

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Sledování proměnlivosti diverzity myxozoi na toku řeky Malše  
analýzou environmentální DNA**

Diplomová práce

**Bc. Veronika Žánová**

Školitel: RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Martina Lisnerová, Ph.D.

České Budějovice 2023

Žánová V., 2023: Sledování proměnlivosti diverzity myxozoi na toku řeky Malše analýzou environmentální DNA. [Monitoring of myxozoan diversity on the Malše river by analysis of environmental DNA. Mgr. Thesis, in Czech.] - 74 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Anotace:**

Myxozoans represent a unique group of mainly fish endoparasites whose diversity remains largely unexplored. In this study, we applied promising non-invasive eDNA metabarcoding to assess myxozoan biodiversity in the Malše river by detecting infectious myxozoan spore stages present in the aquatic environment. eDNA analysis was performed on both water and sediment samples from 15 localities spread along the course of the Malše river. With nine clade-specific primer sets for amplifying freshwater myxozoans, high myxozoan diversity was detected. Based on the metabarcoding approach and seasonal sampling, the biodiversity of myxozoans was compared on the upper and lower course, taking seasonality into account. Subsequent phylogenetic and basic statistical analysis of gained OTUs revealed the diversity and varying distribution of each group of freshwater myxozoans across the river. A comparison of myxozoan diversity at each site looking at different variables (such as abundance, the number of all OTUs or captures) revealed interesting patterns in the distribution of each myxozoan group, influenced by, among other things, human activity. Our results show that combining metabarcoding and eDNA analysis is a powerful tool for the non-invasive and sensitive detection of myxozoan biodiversity suitable for large-scale monitoring applications.

**Čestné prohlášení**

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

V Českých Budějovicích, dne 13.4.2023

.....

Bc. Veronika Žánová

## **Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli Ivanovi Fialovi, za cenné rady a veškerý čas, který mi věnoval, trpělivost a také laskavou podporu během průběhu celého magisterského studia. Děkuji zejména za šanci věnovat se tak zajímavému tématu. Obrovské díky patří také Martině Lisnerové, za veškerou pomoc, ochotu a podporu. Díky patří také všem kolegům z Laboratoře rybí protistologie za vytvoření velmi příjemného a přátelského prostředí. Konkrétně děkuji Vendule Branišové, která mi pomohla se sběrem a preliminárními analýzami, když jsem byla na pobytu v zahraničí. Děkuji také Pavle Sojkové za příležitost, spolupracovat také na jejím výzkumu, čímž jsem si rozšířila obzory do další zajímavé problematiky. V neposlední řadě chci poděkovat za podporu během celého studia celé mé rodině a přátelům.

Chci také poděkovat za finanční podporu z grantu 19-28399X AQUAPARA-OMICS (GAČR EXPRO): Paraziti vodních organismů ve světě „biomiky“ – klíčové biologické otázky ve světle nových dat a moderních analytických nástrojů.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	<b>3</b>
2.1	Skupina Myxozoa .....	3
2.1.1	Fylogenetické postavení skupiny Myxozoa .....	3
2.1.2	Důsledky regresní evoluce u myxozoi a jejich morfologie .....	4
2.1.3	Životní cyklus.....	5
2.1.4	Interakce s hostitelem a význam skupiny Myxozoa.....	6
2.1.5	Biodiverzita skupiny Myxozoa .....	8
2.2	Environmentální DNA.....	9
2.2.1	Výhody a výzvy spojené s eDNA .....	9
2.2.2	Kombinace s molekulárními metodami .....	11
2.2.3	Operativní taxonomická jednotka (tzv. OTU).....	12
2.2.4	Využití environmentální DNA.....	13
2.3	Řeka Malše .....	14
2.3.1	Charakter toku .....	14
2.3.2	Ichtyofauna na řece Malši .....	15
<b>3</b>	<b>Cíle</b> .....	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>18</b>
4.1	Terénní část.....	18
4.2	Laboratorní část .....	20
4.2.1	Zpracování vzorků a izolace eDNA .....	20
4.2.2	Molekulární analýza.....	20
4.3	Bioinformatická analýza.....	23
4.4	Fylogenetická analýza .....	24
4.5	Biostatistická analýza .....	25
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>27</b>
5.1	Molekulární analýza .....	27
5.2	Bioinformatická analýza.....	27
5.3	Fylogenetická analýza .....	29
5.4	Srovnání biodiverzity myxozoi .....	35
5.4.1	Na úrovni počtu detekovaných OTUs.....	35
5.4.2	Na úrovni počtu readů jednotlivých OTUs .....	37
5.4.3	Na úrovni počtu záchytů napříč lokalitami .....	39

5.4.4	Srovnání proměnlivosti na základě sezonality .....	40
5.4.5	Biostatistické srovnání biodiverzity .....	42
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>44</b>
6.1	Detekce myxozoi na základě eDNA.....	45
6.2	Fylogenetická analýza .....	46
6.3	Proměnlivost na řece Malší .....	48
6.4	Shrnutí a nové směry dalšího výzkumu.....	51
<b>7</b>	<b>Závěry .....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Použité zdroje .....</b>	<b>54</b>
8.1	Literatura .....	54
8.2	Internetové zdroje .....	69
<b>9</b>	<b>Příloha .....</b>	<b>70</b>

## 1 Úvod

Biodiverzita je ekologický termín, který popisuje druhovou různorodost, vzájemné vztahy a funkci všech organismů na planetě Zemi. Do dnešní doby je popsáno více než 2,16 miliónu druhů, vezmeme-li v potaz pouze zástupce zvířat, rostlin a hub. Očekává se však, že se jedná pouze o zlomek z celkové rozmanitosti na naší planetě a její skutečná hodnota bude výrazně vyšší (Morton & Hill 2015) (IUCN Red List 2022: 1). Rozsáhlé studie a dlouhodobé trendy však bohužel ukazují, že dochází k celosvětovému poklesu biodiverzity, a to zejména vlivem globálních změn a lidskou činností (Jenkins 2003; Butchart et al. 2010; Cardinale et al. 2012). Zasaženy jsou všechny ekosystémy včetně sladkých vod. Sladkovodní ekosystémy, jako jsou například jezera či řeky, zaujímají sice jen malý zlomek zemského povrchu (pouhé 2 % z celkové plochy), jedná se však o významný habitat s obdivuhodnou druhovou různorodostí. Odhaduje se, že se sladkovodními ekosystémy je svázáno téměř 10 % z veškeré světové druhové diverzity (Balian et al. 2008). Biodiverzita sladkých vod je ohrožena řadou nežádoucích vlivů, které vedou k jejímu poklesu. Jedná se zejména o rostoucí výskyt invazních druhů, znečištění vod, přetěžování systémů, nevhodné úpravy toku a další negativní zásahy do prostředí, které jsou spojené s lidskou aktivitou (Dudgeon et al. 2005; Reid et al. 2019; Tickner et al. 2020). Vědci z celého světa bez přestání prohlubují poznatky nejen o tom, jak rozmanitý život kolem nás je, ale také o směru, jakým se biodiverzita vyvíjí a způsobech, jak nejefektivněji ji můžeme ochránit. Je nezbytné nastavit postupy, díky kterým získáme obsáhlá, relevantní a sjednocená data, která nám umožní co nejlépe zaznamenat změny a získat přehled o stavu a budoucnosti biodiverzity na naší planetě (Morton & Hill 2015). Vyjma tradiční metody biomonitoringu, který je zpravidla založen na morfologické determinaci druhů v prostředí, dochází k zavádění postupů s využitím moderních biologických metod na bázi detekce deoxynukleových kyselin (neboli DNA) (Roy & Foote 1997; Porter & Hajibabaei 2018). Obrovský potenciál pro neinvazivní stanovení druhové rozmanitosti má využití DNA získané z prostředí, jinak zvané environmentální DNA (neboli eDNA). Metody založené na použití eDNA umožňují zachytit stopy aktivity různorodých organismů ve vodním i suchozemském prostředí bez potřeby odchyty nebo pozorování konkrétního jedince (Bohmann et al. 2014; Taberlet et al. 2018; Sales et al. 2020).

Detekce organismů za pomoci eDNA má také obrovský přínos při popisu diverzity parazitů v prostředí. Díky ní je totiž možné detekovat také vnější stádia, jež slouží k přenosu na nového hostitele a obvykle jsou produkována v enormním množství (Bass et al. 2015; Bass et al. 2023). Dobře fungující, zdravý ekosystém bývá obvykle spojován s vyšší druhovou

diverzitou, a to platí také v případě parazitických druhů. Výskyt parazitů v prostředí má klíčový vliv na formování ekosystému, na jeho resistenci a s ní spojenou stabilitu. Vyšší sledovaná proměnlivost parazitických druhů v prostředí obvykle indukuje zdravý ekosystém (Hudson et al. 2006; Bordes & Morand 2009). Jednou ze skupin parazitů, pro které je charakteristická obrovská druhová rozmanitost, jsou Myxozoa (česky rybomorky). Tato podivuhodná skupina parazitů, která se vyvinula z volně žijících žahavců, se přizpůsobila parazitismu u vodních živočichů extrémní morfologickou proměnou. Do dnešní doby bylo popsáno více než 2600 druhů myxozoi, ale odhaduje se, že nemalá část jejich diverzity stále zůstává neodhalená (Okamura et al. 2018).

Cílem této práce je rozšířit poznatky o diverzitě myxozoi na české řece Malší s pomocí metod založených na environmentální DNA. Práce zahrnuje literární rešerši, která shrnuje základní znalosti o skupině Myxozoa. Popisuje také využití možnosti biomonitoringu parazitů s použitím moderních molekulárních metod s hlavním zaměřením na environmentální DNA. Praktická část práce dále popisuje zavedené postupy při sběru a zpracování vzorků, bioinformatickou a fylogenetickou metodiku zpracování získaných dat, vyhodnocení výsledků a diskusi srovnávající získané poznatky s dostupnou literaturou.

## 2 Literární rešerše

### 2.1 Skupina Myxozoa

#### 2.1.1 Fylogenetické postavení skupiny Myxozoa

Kmen Cnidaria (česky žahavci) tvoří rozmanitou skupinu vodních bezobratlých živočichů. Zástupci tohoto celosvětově rozšířeného kmene žijí z převážné většiny volně. Mimo notoricky známé zástupce jako jsou například medúzy, trubýši či mořské koráli, můžeme v rámci skupiny Cnidaria narazit na vskutku podivuhodné organismy, které zvolily odlišnou životní strategii (Atkinson et al. 2018). Řeč je o skupině Myxozoa (česky rybomorky) Grassé, 1970. Tato skupina žahavců zvolila výhradně parazitický způsob života. První zmínky o myxozoích sahají téměř 200 let do minulosti, kdy byly tyto organismy detekovány ve svalovině dnes již vymřelého síha písčinného (Jurine 1825). V souvislosti s jejich zjednodušenou stavbou těla byla Myxozoa po dlouhou dobu zařazena do dnes již neplatné skupiny Myxosporidia, která byla řazena mezi jednobuněčné organismy ve skupině Protista Bütschli 1882 (Fiala et al. 2015a). O jejich postavení se však mezi vědci vedly rozsáhlé diskuse (Štolc 1899; Ikeda 1912; Weill 1938). Průlomový byl výzkum založený na molekulárních analýzách DNA malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA), který rozlouskl záhadný původ rybomorek v živočišné říši (Smothers et al. 1994; Siddall et al. 1995). S podporou několika dalších studií (např. Jiménez-Guri et al. 2007; Holland et al. 2011; Shpirer et al. 2014), dnes již víme, že se Myxozoa v minulosti oddělila od volně žijících žahavců a vlivem parazitismu u nich došlo k výrazné tělní redukci (Fiala et al. 2015a). Tato adaptace k parazitickému způsobu života je příkladem tzv. regresní evoluce, při které dochází k evolučním změnám velikosti organismu spojené s přechodem k parazitismu (Poulin 2011). Není to pouze zjednodušená stavba těla, ale také vývoj jedinečných mechanismů potřebných k parazitismu, díky kterým jsou Myxozoa tak unikátní skupinou žahavců. V současné době jsou Myxozoa rozdělena do dvou skupin: Myxosporea a Malacosporea. Pro početnější skupinu Myxosporea jsou charakteristické tvrdé spory a definitivní hostitel ze skupiny kroužkovci (Annelida). Na základě dat pro SSU rDNA se Myxosporea dále dělí do tří linií: sladkovodní, mořská linie a linie, tvořená druhy *Sphaerospora* spp. Skupina Malacosporea oproti tomu zahrnuje pouze čtyři dosud popsané druhy v rámci dvou rodů. Jejich spory jsou výrazně měkčí a jako definitivní hostitel slouží mechovky (Bryozoa) (Levine et al. 1980; Canning et al. 2000; Kent et al. 2001; Lom & Dyková 2006; Fiala 2006; Fiala et al. 2015b).



### 2.1.2 Důsledky regresní evoluce u myxozoi a jejich morfologie

V průběhu evoluce došlo u myxozoi nejen k extrémním morfologickým, ale také genomovým změnám, díky čemuž jsou tolik odlišné od svých volně žijících příbuzných. V důsledku adaptace na život uvnitř hostitele (tzv. endoparazitismus) se jejich tělo skládá pouze z několika typů buněk. Ačkoliv se tělní stavba myxozoi v porovnání s volně žijícími žahavci výrazně zjednodušila, došlo také k vytvoření nových komplexních struktur, které hrají významnou roli při infekci nového hostitele. Jedná se o vnější vývojové stádium, tzv. spory (Kent et al. 2001; Chang et al. 2015, Fiala et al. 2015b). Kompaktní tvar a pevnost spory umožňuje rybomorkám odolat vlivům vnějšího prostředí, kdežto unikátní mechanismy pro přichycení zajišťují přenos na nového hostitele. Útvar, který je pro Myxozoa charakteristický, je tzv. pólový váček (Weil 1938). Pólový váček je homologem žahavých buněk, které jsou typické pro volně žijící žahavce. Uvnitř váčku je stočené pólové vlákno, které ale neslouží k lovu potravy či obraně, jak je tomu zvykem u většiny žahavců. Při podráždění spory dojde k vymrštění lepkavého vlákna, které se přichytí na povrch nového hostitele. Struktury, které jsou součástí pevné stěny tzv. chlopně, umožňují otevření spory a uvolnění jejího obsahu tzv. sporoplasmy. Sporoplasma následně prostupuje kožní bariérou dovnitř těla hostitele, ve kterém se parazit dále vyvíjí a množí (Lom & Dyková 2006; Kallert et al. 2007; Okamura et al. 2015). Jsou to právě strukturální znaky jako např. tvar a velikost spory, počet chlopní, či postavení váčků, které jsou klíčové pro morfologickou identifikaci jednotlivých druhů (Lom & Arthur 1989; Lom & Dyková 1992, 2006). Druhové odlišení na základě morfologických znaků není příliš spolehlivé, vzhledem k tomu, že morfologie obvykle nekorresponduje se fylogenezí. Současný výzkum je proto založen hlavně na molekulárních metodách (Fiala 2006; Bartošová & Fiala 2011; Rocha et al. 2013; Karlsbakk et al. 2017).

Přechod k obligátnímu parazitismu u myxozoi nevedl pouze k na první pohled zjevným změnám jako je zjednodušení tělní stavby. K zásadní redukci došlo také na genomové úrovni. Stejně jako u řady dalších eukaryotických parazitů docházelo u myxozoi v průběhu evoluce ke zmenšování jaderných a organelových genomů (Kent 2001). Myxozoa mají dokonce jeden z nejmenších jaderných genomů v celé živočišné říši. K takto extrémní redukci došlo následkem ztráty genů, které jsou spřaženy s mnohobuněčným vývojem a metabolismem, který je zpravidla zajištěn hostitelskou buňkou (Chang et al. 2015). Ztráta genů se nevyhnula ani mitochondriím. Ty plní významnou roli v metabolismu, zejména při získávání energie z aerobního dýchání. Právě u organismů, které se nachází v hypoxickém

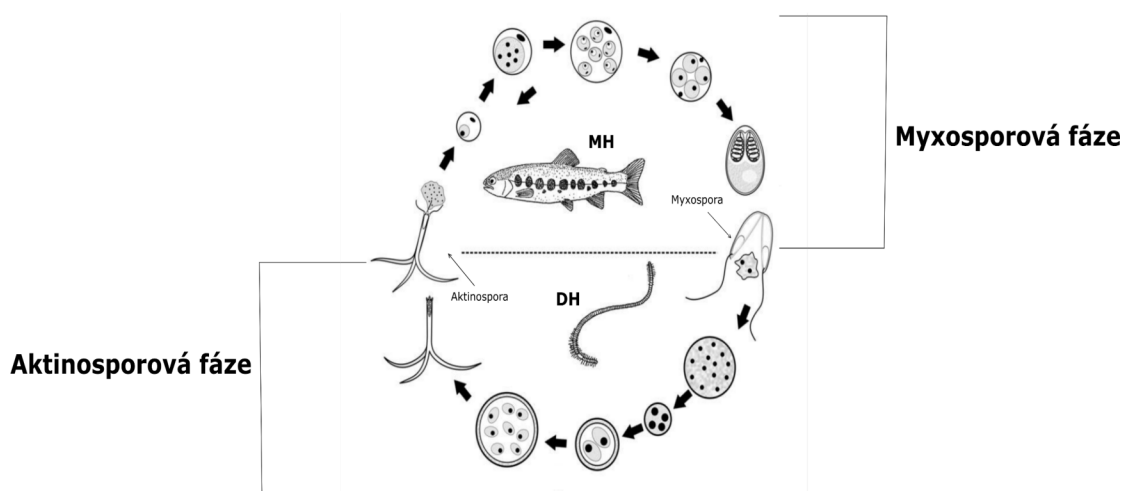
prostředí, což je i velká část parazitů, došlo ke zmenšení nebo dokonce úplné ztrátě mitogenomu (Roger et al. 2017). Obdobná situace nastala také u rybomerek. Dlouhou dobu nebylo možné objasnit strukturu mitochondriálního genomu myxozoí. Důvodem toho byla skutečnost, že dokonce i ty nejkonzervativnější mitochondriální geny byly během evoluce výrazně pozměněny. Až díky sekvenování nové generace se vědcům podařilo popsat některé vlastnosti mitochondriálního genomu myxozoí. Ten má několik jedinečných atributů jako jsou například fragmentace či pravděpodobná ztrátu genů pro tRNA (Yahalomi et al. 2017). Nejpozoruhodnější situace nastala u *Henneguya salminicola*, u které mitochondriální genom kompletně chybí (Yahalomi et al. 2020). Se ztrátou nepotřebných genů došlo naopak k vytvoření nových unikátních genů, které jsou zásadní pro udržení parazita v hostiteli a hrají důležitou roli při oklamání imunitního systému (Hartigan et al. 2020). Zároveň docházelo k tvorbě a akumulaci změn v genetické informaci. Tento fenomén může komplikovat fylogenetické analýzy, při kterých často dochází k tvorbě abnormálně dlouhých větví v důsledku relativně rychlé evoluce jejich genů (Chang et al. 2015; Fiala et al. 2015b).

### 2.1.3 Životní cyklus

V porovnání s volně žijícími žahavci, mají Myxozoa jakožto obligátní parazité poměrně složitý životní cyklus. Rybomorky jsou velmi rozmanitou skupinou, která parazituje u široké škály hostitelských druhů, a jsou zde proto odlišnosti v jejich konkrétních životních strategiích. I přesto však můžeme jejich vývoj zobecnit na následující vzorec, který byl popsán u *Myxobolus cerebralis* (Wolf & Markiw 1984). Toto schéma cyklu je vyobrazeno na obrázku (**Obr. 1**). Pro dokončení životního cyklu je potřeba dvou rozdílných hostitelů. Mezihostitelem bývají zpravidla vodní obratlovci. Nejčastěji se jedná o ryby, jsou ale také záznamy o přítomnosti rybomerek u obojživelníků, plazů, ptáků, a dokonce také u suchozemských savců (např. Kent et al. 2001; Mutschmann 2004; Bartholomew et al. 2008; Székely et al. 2016; Espinoza et al. 2017). Definitivním hostitelem jsou bezobratlí živočichové, nejčastěji se jedná o zástupce skupiny kroužkovci (Annelida) u Myxosporea, nebo mechovky (Bryozoa) v případě skupiny Malacosporea. Morfologicky odlišná stádia, která slouží k přenosu na nového hostitele, tzv. myxospory a aktinospory, jsou vystavena vnějšímu prostředí, a vyznačují se proto vyšší odolností (Lom & Dyková 2006). Infekce nového mezihostitele je zprostředkována aktinosporou. U té dojde při kontaktu s kůží nebo žábry mezihostitele k vystřelení lepkavého polárního filamenta, přichycení a následnému uvolnění sporoplasmy. Ta po vstupu do mezihostitele migruje do cílové tkáně, kde dochází

k nepohlavnímu dělení (tzv. sporogonie). Vývoj v mezihostiteli se jinak nazývá myxosporová fáze. Ta může probíhat buďto ve tkáni (histozoicky) či v dutinách tělních orgánů (coelozoicky) a dochází při ní k tvorbě myxospor. Myxospory, která se dostanou do vnějšího prostředí, mohou následně infikovat bezobratlého definitivního hostitele, ve kterém probíhá aktinosporová fáze. Ten se nejčastěji nakazí alimentární cestou a sporoplasma se uvolňuje přímo ve střevní lumen hostitele. Ta následně infikuje buňky střevního epitelu, případně migruje do coelomu hostitele. Po proliferační fáze (tzv. schizogonie) v bezobratlých dochází k sexuálnímu dělení (tzv. gamogonie). Životní cyklus je ukončen produkcí tzv. aktinospor (tzv. sporogonie), které mohou opět infikovat nového mezihostitele (Wolf & Markiw 1984; Lom 1996; El-Matbouli & Hoffmann 1998; Lom & Dyková 2006).

V životním cyklu malakosporeí jsou zásadní odlišnosti nejen v definitivním hostiteli, kterým jsou mechovky, ale také v tom, že se nevytváří myxospory a aktinospory, ale 2 typy měkkých malakospor. Pro Malacosporea jsou zejména typická aktivní „červovitá“ plasmodia, která se vyskytují v coelomové dutině definitivního hostitele (Yokoyama et al. 2012; Okamura et al. 2015)



**Obrázek 1:** Obecné schéma životního cyklu *Myxobolus cerebralis* (upraveno z Yokoyama et al. 2012).

#### 2.1.4 Interakce s hostitelem a význam skupiny Myxozoa

Myxozoa se mohou vyskytovat v odlišných typech tkáně rybích hostitelů. Podle lokalizace se zpravidla dělí na infekce coelozoické a histozoické. Obvykle platí, že přítomnost myxozoi v hostiteli bývá nepatogenní, případně se u hostitele objevují jen slabé příznaky. Není tomu ale pravidlem a některé druhy u svých hostitelů způsobují velmi závažná onemocnění. Řada ryboborek má celosvětový význam, obzvláště ty druhy, které parazitují

u komerčně chovaných ryb (Kent et al. 2001; Marshall et al. 2016; Holzer et al. 2021). V chovech lososovitých ryb se propuknutí nákazy může projevit například proliferačním onemocněním ledvin (tzv. PKD), jehož původcem je *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Dalším významným patogenem je *Myxobolus cerebralis*, který způsobuje tzv. vrtohlavost pstruhů či *Ceratonova shasta*, která u ryb způsobuje enteronekrózu (Hoffman 1990; Feist & Bucke 1993; Schakau et al. 2019). Rozvoj symptomatického průběhu u kaprovitých ryb je popsán při nákaze *Sphaerospora molnari* nebo *Hoferellus carassi* (Lom & Dyková 1983; Molnár et al. 1989). U mořských ryb způsobuje největší škodu rod *Kudoa*, který znehodnocuje rybí maso svými lytickými enzymy po usmrcení ryby (Moran et al. 1999). V současné době však začíná přibývat také studií, které poukazují na rostoucí trend vyšší morbidity a mortality v důsledku nákazy rybmorkami u volně žijících ryb (např. Gupta & Kaur 2016; 2 Gupta & Kaur 2018; Arndt et al. 2018). Jako významným faktor této rostoucí tendence jsou často uváděny globální změny, obzvláště oteplování ekosystémů. S tímto výrokem koreluje celá řada studií, které potvrdily nejen to, že rostoucí teploty ovlivňují distribuci parazitů do nových naivních habitatů, ale sledovaly také negativní efekt na vztah mezi hostitelem a parazitem (Wahli et al. 2008; Altizer et al. 2013; Schmidt-Posthaus et al. 2013; Marcogliese 2016). Tuto skutečnost potvrdila řada experimentálních studií. Ukázkou je například výzkum Waldnerové a jejích kolegů. Ti prokázali, že u ryb, které jsou vystavené vyšší teplotě dochází k závažnějším projevům při infekci *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Waldner et al. 2021). Vlivu tohoto významného patogena ve volné přírodě se věnují také rakouské vědecké týmy, které ve svém rozsáhlém výzkumu potvrdily korelaci mezi výskytem *Tetracapsuloides bryosalmonae* a poklesem místní populace pstruhů (Gorgoglione et al. 2016; Lewisch et al. 2018).

Kontrola rozšíření nákazy v chovech je obvykle velmi problematická a v přírodě prakticky nemožná. V současné době nejsou na trhu k dispozici žádné léčebné přípravky ani vakcíny a existují pouze preventivní strategie. Ačkoliv jsou tyto škody velmi rozsáhlé, stále platí, že převážná část myxozoí nezpůsobuje svému hostiteli zásadní újmu. Hlavní roli v pochopení takto odlišné interakce mezi parazitem a hostitelem má imunitní systém. Odolnost ryb vůči symptomatickému projevu myxozoí je obvykle spojována s přirozenými imunitními reakcemi a funkčními regulačními mechanismy hostitele. K patologickým změnám zpravidla dochází v případech nepřiměřené imunitní reakce hostitele (Holzer et al. 2021).

### 2.1.5 Biodiverzita skupiny Myxozoa

Již na konci starohor, kdy došlo k prvotního oddělení rybomerek od zbylých žahavců, započal postupný přechod k parazitickému způsobu života. Analýzy molekulárních hodin společně s fosilními záznamy naznačují, že většina diverzifikace myxozoi proběhla přibližně před 600 miliony let (Cartwright & Collins 2007; Van Iten et al. 2014; Holzer et al. 2018). Myxozoa nejprve napadala pouze tehdejší formy kroužkovců a mechovek. Postupně došlo také k přidání druhého hostitele do životního cyklu, a to v podobě nových evolučně vyspělejších hostitelů z řad obratlovců – nejprve paryby a později také kostnaté ryby (Holzer et al. 2018). Skupina Myxozoa se dokonce uchytila u suchozemských obratlovců jako jsou plazi, ptáci či dokonce savci (Bartholomew et al. 2008; Székely et al. 2016; Espinoza et al. 2017). Nejčastějším hostitelem dodnes zůstávají kostnaté ryby, u nichž došlo k masivní diverzifikaci parazitů (Holzer et al. 2018). Extrémní diverzifikace u ryb pravděpodobně souvisí s jejich ohromnou druhovou rozmanitostí. Paprskoploutvé ryby (zejména skupiny Ostariophysi a Percomorpha) tvoří až polovinu všech dosud známých obratlovců na naší planetě (Nelson et al. 2016). Vzhledem k tomu, že samotní hostitelé prošli tak obrovskou radiací, skutečnost že jsou to právě ryby, které hostí téměř 97 % popsáných myxozoi, není příliš překvapivá (Lisnerová 2022). Pozoruhodná rozmanitost rybomerek do dnešní doby sčítá na více než 2600 druhů a představují tak přibližně 20 % ze všech známých žahavců (Okamura et al. 2015; Okamura et al. 2018). Skutečná rozmanitost je ale pravděpodobně velmi odlišná, protože velká část biodiverzity se zdá být skrytá (Bartošová-Sojtková et al. 2014; Hartikainen et al. 2016). S přihlédnutím na evoluční historii, radiaci hostitelů a také na fakt, že téměř každá ryba hostí alespoň jeden druh Myxozoa, se odhady skutečné diverzity rybomerek dostávají na více než 34 tisíc druhů, a to pouze u ryb (Zhang 2013; Lisnerová 2022). Důvodem takto podhodnocené diverzity může být několik faktorů, které znesnadňují jejich odhalení. Jedním z nich je jejich obecně nízká patogenita, díky které jsou na pohled zdraví, infikování hostitelé častokrát přehlíženi. Fenoménu skryté diverzity u skupiny Myxozoa se věnuje několik vědeckých prací (např. Holzer et al. 2013; Hartikainen et al. 2016; Lisnerová et al. 2020; Vieira et al. 2022). Ve své práci to demonstruje například Lisnerová s kolegy, kteří provedli rozsáhlý screening širokého spektra sladkovodních ryb, načež se jim podařilo odhalit obrovskou dosud skrytou rozmanitost *Myxobolus pseudodispar* komplexu (Lisnerová et al. 2020). Je zjevné, že skutečná rozmanitost rybomerek setrvává neodhalená, avšak vývoj a aplikace moderních molekulárních metod s využitím environmentální DNA, by mohlo vést k jejímu postupnému objasňování (Hartikainen et al. 2016; Lisnerová et al. 2023).

## **2.2 Environmentální DNA**

Základní definice popisuje environmentální DNA (neboli eDNA) jako veškerou DNA, která se nachází v prostředí. Každý organismus do svého okolí nepřetržitě uvolňuje nukleární a organelovou DNA v podobě výměšků, žlázových sekretů či odlupujících se kožních derivátů. Tyto nukleové kyseliny se v prostředí vyskytují jak v intracelulární formě, tak také volně, tedy mimo buňku. Vnitrobuněčná je také mikrobiální DNA, která je nejčastěji detekována z celých jedinců (Pietramellara et al. 2009; Taberlet et al. 2012; Bohmann et al. 2014; Barnes & Turner 2016). Deoxynukleové kyseliny (zejména ty extracelulární) nejsou příliš stabilní a v prostředí proto vlivem abiotických i biotických faktorů časem degradují. Vlivem toho se environmentální DNA nejčastěji vyskytuje ve formě krátkých úseku tzv. fragmentů (Taberlet et al. 2012; Barnes et al. 2014; Eichmiller et al. 2016). eDNA lze extrahovat z různých typů prostředí, nejčastěji se jedná o vzorky vody, půdy, sedimentu, trusu nebo dokonce vzduchu (Staley et al. 2018; Banchi et al. 2020; Brandt et al. 2021; Kirse et al. 2021).

### **2.2.1 Výhody a výzvy spojené s eDNA**

Volba metod založených na eDNA s sebou nese řadu výhod, jako jsou například efektivnější odhalení mikroskopických organismů, vysoká senzitivita metody či možnost detekce různých taxonů najednou (Taberlet et al. 2012; Mahon et al. 2013; Zhang et al. 2020). To vše značně usnadňuje výzkum ekosystémů. Kombinace moderních molekulárních technologií a eDNA umožňuje získat a následně zpracovat větší množství dat, což je velmi žádoucím atributem zejména pro dlouhodobé programy biomonitoringu (Wilcox et al. 2016; Porter & Hajibabaei 2018). Tradičně zaváděné metody pro sledování druhů v prostředí obvykle vyžadují přímé pozorování nebo dokonce odchyt konkrétních jedinců. To je obvykle časově a finančně velmi náročné (McCarthy et al. 2012). V neposlední řadě panuje obecná snaha o snížení nadbytečných zásahů do studovaného prostředí, a získání dat neinvazivní metodou je další jasnou výhodou této metody. Vyjma zjevné disturbance habitatu je v případě odchytu zvířat navíc nutné zvolit vhodnou metodu, která je často druhově specifická. Oproti tomu sběr vzorků z prostředí bývá relativně univerzální. Odchyt živých zvířat je také zpravidla svázán s obvykle komplikovanou legislativou (Bohmann et al. 2014; Thomsen & Willerslev 2015; Adams et al. 2019; Ruppert et al. 2019).

Molekulární detekční metody jsou důležitým a relativně spolehlivým prostředkem pro identifikaci a odlišení druhů v prostředí. Je však nutné počítat s možnými komplikacemi při jejich využití, které mohou vést k tzv. „falešné negativitě“, a tedy ke zkreslení výsledných dat. Jedna z nich se týká povahy matrice, z níž jsou nukleové kyseliny získávány. Vzorke životního prostředí mohou mít vysoký obsah necílené DNA. Dále často obsahují chemické látky, které mohou snižovat výtěžnost extrahované eDNA, které případně mohou inhibovat amplifikaci PCR (polymerázové řetězové reakce) (von Wintzingerode et al. 1997). Mimo nežádoucí vliv inhibitorů má na tvorbu artefaktů v datech roli také nevhodně zvolená metodika při sběru a následném zpracování vzorků (např. nedostatečné narušení odolných cyst či vajíček parazitů) (Lisnerová et al. 2023). Ačkoliv je využití environmentální DNA ve vědeckém výzkumu stále v počátcích a obecná standardizace metodiky chybí, je zde několik způsobů, jak zajistit její efektivitu a spolehlivost. Při plánování sběru materiálů je třeba vycházet ze znalostí, jak charakteru prostředí, tak také ekologie sledovaného organismu. V případě studia parazitů je třeba zamyslet se nad tím, zdali detekujeme aktivní či neaktivní stadia parazita (např. oocysty, vajíčka či spory). Je také klíčové vybrat vhodnou dobu vzorkování v závislosti na aktivitě hostitele i parazita ve vztahu se sezonalitou a proměnlivostí prostředí. Zásadní je zvážit zejména obvyklý výskyt potenciálního hostitele a zohlednit také fyzikální povahu habitatu, která může vést k rozšíření parazita po prostředí (zejména při vzorkování tekoucí vody) (Bass et al. 2015; Sengupta et al. 2019; Troth et al. 2021; Zaiko et al. 2022; Bass et al. 2023).

Mimo technické parametry sběru vzorků je klíčová volba prostředků a zpracování molekulární stránky výzkumu. Pro prostředí, ve kterém se snažíme detekovat konkrétní organismus, je často bohaté na velké množství různorodých a pro nás nežádoucích organismů. Aby nedošlo k amplifikaci necílené DNA je potřeba navrhnout citlivé a specifické primery, které ideálně cílí na konkrétní druhy či rody. Nápomocná může být také nested PCR, která zvyšuje specifčnost amplifikovaného úseku (Wilcox et al. 2013; Bass et al. 2015). Na správnou interpretaci dat má také zásadní vliv výběr bioinformatických a statistických metod (Furlan et al. 2020; Macé et al. 2022).

### 2.2.2 Kombinace s molekulárními metodami

Možnosti v biomonitoringu se vyvíjí velmi rychlým tempem a objevují se také nové metody a použití. S pomocí molekulárních metod je z eDNA možné odhalit biologické ukazatele jako je např. výskyt konkrétního druhu, jeho relativní abundance či sezónní druhová variabilita (např. Ficetola et al. 2008; Di Muri et al. 2020; Di Capua et al. 2021). Na základě typu studie je možné zvolit z celé řady metod: například kvantitativní PCR (neboli qPCR), digital PCR, DNA čipování (neboli Microarray), metabarcoding, organelové sekvenování, celogenomové sekvenování a další (Porter & Hajibabaei 2018). Každá z těchto metod má určité výhody a nevýhody, je proto vždy třeba zvážit na co se je soustředěn náš výzkum a na základě toho zvolit nejvhodnější studii. Pokud je sledovanou proměnou přítomnost, případně i míra zastoupení, konkrétního druhu v prostředí, je vhodné zvolit metody jako je např. microarray či qPCR. Jedná se o velmi senzitivní metody, avšak nehodí se pro další fylogenetické analýzy, vzhledem k tomu, že tímto způsobem nezískáme sekvence, které bychom mohli dále srovnávat (Rees et al. 2014; Porter & Hajibabaei 2018). Oproti tomu např. metabarkodováním či sekvenováním celého genomu získáme sekvence, které je možné dále zpracovat. Zejména metabarkodování se stalo klíčovým nástrojem v některých rozsáhlých programech biomonitoringu, které chtějí začlenit metody založené na DNA do svých stávajících regionálních nebo národních programů (Baird & Hajibabaei 2012; Porter & Hajibabaei 2018; Schenekar 2022). DNA barcoding je společně s qPCR nejčastěji užívanou metodu pro analýzu environmentální DNA. Základní princip barkodování spočívá v určování taxonů na základě krátkého druhově unikátního úseku DNA. Právě unikátnost těchto markerů umožňuje přesnou identifikaci druhů v prostředí (Hebert et al. 2003). Metodu lze také použít pro identifikaci vícero různých taxonů najednou, v takovém případě se používá termín metabarcoding. Metabarcoding poskytuje velmi účinný prostředek k mapování biologické rozmanitosti, zejména pokud je kombinován se sekvenováním nové generace (tzv. NGS) (Hebert et al. 2003; Littlefair & Clare 2016; Zhang et al. 2018). Sekvenování nové generace je schopné vysoce kvalitního a obsáhlého čtení i u vzorků, které obsahují směs sekvencí různých druhů. Z tohoto důvodu se jedná o vhodnou alternativu pro práci s eDNA. Výsledkem této hromadné amplifikace je soubor dat, který však může obsahovat duplicitní, nekvalitní či chimérické sekvence. Data je proto potřeba následně bioinformaticky analyzovat, čímž dojde k odfiltrování potenciálních artefaktů (Taberlet et al. 2012; Giebner et al. 2020).



### 2.2.3 Operativní taxonomická jednotka (tzv. OTU)

Jedním z často užívaných bioinformatických nástrojů pro popis mikrobiální diverzity je klasifikace DNA sekvencí do tzv. Operativních taxonomických jednotek (tzv. OTUs) (např. Hartikainen et al. 2016; Kataoka et al. 2019). Jedná se o vhodnou metodu pro studium komplexních společenství, při kterém často dochází k produkci obrovského množství dat, které je náročné analyzovat a následně správně interpretovat. Jednotky (OTUs) vznikají tzv. klastrováním sekvencí blízce příbuzných druhů do společných shluků. Ty vznikají na základě stanoveného prahu podobnosti (nejčastěji 97 %) (Kozich et al. 2013; Schmidt et al. 2014). Takto vzniklé skupiny (neboli klastry) nejsou bezpodmínečně svázány s klasickou Linného ani moderní evoluční taxonomií (Sokal 1963), přesto však dokážou spolehlivě popsat míru rozmanitosti a zastoupení konkrétních druhů ve sledovaném prostředí (Glassman & Martiny 2018). Klastrování sekvencí výrazně usnadňuje analýzu rozsáhlého souboru dat jeho zmenšením, a tedy snížením výpočetních nároků na analýzu. Během shlukování je zároveň možné odfiltrovat chybné sekvence a zamezit tak tvorbě artefaktů při vyhodnocení diverzity (Schloss et al. 2011; Mysara et al. 2017; Siegwald et al. 2017). Z toho důvodu se jedná o vhodnou metodu pro popis mikroskopických společenstev, při kterých není možné použít běžnou biologickou klasifikaci, která se užívá u makroskopických organismů (Blaxter et al. 2005; Schmidt et al. 2014). Je také třeba zmínit, že v současnosti začíná být klastrování do OTUs postupně nahrazováno metodou ASVs, při které vznikají tzv. sekvence amplikonových variant. Jedná se hlavně o studie zaměřené na popis komplexních mikrobiálních společenství (např. Cram et al. 2021; Nilholm et al. 2022; Guo et al. 2023). Do jaké míry se jedná o spolehlivější metodu pro popis biodiverzity, než je použití OTUs je otázkou. Existuje celá řada komparativních studií, ve kterých autoři popisují odlišnosti v hodnotách popsané diverzity s pomocí obou metod (např. Caruso et al. 2019; Prodan et al. 2020; Chiarello et al. 2022). Ačkoliv se autoři studií shodují na vyšší specifitě a přesnosti metody založené na tvorbě ASVs, Chiarello a kolegové ve svém článku poukazují na zajímavý úkaz – a to že nezanedbatelný vliv na odlišnosti v metodách OTUs a ASVs mají vzácné operativní jednotky, které jsou více zastoupeny při OTU klastrování, kdežto při tvorbě ASVs chybí (Chiarello et al. 2022). Je proto diskutabilní, do jaké míry dokáže metoda ASVs zachytit i velmi vzácné druhy.

#### 2.2.4 Využití environmentální DNA

Analýza eDNA de facto odráží diverzitu všech organismů, které daný habitat obývají a tato skutečnost je zásadní pro posun v oblasti sledování rozmanitosti přírody. Výzkum založený na eDNA je moderní a rychle se rozvíjející oblast v rámci biomonitoringu a jeho aplikovatelnost má rozsah do širokého spektra vědeckých disciplín (Jarman et al. 2018). Časté využití této všestranné metody je například při popisu biodiverzity, sledování vzácných či invazních druhů nebo při popisu potravních návyků konkrétních živočichů (Foote et al. 2012; Gomes et al. 2017; Díaz-Abad et al. 2022; Skidmore et al. 2022; Wu et al. 2023). Obrovský potenciál eDNA je zejména u výzkumu mikroskopických organismů, jejich malá velikost je významnou překážkou při jejich pozorování v prostředí (Simon et al. 2015). Mimo studia virů a bakterií se jedná také o eukaryotické parazity. Mikroskopická eukaryota, která se vydala evoluční cestou parazitismu, bývají často extrémně fylogeneticky i funkčně diverzifikovaná. Ovšem vzhledem k jejich malé velikosti a konvergentní evoluci, je obvykle velmi komplikované, někdy až nemožné odlišit od sebe jednotlivé druhy. Parazité jsou z tohoto důvodu jedni z nejvíce kryptických eukaryot (Poulin et al. 2000; Bass et al. 2015).

Detekce a identifikace na základě eDNA je jednou z cest k lepšímu objasnění jejich rozmanitosti. Výzkum patogenů na základě přítomné eDNA v prostředí, se stává široce zavedenou metodou, která již byla aplikována při studium různých skupin parazitů (Bass et al. 2015; Amarasiri et al. 2021). Ve vodním prostředí byli tímto způsobem detekováni jak zástupci protozoí (např. *Giardia intestinalis* či *Cryptosporidium parvum*) (Smith et al. 2010; Nguyen et al. 2016), tak medicínsky významní mnohobuněční červi (např. Gyawali et al. 2016; Hashizume et al. 2017). Detekce ryboborek v prostředí na základě environmentální DNA byla prvně zmíněna v práci Hartikainen a jejích kolegů (Hartikainen et al. 2016). Autorům studie se podařilo amplifikovat DNA myxozoi ze vzorků vody a také z trusu vodních živočichů. Optimalizaci metody založené na eDNA a následnému vyhodnocení její spolehlivosti se ve své práci věnuje Lisnerová a kolegové (Lisnerová et al. 2023). Výsledky obou výše zmíněných studií dokazují, že eDNA metabarkodování je užitečný nástroj pro výzkum diverzity skupiny Myxozoa v prostředí. Metody založené na eDNA, jsou vhodné nejen pro popis druhové rozmanitosti, ale uplatnění našly také při detekci konkrétních druhů. Dokazují to například následující studie, jejímž autorům se tímto způsobem podařilo odhalit přítomnost sladkovodních druhů *Ceratonova shasta* a *Tetracapsuloides bryosalmonae* u lososovitých ryb (Richey et al. 2020; Oredalen et al. 2022). Z mořských zástupců Myxozoa se podařilo detekovat například druh *Kudoa thyrssites*

(Marshall et al. 2022). Druhově specifická metoda eDNA má také obrovský význam při brzkém odhalení patogenů v akvakulturách, což může usnadnit jejich kontrolu, případně zefektivnit prevenci úhynů hostitelů (Gomes et al. 2017).

## 2.3 Řeka Malše

### 2.3.1 Charakter toku

Území na jihu Čech je protkáno bohatou sítí vodních toků, jejíž významnou součástí je řeka Malše. Malše (německy Malsch) pramení v horním Rakousku u obce Sandl, kopíruje rakousko-české hranice a v oblasti Dolního Dvořiště se stáčí k severu směrem k Českým Budějovicím, kde se vlévá do řeky Vltavy (Blažková et al. 1982; Kubeš 2003). V průběhu toku se do řeky vlévá celá řada menších potůčků a říček. Na jihu je to například potok Černá, který svádí vodu z oblasti Novohradských hor, kdežto v dolní části řeky se připojuje řeka Stropnice. Stropnice je největším přítokem řeky a její zásadní význam spočívá v tom, že vytváří spojení Malše s oblastmi Novohradského podhůří a Trhosvinenska, které jsou z velké části pokryty uměle vytvořenými vodními plochami (Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka 2020: 2). Důležitou součástí řeky je vodní nádrž Římov, která zaujímá rozlohu 211,04 ha a již od roku 1978 se jedná o významný zdroj pitné vody pro České Budějovice a okolí (Povodí Vltavy s.p. 2013: 3). Tato dominanta má zásadní vliv na charakter toku celé řeky a lze jí proto brát jako hranici mezi horním a dolním tokem. Horní část Malše je úzké horské řečiště, které meandruje skrze lesnaté porosty a louky. Díky svému skalistému, místy až kaňonovitému terénu, je průběh řeky na mnoha místech těžko přístupný, a z tohoto důvodu byla Malše ušetřena intenzivnímu obhospodařování a odlesňování okolí. Povaha horní Malše vytváří vhodné prostředí pro celou řadu vzácných druhů rostlin a živočichů, jmenovitě se jedná o ohrožené druhy jako je například perlorodka říční (*Margaritifera margaritifera*), velevrub tupý (*Unio crassus*), mihule potoční (*Lampetra planeri*), vranka obecná (*Cottus gobio*) či jeřábek lesní (*Tetrastes bonasia*) (Chábera et al. 1986). Horní Malše díky tomu drží statut chráněné přírodní památky a je také součástí Natura 2000 (z nařízení vlády 318/2013 Sb.) (Blažková et al. 1982; Chábera et al. 1986) (Agentura ochrany přírody a krajiny ČR 2014: 4). Od města Kaplice začíná být okolí řeky zemědělsky využíváno a zásadní zlom nastává při vzduť přehradní nádrže Římov. Vlivem častějších jezů a dalších nepřirozených úprav koryta ztrácí tok v dolní části řeky rychlost. Klidné tempo řeky vede k vyšší akumulaci sedimentu na dně řeky, což je zásadní rozdíl ve srovnání s podložím v horní části, které je náchylnější k erodování. Chemické složení vody, a tedy i složení vodních

společenstev ovlivňují také četné přípojky z okolních rybníků, přiléhající zemědělsky obhospodařované pozemky a lidské usedlosti (Chábera et al. 1986; Matěnová & Matěna 2004b).

### 2.3.2 Ichtyofauna na řece Malší

Odlišnosti v charakteru horní a dolní části Malše mají evidentní vliv na druhové složení ryb. Dosud nejrozsáhlejší průzkum ichtyofauny na povodí řeky Malše byl proveden mezi lety 1999-2003 (Matěnová & Matěna 2004b). Tento výzkum byl zaměřen na plošný monitoring rybích společenstev na podélném povodí horní řeky Malše. Zahrnuty byly například přítoky Černá, Kamenice či menší říčky ústící do Stropnice. Nálezy odpovídaly charakteru toku, který je definován jako pstruhový, při čemž pstruh obecný (*Salmo trutta*) byl pozorován na celé délce toku. Přirozený výskyt pstruha obecného je zaznamenán pouze v nejdříve položených úsecích, směrem dál přibývá vlivu uměle vysazované populace pstruhů. Výskyt dalších typických zástupců pstruhového pásma jako je například vranka obecná (*Cottus gobio*), lipan podhorní (*Thymallus thymallus*) či mník jednovousý (*Lota lota*), byl zaznamenán na hraničním úseku horní Malše. V přítoku řeky Černé se vyskytují také střevle potoční (*Phoxinus phoxinus*). Směrem po proudu klesá dominance pstruha obecného a začínají se objevovat druhy jako je například mřenka mramorovaná (*Barbatula barbatula*), úhoř říční (*Anguilla anguilla*) či hrouzek obecný (*Gobio gobio*). Autoři ve své práci poukazují také na negativní vliv pronikání rybničních druhů, které narušují přirozenou rovnováhu původní ichtyofauny. Jedná se zpravidla o druhy jako je okoun říční (*Perca fluviatilis*), plotice obecná (*Rutilus rutilus*), perlín ostrobřichý (*Scardinius erythrophthalmus*) či střevlička východní (*Pseudorasbora parva*). Největší hrozbou jsou úniky dravých ryb jako je například štika obecná (*Esox lucius*) či candát obecný (*Sander lucioperca*), které mohou vést k úplnému vymizení původních druhů. Rybniční druhy se s největší frekvencí vyskytovaly na řece Stropnici, což odpovídá okolní husté síti rybníků v okolí Trhosvinenska. Ačkoliv se jednalo o velmi malé procento, výskyt kapra a okouna v hraniční části Malše poukazuje na průnik ryb z umělých nádrží i do vyšších úseků Malše (Matěnová & Matěna 2004a, Matěnová & Matěna 2004b). Takto rozsáhlý průzkum rybního společenství na dolním toku řeky Malše bohužel dosud nebyl proveden. Záznamy Povodí Vltavy však naznačují, že úsek nad Římovem ovlivňují migrující ryby z údolí nádrže, jmenovitě se jedná hlavně o ouklej obecnou (*Alburnus alburnus*), plotici obecnou (*Rutilus rutilus*) a okouna říčního (*Perca fluviatilis*) (Povodí Vltavy s.p. 2013: 5). V roce 2022 provedli Tesfaye s kolegy rozsáhlou srovnávací studii, na základě

dat získaných z odchytů ryb na Římově mezi lety 2004 až 2021 (Tesfaye et al. 2022). Autorům této studie se podařilo odhalit relativně vysokou diverzitu místní ichtyofauny. Po srovnání výsledků je zřejmé, že nejzastoupenější čeledí na Římově jsou kaprovití, zastoupení například ploticí obecnou (*Rutilus rutilus*), cejnkem malým (*Blicca bjoerkna*), či cejnem velkým (*Abramis brama*). Výrazné zastoupení mají také vysazené kaprovité ryby jako jsou například tolstolobec pestrý (*Hypophthalmichthys nobilis*), karas stříbřitý (*Carassius gibelio*), či samozřejmě charakteristický zástupce jižních Čech kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Mimo to je Římov domovem také pro dravé ryby jako jsou například okoun říční (*Perca fluviatilis*), štika obecná (*Esox lucius*) nebo candát obecný (*Sander lucioperca*). V neposlední řadě jsou zde také zastoupené nepůvodní lososovité ryby, jedná se například o pstruha obecného (*Salmo trutta*) lipana podhorního (*Thymallus thymallus*) či o siveny (*Salvelinus* spp.).

### 3 Cíle

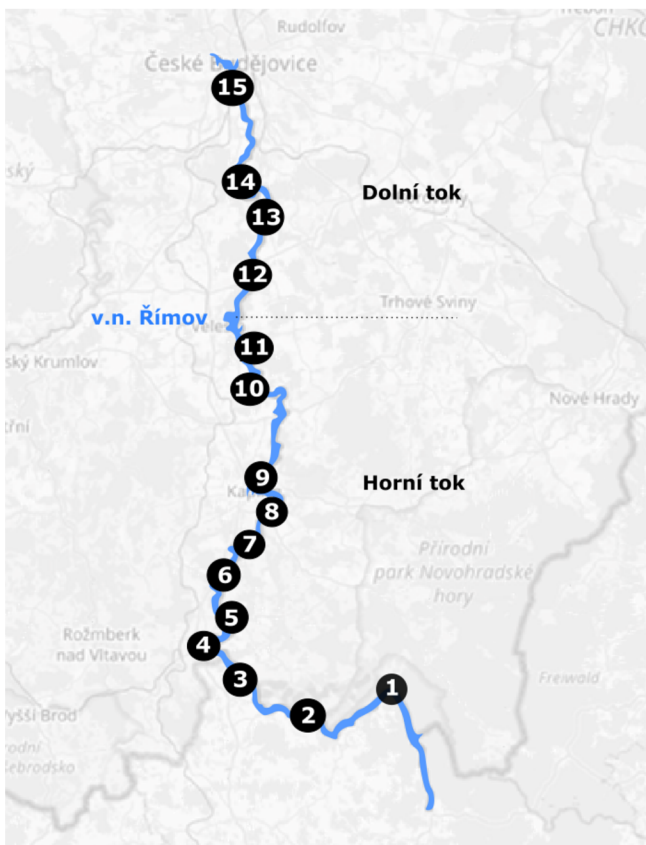
Předkládaná diplomová práce *Sledování proměnlivosti diverzity myxozoi na toku řeky Malše analýzou environmentální DNA* má tyto cíle:

1. Sledování diverzity myxozoi na řece Malši s použitím environmentální DNA z vody a sedimentu.
2. Bioinformatická a fylogenetická analýza NGS dat a následné vyhodnocení proměnlivosti na řece.
3. Porovnání diverzity na horním a dolním toku.
4. Posouzení vlivu ve změně hostitelského spektra kvůli intenzivní akvakultuře v okolních rybnících včetně vlivu přehrady Římov na diverzitu myxozoi.

## 4 Metodika

### 4.1 Terénní část

Veškeré vzorky použité v této práci byly sbírány v průběhu dvou sezón v letech 2021 a 2022 (viz **Tab. 1**). Vzorky vody a sedimentu pochází z řeky Malše, na které bylo zvoleno 15 různých lokalit pro sběr materiálu (viz **Obr. 2**). Souřadnice jednotlivých lokalit jsou znázorněny v tabulce (**Tab. 2**). V červnu v roce 2021 byl sbírán pouze sediment, zbylé tři sběry zahrnovaly také sběr vzorků vody. Voda i sediment byly vždy sbírány z litorální zóny řeky. Na každé lokalitě byly prvně nasbírány vzorky vody, aby nedošlo k jejímu rozvíření, které by mohlo vést ke zkreslení výsledku. Voda byla sbírána do 1,5 litrové čisté nádoby. Vzorky sedimentu byly odebrány z horní vrstvy dna řeky (v hloubce 1-5 cm od povrchu v závislosti na typu podloží). Množství vzorku sedimentu bylo vždy 100 ml. V rámci každé lokality byl vzorek získán z dvou různých míst (po 50 ml) za účelem zvýšení pravděpodobnosti záchytu myxozoi.



**Obrázek 2:** Přehled lokalit na řece Malši. Tečkovaná čára znázorňuje rozdělení horního a dolního toku řeky (upravená mapa z [www.mapy.cz](http://www.mapy.cz) programem Inkscape).

**Tabulka 1:** Nasbíraný materiál v průběhu sezón.

Název lokality	2021		2022	
	červen	září	duben	červenec
L1	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L2	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L3	N	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L4	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L5	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L6	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L7	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L8	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L9	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L10	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L11	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L12	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L13	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L14	sediment	voda_sediment	voda_sediment	voda_sediment
L15	N	N	voda_sediment	voda_sediment

Vysvětlivky: „sediment“= dostupné vzorky pouze sedimentu; „voda\_sediment“= dostupné vzorky vody a sedimentu; „N“= vzorky nebyly sbírány.

**Tabulka 2:** Umístění lokalit na řece Malší.

Název lokality	Tok	Souřadnice	Nejbližší lokality
L1	Horní	48.6278058N, 14.6109322E	Dolní Příbrání
L2	Horní	48.6141303N, 14.5448211E	Cetviny
L3	Horní	48.3767123N, 14.3039327E	Leopoldschlag
L4	Horní	48.6584900N, 14.4580856E	Dolní Dvořiště
L5	Horní	48.6665011N, 14.4807664E	Rychnov nad Malší
L6	Horní	48.6958472N, 14.4714644E	u Louzku
L7	Horní	48.7097536N, 14.4862703E	Skoronice
L8	Horní	48.7248875N, 14.5013978E	jižně od Kaplice
L9	Horní	48.7406433N, 14.4916239E	Kaplice
L10	Horní	48.4609080N, 14.3065422E	pod Pořešínem
L11	Horní	48.7909094N, 14.5195939E	Malče
L12	Dolní	48.8557331N, 14.5002178E	Římov
L13	Dolní	48.8944508N, 14.5042744E	Doudleby
L14	Dolní	48.9023183N, 14.4827150E	Plav
L15	Dolní	48.9580144N, 14.4780897E	České Budějovice



## 4.2 Laboratorní část

### 4.2.1 Zpracování vzorků a izolace eDNA

V laboratoři byly vzorky po sběru ihned zpracovány. Ke vzorkům sedimentu bylo přidáno 600 ml čisté vody (bez přítomnosti DNA myxozoi) a vzorek byl promíchán. Takto vzniklá směs byla následně přesívána skrz síta dvou velikostí za účelem odstranění větších částic. V prvním kroku bylo použito síto s velikostí ok 200  $\mu\text{m}$ , následně pak o velikosti ok 100  $\mu\text{m}$ . Po opětovném promíchání, byl vzorek ponechán sedimentovat (přibližně 4 minuty). Ze vzorku byly tímto způsobem odstraněny těžší částice a dále se pracovalo pouze se supernatantem, který obsahoval lehčí plovoucí částice (včetně spor myxozoi). Veškerý supernatant, který byl rozdělen do potřebného množství 50 ml zkumavek, byl po dobu 20 minut centrifugován při 4000 $\times$ . Vzniklý pelet byl poté podle množství přepipetován do několika 1,5 ml mikrozkušavek (při množství 500 mg sedimentu na zkumavku). Vzorky sedimentu byly následně skladovány ve 100% ethanolu při teplotě -20 °C.

U vzorků vody byl zvolen odlišný způsob. K filtrování vody byly použity filtry o velikosti 5 a 10  $\mu\text{m}$ . Filtry obsahující zachycené mikročástice byly taktéž skladovány ve 100% ethanolu a stejně jako vzorky sedimentu byly ponechány v chladu do dalšího zpracování.

Extrakce environmentální genomové DNA byla u části vzorků provedena s pomocí komerčně dodávaného kitu FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Solon, Ohio). Postupovalo se dle návodu od výrobce.

U části vzorků byla zvolena principiálně identická metoda izolace, ale bez použití komerčního kitu. Při extrakci se postupovalo dle návodu na extrakci eDNA z půdy z článku od Sellerse a jeho kolegů (2018). Celý proces zahrnoval 5 kroků: prvotní lýzi vzorků, odstranění inhibitorů, navázání eDNA na silika kolonku, očištění vzorku a poslední uvolnění eDNA z kolonky (100  $\mu\text{L}$  Ellution buffer).

### 4.2.2 Molekulární analýza

Z jednotlivých vzorků vyizolované eDNA, bylo smícháním 4-5  $\mu\text{l}$  ze všech vzorků eDNA náležící konkrétní lokalitě vytvořeno 13-15 (dle počtu lokalit) poolovaných vzorků. Ty byly následně použity pro PCR analýzu. Každý pool odpovídající dané lokalitě, byl amplifikován 9 různými primerovými sety (viz **Tab. 3**), které obsahovaly specifické barkody. Každý primerový set byl designován tak, aby specificky amplifikoval danou fylogenetickou

skupinu sladkovodních myxozoi. Počet devíti vybraných kombinací právě umožňuje pokrýt širokou diverzitu všech myxosporeí (Lisnerová et al. 2023) až na specifickou skupinu sférospor, jejichž detekci kolegyně z laboratoře právě testují (do mé diplomové práce tato skupina nebyla ještě zařazena). Barkody na jednotlivých primerových kombinacích umožňují zpětnou identifikaci konkrétní lokality, ze které nález pochází. Pro jednotlivé lokality jsem tedy použila 9 výše zmíněných primerových kombinací se specifickými barkody pro každou lokalitu. PCR směs byla připravena do komerčně dodávaných stripů AccuPower PCR PreMix premix (Bioneer, South Korea). Do premixu bylo přidáno 18  $\mu$ l DNase-free water, 0,5  $\mu$ l forward a revers primerů ( $c = 25$  pmol/  $\mu$ l) a 1  $\mu$ l eDNA. Pro zvýšení specifity amplifikace byla zvolena dvoukroková metoda nested PCR (Carr et al. 2010). Pro první krok reakce byly použity universální eukaryotické primery pro SSU rDNA ERIB1 (5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3') a ERIB10 (5'-CTTCCGCAGGTTACCTACGG-3') (Barta et al. 1997). Parametry pro tento krok reakce byly následující: iniciace reakce při 95 °C po dobu 3 min, následovaná 35 cykly při teplotě 94 °C po 1 min, dále 58 °C po 1 min, 72 °C po 1 min a poslední fází byla extenze při 72 °C trvající 10 min. V druhém kole reakce byly použity barkodované páry primerů (viz **Tab. 3**). Tyto primery odpovídají V4 úseku na SSU rDNA pro různé podskupiny sladkovodních myxozoi (cílová oblast je vyznačena na **Obr. 3**, Lisnerová et al. 2023). O jejich navržení a evaulaci pojednává článek autorů Lisnerové a jejich kolegů (Lisnerová et al. 2023). Parametry pro tento krok reakce byly následující: iniciace reakce při 95 °C po dobu 3 min, následovaná 40 cykly při teplotě 94 °C po 1 min, dále 58 °C po 30 sec, 72 °C po 30 sec a poslední fází byla extenze při 72 °C trvající 10 min. Parametry pro oba kroky PCR shrnuje **Tabulka 4**. U každé PCR reakce byly provedeny dvě negativní kontroly, pro různé kombinace primerů. Pro negativní kontrolu byl v prvním kroku použit 1  $\mu$ l DNase-free vody namísto DNA, tento produkt byl poté použit pro negativní kontrolu v druhém kroku PCR namísto vody.

Výtěžek z PCR byl ověřen agarovou gelovou elektroforézou a výsledek byl zobrazen pomocí UV transiluminátoru. Proužek DNA o odpovídající délce (350-400 bp) byl po vyříznutí extrahován z agarového gelu s použitím komerčně dodávaného kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., USA). Všechny pozitivní PCR produkty byly poté zpoolovány do různých knihoven určených k metabarcodovému NGS sekvenování. Amplikony byly osekvenovány metodou Illumina Mi-Seq (Illumina) s párovými konci (250 bp) (SeqMe, Czech Republic).

**Tabulka 3:** Sekvence použitých primerů.

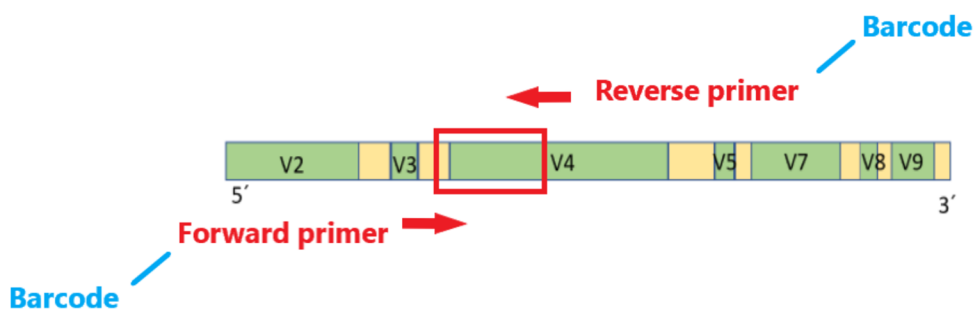
	<b>F</b>	<b>Sekvence</b>	<b>R</b>	<b>Sekvence</b>
1. krok				
	ERIB1	ACCTGGTTGATCCTGCC AG	ERIB10	CTTCCGCAGGTTACCT ACGG
2. krok				
	mid_X_ FR-for1	NNNNNNNNTTTCGATGA GWAACWACTGGAGG	mid_Y_ FR-rev1	NNNNNNNNNCATGCTAT YAACATTCAAGC
	mid_X_ FR-for5	NNNNNNNNTTTGTCTGA GTAACAACACTGRAGG	mid_Y_ FR-rev1	NNNNNNNNNCATGCTAT YAACATTCAAGC
	mid_X_ FR-for3	NNNNNNNNTTMAAYGA GWAACAACACTGGAGG	mid_Y_ FR-rev1	NNNNNNNNNCATGCTAT YAACATTCAAGC
	mid_X_ FR-for6	NNNNNNNNTRWTTTGA GTAACRACACTGGAGG	mid_Y_ FR-rev1	NNNNNNNNNCATGCTAT YAACATTCAAGC
	mid_X_ FR-for4	NNNNNNNNTTTCGTTGA KAAACAACACTAGAGG	mid_Y_ FR-rev6	NNNNNNNNNCATGCTRT AWCATTCAGGC
	mid_X_ FR-for5	NNNNNNNNTTTGTCTGA GTAACAACACTGRAGG	mid_Y_ FR-rev6	NNNNNNNNNCATGCTRT AWCATTCAGGC
	mid_X_ FR-for2	NNNNNNNNTYCGKTGA GTAACWACTGGAGG	mid_Y_ FR-rev6	NNNNNNNNNCATGCTRT AWCATTCAGGC
	mid_X_ Mgiardi F	NNNNNNNNGTTTGTGA CAAACATGCGATACCG G	mid_Y_ Mgiardi R	NNNNNNNNCACTCCGC AAACACAACACACGAC C
	Malaco- for- envir_m id_X_	NNNNNNNNGAAATTCA GGTCCATTCGTG	Malaco- rev- envir_mi d_Y_	NNNNNNNNCATGCTHG AATGTCCAGGC

Vysvětlivky: „F“ = forward primer; „R“ = reverse primer; „NNNNNNNN“ = unikátní barcode pro danou lokalitu; „\_X\_“ = unikátní barkod označení pro forward primer; „\_Y\_“ = unikátní barkod označení pro reverse primer.

**Tabulka 4:** Protokol na PCR.

1. krok		2. krok	
Teplota (°C)	Čas (min)	Teplota (°C)	Čas (min)
95	3	95	3
94*	1	94**	1
58*	1	58**	0.5
72*	1	72**	1
72	10	72	10

Vysvětlivky: „\*“ = opakování cyklů 35x; „\*\*“ = opakování cyklů 40x.



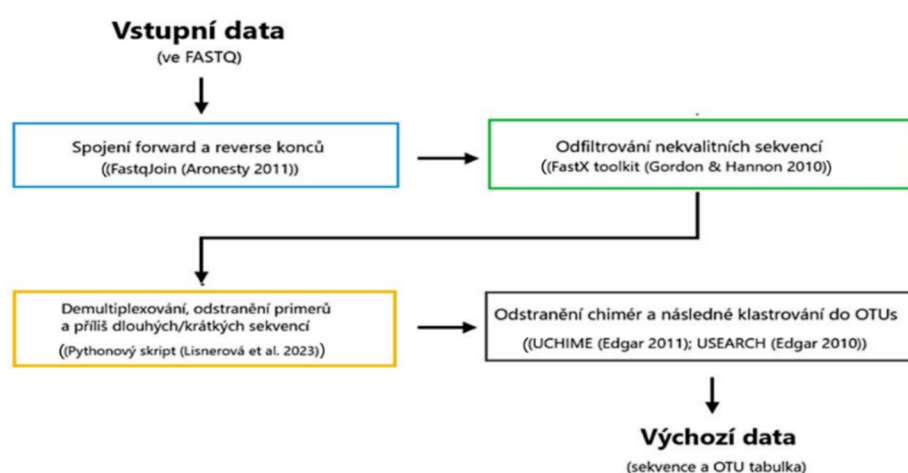
**Obrázek 3:** Cílová oblast použitých primerů na SSU rDNA (upraveno dle Lisnerové et al. 2023).

### 4.3 Bioinformatická analýza

Bioinformatická úprava získaných sekvencí byla provedena v systému Linux. Analýza zahrnovala několik kroků – spojení forward a reverse sekvencí, kontrola kvality sekvencí, konverze na FASTA formát, demultiplexování, odstranění chimér, klastrování OTUs a vytvoření OTU tabulky (viz souhrnné schéma na **Obr. 4**). Pro všechny kroky byl použit pythonový skript dle článku Lisnerová a kol. (2023).

Nejprve byly pomocí FastqJoin (Aronesty 2011) spojeny oba čtecí rámce (forward a reverse sekvence) s minimální překryvností 20 bp a maximální 40 bp. Další krok zahrnoval odfiltrování nekvalitních readů s použitím FastX toolkit dle Gordon & Hannon (2010). FastX toolkit byl také použit pro konverzi dat z formátu FASTQ do FASTA. Získaná data bylo poté potřeba demultiplexovat (oddělit od sebe) na základě unikátních barkodů připojených k sekvencím (pythonový skript dle Lisnerová et al. 2023). Během PCR reakce může docházet k tvorbě tzv. chimér, které by mohly zkreslit výsledky analýzy. Chimérové sekvence byly proto odstraněny s použitím UCHIME (Edgar et al. 2011). Sekvence byly dále s použitím

USEARCH (Edgar 2010) klastrovány do operačních taxonomických jednotek neboli OTUs. Tímto způsobem dojde k vytvoření unikátních setů sekvencí, které odpovídají minimálně z 97 % (OTU radius 3 %). Z OTUs jsou vybrány reprezentativní sekvence, ze kterých je vytvořena OTU tabulka, která slouží k vyobrazení počtu jednotlivých vlastních OTU a také čtení (neboli readů) daného OTU na různých lokalitách. Jednotlivé OTU sekvence byly poté algoritmem BLAST (NCBI BLAST 2023: 6) porovnány s databází GenBank (NCBI GenBank, 2023: 7) a ke každému OTU byla na základě shody přiřazena rodová či druhová příslušnost. Do fylogenetické analýzy byly zahrnuty pouze OTUs, která odpovídala skupině Myxozoa a zároveň u nich byl dostatečný počet čtení (se spodní hranicí 20 čtení).



**Obrázek 4:** Pracovní postup pro bioinformatickou analýzu. (zdroj: vlastní tvorba).

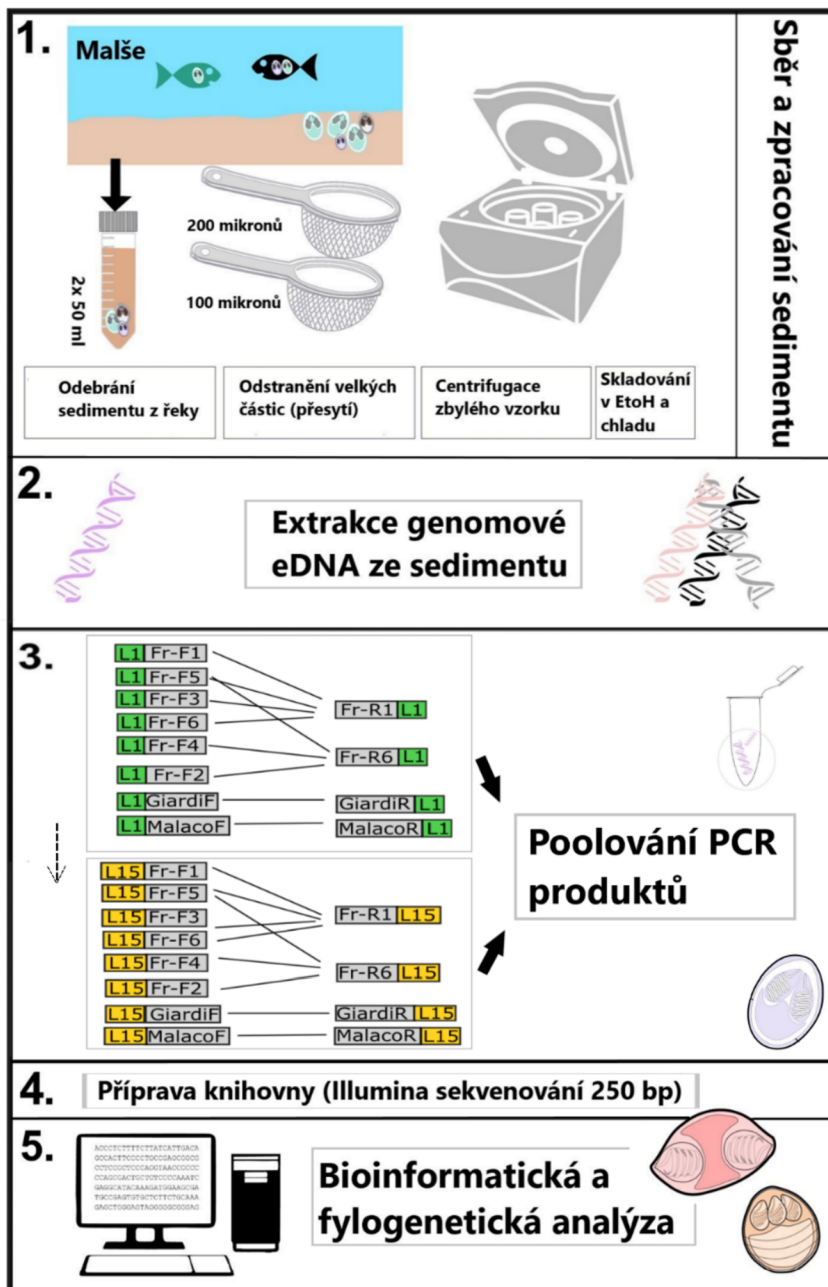
#### 4.4 Fylogenetická analýza

Veškeré úpravy molekulárních dat a následné fylogenetické analýzy byly provedeny v programu Geneious (Geneious Prime, 2022: 8). Prvním krokem molekulárně fylogenetické analýzy bylo vytvoření alignmentů. Alignment, který byl použit pro zjištění fylogenetických vztahů a následné sestavení fylogenetického stromu zahrnoval námi získané OTU sekvence společně s vytvořeným datasetem sekvencí různých skupin sladkovodních myxozoi, které byly dostupné v databázi GenBank. Přehled použitých sekvencí pro obě analýzy je v příloze (viz kap. 9. Příloha). Z důvodu velkého množství získaných OTUs a rozsáhlého datasetu, byly provedeny dvě fylogenetické analýzy. První analýza pro skupinu *Myxobolus* a druhá pro hlavní linie myxozoi. Dataset pro skupinu *Myxobolus* obsahoval celkem 172 sekvencí. Z celkového množství bylo 73 sekvencí získáno v této práci zbytek sekvencí pocházel z dostupné databáze (viz Tab. 10). Pro zakořenění stromu byla použita sekvence

*Hofferehus carrasi* (JQ801547), jakožto outgroupová sekvence. Druhá analýza pro veškeré taxony rybomerek vyjma skupinu *Myxobolus* zahrnovala dataset obsahující 151 sekvencí z databáze (viz. **Tab. 11**), z toho bylo 63 námi získaných OTUs. Fylogenetický strom byl opět zkonstruován na základě výsledků Maximum likelihood (ML) analýzy podpořený výsledky Bayesovské inference (BI). Schéma fylogramu odpovídá ML analýze s bootstrapovou podporou pro ML, na kterou byly namapovány posteriorní pravděpodobnosti i pro Bayesovskou inferenci. Fylogenetické stromy byly zkonstruovány na základě dvou metod: Maximum Likelihood (ML) a Bayesovské interference (BI). Programem RAxML v7.2.8 (Stamatakis 2006) byla provedena ML analýza (model GTR +  $\Gamma$ ; 1000 počet replikací pro výpočet bootstrapových hodnot). Pro BI analýzu byl použit program MrBayes v3.0 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) s volbou modelu GTR +  $\Gamma$  a 5 milióny generací. Výpočet byl zprostředkovan dvěma nezávislými běhy při čtyřech souběžně probíhajících algoritmech (za použití metody Markov Chain Monte Carlo (MCMC)) s uložením každého 100. stromu. Druhově specifické divergence byly identifikovány na základě proporcionálních vzdáleností (v %) na bázi souboru dat použitého pro ML analýzu. Pro finální úpravy fylogenetického stromu byl použit program Inkscape 3.0 (Inkscape Project 2020: 9).

#### **4.5 Biostatistická analýza**

Zpracování veškerých dat získaných z bionformatické a fylogenetické analýzy bylo provedeno v programu Microsoft Excel.

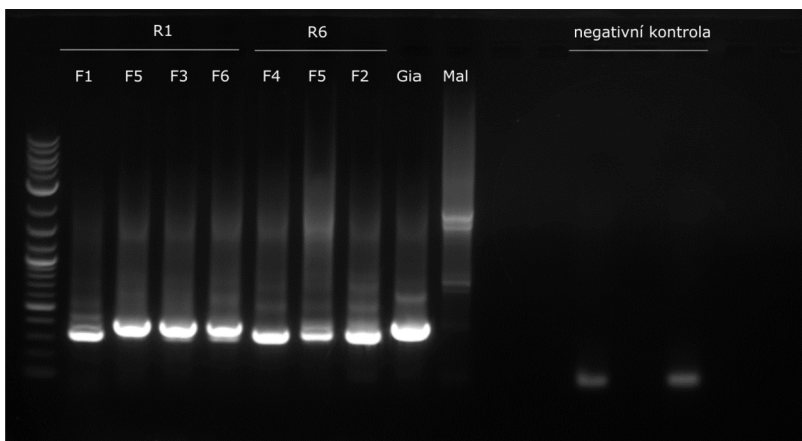


**Obrázek 5:** Souhrn metodiky pro zpracování vzorků sedimentu za účelem získání dat o přítomnosti Myxozoa v prostředí (upraveno z práce Lisnerové a kolegů 2023).

## 5 Výsledky

### 5.1 Molekulární analýza

Molekulární analýza byla provedena u všech vzorků vody a sedimentu z řeky Malše – celkem se jednalo o 101 vzorků. Z celkového počtu 909 provedených PCR reakcí se specifickými primery bylo získáno celkem 626 pozitivních PCR produktů, které byly v šesti knihovnách poslány na sekvenování (knihovny jsou součástí **Tab. 6** a **Tab. 7**). Ukázka pozitivních nálezů na agarovém gelu je vyobrazena na **Obrázku 6**.



**Obrázek 6:** Ukázka pozitivních PCR reakcí environmentálních vzorků se specifickými primery. Pozitivní proužky odpovídají přibližné délce 350-400 bp.

### 5.2 Bioinformatická analýza

Od sekvenační firmy jsem získala ke každému PCR produktu data v průměrné hloubce 50 tisíc čtení na vzorek. Jednotlivé knihovny byly zpracovány v metodice popsaným postupem a celkem se podařilo identifikovat 1509 různých OTUs. Po odfiltrování OTUs nepatřící na základě BLAST analýzy k myxozoím a dále OTUs nesplňující minimální hranici 20 readů zůstalo celkem 162 OTUs myxozoárního původu (**Tab. 5**). Účinnost primerů (definovaná procentuálním zastoupením počtu cílených readů) se pohybovala v rozmezí 65-99 % (viz **Tab. 6**).

Alignováním všech OTU z několika knihoven jsem identifikovala 43 OTUs, které se vyskytovaly minimálně ve dvou knihovnách. Sloučením identických OTUs vzniklo celkem 17 unikátních OTUs. Finální počet OTUs odpovídajícím myxozoím byl tedy 136. Z toho převážná část OTUs byla nalezena ve vzorcích sedimentu, ze kterého pochází 126 OTUs. Z vody se podařilo získat 28 OTUs. 18 OTUs se podařilo zachytit v obou typech vzorků



(viz **Obr. 7**). S přihlédnutím na tok řeky bylo na horní části Malše detekováno celkem 108 OTUs (sediment 95, voda 25 OTUs, z toho 12 OTUs v obou typech vzorku), kdežto z lokalit v dolním toku bylo získáno 67 OTUs (sediment 60 a voda 18 OTUs, 11 OTUs v obou typech vzorku). Ze schématického znázornění plyne, že 69 OTUs bylo popsáno pouze na horním toku, 28 OTUs pouze na dolním a průnik obou množin odpovídá detekci 39 OTUs na obou částech toku (viz **Obr. 7**). V prvním roce bylo detekováno výrazně větší množství OTUs (123 OTUs: 103 v červenci a 38 v září) a to i přes to, že bylo při sběru v roce 2021 získáno méně materiálu ke zpracování. V roce 2022 bylo identifikováno 23 OTUs (20 OTUs v dubnu a 13 OTUs v červnu). 10 OTUs bylo detekováno v obou letech (viz **Obr. 7**). Rozdělení množství nalezených OTU s přihlédnutím lokalitu, čas sběru a původ vzorku je vyobrazeno v **Tabulce 7**.

**Tabulka 5:** Souhrn nálezů OTUs z jednotlivých knihoven.

<b>Knihovna</b>	<b>Sběr*</b>	<b>Všechna OTUs</b>	<b>OTUs myxozoi**</b>	<b>%</b>
ENV11_L1	VI.21	367	60	16
ENV12_L1	IX.21	422	30	7
ENV13_L1	IX.21	326	30	9
ENV15_L1	IV.22; VI.22	118	17	14
ENV15_L2	IV.22; VI.22	163	10	6
ENV15_L3	IV.22; VI.22	113	15	13
<b>Celkem</b>		<b>1509</b>	<b>162</b>	

Vysvětlivky: \* měsíc a rok vzorkování; \*\* OTUs splňující minimální hranici 20 readů.

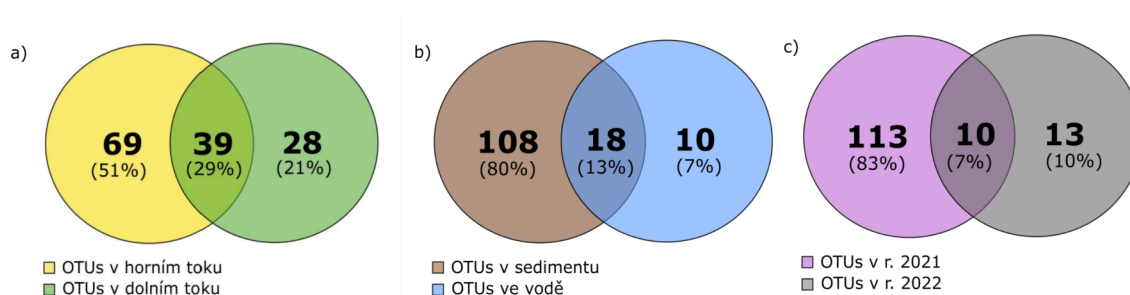
**Tabulka 6:** Počet readů v jednotlivých knihovnách.

<b>Knihovna</b>	<b>Necílené *</b>	<b>Cílené**</b>	<b>% myxozoič OTUs</b>
ENV11_1	35534	2083534	98
ENV12_1	205	2703566	99
ENV13_1	366166	731920	67
ENV15_1	102858	1705651	94
ENV15_2	346538	1206295	78
ENV15_3	548104	1018295	65

Vysvětlivky: \* OTUs jiných organismů; \*\* OTUs myxozoi.

**Tabulka 7:** Rozdělení množství nalezených OTU s přihlédnutím lokalitu, čas sběru a původ vzorku.

		Počet OTUs
Vzorek	Sediment	126
	Voda	28
Tok	Horní	108
	Dolní	67
Sezóna	r. 2021	123
	r. 2022	23



**Obrázek 7:** Vennův diagram zobrazující: a) celkové množství detekovaných OTUs pouze v horním a dolním toku, množina průniku odpovídá nálezů na obou částech toku b) celkové množství OTUs detekovaných pouze v sedimentu, vodě a v obou typech vzorku c) celkové množství OTUs detekovaných pouze v r. 2021, r.2022 a v obou letech.

### 5.3 Fylogenetická analýza

V prvním fylogenetickém stromě, který je zaměřen na skupinu *Myxobolus*, získané OTUs klastrují ve 3 podskupinách (**Obr. 8**). Převážná část získaných sekvencí byla začleněna do podskupiny *Myxobolus* subclade VIII, konkrétně se jednalo o 54 různých OTUs. OTUs byly v rámci této podskupiny rozděleny do 4 klastřů: i) 14 OTUs klastrovalo společně např. s druhy *M. lagodensis* (KP241961), *M. xinyangensis* (OL606014) a komplikovaným komplexem druhů *M. pseudodispar*, ii) 10 OTUs klastrovalo společně, nicméně bez blízké příbuznosti s druhy jako *M. sitjae* (JF311898), *M. obesus* (AY325286) či *M. tambroides* (JX028236), iii) 29 OTUs připadlo do druhově obsáhlé skupiny s nejznámějšími druhy *M. arcasii* (MK053784) a *M. rotundus* (FJ851446). V této skupině byla pozorována shoda jednoho OTU s dříve popsáním druhem z kapra obecného (*Cyprinus carpio*) *M. dispar* (AF507972). Dvě OTUs klastrovaly do společné větve s *M. tauricus* (JQ388896) z parmy obecné (*Barbus barbus*) (podobnost 95,5 %, respektive 93,6 %), příbuznost (téměř shoda) byla

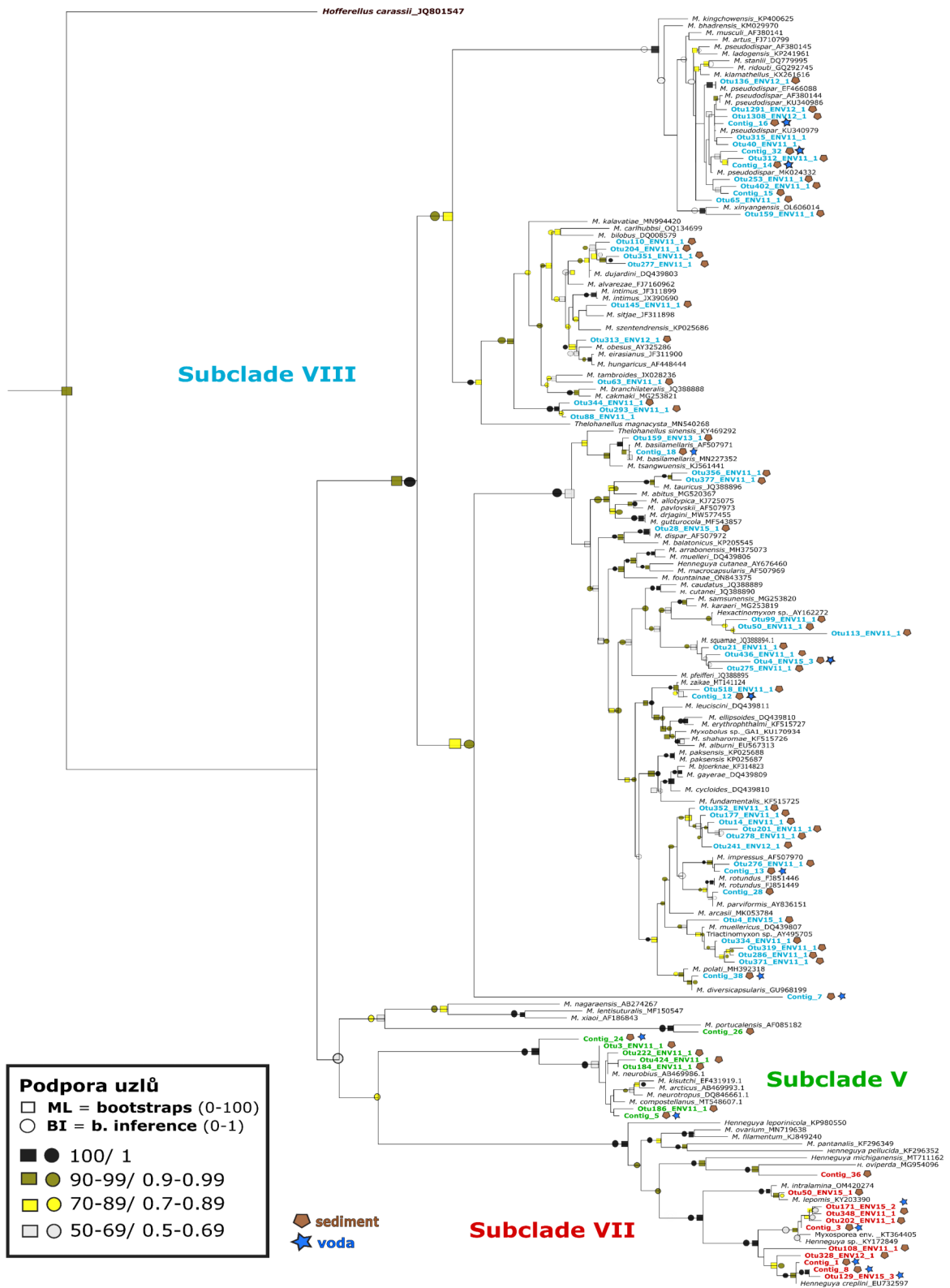
dále pozorována s *M. basilamellaris* (AF507971 a MN227352) u 2 OTUs (podobnost 97.2 %, respektive 99.6 %), jiná 2 OTUs klastrovala v blízké příbuznosti se sekvencí *M. impressus* (AF507970). Do skupiny s *M. muellericus* (DQ439807) připadlo 6 OTUs. Contig\_38 klastroval s podobností 98, 7 % spolu s *M. diversicapsularis* (GU968199). Jiný Contig\_28 klastroval s *M. parviformis* (AY836151) (podobnost 99,1 %). Několik 6 OTUs vytvořilo vlastní klastr, nepodobné známým sekvencím. Do klastru s *M. zaikae* (MT141124) připadlo Otu518 a Contig\_12 (s podobnostmi 96 % a 95,1 %), iv) Contig 7 jako jediný v rámci podskupiny *Myxobolus* subclade VIII klastroval samostatně.

Další dvě podskupiny byly méně zastoupeny – do *Myxobolus* subclade VII, kam spadá například *Henneguya creplini* (EU732597), *H. oviperda* (MG954096) či *M. intralamina* (OM42274) připadlo 11 OTUs. K podskupině *Myxobolus* V se přiřadilo 8 OTUs, žádné OTU nemá 100% shodu s dříve popsány sekvencemi/druhy. Jedno OTU se za silné podpory (podobnost 95,6 %) větvilo s dříve popsáným *M. portucalensis* (AF085182) do příbuznosti u úhoře říčního (*Anguilla anguilla*). Zbytek OTUs se zařadil do skupiny s *M. neurobius* (AB469986), *M. kisutchi* (EF431919), *M. arcticus* (AB469993), *M. neurotropus* (DQ846661) a *M. compostellanus* (MT548607), jež se vyskytují u lososovitých ryb.

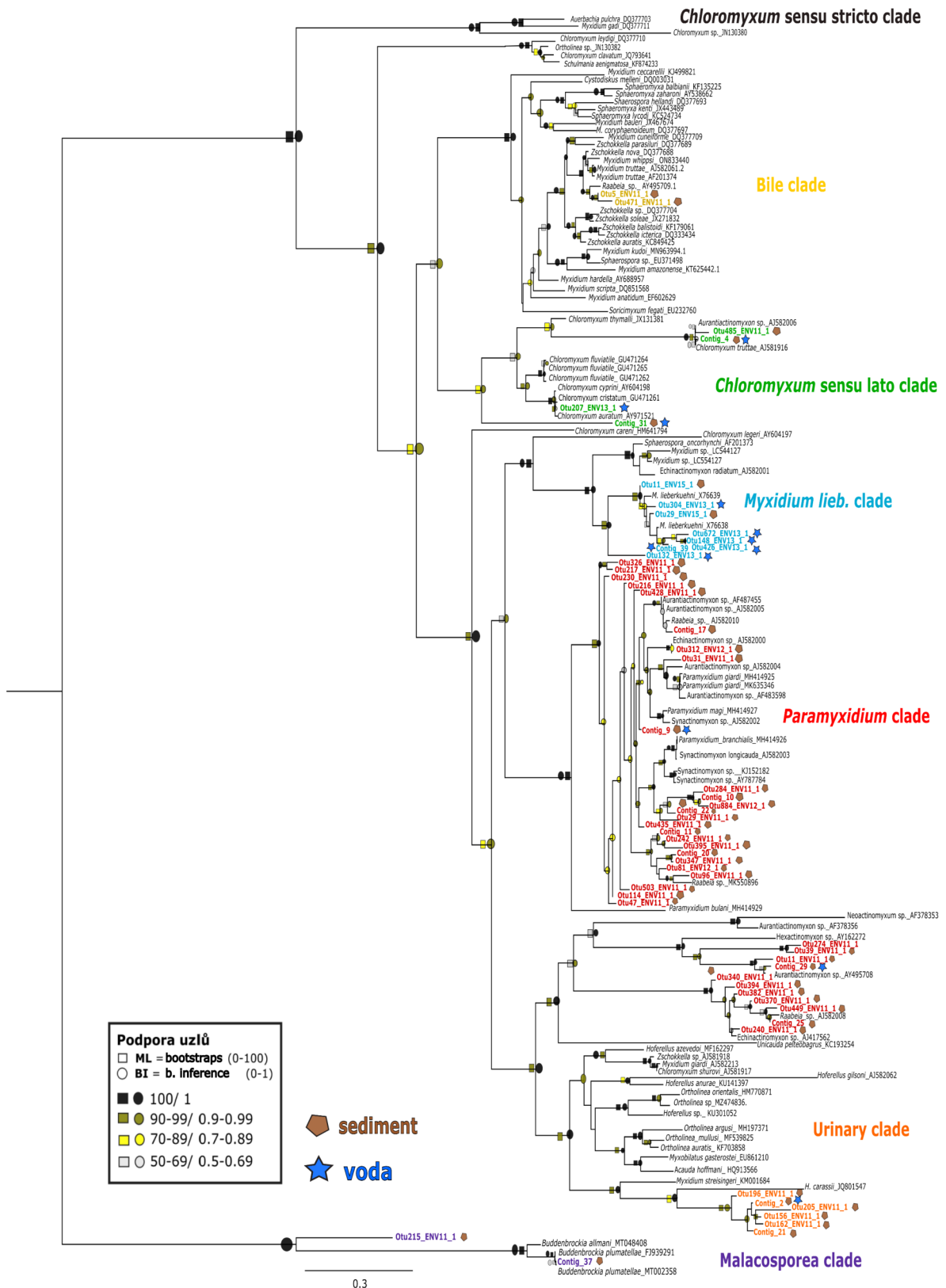
Druhá fylogenetická analýza zahrnovala všechny hlavní linie sladkovodních myxosporeí a Malacosporea, vyjma rodu *Myxobolus*. Výsledný fylogenetický strom je vyobrazen na **Obrázku 9**. Sekvence získané ze vzorků z řeky Malše klastrovaly do 6 podskupin Myxozoa: Bile clade, *Chloromyxum sensu lato* clade, *Myxidium lieberkuehni* clade, *Paramyxidium* clade, Urinary clade a do Malacosporea clade. Nejzastoupenější skupinou byl *Paramyxidium* clade, do kterého připadlo 31 OTUs. Pouze jedno OTU (Otu312\_ENV12\_1) se shoduje s dříve získanou sekvencí *Echinoactinomyxon* sp. (AJ582000). Dvě OTUs připadla do skupiny s *Raabeia* sp (podobnost 96,1 % a 90,9 %). Zbytek OTUs vytvořilo samostatné linie či skupiny, které se neshodovaly s žádným z dříve popsáných druhů dostupných v databázi. Hojně zastoupená byla také skupina s označením *Myxidium lieberkuehni* clade, do které připadlo 8 OTUs. Žádné OTU se neshoduje s dříve popsanou diverzitou této skupiny. K myxozoím parazitujícím v močovém měchýři (Urinary clade) připadlo 5 OTUs, které klastrovaly s druhem *Hoferellus carassi* (JQ801547) (v rozmezí 77,4–88,2% podobnosti). Ačkoliv měl clade *Chloromyxum sensu lato* relativně velkou abundanci, zachycené byly pouze 4 různé OTUs: i) Otu485\_ENV11 a Contig\_4 jsou příbuzné s *C. truttae* (AJ581916) (podobnost 79,3 %, respektive 99,7 %), ii) Otu207\_ENV13\_1,

které je shodné se sekvencí *C. cristatum* (GU471261), iii) Contig\_31 nalezený ve vodě i sedimentu klastroval samostatně.

Nejméně zastoupenou skupinou, detekovanou pouze na dolním toku řeky, byla skupina myxozoi infikující žlučník (Bile clade). Zachyceny byly 2 OTUs (Otu5\_ENV11\_1, Otu471\_ENV11\_1), které klastrovaly v blízkosti sekvence s označením *Raabeia* sp. (AY495709) (podobnost 95,3 %, respektive 90,6 %). Taktéž se podařilo zachytit OTUs patřící do skupiny Malacosporea, a to s nálezem 2 různých OTUs – Otu215\_ENV11\_1 v samostatné linii a Contig\_37 se 100% shodou s *B. plumatela* (FJ939291), popsanou ze střevle potoční (*Phoxinus phoxinus*). Třída Malacosporea v tomto případě zároveň sloužila jako outgroupová skupina.

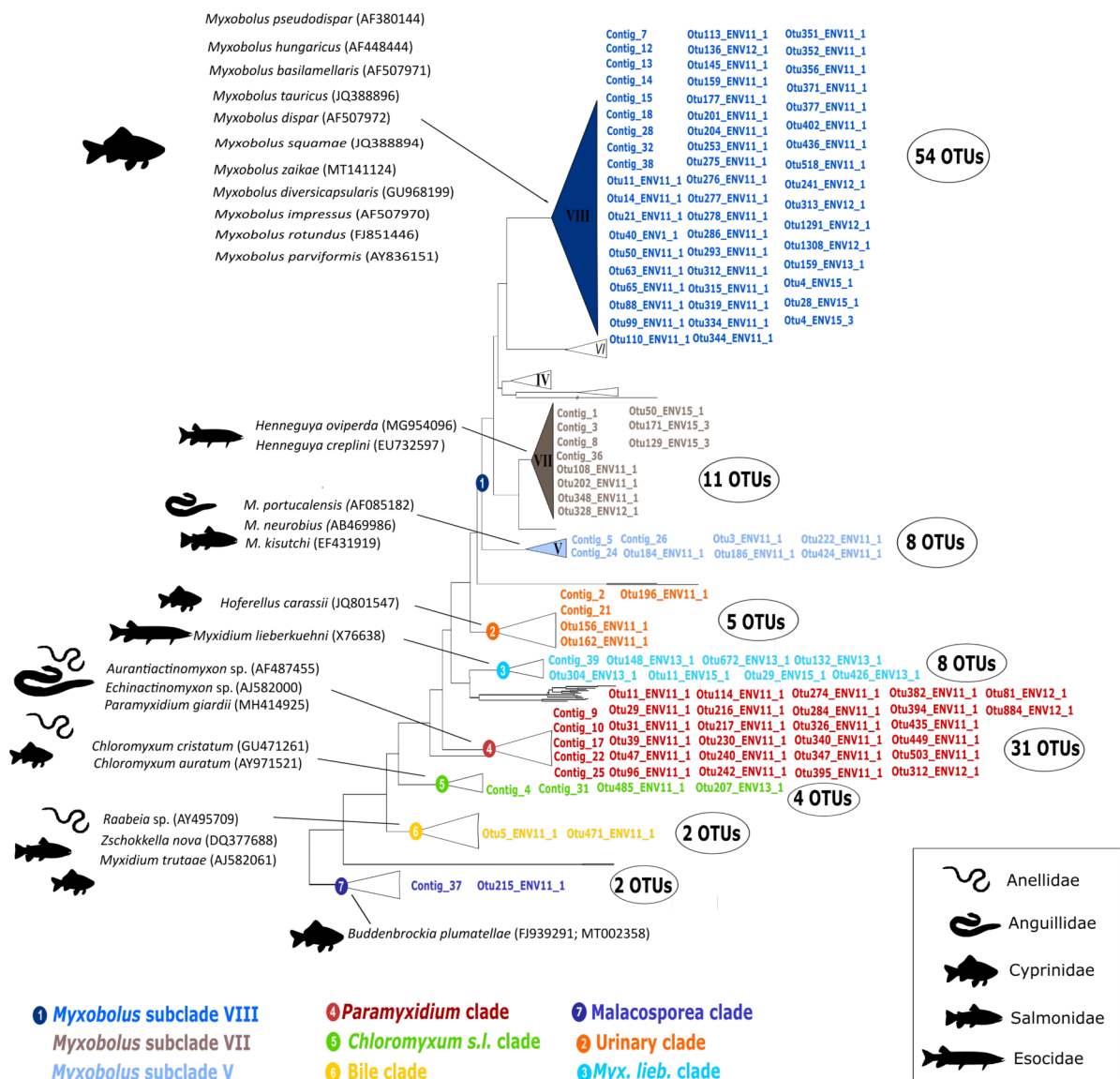


**Obrázek 8:** Výsledný fylogram pro gen SSU rDNA získaný metodou Maximum likelihood (ML) pro rod *Myxobolus*. Parametry pro ML a Bayesovskou inferenci (BI) jsou popsány v kapitole (viz kapitola 4.4. Fylogenetická analýza). Číselné hodnoty uzlů odpovídají hodnotám bootstrapu pro ML. Výsledek BI je vyznačen pomocí posterior probabilities. Podpora uzlů je vyznačena dle legendy, hodnoty nižší než 50/0.5 nebyly zaneseny do fylogramu. OTUs náležící do odlišných podskupin jsou vyznačeny tučně a barevně odlišeny. U jednotlivých OTUs je také vyznačeno, z jakého typu vzorku pochází (sediment/ voda). Pro zakotvení stromu byla použita sekvence *Hofferellus carassii* (JQ801547), která slouží jako outgroupová skupina.



**Obrázek 9:** Výsledný fylogram pro gen SSU rRNA získaný metodou Maximum likelihood (ML) pro všechny taxony vyjma skupinu *Myxobolus*. Parametry pro ML a Bayesovskou inferenci (BI) jsou popsány v kapitole (viz kapitola 4.4. Fylogenetická analýza). Číselné hodnoty uzlů odpovídají hodnotám bootstrapu pro ML. Výsledek BI je vyznačen pomocí posterior probabilities. Podpora uzlů je vyznačena dle legendy, hodnoty nižší než 50/0.5 nebyly zaneseny do fylogramu. OTUs náležící do odlišných podskupin jsou vyznačeny tučně a barevně odlišeny. U jednotlivých OTUs je také vyznačeno, z jakého typu vzorku pochází (sediment/ voda). Jako outgroupová skupina slouží Malacospora clade.

Ze srovnání podobnosti u všech 136 identifikovaných OTUs se ukázalo, že pouze 3 OTUs (2 % OTUs) se shodovala se známými druhy: i) Otu136\_ENV21 (100% podobnost s *M. pseudodispar* (EF466088)), ii) Otu28\_ENV15\_1 (100% podobnost s *M. dispar* (AF507972)), iii) Otu312\_ENV12 (99,8% podobnost s *Echinactinomyxon* sp. (AJ582000)). Souhrnné klastrování všech OTUs získaných v této práci je vyobrazeno na společném fylogenetickém stromu (Obr. 10). K jednotlivým kladům jsou přiřazeny: i) sekvenční, se kterými vykazovaly nejbližší příbuznost, ii) reprezentativní hostitelé, u kterých byly tyto druhy dříve popsány.



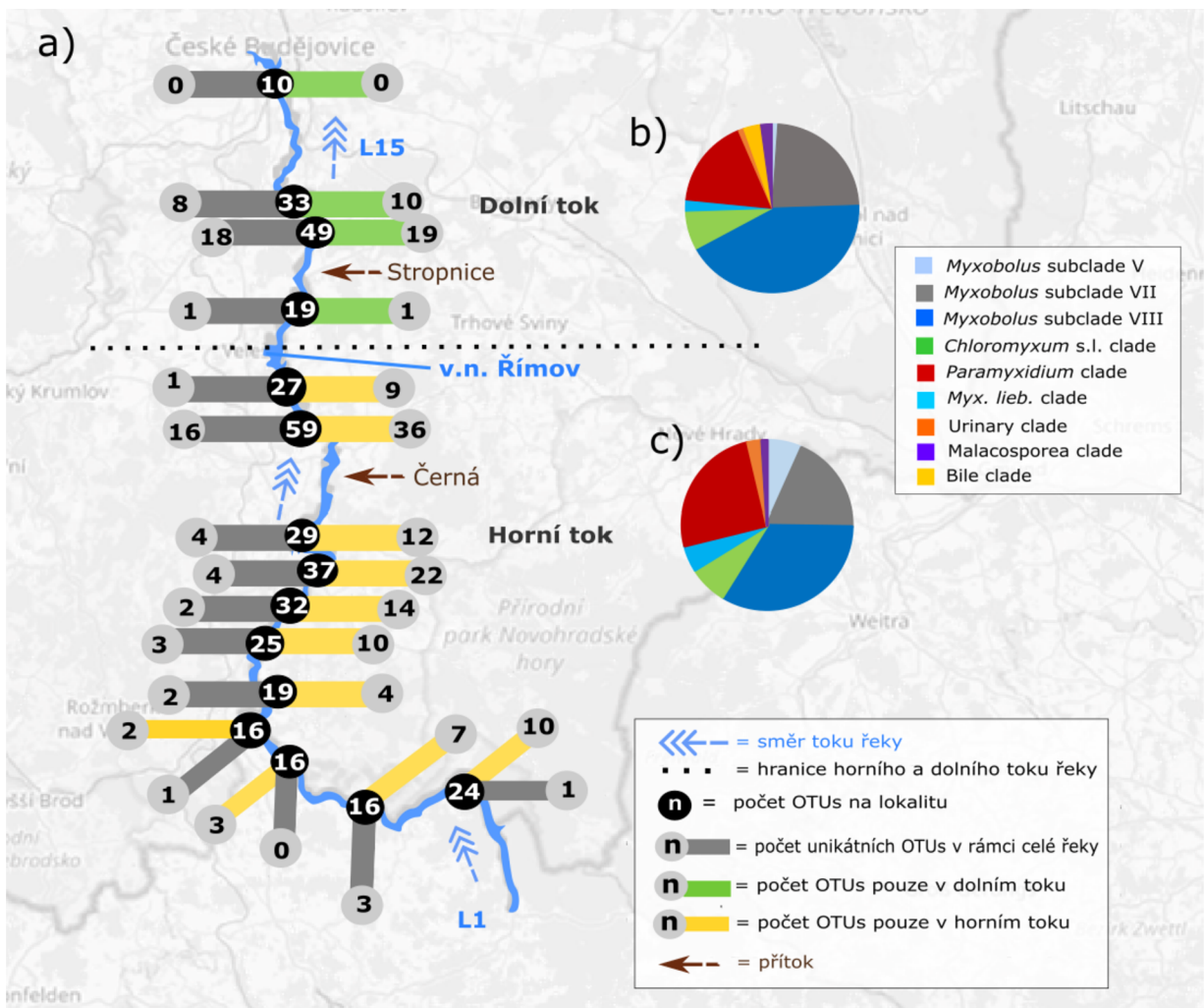
**Obrázek 10:** Fylogram pro SSU rRNA sladkovodních kladů myxozoi. Barevné odlišení odpovídá zaražení detekovaných OTUs do jednotlivých skupiny a počet OTUs v kroužku vyjadřuje celkovému množství OTUs v daném kladu. Vlevo od stromu jsou zahrnuté příklady hostitelů na základě sekvencí z databáze, které klastrují v daných skupinách. Piktogram ryb a kroužkovic odpovídá hostitelům, ze kterých byly získány sekvenční z databáze.

## 5.4 Srovnání biodiverzity myxozoi

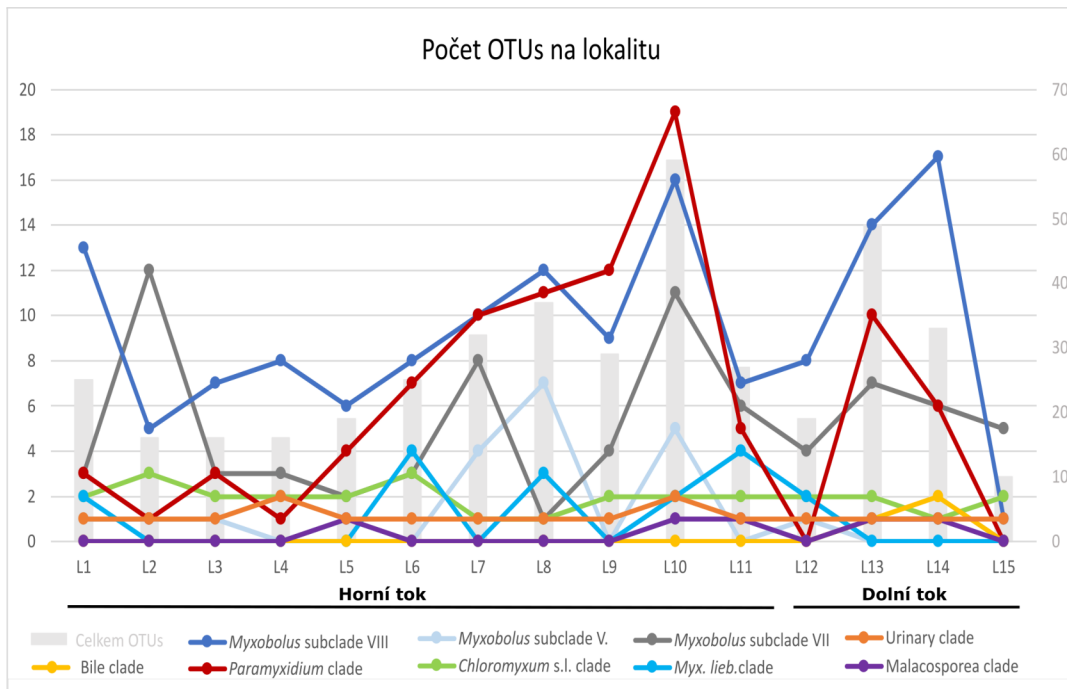
### 5.4.1 Na úrovni počtu detekovaných OTUs

Všech 136 nalezených OTUs myxozoi bylo použito pro srovnání a popis diverzity na řece Malší. **Obrázek 11 a)** znázorňuje množství detekovaných OTUs na jednotlivých studovaných lokalitách, kde jsou vyznačeny: i) všechna detekovaná OTUs myxozoi na dané lokalitě, ii) počet unikátních OTUs pro horní či dolní tok, iii) zastoupení jedinečných OTUs v rámci celé řeky Nejvíce OTUs bylo detekováno na lokalitě č. 10, kde se podařilo zachytit 59 různých OTUs. Z dolního toku bylo nejvíce OTUs identifikováno na lokalitě č. 13 (49 OTUs). Tato lokalita zároveň obsahovala nejvíce unikátních OTUs v rámci celé řeky (18 OTUs). Pro srovnání procentuálního zastoupení jednotlivých kladů Myxozoa (na základě počtu různých OTUs) byly vytvořeny koláčové grafy pro horní (**Obr. 11 c)** a dolní tok (**Obr. 11 b**). Na horním a dolním toku řeky, které zobrazují zjevnou převahu zástupců z *Myxobolus* clade a také hojné zastoupení skupiny *Paramyxidium*. Schéma dále obsahuje graf (**Obrázek 12**) se zastoupením jednotlivých kladů na každé lokalitě. Z tohoto grafu je evidentní nárůst výskytu počtu druhů skupiny *Paramyxidium* po proudu řeky s vrcholem v lokalitě č. 10. Tendence pro růst směrem na jih má také podskupina VIII linie *Myxobolus*, která zároveň dominuje na lokalitách dolního toku.





**Obrázek 11:** Schéma znázorňuje: a) počet nalezených myxozoích OTUs na jednotlivých lokalitách s přihlédnutím na horní a dolní tok řeky s legendou v dolní pravé části. Modré šipky odpovídají směru toku řeky a růstu hodnoty lokality (L1-L15). Plná modrá šipka označuje vodní nádrž Římov (v.n. Římov). Hnědé šipky označují přítok řek Černá a Stropnice; b) procentuální zastoupení OTUs v dolním toku s přihlédnutím na skupinu Myxozoa, do které byly přiřazeny (s legendou vpravo od grafu); c) procentuální zastoupení OTUs v horním toku s přihlédnutím na skupinu Myxozoa, do které byly přiřazeny (s legendou vpravo od grafu).

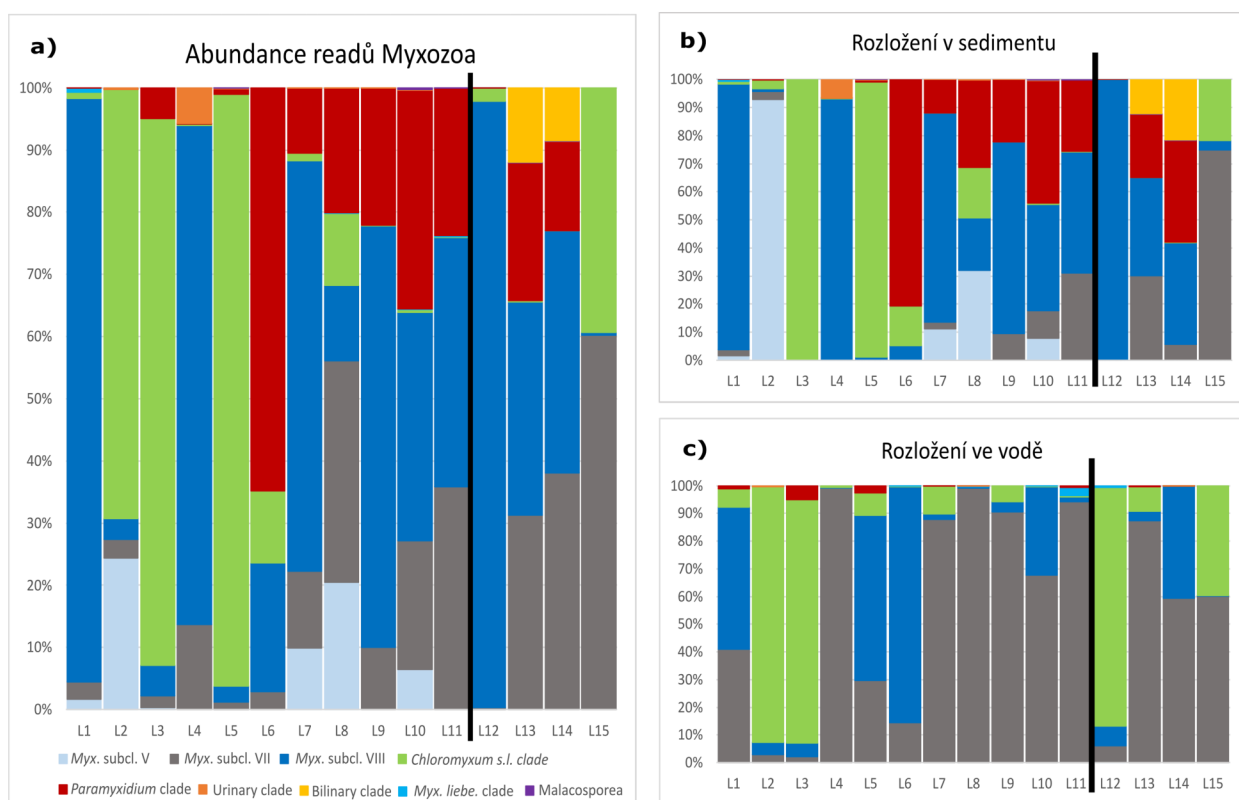


**Obrázek 12:** Kombinovaný graf znázorňující počet detekovaných OTUs na konkrétní lokalitě. Barevně odlišený spojnicový graf odpovídá množství OTUs z daného kladu myxozoi. Šedý sloupcový graf vyjadřuje počet všech nalezených OTU na lokalitě. Osa x odpovídá rozložení lokalit s rozdělením na horní a dolní tok, levá osa y počtu OTUs pro dané kladu (hodnoty pro spojnicový graf) a pravá osa y odpovídá celkovému množství OTUs v lokalitě (hodnoty pro sloupcový graf).

#### 5.4.2 Na úrovni počtu readů jednotlivých OTUs

Procentuální zastoupení jednotlivých kladů myxozoi na základě souhrnného množství readů v jednotlivých lokalitách vypočtené součtem ze všech sezón vyobrazuje graf na **Obr. 13**. Při sledování průběhu toku (směrem od L1 k L15) je evidentní nárůst výskytu *Paramyxidium*, *Myxobolus* subclade VIII a přibývá také detekce *Myxobolus* subclade VII. Oproti tomu abundance *Myxobolus* subclade V s průběhem toku klesá. V horní části řeky (konkrétně v L2, L3 a L5) je vysoká frekvence readů náležících skupině *Chloromyxum s.l.* Skupina *Chloromyxum s.l.* byla také relativně hojně detekována na lokalitě č. 15. Za povšimnutí stojí také detekce myxozoi infikující žlučník (Bile clade), které byla zaznamenána pouze v dolním toku (L13, L14). Myxozoa, která se vyskytují v močových cestách (Urinary clade) a dále také skupina Malacosporea, byla detekována pouze sporadicky napříč celou řekou. Pouze na lokalitě č. 4 byla zaznamenána relativně vysoká míra readů pro Urinary clade.

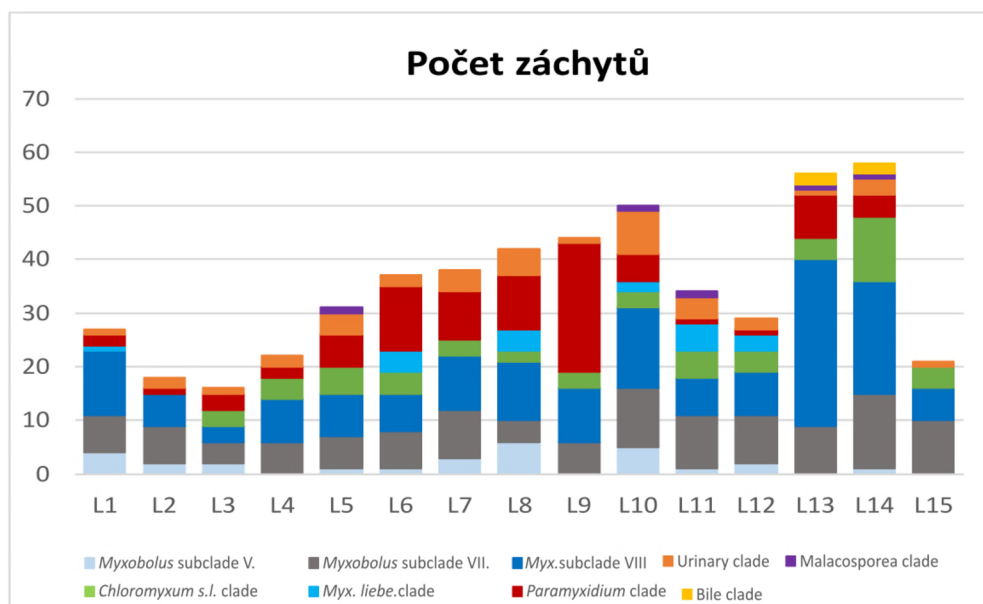
Zajímavé odhalení zastoupení jednotlivých kladů poskytlo rozdělení typu vzorků na vodu a sediment (**Obr. 13**). Při srovnání grafu na **Obr. 13b**) a **Obr. 13c**) je zjevné, že hlavní vzorec unifikovaných dat (**Obr. 13a**) je udán nálezy ze sedimentu. V sedimentu byla detekována převážná část skupiny *Paramyxidium* (zejména v lokalitách L6-L11 a dále také v L13 a L14) a dále také *Myxobolus* subclade VIII (s vysokou abundancí mezi L7 a L14). Oproti tomu *Myxobolus* subclade VII byla vyjma jedné lokality (L15) detekována převážně ze vzorků vody, na celkovém souhrnu je však utlačena nálezy ze sedimentu. Podskupina *Myxobolus* subclade V byla zastoupena pouze v sedimentu s výskytem v horní části řeky (L2, L7, L8 a L10). Zajímavým úkazem je evidentní dominance readů představující skupinu *Chloromyxum s.l.*, jež byla ve vysoké míře zastoupena v obou typech vzorků – v sedimentu převažovala na L3 a L5, ve vodě na L2, L3 a L12. Odfiltrování nálezů ze sedimentu zároveň odhalilo výskyt *Myxidium lieberkuehni* clade v pěti lokalitách (nejvíce v L11 a L12). Urinary clade (s největším zachytem v L4) a skupina Malacosporea byly detekovány pouze v sedimentu.



**Obrázek 13:** Srovnání procentuálního zastoupení (abundance) počtu readů jednotlivých skupiny Myxozoa v datasetu: a) sjednocená data ze všech vzorků (zahrnující sediment a vodu); b) abundance readů ze sedimentu; c) abundance readů z vody. Na ose x jsou rozděleny lokality napříč celou řekou, černá svislá čára mezi L11 a L12 představuje hranici mezi horním a dolním tokem. Osa y vyjadřuje procentuální zastoupení z celkového počtu readů na lokalitě. Barevné odlišení sloupců odpovídá konkrétní skupině myxozoi.

### 5.4.3 Na úrovni počtu záchytů napříč lokalitami

Zajímavé výsledky ukázalo také srovnání počtu záchytů konkrétních OTUs napříč celou řekou Malší (**Obr. 14**). Ukázalo se, že několik OTUs bylo zachyceno na všech patnácti lokalitách sběru. Jednalo se o Contig\_4, který jako jediný klastroval do samostatné větve v rámci skupiny *Chloromyxum s.l.* Contig\_31, který byl nejbližší *Chloromyxum truttae* (AJ581916), byl zachycen na všech lokalitách vyjma L8. Oproti tomu zbylá dvě OTU ze skupiny *Chloromyxum s.l.* byla zachycena pouze na dvou lokalitách. Na všech lokalitách byl také detekován Contig\_2, který klastroval do skupiny rybomerek infikujících močový měchýř (Urinary clade). Ostatní OTUs z této skupiny byla zachycena pouze ojedinele na řece od lokality 7 a výše. Z toho Contig\_21 byl jako jediný zachycen pouze na dolním toku (L13 a L14). Ze skupiny *Myxobolus* byla na všech sběrných lokalitách zachycena pouze dvě OTUs – Contig\_1 a Contig\_3 z podskupiny *Myxobolus* VII Zbylá OTUs z této nejzastoupenější a nejrozmanitější skupiny této práce byla s odlišnostmi ve frekvenci výskytu různě rozprostřena podél celého toku řeku – *Myxobolus* subclade V měl největší množství záchytů v lokalitách horního toku (24 z 26 záchytů). U nejrozmanitější podskupiny VIII stojí za zmínku například Otu28\_ENV15\_1 shodné s dříve popsáním *M. dispar* (AF507972), jež byl detekován na jediné lokalitě (L12). Dvě OTUs (Otu377\_ENV11\_1, Otu356\_ENV11\_1) příbuzné s *M. tauricus* (JQ388896) byla zase zachycena pouze v lokalitě č. 14. U ostatních OTUs nebyl pozorován viditelný vzorec ve výskytu. Záchytnost další hojně pozorované skupiny *Paramyxidium* rostla s proudem řeky. Výjimkou bylo pouze Otu312\_ENV12\_1 shodné s *Echinactinomyxon* sp. (AJ582000), které bylo zachyceno pouze u počátku řeky na L1 a L2. Nejčastějším nálezem *Paramyxidium* clade byl Contig\_9, který se vyskytoval na všech lokalitách vyjma L4, L12 a L15. Z méně časté skupiny *M. lieberkuehni* byl nejčastěji zachycen Contig\_39 a to na 5 různých lokalitách, konkrétně se jednalo o L6, L8, L10, L11 a L12. Vyjma Otu29\_ENV15\_1 a Otu11\_ENV15\_1, které byla jako jediná detekována na L1, byla všechna OTUs z této skupiny zachycena na lokalitách v rozmezí L5 až L12. Odlišnosti byly pozorovány také u nálezů malakosporeí. Contig\_37, který klastroval do skupiny s dříve popsáním druhem *Buddenbrockia plumatellae* (MT002358), se podařilo zachytit na dolní části řeky (L10, L11 a L14), kdežto druhé OTU z této skupiny (Otu215\_ENV11\_1) bylo identifikováno pouze na lokalitě č. 5.



**Obrázek 14:** Počet záchytů OTUs na jednotlivých lokalitách. Barevné odlišení odpovídá fylogenetickým skupinám myxozoi.

#### 5.4.4 Srovnání proměnlivosti na základě sezonality

Další sledovanou proměnou byla změna v zastoupení skupin myxozoi v závislosti na ročním období, kdy byl proveden sběr vzorků. **Tabulka 8** shrnuje počet detekovaných OTUs v jednotlivých sběrech vody a sedimentu. Procentuální zastoupení záchytů jednotlivých skupin (založené na počtu OTU) a abundanci založenou na počtech readů byly srovnáno u sedimentu (**Obr. 15**) a vody (**Obr. 16**).

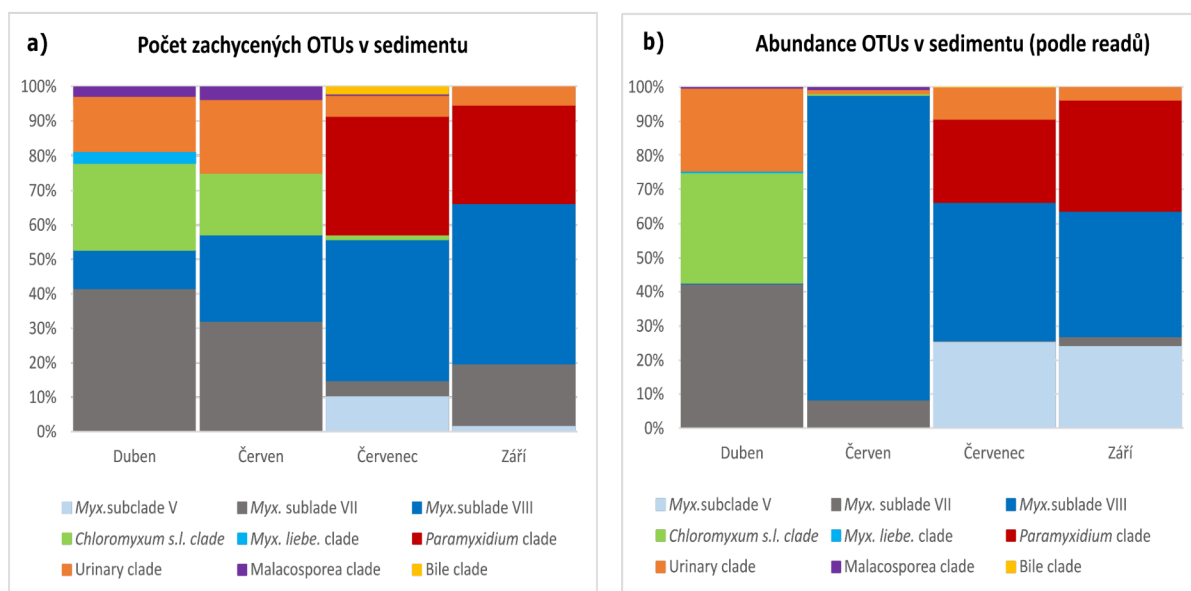
**Tabulka 8:** Souhrn počtu OTUs detekovaného z vody a sedimentu a dále pouze z vody.

Sběr	Počet OTUs (s+v*)	Počet OTUs (s*)	Počet OTUs (v*)
VII. 2020	103	103	0
IX. 2020	38	26	17
IV. 2021	20	8	11
VI. 2021	13	10	6

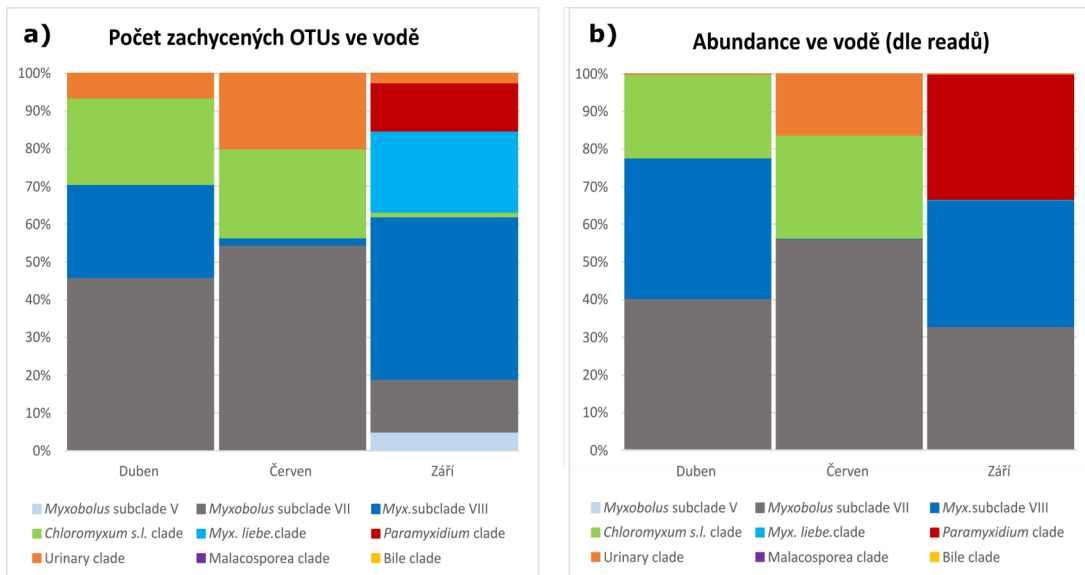
**Vysvětlivky:** \* typ vzorku, ze kterého byla OTUs detekována: „s\*“= sediment; „v\*“=voda; „s+v\*“=sediment a voda.

Analýza vzorků sedimentu (graf na **Obr. 15**) ukázala nejvyšší procentuální zastoupení *Myxobolus* subclade VII v dubnu. Oproti tomu v červnu a červenci rostla prevalence *Myxobolus* subclade VIII, zejména s přihlédnutím na dominanci v počtu readů v červnu. Na začátku léta (v dubnu a v červnu) byla zaznamenána majorita OTUs ze skupiny *Chloromyxum sensu latu* a Malacosporea. *Paramyxidium* clade a *Myxobolus* subclade V byly naopak zachyceny pouze ze vzorků z konce letní sezóny (z července a září). Urinary clade byl zachycen napříč vzorkování s relativně podobnou mírou výskytů.

Analýza vzorků vody (graf na **Obr. 16**) ukázala obdobné vzorce výskytu jako u sedimentu u několika skupin: i) *Myxobolus* subclade VII dominoval v dubnu a červnu, ii) počet OTUs i abundance *Myxobolus* subclade VIII v září signifikantně vzrostla, iii) *Chloromyxum sensu latu* clade bylo pozorováno na začátku léta, iv) Urinary clade byl také zaznamenán více v dubnu a červnu v) výskyt *Paramyxidium* clade byl detekován na konci léta (vzorky vody z července bohužel chybí). Zásadní rozdíl byl pozorován u skupiny *Myxidium lieberkuehni* clade. Ačkoliv byla abundance evidentně utlačena ostatními skupinami, v září byl zaznamenán vůbec největší počet detekovaných OTUs. Ve srovnání s nálezy v sedimentu, ve kterém byl výskyt potvrzen pouze v dubnu, je zde viditelný rozdíl.



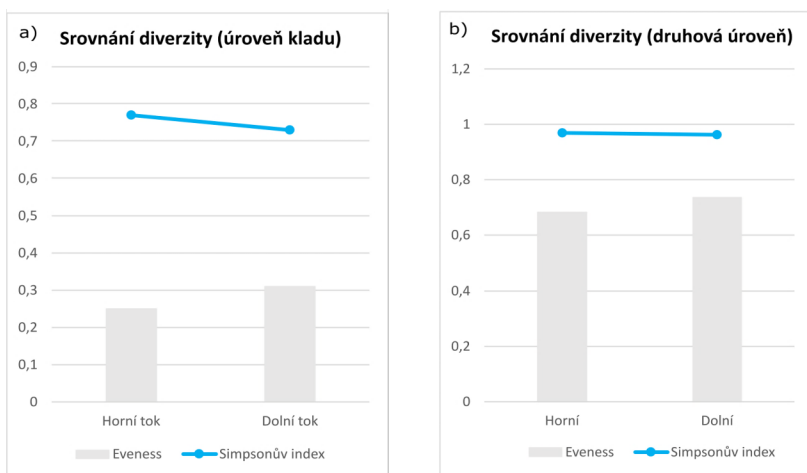
**Obrázek 15:** Srovnání nálezů myxozoích OTUs v sedimentu v závislosti na měsíci sběru: a) graf odpovídá počtu záchytů; b) graf odpovídá množství readů daných skupin v sedimentu mezi sezónami. Barevné odlišení odpovídá fylogenetickým skupinám myxozoi.



**Obrázek 16:** Srovnání nálezů myxozoích OTUs ve vodě v závislosti na měsíci sběru: a) graf odpovídá počtu záchytů; b) graf odpovídá množství readů daných skupin ve vodě mezi sezónami. Barevné odlišení odpovídá fylogenetickým skupinám myxozoí.

#### 5.4.5 Biostatistické srovnání biodiverzity

Rozdíl proměnlivosti na horním a dolním toku řeky byl srovnán na úrovni skupin a podskupin Myxozoa, dále také na druhové úrovni (tedy na základě zastoupení jednotlivých OTUs). Pro srovnání vyváženosti populace myxozoí na horním a dolním toku byl použit Simpsonův index ( $D$ ) a dále byla porovnána Eveness ( $E$ ), udávající rozložení skupin a druhů v lokalitě. Na základě vypočítaných hodnot pro horní a dolní tok byl vytvořen kombinovaný graf, zahrnující hodnoty pro obě hodnoty (**Obr. 17**). Při srovnání biodiverzity na úrovni skupin byl zaznamenán pouze lehký rozdíl mezi částmi toku. Na horním toku byl pozorován vyšší Simpsonův index ( $D = 0,77$ ) v porovnání s dolním tokem ( $D = 0,73$ ). Hodnota Eveness oproti tomu vyšla vyšší na dolním toku, kde byla  $E = 0,31$ , v porovnání s nižší hodnotou na horním toku ( $E = 0,25$ ). Nejedná se však o výrazné rozdíly v diverzitě. Relativně nízká hodnota Eveness, která vypovídá o relativně nízké rozmanitosti na lokalitách, zároveň koreluje s evidentní převahou skupin *Myxobolus* subclade VIII a *Paramyxidium*, což vyplývá i z výše uvedených výsledků. Výsledné hodnoty získané na druhové úrovni neukázaly téměř žádný rozdíl mezi horním ( $D = 0,97$ ,  $E = 0,63$ ) a dolním tokem ( $D = 0,96$ ,  $E = 0,74$ ) (viz **Obr. 17b**).



**Obrázek 17:** Srovnání indexů diverzity na horním a dolním toku a) na úrovni kladu (podle počtu různých OTUs v jednotlivých skupinách); b) na druhové úrovni (podle počtu všech OTUs dohromady). Spojnicový graf představuje hodnoty pro Simpsonův index (D) a sloupcový pro hodnoty Eveness (E).

Pro porovnání proměnlivosti rybamerek na horním a dolním toku byly dále použity statistické testy. Vzhledem k tomu, že data nebyla v normálním rozložení, byl použit Wilcoxonův párový test. Tímto způsobem byla testována rozdílnost diverzity jak na úrovni skupinového zastoupení myxozoi, tak také na úrovni druhové (tedy srovnáním diverzity jednotlivých OTUs). V prvním případě byla zamítnuta nulová hypotéza  $H_0$  s hodnotami ( $W_{stats}=3$ ,  $W_{critical}=6$ ) (viz **Tab. 9a**), což statisticky podporuje výše popsané indexy biodiverzity (**Obr. 17a**). V druhém případě, kdy byla porovnávána proměnlivost na úrovni kladu, nebylo možné zamítnout nulovou hypotézu (viz **Tab. 9b**) a nebyl tak zaznamenán signifikantní rozdíl v druhové rozmanitosti myxozoi na horním a dolním toku, což odpovídá blízkým indexům diverzity na obou lokalitách (**Obr. 17b**).

**Tabulka 9:** Výsledné hodnoty Wilcoxonova párového testu pro odlišnou proměnlivost a) na úrovni jednotlivých druhů; b) pro odlišnou proměnlivost na úrovni skupin.

<b>a)</b>		<b>b)</b>	
Sum-Hodnoty	3	Sum-Hodnoty	1898
Sum+Hodnoty	39	Sum+Hodnoty	7147
N (n)	9	N (n)	138
<b>W_stats</b>	<b>3</b>	<b>W_stats</b>	<b>1898</b>
<b>W_critical</b>	<b>6</b>	<b>W_critical</b>	<b>206</b>
Null_hyp	zamítám	Null_hyp	nezamítám

Vysvětlivky: „W\_stats“ = hodnota testové statistiky; „W\_critical“ = kritická hodnota testové statistiky.



## 6 Diskuze

Přestože se řada vědeckých týmů zabývá výzkumem myxozoi, stále existuje mnoho neznámých aspektů týkajících se jejich rozmanitosti (Bartošová-Sojková et al. 2014; Hartikainen et al. 2016; Okamura et al. 2018). S ohledem na skutečnost, že Myxozoa představují značně komplexní skupinu parazitů s vysokým počtem kryptických druhů (např. Bartošová & Fiala 2011), klíčem k pochopení jejich druhové diverzity je sledování molekulárních znaků (např. Lisnerová et al. 2020; Vieira et al. 2022). V této práci jsem se s využitím moderních molekulárních metod, založených na identifikaci organismů pomocí eDNA, snažila prohloubit naše chápání této problematiky. Získané výsledky dokazují, že detekce parazitární eDNA je velmi efektivní metoda pro popis biodiverzity myxozoi, a to nejen bez potřeby odchyty, ale dokonce bez znalosti potenciálních hostitelů. Tato vlastnost je klíčovou výhodou pro výzkum myxozoi v prostředí, vzhledem k tomu, že podrobné životní strategie většiny druhů jsou stále neobjasněné (Kent et al. 2001; Eszterbauer et al. 2015).

Na základě dostupné literatury lze konstatovat, že výzkum parazitů v prostředí na základě detekce eDNA se dosud nachází v rané fázi vývoje (Bass et al. 2023). S ohledem na studium myxozoi jsou dostupné zdroje ještě více omezené. Jednou z prvních studií, která se zabývá použitím eDNA k popisu výskytu ryboborek v ekosystému, je již dříve zmíněná práce Hartikainen a kolegů (2016). Mezi novějšími články lze zmínit využití eDNA ke zjištění konkrétních druhů *Tetracapsuloides bryosalmonae* na norských jezerech (Oredalen et al. 2022) či *Kudoa thyrsites* (Marshall et al. 2022). Postupy, které byly aplikované v této práci, vychází ze studie provedené Lisnerovou a jejími kolegy publikované v roce 2023. Moje práce je tedy jednou z prvních studií, ve které jsou využívány metody založené na eDNA na popis celkové rozmanitosti skupiny Myxozoa na širokém území, a to konkrétně na řece Malši. Výzkum zahrnoval analýzu vzorků vody a sedimentu z 15 různých lokalit vyskytujících se po celé délce této jihočeské řeky. Hlavním cílem této práce bylo analyzovat diverzitu myxozoi na úrovni kladů a druhů (představených ve formě operativních taxonomických jednotek, dále jen OTU). Důraz byl také kladen na rozdíly mezi zastoupením v horním a dolním toku. Výsledky této práce poukazují na velký potenciál této metody nejen v rámci parazitologie, ale také v dalších vědních disciplínách, které se zabývají biomonitoringem.

## 6.1 Detekce myxozoi na základě eDNA

V rámci této diplomové práce bylo shromážděn a analyzováno rozsáhlé množství environmentálního materiálu, konkrétně vody a sedimentu, ze čtyř sběrů v průběhu dvou sezón. Díky velkému počtu lokalit a jejich rozmístění podél toku řeky jsme byli schopni získat podrobný obraz o rozložení společenství myxozoi v řece Malší. Překvapivě vysoká míra biodiverzity myxozoi, byla v souladu s dříve popsanou proměnlivostí rybomerek na území Velké Británie ve studii od Hartikainen a kolegů (2016). Význam v popisu rozmanitosti rybomerek nespočívá pouze ve vytvoření ucelenějšího obrazu o jejich výskytu na našem území. Parazité mohou být rovněž vnímány jako indikátory stability ekosystému, míra jejich rozmanitosti tedy může odrážet kvalitu studovaného prostředí (Dzikowski et al. 2003; Hudson et al. 2006).

Z celkového počtu nalezených OTU odpovídajícím myxozoiím, byla převážná většina detekována ze sedimentu (93 %). Z vody pocházelo pouze 21 % OTUs a 13 % bylo detekováno v obou typech vzorků. Důvodů k této značné odlišnosti v typech vzorků může být hned několik. V první řadě, odolné a těžké spory v průběhu času sedimentují na dno, kde dochází k jejich akumulaci (McConnell & Cone 1992), což zvyšuje šanci na jejich záchyt. Oproti tomu voda, jakožto zdroj pro stanovení myxozoi v prostředí, je větší měrou ovlivněna sezónní aktivitou parazitů, respektive jejich životním cyklem, kdy předpokládáme zejména výskyt vznášejících se aktinospor ve vodním sloupci. Předpokládaná životnost aktinospor je velmi krátká v řádech několika dnů (Markiw 1992; Yokoyama et al. 1993; Xiao & Desser 2000), proto je nejspíš záchyt myxozoi ve vodě nižší a odráží aktuální nebezpečí pro své hostitele (ryby) (např. Alama-Bermejo et al. 2013). Může se ale i projevit do určité míry fakt, že ve srovnání se sedimentem bylo laboratorní zpracování vzorků vody značně obtížnější. Zejména vzorky vody z lokalit z dolních částí řeky, které obsahovaly obrovské množství nežádoucích organismů, především řas a sinic, a také částic sedimentu z říčního dna. Tento jev, poukazující na špatný stav řeky, vedl k častému zanášení filtrů, což mohlo ve výsledku negativně ovlivnit naši schopnost detekce myxozoi. Je též možné, že objem zpracovaného materiálu v množství 1,5 litru na lokalitu je nedostatečný pro detekci myxozoi v daném prostředí (to však platí i o vzorcích sedimentu). Do dnešní doby bohužel není stanovené, kolik materiálu je potřeba k potvrzení organismu v prostředí analýzou eDNA. V otázce potřebného množství materiálu ve své práci diskutují Hartikainen et al. (2016), kde uvádějí doporučenou hodnotu 5-20 litrů materiálu.

S ohledem na průběh řeky bylo detekováno více OTU na horním toku (celkem 108 OTUs) ve srovnání s dolním tokem (celkem 67 OTUs), z nichž pouze 39 bylo nalezeno na obou částech toku. Vyjma charakterem řeky, může být tento rozdíl způsoben také nevyrovnaným počtem sběrných lokalit na obou částech toku (11 lokalit na horním toku a pouze 4 na dolním toku, které navíc nebyly součástí všech sběrů). Důvodem nerovnoměrného rozdělení toku je vodní nádrž Římov, která výrazně ovlivňuje charakter řeky. Z výsledků dále vyplývá, že výskyt jednotlivých skupin myxozoi v prostředí je značnou měrou ovlivněn ročním obdobím vzorkování. To koreluje s výsledky práce Holzer a kolegů (2006), kteří potvrzují vliv sezonality na odlišnosti v abundanci různých druhů myxozoi u svého mezipřijímatelce. Skutečnost, že v mírném pásu je výskyt myxozoi ovlivněn zvýšenou teplotou vody v letních měsících je diskutována v několika dalších studiích (např. Okamura et al. 2011; Oredalen et al. 2022).

## 6.2 Fylogenetická analýza

Fylogenetické zařazení získaných OTUs naznačuje, že se podařilo odhalit širokou taxonomickou rozmanitost myxozoi. První analýza byla provedena pro skupinu *Myxobolus* clade – nejvíce zastoupenou skupinu myxozoi. Vzhledem k tomu, že *Myxobolus* je celkově nejrozmanitějším rodem v rámci rybomerek, není tento nález příliš překvapivý (Eiras et al. 2014; Liu et al. 2019). Celkově byla zjištěna výrazná převaha podskupiny *Myxobolus* subclade VIII, do které připadlo celkem 54 OTUs. Tento výsledek byl opět očekávaný, neboť tato podskupina je dobře známá pro své rozsáhlé hostitelské spektrum, což zahrnuje zejména ryby z čeledi kaprovitých (Molnár et al. 2003; Cech et al. 2012; Liu et al. 2019). Podle výsledků ichtyologického výzkumu prováděného Matěnovou a Matěnou (2004b) je patrné, že kaprovité ryby jsou na Malši hojně zastoupené. Klastrování 14 různých OTUs dále odhalilo velké zastoupení druhů příbuzných *M. pseudodispar*. *M. pseudodispar* (Gorbunova 1936) představuje ve skutečnosti komplex druhů s parafyletickým charakterem a obrovskou vnitrodruhovou diverzitou (Forró a Eszterbauer 2016; Lisnerová et al. 2020). Zbylé dvě podskupiny byly výrazně méně zastoupeny. Do *Myxobolus* subclade VII klastrovalo 11 OTUs. Tato druhá největší podskupina rodu *Myxobolus* zahrnuje polyfyletický rod *Henneguya*. K podskupině *Myxobolus* clade V se přiřadilo pouze 8 OTUs. *Myxobolus* subclade V navíc zahrnuje druhy s vysokou afinitou k nervové soustavě, převážně u lososovitých ryb (Liu et al.

2019). Tři zjištěná OTU klastrují velmi blízce k *Myxobolus neurobius*, druhu popsaného z mozku pstruhů, kteří se běžně na Malši vyskytují.

98 % získaných OTUs se neshodovalo s žádnými dříve popsanými sekvencemi. Nejunikátnější je Contig\_7, který se vyznačuje jako jediný tím, že vytvořil úplně samostatnou větev, což by mohlo nasvědčovat objevu nové fylogenetické linie v rámci *Myxobolus* clade. Ostatní nálezy se sekvencí odlišnou od známých z GenBank mohou poukazovat na detekci nových druhů. Bez přítomnosti morfologického záznamu však bohužel nelze tuto hypotézu potvrdit a také existuje řada popsaných druhů zatím bez známé SSU rDNA sekvence.

Výsledný fylogenetický strom pro ostatní taxony sladkovodních myxozoí rozdělil nalezené OTUs do šesti skupin, z nichž největší skupinou byl *Paramyxidium* clade s 35 OTUs. Tato skupina, též známá jako „Environmental clade“, má jen málo známé životní cykly, jen několik zástupců známých z úhořů, a byla hlavně popsána u definitivních hostitelů, tj. kroužkovců (Hartikainen et al. 2016; Freeman et al. 2018). Na základě výsledků práce Freeman a kolegů (2018), kteří v úhořích našli myxidii podobné parazity, pro které následně vytvořili nový rod *Paramyxidium*, lze předpokládat, že námi nalezené OTUs klastrující v rámci *Paramyxidium* clade jsou paraziti úhořů. Podle údajů Mezinárodního svazu ochrany přírody úhoř říční patří mezi kriticky ohrožené druhy (IUCN Red List 2018: 10). Důvodem jsou zejména úpravy toků na většině evropských řek, které úhořům znemožňují migrovat do moře a dokončit tak jejich životní cyklus (Liangming et al. 2007). Ačkoliv je záznamů o výskytu úhoří na Malši jen velmi málo, jejich přítomnost na řece Stropnici potvrzuje například monitoring Matěnové a Matěny (2004b). Navíc v roce 2018 byl úhoř říční vysazován do jihočeských řek v rámci projektu udržitelného rozvoje rybních společenstev (Jihočeský územní svaz ČRS 2018: 11).

Pozoruhodný úkaz byl sledován také u skupiny *Myxidium lieberkuehni* clade, do které celkem připadlo 8 OTUs s převážnou detekcí ze vzorků vody (71 %). Náš nález téměř přesně odpovídá dosud nepublikovaným výsledkům naší laboratoře, kdy při důkladném vyšetřování a molekulárně fylogenetické analýze myxidii z močáku štiky bylo nalezeno sedm samostatných druhů tvořící *M. lieberkuehni* komplex. V současné době je jediný potvrzený mezihostitel *M. lieberkuehni* štika obecná (*Esox lucius*) (Lom et al. 1989). Kyslík a kolegové (2022) ve své studii sledovali změnu exprese a lokalizace minikolagenů, jež jsou důležité pro správný vývoj nematocysty, která je součástí spor. Z jejich výsledků je patné, že sporogonie v mezihostiteli (tedy ve štice) terminuje v dubnu, kdy byly u štik nacházeny

zformované spory v močovém měchýři. Po zrání, které pravděpodobně končí v květnu, dochází k jejich uvolnění do prostředí, kde dochází k infekci definitivního hostitele (kroužkovce), ve kterém probíhá aktinosporeová fáze (Wolf & Markiw 1984). Obvykle je tato fáze relativně krátká, Kyslík a kolegové (2022) proto předpokládají, že koncem července by měla být již dokončena. S přihlédnutím na sezonalitu nálezu *M. lieberkuehni* v této práci bylo nejvíce OTUs zachyceno ve vodě ze zářijového sběru je zde možnost zvýšené proliferace a uvolnění aktinospor z kroužkovců do prostředí právě v tomto období. To by potvrzovaly i výsledky výzkumu zaměřeného na *M. lieberkuehni* v naší laboratoři, při kterém byl pozorován počátek infekce u ryb v podzimních měsících s netypickým vývojem nákazy u ryb během zimy. Důvodem relativně pozdního záchytu v porovnání s Kyslíkem a kol. (2022) může být odlišná dynamika našeho říčního ekosystému ve srovnání s jejich limnologickým habitatem.

Malacospora clade, který má jako definitivního hostitele mechovky (Bryozoa), byl zachycen pouze ve dvou různých OTUs. Jeden nález odpovídal druhu *Buddenbrockia plumatellae*. Ačkoliv platí, že druhová početnost malakosporeí je velmi nízká, vyskytují se u širokého spektra hostitelů (Bartošová-Sojková et al. 2014). Jejich definitivní hostitelé, mechovky, jsou zároveň relativně běžní bezobratlí sladkých vod (jejich populace na Malši ale není známá) (Massard & Geimer 2008). Výše zmíněné skutečnosti jsou v rozporu s velmi malou abundancí této skupiny na řece Malši. Faktor, který by mohl vysvětlit malou prevalenci malakosporeí sledovanou v této práci, může být snížená odolnost jejich vnějších stádií, a tím kratší perzistence ve studovaném prostředí (Canning et al. 1996; Okamura 1996).

### 6.3 Proměnlivost na řece Malši

Srovnání horního a dolního toku biostatistickými metodami neprokázalo žádný signifikantní rozdíl v druhové rozmanitosti (vyjádřené v této studii jako OTUs) na obou úsecích řeky. Pouze nepatrné rozdíly byly zaznamenány při sledování diverzity na úrovni skupin myxozoi. S přihlédnutím na výsledky detailního rozložení skupin napříč celou řekou, je evidentní převaha skupiny *Myxobolus* clade a dále také *Paramyxidium* clade. Tuto myšlenku dále podporuje výsledek Eveness na obou lokalitách, který byl na horním toku ( $E = 0,31$ ) a na dolním ( $E = 0,25$ ). Ačkoliv v případě Eveness byl pozorován větší rozdíl, ani v tomto případě se nejednalo o zásadní odlišnost, kterou by se obě části řeky zásadně lišily. Relativně nízké hodnoty Eveness, vypovídají o poměrně nízké rozmanitosti (na skupinové úrovni),

to koreluje s dominancí skupin *Myxobolus* clade a *Paramyxidium* clade. Zajímavé vzorce proměnlivosti myxozoi byly odhaleny až při detailnější analýze výsledků napříč všemi lokalitami na řece. Pro lepší pochopení problematiky byla diverzita myxozoi vyhodnocena na základě několika proměnných.

Při analýze výsledného grafu, který shrnuje počet detekovaných OTUs na jednotlivých lokalitách je patrný nárůst mezi lokalitami L6 až L11, kde začíná průnik řeky zastavěným územím. Zajímavá korelace je také pozorována na lokalitách, kterým předchází dva největší přítoky do Malše – řeka Černá a Stropnice. Na lokalitách, které jsou v těsné blízkosti těchto přítoků (L10 u řeky Černá, L13 u řeky Stropnice) byly naměřeny nejvyšší hodnoty zachycených OTUs (L10 = 59 OTUs, L13 = 49 OTUs). Tyto výsledky naznačují, že lidská aktivita v oblasti přítoků může zásadně ovlivnit diverzitu hostitelských druhů, a tedy i výskyt samotných parazitů. Oba přítoky do řeky Malše přináší vodu bohatou na živiny z okolních rybníků, následkem toho může docházet k eutrofizaci vody, což může mít zásadní vliv na místní ekosystém (Jarvie et al. 2008). Při hodnocení unikátnosti OTUs byl opět pozorován nejvyšší počet na lokalitách L7-L10 (v horním toku i v rámci celé řeky). Na dolním toku byla zajímavá situace na lokalitách L13 a L14, tedy v oblasti přítoku Stropnice, kde bylo zaznamenáno nejvyšší množství unikátních OTUs v celé řece.

S ohledem na počet detekovaných OTUs klasifikovaných do jednotlivých taxonů, na celkovou abundanci a množství záchytů se ukázalo, že nejvíce zastoupenou skupinou byl *Myxobolus* clade. Na úrovni podskupin byla většina nalezených OTUs ze skupiny *Myxobolus* subclade VIII. S výjimkou lokality č. 15 tato skupina převládala v celé studované oblasti. Nejvíce OTUs bylo detekováno na lokalitách L10, L13 a L14, což jsou opět lokality v těsné blízkosti přítoků řek Černé a Stropnice. V podskupině *Myxobolus* subclade VII bylo zaznamenáno nejvíce OTU na lokalitě L2, kde značně převažovala v porovnání s ostatními lokalitami. V ostatních lokalitách její početnost kolísala s výrazným zastoupením na lokalitách L7, L10 a dále po směru toku řeky. Nicméně, nejzajímavější objev přineslo rozložení abundance této skupiny, protože tato podskupina evidentně dominovala ve většině vzorků vody. S přihlédnutím na sezonalitu je zřejmé, že nálezy pocházely nejvíce z počátku léta (duben, červen). Právě vodní prostředí nejlépe odráží fluktuaci a aktuální stav rozložení populace myxozoi na řece. Zda-li je příčinou aktivita mezihostitele či definitivního hostitele není možné ověřit vzhledem k nedostatku dostupné literatury, může to však být jeden z předpokladů. *Myxobolus* subclade V byl ve srovnání s ostatními podskupinami *Myxobolus* zastoupen výrazně méně. Ovšem s přihlédnutím na abundanci byla zaznamenána převaha

readů v sedimentu z L2, která je součástí oblasti Horní Malše. Tato oblast je bohatá na přirozený výskyt pstruha obecného, jež může být mezipřijímcem této skupiny.

Od oblasti poblíž L5 a L6 je pozorovaný růst v počtu zachycených OTUs a abundance *Paramyxidium* clade. S ohledem na charakter řeky lze pozorovat, že lokalita vlastnostmi připomíná dolní tok, který je jinak definován od v. n. Římov. S rozšířením toku se zpomaluje jeho rychlost, což může vést k vyšší akumulaci sedimentu. Zároveň se již nejedná o chráněnou oblast a na řece se začínají objevovat jezy. Tento habitat může poskytovat příznivější podmínky pro výskyt větší diverzity kroužkovců, kteří jsou nezbytní pro úplné dokončení životního cyklu myxozoi (Srovátka et al. 2009). Kontinuum výskytu skupiny *Paramyxidium* napříč lokalitami přerušuje úplná absence na místě sběru na lokalitě č. 12, která se nachází za nádrží Římov. Podobně jako u mnoha evropských řek, je tok Malše regulován, což může zásadně ovlivňovat lokální biodiverzitu (De Leeuw et al. 2005; Jansson 2006). Římov, jakožto fyzická bariéra, ovlivňuje distribuci hostitelů, a tedy i samotných myxozoi, vlivem fragmentace prostředí (Kitanishi et al. 2012; Wu et al. 2019). Zásahy do režimu říčního toku, obecně negativně ovlivňují kvalitu vody, její fyzikálně-chemické parametry a dostupnost potravy v lokalitách níže po proudu (De Leeuw et al. 2005; Smolar-Žvanut & Matjaž Mikoš 2014). Tyto faktory mohou být příčinou celkově relativně nízké pozorované diverzity na lokalitě č. 12.

Ze skupiny *Chloromyxum s. l.* clade byla sice detekována pouze 4 OTUs, výskyt zástupců tohoto kladu byl zaznamenán na všech sledovaných lokalitách (Contig\_31). Pozoruhodné výsledky byly získány při srovnání abundance readů jednotlivých OTUs. Ty převládaly hned na několika sledovaných lokalitách, jak v sedimentu (L3, L5), tak ve vodě (L2, L3 a L12). Na základě analýzy sjednocených dat o abundanci byl zaznamenán patrný výskyt na území Horní Malše (L2-L5). Bohužel opět není dostatek dostupných studií na vyvození závěrů. S porovnáním abundance ve vodě v jednotlivých měsících se ukázalo, že nejvyšší relativní zastoupení této skupiny bylo zaznamenáno na začátku léta (v dubnu a červnu). To koreluje s výsledky Holzer a kol. (2006), kteří ve své práci potvrdili brzký výskyt *C. truttae* u pstruha obecného. Je tedy možné, že právě na začátku letního období dochází k uvolnění aktinospor, které byly pravděpodobně detekované.

Ač byla zaznamenána jen velmi nízká abundance skupiny Urinary clade, Contig\_2, který byl zachycen na všech studovaných lokalitách napovídá o jejich nezanedbatelném zastoupení napříč celou řekou. Dosud známé rybomorky z této skupiny byly popsány u celé

řady mezihostitelských druhů včetně kaprovitých ryb (např. Molnár et al. 1989). Výsledná relativně malá abundance se může zdát překvapivá, ale vzhledem k procentuálnímu porovnání to může být vysvětleno výraznou převahou jiných skupin Myxozoa (zejména dominancí *Myxobolus clade*).

Převážná část OTUs ze skupiny *Myxidium lieberkuehni clade* byla zachycena ve vodě mezi lokalitami L5-L12 a jedním OTU na L1. Nejvyšší procentuální zastoupení bylo zaznamenáno v lokalitách u Římova (L11 a L12). Jak již bylo zmíněné výše, *M. lieberkuehni* bylo zatím popsáno pouze štik, jejichž výskyt je na Římově potvrzen a vysoká abundance v okolí nádrže může být způsobená únikem těchto dravců do okolí (Lom et al. 1989; Tesfaye et al. 2022).

Zajímavým zjištěním byl výskyt Bile clade pouze v dolním toku řeky, a to v L13 a L14, kde se vyskytoval s poměrně velkou abundancí. Důvodem může být přítok řeky Stropnice, která je napojená na rybníky v oblasti Trhosvinenska, což může negativně ovlivňovat kvalitu vody v řece. Rod *Raabeia* se kterou nalezená OTUs blízce klastrovala se vyskytuje u nitěnky obecné. Nitěnky obecné jsou známé svojí tolerancí ke znečištěné vodě a mohou tedy prosperovat i v oblastech zasažených lidskou aktivitou, což je může zvýhodňovat před citlivějšími bezobratlými (Chapman et al. 1982; Lucan-Bouché et al. 1999; Smith 2001)

#### 6.4 Shrnutí a nové směry dalšího výzkumu

Tato práce představovala primární studii, která pojednávala o možném využití metod založených na eDNA v praxi, s cílem popsat rozmanitost skupiny Myxozoa na rozsáhlém území řeky Malše. Vzhledem k tomu, že se jedná o stále relativně novou metodu, je potřeba zohledňovat její limity a omezení. Stejně jako autoři Bass a kolegové (2023) souhlasím s tím, že je potřeba standardizovat metodiku sběru pro jednotlivé matrice, jako je voda, sediment a další, což dosud chybí. Tento krok by umožnil vzájemné srovnávání výsledků mezi různými studii. Stále také chybí poznatky o tom, jaké množství materiálu je adekvátní na spolehlivé stanovení rozmanitosti organismů v prostředí bez jejího podhodnocení. Navíc ze samotné podstaty této metody není možné určit patogenезi parazitů u hostitele. Pro úplnější popis tkáňové lokalizace, věkové preference a dalších faktorů je nutné zachovat tradiční parazitologické metody, jako jsou odchyt hostitele a pitva. Nicméně tato metoda může být



využita jako preventivní mechanismus u druhů, u kterých byla patogeneze již podrobně studována (Oredalen et al. 2022; Bohara et al. 2022; Bass et al. 2023).

Výzkum provedený v této práci měl poměrně široký záběr a otevřel celou řadu otázek, které by mohly být v budoucnu hlouběji prozkoumány. Příští výzkum tedy doporučuji zaměřit na užší oblast s přihlédnutím na co nejvíce možných parametrů, které ovlivňují biodiverzitu myxozoi v daném habitatu. Obrovský potenciál této metody vidím, zejména v tom, že nám může pomoci objasnit dosud málo popsané životní cykly myxozoi. Tato znalost by nám mohla lépe objasnit vzorce distribuce a důvody proměnlivosti na řece Malši a podpořit tak naše spekulace. V budoucnu bych například doporučila zaměřit se na oblast s vysokým výskytem *Paramyxidium* clade spolu s použitím primerů na popis populace potenciálních definitivních hostitelů, případně také s vyšetřením vzorků trusu různých rybožravých zvířat. Jak naznačují výsledky práce Hartikainen a kolegů (2016), odhalení možných paratenických hostitelů by mohlo vést k lepšímu pochopení nejasného životního cyklu, a také mechanismům distribuce této záhadné skupiny.

Výsledky ukázaly sezónní odlišnosti v abundanci různých skupin, což přináší zajímavé poznatky. Určitě by stálo za to, zkusit se zaměřit výzkum na jednu konkrétně skupinu (např. *Chloromyxum sensu lato* clade, *Myxidium lieberkuehni* clade). Použití kvantitativní PCR, více násobné opakování vzorkování vody a aditivní sledování populace hostitelů a dalších faktorů (např. měření teploty vody) na dané lokalitě by mohlo více objasnit sezonalitu těchto skupin. S ohledem na zajímavé nálezy na lokalitách poblíž přítoků řeky Černé a Stropnice by se mohlo být užitečné prozkoumat diverzitu myxozoi v rybnících napojených na Malši, abychom lépe porozuměli, do jaké míry ovlivňují rozložení populace myxozoi v řece. Existuje mnoho dalších témat, která by byla vhodná pro další výzkum, a já věřím, že budou dále rozvíjena. Výše uvedené příklady jsou jen některými z nich.

## 7 Závěry

1. Analýza environmentální DNA z vody a sedimentu ukázala překvapivě vysokou diverzitu skupiny Myxozoa na řece Malší. V materiálu nasbíraném během dvou let se podařilo detekovat celkem 136 různých myxozoích OTUs.
2. Detekovaná OTUs byla fylogenetickou analýzou rozdělena do 6 kladů myxozoi. Z toho největší sledovaná diverzita byla zahrnuta ve skupině *Myxobolus*, ve kterém se OTUs dále dělila do 3 různých podskupin s největším zastoupením v *Myxobolus* subclade VIII.
3. Biostatistickou analýzou nebyly zjištěny signifikantní odlišnosti v diverzitě myxozoi mezi horním a dolním tokem řeky. Z detailnějšího srovnání jednotlivých lokalit se ukázalo, že větší vliv na rozložení myxozoi na řece má vliv urbanizace v oblasti toku řeky.
4. Výsledky ukázaly evidentní vliv lidské aktivity na rozložení myxozoi v prostředí, což potenciálně odráží hostitelské spektrum na řece. Jako nejzásadnější faktory se ukázaly přítoky řek Černá a Stropnice, které řeku napojují na okolní soustavu rybníků. Zřejmý vliv na skladbu hostitelské populace má také vodní nádrž Římov.

## 8 Použité zdroje

### 8.1 Literatura

Adams, C.I.M., 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 (Basel)*, 10(3), 192. <https://doi.org/10.3390/genes10030192>

Alama-Bermejo, G., Šíma, R., Raga, J.A. & Holzer, A.S. (2013). Understanding myxozoan infection dynamics in the sea: seasonality and transmission of *Ceratomyxa punctazzi*. *International Journal for Parasitology*, 43(9):771-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.05.003>

Altizer, S., Ostfeld, R.S., Johnson, P.T., Kutz, S. & Harvell, C.D. (2013). Climate change and infectious diseases: from evidence to a predictive framework. *Science*, 341(6145), 514-519. <https://doi.org/10.1126/science.1239401>

Amarasiri, M., Furukawa, T., Nakajima, F. & Sei, K. (2021). Pathogens and disease vectors/hosts monitoring in aquatic environments: Potential of using eDNA/eRNA based approach. *Science of the Total Environment*, 796(148810). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148810>

Arndt, 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: Myxosporidia) species in South China Sea. *Journal of Fish Diseases*, 41, 663–672. <https://doi.org/10.1111/jfd.12766>

Aronesty, E. (2011). Ea-units: Command-line tools for processing biological sequencing data. Available from <http://code.google.com/p/ea-utils>.

Atkinson, S.D., Bartholomew, J.L. & Lotan, T. (2018). Myxozoans: Ancient metazoan parasites find a home in phylum Cnidaria. *Zoology (Jena)*, 129, 66-68. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.06.005>.

Baird, D.J. & Hajibabaei, M. (2012). Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 2039-2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05519.x>

Balian, E.V., Segers, H., Lévêque, C. & Martens, K. (2008). The freshwater animal diversity assessment: an overview of the results. *Hydrobiologia*, 595, 627-637. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9246-3>

Banchi, E., Ametrano, C.G., Tordoni, E., Stanković, D., Ongaro, S., Tretiach, M., Pallavicini, A., Muggia & L. ARPA Working Group. (2020). Environmental DNA assessment of airborne plant and fungal seasonal diversity. *Science of the Total Environment*, 738, 140249. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140249>

Barnes, M.A. & Turner, C.R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17, 1–17 <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>

Barnes, M.A., Turner, C.R., Jerde, C.L., Renshaw, M.A., Chadderton, W.L. & Lodge, D.M. (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1819-1827. <https://doi.org/10.1021/es404734p>

Barta, J.R., Martin, D.S., Liberator, P.A., Dashkevich, M., Anderson, J.W., Feighner, S.D., Elbrecht, A., Perkins-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. *Journal of Parasitology*, 83(2), 262-271. <https://doi.org/10.2307/3284453>

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(10), 1199-1207. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.01.008>

Bartošová, P. & Fiala, I. (2011). Molecular evidence for the existence of cryptic species assemblages of several myxosporeans (Myxozoa). *Parasitology Research*, 108(3), 573-583. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2100-y>

Bartošová-Sojtková, P., Hrabcová, M., Pecková, H., Patra, S., Kodádková, A., Jurajda, P., Tyml, T. & Holzer, A.S. (2014). Hidden diversity and evolutionary trends in malacosporean parasites (Cnidaria: Myxozoa) identified using molecular phylogenetics. *International Journal for Parasitology*, 44(8), 565-577. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.04.005>

Bass, D., Christison, K.W., Stentiford, G.D., Cook, L.S.J. & Hartikainen, H. (2023). Environmental DNA/RNA for pathogen and parasite detection, surveillance, and ecology. *Trends in Parasitology*, S1471-4922(22)00315-4. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2022.12.010>

Bass, D., Stentiford, G.D., Littlewood, D.T.J. & Hartikainen, H. (2015). Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology. *Trends in Parasitology*, 31(10), 499-513. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.013>

Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R. & Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 360(1462), 1935-1943. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1725>

Blažková, D., Böhm, B. & Černý, V. (1982). Jižní Čechy – Životní prostředí a jeho ochrana. *JčKNV*, České Budějovice, 224 pp.

Bohara, K., Yadav & A.K., Joshi, P. (2022). Detection of fish pathogens in freshwater aquaculture using eDNA methods. *Diversity*, 14(12):1015. <https://doi.org/10.3390/d14121015>

Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M.T., Carvalho, G.R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D.W. & de Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(6), 358-367. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>

Bordes, F. & Morand S. (2009). Parasite Diversity: An Overlooked Metric of Parasite Pressures? *Oikos*, 118(6), 801-806. JSTOR. <http://www.jstor.org/stable/40235389>

Brandt, M.I., Pradillon, F., Trouche, B., Henry, N., Liautard-Haag, C., Cambon-Bonavita M-A., Cuffe-Gauchard V., Wincker P., Belser C., Poulain J., Arnaud-Haond S. & Zeppilli D. (2021). Evaluating sediment and water sampling methods for the estimation of deep-sea biodiversity using environmental DNA. *Scientific Reports*, 11, 7856 <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86396-8>

Butchart, S.H., Walpole, M., Collen, B., van Strien, A., Scharlemann, J.P., Almond, R.E., Baillie, J.E., Bomhard, B., Brown, C., Bruno, J., Carpenter, K.E., Carr, Chanson, G.M., Chenery, J., Csirke, A.M., Davidson, J., Dentener, N.C., Foster, F., Galli, M., Galloway, A., Genovesi, J.N., Gregory, P., Hockings, R.D., Kapos, M., Lamarque, V., Leverington, J.F., Loh, F., McGeoch, J., McRae, M.A., Minasyan, L., Hernández A., Morcillo, M., Oldfield, T.E., Pauly, D., Quader, S., Revenga, C., Sauer, J.R., Skolnik, B., Spear, D., Stanwell-Smith, D., Stuart, S.N., Symes, A., Tierney, M., Tyrrell, T.D. & Vié, J.C. & Watson, R. (2010). Global biodiversity: indicators of recent declines. *Science*, 328(5982), 1164-1168. <https://doi.org/10.1126/science.1187512>

Bütschli, O. (1882). Myxosporidia. V: Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs. 1. Protozoa, Second Edition. C.F. Winter, Leipzig, 590-603 pp.

**Canning, E. U., Okamura, B. & Curry, A.** (1996). Development of a myxozoan parasite *Tetracapsula bryozoides* gen. n. et sp. n. in *Cristatella mucedo* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Folia Parasitologica (Praha)*, 43, 249-261. <https://doi.org/10.14411/fp.2008.032>

**Canning, E.U., Curry, A., Feist, S.W., Longshaw, M. & Okamura, B. A** (2000) New class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(5), 456-468. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00075.x>

**Cardinale, B.J., Duffy, J.E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., Venail, P., Narwani, A., Mace, G.M., Tilman, D., Wardle, D.A., Kinzig, A.P., Daily, G.C., Loreau, M., Grace, J.B., Larigauderie, A., Srivastava, D.S. & Naeem S.** (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486(7401), 59-67. <https://doi.org/10.1038/nature11148>

**Cartwright, P. & Collins, A.** (2007). Fossils and phylogenies: integrating multiple lines of evidence to investigate the origin of early major metazoan lineages, *Integrative and Comparative Biology*, 47(5), 744-751, <https://doi.org/10.1093/icb/icm071>

**Caruso, V., Song, X., Asquith, M. & Karstens, L.** (2019). Performance of microbiome sequence Inference methods in environments with varying biomass. *MSystems*, 4(1), e00163-18. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00163-18>

**Cech, G., Molnár, K. & Székely, C.** (2012). Molecular genetic studies on morphologically indistinguishable *Myxobolus* spp. infecting cyprinid fishes, with the description of three new species, *M. alvarezae* sp. nov., *M. sitjæ* sp. nov. and *M. eirasianus* sp. nov. *Acta Parasitologica*, 57(4), 354-66. doi: 10.2478/s11686-012-0045-2

**Cram, J.A., Gray, M.W., McFarland, K. & Hollins, A.** (2021). Microbiota of *Crassostrea virginica* larvae during a hatchery crash and under normal production: Amplicon sequence data. *Data Brief*, 40, 107755. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2021.107755>

**De Leeuw, J. J., Buijse, A. D., Grift, R. E. & Winter, H. V.** (2005). Management and monitoring of the return of riverine fish species following rehabilitation of Dutch rivers. *Archiv für Hydrobiologie*, 155, 391-411.

**Di Capua, I., Piredda, R., Mazzocchi, M.G. & Zingone, A.** (2021). Metazoan diversity and seasonality through eDNA metabarcoding at a Mediterranean long-term ecological research site. *ICES Journal of Marine Science*, 78(9), 3303-3316, <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsab059>

**Di Muri, C., Lawson Handley, L., Bean, C.W., Li, J., Peirson, G., Sellers, G.S., Walsh, K., Watson, H.W., Winfield, I.J. & Hänfling, B.** (2020). Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. *Metabarcoding and Metagenomics*, 4, e56959. <https://doi.org/10.3897/mbmg.4.56959>

**Díaz-Abad, L., Bacco-Mannina, N., Madeira, F.M., Neiva, J., Aires, T., Serrao, A.E., Regalla, A., Patrício, A.R. & Frade P.R.** (2022). eDNA metabarcoding for diet analyses of green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Marine Biology*, 169, 18. <https://doi.org/10.1007/s00227-021-04002-x>

**Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.H., Soto, D., Stiassny, M.L. & Sullivan, C.A.** (2005). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(2), 163-182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>

**Dzikowski, R., Paperna, I. & Diamant, A.** (2003). Use of fish parasite species richness indices in analyzing anthropogenically impacted coastal marine ecosystems. *Helgoland Marine Research*, 57, 220-227. <https://doi.org/10.1007/s10152-003-0138-2>

**Edgar, R.C.** (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26(19), 2460-2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C. & Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16),2194-2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>

Eichmiller, J.J., Best, S.E. & Sorensen, P.W. (2016). Effects of Temperature and Trophic State on Degradation of Environmental DNA in Lake Water. *Environmental Science & Technology*, 50(4), 1859-1867. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b0567>

Eiras, J.C., Zhang, J. & Molnár, K. (2014). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporidia, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Systematic Parasitology*, 88, 11-36. <https://doi.org/10.1007/s11230-014-9484-5>

El-Matbouli, M. & Hoffmann, R.W. (1998). Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex*. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 195-217. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(97\)00176-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(97)00176-8)

Espinoza, L.L., Mertins, O., Gama, G.S., Fernandes Patta, A.C.M. & Mathews, P.D. (2017). A new *Myxidium* species (Myxozoa: Myxosporidia) infecting the gallbladder of the turtle *Podocnemis unifilis* (Testudines: Podocnemididae) from Peruvian Amazon. *Acta Tropica*, 172, 75-79. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.04.021>

Eszterbauer, E., Atkinson, S., Diamant, A., Morris, D., El-Matbouli, M., & Hartikainen, H. (2015). Myxozoan life cycles: Practical approaches and insights. V knize: Okamura, A. Gruhl, & J. L. Bartholomew (Eds.). (2015). Myxozoan Evolution, *Ecology and Development*, 175-198 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14753-6\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14753-6_10)

Feist, S.W. & Bucke, D. (1993). Proliferative kidney disease in wild salmonids. *Fisheries Research*, 17(1-2), 51-58. [https://doi.org/10.1016/0165-7836\(93\)90006-S](https://doi.org/10.1016/0165-7836(93)90006-S)

Fiala I. (2006). The phylogeny of Myxosporidia (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal for Parasitology*, 36(14):1521-34. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.06.016>

Fiala, I., Bartošová-Sojková, P. & Whipps, C.M. (2015b). Classification and Phylogenetics of Myxozoa. V knize: Okamura, A. Gruhl, & J. L. Bartholomew (Eds.). (2015). Myxozoan Evolution, *Ecology and Development*, 85-110 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14753-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14753-6_5)

Fiala, I., Bartošová-Sojková, P., Okamura, B. & Hartikainen, H. (2015a). Adaptive Radiation and Evolution Within the Myxozoa. V knize: Okamura, A. Gruhl, & J. L. Bartholomew (Eds.). (2015). Myxozoan Evolution, *Ecology and Development*, 69-84 pp. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-14753-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-14753-6_4)

Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F. & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423-425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>

Foote, A.D., Thomsen, P.F., Sveegaard, S., Wahlberg, M., Kielgast, J., Kyhn, L.A., Salling, A.B., Galatius, A., Orlando, L. & Gilbert, M.T. (2012). Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS*, 7(8), e41781. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041781>

Forró, B. & Eszterbauer, E. (2016). Correlation between host specificity and genetic diversity for the muscle-dwelling fish parasite *Myxobolus pseudodispar*: examples of myxozoan host-shift? *Folia Parasitologica (Praha)*, 2(63), 2016.019. <https://doi:10.14411/fp.2016.019>

Freeman, M.A. & Kristmundsson Á. (2018). Studies of *Myxidium giardi* Cépède, 1906 infections in Icelandic eels identifies a genetically diverse clade of myxosporidians that represents the *Paramyxidium* n. g. (Myxosporidia: Myxidiidae). *Parasites & Vectors*, 11(1), 551. <https://doi:10.1186/s13071-018-3087-y>

**Furlan, E.M., Davis, J. & Duncan, R.P.** (2020). Identifying error and accurately interpreting environmental DNA metabarcoding results: A case study to detect vertebrates at arid zone waterholes. *Molecular Ecology Resources*, 20, 1259-1276. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13170>

**Giebner, H., Langen, K., Bourlat, S.J., Kukowka, S., Mayer, C., Astrin, J.J., Misof, B. & Fonseca, V.G.** (2020). Comparing diversity levels in environmental samples: DNA sequence capture and metabarcoding approaches using 18S and COI genes. *Molecular Ecology Resources*, 20, 1333-1345. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13201>

**Glassman, S.I. & Martiny, J.B.H.** (2018). Broadscale Ecological Patterns Are Robust to Use of Exact Sequence Variants versus Operational Taxonomic Units. *mSphere*, 3(4), e00148-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00148-18>

**Gomes, G.B., Hutson, K.S, Domingos, J.A., Chung, C., Hayward, S., Miller, T.L. & Jerry, D.R.** (2017). Use of environmental DNA (eDNA) and water quality data to predict protozoan parasites outbreaks in fish farms. *Aquaculture*, 479, 467-473. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.021>

**Gordon, A. & Hannon, G.** (2010). Fastx-toolkit. Available from URL: [http://hanno.nlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit](http://hanno.nlab.cshl.edu/fastx_toolkit)

**Gorgoglione, B., Kotob, M.H., Unfer, G. & El-Matbouli, M.** (2016). First Proliferative Kidney Disease outbreak in Austria, linking to the aetiology of Black Trout Syndrome threatening autochthonous trout populations. *Diseases of Aquatic Organisms*, 119(2), 117-128. <https://doi.org/10.3354/dao02993>

**Grassé, P.P.** (1970). Embranchement des Myxozoaires. V knize: Grassé, P.P., Poisson, R.A. & Tuzet, O. (Eds.), *Precis de Zoologie 1, Invertébrés. Second Edition*, Mason et Cie, Paris, 107-112 pp.

**Guo, X., Yan, M., Huang, D., Chen, S., Zhang, D., Li, Z., Yang, X. & Wu, W.** 48 (2023). A large scale 16S ribosomal RNA gene amplicon dataset of hand, foot and mouth patients and healthy individuals. *Scientific Data*, 10. <https://doi.org/10.1038/s41597-023-01953-2>

**Gupta, A. & Kaur, H.** (2016). Morphological and histopathological description of *Myxobolus adlardi* n. sp. (Cnidaria: Myxosporia: Myxozoa) infecting an indian major carp, *Labeo rohita* Hamilton, 1822 from A cold water wetland in Punjab (India). *Bulletin of Pure & Applied Sciences - Zoology*, 35a, 39. <https://doi.org/10.5958/2320-3188.2016.00009.7>

**Gupta, A. & Kaur, H.** (2018). *Myxobolus okamurae* sp. nov. (Myxosporia: Myxozoa) causing severe gill myxoboliosis in the cyprinid *Labeo bata* in a cold water wetland, Punjab (India). *Microbial Pathogenesis*, 115, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.041>

**Gyawali, P., Ahmed, W., Sidhu, J.P., Nery, S.V., Clements, A.C., Traub, R., McCarthy, J.S., Llewellyn, S., Jagals, P. & Toze, S.** (2016). Quantitative detection of viable helminth ova from raw wastewater, human feces, and environmental soil samples using novel PMA-qPCR methods. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(18), 18639-18648. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7039-9>

**Hartigan, A., Kosakyan, A., Pecková, H., Eszterbauer, E. & Holzer, A.S.** (2020). Transcriptome of *Sphaerospora molnari* (Cnidaria, Myxosporia) blood stages provides proteolytic arsenal as potential therapeutic targets against sphaerosporosis in common carp. *BMC Genomics*, 21(1), 404. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6705-y>

**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(12), 781-792. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2016.07.006>

- Hashizume, H., Sato, M., Sato, M.O., Ikeda, S., Yoonuan, T., Sanguankiat, S., Pongvongsa, T., Moji, K. & Minamoto, T. (2017). Application of environmental DNA analysis for the detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in water samples. *Acta Tropica*, 169, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.008>
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. & deWaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270(1512), 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hoffman, G.L. (1990). *Myxobolus cerebralis*, a Worldwide Cause of Salmonid Whirling Disease. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2: 30-37. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1990\)002<0030:MCAWCO>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1990)002<0030:MCAWCO>2.3.CO;2)
- Holland, J.W., Okamura, B., Hartikainen, H. & Secombes, C.J. (2011). A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. *Proceedings of the Royal Society B*, 278(1705), 546-553. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1301>
- 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(1), 46-60. <https://doi.org/10.1017/S0031182012001175>
- Holzer, A.S., Bartošová-Sojtková, 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(7), 1651-1666. <https://doi.org/10.1111/mec.14558>
- Holzer, A.S., Sommerville, C. & Wootten, R. (2006). Molecular studies on the seasonal occurrence and development of five myxozoans in farmed *Salmo trutta* L. *Parasitology*, 132(2), 193-205. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008917>
- Holzer, A.S., Piazzon, M.C., Barrett, D., Bartholomew, J.L. & Sitjà-Bobadilla, A. (2021). To React or Not to React: The Dilemma of Fish Immune Systems Facing Myxozoan Infections. *Frontiers in Immunology*, 12, 734238. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.734238>
- Hudson, P.J., Dobson, A.P. & Lafferty, K.D. (2006). Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology & Evolution*, 21(7), 381-385. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.04.007>
- Chábera, S., Hátle, M. & kol. (1986). Jižní Čechy, turistický průvodce ČSSR. *Olympia*, Praha, 383 pp.
- Chang, E.S., Neuhof, M., Rubinstein, N.D., Diamant, A., Philippe, H., Huchon, D. & Cartwright, P. (2015). Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 112(48), 14912-14917. <https://doi.org/10.1073/pnas.1511468112>
- Chapman, P.M., Farrell, M.A. & R.O. Brinkhurst. (1982). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. *Aquatic Toxicology*, 2, 47-67. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(82\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0166-445X(82)90005-4)
- Chiarello, M., McCauley, M., Villéger, S. & Jackson, C.R. (2022). Ranking the biases: The choice of OTUs vs. ASVs in 16S rRNA amplicon data analysis has stronger effects on diversity measures than rarefaction and OTU identity threshold. *PLoS One*, 17(2), e0264443. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264443>
- Ikeda, I. (1912). Studies on some sporozoan parasites of sipunculoids. I. The life history of a new actinomyxidian *Tetractinomyxon intermedium* g. et sp. nov. *Archiv für Protistenkunde*, 25, 240-272.



- Iten, P. & Collins, A.** (2007). Fossils and phylogenies: integrating multiple lines of evidence to investigate the origin of early major metazoan lineages. *Integrative and Comparative Biology*, 47(5), 744-751. <https://doi.org/10.1093/icb/icm071>
- Jansson, R.** (2006). The effect of dams on biodiversity. V knize: Johansson, B. & Sellberg, B. Dams under Debate. *Swedish Research Council*, 77-84 pp.
- Jarman, S.N., Berry, O. & Bunce, M.** (2018). The value of environmental DNA biobanking for long-term biomonitoring. *Nature Ecology & Evolution*, 2(8), 1192-1193. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0614-3>
- Jarvie, H.P., Withers, P.J.A, Hodgkinson, R., Bates, A., Neal, M., Wickham, H.D., Harman, S.A., & Armstrong, L.** (2008). Influence of rural land use on streamwater nutrients and their ecological significance. *Journal of Hydrology*, 350(3-4), 166-186. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2007.10.042>
- Jenkins, M.** (2003). Prospects for biodiversity. *Science*, 302(5648), 1175-1177. <https://doi.org/10.1126/science.1088666>
- Jiménez-Guri, E., Okamura, B. & Holland, P.W.** (2007). Origin and evolution of a myxozoan worm. *Integrative and Comparative Biology*, 47(5), 752-758. <https://doi.org/10.1093/icb/icm026>
- Jurine, L.L.** (1825). Histoire des poissons du Lac Léman. *Memoires de la Société de physique et d'histoire naturelle de Genève*, 3.
- Kallert, D.M., Ponader, S., Eszterbauer, E., El-Matbouli, M. & Haas, W.** (2007). Myxozoan transmission via actinospores: new insights into mechanisms and adaptations for host invasion. *Parasitology*, 134(12), 1741-1750. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003290>
- Karlsbakk, E., Kristmundsson, Á., Albano, M., Brown, P. & Freeman, M.A.** (2017). Redescription and phylogenetic position of *Myxobolus aeglefini* and *Myxobolus platessae* n. comb. (Myxosporea), parasites in the cartilage of some North Atlantic marine fishes, with notes on the phylogeny and classification of the Platysporina. *Parasitology International*, 66(1), 952-959. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.10.014>
- Kataoka, T. & Kondo, R.** (2019). Data on taxonomic annotation and diversity of 18S rRNA gene amplicon libraries derived from high throughput sequencing. *Data Brief*, 25, 104213. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104213>
- Kent, M.L., Andree, K.B., Bartholomew, J.L., El-Matbouli, M., Desser, S.S., Devlin, R.H., Feist, S.W., Hedrick, R.P., Hoffmann, R.W., Khattra, J., Hallett, S.L., Lester, R.J., Longshaw, M., Palenzeula, O., Siddall, M.E. & Xiao, C.** (2001). Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48, 395-413. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2001.tb00173.x>
- Kirse, A., Bourlat, S.J., Langen, K. & Fonseca, V.G.** (2021). Unearthing the potential of soil eDNA metabarcoding—Towards best practice advice for invertebrate biodiversity assessment. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.630560>
- Kitanishi, S., Yamamoto, T., Edo, K. & Higashi, S.** (2012). Influences of habitat fragmentation by damming on the genetic structure of masu salmon populations in Hokkaido, Japan. *Conservation Genetics*, 13, 1017–1026. <https://doi.org/10.1007/s10592-012-0349-7>
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K. & Schloss, P.D.** (2013). Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5112-5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>

**Kubeš, J.** (2003). Vodní toky Novohradských hor – hydrogeografická syntéza. V knize: Papáček M. (ed.): Biodiverzita a přírodní podmínky Novohradských hor II. Č. Budějovice JU Pedagogická fakulta a ENTÚ AV ČR, 9–17 pp.

**Kyslík, J., Vancová, M., Bartošová-Sojtková, 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(10), 667-675. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2022.07.002>.

**Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R. 3rd, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F.G.** (1980). A newly revised classification of the protozoa. *Journal of Protozoology*, 27(1), 37-58. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x>

**Lewisich, E., Unfer, G., Pinter, K., Bechter, T. & El-Matbouli, M.** (2018). Distribution and prevalence of *T. bryosalmonae* in Austria: A first survey of trout from rivers with a shrinking population. *Journal of Fish Diseases*, 41(10), 1549-1557. <https://doi.org/10.1111/jfd.12863>

**Liangming, C., Xinyu, C., Yu, C., Ping, F., Yuyu, H., Haiyan, L., Mingyan, L. & Cong, W.** (2007). Eel population and solution model. *Roskilde University*, UK. 66 p.

**Lisnerová, M.** (2022). Biodiversity of Myxozoa based on extensive screening of fish and environmental samples. Ph.D. Thesis series, No. 13. University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, České Budějovice, 282 pp.

**Lisnerová, M., Blabolil, P., Holzer, A.S., Jurajda, P. & Fiala, I.** (2020). Myxozoan hidden diversity: the case of *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova, 1936. *Folia parasitologica*, 67. <https://doi.org/10.14411/fp.2020.019>

**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*, 00, 1–14. <https://doi.org/10.1002/edn3.380>

**Littlefair, J.E. & Clare, E.L.** (2016). Barcoding the food chain: from Sanger to high-throughput sequencing. *Genome*, 59(11), 946-958. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0028>

**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(7), 523-530. doi: 10.1016/j.ijpara.2019.02.009

**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(3):271-280. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(89\)80064-1](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(89)80064-1)

**Lom, J. & Arthur, J.R.** (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases*, 12, 151-156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1989.tb00287.x>

**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(3):271-80. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(89\)80064-1](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(89)80064-1)

**Lom, J. & Dykova, I.** (1992). Protozoan parasites of fishes. V knize: Developments in Aquaculture and Fisheries Science, *Elsevier*, Amsterdam, 315 pp.

**Lom, J. & Dyková, I.** (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica (Praha)*, 53(1), 1-36. <https://doi.org/10.14411/fp.2006.001>

- Lom, J., Dyková, I., Pavlásková M. & Grupcheva, G.** (1983). *Sphaerospora molnari* sp.nov. (Myxozoa:Myxosporea), an agent of gill, skin and blood sphaerosporosis of common carp in Europe. *Parasitology*, 86(3), 529-535. <https://doi.org/10.1017/S003118200005071X>
- Lucan-Bouché, M.-L., Biagianti-Risbourg, S., Arsac, F. & G. Vernet.** 1999. An original decontamination process developed by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead. *Aquatic Toxicology*, 45, 9-17. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00091-5)
- Macé, B., Hocdé, R., Marques, V., Guerin, P.-E., Valentini, A., Arnal, V., Pellissier, L. & Manel, S.** (2022). Evaluating bioinformatics pipelines for population-level inference using environmental DNA. *Environmental DNA*, 4, 674-686. <https://doi.org/10.1002/edn3.269>
- Mahon, A.R., Jerde, C.L., Galaska, M., Bergner, J.L., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., Hunter, M.E. & Nico, L.G.** (2013). Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of asian carps in controlled and field experiments. *PLoS ONE*, 8(3), e58316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058316>
- Marcogliese, D.J.** (2016). The distribution and abundance of parasites in aquatic ecosystems in a changing climate: More than just temperature. *Integrative and Comparative Biology*, 56(4), 611-619. <https://doi.org/10.1093/icb/icw036>
- 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. <https://doi.org/10.1577/1548-8667>
- 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(9), 1403-1407. <https://doi.org/10.1111/jfd.13665>
- Marshall, W.L., Sitjà-Bobadilla, A., Brown, H.M., MacWilliam, T., Richmond, Z., Lamson, H., Morrison, D.B. & Afonso, L.O.B.** (2016). Long-term epidemiological survey of *Kudoa thyrsites* (Myxozoa) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) from commercial aquaculture farms. *Journal of Fish Diseases*, 39: 929-946. <https://doi.org/10.1111/jfd.12429>
- Matěnová V. & Matěna J.** (2004a). Ichtyofauna hraničního úseku řeky Malše. Biodiverzita ichtyofauny ČR (V), *Ústav biologie obratlovců AV ČR*, Brno, 145-150 pp.
- Matěnová V. & Matěna J.** (2004b). Ryby (Actinopterygii) v tekoucích vodách. V knize: Papáček M. (ed.): Biota Novohradských hor: modelové taxony, společenstva a biotopy. *Pedagogická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice*, 156-166 pp.
- Massard, J.A. & Geimer, G.** (2008). Global diversity of bryozoans (Bryozoa or Ectoprocta) in freshwater. In book: Balian, E.V., Lévêque, C., Segers, H., & Martens K. (2008). *Freshwater Animal Diversity Assessment*, 93-99 pp. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7_11)
- McCarthy, D.P., Donald, P.F., Scharlemann, J.P., Buchanan, G.M., Balmford, A., Green, J.M., Bennun, L.A., Burgess, N.D., Fishpool, L.D., Garnett, S.T., Leonard, D.L., Maloney, R.F., Morling, P., Schaefer, H.M., Symes, A., Wiedenfeld, D.A. & Butchart, S.H.** (2012). Financial costs of meeting global biodiversity conservation targets: current spending and unmet needs. *Science*, 338(6109), 946-949. <https://doi.org/10.1126/science.1229803>
- McConnell C.J. & Cone D.K.** (1992). Settling rates and density of spores of *Henneguya doori* (Myxosporea) in water. *Journal of Parasitology*, 78(3):427-429. <https://doi.org/10.2307/3283639>

**Molnár, K., Fischer-Scherl, T., Ferenc, B. & Hoffmann, R.W.** (1989). Hoferellosis in goldfish *Carassius auratus* and gibel carp *Carassius auratus gibelio*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 7(2), 89-95. <https://doi.org/10.3354/dao007089>

**Molnár, K. & Székely, C.** (2003) Infection in the fins of the goldfish *Carassius auratus* caused by *Myxobolus diversus* (Myxosporaea). *Folia Parasitologica*, 50 (1), 31-36. <https://10.14411/fp.2003.005>

**Moran, J.D.W, Whitaker, D.J & Kent, M.L.** (1999). A review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. *Aquaculture*, 172(1–2), 163-196. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00437-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00437-2)

**Morton, S. & Hill, R.** (2015). What is biodiversity, and why is it important? V knize: Morton, S., Sheppard, A. & Lonsdale, W.M. Biodiversity: science and solutions for Australia. *CSIRO Publishing*, Clayton, 1-12 pp.

**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(3):215-222. <https://doi.org/10.3354/dao060215>

**Mysara, M., Njima, M., Leys, N., Raes, J. & Monsieurs, P.** (2017) From reads to operational taxonomic units: an ensemble processing pipeline for MiSeq amplicon sequencing data. *Gigascience*, 6(2),1-10. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giw017>

**Nelson, J.S., Grande, T.C. & Wilson, M.V.H.** (2016) *Fishes of the World* (5th Edition). *John Wiley and Sons*, Hoboken.

**Nguyen, T.T., Traub, R., Pham, P.D., Nguyen, H.V., Nguyen, K.C., Phung, C.D. & Dalsgaard, A.** (2016). Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in environmental samples in Hanam province, Vietnam, Food and Waterborne. *Parasitology*, 3, 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2016.03.003>

**Nilholm, C., Manoharan, L., Roth, B., D'Amato & M., Ohlsson, B.** (2022). A starch – and sucrose-reduced dietary intervention in irritable bowel syndrome patients produced a shift in gut microbiota composition along with changes in phylum, genus, and amplicon sequence variant abundances, without affecting the micro-RNA levels. *United European Gastroenterol J*, 10(4), 363-375. <https://doi.org/10.1002/ueg2.12227>

**Okamura, B.** (1996). Occurrence, prevalence and effects of the myxozoan *Tetracapsula bryozoides* parasitic in the freshwater bryozoan *Cristatella mucedo* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Folia Parasitologica (Praha)*, 43: 262-266.

**Okamura, B., Gruhl, A. & Bartholomew, J.L.** (2015). An introduction to myxozoan evolution, ecology and development. V knize: B. Okamura, A. Gruhl, J.L. Bartholomew (Eds.), *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. *Springer International Publishing*, Cham, 1-20 pp.

**Okamura, B., Hartigan, A. & Naldoni, J.** (2018). Extensive Uncharted Biodiversity: The Parasite Dimension. *Integrative and Comparative Biology*, 58(6), 1132-1145. <https://doi.org/10.1093/icb/icy039>

**Okamura, B., Hartikainen, H., Schmidt-Posthaus, H. & Wahli, T.** (2011). Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease. *Freshwater Biology*, 56: 735-753. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02465.x>

- 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. <https://doi.org/10.1002/edn3.338>
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Ceccherini, Guerri, G. & Nannipieri, P.** (2009). Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. *Biology and Fertility of Soils*, 45, 219-235 <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0345-8>
- Porter, T.M. & Hajibabaei, M.** (2018). Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular Ecology*, 27(2), 313-338. <https://doi.org/10.1111/mec.14478>
- Poulin R.** (2011). The many roads to parasitism: a tale of convergence. *Advanced Parasitology*, 74:1-40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385897-9.00001-X>
- Poulin, R. & Morand, S.** (2000). The diversity of parasites. *The Quarterly Review of Biology*, 75(3), 277-293. <https://doi.org/10.1086/393500>
- Prodan, A., Tremaroli, V., Brodin, H., Zwinderman, A.H., Nieuwdorp, M. & Levin, E.** (2020). Comparing bioinformatic pipelines for microbial 16S rRNA amplicon sequencing. *PLoS One*, 15(1), e0227434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227434>
- Rees, H.C., Maddison, B.C., Middleditch, D.J., Patmore, J.R.M. & Gough, K.C.** (2014), REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51, 1450-1459. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>
- Reid, A.J., Carlson, A.K., Creed, I.F., Eliason, E.J., Gell, P.A., Johnson, P.T.J., Kidd, K.A., MacCormack, T.J., Olden, J.D., Ormerod, S.J., Smol, J.P., Taylor, W.W., Tockner, K., Vermaire, J.C., Dudgeon, D. & Cooke, S.J.** (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 94(3), 849-873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>
- 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(3), 859-870. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06509-1>
- Roger, A.J., Muñoz-Gómez, S.A. & Kamikawa, R.** (2017). The origin and diversification of mitochondria. *Current Biology*, 27(21), R1177-R1192. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015>
- Rocha, S., Casal, G., Rangel, L., Severino, R., Castro, R., Azevedo, C. & Santos, M.J.** (2013). Ultrastructural and phylogenetic description of *Zschokkella auratis* sp. nov. (Myxozoa), a parasite of the gilthead seabream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 107(1), 19-30. <https://doi.org/10.3354/dao02661>
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P.** (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572-1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Roy, K. & Foote, M.** (1997). Morphological approaches to measuring biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(7), 277-281. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)81026-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)81026-9)
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>

Sales, N.G., McKenzie, M.B., Drake, J., Harper, L.R., Browett, S.S., Coscia, I., Wangenstein, O.S., Baillie, C., Bryce, E., Dawson, D.A., Ochu, E., Hänfling, B., Handley, L.L., Mariani, S., Lambin, X., Sutherland, C. & McDevitt, A.D. (2020). Fishing for mammals: Landscape-level monitoring of terrestrial and semi-aquatic communities using eDNA from riverine systems. *Journal of Applied Ecology*, 57, 707-716. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13592>

Scott, W.B. & Crossman, E.J. (1973). Freshwater Fishes of Canada. *Bulletin*, Ottawa, 966 pp.

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. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.24556>

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.S. & Vennervald, B.J. (2019). Environmental DNA for improved detection and environmental surveillance of schistosomiasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 116(18), 8931-8940. <https://doi.org/10.1073/pnas.1815046116>

Shpirer, E., Chang, E.S., Diamant, A., Rubinstein, N., Cartwright, P. & Huchon, D. (2014). Diversity and evolution of myxozoan minicollagens and nematogalactins. *BMC Ecology and Evolution*, 14, 205. <https://doi.org/10.1186/s12862-014-0205-0>

Schakau, V., Hilker, F.M. & Lewis, M.A. (2019). Fish disease dynamics in changing rivers: Salmonid Ceratomyxosis in the Klamath River. *Ecological Complexity*, 40(A), 100776. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2019.100776>

Schenekar, T. (2022). The current state of eDNA research in freshwater ecosystems: are we shifting from the developmental phase to standard application in biomonitoring? *Hydrobiologia*, 850, 1263-1282. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04891-z>

Schloss, P.D. & Westcott, S.L. (2011). Assessing and improving methods used in operational taxonomic unit-based approaches for 16S rRNA gene sequence analysis. *Applied Environmental Microbiology*, 77(10), 3219-3226. <https://doi.org/10.1128/AEM.02810-10>

Schmidt, T.S.B., Matias Rodrigues, J.F. & von Mering, C. (2014) Ecological Consistency of SSU rRNA-based operational taxonomic units at a global scale. *PLoS Computational Biology*, 10(4), e1003594. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003594>

Schmidt-Posthaus, H., Steiner, P., Müller, B. & Casanova-Nakayama, A. (2013). Complex interaction between proliferative kidney disease, water temperature and concurrent nematode infection in brown trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104(1), 23-34. <https://doi.org/10.3354/dao02580>

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. *Journal of Parasitology*, 81(6), 961-967. <https://doi.org/10.2307/3284049>

Siegwald, L., Touzet, H., Lemoine, Y., Hot, D., Audebert, C. & Caboche, S. (2017). Assessment of common and emerging bioinformatics pipelines for targeted metagenomics. *PLoS ONE*, 12(1), e0169563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169563>

Simon, M., Jardillier, L., Deschamps, P., Moreira, D., Restoux, G., Bertolino, P. & López-García, P. (2015). Complex communities of small protists and unexpected occurrence of typical marine lineages in shallow freshwater systems. *Environmental Microbiology*, 17(10), 3627. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12591>

Sitjà-Bobadilla, A. (2008). Fish immune response to Myxozoan parasites. *Parasite*, 15(3), 420-425. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008153420>

- Skidmore, A.K., Siegenthaler, A., Wang, T., Darvishzadeh, R., Zhu, X., Chariton, A. & Arjen de Groot, G. (2022). Mapping the relative abundance of soil microbiome biodiversity from eDNA and remote sensing. *Science of Remote Sensing*, 6, 100065. <https://doi.org/10.1016/j.srs.2022.100065>
- Slobodkin, L.B., Bossert, P., Matessi, C. & Gatto, M. (1991). A review of some physiological and evolutionary aspects of body size and bud size of Hydra. *Hydrobiologia*, 216, 377-382. <https://doi.org/10.1007/BF00026489>
- Smith, D.G. (2001). Pennack's freshwater invertebrates of the United States (4th ed.). *John Wiley & Sons, Inc*, New York.
- Smith, H.W. & Nichols, R.A.B. (2010). *Cryptosporidium*: Detection in water and food. *Experimental Parasitology*, 124(1), 61-79. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.05.014>
- Smolar-Žvanut, N. & Mikoš, M. (2014) The impact of flow regulation by hydropower dams on the periphyton community in the Soča River, Slovenia, *Hydrological Sciences Journal*, 59(5), 1032-1045, <https://doi.org/10.1080/02626667.2013.834339>
- Smothers, J.F., von Dohlen, C.D., Smith, L.H. Jr. & Spall, R.D. (1994). Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science*, 265(5179), 1719-1721. <https://doi.org/10.1126/science.8085160>
- Sokal, R. (1963) "The Principles and Practice of Numerical Taxonomy." *Taxon*. 12(5), 190-199. *JSTOR*, <https://doi.org/10.2307/1217562>
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), 2688-2690. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
- Staley, Z.R., Chuong, J.D., Hill, S.J., Grabuski, J., Shokralla, J., Hajibabaei, M. & Edge Fecal, T.A. (2018). Fecal source tracking and eDNA profiling in an urban creek following an extreme rain event. *Scientific Reports*, 8, 14390 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32680-z>
- Syrovátka, V. & Brabec, K. (2006) Effects of physical factors on chironomid larvae distribution and community structure at a mesohabitat scale, *SIL Proceedings*, 29 (4), 1845-1848, <https://doi.org/10.1080/03680770.2006.11903009>
- Székely, C., Atkinson, S.D, Molnár, K., Egyed, L., Gubányi, A. & Cech, G. (2016). A synopsis of records of myxozoan parasites (Cnidaria: Myxozoa) from shrews, with additional data on *Soricimyxum fegati* from common shrew *Sorex araneus* in Hungary and pygmy shrew *Sorex minutus* in Slovakia. *Folia Parasitologica (Praha)*, 63, 1-5. <https://doi.org/10.14411/fp.2016.021>
- Štolc, A. (1899). Actinomyxidia, eine neue Gruppe der Mesozoa, der Myxosporidien verwandt. *Abhandlungen der Böhmischen Gesellschaft der Wissenschaften*, 8, 1-12.
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L. & Coissac, E. (2018). Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring. *Oxford Academic*, Oxford, 253 pp.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M. & Rieseberg, L.H. (2012), Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21: 1789-1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Tesfaye, G.C., Souza, A.T.S., Bartoň, D., Blabolil, P., Čech, M., Draščík, V., Frouzová, J., Holubová, M., Kočvara, L., Kolařík, T., Martinez Von Dosow, C., Moraes, K., Muška, M., Prchalová, M., Říha, M., Sajdlová, Z., Soukalová, K., Šmejkal, M., Tušer, M., Vašek, M., Vejřík, L., Vejříková, I., Peterka, J., Jůza, T. & Kubečka, J. (2022). Long-term monitoring of fish in a freshwater reservoir: different ways of weighting complex spatial sampling. *Frontiers in Environmental Science*, 10, <https://doi.org/10.3389/fenvs.2022.1000087>

- Thomsen, P.F. & Willerslev, E.** (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Tickner, D., Opperman, J.J., Abell, R., Acreman, M., Arthington, A.H., Bunn, S.E., Cooke, S.J., Dalton, J., Darwall, W., Edwards, G., Harrison, I., Hughes, K., Jones, T., Leclère, D., Lynch, A.J., Leonard, P., McClain, M.E., Muruven, D., Olden, J.D., Ormerod, S.J., Robinson, J., Tharme, R.E., Thieme, M., Tockner, K., Wright, M. & Young, L.** (2020). Bending the curve of global freshwater biodiversity loss: an emergency recovery plan. *Bioscience*, 70(4), 330-342. <https://doi.org/10.1093/biosci/biaa002>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144466>
- Van Iten, H., Marques, A.C., Leme, J.d.M., Pacheco, M.L.A.F. & Simões, M.G.** (2014). Origin and early diversification of the phylum Cnidaria Verrill: major developments in the analysis of the taxon's Proterozoic–Cambrian history. *Palaeontology*, 57, 677-90. <https://doi.org/10.1111/pala.12116>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102560>
- von Wintzingerode, F., Göbel, U.B. & Stackebrandt, E.** (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21(3), 213-229. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00351.x>
- Wahli, T., Bernet, D., Segner, H. & Schmidt-Posthaus, H.** (2008). Role of altitude and water temperature as regulating factors for the geographical distribution of *Tetracapsuloides bryosalmonae* infected fishes in Switzerland. *Journal of Fish Biology*, 73: 2184-2197. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02054.x>
- Waldner, K., Borkovec, M., Borgwardt, F., Unfer, G. & El-Matbouli, M.** (2021). Effect of water temperature on the morbidity of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) to brown trout (*Salmo trutta*) under laboratory conditions. *Journal of Fish Diseases*, 44(7), 1005-1013. <https://doi.org/10.1111/jfd.13361>
- Weill, R.** (1938). L'interprétation des Cnidosporidies et la valeur taxonomique de leur cnidome. Leur cycle comparé à la phase larvaire des Narcomeduses cuninides. *Travaux de la Station Zoologique de Wimereaux*, 13, 727-744.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.12.023>
- Wilcox, T.M., McKelvey, K.S., Young, M.K., Jane, S.F., Lowe, W.H., Whiteley, A.R. & Schwartz, M.K.** (2013). Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PLoS One*, 8(3), e59520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059520>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.225.4669.1449>



- Wu, Y., Colborne, S. F., Charron, M. R. & Heath, D. D. (2023). Development and validation of targeted environmental DNA (eDNA) metabarcoding for early detection of 69 invasive fishes and aquatic invertebrates. *Environmental DNA*, 5, 73-84. <https://doi.org/10.1002/edn3.359>
- Wu, H., Chen, H., Xu, J. Zeng, G., Sang, L., Liu, Q., Yin, Z., Dai, J., Yin, D., Liang, J. & Ye, S. (2019). Effects of dam construction on biodiversity. *Journal of Cleaner Production*, 221, 480-489. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.03.001>
- Xiao, C. & Desser, S. S. (2000). The longevity of 7 forms of actinosporean spores from oligochaetes of Lake Sasajewun, Algonquin Park, Ontario, and their reaction to fish mucus. *Journal of Parasitology*, 86, 193-195. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0193:TLOASF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0193:TLOASF]2.0.CO;2)
- Yahalomi, D., Atkinson, S.D., Neuhof, M., Chang, E.S., Philippe, H., Cartwright, P., Bartholomew, J.L. & Huchon, D. (2020). A cnidarian parasite of salmon (Myxozoa: *Henneguya*) lacks a mitochondrial genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 117(10), 5358-5363. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909907117>
- Yahalomi, D., Haddas-Sasson, M., Rubinstein, N.D., Feldstein, T., Diamant, A. & Huchon, D. (2017). The multipartite mitochondrial genome of *Enteromyxum leei* (Myxozoa): Eight fast-evolving megacircles. *Molecular Biology and Evolution*, 34(7), 1551-1556. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx072>
- Yokoyama, H., Grabner, D. & Shirakashi, S. (2012). Transmission biology of the Myxozoa. V knize: Carvalho, E. D., David, G. S. & Jose de Silva, R. Health and Environment in Aquaculture. *InTech*, Rijeka, 3-29 pp.
- Yokoyama, H., Ogawa, K. & Wakabayashi, H. (1993). Some biological characteristics of actinosporeans from the oligochaete *Branchiura sowerbyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 17, 223-228. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3306-6>
- 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. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13879>
- Zhang, G.K., Chain, F.J.J., Abbott, C.L. & Cristescu, M.E. (2018). Metabarcoding using multiplexed markers increases species detection in complex zooplankton communities. *Evolutionary Applications*, 11, 1901-1914. <https://doi.org/10.1111/eva.12694>
- Zhang, Y., Pavlovska, M., Stoica, E., Prekrasna, I., Yang, J., Slobodnik, J., Zhang, X. & Dykyi, E. (2020). Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals. *Environment International*, 135, 105307. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105307>
- Zhang, Z.Q. (2013). Animal biodiversity: an update of classification and diversity in 2013. *Zootaxa*, 3703, 5-11. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3703.1.3>

## 8.2 Internetové zdroje

- (1) IUCN Red List (2022) - *Number of described species*.  
Online. [cit. 1.4.2023].  
Dostupné z: <https://ourworldindata.org/grapher/number-of-described-species>
- (2) Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, veřejná výzkumná instituce (2020) - *Charakteristiky toků a povodí ČR (Malše)*.  
Online. [cit. 13.3.2023].  
Dostupné z: <https://www.dibavod.cz/24/charakteristiky-toku-a-povodi-cr.html>
- (3) Povodí Vltavy s.p. (2013) - *VD Římov*.  
Online. [cit. 13.02.2023].  
Dostupné z: <https://www.pvl.cz/files/download/vodohospodarske-informace/vodni-dila-a-nadrze/rimov.pdf>
- (4) Agentura ochrany přírody a krajiny ČR (2014) - *Horní Malše*.  
Online. [cit. 13.02.2023].  
Dostupné z:  
[https://drusop.nature.cz/ost/chrobjedy/zchru/index.php?SHOW\\_ONE=1&ID=14293](https://drusop.nature.cz/ost/chrobjedy/zchru/index.php?SHOW_ONE=1&ID=14293)
- (5) Povodí Vltavy s.p. (2013) - *Studie proveditelnosti zprůchodnění migračních překážek na vodních tocích v povodí Vltavy (Hodnocení Malše)*.  
Online. [cit. 14.3.2023].  
Dostupné z: [https://www.pvl.cz/migrace-vltava/projekt/3\\_TEXTOVA\\_CAST/3\\_textova\\_cast\\_Malse.pdf](https://www.pvl.cz/migrace-vltava/projekt/3_TEXTOVA_CAST/3_textova_cast_Malse.pdf)
- (6) NCBI BLAST, 2023.  
Dostupné z: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>
- (7) NCBI GenBank, 2023.  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- (8) Geneious Prime, 2022.  
Dostupné z: <https://www.geneious.com/>
- (9) Inkscape Project, 2020.  
Dostupné z: <https://inkscape.org/>
- (10) IUCN Red List (2018) - *Anguilla Anguilla*.  
Online. [cit. 13.3.2023].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/60344/12353683>
- (11) Jihočeský územní svaz ČRS (2018) - *Výsazování ryb v rámci dotace MZE*.  
Online. [cit. 5.4.2023].  
Dostupné z: <https://www.jcus.cz/vysazovani-ryb-v-ramci-dotace-mze/>

## 9. Příloha

**Tabulka 10:** Seznam referenčních sekvencí genu SSU rRNA z GenBank databáze použitých pro fylogenetickou analýzu pro skupinu *Myxobolus*. Tabulka zahrnuje druh, odpovídající dané sekvenci a hostitele, u které byl parazit popsán.

<b>Myxozoa</b>	<b>Hostitel</b>	<b>Přístupový kód sekvence</b>
<i>Thelohanellus magnacysta</i>	<i>Cyprinella venusta</i> (jeleček černoocasý)	MN540268
<i>Myxobolus caudatus</i>	<i>Barbus barbus</i> (parma obecná)	JQ388889
<i>Myxobolus intimus</i>	<i>Aspius aspius</i> (bolen dravý)	JF311899
<i>Hexactinomyxon</i> sp.	<i>Limnodrilus udekemianus</i>	AY162272
<i>Myxobolus samsunensis</i>	<i>Capoeta tinca</i> (chramule anatolská)	MG253820
<i>Myxobolus karaeri</i>	<i>Capoeta tinca</i> (chramule anatolská)	MG253819
<i>Myxobolus macrocapsularis</i>	<i>Abramis brama</i> (cejn velký)	AF507969
<i>Myxobolus gutturocola</i>	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (tolstolobik bílý)	MF543857
<i>Myxobolus parviformis</i>	<i>Abramis brama</i> (cejn velký)	AY836151
<i>Myxobolus pseudodispar</i>	<i>Blicca bjoerkna</i> (cejnek malý)	KU340986
<i>Myxobolus paksensis</i>	<i>Chondrostoma nasus</i>	KP025687
<i>Myxobolus polati</i>	<i>Chondrostoma angorense</i>	MH392318
<i>Myxobolus dispar</i>	<i>Cyprinus carpio</i> (kapr obecný)	AF507972
<i>Myxobolus balatonicus</i>	<i>Cyprinus carpio</i> (kapr obecný)	KP205545
<i>Myxobolus fountainae</i>	<i>Semotilus atromaculatus</i>	ON843375
<i>Henneguya leporinicola</i>	<i>Leporinus macrocephalus</i>	KP980550
<i>Myxobolus intralamina</i>	<i>Micropterus dolomieu</i>	OM420274
<i>Myxobolus lepomis</i>	<i>Lepomis miniatus</i>	KY203390
<i>Myxobolus pantanalis</i>	<i>Salminus brasiliensis</i>	KF296349
<i>Thelohanellus sinensis</i>	<i>Carassius auratus gibelio</i>	KY469292
<i>Myxobolus squamae</i>	<i>Barbus barbus</i> (parma obecná)	JQ388894
<i>Myxobolus pavlovskii</i>	<i>Aristichthys nobilis</i>	AF507973
<i>Myxobolus sitjae</i>	<i>Blicca bjoerkna</i> (cejnek malý)	JF311898
<i>Myxobolus szentendrensis</i>	<i>Chondrostoma nasus</i>	KP025686
<i>Myxobolus eirasianus</i>	<i>Blicca bjoerkna</i> (cejnek malý)	JF311900
<i>Myxobolus abitus</i>	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (tolstolobik bílý)	MG520367
<i>Myxobolus cutanei</i>	<i>Luciobarbus bocagei</i>	JQ388890
<i>Myxobolus tsangwuensis</i>	<i>Cyprinus carpio</i> (kapr obecný)	KJ561441
<i>Myxobolus pfeifferi</i>	<i>Luciobarbus bocagei</i>	JQ388895
<i>Myxobolus basilamellaris</i>	<i>Cyprinus carpio</i> (kapr obecný)	AF507971
<i>Myxobolus basilamellaris</i>	<i>Cyprinus carpio</i> (kapr obecný)	MN227352
<i>Myxobolus allotypica</i>	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (tolstolobik bílý)	KJ725075
<i>Myxobolus drjagini</i>	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (tolstolobik bílý)	MW577455
<i>Myxobolus tauricus</i>	<i>Barbus barbus</i> (parma obecná)	JQ388896
<i>Myxobolus pseudodispar</i>	<i>Achondrostoma arcasii</i> (ostroretka podhorská)	MK024332

<i>Myxobolus ladogensis</i>	<i>Pelecus cultratus</i> (ostrucha křivočará)	KP241961
<i>Myxobolus tambroides</i>	<i>Tor tambroides</i>	JX028236
<i>Myxobolus cakmaki</i>	<i>Capoeta tinca</i> (chramule anatolská)	MG253821
<i>Henneguya</i> sp.	<i>Perca fluviatilis</i> (okoun říční)	KY172849
<i>Henneguya creplini</i>	<i>Zingel zingel</i> (drsek větší)	EU732597
<i>Myxobolus dujardini</i>	<i>Leuciscus cephalus</i> (jelec tloušť)	DQ439803
<i>Myxobolus branchilateralis</i>	<i>Barbus barbus</i> (parma obecná)	JQ388888
<i>Myxobolus muellericus</i>	<i>Leuciscus cephalus</i> (jelec tloušť)	DQ439807
<i>Myxobolus arcticus</i>	<i>Salvelinus leucomaenis</i> (siven světloskvrnný)	AB469993
<i>Myxobolus gayerae</i>	<i>Leuciscus cephalus</i> (jelec tloušť)	DQ439809
<i>Myxobolus neurotropus</i>	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (pstruh duhový)	DQ846661
<i>Myxobolus kisutchi</i>	<i>Oncorhynchus kisutch</i> (losos kisuč)	EF431919
<i>Myxobolus diversicapsularis</i>	<i>Rutilus rutilus</i> (plotice obecná)	GU968199
<i>Triactinomyxon</i> sp. 'type 2'	<i>Tubifex tubifex</i> (nitěnka obecná)	AY495705
<i>Myxobolus rotundus</i>	<i>Tubifex tubifex</i> (nitěnka obecná)	FJ851446
<i>Myxobolus xinyangensis</i>	<i>Abbottina rivularis</i> (hrouzkovka skvrnoploutvá)	OL606014
<i>Myxobolus neurobius</i>	<i>Salmo trutta</i> (pstruh obecný)	AB469986
<i>Myxobolus compostellanus</i>	<i>Salmo trutta</i> (pstruh obecný)	MT548607
<i>Myxobolus cycloides</i>	<i>Leuciscus cephalus</i> (jelec tloušť)	DQ439810
<i>Myxobolus impressus</i>	<i>Abramis brama</i> (cejn velký)	AF507970
<i>Myxobolus arcasii</i>	<i>Achondrostoma arcasii</i> (ostroretka podhorská)	MK053784
<i>Myxobolus leuciscini</i>	<i>Leuciscus cephalus</i> (jelec tloušť)	DQ439811
<i>Myxobolus erythrophthalmi</i>	Cyprinidae (kaproví)	KF515727
<i>Myxobolus zaikae</i>	<i>Rutilus rutilus</i> (plotice obecná)	MT141124
<i>Myxobolus carlhubbsi</i>	<i>Luxilus chrysocephalus isolepis</i>	OQ134699
<i>Myxobolus kalavatieae</i>	<i>Labeo rohita</i> (labeo avanské)	MN994420
<i>Myxobolus filamentum</i>	<i>Brycon orthotaenia</i>	KJ849240
<i>Myxobolus ovarium</i>	<i>Brycon orthotaenia</i>	MN719638
<i>Myxobolus bilobus</i>	<i>Notemigonus crysoleucas</i> (jeleček zlatý)	DQ008579
<i>Myxobolus alvarezae</i>	<i>Leuciscus idus</i> (jelec jesen)	FJ716096
<i>Myxobolus hungaricus</i>	<i>Abramis brama</i> (cejn velký)	AF448444
<i>Myxobolus obesus</i>	<i>Alburnus alburnus</i> (ouklej obecná)	AY325286
<i>Henneguya oviperda</i>	<i>Esox lucius</i> (štika obecná)	MG954096
<i>Henneguya pellucida</i>	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	KF296352
<i>Henneguya michiganensis</i>	<i>Esox masquinongy</i> (štika muskalunga)	MT711162
Myxosporea environmental sample clone type11	neznámý	KT364405
<i>Myxobolus intimus</i>	<i>Leuciscus idus</i> (jelec jesen)	JX390690
<i>Myxobolus kingchowensis</i>	neznámý	KP400625
<i>Myxobolus pseudodispar</i>	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	KU340979
<i>Myxobolus pseudodispar</i>	<i>Abramis brama</i> (cejn velký)	AF380144
<i>Myxobolus pseudodispar</i>	<i>Rutilus rutilus</i> (plotice obecná)	AF380145

<i>Myxobolus musculi</i>	<i>Barbus barbus</i> (parma obecná)	AF380141
<i>Myxobolus klamathellus</i>	<i>Gila coerulea</i> (gila modravá)	KX261616
<i>Myxobolus stanlii</i>	<i>Campostoma oligolepis</i> (largescale stoneroller)	DQ779995
<i>Myxobolus ridouti</i>	<i>Pimephales notatus</i>	GQ292745
<i>Myxobolus artus</i>	<i>Carassius gibelio</i> (karas stříbřitý)	FJ710799
<i>Myxobolus bhadrensis</i>	<i>Labeo rohita</i> (labeo avanské)	KM029970
<i>Myxobolus sp</i>	<i>Pelecus cultratus</i> (ostrucha křivočará)	GA1 KU170934
<i>Myxobolus shaharomae</i>	neznámý	KF515726
<i>Myxobolus alburni</i>	<i>Alburnus alburnus</i> (ouklej obecná)	EU567313
<i>Myxobolus ellipsoides</i>	<i>Leuciscus cephalus</i> (jelec tloušť)	DQ439813
<i>Myxobolus fundamentalis</i>	neznámý	KF515725
<i>Myxobolus paksensis</i>	<i>Chondrostoma nasus</i> (ostroretka stěhovavá)	KP025688
<i>Myxobolus rotundus</i>	<i>Abramis brama</i> (cejn velký)	FJ851449
<i>Henneguya cutanea</i>	<i>Abramis brama</i> (cejn velký)	AY676460
<i>Myxobolus arrabonensis</i>	<i>Chondrostoma angorense</i>	MH375073
<i>Myxobolus muelleri</i>	<i>Leuciscus cephalus</i> (jelec tloušť)	DQ439806
<i>Myxobolus lentisuturalis</i>	neznámý	MF150547
<i>Myxobolus nagaraensis</i>	<i>Rhinogobius</i> sp.	AB274267
<i>H. carassii</i>	<i>Carassius auratus auratus</i> (karas zlatý)	JQ801547
<i>Myxobolus portucalensis</i>	<i>Anguilla anguilla</i> (úhoř říční)	AF085182
<i>Myxobolus xiaoi</i>	<i>Notemigonus crysoleucas</i> (jeleček zlatý)	AF186843
<i>M. pseudodispar</i>	<i>Tubifex</i> sp. (nitěnka)	EF466088

**Tabulka 11:** Seznam referenčních sekvencí genu SSU rRNA z GenBank databáze použitých pro fylogenetickou analýzu pro skupinu *Myxobolus*. Tabulka zahrnuje druh, odpovídající dané sekvenci a hostitele, u které byl parazit popsán.

<b>Myxozoa</b>	<b>Hostitel</b>	<b>Přístupový kód sekvence</b>
<i>Neoactinomyxon</i> sp.	<i>Lumbriculus hoffmeisteri</i>	AF378353
<i>Aurantiactinomyxon</i> sp.	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	AY495708
<i>Hexactinomyxon</i> sp.	<i>Limnodrilus udekemianus</i>	AY162272
<i>Raabeia</i> sp.	<i>Tubifex tubifex</i> (nitěnka obecná)	AY495709
<i>Ortholinea</i> sp.	<i>Alosa pseudoharengus</i> (placka velkooká)	MZ474836
<i>Echinactinomyxon</i> sp.	Oligochaeta	AJ417562
<i>Chloromyxum cristatum</i>	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (tolstolobik bílý)	GU471261
<i>Chloromyxum cyprini</i>	<i>Cyprinus carpio</i> (kapr obecný)	AY604198
<i>Chloromyxum truttae</i>	<i>Salmo salar</i> (losos obecný)	AJ581916
<i>Chloromyxum fluviatile</i>	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (tolstolobik bílý)	GU471264

<i>Myxidium truttae</i>	<i>Salmo trutta</i> (pstruh obecný)	AJ582061
<i>Myxidium truttae</i>	<i>Oncorhynchus kisutch</i> (losos kisuč)	AF201374
<i>Myxidium whippsi</i>	<i>Esox niger</i> (štika černá)	ON833440
<i>Aurantiactinomyxon</i> sp.	<i>Branchiura sowerbyi</i>	AF487455
<i>Aurantiactinomyxon</i> sp.	<i>Tubifex tubifex</i> (nitěnka obecná)	AJ582005
<i>Paramyxidium branchialis</i>	<i>Anguilla anguilla</i> (úhoř říční)	MH414926
<i>Paramyxidium giardi</i>	<i>Anguilla anguilla</i> (úhoř říční)	MH414925
<i>Paramyxidium magi</i>	<i>Anguilla anguilla</i> (úhoř říční)	MH414927
<i>Synactinomyxon</i> 'type 1'	<i>Tubifex tubifex</i> (nitěnka obecná)	AY787784
<i>Synactinomyxon</i> sp. 'type 1'	<i>Tubifex tubifex</i> (nitěnka obecná)	AJ582002
<i>Aurantiactinomyxon</i> sp. 'type 1'	<i>Tubifex tubifex</i> (nitěnka obecná)	AJ582004
<i>Echinactinomyxon</i> sp. 'type 1'	<i>Lumbriculus variegatus</i> (žížalice pestrá)	AJ582000
<i>Raabeia</i> sp. 'type 4'	<i>Tubifex tubifex</i> (nitěnka obecná)	AJ582010
<i>Aurantiactinomyxon</i> sp.	<i>Tubifex ignotus</i>	AF483598
<i>Paramyxidium giardi</i>	<i>Tubificoides pseudogaster</i>	MK635346
<i>Henneguya creplini</i>	<i>Zingel zingel</i> (Drsek větší)	EU732597
<i>Raabeia</i> sp.	<i>Tubificoides pseudogaster</i>	MK550896
<i>Synactinomyxon longicauda</i>	<i>Tubifex tubifex</i> (nitěnka obecná)	AJ582003
<i>Echinactinomyxon radiatum</i>	<i>Tubifex tubifex</i> (nitěnka obecná)	AJ582001
<i>M.lieberkuehni</i> (mx18)	<i>Esox lucius</i> (štika obecná)	X76638
<i>M.lieberkuehni</i> (mx19)	<i>Esox lucius</i> (štika obecná)	X76639
<i>Myxidium</i> sp.	<i>Oncorhynchus masou ishikawae</i>	LC544127
<i>Sphaerospora oncorhynchi</i>	<i>Oncorhynchus nerka</i> (losos nerka)	AF201373
<i>Acauda hoffmani</i>	<i>Lepomis macrochirus</i> (slunečnice velkoploutvá)	HQ913566
<i>Hoferellus</i> sp. 'alosa'	<i>Alosa alosa</i> (placka pomořanská)	KU301052
<i>Ortholinea mullusi</i>	<i>Mullus barbatus</i> (parmice nachová)	MF539825
<i>Ortholinea argusi</i>	<i>Scatophagus argus</i>	MH197371
<i>Raabeia</i> sp. 'type 1'	<i>Tubifex tubifex</i> (nitěnka obecná)	AJ582008
<i>Buddenbrockia plumatellae</i>	<i>Phoxinus phoxinus</i> (střevle potoční)	FJ939291
<i>Buddenbrockia plumatellae</i>	<i>Rutilus rutilus</i> (plotice obecná)	MT002358
<i>Buddenbrockia allmani</i>	<i>Lophopus crystallinus</i> (mechovka křišťálová)	MT048408
<i>Aurantiactinomyxon</i> sp.	<i>Lumbriculus hoffmeisteri</i>	AF378356
<i>Chloromyxum fluviatile</i>	<i>Lumbriculus hoffmeisteri</i>	GU471265
<i>Aurantiactinomyxon pavinsis</i>	<i>Stylodrilus heringianus</i> (žížalice říční)	AJ582006
<i>Ortholinea orientalis</i>	<i>Clupea harengus</i> (sleď obecný)	HM770871
<i>Paramyxidium bulani</i>	<i>Megalops cyprinoides</i> (tarpon indický)	MH414929
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	<i>Carassius auratus</i> (karas zlatý)	AY971521
<i>Chloromyxum thymalli</i>	<i>Thymallus nigrescens</i>	JX131381
<i>Salmo salar</i>	<i>Megophrys nasuta</i>	HM641794
<i>Sphaerospora</i> sp.	<i>Oncorhynchus nerka</i> (losos nerka)	EU371498
<i>Myxidium kudoii</i>	<i>Ictalurus furcatus</i> (sumeček velký)	MN963994

<i>Myxidium hardella</i>	<i>Hardella thurjii</i>	AY688957
<i>Myxidium scripta</i>	<i>Trachemys scripta</i>	DQ851568
<i>Myxidium cuneiforme</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	DQ377709
<i>Z nova</i>	<i>Ctenopharyngodon idella</i> (amur bílý)	DQ377688
<i>Zschokkella auratis</i>	<i>Sparus aurata</i>	KC849425
<i>Zschokkella balistoidi</i>	<i>Balistoides viridescens</i>	KF179061
<i>Zschokkella icterica</i>	<i>Siganus sp</i>	DQ333434
<i>Zschokkella parasiluri</i>	<i>Pseudobagrus fulvidraco</i>	DQ377689
<i>Myxidium anatum</i>	<i>Anas platyrhynchos</i>	EF602629
<i>Myxidium amazonense</i>	<i>Corydoras melini</i> (pancéřníček šikmopruhý)	KT625442
<i>Myxidium coryphaenoideum</i>	<i>Coryphaenoides rupestris</i>	DQ377697
<i>Myxidium baueri</i>	<i>Macruromus magellanicus</i>	JX467674
<i>Sphaeromyxa kenti</i>	<i>Gobiosoma bosc</i>	JX443489
<i>Sphaeromyxa lycodi</i>	<i>Lycodes sp</i>	KC524734
<i>Sphaeromyxa hellandi</i>	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	DQ377693
<i>Sphaeromyxa balbianii</i>	<i>Gaidropsarus vulgaris</i>	KF135225
<i>Sphaeromyxa zaharoni</i>	<i>Pterois miles</i>	AY538662
<i>C melleni</i>	<i>Pseudacris triseriata</i>	DQ003031
<i>Soricimyxum fegati</i>	<i>Sorex araneus</i>	EU232760
<i>Myxidium ceccarellii</i>	<i>Leporinus elongatus</i>	KJ499821
<i>Myxobilatus gasterostei</i>	<i>Gasterosteus aculeatus</i> (koljuška tříostná)	EU861210
<i>Myxobilatus gasterostei</i>	<i>Gasterosteus aculeatus</i> (koljuška tříostná)	AJ582063
<i>Ortholinea orientalis</i>	<i>Clupea harengus</i> (sled' obecný)	HM770873
<i>Hoferellus gilsoni</i>	<i>Anguilla anguilla</i> (úhoř říční)	AJ582062
<i>Zschokkella sp</i>	<i>Anguilla anguilla</i> (úhoř říční)	AJ581918
<i>Myxidium giardi</i>	<i>Anguilla anguilla</i> (úhoř říční)	AJ582213
<i>Chloromyxum shurovi</i>	<i>Salmo salar</i> (losos obecný)	AJ581917
<i>Hoferellus azevedoi</i>	<i>Chaetobranchius flavescens</i>	MF162297
<i>Myxidium streisingeri</i>	<i>Danio rerio</i> (danio pruhované)	KM001684
<i>Synactinomyxon sp</i>	<i>Isochaetides michaelsoni</i>	KJ152182
<i>Chloromyxum legeri</i>	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	AY604197
<i>Unicauda pelteobagrus</i>	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	KC193254
<i>Ortholinea sp</i>	<i>Squalus acanthias</i>	JN130382
<i>Squalus acanthias</i>	<i>Centroscymnus coelolepis</i>	DQ377710
<i>Chloromyxum clavatum</i>	<i>Raja clavata</i>	JQ793641
<i>H carassii</i>	<i>Carassius auratus</i> (karas zlatý)	JQ801547
<i>Myxidium gadi</i>	<i>Pollachius virens</i>	DQ377711
<i>Auerbachia pulchra</i>	<i>Coryphaenoides rupestris</i>	DQ377703
<i>Schulmania aenigmatica</i>	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	KF874233
<i>Hoferellus amurae</i>	neznámý	KU141397