

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Biodiverzita myxozoi v přehradní nádrži  
Římov zjištěná analýzou environmentální  
DNA

Diplomová práce

Bc. Monika Bürgerová

Školitel: RNDr. Martina Lisnerová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.

České Budějovice 2023

M. Bürgerová, 2023: Diverzita myxozoi v přehradní nádrži Římov zjištěná analýzou environmentální DNA [Biodiversity of myxozoan parasites in the Římov Reservoir determined by environmental DNA analysis, Mgr. Thesis, in Czech] – 84 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

Myxozoans represent a diverse group of microscopic endoparasites primarily infecting fish, including over 2,600 nominal species. Despite the extensive number of described species, their diversity remains still unexplored and underestimated. The detection and surveillance of myxozoan parasites in previously unexamined areas can reveal crucial pathogens linked to fish mortality and discover myxozoans biodiversity. This thesis investigates the parasite diversity in the Římov Reservoir, focusing on myxozoan detection through environmental DNA (eDNA). A comparison of detected diversity at various sites and in different environmental samples across the Římov Reservoir unveiled interesting patterns of read abundance and number of OTUs within each myxozoan clade. This study underscores the importance of eDNA analysis in detecting pathogens and assessing biodiversity in myxozoan parasites.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, dne 7. 12. 2023

Bc. Monika Bürgerová

## **Poděkování**

Ráda bych vyjádřila své upřímné díky všem, kteří mi pomohli při dokončování této diplomové práce. Za odborné vedení a trpělivost během celého procesu zpracování této práce bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Martině Lisnerové, Ph.D.. Dále děkuji RNDr. Ivanu Fialovi, Ph.D. za cenné rady a konzultace, které mi poskytl. Také RNDr. Petru Blabolilovi, Ph.D. děkuji za dodání vzorků sedimentu, vody a ryb z Římovské přehradní nádrže.

Velké poděkování patří všem pracovníkům Laboratoře rybí protistologie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR za jejich podnětné připomínky a za vytvoření příjemného pracovního prostředí, ve kterém jsem mohla práci realizovat.

Neméně důležité je i poděkování mé rodině za podporu a umožnění mého studia. Vaše neocenitelná podpora mi byla velkou oporou.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Teoretická část diplomové práce</b> .....	<b>2</b>
2.1. Myxozoa jako parazité.....	2
2.2. Morfologie, taxonomie a životní cyklus.....	3
2.3. Hospodářský a ekonomický význam .....	12
2.4. Fylogeneze .....	12
2.5. Diverzita .....	16
2.6. Environmentální DNA.....	19
2.7. Přehradní nádrž Římov a její diverzita ryb a myxozoi .....	20
<b>3. Cíle práce a hypotézy</b> .....	<b>22</b>
<b>4. Metodika</b> .....	<b>23</b>
4.1. Materiál, zpracování vzorků a izolace DNA .....	23
4.1.1. Sediment .....	23
4.1.2. Voda.....	25
4.1.3. Ryby.....	26
4.2. Molekulární analýza .....	27
4.3. Bioinformatické analýzy.....	30
4.4. Fylogenetické analýzy .....	30
4.5. Biostatistické analýzy .....	31
<b>5. Výsledky</b> .....	<b>32</b>
5.1. Molekulární analýza .....	32
5.2. Bioinformatické analýzy.....	32
5.2.1. Srovnání diverzity a abundance myxozoi.....	32
5.2.2. Srovnání diverzity a abundance myxozoi na lokalitách .....	35
5.2.3. Srovnání diverzity a abundance myxozoi v prostředích.....	39
5.2.4. Srovnání diverzity a abundance myxozoi v rybách.....	44
5.2.5. Srovnání diverzity a abundance myxozoi v různých hloubkách sedimentu.....	46
5.2.6. Srovnání diverzity a abundance myxozoi v různých hloubkách vody .....	47

5.3.	Fylogenetické analýzy .....	49
<b>6.</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>55</b>
6.1.	Porovnání celkové diverzity myxozoi v prostředích .....	55
6.2.	Detekce myxozoi na lokalitách.....	58
6.3.	Detekce myxozoi v různých hloubkách ve vodě .....	59
6.4.	Detekce myxozoi v rybách .....	60
<b>7.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>Zdroje .....</b>	<b>63</b>

# 1. Úvod

Myxozoa Grassé, 1970 neboli česky rybomorky (kmen žahavci) představují skupinu mikroskopických endoparazitů (Fook & Siddall 2015). Reprezentují jeden z mnoha případů morfologického zjednodušení v důsledku parazitizmu a nejenom pro svůj mikroskopický vzhled byla dříve řazena mezi Protista (např. Corliss 1984). Avšak s příchodem modernějších molekulárních metod byla definitivně přiřazena mezi Metazoa (Smothers et al. 1994; Schlegel et al. 1996).

Podkmen Myxozoa je rozdělen na dvě skupiny – druhově bohatou Myxosporea Bütschli, 1881 a druhově chudou Malacosporea Canning et al., 2000. Druhová bohatost obou skupin myxozoi je odrazem biodiverzity jejich definitivních hostitelů – kroužkoců a mechovek (Okamura et al. 2018). Myxosporea jsou schopna ve svém životním cyklu infikovat celou řadu obratlovců jako své mezihostitele (např. Mutschmann 2004; Prunescu et al. 2007; Bartholomew et al. 2008; Espinoza et al. 2017; Lisnerová et al. 2020; Lisnerová et al. 2022a) a jejich definitivními hostiteli jsou kroužkovci (např. Wolf & Markiw 1984, Holzer et al. 2004; Rocha 2019). Na druhou stranu u třídy Malacosporea jsou jedinými známými mezihostiteli paryby a ryby a definitivním hostitelem jsou mechovky (Patra et al. 2017; Ruggeri et al. 2020; Naldoni et al. 2021). Do této skupiny je zařazeno v současnosti pouze pět popsáných druhů ve dvou rodech – *Buddenbrockia* Schröder, 1910 a *Tetracapsuloides* Canning et al., 2002 (Schröder 1910; Canning et al. 2002; Canning et al. 2008; Bartošová-Sojková et al. 2014; Hartikainen et al. 2014; Patra et al. 2017; Naldoni et al. 2019; Naldoni et al. 2021), ve druhé skupině, Myxosporea, je popsáno přes 2600 druhů v celkem 63 rodech (Fiala et al. 2015a; Freeman & Kristmundsson 2018). Můžeme ale očekávat, že množství popsáných druhů/rodů neustále poroste, vzhledem k obrovskému počtu potenciálních zatím parazitologickým zkoumáním nedotknutých obratlovců i bezobratlých hostitelů a doposud neprozkoumaným geografickým oblastem (např. Alama-Bermejo et al. 2023; Lisnerová et al. 2023). Už nyní ale s celkovým počtem popsáných druhů zaujímají obě skupiny více jak 20 % celkové diverzity žahavců (Fiala & Bartošová 2010; Holzer et al. 2018; Okamura et al. 2018).

I přes to, že studium těchto parazitů urazilo kus cesty, stále čelíme výzvám při objasňování životních cyklů, objevování diverzity, zjišťování hostitelského spektra, fylogeneze a evoluce. S objasňováním diverzity myxozoi by mohly pomoci metody založené na detekci parazitů z environmentální DNA, které by usnadnily identifikaci rybomerek a pomohly při monitoringu významných patogenů (Bass et al. 2023).

## 2. Teoretická část diplomové práce

### 2.1. Myxozoa jako parazité

Žahavci jsou volně žijící, draví mnohobuněční živočichové. Patří mezi ně koráli, mořské sasanky a medúzy. Ty se vyskytují v mořích jako přisedlé stádium polypa nebo volně se pohybující medúzy. Mají poměrně jednoduché tělní uspořádání – pouze dvě vrstvy (ektoderm a entoderm) a žahavé buňky neboli knidocyty, které jim slouží k lovu a obraně. Mezi žahavci vznikl parazitizmus několikrát. Napříč celou skupinou existuje dalších devět parazitických linií/řádů (Okamura & Gruhl 2021). I toto číslo ale bude pravděpodobně vyšší, vzhledem k tomu, že o biologii parazitických žahavců toho zatím víme jen málo (Collins et al. 2008; Appeltans et al. 2012; Okamura & Gruhl 2021).

Myxozoa se objevila na Zemi přibližně před 750 miliony lety a k jejich diverzifikaci došlo přibližně před 600 miliony lety. V té době jim jako hostitelé sloužili pouze tehdejší kroužkovci a mechovky, protože ke vzniku obratlovců na Zemi došlo o několik desítek milionů let později. To znamená, že původními hostiteli rybomorek jsou kroužkovci a mechovky a až druhotně došlo k osídlení obratlovců (Holzer et al. 2018). Do současnosti se myxozoím podařilo během evoluce osídlit prakticky všechny skupiny obratlovců, kdy nejčastějšími hostiteli jsou ryby, konkrétně kostnaté ryby (Lisnerová et al. 2020). Myxozoa jsou tak jediní doposud známí žahavci se zcela parazitickým životním cyklem, který zahrnuje střídání dvou hostitelů bez volně žijícího trofického stádia. Hlavní fylogenetické linie myxozoí reflektují fylogenezi jejich bezobratlých hostitelů (Holzer et al. 2018). V rámci jednotlivých linií pozorujeme fylogenetické trendy sledující zejména místa infekce u obratlovcích hostitelů (skupiny infikující žlučový měchýř, ledviny či svalovinu) (Fiala 2006, Liu et al. 2019).

Sesterskou skupinou myxozoí je na základě molekulárních analýz a morfologických podobností *Polypodium hydriforme* Ussov, 1885 (Okamura & Gruhl 2016). *P. hydriforme* je parazit ryb, podobně jako Myxozoa. S rybomorkami ho ale spojuje daleko více znaků – má stejný typ pólových váček, kterými infikuje své rybí hostitele, vývojové stádium buňka v buňce a mitochondrie s tubulárními kristami (Raikova 2008). Dalším znakem, který spojuje tyto dvě skupiny s žahavci, je např. mesodermální uspořádání svaloviny (Seipel & Schmidt 2006). O příbuznosti těchto dvou taxonů byla nicméně řada pochybností, a to díky velmi dlouhým větvím, které tyto taxony ve fylogenetických stromech tvoří a mohou se uměle přitahovat. Přesto v současnosti na základě analýz genomických dat už není pochyb, že *P. hydriforme* je nejbližší fylogenetická linie myxozoí (Novosolov et al. 2022).



## 2.2. Morfologie, taxonomie a životní cyklus

Rybmorky jsou extrémně morfologicky redukování žahavci, jejichž studium fylogeneze bylo dlouhou dobu opřeno tajemstvím. O tom svědčí i fakt, že představa o fylogenetické pozici byla více ujasněna až na konci minulého století na základě molekulárních analýz a ultrastrukturních poznatků (Desser et al. 1983; Smothers et al. 1994; Schlegel et al. 1996), a to i přesto, že rybmorky jsou známé již od první poloviny 19. století (Jurine 1825). Právě jejich mikroskopický vzhled a zjednodušení je důvod, proč byly rybmorky dříve klasifikovány jako jednobuněčné organismy (např. Levine et al. 1980; Corliss 1981; Corliss 1984). V minulosti kvůli svým morfologickým podobnostem polárních váčků a polárních vláken, vytvářely společně s mikrosporidii taxon zvaný *Cnidospora Doflein*, 1901 (např. Lom & Vávra 1965). Později ale Weill (1938) upozornil na podobnost polárních váčků s knidocyty žahavců. Dnes již s jistotou víme, že Myxozoa patří mezi mnohobuněčné živočichy, se kterými je spojují znaky jako například pro živočichy typické buněčné spoje, separace zárodečné a somatické linie buněk a další diference somatické linie (Schlegel et al. 1996).

Podkmen Myxozoa se dělí na dvě třídy Myxosporea a Malacosporea, kdy tyto skupiny čítají dohromady 65 rodů (Fiala et al. 2015a; Freeman & Kristmundsson 2018). K početně nejvýznamnějším rodům patří: *Ceratomyxa* Thélohan, 1892; *Henneguya* Thélohan, 1892; *Kudoa* Mechlitsch, 1947 a *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Eiras et al. 2014; Fiala et al. 2015a; Eiras et al. 2018; Eiras et al. 2021; Rangel et al. 2023). Nomenklaturu podkmenu Myxozoa znázorňuje tabulka I.

Tab. I: Nomenklatura skupiny Myxozoa (převzato z: Fiala et al. 2015a).

**Kmen:** Cnidaria

**Nezařazený podkmen:** Myxozoa

**Třída:** Malacosporea

**Řád:** Malacovalvulida

**Čeď:** Saccosporidae: *Buddenbrockia*, *Tetracapsuloides*

**Třída:** Myxosporea

**Řád:** Bivalvulida

**Podřád:** Variisporina

**Čeď:** Sphaeromyxidae: *Sphaeromyxa*

**Čeď:** Myxidiidae: *Myxidium*, *Zschokkella*, *Enteromyxum*,  
*Sigmomyxa*, *Soricimyxum*, *Cystodiscus*

**Čeď:** Ortholineidae: *Ortholinea*, *Neomyxobolus*, *Cardimyxobolus*,  
*Triangula*, *Kentmoseria*

**Čeď:** Sinuolineidae: *Sinuolinea*, *Myxodavisia*, *Myxoproteus*,  
*Bipteria*, *Paramyxoproteus*, *Neobipteria*, *Schulmania*, *Noblea*,  
*Latyspora*

**Čeď:** Fabesporidae: *Fabespora*

**Čeď:** Ceratomyxidae: *Ceratomyxa*, *Meglitschia*, *Ellipsomyxa*,  
*Ceratonova*

**Čeď:** Sphaerosporidae: *Sphaerospora*, *Wardia*, *Palliatius*

**Čeď:** Myxobilatidae: *Myxobilatus*, *Acauda*, *Hoferellus*

**Čeď:** Chloromyxidae: *Chloromyxum*, *Caudomyxum*, *Agarella*

**Čeď:** Coccomyxidae: *Coccomyxa*, *Auerbachia*, *Globospora*

**Čeď:** Alatosporidae: *Alatospora*, *Pseudoalatospora*, *Renispora*

**Čeď:** Parvicapsulidae: *Parvicapsula*, *Neoparvicapsula*, *Gadimyxa*

**Podřád:** Platysporina

**Čeď:** Myxobolidae: *Myxobolus*, *Spirosuturia*, *Unicauda*, *Dicauda*,  
*Phlogospora*, *Laterocaudata*, *Henneguya*, *Hennegoides*,  
*Tetrauronema*, *Thelohanellus*, *Neothelohanellus*, *Neohenneguya*,  
*Trigonosporus*

**Řád:** Multivalvulida

**Čeď:** Trilosporidae: *Trilospora*, *Unicapsula*

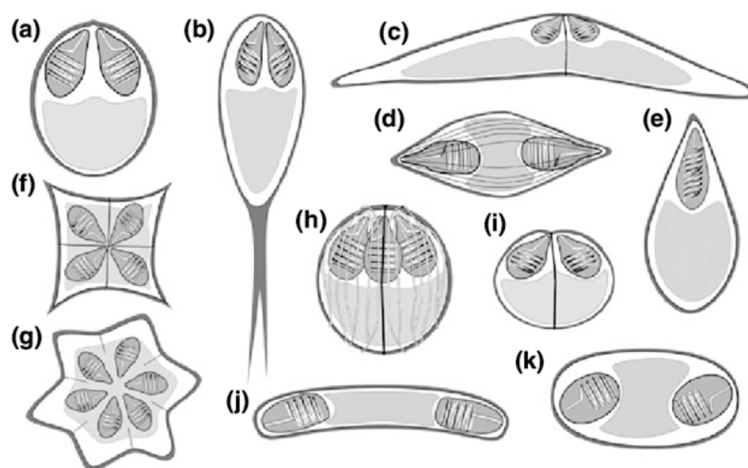
**Čeď:** Kudoidae: *Kudoa*

**Čeď:** Spinavaculidae: *Octospina*

Nejasné zařazení u Multivalvulida: *Trilosporoides*

Myxosporea tvoří dva morfologicky odlišné typy spor. V obratlovčím mezihostiteli to jsou myxospory, v definitivním hostiteli aktinospory. Morfologie myxospor je v rámci této skupiny poměrně variabilní. Morfotypy myxospor jsou vyobrazeny na obrázku 1. Může se sestávat z jednoho až čtyř pólových váčků s pólovými vlákny (u rodu *Kudoa* se vyskytují čtyři a více pólových váčků (Eiras et al. 2014)) (Siddall et al. 1995), která vytvářejí různý počet závitů, přičemž morfologické znaky stěžejní pro zařazení myxosporeí do rodu jsou právě tvar, počet a pozice pólových váčků, počet závitů pólových vláken, tvar a symetrie spor. Tato vytvořená klasifikace a taxonomie na základě spor přetrvává až dodnes, avšak jednoznačné morfologické hranice mezi jednotlivými rody jsou nejasné, např. u rodů *Ellipsomyxa* Kōie, 2003, *Myxidium* Bütschli, 1882, *Sigmomyxa* Thélohan, 1895 a *Zschokkella* Auerbach, 1910

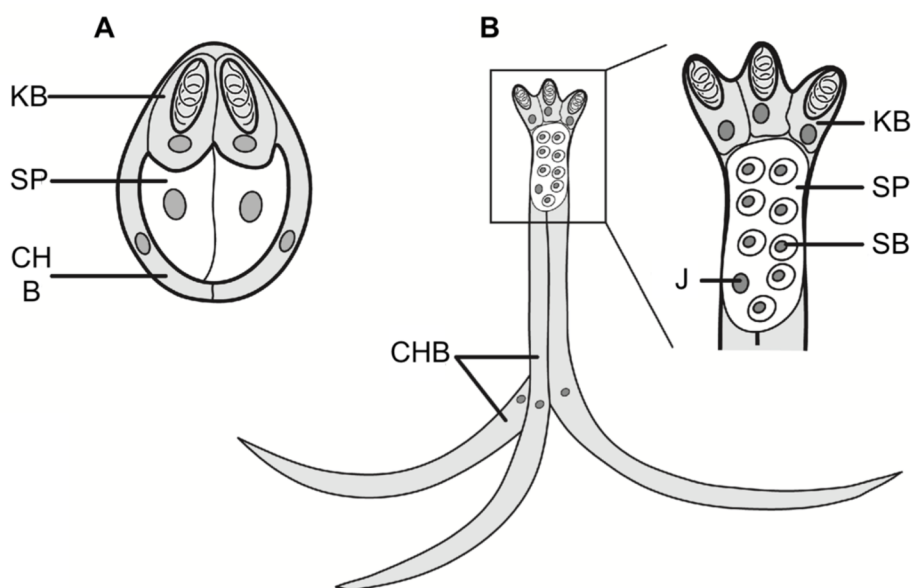
jsou spory morfologicky velice podobné – protáhlé se dvěma pólovými váčky (Fiala et al. 2015a). Na druhové úrovni je navíc nutné sledovat i další znaky jako hostitelský druh a jeho stanoviště a vegetativní stádia parazita (Lom & Arthur 1989). Dalším problémem klasifikace na základě morfologických znaků je to, že neodpovídá fylogenezi této skupiny, většina rodů je tak polyfyletických či parafyletických (viz kapitola 2.4. Fylogeneze) (např. Fiala 2006; Liu et al. 2019). Kromě pólových váček s pólovými vlákny je myxospora tvořena dvěma jednojadernými nebo jednou dvoujadernou sporoplasmou a chlopnovými buňkami (Gruhl 2015). Myxospora je vyobrazena na obrázku 2.



Obr. 1: Vyobrazení různých morfologických typů myxospor. (a) *Myxobolus*; (b) *Henneguya*; (c) *Ceratomyxa*; (d) *Myxidium*; (e) *Thelohanellus*; (f) *Kudoa* (se čtyřmi pólovými váčky); (g) *Kudoa* (se šesti pólovými váčky); (h) *Chloromyxum*; (i) *Sphaerospora*; (j) *Sphaeromyxa*; (k) *Zschokkella* (převzato z: Fiala et al. 2015b).

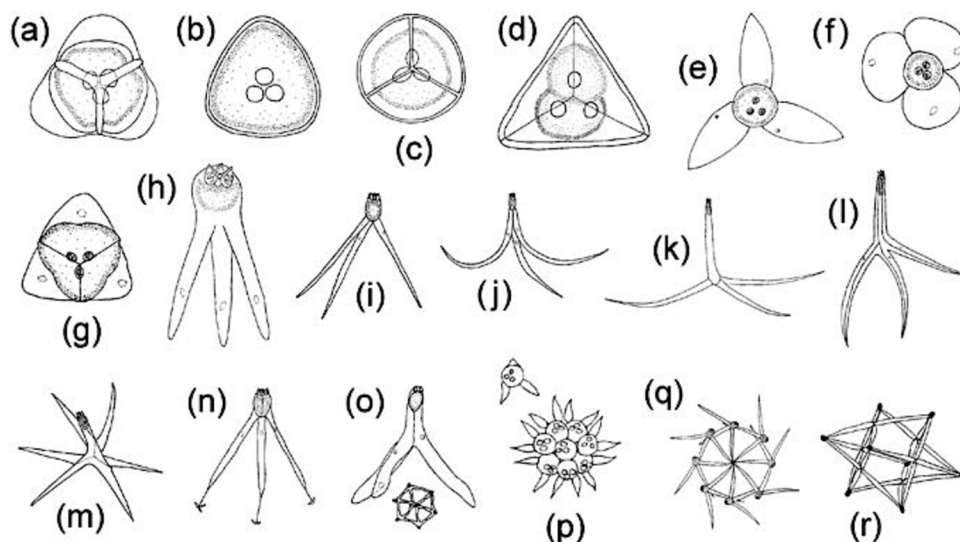
Rod *Myxobolus* Bütschli, 1882 je druhově nejpočetnějším rodem myxozoí, zahrnuje druhy parazitující v různých tkáních a orgánech ryb z mořského, sladkovodního i brakického prostředí (např. Yokoyama et al. 2004; Karlsbakk et al. 2017; Liu et al. 2019; Lisnerová et al. 2020). V mezihostiteli vytvářejí dorsoventrálně zploštělé spory se dvěma pólovými váčky hruškovitého tvaru, které mohou být různě velké. Právě tvar spor může být důvodem, proč jsou infekce těmito parazity tak úspěšné u různých hostitelů i v různých prostředích (Lisnerová et al. 2020). Obrázek 1(a) znázorňuje morfologii spory rodu *Myxobolus*. Při určování jednotlivých druhů je ale nutné sledovat i další vývojová stádia a zaměřit se na hostitele a jeho ekologii (viz výše). Rod *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 se vyznačuje podlouhlými myxosporami, které mají tvar rohlíku či půlměsíce. Morfologie spory je znázorněna na obrázku 1(c). Jsou to coelozoičtí parazité mořských ryb, jen několik druhů je popsáno z ryb

sladkovodních (Lom & Dyková 2006) (např. *Ceratomyxa hungarica* Molnár, 1992 parazituje v ledvinách hlavačky mramorované (Molnár 1992)). Rod *Kudoa* Meglitsch, 1947 tvoří myxospory hvězdicovitého (čtyřboké) tvaru se čtyřmi a více pólovými váčky hruškovitého tvaru (obrázek 1(f), Eiras et al. 2014). Jsou to parazité svalové tkáně mořských ryb, jen výjimečně infikují i jiné tkáně (např. Joy 1972). Rod *Henneguya* Thélohan, 1892 má myxospory se dvěma pólovými váčky protáhlého tvaru a chlopňové buňky vytvářejí dva kaudální výběžky (obrázek 1(b)). Popsané jsou druhy ze sladkovodních, mořských i brakických obratlovců (např. Iwanowicz et al. 2008; Griffin et al. 2009; Bahri et al. 2010).



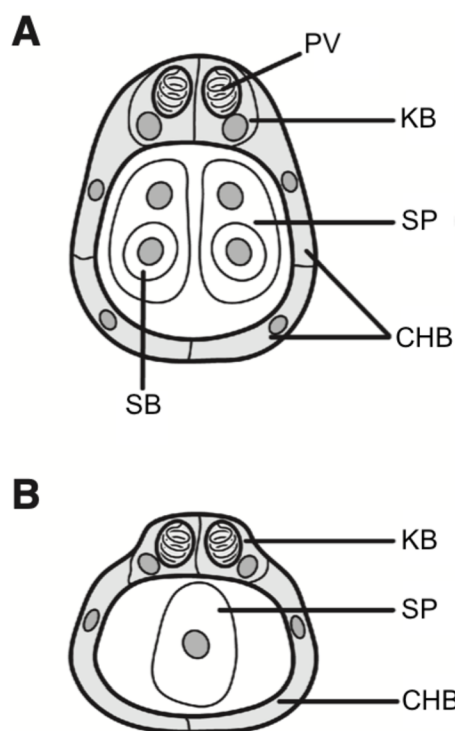
Obr. 2: Morfologie myxospory (A) a aktinospory (B). KB – kapsulogenní buňka se vznikajícím pólovým váčkem; SP – sporoplasma; CHB – chlopňové buňky; SB – sekundární buňka; J – jádro (převzato z: Gruhl 2015, upraveno).

Aktinospory infikující ryby jsou triradiálně souměrné, nejčastěji vyobrazované jako tzv. kotva neboli triaktinomyxon, který je naplněný sporoplasmou s infekčními stádii (obrázek 2B). Nejrozšířenější morfotyp je Aurantiactinomyxon, který je znázorněn na obrázku 3(e). Aurantiactinomyxon je tvořen třemi chlopňovými buňkami, třemi pólovými váčky a velkým počtem sporoplasem – infekčních stádií. Vyskytuje se u rodů *Chloromyxum* Mingazzini, 1890; *Henneguya*; *Hoferellus* Berg, 1898; *Myxobolus*; *Paramyxidium* Freeman & Kristmundsson, 2018; *Thelohanellus* Kudo, 1933 a *Zschokkella* (Rocha 2023). Další morfologické typy aktinospor jsou zobrazeny na obrázku 3. Aktinospory mají také pólové váčky a pólová vlákna, kterými se přichytávají na hostitele, podobně jako myxospory (Lom & Dyková 1992).



Obr. 3: Vyobrazení různých morfologických typů aktinospor. (a) Endocapsa; (b) Sphaeractinomyxon; (c) Tetraspore; (d) Tetractinomyxon; (e) Aurantiactinomyxon; (f) Neoactinomyxum; (g) Neoactinomyxum; (h) Guyenotia; (i) Echinactinomyxon; (j) Raabeia; (k) Triactinomyxon; (l) Pseudotriactinomyxon; (m) Hexactinomyxon; (n) Ormieractinomyxon; (o) Siedleckiella; (p) Synactinomyxon; (q) Synactinomyxon; (r) Antonactinomyxon (převzato z: Weist & Longshaw 2006).

Malacosporea vytvářejí v mechovkách vakovitá nebo červovitá stádia naplněná malakosporami (obrázek 4A). Ty jsou tvořeny dvěma sporoplasmami, z nichž každá obklopuje jednu sekundární buňku a dvěma pólovými váčky (Patra et al. 2017). V případě druhu *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Canning et al., 1999) dochází k infekci lososovitých ryb, kde vznikají rybí malakospory se dvěma pólovými váčky a sporoplasmou (obrázek 4B) (Canning et al. 2000; Gruhl 2015).



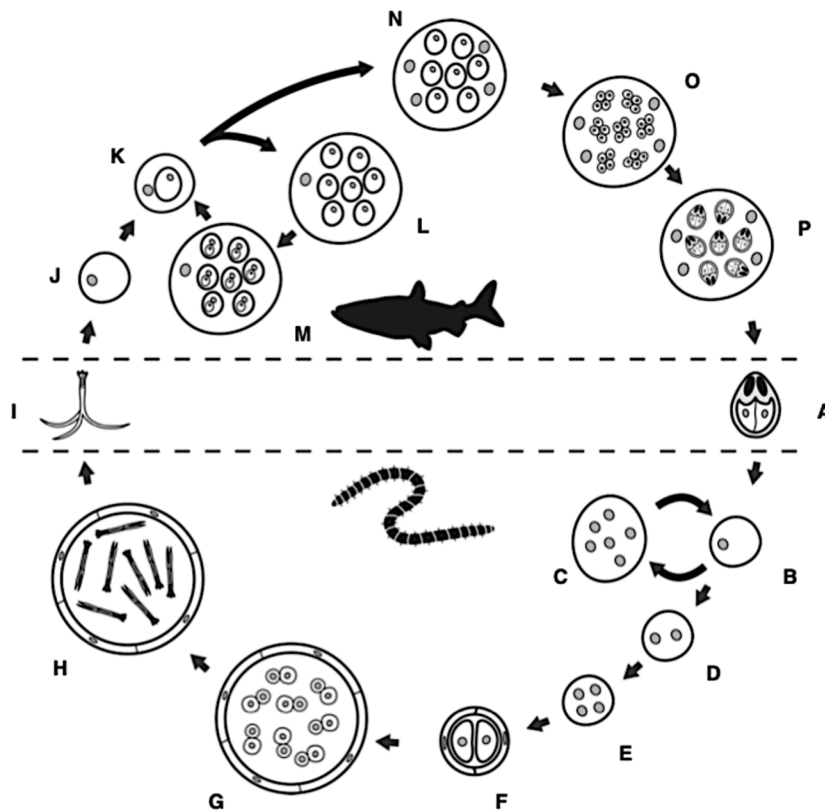
Obr. 4: Morfologie malakospory (A) a rybí malakospory (B). PV – polární váček; KB – kapsulogenní buňka; SP – sporoplasma; CHB – chlopněvé buňky; SB – sekundární buňka (převzato z: Gruhl 2015, upraveno).

Většinu minulého století byla vývojová stádia reprezentovaná myxosporami a aktinosporami považována za dva různé druhy, která vytvářela společný taxon (viz výše), do kterého patřily skupiny: Myxosporidia, Actinomyxidia a Microsporidia (Lom & Vávra 1962). Až objev komplexního životního cyklu myxozoí pomohl zredukovat počty taxonomických skupin, na druhou stranu ale otevřel dveře studiu dvou životních stádií komplexního životního cyklu myxozoí (Okamura & Gruhl 2015). V současné době už víme, že Myxozoa mají dixenní, tedy dvouhostitelský, životní cyklus. Mezihostitelem jsou vždy obratlovci, nejčastěji ryby, ale jsou popsány druhy i z paryb, obojživelníků, plazů, ptáků, a dokonce i savců (např. Bartholomew et al. 2008; Hartigan et al. 2012; Székely et al. 2015; Espinoza et al. 2017; Naldoni et al. 2021; Lisnerová et al. 2022a). Fylogenetické analýzy naznačují, že původními hostiteli myxozoí jsou paryby a další obratlovce rybomorky osídlily až později (Fiala et al. 2015b; Kodádková et al. 2015; Lisnerová et al. 2022a). Definitivními hostiteli jsou zástupci z kmene kroužkvců nebo mechovek (např. Patra et al. 2017; Atkinson et al. 2019).

V současné době jsou životní cykly známy jen u 50 druhů rybomorek, což je při počtu 2600 popsaných druhů jen kolem 2 % (Atkinson & Bartholomew 2009; Eszterbauer et al. 2015; Fiala et al. 2015a). Problémů při zkoumání životních cyklů u těchto mikroskopických

organismů je hned několik: neznalost definitivních hostitelů (kroužkovců a mechovek) pro většinu druhů rybomerek; neznámá morfologie aktinospor v definitivních hostitelích a zejména nízká prevalence rybomerek v definitivních hostitelích a v některých případech i mezihostitelích (Okamura 1996; Nehring et al. 2003; Eszterbauer et al. 2015; Patra et al. 2018; Naldoni et al. 2019).

Prvním, kompletně popsaným životním cyklem, byl v roce 1984 cyklus druhu *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903. Ten probíhá mezi pstruhem duhovým (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)), u kterého způsobuje vrtohlavost, a nitěnkou obecnou (*Tubifex tubifex* (Müller, 1774)) (Wolf & Markiw 1984; Hedrick et al. 1998). Celý cyklus má dvě fáze – myxosporeovou a aktinosporeovou (obrázek 5). Myxosporeová fáze začíná infekcí obratlovčího mezihostitele aktinosporou a končí vznikem myxospory. Když aktinospora přijde do kontaktu s vhodným mezihostitelem, vystřelí pólová vlákna z pólových váčků a uvolní infekční sporoplasmu do těla mezihostitele. Ta dále proliferuje a výsledkem jsou vývojová stádia označována jako buňka v buňce, kdy uvnitř primární (mateřské) buňky vznikají endogenně sekundární (dceřiné) buňky. Buňky se následně množí, diferencují a vznikají z nich mnohjaderné útvary – plasmodia. Ta se mohou vyvíjet buď v tkáních (např. v ledvinách nebo játrech (Molnár et al. 2009)) nebo v tělních dutinách (např. v orgánech vylučovací soustavy (Pereira et al. 2022)). V plasmodiích vznikají následně dalším dělením buněk zralé myxospory (Wolf & Markiw 1984). Laboratorní studie naznačují, že myxospory opouštějí mezihostitele až po jeho smrti, případně močí (podle tkáňové lokalizace) nebo v případě, že je pozřený predátorem, který ho následně vyloučí (El-Matbouli et al. 1992). Myxospory následně napadají bezobratlého hostitele za pomoci pólových vláken, která vystřelí a vypouštějí do něj infekční stádia. V definitivním hostiteli probíhá aktinosporeová fáze, která zahrnuje pohlavní rozmnožování rybomorky, a jejíž výsledkem jsou aktinospory schopné infikovat obratlovce (Wolf & Markiw 1984; Lom & Dyková 2006).

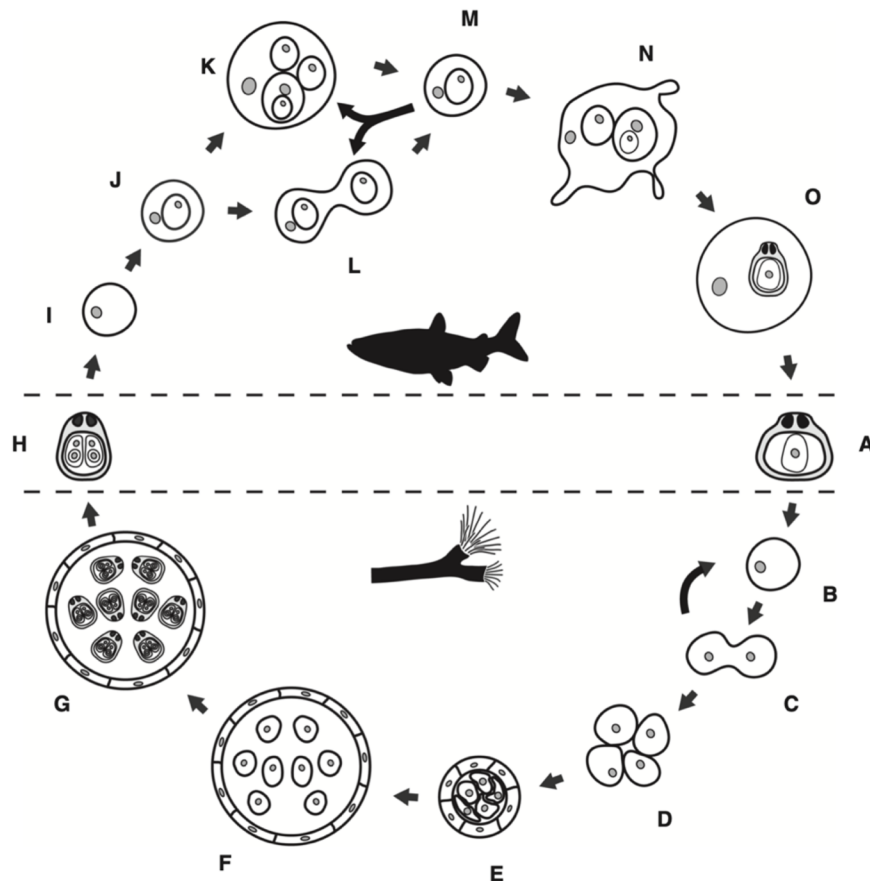


Obr. 5: Životní cyklus myxosporeí. (A) myxospora; (B) sporoplasma vstupující do kroužkovce prostřednictvím pokožky nebo střevního epitelu; (C) extrasporogonická proliferace; (D) dvoujaderná buňka; (E) čtyřjaderná buňka; (F) pansporocysta skládající se ze čtyř buněk; (G) pansporocysta s osmi zygotami; (H) zralá pansporocysta s osmi aktinosporami; (I) aktinospora; (J) sporoplasma uvolňující se z aktinospory po penetraci hostitelské pokožky; (K) endogenní primární a sekundární stádium; (L), (M) extrasporogenní proliferace; (N) vícejaderné plasmodium obsahující několik sekundárních buněk; (O) sporoblast; (P) zralé plasmodium (převzato z Gruhl 2015).

U malakosporeí je životní cyklus nejvíce prozkoumaný u druhu *T. bryosalmonae*. Víme ale, že jednotlivé životní cykly se u různých druhů trochu liší. V definitivním hostiteli – mechovce tvoří malakospory a jsou přichyceny v tělní dutině. *T. bryosalmonae* může být ve fázi ataku definitivního hostitele v inaktivním stádiu a infekce může být tedy inaparentní. Propukne až vlivem stavu hostitele a dochází k množení. Raná mnohobuněčná stádia připomínají svojí velikostí spíše jednobuněčné organismy, dalším růstem ale vzniká útvar o velikosti až 300  $\mu\text{m}$ . V další fázi vývoje dochází ke sporogonii a diferenciaci jednotlivých tkání, konkrétně svalové a epiteliární. Následně se parazit oddělí od stěny tělní dutiny a pohybuje se volně v coelomu. Nato dochází ke sporogonii a meióze. Vznikají spory, které zůstávají ve vaku. Každá zralá spora má dvě sporoplasmy, čtyři kapsulogenní buňky a osm



chlopňových buněk. Vstupní branou do rybího meziphostitele je pravděpodobně epidermis nebo hlenové buňky (Grabner & El-Matbouli 2010). V ledvinách probíhá extrasporogonické dělení, ze kterého vznikají plasmodia (mnohojaderné útvary se sekundárními útvary). Sekundární útvary se nadále diferencují na kapsulogenní a chlopňové buňky a z každého plasmodia tak vzniká jedna rybí malakospora, ty se uvolňují z ryby spolu s močí (Gruhl 2015). Celý životní cyklus malakosporeí, konkrétně druhu *T. bryosalmonae*, popisuje obrázek 6.



Obr. 6: Životní cyklus malakosporeí (ukázán na druhu *Tetracapsuloides bryosalmonae*). (A) rybí malakospora; (B) sporoplazma se dostává do mechovky přes střevní epitel a epidermis; (C) proliferace v hostitelském coelomu; (D) raný shluk buněk; (E) rané kompaktní dvoujaderné stadium; (F) nezralý váček, sporogonální buňky volně plovoucí ve vnitřní dutině. (G) zralý váček naplněný spori; (H) malakospora; (I) zárodek sporoplazmy pronikající do rybího hostitele přes pokožku; (J) endogenní stadium se sekundární buňkou; (K) proliferace (mitotické dělení) a uvolnění sekundárních buněk; (L) další proliferace mitotickým dělením primárních a sekundárních buněk; (M) endogenní stadium se sekundární buňkou; (N) sporogonické pseudoplasmodium; (O) zralé sporogonické pseudoplasmodium (převzato z Gruhl 2015).

### 2.3. Hospodářský a ekonomický význam

Rybmorky si nezískaly pozornost kvůli jejich infekci kroužkovců a mechovek. Definitivní hostitelé jsou ekonomicky bezvýznamní, a tak se jejich studiu nedostává tolik pozornosti. Čím na sebe ale rybmorky upoutaly pozornost je jejich negativní vliv na mezhospitele – ryby. Některé druhy rybmorek mají velký hospodářský a ekonomický význam a jsou zodpovědné za ztráty ve velkochovech ryb. Jednou z ekonomicky významných rybmorek ze skupiny Myxosporea je druh *M. cerebralis* způsobující vrtohlavost lososovitých ryb (z anglického whirling disease). Tento druh napadá centrální nervovou soustavu a u ryby se projevuje plaváním v kruzích, deformací těla, konkrétně zkrivením páteře a zčernalým ocasem (Hedrick et al. 1998). Na lososovitých rybách parazituje i *Kudoa thyrsites* (Gilchrist, 1924), která má ovšem širší hostitelské spektrum a postihuje i jiné ekonomicky významné ryby. Zástupci tohoto druhu vytvářejí pseudocysty uvnitř svalové tkáně. Tyto pseudocysty jsou izolovány od imunitního systému, až na intenzivní infekce, kdy mohou způsobovat záněty v okolí pseudocysty. I přes to, že u živých ryb je *K. thyrsites* zdánlivě asymptomatická (kromě intenzivních infekcí), po smrti ryby ale způsobuje posmrtnou lyzi svalové tkáně a tím velké ekonomické škody (Kent & Poppe 1999). *Ceratonova shasta* (Noble, 1950) parazituje v trávicím traktu lososů a pstruhů, kde způsobuje záněty, které mohou vést až k perforaci střeva, a taktéž se objevuje i sekundární bakteriální infekce. Nemoc se také projevuje celkovou letargií ryby a ztrátou hmotnosti (Bartholomew et al. 1989).

*T. bryosalmonae* je rybmorka ze skupiny Malacosporea parazitující u lososovitých ryb a také u štik. Projevuje se celkovou bledostí ryby a způsobuje PKD (z anglického proliferative kidney disease), napadá ledviny, které se vlivem parazita zvětšují (Hendrick et al. 1986).

### 2.4. Fylogeneze

Fylogenetická pozice rybmorek byla dlouhou dobu nejasná, a to i přes to, že jejich patologické působení u ryb bylo známé už v první polovině 19. století (Jurine 1825). Definitivně bylo jejich zařazení mezi žahavce potvrzeno až na konci minulého století (viz kapitola 2.2. Morfologie, taxonomie a životní cyklus).

Jejich klasifikace byla a stále je založena na morfologických vlastnostech myxospor z obratlovčích hostitelů (viz kapitola 2.2. Morfologie, taxonomie a životní cyklus). Toto řazení se však neslučuje s fylogenezí této skupiny. Skutečné vztahy mezi rybmorkami jsou založené spíše na jejich hostitelském spektru, tkáňové specifitě a habitatu, ve kterém žijí, než na vzhledu

spory (Fiala 2006; Holzer et al. 2018). Zároveň fylogeneze myxozoi odráží fylogenezi jejich původních hostitelů – bezobratlých (viz kapitola 2.1. Myxozoa jako parazité).

Rybomorky se dělí na dvě fylogenetické větve – Myxosporea a Malacosporea. Fylogeneze skupiny Myxosporea se dále člení na tři linie: sladkovodní linii, jejíž definitivním hostitelem jsou kroužkovci ze skupiny Oligochaeta Grube, 1850; mořskou linii, jejíž zástupci infikují kroužkovce skupiny Polychaeta Grube, 1850 a linii *Sphaerospora sensu stricto*, pro které bezobratlé hostitele doposud neznáme (Fiala & Bartošová 2010; Bartošová et al. 2013; Holzer et al. 2018).

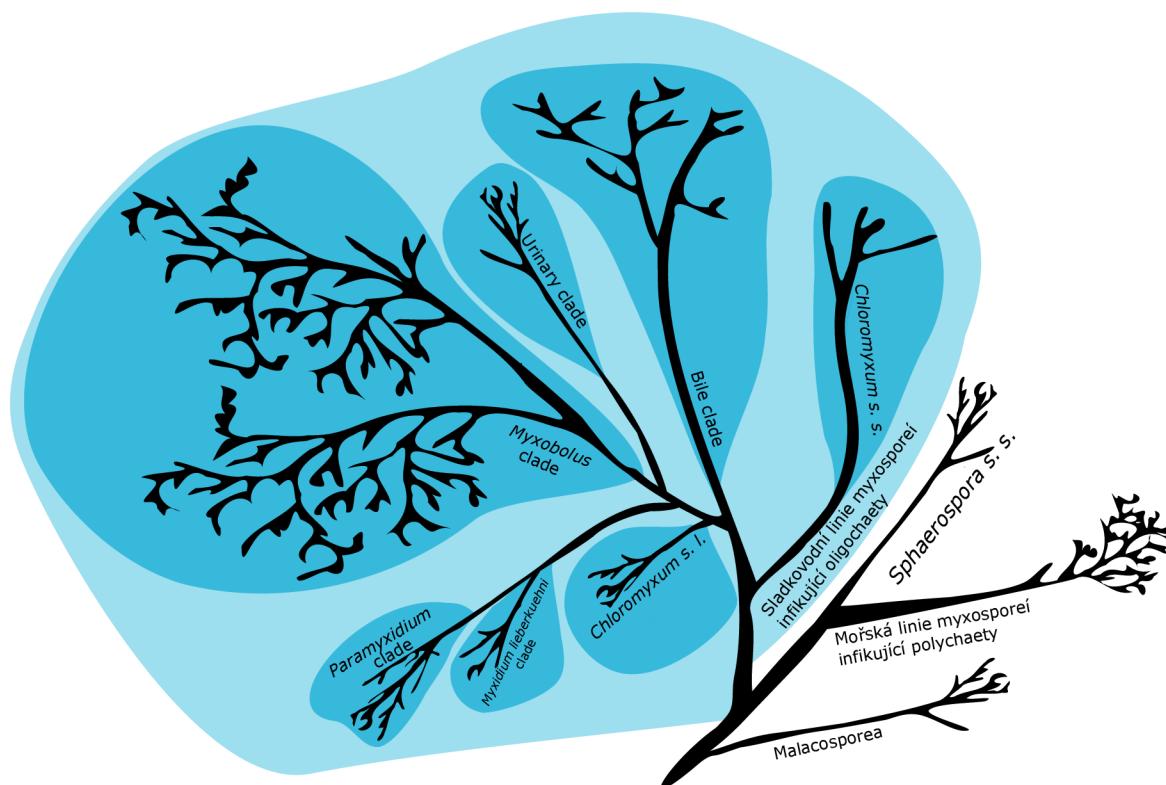
Taxonomicky vytvořený rod *Sphaerospora* Thélohan, 1892 nekorresponduje s fylogenezí. Druhy zařazené do rodu *Sphaerospora* náleží do více fylogenetických skupin. Linie *Sphaerospora sensu stricto* je také označována jako pravé sphaerospory a řadí se do ní většina druhů z rodu *Sphaerospora*. Tato skupina infikuje většinou vylučovací soustavu (ledviny nebo močový měchýř) mořských a sladkovodních ryb, paryb a obojživelníků, zatímco skupina *Sphaerospora sensu lato* je schopná infikovat mořské, sladkovodní, ale i brakické obratlovce (Lom & Dyková 2006; Jirků et al. 2007; Bartošová et al. 2013; Liu et al. 2018; Patra et al. 2018; Lisnerová et al. 2022b). Předchozí studie ukazují, že *Sphaerospora sensu lato* nejsou pravé sphaerospory a měla by být tedy překlasifikována (např. Diamant et al. 2005; Bartošová et al. 2011; Jones et al. 2011; Casal et al. 2019), naproti tomu *Sphaerospora sensu stricto* tvoří linii na bázi skupiny Myxosporea (Bartošová et al. 2013; Holzer et al. 2018).

Fylogenetické vztahy uvnitř mořské a sladkovodní linie myxosporeí neodpovídají taxonomii. Velká část rodů je tak para- nebo polyfyletických a jednotlivé klejdy tedy dohromady nespojuje a vzájemně neodděluje morfologie spor, nýbrž prostředí, ve kterém žijí a koevoluce s jejich hostiteli. Například pro rod *Henneguya* jsou typické dva kaudální přívěsky. Tyto přívěsky byly ale pozorovány i u druhů z jiného rodu – *Myxobolus* (*Myxobolus tsangwuensis* a *Myxobolus oralis*). Jejich společným znakem však je infekce kaprovitých ryb ve sladkovodním prostředí (Liu et al. 2019).

Do sladkovodní linie myxosporeí patří klejdy: *Myxobolus* clade, který se ještě dále dělí na další subklejdy podle typu hostitele (*Myxobolus* subclade I–VIII, dle Liu et al. 2019), z nichž je nejpočetnější *Myxobolus* subclade VIII, který typicky infikuje kaprovité ryby. Do této skupiny patří zástupci z rodů *Myxobolus*, *Henneguya*, *Hennegoides* Lom, Tonguthai et Dyková, 1991, *Unicauda* Davis, 1944 a *Thelohanellus* Kudo, 1933 (Liu et al. 2019). Dalším druhově významným klejdem ve sladkovodní linii je i Bile clade (žlučníkový klejd), jehož zástupci jsou schopni infikovat i jiné obratlovce než jenom ryby (obojživelníky, plazy, ptáky a savce) (Dyková et al. 2007; Bartholomew et al. 2008; Roberts et al. 2008; Hartigan et al.

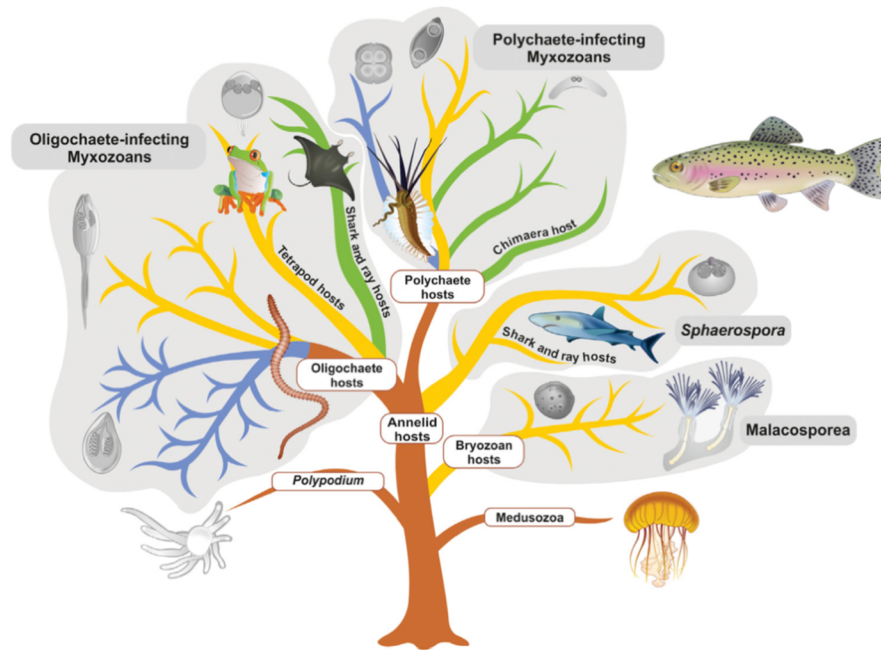
2012). Další kladby ze sladkovodní linie jsou Urinary clade, *Myxidium lieberkuehni* clade, *Chloromyxum sensu lato* a *Chloromyxum sensu stricto* a *Paramyxidium* clade (Fiala et al. 2015a; Freeman & Kristmundsen 2018). Jednotlivé skupiny sladkovodní linie jsou vyznačeny na obrázku 7.

Do mořské linie myxosporeí patří k druhově bohatým *Ceratomyxa* clade, do které se řadí převážně zástupci rodu *Ceratomyxa*. Dále sem patří Gall bladder clade, do kterého klastruje celkem sedm různých rodů (*Auerbachia* Meglitsch, 1968; *Myxidium*; *Coccomyxa* Léger et Hesse, 1907; *Ellipsomyxa* Koie, 2003; *Sigmomyxa* Thélohan, 1895; *Sinuolinea* Davis, 1917 a *Zschokkella*). Většina zástupců infikující močovou soustavu obratlovců klastruje do mořského Urinary clade, kam patří zástupci rodů *Parvicapsula* Schulman, 1953, *Sphaerospora*, *Zschokkella*, a další. V mořské linii je i *Kudoa* clade, který obsahuje zástupce ze skupiny *Kudoa* Meglitsch, 1947 a *Sphaerospora* (Diamant et al. 2005; Fiala 2006) a dále druhově chudé kladby *Enteromyxum* clade a *Ceratonova* clade (Fiala & Bartošová 2010; Breyta et al. 2020).



Obr. 7: Fylogenetický strom skupiny Myxozoa. Světle modře je zvýrazněná linie sladkovodních myxosporeí infikující oligochaety, na které je zaměřena tato diplomová práce (kromě linie *Chloromyxum s. s.*). Dále jsou znázorněny skupiny Malacosporea, *Sphaerospora sensu stricto* a mořská linie myxosporeí infikující polychaety (převzato z: Lisnerová et al. 2023, upraveno).

O fylogenezi malakosporeí toho víme méně než o jejich sesterské skupině – myxosporeích. Malacosporea ve svých definitivních hostitelích mechovkách vytvářejí vakovitá nebo červovitá stádia s velkou morfologickou podobností, což v jeden okamžik vedlo k synonymizování dvou druhů – *T. bryosalmonae* a *Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910 (Canning et al. 2002; Monteiro et al. 2002; Canning et al. 2007). Avšak následné fylogenetické analýzy dokázaly, že se jedná o dva různé druhy, nikoliv dva morfotypy stejného organismu (Tops et al. 2005; Jiménez-Guri et al. 2007; Bartošová-Sojková et al. 2014; Hartikainen et al. 2014). Dva morfotypy se nacházejí napříč celou větví skupiny Malacosporea, navíc se zde vyskytuje i další morfotyp: protáhlý vakovitý s laloky, který se vyskytuje u doposud nepopsané linie malakosporeí (Patra et al. 2017). Fylogenetické analýzy založené na genu pro SSU rDNA také odhalily, že kromě pěti doposud popsáných druhů se v celé skupině malakosporeí vyskytují další linie, které mohou reprezentovat druhy, ale i celé rody (Bartošová et al. 2014; Hartikainen et al. 2014; Patra et al. 2017; Naldoni et al. 2019). Fylogenetické vztahy myxosporeí, malakosporeí a jejich blízce příbuzných skupin znázorňuje obrázek 8.



Obr. 8: Ilustrace fylogenetických vztahů v rámci skupiny Myxozoa a skupin blíže příbuzných – *Polypodium hydriforme* a Medusozoa. Jsou vyznačeny čtyři hlavní linie myxozoi – Oligochaete-infecting group (skupina infikující kroužkovce skupiny Oligochaeta), Polychaete-infecting group (skupina infikující kroužkovce skupiny Polychateta), *Sphaerospora* a Malacosporea. Barva větví naznačuje orgánovou a tkáňovou specifitu parazitů (žlutá – infikující ledviny, zelená – infikující žlučník a modrá – infikující tkáň) (převzato z: Alama-Bermejo & Holzer 2021).

## 2.5. Diverzita

Diverzita neboli druhová bohatost je důkazem evolučních, ale i ekologických procesů, které se v přírodě dějí a výsledkem biotických a abiotických změn, na které organismy reagují (Thompson 2019). I přes to, že v současné době se při studiu fylogeneze myxozoi využívají sekvence DNA, nejčastěji SSU rDNA (např. Fiala 2006; Lisnerová et al. 2020), nebo LSU rDNA (např. Woodyard et al. 2022)), je při zkoumání jejich biodiverzity nutné kombinovat mikroskopický i molekulární přístup (např. Iwanowicz et al. 2008; Liu et al. 2016; Vieira et al. 2022). Právě kvůli svému extrémnímu morfologickému zjednodušení a mikroskopickému vzhledu jsou tyto parazity často přehlíženi, a je nutné využít molekulární metody (např. Lisnerová et al. 2020; Wang et al. 2022; Alama-Bermejo et al. 2023; Thu et al. 2023). Na druhou stranu, ke spoustě druhů známe morfologické údaje, ale neexistují k nim molekulární data (např. Cone et al. 1990; Eiras et al. 2005), protože k jejich popisu došlo před molekulární érou.

Je známo, že diverzita myxozoi zůstává i v dnešní době značně podhodnocená (Hartikainen et al. 2016; Okamura et al. 2018; Patra et al. 2018; Alama-Bermejo et al. 2023; Lisnerová et al. 2023). A to i přes to, že počty popsáných druhů ve sladkovodní linii rybomerek infikující kroužkovce skupiny Oligochaeta i mořské linii rybomerek, která infikuje kroužkovce skupiny Polychaeta, jsou poměrně vysoké – v současnosti je popsáno více jak 2600 druhů, čímž zaujímají přibližně 20 % celkové diverzity žahavců (Okamura et al. 2018). Navíc, některé druhy rybomerek působí značné škody ve velkochovech ryb a pro své hostitele jsou velice patogenní (viz kapitola 2.3. Hospodářský a ekonomický význam). I přes to, je ale spousta infekcí bez patologických projevů (např. Sipos et al. 2018), a to je jeden z důvodů, proč rybomorky stále unikají pozornosti. Také stále přibývají důkazy o kryptických druzích, které komplikují pochopení komplexní diverzity myxozoi (Bartošová & Fiala 2011; Holzer et al. 2013; Hartikainen et al. 2014; Lisnerová et al. 2020). Dalším důvodem podhodnocené diverzity mohou být i v některých případech nízké intenzity infekce a nízké prevalence (Hartikainen et al. 2016; Banerjee et al. 2021; Lauringson et al. 2022). Značnou komplikací zůstává i neznalost životních cyklů rybomerek a jejich hostitelů (Eszterbauer et al. 2015). Můžeme tedy předpokládat, že s postupným objasňováním životních cyklů a tím i zvyšujícím se počtem potenciálních a vyšetřených hostitelů, ale i s rostoucím množstvím prozkoumaných možných stanovišť, počty popsáných druhů a tím diverzita těchto mikroskopických parazitů bude neustále narůstat (např. Lisnerová et al. 2020; Alama-Bermejo et al. 2023). Dalším důležitým faktorem při objevování diverzity jsou i geografické oblasti, kde by se mohli vyskytovat noví parazité, ale i nové hostitelské druhy (např. Ahmed et al. 2019; Ksepka et al. 2019; Zatti et al. 2022).

Myxozoa byla objevena v Evropě (Jurine 1825) a studována primárně v Evropě, Severní Americe, Rusku, Číně, Japonsku, Austrálii, Turecku a Indii (např. Gleeson et al. 2012; Özer et al. 2016; Kaur et al. 2017; Liu et al. 2016; Atkinson et al. 2019; Li et al. 2020; Lisnerová et al. 2020; Wang et al. 2022). Také se podařilo detekovat Myxozoa infikující mořské ryby v Arktických oblastech (např. Kodádková et al. 2014). To znamená, že v pochopení diverzity máme stále zásadní mezery, jako je například nevěnování se různým biogeografickým oblastem (např. moře a oceány (MacKenzie & Kalavati 2014)). Další příležitosti pro rozšíření diverzity rybomerek by mohlo být studium hostitelů ve Střední a Jižní Americe a v mnoha asijských státech (Naldoni et al. 2019; Naldoni et al. 2021; Araújo et al. 2022; Alama-Bermejo et al. 2023).

Environmentální DNA (eDNA) nám také ukazuje, že biodiverzita myxozoi je stále ještě dostatečně neprobádaná i v oblastech, které máme poměrně dobře zmapované

(Hartikainen et al. 2016; Lisnerová et al. 2023). eDNA by mohla představovat neinvazivní metodu studia těchto parazitů na určitých lokalitách a v určitém prostředí. Do budoucna můžeme předpokládat, že počty unikátních OTU překonají počty popsáných druhů a odhalí diverzitu rybomerek i na místech, na kterých bychom to nečekali (Okamura et al. 2018).

V současné době existuje pět popsáných druhů ze skupiny Malacosporea (Bartošová-Sojková et al. 2014; Hartikainen et al. 2014; Patra et al. 2017). Naproti tomu skupina Myxosporea zahrnuje již přes 2 600 popsáných druhů (Okamura et al. 2018). Tato čísla ale neustále rostou. V roce 2005 bylo popsáno 2 180 druhů rybomerek (Lom & Dyková 2006), v roce 2017 to bylo už 2596 druhů (Okamura et al. 2018). Navíc, toto číslo nezahrnuje unikátní sekvence z databáze GenBank, takže můžeme očekávat, že počty druhů jsou mnohonásobně vyšší. S celkovým počtem 10 203 žahavců (Zhang 2013) tak Myxozoa tvoří 20 % jejich celkové diverzity a minimálně jedna pětina žahavců jsou parazité (Okamura et al. 2018). Je na první pohled patrné, že rozdíl mezi druhovou bohatostí myxosporeí a malakosporeí je veliký (pět popsáných druhů oproti 2 600 popsáných druhů). Tento jev může být i následkem druhové rozmanitosti definitivních hostitelů myxozoi. Kroužkvců (definitivních hostitelů myxosporeí) je v současné době popsáno přes 11 000 druhů (Ruppert et al. 2003), zatímco mechovek (definitivních hostitelů malakosporeí) jen asi 70 druhů (Massard & Geimer 2008). Navíc tento vzorec koresponduje i s dalšími parazitickými skupinami, jejichž diverzita je úměrná diverzitě jejich hostitelů (Kamiya et al. 2014; Johnson et al. 2016).

Druhově nejpočetnějšími rody ve skupině Myxosporea jsou rody *Myxobolus*, *Ceratomyxa*, *Kudoa* a *Henneguya*. Rod *Myxobolus* čítá celkem 978 popsáných druhů (Eiras et al. 2005; Eiras et al. 2014; Eiras et al. 2021), rod *Ceratomyxa* celkem 230 druhů (Eiras et al. 2006; Eiras et al. 2018), rod *Kudoa* 95 druhů (Eiras et al. 2014) a rod *Henneguya* obsahuje v současnosti 254 popsáných druhů (Eiras & Adriano 2012; Rangel et al. 2023). Za velkým počtem zástupců z rodu *Myxobolus* stojí pravděpodobně schopnost infikovat různé množství tkání z bohatého spektra hostitelů z různých prostředí (viz kapitola 2.2. Morfologie, taxonomie a životní cyklus).

Přestože je známo pouze pět popsáných druhů malakosporeí, existují i molekulární data pro 12 nepopsáných druhů malakosporeí, z nichž většina byla detekována v rybách (Bartošová-Sojková et al. 2014; Hartikainen et al. 2014; Naldoni et al. 2019; Naldoni et al. 2021) a jeden druh (*Buddenbrockia* sp. E) dokonce v ledvinách paryby z čeledi Potamotrygonidae, konkrétně šlo o druh sladkovodního rejnoka *Potamotrygon motoro* (Naldoni et al. 2019). Celková diverzita malakosporeí je pravděpodobně tedy také větší než počet dosud známých druhů.



## 2.6. Environmentální DNA

Environmentální DNA je označení pro nukleové kyseliny extrahované z environmentálních vzorků jako je sediment, voda, prach, půda, a dokonce i vzduch. eDNA zahrnuje i materiál, který je získaný z živých organismů, ale není z organismu odebraný přímo tak, aby ho nějak závažně poranil např. výkaly a další produkt sekrece a exkrece, krev, hlen, epidermální a další buňky (Bass et al. 2023). Tradiční přístup ke studiu parazitů zahrnuje pitvu jednotlivých hostitelů následovanou molekulární a histologickou analýzou. Tento přístup ale čelí mnoha problémům jako jsou finanční nákladnost získání hostitelů či jejich transport a zabíjení nejen ohrožených hostitelských druhů (Bass et al. 2015; Hartikainen et al. 2016). Další výzvou při detekci mnoha parazitů je jejich mikroskopická velikost, častá intracelulární lokalizace, asymptomatický průběh infekce, morfologická a molekulární rozmanitost organismů. Důsledkem toho je komplikované určení parazitů na základě histologických, mikroskopických a molekulárních analýz s použitím široce zaměřených primerů (Bass et al. 2015). Naproti tomu zjišťování diverzity z environmentální DNA a sekvenování nové generace (NGS) je vysoce senzitivní a umožňuje detekci i více druhů najednou a dovoluje tak odhalení větší druhové diverzity. Navíc se můžeme zaměřit na širokou škálu ekosystémů bez větších zásahů lidské činnosti. K tomu navíc odběr environmentu je více méně univerzální pro všechny druhy prostředí a pro všechny organismy, oproti odchytu samotného studovaného organismu, který může být druhově specifický a řídí se složitou legislativou (Bohmann et al. 2014; Thomsen & Willerslev 2015; Adams et al. 2019; Ruppert et al. 2019). To všechno v kombinaci s moderními molekulárními metodami nám umožňuje zpracovávat velké množství dat a informací najednou, což je značnou výhodou nejen v ekologických studiích (např. biomonitoring) (Wilcox et al. 2016; Porter & Hajibabaei 2018). I přes všechny benefity analýz eDNA, je to stále nová metoda a chybí její standardizace (Zaiko et al. 2022). Je ale několik zásad, které je třeba brát v potaz při využití environmentální DNA: zamyslet se nad charakterem prostředí (např. stojatá vs. tekoucí voda) (Sengupta et al. 2019) a přizpůsobit zpracování vzorků povaze materiálu (např. mořská vs. sladká voda) (např. Díaz-Ferguson & Moyer 2014; Hartikainen et al. 2016; Lisnerová et al. 2023) a neméně důležitá je také ekologie studovaného organismu (životní cyklus a sezónní výskyt) (Troth et al. 2021; Lisnerová et al. 2023). Do budoucna ale představuje detekce parazitů a patogenů prostřednictvím eDNA slibnou metodu s velkým potenciálem v oblasti objevování nových druhů, ekologických studií a hodnocení rizika onemocnění a aktivity parazitů (Bass et al. 2023).

eDNA našla svoje uplatnění už i při studiu biodiverzity myxozoi a cílené detekci jednotlivých druhů. Využití našla při monitoringu významných patogenů jako je *K. thyrsites*, který parazituje na lososovitých rybách (viz kapitola 2.3. Hospodářský a ekonomický význam) (Marshall et al. 2022), dále se podařilo pomocí eDNA detekovat i druhy *C. shasta* (viz kapitola 2.3. Hospodářský a ekonomický význam) (Richey et al. 2020) a původce PKD (proliferative kidney disease) *T. bryosalmonae* (Oredalen et al. 2022). Při studiu biodiverzity se eDNA rovněž ukázala být velice užitečným nástrojem. Pomocí amplikonového sekvenování mořské a sladké vody a také trusu rybožravých obratlovců (vyder a kormoránů) odhalila Hartikainen et al. (2016) 107 unikátních OTUs, z nichž pouze 7 % našlo shodu v databázi GenBank. Ve vydřím trusu se také podařilo detekovat linii myxozoi, která byla známá pouze z environmentálních vzorků a z definitivních hostitelů. Navíc, použití liniově specifického amplikonového sekvenování nabízí efektivní nástroj při studiu diverzity, vzhledem k tomu, že široce zaměřené primery jsou schopny odhalit jen malou část diverzity (Hartikainen et al. 2016). Existuje i další práce, která se zabývá zjišťováním diverzity myxozoi, tentokrát z eutrofních sladkých vod (Lisnerová et al. 2023), ve které se ukázalo použití specifických primerů pro jednotlivé linie myxozoi spolu s amplikonovým sekvenováním (Illumina MiSeq) jako daleko citlivější metoda pro detekci diverzity myxozoi než použití obecných primerů pro celou skupinu. Kombinace osmi různých liniově specifických setů primerů se ukázala dvakrát citlivější, než použití široce zaměřených primerů a Sangerova sekvenování a sedmkrát citlivější než samotná světelná mikroskopie. Z tohoto článku také vychází metodika této diplomové práci. I v malém množství sedimentu se podařilo detekovat celkem 44 OTUs, z nichž většina patřila do skupiny *Myxobolus* clade. Environmentální DNA ve spojení s rybomorkami by tedy mohla usnadnit jejich detekci a identifikaci jednotlivých druhů myxozoi v různých prostředích – sladkovodním, mořském i v různých hostitelích (Hartikainen et al. 2016; Richey et al. 2020; Marshall et al. 2022; Lisnerová et al. 2023), přispět k objasnění doposud neznámých životních cyklů (Richey et al. 2020) a pomoci při monitoringu významných patogenů (Richey et al. 2020; Oredalen et al. 2022).

## 2.7. Přehradní nádrž Římov a její diverzita ryb a myxozoi

Vodní nádrž Římov byla vybudovaná v letech 1971–1978 na řece Malší. V současné době slouží jako zásobárna pitné vody pro České Budějovice a široké okolí, a proto je kladen důraz na kvalitu vody v nádrži. V přehradní nádrži Římov, kde tato diplomová práce studuje diverzitu myxozoi, se z ryb nachází nejčastěji plotice obecná (*Rutilus rutilus* Linnaeus, 1758), cejn velký (*Abramis brama* Linnaeus, 1758) a okoun říční (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758).

Před naplněním vodní nádrže ale patřily na řece Malši k dominantním druhům pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792), jelec proudník (*Leuciscus leuciscus* Linnaeus, 1758), jelec tloušť (*Squalius cephalus* Linnaeus, 1758) a lipan podhorní (*Thymallus thymallus* Linnaeus, 1758) (Říha et al. 2009). Tyto rybí druhy jsou běžnými hostiteli pro celou řadu rybomerek, např. z plotice obecné jsou popsáni zástupci z rodu *Myxobolus*, *Myxidium* nebo *Henneguya* (Dyková et al. 1987; Eiras 2002; Eiras et al. 2005), z cejna velkého to jsou zástupci rodů *Myxobolus* nebo *Thelohanellus* (Eiras et al. 2005; Zhang et al. 2013) a z okouna říčního rybomorky rodu *Henneguya* a *Myxobolus* (Eiras et al. 2005; Székely et al. 2018). V Římovské přehradní nádrži byly již detekovány druhy ze skupiny *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova, 1936 (Lisnerová et al. 2020) a zástupci ze skupiny *Sphaerospora sensu stricto* (Patra et al. 2018).

### 3. Cíle práce a hypotézy

Cílem této diplomové práce bylo:

- 1) detekovat parazity skupiny Myxozoa v sedimentu přehradní nádrže Římov za použití environmentální DNA a amplikonového sekvenování,
- 2) detekovat parazity skupiny Myxozoa ve vodě přehradní nádrže Římov za použití environmentálního DNA a amplikonového sekvenování,
- 3) detekovat parazity skupiny Myxozoa v rybách z přehradní nádrže Římov za použití DNA získané z tkání a amplikonového sekvenování,
- 4) bioinformaticky zpracovat získaná data,
- 5) porovnat biodiverzitu myxozoi v jednotlivých prostředích (sediment, voda, rybí tkáň) a mezi prostředími a na jednotlivých lokalitách,
- 6) určit biodiverzitu myxozoi v přehradní nádrži Římov.

V rámci své diplomové práce jsem předpokládala, že: i) biodiverzita myxosporeí bude vyšší v sedimentu než ve vodě; ii) biodiverzita malakosporeí bude vyšší ve vodě než v sedimentu; iii) nejběžnějším rodem v této oblasti bude rod *Myxobolus*; iv) výskyt myxozoi v rámci jedné skupiny bude na všech vyšetřovaných lokalitách v jednom prostředí stejný.

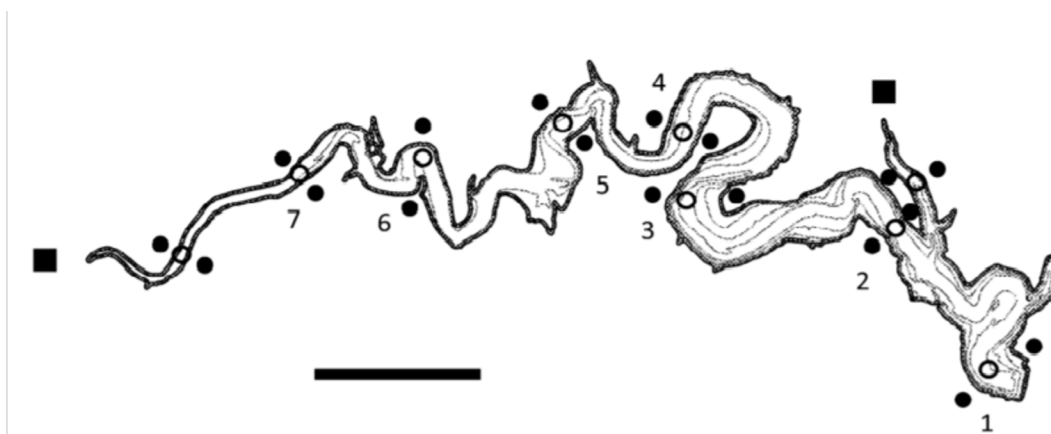
Zjišťování biodiverzity myxozoi za pomoci environmentální DNA může pomoci nejen odhalovat nové, skryté druhy, ale také pomoci při monitoringu těchto parazitů a nemocí, které způsobují. Rozšíření poznatků o diverzitě může pomoci při řešení důležitých otázek nejen v biologii a ekologii této skupiny, ale po zařazení druhů do fylogeneze, také v problematice evoluce myxozoi a parazitismu.

## 4. Metodika

### 4.1. Materiál, zpracování vzorků a izolace DNA

#### 4.1.1. Sediment

Sediment byl odebírán v létě 2021 RNDr. Petrem Blabolilem, Ph.D. v rámci spolupráce s Hydrobiologickým ústavem BC AVČR. Bylo zvoleno 7 lokalit napříč celou vodní nádrží Římov (obrázek 9).



Obrázek 9: Mapa vodní nádrže Římov s vyznačenými místy pro odběr vzorků sedimentu. ● – místa pro odběr vzorků ze břehu; ○ - místa pro odběr vzorků ze dna a z maximální možné hloubky; 1–7 – lokality pro odběr vzorků; měřítko: 1 km (převzato z: Blabolil et al. 2021, upraveno).

Na každé lokalitě byly odebírány vzorky z obou břehů nádrže (černé puntíky, obrázek 9), ze dna nádrže a z maximální možné hloubky (kolečka, obrázek 9). Celkem jsem obdržela 27 vzorků sedimentu, kdy každý vzorek měl 50 ml (tabulka II). Speciální zařízení (drapák), které bylo použito ke sběru vzorků sedimentů, ukazuje obrázek 10.



Obr. 10: Speciální zařízení určené k odběru vzorků sedimentu (foto: Petr Blabolil).

Zpracování sedimentu probíhalo mnou osobně. Sediment byl společně s přidanou vodou (cca 150–200 ml) přefiltrován přes sítko o velikosti ok 100  $\mu\text{m}$ , aby se ze vzorku odstranily větší částice a nečistoty. Filtrát se nechal chvíli odstát (přibližně 2 minuty), aby těžší částice klesly na dno misky, ale zároveň spory (další vývojová stádia, volná DNA) zůstaly plavat ve vodě. Zbylá voda byla centrifugována při 4000 g po dobu 20 minut. Poté byla větší část přebytečné vody ve falkonce odsáta, tak aby nedošlo k narušení peletu a zbývající voda byla smíchána s peletem, aby bylo možné ho přenést do eppendorfek. Následně byl tento přenesený materiál dodatečně centrifugován při 4000 g po dobu 20 minut. Poté byla z eppendorfek odsáta přebytečná voda a byl přidán 100% ethanol. Takto byly vzorky skladovány v mrazáku při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , až do izolace DNA (Lisnerová et al. 2023).

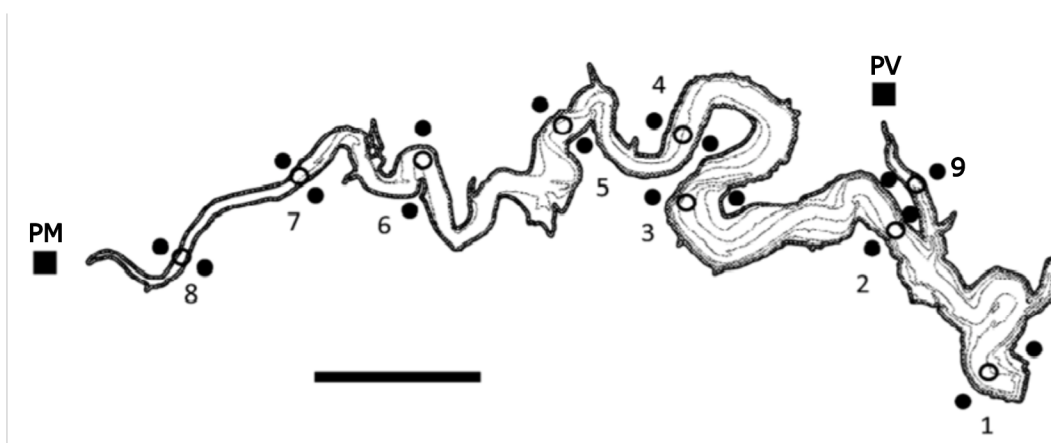
Tab. II: Počty odebraných vzorků sedimentu z jednotlivých míst napříč vodní nádrží. P – počty odebraných vzorků.

Místo	P
Levý břeh	5
Pravý břeh	7
Dno nádrže	7
Maximální hloubka	8
<b>Celkem</b>	<b>27</b>

Izolaci eDNA ze sedimentu byla prováděna za pomoci komerčního kitu FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA), kdy se postupovalo podle návodu výrobce.

#### 4.1.2. Voda

Vzorky vody byly opět získány ve spolupráci s RNDr. Petrem Blabolilem Ph.D. z Hydrobiologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR. V létě 2020 byly odebrány vzorky z celkem 9 lokalit napříč celou vodní nádrží, kdy tentokrát byly odebírány vzorky i ze zátoky (obrázek 11, lokalita 9) a z přítoků řeky Malše (obrázek 11, lokalita s označením PM) a Velešínského potoka (obrázek 11, lokalita s označením PV).



Obr. 11: Mapa vodní nádrže Římov s vyznačenými místy pro odběr vzorků vody. ● – místa pro odběr vzorků ze břehu; ○ – místa pro odběr vzorků z různých hloubek (1 m, 5 m, 7 m a 9 m); ■ – místa pro odběr vzorků z přítoků (řeka Malše a Velešínský potok); 1–9 – lokality pro odběr vzorků; měřítko: 1 km (převzato z: Blabolil et al. 2021, upraveno).

Na každé lokalitě bylo odebráno 500 ml vody z obou břehů nádrže (černé puntíky) a z různých hloubek nádrže – vždy z 1 m, 5 m, 7 m a 9 m pokud to hloubka nádrže dovozovala (kolečka). Environmentální DNA z vody byla izolována pomocí Modular Universal Method (Sellers et al. 2018; Blabolil et al. 2021). Pro svoji diplomovou práci jsem obdržela již vyizolovanou DNA z vody od RNDr. Petra Blabolila, Ph.D., který ji už před tím použil pro svůj výzkum (Blabolil et al. 2021). Celkem jsem dostala 37 vzorků (tabulka III).

Tab. III: Počty odebraných vzorků vody z jednotlivých míst napříč vodní nádrží. P – počty odebraných vzorků.

Místo	P
Levý břeh	9
Pravý břeh	9
1 m	8
5 m	4
7 m	3
9 m	2
Přítoky	2
<b>Celkem</b>	<b>37</b>

#### 4.1.3. Ryby

Celkem byly odebrány vzorky z 43 ryb (11 druhů) (tabulka IV), které byly chyceny na jaře v letech 2016 a 2017 ve spolupráci s RNDr. Petrem Blabolilem, Ph.D. z Hydrobiologické ústavu Biologického centra Akademie věd ČR. Z ryb byly odebrány tkáně – žábry (40 vzorků), ledviny (35 vzorků), svalovina (13 vzorků), žlučník (20 vzorků), játra (13 vzorků) a v jednom případě i pohlavní orgány a močový měchýř.

Tab. IV: Vyšetřené ryby a jejich počty. P – počet vyšetřených ryb.

Druh	P
<i>Abramis brama</i> (Linnaeus, 1758)	5
<i>Acipenser ruthenus</i> Linnaeus, 1758	1
<i>Alburnus alburnus</i> (Linnaeus, 1758)	5
<i>Anguilla anguilla</i> (Linnaeus, 1758)	1
<i>Aspius aspius</i> (Linnaeus, 1758)	3
<i>Esox lucius</i> Linnaeus, 1758	1
<i>Leuciscus leuciscus</i> (Linnaeus, 1758)	5
<i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus, 1758	8
<i>Rutilus rutilus</i> (Linnaeus, 1758)	8
<i>Sander lucioperca</i> (Linnaeus, 1758)	5
<i>Squalius cephalus</i> (Linnaeus, 1758)	1
<b>Celkem</b>	<b>43</b>



DNA z ryb byla vyizolována pomocí fenol-chloroformové metody. Některé vzorky jsem již dostala jako vyizolovanou DNA, většinu vzorků jsem ale obdržela jako kousek tkáně ve 400  $\mu$ l Buffer TNES urea (pH = 8; 10mM Tris-HCl, 125mM NaCl, 10mM ethylenediaminetetraacetová kyselina (EDTA), 0,5% sodium dodecyl sulphate (SDS), 4M urea). Do každého takového vzorku byly následně přidány 4  $\mu$ l proteinázy K (100  $\mu$ g/ml; Serva, Německo) a tato směs byla inkubována při 55 °C přes noc. Další den bylo přidáno 400  $\mu$ l fenolu (Sigma, Německo). Směsný roztok se míchal otáčením zkumavek po dobu přibližně 2 minut a následně byl centrifugován 9000 g po dobu 10 minut. Během centrifugace došlo k oddělení dvou fází a jedné interfáze. Nejsvrchnější fáze obsahující DNA (přibližně 300  $\mu$ l) byla oddělena do nových zkumavek a bylo přidáno 400  $\mu$ l chloroformu (Sigma, Německo). V dalším kroku byly vzorky opět přibližně 2 minuty míchány a následně 10 minut centrifugovány 9000 g. Opět se vytvořily dvě fáze a jedna interfáze. Vrchní vrstva obsahující DNA (přibližně 300  $\mu$ l) byla přepipetována do nových zkumavek. Následně byl přidán do každé zkumavky 1 ml vychlazeného 92% ethanolu (-20 °C). A proběhla další centrifugace při 14 000 g po dobu 10 minut při 4 °C. Na spodu zkumavky vznikl pelet obsahující DNA. Ethanol byl ze zkumavek opatrně vylit, následovalo propláchnutí ethanolem, kdy byl do každé zkumavky přidán 1 ml vychlazeného 70% ethanolu (-20 °C). Vzorky byly centrifugovány 10 min při 14 000 g a 4 °C. Zbylý ethanol byl opatrně vylit a zkumavky s peletem následně vysušeny v termobloku při 37 °C, nebo přes noc při pokojové teplotě. Nakonec byla DNA rozsuspendována ve 200  $\mu$ l DNase-free water (Holzer et al. 2004).

Vyizolovaná DNA z tkání byla poté sloučená do jednoho vzorku podle jednotlivých druhů ryb (viz tabulka IV). Celkem jsem tedy měla 11 vzorků pro následnou molekulární analýzu.

## **4.2. Molekulární analýza**

Všech 75 vzorků DNA (z vody, sedimentu a poolovaných ryb) bylo podrobeno molekulární analýze. Na každý vzorek bylo použito celkem 9 kombinací primerů, navržené mými školiteli tak, aby komplexně pokrývaly celou diverzitu sladkovodních myxosporeí a malakosporeí (Lisnerová et al. 2023, Lisnerová et al. in prepar.). Primery navíc obsahovaly barkody, což jsou 10 bp dlouhé rozlišovací značky, které umožnily rozlišit vzorky při následné bioinformatické analýze. V prvním kroku PCR byla použita sada vnějších primerů (ERIB1+ERIB10; Barta et al. 1997) a ve druhém kroku 9 kombinací vnitřních primerů (Lisnerová et al. 2023). Všechny primery byly použity v koncentraci 25 pmol/ $\mu$ l. Sekvence jednotlivých primerů, jejich názvy a cílové geny jsou vyobrazeny v tabulce V.

Tab. V: Sekvence a názvy použitých primerů. **NNNNNNNNNN** – unikátní sekvence barkodu; X – označení pro barkod.

Primer	Sekvence (5' → 3')	Cílový gen	Citace
ERIB1	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	SSU rDNA	Bárta et al. 1997
ERIB10	CTTCCGCAGGTTACCTACGG	SSU rDNA	Bárta et al. 1997
mid X FR-for1	<b>NNNNNNNNNN</b> TTCGATGAGWAACWACTGGAGG	SSU rDNA	Lisnerová et al. 2023
mid X FR-for2	<b>NNNNNNNNNN</b> TYCGKTGAGTAACWACTGGAGG	SSU rDNA	Lisnerová et al. 2023
mid X FR-for3	<b>NNNNNNNNNN</b> TTMAAYGAGWAACAACACTGGAGG	SSU rDNA	Lisnerová et al. 2023
mid X FR-for4	<b>NNNNNNNNNN</b> TTCGTTGAKAAACAACACTAGAGG	SSU rDNA	Lisnerová et al. 2023
mid X FR-for5	<b>NNNNNNNNNN</b> TTTGTGCGAGTAACAACACTGRAGG	SSU rDNA	Lisnerová et al. 2023
mid X FR-for6	<b>NNNNNNNNNN</b> TRWTTTGAGTAACRACTGGAGG	SSU rDNA	Lisnerová et al. 2023
mid X Pgiardi F	<b>NNNNNNNNNN</b> GTTTGTGACAAACATGCGATACCGG	SSU rDNA	Lisnerová et al. in prepar.
Malaco-for-envirmid X	<b>NNNNNNNNNN</b> GAAATTCAGGTCCATTCGTG	SSU rDNA	Lisnerová et al. in prepar.
mid X FR-rev1	<b>NNNNNNNNNN</b> CATGCTATYAACTTCAAGC	SSU rDNA	Lisnerová et al. 2023
mid X FR-rev6	<b>NNNNNNNNNN</b> CATGCTRTAWCATTCAAGC	SSU rDNA	Lisnerová et al. 2023
mid X Mgiardi R	<b>NNNNNNNNNN</b> CACTCCGCAAACACAACACAGACC	SSU rDNA	Lisnerová et al. in prepar.
Malaco-rev-envir mid X	<b>NNNNNNNNNN</b> CATGCTHGAATGTCCAGGC	SSU rDNA	Lisnerová et al. in prepar.

Celkem bylo použito 9 kombinací primerů ve složení, které popisuje tabulka VI.

Tab. VI: Kombinace primerů na PCR reakci. F – forward primer; R – reverse primer; X – označení pro barcode.

Primer F	Primer R
mid X FR-for1	mid X FR-rev1
mid X FR-for5	mid X FR-rev1
mid X FR-for3	mid X FR-rev1
mid X FR-for6	mid X FR-rev1
mid X FR-for4	mid X FR-rev1
mid X FR-for5	mid X FR-rev6
mid X FR-for2	mid X FR-rev6
mid X Pgiardi F	mid X Pgiardi R
Malaco-for-envir mid X	Malaco-rev-envir mid X

Do PCR reakční směsi byly kromě primerů přidány ještě: premix (Taq DNA polymeráza, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, enhancer a stabilizátor) (Wizbiosolutions Inc., Jižní Korea), DNase-free voda a samotná DNA (o koncentraci 10–30 ng/μl). Všechny komponenty a jednotlivá množství popisuje tabulka VII.

Tabulka VII: Komponenty reakční směsi a jejich množství.

Komponenta	Objem (μl)
premix	X
primer F	0,5
primer R	0,5
voda	18,0
DNA/PCR produkt	1,0
<b>Celkový objem reakce</b>	<b>20,0</b>

Následovala samotná PCR reakce v cycleru (Biometra, Německo). Všechny kroky obou cyklů polymerázové řetězové reakce popisuje tabulka VIII.

Tab. VIII: Cyklus polymerázové řetězové reakce pro Myxozoa. 1. run byl opakován 35x, 2. run 40x.

	Kroky PCR	1. run	2. run
35x / 40x	Počáteční denaturace	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min
	Denaturace	95 °C / 1 min	94 °C / 1 min
	Nasedání primerů	62 °C / 1 min	58 °C / 30 s
	Extenze/elongace	68 °C / 2 min	72 °C / 30 s
	Finální elongace	68 °C / 2 min	72 °C / 10 min
	Chlazení	12 °C / ∞	12 °C / ∞

K separaci pozitivních bandů po PCR reakci byla použita gelová elektroforéza. 1% agarózový gel byl připraven smícháním a následným zahřátím agarózy (Sigma, Německo) a TAE (tris-acetátového) pufru. Zahřátá směs byla následně ochlazena pod tekoucí vodou a byl k ní přidán Ethidium bromide (1 μl na 20 μl gelu; Top-Bio, Česká republika). Hotová směs byla nalita do připravených elektroforetických vaniček a přibližně po 20 minutách, kdy gel ztuhnul, bylo do připravených jamek napipetováno 20 μl PCR produktu. DNA fragmenty byly děleny přibližně 30 minut při 100 V a nakonec vizualizovány pomocí UV transiluminátoru. Délka výsledných fragmentů byla odhadnuta pomocí žebříčku (2-log ladder, Promega, USA).

Pozitivní vzorky o délce přibližně 350–400 bp byly z gelu vyříznuty a přečištěny komerčním kitem – Gel/PCR DNA Fragments Kit (Geneaid Biotech Ltd., USA). Bylo postupováno dle návodu výrobce, avšak výsledný produkt byl rozpuštěn v DNase-free vodě.

Všechny pozitivní vzorky byly následně spojeny do jednoho vzorku, byly vytvořeny knihovny a vzorky byly odeslány na NGS sekvenování. Amplikony byly osekvenovány metodou Illumina Nova-Seq 250 bp paired-end (SEQme, Česká republika).

### 4.3. Bioinformatické analýzy

Bioinformatická analýza všech získaných sekvencí byla provedena v systému Linux. Byla použit postup, který byl již dříve využit v naší laboratoři (Lisnerová et al. 2023). Tento postup zahrnuje následující kroky: i) spojení forward a reverse sekvencí s překryvem 20–40 bp (fastq-join; Aronesty 2011); ii) odfiltrování nekvalitních sekvencí a převedení formátu FASTQ do formátu FASTA (fastx toolkit; Patel & Jain 2012); iii) demultiplexování získaných dat na základě specifických barkodů připojených k sekvencím, jejich oříznutí a následné assemblování (python skript; Lisnerová et al. 2023); iv) odstranění chimér (UCHIME; Edgar et al. 2011); v) klastrování sekvencí do operačních taxonomických jednotek (OTUs) a jejich sdružení (USEARCH – UPARSE) a následné vytvoření unikátních setů sekvencí a OTU tabulky se sekvencemi (USEARCH; Edgar 2010), tato tabulka sloužila ke zjištění individuálních OTUs a readů na jednotlivých lokalitách; OTUs sekvence byly nakonec prostřednictvím databáze GenBank porovnány a k jednotlivým OTUs byla přiřazena skupinová příslušnost a vybrány ty odpovídající skupině Myxozoa. Hladina pro oddělení jednotlivých OTUs byla zvolena 97 %. Tato hladina byla vybrána na základě předchozích zkušeností (Lisnerová et al. 2023).

### 4.4. Fylogenetické analýzy

Pro fylogenetické analýzy byly vytvořeny 2 datasety: první pro skupinu *Myxobolus* a druhý pro sladkovodní linii myxosporeí a skupinu Malacosporea. Oba datasety se skládaly z mnoha získaných sekvencí a ze sekvencí z databáze GenBank. Dataset pro skupinu *Myxobolus* obsahoval 314 sekvencí a jako outgroupová skupina byla použita sekvence *Hoferellus carassii* (JQ801547). Druhý dataset pro celou sladkovodní linii myxosporeí a skupinu Malacosporea obsahoval 199 sekvencí a jako outgroupová skupina byla použita skupina Malacosporea. Oba datasety byly alignovány v programu MAFFT v6.864b s použitím E-INS-i algoritmu (Kato et al. 2005) implementovaném v Geneious Prime 2019.0.4 (Kearse et al. 2012). Fylogenetické stromy byly sestaveny prostřednictvím metody maximum likelihood (ML) v programu RAxML (Stamatakis 2006) implementovaném v programu Geneious Prime 2019.0.4 (Kearse et al. 2012) s modelem evoluce GTR+ $\Gamma$  vybraným pomocí jModelTest2 (Posada 2008). Bootstrapové podpory byly počítány z 1000 replikátů. Fylogenetické stromy byly vizualizovány v programu FigTree (verze v1.4.4; Rambaut 2009) a finální grafické úpravy byly provedeny v programu InkScape (verze 1.0.2; Harrington 2004–2005).

## **4.5. Biostatistické analýzy**

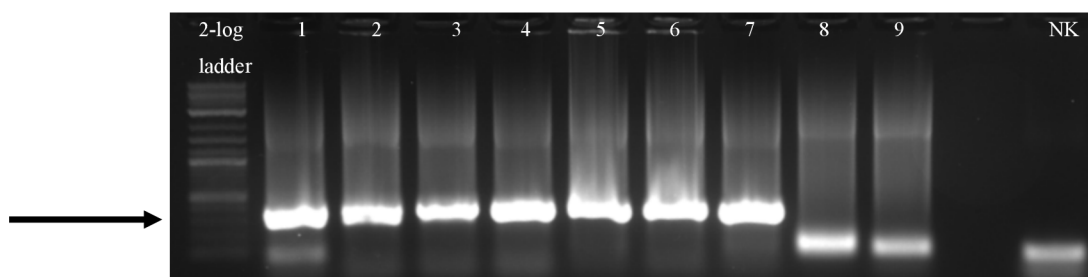
Všechny grafy a tabulky byly vytvořeny prostřednictvím programu Microsoft Excel (verze 16.79.1).

Při výpočtu počtu OTUs na jednotlivých lokalitách/v jednotlivých prostředích byly brány v potaz pouze OTUs, která byla na dané lokalitě detekována nad 50 readů (Lisnerová et al. 2023).

## 5. Výsledky

### 5.1. Molekulární analýza

Všechny vzorky DNA ze sedimentu, vody a ryb byly podrobeny molekulární analýze (celkem 75 vzorků). Dohromady bylo provedeno 675 PCR reakcí se specifickými primery pro jednotlivé fylogenetické skupiny myxozoi (viz kapitola 4.2. Molekulární analýza), z nichž bylo 433 PCR pozitivních. Celkově bylo vytvořeno pět knihoven a ty byly poslány na sekvenování (Nova-Seq). Ukázka agarózového gelu s pozitivními vzorky je na obrázku 12).



Obr. 12: Ukázka gelu vybraného vzorku s pozitivními PCR produkty. Pozitivní amplifikované PCR produkty označené šipkou odpovídají délce přibližně 350–400 bp. 2-log ladder – žebříček; vzorky 1–7 – pozitivní vzorky; vzorky 8 a 9 – negativní vzorky; NK – negativní kontrola.

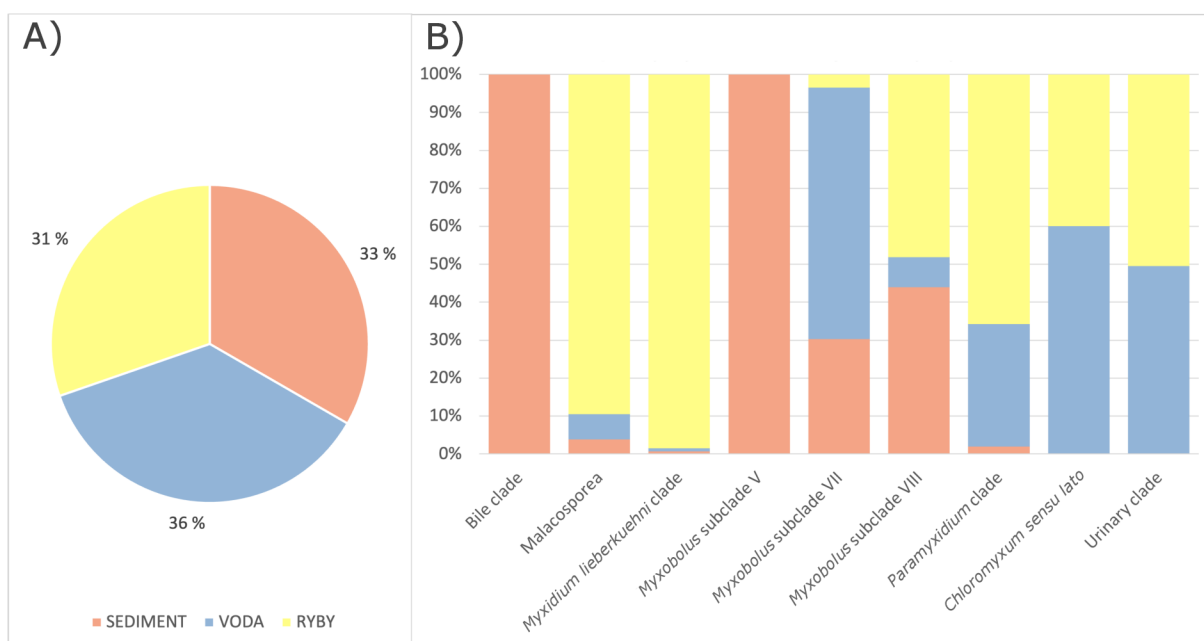
### 5.2. Bioinformatické analýzy

Bioinformatickými analýzami bylo ve všech pěti sekvenačních knihovnách identifikováno celkem 137 OTUs myxozoi, z nichž po assamblování stejných OTUs vzniklo 55 unikátních OTUs přiřazených ke skupině Myxozoa. Celkem 25 OTUs bylo detekováno v sedimentu, 31 OTUs ve vodě a 25 OTUs v tkáních ryb.

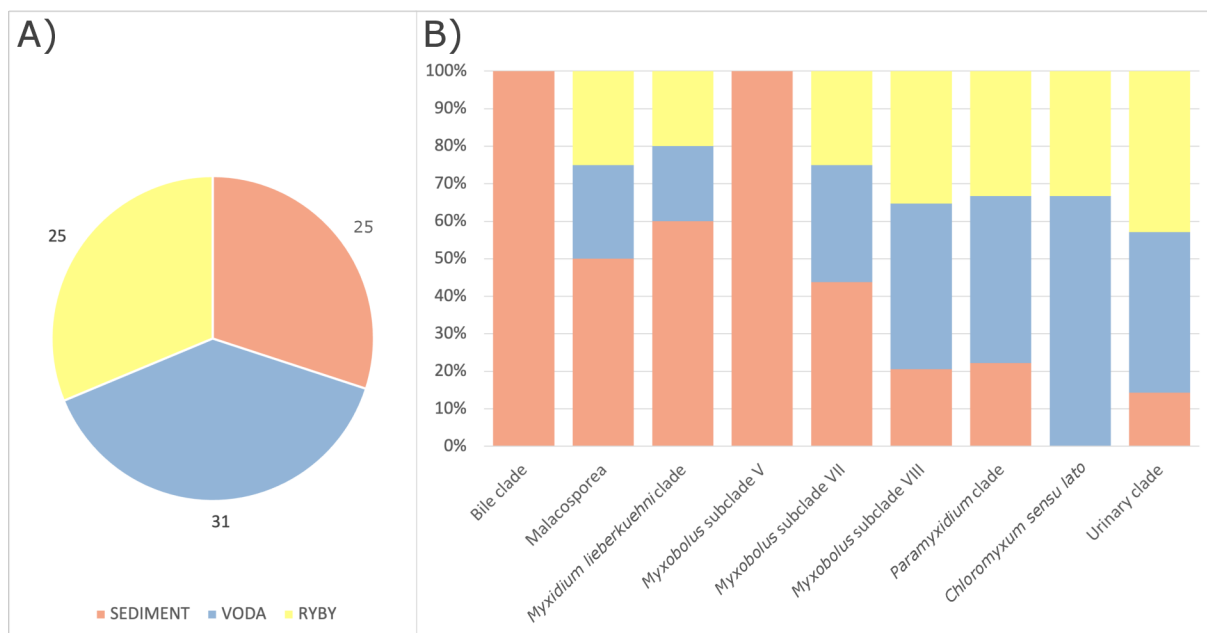
#### 5.2.1. Srovnání diverzity a abundance myxozoi

Všech 55 detekovaných OTUs myxozoi s počty readů >50 bylo použito pro porovnání biodiverzity (počet OTUs) a abundance (% zastoupení počtu readů v daném vzorku) rybomerek mezi jednotlivých prostředích (voda, sediment, ryby) a mezi jednotlivými lokalitami. V celkovém srovnání mezi abundancemi (biomasa parazitů) a počty OTUs (druhová diverzita) myxozoi ve všech třech porovnávaných prostředích zaujímá voda, sediment i rybí tkáň přibližně jednu třetinu, přičemž v počtu OTUs mírně převažuje zjištěný počet OTUs ve vodě (Obrázek 13A). Pokud se zaměříme na procentuální zastoupení počtu readů jednotlivých fylogenetických skupin detekovaných ve vzorcích sedimentu vody a tkání

ryb (obrázek 13B), tak ve všech třech typech vzorků se podařilo detekovat tyto skupiny: Malacosporea (4 % ve vzorcích sedimentu, 6 % ve vzorcích vody a 90 % ve vzorcích rybích tkání), *Myxobolus* subclade VII (30 % ve vzorcích sedimentu, 67 % vzorcích vody a 3 % ve vzorcích rybích tkání), VIII (44 % ve vzorcích sedimentu, 7 % ve vzorcích vody a 49 % ve vzorcích rybích tkání), *M. lieberkuehni* clade (0,1 % ve vzorcích sedimentu, 0,1 % ve vzorcích vody a 99,8 % ve vzorcích rybích tkání) a *Paramyxidium* clade (0,2 % ve vzorcích sedimentu, 33,8 % ve vzorcích vody a 66 % ve vzorcích rybích tkání). Urinary clade byl pozorován ve vodě a v rybách (49,9 % ve vzorcích vody a 50,1 % ve vzorcích rybích tkání) a stejně tak skupina *Chloromyxum sensu lato* (dále jen *Chloromyxum s. l.*) (60 % ve vzorcích vody a 40 % ve vzorcích rybích tkání). Pouze v jednom prostředí (v sedimentu) byli detekováni zástupci skupin Bile clade (100 %) a *Myxobolus* subclade V (100 %).



Obr. 13: A) Celková abundance (procentuální zastoupení počtu readů vypočítané z celkového počtu readů přiřazených k jednotlivým prostředím) myxozoi v jednotlivých prostředích; B) Abundance (procentuální zastoupení počtu readů vypočítané z celkového počtu readů přiřazených k jednotlivým fylogenetickým liniím) myxozoi v jednotlivých prostředích rozdělená do fylogenetických skupin. Jednotlivá prostředí jsou označena barvami dle legendy.



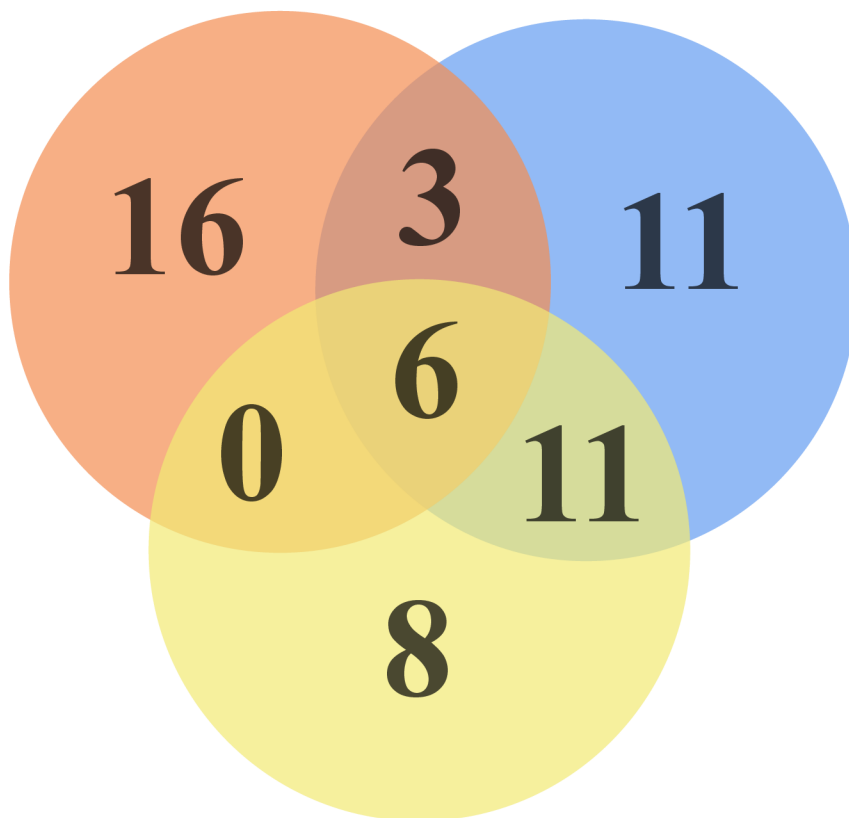
Obr. 14: A) Celkové počty OTUs myxozoi a celkové procentuální zastoupení v jednotlivých prostředích; B) Procentuální zastoupení OTUs myxozoi v jednotlivých prostředích rozdělených do jednotlivých fylogenetických skupin. Jednotlivá prostředí jsou označena barvami dle legendy.

Nejvyšší diverzitu se podařilo detekovat ve vzorcích odebraných ve vodě – celkem 31 různých OTUs (což tvoří 56,4 % celkové diverzity) (obrázek 14A) klastrujících do sedmi různých klejdů (obrázek 14B). 15 OTUs bylo přiřazeno do *Myxobolus* subclade VIII, pět OTUs do *Myxobolus* subclade VII, čtyři OTUs do *Paramyxidium* clade, tři OTUs do Urinary clade, dvě OTUs do *Chloromyxum s. l.* a jedno OTUs do skupiny Malacosporea a *M. lieberkuehni* clade. Ve vzorcích odebraných z hostitelských tkání ryb (celkově 25 OTUs) 12 patří do *Myxobolus* subclade VIII, čtyři do *Myxobolus* subclade VII, tři do *Paramyxidium* clade a Urinary clade, jedno OTU do *M. lieberkuehni* clade, jedno OTU do *Chloromyxum s. l.* a jedno OTU do skupiny Malacosporea. Ve vzorcích sedimentu se stejně jako ve vzorcích odebraných z tkání ryb podařilo zjistit 25 různých OTUs myxozoi, která klastrovala k osmi různým fylogenetickým skupinám (což tvoří 45,5 % celkové diverzity). *Myxobolus* subclade VII a VIII jsou zde reprezentovány sedmi OTUs respektive osmi OTUs, tři OTUs patří do *M. lieberkuehni* clade, dvě OTUs do *Paramyxidium* clade a malakosporeí a po jednom OTU do klejdů: Urinary clade, *Myxobolus* subclade V a Bile clade.

Nejvíce jedinečných OTUs se podařilo detekovat ve vzorcích odebraných ze sedimentu – celkem 16 OTUs, které nebyly zachyceny v jiných typech prostředí. Pouze ve vzorcích vody se podařilo zjistit 11 různých OTUs myxozoi a ve vzorcích tkání ryb celkem 8



unikátních OTUs. Ve vzorcích sedimentu i vody se nacházela tři unikátní OTUs a ve vzorcích sedimentu a ryb ani jedno. Naproti tomu ve vzorcích vody i ryb se podařilo detekovat celkem 11 unikátních OTUs myxozoi. A celkem šest OTUs bylo zjištěno ve všech třech prostředích současně (obrázek 15).



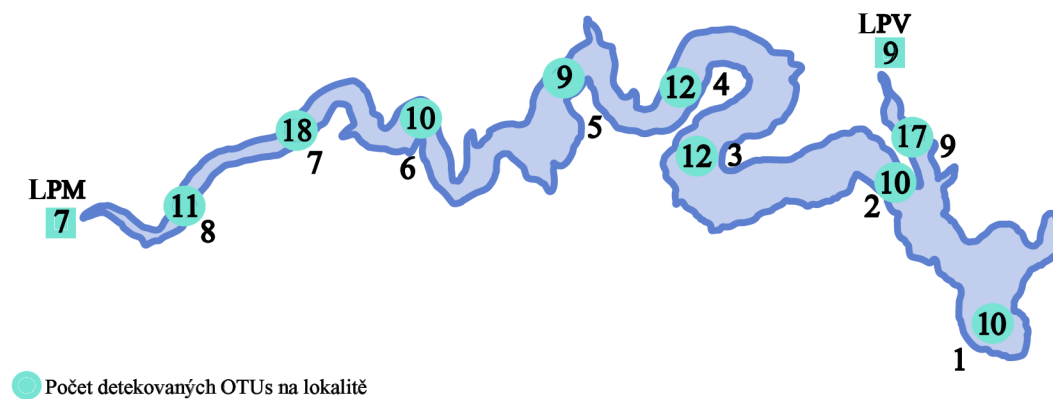
- OTUs detekovaná v rybách
- OTUs detekovaná v sedimentu
- OTUs detekovaná ve vodě

Obr. 15: Vennův diagram znázorňující OTUs myxozoi detekované ve vzorcích ze tří studovaných prostředí. Oranžové kolečko – označení pro sediment; modré kolečko – označení pro vodu; žluté kolečko – označení pro ryby.

### 5.2.2. Srovnání diverzity a abundance myxozoi na lokalitách

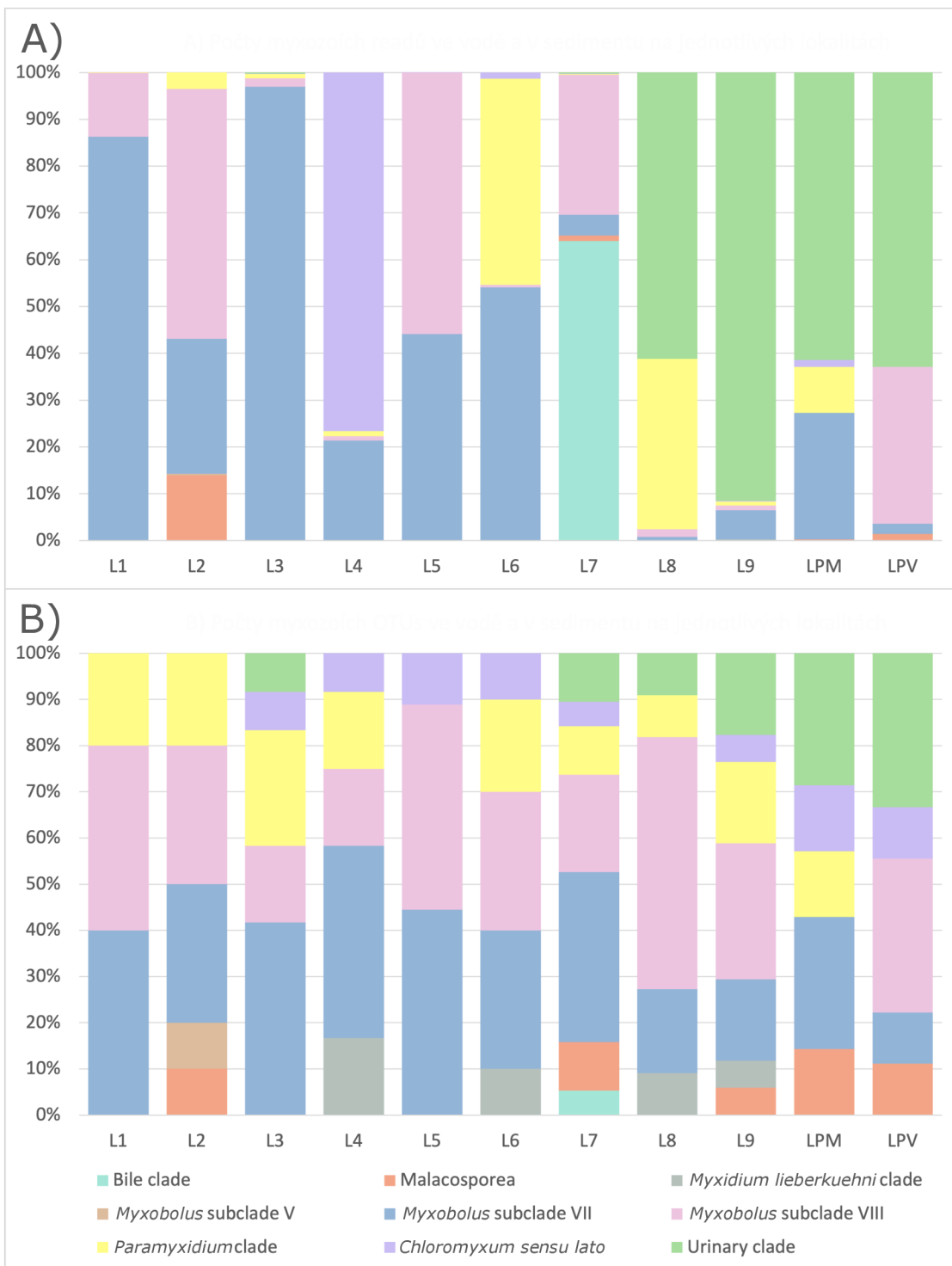
V porovnání celkové diverzity získané v sedimentu a ve vodě na jednotlivých lokalitách (obrázek 16) je patrné, že nejvyšší diverzita OTUs myxozoi byla detekována ze vzorků odebraných na lokalitách L7 (18 OTUs) a L9 (17 OTUs), tedy v blízkosti přítoků řeky Malše a Velešinského potoka. Naopak nejnižší diverzita byla nalezena přímo v oblasti přítoků

na lokalitách LPM (sedm OTUs) a LPV (osm OTUs). Napříč celou vodní nádrží se podařilo na všech lokalitách detekovat minimálně šest a maximálně 19 OTUs.



Obr. 16: Počet OTUs myxozoi detekovaných na dané lokalitě. Lokality jsou označené čísly 1–9; LPM – přítok Malše; LPV – přítok Velešínského potoka. Barevné znázornění jednotlivých prostředí je ukázáno v legendě.

Dále byla porovnávána biodiverzita (počet OTU) a abundance (% zastoupení počtu readů) myxozoi na studovaných lokalitách zjištěných pomocí odebrané eDNA z vody a sedimentu (s označením L1–L9, LPM a LPV) (obrázky 17A a B).



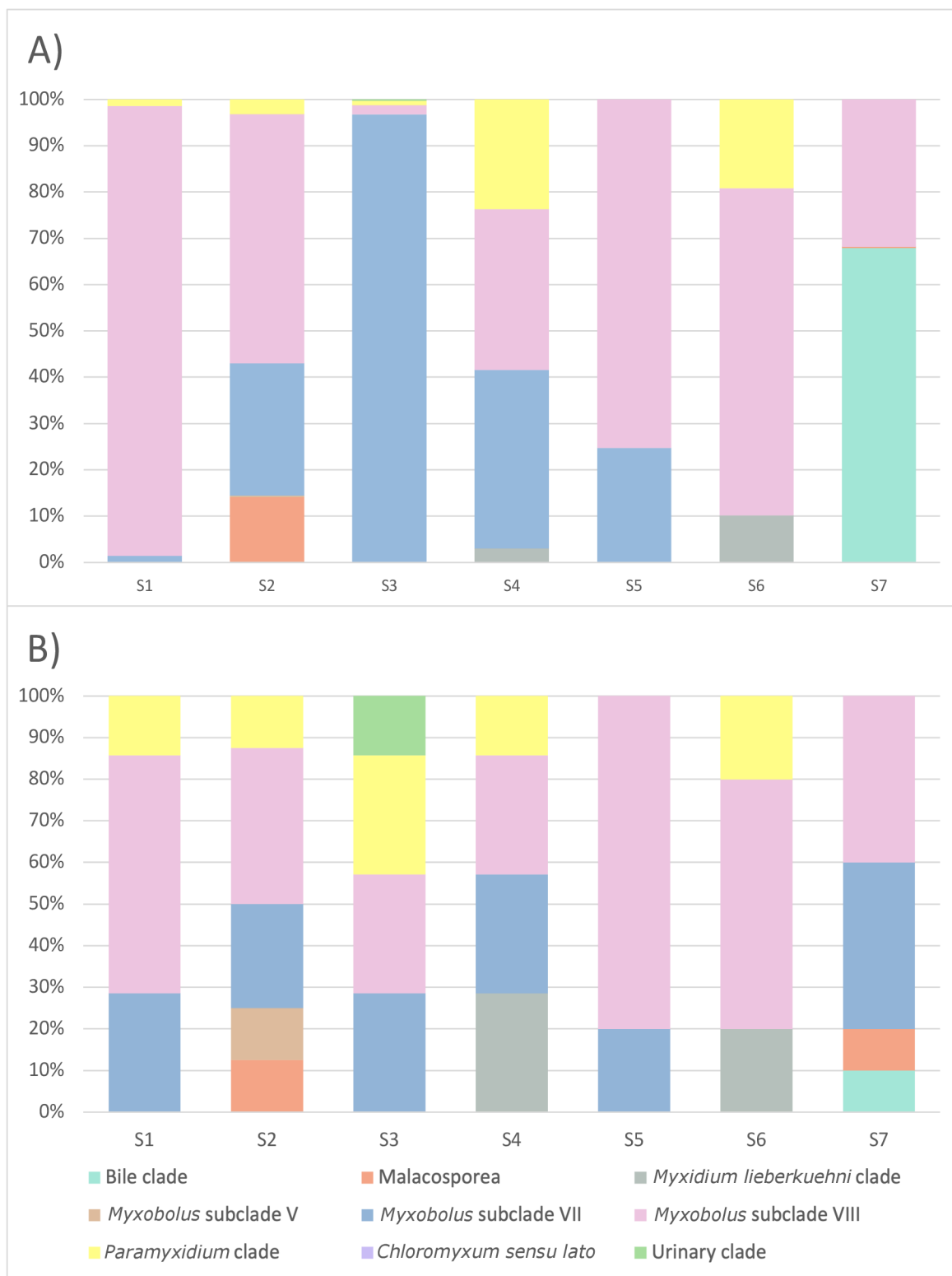
Obr. 17: A) Procentuální zastoupení jednotlivých skupin myxozoi (vyjádřených v počtu readů) zjištěných z environmentálních vzorků vody a sedimentu detekovaných na vybraných lokalitách přehradní nádrže Římov; B) Procentuální zastoupení OTUs myxozoi zjištěných z environmentálních vzorků vody a sedimentu na jednotlivých lokalitách přehradní nádrže Římov. L1–L9 – vybrané lokality pro odběr napříč vodní nádrží. L1 – lokalita nejbližší hrázi, L8 – lokalita nejbližší přítoku řeky Malše, L9 – zátoka, LPM – přítok řeky Malše; LPV – přítok Velešínského potoka. Barevně jsou označeny jednotlivé linie myxozoi dle legendy.

Přímo u hráze vodní nádrže (na obrázku 16 **lokality označená jako 1**) se podařilo detekovat 10 OTUs. Ta klastrovala do skupin *Myxobolus* subclade VII a VIII (vždy čtyři OTUs) a do *Paramyxidium* clade (dvě OTUs). Svoji abundancí lokalitě dominuje *Myxobolus* subclade VII (celkem 87 % readů na lokalitě), naopak minimálně se zde vyskytoval *Paramyxidium* clade (0,1 % readů na lokalitě). Na lokalitách L2, L3 a L4 (na obrázku 16 lokality označené jako 2, 3 a 4) se podařilo detekovat zástupce z pěti různých klejdu a subklejdu. Na **lokality L2** to bylo 10 OTUs z klejdu: *Myxobolus* subclade V (jedno OTU, 10 % readů na lokalitě), VII (tři OTUs, 30 % readů na lokalitě) a VIII (tři OTUs, 30 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (dvě OTUs, 20 % readů na lokalitě), a ze skupiny Malacosporea (jedno OTU, 10 % readů na lokalitě). Na **lokality L3** byl determinován *Myxobolus* subclade VII, který zde s 99% zastoupením dominuje (pět OTUs), dále *Myxobolus* subclade VIII (dvě OTUs, 1,8 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (tři OTUs, 0,9 % readů na lokalitě), Urinary clade (jedno OTU, 0,9 % readů na lokalitě) a jedno OTU ze skupiny *Chloromyxum s. l.* zaujímá přibližně 0,1 % detekovaných readů myxozoí na lokalitě. Na **lokality L4** byly nalazeny klejdy: *Chloromyxum s. l.*, který se zastoupením pouze jednoho OTU svojí abundancí na lokalitě jednoznačně dominoval (78 %), *Myxobolus* subclade VII (pět OTUs, 21,3 % readů na lokalitě) a VIII (dvě OTUs, 0,1 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (dvě OTUs, 1,1 % readů na lokalitě) a *M. lieberkuehni* clade (dvě OTUs, 0,1 % readů na lokalitě). Na **lokality L5** byly determinovány pouze subklejdy *Myxobolus* subclade VII (čtyři OTUs, 44,1 % readů na lokalitě) a VIII (čtyři OTUs, 55,8 % readů na lokalitě) a *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 0 % (60 readů z celkového počtu 419 095 readů na lokalitě)). Přibližně od poloviny vodní nádrže (od **lokality L6**, na obrázku 16 znázorněné číslem 6) roste detekovaná diverzita (počet detekovaných OTUs). Na této lokalitě se podařilo rozpoznat 10 různých OTUs klastující do pěti různých klejdu (*Myxobolus* subclade VII (tři OTUs zaujímající 54 % readů zjištěných na lokalitě) a VIII (tři OTUs, 0,6 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (dvě OTUs, 44 % readů na lokalitě), *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 1,3 % readů na lokalitě) a *M. lieberkuehni* clade (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě)). Na **lokality L7** (na obrázku 16 znázorněné číslem 7) jednoznačně dominuje, jakožto na jediné lokalitě, žlučnickový klejd (Bile clade) (jedno OTU zaujímající 64 % readů zjištěných na lokalitě), v menším množství jsou zde zastoupeny klejdy: *Myxobolus* subclade VII (sedm OTUs, 4,4 % readů na lokalitě), a VIII (čtyři OTUs, 29,9 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (dvě OTUs, 0,1 % readů na lokalitě), Urinary clade (dvě OTUs, 0,2 % readů na lokalitě) a Malacosporea (dvě OTUs, 1,2 % readů na lokalitě). Na **lokality L8** (na obrázku 16 označené číslem 8) dominují svou diverzitou opět zástupci *Myxobolus* clade (osm OTUs zaujímají 2,3 % readů zjištěných na lokalitě), konkrétně

*Myxobolus* subclade VIII (šest OTUs, 1,6 % readů na lokalitě) a *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 0,7 % readů na lokalitě) dále zde byl detekován *M. lieberkuehni* clade (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 36,4 % readů na lokalitě) a Urinary clade (jedno OTU, 61,2 % readů na lokalitě). Na **lokalitě L9** (na obrázku 16 označené číslem 9, u přítoku Velešínského potoka) opět dominuje Urinary clade (zaujímající přes 90 % zjištěných readů na dané lokalitě, tři OTUs), v mizivém zastoupení jsou zde i *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě), Malacosporea (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade VII (tři OTUs, 6,3 % readů na lokalitě), *M. lieberkuehni* clade (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě) a *Paramyxidium* clade (tři OTUs, 0,9 % readů na lokalitě). Největší diverzitu zde ovšem tvoří *Myxobolus* subclade VIII – celkem pět různých OTUs (1 % readů na lokalitě). U **obou přítoků** (na obrázku 16 lokality označené jako LPM a LPV) dominuje z 60 % Urinary clade (dvě OTUs u přítoku řeky Malše – LPM a tři OTUs u přítoku Velešínského potoka – LPV). Dále byly na obou lokalitách detekovány další čtyři klejdy. U přítoku řeky Malše (lokalita označená jako LPM) to byl *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 1,5 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 9,8 %), *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 27 % readů na lokalitě) a Malacosporea (jedno OTU, 0,3 % readů na lokalitě) a u přítoku Velešínského potoka (lokalita označená LPV) to byl *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade VII (jedno OTU, 2,1 % readů na lokalitě) a VIII (tři OTUs, 33,6 % readů na lokalitě) a Malacosporea (jedno OTU, 1,4 % readů na lokalitě).

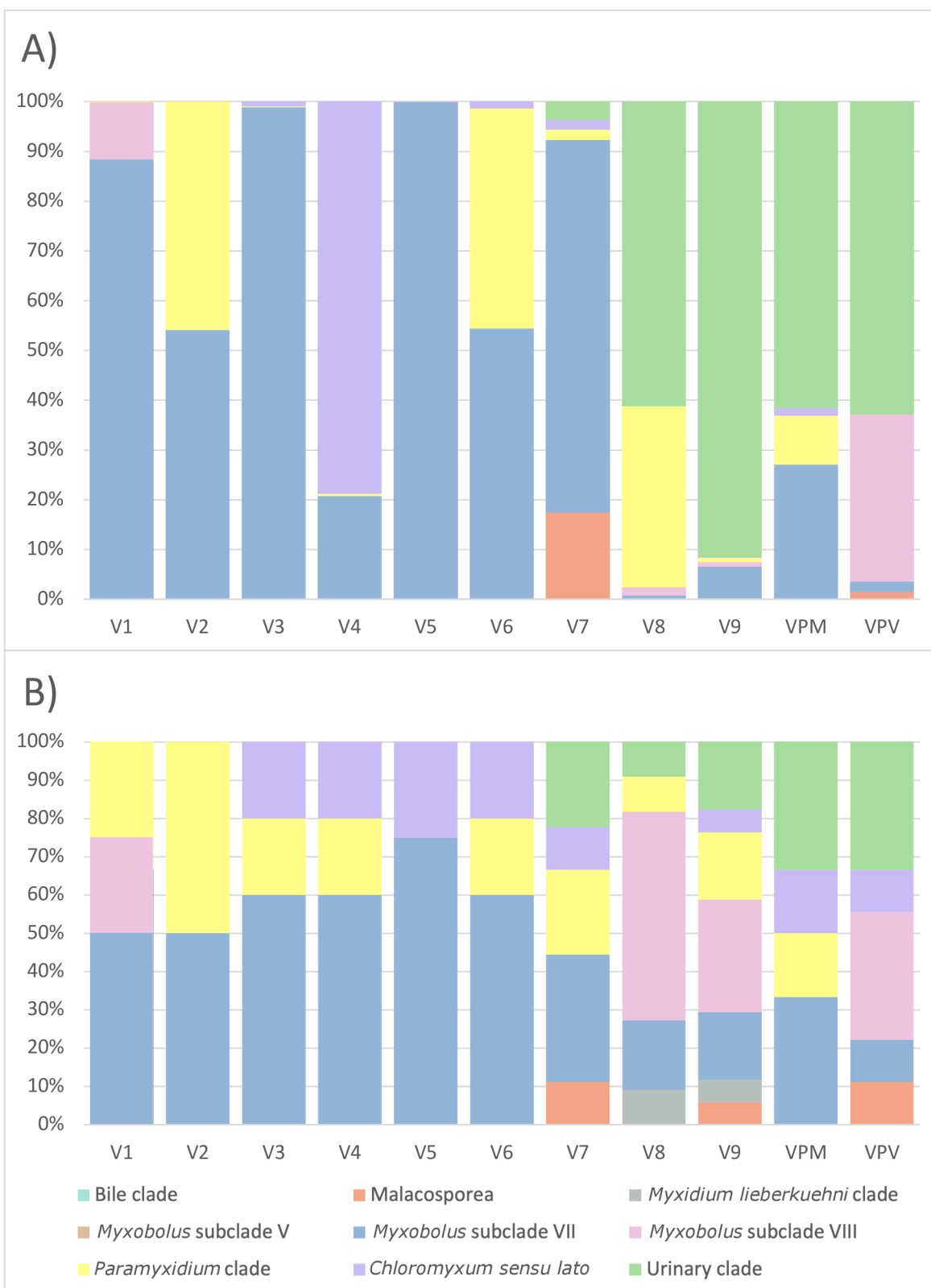
### 5.2.3. Srovnání diverzity a abundance myxozoi v prostředích

Dále bylo provedeno porovnání jak abundance a biodiverzity v sedimentu (obrázek 18A a B), tak i ve vodě (obrázek 19A a B). Bylo porovnáno celkem 7 lokalit, ze kterých byl odebírán sediment (L1–L7) a 11 lokalit, ze kterých byla odebírána voda (V1–V9, VPM a VPV). Vzorků rybích tkání bylo celkem 43, které byly spojeny do 11 vzorků podle druhů ryb, ve kterých byla Myxozoa vyšetřována. Ve vzorcích sedimentu se celkem podařilo stanovit 25 OTU a osm různých klejdů a subklejdů. Ve vodě se podařila detekovat 31 OTUs ze sedmi klejdů.



Obr. 18: A) Procentuální zastoupení počtu readů myxozoi ve vzorcích sedimentu; B) Procentuální zastoupení OTUs myxozoi ve vzorcích sedimentu; S1–S7 – lokality, kde byl odebrán sediment. Jednotlivé linie myxozoi jsou znázorněny barevně a vysvětleny v legendě grafu.

**Na lokalitě 1** se v sedimentu podařily detekovat 3 linie: *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 1,4 % celkové abundance myxozoi na dané lokalitě) a VIII (čtyři OTUs, 97,2 % readů na lokalitě) a *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 1,4 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 2** bylo zjištěno pět různých klejdů: Malacosporea (jedno OTU, 14,1 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade V (jedno OTU, 0,3 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 28,6 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade VIII (tři OTUs, 53,8 %) a *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 3,2 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 3** se podařila zachytit OTUs ze čtyř různých klejdů: *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 96,8 % readů na lokalitě) a VIII (dvě OTUs, 2 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (dvě OTUs, 1 % readů na lokalitě) a Urinary clade (jedno OTU, 0,3 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 4** se v sedimentu podařily detekovat čtyři klejdy: *M. lieberkuehni* clade (dvě OTUs, 3 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 38,6 % readů na lokalitě) a VIII (dvě OTUs, 34,7 % readů na lokalitě) a *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 23,7 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 5** to byla v sedimentu OTUs pouze ze dvou subklejdů: *Myxobolus* subclade VII (jedno OTU, 24,7 % readů na lokalitě) a *Myxobolus* subclade VIII (čtyři OTUs, 75,3 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 6** se podařila detekovat OTUs ze tří klejdů: *M. lieberkuehni* clade (jedno OTU, 10,1 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade VIII (tři OTUs, 70,7 %) a *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 19,2 % readů na lokalitě). A na poslední lokalitě, **lokalitě 7**, se podařily zjistit čtyři linie myxozoi: Bile clade (jedno OTU, 68 % readů na lokalitě), Malacosporea (jedno OTU, 0,2 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade VII (čtyři OTUs, 0,1 % readů na lokalitě) a VIII (čtyři OTUs, 31,8 % readů na lokalitě). Na obrázku 18 jsou graficky znázorněny procentuální zastoupení readů (18A) a OTUs (18B) na jednotlivých lokalitách v sedimentu.



Obr. 19: A) Procentuální zastoupení počtu readů myxozoi ve vzorcích vody; B) Procentuální zastoupení OTUs myxozoi ve vzorcích vody. V1–V9, VPM, VPV – lokality, kde byla odebrána voda. Jednotlivé linie myxozoi jsou znázorněny barevně a vysvětleny v legendě grafu.



Ve vodě se **na lokalitě 1** podařily detekovat tři různé klejdy: *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 88,5 % readů na lokalitě) a VIII (jedno OTU, 11,5 % readů na lokalitě) a *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 2** to byla OTUs pouze ze dvou klejdů: *Myxobolus* subclade VII (jedno OTU, 54,1 % readů na lokalitě) a *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 45,9 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 3** to byly tři klejdy: *Myxobolus* subclade VII (tři OTUs, 98,9 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě) a *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 1 %). **Na lokalitě 4** to byly stejné tři klejdy: *Myxobolus* subclade VII (tři OTUs, 20,8 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 0,4 % readů na lokalitě) a *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 78,8 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 5** se podařila detekovat OTUs z klejdů *Myxobolus* subclade VII (tři OTUs, 99,9 % readů na lokalitě) a *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 6** se vodě podařily zjistit klejdy: *Myxobolus* subclade VII (tři OTUs, 54,4 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 44,2 % readů na lokalitě), *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 1,3 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 7** se ve vodě podařilo zachytit pět linií myxozoi: *Malacospora* (jedno OTU, 17,4 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade VII (tři OTUs, 74,9 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (dvě OTUs, 2 % readů na lokalitě), *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 2 % readů na lokalitě) a Urinary clade (dvě OTUs, 3,7 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 8**, u přítoku řeky Malše, se ve vodě podařila detekovat OTUs z pěti klejdů: *M. lieberkuehni* clade (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 0,1 % readů na lokalitě) a VIII (šest OTUs, 1,6 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 36,4 % readů na lokalitě) a Urinary clade (jedno OTU, 61,2 % readů na lokalitě). **Na lokalitě 9**, v zátocce u přítoku Velešínského potoka, bylo detekováno celkem sedm různých klejdů a subklejdů: *Malacospora* (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě), *M. lieberkuehni* clade (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade VII (tři OTUs, 6,3 % readů na lokalitě) a VIII (pět OTUs, 1 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (tři OTUs, 0,9 % readů na lokalitě), *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě) a Urinary clade (tři OTUs, 91,5 % readů na lokalitě). Ve vodě **na lokalitě VPM** (u přítoku řeky Malše) byla zachycena OTUs ze čtyř skupin: *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 27,1 % readů na lokalitě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 9,9 % readů na lokalitě), *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 1,5 % readů na lokalitě) a Urinary clade (dvě OTUs, 61,6 % readů na lokalitě). A **na lokalitě VPV** (u přítoku Velešínského potoka) bylo detekováno pět různých linií myxozoi: *Malacospora* (jedno OTU, 1,4 % readů na lokalitě), *Myxobolus* subclade VII (jedno OTU, 2,1 % readů na lokalitě) a VIII (tři OTUs, 33,6 % readů na lokalitě),

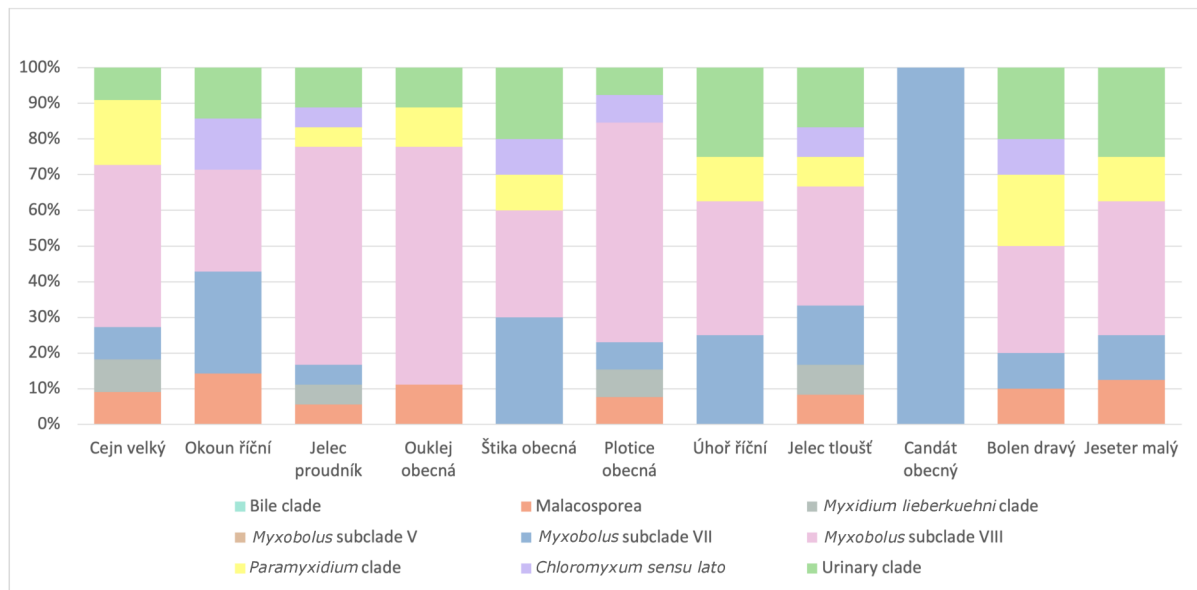
*Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 0,1 % readů na lokalitě) a Urinary clade (tři OTUs, 62,9 % readů na lokalitě). Na obrázku 19 jsou graficky znázorněny procentuální zastoupení readů (19A) a OTUs (19B) na jednotlivých lokalitách ve vodě.

#### 5.2.4. Srovnání diverzity a abundance myxozoi v rybách

V rybách bylo celkem detekováno 25 myxozoičích OTUs, kdy v každém rybím druhu se podařilo detekovat minimálně jedno OTU a maximálně 18 OTUs (obrázek 20). Nejvíce OTUs (celkem 18 OTUs) se podařilo detekovat v **jelci proudníkoví**: *Malacospora* (jedno OTU, 12,6 % readů v dané rybě), *M. lieberkuehni* clade (jedno OTU, 22,2 % readů v dané rybě), *Myxobolus* subclade VII (jedno OTU, 0,1 % readů v dané rybě), *Myxobolus* subclade VIII (11 OTUs, 61,4 % readů v dané rybě) *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 0,3 % readů v dané rybě), *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 0,8 % readů v dané rybě) a Urinary clade (dvě OTUs 2,6 % readů v dané rybě). V **jelci tloušťovi** to bylo 12 OTUs: *Malacospora* (jedno OTU, 0,1 % readů v dané rybě), *M. lieberkuehni* clade (jedno OTU, 0,1 % readů v dané rybě), *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 0,4 % readů v dané rybě) a VIII (čtyři OTUs, 0,7 % readů v dané rybě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 0,1 % readů v dané rybě), *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 96,7 % readů v dané rybě) a Urinary clade (dvě OTUs 1,9 % readů v dané rybě). Více než 10 OTUs bylo zjištěno i v **cejnovi velkém** – 11 OTUs. Konkrétně skupiny *Malacospora* (jedno OTU, 17,1 % readů v dané rybě), *M. lieberkuehni* clade (jedno OTU, 0,2 % readů v dané rybě), *Myxobolus* subclade VII (jedno OTU, 1,1 % readů v dané rybě) a VIII (pět OTUs, 39,3 % readů v dané rybě), *Paramyxidium* clade (dvě OTUs a 0,7 % readů v dané rybě) a Urinary clade (jedno OTU, 41,6 % readů v dané rybě). Ve **šticce obecné** se podařilo zjistit 10 OTUs. Konkrétně *Myxobolus* subclade VII (tři OTU, 7,9 % readů v dané rybě) a VIII (tři OTUs, 7,2 % readů v dané rybě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 18,7 % readů v dané rybě), *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 8,2 % readů v dané rybě) Urinary clade (dvě OTUs, 58 % readů v dané rybě). V **bolenu dravém** se podařilo detekovat také celkem 10 OTUs z klejdů: *Malacospora* (jedno OTUs, 60,6 % readů v dané rybě), *Myxobolus* subclade VII (jedno OTU, 2,9 % readů v dané rybě), a VIII (tři OTUs, 9,4 % readů v dané rybě), *Paramyxidium* clade (dvě OTUs, 6,7 % readů v dané rybě), *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 8,7 % readů v dané rybě), a Urinary clade (dvě OTUs, 11,7 % readů v dané rybě). Dále v **plotici obecné** se podařilo zjistit 13 OTUs, která patřila do klejdů: *Malacospora* (jedno OTU, 0,6 % readů v dané rybě), *M. lieberkuehni* clade (jedno OTU, 0,1 % readů v dané rybě), *Myxobolus* subclade VII (jedno OTU, 0,1 % readů v dané rybě), a VIII (osm OTUs, 49,1 % readů v dané rybě), Urinary clade (jedno OTU, 49,5 % readů v dané rybě) a *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU,

0,6 % readů v dané rybě). Sedm různých OTUs klastrující do pěti klejdů se podařilo zjistit v **okounu říčním**: Malacosporea (jedno OTU, 9,9 % readů v dané rybě), *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 10,2 % readů v dané rybě) a VIII (dvě OTUs, 47,7 % readů v dané rybě), Urinary clade (jedno OTU, 32 % readů v dané rybě) a *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 0,1 % readů v dané rybě). V **oukleji obecné** bylo detekováno devět OTUs patřící do čtyř klejdů: Malacosporea (jedno OTU, 14,4 % readů v dané rybě), *Myxobolus* subclade VIII (šest OTUs, 84,3 % readů v dané rybě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 0,2 % readů v dané rybě) a Urinary clade (jedno OTU, 1,1 % readů v dané rybě). I v **úhoři říčním** se podařily zjistit čtyři klejdy: *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 0,2 % readů v dané rybě) a VIII (tři OTUs, 0,3 % readů v dané rybě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 98,1 % readů v dané rybě) a Urinary clade (dvě OTUs, 1,4 % readů v dané rybě). V **candátovi obecném** se podařilo zjistit pouze jedno OTU z linie *Myxobolus* subclade VII (100 % readů v dané rybě) a v **jeseterovi malém** osm OTUs z celkem pěti klejdů: Malacosporea (jedno OTU, 11,8 % readů v dané rybě), *Myxobolus* subclade VII (jedno OTU, 4 % readů v dané rybě) a VIII (tři OTUs, 30,5 % readů v dané rybě), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 4,1 % readů v dané rybě) a Urinary clade (dvě OTUs, 49,6 % readů v dané rybě).

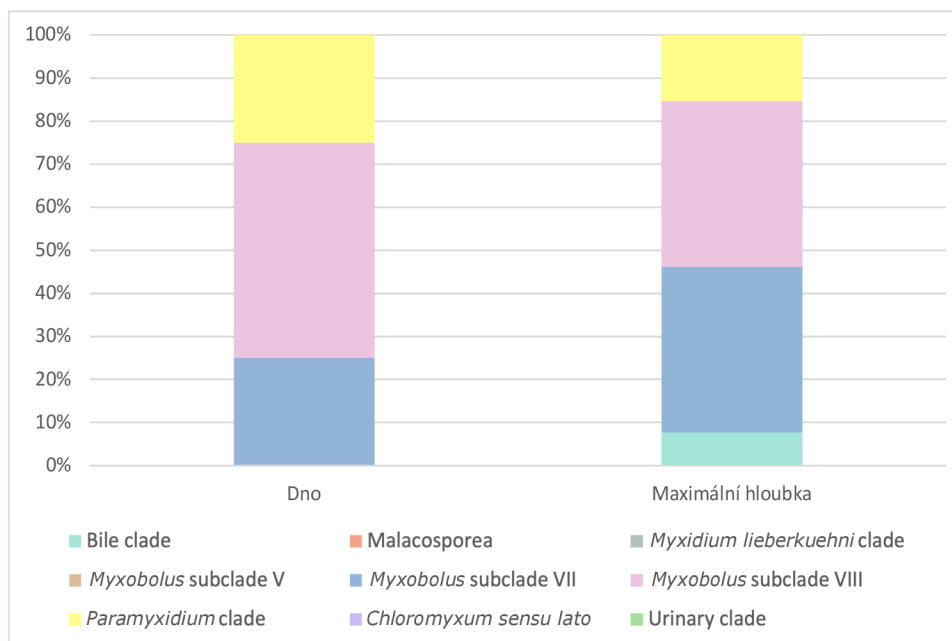
Téměř ve všech vzorcích odebraných z tkání rybích hostitelů byli zjištěni zástupci skupin *Myxobolus* subclade VII (kromě oukleje obecné) a VIII (kromě candáta obecného). U tří druhů rybích hostitelů (jelec proudník, ouklej obecná a plotice obecná) zabírá *Myxobolus* subclade VIII dokonce více než 50 % celkové zjištěné diverzity myxozoi. *Myxobolus* subclade VII byl v candátu obecném jediný detekovaný klejd. Naopak se v rybách vůbec nepovedlo zachytit zástupce ze skupin Bile clade a *Myxobolus* subclade V, kteří byli detekováni ve vzorcích z environmentu (viz obrázky 18 a 19).



Obr. 20: Procentuální zastoupení OTUs myxozoí detekovaných v rybích tkáních a orgánech. Barevně jsou označeny jednotlivé linie myxozoí, které jsou vyznačeny v legendě grafu.

### 5.2.5. Srovnání diverzity a abundance myxozoí v různých hloubkách sedimentu

Sediment byl odebírán pomocí speciálního zařízení ze dna vodní nádrže a z maximální možné hloubky (viz kapitola 4.1.1 Sediment). Celkem bylo odebráno 15 vzorků sedimentu ze dna a maximální možné hloubky nádrže. Ze dna vodní nádrže se podařilo získat celkem pět OTUs klastrující do tří kladů: *Myxobolus* subclade VII (jedno OTU, 5,8 % readů na dně v sedimentu), *Myxobolus* subclade VIII (dvě OTUs, 78 % readů na dně v sedimentu) a *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 16,2 % readů na dně v sedimentu). V maximální možné hloubce bylo detekováno celkem 13 OTUs, která byla přiřazena ke čtyřem fylogenetickým liniím. Stejně jako na dně vodní nádrže se podařilo detekovat *Myxobolus* subclade VII (pět OTUs, 0,3 % readů v sedimentu v maximální možné hloubce), VIII (pět OTUs, 47,3 % readů v sedimentu v maximální možné hloubce) a *Paramyxidium* clade (dvě OTU, 0,5 % readů v sedimentu v maximální možné hloubce). Navíc se v maximální hloubce v sedimentu podařilo detekovat jedno OTU přiřazené ke skupině Bile clade (51,9 % readů v sedimentu v maximální možné hloubce). Procentuální zastoupení OTUs na dně a v maximální možné hloubce popisuje obrázek 21.

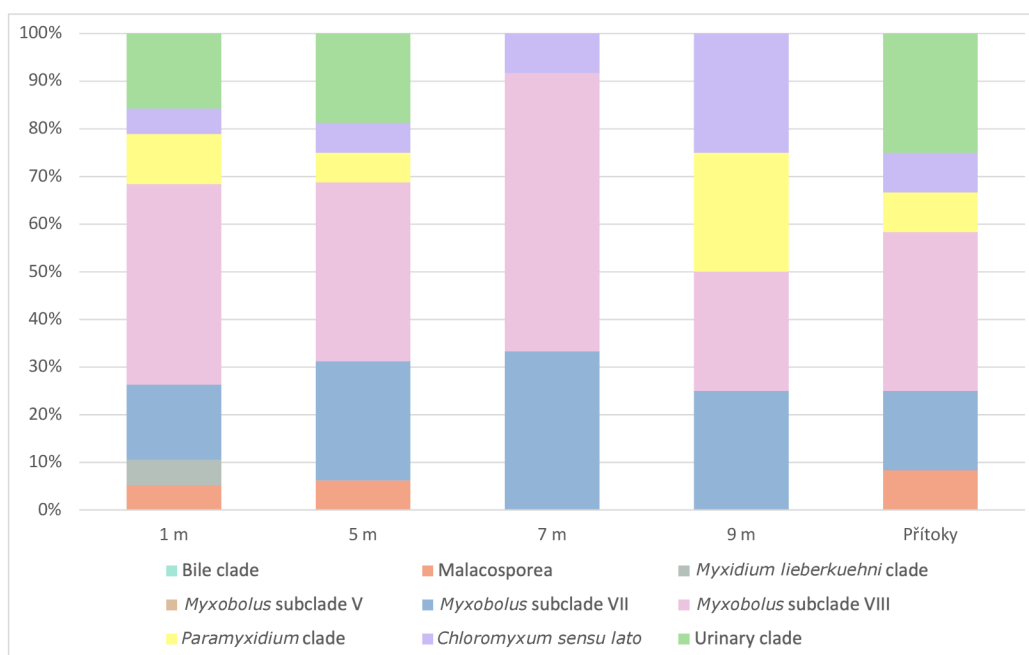


Obr. 21: Procentuální zastoupení OTUs myxozoi detekovaných ve vzorcích sedimentu odebraných v různých hloubkách (dno a maximální hloubka). Barevně jsou označeny jednotlivé linie myxozoi dle legendy v grafu.

### 5.2.6. Srovnání diverzity a abundance myxozoi v různých hloubkách vody

Následně bylo provedeno porovnání diverzity myxozoi determinované ze vzorků vody z různých hloubek přehradní nádrže Římov (obrázek 22). Je patrné, že diverzita myxozoi klesala s rostoucí hloubkou odběru vody. Nejvíce OTUs (19 OTUs) se podařilo detekovat ve vzorcích odebraných v hloubce 1 m a 5 m (15 OTUs). V hloubce 7 m bylo nalezeno 12 OTUs a v 9 m pouze čtyři OTUs. V oblastech přítoků se podařilo zjistit celkem 12 OTUs (obrázek 22). Sedm, respektive šest, různých klejdů a subklejdů se podařilo zjistit v hloubkách 1 a 5 m **V hloubce 1 m** to byly skupiny Malacosporea (jedno OTU, 0,7 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce), *M. lieberkuehni* clade (jedno OTU, 1,6 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce), *Myxobolus* subclade VII (tři OTUs, 53,2 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce) a VIII (osm OTUs, 12,3 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce), *Paramyxidium* clade (dvě OTUs, 2,9 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce), *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 1,6 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce) a Urinary clade (tři OTUs, 27,8 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce). **V hloubce 5 m** to byly klejdy Malacosporea (jedno OTU, 0,4 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce), *Myxobolus* subclade VII (tři OTUs, 42,9 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce) a VIII (šest OTUs, 17,4 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 0,5 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané

hloubce), *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 5,5 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce) a Urinary clade (tři OTUs, 33,1 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce). **V hloubce 7 m** klastrovala všechna detekovaná OTUs pouze do tří klejdů: *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 40,8 % zastoupení readů myxozoi v dané hloubce), *Myxobolus* subclade VII (čtyři OTUs, 38,4 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce) a VIII (sedm OTUs, 20,8 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce). **V hloubce 9 m** se navíc podařilo detekovat *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 1,1 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce), a stejně jako v hloubce 7 m *Myxobolus* subclade VII (jedno OTU, 7 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce) a VIII (jedno OTU, 2,3 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce) a *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 89,6 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce). **V přítocích** opět diverzita vzrostla, tam se podařilo detekovat šest různých klejdů a subklejdů (podobně jako v hloubce 1 m a 5 m): Malacospora (jedno OTU, 0,1 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce), *Myxobolus* subclade VII (dvě OTUs, 22,9 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce) a VIII (čtyři OTUs, 10,1 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce), *Paramyxidium* clade (jedno OTU, 8,3 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce), Urinary clade (tři OTUs, 57,3 % zastoupení počtu readů myxozoi v dané hloubce) a *Chloromyxum s. l.* (jedno OTU, 1,3 %). Ve všech hloubkách se podařil detekovat *Myxobolus* subclade VII, VIII a *Chloromyxum s. l.* Pouze v hloubkách 1 a 5 m a u přítoků se vyskytovaly linie Malacospora a Urinary clade a v hloubce 1 m byl jako v jediné hloubce detekován *M. lieberkuehni* clade.



Obr. 22: Procentuální zastoupení OTUs myxozoi detekovaných ve vzorcích vody odebraných v různých hloubkách. Barevně jsou označeny jednotlivé linie myxozoi dle legendy v grafu.

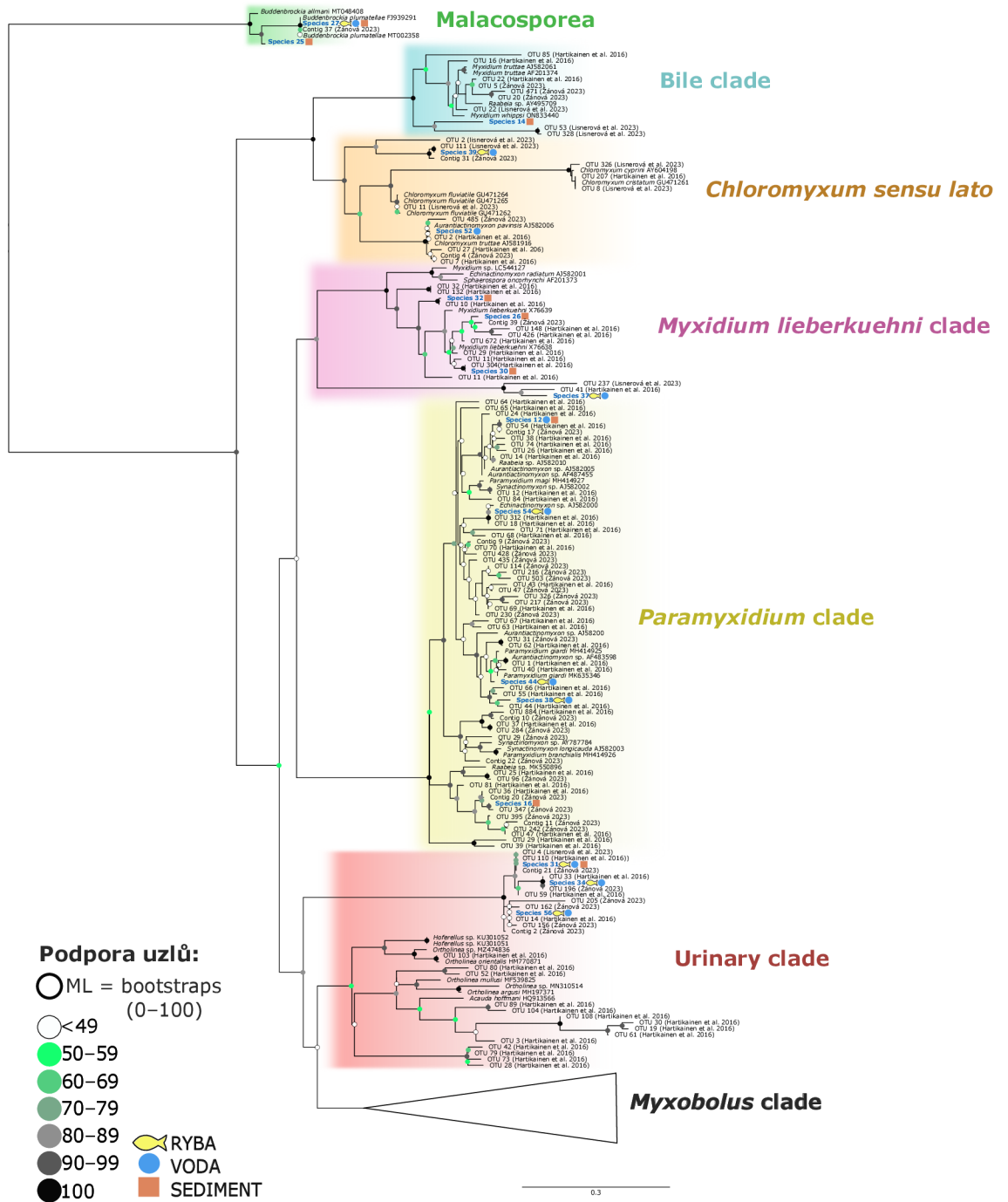
### 5.3. Fylogenetické analýzy

Byly vytvořeny dva fylogenetické stromy – jeden pro sladkovodní linii myxosporeí a Malacosporea (obrázek 23) a druhý pro samotnou linii *Myxobolus* (obrázek 24).

V rámci fylogenetické analýzy zaměřené na všechny Myxozoa vyjma linie *Myxobolus*, 17 detekovaných OTUs klastrovalo do šesti klejdů (Malacosporea, Bile clade, *Paramyxidium* clade, *Chloromyxum s. l.*, *M. lieberkuehni* clade a Urinary clade). Nejvíce OTUs (celkem 5 OTUs) připadlo do ***Paramyxidium* clade** (Species 12, Species 16, Species 38, Species 44 a Species 54). Species 12 se shoduje s pracemi Hartikainen et al. (2016) a Žánová (2023). Species 16, 38 a 44 jsou unikátní sekvence, které nebyly dříve detekovány. Species 54 byl shodný se dvěma OTUs dříve detekovanými v práci Hartikainen et al. (2016). Do ***M. lieberkuehni* clade** se zařadila čtyři různá OTUs (Species 26, Species 30, Species 32 a Species 37). Unikátní sekvence byly detekovány celkem ve třech případech (Species 26, 32 a Species 37) a Species 30 se shodoval s OTU dříve detekovaným v práci Hartikainen et al. (2016). Tři OTUs klastrovala na základě fylogenetické analýzy do **Urinary clade** (Species 31, Species 34 a Species 56). Species 31 se shodoval s Contig 21 (Žánová 2023), ale i se sekvencemi zjištěnými v pracích Hartikainen et al. (2016) a Lisnerové et al. (2023). Species 34 se také shodoval se sekvencemi detekovanými ve studiích Žánové (2023) a Hartikainen et al. (2016)

a poslední OTU z tohoto klejdu – Species 56 se shodoval s OTU 14 z práce Hartikainen et al. (2016). Do *Chloromyxum sensu lato* linie byla přiřazena dvě OTUs (Species 39 a Species 52). Species 39 se shodoval se sekvencí zjištěnou v práci Lisnerové et al. (2023) a Species 52 byl podle databáze GenBank unikátní sekvence. Do skupiny **Malacosporea** se podařila zařadit dvě OTUs. Species 25, který je na základě fylogenetické analýzy shodné s druhem *Buddenbrockia* sp. 1. Species 27 byl přiřazen k druhu *B. plamtellae* (FJ939291) a shoduje se se sekvencí Contig 37 (Žánová 2023). Prostředí, ve kterých byla jednotlivá OTUs detekována, jsou vyznačena ve fylogenetickém stromečku, zároveň, konkrétní rybí druhy, ve kterých se daná OTUs podařilo zachytit shrnuje tabulka IX. Z celkových 17 detekovaných OTUs (počítáno bez skupiny *Myxobolus*) se společně v práci Žánové (2023) a v této diplomové práci podařila detekovat pouze čtyři OTUs. Unikátních OTUs se podařilo získat devět a osm OTUs bylo přiřazeno k dříve detekovaným druhům nebo sekvencím.

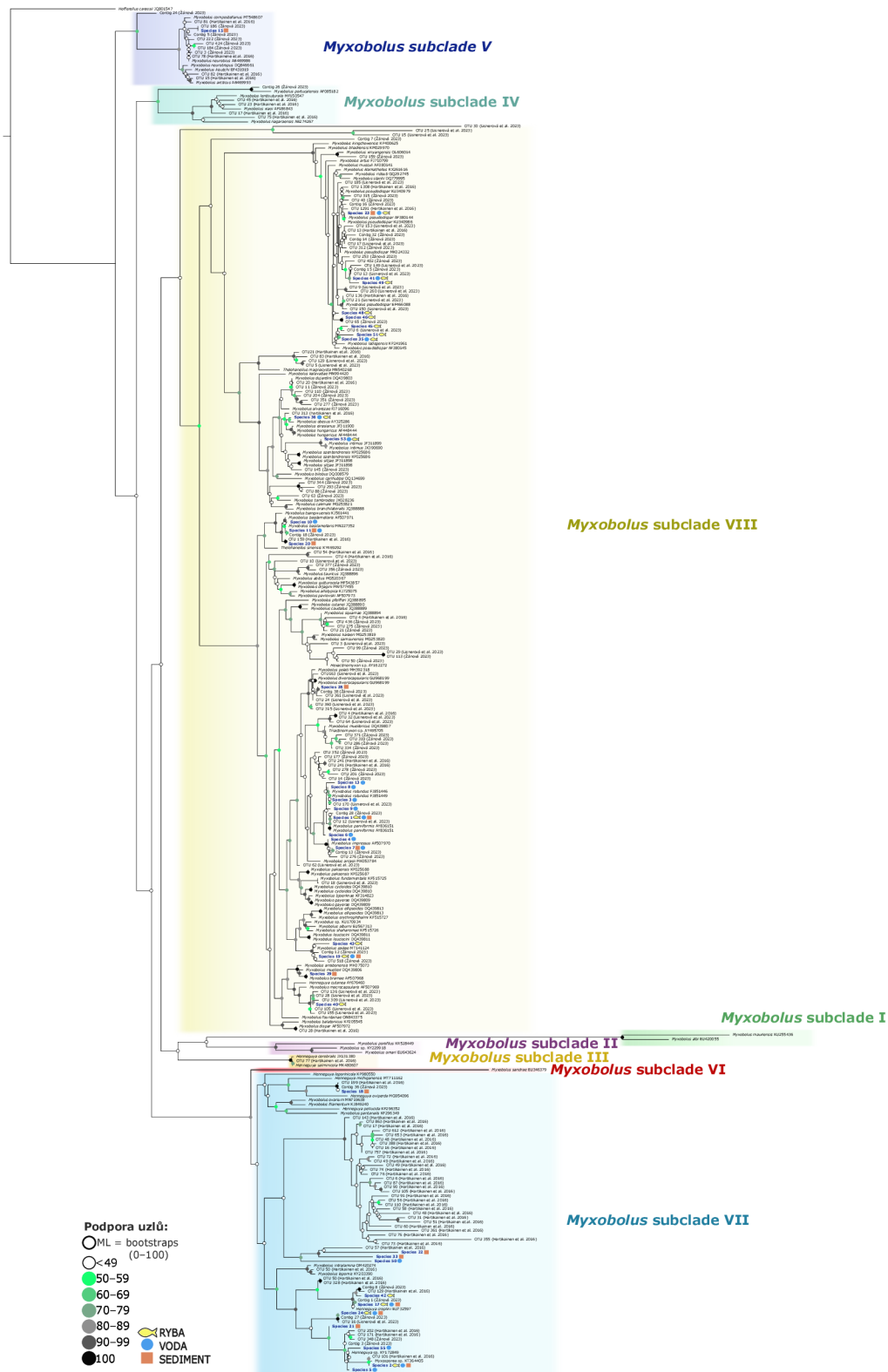




Obr. 23: Výsledný fylogenetický strom pro gen SSU rDNA vytvořený metodou Maximum likelihood pro skupinu Myxozoa s kolapsovaným cladem *Myxobolus*. Sekvence získané v této práci jsou vyznačeny tučně a světle modrou barvou. Barevné označení pro bootstrapové podpory jednotlivých uzlů jsou vyznačeny v legendě, stejně jako kde se dané OTU podařilo detekovat (voda, sediment, ryby). Jako outgroup byla použita skupina *Malacosporea*.

Druhá fylogenetická analýza obsahovala sekvence zastupující hlavní fylogenetické sublinie pro *Myxobolus* clade (obrázek 24) dle Liu et al. (2019). Všechna detekovaná OTUs klastrovala do tří subklejdů – jedno OTU do *Myxobolus* subclade V, 11 OTUs do *Myxobolus* subclade VII a nejvíce OTUs klastrovalo do *Myxobolus* subclade VIII, celkem 26 OTUs. Dohromady bylo přiřazeno do linie *Myxobolus* clade 38 OTUs. Celkem osm OTUs se shodovalo s již dříve detekovanými OTUs v práci Žánové (2023) a celkem 26 OTUs bylo naprosto unikátních a tyto sekvence nenašly žádnou shodu v databázi GenBank. Zbýlá čtyři OTUs byla detekovaná ve studiích Lisnerové et al. (2023), Hartikainen et al. (2016) nebo se shodovala se sekvencemi v databázi GenBank.

OTU klastující v **Myxobolus subclade V**, typicky infikující lososovité ryby, je shodné se sekvencí, která byla získána v práci Žánové (2023). Do **Myxobolus subclade VII** bylo přiřazeno celkem 11 OTUs. Osm těchto OTUs (s označením Species 2, 5, 21, 22, 33, 42, 50 a 55) jsou unikátní a neshodují se s žádnou dříve detekovanou sekvencí. OTU s označením Species 17, 18 a 24 jsou shodná s OTUs, která byla získána v práci Žánové (2023). 26 různých OTUs klastrovalo ve fylogenetické analýze do skupiny **Myxobolus subclade VIII**. Celkem 18 sekvencí (Species 4, 6, 8, 9, 10, 13, 19, 23, 35, 36, 40, 41, 43, 45, 48, 49, 51 a 53) jsou unikátní sekvence s neshodují se s žádnou dříve získanou sekvencí. Species 7, 11, 28 a 46 jsou shodné s dříve detekovanými OTUs na řece Malši v práci Žánové (2023). Species 20 se již dříve podařilo detekovat v práci Hartikainen et al. (2016). Species 3 byl na základě fylogenetické analýzy shodný s druhem *Myxobolus rotundus* (FJ851446). Species 1 je shodný se sekvencí detekovanou ve studii Lisnerové et al. (2023) a zároveň jsou tyto OTUs shodná s druhem *Myxobolus parviformis* (AY836151). Species 29 se nepodařilo na této lokalitě detekovat dříve (v práci Žánové (2023)), shoduje se ale s druhem *Myxobolus bramae* (AF507968). Prostředí, ve kterých byla jednotlivá OTUs nalezena, jsou vyznačena ve fylogenetickém stromu a konkrétní rybí druhy, ve kterých se jednotlivá OTUs podařilo zachytit, jsou shrnuty v tabulce IX.



Obr. 24: Fylogenetický strom vytvořený metodou Maximum likelihood pro gen SSU rDNA. Barevné označení podpory jednotlivých bootstrapových uzlů je vyznačeno v legendě, stejně jako kde se dané OTU podařilo detekovat (voda, sediment, ryby). Jako outgroup byl použit druh *Hofferellus carassii* (JQ801547).

Tab. IX: Jednotlivá OTUs detekovaná v rybách.

<b>Druh ryby</b>	<b>Druh rybomorky detekovaný v rybě</b>
Cejn velký	Species 1, Species 23, Species 24, Species 27, Species 31, Species 35, Species 36, Species 37, Species 38, Species 53, Species 54
Okoun říční	Species 19, Species 24, Species 27, Species 31, Species 35, Species 39, Species 42
Jelec proudník	Species 1, Species 19, Species 23, Species 24, Species 27, Species 31, Species 35, Species 37, Species 39, Species 40, Species 41
Ouklej obecná	Species 1, Species 19, Species 23, Species 24, Species 27, Species 31, Species 36, Species 38, Species 40, Species 41
Štika obecná	Species 2, Species 17, Species 19, Species 24, Species 31, Species 34, Species 35, Species 38, Species 39, Species 41
Plotice obecná	Species 19, Species 24, Species 27, Species 31, Species 35, Species 36, Species 37, Species 39, Species 40, Species 41, Species 43, Species 49, Species 53
Úhoř říční	Species 1, Species 2, Species 17, Species 23, Species 31, Species 34, Species 36, Species 38,
Jelec tloušť	Species 17, Species 19, Species 24, Species 27, Species 31, Species 35, Species 37, Species 39, Species 41, Species 44, Species 53, Species 56
Candát obecný	Species 17
Bolen dravý	Species 1, Species 17, Species 27, Species 31, Species 36, Species 38, Species 39, Species 44, Species 53, Species 56
Jeseter malý	Species 1, Species 19, Species 24, Species 27, Species 31, Species 34, Species 36, Species 38

## 6. Diskuze

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjistit a porovnat diverzitu myxozoi v přehradní nádrži Římov, a to z environmentálních vzorků sedimentu, vody, a dále ze vzorků rybích tkání za pomoci metabarkodingu a amplikonového sekvenování. Celkem bylo identifikováno 55 různých OTUs přiřazených k myxozoím, z nichž 25 bylo zachyceno v sedimentu, 31 ve vodě a 25 v rybách.

Tato diplomová práce je součástí širšího projektu, který se zabývá zjišťováním diverzity myxozoi z environmentálních vzorků odebraných na řece Malší za použití metabarkodingu a amplikonového sekvenování (Žánová 2023). Pokud porovnáám mnou získaná OTUs z přehradní nádrže Římov s diverzitou detekovanou v práci Žánové (2023) zaměřené na celý vodní tok Malše, bylo nalezeno 12 shodných OTUs, což je 21,8 % celkové diverzity myxozoi získané v této práci. Nejvyšší počet shodných OTUs byl přiřazen k *Myxobolus* clade, konkrétně k subclade VIII (čtyři OTUs z 26 detekovaných, respektive z 54 (Žánová (2023))). V *Myxobolus* subclade VII byla nalezena dvě shodná OTUs z 10 detekovaných, respektive z 11 detekovaných v práci Žánové (2023). Jedno shodné OTU klastrovalo do *Myxobolus* subclade V a bylo jediným nalezeným OTU přiřazeným do této skupiny, zatímco v práci Žánové (2023) se jich podařilo detekovat sedm. Do Urinary clade byla zařazena dvě shodná OTUs, kdy v této práci byla detekována celkem tři a v práci Žánové (2023) to bylo celkem pět OTUs. Poslední shodné OTU bylo přiřazeno ke skupině Malacosporea, kdy ze dvou detekovaných v této práci, se jedno shodovalo s jediným zachyceným OTU v práci Žánové (2023). Do linií Bile clade, *Chloromyxum s. l.*, *M. lieberkuehni* clade, a dokonce ani *Paramyxidium* clade se nepodařilo přiřadit ani jedno shodné OTU. Navíc, v práci Žánové (2023) bylo detekováno jedno OTU klastrující v *Myxobolus* subclade IV, avšak v této diplomové práci do této skupiny nebylo přiřazeno žádné OTU.

### 6.1. Porovnání celkové diverzity myxozoi v prostředích

Životní cyklus myxozoi probíhá zejména ve vodním prostředí a je komplexní. Zahrnuje střídání hostitelů, kdy spory jsou uvolňovány do prostředí (vody) a klesají ke dnu (do sedimentu) (McConnell & Cone 1992). Ač je zjišťování diverzity těchto parazitů pomocí eDNA (odběrů vzorků vody a sedimentů) zatím na začátku, studie naznačují, že použití této metody je velmi vhodné pro tyto účely (Hartikainen et al. 2016, Lisnerová et al. 2023).

V této diplomové práci se podařilo detekovat 55 myxozoích OTUs ve vzorcích ze sedimentu, vody a ryb pomocí amplikonového sekvenování, naproti tomu v práci Lisnerové

et al. (2023) to bylo dokonce 135 OTUs myxozoi. Navíc, pouze v environmentálních vzorcích (sediment a voda) bylo v této diplomové práci zjištěno 47 OTUs (85,5 % z celkové zjištěné diverzity), a to je více než v práci Lisnerové et al. (2023), kde bylo identifikováno 44 OTUs (32,6 % z celkové zjištěné diverzity) v environmentálních vzorcích. Nejvyšší diverzitu v environmentálních vzorcích se ale podařilo odhalit ve studiích Žánové (2023) (136 OTUs myxozoi ze sedimentu a vody) a Hartikainen et al. (2016) (107 OTUs z vody a ze vzorků trusu rybožravých obratlovců). Svou roli na výsledné rozložení diverzity může hrát počet vyšetřených ryb, kdy v této práci bylo vyšetřeno pouze 43 ryb, zatím co ve studii Lisnerové et al. (2023) to bylo 166 ryb. Tato rozdílná úroveň detekovaných OTUs v rybách nám naznačuje tendenci k rostoucí diverzitě se zvyšujícím se počtem vyšetřených vzorků. Zároveň výsledné množství detekované diverzity je zcela závislé na designu studie a množství odebraných vzorků, které v práci Lisnerové et al. (2023) nebylo dostatečné, jelikož cílem nebylo řešit celkovou diverzitu na lokalitách, ale pouze testovat metodiku.

Sediment je prostředí, kde se mohou kumulovat spory uvolňované mezihostitelem a definitivním hostitelem do prostředí a setrvávat zde po určitý čas (Halliday 1976). Bylo mým předpokladem, že diverzita v tomto prostředí bude nejvyšší, avšak to se nepotvrdilo (ve vodě byla detekována vyšší diverzita, 56,4 % celkové diverzity), protože se podařilo nalézt ani ne polovinu celkové diverzity (45,5 %, 25 OTUs). Naopak v práci Žánové (2023) se nejvíce OTUs podařilo nalézt právě v sedimentu – celkem 126 (92,6 % nalezené diverzity) a v práci Lisnerové et al. (2023) se v environmentech podařilo detekovat 44 OTUs (32,6 % nalezené diverzity). Důvodem vysoké zachytnosti myxozoi v sedimentu mohou být fyzikální vlastnosti spor – tedy jejich váha. Spory postupem času sedimentují na dno (McConnell & Cone 1992), kde se mohou kumulovat po delší dobu, což zvyšuje pravděpodobnost jejich nálezu v tomto prostředí – spory jsou schopné přežít až 30 let (Halliday 1976). Některé spory jsou navíc lépe přizpůsobeny usazování na dně v sedimentu. Například spory rodu *Myxobolus* jsou kulovité s relativně malým povrchem, to pravděpodobně usnadňuje jejich usazování na dně, kde mohou infikovat bentické kroužkovce (Lemmon & Kerans 2001; Lom & Dyková 2006). I v této diplomové práci 64 % OTUs (16 OTUs) detekovaných v sedimentu klastrovalo do *Myxobolus* clade, v práci Žánové (2023) to bylo 57,9 % (73 OTUs) a v práci Lisnerové et al. (2023) 61,5 % (83 OTUs). Sediment byl odebrán i z různých hloubek (konkrétně ze dna nádrže a z maximální možné hloubky), kdy na dně vodní nádrže se podařilo detekovat tři různé linie myxozoi (čtyři OTUs). Ovšem o poznání vyšší diverzita se vyskytovala v maximálních možných hloubkách, kde bylo detekováno celkem 13 OTUs klastrující do čtyř klejdů. Z těchto

13 OTUs bylo 10 přiřazeno do *Myxobolus* clade. To naznačuje, že spory s kulovitým tvarem mají větší tendence sedimentovat na dno nádrže (popřípadě jiného vodního ekosystému).

Dalším studovaným prostředím byla voda, kde byla nalezena nejvyšší diverzita a to 31 OTUs (56,4 % detekované diverzity). V práci Žánové (2023) to bylo pouze 10 OTUs (7,4 % z celkově detekované diverzity) a ve studii Hartikainen et al. (2016) 95 OTUs (88,8 % celkové zjištěné diverzity). V přehradní nádrži je stojatá voda, naproti tomu, řeka je voda tekoucí, odkud mohou být spory myxozoí odneseny proudem např. do vodních nádrží nebo rybníků. Zároveň Hartikainen et al. (2016) soustředila svou studii na detekci myxozoí právě ve vodě, proto jsou počty OTUs z vody v této práci tak vysoké. Ve vodním sloupci se očekává především výskyt aktinospor, které se vznášejí, aby infikovaly ryby (Bartholomew et al. 1997). Ovšem životnost těchto vývojových stádií je pouze několik dní, než dojde k jejich rozpadu (např. Markiw 1992; Xiao & Dessler 2000), takže to, že jsme byli schopni skupinu Myxozoa detekovat i ve vodě nám naznačuje aktivní sezónní výskyt parazitů. Jejich detekce ve vodě může naznačovat potenciální nebezpečí pro ryby, a proto by se mohla eDNA využít k varování před možným rizikem různých onemocnění (Sohn et al. 2021).

V sedimentu se kumulují spory myxozoí (viz výše) a je předpokladem, že diverzita je tak v tomto prostředí stálejší po více sezón. Na druhou stranu, v rybách (případně ve vodě) se vyskytují pouze parazité, jejichž životní cyklus zrovna probíhá a je velice proměnlivý a závislý mimo jiné i na období odběru vzorků/sezonalitě parazita (např. Foott & Hedrick 1987; Yokoyama et al. 2012; Alama-Bermejo et al. 2013; Kyslík et al. 2022). Není proto divu, že se žádná OTUs nepřekrývala mezi sedimentem a rybami (nepodařilo se detekovat žádné společné OTU) a mezi sedimentem a vodou se podařilo detekovat pouze tři společná OTUs. Naopak mezi vodou a rybami se překrývalo 11 OTUs. Výsledky této diplomové práce naznačují významné rozdíly mezi sedimentem a vodním sloupcem s rybami jako prostředími, kde jsme byli schopni detekovat Myxozoa a podporují potřebu pečlivého zvážení metodiky sběru vzorků podle daného cíle projektu, ideálně analyzovat vždy sedimenty i vodu pro celkové vyhodnocení diverzity myxozoí.

V porovnání jednotlivých myxozoích linií v prostředích se největší diverzitu jednotlivých klejdů podařilo detekovat v sedimentu. 25 OTUs detekovaných v sedimentu bylo přiřazeno k celkem osmi klejdům, z nichž Bile clade (jedno OTU) a *Myxobolus* subclade V (jedno OTU) se nacházely pouze v sedimentu. V práci Žánové (2023) se také tyto dva klejdy podařilo detekovat pouze ve vzorcích ze sedimentu. *Myxobolus* subclade V je sublinie, která zahrnuje druhy infikující lososovité ryby např. pstruha obecného (Couso-Pérez et al. 2021). Mnou detekované OTU z *Myxobolus* clade V se podařilo detekovat i v práci Žánová

(2023). Lososovité ryby (konkrétně druh pstruh obecný) se na řece Malši hojně vyskytovaly ještě před vybudováním přehradní nádrže Římov, tedy před více jak 50 lety (Vostradovská & Vostradovský 1983; Kubečka 1990; Sed'a & Kubečka 1997; Říha et al. 2009). Lososovité ryby byly v Římově detekovány i pomocí eDNA na podzim v letech 2018, 2019 a 2020 (konkrétně šlo o druhy pstruh obecný, pstruh duhový, siven americký a lipan podhorní) (Blabolil et al. 2021b). Lososovité ryby (pstruh obecný) se také běžně vyskytují v řece Malši (Matěnová & Matěna 2004), důkazem může být i detekce jednoho OTU z *Myxobolus* subclade V na čtyřech lokalitách v sedimentu na horním toku řeky Malše (Žánová 2023). Tato linie může představovat potenciální hrozbu pro pstruhy, protože druhy z *Myxobolus* subclade V napadají nervový systém ryb (např. Schuberg 1905; Urawa et al. 2011). Ze žlučnickového klejdu se podařilo detekovat jen jedno OTU na lokalitě 7, která je poměrně blízko přítoku řeky Malše. Toto OTU se však neshoduje s žádným dříve detekovaným OTU a je unikátní. V práci Žánové (2023) se zástupce tohoto klejdu také podařilo zachytit (celkem tři OTUs), ale pouze v dolním toku řeky Malše, tedy až za přehradní nádrží, z toho vyplývá, že tato linie je na dané lokalitě vzácná.

Jeden z předpokladů byl i výskyt malakosporeí spíše ve vodě než v sedimentu. Jejich spory jsou křehké s krátkou životností (12–24 h) a snadno se rozpadají (Fontes et al. 2017, De Kinkelin et al. 2002), a proto by se měly snáze detekovat ve vodě, než klesnou ke dnu a rozpadnou se. V obou prostředích se ale skupinu Malacosporea podařilo detekovat (ve vodě i v sedimentu). Křehké spory malakosporeí a tím i DNA mohly být zničeny už při filtrování vzorků vody při zpracování sedimentu a jejich biomasa a diverzita může být podhodnocena. V práci Žánové (2023) se podařilo detekovat pouze jedno OTU v sedimentu. To bylo shodné se sekvencí Species 27. Zároveň jsou tyto dvě sekvence na základě databáze GenBank shodné s druhem *Buddenbrockia plumatellae* (FJ939291). V této diplomové práci se ho podařilo detekovat ve všech třech prostředích na několika lokalitách po celé vodní nádrži. Navíc bylo v této práci zachyceno na jedné lokalitě (L7) v sedimentu další OTU ze skupiny Malacosporea – Species 25, které na základě srovnání s databází GenBank bylo identické se sekvencí *Buddenbrockia* sp. (FJ939290).

## 6.2. Detekce myxozoi na lokalitách

Celkový počet detekovaných OTUs na lokalitu je nejvyšší u přítokových oblastí, konkrétně na lokalitě 7 a 9 (18 OTUs, respektive 17 OTUs na lokalitě 9). Řeky a potoky mohou do rybníků a vodních nádrží přinést vysokou diverzitu parazitů, ale i ryb s parazity či volnou DNA. Zároveň je v oblasti hlavních přítoků nádrže vyšší diverzita ryb než u malých přítoků a



v hlavní části nádrže (Blabolil et al. 2021). Vyšší diverzita byla detekována až za oblastí přítoku, což mohlo být ovlivněno proudem vody, který odnesl spory a jejich DNA dále do vodní nádrže, kde došlo k jejich usazení v sedimentu. Proto je důležité diverzitu myxozoi z přítokových oblastí zjišťovat i v přítoku, a nejen přímo v oblasti vtoku do nádrže nebo rybníka. V práci Žánové (2023) se také podařilo vyšší diverzitu rybomerek detekovat za přítokovými oblastmi. Nejméně OTUs se podařilo detekovat přibližně vprostředku vodní nádrže (na lokalitě 5 – devět OTUs) a u přítoku řeky Malše (sedm OTUs), takže jednoznačný vzorec rozprostření diverzity myxozoi pozorovat nemůžeme. Svou roli ovšem může hrát i to, že ne ze všech studovaných lokalit byl odebírán sediment i voda. Je tedy nutné odebírat vzorky na několika lokalitách napříč celou studovanou oblastí, a taktéž je třeba brát v potaz další vlivy jako např. sezónnost, aby byl konečný odhad diverzity co nejpřesnější (Lisnerová et al. 2023).

Skoro na všech lokalitách převažuje *Myxobolus* clade – výjimkou je pouze lokalita u přítoku řeky Malše (LPM). Většinová detekce této linie byl jeden z předpokladů této diplomové práce, vzhledem k tomu, že zástupci tohoto klejdu parazitují u různých rybích druhů v různých tkáních a orgánech a tento klejd je i největší napříč celou skupinou Myxozoa – zaujímá přibližně 50 % celkové diverzity myxozoi (Molnár & Székely 2014; Holzer et al. 2018; Liu et al. 2019; Lisnerová et al. 2020; Lisnerová et al. 2023; Rangel et al. 2023). Co je ovšem zajímavé, je vyšší diverzita Urinary clade blíže k přítokům (dvě OTUs na lokalitě LPM a tři OTUs na lokalitě LPV). Ovšem práce Žánové (2023) nedetekuje žádné zástupce z tohoto klejdu v oblasti přítoku řeky Malše do Římovské přehrady, pouze na dvou lokalitách horního toku řeky byla detekována dvě shodná OTUs, z nichž jedno se shodovalo s OTU detekovaným na lokalitě LPM a obě tato OTUs detekovaná v práci Žánové (2023) se podařilo zjistit na lokalitě LPV.

### **6.3. Detekce myxozoi v různých hloubkách ve vodě**

V rámci jednotlivých hloubek vody byl nejvyšší počet detekovaných myxozoičích OTUs v hloubce 1 m (19 OTUs) a v hloubce 5 m (15 OTUs), v dalších hloubkách bylo zjištěno 12 OTUs (v 7 m), respektive čtyři OTUs v hloubce 9 m. Zároveň i diverzita jednotlivých klejdů je nejvyšší v hloubkách 1 a 5 m, kde se podařilo detekovat zástupce ze sedmi klejdů v 1 m, respektive šesti klejdů v hloubce 5 m (v hloubce 7 m to byly tři linie a 9 m to byly čtyři linie). Může to být způsobeno přítomností jejich mezipřenositelů, kteří na hladině hledají potravu a jsou pozitivně přitahováni světlem (Kim & Mandrak 2017; Poulin 2023). Například *M. lieberkuehni* clade (detekovaný v hloubce 1 m) typicky infikuje štiky (Lom et al. 1989). Ty

plavou u hladiny, aby se vyhrály na slunci, a parazit se do prostředí dostává močí nakažené ryby (Nordahl et al. 2020).

#### 6.4. Detekce myxozoi v rybách

V rybách se podařilo detekovat 25 různých OTUs (45,5 % z celkové detekované diverzity). V práci Lisnerové et al. (2023) se podařilo najít v rybách 91 OTUs (67,4 % z celkové detekované diverzity). V rybách se nejčastěji podařilo detekovat zástupce z *Myxobolus* clade. Ten v deseti z jedenácti vyšetřovaných druhů ryb tvořil 50 % a více celkového počtu OTUs v dané rybě, pouze v bolenu dravém to bylo 40 % počtu OTUs. Dominance tohoto klejdu v rybách se očekávala, vzhledem k tomu, že tento klejd je druhově nejpočetnější napříč celou sladkovodní linií myxosporeí – je popsáno přes 1 200 druhů (Eiras et al. 2005; Eiras et al. 2014; Eiras & Adriano 2012; Eiras et al. 2021 Rangel et al. 2023).

Úhoř říční je typickým hostitelem linie *Paramyxidium* (Freeman & Kristmundsson 2018, Lisnerová et al. in prepar.) a prevalence zástupců této linie v tomto druhu úhoře se blíží 100 % (Lisnerová et al. in prepar.). Doposud byla tato linie myxozoi detekovaná pouze v úhoři říčním a tarponu americkém (Freeman & Kristmundsson 2018), přičemž počty detekovaných OTUs tohoto klejdu jsou řádově desítky. V této práci se tento klejd podařilo detekovat i v dalších sedmi vyšetřovaných druzích: bolen dravý, cejn velký, jelec proudník, jelec tloušť, jeseter malý, ouklej obecná a štika obecná. Tyto studované rybí druhy jsou běžnými hostiteli myxozoi (Baska et al. 1990; Longshaw et al. 2005; Cech et al. 2015; Lisnerová et al. 2020), ale skupinu *Paramyxidium* se v nich doposud detekovat nepodařilo. Může jít tedy o první záznamy těchto OTUs u jiných druhů než úhořovitých, což by vysvětlovalo obrovskou škálu dosud nepopsaných druhů (OTUs). Neméně pravděpodobné je ale také to, že u těchto vzorků mohlo dojít ke kontaminaci během zpracování v laboratoři. Ryby a jejich tkáně byly zpracovávány na jaře v letech 2016 a 2017. V této době ještě nebyla v naší laboratoři zavedena metoda environmentální DNA a amplikonového sekvenování, a s tím i přísná opatření zamezující kontaminacím. Metabarkodování a amplikonové sekvenování je vysoce senzitivní metoda, která je schopná detekovat i nepatrné množství DNA myxozoi (Lisnerová et al. 2023; Bass et al. 2023). V některých případech se také mohlo jednat o stádia parazitů, která se dostala do nesprávného mezihostitele a byla detekována ještě předtím, než je zničil imunitní systém ryby (Holzer et al. 2013).

*M. lieberkuehni* clade je linie infikující nejčastěji vylučovací soustavu štik a je hostitelsky i tkáňově specifická (Lom et al. 1989; McAllister et al. 2022). Konkrétně druh *Myxidium lieberkuehni* infikuje vylučovací soustavu (močový měchýř a ledviny) štik a jeho

prevalence v nich je poměrně vysoká (Lom et al. 1989). Je proto zvláštní, že se tento klejd nepodařilo detekovat ve štikách. Štika byla vyšetřena pouze jedna a je proto možné, že tato štika nebyla infikována rybmorkami z linie *M. lieberkuehni*, případně ryba byla infikovaná, ale ve vyšetřovaném vzorku se nenacházely žádné spory nebo jiná vývojová stádia a jednalo se tak o falešně negativní vzorek/rybu (vzorek se jevil jako negativní, i přesto, že se v rybě Myxozoa nacházela).

Druh *Buddendrockia plumatellae* (v této práci jako Species 27) je druh malakosporeí běžně se vyskytující u sladkovodních ryb (Bartošová-Sojková et al. 2014) a byl již detekován ve více než 12 sladkovodních druzích ryb a dokonce i v jedné parybě (např. Bartošová-Sojková et al. 2014; Naldoni et al. 2019). V této diplomové práci se tento druh podařilo nalézt u sedmi rybích druhů, kde již druh byl detekován dříve a to včetně mikroskopické detekce. To naznačuje, že v těchto rybách probíhal životní cyklus myxozoi a jsou tedy pravými hostiteli. U druhu jeseter malý se *B. plumatellae* podařilo identifikovat až v této diplomové práci. Avšak součástí této práce nebyla mikroskopická analýza, tudíž není možné říci, zda je tento rybí druh pravým hostitelem, ve kterém může probíhat životní cyklus nebo se jedná o kontaminaci (Lisnerová et al. 2023; Bass et al. 2023) či záchyt stádií parazitů v nesprávném hostiteli (Holzer et al. 2013).

## 7. Závěr

- 1) Celkem bylo detekováno 55 OTUs v 75 vzorcích, z nichž 27 vzorků pochází ze sedimentu, 37 z vody a 11 z ryb.
- 2) Nejvyšší diverzita OTUs byla zaznamenána ve vodě (31 OTUs, což představuje 56 % detekované diverzity). V ostatních prostředích, konkrétně v sedimentu a v rybách, bylo nalezeno po 25 OTUs (což představuje 46 % identifikované diverzity).
- 3) Téměř 64 % detekovaných OTUs se neshoduje s dříve získanými sekvencemi v databázi a je považováno za unikátní. Přibližně 22 % nalezené diverzity odpovídá OTUs detekovaným v řece Malši v práci Žánové (2023), a 20 % bylo přiřazeno k již dříve získaným sekvencím a popsáným druhům.
- 4) Získaná OTUs klastrovala do devíti fylogenetických linií, přičemž nejvíce OTUs bylo přiřazeno do skupiny *Myxobolus* clade. V rámci této skupiny se získané sekvence rozčlenily do tří sublinií, s největším zastoupením v *Myxobolus* subclade VIII, který byl detekován jak ve vodě, tak v sedimentu napříč celou nádrží.

## 8. Zdroje

- Adams, C. I., Knapp, M., Gemmell, N. J., Jeunen, G. J., Bunce, M., Lamare, M. D., & Taylor, H. R. (2019). Beyond biodiversity: Can environmental DNA (eDNA) cut it as a population genetics tool?. *Genes*, *10*, 192.
- Ahmed, I., Ahmad, I., Dar, S. A., Awas, M., Kaur, H., Ganai, B. A., & Shah, B. A. (2019). *Myxobolus himalayaensis* sp. nov. (Cnidaria: Myxozoa) parasiting *Schizothorax richardsonii* (cyprinidae: Schizothoracinae) from River Poonch in north west Himalaya, India. *Aquaculture Reports*, *14*, 100192.
- Alama-Bermejo, G., & Holzer, A. S. (2021). Advances and discoveries in myxozoan genomics. *Trends in Parasitology*, *37*, 552–568.
- Alama-Bermejo, G., Hernández-Orts, J. S., García-Varela, M., Ocegüera-Figueroa, A., Pecková, H., & Fiala, I. (2023). Diversity of myxozoans (Cnidaria) infecting Neotropical fishes in southern Mexico. *Scientific Reports*, *13*, 12106.
- Alama-Bermejo, G., Šíma, R., Raga, J. A., & Holzer, A. S. (2013). Understanding myxozoan infection dynamics in the sea: seasonality and transmission of *Ceratomyxa puntazzi*. *International Journal for Parasitology*, *43*, 771–780.
- Appeltans, W., Ahyong, S. T., Anderson, G., Angel, M. V., Artois, T., Bailly, N., Bamber, R., Barber, A., Bartsch, I., Berta, A., Błazewicz-Paszkowycz, M., Bock, P., Boxshall, G., Boyko, C. B., Brandão, S. N., Bray, R. A., Bruce, N. L., Cairns, S. D., Chan, T., Cheng, L., ... & Costello, M. J. (2012). The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology*, *22*, 2189–2202.
- Araújo, B. L., Adriano, E. A., Franzolin, G. N., Zatti, S. A., & Naldoni, J. (2022). A novel *Ceratomyxa* species (Myxozoa: Cnidaria) infecting an Amazonian catfish. *Parasitology International*, *89*, 102582.
- Aronesty, E. (2011). Ea-unils: Command-line tools for processing biological sequencing data <http://code.google.com/p/ea-utils>.

- Atkinson, S. D., & Bartholomew, J. L. (2009). Alternate spore stages of *Myxobilatus gasterostei*, a myxosporean parasite of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) and oligochaetes (*Nais communis*). *Parasitology Research*, *104*, 1173–1181.
- Atkinson, S. D., Hallett, S. L., Díaz-Morales, D., Bartholomew, J. L., & de Buron, I. (2019). First myxozoan infection (Cnidaria: Myxosporea) in a marine polychaete from North America and erection of actinospore collective group Saccimyxon. *Journal of Parasitology*, *105*, 252–262.
- Bahri, S., Marton, S., Marques, A., & Eszterbauer, E. (2010). *Henneguya tunisiensis* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida), a new gill parasite of *Symphodus tinca* (L.) (Teleostei: Labridae) off Tunisia. *Systematic Parasitology*, *76*, 93–101.
- Banerjee, P., Basu, S., & Modak, B. K. (2021). Prevalence of Myxozoan Parasites of Riverine Fishes of Jalpaiguri District, West Bengal, India. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, *91*, 635–641.
- Barta, J. R., Martin, D. S., Liberator, P. A., Dashkevich, M., Anderson, J. W., Feighner, S. D., Elbrrecht, A., Perkin-Barrow, A., Jenkins, M. C., Danforth, H. D., Ruff, M. D., & Profous-Juchelka, H. (1997). Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *The Journal of Parasitology*, *83*, 262–271.
- Bartholomew, J. L., Atkinson, S. D., Hallett, S. L., Lowenstine, L. J., Garner, M. M., Gardiner, C. H., Rideout, B. A., Keel, M. K., & Brown, J. D. (2008). Myxozoan parasitism in waterfowl. *International Journal for Parasitology*, *38*, 1199–1207.
- Bartholomew, J. L., Rohovec, J. S., & Fryer, J. L. (1989). *Ceratomyxa shasta*, a Myxosporean Parasite of Salmonids. *U.S. Fish & Wildlife Service Fish Disease*, *80*, 1–8.
- Bartholomew, J. L., Whipple, M. J., Stevens, D. G., & Fryer, J. L. (1997). The life cycle of *Ceratomyxa shasta*, a myxosporean parasite of salmonids, requires a freshwater polychaete as an alternate host. *Journal of Parasitology*, *83*, 859–868.
- Bartošová-Sojtková, P., Hrabcová, M., Pecková, H., Patra, S., Kodádková, A., Jurajda, P., Tým, T., & Holzer, A. S. (2014). Hidden diversity and evolutionary trends in malacosporean

parasites (Cnidaria: Myxozoa) identified using molecular phylogenetics. *International Journal for Parasitology*, *44*, 565–577.

Bartošová, P., & Fiala, I. (2011). Molecular evidence for the existence of cryptic species assemblages of several myxosporeans (Myxozoa). *Parasitology Research*, *108*, 573–583.

Bartošová, P., Fiala, I., Jirků, M., Cinková, M., Caffara, M., Fioravanti, M. L., Atkinson, S. D., Bartholomew, J. L., & Holzer, A. S. (2013). *Sphaerospora sensu stricto*: taxonomy, diversity and evolution of a unique lineage of myxosporeans (Myxozoa). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *68*, 93–105.

Bartošová, P., Freeman, M. A., Yokoyama, H., Caffara, M., & Fiala, I. (2011). Phylogenetic position of *Sphaerospora testicularis* and *Latyspora scomberomori* n. gen. n. sp. (Myxozoa) within the marine urinary clade. *Parasitology*, *138*, 381–393.

Baska, F. (1990). *Chloromyxum inexpectatum* n. sp. and *Sphaerospora colomani* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea), parasites of the urinary system of the sterlet, *Acipenser ruthenus* L. *Systematic Parasitology*, *16*, 185–193.

Bass, D., Christison, K. W., Stentiford, G. D., Cook, L. S., & Hartikainen, H. (2023). Environmental DNA/RNA for pathogen and parasite detection, surveillance, and ecology. *Trends in Parasitology*, *39*, 285–304.

Bass, D., Stentiford, G. D., Littlewood, D. T. J., & Hartikainen, H. (2015). Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology. *Trends in Parasitology*, *31*, 499–513.

Blabolil, P., Hänfling, B., Harper, L. R., Sellers, G., Di Muri, C., Griffiths, N. P., dos Santos, R. A., Knežević-Jarić, J., Jůza, T., Vašek, M., Čech, M., Muška, M., Fiala, I., Lisnerová, M., & Peterka, J. (2021b). *Vzorkování volné genetické informace (eDNA) z vody*. Biologické centrum Akademie věd ČR, Česká republika.

Blabolil, P., Harper, L. R., Říčanová, Š., Sellers, G., Di Muri, C., Jůza, T., Vašek, M., Sajdlová, Z., Rychtecký, P., Znachor, P., Hejzlar, J., Peterka, J., & Hänfling, B. (2021). Environmental DNA metabarcoding uncovers environmental correlates of fish communities in spatially heterogeneous freshwater habitats. *Ecological Indicators*, *126*, 107698.

- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., Douglas, W. Y., & De Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, *29*, 358–367.
- Breyta, R., Atkinson, S. D., & Bartholomew, J. L. (2020). Evolutionary dynamics of *Ceratonova* species (Cnidaria: Myxozoa) reveal different host adaptation strategies. *Infection, Genetics and Evolution*, *78*, 104081.
- Bütschli, O. (1882). Myxosporidia. In: *Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs. 1. Protozoa, Second Edition*, 590–603. C. F. Winter'sche, Germany.
- Canning, E. U., Curry, A., & Okamura, B. (2008). Early development of the myxozoan *Buddenbrockia plumatellae* in the bryozoans *Hyalinella punctata* and *Plumatella fungosa*, with comments on taxonomy and systematics of the Myxozoa. *Folia Parasitologica*, *55*, 241.
- Canning, E. U., Curry, A., Feist, S. W., Longshaw, M., & Okamura, B. (2000). A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *47*, 456–468.
- Canning, E. U., Curry, A., Hill, S. L., & Okamura, B. (2007). Ultrastructure of *Buddenbrockia allmani* n. sp. (Myxozoa, Malacosporea), a parasite of *Lophopus crystallinus* (Bryozoa, Phylactolaemata). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *54*, 247–262.
- Canning, E. U., Tops, S., Curry, A., Wood, T. S., & Okamura, B. (2002). Ecology, development and pathogenicity of *Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910 (Myxozoa, Malacosporea) (syn. *Tetracapsula bryozoides*) and establishment of *Tetracapsuloides* n. gen. for *Tetracapsula bryosalmonae*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *49*, 280–295.
- Casal, G., Soares, E. C., Rocha, S., Silva, T. J., Santos, E. L., Nascimento, R., Oliviera, E., & Azevedo, C. (2019). Description of a new myxozoan *Kudoa eugerres* n. sp. and reclassification of two *Sphaerospora sensu lato* species. *Parasitology Research*, *118*, 1719–1730.
- Cech, G., Borzák, R., Molnár, K., & Székely, C. (2015). Three new species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxobolidae) infecting the common nase *Chondrostoma nasus* (L.) in the River Danube. *Systematic Parasitology*, *92*, 101–111.



- Collins, A. G., Bentlage, B., Lindner, A., Lindsay, D., Haddock, S. H., Jarms, G., Norenburg, J. L., Jankowski, T., & Cartwright, P. (2008). Phylogenetics of Trachylina (Cnidaria: Hydrozoa) with new insights on the evolution of some problematical taxa. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *88*, 1673–1685.
- Cone, D. K., Horner, R. W., & Hoffman, G. L. (1990). Description of *Myxobolus corneus* (Myxosporea): A new species from the eyes of bluegills from Illinois. *Journal of Aquatic Animal Health*, *2*, 132–134.
- Corliss, J. O. (1981). What are the taxonomic and evolutionary relationships of the Protozoa to the Protista?. *Biosystems*, *14*, 445–459.
- Corliss, J. O. (1984). The kingdom Protista and its 45 phyla. *BioSystems*, *17*, 87–126.
- Couso-Pérez, S., Rangel, L. F., Santos, M. J., Ares-Mazás, E., & Gómez-Couso, H. (2021). Morphological and molecular characterization of a novel *Myxobolus* species from the gastrointestinal tract of brown trout (*Salmo trutta*) in Spain. *Parasitology Research*, *120*, 2469–2478.
- De Kinkelin, P., Gay, M., & Forman, S. (2002). The persistence of infectivity of *Tetracapsula bryosalmonae*-infected water for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, *25*, 477–482.
- Desser, S. S., Molnar, K., & Weller, I. (1983). Ultrastructure of sporogenesis of *Thelohanellus nikolskii* Akhmerov, 1955 (Myxozoa: Myxosporea) from the common carp, *Cyprinus carpio*. *The Journal of Parasitology*, *69*, 504–518.
- Diamant, A., Ucko, M., Paperna, I., Colorni, A., & Lipshitz, A. (2005). *Kudoa iwatai* (Myxosporea: Multivalvulida) in wild and cultured fish in the Red Sea: redescription and molecular phylogeny. *Journal of Parasitology*, *91*, 1175–1189.
- Díaz-Ferguson, E. E., & Moyer, G. R. (2014). History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Revista de Biología Tropical*, *62*, 1273–1284.

- Dyková, I., Lom, J., & Grupcheva, G. (1987). Pathogenicity and some structural features of *Myxidium rhodei* (Myxozoa: Myxosporea) from the kidney of the roach *Rutilus rutilus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2, 109–115.
- Dyková, I., Tým, T., Fiala, I., & Lom, J. (2007). New data on *Soricimyxum fegati* (Myxozoa) including analysis of its phylogenetic position inferred from the SSU rRNA gene sequence. *Folia Parasitologica*, 54, 272.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460–2461.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27, 2194–2200.
- Eiras, J. C. (2002). Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*, 52, 43–54.
- Eiras, J. C. (2006). Synopsis of the species of *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Ceratomyxidae). *Systematic Parasitology*, 65, 4–71.
- Eiras, J. C., & Adriano, E. A. (2012). A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. *Systematic Parasitology*, 83, 95–104.
- Eiras, J. C., Cruz, C. F., Saraiva, A., & Adriano, E. A. (2021). Synopsis of the species of *Myxobolus* (Cnidaria, Myxozoa, Myxosporea) described between 2014 and 2020. *Folia Parasitologica*, 68, 1–19.
- Eiras, J. C., Cruz, C., & Saraiva, A. (2018). Synopsis of the species of *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Cnidaria, Myxosporea, Ceratomyxidae) described between 2007 and 2017. *Systematic Parasitology*, 95, 427–446.
- Eiras, J. C., Molnár, K., & Lu, Y. (2005). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*, 61, 1–46.
- Eiras, J. C., Saraiva, A., & Cruz, C. (2014). Synopsis of the species of *Kudoa* Meglitsch, 1947 (Myxozoa: Myxosporea: Multivalvulida). *Systematic Parasitology*, 87, 153–180.

- El-Matbouli, M., Fischer-Scherl, T., & Hoffmann, R. W. (1992). Present knowledge on the life cycle, taxonomy, pathology, and therapy of some Myxosporea spp. important for freshwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 367–402.
- Espinoza, L. L., Mertins, O., Gama, G. S., Patta, A. C. F., & Mathews, P. D. (2017). A new *Myxidium* species (Myxozoa: Myxosporea) infecting the gallbladder of the turtle *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) from Peruvian Amazon. *Acta Tropica*, 172, 75–79.
- Eszterbauer, E., Atkinson, A., Diamant, A., Morris, D., El-Matbouli, M., & Hartikainen, H. (2015). Myxozoan life cycles: Practical approaches and insights. In: B. Okamura, A. Gruhl, J. L. Bartholomew (Eds.), *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*, 175–198. Springer International Publishing, Switzerland.
- Feist, S. W., & Longshaw, M. (2006). Phylum Myxozoa. In: P. T. K. Woo (Ed.), *Fish diseases and disorders. Volume 1: protozoan and metazoan infections*, 230–296. CABI, UK.
- Fiala, I. (2006). The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal for Parasitology*, 36, 1521–1534.
- Fiala, I., & Bartošová, P. (2010). History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 1–13.
- Fiala, I., Bartošová-Sojtková, P., Okamura, B., & Hartikainen, H. (2015b). Adaptive radiation and evolution within the Myxozoa. In: B. Okamura, A. Gruhl, J. L. Bartholomew (Eds.), *Myxozoan evolution, ecology and development*, 69–84. Springer International Publishing, Switzerland.
- Fiala, I., Bartošová-Sojtková, P., & Whipps, C. M. (2015a). Classification and phylogenetics of Myxozoa. In: B. Okamura, A. Gruhl, J. L. Bartholomew (Eds.), *Myxozoan evolution, ecology and development*, 85–110. Springer International Publishing, Switzerland.
- Fontes, I., Hartikainen, H., Holland, J. W., Secombes, C. J., & Okamura, B. (2017). *Tetracapsuloides bryosalmonae* abundance in river water. *Diseases of Aquatic Organisms*, 124, 145–157.

- Foott, J. S., & Hedrick, R. P. (1987). Seasonal occurrence of the infectious stage of proliferative kidney disease (PKD) and resistance of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to reinfection. *Journal of Fish Biology*, *30*, 477–483.
- Foxx, J., & Siddall, M. E. (2015). The road to Cnidaria: history of phylogeny of the Myxozoa. *The Journal of Parasitology*, *101*, 269–274.
- Freeman, M. A., & Kristmundsson, Á. (2018). Studies of *Myxidium giardi* Cépède, 1906 infections in Icelandic eels identifies a genetically diverse clade of myxosporeans that represents the *Paramyxidium* ng. (Myxosporea: Myxidiidae). *Parasites & Vectors*, *11*, 1–13.
- Gleeson, R. J., & Adlard, R. D. (2012). Phylogenetic relationships amongst *Chloromyxum* Mingazzini, 1890 (Myxozoa: Myxosporea), and the description of six novel species from Australian elasmobranchs. *Parasitology International*, *61*, 267–274.
- Grabner, D. S., & El-Matbouli, M. (2010). *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacospora) portal of entry into the fish host. *Diseases of Aquatic Organisms*, *90*, 197–206.
- Griffin, M. J., Khoo, L. H., Torrans, L., Bosworth, B. G., Quiniou, S. M., Gaunt, P. S., & Pote, L. M. (2009). New data on *Henneguya pellis* (Myxozoa: Myxobolidae), a parasite of blue catfish *Ictalurus furcatus*. *Journal of Parasitology*, *95*, 1455–1467.
- Gruhl, A. (2015). Myxozoa. In: A. Wanninger (Ed.), *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 1: Introduction, Non-Bilateria, Acoelomorpha, Xenoturbellida, Chaetognatha*, 165–177. Springer, Germany.
- Halliday, M. M. (1976). The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease of salmonids. *Journal of Fish Biology*, *9*, 339–357.
- Harrington, B., the Inkscape developer team (2004–2005). Inkscape. <https://inkscape.org/>
- Hartigan, A., Fiala, I., Dykova, I., Rose, K., Phalen, D. N., & Šlapeta, J. (2012). New species of Myxosporea from frogs and resurrection of the genus *Cystodiscus* Lutz, 1889 for species with myxospores in gallbladders of amphibians. *Parasitology*, *139*, 478–496.
- Hartikainen, H., Bass, D., Briscoe, A. G., Knipe, H., Green, A. J., & Okamura, B. (2016). Assessing myxozoan presence and diversity using environmental DNA. *International Journal for Parasitology*, *46*, 781–792.

- Hartikainen, H., Gruhl, A., & Okamura, B. (2014). Diversification and repeated morphological transitions in endoparasitic cnidarians (Myxozoa: Malacosporea). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 76, 261–269.
- Hedrick, R. P., Adkison, M. A., El-Matbouli, M., & MacConnell, E. (1998). Whirling disease: re-emergence among wild trout. *Immunological Reviews*, 166, 365–376.
- Hendrick, R. P., Kent, M. L., & Smith, C. E. (1986). Proliferative kidney disease in salmonid fishes. *US Fish & Wildlife Publication*, 74, 1–9.
- Holzer, A. S., Bartošová-Sojková, P., Born-Torrijos, A., Lövy, A., Hartigan, A., & Fiala, I. (2018). The joint evolution of the Myxozoa and their alternate hosts: a cnidarian recipe for success and vast biodiversity. *Molecular Ecology*, 27, 1651–1666.
- Holzer, A. S., Bartošová, P., Pecková, H., Tysl, T., Atkinson, S., Bartholomew, J., Sipos, D., Eszterbauer, E., & Dyková, I. (2013). 'Who's who' in renal sphaerosporids (Bivalvulida: Myxozoa) from common carp, Prussian carp and goldfish: Molecular identification of cryptic species, blood stages and new members of *Sphaerospora sensu stricto*. *Parasitology*, 140, 46–60.
- Holzer, A. S., Sommerville, C., & Wootten, R. (2004). Molecular relationships and phylogeny in a community of myxosporeans and actinosporeans based on their 18S rDNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 34, 1099–1111.
- Iwanowicz, L. R., Iwanowicz, D. D., Pote, L. M., Blazer, V. S., & Schill, W. B. (2008). Morphology and 18s rDNA of *Henneguya gurlei* (myxosporea) from *Ameiurus nebulosus* (siluriformes) in North Carolina. *Journal of Parasitology*, 94, 46–57.
- Jiménez-Guri, E., Okamura, B., & Holland, P. W. (2007). Origin and evolution of a myxozoan worm. *Integrative and Comparative Biology*, 47, 752–758.
- Jirků, M., Fiala, I., & Modrý, D. (2007). Tracing the genus *Sphaerospora*: rediscovery, redescription and phylogeny of the *Sphaerospora ranae* (Morelle, 1929) n. comb. (Myxosporea, Sphaerosporidae), with emendation of the genus *Sphaerospora*. *Parasitology*, 134, 1727–1739.

- Johnson, P. T., Wood, C. L., Joseph, M. B., Preston, D. L., Haas, S. E., & Springer, Y. P. (2016). Habitat heterogeneity drives the host-diversity-begets-parasite-diversity relationship: evidence from experimental and field studies. *Ecology Letters*, *19*, 752–761.
- Jones, S., Fiala, I., Prosperi-Porta, G., House, M., & Mumford, S. (2011). *Sphaerospora elwhaiensis* sp. n. (Myxosporidia: Sphaerosporidae) from landlocked sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* (Salmoniformes: Salmonidae) in Washington State, USA. *Folia Parasitologica*, *58*, 87.
- Joy, J. E. (1972). A new species of *Kudoa* (Myxosporidia: Chloromyxidae) from the spot, *Leiostomus xanthurus* Lacépède, in Clear Lake, Texas. *The Journal of Protozoology*, *19*, 264–265.
- Jurine, L. L. (1825). Histoire des poissons du Lac Léman. *Mémoires de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève*, *3*, 133–235.
- Kamiya, T., O'Dwyer, K., Nakagawa, S., Poulin, R. (2014). Host diversity drives parasite diversity: meta-analytical insights into patterns and causal mechanisms. *Ecography*, *37*, 689–697.
- Karlsbakk, E., Kristmundsson, Á., Albano, M., Brown, P., & Freeman, M. A. (2017). Redescription and phylogenetic position of *Myxobolus aeglefini* and *Myxobolus platessae* n. comb. (Myxosporidia), parasites in the cartilage of some North Atlantic marine fishes, with notes on the phylogeny and classification of the Platysporina. *Parasitology International*, *66*, 952–959.
- Katoh, K., Kuma, K. I., Toh, H., & Miyata, T. (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, *33*, 511–518.
- Kaur, H., Singh, R., Katoch, A., Attri, R., Dar, S. A., & Gupta, A. (2017). Species diversity of the genus *Thelohanellus* Kudo, 1933 (Myxozoa: Bivalvulida) parasitizing fishes in Indian subcontinent. *Journal of Parasitic Diseases*, *41*, 305–312.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, *28*, 1647–1649.

- Kent, M. L., & Poppe, T. T. (1999). *Diseases of seawater netpen-reared salmonid fishes*. Department of Fisheries and Oceans, Biological Sciences Branch, Pacific Biological Station, Canada.
- Kim, J., & Mandrak, N. E. (2017). Effects of strobe lights on the behaviour of freshwater fishes. *Environmental Biology of Fishes*, *100*, 1427–1434.
- Kodádková, A., Bartošová-Sojková, P., Holzer, A. S., & Fiala, I. (2015). *Bipteria vetusta* n. sp.—an old parasite in an old host: tracing the origin of myxosporean parasitism in vertebrates. *International Journal for Parasitology*, *45*, 269–276.
- Kodádková, A., Dyková, I., Tým, T., Ditrich, O., & Fiala, I. (2014). Myxozoa in high Arctic: Survey on the central part of Svalbard archipelago. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *3*, 41–56.
- Kubečka, J. (1990). Ichthyofauna on the Malše River and Římov Reservoir. České Budějovice: University of South Bohemia.
- Ksepka, S. P., Rash, J. M., Whelan, N., & Bullard, S. A. (2019). A new species of *Myxobolus* (Myxozoa: Bivalvulida) infecting the medulla oblongata and nerve cord of brook trout *Salvelinus fontinalis* in southern Appalachia (New River, NC, USA). *Parasitology Research*, *118*, 3241–3252.
- Kyslík, J., Vancová, M., Bartošová-Sojková, P., Lövy, A., Holzer, A. S., & Fiala, I. (2022). Expression profiling and cellular localization of myxozoan minicollagens during nematocyst formation and sporogenesis. *International Journal for Parasitology*, *52*, 667–675.
- Lauringson, M., Ozerov, M. Y., Lopez, M. E., Wennevik, V., Niemelä, E., Vorontsova, T. Y., & Vasemägi, A. (2022). Distribution and prevalence of the myxozoan parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* in northernmost Europe: analysis of three salmonid species. *Diseases of Aquatic Organisms*, *151*, 37–49.
- Lemmon, J. C., & Kerans, B. L. (2001). Extraction of whirling disease myxospores from sediments using the plankton centrifuge and sodium hexametaphosphate. *Intermountain Journal of Sciences*, *7*, 57–62.

- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vávra, J., & Wallace, F. G. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa\* The committee on systematics evolution of the society of protozoologists. *The Journal of Protozoology*, 27, 37–58.
- Li, Y. C., Tamemasa, S., Zhang, J. Y., & Sato, H. (2020). Phylogenetic characterisation of seven *Unicapsula* spp. (Myxozoa: Myxosporaea: Multivalvulida) from commercial fish in southern China and Japan. *Parasitology*, 147, 448–464.
- Lisnerová, M., Blabolil, P., Holzer, A., Jurajda, P., & Fiala, I. (2020). Myxozoan hidden diversity: The case of *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova, 1936. *Folia Parasitologica*, 67, 19.
- Lisnerová, M., Holzer, A., Blabolil, P., & Fiala, I. (2023). Evaluation and optimization of an eDNA metabarcoding assay for detection of freshwater myxozoan communities. *Environmental DNA*, 5, 312–325.
- Lisnerová, M., Lisner, A., Cantatore, D. M., Schaeffner, B. C., Pecková, H., Tymł, T., Fiala, I., Bartošová-Sojtková, P., & Holzer, A. S. (2022b). Correlated evolution of fish host length and parasite spore size: a tale from myxosporeans inhabiting elasmobranchs. *International Journal for Parasitology*, 52, 97–110.
- Lisnerová, M., Martinek, I. N., Alama-Bermejo, G., Boubelová, K., Schaeffner, B. C., Nkabi, N., Holzer, A. S., & Bartošová-Sojtková, P. (2022a). An ancient alliance: Matching evolutionary patterns of cartilaginous fishes (Elasmobranchii) and chloromyxid parasites (Myxozoa). *Infection, Genetics and Evolution*, 103, 105346.
- Liu, X. H., Batueva, M. D., Zhao, Y. L., Zhang, J. Y., Zhang, Q. Q., Li, T. T., & Li, A. H. (2016). Morphological and molecular characterisation of *Myxobolus pronini* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) from the abdominal cavity and visceral serous membranes of the gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch) in Russia and China. *Parasites & Vectors*, 9, 1–11.
- Liu, X. H., Xu, L. W., Luo, D., Zhao, Y. L., Zhang, Q. Q., Liu, G. F., & Zhang, J. Y. (2018). Outbreak of mass mortality of yearling groupers of *Epinephelus* (Perciformes, Serranidae) associated with the infection of a suspected new enteric *Sphaerospora* (Myxozoa: Myxosporaea) species in South China Sea. *Journal of Fish Diseases*, 41, 663–672.



- Liu, Y., Lövy, A., Gu, Z., & Fiala, I. (2019). Phylogeny of Myxobolidae (Myxozoa) and the evolution of myxospore appendages in the *Myxobolus* clade. *International Journal for Parasitology*, *49*, 523–530.
- Lom, J., & Arthur, J. R. (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases*, *12*, 151–156.
- Lom, J., & Dykova, I. (1992). Fine structure of Triactinomyxon early stages and sporogony: myxosporean and actinosporean features compared. *The Journal of Protozoology*, *39*, 16–27.
- Lom, J., & Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, *53*, 1–36.
- Lom, J., & Vávra, J. (1962). A proposal to the classification within the subphylum Cnidospora. *Systematic Zoology*, *11*, 172–175.
- Lom, J., & Vávra, J. (1965). Notes on the morphogenesis of the polar filament in *Henneguya* (Protozoa, Cnidosporidia). *Acta Protozoologica*, *3*, 1–8.
- Lom, J., Dyková, I., & Feist, S. (1989). Myxosporea-induced xenoma formation in pike (*Esox lucius* L.) renal corpuscles associated with *Myxidium lieberkuehni* infection. *European Journal of Protistology*, *24*, 271–280.
- Longshaw, M., Frear, P. A., & Feist, S. W. (2005). Descriptions, development and pathogenicity of myxozoan (Myxozoa: Myxosporea) parasites of juvenile cyprinids (Pisces: Cyprinidae). *Journal of Fish Diseases*, *28*, 489–508.
- MacKenzie, K., & Kalavati, C. (2014). Myxosporean parasites of marine fishes: their distribution in the world's oceans. *Parasitology*, *141*, 1709–1717.
- Markiw, M. E. (1992). Experimentally induced whirling disease II. Determination of longevity of the infective triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* by vital staining. *Journal of Aquatic Animal Health*, *4*, 44–47.
- Marshall, W. L., MacWilliam, T., Williams, K., Reinholt, H., VanVliet, H., New, D., Mills, M., & Morrison, D. (2022). Detection of *Kudoa thyrsites* (Myxozoa) eDNA by real-time and digital PCR from high seawater volumes. *Journal of Fish Diseases*, *45*, 1403–1407.

- Massard, J. A., & Geimer, G. (2008). Global diversity of bryozoans (Bryozoa or Ectoprocta) in freshwater. *Freshwater Animal Diversity Assessment*, 93–99.
- Matěnová, V., & Matěna, J., (2004). Ryby (Actinopterygii) v tekoucích vodách. In: Papáček M. (Ed.), *Biota Novohradských hor: modelové taxony, společenstva a biotopy*, 156–166. Pedagogická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- McAllister, C. T., Cloutman, D. G., Leis, E. M., & Robison, H. W. (2022). A new species of *Myxidium* (Cnidaria: Myxosporea: Myxidiidae) from the gallbladder of pickerels, *Esox* spp. (Esociformes: Esocidae), from southwestern Arkansas, USA. *Systematic Parasitology*, 99, 611–620.
- McConnell, C. J., & Cone, D. K. (1992). Settling rates and density of spores of *Henneguya doori* (Myxosporea) in water. *The Journal of Parasitology*, 427–429.
- Molnár, K. (1992). *Ceratomyxa hungarica* n. sp. and *Chloromyxum proterorhini* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) from the freshwater goby *Proterorhinus marmoratus* (Pallas). *Systematic Parasitology*, 22, 25–31.
- Molnár, K., Eszterbauer, E., Marton, S., Cech, G., & Székely, C. (2009). *Myxobolus erythrophthalmi* sp. n. and *Myxobolus shaharomae* sp. n. (Myxozoa: Myxobolidae) from the internal organs of rudd, *Scardinius erythrophthalmus* (L.), and bleak, *Alburnus alburnus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 32, 219–231.
- Molnár, K., & Székely, C. (2014). Tissue preference of some myxobolids (Myxozoa: Myxosporea) from the musculature of European freshwater fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 107, 191–198.
- Monteiro, A. S., Okamura, B., & Holland, P. W. (2002). Orphan worm finds a home: *Buddenbrockia* is a myxozoan. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 968–971.
- Mutschmann, F. (2004). Pathological changes in African hyperoliid frogs due to a myxosporidian infection with a new species of *Hoferellus* (Myxozoa). *Diseases of Aquatic Organisms*, 60, 215–222.
- Naldoni, J., Adriano, E. A., Hartigan, A., Sayer, C., & Okamura, B. (2019). Malacosporean myxozoans exploit a diversity of fish hosts. *Parasitology*, 146, 968–978.

- Naldoni, J., Okamura, B., Hartikainen, H., Corrêa, L. L., & Adriano, E. A. (2021). Broad but restricted detection of malacosporeans in a Neotropical cradle of diversification. *Parasitology*, *148*, 511–518.
- Nehring, R. B., Thompson, K. G., Shuler, D. L., & James, T. M. (2003). Using sediment core samples to examine the spatial distribution of *Myxobolus cerebralis* actinospore production in Windy Gap Reservoir, Colorado. *North American Journal of Fisheries Management*, *23*, 376–384.
- Nordahl, O., Koch-Schmidt, P., Tibblin, P., Forsman, A., & Larsson, P. (2020). Vertical movements of coastal pike (*Esox lucius*) - On the role of sun basking. *Ecology of Freshwater Fish*, *29*, 18–30.
- Novosolov, M., Yahalomi, D., Chang, E. S., Fiala, I., Cartwright, P., & Huchon, D. (2022). The phylogenetic position of the enigmatic, *Polypodium hydriforme* (Cnidaria, Polypodiozoa): insights from mitochondrial genomes. *Genome Biology and Evolution*, *14*, 1–9.
- Okamura, B. (1996). Occurrence, prevalence, and effects of the myxozoan *Tetracapsula*. *Folia Parasitologica*, *43*, 262–266.
- Okamura, B., & Gruhl, A. (2015). Myxozoan affinities and route to endoparasitism. In: B. Okamura, A. Gruhl, J. L. Bartholomew (Eds.), *Myxozoan evolution, ecology and development*, 23–44. Springer International Publishing, Switzerland.
- Okamura, B., & Gruhl, A. (2016). Myxozoa + *Polypodium*: a common route to endoparasitism. *Trends in Parasitology*, *32*, 268–271.
- Okamura, B., & Gruhl, A. (2021). Evolution, origins and diversification of parasitic cnidarians. In: K. De Baets, J. W. Huntley (Eds.), *The Evolution and Fossil Record of Parasitism: Identification and Macroevolution of Parasites*, 109–152. Springer International Publishing, Switzerland.
- Okamura, B., Hartigan, A., & Naldoni, J. (2018). Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension. *Integrative and Comparative Biology*, *58*, 1132–1145.

- Oredalen, T. J., Mo, T. A., Jenkins, A., Haugan, N., & Sæbø, M. (2022). Use of environmental DNA to detect the myxozoan endoparasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* in large Norwegian lakes. *Environmental DNA*, 4, 1294–1322.
- Özer, A., Özkan, H., Gürkanlı, C. T., Yurakhno, V., & Çiftçi, Y. (2016). Morphology, histology and phylogeny of *Henneguya sinova* sp. nov. (Myxobolidae: Myxozoa) infecting gills of *Parablemmius tentacularis* in the Black Sea, Turkey. *Diseases of Aquatic Organisms*, 118, 207–215.
- Patel, R. K., & Jain, M. (2012). NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS One*, 7, e30619.
- Patra, S., Bartošová-Sojtková, P., Pecková, H., Fiala, I., Eszterbauer, E., & Holzer, A. S. (2018). Biodiversity and host-parasite cophylogeny of *Sphaerospora (sensu stricto)* (Cnidaria: Myxozoa). *Parasites & Vectors*, 11, 347.
- Patra, S., Hartigan, A., Morris, D. J., Kodádková, A., & Holzer, A. S. (2017). Description and experimental transmission of *Tetracapsuloides vermiformis* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) and guidelines for describing malacosporean species including reinstatement of *Buddenbrockia bryozoides* n. comb. (syn. *Tetracapsula bryozoides*). *Parasitology*, 144, 497–511.
- Pereira, C. M. B., de Matos Guerreiro, S. L., da Silva, D. T., de Azevedo, R. K., Matos, E. R., & Hamoy, I. G. (2022). Morphology and molecular phylogeny of *Hoferellus jutubensis* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) found parasitising *Ageneiosus inermis* (Siluriformes: Auchenipteridae), in the Brazilian Amazon region. *Parasitology International*, 86, 102445.
- Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2018). Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular Ecology*, 27, 313–338.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253–1256.
- Poulin, R. (2023). Light pollution may alter host–parasite interactions in aquatic ecosystems. *Trends in Parasitology*, 39, 1050–1059.

- Prunescu, C. C., Prunescu, P., Pucek, Z., & Lom, J. (2007). The first finding of myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum fegati* gen. et sp. n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha). *Folia Parasitologica*, *54*, 159.
- Raikova, E. V. (2008). Cytomorphological peculiarities of *Polypodium hydriforme* (Cnidaria). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, *88*, 1695–1702.
- Rambaut, A. (2009). FigTree v1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rangel, L. F., Santos, M. J., & Rocha, S. (2023). Synopsis of the species of *Henneguya* Thelohan, 1892 (Cnidaria: Myxosporea: Myxobolidae) described since 2012. *Systematic Parasitology*, *100*, 291–305.
- Richey, C. A., Kenelty, K. V., Hopkins, K. V. S., Stevens, B. N., Martínez-López, B., Hallett, S. L., Atkinson, S. D., Bartholomew, J. L., & Soto, E. (2020). Validation of environmental DNA sampling for determination of *Ceratonova shasta* (Cnidaria: Myxozoa) distribution in Plumas National Forest, CA. *Parasitology Research*, *119*, 859–870.
- Roberts, J. F., Whipps, C. M., Bartholomew, J. L., Schneider, L., & Jacobson, E. R. (2008). *Myxidium scripta* n. sp. identified in urinary and biliary tract of Louisiana-farmed red-eared slider turtles *Trachemys scripta elegans*. *Diseases of Aquatic Organisms*, *80*, 199–209.
- Rocha, S. (2019). *Biodiversity and phylogeny of myxosporean parasites (Cnidaria, Myxozoa) infecting fish and annelids in Portuguese estuaries*. Doctoral dissertation, Universidade do Porto, Portugal.
- Rocha, S. (2023). Synopsis of the aurantiactinomyxon collective group (Cnidaria, Myxozoa), with a discussion on the validity of morphotype definition and demise of *guyenotia*. *Systematic Parasitology*, *100*, 307–323.
- Ruggeri, P., Naldoni, J., Hartikainen, H., & Okamura, B. (2020). PCR-RFLP: a targeted method to reveal host specific malacosporan infection profiles (Cnidaria: Myxozoa: Malacosporae). *Diseases of Aquatic Organisms*, *141*, 91–101.

Ruppert, E. E., Fox, R. S., & Barnes, R. D. (2003). In: E. E. Ruppert, R. S. Fox, R. D. Barnes (Eds.), *Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach*. Belmont (CA): Thomson Brookes/Cole, USA.

Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, *17*, e00547.

Říha, M., Kubečka, J., Vašek, M., Sed'a, J., Mrkvička, T., Prchalová, M., Matěna, J., Hladíková, M., Čech, M., Drašík, V., Frouzová, J., Hohausová, E., Jarolím, O., Jůza, T., Kratochvíl, M., Peterka, J., & Tušer, M. (2009). Long-term development of fish populations in the Řimov Reservoir. *Fisheries Management and Ecology*, *16*, 121–129.

Seipel, K., & Schmid, V. (2006). Mesodermal anatomies in cnidarian polyps and medusae. *International Journal of Developmental Biology*, *50*, 589–599.

Sellers, G. S., Di Muri, C., Gómez, A., & Hänfling, B. (2018). Mu-DNA: a modular universal DNA extraction method adaptable for a wide range of sample types. *Metabarcoding and Metagenomics*, *2*, e24556.

Sengupta, M. E., Hellström, M., Kariuki, H. C., Olsen, A., Thomsen, P. F., Mejer, H., Willerslev, E., Mwanje, M. T., Madsen, H., Kristensen, T. K., Stensgaard, A., & Vennervald, B. J. (2019). Environmental DNA for improved detection and environmental surveillance of schistosomiasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*, 8931–8940.

Schlegel, M., Lom, J., Stechmann, A., Bernhard, D., Leipe, D., Dyková, I., & Sogin, M. L. (1996). Phylogenetic analysis of complete small unit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: evidence that Myxozoa are Metazoa and related to the Bilateria. *Archiv für Protistenkunde*, *147*, 1–9.

Schröder, O. (1910). *Buddenbrockia plumatellae* eine neue Mesozoenart aus *Plumatella repens* L. and *Pl. fungosa*. Pall. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie*, *96*, 525–535.

Schuberg, A. (1905). Myxosporidien aus dem nervensystem und der haut der bachforelle. *Archiv für Protistenkunde*, *6*, 47–60.

- Sed'a, J., & Kubečka, J. (1997). Long-term biomanipulation of Římov Reservoir (Czech Republic). *Hydrobiologica*, *345*, 95–108.
- Siddall, M. E., Martin, D. S., Bridge, D., Desser, S. S., & Cone, D. K. (1995). The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic Cnidaria. *The Journal of Parasitology*, *81*, 961–967.
- Sipos, D., Ursu, K., Dán, Á., Herczeg, D., & Eszterbauer, E. (2018). Susceptibility-related differences in the quantity of developmental stages of *Myxobolus* spp. (Myxozoa) in fish blood. *PLoS One*, *13*, 1–15.
- Smothers, J. F., von Dohlen, C. D., Smith Jr, L. H., & Spall, R. D. (1994). Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science*, *265*, 1719–1721.
- Sohn, H., Jin, C. N., Kang, B. J., Shin, S. P., & Lee, J. (2021). Infection dynamics of *Enteromyxum leei* (Myxozoa, Myxosporidia) in culture water and its effects on cultured olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, *44*, 1475–1479.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, *22*, 2688–2690.
- Székely, C., Borzák, R., & Molnár, K. (2018). Description of *Henneguya jaczoi* sp. n. (Myxosporidia, Myxobolidae) from *Perca fluviatilis* (L.) (Pisces, Percidae) with some remarks on the systematics of *Henneguya* spp. of European fishes. *Acta Veterinaria Hungarica*, *66*, 426–443.
- Székely, C., Cech, G., Atkinson, S. D., Molnár, K., Egyed, L., & Gubányi, A. (2015). A novel myxozoan parasite of terrestrial mammals: description of *Soricimyxum minuti* sp. n. (Myxosporidia) in pygmy shrew *Sorex minutus* from Hungary. *Folia Parasitologica*, *62*, 1–5.
- Thompson, J. N. (2019). Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. In: J. N. Thompson (Ed.), *The Geographic Mosaic of Coevolution*. Chicago Press, USA.
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, *183*, 4–18.

- Thu, M. M., Bawm, S., & Wilbur, N. D. (2023). Morphological and molecular detection of myxosporean parasites in freshwater fish in Myanmar. *Journal of Parasitic Diseases*, *47*, 429–435.
- Tops, S., Curry, A., & Okamura, B. (2005). Diversity and systematics of the Malacosporea (Myxozoa). *Invertebrate Biology*, *124*, 285–295.
- Troth, C. R., Sweet, M. J., Nightingale, J., & Burian, A. (2021). Seasonality, DNA degradation and spatial heterogeneity as drivers of eDNA detection dynamics. *Science of the Total Environment*, *768*, 144466.
- Urawa, S., Freeman, M. A., Johnson, S. C., Jones, S. R., & Yokoyama, H. (2011). Geographical variation in spore morphology, gene sequences, and host specificity of *Myxobolus arcticus* (Myxozoa) infecting salmonid nerve tissues. *Diseases of Aquatic Organisms*, *96*, 229–237.
- Vieira, D. H. M. D., Narciso, R. B., & da Silva, R. J. (2022). Morphological and molecular characterization of the cryptic species *Myxobolus cataractae* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa: Myxobolidae) parasitizing *Imparfinis mirini* (Siluriformes: Heptapteridae). *Parasitology International*, *88*, 102560.
- Vostradovská, M., & Vostradovský, J. (1983). Prognóza a skutečný vývoj ichtyofauny v dvou českých přehradách (Římov a Lučina). *Živočišná výroba*, *28*, 801–805.
- Wang, M. M., Zhang, J. Y., & Zhao, Y. J. (2022). Morphological description and molecular identification of *Myxobolus dajiangensis* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) from the gill of *Cyprinus carpio* in southwest China. *PeerJ*, *10*, e13023.
- Weill, R. (1938). L'interpretation des Cnidosporidies et la valeur taxonomique de leur cnidome. Leur cycle compare a la phase larvaire des narcomeduses cuninides. *Travaux de la Station Zoologique de Wimereux*, *13*, 724–744.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Sepulveda, A. J., Shepard, B. B., Jane, S. F., Whiteley, A. R., Lowe, W. H., & Schwartz, M. K. (2016). Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation*, *194*, 209–216.



- Wolf, K., & Markiw, M. E. (1984). Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science*, *225*, 1449–1452.
- Woodyard, E. T., Rosser, T. G., Stilwell, J. M., Camus, A. C., Khoo, L. H., Waldbieser, G., Lorenz, W. W., & Griffin, M. J. (2022). New data on *Henneguya postexilis* Minchew, 1977, a parasite of channel catfish *Ictalurus punctatus*, with notes on resolution of molecular markers for myxozoan phylogeny. *Systematic Parasitology*, *99*, 41–62.
- Xiao, C., & Desser, S. S. (2000). The longevity of actinosporean spores from oligochaetes of Lake Sasajewun, Algonquin Park, Ontario, and their reaction to fish mucus. *Journal of Parasitology*, *86*, 193–195.
- Yokoyama, H., Freeman, M. A., Yoshinaga, T., & Ogawa, K. (2004). *Myxobolus buri*, the myxosporean parasite causing scoliosis of yellowtail, is synonymous with *Myxobolus acanthogobii* infecting the brain of the yellowfin goby. *Fisheries Science*, *70*, 1036–1042.
- Yokoyama, H., Grabner, D., & Shirakashi, S. (2012). Transmission biology of the Myxozoa. In: E. Carvalho, G. S. David, R. J. Silva (Eds.), *Health and Environment in Aquaculture*, 3–42. IntechOpen, UK.
- Zaiko, A., von Ammon, U., Stuart, J., Smith, K. F., Yao, R., Welsh, M., Pochon, X., & Bowers, H. A. (2022). Assessing the performance and efficiency of environmental DNA/RNA capture methodologies under controlled experimental conditions. *Methods in Ecology and Evolution*, *13*, 1581–1594.
- Zatti, S. A., Marinho, A. M., Adriano, E. A., & Maia, A. A. (2022). Integrative taxonomy reveals a panmictic population of *Henneguya longisporoplasma* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) in the Amazon Basin. *Acta Parasitologica*, *67*, 1644–1656.
- Zhang, Z. Q. (2013). Animal biodiversity: an update of classification and diversity in 2013. *Zootaxa*, *3703*, 1–11.
- Zhang, J. Y., Gu, Z. M., Kalavati, C., Costa Eiras, J., Liu, Y., Guo, Q. Y., & Molnár, K. (2013). Synopsis of the species of *Thelohanellus* Kudo, 1933 (Myxozoa: Myxosporae: Bivalvulida). *Systematic Parasitology*, *86*, 235–256.

Žánová, V. (2023). Sledování proměnlivosti diverzity myxozoi na toku řeky Malše analýzou environmentální DNA. *Diplomová práce*. Faculty of Science, University of South Bohemia, Czech Republic.