

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Myxozoa parazitující na rybách
v přehradních nádržích v deltě řeky Rýna:
morfologická a molekulární charakterizace

Bakalářská práce

Monika Bürgerová

Školitel: Mgr. Martina Lisnerová
Konzultant: RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.

České Budějovice 2021

M. Bürgerová, 2021: Myxozoa parazitující na rybách v přehradních nádržích v deltě řeky Rýna: morfologická a molekulární charakterizace [Myxozoan parasites in fish from dams in the river Rhine: morphological and molecular characterization, Bc. Thesis, in Czech] – 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Myxozoans are group of microscopic endoparasites infecting mainly fish including more than 2 600 nominal species. Notwithstanding, the diversity of these parasites seems to be still largely unexplored and undervalued. The detection and monitoring of myxozoan species in not yet studied localities can help to clarify important pathogens, which are responsible for death of fish and to find new species. This bachelor thesis is focused on diversity of these parasites in dams in the river Rhine, their morphological and molecular characterization based on SSU rDNA.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, dne 12. 4. 2021

Monika Bürgerová

Poděkování

V první řadě bych ráda poděkovala své vedoucí Mgr. Martině Lisnerové za odborné vedení a trpělivost při zpracování této bakalářské práce, dále svému konzultantovi RNDr. Ivanu Fialovi, PhD. za jeho cenné rady a připomínky a také RNDr. Petru Blabolilovi, PhD. za dodání rybiček plných parazitů z Nizozemska.

Další poděkování patří všem pracovníkům Laboratoře rybí protistologie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR za jejich podnětné připomínky a vytvoření přátelského prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i své rodině za umožnění studia a za podporu během něj.

Obsah

1.	Seznam použitých zkratk	1
2.	Úvod	2
3.	Teoretická část bakalářské práce	3
3.1.	Morfologie a taxonomie.....	3
3.2.	Životní cyklus	7
3.3.	Fylogenetické postavení	9
3.4.	Diverzita.....	11
3.5.	Hospodářský a ekonomický význam	13
4.	Cíle práce	14
5.	Metodika	15
5.1.	Materiál	15
5.2.	Mikroskopická analýza	16
5.3.	Molekulární analýza	16
5.3.1.	Izolace DNA	16
5.3.2.	PCR.....	17
5.3.3.	Gelová elektroforéza.....	19
5.3.4.	Extrakce PCR produktů z gelu.....	19
5.3.5.	Sekvenace	19
5.3.6.	Fylogenetické analýzy	19
5.3.7.	Výpočet prevalence a výskytu myxozoi	20
6.	Výsledky	21
6.1.	Mikroskopická analýza	21
6.2.	Molekulární analýza	22
6.3.	Fylogeneze a geografie	26
6.4.	Charakterizace nalezených druhů třídy Myxosporea.....	26
6.5.	Prevalence a výskyt myxozoi	38
7.	Diskuze	40

7.1.	Metodika: mikroskopická a molekulární analýza	40
7.2.	Výskyt myxozoi	41
7.3.	Screening malakosporeí	43
7.4.	Charakterizace nalezených druhů	44
8.	Závěr	47
9.	Zdroje	48

1. Seznam použitých zkratek

AV ČR – Akademie věd České republiky

BC – Biologické centrum

BI – Bayesovská inference

bp – base pair (komplementární pár bází)

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dNTP – deoxyribonucleotide triphosphate (deoxyribonukleotid trifosfát)

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (thylendiamintetraoctová kyselina)

F primer – forward primer

Gen SSU rDNA, SSU rDNA – gen pro malou ribozomální podjednotku

HBÚ – Hydrobiologický ústav

ML – Maximum likelihood

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NP – národní park

PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

R primer – reverse primer

SDS – sodium dodecyl sulfate (dodecylsírán sodný)

TAE pufr – tris-acetátový pufr

Taq polymeráza – syntetická polymeráza

UV – ultrafialové záření

2. Úvod

Myxozoa Grassé, 1970 (nebo-li rybomorky) jsou unikátní skupinou mnohobuněčných mikroskopických endoparazitů patřící do kmene žahavců (Kent et al. 2001). Během evoluce značně redukovala velikost svého těla a přizpůsobila se parazitismu (Fiala et al. 2015a). Z toho důvodu byla, mimo jiné, dříve řazena mezi jednobuněčná Protista. Nové molekulární (SSU rDNA analýza) a ultrastrukturní poznatky je ale definitivně přiřadily mezi žahavce (Siddall et al. 1995; Holland et al. 2011). Redukce velikosti těla je příkladem regresní evoluce, která proběhla u mnoha druhů, které jsou přizpůsobeny parazitickému životu (Poulin 2011).

Rybomorky jsou parazité s komplexním životním cyklem, který zahrnuje dva hostitele. Mezihostitelem je obratlovec, obvykle ryba. Definitivní hostitel je vodní bezobratlý z kmene kroužkovců nebo mechovek (Wolf & Markiw 1984; Patra et al. 2017). Všichni zástupci produkují v obratlovcích a bezobratlých hostitelích různé typy spor. Ty se pomocí pólových váčků s pólovými vlákny přichycují na svého hostitele. Tyto buňky jsou homologní s knidocyty u žahavců (Okamura et al. 2015).

Kmen Myxozoa se dělí do dvou tříd – Malacosporea Canning et al., 2000 a Myxosporea Bütschli, 1881. Třída Malacosporea zahrnuje pouze 4 popsané druhy ve dvou rodech – *Buddenbrockia* Schröder, 1910 a *Tetracapsuloides* Canning et al., 2002 (Hartikainen et al. 2014). Jejich jediný známý mezihostitel je ryba, definitivním hostitelem jsou mechovky (Okamura et al. 2015). U druhé třídy, myxosporeí, je popsáno přibližně 2 600 druhů v 63 rodech a diverzita jejich mezihostitelů je podstatně větší (Lom & Dyková 2006; Fiala et al. 2015b; Freeman & Kristmundsson 2018; Okamura et al. 2018). Všichni zástupci z kmene rybomerek tak značně přispívají k celkové diverzitě žahavců. Ti zahrnují přes 16 000 popsáných druhů (Zhang 2013).

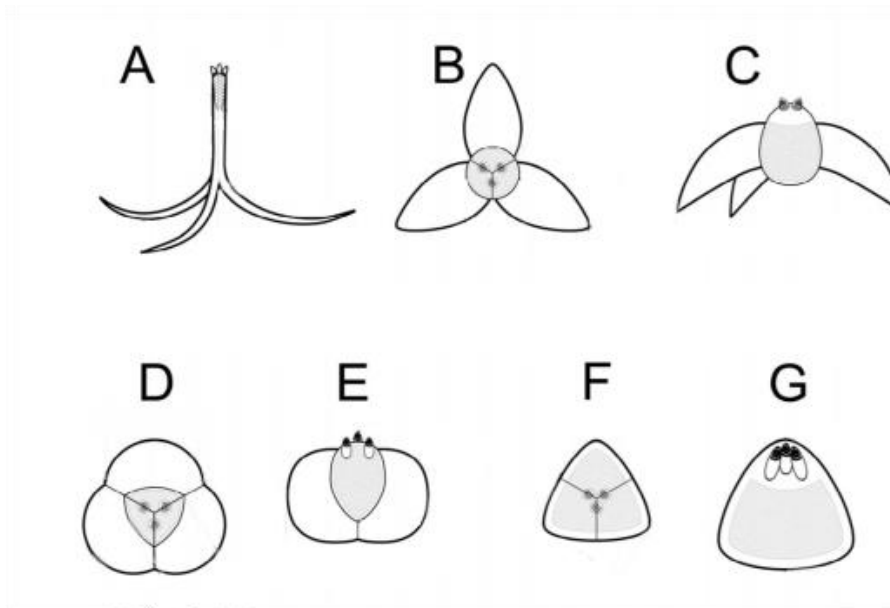
3. Teoretická část bakalářské práce

3.1. Morfologie a taxonomie

Rybmorky jsou mikroskopičtí parazité. To je také jeden z důvodů, proč byly dříve řazeny mezi Protista. Spolu s mikrosporidii tak v minulosti vytvářely taxon zvaný Cnidosporidia. Bylo tomu tak na základě přítomnosti vystřelovacího aparátu sloužícího k uchycení k hostiteli, který se nachází u obou skupin. S metazoi je ale také spojuje řada vlastností (např.: separace zárodečné a somatické linie buněk, další diferenciací somatických buněk a cell junction (spojení dvou sousedních buněk pomocí membránových kanálků sloužící k předávání informací)) (Smothers et al. 1994; Schlegel et al. 1996). Jejich zařazení mezi mnohobuněčné živočichy bylo definitivně potvrzeno až na základě molekulárních analýz na konci 20. století (Smothers et al. 1994).

Malacospora vytváří v definitivním hostiteli (mechovce) stádia s červovitým (*Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910), nebo vakovitým tvarem těla (*Tetracapsuloides bryosalmonae* Canning et al., 2002). V mezihostiteli produkují spory se čtyřmi pólými váčky (Canning & Okamura 2004; Bartošová-Sojková et al. 2014; Hartikainen et al. 2014).

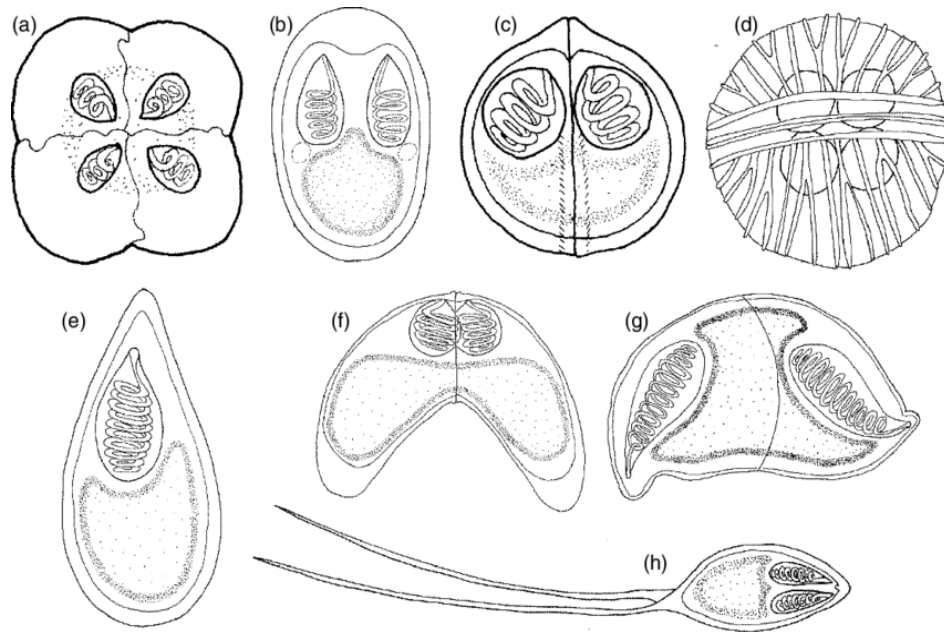
Myxospora vytváří dva typy morfologicky odlišných spor (myxospor a aktinospor), v závislosti na fázi jejich životního cyklu. Většinu 20. století byly myxospor z obratlovců a aktinospor z bezobratlých hostitelů rozlišovány jako dva druhy. Až na konci 20. století se podařilo dokázat, že myxospora a aktinospora jsou jen dvě vývojová stádia téhož živočicha (Wolf & Markiw 1984). Jejich klasifikace a taxonomie je založena právě na morfologii spor (myxospor), které byly nalezeny v mezihostitelích – nejčastěji v rybách (Okamura et al. 2015). Mnohobuněčná myxospora obsahuje většinou jeden až čtyři pólé váčky – buňky typické pro všechna Myxozoa. Jejich morfologické uspořádání je podobné morfologii knidocytů u žahavců (Siddall et al. 1995). Strukturní a chemická podobnost jsou přesvědčivým důkazem příbuznosti rybmorek s touto skupinou mnohobuněčných živočichů. Uvnitř pólých váček jsou pólá vlákna, pomocí nichž se rybmorky přichytají na tělo svého hostitele (Siddall et al. 1995; Okamura et al. 2015). Jak je již zmíněno výše, aktinospora v definitivním hostiteli má odlišnou morfologii oproti myxosporě v mezihostiteli. Aktinospora je často triradiálně souměrná – má tvar triaktinomyxonu, který vzhledově připomíná kotvu. Další morfologické typy aktinospor popisuje obrázek 1. Uvnitř je sporoplasma, která obsahuje velké množství infekčních stádií (Lom & Dyková 1992).



Obr. 1: Schématické vyobrazení různých morfortypů aktinospor. (A) triaktinomyxon; (B), (C) aurantiaktinomyxon; (D), (E) neoaktinomyxon; (F), (G) tetraktinomyxon; (B), (D), (F) pohled ze shora; (C), (E), (G) boční pohled (převzato z: Yokoyama et al. 2012, upraveno).

Třída Myxosporae má mnoho morfortypů myxospor (obrázek 2). Určující morfologické znaky stěžejní pro zařazení myxosporae do rodu jsou např. tvar a charakter povrchu spory, tvar a počet pólových váčků, jejich symetrie a orientace (Lom & Dyková 2006; Okamura et al. 2015). Pro zařazení myxosporae do druhu je nutné sledovat další, ultrastrukturní znaky jako např. počet závitů pólových váčků nebo počet a tvar chlopní myxospor (Lom & Dyková 2006). V mnoha případech je možné danou sporu určit do druhu pouze na základě molekulárních dat (např. Lisnerová et al. 2020a).

Dalším z určovacích znaků, kromě morfologie myxospor, je mezihostitelská specifita. Většina myxozoí se specializuje na konkrétní čeleď nebo druh hostitelů (např. Molnár 1994; Liu et al. 2019; Lisnerová et al. 2020a). Jiným určujícím faktorem může být i tkáňová specifita. Jednotliví zástupci se většinou specializují na vývoj v určitých tkáních (např. Holzer et al. 2004). Důležité je potvrdit, že tkáň, kterou parazit infikuje, je opravdu místo definitivní infekce. Může se totiž jednat jen o neselektivní parazitismus, šíření spor z prasklé cysty nebo konzumaci kořisti napadené rybmorkami (Holzer et al. 2013; Atkinson et al. 2015). Pro zařazení zástupce do druhu je ale nutný kombinovaný přístup – jak molekulární analýzy, tak morfologie/morfometrie a ekologie parazita (např. rozlišení druhů *Chloromyxum legeri* Touraine, 1931 parazitující na kapru obecném (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) a *Chloromyxum fluviatile* Thélohan, 1892 parazitující na tolstolobiku bílém (*Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844)) (Bartošová & Fiala 2011)).



Obr. 2: Schématické vyobrazení různých morfotypů myxospor. (a) *Kudoa* sp.; (b) *Myxobolus* sp.; (c) *Sphaerospora* sp.; (d) *Chloromyxum* sp.; (e) *Thelohanellus* sp.; (f) *Ceratonova* sp.; (g) *Enteromyxum* sp.; (h) *Henneguya* sp. (převzato z: Paladini et al. 2017).

Klasifikace na základě morfologických vlastností má však spoustu omezení. Jedním z nich je nedostatek rozlišovacích znaků u stavebně jednodušších spor. Dalším z problémů je, že ani v současnosti nekorresponduje taxonomie na základě morfologie s fylogenezí skupin. Většina rodů je proto polyfyletických (např. Fiala 2006; Liu et al. 2019).

Podkmen Myxozoa zahrnuje v současnosti 65 rodů ve dvou třídách – Myxosporea a Malacosporea (Fiala et al. 2015b; Freeman & Kristmundsson 2018). Třída Malacosporea obsahuje pouze jednu čeleď a to Saccosporidae Canning et al., 1996 se dvěma rody – *Buddenbrockia* a *Tetracapsuloides*. Třída Myxosporea obsahuje 15 čeledí (např. Myxidiidae Thélohan, 1892, Sphaeromyxidae Lom & Noble, 1984, Myxobolidae Thélohan, 1892) z nichž druhově nejbohatší je právě čeleď Myxobolidae (Eiras et al. 2014; Okamura et al. 2015) (tabulka I).

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

Kmen: Cnidaria

Nezařazený podkmen: Myxozoa

Třída: Malacosporea

Řád: Malacovalvulida

Čeled': Saccosporidae: *Buddenbrockia*, *Tetracapsuloides*

Třída: Myxosporea

Řád: Bivalvulida

Podřád: Variisporina

Čeled': Sphaeromyxidae: *Sphaeromyxa*

Čeled': Myxidiidae: *Myxidium*, *Zschokkella*, *Enteromyxum*,
Sigmomyxa, *Soricimyxum*, *Cystodiscus*

Čeled': Ortholineidae: *Ortholinea*, *Neomyxobolus*,
Cardimyxobolus, *Triangula*, *Kentmoseria*

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

Čeled': Fabesporidae: *Fabespora*

Čeled': Ceratomyxidae: *Ceratomyxa*, *Meglitschia*, *Ellipsomyxa*,
Ceratonova

Čeled': Sphaerosporidae: *Sphaerospora*, *Wardia*, *Palliatius*

Čeled': Myxobilatidae: *Myxobilatus*, *Acauda*, *Hoferellus*

Čeled': Chloromyxidae: *Chloromyxum*, *Caudomyxum*, *Agarella*

Čeled': Coccomyxidae: *Coccomyxa*, *Auerbachia*, *Globospora*

Čeled': Alatosporidae: *Alatospora*, *Pseudoalatospora*, *Renispora*

Čeled': Parvicapsulidae: *Parvicapsula*, *Neoparvicapsula*,
Gadimyxa

Gadimyxa

Podřád: Platysporina

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

Řád: Multivalvulida

Čeled': Trilosporidae: *Trilospora*, *Unicapsula*

Čeled': Kudoidae: *Kudoa*

Čeled': Spinavaculidae: *Octospina*

Nejasné zařazení u Multivalvulida: *Trilosporoides*

3.2. Životní cyklus

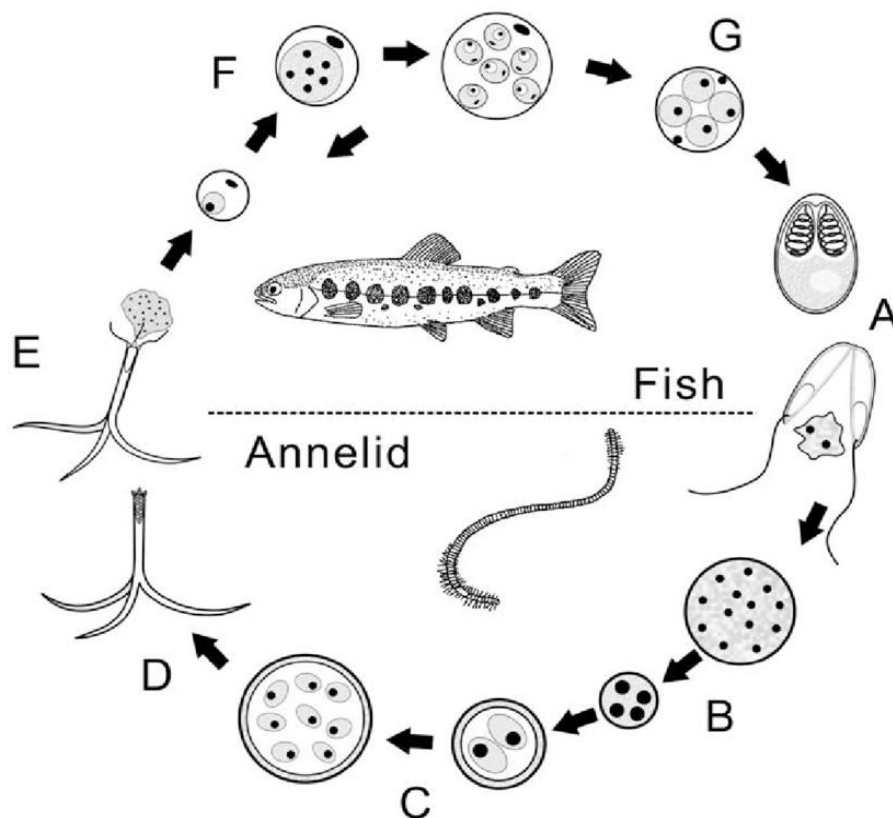
Rybomorky mají dixenní životní cyklus. Mezihostitelem je obratlovec, nejčastěji ryba, ve které se vytvářejí mnohobuněčné myxospory. Některá Myxozoa byla ale nalezena i u paryb, obojživelníků, plazů, ptáků, a dokonce i u savců (Bartholomew et al. 2008; Hartigan et al. 2012; Székely et al. 2016; Aguiar et al. 2017; Lisnerová et al. 2020b). Definitivním hostitelem je bezobratlý z kmene kroužkovců nebo mechovek (např. Wolf & Markiw 1984; Patra et al. 2017).

První rybomorka, u které se podařilo celý životní cyklus popsat, byl druh *Myxobolus cerebralis* Hofer, 1903 (Wolf & Markiw 1984). Ten se i v dnešní době běžně využívá jako modelový organismus pro demonstraci vývojového cyklu myxosporeí. Většina myxosporeí s kompletně popsaným životním cyklem spadá do sladkovodní větve (Fiala et al. 2015a). Pouze u několika druhů z mořské větve myxosporeí byl popsán celý jejich životní cyklus (mezi nimi například druhy: *Ceratomyxa auerbachii* Kabata, 1962, *Gadimyxa atlantica* Køie et al., 2007, *Sigmomyxa sphaerica* (Thélohan, 1895) a dva druhy z rodů *Parvicapsula* Shulman, 1953 a *Ellipsomyxa* Køie, 2003). Všichni tito zástupci i další zástupci mořského kladu infikují mořské kroužkovce skupiny Polychaeta Grube, 1850 (Køie et al. 2004; Køie et al. 2007; Køie et al. 2008).

Celý cyklus myxosporeí zahrnuje celkem dvě fáze: myxosporeovou a aktinosporeovou (Lom 1996). Každá fáze probíhá v jiném hostiteli a jejím výsledkem jsou morfologicky odlišné spory. Myxosporeová fáze začíná infekcí mezihostitele. Pomocí pólových váčku se aktinospora přichytí na tělo mezihostitele a uvolní sporoplasmu do těla ryby. Tuto část cyklu nazýváme presporogonická fáze. Sporoplasma dál proliferuje a výsledkem jsou sekundární endogenně vzniklé buňky, kdy uvnitř primárních buněk vznikají buňky sekundární. Tyto útvary jsou charakteristické právě pro skupinu Myxozoa. Buňky se následně množí a diferencují. Výsledkem jsou mnohobuněčná stádia, která migrují do tkání definitivní infekce. V tkáních se vyvíjí mnohojaderné útvary – plasmodia. Ta mohou být dvojího typu, podle místa infekce: histozoická (infikují tkáň, např. ledviny a játra) a coelozoická (infikují tělní dutiny, např. orgány vylučovací soustavy). Z plasmodií vznikají dalším dělením primárních a sekundárních buněk během sporogonické fáze finální myxospory (Wolf & Markiw 1984). Myxospory opouštějí svého mezihostitele, nejčastěji s močí močovými cestami. Infekční stádia mimo tělo hostitele uvolňují pólová vlákna a napadají definitivního hostitele (kroužkovce), ke kterému se pomocí vláken přichytí a do jehož těla vypouštějí infekční stádia. V definitivním hostiteli probíhá fáze aktinosporeová, která zahrnuje pohlavní rozmnožování parazita a vývoj skládající se ze 3 etap: schizogonie, gametogonie a

sporogonie. Během schizogonie dochází k přichycení spory na tělo definitivního hostitele, dochází k dělení sporoplasmy a výsledkem jsou vícejaderná stádia. Během gametogonie dochází k mitotickému i meiotickému dělení buněk, jejichž výsledkem je zygota. Z ní během sporogonie vznikají mitózou spory, ze kterých se následně vyvíjí aktinospora. Celý cyklus se tak uzavře, aktinospora opouští definitivního hostitele a je připravena infikovat meziphostitele (Lom & Dyková 2006). Kompletní životní cyklus myxosporeí popisuje obrázek 3.

Pro Malacosporea je životní cyklus kompletně popsán u dvou druhů – *Tetracapsuloides bryosalmonae* a *Tetracapsuloides vermiformis* Patra et al., 2017 (Feist et al. 2001; Morris & Adams 2006; Patra et al. 2017). Ten zahrnuje meziphostitele, rybu z řádu Salmoniformes Bleeker, 1859, Cypriniformes Bleeker, 1859 nebo Perciformes Bleeker, 1863 (Grabner & El-Matbouli 2008; Bartošová-Sojková et al. 2014) a definitivního hostitele, zástupce z kmene mechovek (Bryozoa Ehrenberg, 1831) (Canning et al. 2000).



Obr. 3: Životní cyklus myxosporeí zahrnující rybu jako meziphostitele a kroužkovce jako definitivního hostitele. (A) uvolnění pólových vláken, uchycení na těle hostitele; (B) gametogonie; (C) sporogonie; (D) uvolňování aktinospor do vody; (E) přilnutí aktinospory na tělo meziphostitele, vypuštění infekčních stádií do těla ryby; (F) presporogonická fáze – vznik sekundárních buněk uvnitř primárních; (G) sporogonická fáze (převzato z: Yokoyama et al. 2012).

3.3. Fylogenetické postavení

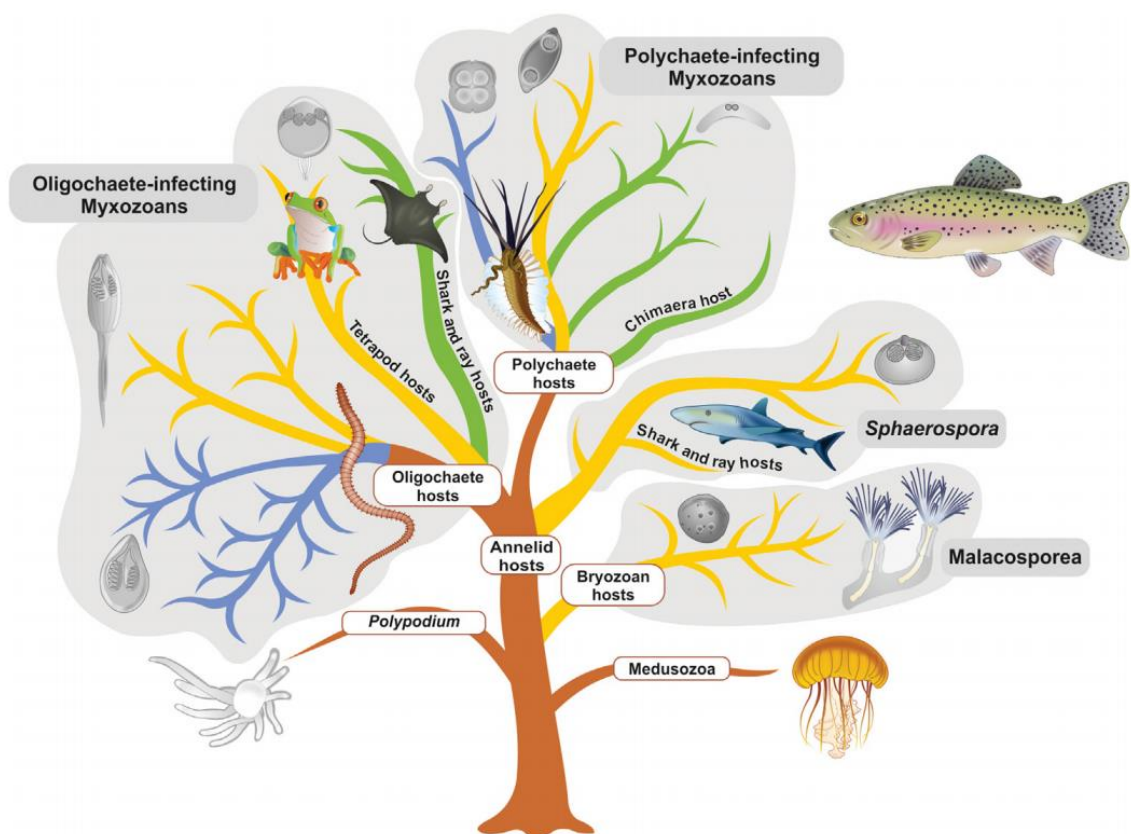
Myxozoa popsal Grassé jako samostatný kmen v roce 1970. Objevena byla ale už v roce 1825 (Jurine 1825). Konkrétně šlo o jednu ze dvou tříd rybomerek – Myxosporia. Pozice myxozoi ve fylogenezi byla dlouhou dobu nejasná. Důvodem byl neuvěřitelně pozměněný tvar těla a jeho redukce. V 2. polovině 19. století byla zařazena mezi Sporozoa (výtrusovce) (Bütschli 1882), tedy mezi Protista. I přes to, že první spekulace o mnohobuněčnosti myxozoi pochází již z konce 19. století (Štolc 1899) a v následujících letech byly tyto úvahy několikrát potvrzeny (např. Emery 1909; Ikeda 1912), byly rybomorky ještě dlouhou dobu řazeny i v odborné literatuře mezi jednobuněčné živočichy (např. Margulis & Schwartz 1998). Předpoklady, že rybomorky s mnohobuněčnými sporami patří mezi žahavce, byly potvrzeny až na základě fylogenetických analýz v kombinaci s ultrastrukturními poznatky (Jiménez-Guri et al. 2007).

Klasifikace rybomerek byla založena na morfoloických vlastnostech spor nalezených v mezihostitelích. Studie ukázaly, že taxonomie podložená strukturou spor a fylogenetické vztahy se liší. Příčinou jsou nejasné hranice mezi jednotlivými rody v rámci skupiny (Fiala 2006; Lom & Dyková 2006) a také fakt, že příbuznost druhů je založena na ekologii jejich výskytu, nikoli na stavbě spory. Příbuznost druhů je tedy založena na hostitelské a tkáňové specifitě a také na prostředí jejich výskytu – mořské nebo sladkovodní (Fiala 2006). Některá Myxozoa jsou schopna obývat oba typy prostředí. Mezi nimi jsou např. zástupci rodů *Chloromyxum* Mingazzini, 1890, *Myxidium* Bütschli, 1882, *Zschokkella* Auerbach, 1910 a *Sphaerospora* Thélohan, 1892 (např. Fiala & Dyková 2004; Bartošová et al. 2013; Heiniger & Adlard 2014; Matsche et al. 2020).

Rozdělení tříd Malacosporia a Myxosporia se shoduje s výsledky fylogenetických analýz, které byly provedeny pro gen SSU rDNA (Kent et al. 2001; Fiala 2006). Nízký počet známých druhů malakosporeí je ovlivněn především nedostatečným počtem vyšetřených hostitelů, což má vliv i na současné představy o fylogenezi této skupiny. Tato skupina zahrnuje pouze dva nominální rody (*Tetracapsuloides* a *Buddenbrockia*) představující oddělené fylogenetické linie, které se dále větví, ale fylogenetické vztahy uvnitř těchto skupin jsou vyřešené jen částečně (Tops et al. 2005; Grabner & El-Matbouli 2010). Není u nich patrná žádná fylogenetická korelace na základě hostitelské specifity, tkáňové specifity ani morfologie (Bartošová-Sojková et al. 2014). Rekonstrukce postupné evoluce druhé skupiny, myxosporeí, je rozdělena do 3 větví: mořské větve, která infikuje mořské kroužkovce skupiny Polychaeta, sladkovodní větve, jejíž definitivní hostitel je sladkovodní kroužkovec skupiny Oligochaeta Grube, 1850 a větve obsahující zástupce rodu *Sphaerospora* (Fiala 2006;

Fiala & Bartošová 2010). Počty známých druhů ve sladkovodní a mořské větvi skupiny Myxosporea jsou poměrně velké (Fiala & Bartošová 2010; Holzer et al. 2018) a vzhledem k tomu, že fylogenetické vztahy uvnitř těchto dvou skupin nekorespondují s morfologií spor, zástupci jednotlivých rodů se ve fylogenetických stromech neseskupují v oddělené linie a mnoho rodů je tak para- nebo polyfyletických (do kladu *Myxobolus* spadají na základě fylogenetických vztahů zástupci rodů *Myxobolus* Bütschli, 1882, *Henneguya* Thélohan, 1892, *Telohanellus* Kudo, 1933 a další) (např. Kent et al. 2001; Liu et al. 2019). Příbuznost druhů s odlišnou stavbou spor odhalily až fylogenetické analýzy. Jejich společným znakem často bývá hostitelská nebo tkáňová specifita. Například druhy *Myxidium giardi* Cépède, 1906, *Chloromyxum schurovi* Shulman & Ieshko, 2003 a *Myxobilatus gasterostei* Parisi, 1912 – mají odlišnou stavbu spory, ale všechny tyto druhy infikují ledviny a močový měchýř sladkovodních ryb a klastrují ve sladkovodním ledvinovém kladu (např. Paperna et al. 1987; Holzer et al. 2006; Atkinson & Bartholomew 2009).

U fylogenetické větve obsahující zástupce rodu *Sphaerospora* zatím není známý definitivní hostitel. I tato větev myxosporeí klastruje na základě ekologie – určující je hostitelská specifita. Další kofylogenetické analýzy také odhalují koevoluci mezi evolucí rodu *Sphaerospora* a evolucí rybích hostitelů z řádu máloostných (Cypriniformes). To naznačuje adaptaci parazita na svého hostitele (Patra et al. 2018). Fylogenetické vztahy skupiny Myxozoa ukazuje obrázek 4.



Obr. 4: Ilustrace fylogenetických vztahů v rámci skupiny Myxozoa a skupin blízce příbuzných – *Polypodium* a Medusozoa. Jsou vyznačeny čtyři hlavní linie myxozoi – Oligochaete-infecting group (skupina infikující kroužkovce skupiny Oligochaeta), Polychaete-infecting group (skupina infikující kroužkovce skupiny Polychateta), *Sphaerospora* a Malacospora. Barva větví naznačuje orgánovou a tkáňovou specifitu parazitů (žlutá – infikující ledviny, zelená – infikující žlučník a modrá – infikující tkáň) (převzato z: Alama-Bermejo & Holzer 2021).

3.4. Diverzita

Evoluce parazitů je ze značné části ovlivněna interakcí s hostiteli a jejich evolucí. Dalo by se tedy předpokládat, že fylogenetické stromy myxozoi a jejich hostitelů budou kongruentní, bude docházet ke kospeciám a kolonizaci hostitelů parazity. Myxozoa jsou parazité se složitým životním cyklem, a kromě střídání hostitelů zahrnuje diverzifikaci i nutnost přežití mimo tělo hostitele. Dalším faktorem významně ovlivňujícím jejich diverzitu je tedy okolní prostředí (Fiala et al. 2015a).

Diverzita myxozoi je stále velmi neprozkoumaná, a to jak ve slaných a sladkých vodách, tak i na souši (Bartošová-Sojková et al. 2014; Hartikainen et al. 2016; Okamura et al. 2018; Patra et al. 2018). V současnosti je popsáno přes 2600 druhů ryboborek

(Okamura et al. 2018) a všichni popsaní zástupci tedy výrazně přispívají k diverzitě žahavců (Myxozoa tvoří téměř 18 % celkové diverzity žahavců). Zvyšování diverzity je spojené zejména s odhalováním skryté diverzity pomocí sekvenování molekulárních markerů, dále s postupným objevováním životních cyklů v různých hostitelích, se zvyšujícím se počtem vyšetřených hostitelů u ohrožených a málo prozkoumaných druhů a s prozkoumáváním dosud neprozkoumaných oblastí (Lisnerová et al. 2020a, b). Hostitelské spektrum se bude nadále rozšiřovat s přibývajícím znalostmi o jejich cyklu. Bohužel, infekce rybmorkami není ve většině případů patrná na první pohled, proto jsou často infikovaní živočichové přehlíženi (Okamura et al. 2015).

Při studiu myxozoi a jejich diverzity je důležité kombinovat mikroskopické i molekulární metody. Ve spoustě případů nelze Myxozoa detekovat mikroskopicky a je tedy nutné využít molekulární screening (Lisnerová et al. 2020a). Naopak ke spoustě druhům existují morfologické záznamy, ale nejsou k nim molekulární data pro porovnání sekvencí (např. Eiras et al. 2005). Při studiu diverzifikace se uplatňuje i ekologie parazita – hostitelská a tkáňová specifita (kapitola 3.1. Morfologie a taxonomie).

Rody *Myxobolus* a *Henneguya* patří ve skupině Myxozoa mezi druhově nejbohatší rody. Téměř polovina celkové diverzity rybmerek je řazena právě do těchto rodů. U rodu *Myxobolus* je popsáno přibližně 900 druhů (Eiras et al. 2005; Eiras et al. 2014) a u rodu *Henneguya* je popsáno kolem 200 druhů (Eiras & Adriano 2012). Zástupci polyfyletického rodu *Myxobolus* mohou infikovat ryby sladkovodní i mořské (např. Li et al. 2012; Liu et al. 2019) a jsou schopni infikovat různé tkáně (Fiala et al. 2015a). Jejich spory jsou dorzoventrálně zploštělé, což může zapříčiňovat úspěšnost infekce jak v různých hostitelích, tak v různých tkáních (Lisnerová et al. 2020a). Fylogenetické vztahy této skupiny jsou, stejně jako je tomu i u ostatních skupin, založeny na specifitě rybiho hostitele (Liu et al. 2019) a místě infekce (např. Andree et al. 1999; Eszterbauer 2004).

Molekulární pozice byla determinována pro přibližně 23 % známých myxozoi (Holzer et al. 2018). Celkové množství druhů jednotlivých skupin rybmerek je dáno podmínkami, ve kterých žijí, a také životními cykly a hostiteli, ve kterých se vyskytují. U malakosporeí je biodiverzita nízká. To může být způsobeno i malou diverzifikací definitivních hostitelů – mechovek (Bartošová-Sojková et al. 2014).

V oblasti delty Rýna, kterou se zabývá tato bakalářská práce, byla zjištěna řada jednobuněčných parazitů – *Trichodina* sp., *Trypanosoma granulorum* Laveran & Mesnil, 1902 a další (Sures et al. 1999). Z metazoi byli nalezeni někteří parazitičtí helminti (např. *Acanthocephalus anguillae* (Müller, 1780)) (Sures & Streit 2001). Diverzita parazitických

žahavců v této oblasti není ale ještě dostatečně prozkoumaná. Existuje jen hrstka studií, které se zabývají zjišťováním spektra myxozoi v dané oblasti. Již dříve byly v této oblasti detekovány druhy: *Hoferellus alosae* Wünnemann et al., 2016, *Kudoa camarguensis* Pampoulie et al., 1999, *Myxidium giardi*, *Myxobolus cerebralis* a *Myxobolus* sp. (Pampoulie et al. 1999; Sures et al. 1999; Woo & Buchmann 2012; Wünnemann et al. 2016). Na území Nizozemska se podařilo popsat druhy *Myxidium macrocapsulatum* Schuurmans & Stekhoven, 1920 a *Myxidium rhomboideum* Schuurmans & Stekhoven, 1920 (Eiras et al. 2011).

Ryby, které byly v této bakalářské práci studovány z důvodu výskytu parazitů, jsou běžně myxozoi hostiteli a vyskytuje se u nich široké spektrum rodů (i druhů) rybomerek, např. sladkovodní Myxosporea rodů *Henneguya*, *Chloromyxum*, *Myxidium*, *Myxobolus*, *Sphaerospora* (Jaczó 1940; Eiras 2002; Eiras et al. 2005; Fiala 2006; Patra et al. 2018; Lisnerová et al. 2020a); sladkovodní Malacosporea rodů *Buddenbrockia*, *Tetracapsuloides* (Bartošová-Sojková et al. 2014) či dokonce mořský rod *Kudoa* Meglitsch, 1947 (Shpilev et al. 2005; Whipps & Kent 2006).

3.5. Hospodářský a ekonomický význam

Myxozoa, stejně jako jiní parazité, mají patogenní vliv na svého hostitele – rybu. Některé druhy myxozoi mají velký veterinární, hospodářský i ekonomický význam. Způsobují závažná onemocnění ryb a velké ztráty v rybích chovech. Mezi nejvýznamnější parazity patří například *Myxobolus cerebralis*. Ten způsobuje závažné onemocnění (tzv. vrtohlavost) lososovitých ryb, které se projevuje mimo jiné i deformací těla, zčernalým ocasem nebo tím, že se nakažená ryba pohybuje v kruzích (Hedrick et al. 1998). Dalším zástupcem parazitujícím na lososovitých rybách je *Kudoa thyrssites* (Gilchrist, 1924), která po smrti hostitele zapříčiňuje rozklad masa a tím způsobuje významné ekonomické škody (Kent & Poppe 1999). Mezi jednoho z nejvíce patogenních zástupců patří *Ceratonova shasta* (Noble, 1950) (syn. *Ceratomyxa shasta*), která také parazituje na lososovitých rybách. Nákaza se projevuje letargií, ztrátou hmotnosti nebo puchýřky na ledvinách ryby (Bartholomew et al. 1989). Ekonomicky významnou rybomorkou ze třídy Malacosporea je *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Tento druh způsobuje onemocnění zvané PKD (proliferative kidney disease), infikuje tedy převážně ledviny, které se s přítomností parazita zvětšují. Dalším patogenním projevem je například celková bledost ryby (Sterud et al. 2007; Wahli et al. 2007).

4. Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce bylo:

- 1) vypracovat rešerši na dané téma,
- 2) detekovat druhovou diverzitu skupiny Myxozoa (Myxosporea a Malacosporea) v získaných rybách v přehradních nádržích na soutoku řek Rýna a Mázy,
- 3) jejich morfologická a molekulární charakterizace (získat sekvence pro gen SSU rDNA),
- 4) z nasbíraných dat vytvořit fylogenetickou analýzu a vyhodnotit příbuzenské vztahy v rámci skupiny Myxozoa,
- 5) zjistit prevalenci jednotlivých druhů parazitů a výskyt myxozoí v odebraných tkáních/orgánech a na jednotlivých lokalitách.

V rámci této bakalářské práce jsem předpokládala, že: i) diverzita parazitických rybmomerek je v oblasti Rýna (v severozápadní Evropě) bohatší, než bylo ukázáno v dřívějších studiích; ii) nejběžnějším rodem v této oblasti je rod *Myxobolus*; iii) nejčastějším rybím hostitelem je plotice obecná (*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758)); iv) výskyt myxozoí je na všech třech vyšetřovaných lokalitách stejný.

Zjišťování biodiverzity i v malých oblastech může pomoci nejen odhalovat nové, skryté druhy, ale také pomoci při monitoringu těchto parazitů a jejich šíření spolu s invazními druhy ryb. Rozšíření poznatků o druhové biodiverzitě může pomoci při řešení důležitých otázek nejen v biologii a ekologii této skupiny, ale po zařazení druhů do fylogeneze také v problematice evoluce myxozoí a parazitismu.

Tato bakalářská práce je součástí širšího projektu Laboratoře rybí protistologie na Parazitologickém ústavu BC AV ČR a byla podpořena Studentskou grantovou agenturou a Grantovou agenturou České republiky (č. 19-28399X).

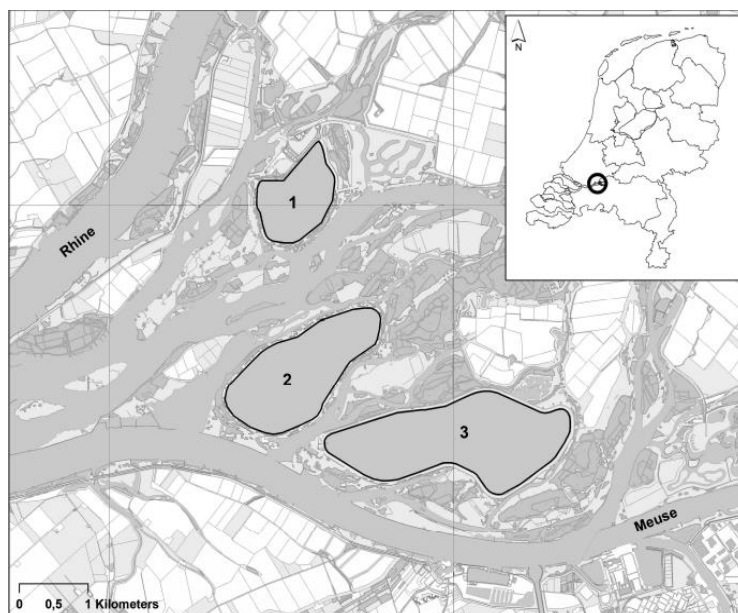
5. Metodika

5.1. Materiál

Celkem bylo vyšetřeno 112 ryb (tabulka II), které byly dodány ve zmraženém stavu kolegy z HBÚ BC AV ČR. Ze všech ryb byly odebrány tkáně – žábry, ledviny, svalovina a pokud to bylo možné, tak i žlučník (v jednom případě močový měchýř). Celkem tedy bylo odebráno a vyšetřeno 329 vzorků. Všechny ryby pocházely z oblasti Národního parku Biesbosch (jihovýchodní část Nizozemska). Tam jsou, na soutoku řek Rýna a Mázy, tři vzájemně propojené, uměle vytvořené vodní nádrže – De Gijster, Honderd en Dertig a Petrusplaat (obrázek 5). Tyto vodní nádrže vznikly v sedmdesátých letech minulého století jako zásobárna pitné a užitkové vody (Oskam 1982).

Tab. II: Vyšetřované ryby a jejich počty z jednotlivých oblastí. P – počet vyšetřených ryb.

De Gijster	P	Honderd en Dertig	P	Petrusplaat	P
<i>Anguilla anguilla</i> (Linnaeus, 1758)	1	<i>Aspius aspius</i> (Linnaeus, 1758)	4	<i>Gasterosteus aculeatus</i> Linnaeus, 1758	5
<i>Aspius aspius</i> (Linnaeus, 1758)	2	<i>Cobitis taenia</i> Linnaeus, 1758	2	<i>Leuciscus idus</i> (Linnaeus, 1758)	1
<i>Esox lucius</i> Linnaeus, 1758	1	<i>Coregonus oxyrhynchus</i> (Linnaeus, 1758)	2	<i>Neogobius melanostomus</i> (Pallas, 1814)	5
<i>Gymnocephalus cernuus</i> (Linnaeus, 1758)	5	<i>Gymnocephalus cernuus</i> (Linnaeus, 1758)	5	<i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus, 1758	5
<i>Leuciscus idus</i> (Linnaeus, 1758)	1	<i>Neogobius fluviatilis</i> (Pallas, 1814)	5	<i>Proterorhinus marmoratus</i> (Pallas, 1814)	5
<i>Neogobius fluviatilis</i> (Pallas, 1814)	1	<i>Neogobius melanostomus</i> (Pallas, 1814)	5	<i>Rutilus rutilus</i> (Linnaeus, 1758)	4
<i>Neogobius melanostomus</i> (Pallas, 1814)	5	<i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus, 1758	5	<i>Sander lucioperca</i> (Linnaeus, 1758)	5
<i>Osmerus eperlanus</i> (Linnaeus, 1758)	5	<i>Ponticola kessleri</i> (Günther, 1861)	2		
<i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus, 1758	5	<i>Proterorhinus marmoratus</i> (Pallas, 1814)	5		
<i>Ponticola kessleri</i> (Günther, 1861)	5	<i>Rutilus rutilus</i> (Linnaeus, 1758)	6		
<i>Proterorhinus marmoratus</i> (Pallas, 1814)	2	<i>Sander lucioperca</i> (Linnaeus, 1758)	4		
<i>Rutilus rutilus</i> (Linnaeus, 1758)	4				
	37		45		30



Obr. 5: Vodní nádrže v Národním parku Biesbosch (převzato z: Verstijnen et al. 2019).

5.2. Mikroskopická analýza

Na základě předchozích studií (např. Bartošová et al. 2013; Patra et al. 2018; Liu et al. 2019; Lisnerová et al. 2020a) byly vybrány rybomorkami nejčastěji infikované tkáně a odebrány (žábry, ledviny, svalovina, případně žlučník a močový měchýř). Všechny vzorky byly mikroskopicky vyšetřeny pomocí světelného mikroskopu Olympus BX51 (Tokyo, Japonsko). Pozitivní vzorky (fotografie spor a plasmodií) byly vyfotografovány při zvětšení 400x nebo 1000x za použití digitálního fotoaparátu Olympus DP70 (Tokyo, Japonsko) umístěném na mikroskopu Olympus BX51 (Tokyo, Japonsko). Měření (v μm) bylo prováděno dle publikace Loma a Arthura (1989) v programu ImageJ (verze 1.53e) (Rasband, <http://imagej.nih.gov/ij>). Hodnoty byly získány z 2–18 spor a 5 plasmodií a jsou znázorněny jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD), minimální/maximální rozsah v závorce.

Z mikroskopicky pozitivních vzorků byly připraveny histologické preparáty. Ty byly fixovány ve fixáži podle Davidsona a dále uchovávány v jeho zásobním roztoku. Materiál byl zpracován klasickou parafínovou metodou v Laboratoři rybí protistologie na Parazitologickém ústavu BC AV ČR.

5.3. Molekulární analýza

Všech 329 získaných vzorků bylo podrobena molekulární analýze.

5.3.1. Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí fenol-chloroformové metody. Kousek tkáně byl vložen do 400 μl Buffer TNES urea (pH = 8; 10mM Tris-HCl, 125mM NaCl, 10mM

ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0,5% sodium dodecyl sulphate (SDS), 4M urea). Do každého vzorku byly přidány 4 µl proteinázy K (100 µg/ml; Serva, Německo) a tato směs byla inkubována při 55 °C přes noc. Následně bylo přidáno 400 µl fenolu. Směsný roztok se míchal otáčením zkumavek po dobu 2 minut a následně byl centrifugován (9000 g) po dalších 10 minut. Došlo k oddělení dvou fází a jedné interfáze. Nejsvrchnější fáze obsahující DNA (přibližně 300 µl) byla oddělena do nových zkumavek a bylo dodáno 400 µl chloroformu. V dalším kroku byly vzorky opět otáčením 2 minut míchány a následně 10 minut centrifugovány (9000 g). Opět se vytvořily dvě fáze a jedna interfáze. Vrchní vrstva obsahující DNA (přibližně 300 µl) byla přepipetována do nových zkumavek. Následně byl přidán do každé zkumavky 1 ml vychlazeného 92% ethanolu (-20 °C). A následně proběhla další centrifugace při 14 000 g po dobu 10 minut. Na spodu zkumavky vznikl pelet obsahující DNA. Ethanol byl ze zkumavek odstraněn vylitím, následovalo propláchnutí ethanolom, kdy byl do každé zkumavky přidán 1 ml vychlazeného 70% ethanolu (-20 °C). Vzorky byly centrifugovány 10 min při 14 000 g. Zbylý ethanol byl vylit a zkumavky s peletem následně vysušeny v termobloku při 55 °C nebo přes noc při pokojové teplotě. DNA byla rozsuspendována ve 200 µl destilované vody.

5.3.2. PCR

Polymerázová řetězová reakce je běžně používaná metoda v molekulární biologii, která slouží k amplifikaci příslušného genu (Alberts et al. 2013). V mém případě byla použita nested PCR. V prvním kroku je použita sada vnějších primerů, jejichž výsledek je použit jako templát v druhém kroku. Výsledný amplifikovaný úsek je dále zpracováván jako klasická PCR (Carr et al. 2010).

Po provedení optimalizace PCR byla pro všechny provedené PCR použita TitTaq polymeráza (Takara Bio Europe/Clontech, Francie) pro Myxosporea a TaqPurple polymeráza (Top-Bio, Česká republika) pro Malacosporea. Spolu s nimi byly do reakční směsi přidány další chemikálie: pufr (TitTaq pufr: Takara Bio Europe/Clontech, Francie; TaqPurple pufr: Top-Bio, Česká republika), dNTP (Promega, USA), primery a destilovaná voda. Jako primery byly použity pro 1. run 18e a 18g. Pro 2. run MyxGP2F a Act1R pro Myxosporea a MalaF a MalaR pro Malacosporea. Sekvence jednotlivých primerů a cílové geny ukazuje tabulka III.

Tab. III: Sekvence použitých primerů.

Primer	Cílový gen	Sekvence (5' → 3')	Citace
18e	SSU rDNA	TGGTTGATCCTGCCAGT	Hillis & Dixon 1991
18g	SSU rDNA	GGTAGTAGCGACGGGCGGTGTG	Hillis & Dixon 1991
MyxGP2F	SSU rDNA	TGGATAACCGTGGGAAA	Kent et al. 1998
Act1R	SSU rDNA	AATTTACCTCTCGCTGCCA	Hallet & Diamant 2001
MalaF	SSU rDNA	AAACGARTAAGGTCCAGGTC	Grabner & El-Matbouli 2010
MalaR	SSU rDNA	CACCAGTGTAKCCCGCGT	Grabner & El-Matbouli 2010

Primery byly použity ve výsledné koncentraci 25 pmol/μl. Přesné množství jednotlivých složek reakční směsi pro Myxosporea a Malacosporea znázorňuje tabulka IV.

Tab. IV: Komponenty reakční směsi pro Myxosporea a Malacosporea a jejich množství.

Myxosporea		Malacosporea	
Komponenta	Objem (μl)	Komponenta	Objem (μl)
TitTaq polymeráza	0,05	TaqPurple polymeráza	0,40
Pufr	1,00	Pufr	1,00
dNTP	0,20	dNTP	0,20
primer F	0,20	primer F	0,20
primer R	0,20	primer R	0,20
voda	7,35	voda	7,00
DNA/PCR produkt	1,00	DNA/PCR produkt	1,00
Celkový objem reakce	10,00	Celkový objem reakce	10,00

Jednotlivé kroky PCR (teploty a čas v cycleru) zobrazuje tabulka V.

Tab. V: Cyklus polymerázové řetězové reakce pro Myxosporea a Malacosporea. Pro Myxosporea byl cyklus opakován 35x (1. run a 2. run), pro Malacosporea byl cyklus opakován 35x (1. run) a 40x (2. run).

Kroky PCR	Myxosporea		Malacosporea	
	1. run	2. run	1. run	2. run
Počáteční denaturace	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min	95 °C / 3 min
Denaturace	95 °C / 1 min	94 °C / 50 s	95 °C / 1 min	94 °C / 1 min
Nasedání primerů	62 °C / 1 min	58 °C / 50 s	62 °C / 1 min	64 °C / 30 s
Extenze / elongace	68 °C / 2 min	72 °C / 1 min 30 s	72 °C / 2 min	72 °C / 30 s
Finální elongace	68 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min	72 °C / 5 min
Chlazení	12 °C / ∞	12 °C / ∞	12 °C / ∞	12 °C / ∞

5.3.3. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza je separační metoda makromolekul (DNA, RNA a proteinů), která využívá jejich záporného náboje. V elektrickém poli se tak, v mém případě DNA, pohybuje ke kladné elektrodě (Alberts et al. 2013).

K samotné analýze amplifikovaných PCR produktů byl použit 1% agarózový gel. Ten byl připraven za pomoci agarózy a TAE pufru. Obě složky byly smíchány, aby výsledný produkt byl o koncentraci právě 1 %. Vzniklá směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě po dobu 1–2 minut, aby se agaróza kompletně rozpustila. Směs byla následně ochlazená pod tekoucí vodou a do ochlazené směsi byl přidán Ethidium bromide (1 μ l na 20 μ l gelu; Top-Bio, Česká republika). Hotová směs byla nalita do připravených elektroforetických vaniček a gel se nechal ztuhnout cca 20 minut. Do připravených jamek bylo po utužení gelu napipetováno 10 μ l PCR produktů. DNA byla dělena při 100 V po dobu 25–30 minut. PCR produkty byly zkontrolovány pomocí přístroje s UV spektrem. Délka výsledných fragmentů byla odhadnuta pomocí žebříčku (2-log ladder; Promega, USA).

5.3.4. Extrakce PCR produktů z gelu

Pozitivní vzorky o délce cca 900 bp byly z gelu vyřezány přečištěny za pomoci kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., USA). Oproti protokolu od výrobce byl výsledný produkt rozpuštěn v destilované vodě.

5.3.5. Sekvenace

Amplifikované fragmenty DNA získané z gelu pomocí extrakčního kitu byly sekvenovány přímo firmou SeqMe s.r.o (Dobříš, Česká republika) pomocí Sangerova sekvenování. Amplikony byly sekvenovány se stejnými forward a reverse primery, které byly použity při samotné PCR.

5.3.6. Fylogenetické analýzy

Pro sestavení fylogenetických stromů byly nejprve vytvořeny dva datasey sekvencí: první zahrnující vybrané zástupce všech kladů sladkovodních linie myxosporeí (75 sekvencí), druhý zaměřující se na druhy z velmi početného kladu *Myxobolus* (86 sekvencí). Datasetsy se skládaly z mnou získaných sekvencí a sekvencí pocházející z databáze GenBank. Při tvorbě datasetu bylo vždy vybráno jen několik zástupných sekvencí z každého kladu (pro *Myxobolus* clade dle Liu et al. (2019)). Tento postup byl použit z důvodu přehlednosti výstupů. Tyto dva datasetsy byly alignovány pomocí metody E-INS-i v programu MAFFT verze v6.864b (Kato et al. 2002) implementovaný v programu Geneious prime 2019.0.4 a manuálně upraveny (odstranění inzertů a nehomologních úseků) do výsledných alignmentů (délka po úpravě 1594 bp pro Myxosporea, respektive 830 bp pro rod *Myxobolus*). Výsledný alignment pro rod

Myxobolus je kratší z důvodu použití většího množství sekvencí po kratší částečnou sekvenci pro daný gen. Fylogenetické analýzy byly provedeny pomocí dvou metod: i) maximum likelihood (ML), ii) Bayesovskou metodou, Bayesovskou inferencí (BI). ML stromečky byly sestaveny v programu RAxML v7.0.3 (Stamatakis 2006), který byl implementován do programu Geneious prime 2019.0.4 s GTR+ Γ modelem evoluce vybraným pomocí jModelTest2 (Posada 2008). Bootstrap podpory byly počítány z 1000 replikátů. BI byla provedena v programu MrBayes v3.0 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) s GTR modelem evoluce ve čtyřech paralelních řetězcích Markov Chain Monte Carlo (MCMC) s každým uloženým 100. stromem (program taktéž implementován v Geneious prime 2019.0.4). Stromy byly vizualizovány v programu FigTree verze v1.4.4 (Rambaut 2009) a graficky upraveny v programu Inkscape verze 1.0.2 (Harrington 2004–2005).

Dále byl vytvořen dataset obsahující pouze mnou získané sekvence (10 sekvencí; finální délka alignmentu 841 bp). Fylogenetická analýza byla provedena pomocí metody ML stejně jako v prvních dvou případech, jak je popsáno výše. Tento jednoduchý strom byl použit pro manuální namapování fylogeneze na geografii oblasti odkud dané vzorky pochází, respektive pro vytvoření představ o prevalenci.

5.3.7. Výpočet prevalence a výskytu myxozoi

Prevalence, neboli výskyt daného parazita v daném rybím hostiteli, byla počítána jako podíl PCR pozitivních jedinců a všech jedinců daného hostitelského druhu, případně celková prevalence pro daný druh parazita jako podíl PCR pozitivních hostitelů a všech hostitelských jedinců, ve kterých byl daný parazit detekován.

Výskyt myxozoi v jednotlivých tkáních/orgánech byl počítán jako podíl PCR pozitivních vzorků a všech vzorků dané tkáně. Výskyt myxozoi na jednotlivých lokalitách byl počítán jako podíl PCR pozitivních jedinců a všech hostitelských jedinců z dané lokality. Celkový výskyt myxozoi pro všechny tři lokality byl spočítán jako podíl PCR pozitivních jedinců a všech vyšetřených hostitelů.

6. Výsledky

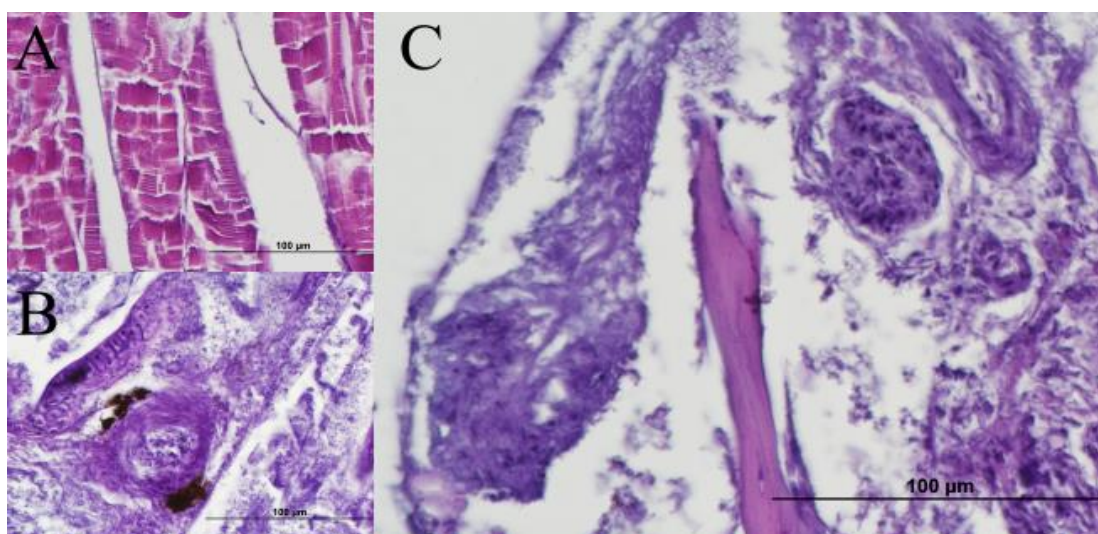
6.1. Mikroskopická analýza

Byla provedena parazitologická pitva 112 ryb ze tří přehradních nádrží v deltě řeky Rýna (kapitola 5.1. Materiál, tabulka II). Mikroskopicky se podařilo parazity prokázat u 15 vzorků z 9 ryb. Na základě tvaru spor a znaků dalších vývojových stádií byla nalezená Myxozoa přiřazena k rodům *Myxobolus* a *Myxidium*. Mikroskopicky nalezené rybmorky, jejich hostitele a hostitelské tkáně shrnuje tabulka VI.

Tab. VI: Mikroskopicky nalezená Myxozoa a jejich hostitelé z vodních nádrží De Gijster a Honderd en Dertig.

De Gijster			Honderd en Dertig		
Druh ryby	Tkáň	Druh rybmorky	Druh ryby	Tkáň	Druh rybmorky
<i>Esox lucius</i>	močový m.	<i>Myxidium lieberkuehni</i>	<i>Aspius aspius</i> /4	žábry	<i>Myxobolus</i> sp. 7
<i>Leuciscus idus</i> /1	žábry	<i>Myxobolus</i> sp. 1	<i>Aspius aspius</i> /4	ledviny	<i>Myxobolus</i> sp. 8
<i>Rutilus rutilus</i> /1	žábry	<i>Myxobolus</i> sp. 2	<i>Rutilus rutilus</i> /3	ledviny	<i>Myxobolus</i> sp. 9
<i>Rutilus rutilus</i> /1	svalovina	<i>Myxobolus</i> sp. 3	<i>Rutilus rutilus</i> /4	žábry	<i>Myxobolus</i> sp. 10
<i>Rutilus rutilus</i> /2	svalovina	<i>Myxobolus</i> sp. 4	<i>Rutilus rutilus</i> /4	ledviny	<i>Myxobolus</i> sp. 11
<i>Rutilus rutilus</i> /4	žábry	<i>Myxobolus</i> sp. 5	<i>Rutilus rutilus</i> /4	svalovina	<i>Myxobolus</i> sp. 12
<i>Rutilus rutilus</i> /4	ledviny	<i>Myxobolus</i> sp. 6	<i>Rutilus rutilus</i> /8	žábry	<i>Myxobolus</i> sp. 13
			<i>Rutilus rutilus</i> /8	ledviny	<i>Myxobolus</i> sp. 14

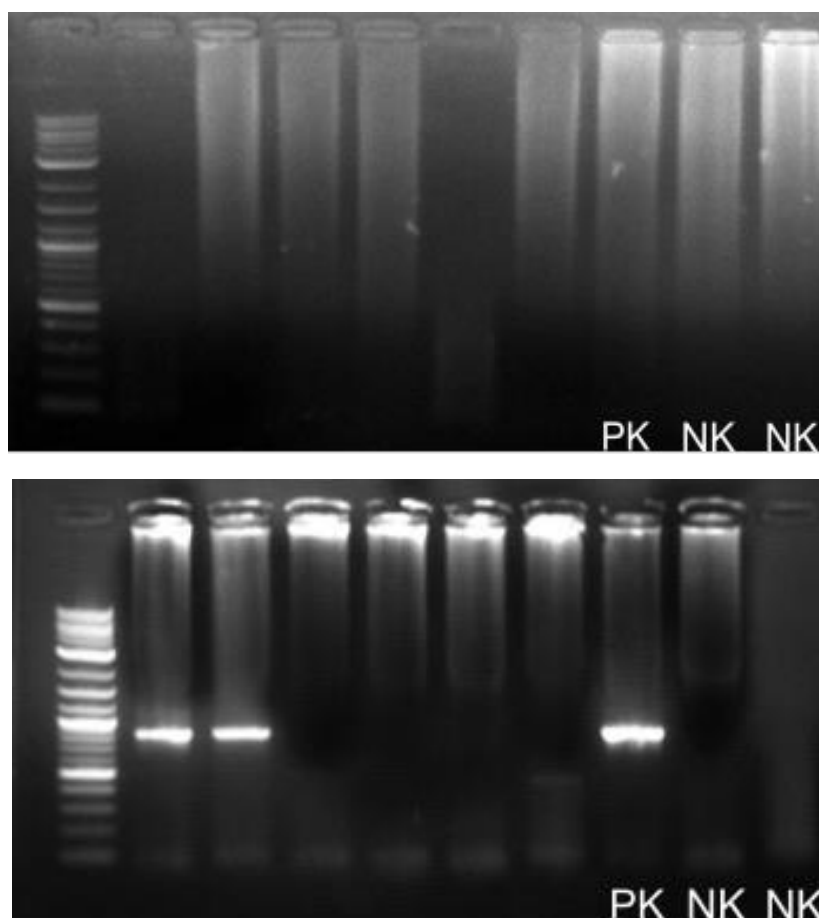
Příprava histologických preparátů ze zmrazeného materiálu se ukázala jako velmi nekvalitní (obrázek 6 (A)), i přesto se ale podařilo odhalit plasmodia *Myxobolus* sp. na žábřích plotice obecné (obrázek 6 (B), (C)).



Obr. 6: Histologické vyšetření svaloviny a žaber. (A) ukázka poničení tkáně svaloviny vlivem zamražení ryby; (B) a (C) ukázka plasmodií *Myxobolus* sp. na žábřích plotice obecné, použité měřítko 100 µm.

6.2. Molekulární analýza

Dle hostitelského spektra a očekávaných rodů a druhů parazitů byly vybrány dvě kombinace primerů. Jedna z kombinací amplifikuje vybraný úsek SSU rDNA u myxosporeí, obecně; druhá kombinace amplifikuje SSU rDNA u malakosporeí. Tyto dvě kombinace byly zkoušeny u mikroskopicky pozitivních i negativních (výběr) vzorků; pro zajištění co nejlepších výsledků byly taktéž testovány různé druhy polymeráz (TitTaq polymeráza (Takara Bio Europe/Clontech, Francie), TaqPurple polymeráza (Top-Bio, Česká republika) a Blue Hot Star polymeráza (Bioneer, Jižní Korea). Gely s optimalizací ukazuje obrázek 7.



Obr. 7: Testování vhodné polymerázy pro skupinu Myxosporea: Agarózový gel za použití TaqPurple polymerázy (nahore) a TitTaq polymerázy (dole). Výsledné produkty mají délku cca 900 bp. PK – pozitivní kontrola; NK – negativní kontroly.

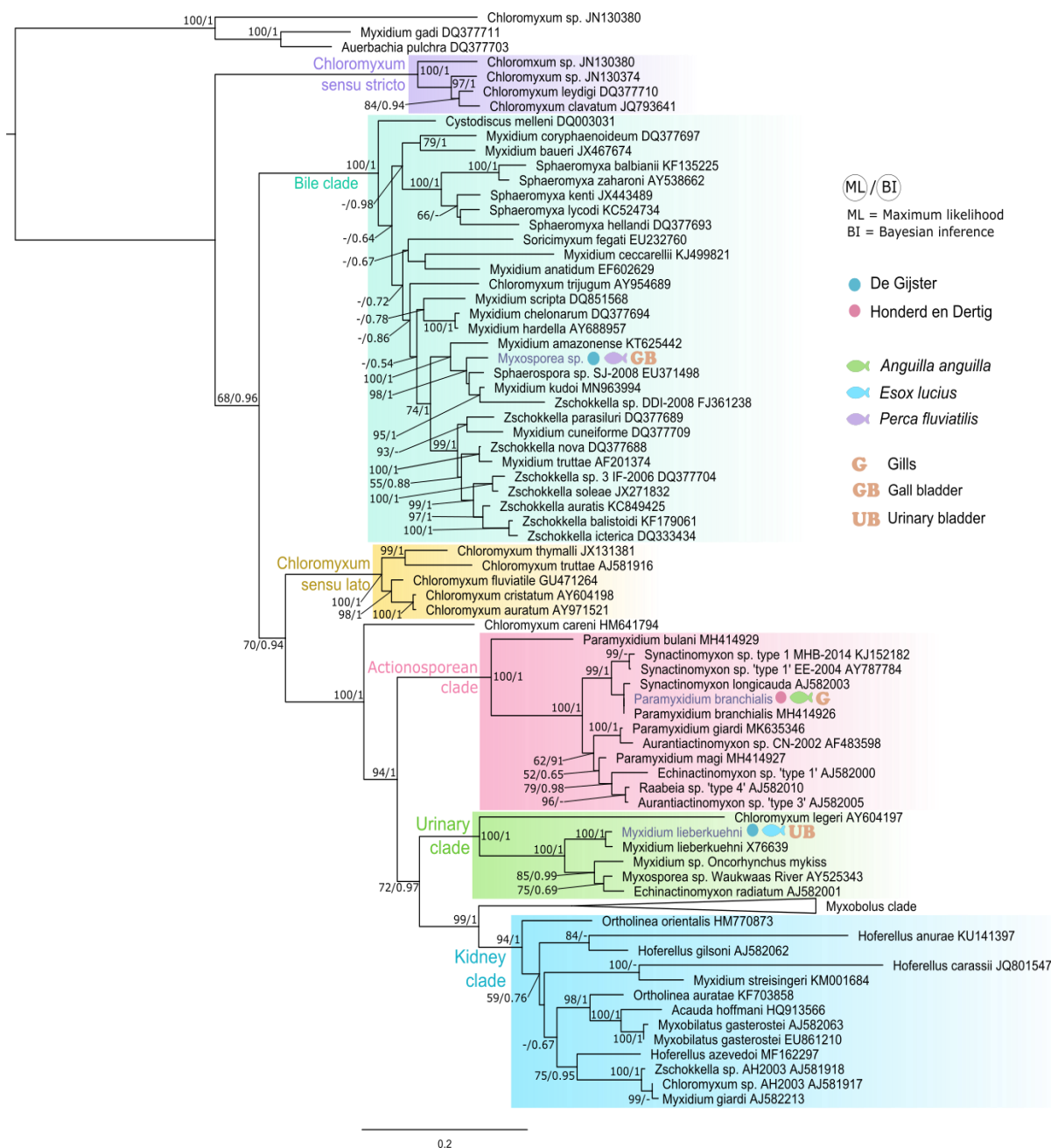
Jako nejoptimálnější varianta byla zvolena TaqPurple polymeráza pro Malacospora a TitTaq polymeráza pro Myxosporea (obrázek 7).

Pomocí polymerázové řetězové reakce se podařilo detekovat pozitivitu 37 vzorků z celkových 329. Na obrázku 7 (dole) je ukázka gelu s pozitivními vzorky a amplifikovaným úsekem o délce cca 900 bp. Na základě genu SSU rDNA a následnou analýzou pomocí metod ML a BI byla zjištěna přítomnost sedmi druhů a jednoho komplexu druhů. Čtyři druhy byly

popsány již dříve: *Myxidium lieberkuehni* Bütschli, 1882 ze štiky obecné (*Esox lucius*), *Myxobolus portucalensis* Saraiva & Molnár, 1990 ze sekavce písečného (*Cobitis taenia*) (původně popsáno z úhoře říčního (*Anguilla anguilla*)), *Myxobolus fundamentalis* Molnár et al., 2010 z plotice obecné (*Rutilus rutilus*) pozorován v mikroskopické analýze jako *Myxobolus* sp. 2 a *Myxobolus* sp. 10 a *Paramyxidium branchialis* Freeman & Kristmundsson, 2018 z úhoře říčního (*Anguilla anguilla*). Dále byla potvrzena přítomnost komplexu *Myxobolus pseudodispar* z hostitele plotice obecné (*Rutilus rutilus*). V mém případě do tohoto komplexu spadají tři mnou osekvenované druhy (dva z nich pozorovány v mikroskopické analýze jako *Myxobolus* sp. 3, *Myxobolus* sp. 5, *Myxobolus* sp. 6, *Myxobolus* sp. 11 a *Myxobolus* sp. 12). *Myxobolus pseudodispar* s označením 1 je sekvenčně totožný s dříve získanou sekvencí AF380145, stejně tak *Myxobolus pseudodispar* s označením 3 a sekvence EF466088; respektive *Myxobolus pseudodispar* s označením 2 a sekvence KU340991.

Během studie byly objeveny tři sekvenčně nové druhy. Dva z nich se na základě morfologie spor nebo molekulární analýzy podařilo přiřadit k rodu *Myxobolus*. Pro jeden z nich (s označením *Myxobolus* sp. 2), který byl v mikroskopické analýze pozorován jako *Myxobolus* sp. 1, *Myxobolus* sp. 7, *Myxobolus* sp. 8 a *Myxobolus* sp. 13, existuje morfologický záznam a byla provedena morfometrická analýza spor z mezihostitele. Ke druhému zástupci (s označením *Myxobolus* sp. 1) neexistují žádné morfologické záznamy. K poslednímu nalezenému druhu se nepodařilo získat žádné fotografie, na základě fylogenetických analýz se ho podařilo zařadit do žlučnickového kladu (Bile clade), ale nelze jej jasně přiřadit k rodu (u myxozoí jsou poly- a parafyletické rody velmi časté a klasifikace neodpovídá fylogenezi skupin).

Obě provedené analýzy (ML a BI) vedou pouze k jiným podporám jednotlivých větví, ale topologické vztahy relevantní pro mou studii se v rámci skupiny Myxosporea nemění. Všechny získané sekvence klastrují s vysokou podporou ve sladkovodní větvi skupiny Myxosporea. Druh *Myxidium lieberkuehni* spadá do větve infikující močový měchýř (Urinary clade), *Paramyxidium branchialis* do větve sekvencí známých převážně z kroužkoveců a environmentu (Environmental/Actinosporean clade). Největší druhové zastoupení bylo nalezeno v myxobolí skupině (7 druhů) (*Myxobolus* clade), z nichž tři spadají do komplexu druhů *Myxobolus pseudodispar*. Jedna ze sekvencí klastruje v myxosporeové větvi infikující žlučník (Bile clade). Fylogenetické vztahy v rámci skupiny Myxosporea popisuje obrázek 8. Detailnější fylogenetická analýza byla provedena pro rod *Myxobolus* (obrázek 9).



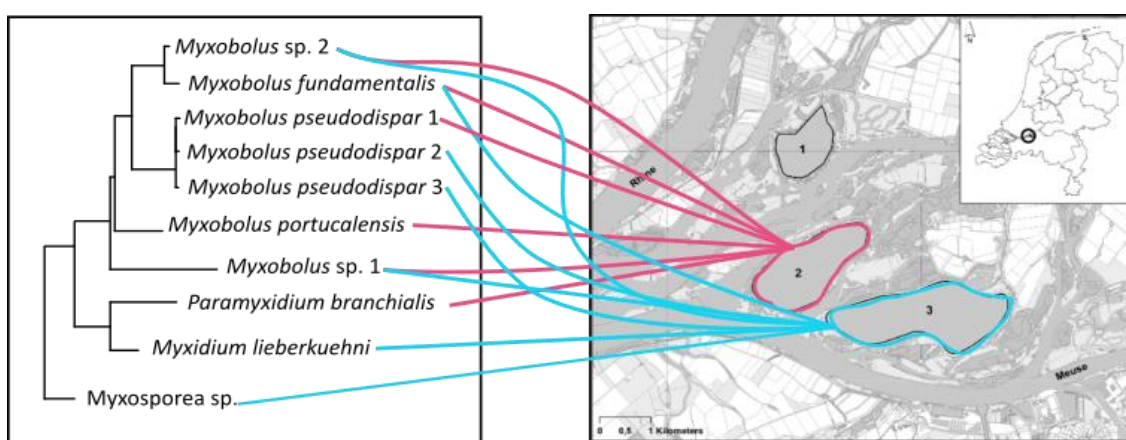
Obr. 8: Fylogenetické vztahy v rámci skupiny Myxosporea založené na SSU rDNA. Podpory jednotlivých větví jsou označeny jako ML/BI. Hodnoty ML < 50 a BI < 0.5 jsou označeny symbolem “-”; barevné kolečko označuje lokalitu; barevná rybička označuje druh ryby (barvy vyznačeny v legendě); tkáň je označena písmeny: G – žábry, GB – žlučník, UB – močový měchýř. Mnou získané sekvence jsou vyznačeny fialovým písmem. Jako outgroup byla zvolena skupina myxosporeí infikující mořské kroužkovce skupiny Polychaeta. Kódy sekvencí z GenBank jsou uvedeny za názvem u každého taxonu.



Obr. 9: Fylogenetické vztahy v rámci rodu *Myxobolus* založené na SSU rDNA. Podpory jednotlivých větví jsou označeny jako ML/BI. Hodnoty ML < 50 a BI < 0.5 jsou označeny symbolem “-”; barevné kolečko označuje lokalitu; barevná rybička označuje druh ryby (barvy vyznačeny v legendě); tkáň je označena písmeny: G – žábry, K – ledviny, M – svalovina. Mnou získané sekvence jsou vyznačeny fialovým písmem. Jako outgroup byl zvolen druh *Hoferellus carassii*. Kódy sekvencí z GenBank jsou uvedeny za názvem u každého taxonu.

6.3. Fylogeneze a geografie

Z namapování fylogenetických vztahů na geografickou mapu oblasti, odkud dané vzorky pocházejí (jednoduchá fylogeografie), nevyplývají žádné jasné trendy a závěry. Na obou pozitivně testovaných lokalitách (Honderd en Dertig a De Gijster; označení 2 a 3) bylo nalezeno po pěti druzích myxozoí a jeden komplex druhů; velká část výskytu druhů rodu *Myxobolus* se překrývá. Výskyt druhů z komplexu *Myxobolus pseudodispar* se liší. Na lokalitě 2 se podařilo detekovat pouze zástupce s označením *Myxobolus pseudodispar* 1, na lokalitě 3 zástupce s označením *Myxobolus pseudodispar* 2 a *Myxobolus pseudodispar* 3. Na lokalitě 1 (Petrusplaat) se nepodařilo detekovat žádné parazity (obrázek 10).



Obr. 10: Fylogenetické vztahy nalezených parazitů manuálně namapované na geografickou mapu oblasti původu hostitelů (převzato z: Verstijnen et al. 2019, upraveno).

6.4. Charakterizace nalezených druhů třídy Myxosporea

Na základě získaných molekulárních a morfologických dat je možno charakterizovat druhy popsané/determinované níže. Jeden z druhů je označen pouze jako *Myxosporea* sp. a nelze jakkoliv charakterizovat, v tomto výčtu chybí (nepovedlo se jej zachytit morfologicky a molekulární analýza pomohla k zařazení do fylogenetické skupiny, ale ne rodu).

Kmen (phylum): Cnidaria Hatschek, 1888

Podkmen (subphylum): Myxozoa Grassé, 1970

Třída (class): Myxosporea Bütschli, 1881

Řád (order): Bivalvulida Shulman, 1959

Čeleď (family): Myxidiidae Thélohan, 1892

Rod (genus): *Myxidium* Bütschli, 1882

Druh (species): *Myxidium lieberkuehni* Bütschli, 1882

Hostitel: štika obecná (*Esox lucius* Linnaeus, 1758)

Orgán/tkáň: močový měchýř

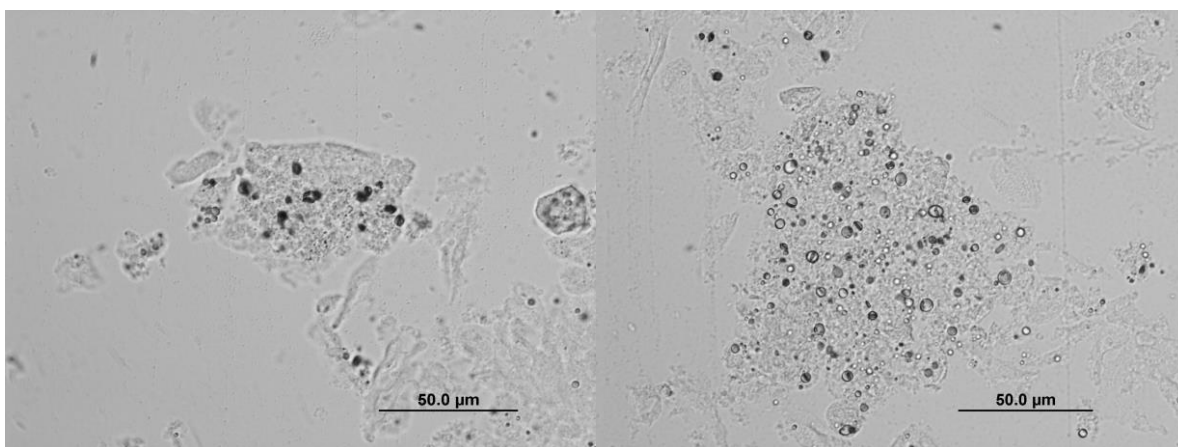
Prevalence: 100 % (1/1)

Lokalita: Nizozemsko; NP Biesbosch (51°44" N; 4°46" E); lokalita 3 (51°68" N; 4°80" E)

Charakterizace molekulárních dat: Částečná sekvence SSU rDNA o délce 1099 bp.

Morfologický popis plasmodií a spor (obrázek 11): Plasmodium nepravidelného tvaru; spory nepozorovány.

- délka plasmodia: $103,3 \pm 20,6 \mu\text{m}$ (75,0–122,8 μm); (n = 5; 1 jedinec)
- šířka plasmodia: $68,2 \pm 22,3 \mu\text{m}$ (44,2–102,9 μm); (n = 5; 1 jedinec)



Obr. 11: Plasmodia druhu *Myxidium lieberkuehni*, použité měřítko 50 μm .

Poznámky: Kvalita zdokumentovaných plasmodií je ovlivněna povahou dostupného materiálu (zamražené ryby). Na základě morfologie plasmodia, hostitelského druhu, tkáně a SSU rDNA dat byl tento druh přiřazen k druhu *Myxidium lieberkuehni*.

Kmen (phylum): Cnidaria Hatschek, 1888

Podkmen (subphylum): Myxozoa Grassé, 1970

Třída (class): Myxosporea Bütschli, 1881

Řád (order): Bivalvulida Shulman, 1959

Čeleď (family): Myxobolidae Thélohan, 1892

Rod (genus): *Myxobolus* Bütschli, 1882

Druh (species)/označení: *Myxobolus* sp. 1

Hostitel: okoun říční (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758), plotice obecná (*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758))

Orgán/tkáň: žábry, ledviny

Prevalence: 17 % (5/29); okoun říční 20 % (3/15), plotice obecná 14 % (2/14)

Lokalita: Nizozemsko; NP Biesbosch (51°44" N; 4°46" E); lokalita 2 a 3 (51°73" N; 4°77" E a 51°68" N; 4°80" E)

Charakterizace molekulárních dat: Částečná sekvence SSU rDNA o délce 859 bp.

Morfologický popis plasmodií a spor: Morfologický popis není k dispozici, tento druh se podařilo zjistit pouze molekulární analýzou.

Poznámky: Jedná se o druh, který je molekulárně unikátní a nebyla nalezena shoda (obrázek 9) (nejpodobnější druh dle fylogenetických analýz: *Myxobolus bizerti* AY129318; shoda: 70,5 %). Bez morfologických dat nelze určit, zda by se mohlo jednat o druh popsáný dříve. Dle dostupné literatury byly z těchto hostitelů popsány tyto druhy (a neexistují pro ně porovnatelná molekulární data): *M. guyenoti* Naville, 1928 (hostitel okoun říční), *M. chernovae* (Chernova, 1970), *M. marginatus* Kulemina, 1969 (v obou případech hostitel plotice obecná). Dle fylogenetického postavení by se taktéž mohlo jednat o zástupce rodu *Henneguya*. Z těchto hostitelů byly popsány tyto druhy bez molekulárních dat: *H. similis* Zandt, 1924 a *H. texta* (Cohn, 1895) Labbé, 1899 (hostitel v obou případech okoun říční) (Eiras 2002; Eiras et al. 2005) (detaily morfologie a ekologie v tabulce VII).

Kmen (phylum): Cnidaria Hatschek, 1888

Podkmen (subphylum): Myxozoa Grassé, 1970

Třída (class): Myxosporea Bütschli, 1881

Řád (order): Bivalvulida Shulman, 1959

Čeleď (family): Myxobolidae Thélohan, 1892

Rod (genus): *Myxobolus* Bütschli, 1882

Druh (species)/označení: *Myxobolus* sp. 2

Hostitel: bolen dravý (*Aspius aspius* (Linnaeus, 1758)), candát obecný (*Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758)), hlavačka mramorovaná (*Proterorhinus marmoratus* (Pallas, 1814)), jelec jesen (*Leuciscus idus* (Linnaeus, 1758)), ježdík obecný (*Gymnocephalus cernuus* (Linnaeus, 1758)), plotice obecná (*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758))

Orgán/tkáň: žábry, ledviny, svalovina

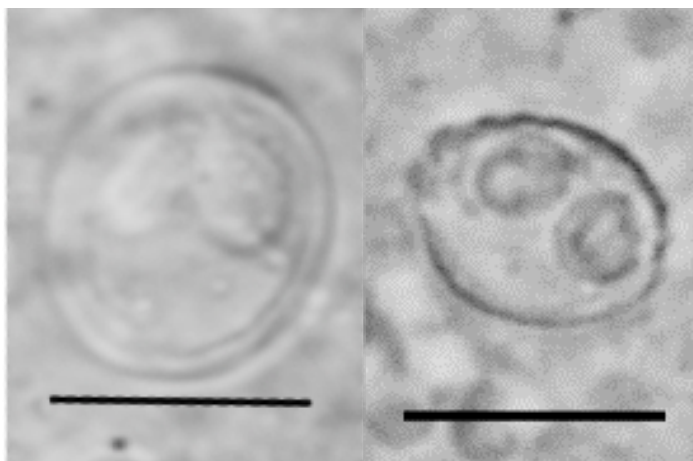
Prevalence: 13 % (7/53); bolen dravý 33 % (2/6), candát obecný 11 % (1/9), hlavačka mramorovaná 8 % (1/12), jelec jesen 50 % (1/2), ježdík obecný 10 % (1/10), plotice obecná 7 % (1/14)

Lokalita: Nizozemsko; NP Biesbosch (51°44" N; 4°46" E); lokalita 2 a 3 (51°73" N; 4°77" E a 51°68" N; 4°80" E)

Charakterizace molekulárních dat: Částečná sekvence SSU rDNA o délce 845 bp.

Morfologický popis plasmodií a spor (obrázek 12): Spory oválného tvaru; stejně velké pólové váčky se 4–5 pólovými závity (n=4); plasmodia nepozorována.

- délka spor: $11,8 \pm 1,4 \mu\text{m}$ (9,9–14,5 μm); (n=10; 3 jedinci)
- šířka spor: $9,5 \pm 2,5 \mu\text{m}$ (6,7–12,4 μm); (n=5; 3 jedinci)
- tloušťka spor: $6,6 \pm 1,0 \mu\text{m}$ (5,8–12,4 μm); (n=6; 3 jedinci)
- délka pólových váčků: $4,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (3,5–5,0 μm); (n=9; 3 jedinci)
- šířka pólových váčků: $2,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (2,1–3,0 μm); (n=9; 3 jedinci)



Obr. 12: Spory druhu *Myxobolus* sp. 2, použité měřítko 10 μm .

Poznámky: Tento druh je molekulárně unikátní a nebyla nalezena přesná shoda (nejpodobnější druh dle fylogenetických analýz: *Myxobolus* sp. GA1 KU170934; shoda: 99 %, ke kterému neexistuje morfologický záznam). Z příslušných hostitelů bylo popsáno 23 druhů (Eiras 2005; Eiras et al. 2014; Liu et al. 2016; Batueva 2020), pro 8 z nich neexistují porovnatelná molekulární data (tabulka VII).

Oproti druhu *M. kuleminae* Donec in Shulman, 1984 (délka spory: 15,0–19,5 μm , šířka spory: 12,0–15,0 μm , tloušťka spory: 8,0–9,1 μm) jsou mnou měřené spory kratší (v průměru 11,8 μm), užší (v průměru 9,5 μm) a hubenější (v průměru 6,6 μm). Mnou měřené pólové váčky jsou kratší (v průměru 4,1 μm) a užší (v průměru 2,8 μm) oproti druhu *M. kuleminae* (délka pólových váčků: 7,0–9,0 μm , šířka pólových váčků: 4,0–5,0 μm). *M. heterocapsulatus* Jaczó, 1940 má shodně dlouhé spory, měřené spory jsou ale širší (v průměru 9,5 μm) oproti druhu *M. heterocapsulatus* (v průměru 7,7 μm), tloušťka spor je shodná. Pólové váčky jsou kratší (v průměru 4,1 μm) a užší (v průměru 2,8 μm) oproti druhu *M. heterocapsulatus* (délka pólových váčků v průměru: 6,3 μm , šířka pólových váčků: 5,0 μm). Spory druhu *M. magnus* Awerinzev, 1913 jsou delší, širší a tlustší (38,0–45,0 μm , 32,0–38,0 μm , 28,0–35,0 μm) oproti druhu *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 11,8 μm , 9,5 μm , 6,6 μm). Pólové váčky druhu *M. magnus* jsou delší (15,0–17,0 μm) oproti druhu *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 4,1 μm). Spory druhu

M. improvisus Izyumova in Shulmani, 1966 jsou kratší (6,5–7,7 µm) oproti druhu *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 11,8 µm), šířka spor je shodná, spory jsou hubenější (4,6–5,6 µm) oproti druhu *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 6,6 µm). Pólové váčky jsou kratší (2,0–4,1 µm) oproti druhu *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 4,1 µm). Spory *M. guyenoti* Naville, 1928 jsou delší (14,5–16,0 µm) oproti druhu *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 11,8 µm), širší (11,0–12,0 µm) oproti druhu *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 9,5 µm). Pólové váčky jsou delší (7,0–8,0 µm) a širší oproti pólovým váčkům druhu *Myxobolus* sp. 2 (4,1 µm v průměru na délku a 2,8 µm na šířku). Spory druhu *M. chernovae* (Chernova 1970) Landsberg & Lom, 1991 jsou delší (12,0–14,0 µm) oproti druhu *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 11,8 µm), stejně široké. Pólové váčky jsou delší (5,5 µm) oproti druhu *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 4,1 µm) a širší (3,0–4,0 µm) oproti druhu *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 2,8 µm). Spory druhu *M. marginatus* Kulemina, 1969 jsou kratší, užší a hubenější (8,5–10,0 µm, 5,0–7,0 µm, 4,0 µm) oproti druhu *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 11,8 µm, 9,5 µm, 6,6 µm). Pólové váčky jsou stejně dlouhé a užší (1,4–1,7 µm) oproti *Myxobolus* sp. 2 (v průměru 2,8 µm) (Eiras et al. 2005; Eiras et al. 2014). Druhy *M. diversicapsularis* Slukhkaï in Shulman, 1996, *M. dujardini* (Thélohan, 1892) Landsberg & Lom, 1991, *M. pseudodispar* Gorbunova, 1936, *M. elegans* Kashkovski in Shulman, 1966, *M. rutili* Donec & Tozzyakova in Shulmani, 1984, *M. alvareaze* Cech et al., 2012, *M. cycloides* Gurley, 1893, *M. feisti* Molnár et al., 2008, *M. fundamentalis* Molnár et al., 2010, *M. intimus* Zaïka, 1965, *M. sommervillae* Molnár et al., 2010, *M. wootteni* Molnár, et al., 2010, *M. sandrae* Reuss, 1906, *M. mucosus* Liu et al., 2016 a *M. zaïkae* Batueva, 2020 se s druhem *Myxobolus* sp. 2 neshodují sekvenčně, tudíž není třeba porovnávat morfologie jejich spor. Na základě porovnání morfologických dat bylo zjištěno, že už dříve byl popsán druh se shodnými morfometrickými údaji: *Myxobolus strelkovi* Kostarev & Kulemina, 1971 (tabulka VII). Neexistují ale k němu molekulární data pro porovnání. Tento druh se shoduje v morfologii a morfometrii spory a odpovídá tkáň i parazitovaný hostitel.

Kmen (phylum): Cnidaria Hatschek, 1888

Podkmen (subphylum): Myxozoa Grassé, 1970

Třída (class): Myxosporea Bütschli, 1881

Řád (order): Bivalvulida Shulman, 1959

Čeleď (family): Myxobolidae Thélohan, 1892

Rod (genus): *Myxobolus* Bütschli, 1882

Druh (species)/označení: *Myxobolus pseudodispar* 1

Hostitel: plotice obecná (*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758))

Orgán/tkáň: ledviny, svalovina

Prevalence: 7 % (1/14)

Lokalita: Nizozemsko; NP Biesbosch (51°44" N; 4°46" E); lokalita 2 (51°73" N; 4°77" E)

Charakterizace molekulárních dat: Částečná sekvence SSU rDNA o délce 828 bp.

Morfologický popis plasmodií a spor (obrázek 13): Spory oválného tvaru; nestejně velké pólové váčky se 4–5 pólovými závity (n=6); plasmodia nepozorována.

- délka spor: $13,7 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (12,2–14,6 μm); (n=11; 1 jedinec)
- šířka spor: $8,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$ (7,0–9,3 μm); (n=9; 1 jedinec)
- tloušťka spor: $6,9 \pm 0,0 \mu\text{m}$ (6,9–6,9 μm); (n=2; 1 jedinec)
- délka velkých pólových váček: $6,7 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (6,0–7,2 μm); (n=11; 1 jedinec)
- šířka velkých pólových váček: $3,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ (3,2–3,9 μm); (n=11; 1 jedinec)
- délka malých pólových váček: $5,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$ (4,5–5,8 μm); (n=11; 1 jedinec)
- šířka malých pólových váček: $2,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (2,5–2,9 μm); (n=11; 1 jedinec)



Obr. 13: Spory *Myxobolus pseudodispar* 1, použité měřítko 10 μm .

Poznámky: Měřené spory byly delší (13,7 μm v průměru) než spory druhu *M. pseudodispar* v původním popisu (10,0–12,0 μm) (Gorbunova 1936), šířka spor (8,5 μm v průměru) odpovídá původnímu popisu druhu, měřené spory jsou tlustší (6,9 μm v průměru) oproti původnímu popisu (5,3–6,0 μm). Větší pólové váčky jsou v průměru delší (6,7 μm) oproti původnímu popisu (4,5–6,2 μm), šířka (3,5 μm v průměru) odpovídá původnímu popisu (3,0–3,7 μm). Menší pólové váčky jsou v průměru užší (2,7 μm) oproti původnímu popisu druhu (3,0–3,7 μm), délka (5,3 μm v průměru) odpovídá původnímu popisu (4,5–6,2 μm). Molekulárně se shoduje z 99,7 % na daném úseku se sekvencí *Myxobolus pseudodispar* AF380145. Pro tuto sekvenci není zveřejněná morfometrie pro porovnání.

Kmen (phylum): Cnidaria Hatschek, 1888

Podkmen (subphylum): Myxozoa Grassé, 1970

Třída (class): Myxosporea Bütschli, 1881

Řád (order): Bivalvulida Shulman, 1959

Čeleď (family): Myxobolidae Thélohan, 1892

Rod (genus): *Myxobolus* Bütschli, 1882

Druh (species)/označení: *Myxobolus pseudodispar* 2

Hostitel: plotice obecná (*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758))

Orgán/tkáň: ledviny, svalovina

Prevalence: 21 % (3/14)

Charakterizace molekulárních dat: Částečná sekvence SSU rDNA o délce 805 bp.

Lokalita: Nizozemsko; NP Biesbosch (51°44" N; 4°46" E); lokalita 3 (51°68" N; 4°80" E)

Morfologický popis plasmodií a spor: Morfologický popis není k dispozici, tento druh se podařilo zjistit pouze molekulární analýzou. Molekulárně se shoduje ze 100 % na daném úseku se sekvencí *Myxobolus pseudodispar* KU340991.

Kmen (phylum): Cnidaria Hatschek, 1888

Podkmen (subphylum): Myxozoa Grassé, 1970

Třída (class): Myxosporea Bütschli, 1881

Řád (order): Bivalvulida Shulman, 1959

Čeleď (family): Myxobolidae Thélohan, 1892

Rod (genus): *Myxobolus* Bütschli, 1882

Druh (species)/označení: *Myxobolus pseudodispar* 3

Hostitel: plotice obecná (*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758))

Orgán/tkáň: žábry, ledviny, svalovina

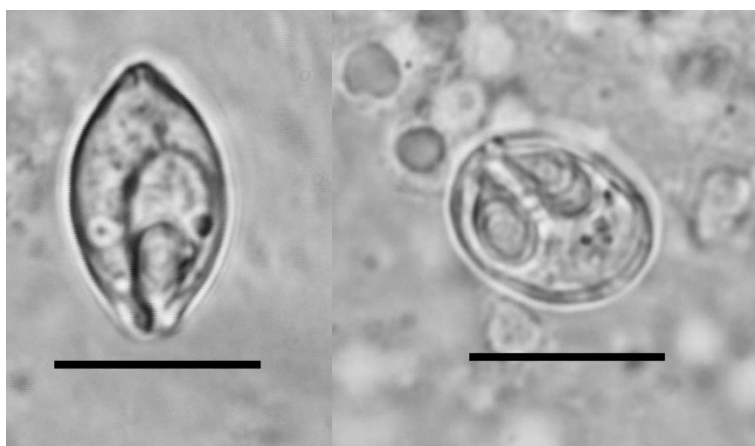
Prevalence: 14 % (2/14)

Lokalita: Nizozemsko; NP Biesbosch (51°44" N; 4°46" E); lokalita 3 (51°68" N; 4°80" E)

Charakterizace molekulárních dat: Částečná sekvence SSU rDNA o délce 822 bp.

Morfologický popis plasmodií a spor (obrázek 14): Spory oválného tvaru; stejně velké pólové váčky se 4–5 pólovými závity (n=4); plasmodia nepozorována.

- délka spor: $11,2 \pm 1,3 \mu\text{m}$ (9,5–13,2 μm); (n=18; 2 jedinci)
- šířka spor: $7,4 \pm 0,9 \mu\text{m}$ (6,2–9,0 μm); (n=15; 2 jedinci)
- tloušťka spor: $7,4 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (7,3–7,5 μm); (n=3; 2 jedinci)
- délka pólových váčků: $5,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (4,8–5,7 μm); (n=12; 3 jedinci)
- šířka pólových váčků: $2,9 \pm 0,4 \mu\text{m}$ (2,3–3,5 μm); (n=12; 3 jedinci)



Obr. 14: Spory druhu *Myxobolus pseudodispar* 3, použité měřítko 10 μm .

Poznámky: Rozměry spor a pólových váčků odpovídají původnímu popisu (Gorbunova 1936). Molekulárně se shoduje z 99,7 % na daném úseku se sekvencí *Myxobolus pseudodispar* EF466088.

Kmen (phylum): Cnidaria Hatschek, 1888

Podkmen (subphylum): Myxozoa Grassé, 1970

Třída (class): Myxosporea Bütschli, 1881

Řád (order): Bivalvulida Shulman, 1959

Čeleď (family): Myxobolidae Thélohan, 1892

Rod (genus): *Myxobolus* Bütschli, 1882

Druh (species): *Myxobolus fundamentalis* Molnár et al., 2010

Hostitel: plotice obecná (*Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758))

Orgán/tkáň: žábry

Prevalence: 14 % (2/14)

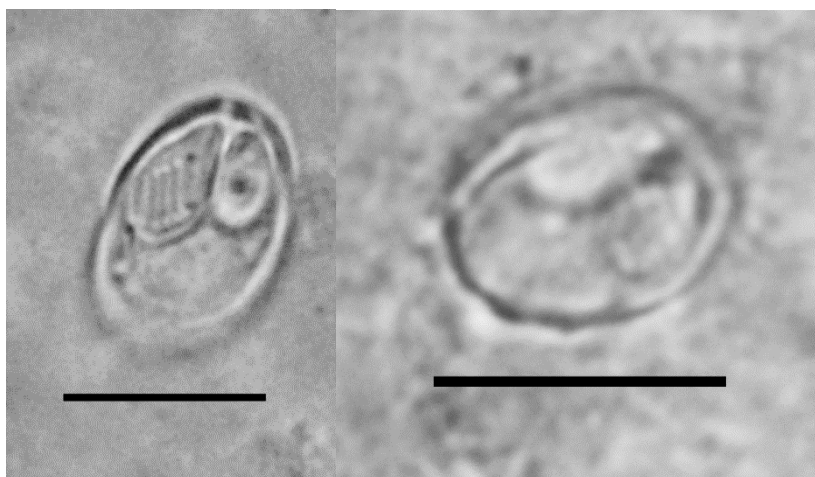
Lokalita: Nizozemsko; NP Biesbosch (51°44" N; 4°46" E); lokalita 2 a 3 (51°73" N; 4°77" E a 51°68" N; 4°80" E)

Charakterizace molekulárních dat: Částečná sekvence SSU rDNA o délce 849 bp.

Morfologický popis plasmodií a spor (obrázek 15): Spory oválného tvaru; nestejně velké pólové váčky se 4–5 pólovými závity (n=4); plasmodia nepozorována.

- délka spor: $12,1 \pm 1,8 \mu\text{m}$ (9,8–14,2 μm); (n=9; 2 jedinci)
- šířka spor: $7,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (7,0–9,1 μm); (n=6; 2 jedinci)
- tloušťka spor: $6,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (5,4–6,9 μm); (n=3; 2 jedinci)
- délka velkých pólových váčků: $6,0 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (5,0–7,5 μm); (n=10; 2 jedinci)
- šířka velkých pólových váčků: $3,0 \pm 0,4 \mu\text{m}$ (2,4–3,7 μm); (n=10; 2 jedinci)
- délka malých pólových váčků: $4,6 \pm 0,6 \mu\text{m}$ (4,0–5,5 μm); (n=10; 2 jedinci)

- šířka malých pólových váčků: $2,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$ (2,2–3,0 μm); (n=10; 2 jedinci)



Obr. 15: Spory druhu *Myxobolus fundamentalis*, použité měřítko 10 μm .

Poznámky: Měřené spory jsou v průměru o 3,4 μm kratší a o 4,3 μm užší; pólový váček je v průměru o 0,7 μm kraší a o 1,0 μm užší než je v původním popisu druhu. Hostitelské spektrum a molekulární data (SSU rDNA shodná z 99,8 % na daném úseku se sekvencí *Myxobolus fundamentalis* KF515725) odpovídají původnímu popisu (Molnár et al. 2010).

Kmen (phylum): Cnidaria Hatschek, 1888

Podkmen (subphylum): Myxozoa Grassé, 1970

Třída (class): Myxosporea Bütschli, 1881

Řád (order): Bivalvulida Shulman, 1959

Čeleď (family): Myxobolidae Thélohan, 1892

Rod (genus): *Myxobolus* Bütschli, 1882

Druh (species): *Myxobolus portucalensis* Saraiva & Molnár, 1990

Hostitel: sekavec písečný (*Cobitis taenia* Linnaeus, 1758)

Orgán/tkáň: žábry

Prevalence: 50 % (1/2)

Lokalita: Nizozemsko; NP Biesbosch (51°44" N; 4°46" E); lokalita 2 (51°73" N; 4°77" E)

Charakterizace molekulárních dat: Částečná sekvence SSU rDNA o délce 891 bp.

Morfologický popis plasmodií a spor: Morfologický popis není k dispozici, tento druh se podařilo zjistit pouze molekulární analýzou. Molekulárně se shoduje ze 100 % na daném úseku se sekvencí *Myxobolus portucalensis* AF085182.

Kmen (phylum): Cnidaria Hatschek, 1888

Podkmen (subphylum): Myxozoa Grassé, 1970

Třída (class): Myxosporea Bütschli, 1881

Řád (order): Bivalvulida Shulman, 1959

Čeleď (family): Myxidiidae Thélohan, 1892

Rod (genus): *Paramyxidium* Freeman & Kristmundsson, 2018

Druh (species): *Paramyxidium branchialis* Freeman & Kristmundsson, 2018

Hostitel: úhoř říční (*Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758))

Orgán/tkáň: žábry

Prevalence: 100 % (1/1)

Lokalita: Nizozemsko; NP Biesbosch (51°44" N; 4°46" E); lokalita 2 (51°73" N; 4°77" E)

Charakterizace molekulárních dat: Částečná sekvence SSU rDNA o délce 1174 bp.

Morfologický popis plasmodií a spor: Morfologický popis není k dispozici, tento druh se podařilo zjistit pouze molekulární analýzou. Molekulárně se shoduje ze 100 % na daném úseku se sekvencí *Paramyxidium branchialis* MH414926.

Tab. VII: Soupis porovnávaných druhů rodů *Myxobolus* a *Henneguya* a druhů získaných v této práci s jejich morfometrickými údaji.

Druh	LS (µm)	WS (µm)	TS (µm)	LPC (µm)	WPC (µm)	Molekulární data
<i>H. similis</i> Zandt, 1924	18,0–32,0 (LSB); 7,5–12,8 (LS)	5,7–10,0	37,0–60,0	2,0–2,8		n
<i>H. texta</i> (Cohn, 1895) Labbé, 1899	30,0–40,0 (LSB); 8,0 (LS)		7,0–8,0	2,0–3,0		n
<i>M. alvarezae</i> Cech et al., 2012	11,7 ± 0,4 (11,3–12,6)	6,8 ± 0,3 (6,5–7,6)	6,4 ± 0,4 (6,1–6,9)	6,7 ± 0,3 (6,1–7,2)	2,3 ± 0,1 (2,0–2,5)	a
<i>M. cycloides</i> Gurley, 1893	14,1 ± 0,4 (13,0–15,2)	10,4 ± 0,1 (9,8–11,1)	7,6 ± 0,5 (7,2–8,5)	5,2 ± 0,2 (4,1–6,5)	3,3 ± 0,5 (3,0–4,0)	a
<i>M. diversicapsularis</i> Slukhkai in Shulman, 1996	8,5–13,0	8,5–12,5	6,0	3,8–5,5	2,2–3,7	a
<i>M. dujardini</i> (Thélohan, 1892) Landsberg & Lom, 1991	12,0–13,0	7,0–8,0				a
<i>M. elegans</i> Kashkovski in Shulman, 1966	13,5–17,0	7,4–10,0	7,4–8,0	6,8–8,0	2,5–3,5	a
<i>M. feisti</i> Molnár et al., 2008	11,7 (11,5–13,2)	10,0 (9,4–10,8)	6,7 (6,6–7,0)	6,2 (6,0–6,3)	3,7 (3,3–4,0)	a
<i>M. fundamentalis</i> Molnár et al., 2010	15,5 ± 0,8 (14,4–17,0)	11,8 ± 0,6 (11,2–13,2)	9,2 ± 0,3 (9,0–9,6)	6,7 ± 0,2 (6,5–7,2)	4,0 ± 0,3 (3,7–4,3)	a
<i>M. guyenoti</i> Naville, 1928	14,5–16,0	11,0–12,0		7,0–8,0	3,0–4,0	n
<i>M. heterocapsulatus</i> Jaczó, 1940	12,2 (11,0–14,1)	7,7 (7,5–7,6)	6,0	6,3 (6,0–7,0)	5,0	n
<i>M. chernovae</i> (Chernova, 1970) Landsberg & Lom, 1991	12,0–14,0	9,0–11,0		5,5	3,0–4,0	n

<i>M. improvisus</i> Izyumova in Shulmani, 1966	6,5–7,7	7,5–9,3	4,6–5,6	2,0–3,3		n
<i>M. intimus</i> Zaika, 1965	13,5 ± 0,6 (12,6–14,7)	9,2 ± 0,4 (8,6–9,7)	8,0 ± 0,4 (7,0–8,5)	5,5 ± 0,4 (4,8–6,2)	3,4 ± 0,5 (2,9–4,8)	a
<i>M. kuleminae</i> Donec in Shulman, 1984	15,0–19,5	12,0–15,0	8,0–9,1	7,0–9,0	4,0–5,0	n
<i>M. magnus</i> Awerinzev, 1913	38,0–45,0	32,0–38,0	28,0–35,0	15,0–17,0		n
<i>M. marginatus</i> Kulemina, 1969	8,5–10,0	5,0–7,0	4,0	3,0–4,0	1,4–1,7	n
<i>M. mucosus</i> Liu et al., 2016	13,6 ± 0,6 (12,8–14,2)	10,7 ± 0,5 (10,3–11,4)	7,8 ± 0,4 (7,2–8,3)	5,9 ± 0,2 (5,7–6,3)	1,6 ± 0,2 (1,5–1,8)	a
<i>M. pseudodispar</i> Gorbunova, 1936	10,0–12,0	7,0–9,5	5,3–6,0	4,5–6,2	3,0–3,7	a
<i>M. rutili</i> Donec & Tozzyakova in Shulmani, 1984	14,0–16,5	10,5–13,5	7,4–9,5	4,8–8,4	3,0–4,5	a
<i>M. sandrae</i> Reuss, 1906	9,3 (9,2–10,0)	7,8 (7,2–8,2)	4,0–5,0	3,5 (3,5–4,0)	2,0 (1,7–2,2)	a
<i>M. sommervillae</i> Molnár et al., 2010	11,8 ± 1,0 (10,5–13,5)	9,7 ± 0,8 (8,4–11,2)	7,2 ± 0,4 (6,6–7,5)	6,0 ± 0,4 (5,4–6,7)	3,3 ± 0,4 (3,0–4,2)	a
<i>M. strelkovi</i> Kostarev & Kulemina, 1971	8,0–12,2	6,0–11,0	4,0–7,0	3,3–5,4	2,0–4,1	n
<i>M. wootteni</i> Molnár et al., 2010	13,3 ± 1,0 (11,6–15,0)	11,6 ± 0,7 (10,2–13,0)	5,7 ± 0,4 (5,5–6,0)	6,2 ± 0,8 (5,0–7,0)	3,9 ± 0,5 (3,0–4,4)	a
<i>M. zaikae</i> Batueva, 2020	11,4 ± 0,1 (10,2–14,0)	10,3 ± 0,1 (9,6–11,0)	6,3 ± 0,1 (5,8–7,1)	4,5 ± 0,1 (3,4–5,2)	2,9 ± 0,0 (2,6–3,3)	a
<i>Myxobolus fundamentalis</i>	12,1 ± 1,8 (9,8–14,2)	7,5 ± 0,8 (7,0–9,1)	6,4 ± 0,8 (5,4–6,9)	6,0 ± 0,8 (5,0–7,5); 4,6 ± 0,6 (4,0–5,5)	3,0 ± 0,4 (2,4–3,7); 2,6 ± 0,3 (2,2–3,0)	a
<i>Myxobolus pseudodispar</i> 1	13,7 ± 0,8 (12,2–14,6)	8,5 ± 0,7 (7,0–9,3)	6,9 ± 0,0 (6,9–6,9)	6,7 ± 0,3 (6,0–7,2); 5,3 ± 0,4 (4,5–5,8)	3,5 ± 0,2 (3,2–3,9); 2,7 ± 0,1 (2,5–2,9)	a
<i>Myxobolus pseudodispar</i> 3	11,2 ± 1,3 (9,5–13,2)	7,4 ± 0,9 (6,2–9,0)	7,4 ± 0,1 (7,3–7,5)	5,2 ± 0,3 (4,8–5,7)	2,9 ± 0,4 (2,3–3,5)	a
<i>Myxobolus</i> sp. 2	11,8 ± 1,4 (9,9–14,5)	9,5 ± 2,5 (6,7–12,4)	6,6 ± 1,0 (5,8–12,4)	4,1 ± 0,5 (3,5–5,0)	2,8 ± 0,3 (2,1–3,0)	a

Tab. VII (pokračování): Soupis porovnávaných druhů rodů *Myxobolus* a *Henneguya* a druhů získaných v této práci s jejich morfologickými (provnání pólových váčků a počet pólových závitů v nich) a ekologickými (infikovaný hostitel, tkáň a lokalita popisu).

Druh	PC	NC	Infikovaný orgán	Hostitel	Lokalita/stát popisu	Citace
<i>H. similis</i> Zandt, 1924			žábry	<i>Perca fluviatilis</i>	Německo	(Eiras 2002)
<i>H. texta</i> (Cohn, 1895) Labbé, 1899			žábry	<i>Perca fluviatilis</i>	Německo	(Eiras 2002)
<i>M. alvarezae</i> Cech et al., 2012	=	6	žábry	<i>Leuciscus idus</i> , <i>Aspius aspius</i> , <i>Carassius auratus</i>	Maďarsko	(Eiras et al. 2014)

<i>M. cycloides</i> Gurley, 1893	=	6–7	plynový měchýř	<i>Rutilus rutilus</i>	Německo	(Eiras et al. 2014)
<i>M. diversicapsularis</i> Slukhkai in Shulman, 1996	≠		žábry	<i>Rutilus rutilus</i>	Rusko	(Eiras et al. 2005)
<i>M. dujardini</i> (Thélohan, 1892) Landsberg & Lom, 1991			žábry	<i>Rutilus rutilus</i>	Francie	(Eiras et al. 2005)
<i>M. elegans</i> Kashkovski in Shulman, 1966	=		žábry, ploutve	<i>Leuciscus idus, Rutilus rutilus</i>	Rusko	(Eiras et al. 2005)
<i>M. feisti</i> Molnár et al., 2008	=	6	žábry	<i>Rutilus rutilus</i>	Maďarsko	(Eiras et al. 2014)
<i>M. fundamentalis</i> Molnár et al., 2010	=	6–7	žábry	<i>Rutilus rutilus</i>	Maďarsko	(Eiras et al. 2014)
<i>M. guyenoti</i> Naville, 1928	=		žábry	<i>Perca fluviatilis</i>	Švýcarsko	(Eiras et al. 2005)
<i>M. heterocapsulatus</i> Jaczó, 1940	≠		střevo	<i>Aspius aspius</i>	Maďarsko	(Eiras et al. 2005)
<i>M. chernovae</i> (Chernova, 1970) Landsberg & Lom, 1991	=		žábry	<i>Rutilus rutilus</i>	Rusko	(Eiras et al. 2005)
<i>M. improvisus</i> Izyumova in Shulmani, 1966	≠		svalovina	<i>Leuciscus idus</i>	Ukrajina	(Eiras et al. 2005)
<i>M. intimus</i> Zaika, 1965	=	5–6	žábry	<i>Rutilus rutilus</i>	Rusko	(Eiras et al. 2014)
<i>M. kuleminae</i> Donec in Shulman, 1984	≠		svalovina, srdce	<i>Aspius aspius, Leuciscus leuciscus</i>	Ukrajina	(Eiras et al. 2005)
<i>M. magnus</i> Awerinzev, 1913	=		oko	<i>Gymnocephalus cernuus</i>	Německo	(Eiras et al. 2005)
<i>M. marginatus</i> Kulemina, 1969	=		lebka	<i>Rutilus rutilus</i>	Rusko	(Eiras et al. 2005)
<i>M. mucosus</i> Liu et al., 2016		5–6	žábry	<i>Rutilus rutilus, Leuciscus leuciscus</i>	Rusko	(Liu et al. 2016)
<i>M. pseudodispar</i> Gorbunova, 1936	≠		svalovina	<i>Rutilus rutilus</i>	Evropa	(Eiras et al. 2005)
<i>M. rutili</i> Donec & Tozyyakova in Shulmani, 1984	=		oko, žábry, ploutve, svalovina	<i>Rutilus rutilus</i>	Ukrajina	(Eiras et al. 2005)
<i>M. sandrae</i> Reuss, 1906	=		svalovina	<i>Sander lucioperca</i>	Rusko	(Eiras et al. 2014)
<i>M. sommervillae</i> Molnár et al., 2010	=	6	žábry	<i>Rutilus rutilus</i>	Maďarsko	(Eiras et al. 2014)
<i>M. strelkovi</i> Kostarev & Kulemina, 1971	=		žábry, játra	<i>Phoxinus phoxinus, Leuciscus idus</i>	Rusko	(Eiras et al. 2005)
<i>M. wootteni</i> Molnár et al., 2010	=	6–7	žábry	<i>Rutilus rutilus</i>	Maďarsko	(Eiras et al. 2014)
<i>M. zaikae</i> Batueva, 2020		6	střevo	<i>Rutilus rutilus</i>	Rusko	(Batueva 2020)
<i>Myxobolus fundamentalis</i>	≠		žábry	<i>Rutilus rutilus</i>	Nizozemsko	Tato práce
<i>Myxobolus pseudodispar</i> 1	≠		ledviny, svalovina	<i>Rutilus rutilus</i>	Nizozemsko	Tato práce

<i>Myxobolus pseudodispar</i> 3	=		žábry, ledviny, svalovina	<i>Rutilus rutilus</i>	Nizozemsko	Tato práce
<i>Myxobolus</i> sp. 2	=		žábry, ledviny, svalovina	<i>Aspius aspius, Sander lucioperca, Proterorhinus marmoratus, Leuciscus idus, Gymnocephalus cernuus, Rutilus rutilus</i>	Nizozemsko	Tato práce

LS – délka spory; LSB – délka těla spory; WS – šířka spory; WSB – šířka těla spory; TS – tloušťka spory; LPC – délka pólového váčku; WPC – šířka pólového váčku; Molekulární data (a – dostupná v databázi GenBank, n – nedostupná v databázi GenBank); PC – relativní velikost pólových váčků (= stejně velké, ≠ nestejně velké); NC – počet závitů pólových váčků.

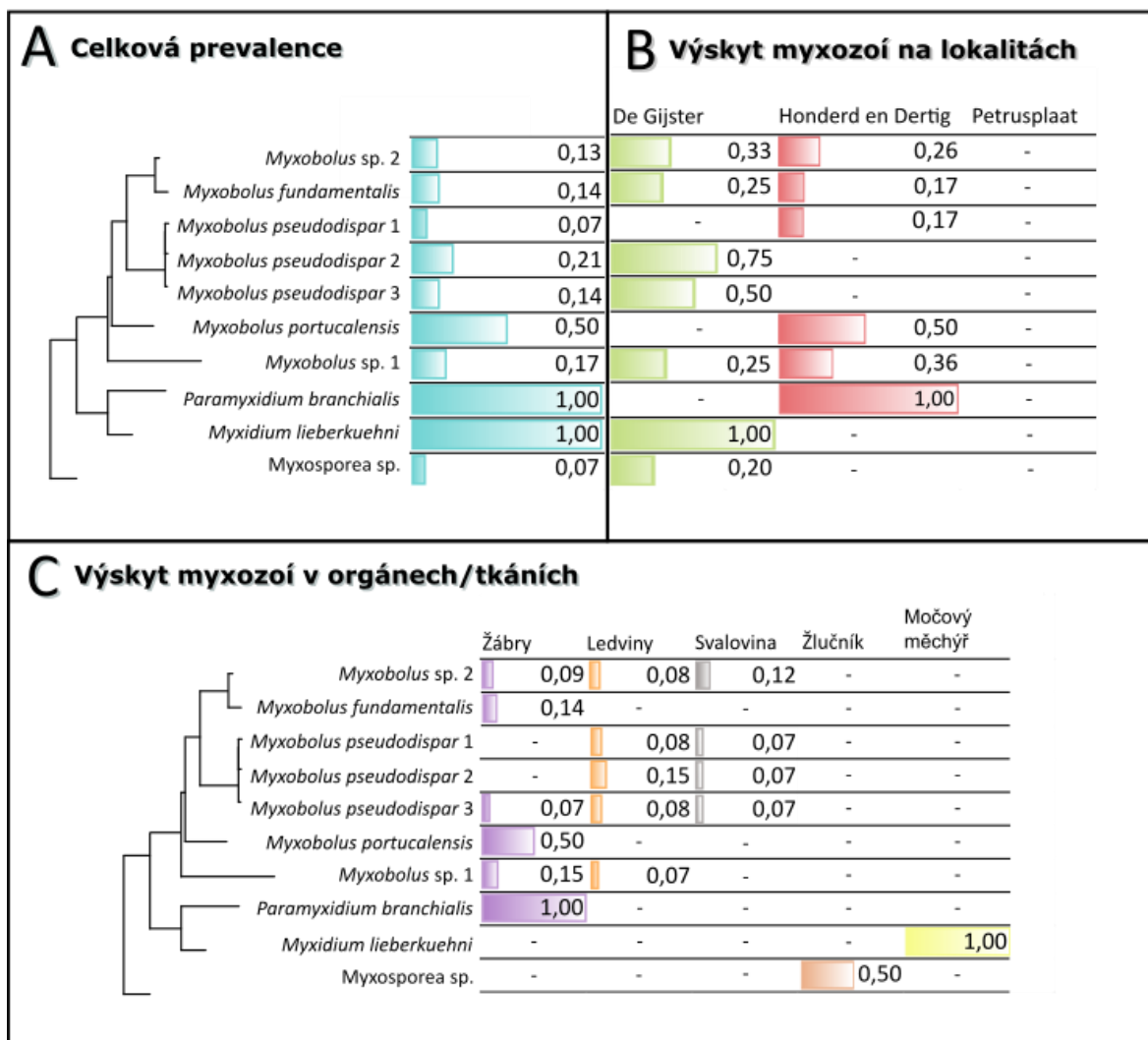
6.5. Prevalence a výskyt myxozoi

Celková prevalence pro jednotlivé determinované druhy (vycházející z molekulárních analýz) je znázorněna na obrázku 16 (A). Ve 100 % případů se vyskytovaly druhy *Paramyxidium branchialis* a *Myxidium lieberkuehni*, kdy byla ale vždy vyšetřena pouze jedna ryba, v níž se parazita podařilo detekovat. Druh *Myxobolus portucalensis* byl detekován v 50 % (1/2) případů. Komplex druhů *Myxobolus pseudodispar* má prevalenci od 7 do 21 %. *Myxobolus fundamentalis* byl nalezen ve 14 % případů. Sekvenčně nové druhy *Myxobolus* sp. 1 a *Myxobolus* sp. 2 mají prevalenci 17 % a 13 % (respektive 7 % v případě druhu *Myxosporea* sp.).

Výskyt myxozoi pro jednotlivé studované lokality je zobrazen na obrázku 16 (B). Ve vodní nádrži Petrusplaat (lokalita 1) se nepodařilo detekovat žádnou rybmorku. *Myxidium lieberkuehni* bylo zjištěno pouze ve vodní nádrži Honderd en Dertig (lokalita 2), druhy *Paramyxidium branchialis* a *Myxobolus portucalensis* pouze ve vodní nádrži De Gijster (lokalita 3). Druh *Myxobolus fundamentalis* se vyskytoval na lokalitách 2 a 3 v 17 % a 25 % případů. Druhy komplexu *Myxobolus pseudodispar* se nacházely na lokalitách odděleně – *Myxobolus pseudodispar* 1 byl detekován pouze na lokalitě 2 (v 17 %), *Myxobolus pseudodispar* 2 a 3 byly detekovány pouze na lokalitě 3 (v 75 % a 50 %). *Myxobolus* sp. 1 a *Myxobolus* sp. 2 byly detekovány na lokalitách 2 a 3 vždy v průměru ve 30 %. Druh *Myxosporea* sp. se podařilo zjistit pouze na lokalitě 3 a to ve 20 %.

Výskyt myxozoi v jednotlivých tkáních/orgánech je vyobrazen na obrázku 16 (C). Nejvíce rybmorek bylo detekováno v žábřích (15 vzorků / 13,4 %). V ledvinách se podařilo detekovat druhy *Myxobolus* sp. 1, *Myxobolus* sp. 2 a všechny zástupce komplexu *Myxobolus pseudodispar*. Průměrný výskyt myxozoi v ledvinách je 9,2 % (9 pozitivních vzorků). Ve svalovině se podařily detekovat pouze 4 druhy – komplex druhů *Myxobolus pseudodispar*

a *Myxobolus* sp. 2. Průměrný výskyt myxozoí ve svalovině je 8,3 % (9 pozitivních vzorků). Ve žlučníku a močovém měchýři se podařilo detekovat vždy jen jednoho parazita – *Myxosporea* sp. a *Myxidium lieberkuehni*. Z každé tkáně byl jeden pozitivní vzorek.



Obr. 16: (A) Prevalence pro jednotlivé nalezené druhy; (B) Výskyt myxozoí na lokalitách; (C) Výskyt myxozoí podle tkání/orgánů.

7. Diskuze

Myxozoa jsou významný podkmen parazitických žahavců (Kent et al. 2001). Způsobují velké ztráty ve velkochovech ryb a zapříčiňují tak obří ekonomické škody (např. Hedrick et al. 1998; Kent & Poppe 1999). Jejich studium má nejen ve střední Evropě poměrně dlouhou tradici, i přesto jsou poznatky o nich nedostačující a jejich diverzita zůstává stále ještě dostatečně neprozkoumaná (Bartošová-Sojková et al. 2014; Hartikainen et al. 2016; Patra et al. 2018; Okamura et al. 2018). Studium diverzity je spojeno s postupným objevováním nových druhů, ucelováním fylogenetických vztahů a doplňováním mezer v představě o evoluci. Životní cyklus se podařilo kompletně popsat pouze u několika málo druhů (např. Wolf & Markiw 1984; Køie et al. 2004). S životním cyklem souvisí i nedostatečná znalost jejich hostitelů (hlavně těch definitivních, kterými jsou kroužkovci a mechovky (Fiala et al. 2015a)). Ucelení informací o myxozoích by tak mohlo pomoci k poznání jejich životních cyklů a k celkovému pochopení vzájemných vztahů mezi těmito parazitickými žahavci.

7.1. Metodika: mikroskopická a molekulární analýza

Všechny vzorky byly mikroskopicky vyšetřeny a podrobeny molekulární analýze. Všem rybám byly pro analýzy odebrány žábry, ledviny a svalovina. Ve většině případů se nepodařilo odebrat žlučníky. Ty totiž příčinou zmrazení popraskaly a vzhledem k velikosti ryb (v průměru 8 cm a 5 g) je bylo téměř nemožné najít. PCR se v detekci myxozoi ukázala být jako daleko citlivější metoda. Mikroskopicky bylo detekováno 15 pozitivních vzorků. Všechny vzorky (329) byly dále podrobeny molekulární analýze, kde se podařilo detekovat 37 pozitivních vzorků. Pomocí molekulárního screeningu se dají Myxozoa zachytit ve fázi, kdy ještě infekce není zjevná pod mikroskopem (např. Moran et al. 1999; Grossel et al. 2005; Lisnerová et al. 2020a). V rybě se také může nacházet jen několik málo spor, které jsou pod mikroskopem jen obtížně pozorovatelné a odhalí je až molekulární screening (Grossel et al. 2005). Naopak, ve třech případech se nepodařilo detekovat Myxozoa pomocí PCR, i přesto, že při mikroskopické analýze bylo vždy po jedné spoře pozorováno. To může být způsobeno nedostatečným množstvím cílové DNA parazita ve vzorku; taktéž se nemuselo podařit tuto jednu sporu přenést do eppendorfky určené pro izolaci DNA.

V případě vyšetření svaloviny bylo detekováno 9 pozitivních vzorků (z celkových 37 pozitivních). Nemuselo se ale podařit detekovat všechny pozitivní vzorky. Z každé ryby byla odebrána jen malá část tkáně na mikroskopické vyšetření a malá část tkáně na molekulární analýzu. Vyšetřovaný vzorek nemusel tedy obsahovat žádnou sporu, nicméně ve zbytku svaloviny se Myxozoa mohla nacházet. Na druhou stranu, vyšetřované ryby nebyly

velké (v průměru 8 cm na délku), mikroskopicky byly často prohlédnuty kousky tkání z různých částí těla a na molekulární analýzu bylo také odebráno víc vzorků z různých částí těla. Pravděpodobnost záchytu parazitů byla tedy poměrně velká. Ostatní vyšetřované tkáně (žábry, ledviny, žlučník) jsou v poměru k tělu malé, a tedy je velmi málo pravděpodobné, že by se infekce nepodařila zachytit.

S počtem spor, a tedy i s množstvím získané DNA, souvisí také volba metody izolace DNA. Byla použita metoda izolace pomocí fenolu a chloroformu, která je pro izolaci spor myxozoí z tkání běžně používána (např. Bartošová-Sojková et al. 2014). Ze zkušeností z Laboratoře rybí protistologie na Parazitologickém ústavu BC AV ČR se ukázaly výtěžnosti DNA s použitím této metody daleko vyšší než za použití standardního kitu s kolonkami. V tkáni může být pouze několik spor a je tedy nutné zabránit ztrátám DNA, ke kterým právě za použití kolonek a např. kitu na tkáně dochází.

Během optimalizace PCR bylo použito několik druhů polymeráz. TaqPurple polymeráza a TitTaq polymeráza pro Myxosporea a TaqPurple polymeráza, TitTaq polymeráza a Blue Hot Star polymeráza pro Malacosporea (kapitola 6.1. Mikroskopická analýza, obrázek 7). Pro Myxosporea se ukázala být vhodná TitTaq polymeráza. Může to být způsobeno tím, že je ze všech testovaných polymeráz nejcitlivější (Bartošová et al. 2013). U malakosporeí byla po optimalizaci zvolena TaqPurple polymeráza, ta ovšem v průběhu práce přestala poskytovat spolehlivé výsledky. Podařilo se tedy oscreenovat pouze 8 rybích druhů (20 vzorků) z lokality 3 (De Gijster). Možnou příčinou problému s amplifikací genu SSU rDNA u malakosporeí může být kontaminace chemikálií nebo množství inhibitorů PCR v DNA vzorcích. Z druhého zmiňovaného důvodu byla DNA několikrát ředěna (1 : 2, 1 : 10, 1 : 100). Ani to ovšem nepomohlo.

7.2. Výskyt myxozoí

V oblasti delty Rýna se již dříve podařilo zachytit a popsat Myxosporea několika rodů – *Hoferellus*, *Kudoa*, *Myxidium* a *Myxobolus* (Pampoulie et al. 1999; Sures et al. 1999; Wünnemann et al. 2016). Celá řeka Rýn i její delta by mohly skýtat poměrně velkou druhovou variabilitu rybomerek. Ty jsou do této oblasti často zavlečeny různými zvířecími přenašeči (Wünnemann et al. 2016). Diverzita těchto parazitů v Nizozemsku je ale stále ještě dostatečně neprozkoumaná.

Celkově nejpočetnějším rodem ve skupině Myxozoa je polyfyletický rod *Myxobolus* (Eiras et al. 2014). Proto by se dalo předpokládat, že mezi nejčastější infekce bude patřit právě ta, způsobená tímto rodem. Navíc nejsou tkáňově a hostitelsky tak specifictí jako jiné rody (mezi nimi i rod *Sphaerospora* (Holzer et al. 2013)), tudíž možnost jejich výskytu a záchytu

je velká (Fiala et al. 2015a; Liu et al. 2019). Nejčastěji detekovaným druhem byli opravdu zástupci právě tohoto rodu. Z celkových 37 pozitivních vzorků jich bylo molekulární analýzou přiřazeno k rodu *Myxobolus* 32 (7 druhů). Dále byly zachyceny rody *Myxidium*, *Paramyxidium* (2 druhy) a jednu ze sekvencí se do rodu určit nepovedlo.

Celkem byly během práce vyšetřovány ryby ze tří přehradních nádrží NP Biesbosch v Nizozemsku, který se nachází na soutoku řek Rýna a Mázy (kapitola 5.1. Materiál, obrázek 5). Řeky Máza a Rýn ztratily během posledních století svůj původní vzhled – především kvůli urbanizaci (Van Urk & Smit 1989). Podoba těchto řek byla, hlavně v deltách, změněna v důsledku regulace vodního toku, zemědělským účelům a tvorbě kanálů. To mělo za následek zhoršení kvality vody. Kvalita vody a nadměrný rybolov se postupně projevil v bohatosti rybího osazenstva (De Leeuw et al. 2005). Mnoho druhů bylo v důsledku zničení jejich přirozeného prostředí zapsáno na Červenou listinu (De Nie & Ommering 1998). Současná pozorování nasvědčují, že populace mnoha původních druhů opět narůstají (De Leeuw et al. 2005). Po screeningu na Myxosporia byl ve vodních nádržích Honderd en Dertig a De Gijster (lokalita 2 a 3) výskyt pozitivních ryb vždy okolo 25 %. Ve vodní nádrži Petrusplaat (lokalita 1) se nepodařilo detekovat žádnou nakaženou rybu mikroskopicky ani pomocí molekulární analýzy. Tato vodní nádrž je ze všech tří přehrad nejmenší, nejmělkčí a také nejvzdálenější od dalších dvou (Verstijnen et al. 2019). Všechny vyšetřované ryby byly poměrně mladé, a tak se za svůj krátký život nemusely stihnout nakazit. Další z příčin může být nepřítomnost definitivního hostitele myxozoí v dané oblasti, tedy kroužkovců a mechovek. Rybomorky tím pádem nemohou dokončit svůj životní cyklus, a i kdyby byly vysazené ryby pozitivní, infekce se dál šířit nemůže. Neméně zanedbatelný důvod je počet vyšetřených ryb. Z lokality 2 a 3 bylo vyšetřeno kolem 40 ryb. Z lokality 1 to bylo pouze 30 ryb. Může být tedy jen náhoda, že se nepodařilo zachytit žádnou parazitovanou rybu.

Při monitoringu HBÚ BC AV ČR bylo zjištěno v dané oblasti v letech 1998, 2000, 2002, 2008, 2014, 2015 a 2016 27 rybích druhů z 10 hostitelských řádů (Anguilliformes Berg, 1943, Carangiformes Jordan, 1923, Cypriniformes, Esociformes Bleeker, 1859, Gasterosteiformes, Gobiiformes Günther, 1880, Osmeriformes, Perciformes, Salmoniformes, Scorpaeniformes Greenwood et al., 1996) (Jůza et al. 2018a; Jůza et al. 2018b). V této studii byla provedena parazitologická pitva 16 rybích druhů, tedy celkové rybí spektrum bylo obsaženo z 64 %; nebyly vyšetřeny jedenáct druhů potenciálních hostitelů, a to cejnek malý (*Blicca bjoerkna* (Linnaeus, 1758)), cejn velký (*Abramis brama* (Linnaeus, 1758)), *Chelon* sp., hrouzek obecný (*Gobio gobio* (Linnaeus, 1758)), kapr obecný (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758), karas obecný (*Carassius carassius* (Linnaeus, 1758)), ostroretka stěhovavá

(*Chondrostoma nasus* (Linnaeus, 1758)), ouklej obecná (*Alburnus alburnus* (Linnaeus, 1758)), perlín ostrobřichý (*Scardinius erythrophthalmus* (Linnaeus, 1758)), platýs bradavičnatý (*Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758)) a vranka obecná (*Cottus gobio* Linnaeus, 1758). Zároveň bylo vyšetřeno nezanedbatelné množství ryb (112), tedy je předpokladem, že výsledky této studie v dané oblasti mohou z větší části také pokrývat diverzitu studovaných parazitů.

Celkový výskyt myxozoí pro všechny tři lokality je 18,8 %. Ten ale může být ovlivněn ročním obdobím, kdy byly ryby chyceny. Může docházet k migracím mezihostitelů nebo nemusí na lokalitě být definitivní hostitel (v závislosti na jeho životním cyklu) (např. Rothwell et al. 1997). Některé studie (např. Adriano et al. 2005; Bartholomew et al. 2007) také uvádí nižší procento infekce u nedospělých a malých ryb, což v mém případě mohlo hrát roli vzhledem k velikosti vyšetřovaných ryb (v průměru 8 cm). Prevalence pro zástupce komplexu *Myxobolus pseudodispar* byla 7 %, 21 % a 14 % a byly detekovány pouze v plotici obecné (*Rutilus rutilus*), která je typovým hostitelem. Jiná studie (Lisnerová et al. 2020a) uvádí v tomto druhu prevalenci 67 % (28/42), další studie (Molnár et al. 2010) uvádí prevalenci 40,5 % (244/603). Příčinou může být množství vyšetřených ryb, kdy v mé práci to bylo pouze 14 zástupců tohoto druhu. Taktéž může hrát roli lokalita.

Fylogenetické vztahy v rámci skupiny Myxosporea jsou určeny ekologií rybomerek, tedy jestli infikují mořské kroužkovce skupiny Polychaeta (mořská větev) nebo sladkovodní kroužkovce skupiny Oligochaeta (sladkovodní větev) (Fiala et al. 2015a). Některé rody jsou ale schopny infikovat ryby sladkovodní i mořské (Fiala 2006). Příkladem takového rodu je rod *Myxobolus* (např. Bahri et al. 2003), jehož druhy fylogeneticky klastrují pouze ve sladkovodní větvi (dáno definitivním hostitelem skupiny Oligochaeta), ale mezihostitelem může být ryba sladkovodní i mořská. Tento rod byl také pomocí mikroskopie a molekulárních metod detekován nejčastěji. Rod *Myxidium* je hostitelsky a tkáňově specifický (Mavor 1916). *Myxidium lieberkuehni* infikuje močové měchýře štik a prevalence jeho výskytu je poměrně vysoká (Lom et al. 1989). Všechny vyšetřované ryby (až na jeden druh – *Osmerus eperlanus* (Linnaeus, 1758)) byly sladkovodní, tedy předpokladem bylo, že i nalezené druhy parazitů budou klastrovat podle dané ekologie (např. Fiala et al. 2015a). A to se i potvrdilo, v mém případě všechny druhy s vysokou podporou klastrují ve sladkovodní větvi.

7.3. Screening malakosporeí

Na výskyt malakosporeí byly testovány pouze vzorky ledvin, které jsou specifickou tkání pro tuto skupinu myxozoí. Po částečném screeningu malakosporeí se nepodařilo detekovat jediného parazita z této třídy rybomerek. Jejich definitivní hostitelé jsou mechovky

(Bryozoa) a je možné, že ani na jedné z lokalit tyto živočichové nebyli. Další z možností, stejně jako v případě lokality 1 negativní na Myxosporea je, že se mohlo jednat pouze o náhodu a Malacospora by se podařilo detekovat až s větším množstvím vzorků (v mém případě screenováno jen 20 vzorků ledvin), prevalence je v tomto případě nižší (např. Canning et al. 2002).

7.4. Charakterizace nalezených druhů

Druh *Myxobolus portucalensis* byl detekován v sekavci písečném (*Cobitis taenia*). Jeho typovým hostitelem je ale úhoř říční (*Anguilla anguilla*) (Saraiva & Molnár 1990) a dosud byl nalezen pouze v tomto hostiteli (např. Wierzbicka & Orecka-Grabda 1996; El-Mansy 1998). Vývojové stádium tohoto druhu bylo v této bakalářské práci zachyceno pouze pomocí PCR (na žábrách), nikoli mikroskopicky. PCR je velmi citlivá metoda a dokáže zachytit i malé množství vstupní DNA, může se tedy jednat o náhodný záchyt. Žábry jsou běžným vstupem infekce myxosporeí a může zde být zachycena řada nespecifických druhů před tím, než je imunitní systém stihne zachytit/zničit (Korytář et al. 2019), a proto se tento druh mohlo podařit naamplifikovat pomocí PCR, tedy jinými slovy se nemusí jednat o místo/hostitele, kde probíhá vývoj, ale pouze o náhodný záchyt vývojového stádia daného druhu. Taktéž se může jednat o jednoho z dalších druhů mezihostitelů, ve kterém probíhá vývoj, ale k tomuto tvrzení není dostatek důkazů (bylo by třeba vývojová stádia tohoto druhu zachytit i mikroskopicky). Pokud by se toto tvrzení povedlo potvrdit, pak by to tedy nasvědčovalo tomu, že tento druh není hostitelsky specifický, což ve studovaném rodu není výjimečný stav (dalším zástupcem, který není hostitelsky specifický je např. *M. dujardini* (Cech et al. 2012)).

Sekvenčně nový druh označený jako *Myxobolus* sp. 1 byl detekován v plotici obecné (*Rutilus rutilus*) a okounu říčním (*Perca fluviatilis*), kde infikoval žábry a v jednom případě ledviny. Tento druh je sekvenčně unikátní a nebyla pro něj nalezena přesná shoda v databázi GenBank. Bez morfologických dat nelze určit, zda jde o nový druh, nebo jestli byl popsán již dříve. Zároveň nejde určit ani přesný morfotyp (*Myxobolus* vs. *Henneguya*). Tento druh má poměrně zajímavou fylogenetickou pozici s dlouhou větví, spadá do skupiny nazývané Subclade VII (dle Liu et al. 2019) a v rámci ní klastruje k druhům, které parazitují u ryb řádu Perciformes a Mugiliformes (Liu et al. 2019). Tyto druhy myxosporeí jsou popsány z mořského nebo brakického prostředí a vytváří jasně definovanou skupinu (Liu et al. 2019), i když v naší analýze poměrně nízce podpořenou (skupina druhů okolo *M. bizerti* Bahri & Marques, 1996). Nález mořského či brakického druhu myxosporeí odpovídá povaze mnou studovaného lokality, která se nachází v blízkosti moře a řeka v této části je mísená

s mořskou vodou. Je pravděpodobné, vzhledem k povaze sekvence (vytváří velmi dlouhou větev (obrázek 9)), že tento druh může představovat dosud neznámou vývojovou linii brakických myxosporeí z kladu *Myxobolus*. Dle dostupné literatury byly z těchto hostitelů popsány druhy (a neexistují pro ně porovnatelná molekulární data): *M. guyenoti* (hostitel okoun říční), *M. chernovae*, *M. marginatus* (v obou případech hostitel plotice obecná). Dle fylogenetického postavení by se taktéž mohlo jednat o zástupce rodu *Henneguya*. Z těchto hostitelů byly popsány tyto druhy bez molekulárních dat: *H. similis*, *H. texta* (hostitel v obou případech okoun říční).

Další sekvenčně nový druh s označením *Myxobolus* sp. 2 má velmi široké hostitelské spektrum, což je u myxobolů poměrně běžné (např. *M. dujardini* parazituje v kapru obecném, okounu říčním i plotici obecné (Cech et al. 2012)) a byl detekován u 6 různých hostitelů ze tří řádů (Cypriniformes, Gobiiformes, Perciformes) na žábrách, v ledvinách a svalovině. Mikroskopicky se povedlo zaznamenat spory ve třech druzích (bolen dravý, jelec jesen a plotice obecná), u těchto druhů byly spory v tkáni časté, není tedy předpokladem, že by se jednalo o pasáž, ale o opravdového mezihostitele. Stejně tak v 10 případech (v ledvinách bolena dravého, jelce jesena a plotice obecné; ve svalovině bolena dravého, candáta obecného, hlavačky mramorované, jelce jesena a plotice obecné) byl druh zachycen ve svalovině a ledvinách, kde už tedy došlo k nějakému vývoji/průchodu hostitelským jedincem a není tedy předpokládáno ani v těchto případech, že by se jednalo o mezihostitele, kde neprobíhá vývoj. Na základě morfologických dat, hostitelské a tkáňové specifity by se mohlo jednat o druh *M. strelkovi*. Fylogeneticky tento druh klastruje uvnitř Subclade VIII (dle Liu et al. 2019). Téměř všechny druhy spadající do tohoto největšího subclade čítajícího 154 sekvencí parazitují v rybích hostitelích řádu Cypriniformes (až na výjimku druhu *Myxobolus marumotoi* Li & Sato, 2014 (Liu et al. 2019)), proto je velmi zajímavé, že v případě této studie byl druh *Myxobolus* sp. 2 objeven i v rybích hostitelích skupiny Gobiiformes a Perciformes. Z hostitelů skupiny Perciformes byly obdrženy dvě sekvence, což vypovídá o tom, že se nejedná o výjimečný záchyt.

Druh *Myxosporea* sp. byl určen až na základě molekulárního screeningu a na základě fylogenetické analýzy zařazen do skupiny infikující žlučník (Bile clade). V tomto kladu se nachází řada para- nebo polyfyletických rodů (*Myxidium*, *Zschokkella* či *Chloromyxum*) (např. Kent et al. 2001; Jirků et al. 2011; Heiniger & Adlard 2014). Bez morfologických záznamů nelze určit, zda se jedná o druh popsáný dříve, nebo je to druh nový, dosud morfologicky nepopsaný. Na základě hostitelské a tkáňové specifity by se mohlo jednat o blíže nepopsaný druh *Chloromyxum* sp.. Ten byl zachycen v Maďarsku v jezeře Balaton, kde

infikoval žábry a žlučník okouna říčního (Jaczó 1940). K tomuto druhu ale neexistují žádné morfologické ani molekulární záznamy. Pokud by se opravdu jednalo o zástupce z rodu *Chloromyxum*, spory by byly kulaté se čtyřmi pólovými váčky (kapitola 3.1. Morfologie a taxonomie, obrázek 2 (d)).

Myxobolus pseudodispar byl původně popsán ze svaloviny plotice obecné (Gorbunova 1936), ale později na základě morfologických dat taktéž z dalších kaprovitých ryb (např. Molnár et al. 2002; Forró & Eszterbauer 2016). Spory tohoto druhu mají oválný tvar se dvěma pólovými váčky (Gorbunova 1936), který je typický právě pro morfotyp tohoto rodu (Lom & Dyková 2006). Na základě molekulárních analýz bylo potvrzeno, že se jedná o komplex druhů (Forró & Eszterbauer 2016; Lisnerová et al. 2020a) s parafyletických charakterem (Lisnerová et al. 2020a). V této bakalářské práci byly pozorovány tři molekulárně jasně rozlišitelné druhy klastrující uvnitř komplexu a navíc parazitující u typového hostitele. Všechny tři nalezené druhy jsou sekvenčně identické s již dříve determinovanými sekvencemi. I v tomto případě byl potvrzen parafyletický charakter studované skupiny (Lisnerová et al. 2020a), mezi zástupce tohoto “druhu/komplexu” klastrují též sekvence s označením *M. artus*, *M. ridouti* a další (v mém případě: *M. artus* FJ710799, *M. musculi* AF380141, *M. klamathellus* KX261616, *M. stanlii* DQ779995, *M. ridouti* GQ292745). U tohoto komplexu byla taktéž pozorována velká variabilita/plasticita spor (Molnár et al. 2002; Lisnerová et al. 2020a). I v mém případě se povedlo dva ze tří druhů zachytit morfologicky, a výrazně se od sebe liší (*M. pseudodispar* 1 má spory v průměru o 2,5 µm delší a o 1,1 µm širší než *M. pseudodispar* 3; dále má nestejně velké pólové váčky s průměrnými rozměry 6,7 x 3,5 µm a 5,3 x 2,7 µm, *M. pseudodispar* 3 má stejně velké pólové váčky s průměrnými rozměry, které odpovídají rozměrům menšího pólového váčku *M. pseudodispar* 1 (5,2 x 2,9 µm)). Je tedy předpokladem, že tyto dva (respektive tři) druhy identifikované v mé práci by měly být popsány jako oddělené druhy, ale je samozřejmě otázkou, který z těchto či dříve molekulárně identifikovaných druhů je tím popsáním v původním popisu z roku 1936 (Gorbunova 1936).

8. Závěr

Při studiu diverzity v dané lokalitě byla určena fylogenetická pozice pro 37 sekvencí. Ty byly přiřazeny celkem k 7 druhům, z nichž 4 byly již popsány a 1 komplexu druhů, ve kterém klastrují tři mnou získané molekulárně odlišitelné druhy. Byly objeveny i 3 sekvenčně nové druhy, které byly na základě morfologických vlastností spor a fylogenetických analýz přiřazeny do rodu *Myxobolus* a do žlučníkového kladu (Bile clade). Ze všech 329 vzorků bylo na Myxosporea pozitivních 15 vzorků z žaber, 9 z ledvin, 9 ze svaloviny, 1 vzorek ze žlučového měchýře a 1 vzorek z močového měchýře. Na Malacosporea se podařilo oscreenovat pouze 8 rybích druhů (20 vzorků) z lokality 3 (De Gijster).

Ze tří lokalit se podařilo Myxozoa najít na dvou z nich – Honderd en Dertig a De Gijster (lokality 2 a 3). Výskyt myxozoí na první zmiňované lokalitě byl 24,4 %, na druhé 27 %. Celkový výskyt myxozoí ze všech tří lokalit byl 18,8 %.

9. Zdroje

- Adriano, E. A., Arana, S., & Cordeiro, N. S. (2005). Histology, ultrastructure and prevalence of *Henneguya piaractus* (Myxosporaea) infecting the gills of *Piaractus mesopotamicus* (Characidae) cultivated in Brazil. *Diseases of Aquatic Organisms*, *64*, 229–235.
- Aguiar, J. C., Adriano, E. A., & Mathews, P. D. (2017). Morphology and molecular phylogeny of a new *Myxidium* species (Cnidaria: Myxosporaea) infecting the farmed turtle *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) in the Brazilian Amazon. *Parasitology International*, *66*, 825–830.
- Alama-Bermejo, G., & Holzer, A. S. (2021). Advances and Discoveries in Myxozoan Genomics. *Trends in Parasitology*, 1–17.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. D., Lewis, J., Raff, M., & Walter, P. (2013). *Essential cell biology*. Garland Science, USA.
- Andree, K. B., Székely, C., Molnár, K., Gresoviac, S. J., & Hedrick, R. P. (1999). Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvulidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. *The Journal of Parasitology*, *85*, 68–74.
- Atkinson, S. D., & Bartholomew, J. L. (2009). Alternate spore stages of *Myxobilatus gasterostei*, a myxosporean parasite of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) and oligochaetes (*Nais communis*). *Parasitology Research*, *104*, 1173–1181.
- Atkinson, S. D., Bartošová-Sojková, P., Whipps, C. M., & Bartholomew, J. L. (2015). Approaches for characterising myxozoan species. In *Myxozoan evolution, ecology and development*, 111–123. Springer, Switzerland.
- Bahri, S., Andree, K. B., & Hedrick, R. P. (2003). Morphological and phylogenetic studies of marine *Myxobolus* spp. from mullet in Ichkeul Lake, Tunisia. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *50*, 463–470.
- Bartholomew, J. L., Atkinson, S. D., Hallett, S. L., Lowenstine, L. J., Garner, M. M., Gardiner, C. H., ... & Brown, J. D. (2008). Myxozoan parasitism in waterfowl. *International Journal for Parasitology*, *38*, 1199–1207.

- Bartholomew, J. L., Atkinson, S. D., Hallett, S. L., Zielinski, C. M., & Foott, J. S. (2007). Distribution and abundance of the salmonid parasite *Parvicapsula minibicornis* (Myxozoa) in the Klamath River basin (Oregon – California, USA). *Diseases of Aquatic Organisms*, 78, 137–146.
- Bartholomew, J. L., Rohovec, J. S., & Fryer J. L. (1989). *Ceratomyxa shasta*, a Myxosporean Parasite of Salmonids. U.S. Fish & Wildlife Service Fish Disease Leaflet 80.
- Bartošová, P., & Fiala, I. (2011). Molecular evidence for the existence of cryptic species assemblages of several myxosporeans (Myxozoa). *Parasitology Research*, 108, 573–583.
- Bartošová, P., Fiala, I., Jirků, M., Cinková, M., Caffara, M., Fioravanti, M. L., ... & Holzer, A. S. (2013). *Sphaerospora sensu stricto*: taxonomy, diversity and evolution of a unique lineage of myxosporeans (Myxozoa). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68, 93–105.
- Bartošová-Sojková, P., Hrabcová, M., Pecková, H., Patra, S., Kodádková, A., Jurajda, P., ... & Holzer, A. S. (2014). Hidden diversity and evolutionary trends in malacosporan parasites (Cnidaria: Myxozoa) identified using molecular phylogenetics. *International Journal for Parasitology*, 44, 565–577.
- Batueva, M. D. D. (2020). Morphological, histological, and molecular aspects of *Myxobolus zaikae* n. sp., a parasite of the roach *Rutilus rutilus*, in Lake Baikal. *Diseases of Aquatic Organisms*, 142, 75–82.
- Bütschli, O. (1882). Myxosporidia. In *Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs. 1. Protozoa, Second Edition*, 590–603. C. F. Winter'sche, Germany.
- Canning, E. U., & Okamura, B. (2004). Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Advances in Parasitology*, 56, 43–131.
- Canning, E. U., Curry, A., Feist, S. W., Longshaw, M., & Okamura, B. (2000). A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47, 456–468.

- Canning, E. U., Tops, S., Curry, A., Wood, T. S., & Okamura, B. (2002). Ecology, development and pathogenicity of *Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910 (Myxozoa, Malacosporea) (syn. *Tetracapsula bryozoides*) and establishment of *Tetracapsuloides* n. gen. for *Tetracapsula bryosalmonae*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *49*, 280–295.
- Carr, J., Williams, D. G., & Hayden, R. T. (2010). Molecular detection of multiple respiratory viruses. In *Molecular diagnostics*, 289–300. Academic Press, Netherlands.
- 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. sitjae* sp. nov. and *M. eirasianus* sp. nov. *Acta Parasitologica*, *57*, 354–366.
- 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, Supplement*, *155*, 391–411.
- De Nie, H. W., & Ommering, G. (1998). *Bedreigde en kwetsbare zoetwatervissen in Nederland: Toelichting op de Rode Lijst*. Informatie-en KennisCentrum Natuurbeheer, Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij. Netherlands.
- Eiras, J. C. (2002). Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*, *52*, 43–54.
- Eiras, J. C., & Adriano, E. A. (2012). A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. *Systematic Parasitology*, *83*, 95–104.
- Eiras, J. C., Molnár, K., & Lu, Y. S. (2005). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). *Systematic Parasitology*, *61*, 1–46.
- Eiras, J. C., Saraiva, A., Cruz, C. F., Santos, M. J., & Fiala, I. (2011). Synopsis of the species of *Myxidium* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Bivalvulida). *Systematic Parasitology*, *80*, 81–116.
- Eiras, J. C., Zhang, J., & Molnár, K. (2014). Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. *Systematic Parasitology*, *88*, 11–36.

- El-Mansy, A. (1998). Development of *Myxobolus portucalensis* Saraiva & Molnár, 1990 (Myxosporaea: Myxobolidae) in the oligochaete *Tubifex tubifex* (Müller). *Systematic Parasitology*, 41, 95–103.
- Emery, C. (1909). I missosporidii sono Protozoi? *Monitore Zoologico Italiano*, 22, 247.
- Eszterbauer, E. (2004). Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporaea) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 58, 35–40.
- Feist, S. W., Longshaw, M., Canning, E. U., Okamura, B. (2001). Induction of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* via the bryozoan *Fredericella sultana* infected with *Tetracapsula bryosalmonae*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45, 61–68.
- Fiala, I. (2006). The phylogeny of Myxosporaea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal for Parasitology*, 36, 1521–1534.
- Fiala, I., & Bartošová, P. (2010). History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 1–13.
- Fiala, I., & Dyková, I. (2004). The phylogeny of marine and freshwater species of the genus *Chloromyxum* Mingazzini, 1890 (Myxosporaea: Bivalvulida) based on small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Folia Parasitologica*, 51, 211.
- Fiala, I., Bartošová-Sojtková, P., & Whipps, C. M. (2015b). Classification and phylogenetics of Myxozoa. In *Myxozoan evolution, ecology and development*, 85–110. Springer, Switzerland.
- Fiala, I., Bartošová-Sojtková, P., Okamura, B., & Hartikainen, H. (2015a). Adaptive radiation and evolution within the Myxozoa. In *Myxozoan evolution, ecology and development*, 69–84. Springer, Switzerland.
- 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*, 63, 1.
- Freeman, M. A., & Kristmundsson, Á. (2018). Studies of *Myxidium giardi* Cépède, 1906 infections in Icelandic eels identifies a genetically diverse clade of myxosporaeans that represents the *Paramyxidium* ng (Myxosporaea: Myxidiidae). *Parasites & Vectors*, 11, 1–13.

- Gorbunova, M. (1936). Changes in the parasitic fauna of pike and roach according to their age. *Uchenye Zapiski Leningradskogo Ordena Lenina Gosudarstvennogo Universiteta*, 5–30.
- Grabner, D. S., & El-Matbouli, M. (2008). Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) to *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata) by various fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, 79, 133–139.
- Grabner, D. S., El-Matbouli, M. (2010). Experimental transmission of malacosporean parasites from bryozoans to common carp (*Cyprinus carpio*) and minnow (*Phoxinus phoxinus*). *Parasitology* 137, 629–639.
- Grassé, P. P. (1970). Embranchement des Myxozoaires. *Précis de Zoologie 1, Invertébrés*, Masson et Cie, France.
- Grossel, G., Handlinger, J., Battaglione, S., & Munday, B. (2005). Diagnostic polymerase chain reaction assay to detect *Kudoa neurophila* (Myxozoa: Multivalvulida) in a marine finfish hatchery. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64, 141–149.
- Hallett, S. L., & Diamant, A. (2001). Ultrastructure and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 46, 197–212.
- Harrington, B., the Inkscape developer team (2004–2005). Inkscape. <https://inkscape.org/>
- Hartigan, A., Fiala, I., Dyková, I., Rose, K., Phalen, D. N., & Slapeta, J. (2012). New species of Myxosporea from frogs and resurrection of the genus *Cystodiscus* Lutz, 1889 for species with myxospores in gallbladders of amphibians. *Parasitology*, 139, 478.
- Hartikainen, H., Bass, D., Briscoe, A. G., Knipe, H., Green, A. J., & Okamura, B. (2016). Assessing myxozoan presence and diversity using environmental DNA. *International Journal for Parasitology*, 46, 781–792.
- Hartikainen, H., Gruhl, A., & Okamura, B. (2014). Diversification and repeated morphological transitions in endoparasitic cnidarians (Myxozoa: Malacosporea). *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 76, 261–269.
- Hedrick, R. P., Adkison, M. A., El-Matbouli, M., & MacConnell, E. (1998). Whirling disease: re-emergence among wild trout. *Immunological Reviews*, 166, 365–376.

- Heiniger, H., & Adlard, R. D. (2014). Relatedness of novel species of *Myxidium* Bütschli, 1882, *Zschokkella* Auerbach, 1910 and *Ellipsomyxa* Køie, 2003 (Myxosporea: Bivalvulida) from the gall bladders of marine fishes (Teleostei) from Australian waters. *Systematic Parasitology*, 87, 47–72.
- Hillis, D. M., & Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology*, 66, 411–453.
- 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: Biological Sciences*, 278, 546–553.
- Holzer, A. S., Bartošová, P., Pecková, H., Tysl, T., Atkinson, S., Bartholomew, J., ... & Dyková, I. (2013). 'Who's who' in renal sphaerosporids (Bivalvulida: Myxozoa) from common carp, Prussian carp and goldfish—molecular identification of cryptic species, blood stages and new members of *Sphaerospora sensu stricto*. *Parasitology*, 140, 46.
- Holzer, A. S., Bartošová-Sojková, P., Born-Torrijos, A., Lövy, A., Hartigan, A., & Fiala, I. (2018). The joint evolution of the Myxozoa and their alternate hosts: a cnidarian recipe for success and vast biodiversity. *Molecular Ecology*, 27, 1651–1666.
- Holzer, A. S., Sommerville, C., & Wootten, R. (2004). Molecular relationships and phylogeny in a community of myxosporeans and actinosporeans based on their 18S rDNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 34, 1099–1111.
- Holzer, A. S., Sommerville, C., & Wootten, R. (2006). Molecular identity, phylogeny and life cycle of *Chloromyxum schurovi* Shulman & Ieshko 2003. *Parasitology Research*, 99, 90–96.
- Ikeda, I. (1912). Studies on some sporozoan parasites of sipunculoids. *Archiv für Protistenkunde*, 25, 240–272.
- Jaczó, I. (1940). Beiträge zur Kenntnis der Myxosporidien der Balaton-Fische. I. *A Magyar Biológiai Kutatóintézet Munkáiból*, 12, 278–289.
- Jiménez-Guri, E., Philippe, H., Okamura, B., & Holland, P. W. (2007). *Buddenbrockia* is a cnidarian worm. *Science*, 317, 116–118.

- Jirků, M., Bartošová, P., Kodádková, A., & Mutschmann, F. (2011). Another chloromyxid lineage: Molecular phylogeny and redescription of *Chloromyxum careni* from the Asian horned frog *Megophrys nasuta*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *58*, 50–59.
- Jurine, L. L. (1825). Histoire des poissons du Lac Léman. *Mémoires de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève*, *3*, 133–235.
- Jůza, T., Blabolil, P., Baran, R., Bartoň, D., Čech, M., Draštík, V., ... & Peterka, J. (2018a). Collapse of the native ruffe (*Gymnocephalus cernua*) population in the Biesbosch lakes (the Netherlands) owing to round goby (*Neogobius melanostomus*) invasion. *Biological Invasions*, *20*, 1523–1535.
- Jůza, T., Blabolil, P., Baran, R., Draštík, V., Holubová, M., Kočvara, L., ... & Ketelaars, H. A. (2018b). Comparison of two passive methods for sampling invasive round goby (*Neogobius melanostomus*) populations at different depths in artificial lakes. *Fisheries Research*, *207*, 175–181.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, *30*, 3059–3066.
- Kent, M. L., & Poppe, T. T. (1999). *Diseases of seawater netpen-reared salmonid fishes*. Biological Station, Department of Fisheries and Oceans ST. Andrews, Canada.
- Kent, M. L., Andree, K. B., Bartholomew, J. L., El-Matbouli, M., Dessler, S. S., Devlin, R. H., ... & Hallett, S. L. (2001). Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *48*, 395–413.
- Kent, M. L., Khattra, J., Hervio, D. M. L., & Devlin, R. H. (1998). Ribosomal DNA sequence analysis of isolates of the PKX myxosporean and their relationship to members of the genus *Sphaerospora*. *Journal of Aquatic Animal Health*, *10*, 12–21.
- Køie, M., Karlsbakk, E., & Nylund, A. (2007). A new genus *Gadimyxa* with three new species (Myxozoa, Parvicapsulidae) parasitic in marine fish (Gadidae) and the two-host life cycle of *Gadimyxa atlantica* n. sp. *Journal of Parasitology*, *93*, 1459–1467.

- Køie, M., Karlsbakk, E., & Nylund, A. (2008). The marine herring myxozoan *Ceratomyxa auerbachi* (Myxozoa: Ceratomyxidae) uses *Chone infundibuliformis* (Annelida: Polychaeta: Sabellidae) as invertebrate host. *Folia Parasitologica* 55, 100–104.
- Køie, M., Whipps, C. M., & Kent, M. L. (2004). *Ellipsomyxa gobii* (Myxozoa: Ceratomyxidae) in the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei: Gobiidae) uses *Nereis* spp. (Annelida: Polychaeta) as invertebrate hosts. *Folia Parasitologica*, 51, 14.
- Korytář, T., Wiegertjes, G. F., Zusková, E., Tomanová, A., Lisnerová, M., Patra, S., ... & Holzer, A. S. (2019). The kinetics of cellular and humoral immune responses of common carp to presporogonic development of the myxozoan *Sphaerospora molnari*. *Parasites & Vectors*, 12, 1–16.
- Li, Y. C., Sato, H., Kamata, Y., Ohnishi, T., & Sugita-Konishi, Y. (2012). Three novel myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan. *Parasitology Research*, 111, 819–826.
- Lisnerová, M., Blabolil, P., Holzer, A., Jurajda, P., & Fiala, I. (2020a). Myxozoan hidden diversity: the case of *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova, 1936. *Folia Parasitologica*, 67, 19.
- Lisnerová, M., Fiala, I., Cantatore, D., Irigoitia, M., Timi, J., Pecková, H., ... & Holzer, A. S. (2020b). Mechanisms and drivers for the establishment of life cycle complexity in Myxozoan parasites. *Biology*, 9, 10.
- Liu, X. H., Voronin, V. N., Dudin, A. S., & Zhang, J. Y. (2016). Morphological and molecular characterization of *Myxobolus mucosus* sp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) with basifilamental sporulation in two cyprinid fishes, *Rutilus rutilus* (L.) and *Leuciscus leuciscus* (L.) in Russia. *Parasitology Research*, 115, 1297–1304.
- Liu, Y., Lövy, A., Gu, Z., & Fiala, I. (2019). Phylogeny of Myxobolidae (Myxozoa) and the evolution of myxospore appendages in the *Myxobolus* clade. *International Journal for Parasitology*, 49, 523–530.
- Lom, J. (1996). Prvoci kmene Myxozoa novou skupinou vícebuněčných parazitů. *Vesmír*, 75, 146–149.

- Lom, J., & Arthur, J. R. (1989). A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. *Journal of Fish Diseases*, *12*, 151–156.
- Lom, J., & Dyková, I. (1992). *Protozoan parasites of fishes*. Elsevier Science, Netherlands.
- Lom, J., Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, *53*, 1–36.
- Lom, J., Dyková, I., & Feist, S. (1989). Myxosporea-induced xenoma formation in pike (*Esox lucius* L.) renal corpuscles associated with *Myxidium lieberkuehni* infection. *European Journal of Protistology*, *24*, 271–280.
- Margulis, L., & Schwartz, K. (1998). *Five kingdoms, an illustrated guide to the phyla of life on earth, 3rd edn*. W.H. Freeman and Company, USA.
- Matsche, M. A., Yurakhno, V., Zhang, J., & Sato, H. (2020). Synopsis of the species of the genus *Zschokkella* Auerbach, 1910 (Myxozoa: Bivalvulida: Myxidiidae). *Systematic Parasitology*, 1–31.
- Mavor, J. W. (1916). On the occurrence of a parasite of the pike on Europe, *Myxidium lieberkuehni* Bütschli, in the pike on the American continent and its significance. *The Biological Bulletin*, *31*, 373–378.
- Molnár, K. (1994). Comments on the host, organ and tissue specificity of fish myxosporeans and on the types of their intrapiscine development. *Parasitologia Hungarica*, *27*, 5–20.
- Molnár, K., Eszterbauer, E., Székely, C., Dán, Á., & Harrach, B. (2002). Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. *Journal of Fish Diseases*, *25*, 643–652.
- Molnár, K., Marton, S., Székely, C., & Eszterbauer, E. (2010). Differentiation of *Myxobolus* spp. (Myxozoa: Myxobolidae) infecting roach (*Rutilus rutilus*) in Hungary. *Parasitology Research*, *107*, 1137–1150.
- Moran, J. D. W., Margolis, L., Webster, J. M., & Kent, M. L. (1999). Development of *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea) in netpen-reared Atlantic salmon determined by light microscopy and a polymerase chain reaction test. *Diseases of Aquatic Organisms*, *37*, 185–193.

- Morris, D. J., & Adams, A. (2006). Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea), the causative organism of salmonid proliferative kidney disease, to the freshwater bryozoan *Fredericella sultana*. *Parasitology* *133*, 701–709.
- Okamura, B., Gruhl, A., & Bartholomew, J. L. (2015). An introduction to myxozoan evolution, ecology and development. In *Myxozoan evolution, ecology and development*, 1–20. Springer, Switzerland.
- Okamura, B., Hartigan, A., & Naldoni, J. (2018). Extensive uncharted biodiversity: the parasite dimension. *Integrative and Comparative Biology*, *58*, 1132–1145.
- Oskam, G. (1982). Quality aspects of the Biesbosch reservoirs. *Aqua*, *6*, 497–504.
- Paladini, G., Longshaw, M., Gustinelli, A., & Shinn, A. P. (2017). Parasitic diseases in aquaculture: their biology, diagnosis and control. In *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish*, 37–107, John Wiley & Sons Ltd., USA.
- Pampoulie, C., Marques, A., Rosecchi, E., Crivelli, A. J., & Bouchereau, J. L. (1999). A new myxosporean parasite, *Kudoa camarguensis* n. sp., recorded on two goby species (Teleostei: Pisces) in the Rhône delta (Mediterranean Sea, France). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *46*, 304–310.
- Paperna, I., Hartley, A. H., & Cross, R. H. M. (1987). Ultrastructural studies on the plasmodium of *Myxidium giardi* (Myxosporea) and its attachment to the epithelium of the urinary bladder. *International Journal for Parasitology*, *17*, 813–819.
- Patra, S., Bartošová-Sojtková, P., Pecková, H., Fiala, I., Eszterbauer, E., & Holzer, A. S. (2018). Biodiversity and host-parasite cophylogeny of *Sphaerospora* (*sensu stricto*) (Cnidaria: Myxozoa). *Parasites & Vectors*, *11*, 347.
- Patra, S., Hartigan, A., Morris, D. J., Kodádková, A., & Holzer, A. S. (2017). Description and experimental transmission of *Tetracapsuloides vermiformis* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) and guidelines for describing malacosporean species including reinstatement of *Buddenbrockia bryozoides* n. comb. (syn. *Tetracapsula bryozoides*). *Parasitology*, *144*, 497–511.
- Posada, D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, *25*, 1253–1256.
- Poulin, R. (2011). *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton University Press, USA.

- Rambaut, A. (2009). FigTree v1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rasband, W. S. (1997). ImageJ.
- Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, *19*, 1572–1574.
- Rothwell, J. T., Virgona, J. L., Callinan, R. B., Nicholls, P. J., & Langdon, J. S. (1997). Occurrence of cutaneous infections of *Myxobolus episquamalis* (Myxozoa: Myxobolidae) in sea mullet, *Mugil cephalus* L, in Australia. *Australian Veterinary Journal*, *75*, 349–352.
- Saraiva, A., & Molnár, K. (1990). *Myxobolus portucalensis* n. sp. in the fins of European eel *Anguilla anguilla* (L.) in Portugal. *Revista Iberica de Parasitologica*, *50*, 31–35.
- Shpilev, H., Ojaveer, E., & Lankov, A. (2005). Smelt (*Osmerus eperlanus* L.) in the Baltic Sea. *Proceeding of the Estonian Academy of Sciences. Biology, Ecology*, *54*, 230–241.
- Schlegel, M., Lom, J., Stechmann, A., Bernhard, D., Leipe, D., Dyková, I., & Sogin, M. L. (1996). Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: evidence that Myxozoa are Metazoa and related to the Bilateria. *Archiv für Protistenkunde*, *147*, 1–9.
- Siddall, M. E., Martin, D. S., Bridge, D., Desser, S. S., & Cone, D. K. (1995). The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic Cnidaria. *The Journal of Parasitology*, 961–967.
- Smothers, J. F., von Dohlen, C. D., Smith, L. H., & Spall, R. D. (1994). Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science*, *265*, 1719–1721.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, *22*, 2688–2690.
- Sterud, E., Forseth, T., Ugedal, O., Poppe, T.T., Jørgensen, A., Bruheim, T., Fjeldstad, P.H., & Mo, A.T. (2007). Severe mortality in wild Atlantic salmon *Salmo salar* due to proliferative kidney disease (PKD) caused by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). *Diseases of Aquatic Organisms*, *77*, 191–198.
- Sures, B., & Streit, B. (2001). Eel parasite diversity and intermediate host abundance in the River Rhine, Germany. *Parasitology*, *123*, 185.

- Sures, B., Knopf, K., Würtz, J., & Hirt, J. (1999). Richness and diversity of parasite communities in European eels *Anguilla anguilla* of the River Rhine, Germany, with special reference to helminth parasites. *Parasitology*, *119*, 323–330.
- Székely, C., Molnár, K., Egyed, L., Cech, G., Gubányi, A., & Atkinson, S. D. (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*, *63*, 1–5.
- Štolc, A. (1899). Actinomyxidies, nouveau groupe de Mesozoaires parent des Myxosporidies. *Bulletin international de l'Académie des sciences de Bohème*, *12*, 1–12.
- Tops, S., Curry, A., & Okamura, B. (2005). Diversity and systematics of the Malacosporea (Myxozoa). *Invertebrate Biology*, *124*, 285–295.
- Van Urk, G., & Smit, H. (1989). The lower Rhine geomorphological changes. In *Historical change of large alluvial rivers, Western Europe*, 167–182, John Wiley & Sons Ltd., USA.
- Verstijnen, Y., Lucassen, E. C. H. E. T., van der Gaag, M., Wagenvoort, A. J., van der Velde, G., & Smolders, A. J. P. (2019). Trophic relationships in Dutch reservoirs recently invaded by Ponto-Caspian species: insights from fish trends and stable isotope analysis. *Aquatic Invasions*, *14*, 280–298.
- Wahli, T., Bernet, D., Steiner, A.P., & Schmidt-Posthaus, H. (2007). Geographic distribution of *Tetracapsuliodes bryosalmonae* infected fish in Weiss revers: an update. *Aquatic Science* *69*, 3–10.
- Whipps, C. M., & Kent, M. L. (2006). Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporia). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *53*, 364–373.
- Wierzbicka, J., & Orecka-Grabda, T. (1996). *Myxobolus portucalensis* Saraiva & Molnar, 1990 in various organs of eel, *Anguilla anguilla* [L.]. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, *2*, 95–101.
- 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.
- Woo, P. T., & Buchmann, K. (2012). *Fish parasites: pathobiology and protection*. CABI, England.

Wünnemann, H., Holzer, A. S., Pecková, H., Bartošová-Sojková, P., Eskens, U., & Lierz, M. (2016). Repatriation of an old fish host as an opportunity for myxozoan parasite diversity: The example of the allis shad, *Alosa alosa* (Clupeidae), in the Rhine. *Parasites & Vectors*, 9, 1–13.

Yokoyama, H., Grabner, D., & Shirakashi, S. (2012). *Health and Environment in Aquaculture*. InTech, Croatia.

Zhang, Z. Q. (2013). Animal biodiversity: An update of classification and diversity in 2013. In: Zhang, Z. Q.(ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (addenda 2013). *Zootaxa*, 3703, 5–11.