

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství (FAPPZ)**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Mechanismy detekce rybiho hostitele u mlžů čeledi  
Unionidae – význam pro dopad na hostitele a reprodukční  
úspěšnost**

**Diplomová práce**

**Bc. Barbora Janíčková  
Zájmové chovy zvířat**

**Ing. Karel Douda, Ph.D.**



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Mechanismy detekce rybího hostitele u mlžů čeledi Unionidae – význam pro dopad na hostitele a reprodukční úspěšnost“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14. 04. 2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu diplomové práce Ing. Karlu Doudovi, PhD. za vedení, poskytnutí užitečných rad i zkušeností a pomoc při nalezení vhodných experimentálních metod. Dále bych také ráda poděkovala za veškerou pomoc a podporu při experimentech, a především za zpracovávání statistických dat Ing. Juanu Felipemu Escobaru Calderonovi. Nemalé poděkování patří i Ing. Barboře Vodákové a Mehrak Mohammadi za pomoc při péči o ryby a mlže.

# Mechanismy detekce rybího hostitele u mlžů čeledi Unionidae – význam pro dopad na hostitele a reprodukční úspěšnost

## Souhrn

Lepší porozumění reprodukční biologii sladkovodních mlžů je nutným předpokladem pro vývoj nových odchovných metod reagujících na potřeby projektů na ochranu biodiverzity, ekosystémových služeb a produkčních chovů mlžů. Teoretická část práce se zaměřuje na zhodnocení a význam vztahu parazit–hostitel mezi mlžem a hostitelskou rybou, na mechanismy detekce a nalezení hostitele a rovněž na vliv hostitelské specifity na rozmnožování mlžů. Experimentální část hodnotí schopnosti dospělců a larválního stadia mlže druhu *Anodonta anatina* identifikovat přítomnost hostitelské ryby ve vodě.

První experiment se zabývá schopností dospělců detekovat přítomnost ryby na základě chemosenzorických signálů ve vodě pocházejících od různých druhů ryb. Do nádrže s mlžem byla přidána voda, ve které byly přítomny ryby (standardizovaná biomasa a čas pobytu), a bylo sledováno, zda na základě přidání tohoto signálu bude mlž reagovat vypuštěním parazitických larev (glochidií). Experiment dokázal, že mlži jsou schopni rozpoznat přítomnost ryby ( $p < 0,05$ ), zároveň zde byly pozorovány rozdíly mezi mírou reakce na různé rybí druhy. Statisticky významný rozdíl byl i mezi reakcemi na druhy *Perca fluviatilis* a *Scardinius erythrophthalmus*.

Druhý experiment se zabýval mírou reakce glochidií na kožní sliz pocházející z různých rybích druhů. Z těla ryby byl neinvazně pomocí absorpčního materiálu odebrán vzorek kožního slizu, následně byla na vzorek přidána voda obsahující glochidia a bylo pozorováno, zda glochidia reagují. Výsledky druhé části experimentu dokazují, že reakce glochidií je ovlivněna přítomností kožního slizu. Zároveň byl u glochidií prokázán statisticky významný rozdíl mezi reakcemi na *P. fluviatilis* a *Pseudorasbora parva* ( $p < 0,001$ ), *P. fluviatilis* a *S. erythrophthalmus* ( $p < 0,001$ ). Na míru reakce nemělo vliv množství proteinu obsaženého v kožním slizu ( $p = 0,37$ ).

Práce přináší nové informace o reprodukční biologii mlžů, které jsou přímo využitelné pro management hostitelských zdrojů.

**Klíčová slova:** *Anodonta anatina*, glochidium, rozpoznání hostitele, chemorecepce, hostitelská specifita

# Mechanisms of fish host detection in bivalves of the family Unionidae – implications for the host and reproductive success

## Summary

A better understanding of the reproductive biology of freshwater bivalves is a prerequisite for the development of new breeding methods that respond to the needs of biodiversity conservation projects, ecosystem services and bivalve farms. The theoretical part of the thesis focuses on the evaluation and significance of the parasite-host relationship between the bivalve and the host fish, the mechanisms of detection and finding of the host and the influence of host specificity on the reproduction of bivalves. The experimental part evaluates the ability of adults and the larval stage of the species *Anodonta anatina* to identify the presence of the host fish in the water.

The first experiment deals with the ability of adults to detect the presence of fish based on chemosensory signals in water from different species of fish. Fishcue was added to the mussel tank, and it was observed whether the mussel react by releasing glochidia based on the addition of the signal. The experiment proved that bivalves are able to recognize the presence of fish ( $f < 0.05$ ), at the same time there were observed differences in the strength of response to different fish species. There was a statistically significant difference between the responses to *Perca fluviatilis* and *Scardinius erythrophthalmus*.

The second experiment evaluated response of glochidia to skin mucus from different fish species. The mucus was wiped off the fish's body with a glass filter, then water containing glochidia was added and it was observed whether the glochidia reacted. The results of the second part of the experiment prove that the reaction of glochidia is influenced by the presence of mucus. Glochidia showed a statistically significant difference between the responses to *P. fluviatilis* and *Pseudorasbora parva* ( $p < 0.001$ ), *P. fluviatilis* and *S. erythrophthalmus* ( $p < 0.001$ ). The amount of protein in the mucus had no effect on the glochidia response ( $p = 0.37$ ).

The thesis brings new information about the reproductive biology of bivalves, which are directly usable for the management of host resources.

**Keywords:** *Anodonta anatina*, glochidium, host recognition, chemoreception, host specialization

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2 Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>10</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>11</b>
3.1.1 Životní cyklus mlžů .....	14
<b>3.2 Mlži jako parazité .....</b>	<b>16</b>
3.2.1 Interakce parazit-hostitel.....	16
3.2.2 Obranné mechanismy ryb .....	18
3.2.3 Mechanismy detekce a nalezení rybího hostitele .....	20
3.2.4 Hostitelská specifita .....	22
<b>4 Metodika .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1 Intenzita vypouštění glochidií v závislosti na přítomnosti hostitele .....</b>	<b>24</b>
4.1.1 Experimentální druhy .....	24
4.1.1.1 <i>Anodonta anatina</i> (Linnaeus, 1758).....	24
4.1.1.2 <i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus, 1758.....	25
4.1.1.3 <i>Pseudorasbora parva</i> (Temminck & Schlegel, 1846) .....	25
4.1.1.4 <i>Rhodeus amarus</i> (Bloch, 1782).....	26
4.1.1.5 <i>Scardinius erythrophthalmus</i> (Linnaeus, 1758) .....	26
4.1.2 Experiment 1 .....	27
4.1.2.1 Příprava před experimentem a péče o mlže.....	27
4.1.2.2 Popis nádrží .....	27
4.1.2.3 Příprava rybího signálu.....	28
4.1.2.4 Samotný experiment.....	28
<b>4.2 Reaktivita glochidií na přítomnost rybích chemických signálů.....</b>	<b>30</b>
4.2.1 Experiment 2.....	30
4.2.1.1 Příprava před experimentem.....	30
4.2.1.2 Odběr kožního slizu.....	30
4.2.1.3 Hodnocení reaktivity glochidií .....	32
4.2.2 Stanovení koncentrace proteinů v kožním slizu vybraných druhů ryb.....	33
<b>5 Výsledky .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 Intenzita vypouštění glochidií v závislosti na přítomnosti hostitele .....</b>	<b>35</b>
<b>5.2 Reaktivita glochidií na přítomnost rybích chemických signálů.....</b>	<b>36</b>
5.1.1 Stanovení koncentrace proteinů v kožním slizu vybraných druhů ryb.....	38

<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>39</b>
<b>6.1</b>	<b>Intenzita vypouštění glochidií v závislosti na přítomnosti hostitele .....</b>	<b>39</b>
<b>6.2</b>	<b>Reaktivita glochidií na přítomnost rybích chemických signálů.....</b>	<b>41</b>
6.2.1	Stanovení koncentrace proteinů v kožním slizu vybraných druhů ryb.....	43
<b>6.3</b>	<b>Rozdíly v reakcích dospělců a glochidií .....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>47</b>



# 1 Úvod

Sladkovodní ekosystémy patří k nejohroženějším na planetě. Zvyšující se antropogenní tlak na celém světě vede ke ztrátě, modifikaci a fragmentaci stanovišť, nadměrnému využívání přírodních zdrojů (včetně vody), znečištění, zavlečení invazních cizích druhů a celkové změně klimatu (Geist 2010; Modesto et al. 2018). Krize biodiverzity je jedním z hlavních důsledků a mezi živočichy s vysokou mírou vymírání patří sladkovodní mlži (Lopes-Lima et al. 2017). Kvůli komplikovanému životnímu cyklu a závislosti na přítomnosti hostitelské ryby jsou mlži velmi ohroženi a počet sladkovodních mlžů v posledních desetiletích výrazně klesá, přičemž mnoho druhů nyní čelí riziku vyhynutí (Geist 2010).

V životě mlže je nalezení vhodného hostitele jednou z nejkritičtějších fází (Jokela & Palokangas 1993), proto je načasování vypuštění glochidií velmi důležitým okamžikem při rozmnožování mlžů. Parazitické larvy mlžů (glochidia) se musí přichytit k hostiteli, aby mohly projít metamorfózou a pokračovat ve svém vývoji. Ke kontaktu s hostitelskou rybou musí dojít brzy, protože životaschopnost a reaktivita po vypuštění velmi rychle klesá (Bauer & Wachtler 2001; Barnhart et al. 2008).

Přestože některé výzkumy (Jokela & Palokangas 1993) dokazují schopnost mlžů rozpoznat přítomnost hostitele a reagovat vypuštěním glochidií, některé jiné výzkumy (Schneider et al. 2018) tuto schopnost identifikovat hostitele naopak vyvracejí.

Identifikace vhodnosti hostitelské ryby je dalším důležitým bodem, protože dle mnoha výzkumů (Douda 2015; Huber & Geist 2017; Jokela et al. 1991) má druh hostitelské ryby velký vliv na úspěšnost metamorfózy glochidií, přičemž na některých druzích se glochidia nejsou schopny vyvíjet vůbec. Úspěšná identifikace vhodného hostitele by proto byla více než vhodnou adaptací dospělých mlžů, zajišťující vyšší úspěšnost reprodukce.

Odlišné reakce glochidií na různé látky již zkoumali například (Henley & Neves 2001), kteří mimo jiné testovali reakci glochidií na kožního sliz *Micropterus dolomieu* Lacépède, 1802 a *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 a prokázali odlišnou míru reakce glochidií na tyto druhy.

V této práci jsem se zaměřila na zkoumání vlivu odlišných druhů ryb na reakci jak dospělců, tak larválního stadia mlže *Anodonta anatina*.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Na základě literární rešerše a vlastních experimentálních práce vyhodnocuje schopnost dospělců a larválního stadia mlžů identifikovat přítomnost hostitelské ryby ve vodě. Dále práce diskutuje praktické dopady tohoto mechanismu, včetně důsledků pro dynamiku šíření invazních druhů, interakce s různými druhy rybích hostitelů a reprodukční úspěšnosti v přírodních podmínkách i v chovných zařízeních. Prvním cílem je kriticky otestovat výsledky předchozích studií (Jokela & Palokangas, 1993), zda jsou dospělí jedinci mlžů schopni identifikovat přítomnost a vhodnost hostitelské ryby, a na základě tohoto ovlivnit intenzitu vypouštění glochidií. Druhým cílem je vyhodnotit schopnost samotných glochidií identifikovat přítomnost hostitele ve vodě, konkrétně zdali v přítomnosti těchto signálů glochidia reagují rychleji na přidaný referenční signál.

V rámci diplomové práce jsou testovány následující hypotézy:

1.  $H_0$ : Režim vypuštění glochidií u dospělců *Anodonta anatina* inkubujících glochidia v marsupíích není ovlivněn přítomností standardizované úrovně chemosenzorických signálů ve vodě vytvořených pobýtem různých druhů hostitelských ryb.
2.  $H_0$ : Reakční rychlosti a senzitivita glochidií škeble říční (*Anodonta anatina*) v rámci laboratorních testů není ovlivněna přítomností standardizované úrovně chemosenzorických rybích signálů z kožního slizu různých druhů ryb v porovnání s referenčním signálem (NaCl).

### 3 Literární rešerše

Mlži zahrnují 8 000 druhů a jsou druhou nejpočetnější třídou měkkýšů. Sladkovodní mlži zahrnují asi 1000 druhů žijících po celém světě kromě Antarktidy (Araujo & de Jong 2015). Evropští sladkovodní mlži patří k řádům Unionoidea a Cardiida. Mezi Unionoidea (čeledi Margaritiferidae a Unionidae) patří i nejvíce ohrožené skupiny zvířat na naší planetě (Araujo & de Jong 2015). V České republice se vyskytuje 8 druhů mlžů, z toho jeden druh z čeledi Margaritiferidae, druh *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus, 1758) a 7 druhů z čeledi Unionidae (Horsák et al. 2018).

Sladkovodní mlži jsou jednou z nejohroženějších skupin živočichů na světě (Lydeard et al. 2004). Vzhledem k vysoké biomase, vysokým původním hustotám (stovky mušlí na metr čtvereční) a důležité úloze mlžů při zpracování částic, uvolňování živin a míchání sedimentů, může mít úbytek mlžů velký dopad na fungování vodních ekosystémů (Vaughn & Hakenkamp 2001). Přes jejich význam často chybí znalosti o jejich složité biologii, která spojuje procesy ovlivňující jejich rychlé úbytky (Geist 2010). Mezi hlavní příčiny úbytku mlžů patří ztráta stanovišť, fragmentace a degradace prostředí, změna klimatu a lze sem zařadit i predaci nepůvodními druhy, jako jsou ondatry a nepůvodní druhy raků (Dobler et al. 2022). K poklesu populací mlžů může vést i snížení populací hostitelských ryb, a řada zásahů do chemie, biologie a geomorfologie toků (Geist 2010; Modesto et al. 2018). Dle výsledků analýzy společenstev sladkovodních mlžů v Severní Americe (Spooner et al. 2011) má ztráta stanovišť větší dopad na mlže než ztráta hostitele, a kombinace těchto faktorů může mít zničující dopad na takto ohroženou skupinu organismů.

Dlouhodobé zachování druhové rozmanitosti mlžů závisí na ochraně a obnově přirozeného prostředí, a proto by řízené rozmnožování a reintrodukce měly být považovány za sekundární oproti obnově stanovišť nebo řešení příčin ohrožení. Repatriace mlžů do oblastí, kde se stále vyskytují antropogenní hrozby, které úbytek způsobily, bude pravděpodobně neúspěšná a bude to plýtvání zdroji. Pokud je navrhovaným cílem vytvoření dalších populací, měla by být určena nejlepší vhodná místa reintrodukce v rámci historického areálu druhu (Patterson et al. 2018). Translokace je dalším důležitým nástrojem, který lze použít k obnovení populací sladkovodních mlžů. Translokace jedinců má ovšem své vlastní nevýhody, včetně ekologických a evolučních problémů (McMurray & Roe 2017).

Obecně lze rozlišit dva různé přístupy ke zvýšení počtu mlžů. Jeden z přístupů je získání glochidií z volně žijící populace a umělá infekce ryb, druhý přístup je umělý odchov jedinců a následné vypuštění do volné přírody (Gum et al. 2011; Simon et al. 2015).

Jak například ukazuje studie (Schneider et al. 2017), umělé osídlení větších ryb může přispět k většímu počtu metamorfozujících juvenilních jedinců. Některé kombinace sympatrických nebo alopatrických mlžů a ryb mohou mít za následek zvýšení úspěšnosti metamorfózy a postparazitického přežití. Individuální testování kombinací druhů sympatrických a alopatrických mlžů a ryb může zvýšit úspěšnost snahy zachovat druhy pomocí například reintrodukce, zarybnění hostitelskými druhy ryb a přemístění mlžů. Podle této studie jsou testy kompatibility mezi liniemi mlžů a lokálními hostitelskými rybami nezbytné před zavedením ochranných opatření (Douda et al. 2014).

Pomocí chovných technik lze vyprodukovat dostatečné množství juvenilních jedinců pro udržení vybraných populací, ale chov v zajetí a následné vysazování na lokality by měly být pečlivě zdokumentovány a nesmí nahrazovat obnovu funkčních stanovišť toků. Z hlediska ochrany může být chov ohrožených druhů mlžů v zajetí záchranným nástrojem, aby se zachoval evoluční potenciál prioritních populací, které by nepřetržovaly dostatečně dlouho, aby měly prospěch z postupů obnovy stanovišť (Gum et al. 2011).

Ochranné programy ex situ by ale měly být využity jako poslední možnost, jak udržet ohrožené druhy. S chovem ex situ je spojena řada rizik, včetně ztráty genetické diverzity, vzniku nevhodných až škodlivých kombinací alel, změn chování a přenosu patogenů mezi populací v zajetí a ohroženými populacemi (Kyle et al. 2016). Protože mnoho evropských programů odchovu a kultivace zahrnuje přímé vypouštění mladých mlžů (od rané postparazitické fáze až po několik let) do toků bez značkování, o úspěchu těchto projektů není dostatek informací (Gum et al. 2011). Dlouhodobý experiment (Schmidt & Vandré 2010) v období 1997-2007 ovšem zjistil, že míra přežití perlorodek (*M. margaritifera*) chovaných v zajetí v různých typech klecí a jiných systémech, je velmi nízká. Jeden z důvodů vysoké úmrtnosti a nízké úspěšnosti odchovu může být absence laboratorní fáze péče o juvenilní jedince, která byla použita například ve studii Hrušky (1992). Bylo zjištěno, že počáteční růst a přežití jsou nejdůležitější ve fázi čerstvě excystovaných mlžů, minimální celková délka lastury kolem 1 mm je považována za prahovou velikost pro přežití první zimy (Gum et al. 2011).

Výsledky studie Taeuberta et al. (2010) naznačují, že pečlivý výběr a management vhodných hostitelských rybích kmenů je nezbytný pro udržitelnou ochranu populací mlžů. Přestože růst glochidií může být ovlivněn počáteční mírou infekce, velikostí ryb a aktivitou ryb, a také fyziologickými obrannými mechanismy hostitele, v experimentu dokázali, že vhodnost hostitele, a to především na individuální úrovni má největší dopad na vývoj glochidií. S důležitostí hodnocení a výběru vhodných hostitelů souhlasí i Douda (2015a),

který dokázal, že toto může ovlivnit nejen kvantitativní efektivitu produkce mláďat, ale také vitalitu mláďat, kdy optimalizace výběru hostitelských druhů ryb používaných pro metamorfózu glochidií může vést ke zlepšení výživového stavu a růstu mláďat sladkovodních mlžů během raného postparazitárního stádia, s očekávaným zvýšením kvality mláďat.

Přestože se chov sladkovodních mlžů v Evropě zaměřuje především na ochranu, pro některé asijské země slouží mlži jako zdroj potravy (Sicuro et al. 2010). Produkce většiny chovaných měkkýšů je silně závislá na populacích z volné přírody. Přesunutí celého životního cyklu druhu do líhni může zajistit nezávislost na volně žijících populacích a umožňuje dlouhodobé genetické zlepšování jedinců prostřednictvím selektivního chovu. Přehled výsledků současných šlechtitelských programů v literatuře ukazuje, že selektivní šlechtění s kontrolou příbuzenské plemenitby je pravděpodobně nejlepší strategií pro genetické zlepšení většiny chovaných měkkýšů. Průměrnou rychlost růstu lze zlepšit o 10 % za generaci a odolnost vůči chorobám o 15 % na generaci, u hlavních chovaných druhů prováděním individuální nebo rodinné selekce (Hollenbeck & Johnston 2018).

Schopnost detekce hostitelské ryby, může výrazně zvýšit šance mlže na úspěšné rozmnožení se (Jokela & Palokangas 1993). V případě sladkovodních mlžů je vzhledem k jejich komplikovanému životnímu cyklu hostitelská specifita klíčovým faktorem pro přežití a podrobnější informace jsou zásadní pro úspěch jakýchkoliv budoucích opatření věnovaných jejich ochraně (Ferreira-Rodríguez et al. 2019). Kromě toho získané informace o mechanismech detekce hostitele mohou být také užitečné pro budoucí ochranu sladkovodních mlžů a jejich nejvhodnějších hostitelských druhů ryb (Dias et al. 2020), mohou sloužit jako faktor při výběru vhodné rybí osádky a nebo využít v produkčních chovech při volbě hostitelských druhů.

### 3.1.1 Životní cyklus mlžů

Sladkovodní mlži vykazují sezónnost, hlavní jsou změny v rychlosti metabolismu ve spojitosti s teplotou a reprodukčními cykly (McMahon & Bogan 2001). Mlži jsou převážně gonochoristé s nepřímým vývojem, ale vyskytují se i hermafrodité s vývojem přímým (Gosling 2015; Williams et al. 2014). Vývoj sladkovodních mlžů může probíhat třemi různými způsoby, pomocí larvy zvané veliger – například u druhu *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771), vypouštěním plně vyvinutých mladých jedinců z marsupíí (viviparie) jako u čeledi Sphaeriidae, nebo pomocí parazitické larvy typické pro řád Unionoida (Obrázek 1). V závislosti na druhu mohou být glochidia v marsupíích před uvolněním uchovávána po dobu několika týdnů až několika měsíců (Bauer & Wachtler 2001).

Glochidia musí přijít do kontaktu s hostitelskou rybou brzy po uvolnění z marsupíí. Pokud jsou glochidia uchovávána v laboratorních podmínkách v suspenzi déle než 3 dny, počet infekčních glochidií rychle klesá. Doba přežití glochidia se může pohybovat od několika hodin až do několika dnů (Bauer & Wachtler 2001; Barnhart et al. 2008).

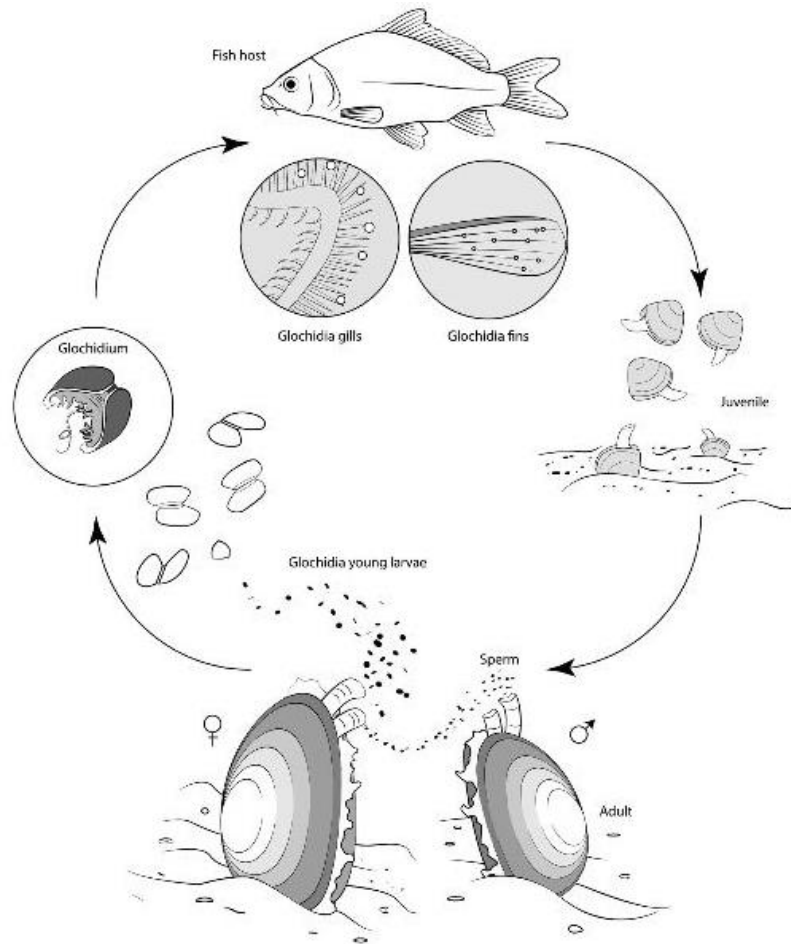
Glochidium se musí přichytit k rybě (zřídka i k obojživelníkovi), aby mohlo projít metamorfózou a pokračovat ve svém vývoji. Glochidia se mohou přichytit na žábry nebo na kůži hostitele, přichycení na kůži a ploutve je častější u trojúhelníkovitých glochidií s háčky u *Unionia* a *Hyriidae*, zatímco menší glochidia bez háčků, časté u *Margaritiferae* a část *Amblyminae*, se přichytávají na žábry (Barnhart et al. 2008).

Po přichycení glochidia tkáň ryby vytvoří cystu, která poskytuje mechanickou ochranu a živiny od hostitele po celou dobu larválního vývoje. Metamorfóza vyžaduje úplnou reorganizaci tělních struktur parazitické larvy, hlavními prvky je změna larválního adduktoru na pár definitivních adduktorů, tvorba pláště, trávicího a nervového systému, sekrece lastur a vznik pohyblivé nohy (Bauer & Wachtler 2001; Modesto et al. 2018; Wood 1974).

Délka trvání larválního stadia je ovlivněna několika faktory jako je teplota vody a velikost glochidia, a může trvat od 3 dnů až do 10 měsíců (Bauer & Wachtler 2001).

Uvolnění z hostitele začíná otevřením epitelární cysty, po opuštění cysty většina druhů migruje do substrátu, kde vyroste do velikosti 1-2 cm, než se přesune na povrch substrátu. Velkou úmrtnost (40–95 %) těchto juvenilních jedinců způsobuje pravděpodobně nevhodnost stanoviště a nepříznivé podmínky v místě opuštění hostitele a pravděpodobně i predace (Bauer & Wachtler 2001).

Růst jedince ovlivňuje mnoho faktorů jako množství potravy, teplota, množství kyslíku i hustota populace (Gosling 2015). Množství potravy a velikost jedince mají vliv i na množství produkovaných glochidií, s růstem těchto faktorů roste i množství glochidií (Bauer & Wachtler 2001).



Obrázek 1 Vývoj sladkovodního mlže přes stádium glochidie (Modesto et al. 2018)

## 3.2 Mlži jako parazité

### 3.2.1 Interakce parazit-hostitel

Parazité jsou všudypřítomné složky přírodních ekosystémů. Voda je obzvláště vhodným médiem pro podporu a pohyb ektoparazitů. Ústřední role ryb ve vodních potravních sítích z nich činí ideální mezihostitele pro nepřímo přenášené infekce. V důsledku toho používají paraziti ryby jako hostitele (Barber & Rushbrook 2008). Vztahy mezi hostitelem a parazitem jsou často charakterizovány rychlým vývojem adaptací parazitů k využití jejich hostitele a protiadaptací v hostiteli, aby se zabránilo nákladům způsobených parazitismem (Reichard et al. 2010).

Existují různé strategie ke zvýšení pravděpodobnosti infekce hostitele: (1) Vysoká plodnost díky velkému počtu a malému vzrůstu glochidií. Tato strategie je spojená s velmi vysokou mortalitou glochidií a je běžná například u Margaritiferidae. (2) Synchronizace reprodukce tak, aby odpovídala dostupnosti a výskytu hostitele. (3) Uvolňování glochidií v malém množství, když mlž olfaktoricky vycítí přítomnost hostitelské ryby, jak je známo u některých Anodontinae. (4) Přilákání ryb uvolněním glochidií s konglutináty, které napodobují potravu ryb (jako jsou červi, pijavice nebo larvy hmyzu). Tato strategie se vyskytuje u Unionidae a Hyriidae (Bauer et Wachtler 2001). U některých parazitů se vyvinuly adaptace, aby se zabránilo imunitní reakci specifických hostitelů, protože adaptace na imunitní systém hostitele je náročná. Může to vést až k extrémně vysokému stupni specializace (Löhmus & Björklund 2015).

Infekce glochidii může negativně ovlivňovat hostitelskou rybu. Je dokázáno že u infikovaných jedinců je zvýšený standardní metabolismus a zvýšené hladiny hematokritu (Filipsson et al. 2017). Mohou se objevit větší energetické náklady vynaložené na pohyb (Slavík et al. 2017) a negativně může být ovlivněna i rychlost a úspěšnost získávání potravy (Österling et al. 2014).

Všechny tyto negativní vlivy mohou mít vliv na růstový potenciál, snížení konkurenceschopnosti a vystavení zvýšenému riziku predace (Österling et al. 2014). Jak dokazuje pokus Chowdhuryho et al. (2021) může mít infekce glochidii vliv na růst hostitele. Rychlost růstu sledovali u juvenilních pstruhů obecných (*Salmo trutta lacustris* Linnaeus, 1758) infikovanými glochidiiem druhu *M. margaritifera*. Infekce glochidii zpomalila růst hostitelské ryby o 11 % během 45týdenního experimentu.



Snížení rychlosti růstu při i po infekci glochidii potvrzuje Ooue et al. (2017), který tuto problematiku zkoumal na druzích *Margaritifera laevis* (Haas, 1910) a hostitelské rybě *Oncorhynchus masou masou* (Brevoort, 1856).

Jak ale dokazují některé výzkumy (Taeubert et al. 2012) jednou z největších výhod z parazitického stadia nemusí být výrazný růst ani zisk energie z hostitelské ryby, ale rozptýlení juvenilních jedinců pomocí hostitelské ryby. Toto tvrzení naznačuje například to, že zkoumané larvy *Unio crassus* Philipsson, 1788 nevykázaly výrazný růst (<15 %) během parazitárního stádia. Pozorované rozdíly v rychlosti vývoje a načasování excystace na různých vhodných hostitelských druzích tak pravděpodobně zvýší šance na úspěšné šíření a přežití v nepříznivých podmínkách. Intenzita osídlení glochidii bývá největší na bentických rybách, což může být důsledkem vyšší četnosti setkání, ale prevalenci a intenzitu glochidií pravděpodobně ovlivňují i další faktory, jako je velikost hostitele (Klunzinger et al. 2012).

Některé druhy mlžů vykazují pozoruhodné adaptace na vztah s rodem *Rhodeus*, což naznačuje, že mohou mít společnou evoluci. *Rhodeus amarus* (Bloch, 1782), je sladkovodní druh ryby, který je obligátním parazitem mlžů, kladoucích svá vajíčka do žaberní dutiny mlže (Reichard et al. 2010). Jednou z adaptací mlžů je předčasná ejakce, která probíhá stažením svalů a vypuštěním proudu vody, což uvolní jikry a embrya hořavek. K tomuto chování může docházet buď bezprostředně po tření, nebo po určitém čase, obvykle ale během prvního týdne inkubace jiker (Reichard et al. 2006).

Jak ale Reichard et al. (2010) později publikoval, odolnost vůči parazitismu hořavek na mlžích je prokázána pouze v oblastech dlouhodobé sympatrie. V oblastech střední Evropy, kde je momentálně druh *R. amarus* považován za invazní, původní mlži žádnou takovou odolnost nemají. Oproti tomu se, ale *R. amarus* dokáže vyhnout infekci glochidii bez ohledu na dobu trvání sympatrie. Ovšem studie Douady et al. (2017) naznačuje, že v Evropě invazivní druh *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) snadno a ve vysokých hustotách parazituje na druhu *R. amarus*.

### 3.2.2 Obranné mechanismy ryb

U ryb byly popsány tři hlavní typy mechanismů pro snížení pravděpodobnosti rozvoje parazitární infekce. Tyto mechanismy zahrnují způsoby chování, které omezují kontakt mezi hostiteli a parazity, fyzické bariéry pro invazivní stadia a imunitní systém ryby (Löhmus & Björklund 2015).

Mikheev a Pasternak (2006) tvrdí, že individuální chování při vyhýbání se parazitům není příliš účinné, protože ryby nejsou obvykle schopny lokalizovat parazity na dálku. Vizuální ani chemické podněty z parazitů neměly vliv na antiparazitní chování ryb. Popsané reakce na vyhýbání se místu mohou být účinné jako individuální obranné mechanismy proti parazitům pouze tehdy, když je velikost místa s vysokou koncentrací parazitů relativně malá (přibližně několik délek těla hostitelské ryby). Ovšem právě Mikheev et al. (2013) dokázali, že se ryby dokáží místům s výskytem parazitů aktivně vyhýbat, přičemž ryby ve skupinách byly ve vyhýbání se parazitům úspěšnější a měly méně parazitů, než ryby pohybující se samostatně.

Ve studii Wengström et al. (2016) bylo zjištěno, že rychlost plavání během testu byla vyšší u ryb infikovaných glochidii, což naznačuje, že zamoření glochidii není náhodné a že chování hostitelské ryby může ovlivnit pravděpodobnost zamoření glochidii. Vysoká aktivita ryb by mohla zvýšit jejich expozici glochidii.

Dle Horkého et al. (2019) je jedním z obranných mechanismů ryb změna v termoregulaci, která může poškodit parazita. Jako model byl použit pstruh potoční (*Salmo trutta*) experimentálně infikovaný glochidii ohrožené perlodky říční (*M. margaritifera*). Bylo zjištěno, že preference teplot u napadených ryb se lišila a byla buď nad, nebo pod teplotou preferovanou neinfikovanými jedinci. Napadené ryby také upřednostňovaly různé teploty napříč lokalitami, zatímco nenapadené ryby si udržovaly své tepelné preference bez ohledu na prostředí.

V momentu, kdy se ryba neubrání před parazity pomocí chování, nastává obrana imunitním systémem. Imunitní systém ryb je soubor buněčných a humorálních složek, jejichž funkcí je obrana organismu proti cizorodým objektům. Je rozdělena na nespecifickou, jinak také nazývanou vrozenou, a specifickou neboli získanou imunitu. Tyto dvě složky imunity navzájem spolupracují na odstranění cizího objektu nebo na spuštění obranných mechanismů. Aktivace specifického obranného systému závisí na přítomnosti antigenu, který spustí kaskádovou reakci způsobující zvýšení koncentrace protilátek v krvi (Urbinati et al. 2019).

Mezi části nespecifické imunity patří především hlen, obranné buňky (granulocyty, monocyty, makrofágové a NK buňky) a humorální komponenty, které tvoří antimikrobiální enzymy a nespecifické mediátory (Urbinati et al. 2019).

Základní mechanismy získané rezistence hostitelských ryb vůči glochidiím nejsou plně pochopeny, ale doba a rozsah tvorby cyst se liší u ryb, které se již s infekcí setkaly, od jedinců, kteří ještě infekci vystavení nebyli, a tyto rozdíly mohou přispívat k získané rezistenci. Několik studií zjistilo, že dříve infikované hostitelské ryby si mohou vyvinout specifické protilátky proti glochidiím. Získaná imunita u ryb proti specifickému parazitovi může přetrvávat měsíce i roky. V některých případech může zůstat i trvale. Při pokusu s glochidii *Lampsilis reeveiana* (Lea, 1852) a hostitelem druhu *Micropterus salmoides* (Lacépède, 1802) klesla úspěšnost metamorfózy při reinfekci z 67,9 % na 38,1 %, a až na 28 % při třetí reinfekci (Dodd et al. 2006).

Rezistence vůči glochidiím ovšem nemusí vzniknout pouze na jeden konkrétní druh, ale může vzniknout i předchozí infekcí glochidii jiného druhu mlže, jak je dokázáno na pokusu Donroviche et al. (2017), kdy byla úspěšnost metamorfózy glochidií *Anatina anatina* (Spengler, 1802) výrazně ovlivněna předchozím vystavením rybích hostitelů glochidiím druhu *S. woodiana*. Úspěšnost metamorfózy zde klesla o 42,1 a 45,4% ve srovnání s kontrolní skupinou.

### 3.2.3 Mechanismy detekce a nalezení rybího hostitele

Nalezení vhodného hostitele je nejkritičtější fází životního cyklu mlže. Předpokládá se, že evropské druhy mlžů uvolňují své larvy více či méně pasivně, přestože u některých severoamerických škeblí byly prokázány adaptace na nalezení hostitele (Jokela & Palokangas, 1993). Mezi nejméně specializované adaptace řadíme například synchronizaci načasování reprodukce tak, aby odpovídala dostupnosti hostitele, což je často spojeno s migrací ryb (například lososů). Tuto adaptaci vykazuje například druh *Utterbackiana implicata* (Say, 1829) na rybí hostitelský druh *Alosa pseudoharengus* (Wilson, 1811) (Kat 1984).

Mezi další adaptace patří například modifikace glochidiálních konglutinátů tak, aby se podobaly potravě ryb (červi, pijavice a další). Nejzajímavějším příkladem je pravděpodobně *Cyprogenia aberti* (Conrad, 1850), která vytváří červené červovité konglutináty, které při ožírání rybou způsobí uvolnění glochidií, které se pak přichytávají na žábry ryby, kde probíhá metamorfóza (Kat 1984). Konglutináty druhu *Hamiota perovalis* (Conrad, 1834) připomínají tvarem a zbarvením drobné rybky a po uvolnění může zůstat hmota přichycena pomocí slizového vlákna k tělu samice. Poté se hmota trhavě pohybuje v proudu vody, což může také připomínat pohyb ryby (Haag et al. 1995).

Za adaptaci k nalezení hostitele můžeme považovat i různé modifikace pláště u mlžů, což je známé především u rodů *Lampsilis* a *Quadrula*, kdy tato modifikace pláště má evokovat nespécifickou potravu pro rybího hostitele, a po dotyku ryby jsou vypuštěny glochidi (Sietman et al. 2012). Pozoruhodná strategie se vyskytuje u rodu *Epioplasma*, jehož jedinci zachytí hostitelskou rybu a vypustí glochidia přímo na hostitelskou rybu předtím, než ji uvolní (Barnhart et al. 2008).

V experimentu Jokely a Palokangase (1993) s druhem *Anodonta pisconalis* (dle Riccardi et al. (2020) se ale pravděpodobně jednalo o druh *A. Anatina*) dokazují, že je druh schopný identifikovat přítomnost ryby a uzpůsobit tomu uvolňování glochidií. Zároveň prokázali, že mlži reagují i na různé podněty jako například na vodu pocházející z akvária s rybami, pohyb (simulován dřevěnou návnadou), fyzický kontakt s potenciaálním hostitelem (dotyk štětcem na sifon mlže) a zastínění jedince (zastínění akvária na 3 × 5 sekund).

Nespecifické reakce mohou být žádoucí v neznámém prostředí, ale schopnost detekovat rybu může výrazně zvýšit reprodukční úspěch mlže. Vzhledem k široké škále hostitelů jsou ale reakce na nespecifické podměty dostačující. I když pokus Schneidera et al. (2018) na druhu *Unio crassus* Philipsson, 1788 statisticky nepotvrdil vliv přítomnosti hostitele na uvolňování glochidií, bylo pozorováno, že 80 % mlžů bez přítomnosti hostitele vypustilo glochidia později, než jedinci u kterých byla přítomna hostitelská ryba.

### 3.2.4 Hostitelská specifita

Hostitelská specifita je často chápána jako počet hostitelských druhů, využívaných parazitem, nebo jako fylogenetická rozmanitost využívaných druhů. Parazit ovšem může na jedné lokalitě využívat velmi málo hostitelských druhů. Tito hostitelé mohou být nahrazeni zcela jinými druhy v jiné lokalitě; stejně tak může jiný parazit využívat mnoho hostitelských druhů v jedné lokalitě, přičemž druh těchto hostitelů zůstává stejný v celém geografickém rozsahu parazita (Krasnov et al. 2011).

Výzkumy v oblasti hostitelské specifity naznačují, že hostitelská specifita není ve skutečnosti způsobena druhovou příslušností, ale je spíše geograficky plastickým rysem, který se může lišit napříč různými populacemi stejného druhu. Hostitelská specifita může být navíc částečně závislá na fylogenetických vztazích mezi jednotlivými populacemi (Douda et al. 2014).

Mlži vyskytující se ve specifických biotopech s relativně homogenní rybí faunou bývají specialisty na hostitele, zatímco druhy z rozmanitějších a druhově bohatších biotopů jsou hostitelskými generalisty (Bauer 2001). Předpokládá se tedy, že hostitelsky generalistická strategie je výhodná v méně předvídatelných prostředích s různorodým a variabilním rybím společenstvím, kde je šance přežití glochidií zvýšena jejich schopností využívat širokou škálu druhů ryb. Zároveň ale může být hostitelský generalismus nákladný, protože generalističtí parazité jsou často méně schopni efektivně využívat své hostitele (Leggett et al. 2013). Dřívější studie dokumentují, že glochidia generalistických mlžů jsou produkovány v nižších počtech než u hostitelských specialistů, ačkoli jsou větší a v pokročilejším stadiu vývoje. Je pozoruhodné, že nerostou na svých hostitelských rybách a oddělují se dříve než glochidia specialistů – možná dříve, než může být zahájena hostitelská specifická imunitní odpověď (Bauer 2001; Douda et al. 2017).

U parazitů využívajících několik hostitelů může každý hostitelský druh vyžadovat odlišnou adaptaci a každý může vyvinout odlišné protiadaptace. V důsledku toho může být žádoucí pro parazita, který úspěšně dokončí vývoj na konkrétním hostiteli, aby produkoval potomstvo, které má tendenci využívat stejný hostitelský druh, což může vést k vývoji rodově specifických linií (Reichard et al. 2010).

Zatímco u Margaritiferidae je hostitelská specifita poměrně vysoká a zahrnuje jen několik blízkých příbuzných druhů ryb, u většiny Unionidae je hostitelská specifita nižší a mnoho druhů využívá široké spektrum hostitelů, včetně exotických druhů ryb, ale i obojživelníků (Bauer & Wachtler 2001). Například *A. anatina* je považována za lokálního generalistu, dokáže jako hostitelskou rybu využít jakýkoliv druh ryby původní pro její areál, ale na většině invazivních a nepůvodních druhů nedokáže dokončit vývoj. Na rozdíl od tohoto druhu můžeme za „globálního“ generalistu považovat například druh *S. woodiana*, která je schopna vývoj dokončit na velmi širokém množství druhů, jak původních, tak i nepůvodních v jejím areálu výskytu (Douda 2015b).

Snížení počtu vhodných hostitelů je hrozba pro řadu druhů. Pokles počtu dospělých jedinců s vysokou hostitelskou specifitou v důsledku nepřítomnosti hostitelů je typický například pro druh *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793), který je jedním z nejvýznamnějších druhů velkých sladkovodních mlžů v Evropě. Dostupnost vhodného hostitele může také být ovlivněna sníženou rychlostí reprodukce hostitele, protože se glochidie nejlépe vyvíjí na juvenilních jedincích, protože starší ryby jsou rezistentnější díky získané imunitě. Tuto imunitu může zvyšovat i předchozí infekce glochidii jiných druhů (Bauer & Wachtler 2001).

Tradiční experimentální metody určování vhodnosti hostitele jsou založeny především na kvantifikaci podílu úspěšně transformovaných glochidií získaných z hostitelských ryb (rychlost transformace) nebo vyhodnocení přítomnosti encystovaných glochidií. Tento kvantitativní přístup je založen na předpokladu, že metamorfování juvenilní mlži z různých hostitelů mají srovnatelnou životaschopnost, tj. rychlost transformace dostatečně charakterizuje fyziologickou kvalitu hostitele. Nicméně několik důkazů naznačuje, že tento předpoklad nemusí být vždy pravdivý. Nedávné poznatky poskytují údaje o úloze rybích hostitelů při poskytování nutričních zdrojů vyvíjejícím se glochidiím, což lze dokumentovat posuny v izotopových poměrech, trávením hostitelské rybí tkáně glochidii, a dokonce i podstatným růstem glochidií některých druhů během metamorfózy (Douda 2015a).

## 4 Metodika

V této kapitole je popsána dvojice laboratorních experimentů, jejichž cílem bylo zjištění, zda jsou dospělí jedinci a larvální stadia druhu *Anodonta anatina* schopni identifikovat přítomnost potenciaálně hostitelského jedince ve vodě a reagovat na ni.

### 4.1 Intenzita vypouštění glochidií v závislosti na přítomnosti hostitele

Byla studována intenzita vypouštění glochidií druhem *Anodonta anatina* v závislosti na přítomnosti signálů různých potenciaálně hostitelských druhů ryb.

#### 4.1.1 Experimentální druhy

##### 4.1.1.1 *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758)

*A. anatina* je vhodným modelovým organismem pro testování biogeografických hypotéz týkajících se evropských sladkovodních ekosystémů, zejména díky svému výskytu na většině území kontinentu. Vyskytuje se v Evropě a v Asii od Portugalska přes Turecko a zasahuje až na východ na Sibiř (jezero Bajkal). *A. anatina* je generalistou, který obývá lokality od malých toků po velké řeky, jezera a nádrže (Froufe et al. 2014).

Reprodukční cyklus trvá 10 měsíců, produkce spermií a vajíček vrcholí na začátku jara a vypouštění probíhá synchronně mezi pohlavími. Zrání vajíček nastává postupně během dubna až září a zralá glochidia lze identifikovat na základě barvy marsupia, která se mění od béžové až po oranžovohnědou v době, kdy jsou přítomna zralá glochidia. V jednom jedinci se mohou naráz vyskytovat jak zralá glochidia, tak i vajíčka. Většinou se převážně vyskytuje pouze jedna forma. Je produkováno velké množství glochidií, která jsou postupně vypouštěna od září do března. Největší množství glochidií je vypuštěných v průběhu 2 – 3 týdnů v březnu (Hinzmann et al. 2013).

Dle pokusu Hubera a Geista (2019b) lze pozorovat rozdíl mezi vhodností hostitelský druhů ryb na základě množství encystovaných parazitických larev druhu *A. anatina*. Nejvyšší úspěšnost metamorfózy, a tím pádem nejvhodnějším hostitelem, byly druhy *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), *Leuciscus idus* (Linnaeus, 1758), *S. trutta* a *Leucaspius delineatus* (Heckel, 1843). Naopak jako nevhodní hostitelé byly identifikovány druhy *Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758, *Gobio gobio* (Linnaeus, 1758), *Rutilus rutilus* (Linnaeus, 1758) a *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846). Při pokusu Doudy et al. (2013) byl prokázán úspěšný vývoj glochidií na 16 ze 17 použitých



původních druhů ryb z České republiky a Španělska (pouze u druhu *Tinca tinca* byla úspěšnost metamorfózy 0,1 %), ve srovnání s vývojem pouze na 2 (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792 a *Rhodeus amarus*) z 10 testovaných nepůvodních druhů ryb.

#### 4.1.1.2 *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758

*P. fluviatilis* je jednou z nejrozšířenějších sladkovodních ryb na severní polokouli. Larvální fáze je krátká a trvá jen několik týdnů, pozdější stadia nemigrují na velké vzdálenosti, a proto se *P. fluviatilis* běžně používá jako indikátorový druh při monitorování životního prostředí (Olsson et al. 2011).

Studie Jokely et al. (1991) zabývající se rozdíly v citlivosti různých hostitelských druhů na glochidia bylo zaznamenáno, že druh *P. fluviatilis* byl nejnáchylnější k infekci glochidii mlže *A. anatina* v porovnání s druhy *Esox lucius* (Linnaeus, 1758), *Gymnocephalus cernua* (Linnaeus, 1758) a *Rutilus rutilus*. V experimentu (Huber & Geist 2019a) byl druh také hodnocen jako nevhodnější hostitelský druh pro *A. anodonta* i *A. cygnea*.

V pokusu Doudy et al. (2013) byla úspěšnost metamorfózy na tomto druhu 57,1 %, což byl druhý nejvyšší zaznamenaný výsledek po druhu *Scardinius erythrophthalmus*.

#### 4.1.1.3 *Pseudorasbora parva* (Temminck & Schlegel, 1846)

Má se za to, že druh *P. parva* byl zavlečen náhodou v zásilce čínských kaprů, poprvé byl objeven v Evropě na rybí farmě v Rumunsku v roce 1961. V důsledku náhodného zavlečení se nyní vyskytuje ve východní, střední i západní Evropě (Gozlan et al. 2010).

Druh *P. parva* je považován za nevhodného hostitele pro glochidia *A. cygnea* (průměrný počet 0,5 excystovaných glochidií na rybu) (Huber & Geist 2017). V dalším pokusu Hubera a Geista (2019a), s druhem *A. anatina* byl druh *P. parva* také zařazen jako nevhodný hostitel. Přestože počáteční míra zamoření byla vysoká, tento druh vykazoval velkou ztrátu glochidií. Metamorfózou prošlo pouze 0,3 juvenilů na 1 gram ryby, pro srovnání na nevhodnějším hostiteli *P. fluviatilis* bylo dosaženo vývinu 19,9 juvenilů/gram ryby. I v pokusu Doudy et al. (2013) byla úspěšnost metamorfózy na tomto druhu pouze 0,4 %.

#### 4.1.1.4 *Rhodeus amarus* (Bloch, 1782)

Ve střední Evropě se *R. amarus* dokáže téměř úplně vyhnout glochidiálním infekcím původních druhů mlžů, ačkoliv v oblasti Ruska a Dálného východu je častá přítomnost glochidií na dospělých i embryích *Rhodeus spp.*, například *Rhodeus ocellatus* (Kner, 1866) z jižní a východní Číny se zřejmě částečně umí vyhnout glochidiím *S. woodiana* (Reichard et al. 2010). Při pokusu Hubera a Geista (2019a) byl *R. amarus* jediným z 10 testovaných druhů ryb, u kterého nedošlo k encystaci glochidii mlže *A. anatina*. Ovšem v experimentu Douady et al. (2013) byla úspěšnost metamorfózy na tomto druhu 7,6 %, což dokazuje, že jsou na tomto druhu glochidia schopna metamorfózy, i když s nízkou úspěšností.

#### 4.1.1.5 *Scardinius erythrophthalmus* (Linnaeus, 1758)

Dle Douady et al. (2012) patří tento druh mezi primární hostitele pro druh *U. crassus*, kdy úspěšnost metamorfózy glochidií na tomto druhu byla 74,7 % (70,4 – 85,0). Při pokusu s druhem *A. anatina* byla úspěšnost metamorfózy na tomto druhu 65,5 % a zároveň mláďata pocházející ze *S. erythrophthalmus* a *R. rutilus* vykazovala vyšší hodnoty fluorescenční aktivity a vyšší růstový přírůstek (Douada 2015a). I v předchozím pokusu Douady et al. (2013) byla zaznamenána vysoká úspěšnost (73,4 %) metamorfózy *A. anatina* na tomto druhu.

Dle pozorování Blažka a Gelnara (2006) se glochidia rodu *Anodonta* vyskytují jak na ploutvích, tak na žábách a těle u druhu *S. erythrophthalmus*, na rozdíl například od druhů *P. fluviatilis* a *R. rutilus*, kde se nejčastěji glochidia vyskytují na ploutvích.

## 4.1.2 Experiment 1

### 4.1.2.1 Příprava před experimentem a péče o mlže

K experimentu bylo potřeba předem získat dospělé samice *A. anodonta*, odlov byl proveden 23. 11. 2021 v řece a slepých ramenech Labe poblíž obce Libotenice (50.4853489 N, 14.2335067 E). Jednotliví mlži byli určeni do druhu, následně pomocí speciálních kleští pro pootevření a fixaci pozice lastur byli prohlédnuti a na základě barvy marsupia (Hinzmann et al. 2013), bylo určeno, zda jsou v jedinci přítomna zralá glochidia. Jedinci jiných druhů, samci a mlži bez zralých glochidií byly navraceni do řeky na místě odlovu. Celkově bylo nalezeno 119 jedinců hledaného druhu, z toho bylo 69 identifikováno jako jedinci bez zralých glochidií a 50 jako samice se zralými glochidii.

Jedinci byli po převozu z místa odlovu přes noc ponecháni v nádržích se vzduchováním, aby se aklimatizovali. Následující den bylo 40 vybraných jedinců přesunuto do experimentálních nádrží, před přesunem byl každý jedinec očištěn a byla změřena délka lastury.

Byl ustanoven denní plán péče obsahující zaznamenání aktivity jednotlivých mlžů, měření teploty v 6 vybraných nádržích, doplnění 1 litru vody do každé experimentální nádrže, kontrolu funkčnosti filtrů a krmení mlžů pomocí 1 nl/ml živé kultury řasy *Ettlia spp.*, jejíž pěstování probíhalo paralelně ve fotobioreaktoru. Kontrola probíhala každý experimentální den a každý druhý den mezi jednotlivými opakováními.

### 4.1.2.2 Popis nádrží

V pokusu byl použit recirkulační systém obsahující 40 samostatných nádrží o rozměrech 30 × 15 × 40 cm (šířka × hloubka × výška). Primární nádrž měly kónické dno, u dna byla umístěna odtoková hadice, která přes filtrační síťku s vedla vodu do sekundární nádrže, kde bylo umístěno čerpadlo. V sekundární nádrži o rozměrech 14 × 14 × 21 cm (šířka × hloubka × výška) bylo umístěno čerpadlo, které hadicí ústilo zpět do primární nádrže, ve které byl umístěn mlž. V sekundární nádrži byla umístěna hadice napojená na odtokovou trubici, která zajišťovala odtok přebytečné vody a zabraňovala přetečení nádrží.

#### 4.1.2.3 Příprava rybího signálu

Příprava rybího signálu probíhala v samostatných nádržích o obsahu 8l, v každé nádrži bylo vzduchování a byla opatřena víkem. Z vybraných druhů ryb (*P. fluviatilis*, *P. parva*, *R. amarus* a *S. erythrophthalmus*) byli z chovných nádrží odloveni jedinci (1 – 3 jedinci od jednotlivých druhů), následně byli zváženi a přesunuti do externích nádrží s množstvím vody určeným na základě hmotnosti experimentálních ryb jednoho druhu (5 gramů ryby na 1 litr vody). Vždy bylo použito tolik jedinců, aby finální hmotnost dosahovala alespoň 20 gramů. Ryby v těchto nádržích byly ponechány 23,5 hodiny (výjimku tvořilo první opakování, kde byly ryby v nádržích pouze 16,5 hodiny), následně byly pomocí čisté akvarijní sítky odloveny a umístěny zpět do chovných nádrží. Během pobytu mimo chovné nádrže nebyly ryby krmeny, aby se zabránilo kontaminaci rybího signálu.

Schéma pro přidávání rybího signálu bylo navrženo tak, aby se u každého jednotlivce vyskytlo všech 5 variant signálu (4 druhy ryb + 1 kontrolní bez ryb), pro 6. opakování bylo použito stejné schéma jako u 1. opakování.

#### 4.1.2.4 Samotný experiment

Pokus se skládal ze 6 opakování, přičemž každé opakování probíhalo 3 experimentální dny. Prvním experimentálním dnem jednotlivých opakování byly dny 1. 12. 2021, 7. 12. 2021, 15. 12. 2021, 21. 12. 2021, 6. 1. 2022 a 13. 1. 2022. První den opakování byl považován za kontrolní den, kdy proběhl předem určený denní plán péče, a navíc byly vyčištěny filtrační sítky ve všech nádržích. V tento den také začala příprava rybího signálu.

Druhý den experimentu proběhla výměna sítěk a následně místo doplnění vody bylo do jednotlivých nádrží přidáváno 500 ml rybího signálu na základě stanoveného schématu. Z použitých filtračních sítěk byly glochidia vypláchnuta do Petriho misky pomocí tlakového rozprašovače s vodou. Následně byla glochidia vyfocena pomocí mikroskopové kamery (Dino-Lite Edge 3.0 Digital microscope) a z pořízených fotografií bylo pomocí programu ImageJ spočítáno množství glochidií. Množství glochidií vypuštěných za 24 hodin bez přítomnosti rybích signálů pak bylo považováno jako referenční hodnota pro jednotlivé mlže.

Třetí den opakování proběhla výměna filtračních sítěk a z nich počítání vypuštěných glochidií – na základě tohoto množství glochidií bylo určeno, zda se jednalo o reakci na přítomnost rybích signálů. Jako reakce na rybí signál bylo považováno, pokud se množství vypuštěných glochidií alespoň zdvojnásobilo oproti referenčnímu množství, pokud bylo referenční nižší než 30, bylo za reakci považováno množství alespoň o 30 vyšší než referenční množství.

## 4.2 Reaktivita glochidií na přítomnost rybích chemických signálů

Byla studována reaktivita parazitických larev (glochidií) druhu *A. anatina* na přítomnost rybích chemických signálů z kožního slizu různých druhů ryb. Testovány byly reakce na kožní sliz tří různých rybích druhů: *Perca fluviatilis*, *Pseudorasbora parva* a *Scardinius erythrophthalmus* a tyto reakce byly porovnány s reakcí na referenční signál (NaCl).

### 4.2.1 Experiment 2

#### 4.2.1.1 Příprava před experimentem

K experimentu byly použity dospělé samice *A. anodonta* odlovené 02. 03. 2022 ve slepém ramenu Labe poblíž obce Libotenice (50.4853489N, 14.2335067E). Jednotliví mlži byli určeni do druhu, následně pomocí kleští byli pootevřeni a na základě barvy marsupia (Hinzmann et al. 2013) bylo určeno, zda jsou v jedinci přítomna zralá glochidia. Bylo získáno 6 jedinců obsahujících zralá glochidia. Mlži byli po převozu přemístěni do nádrží se vzduchováním a byli zde ponecháni až do dne experimentu, který se konal 08. 03. 2022.

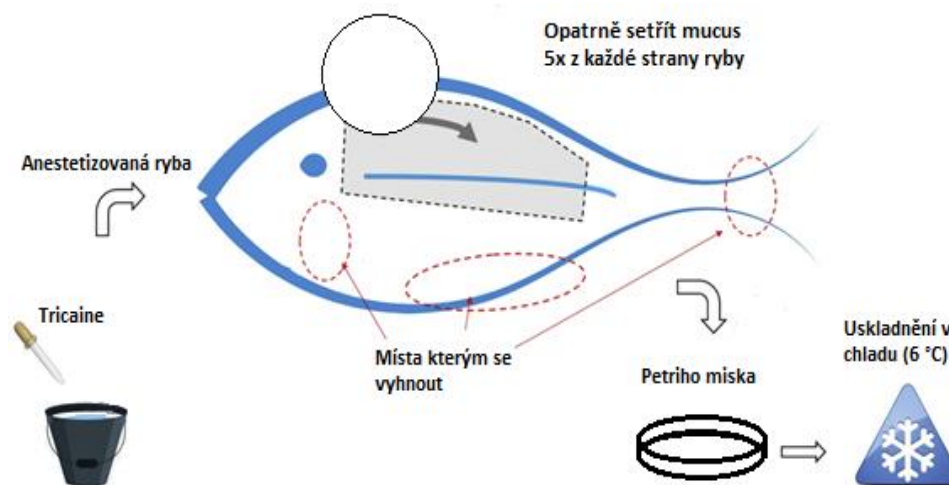
V den experimentu byly vybrány 3 samice, kterým byla naříznuta marsupia a pomocí proudu vody z injekční stříkačky byla extrahována glochidia.

U glochidií jednotlivých samic byl proveden test životaschopnosti pomocí chloridu sodného (Wang et al. 2007). Životaschopnost glochidií od jednotlivých samic dosahovala 90–100 %. Následně byla získaná glochidia smíchána a přibližně 4 hodiny ponechána v nádobě s odstátou vodou při nízké teplotě (11–13 °C) až do doby experimentu.

#### 4.2.1.2 Odběr kožního slizu

K odběru kožního slizu byla použita upravená verze metody Fernándeze-Alacida et al. (2018). Jedinec byl odloven z chovné nádrže a přenesen do nádrže s odstátou vodou, poté byl přendán do nádrže obsahující neletální dávku sloučeniny Tricaine methanesulfonate (Rao et al. 2015), kde byl po dobu 2–3 minut ponechán, než byl kompletně uspán. Následně byl opláchnut v nádrži s čistou vodou a zvážen. Potom byl jedinec přenesen na platový ták a byla změřena celková délka, délka těla a výška v nejvyšším bodě těla. Celková tělesná hmotnost ryb k extrakci jednoho vzorku byla 17–25g, bylo použito 1–3 jedinců v závislosti na celkové hmotnosti těla.

Odběr probíhal pomocí absorpčního materiálu – kulatého filtru ze skleněných vláken (Whatman GF/F), ke stěru byla vždy použita pouze jedna strana filtru. Filtrem byly setřeny obě dorzální části ryby 5 × (Obrázek 2). Po odběru byl filtr vložen do Petriho misky a bylo přidáno několik kapek čisté vody, aby se zabránilo vyschnutí. Vzorek byl označen druhem ryby a číslem odběru a následně byl skladován v chladu (5°C).



Obrázek 2 Schéma odběru kožního slizu z ryby. Upraveno (Fernández-Alacid et al. 2018)

Celkově byly odebrány 3 vzorky od každého ze tří použitých druhů, navíc byly vytvořeny 3 vzorky filtru obsahující pouze odstátou vodu jako negativní kontrola a tři další vzorky obsahující referenční signál. Byla použita destilovaná voda s NaCl o koncentraci 20mg/ml. Z každého filtru byl ze středu (místo s největší koncentrace kožního slizu) vystřížen čtverec o ploše 1cm<sup>2</sup>, který byl poté rozstříhán na 9 čtverců o hraně 3,33mm.

#### 4.2.1.3 *Hodnocení reaktivity glochidií*

Hodnocení reakci glochidií probíhalo v mikrotitrační destičce, kdy byl do jamky přenesen 1 malý čtverec (hrana 3,33mm) se vzorkem tak, aby strana použitá k odběru kožního slizu směřovala vzhůru. Do jamky bylo přidáno 100  $\mu$ l vody obsahující glochidia (6–63 glochidií v jamce, průměrně 25,53). Ihned po přidání glochidií bylo spuštěno nahrávání 60sekundového videa. Video bylo pojmenováno pomocí označení druhu nebo kontroly (Sc, Pr, Sp, Cp a Cn) a písmen A, B a C označující číslo vzorku, a číslem opakování (1–6) například ScB5 označující vzorek Scardinius, odběr B, opakování 5.

Videa byla později analyzována tak, že byl spočítán počet otevřených a zavřených glochidií v 0. sekundě videa a byl porovnán s počtem otevřených a zavřených glochidií spočítaných v 60. sekundě videa.



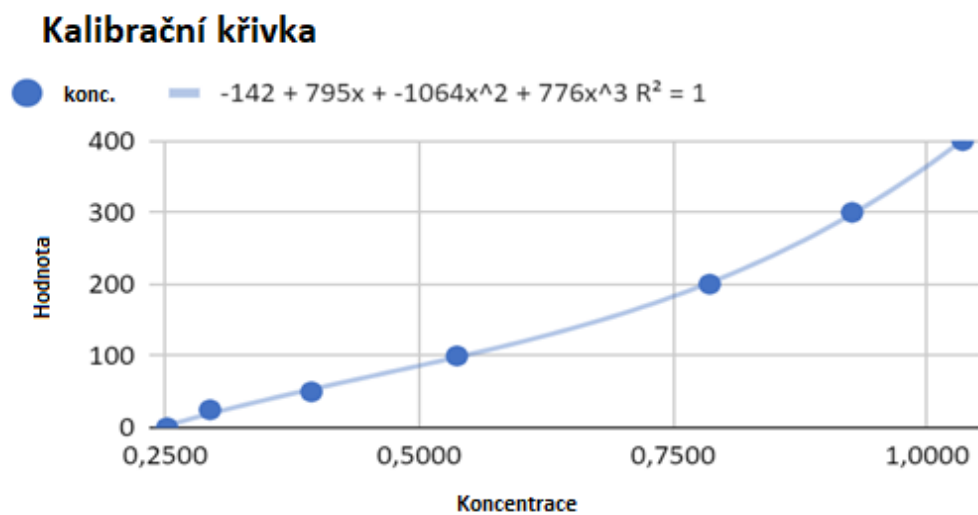
#### 4.2.2 Stanovení koncentrace proteinů v kožním slizu vybraných druhů ryb

Bylo odebráno 5 vzorků od každého použitého druhu ryb a jeden kontrolní vzorek obsahující pouze skleněný filtr namočený ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl). Odběr kožního slizu pro stanovení množství proteinu proběhl stejným postupem, jako je popsáno v předchozí podkapitole 4.2.1.2 Odběr kožního slizu, až do bodu, kdy byl ze vzorku vystřižen 1 cm<sup>2</sup> (jediným rozdílem byla absence kroku přidání vody k filtru). Po vystřížení čtverce z filtru byl tento vzorek rozstříhán na malé části a vložen do mikrozkušavky o objemu 2 ml. Do mikrozkušavky bylo přidáno 0,5 ml fyziologického roztoku, následně byl každý vzorek důkladně protřepán po dobu 2 minut pomocí Vortexu značky MS2 Minishaker IKA®.

Dále byl proveden jeden odběr čistého kožního slizu z jednoho anestetizovaného jedince druhu *S. erythrophthalmus*, kdy pomocí plastové stěrky (Kumari et al. 2019) byl z jedince a z povrchu na kterém byl odběr proveden, setřen čistý kožní sliz a přenesen do mikrozkušavky, tímto způsobem se povedlo odebrat 0,5 ml vzorku.

Všechny vzorky byly ponechány 60 minut při nízké teplotě 5 °C, aby se uvolnilo z filtru co největší množství kožního slizu. Poté byly vzorky opět promíchány pomocí Vortexu a umístěny do centrifugy na 5 minut (3 000 ot/min). Ze vzorků poté bylo odebráno 0,5 ml tekutiny bez částí filtru. Tento vzorek byl přenesen do nových mikrozkušavek o objemu 0,5 ml, ke kterým byly přidány veškeré další chemické sloučeniny dle návodu. Ke stanovení množství proteinů byl použit kit Sigma TP0300, byl použit postup stanovení proteinů bez srážení (bylo použité pouze poloviční množství všech sloučenin, protože vstupní vzorek byl poloviční oproti množství uvedeného v návodu ke kitu – 0,5 ml namísto 1 ml).

Po připravení všech vzorků, včetně standardních vzorků dle návodu bylo 200 µl vzorku přeneseno do mikrotitrační destičky a byla zaznamenána poloha vzorků a standardních roztoků v mikrotitrační destičce. Každý vzorek i roztok byl použit 3×. Byl použit Spektrofotometr Infinite M200 Tecan (software Magellan™ Tecan) hodnoty byly odečítány při vlnové délce 750 nm. Pomocí standardizovaných koncentrací proteinu byla určena kalibrační křivka a její rovnice (Obrázek 3), jejíž pomocí bylo stanoveno průměrné množství proteinu v jednotlivých vzorcích.



Obrázek 3 Kalibrační křivka a rovnice kalibrační křivky

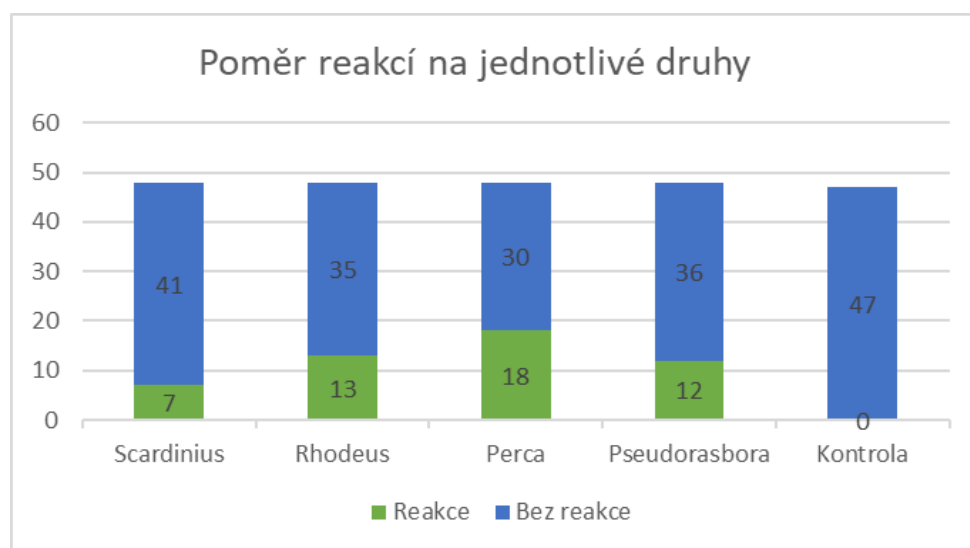
## 5 Výsledky

### 5.1 Intenzita vypouštění glochidií v závislosti na přítomnosti hostitele

Ze 40 použitých jedinců v průběhu experimentu reagovalo alespoň jednou 28 jedinců, 8 jedinců nevykázalo žádnou reakci a v průběhu experimentu nikdy neuvolnili více než 20 glochidií, 3 jedinci v průběhu experimentu alespoň jednou vypustili více než 50 glochidií, ale nevykázali reakci na přítomnost rybího signálu. Z celkového počtu byly v průběhu experimentu nahrazeny 3 jedinci, a to z důvodu úhynu, toto zapříčinilo jednu chybějící kontrolu v 5. opakování. Jelikož jedinec uhynul v průběhu opakování, nebylo již možné jej nahradit.

Z celkového počtu 239 testování bylo 47 testování kontrolních bez přítomnosti rybího signálu a 192 testování s přítomností rybího signálu, z tohoto počtu bylo zaznamenáno celkem 50 reakcí na rybí signál. Jako reakce na rybí signál bylo považováno, pokud se množství vypuštěných glochidií alespoň zdvojnásobilo oproti referenčnímu množství. Pokud bylo referenční množství nižší než 30 bylo za reakci považováno množství alespoň o 30 vyšší než referenční množství.

Z celkového počtu 50 zaznamenaných reakcí bylo 18 na druh *P. fluviatilis*, 13 reakcí na druh *R. amarus*, 12 reakcí na druh *P. parva* a 7 reakcí na signály druhu *S. erythrophthalmus*. Nevyskytla se žádná reakce na přidání vody bez přítomnosti rybích signálů (kontrola) (Obrázek 4).



Obrázek 4 Poměr reakcí na jednotlivé rybí druhy

V experimentu se nevyskytl žádný jedinec, který by reagoval v rámci všech opakování, ale vyskytli se 2 jedinci, kteří reagovali na všechny použité rybí druhy. Z celkového počtu 28 reagujících jedinců reagovalo pouze na jeden druh ryby 11 jedinců, nejčastěji reagovali pouze na druh *P. fluviatilis* (6 případů), reakce pouze na druh *R. amarus* nastala u 3 případů a u druhů *P. parva* a *S. erythrophthalmus* jedenkrát pro každý druh

Pomocí Fisherova testu byla zhodnocena závislost mezi reakcí a přidáním signálu ( $p=0,0183$ ), tento výsledek nám umožňuje zamítnout nulovou hypotézu, o nezávislosti dvou proměnných, ale neukazuje, zda některý z použitých druhů neovlivňuje reakci více než ostatní. Za tímto účelem bylo provedeno párové porovnání. Kvůli způsobu, jakým jsou hodnoty  $p$  koncipovány, nemůžeme při tomto výpočtu očekávat, že budou mít stejnou chybu (5 %). Ve skutečnosti je pravděpodobnost chyby pro více  $p$  hodnot mnohem vyšší než 5 % v závislosti na počtu  $p$  hodnot, které vypočítáme, z tohoto důvodu je potřeba vypočítat upravenou hodnotu  $p$ .

Statisticky významné rozdíly (upravená hodnota  $p < 0,05$ ) byly pozorovány mezi všemi vzorky ryb ve srovnání s kontrolou (Obrázek 5), statisticky významný rozdíl byl i mezi reakcemi na druhy *P. fluviatilis* a *S. erythrophthalmus*.

Jelikož jsou upravené hodnoty  $p$  ve všech případech porovnání mezi kontrolou a rybím druhem nižší, než zvolená hladina významnosti 0,05 můžeme zamítnout nulovou hypotézu o nezávislosti vypouštění glochidií na přítomnosti chemosenzorického signálu.

Porovnávané druhy	Hodnota $p$	Upravená hodnota $p$
<i>Scardinius</i> : <i>Rhodeus</i>	0,176865116	0,10601713
<i>Scardinius</i> : <i>Perca</i>	0,037488998	0,00937225
<i>Scardinius</i> : <i>Pseudorasbora</i>	0,12022204	0,096303519
<i>Scardinius</i> : Kontrola	0,088017224	0,014082756
<i>Rhodeus</i> : <i>Perca</i>	0,096052073	0,086356676
<i>Rhodeus</i> : <i>Pseudorasbora</i>	2,718281828	2,718281828
<i>Rhodeus</i> : Kontrola	8,43797E-08	3,50841E-05
<i>Perca</i> : <i>Pseudorasbora</i>	0,135748871	0,096303519
<i>Perca</i> : Kontrola	0,001399191	0,004804063
<i>Pseudorasbora</i> : Kontrola	0,000740632	6,00989E-06

Obrázek 5 Výsledné hodnoty výpočtu Fisherova exaktního testu, vyznačené modrou barvou jsou upravené hodnoty  $p < 0,05$

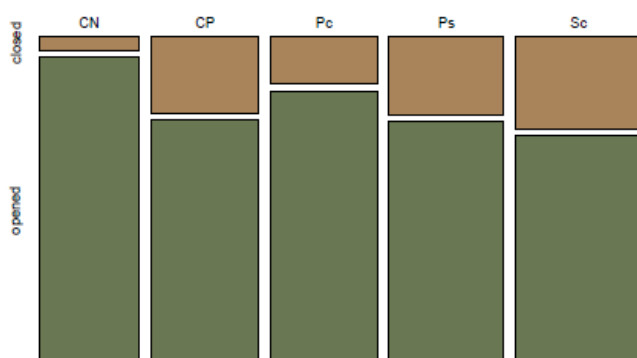
## 5.2 Reaktivita glochidií na přítomnost rybích chemických signálů

Pro porovnání reakcí byla vytvořena kontingenční tabulka (Obrázek 6 a 7) a následně bylo provedeno párové srovnání jednotlivých druhů a kontrol. Hodnoty  $p$  byly zkorigovány pomocí metody Benjaminiho a Hochberga (1995). Následovalo testování pomocí Pearsonova chí-kvadrátu, které prokázalo signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami ( $p < 2,2e-16$ ), následně byly výsledky porovnány pomocí párového porovnání, jehož výsledky můžeme vidět na Obrázku 8.

Můžeme pozorovat, že všechny druhy ryb a pozitivní kontrola byly významně odlišné od negativní kontroly (CN), navíc test detekoval významné rozdíly mezi *Perca fluviatilis* (Pc) a pozitivní kontrolou (CP), *P. fluviatilis* a *Pseudorasbora parva* (Ps), *P. fluviatilis* a *Scardinius erythrophthalmus* (Sc).

Na základě těchto výsledků můžeme zamítnout  $H_0$ , a můžeme říci, že reakce glochidií je ovlivněna přítomností chemosenzorických signálů pocházejících z kožního slizu ryb.

Proportion of glochidia that closed after 60s



	CN	CP	Pc	Ps	Sc
otevřené	23	135	83	146	189
uzavřené	495	424	467	450	462

Obrázek 7 Kontingenční tabulka uvádějící výsledné množství otevřených a uzavřených glochidií po 60s

Obrázek 6 Grafické znázornění počtu reagujících glochidií po 60 s. CN-negativní kontrola, CP-pozitivní kontrola, Pc-*Perca fluviatilis*, Ps-*Pseudorasbora parva*, Sc- *Scardinius erythrophthalmus*

	CN	CP	Pc	Ps
CP	< 2e-16	-	-	-
Pc	2.7e-08	0.00028	-	-
Ps	< 2e-16	0.94539	0.00016	-
Sc	< 2e-16	0.08095	2.7e-08	0.09076

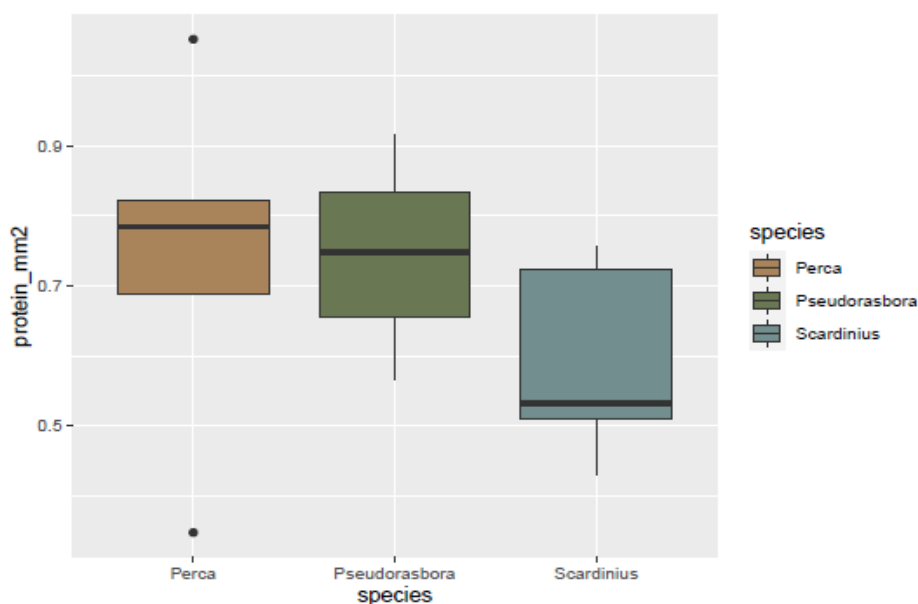
Obrázek 8 Výsledky párového porovnání pro jednotlivé skupiny.

### 5.1.1 Stanovení koncentrace proteinů v kožním slizu vybraných druhů ryb

Hodnoty koncentrace proteinů (Obrázek 9) vypočítané pomocí získané kalibrační křivky (Obrázek 3) byly porovnány pomocí ANOVA a nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl ( $p = 0,37$ , Obrázek 10) v množství proteinu mezi jednotlivými druhy.

Vzorek	Průměr	Vypočítaná koncentrace $\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g proteinu/mm}^2$	Výsledné množství proteinu ( $\mu\text{g}$ ) v jedné jamce
Perca 1	<b>0,3169</b>	34,737	0,434	4,8169
Perca 2	<b>0,4333</b>	82,278	1,028	11,4097
Perca 3	<b>0,4925</b>	105,199	1,315	14,5950
Perca 4	<b>0,399</b>	68,903	0,861	9,5561
Perca 5	<b>0,4232</b>	78,385	0,98	10,8769
Scardinius 1	<b>0,3361</b>	43,083	0,539	5,9823
Scardinius 2	<b>0,355</b>	51,07	0,638	7,0811
Scardinius 3	<b>0,4078</b>	72,34	0,904	10,0334
Scardinius 4	<b>0,4159</b>	75,525	0,944	10,4774
Scardinius 5	<b>0,3601</b>	53,198	0,665	7,3808
Pseudorasbora 1	<b>0,4572</b>	91,514	1,144	12,6971
Pseudorasbora 2	<b>0,414</b>	74,792	0,935	10,3775
Pseudorasbora 3	<b>0,4357</b>	83,229	1,04	11,5428
Pseudorasbora 4	<b>0,3905</b>	65,494	0,819	9,0900
Pseudorasbora 5	<b>0,3684</b>	56,58	0,707	7,8469
Kožního sliz Sc1	<b>336,135</b>	<b>672,27</b>		
Kožního sliz Sc2	<b>320,163</b>	<b>640,33</b>		

Obrázek 9 Uvádí průměry získaných hodnot ze spektrofotometru a výpočty koncentrací proteinů pro jednotlivé vzorky. Poslední sloupec uvádí přibližné množství proteinu na čtverci  $3,33 \times 3,33 \text{ mm}$ , který byl vkládán do jamky v předchozí části při experimentu.



Obrázek 10 Grafický výsledek ANOVA pro hodnocení množství proteinu na  $\text{mm}^2$  pro jednotlivé druhy ryb.

## 6 Diskuse

### 6.1 Intenzita vypouštění glochidií v závislosti na přítomnosti hostitele

Výsledky dokazují, že mlži druhu *Anatina anodonta* jsou schopni rozpoznat dle signálů přítomnost ryby a na základě tohoto signálu dokážou ovlivnit vypouštění glochidií. Nejvyšší počet reakcí a to 18 bylo zaznamenáno v přítomnosti signálů druhu *Perca fluviatilis*, což je pro druh *A. anodonta* nejvhodnější hostitel z použitých druhů, ovšem na druhý vhodný hostitelský druh, kterým je *Scardinius erythrophthalmus*, bylo pozorováno nejméně reakcí, a to pouze v 7 případech. U obou použitých nevhodných hostitelských rybích druhů *Rhodeus amarus* a *Pseudorasbora parva* byla pozorována střední počet reakcí (12 a 13).

Podobné výsledky uvádí i další studie, například Jokely a Palokangase (1993), kteří pozorovali, že mlž dokáže reagovat na přítomnost rybích signálů ve vodě, a poté vypouští více glochidií než v kontrolním prostředí, ale zároveň druh reaguje i na nespecifické podněty, jako je například stín nebo pohyb ve vodě. Další výzkum provedený na druzích *Villosa nebulosa* (Conrad, 1834) a *Villosa vibex* (Conrad, 1834) potvrzuje, že mlži v přítomnosti ryb vypouští větší množství glochidií, zatímco jedinci bez rybích signálů sice glochidia vypouští, ale pouze v nízkém počtu.

Naopak výzkum Schneidera et al. (2018) na *Unio crassus* tvrdí, že vliv na vypouštění glochidií má teplota, nikoliv přítomnost hostitele, přestože mlži v přítomnosti hostitele vypouští glochidia dříve. V našem pokusu nebyl prokázán vliv teploty na množství reakcí ( $p = 0,9286$ ). Ovšem pokus Schneidera et al. (2018) se zaměřoval na druh, u kterého vypouštění glochidií nastává až na jaře a téměř nevypouští glochidia v průběhu zimy (Schneider et al. 2018), proto u tohoto druhu může mít teplota větší vliv na vypouštění glochidií než u námi testovaného druhu, který je schopen postupně uvolňovat glochidia v průběhu zimy (Hinzmann et al. 2013).

Rozdílné výsledky mohou být zapříčiněny různou metodikou porovnávání reakcí, ale také to může být způsobeno tím, že experimenty probíhaly na odlišných druzích mlžů, a je možné, že na vypouštění glochidií mají vliv různé faktory, případně může mít na vypouštění glochidií vliv i vzájemná kombinace různých faktorů. Nabízí se tedy otázka, zda se může jednat o adaptaci některých druhů, která by zvyšovala pravděpodobnost, že glochidia naleznou hostitele, a tím zvýšila pravděpodobnost úspěšné reprodukce.

Osm jedinců v průběhu experimentu nevyпустиťo vůbec žádné nebo velmi malý počet glochidií, což může značit například to, že jedinec neměl zralá glochidia, nebyl v optimální kondici nebo například vypustil všechna zralá glochidia v průběhu aklimatizace – například v důsledku změny teploty nebo teplotního šoku (Hastie & Young 2003). Toto bude předmětem dalšího stanovení v rámci pitev jedinců pro připravovaný vědecký článek.

Jedenáct jedinců reagovalo pouze na jeden druh, což může indikovat, že někteří jedinci mohou citlivěji reagovat na druh ryby, na kterém daný jedinec prošel metamorfózou (Reichard et al. 2010), nebo například to, že určité druhy ryb mohou vytvářet silnější nebo částečně odlišné signály ve vodě, na které mlž reaguje.

Výsledky také mohly ovlivnit další faktory, například původ jedinců, kdy, pokud by byli použiti jedinci z různých populací, bylo by možné, že by zde existovaly rozdíly v počtu reakcí mezi odlišnými populacemi. Zároveň hodnocení, zda jedinec reagoval, by bylo optimálnější stanovit jednotlivě pro každého jedince zvlášť, přestože se porovnávalo množství vypuštěných glochidií v přítomnosti rybího signálu s počtem glochidií vypuštěných za předchozích 24 hodin. Bylo by vhodné sledovat průměrné množství vypuštěných glochidií za delší časové období, aby bylo stanovení průměrného denního vypouštěného množství přesnější.

Při zpracování dat zároveň nebylo bráno v potaz, o kolikáté opakování se jedná, což by mohlo ovlivnit interpretaci výsledků. Teoreticky by pozdější opakování mohla být ovlivněna zmenšující se zásobou glochidií, a tudíž by mlži vypouštěli larvy méně anebo v menším počtu. To je ovšem v rozporu s naším pozorováním, kdy nejvyšší počet reakcí byl zaznamenán v průběhu 5. opakování. Citlivost jedinců na signál však mohla být ovlivněna i dlouhým pobytem jedinců ve vodě s velmi nízkou nebo žádnou mírou signálů od ryb, a proto se mohli mlži s postupem experimentu stávat citlivějšími na množství signálu ve vodě.

Další výzkumy zabývající se touto problematikou by se mohly zaměřit na zjištění, na jaké konkrétní složky kožního slizu ryb mlži reagují, a zda reakci typu vypuštění glochidií ovlivňuje pouze jeden faktor (například přítomnost ryby) nebo musí nastat specifická kombinace více faktorů (například přítomnost ryby a vhodná teplota), aby byla spuštěna reakce mlže.

Otázkou také zůstává, zda se v průběhu času mění citlivost mlže na nespecifické signály způsobené přítomností ryb. Je možné, že mlži z oblastí s velmi malou populací ryb budou reagovat odlišně od jedinců pocházejících z oblastí s velkou koncentrací ryb (tzn. i vyšší koncentrací rybích signálů ve vodě).



## 6.2 Reaktivita glochidií na přítomnost rybích chemických signálů

Výsledky dokazují, že reakce glochidií je ovlivněna přítomností kožního slizu a že glochidia reagují odlišnou mírou na různé testované druhy. Statisticky významný rozdíl byl mezi reakcemi na *Perca fluviatilis* a pozitivní kontrolou ( $p < 0,001$ ), v tomto případě byla tedy reakce na přítomnost kožního slizu ryby nižší než na referenční signál (NaCl), stejně tak v porovnání tohoto druhu s druhem *Scardinius erythrophthalmus* ( $p < 0,001$ ) i s druhem *Pseudorasbora parva* ( $p < 0,001$ ). Můžeme tedy říci, že reakce na nejvhodnější hostitelský druh byla vůbec nejmenší z pozorovaných reakcí (s výjimkou negativní kontroly).

Naše výsledky jsou podobné, jako v pozorování Henleyho a Nevese (2001), kteří pozorovali rozdíl v reakcích glochidií druhů *Villosa iris* a *Lampsilis fasciola* na rybí druhy *Micropterus dolomieu* a *Cyprinus carpio*. V obou případech byla reakce vyšší na nehostitelský druh (*C. carpio*) než na hostitelský druh (*M. dolomieu*). Jak ale sami naznačují, vyšší reakce na druh *C. carpio* mohla být způsobena kontaminací vzorku kožního slizu krví ryby. Jejich výzkum také dokazuje, že odlišná reakce na kožní sliz může být zapříčiněna i druhem glochidií, protože v obou případech měla *V. iris* větší reakci než druhý experimentální druh.

Při experimentu byl pozorován mírně odlišný průběh reakcí mezi glochidii reagujícími na kožní sliz a glochidii v přítomnosti solného roztoku. Glochidia v přítomnosti kožního slizu mají větší tendenci opakovaně se otevírat a zavírat („klapou“), naopak glochidia v solném roztoku zareagují většinou pouze zavřením. Podobná reakce na kožní sliz (resp. roztok kožního slizu) byla pozorována i dle Woodové (1974), kdy glochidia reagovala na přidání kožního slizu rychlým „klapáním“ v průběhu prvních 15–20 sekund.

Byla zvolena poněkud neobvyklá metoda odběru kožního slizu pomocí skleněného filtru, protože častější metody, jako je například stěr kožního slizu pomocí sterilního podložního sklíčka (Fernández-Alacid et al. 2018) nebo pomocí plastové stěrky (Kumari et al. 2019), vyžadují k získání dostatečného množství kožního slizu velké druhy ryb, které v této studii nebyly k dispozici. Přestože v případě přidání čistého kožního slizu by mohl být vyšší počet reakcí, tento experiment se zaměřoval především na rozdíl mezi množstvím reakcí na jednotlivé druhy.

Ačkoliv se jednalo o neobvyklou metodu odběru kožního slizu, ukázala se pro tento pokus jako vhodná, protože množství kožního slizu přítomného na skleněném filtru bylo dostatečné k vyvolání reakce u glochidií. Zároveň tento typ odběru umožnil i odebrání vzorku od druhu *Perca fluviatilis*, u kterého bylo možné pozorovat menší množství kožního slizu oproti ostatním použitým druhům.

### **6.2.1 Stanovení koncentrace proteinů v kožním slizu vybraných druhů ryb**

Výsledky stanovení obsahu proteinu v kožním slizu neprokázaly žádný statisticky významný rozdíl ( $p = 0,37$ ) mezi obsahem proteinů a druhem ryby, ze které kožní sliz pocházel. Přestože jsou rozdíly v množství a složení kožního slizu druhově specifické (Kumari et al. 2019), výsledky diplomové práce neprokázaly žádný významný rozdíl mezi použitými druhy.

Výsledná koncentrace proteinů z kožního slizu získaného přímým stěrem z ryby byla 0,656 mg/ml, což přibližně odpovídá experimentům (Ghafoori et al. 2014; Henley & Neves 2001; Roberts & Powell 2005), ale je v přímém rozporu s výsledky experimentu Kumariho et al. (2019), který uvádí obsah proteinů v kožním slizu 100,79–378,00 mg/ml u různých druhů ryb.

### 6.3 Rozdíly v reakcích dospělců a glochidií

Při porovnání reakcí dospělců a glochidií byl zaznamenán na velmi zajímavý fakt, kterým je naprosto opačná míra reakce na dva vhodné hostitelské druhy. Zatímco dospělé samice mlžů vypouštěly glochidia nejvíce v přítomnosti chemosenzorických signálů pocházejících od druhu *Perca fluviatilis*, glochidia vykazovala nejmenší míru reakce na tento druh. Zatímco glochidia nejvíce reagovala na kožní sliz pocházející z druhu *Scardinius erythrophthalmus*, u dospělců byla pozorována nejmenší míra reakce právě na tento druh.

Vysvětlení této „neshody“ mezi dospělci a larválním stádiem může být několik. Je možné, že dospělé samice reagují obecně na přítomnost hostitelské ryby danou přítomností signálů ve vodě, glochidia mohou reagovat pouze na konkrétní signál. Zatímco povaha látek, na které dospělci reagují, nám zatím není známá, dle Henleyho a Nevese (2001) glochidia reagují především na přítomnost fibrinogenu. Toto by mohlo zapříčinit i různé výsledky reakcí na jednotlivé rybí druhy, přestože jsme hodnotili koncentraci proteinů, ve které nebyl prokázán rozdíl, již jsme se nezaměřovaly na množství jednotlivých proteinů. Proto by mohla odlišná reakce glochidií být způsobená právě odlišným obsahem zmíněného fibrinogenu.

Jedním z možných vysvětlení může být přítomnost specifických protilátek (případně sloučenin) v kožním slizu některých ryb, především *P. fluviatilis*, které mohou snižovat míru reakce glochidií.

Do jisté míry by i rozdíly v reakcích na kožní sliz mohly souviset s tím, že glochidia se na rybách častěji vyskytují na určitých místech těla. Zatímco u druhu *Perca fluviatilis* častěji nacházíme glochidia na ploutvích, u druhu *Scardinius erythrophthalmus* lze nalézt glochidia po celém těle, ploutvích i žábrách (Blažek & Gelnar 2006). Při tomto experimentu byl získán kožní sliz pouze z těla ryb, nikoliv z ploutví. Pokud by měl kožní sliz mírně odlišné složení na různých částech těla, mohlo by toto částečně vysvětlovat, proč reakce na *P. fluviatilis* byla tak mírná.

## 7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo vyhodnotit schopnost dospělých jedinců a larválního stádia mlžů identifikovat přítomnost a vhodnost hostitelské ryby.

V literární části byly shrnuty obecné poznatky, především o vztahu hostitel–parazit mezi mlži a rybami. Experimentální část práce prokázala, že dospělí jedinci druhu *Anodonta anatina* jsou schopni ovlivnit míru vypouštění glochidií v závislosti na detekci přítomnosti ryby, ovšem schopnost rozpoznat vhodné a nevhodné druhy ryb pro vývoj glochidií prokázána nebyla. Přesto je nutné vyzdvihnout, že na nejvhodnější hostitelský druh byl opravdu zaznamenán nejvyšší počet reakcí.

Druhá část experimentu prokázala vliv chemosenzorických signálů pocházejících z kožního slizu různých druhů ryb na množství reagujících glochidií, přičemž množství obsažených proteinů nehrálo význam v míře reakce.

Ze získaných poznatků můžeme říct, že je vhodné provést další experimenty, především v oblasti rozpoznávání přítomnosti ryby u dospělých mlžů, a případně se zaměřit na porovnání míry reakce na jednotlivé druhy ryb. Další výzkum by také mohl zodpovědět otázku, zda různé druhy mlžů reagují na odlišné druhy ryb jiným způsobem nebo zdali je zvýšené množství reakcí na určitý druh vhodné pro odlišné populace stejného druhu.

Tyto a další výzkumy umožní porozumět mechanismům, které ovlivňují pravděpodobnost kontaktu a přichycení glochidií na hostitelské ryby a mohou být limitujícím faktorem pro úspěšnou reprodukci mlžů. To lze využít při ochraně populací ohrožených druhů, ale také i při umělých odchovech.



## 8 Literatura

- Araujo R, de Jong Y,. 2015. Fauna Europaea: Mollusca - Bivalvia. Biodiversity Data Journal. **3** (1). doi: 10.3897/BDJ.3.e5211.
- Barber I, Rushbrook BJ,. 2008. Parasites and fish behaviour. *Fish Behaviour*. 525–561. doi: 10.1201/B10757-19.
- Barnhart MC, Haag WR, Roston WN,. 2008. Adaptations to host infection and larval parasitism in Unionoida. *Journal of the North American Benthological Society*. **27**(2), 370-394.
- Bauer G,. 2001. Framework and Driving Forces for the Evolution of Naiad Life Histories. 233–255. doi: 10.1007/978-3-642-56869-5\_13.
- Bauer G, Wachtler K,. 2001. Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida. Springer Science & Business Media. Germany.
- Benjamini Y, Hochberg Y,. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. **57** (1). 289–300. doi: 10.1111/J.2517-6161.1995.TB02031.X.
- Blažek R, Gelnar M,. 2006. Temporal and spatial distribution of glochidial larval stages of European unionid mussels (Mollusca: Unionidae) on host fishes. *Folia Parasitologica*. **53** (2). 98–106. doi: 10.14411/fp.2006.013.
- Chowdhury MMR, MarjomäkiTJ, Taskinen J,. 2021. Effect of glochidia infection on growth of fish: freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* and brown trout *Salmo trutta*. *Hydrobiologia*. **848** (12–13). 3179–3189. doi: 10.1007/S10750-019-03994-4.
- Dias AR, Teixeira A, Lopes-Lima M, Varandas S, Sousa R,. 2020. From the lab to the river: determination of ecological hosts of *Anodonta anatina*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. **30** (5). 988–999. doi: 10.1002/AQC.3328.
- Dobler AH, Hoos P, Geist J,. 2022. Distribution and potential impacts of non-native Chinese pond mussels *Sinanodonta woodiana* (Lea, 1834) in Bavaria, Germany. *Biological Invasions*. (2022). doi: 10.1007/S10530-022-02737-2/TABLES/3.
- Dodd BJ, Barnhart MC, Rogers-Lowery CL, Fobian TB, Dimock RV,. 2006. Persistence of host response against glochidia larvae in *Micropterus salmoides*. *Fish & Shellfish Immunology*. **21** (5). 473–484. doi: 10.1016/J.FSI.2006.02.002.
- Donrovich SW, Douda K, Plechingerová V, Rylková K, Horký P, Slavík O, Liu HZ, Reichard M, Lopes-Lima M, Sousa R,. 2017. Invasive Chinese pond mussel *Sinanodonta woodiana* threatens native mussel reproduction by inducing cross-resistance of host fish. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. **27** (6). 1325–1333. doi: 10.1002/aqc.2759.

- Douda K, Horký P, Bílý M,. 2012. Host limitation of the thick-shelled river mussel: Identifying the threats to declining affiliate species. *Animal Conservation*. **15** (5). 536–544. doi: 10.1111/J.1469-1795.2012.00546.X.
- Douda K, 2015. a Host-dependent vitality of juvenile freshwater mussels: Implications for breeding programs and host evaluation. *Aquaculture*. **445** . 5–10. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2015.04.008.
- Douda K,. 2015. b Velcí mlži a jejich hostitelské vazby. *Živa*. **5** . 222–224.
- Douda K, Liu HZ, Yu D, Rouchet R, Liu F, Tang QY, Methling C, Smith C, Reichard M,. 2017. The role of local adaptation in shaping fish-mussel coevolution. *Freshwater Biology*. **62** (11). 1858–1868. doi: 10.1111/fwb.13026.
- Douda K, Lopes-Lima M, Hinzmann M, Machado J, Varandas S, Teixeira A, Sousa R,. 2013. Biotic homogenization as a threat to native affiliate species: fish introductions dilute freshwater mussel's host resources. *Diversity and Distributions*. **19** (8). 933–942. doi: 10.1111/DDI.12044.
- Douda K, Sell J, Kubíková-Peláková L, Horký P, Kaczmarczyk A, Mioduchowska M,. 2014. Host compatibility as a critical factor in management unit recognition: Population-level differences in mussel-fish relationships. *Journal of Applied Ecology*. **51** (4). 1085–1095. doi: 10.1111/1365-2664.12264.
- Fernández-Alacid L, Sanahuja I, Ordóñez-Grande B, Sánchez-Nuño S, Viscor G, Gisbert E, Herrera M, Ibarz A,. 2018. Skin mucus metabolites in response to physiological challenges: A valuable non-invasive method to study teleost marine species. *Science of The Total Environment*. **644** . 1323–1335. doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2018.07.083.
- Ferreira-Rodríguez N, et al. 2019. Research priorities for freshwater mussel conservation assessment. *Biological Conservation*. **231** . 77–87. doi: 10.1016/j.biocon.2019.01.002.
- Filipsson K, Brijs J, Näslund J, Wengström N, Adamsson M, Závorka L, Österling EM, Höjesjö J,. 2017. Encystment of parasitic freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) larvae coincides with increased metabolic rate and haematocrit in juvenile brown trout (*Salmo trutta*). *Parasitology Research*. **116** (4). 1353–1360. doi: 10.1007/S00436-017-5413-2/FIGURES/2.
- Froufe E, Sobral C, Teixeira A, Sousa R, Varandas S, Aldridge DC, Lopes-Lima M,. 2014. Genetic diversity of the pan-European freshwater mussel *Anodonta anatina* (Bivalvia: Unionoida) based on CO1: new phylogenetic insights and implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. **24** (4). 561–574. doi: 10.1002/AQC.2456.
- Geist J,. 2010. Strategies for the conservation of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* L.): A synthesis of conservation genetics and ecology. *Hydrobiologia*. **644** (1). 69–88. doi: 10.1007/S10750-010-0190-2/TABLES/2.
- Ghafoori Z, Heidari B, Farzadfar F, Aghamaali M,. 2014. Variations of serum and mucus lysozyme activity and total protein content in the male and female Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamensky 1901) during reproductive period. *Fish & Shellfish Immunology*. **37** (1). 139–146. doi: 10.1016/J.FSI.2014.01.016.



- Gosling E., 2015. *Marine Bivalve Molluscs: Second Edition*. Wiley Blackwell. p. 1–524. ISBN: 9780470674949.
- Gozlan RE, Britton JR, Cowx I, Copp GH., 2010. Current knowledge on non-native freshwater fish introductions. *Journal of Fish Biology*. **76** (4). 751–786. doi: 10.1111/J.1095-8649.2010.02566.X.
- Gum B, Lange M, Geist J., 2011. A critical reflection on the success of rearing and culturing juvenile freshwater mussels with a focus on the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. **21** (7). 743–751. doi: 10.1002/AQC.1222.
- Haag WR, Butler RS, Hartfield PD., 1995. An extraordinary reproductive strategy in freshwater bivalves: prey mimicry to facilitate larval dispersal. *Freshwater Biology*. **34** (3). 471–476. doi: 10.1111/j.1365-2427.1995.tb00904.x.
- Hastie LC, Young MR., 2003. Timing of spawning and glochidial release in Scottish freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) populations. *Freshwater Biology*. **48** (12). 2107–2117. doi: 10.1046/J.1365-2427.2003.01153.X.
- Henley WF, Neves RJ., 2001. Behavioral responses of glochidia of freshwater mussels (Bivalvia: Unionidae) to chemical cues of fish. *American Malacological Bulletin*. **16** (1–2). 131–135.
- Hinzmann M, Lopes-Lima M, Teixeira A, Varandas S, Sousa R, Lopes A, Froufe E, Machado J., 2013. Reproductive Cycle and Strategy of *Anodonta anatina* (L., 1758): Notes on Hermaphroditism. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. **319** (7). 378–390. doi: 10.1002/JEZ.1801.
- Hollenbeck CM, Johnston IA., 2018. Genomic tools and selective breeding in molluscs. *Frontiers in Genetics*. **9** (JUL). 253. doi: 10.3389/FGENE.2018.00253/BIBTEX.
- Horký P, Slavík O, Douša K., 2019. Altered thermoregulation as a driver of host behaviour in glochidia-parasitised fish. *Journal of Experimental Biology*. **222** (1). doi: 10.1242/JEB.184903.
- Horsák M, Čejka T, Juříčková L, Beran L, Horáčková J, Hlaváč JČ, Dvořák L, Hájek O, Divíšek J, Maňas M, Ložek V., 2018. Check-list and distribution maps of the molluscs of the Czech and Slovak Republics Check-list and distribution maps of the molluscs of the Czech and Slovak Republics. . (October). doi: 10.5281/ZENODO.5643017.
- Hruška J., 1992. The freshwater pearl mussel in South Bohemia: Evaluation of the effect of temperature on reproduction, growth and age structure of the population. *Archiv für Hydrobiologie*. **126** (2). 181–191. doi: 10.1127/archiv-hydrobiol/126/1992/181.
- Huber V, Geist J., 2017. Glochidial development of the freshwater swan mussel (*Anodonta cygnea*, Linnaeus 1758) on native and invasive fish species. *Biological Conservation*. **209** . 230–238. doi: 10.1016/J.BIOCON.2017.02.030.

- Huber V, Geist J,. 2019. a Host fish status of native and invasive species for the freshwater mussel *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758). *Biological Conservation*. **230** . 48–57. doi: 10.1016/J.BIOCON.2018.12.007.
- Huber V, Geist J,. 2019. b Reproduction success of the invasive *Sinanodonta woodiana* (Lea 1834) in relation to native mussel species. *Biological Invasions* 2019 21:11. **21** (11). 3451–3465. doi: 10.1007/S10530-019-02060-3.
- Jokela J, Valtonen TE, Lappalainen M,. 1991. Development of glochidia of *Anodonta piscinalis* and their infection of fish in a small lake in Northern Finland. *Arch. Hydrobiol.* **120** . 345–355.
- Jokela J, Palokangas P,. 1993. Reproductive tactics in *Anodonta* clams: Parental host recognition. *Animal Behaviour*. **46** (3). 618–620. doi: 10.1006/anbe.1993.1234.
- Kat PW,. 1984. Parasitism and the Unionacea ( Bivalvia). *Biological Reviews*. **59** (2). 189–207. doi: 10.1111/j.1469-185X.1984.tb00407.x.
- Klunzinger MW, Beatty SJ, Morgan DL, Thomson GJ, Lymbery AJ,. 2012. Glochidia ecology in wild fish populations and laboratory determination of competent host fishes for an endemic freshwater mussel of south-western Australia. *Australian Journal of Zoology*. **60** (1). 26–36. doi: 10.1071/ZO12022.
- Krasnov BR, Mouillot D, Shenbrot GI, Khokhlova IS, Poulin R,. 2011. Beta-specificity: The turnover of host species in space and another way to measure host specificity. *International Journal for Parasitology*. **41** (1). 33–41. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.06.001.
- Kumari S, Tyor AK, Bhatnagar A,. 2019. Evaluation of the antibacterial activity of skin mucus of three carp species. *International Aquatic Research*. **11** (3). 225–239. doi: 10.1007/S40071-019-0231-Z/TABLES/7.
- Kyle R, Beatty GE, Roberts D, Provan J,. 2016. Using genetic monitoring to inform best practice in a captive breeding programme: inbreeding and potential genetic rescue in the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. *Conservation Genetics*. **17** (6). 1323–1332. doi: 10.1007/S10592-016-0864-Z/FIGURES/2.
- Leggett HC, Buckling A, Long GH, Boots M,. 2013. Generalism and the evolution of parasite virulence. *Trends in ecology & evolution*. **28** (10). 592–596. doi: 10.1016/J.TREE.2013.07.002.
- Lõhmus M, Björklund M,. 2015. Climate change: what will it do to fish—parasite interactions? *Biological Journal of the Linnean Society*. **116** (2). 397–411. doi: 10.1111/BIJ.12584.
- Lopes-Lima M, et al,. 2017. Conservation status of freshwater mussels in Europe: state of the art and future challenges. *Biological Reviews*. **92** (1). 572–607. doi: 10.1111/brv.12244.
- Lydeard C, et al,. 2004. The global decline of nonmarine mollusks. *BioScience*. **54** (4). 321–330. doi: 10.1641/0006-3568(2004)054[0321:TGDONM]2.0.CO;2.
- McMahon RF, Bogan AE,. 2001. Mollusca: bivalvia. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*, edited by James H. Thorp, et al.. Elsevier Science

- McMurray SE, Roe KJ,. 2017. Perspectives on the Controlled Propagation, Augmentation, and Reintroduction of Freshwater Mussels (Mollusca: Bivalvia: Unionoidea). **20** (1). 1-12. doi: 10.31931/FMBC.V20I1.2017.1-12.
- Mikheev VN, Pasternak AF,. 2006. Defense behavior of fish against predators and parasites. *Journal of Ichthyology*. **46** . doi: 10.1134/S0032945206110063.
- Mikheev VN, Pasternak AF, Taskinen J, Valtonen TE,. 2013. Grouping facilitates avoidance of parasites by fish. *Parasites and Vectors*. **6** (1). doi: 10.1186/1756-3305-6-301.
- Modesto V, Ilarri M, Souza AT, Lopes-Lima M, Douda K, Clavero M, Sousa R,. 2018. Fish and mussels: Importance of fish for freshwater mussel conservation. *Fish and Fisheries*. **19** (2). 244–259. doi: 10.1111/faf.12252.
- Olsson J, Mo K, Florin AB, Aho T, Ryman N,. 2011. Genetic population structure of perch *Perca fluviatilis* along the Swedish coast of the Baltic Sea. *Journal of Fish Biology*. **79** (1). 122–137. doi: 10.1111/J.1095-8649.2011.02998.X.
- Ooue K, Terui A, Urabe H, Nakamura F,. 2017. A delayed effect of the aquatic parasite *Margaritifera laevis* on the growth of the salmonid host fish *Oncorhynchus masou masou*. *Limnology*. **18** (3). 345–351. doi: 10.1007/S10201-017-0514-2.
- Österling EM, Ferm J, Piccolo JJ,. 2014. Parasitic freshwater pearl mussel larvae (*Margaritifera margaritifera* L.) reduce the drift-feeding rate of juvenile brown trout (*Salmo trutta* L.). *Environmental Biology of Fishes*. **97** (5). 543–549. doi: 10.1007/S10641-014-0251-X/FIGURES/3.
- Patterson MA, Mair RA, Eckert NL, Gatenby CM, Brady T, Jones JW, Simmons BR, Devers JL,. 2018. Freshwater Mussel Propagation for Restoration. *Freshwater Mussel Propagation for Restoration*. doi: 10.1017/9781108551120.
- Rao V, Marimuthu K, Kupusamy T, Rathinam X, Arasu MV, Al-Dhabi NA, Arockiaraj J,. 2015. Defense properties in the epidermal mucus of different freshwater fish species. *AAFL Bioflux*. **8** (2). 184–194.
- Reichard M, Ondračková M, Przybylski M, Liu H, Smith C,. 2006. The costs and benefits in an unusual symbiosis: Experimental evidence that bitterling fish (*Rhodeus sericeus*) are parasites of unionid mussels in Europe. *Journal of Evolutionary Biology*. **19** (3). 788–796. doi: 10.1111/j.1420-9101.2005.01051.x.
- Reichard M, Polačik M, Tarkan AS, Spence R, Gaygusuz Ö, Ercan E, Ondračková M, Smith C,. 2010. The bitterling-mussel coevolutionary relationship in areas of recent and ancient sympatry. *Evolution*. **64** (10). 3047–3056. doi: 10.1111/j.1558-5646.2010.01032.x.
- Riccardi N, Froufe E, Bogan AE, Zieritz A, Teixeira A, Vanetti I, Varandas S, Zaccara S, Nagel KO, Lopes-Lima M,. 2020. Phylogeny of European Anodontini (Bivalvia: Unionidae) with a redescription of *Anodonta exulcerata*. *Zoological Journal of the Linnean Society*. **189** (3). 745–761. doi: 10.1093/ZOOLINNEAN/ZLZ136.

- Roberts SD, Powell MD,. 2005. The viscosity and glycoprotein biochemistry of salmonid mucus varies with species, salinity and the presence of amoebic gill disease. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology.* **175** (1). 1–11. doi: 10.1007/S00360-004-0453-1.
- Schmidt C, Vandr  R,. 2010. Ten years of experience in the rearing of young freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems.* **20** (7). 735–747. doi: 10.1002/AQC.1150.
- Schneider LD, Nilsson PA, Höjesjö J,  sterling ME,. 2017. Local adaptation studies and conservation: Parasite–host interactions between the endangered freshwater mussel *Unio crassus* and its host fish. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems.* **27** (6). 1261–1269. doi: 10.1002/aqc.2816.
- Schneider LD, Nilsson PA,  sterling EM,. 2018. Evaluating temperature- and host-dependent reproduction in the parasitic freshwater mussel *Unio crassus*. *Hydrobiologia.* **810** (1). 283–293. doi: 10.1007/s10750-017-3217-0.
- Sicuro B, Mioletti S, Abete C,. 2010. Potential utilisation of farmed freshwater mussels (*Anodonta anatina* and *Unio mancus*) in Italy. *Cuban Journal of Agricultural Science.* **44.4** (2010): 409-411.
- Sietman BE, Davis JM, Hove MC,. 2012. Mantle display and glochidia release behaviors of five quadraline freshwater mussel species (*Bivalvia: Unionidae*). *American Malacological Bulletin.* **30** (1). 39–46. doi: 10.4003/006.030.0103.
- Simon OP, Van ckov  I, B l  M, Douda K, Patzenhauerov  H, Hruška J, Pelt nov  A,. 2015. The status of freshwater pearl mussel in the Czech Republic: Several successfully rejuvenated populations but the absence of natural reproduction. *Limnologica.* **50** . 11–20. doi: 10.1016/J.LIMNO.2014.11.004.
- Slavík O, Hork  P, Douda K, Vel šek J, Kol řov  J, Lepi  P,. 2017. Parasite-induced increases in the energy costs of movement of host freshwater fish. *Physiology & Behavior.* **171** . 127–134. doi: 10.1016/J.PHYSBEH.2017.01.010.
- Spooner DE, Xenopoulos MA, Schneider C, Woolnough DA,. 2011. Coextirpation of host–affiliate relationships in rivers: the role of climate change, water withdrawal, and host-specificity. *Global Change Biology.* **17** (4). 1720–1732. doi: 10.1111/J.1365-2486.2010.02372.X.
- Taeubert JE, Denic M, Gum B, Lange M, Geist J,. 2010. Suitability of different salmonid strains as hosts for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems.* **20** (7). 728–734. doi: 10.1002/AQC.1147.
- Taeubert JE, Gum B, Geist J,. 2012. Host-specificity of the endangered thick-shelled river mussel (*Unio crassus*, Philipsson 1788) and implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems.* **22** (1). 36–46. doi: 10.1002/AQC.1245.

- Urbinati EC, Zanuzzo FS, Biller JD,. 2019. Stress and immune system in fish. *Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish*. 93–114. doi: 10.1016/B978-0-12-815872-2.00005-1.
- Vaughn CC, Hakenkamp CC,. 2001. The functional role of burrowing bivalves in freshwater ecosystems. *Freshwater Biology*. **46** (11). 1431–1446. doi: 10.1046/j.1365-2427.2001.00771.x.
- Wang N, et al,. 2007. Intra- and interlaboratory variability in acute toxicity tests with glochidia and juveniles of freshwater mussels (unionidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*. **26** (10). 2029–2035. doi: 10.1897/06-520R.1.
- Wengström N, Wahlqvist F, Näslund J, Aldvén D, Závorka L, Österling ME, Höjesjö J,. 2016. Do individual Activity Patterns of Brown Trout (*Salmo trutta*) alter the Exposure to Parasitic Freshwater Pearl Mussel (*Margaritifera margaritifera*) Larvae? *Ethology*. **122** (9). 769–778. doi: 10.1111/eth.12524.
- Williams JD, Butler RS, Warren GL, Johnson NA,. 2014. *Freshwater Mussels of Florida* - University of Alabama Press. Florida. University of Alabama press. p. 528. ISBN: 9780817318475.
- Wood EM,. 1974. Some mechanisms involved in host recognition and attachment of the glochidium larva of *Anodonta cygnea* (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Zoology*. **173** (1). 15–30. doi: 10.1111/J.1469-7998.1974.TB01744.X.