 20.0%. *Sarcocystis*

infection prevalence results of this investigation are similar to the data of other researchers.

Besides microcysts, macrocysts were found in four specimens of the mallard in the muscles of birds examined. Previously detected *Sarcocystis* macrocysts in the muscles of birds of the Anseriformes order were not investigated in detail and after examining them with the naked eye these macrocysts were preliminary assigned to *S. rileyi*. On the basis of the results of the cyst wall ultrastructure and DNA analysis obtained in this work, it was proved that the mallard in Europe was also infected with *S. rileyi*. The transmission experiments made in Canada and the USA established that the striped skunk was the definitive host for this species. (Cawthorn et al., 1981; Wicht, 1981). As the range of the striped skunk is exclusively North America, it is unclear what animal contributes to the distribution of *S. rileyi* in Europe. In order to answer to the question about prevalence of *S. rileyi* in ducks in Lithuania and Europe, much more detailed investigations are necessary, which would be carried out in different regions of the continent examining the breast muscles of the birds. Furthermore, the birds should be differentiated according to their age because prevalence of macrocysts in juveniles is diagnosed comparatively rarer (Hoppe, 1976).

In the examined game mammals (the wild boar, the roe deer, the red deer and the moose) the recorded 89.8% prevalence of *Sarcocystis* infection was similar to the data obtained during previous investigations carried out in Lithuania when prevalence ranged from 80 to 90% (Grikienienė et al., 2001; Kutkienė, Baleišis, 2001; Malakauskas et al., 2001; Malakauskas, Grikienienė, 2002). As compared with the data of earlier investigations in Lithuania when intense *Sarcocystis* infection in the roe deer was lower than 30% (Malakauskas et al., 2001; Malakauskas, Grikienienė, 2002), the present work established significantly more cases of intense *Sarcocystis* infection in the roe deer, which accounted for as much as 75.6%. Thus far it has been difficult to present well-grounded suppositions explaining this phenomenon.

It was once again confirmed, that the *Sarcocystis* species is widespread in Lithuanian game mammals and birds. Uncooked meat of game animals should be never fed to dogs or other domestic carnivorous, which can transmit *Sarcocystis*. This is a major preventative measure, which does not require high cost for reducing meat contamination with sarcocysts. Therefore hunters are recommended to become well acquainted with *Sarcocystis* species biology and ways of its transmission.

Sarcocystis species belonging to cyst type I from the barnacle goose, the mallard, the woodpigeon and the herring gull had the cyst wall of the same type-1. This type of cyst wall was established for more than 20 *Sarcocystis* species that have taxonomically distant intermediate hosts (Odening, 1998). Furthermore, *S. calchasi* from the domestic pigeon and *S. columbae* from the wood pigeon had the same sarcocysts wall type-1 (Olias et al., 2010b; 2010c). The 18S rRNA gene, 28S rRNA gene and ITS-1 region sequences analysis showed that at least three *Sarcocystis* species (*S. wobeseri*, *S. columbae*, *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Corvus monedula*) that had the cyst wall of type I parasitized in the examined birds. Thus, these results indicate that morphological investigations alone are insufficient in order to separate some *Sarcocystis* species from birds.

According to morphological and genetic characteristics of *Sarcocystis* sp. (cyst type I) ex *Larus argentatus*, it corresponded to the *S. wobeseri* species. Since parasitism of one *Sarcocystis* species in the species of intermediate hosts of different orders is a

very rare phenomenon, at the present time *Sarcocystis* sp. from the herring gull is named *S. wobeseri*-like. Subsequent cross-transmission experiments should confirm or deny the *S. wobeseri* existence in the herring gull.

In addition to *S. gracilis*, *S. capreolicanis* and *S. cf. hofmanni*-like found in the roe deer in Lithuania earlier, ovoid shaped sarcocysts were also discovered, which genetically were identified as *S. oviformis*. *S. hofmanni* from the badger was described in Germany (Odening et al., 1994a). *Sarcocystis* species, which morphologically are indistinguishable from *S. hofmanni* were also identified in the cervids: in the roe deer, the red deer, the fallow deer, the white-lipped deer (*Cervus albirostris*) and the Sambar (*Cervus unicolor*) (Sedlaczek, Wesemeier, 1995; Wesemeier, Sedlaczek, 1995a; Wesemeier, Sedlaczek, 1995b; Odening, 1997). These *Sarcocystis* spp. were attributed to *S. cf. hofmanni* (*S. cf. hofmanni* corresponds to *S. hofmanni*-like). Molecular results of this study indicate that there exist two species, which, using the light microscopy analysis were identified as *S. hofmanni*-like. On the basis of 18S rRNA gene sequences investigations *S. hofmanni*-like was split into *S. hofmanni*-like1 and *S. hofmanni*-like2, without giving specific species names to them, because a detail comparison of the cyst wall ultrastructure was not performed. By light microscopy, morphological differences of the cyst wall characteristics between *S. hofmanni*-like1 and *S. hofmanni*-like2 were observed, however, identification of these species by means of light microscope is complicated. On the basis of the cyst wall ultrastructure and 18S rRNA gene comparison Gjerde (2011) described *S. silva* sp. nov. from the roe deer. According to the morphological and genetic diagnostic criteria, *S. silva* and *S. hofmanni*-like1 should be considered as the same species. It is likely that a more detailed morphological analysis of *S. hofmanni*-like2 would allow *S. hofmanni*-like2 to be described as a separate species, however, thus far these investigations have not been carried out. Further in this *S. hofmanni*-like1 and *S. hofmanni*-like2 are referred to as *S. silva* and *S. hofmanni*-like, respectively.

S. hjorti found in this study morphologically clearly differed from *Sarcocystis* spp. identified in the moose in Lithuania (Grikienienė et al., 2001; Kutkienė, 2002). On the basis of the 18S rRNA gene sequences analysis *S. hofmanni*-like, *S. hjorti* and *S. sp. ex Cervus elaphus* were identified in the red deer. *S. sp. ex Cervus elaphus*, which distinguishes itself in smooth sarcocysts by light microscopy, was similar to *S. cervicanis*, which was described in the red deer (Hernández-Rodríguez et al., 1981). However, a further electron microscopy analysis of the cysts walls is necessary to determine whether these species are synonymous.

The majority of *Sarcocystis* species are strictly host specific to the intermediate hosts (Dubey et al., 1989). Sometimes morphologically similar sarcocysts are found in taxonomically related intermediate host species (Odening, 1998). Based on the molecular results of this study it was proved that *S. wobeseri* can parasitize at least two different species of order Anseriformes i.e. barnacle goose and mallard. On the basis of the 18S rRNA gene sequences analysis it was established that *S. silva* can form sarcocysts in the roe deer and the moose (Dahlgren, Gjerde, 2008 named *Sarcocystis* sp. TypeD), whereas *S. hofmanni*-like can parasitize the roe deer and red deer, likewise it was confirmed once that intermediate hosts of *S. hjorti* can be red deer and moose.

The branch length in phylograms of 18S rRNA and 28S rRNA genes were significantly shorter between *Sarcocystis* species whose intermediate hosts are birds than those between *Sarcocystis* species whose intermediate hosts are mammals or reptiles.

The *Sarcocystis* species from birds are supposed to be evolutionary young recently separated species. When comparing 18S rRNA gene and 28S rRNA gene sequences of *Sarcocystis* from the birds, low (1%) interspecific genetic differences were determined in many cases. Moreover, an intraspecific genetic variability of some *Sarcocystis* species from mammals or reptiles is greater than interspecific genetic variability of the *Sarcocystis* species from birds (Šlapeta et al., 2002a; Dahlgren, Gjerde, 2010). Due to all these reason, when identifying *Sarcocystis* species from birds, ITS–1 region was used. Other authors also used the ITS–1 region sequences analysis to separate *Sarcocystis* species parasitizing in birds (Marsh et al., 1999; Dubey 2001a; Dubey 2006b; Olias 2009; Dubey 2010; Olias 2010c). Also, the molecular investigation showed that the examined *Sarcocystis* species from birds were closely related to pathogenic *S. calchasi*, *S. falcatula* and *S. neurona*.

Game fauna *Sarcocystis* species analysed groups in the phylogenetic trees according to the similarity of their morphological features and characteristics of the life cycle have been observed, i.e. *Sarcocystis* species grouped according to the definitive rather than intermediate hosts. Earlier the relationship between the phylogenetic relatedness of livestock *Sarcocystis* and kinship of the phenotypic traits, focusing on the structure of the sarcocysts wall was established (Holmdahl et al., 1999). In this study it was observed that the *Sarcocystis* species from birds and cervids distinguished themselves in similar morphology of the cyst walls and cystozoites were grouped together in phylogenetic trees. It should be noted that definitive hosts are not known for all the *Sarcocystis* species investigated. Therefore phylogenetic relatedness according to the characteristics of the life cycle should be regarded as a hypothesis. The definitive hosts of *S. ovalis*, *S. hjorti*, *S. alces* and *S. calchasi* that have been disclosed recently practically confirm the hypothesis put forward (Gjerde, Dahlgren, 2010; Dahlgren, Gjerde, 2010b; Olias et al., 2010a).

CONCLUSIONS

1. *Sarcocystis* cysts were found in 18 species of the Lithuanian game fauna, in seven species (in the barnacle goose, in the greylag goose, in the rook, in the jackdaw, in the hooded crow, in the jay, in the wood pigeon and in the herring gull) sarcocysts were detected for the first time. Statistically significant higher *Sarcocystis* infection prevalence and intensity rates ($p < 0.05$) were determined in mammals as compared with birds.
2. On the basis of the morphometric characteristics of *Sarcocystis* parasites cyst walls and cystozoites, four morphological types of microcysts were distinguished in the examined birds, and macrocysts were found only in the mallard.
3. *S. rileyi* has been identified in Europe for the first time.
4. According to the results of the cyst wall ultrastructure and DNA analysis four new bird *Sarcocystis* species were described: *S. albifronsi*, *S. wobeseri*, *S. anasi* and *S. cornixi*.
5. *S. columbae*, *S. oviformis*, *S. hjorti* and *S. silva* parasitizing in wood pigeon, roe deer, red deer and moose, roe deer and moose, respectively were identified in Lithuania for the first time using original molecular test for diagnosis of species.

6. Game fauna *Sarcocystis* species investigated in the phylogenetic trees of 18S rRNA and 28S rRNA genes were grouped according to the similarity of the morphological characteristics of sarcocysts. Also, phylogenetically related *Sarcocystis* species parasitize in the taxonomically related species of definitive hosts.
7. The analysis of the molecular results showed that some *Sarcocystis* species from birds and cervids (*S. wobeseri*, *S. hjorti*, *S. silva*, *S. hofmanni*-like) could parasitize more than one intermediate host species.

ĮVADAS

Temos aktualumas. *Sarcocystis* genties (Lankester, 1882) atstovai – tai cistas sudarančių kokcidijų grupės vienaląsčiai parazitai, plačiai paplitę įvairiose žinduolių, paukščių ir roplių rūšyse. *Sarcocystis* genčiai šiuo metu priskiriama virš 200 rūšių, o kai kurios *Sarcocystis* rūšys yra svarbūs žmogaus bei naminių gyvūnų patogenai (Dubey ir kt., 1989). *Sarcocystis* parazitams būdingas obligatinis-heterokseninis gyvybinis ciklas, paremtas aukos–plėšrūno ekologiniais santykiais. Nelytinė *Sarcocystis* rūšių vystymosi fazė vyksta tarpiniame šeimininke ir pasibaigia sarkocistos susiformavimu šeimininko raumenyse. Lytinė vystymosi stadija vyksta parazitui patekus į galutinio šeimininko žarnyną, kuriame susiformuoja oocistos/sporocistos (Mehlhorn, Heydorn, 1978). Išsamiausiai tyrinėtos ekonomiškai svarbių naminių gyvūnų sarkosporidijos. *Sarcocystis* parazitų rūšinė sudėtis, infekcijos paplitimo mastas, poveikis šeimininkui daugelyje laukinės faunos rūšių nėra tiksliai žinomas. Laukinių gyvūnų *Sarcocystis* rūšių tyrimai yra aktualūs vertinant *Sarcocystis* parazitų paplitimą, patogenezę, specifiškumą šeimininkui, tarpūšinę ir vidurūšinę genetinę įvairovę, gilinant žinias apie infekcijos mechanizmus, gyvybinių ciklų modelius, parazito evoliucinius ryšius su šeimininkais. Šiuolaikinė *Sarcocystis* rūšių identifikacija yra sudėtinga, paremta morfologiniais ir DNR tyrimais. Skirtingi DNR žymenys, daugiausiai 18S rRNR ir 28S rRNR genai, ITS–1 regionas sėkmingai naudojami morfologiškai panašių sarkosporidijų rūšių atskyrimui, parazito specifiškumo šeimininkui nustatymui, filogenetiniuose ir kituose tyrimuose (Dahlgren, Gjerde 2010a; Olias ir kt., 2010b).

Šiame darbe tiriamos sarkosporidijos, aptinkamos Lietuvoje medžiojamuose gyvūnuose. Medžiojamosios faunos sarkosporidijų tyrimai yra svarbūs dėl potencialios grėsmės žmogui. Iki šiol Lietuvoje medžiojamosios faunos *Sarcocystis* rūšių ekologija ir įvairovė tirta naudojant tradicinius morfologinius metodus (Grikienienė ir kt., 2001; Malakauskas, Grikienienė 2002; Kutkienė, 2001; 2002; 2003; Kutkienė, Sruoga, 2004). Tiriant šviesiniu mikroskopu, medžiojamuosiuose žinduoliuose identifikuotos sarkosporidijų rūšys, o medžiojamuosiuose paukščiuose aptikti bei apibūdinti *Sarcocystis* parazitų cistų morfologiniai tipai. Šiame medžiojamos faunos sarkosporidijų įvairovės tyrime nagrinėjamas *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas, intensyvumas, rūšinė sudėtis, specifiškumas tarpiniam šeimininkui, filogenija. Identifikuojant *Sarcocystis* rūšis, naudojami klasikiniai morfologiniai bei DNR analizės metodai, gauti skirtingų metodikų duomenys glaudžiai siejami tarpusavyje atsakant į ekologinius ir filogenetinius klausimus.

Darbo tikslas ir uždaviniai.

Šio darbo tikslas – Lietuvos medžiojamosios faunos rūšyse aptinkamų *Sarcocystis* rūšių paplitimo, morfologinės ir genetinės įvairovės įvertinimas. Tikslui pasiekti buvo suformuluoti uždaviniai:

1. Naudojant kompresinį-mikroskopinį dažytų raumenų iškarpų tyrimo metodą palyginti skirtingose laukinių žinduolių ir paukščių rūšyse aptinkamų *Sarcocystis* rūšių infekcijos ekstensyvumą ir intensyvumą.
2. Tiriant šviesiniu mikroskopu pagal morfometrines sarkocistų ypatybes paukščiuose rastas sarkocistas suskirstyti į morfologinius cistų tipus, o žinduoliuose atrastas sarkocistas priskirti tam tikrai sarkosporidijų rūšiai.

3. Naudojant sarkocistų sienelės ultrastruktūros ir DNR analizę, identifikuoti medžiojamos faunos rūšyse parazituojančias *Sarcocystis* rūšis.
4. Naudojant 18S rRNR, 28S rRNR genų bei ITS–1 regiono sekų analizę nustatyti tiriamų *Sarcocystis* rūšių filogenetinius ryšius Sarcocytidae šeimoje.
5. Įvertinti *Sarcocystis* rūšių, parazituojančių elniniuose ir tirtuose paukščiuose specifiškumą tarpiniam šeiminkui.

Ginamieji teiginiai.

1. Kompleksiniai morfologiniai ir DNR tyrimai yra būtini identifikuojant medžiojamoje faunoje aptinkamas sarkosporidijų rūšis.
2. Siekiant atskirti artimai giminingas paukščių sarkosporidijų rūšis reikalingi ITS–1 regiono sekų tyrimai.
3. Aprašytos keturios naujos mokslui paukščių *Sarcocystis* rūšys.
4. Ne visos Lietuvoje medžiojamuose gyvūnuose parazituojančios *Sarcocystis* rūšys pasižymi griežtu specifiškumu tarpiniam šeiminkui.

Mokslinis naujumas.

Sarkosporidijų tyrimai Lietuvoje, nagrinėjant *Sarcocystis* rūšių paplitimą, nustatant *Sarcocystis* rūšinę sudėtį tam tikrame tarpiniame šeiminko apsiribodavo tradiciniais morfologiniais metodais. Šiame darbe, identifikuojant *Sarcocystis* rūšis medžiojamuosiuose žinduoliuose ir paukščiuose, greta šviesinės mikroskopijos naudoti elektroninės mikroskopijos bei DNR tyrimo metodai. Vertinant analizuojamų *Sarcocystis* rūšių filogenetinius ryšius, naudoti molekuliniai žymenys (18S rRNR ir 28S rRNR genai, ITS–1 regionas). Sarkocistos pirmą kartą Lietuvoje aptiktos baltaskruosčių berniklių, pilkųjų žąsų, kovų, kuosų, varnų, kėkštų, keršulių, sidabrinių kirų raumenyse. Šio tiriamojo darbo metu aptiktos iki šiol Lietuvoje nenustatytos *S. columbae*, *S. oviformis*, *S. hjorti*, *S. silva* rūšys, parazituojančios atitinkamai keršuliuose, stirnose, tauriuosiuose elniuose ir briedžiuose bei stirnose ir briedžiuose. Remiantis DNR sekų tyrimais išaiškinta, jog stirnose ir tauriuosiuose elniuose egzistuoja dvi sarkosporidijų rūšys, kurios anksčiau buvo įvardijamos kaip viena į *S. hofmanni* panaši rūšis. Pirmą kartą genetiškai charakterizuota *Sarcocystis* sp., pasižyminti I cistos tipu, aptikta kuosoje. Šiame darbe taip pat pirmą kartą pateikiami *S. rileyi* infekcijos įrodymai Europoje. Remiantis cistų sienelės ultrastruktūros ir DNR tyrimų rezultatais aprašytos keturios naujos sarkosporidijų rūšys – baltakaktėje žąsyje – *S. albifronsi*, baltaskruostėje berniklėje – *S. wobeseri*, didžiojoje antyje – *S. anasi* ir varnoje – *S. cornixi*.

Mokslinė ir praktinė darbo reikšmė.

Šio darbo metu nustatyti *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumo ir intensyvumo Lietuvos medžiojamoje faunoje duomenys yra svarbūs tolimesniems parazitologiniams bei veterinariniams tyrimams. Lietuvoje didžiosiose antyse rastų makrocistų priskyrimas *S. rileyi* keičia supratimą apie šios rūšies paplitimą, nes iki šiol *S. rileyi* infekcija buvo patvirtinta tik Šiaurės Amerikoje. Analizuotų *Sarcocystis* rūšių filogenetinių ryšių įvertinimas pagal 18S rRNR, 28S rRNR genų bei ITS–1 regiono sekas turi didelę reikšmę išaiškinant tirtųjų *Sarcocystis* rūšių, galutinius šeiminkus. Naudojant DNR analizę nustatyta, kad *S. wobeseri*, *S. silva*, *S. hofmanni*-like, *S. hjorti* rūšys nėra griežtai specifinės tarpiniam šeiminkui. Tai, savo ruožtu, suteikia vertingos informacijos vertinant *Sarcocystis* genties rūšių specifiškumą tarpiniam šeiminkui.

Šiame darbe aprašytos keturios mokslui naujos *Sarcocystis* rūšys, formuojančios sarkocistas paukščiuose, taip pat kelios sarkosporidijų rūšys pirmą kartą aptiktos Lietuvoje. Šie rezultatai yra svarbūs plėtojant sarkosporidijų tyrimus bei gilinant žinias apie bioįvairovę.

Rezultatų pristatymas ir aprobavimas. Disertacinio darbo rezultatai paskelbti 14 publikacijų, iš jų 8 straipsniai ir 6 mokslinių pranešimų tezės. Konferencijose disertacijos tema perskaityti 5 žodiniai pranešimai bei pristatyti 3 standiniai pranešimai.

Disertacijos struktūra. Disertacijos rankraštį sudaro šie skyriai: Santrumpos, Įvadas, Literatūros apžvalga, Medžiaga ir metodai, Rezultatai ir jų aptarimas (skyrius susideda iš 7 dalių), Išvados, Literatūros sąrašas, autoriaus mokslinių publikacijų sąrašas. Visa medžiaga išdėstyta 152 puslapiuose. Literatūros sąraše pateikiami 216 šaltiniai. Disertacija parašyta lietuvių kalba, santrauka – anglų ir lietuvių kalbomis.

Padėkos. Esu dėkingas darbo vadovui dr. (hb.) Daliui Butkauskui už vadovavimą, pasitikėjimą, vertingus patarimus, visokeriopą pagalbą, supratimą, optimistinį požiūrį bei ryžtingumo skatinimą; darbo konsultantui prof. habil. dr. Aniului Sruogai už pagalbą planuojant bei organizuojant medžiagos rinkimo bei tyrimo darbus, toliaregiškus patarimus. Nuoširdžiai dėkoju dr. Liudai Kutkienei už pagalbą sarkocistų morfologiniuose tyrimuose, draugiškumą, praktines bei teorines žinias. Labai dėkoju dr. Jitender P. Dubey iš gyvūnų ir gamtinių išteklių instituto, JAV ir dr. Jan Votýpka iš Karlo universiteto, Čekija už vertingus patarimus vertinant tyrimų rezultatus. Dėkoju Irenai Žalakevičienei už pagalbą atliekant sarkocistų elektroninės mikroskopijos tyrimus. Esu dėkingas Gamtos Tyrimų Centro darbuotojui Valentinui Pabrinskiui, žvėrienos perdirbimo įmonės UAB „Viltlit“ vadovui Jonui Vyšniauskui, Nacionalinio Maisto ir Veterinarijos Rizikos vertinimo Instituto, Molekulinės Biologijos ir Genetiškai Modifikuotų organizmų tyrimų skyriaus vedėjui dr. Vaclovui Jurgelevičiui už pagalbą renkant mėginius tyrimams. Dėkoju Gamtos tyrimų centro Ekologijos Instituto Molekulinės Ekologijos laboratorijos kolektyvui už draugišką atmosferą ir palaikymą.

Taip pat dėkoju Lietuvos valstybiniam mokslo ir studijų fondui už finansinę paramą atliekant dalį tyrimų disertacijos tema.

LITERATŪROS APŽVALGA

Šiame skyriuje pateikta *Sarcocystis* genties rūšių pagrindinių biologinių ypatybių, parazitavimo įvairiose organizmų grupėse apžvalga. Taip pat nagrinėjami *Sarcocystis* parazitų ekstensyvumo ir intensyvumo, rūšių identifikavimo, parazitų specifiškumo šeimininkui, filogenetinių tyrimų aktualūs klausimai, glaudžiai susiję su disertacinio darbo problematika. Išskirtinis dėmesys skiriamas apibendrinat medžiojamų žvėrių ir paukščių sarkosporidijų tyrimus Lietuvoje ir pasaulyje. Literatūros apžvalgos skyrius susideda iš 10 dalių.

MEDŽIAGA IR METODAI

Tyrimo medžiaga. Šiame medžiojamosios faunos sarkosporidijų tyrime analizuoti 384 paukščiai ir 177 žinduoliai (1 lentelė). Medžiaga surinkta 2005-2011

metais – laukinių žinduolių raumenų pavyzdžiai gauti iš žvėrienos perdirbimo įmonės „Viltlit“, o paukščių medžiaga surinkta iš Nacionaliniu Maisto ir Veterinarijos Rizikos vertinimo Instituto, ekspedicijų metu, bendradarbiaujant su medžiotojais. Ieškant *Sarcocystis* parazitų cistų tirti stirnų, šernų, tauriųjų elnių ir briedžių diafragmos raumenys, o paukščių – kaklo, kojos ir krūtinės raumenys.

Metodai. *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas ir intensyvumas analizuotuose gyvūnuose nustatytas naudojant kompresinį-mikroskopinį dažytų raumenų iškarpų metodą 28 avižos grūdo dydžio raumenų gabalėliuose. *Sarcocystis* parazitų infekcijos intensyvumas skirstytas į grupes: 1-10 cistų – silpna infekcija; 11-40 cistų – vidutinė infekcija; daugiau kaip 40 cistų – intensyvi infekcija. Sarkocistų morfologinės charakteristikos, morfologinis cistų tipas bei preliminari *Sarcocystis* rūšis natyviuose preparatuose nustatyta šviesiniu mikroskopu (Nicon ECLIPSE 80i) naudojant vaizdo analizės sistemą INFINITY3. Sarkocistos diferencijuotos remiantis morfometriniiais kriterijais – cistos sienelės storium, išaugų forma ir ilgiu bei cistozoitų forma ir dydžiu.

Elektroninio mikroskopavimo analizei, raumeninio audinio pavyzdžiai su sarkocistomis fiksuoti Kornovskio tirpale, po to fiksuoti osmio tetrokside, dehidratuoti ir įlieti į epoksidinių dervų mišinį. Labai ploni pjūviai (50-100 nm) nudažyti 2% uranil acetatu ir švino citratu bei tirti transmisiniu elektroniniu mikroskopu JEOL JEM-100B.

Kiekvienu atveju nustačius sarkocistų morfologines savybes, keletas cistų išpreparuota ir saugota tolimesnėms DNR manipuliacijoms 1,5 ml talpos mėgintuvėlyje, 70% etilo alkoholio tirpale. Genominė DNR išskirta naudojant „Macherey-Nagel“ firmos „NucleoSpin[®] tissue“ DNR išskyrimo iš audinių rinkinį bei pagal Aljanabi ir Martinez (1997) metodiką. Naudojant Primer3 programą (Rozen, Skaletsky, 2000) sukurtos 7 pradmenų poros siekiant padauginti 18S rRNR geną, ITS–1 regioną ir labai variabilų 28S rRNR geno fragmentą. Polimerazinė grandininė reakcija (PGR) atlikta galutiniame 25 µl tūryje, susidedančiam iš 1 x PGR buferio (turinčio 50 mM KCl), 0,2 mM dNTP, po 0,2 µM kiekvieno iš pradmenų, 1 vieneto (u) Taq polimerazės (MBI, Fermentas, Lietuva), 2,5 mM MgCl₂, 0,04 µg genominės DNR ir likusio kiekio vandens. Amplifikacija atlikta pradedant denatūracijos žingsniu 5 min. 94°C temperatūroje, toliau reakcija vykdyta 5 amplifikacijos ciklus: 45 s. – 94°C, 60 s. – 64°C, 70 s. – 72°C, toliau reakcija tęsta 30 amplifikacijos ciklų 45 s. – 94°C, 60 s. – 58°C, 70 s. – 72°C, reakcija baigiama galutiniu prailginimo žingsniu 10 min. – 72°C. PGR produktai vizualizuoti atlikus elektroforezę 1,7% agarozės gelyje. Teigiami pavyzdžiai paruošti sekvenavimo reakcijomis, PGR produktus gryninat egzozonukleazių rinkiniu. Sekvenavimo reakcijos atliktos automatinio sekvenatoriaus ABI Prism 377 pagalba (Sekvenavimo centras, Biotechnologijos institutas, Vilnius), sekvenavimui naudojant tuos pačius pradmenis kaip ir pagausinant DNR fragmentus.

Sarcocystis parazitų infekcijos ekstensyvumo ir intensyvumo rodikliai tirtuose medžiojamuosiuose gyvūnuose apskaičiuoti naudojant Quantitative Parasitology 3.0 programą (Rozsa ir kt., 2000). Parazitų agregacija, tai yra netolygus parazitų pasiskirstymas tarp šeimininkų įvertintas naudojant D indeksą, kuris parodo neatitikimą tarp nustatyto ir tolygaus pasiskirstymų (Poulin, 1993). Statistiškai patikimi skirtumai laikyti, kai $p < 0,05$.

Procentinės sekų identiškumo vertės, gautos naudojant EMBOSS programą (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/>). Sekų sulyginimas atliktas MUSCLE algoritmu (Edgar, 2004), kuris įdiegtas į MEGA 5.05 programinį paketą (Tamura ir kt., 2011).

Filogenetinių medžių šakų išsidėstymas nustatytas Bayesian metodu, MrBayes 3.1.2 programa (Ronquist, Huelsenbeck, 2003). 18S rRNR ir 28S rRNR genų filogramose išorine grupe pasirinkta *Besnoitia besnoiti*, o ITS-1 regiono filogramoje – *S. tarandi*. Filogenetiniai medžiai nubraižyti naudojant TreeView programą (Page, 1996).

REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

***Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumas ir intensyvumas tirtuose gyvūnuose.** Tiriant 26 gyvūnų rūšis, 18 iš jų atrastos sarkocistos (1 lentelė). Lyginant paukščių ir žinduolių sistematines grupes, žinduoliuose nustatyti patikimai ($p < 0,05$) didesni *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumo bei intensyvumo rodikliai. Paukščiuose infekcijos ekstensyvumas sudarė 27,6% (106 užsikrėtę iš 384 tirtų), užfiksuotas 11,1 infekcijos intensyvumo vidurkis, 4,0 infekcijos intensyvumo mediana. Žinduoliuose nustatytas 89,8% infekcijos ekstensyvumas (159 užsikrėtusių iš 177 tirtųjų), intensyvumo vidurkis buvo 62,0, o mediana 23,0.

Detalesniam *Sarcocystis* parazitų infekcijos ekstensyvumo ir intensyvumo parametrų palyginimui tarp atskirų medžiojamosios faunos rūšių, pasirinktos šešios rūšys, turinčios didžiausią ištirtų individų imtį (2 lentelė). Medžiojamuosiuose paukščiuose infekcijos ekstensyvumas svyravo nuo 20,0% (didžiojoje antyje), iki 43,2 % (varnoje). Tarp medžiojamųjų žinduolių didžiausiu infekcijos ekstensyvumu išsiskyrė stirnos (97,6%). Lyginant infekcijos ekstensyvumą, patikimi ($p < 0,05$) skirtumai nustatyti tarp paukščių ir žinduolių rūšių, taip pat tarp anties – varnos, didžiosios anties – baltakaktės žąsies, stirnos – šerno, stirnos – tauriojo elnio porų. Labai aukštomis infekcijos intensyvumo reikšmėmis išsiskyrė stirnos. Statistiškai patikimi ($p < 0,05$) infekcijos intensyvumo skirtumai fiksuoti tarp stirnos – šerno, stirnos – tauriojo elnio imčių porų. D indekso, parodančio parazitų agregaciją, vertės buvo aukštesnės paukščių rūšyse, lyginant su žinduoliais. Didžiausios D koeficiento reikšmės nustatytos baltakaktėse žąsyse, didžiosiose antyse, varnose, kur daugelyje individų atrasta santykinai mažai sarkocistų, o tik kai kuriuose santykinai daug sarkocistų. Mažiausios D indekso vertės apskaičiuotos stirnose ir šernuose, o tai parodo, kad šiose rūšyse sarkocistos pasiskirsčiusios tolygiausiai tarp analizuotų gyvūnų rūšių.

Sarcocystis parazitų infekcijos intensyvumą sugrupavus į tris kategorijas, paaiškėjo, kad intensyvios infekcijos (> 40 sarkocistų) atvejų, aptikta penkiose iš šešių analizuotų gyvūnų rūšių, intensyvi infekcija nenustatyta tik didžiosiose antyse (1 pav.). Daugiausia ($p < 0,05$) intensyvios infekcijos atvejų (75,6%), nustatyta stirnose, o kitose rūšyse intensyvios infekcijos atvejai buvo labai reti arba pavieniai. Vidutinės invazijos didžiausiomis reikšmėmis iš žinduolių pasižymėjo šernai (17,7%) o iš paukščių – varnos (12,8 %), tačiau statistiškai patikimų skirtumų neužfiksuota ($p > 0,05$).

Paukščiuose aptiktų sarkocistų morfologinės analizės rezultatai. Iš tirtų 22 paukščių rūšių makroskopinės sarkocistos atrastos tik didžiosios anties keturiuose patinėliuose. Cistos buvo gelsvai baltos spalvos 1,5–2,0×4,2–7,0 mm dydžio ir savo išvaizda priminė ryžio grūdą (2A pav.). Šviesiniu mikroskopu tirtos cistos sienelė pasižymėjo sudėtinga struktūra, o jos storis siekė iki 5,6 μm . Cistozoitai buvo tiesios formos – 15,3–16,8 μm ilgio. Tiriant elektroniniu mikroskopu, cistos sienelės išaugos priminė žiedinio kopūsto formą (2B pav.) ir pagal Dubey ir Odening (2001) sarkocistų sienelių ultrastruktūros klasifikaciją atitiko 23 cistos sienelės tipą. Šiuo tipu pasižymi tik

S. rileyi rūšies makrocistos išskirtos iš šaukštasnapės ir didžiosios ančių (Dubey ir kt. 2003; 2010). Apibendrinant, pagal morfologines savybes, tirtosios makrocistos iš didžiosios anties, priskirtos *S. rileyi* rūšiai.

Analizuojant šviesiniu mikroskopu, paukščiuose rastos mikroskopinės sarkocistos suskirstytos į keturis tipus (I, II, III, V) pagal sienelės storį, sienelės išaugų ilgį ir formą bei cistozoitų morfometrines ypatybes. I tipo sarkocistos pasižymėjo plona (~ 1.0 μm), lygia ar truputį banguota cistos sienele, be aiškiai matomų išaugų ir santykinai mažais (6,3–8,1 μm ilgio) lanceto ar banano formos cistozoitais; II tipo sarkocistos pasižymėjo iki 1,5 μm storio cistos sienele, turinčia tankiai išsidėsčiusias išaugas, kurios formavo į tvorelę panašią struktūrą, o cistozoitai buvo 13,0–16,1 μm ilgio, palinkusios formos, vienas galas šiek tiek platesnis; III tipo sarkocistos pasižymėjo santykinai stora (iki 2,4 μm) cistos sienele su piršto ar spenelio formos išaugomis, o 10,0–13,5 μm ilgio cistozoitai buvo beveik tiesūs ir savo forma priminė šaudyklę; V tipo sarkocistos pasižymėjo ruožuota iki 2,5 μm ilgio cistos sienele ir smulkiais (6,1–7,9 μm ilgio) banano formos cistozoitais (3 pav.). I tipo sarkocistos nustatytos visose sarkosporidijomis užsikrėtusių paukščių rūšyse: baltakaktėje žąsyje, pilkojoje žąsyje, baltaskruostėje berniklėje, didžiojoje antyje, rudagalvėje kryklėje, cyplėje, kuoduotoje antyje, klykuolėje, sidabriname kire, varnoje, kove, kuosoje, kėkšte, keršulyje. II tipo sarkocistos identifikuotos didžiojoje antyje ir klykuolėje, III tipo sarkocistos rastos baltakaktėje žąsyje, pilkojoje žąsyje ir cyplėje, V tipo sarkocistos išimtinai nustatytos tik varnoje. Užfiksuota mišrios *Sarcocystis* parazitų infekcijos atveju, kai vienas paukštis užsikrečia daugiau negu vieno morfologinio tipo sarkocistomis.

Mikrocistų sienelių elektroninės mikroskopijos analizė atlikta septynioms *Sarcocystis* spp. iš paukščių: *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Branta leucopsis*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Columba palumbus*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus*, *Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp. (III cistos tipas) ex *Anser albifrons*, *Sarcocystis* sp. (V cistos tipas) ex *Corvus cornix*. Keturiuose paukščių rūšyse surastos sarkocistos turėjo tą patį primityviausią cistos sienelės tipą pagal Dubey ir Odening (2001) klasifikaciją, t.y. *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Branta leucopsis*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Columba palumbus*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus* cistų sienelės priklausė 1 tipui. Tiriant šviesiniu ir elektroniniu mikroskopais, esminių morfologinių skirtumų tarp minėtųjų *Sarcocystis* spp. neužfiksuota. *Sarcocystis* sp. (III cistos tipas) ex *Anser albifrons* turėjo 9 tipo cistos sienelę *Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos* cistos sienelė buvo panaši į 9 tipą, tačiau savo forma ir mažesniu išaugų dydžiu skyrėsi nuo pastarojo tipo, o *Sarcocystis* sp. (V cistos tipas) ex *Corvus cornix* cistos sienelė nepriskirtina nei vienam iš anksčiau aprašytų cistos sienelės tipų.

Žinduoliuose aptiktų sarkocistų morfologinės analizės rezultatai. Įvertinus cistų morfologinius požymius, stirnose nustatytos keturių morfologinių tipų sarkocistos, trys iš kurių identifikuotos kaip *S. capreolicanis*, *S. gracilis* ir *S. hofmanni*-like. Šios trys *Sarcocystis* rūšys jau anksčiau buvo aptiktos Lietuvoje ir jų morfologija šviesiniu mikroskopu detalai aprašyta (Kutkienė, 2001). Taip pat pirmą kartą Lietuvoje, vienoje iš visų tirtų stirnų rastos naujo morfologinio tipo sarkocistos. Cistų dydis siekė iki 0,9×0,4 mm, turėjo kiaušinio formą, buvo apgaubtos apie 6 μm storio skaidulinio sluoksnio kapsule, kurios nepavyko atskirti nuo cistos paviršiaus, esant kapsulei cistos sienelė

atrodė lygi. Šio tipo sarkocistos morfologiškai nebuvo atskiriamos nuo *S. hardangeri*, *S. ovalis*, *S. oviformis* rūšių. Šeruose nustatytos vieno tipo sarkocistos, kurios diagnozuotos kaip *S. miescheriana* rūšis. Tauriuosiuose elniuose nustatyti trys sarkocistų tipai, kurie, vertinant morfologines ypatybes, įvardinti *S. hofmanni-like*, *S. capreolicanis-like* ir *S. grueneri-like*. Tauriuosiuose elniuose aptiktos *S. capreolicanis-like* ir *S. hofmanni-like* rūšys pagal morfologinius požymius buvo identiškos *S. capreolicanis* ir *S. hofmanni-like* rūšims, parazituojančioms stirnose. Šiame darbe elniuose rasti sarkocistų tipai atitiko visus iki šiol Lietuvoje nustatytus sarkocistų tipus (Kutkienė, 2003). Stirnose ir tauriuosiuose elniuose pasitaikė mišrios infekcijos atvejų.

Briedžiuose aptiktos tik vieno tipo sarkocistos, tai kaspino formos cistos (iki 1,5 mm ilgio bei 0,1 mm storio) ant sienelės paviršiaus turinčios plauko formos iki 12 μm ilgio išaugas (4A pav.). Cistozoitai stambūs, banano formos (12,8–14,1×3,8–4,5 μm, n=25) (4B pav.). Tokios morfologijos sarkocistos briedžiuose Lietuvoje anksčiau nebuvo aptiktos. Analizuojant transmisiniu elektroniniu mikroskopu, cistos sienelė turėjo 10–12 μm ilgio plauko formos palinkusias išaugas, kurios pamatinėje dalyje išplatėjusios, o atstumai tarp išaugų pagrindų buvo beveik vienodi (4C pav.). Išaugos pasižymėjo netaisyklinga forma bei skirtingu dydžiu (4D pav.). Parazitoforinės vakuolės membrana turėjo įlinkimus, o išaugų viduje buvo matomi fibriliniai elementai bei mikrogranulės (4E pav.). Pagal Dubey ir Odening (2001) klasifikaciją cistos sienelė buvo panaši į 6-7 tipus.

Medžiojamosios faunos sarkosporidijų genetinių tyrimų rezultatai. Paukščių *Sarcocystis* rūšys genetiškai charakterizuotos naudojant 18S rRNR geno sekų, 28S rRNR geno dalinių sekų ir ITS-1 regiono sekų analizę, o žinduolių *Sarcocystis* rūšys – naudojant 18S rRNR geno sekų analizę. Genetiškai patvirtinta, jog šiame tyrime iš šernų raumenų išskirtos sarkocistos priklauso *S. miescheriana* rūšiai. *Sarcocystis* sp. išskirtos iš briedžio 18S rRNR geno seka 100% sutapo su *S. hjorti* rūšies iš tauriojo elnio GQ250990 ir briedžio EU282017 sekomis. *Sarcocystis* sp. iš stirnos, kuri pasižymi kiaušinio sarkocistų forma pagal 18S rRNR geno sekas identifikuota kaip *S. oviformis*. *S. capreolicanis* rūšies 18S rRNR geno sekos buvo nustatytos pirmą kartą. Šiame tyrime šešiuose izoliatuose nustatyta *S. gracilis* seka buvo identiška *S. gracilis* FJ196261 sekai. Sekvenavus dešimt iš stirnų išskirtų *S. hofmanni-like* izoliatų gautos 6 skirtingos sekos, kurių palyginimas parodė tarprūšinius skirtumus. Trys izoliatai priskirti *S. hofmanni-like*1, o kiti septyni – *S. hofmanni-like*2, nesuteikiant atskirų rūšių pavadinimų, nes išsamūs cistų sienelių ultrastruktūros palyginimai nebuvo atlikti. Naujai išskirtų rūšių 18S rRNR geno sekų identiškumo skirtumai svyravo nuo 3,8 iki 4,0%. Panaudojus genetinę analizę paaiškėjo, jog tauriuosiuose elniuose morfologiškai identifikuotos *S. hofmanni-like* ir *S. capreolicanis-like* priklauso atitinkamai *S. hofmanni-like*2 ir *S. hjorti* rūšims. Lyginant 18S rRNR geno sekas, *S. grueneri-like* skyrėsi nuo visų kitų *Sarcocystis* rūšių daugiau kaip 3,5%. *S. grueneri-like* negali būti priskiriama nei vienai sarkosporidijų rūšiai, kuriai nustatytos 18S rRNR geno sekos, todėl *S. grueneri-like* laikinai įvardinta *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus*, nesuteikiant specifinio rūšies pavadinimo dėl sarkocistų sienelės ultrastruktūros tyrimų trūkumo. Analizuojant 18S rRNR geno sekas tirtuose medžiojamuosiuose žinduoliuose identifikuotos aštuonios *Sarcocystis* rūšys: šeruose – *S. miescheriana*; briedžiuose – *S. hjorti*; stirnose – *S. capreolicanis*, *S. gracilis*, *S. hofmanni-like*1, *S. hofmanni-like*2, *S. oviformis*;

tauriuosiuose elniuose – *S. hjorti*, *S. hofmanni-like2*, *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus*, iš kurių *S. hjorti* ir *S. oviformis* Lietuvoje aptiktos pirmą kartą.

Laukiniuose žinduoliuose rastų sarkosporidijų vidurūšinė genetinė įvairovė, analizuojant 18S rRNR geno sekas buvo nedidelė, o sekų skirtumai buvo mažesni negu 0,4%. Skirtingos sekos tarp tirtųjų izoliatų aptiktos tik *S. hofmanni-like2* ir *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* rūšims. Tuo tarpu analizuotų žinduolių *Sarcocystis* rūšių sekų identiškumo vertės svyravo nuo 87,3% (*S. oviformis* lyginant su *S. capreolicanis*) iki 96,9% (*S. hjorti* lyginant su *S. capreolicanis*). Pagal 18S rRNR geno sekas, *S. miescheriana* artimiausia kiaulėje parazituojančiai *S. sui hominis* bei *S. hirsuta*, ir *S. buffalonis* rūšims, aptinkamoms naminiuose galvijuose. Stirnų, taurių elnių ir briedžių sarkosporidijų rūšys buvo genetiškai panašiausios *Sarcocystis* rūšims, parazituojančioms elnių šeimoje. Šiame darbe analizuojamoms žinduolių sarkosporidijų rūšims užfiksuoti mažiausi tarprūšiniai skirtumai (1%) buvo didesni už vidurūšinius skirtumus (< 0,4%), nustatytus lyginant tiriamųjų rūšių skirtingus izoliatų.

Paukščių sarkosporidijos pasižymėjo tarpusavio didžiausiais sekų panašumais. Paukščių *Sarcocystis* rūšių 18S rRNR geno sekų identiškumo skirtumai buvo labai nedideli ir neviršijo 1%. Analizuotų rūšių 28S rRNR geno sekų identiškumo reikšmės buvo mažesnės (95,2–99,7%) lyginant su 18S rRNR genu, tačiau tarprūšiniai skirtumai daugeliu atvejų buvo nedideli. Lyginant tirtų sarkosporidijų rūšių ITS–1 regiono sekas, nustatytas labai didelis sekų variabilumas. Mažiausias nustatytas analizuotų paukščių *Sarcocystis* parazitų tarprūšinis sekų identiškumo skirtumas buvo 6,4%, o tuo tarpu vidurūšiniai sekų skirtumai neviršijo 0,4%, todėl ITS–1 regiono sekos panaudotos labai giminingų paukščių *Sarcocystis* rūšių atskyrimui.

Šiame darbe, remiantis morfologiniais tyrimais, didžiojoje antyje nustatyta *S. rileyi* genetiškai skyrėsi nuo *S. rileyi*, identifikuotos didžiojoje antyje JAV tik vienu nukleotidu, kai buvo lyginamos ITS–1 regiono sekos. Tai pirmas genetiškai patvirtintas *S. rileyi* infekcijos atvejis Europoje. Remiantis DNR tyrimų rezultatais Lietuvoje keršuliuose pirmą kartą identifikuota *Sarcocystis* rūšis – *S. columbae*. Visos kitos iš paukščių, kaip tarpinių šeimininkų, išskirtos sarkosporidijų rūšys genetiškai charakterizuotos pirmą kartą. *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula*, *Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, *Sarcocystis* sp. (III cistos tipas) ex *Anser albifrons*, *Sarcocystis* sp. (V cistos tipas) ex *Corvus cornix* vertintinos kaip keturios skirtingos rūšys. Lyginant *Sarcocystis* parazitų izoliatų, pasižymintį pirmu cistos sienelės tipu iš baltaskruostės berniškės, didžiosios anties ir sidabrinio kiro ITS–1 regiono sekas, sekų identiškumo vertės svyravo nuo 99,8 iki 100%. DNR tyrimų rezultatai parodo, jog šios sarkosporidijos išskirtos iš trijų skirtingų tarpinių šeimininkų priklauso vienai rūšiai.

Naujų *Sarcocystis* rūšių aprašymas. Remiantis cistų sienelės ultrastruktūros tyrimų ir DNR analizės, naudojant 18S rRNR, 28S rRNR, ITS–1 žymenis rezultatais, buvo aprašytos keturios naujos *Sarcocystis* rūšys, sudarančios cistas paukščių raumenyse (5 pav.). *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Branta leucopsis* ir *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, įvardintos *Sarcocystis wobeseri*; *Sarcocystis* sp. (II cistos tipas) ex *Anas platyrhynchos*, įvardinta *Sarcocystis anasi*; *Sarcocystis* sp. (III cistos tipas) ex *Anser albifrons*, įvardinta *Sarcocystis albifronsi*; *Sarcocystis* sp. (V cistos tipas) ex *Corvus cornix*, įvardinta *Sarcocystis cornixi*. Pagal genetinius ir morfologinius tyrimų rezultatus, *Sarcocystis* sp., išskirta iš sidabrinio kiro (Charadriiformes būrys), nesiskyrė

nuo *S. wobeseri*, kurios tarpiniai šeimininkai – baltaskruostė berniklė ir didžioji antis (Anseriformes būrys). Iki šiol buvo žinomos tik dvi sarkosporidijų rūšys (*S. neurona* ir *S. falcatula*), kurių tarpiniai šeimininkai priklausytų skirtingiems būriams ar aukštesniems taksonomiiniams rangams. Dėl minėtos priežasties, kol neatlikti kryžminiai užkrėtimo eksperimentai, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus* pavadinta *S. wobeseri*-like.

Sarcocystis wobeseri Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2010

Tipinis tarpinis šeimininkas: baltaskruostė berniklė (*Branta leucopsis*). Kitas tarpinis šeimininkas – didžioji antis (*Anas platyrhynchos*).

Galutinis šeimininkas: nežinomas.

Vieta: Šilutės rajonas, vakarų Lietuva.

Genų Banko identifikavimo numeriai: GQ922885, GQ922886 (18S rDNR); GQ922887, GQ922888 (28S rDNR); GU475111, GU475112, JN256121 (ITS–1 regionas).

Tipiniai pavyzdžiai saugojami: transmisinės elektroninės mikroskopijos medžiaga saugoma Gamtos Tyrimų Centro, Ekologijos Instituto, Molekulinės Ekologijos Laboratorijoje, Vilnius, Lietuva.

Etimologija: rūšis pavadinta veterinarinės patologijos tyrimais pasižymėjusio Kanados mokslininko Gary Wobeser garbei, kuris pirmasis žąsyse surado sarkocistas turinčias 1 sienelės tipą.

Sarcocystis anasi Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2011

Tipinis tarpinis šeimininkas: didžioji antis (*Anas platyrhynchos*).

Galutinis šeimininkas: nežinomas.

Vieta: Šilutės rajonas, vakarų Lietuva.

Genų Banko identifikavimo numeriai: EU553477 (18S rDNR); EF079887 (28S rDNR); JF520779 (ITS–1 regionas).

Tipiniai pavyzdžiai saugojami: transmisinės elektroninės mikroskopijos medžiaga saugoma Gamtos Tyrimų Centro, Ekologijos Instituto, Molekulinės Ekologijos Laboratorijoje, Vilnius, Lietuva.

Etimologija: plaukiojančių ančių genties lotyniškas pavadinimas panaudotas sudarant rūšies vardą.

Sarcocystis albifronsi Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2011

Tipinis tarpinis šeimininkas: baltakaktė žąsis (*Anser albifrons*).

Galutinis šeimininkas: vienas iš galutinių šeimininkų – poliarinė lapė (*Alopex lagopus*).

Vieta: Šilutės rajonas, vakarų Lietuva.

Genų Banko identifikavimo numeriai: EU502868 (18S rDNR); EF079885 (28S rDNR); JF520780, JN256122 (ITS–1 regionas).

Tipiniai pavyzdžiai saugojami: transmisinės elektroninės mikroskopijos medžiaga ir histologiniai preparatai saugomi Gamtos Tyrimų Centro, Ekologijos Instituto, Molekulinės Ekologijos Laboratorijoje, Vilnius, Lietuva.

Etimologija: baltakaktės žąsies lotyniškas pavadinimas panaudotas sudarant rūšies vardą.

Sarcocystis cornixi Kutkienė, Prakas, Sruoga, Butkauskas, 2009

Tipinis tarpinis šeimininkas: varna (*Corvus cornix*).

Galutinis šeimininkas: nežinomas.

Vieta: Šilutės rajonas, vakarų Lietuva.

Genų Banko identifikavimo numeriai: EU553478 (18S rDNR); EF079884 (28S rDNR); JF520781, JN256120 (ITS–1 regionas).

Tipiniai pavyzdžiai saugojami: transmisinės elektroninės mikroskopijos medžiaga ir histologiniai preparatai saugomi Gamtos Tyrimų Centro, Ekologijos Instituto, Molekulinės Ekologijos Laboratorijoje, Vilnius, Lietuva.

Etimologija: varnos lotyniškas pavadinimas panaudotas sudarant rūšies vardą.

Sarcocystis rūšių filogenetinių tyrimų rezultatai. 18S rRNR geno sekų sulyginimas atliktas panaudojus 55 taksonų, priskiriamų skirtingoms rūšims, sekas, kurias sudarė 1858 nukleotidų pozicijos, įskaičiuojant ir tarpus. 28S rRNR geno sekų sulyginimas atliktas panaudojus 23 rūšių sekas, kurių ilgis 1625 nukleotidų pozicijos su tarpais. Filogenetiniame medyje, sudarytame panaudojus 18S rRNR geno sekas, išskirtos keturios filogenetinės grupės (I, II, III, IV), kurių buvimą paremia aukštos tikimybinės vertės (6 pav.). Daugiausia analizuotų sarkosporidijų rūšių, kurių tarpiniai šeimininkai yra porakanopiai žinduoliai, išsidėsto IV filogenetinio medžio grupėje. Ši grupė suskaidyta į tris smulkesnes (IVA, IVB, IVC) pagal galutinius šeimininkus nors IVB bei IVC išskyrimą paremia žema (0.61) tikimybinė reikšmė. Į IVB grupę patenka tik tos *Sarcocystis* rūšys, kurių galutiniai šeimininkai yra katinių šeimos plėšrūnai, IVC grupę formuoja *Sarcocystis* rūšys, kurių galutiniai šeimininkai yra šuninių šeimos plėšrūnai, iš IVA grupę sudarančių trijų *Sarcocystis* rūšių gyvybinis ciklas nustatytas tik *S. ovalis* rūšiai, jos galutiniai šeimininkai – paukščiai. *S. aucheniae* patikimai nesigrupavo su kitoms porakanopių sarkosporidijomis. *Sarcocystis* rūšys, pasižyminčios „graužikai–gyvatės“ gyvybiniu ciklu, formuoja III grupę, o *Sarcocystis* rūšys, pasižyminčios „graužikai–katinių šeimos plėšrūnai“ gyvybiniu ciklu, apjungiamos II grupėje. 15 *Sarcocystis* rūšių, tarp jų ir tirtosios paukščių sarkosporidijos bei du *Frenkelia* atstovai priskirti I filogramos grupei. 18S rRNR žymens skiriamoji raiška pasirodė esanti nepakankama, siekiant daryti patikimas išvadas apie filogenetinius ryšius tarp I grupės rūšių. Tirtosios aštuonios *Sarcocystis* rūšys, išskirtos iš medžiojamųjų porakanopių žinduolių, buvo išskaidytos į tris filogenetines grupes. *S. oviformis* parazituojanči stirnose grupavosi su morfologiškai neatskiriamomis *S. ovalis* ir *S. hardangeri* iš elninių. *S. hjorti*, *S. capreolicanis*, *S. gracilis*, *Sarcocystis* sp. ex *Cervus elaphus* filogenetiškai artimiausios porakanopių *Sarcocystis* rūšims, kurių galutiniai šeimininkai yra šuninių šeimos plėšrūnai. *S. hofmanni-like1* išskirtos iš stirnos ir *S. hofmanni-like2* – iš stirnos bei tauriojo elnio yra apjungiamos IVB grupėje kartu su sarkosporidijų rūšimis, pasižyminčiomis „porakanopiai žinduoliai–katinių šeimos plėšrūnai“ gyvybiniu ciklu. *S. hofmanni-like1* ir *S. hofmanni-like2* filogenetiškai artimiausios sarkosporidjoms, kurių tarpiniai šeimininkai elniniai – *S. tarandi*, *S. rangiferi* (parazituoja tauriuosiuose ir šiauriniuose elniuose), *Sarcocystis* sp. VI (parazituoja dėmėtuose elniuose).

Paukščių *Sarcocystis* rūšių filogenetiniai ryšiai nustatyti naudojant 28S rRNR geno sekų analizę (7 pav.). *S. anasi*, *S. albifronsi* ir *S. rileyi* apjungiamos į vieną filogenetinę grupę. *S. cornixi*, *S. columbae*, *S. wobeseri*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula* sudaro vieną filogenetinę grupę kartu su *S. calchasi*, *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus* ir dviem *Frenkelia* genties rūšimis. Šiame klasteryje suporuojamos *Frenkelia* genties abejos rūšys, *S. cornixi* su *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus*, *S. calchasi* su *S. wobeseri*, *S. columbae* su *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula*. Pažymėtina, kad *S. calchasi*, *Sarcocystis* sp. ex *Accipiter nisus*, *F. glareoli*. *F.*

microti galutiniai šeimininkai – plėšrieji paukščiai, o *S. rileyi* ir *S. albifronsi* galutiniai šeimininkai – plėšrieji žinduoliai. Paukščių sarkosporidijų rūšys filogenetiniame medyje atsiskiria į dvi grupes pagal galutinius šeimininkus, atitinkamai, paukščius ar žinduolius.

Rezultatų apibendrinimas. *Sarcocystis* parazitų cistos pirmą kartą Lietuvoje aptiktos varniniuose, karveliniuose ir sėjikiniuose paukščiuose (kove, kuosoje, varnoje, kėkšte, keršulyje, sidabriniam kire), bei dviejose žasinių paukščių rūšyse – baltaskruostėje berniklėje ir pilkojoje žasyje. Literatūriniuose šaltiniuose, kuriuose minimos tos pačios paukščių rūšys kaip ir šiame darbe, daugeliu atvejų nurodomas 40% neviršijantis *Sarcocystis* infekcijos ekstensyvumas tam tikroje paukščių rūšyje (Dylko, 1962; Chabreck ir kt., 1965; Hoppe, 1976; Drouin, Mahrt, 1979; Canaris ir kt., 1981; Pak, Eshtokina, 1984; Fedynich, Pense, 1992; Kutkienė, Sruoga, 2004). Šiame darbe baltakaktėje žasyje fiksuotas 43,2% infekcijos ekstensyvumas, varnoje – 35,9%, o didžiojoje antyje šis rodiklis siekė 20,0%. Gauti rezultatai yra panašūs į kitų autorių duomenis.

Analizuotų paukščių raumenyse be mikrocistų taip pat rastos makrocistos keturiuose didžiųjų ančių individuose. Europoje rastos makrocistos anksčiau detaliau nebuvo tiriamos, apžiūrėjus plika akimi buvo vertinama, jog tai greičiausiai *S. rileyi* rūšis. *S. rileyi* infekcija pasauliniu mastu buvo žinoma tik Šiaurės Amerikoje. Šiame darbe cistų sienelės ultrastruktūros ir DNR analizės duomenimis įrodyta, jog didžiosios antys *S. rileyi* rūšimi užsikrėtusios ir Europoje. Užkrėtimo eksperimentais, atliktais Kanadoje ir JAV nustatyta, kad *S. rileyi* galutinis šeimininkas yra dryžuotasis skusas (Cawthorn ir kt., 1981; Wicht, 1981). Pastarasis paplitęs išimtinai Š. Amerikoje, todėl lieka neaišku, koks gyvūnas platina šią rūšį Europoje. Siekiant įvertinti ančių užsikrėtimo lygį *S. rileyi* Lietuvoje bei visoje Europoje, reikalingi plataus masto tyrimai skirtinguose žemyno regionuose apžiūrint paukščių krūtinės raumenis ir diferencijuojant paukščius pagal amžių, nes jaunikliuose užsikrėtimas sarkocistomis diagnozuojamas patikimai rečiau (Hoppe, 1976).

Šiame darbe tirtuose medžiojamuosiuose žvėryse (šernuose, stirnose, tauriuosiuose elniuose, briedžiuose) registruotas 89,8% *Sarcocystis* parazitais infekcijos ekstensyvumas yra panašus, lyginant su ankstesniais darbais Lietuvoje, kai nustatytas ekstensyvumas svyravo nuo 80 iki 90% (Grikienienė ir kt., 2001; Kutkienė, Baleišis, 2001; Malakauskas ir kt., 2001; Malakauskas, Grikienienė, 2002). Lyginant su ankstesniais tyrimais Lietuvoje, kai intensyvi *Sarcocystis* parazitų infekcija stirnose nesiekė 30% (Malakauskas ir kt., 2001; Malakauskas, Grikienienė, 2002), šiame tyrime nustatyta patikimai daugiau intensyvios *Sarcocystis* parazitų infekcijos atvejų, kurie sudarė net 75,6% nuo bendro tirtų gyvūnų skaičiaus. Kol kas sunku būtų pateikti pagrįstas prielaidas aiškinančias šį reiškinį.

Patvirtinta, kad sarkosporidijų rūšys yra plačiai paplitusios Lietuvoje mėšai medžiojamuose paukščiuose ir žvėryse. Termiškai neapdorotos sumedžiotos mėsos nedavimas šunims ar kitiems naminiams mėsėdžiams, galintiems platinti sarkosporidjas, yra pagrindinis nereikalaujantis didelių išlaidų prevencinis veiksmas *Sarcocystis* parazitų infekcijos sumažinimui. Todėl rekomenduojama medžiotojams išsamiai susipažinti su *Sarcocystis* rūšių biologija, bei jų plitimo keliais.

I sarkocistų tipui priklausančios sarkocistos išskirtos iš baltaskruostės berniklės, didžiosios anties, keršulio, sidabrinio kiro turėjo tą patį 1 cistos sienelės tipą. Šis sienelės tipas nustatytas daugiau kaip 20 *Sarcocystis* rūšių, kurių šeimininkai priklauso

įvairioms sistematinėms grupėms (Odening, 1998). *S. calchasi*, parazituojančios naminiame karvelyje ir *S. columbae*, randamos keršulyje, cistų sienelės irgi priskirtinos I cistų sienelių tipui (Olias ir kt., 2010b; 2010c). 18S rRNR, 28S rRNR genų bei ITS–1 regiono DNR sekų analizė parodė, jog tirtuose paukščiuose egzistuoja mažiausiai trys sarkosporidijų rūšys (*S. wobeseri*, *S. columbae*, *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Corvus monedula*) turinčios I cistos sienelės tipą. Taigi, šie rezultatai parodo, kad morfologinės analizės nepakanka atskiriant kai kurias paukščių sarkosporidijų rūšis.

Sarcocystis sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus* pagal tirtas morfologines ir genetines charakteristikas atitiko *S. wobeseri* rūšį. Kadangi vienos sarkosporidijų rūšies parazitavimas skirtingiems būriams priklausančiose tarpinių šeimininkų rūšyse yra labai retas reiškinys, kol kas *Sarcocystis* sp. (I cistos tipas) ex *Larus argentatus* pavadinta *S. wobeseri*-like. Vėlesni kryžminiai užkrėtimo eksperimentai turėtų patvirtinti arba paneigti *S. wobeseri* parazitavimą sidabriniam kire.

Be anksčiau Lietuvoje stirnose aptiktų *S. gracilis*, *S. capreolicanis*, *S. cf. hofmanni* rūšių taip pat rastos kiaušinio formos sarkocistos, kurios genetiškai identifikuotos kaip *S. oviformis* rūšis. *S. hofmanni* rūšis, parazituojanči barsuke, buvo aprašyta Vokietijoje (Odening ir kt., 1994a). Morfologiškai nuo *S. hofmanni* neatskiriamos sarkosporidijos taip pat identifikuotos elninių šeimos rūšyse: stirnoje, tauriajame elnyje, danielyje, baltasnukiam elnyje (*Cervus albirostris*), Indiniam zambare (*Cervus unicolor*) (Sedlaczek, Wesemeier, 1995; Wesemeier, Sedlaczek, 1995a; Wesemeier, Sedlaczek, 1995b; Odening, 1997). Šios sarkosporidijos buvo įvardijamos kaip *S. cf. hofmanni* (*S. cf. hofmanni* atitinka *S. hofmanni*-like). Šio darbo metu atlikti molekuliniai tyrimai parodė, jog egzistuoja dvi rūšys, kurios naudojant šviesinės mikroskopijos analizę įvardintos *S. hofmanni*-like. Remiantis 18S rRNR geno sekų analize, *S. hofmanni*-like išskaidyta į *S. hofmanni*-like1 ir *S. hofmanni*-like2, nesuteikiant joms atskirų rūšių pavadinimų, nes išsamūs cistų sienelių ultrastruktūros palyginimai nebuvo atlikti. Analizuojant šviesiniu mikroskopu buvo pastebėti morfologiniai cistos sienelės skirtumai tarp *S. hofmanni*-like1 ir *S. hofmanni*-like2, tačiau kol kas šių dvejų rūšių atskyrimas šviesiniu mikroskopu yra problematiškas. Gjerde (2011) remiantis cistų sienelės ir 18S rRNR geno sekų ypatumais aprašė naują stirnų *Sarcocystis* rūšį – *S. silva*. Ši rūšis pagal morfologinius ir molekulinis diagnostinius požymius atitinka *S. hofmanni*-like1. Tikėtina, kad detalesnė morfologinė analizė leistų ir *S. hofmanni*-like2 aprašyti kaip atskirą rūšį, tačiau kol šie tyrimai neatlikti, *S. hofmanni*-like1 ir *S. hofmanni*-like2 toliau darbe vadinamos, atitinkamai, *S. silva* ir *S. hofmanni*-like.

Šiame tyrime pirmą kartą Lietuvoje aptikta *S. hjorti* rūšis morfologiškai ryškiai skyrėsi nuo iki šiol briedžiuose identifikuotų *Sarcocystis* spp. (Grikienienė ir kt., 2001; Kutkienė, 2002). Pagal 18S rRNR geno sekas tauriuosiuose elniuose identifikuotos *S. hofmanni*-like, *S. hjorti*, *S. sp. ex Cervus elaphus*. Lygiasienes sarkocistas sudaranti *S. sp. ex Cervus elaphus*, vertinant šviesiniu mikroskopu, buvo panaši į *S. cervicanis*, aprašytą tauriuosiuose elniuose (Hernández-Rodríguez ir kt., 1981), tačiau reikalingi tolimesni cistų sienelių elektroninės mikroskopijos tyrimai siekiant išsiaiškinti ar šios rūšys yra sinonimai.

Dauguma *Sarcocystis* rūšių aptinkamos tik vienoje tarpinių šeimininkų rūšyje (Dubey ir kt., 1989). Kartais morfologiškai panašios sarkocistos randamos taksonomiškai artimose tarpinių šeimininkų rūšyse (Odening, 1998). Šiame darbe molekuliniais tyrimais parodyta, jog *S. wobeseri* tarpiniais šeimininkais tarnauja mažiausiai dvi žąsinių paukščių rūšys (baltaskruostė berniklė ir didžioji antis).

Remiantis 18S rRNR geno sekų analize nustatyta, kad *S. silva* sudaro sarkocistas stirnose ir briedžiuose (Dahlgren, Gjerde, 2008 įvardinta kaip *Sarcocystis* sp. TypeD), o *S. hofmanni*-like sudaro sarkocistas stirnose ir tauriuosiuose elniuose, taip pat dar kartą pavirtinta, jog *S. hjorti* sudaro sarkocistas tauriuosiuose elniuose ir briedžiuose.

18S rRNR ir 28S rRNR genų filogramose šakų ilgiai tarp *Sarcocystis* rūšių, kurių tarpiniai šeimininkai – paukščiai yra reikšmingai trumpesni, lyginant su sarkosporidijų rūšimis, kurių tarpiniai šeimininkai – žinduoliai ar ropliai. Manoma, jog paukščių sarkosporidijos yra jaunos, neseniai atsiskyrusios rūšys. Daugeliu atvejų fiksuoti nedideli (iki 1%) tarprūšiniai skirtumai lyginant paukščių *Sarcocystis* rūšių 18S rRNR ir 28S rRNR genų sekas. Pastebėta, jog kai kurių žinduolių ir roplių *Sarcocystis* rūšių vidurūšinė įvairovė yra didesnė, lyginant su paukščių sarkosporidijų tarprūšine įvairove (Šlapeta ir kt., 2002a; Dahlgren, Gjerde, 2010). Dėl minėtų priežasčių identifikuojant paukščių sarkosporidijas naudotas ITS–1 regionas. Paukščių *Sarcocystis* rūšių genetiniam atskyrimui kiti autoriai taip pat taikė ITS–1 regiono sekų analizę (Marsh ir kt., 1999; Dubey 2001a; Dubey 2006b; Olias 2009; Dubey 2010; Olias 2010c). Taip pat naudojant molekulinę analizę nustatyta, jog tirtosios paukščių sarkosporidijų rūšys yra artimai giminingos patogeninėms *S. calchasi*, *S. falcatula*, *S. neurona* rūšims.

Tirtosios medžiojamosios faunos *Sarcocystis* rūšys filogenetiniuose medžiuose grupavosi pagal morfologinių požymių panašumus ir pagal gyvybinio ciklo ypatumus, *Sarcocystis* rūšys grupavosi labiau pagal galutinius negu tarpinius šeimininkus. Anksčiau buvo nustatytas ryšys tarp naminiuose gyvuliuose parazituojančių sarkosporidijų rūšių filogenetinio giminingumo ir šių rūšių fenotipinių požymių, didžiausią dėmesį kreipiant į sarkocistų sienelių išvaizdą (Holmdahl ir kt., 1999). Šiame darbe pastebėta, kad elnių ir paukščių *Sarcocystis* rūšys pasižymi panašia sarkocistų sienelių ir cistozoitų morfologija, filogenetiniuose medžiuose susigrupuoja kartu. Būtina pažymėti, jog ne visoms tirtosioms sarkosporidijų rūšims žinomi galutiniai šeimininkai, tad filogenetinį grupavimąsi pagal parazito gyvybinį ciklą vertėtų laikyti hipoteze. Pastaraisiais metais nustatyti *S. ovalis*, *S. hjorti*, *S. alces*, *S. calchasi* galutiniai šeimininkai praktikoje patvirtina išdėstytą hipotezę (Gjerde, Dahlgren, 2010; Dahlgren, Gjerde, 2010b; Olias ir kt., 2010a).

IŠVADOS

1. Aštuoniolikoje Lietuvos laukinės faunos rūšių atrastos *Sarcocystis* parazitų cistos, iš jų septyniose (baltaskruostėje berniklėje, pilkojoje žąsyje, kove, kuosoje, varnoje, kėkšte, keršulyje, sidabriniam kire) sarkocistos aptiktos pirmą kartą. Žinduoliuose, lyginant su paukščiais, nustatyti patikimai ($p < 0,05$) aukštesni infekcijos ekstensyvumo bei intensyvumo rodikliai.
2. Analizuojant *Sarcocystis* parazitų cistų sienelių ir cistozoitų morfometrines charakteristikas tirtuose paukščiuose išskirti keturi morfologiniai mikrocistų tipai, o makrocistos aptiktos tik didžiojoje antyje.
3. Europoje pirmą kartą nustatyta *S. rileyi* rūšis.
4. Remiantis sarkocistų ultrastruktūros ir DNR analizės duomenimis aprašytos keturios naujos mokslui paukščių *Sarcocystis* rūšys: *S. albifronsi*, *S. wobeseri*, *S. anasi*, *S. cornixi*.
5. Panaudojus originalų molekulinį tyrimų metodą rūšių diagnostikai, Lietuvoje pirmą kartą nustatytos *S. columbae*, *S. oviformis*, *S. hjorti*, *S. silva* rūšys,

parazituojančios atitinkamai keršuliuose, stirnose, tauriuosiuose elniuose ir briedžiuose bei stirnose ir briedžiuose.

6. Tirtosios medžiojamosios faunos *Sarcocystis* rūšys 18S rRNR, 28S rRNR genų filogenetiniuose medžiuose grupuojasi pagal sarkocistų morfologinių požymių panašumą bei filogenetiškai artimos *Sarcocystis* rūšys parazituoja taksonomiškai artimose galutinių šeimininkų rūšyse.
7. Molekulinių rezultatų analizė parodė, kad kai kurios paukščių ir elninių *Sarcocystis* rūšys (*S. wobeseri*, *S. hjorti*, *S. silva*, *S. hofmanni-like*) gali parazituoti daugiau negu vienoje tarpinių šeimininkų rūšyje.

**ARTICLES ON THE SUBJECT OF THE DISSERTATION
DISERTACIJOS TEMA PUBLIKUOTI STRAIPSNIAI**

1. Butkauskas, D., Sruoga, A., Kutkienė, L., **Prakas, P.** 2007. Investigation of the phylogenetic relationships of *Sarcocystis* spp. from greylag (*Anser anser*) and white-fronted (*Anser albifrons*) geese to other cyst forming coccidia using 18S and 28S rRNA gene sequences. Acta Zool Lituonica 17(2): 124-127.
2. **Prakas, P.**, Butkauskas, D., Sruoga, A., Kutkienė, L. 2008. Genetic characterisation of *Sarcocystis* species from European roe deer (*Capreolus capreolus*) based on ssu rRNA gene partial sequences. Animal Husbandary 51: 83-91.
3. Kutkienė, L., **Prakas, P.**, Sruoga, A., Butkauskas, D. 2009. *Sarcocystis* in the birds family Corvidae with description of *Sarcocystis cornixi* sp. nov. from the hooded crow (*Corvus cornix*). Parasitol Res 104(2): 329-336.
4. Kutkienė, L., **Prakas, P.**, Sruoga, A., Butkauskas, D. 2010. The mallard duck (*Anas platyrhynchos*) as intermediate host for *Sarcocystis wobeseri* sp. nov. from the barnacle goose (*Branta leucopsis*). Parasitol Res 107(4): 879-888.
5. Kutkienė, L., **Prakas, P.**, Sruoga, A., Butkauskas, D. 2011. Identification of *Sarcocystis rileyi* from the mallard duck (*Anas platyrhynchos*) in Europe: cyst morphology and results of DNA analysis. Parasitol Res 108(3): 709-714.
6. **Prakas, P.**, Kutkienė, L., Sruoga, A., Butkauskas, D. 2011. *Sarcocystis* sp. from the herring gull (*Larus argentatus*) identity to *Sarcocystis wobeseri* based on cyst morphology and DNA results. Parasitol Res (DOI 10.1007/s00436-011-2421-5).
7. Kutkienė, L., **Prakas, P.**, Sruoga, A., Butkauskas, D. 2011. Description of *Sarcocystis anasi* sp. nov. and *Sarcocystis albifronsi* sp. nov. in birds of the order Anseriformes. Parasitol Res (DOI 10.1007/s00436-011-2588-9).
8. **Prakas, P.**, Butkauskas, D., Sruoga, A., Švažas, S., Kutkienė, L. 2011. Identification of *Sarcocystis columbae* in wood pigeons (*Columba palumbus*) in Lithuania. Veterinarija ir Zootechnika 55(77): 33-39.

**ABSTRACTS OF CONFERENCE REPORTS
KONFERENCIJŲ TEZĖS**

1. Kutkienė, L., **Prakas, P.**, Butkauskas, D., Sruoga, A. 2009. *Sarcocystis* spp. in the mallards (*Anas platyrhynchos*) and in the bird family Turdidae. The 3rd Symposium of the Scandinavian Baltic Society for Parasitology: 27. Riga.
2. **Prakas, P.**, Butkauskas, D., Sruoga, A., Kutkienė, L. 2009. Molecular characterization of *Sarcocystis* spp. from some bird species based on ssu rRNA gene sequence analysis. 5th International Conference Research and Conservation of Biological Diversity in Baltic Region: 108. Daugavpils.
3. **Prakas, P.** 2009. Molecular investigation of *Sarcocystis* spp. in the birds order Anseriformes. 4th International Student Conference Biodiversity and functioning of aquatic ecosystems in the Baltic sea region: 28. Dubingiai.
4. **Prakas, P.**, Kutkienė, L., Sruoga, A., Butkauskas, D. 2011. Investigations of *Sarcocystis* spp. in birds of the order Anseriformes. The IVth Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology (SBSP): 56. Oslo.

5. Butkauskas, D., **Prakas, P.**, Sruoga, A., Kutkienė, L., Švažas, S. 2011. Investigation of *Sarcocystis* in domestic pigeons (*Columba livia* f. domestica) and woodpigeons (*Columba palumbus*) in Lithuania. The IVth Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology (SBSP): 75. Oslo.
6. Švažas, S., **Prakas, P.**, Kutkienė, L., Sruoga, A., Butkauskas, D. 2011. Sarcocysts *Sarcocystis columbae* detected in woodpigeons *Columba palumbus*. XXXth IUGB (International Union of Game Biologist) Congress and Perdix XIII: 286. Barcelona.

CURRICULUM VITAE

Name: Petras Prakas

Date and place of birth:

20 February 1983, Vilnius district, Lithuania

Education:

2007-2011 PhD studies at the Institute of Ecology of Vilnius University.

2005-2007 Master's Degree in Microbiology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University.

2001-2005 Bachelor's Degree in Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University.

Contacts:

Nature Research Centre, Institute of Ecology, Laboratory of Molecular Ecology, Akademijos 2, LT-08412, Vilnius, Lithuania.

Phone + 370 6 718 51 23.

E-mail petrasprakas@yahoo.com; pprakas@ekoi.lt.