

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Ecology
Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
katedra ekologie

Ph.D. study program: Ecology
Doktorský studijní program: Ekologie

Summary of the Ph.D. Thesis
Autoreferát disertační práce



**The crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in its introduced ranges:
vectors, introduction pathways, genetic variation and host-pathogen interactions**

**Vektory, šíření a genetická variabilita patogenu račího moru
v oblastech, kam byl zavlečen**

Agata Mrugała

Supervisor/Školitel: Adam Petrusek

Prague, 2016

– ABSTRACT –

The crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, is responsible for substantial declines and local extinctions of native European crayfish populations. As a consequence, the pathogen is now listed among 100 world's worst invasive alien species. The spread of *A. astaci* is greatly facilitated by its natural hosts, North American crayfish, that thanks to a long co-evolutionary history with the crayfish plague pathogen evolved efficient defence mechanisms. In contrast, European, Australian and Asian crayfish species are highly susceptible to this disease agent. However, progress of *A. astaci* infection in native European crayfish was observed to differ between distinct pathogen strains, indicating variability in their virulence. Indeed, we demonstrated a relationship between patterns in crayfish immune response and *A. astaci* virulence in an experimental infection involving the European noble crayfish and three differently virulent crayfish plague strains.

The European continent is currently inhabited by at least eight North American crayfish species. The carrier status was confirmed in six of them, including also *Orconectes* cf. *virilis* occurring in the Netherlands and the UK. In this country, we detected *A. astaci* presence in some populations of the non-indigenous crayfish species as well as in individuals of the introduced catadromous crab, with the observed variation in pathogen prevalence among hosts linked to their introduction history and coexistence. Moreover, owing to aquaculture and stocking to open waters, several North American crayfish species established populations also on other continents as, e.g., *Procambarus clarkii* and *Pacifastacus leniusculus* in Japan. Therefore, as happened in Europe, they may pose a threat to endemic crayfish diversity. As the first such case, we confirmed the crayfish plague infection in Japanese populations of both crayfish species, indicating that *A. astaci* may have contributed to declines of the Japanese endemic crayfish *Cambaroides japonicus*.

The trade in ornamental crayfish species is nowadays a very popular hobby. Unfortunately, its rapid growth coincides in Europe with exotic crayfish releases to open waters. Our screening for *A. astaci* presence in various non-European crayfish species available for sale in Germany and the Czech Republic confirmed that aquarium trade may represent a source of crayfish plague pathogen (as well as other crustacean diseases), and hence may contribute to *A. astaci* spread to the natural environment with crayfish released from home aquaria. Furthermore, the crayfish plague pathogen may be also transmitted horizontally within shop facilities to presumably uninfected crayfish species, such as the parthenogenetically reproducing marbled crayfish. This widely traded crayfish taxon has been introduced to open waters in several European countries, including Slovakia where its recent expansion has been documented. Although I have not detected *A. astaci* in any of the three studied Slovak populations, the marbled crayfish might acquire the infection from the North American crayfish species encountered during its expansion.

Even ornamental crayfish of non-American origin may contribute to crayfish plague spread, if popular and widely available species exhibit elevated resistance. Experimental infection of the Australian *Cherax destructor* with *A. astaci* indeed indicated its decreased susceptibility, in comparison to European noble crayfish. Thus, *C. destructor* releases may result in formation of new pathogen reservoirs. Moreover, recently reported *A. astaci* infection in two crab species raised concerns that freshwater shrimps may also facilitate crayfish plague transmission to susceptible hosts. Although laboratory experiments with two ornamental Asian shrimp species revealed their resistance to *A. astaci*, pathogen growth was observed in some individuals and exuviae. Therefore, their potential to act as *A. astaci* vectors warrants further evaluation.

– ABSTRAKT –

Patogen račoho moru, *Aphanomyces astaci*, je zodpovědný za významný úbytek a lokální vymizení populací původních evropských druhů raků, v důsledku čehož byl zařazen mezi 100 nejhorších invazních druhů světa. Při šíření *A. astaci* mají významnou roli jeho původní hostitelé, severoamerické druhy raků, jež během dlouhé koevoluce vybudovaly efektivní obranné mechanismy proti tomuto patogenu. Naproti tomu evropské, asijské i australské druhy raků jsou vůči nákaze velmi citlivé. Průběh infekce evropských populací různými kmeny patogenu se ale často liší, což naznačuje, že existuje variabilita ve virulenci různých genotypů *A. astaci*. To se ukázalo i v experimentech, při kterých jsme evropské raky říční vystavili infekci třemi různými kmeny *A. astaci*; sledované parametry račí imunity skutečně závisely na virulenci příslušného patogenu.

V evropských vodách se v současnosti vyskytuje osm amerických druhů raků. U šesti z nich, včetně *Orconectes cf. virilis* v Nizozemí a Anglii, bylo prokázáno, že ve volné přírodě patogen račoho moru přenáší. V nizozemských vodách jsme potvrdili přítomnost *A. astaci* jak u několika amerických druhů raků, tak u migrujícího kraba čínského. Rozdíly v prevalenci patogenu v populacích jednotlivých potenciálních hostitelů souvisely zejména s jejich introdukční historií a lokální koexistencí druhů. Za účelem lovu nebo akvakultury byly americké druhy raků introdukovány i na další kontinenty, mimo jiné se tak dostal rak signální a rak červený do Japonska. V invadovaných oblastech proto tyto druhy mohou ohrožovat místní raky přenosem račoho moru podobně, jako se to stalo v Evropě. Prvním dobře doloženým případem nákazy introdukovaných populací amerických raků mimo evropský kontinent je naše studie potvrzující přítomnost *A. astaci* v populacích obou výše zmíněných druhů v Japonsku. To naznačuje, že račí mor mohl mít významný podíl na úbytku japonského endemického račoho druhu *Cambaroides japonicus*.

Chov akvariálních raků se v poslední době stal rozšířeným fenoménem. Bohužel s nárůstem jeho popularity v Evropě přibýlo i vysazování exotických račích druhů do volných vod. Naše studie zaměřená na potenciální výskyt *A. astaci* v různých druzích raků dostupných v online i kamenných obchodech v Německu a ČR

potvrdila, že obchod s akvariijními druhy může být zdrojem šíření tohoto patogenu. V důsledku toho se může z domácích akvárií dostat račí mor i do volné přírody. Patogen se může u akvaristů šířit mezi raky horizontálně a tak nakazit i hostitelské druhy, u nichž by se nákaza neočekávala – např. partenogenetického raka pruhovaného. Tento mezi akvaristy velmi rozšířený taxon byl nalezen ve vodách několika evropských zemí včetně Slovenska, kde jsme nedávno zdokumentovali jeho šíření do nových lokalit. Ačkoli nebyl patogen račího moru potvrzen v žádné ze třech studovaných slovenských populací, v případě kontaktu šířícího se raka mramorovaného s jinými nakaženými hostitelskými druhy může k jeho nakažení v budoucnosti dojít.

I okrasné druhy raků pocházející z jiných oblastí než Severní Ameriky mohou potenciálně přispívat k šíření račího moru, zejména pokud se ukáže, že některé populární druhy mají vůči *A. astaci* zvýšenou odolnost. Experimentální infekce australského raka *Cherax destructor* skutečně prokázaly, že je méně citlivý na nákazu patogenem račího moru než rak říční. Vysazování *C. destructor* by proto mohlo vést ke vzniku nových rezervoárů této nemoci. Nedávno potvrzená schopnost sladkovodních krabů hostit její patogen navíc naznačila, že i další desetinožci včetně sladkovodních krevet by mohly přispívat k šíření patogenu na citlivé hostitele. Ačkoli naše laboratorní experimenty se dvěma druhy akvariijních krevet prokázaly jejich rezistenci vůči *A. astaci*, v některých jedincích a jejich svlečkách jsme dokumentovali růst patogenu. Studium této skupiny jako potenciálních hostitelů nebo vektorů patogenu račího moru proto vyžaduje další pozornost

– CONTENTS / OBSAH –

Chapters of the thesis / Kapitoly disertační práce	1
1. Introduction	3
2. Aims of the study	6
3. Material & methods	7
4. Results & discussion	9
5. Conclusions	12
1. Úvod	15
2. Cíle práce	18
3. Materiál & metodika	19
4. Výsledky & diskuse	21
5. Závěry	23
References / Seznam použité literatury	26
Curriculum vitae	32
Životopis	33
List of publications / Seznam publikací	34

– Chapters of the thesis / Kapitoly disertační práce –

chapter 1

Tilmans M*, Mrugała A*, Svoboda J, Engelsma MY, Petie M, Soes DM, Nutbeam-Tuffs S, Oidtmann B, Roessink I, Petrusek A (2014) Survey of the crayfish plague pathogen presence in the Netherlands reveals a new *Aphanomyces astaci* carrier. *Journal of Invertebrate Pathology* 120: 74-79 (* shared first authorship)

chapter 2

Mrugała A, Kawai T, Kozubíková-Balcarová E, Petrusek A (2016) *Aphanomyces astaci* presence in Japan: a threat to the endemic and endangered crayfish species *Cambaroides japonicus*? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, doi: 10.1002/aqc.2674

chapter 3

Lipták B, Mrugała A, Pekárik L, Mutkovič A, Gruľa D, Petrusek A, Kouba A (2016) Expansion of the marbled crayfish in Slovakia: beginning of an invasion in the Danube catchment? *Journal of Limnology* 75: 305-312

chapter 4

Mrugała A, Kozubíková-Balcarová E, Chucholl C, Cabanillas Resino S, Viljamaa-Dirks S, Vukić J, Petrusek A (2015) Trade of ornamental crayfish in Europe as a possible introduction pathway for important crustacean diseases: crayfish plague and white spot syndrome. *Biological Invasions* 17: 1313-1326

chapter 5

Becking T*, Mrugała A*, Delaunay C, Svoboda J, Raimond M, Viljamaa-Dirks S, Petrusek A, Grandjean F, Braquart-Varnier C (2015) Effect of experimental exposure to differently virulent *Aphanomyces astaci* strains on the immune response of the noble crayfish *Astacus astacus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 115-124 (* shared first authorship)

chapter 6

Mrugała A, Veselý L, Petrusek A, Viljamaa-Dirks S, Kouba A (in press) May *Cherax destructor* contribute to *Aphanomyces astaci* spread in Central Europe? *Aquatic Invasions*

chapter 7

Svoboda J, Mrugała A, Kozubíková-Balcarová E, Kouba A, Diéguez-Uribeondo J, Petrusek A (2014) Resistance to the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, in two freshwater shrimps. *Journal of Invertebrate Pathology* 121: 97-104

chapter 8

Svoboda J, Mrugała A, Kozubíková-Balcarová E, Petrusek A (2016) Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *Journal of Fish Diseases*, doi: 10.1111/jfd.12472

– Introduction –

The crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, was accidentally introduced to Europe in the mid-19th century where it caused so far irreversible declines in populations of the native crayfish species (Diéguez-Uribeondo *et al.* 2006; Holdich *et al.* 2009). Consequently, to compensate for extensive losses of European crayfish stocks three North American crayfish species (*Orconectes limosus*, *Pacifastacus leniusculus*, *Procambarus clarkii*) were introduced for stocking and aquaculture (Holdich *et al.* 2009). As discovered decades later, these (and likely others) North American crayfish species are natural carriers of *A. astaci* (Unestam 1972; Vey *et al.* 1983; Diéguez-Uribeondo & Söderhäll 1993). The crayfish plague infection was also detected in some recently introduced North American crayfish species (Filipová *et al.* 2013; Schrimpf *et al.* 2013; Keller *et al.* 2014; **chapter 1**).

The introduction of *A. astaci* natural carriers accelerated pathogen spread, and contributed further to mortalities in native European crayfish populations (e.g., Vennerström *et al.* 1998; Souty-Grosset *et al.* 2006; Kozubíková *et al.* 2008; Holdich *et al.* 2009). The studies on *A. astaci* distribution and prevalence in European populations of North American crayfish species (e.g., Kozubíková *et al.* 2009, 2010; Skov *et al.* 2011; Vrålstad *et al.* 2011; Filipová *et al.* 2013; **chapter 1**) indicated that actual pathogen prevalence may be affected by several interconnected factors, e.g., density of crayfish population, temporal fluctuations in pathogen presence, type of water body inhabited by crayfish and/or age and sex of sampled individuals (Kozubíková *et al.* 2009, 2010; Matasová *et al.* 2011; Vrålstad *et al.* 2011). Moreover, the introduction history of non-indigenous species may also greatly affect the probability of pathogen introduction (Torchin *et al.* 2003). Therefore, the results obtained during monitoring of *A. astaci* prevalence (especially the lack of detections) should be interpreted with caution as only long-term extensive

sampling over several seasons may provide sufficient results representative for the real *A. astaci* status in its natural hosts.

Owing to anthropogenic introductions for commercial purposes some crayfish species, as e.g., two recognized *A. astaci* carriers in Europe: *P. clarkii* and *P. leniusculus*, have been translocated outside of their native ranges (Lodge *et al.* 2012). Recently, the crayfish plague pathogen was detected in populations of both North American crayfish species in Japan where its presence might have contributed to declines of the endemic crayfish *Cambaroides japonicus* (**chapter 2**). In addition, the presence of *A. astaci* outside of Europe and its native range in North America has been reported from crayfish farms in Israel and Taiwan (OIE; Hsieh *et al.* 2016).

The market for ornamental crayfish has grown rapidly in Central Europe in the last two decades and keeping crayfish in home aquaria gained in popularity (Chucholl 2013; Patoka *et al.* 2014). Consequently, the aquarium trade is nowadays considered the main introduction pathway of non-indigenous crayfish species into European freshwaters (Peay 2009; Chucholl 2013). It may also constitute a source of exotic pathogens, as confirmed for *A. astaci* and the white spot syndrome virus (Longshaw *et al.* 2012; **chapter 4**), and hence contribute to crayfish plague spread to the natural environment. In addition, *A. astaci* may be horizontally transmitted within shop facilities to presumably uninfected crayfish species, such as the parthenogenetically reproducing marbled crayfish (**chapter 4**).

In fact, horizontal transmission is considered responsible for detection of *A. astaci*-positive marbled crayfish individuals in Lake Moosweiher (Germany) where it coexists with infected *O. limosus* (Keller *et al.* 2014). Releases of this widely available and popular crayfish taxon have already resulted in a number of marbled crayfish encounters in the wild (Kouba *et al.* 2014; Samardžić *et al.* 2014; Lökkös *et al.* 2016; Novitsky & Son 2016). Furthermore, the marbled crayfish has successfully established populations in Germany and Slovakia (Chucholl *et al.* 2012; **chapter 3**).

So far, four distinct *A. astaci* genotype groups have been identified in Europe (Huang *et al.* 1994; Diéguez-Uribeondo *et al.* 1995; Kozubíková *et al.* 2011). Group A is associated with infected native European crayfish (*Astacus astacus* and *Astacus leptodactylus*) whereas groups B, D and E with different American crayfish species (*P. leniusculus*, *P. clarkii* and *O. limosus*, respectively). *A. astaci* strains belonging to different genotype groups may differ in such ecological properties as, e.g., climate requirements (Diéguez-Uribeondo *et al.* 1995; Rezinciuc *et al.* 2014) and virulence (Makkonen *et al.* 2012, 2014; Viljamaa-Dirks *et al.* 2013, 2016; **chapter 5**).

The differences in *A. astaci* virulence were confirmed during laboratory experiments with susceptible *A. astacus* (Makkonen *et al.* 2012, 2014; **chapter 5**). Whereas the total mortality was repeatedly observed in crayfish infected with highly virulent *A. astaci* strains from the genotype groups B and E, the crayfish plague infection developed more slowly and only sporadically caused mortality of *A. astacus* challenged with pathogen strains from genotype group A (Makkonen *et al.* 2012, 2014; **chapter 5**). As the *A. astaci* strains from group A have been also implicated in latent crayfish plague infections carried by various European crayfish species (reviewed in **chapter 8**), it was hypothesised that pathogen decreased virulence may be a result of a century-long coexistence with European crayfish species (Jussila *et al.* 2014).

Apart from *A. astaci* lowered virulence, also decreased susceptibility of hosts was suggested as a mechanism enabling latent infections in European crayfish species. Indeed, at least two non-American crayfish species *A. leptodactylus* and *Cherax destructor* seem less susceptible to *A. astaci*, based on laboratory experiments (Unestam 1969, 1975, **chapter 6**). Therefore, under favourable conditions established populations of these crayfish species may act as pathogen reservoirs in European freshwaters; this seems true not only for widespread and frequently traded *A. leptodactylus* (confirmed to

host *A. astaci* in some regions; Kokko *et al.* 2012; Pârvulescu *et al.* 2012; Schrimpf *et al.* 2012; Svoboda *et al.* 2012), but we suppose it may be relevant also for *C. destructor* when established in the wild. Other freshwater decapods could also be involved in *A. astaci* transmission to European crayfish species, as already confirmed for the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Schrimpf *et al.* 2014).

– Aims of the study –

The thesis focuses on four interconnected topics: 1) distribution and prevalence of *A. astaci* infection in populations of its natural hosts introduced to new regions, 2) novel introduction pathways as well as vectors of *A. astaci*, 3) genetic variation of the crayfish plague pathogen, 4) *A. astaci* pathogenicity and crayfish immune defence dynamics.

Specifically, the main aims were:

- to evaluate *A. astaci* presence and prevalence in Dutch populations of North American crayfish species and Asian catadromous crab (**chapter 1**), in Japanese populations of two North American crayfish, *P. clarkii* and *P. leniusculus* (**chapter 2**), as well as in newly discovered Slovak populations of the marbled crayfish (**chapter 3**)
- to assess the presence of two exotic pathogens, *A. astaci* and white spot syndrome virus, in the ornamental trade markets in Germany and the Czech Republic (**chapter 4**)
- to experimentally evaluate potential correlation between *A. astaci* virulence and the immune response of European crayfish species *A. astacus* (**chapter 5**)
- to experimentally investigate the susceptibility of Australian yabby, *Cherax destructor*, to the crayfish plague pathogen present in Central European freshwaters (**chapter 6**)
- to experimentally evaluate resistance to *A. astaci* of two freshwater Asian shrimp species *Macrobrachium dayanum* and *Neocaridina davidi* (**chapter 7**)

- to review recent advances in *A. astaci* research with respect to its host range and transmission (**chapter 8**)

– **Material & methods** –

The material used in the thesis was as follows:

- selected Dutch populations of five North American crayfish species (*O. limosus*, *O. cf. virilis*, *P. leniusculus*, *P. clarkii*, *Procambarus cf. acutus*; in total 216 individuals) as well as of the Asian catadromous crab (29 individuals; **chapter 1**)
- selected Japanese populations of *P. clarkii* and *P. leniusculus* (54 & 47 individuals, respectively; **chapter 2**)
- three Slovak populations of the marbled crayfish (80 individuals; **chapter 3**)
- ornamental crayfish species purchased from aquarium trade in Germany and the Czech Republic (in total 242 crayfish individuals covering 19 taxa; **chapter 4**)
- the noble crayfish, *A. astacus*, obtained from an aquaculture (380 individuals) exposed to three *A. astaci* strains (belonging to genotype groups A, B & E; **chapter 5**)
- the Australian yabby, *C. destructor*, obtained from an experimental culture (70 individuals) and *A. astacus* sampled from wild Czech population (36 individuals) exposed as in **chapter 5** to three *A. astaci* strains (**chapter 6**)
- two Asian shrimp species, *M. dayanum* and *N. davidi* (in total 62 & 33 individuals, respectively) purchased from the aquarium trade and *A. astacus* from an experimental culture (14 individuals) exposed to *A. astaci* strain from genotype group D (**chapter 7**)

Detection and characterization of *A. astaci* in host tissues

- dissection (**chapters 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**) of crayfish and crab tissues likely to contain *A. astaci* mycelium (e.g., soft

abdominal cuticle, uropods and telson, any melanized tissues).

- DNA extraction from dissected crayfish and crab tissues ground beforehand in liquid nitrogen (**chapters 1, 2, 3, 4, 6, 7**) or crushed with stainless steel beads (**chapter 5**). Up to 50 mg of mix-tissue samples were used in DNA extraction with a DNeasy tissue kit (Qiagen; **chapters 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**).
- DNA extraction from whole shrimp bodies (**chapter 7**) with a phenol-chloroform method.
- conventional PCR and *A. astaci* sequencing (**chapters 1, 2, 4**) using PCR assay targeting the internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA (Oidtmann *et al.* 2006). *A. astaci*-positive samples (assessed by visualization with agarose gel electrophoresis) were purified with ethanol precipitation, sequenced and compared with publicly available *A. astaci* sequences in GenBank.
- TaqMan MGB quantitative PCR (**chapters 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**) according to Vrålstad *et al.* (2009) with minor modifications to increase assay specificity (as in Svoboda *et al.* 2014)
- microsatellite analysis (**chapter 2**) with nine co-dominant markers according to Grandjean *et al.* (2014)

Detection of the white spot syndrome virus (WSSV; **chapter 4**)

- DNA isolates previously used for *A. astaci* detection were analyzed with a nested PCR according to Lo *et al.* (1996). The PCR results were visualized with agarose gel electrophoresis. WSSV-positive detections were later confirmed with sequencing (preceded by ethanol precipitation of PCR products) and subsequent comparison with publicly available sequences in GenBank.

COI barcoding of crayfish specimens (**chapters 3, 4**)

- 658 bp long fragment of the mitochondrial gene for the cytochrome c oxidase subunit I (COI) was amplified with

primers LCO1490 and HCO2198 designed by Folmer *et al.* (1994). Prior to sequencing, PCR products were visualized on agarose gel and purified with ethanol precipitation. Obtained sequences were later compared with those publicly available in GenBank.

Statistical analyses

- estimation of *A. astaci* prevalence in studied populations of North American crayfish species by calculation of the 95% confidence intervals (as in Filipová *et al.* 2013; **chapters 1, 2**)
- Kaplan-Meier survival test (**chapters 5, 6**); Shapiro-Wilk, Bartlett, Tukey HSD and Kruskal-Wallis tests (**chapter 5**); Mann-Whitney U-test (**chapter 7**).

– Results & discussion –

The presence of *A. astaci* infection was confirmed in Dutch populations of some North American crayfish species as well as in individuals of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* (**chapter 1**), with the observed variation in pathogen prevalence consistent with observations in other European countries (e.g., Kozubíková *et al.* 2009; Filipová *et al.* 2013). Moderate *A. astaci* prevalence was detected in populations of *O. limosus*, *P. leniusculus* and *E. sinensis*, whereas the pathogen was only sporadically detected in populations of *P. clarkii*. For the first time, crayfish plague infection was reported in the populations of *Orconectes* cf. *virilis*, being after *Orconectes immunis*, the second newly introduced crayfish species testing positive for *A. astaci* presence (Filipová *et al.* 2013; Schrimpf *et al.* 2013). Contrastingly, despite an extensive sampling, no pathogen was detected in *P. cf. acutus*.

The screening of selected populations of two North American crayfish species, *P. clarkii* and *P. leniusculus* revealed *A. astaci* presence also in Japanese freshwaters (**chapter 2**). The crayfish

plague pathogen was detected in every sampled location with moderate to very high prevalence in *P. leniusculus* and *P. clarkii* populations, respectively. The endemic Japanese crayfish, *C. japonicus*, is according to laboratory experiments highly susceptible to the crayfish plague pathogen (Unestam 1969). Therefore, the presence of *A. astaci* carriers pose a threat of pathogen transmission and might have contributed to declines in *C. japonicus* populations, as already suggested by Nakata & Goshima (2003).

Three newly established populations of the parthenogenetically reproducing marbled crayfish, *Procambarus fallax* f. *virginialis*, were reported from Slovakia (**chapter 3**). Due to their location close to major rivers in the Danube basin, these populations may serve as a source of crayfish further expansion. Although the pathogen was not detected in marbled crayfish populations in this country, *A. astaci* may be transmitted horizontally to marbled crayfish individuals, as already observed in the German aquarium trade (Viljamaa-Dirks *et al.* 2014; **chapter 4**), and in Lake Moosweiher in Germany where this crayfish coexists with infected *O. limosus* (Keller *et al.* 2014). Therefore, if these crayfish manage to successfully spread to the River Danube, they may encounter established populations of *A. astaci* carriers and thus further contribute to pathogen transmission to susceptible European crayfish.

The screening of ornamental crayfish species for the presence of two important agents of crustacean diseases, the crayfish plague pathogen and the white spot syndrome virus, revealed their presence in the aquarium trade markets in Germany and the Czech Republic (**chapter 4**). While WSSV was only confirmed in three individuals of Australian *Cherax quadricarinatus*, crayfish plague pathogen was detected in eight American and one Australian crayfish species, comprising in total 27 % of screened crayfish batches. Furthermore, the study revealed *A. astaci* horizontal transmission between crayfish species within shop facilities, indicating that also presumably uninfected crayfish might acquire the crayfish plague infection. The

DNA barcoding of purchased crayfish individuals revealed several inconsistencies between shop labelling and species identity that are likely to contribute to introductions of crayfish species and their associated pathogens.

Individuals of the European crayfish species, *A. astacus*, were exposed to three *A. astaci* strains responsible for the crayfish plague outbreaks in Central Europe (e.g., Filipová *et al.* 2013; Kozubíková-Balcarová *et al.* 2014) and belonging to two highly virulent (B & E) and one of lower virulence (A) genotype groups (**chapter 5**). The intensity and timing of the immune response differed between *A. astaci* strains as well as between the spore concentrations (1 and 10 spores ml⁻¹). In addition, the virulence of crayfish plague strain belonging to the genotype group E (isolated from *O. limosus*) was experimentally tested for the first time, revealing equally high and rapid mortality as caused by the genotype group B (from *P. leniusculus*).

Experimental exposure of *C. destructor* to two doses of *A. astaci* zoospores (10 and 100 spores ml⁻¹) from the same pathogen strains as used in **chapter 5** confirmed its presumed decreased susceptibility, compared with that of European noble crayfish (**chapter 6**). In contrast to *A. astacus*, some survival among *C. destructor* individuals was observed after exposure to the least virulent *A. astaci* strain (from the genotype group A). Moreover, despite no survival of Australian crayfish after infection with the two more virulent strains, compared with *A. astacus*, their mortality was significantly delayed.

Two Asian shrimp species were exposed to zoospores of *A. astaci* strain belonging to genotype group D (**chapter 7**). In contrast to *A. astacus*, no mortality was observed among infected shrimp individuals. In *N. davidi*, frequent moulting was suggested as a factor contributing to decreasing levels of *A. astaci* DNA. However, high pathogen DNA levels were detected in some non-moulting individuals and exuviae of *M. dayanum*, indicating that pathogen growth may have occurred in tissues of this shrimp species.

– Conclusions –

Substantial variation in pathogen prevalence among *A. astaci* hosts in the Netherlands is most likely linked to their introduction history and coexistence (**chapter 1**). Relatively high prevalence of *A. astaci* infection in populations of *O. limosus*, the most widespread non-indigenous crayfish species in the Netherlands (Soes & Koese 2010), indicates that this crayfish species may serve as an important *A. astaci* reservoir in Dutch open waters. Moreover, the identification of *A. astaci* infections in newly confirmed crayfish plague carrier, *O. cf. virilis*, deserves further consideration as it may carry novel *A. astaci* strain differing in such properties as virulence and climate requirements.

Similarly as happened in Europe, also in Japan introduction of the North American crayfish species may impose irreversible impacts on the native crayfish species (**chapter 2**). Therefore, prevention of further spread and new introductions of North American crayfish species, and hence also *A. astaci* transmission and emergence of novel pathogen strains, is especially recommended in every region inhabited by susceptible to *A. astaci* crayfish species.

The presence and potential spread of the parthenogenetically reproducing marbled crayfish in Slovak freshwaters represents a threat to native European crayfish species (**chapter 3**), particularly with regard to its capacity for competition with other crayfish species (Jimenez & Faulkes 2010) and ability to spread *A. astaci* (Keller *et al.* 2014; **chapter 4**). Given that the marbled crayfish is a widely available ornamental crayfish introduced already to several locations in Europe, development of management strategies aiming to prevent its further expansion is especially recommended.

Detection of the crayfish plague pathogen in the ornamental non-European crayfish (**chapter 4**) indicates that the aquarium trade, considered nowadays as the most important introduction pathway of non-indigenous crayfish in Europe (Peay 2009), may also act as

A. astaci reservoir. It may facilitate pathogen transmission to the natural environment in a twofold manner 1) with discarded water, or 2) with infected crayfish individuals that were either released from home aquaria or escaped from garden ponds. Therefore, public education focused on mechanisms of pathogen introduction into aquatic environments is especially recommended in regions characterized by high popularity of ornamental crayfish.

The crayfish plague infection significantly affects the immune system of the European noble crayfish (**chapter 5**). The more virulent is *A. astaci* strain, the faster and stronger is the host immune response. However, the response is not sufficient to prevent the development of the infection by the more virulent strains, which results in high mortality of infected hosts. In contrast, individuals of *A. astacus* are able to survive exposure to zoospores of *A. astaci* strain from genotype group A, thus providing an evidence of pathogen's loss of virulence during more than a century of interactions with European crayfish (Jussila *et al.* 2014).

Elevated resistance of *C. destructor* to crayfish plague pathogen (**chapter 6**), depending on *A. astaci* virulence, may lead to chronic infections or delayed mortalities in *C. destructor* populations. The potential of the yabby to survive Central European winters (Veselý *et al.* 2015; Kouba *et al.* 2016) together with its environmental plasticity known from Australia (Beatty *et al.* 2005) indicate that this crayfish species is likely to establish populations in temperate Europe. Therefore, under favourable conditions, releases of this common ornamental crayfish species may contribute to formation of new *A. astaci* reservoirs in Central Europe.

Lack of the mortality among experimentally infected freshwater shrimps but also some indications of likely mycelium growth in their tissues highlights that further experiments, preferably including shrimp species with lower moult frequency, are crucial to evaluate their potential ability to become long-term *A. astaci* carriers capable of pathogen transmission to other hosts (**chapter 7**). Moreover,

experimental exposures with other *A. astaci* strains differing in, e.g., virulence should also be considered.

Research on *A. astaci* has greatly benefited from the development of molecular methods for pathogen diagnostics and characterization and has led to recent advances in *A. astaci* biology with respect to its host range and transmission (**chapter 8**). Nevertheless, our knowledge on this devastating invasive pathogen still has many gaps and there is no doubt that research on *A. astaci* will continue.

– Úvod –

Patogen račího moru *Aphanomyces astaci* byl v polovině 19. století náhodně zavlečen do Evropy a způsobil zde rozsáhlé a zatím nezvratné úbytky populací původních druhů raků (Diéguez-Uribeondo *a kol.* 2006; Holdich *a kol.* 2009). Následně, aby se tyto úbytky kompenzovaly, byly za účelem vysazování a chovu dovezeny tři račí druhy ze Severní Ameriky: rak pruhovaný *Orconectes limosus*, rak signální *Pacifastacus leniusculus* a rak červený *Procambarus clarkii* (Holdich *a kol.* 2009). Později se ale prokázalo, že tyto a zřejmě i mnozí jiní severoameričtí raci jsou původními hostiteli *A. astaci* (Unestam 1972; Vey *a kol.* 1983; Diéguez-Uribeondo & Söderhäll 1993). Infekce tímto patogenem byla prokázána i u dalších druhů nedávno introdukovaných amerických račích druhů (Filipová *a kol.* 2013; Schrimpf *a kol.* 2013; Keller *a kol.* 2014; **kap. 1**).

Introdukce původní hostitelů *A. astaci* do Evropy urychlila šíření račího moru a přispěla k dalším masovým úhynům evropských raků (např. Vennerström *a kol.* 1998; Souty-Grosset *a kol.* 2006; Kozubíková *a kol.* 2008; Holdich *a kol.* 2009). Studie zaměřené na výskyt patogenu v hostitelských populacích (např. Kozubíková *a kol.* 2009, 2010; Skov *a kol.* 2011; Vrålstad *a kol.* 2011; Filipová *a kol.* 2013; **kap. 1**) naznačily, že jeho momentální prevalence může být ovlivněna řadou vzájemně souvisejících faktorů jako hustoty populace, typu lokality, věku a případně pohlaví vzorkovaných jedinců, a navíc se může měnit v čase (Kozubíková *a kol.* 2009, 2010; Matasová *a kol.* 2011; Vrålstad *a kol.* 2011). Konkrétní historie introdukce nepůvodního hostitelského druhu také může velmi významně ovlivnit pravděpodobnost, že s ním bude zavlečen i patogen (Torchin *a kol.* 2003). Výsledky získané z terénního monitoringu *A. astaci* (zejména možná absence patogenu) musí být tedy interpretovány opatrně, neboť pouze dlouhodobější a poměrně intenzivní sledování může přinést data dobře reprezentující skutečný status hostitelských populací.

V důsledku vysazování lidmi pro komerční účely se některé račí druhy dostaly do oblastí mimo své původní areály; to platí i pro prokázané hostitele račí moru, raka signálního a raka červeného (Lodge *a kol.* 2012). Nedávno jsme potvrdili, že tyto druhy jsou nakažené patogenem račího moru i v Japonsku, což naznačuje, že přenos choroby mohl hrát významnou roli v úbytku místního endemického druhu *Cambaroides japonicus* (**kap. 2**). Přítomnost *A. astaci* mimo Evropu a Severní Ameriku byla potvrzena také na račích farmách v Izraeli a na Taiwanu (OIE; Hsieh *a kol.* 2016).

V posledních desetiletích se ve střední Evropě významně rozvinul obchod s raky pro okrasné účely a chov akvariálních raků se stal populárním koníčkem (Chucholl 2013; Patoka *a kol.* 2014). V důsledku toho je právě akvaristika v současnosti považována za nejdůležitější cestu introdukcí dalších nepůvodních račích druhů do evropských vod (Peay 2009; Chucholl 2013). Zároveň může přispět i k šíření patogenů, což bylo prokázáno jak pro *A. astaci*, tak pro *white spot syndrome virus* (Longshaw *a kol.* 2012; **kap. 4**). I akvariální raci proto mohou přispět k pronikání račího moru do volné přírody. V rámci umělých chovů navíc může dojít k horizontálnímu přenosu na hostitelské druhy, u nichž není infekce primárně očekávána – např. na partenogenetického raka mramorovaného (**kap. 4**).

Právě tento způsob přenosu nákazy zřejmě vysvětluje detekci nákazy *A. astaci* v jedincích raka mramorovaného z německého jezera Moosweiher, kde koexistují s nakaženými raky pruhovanými (Keller *a kol.* 2014). Vysazování raka mramorovaného nezodpovědnými akvaristy již vedlo k nálezům tohoto taxonu v řadě evropských zemí (Kouba *a kol.* 2014; Samardžić *a kol.* 2014; Lökkös *a kol.* 2016; Novitsky & Son 2016). Minimálně v některých případech došlo k vytvoření jeho stabilních rozmnožujících se populací, což je doloženo z Německa a Slovenska (Chucholl *a kol.* 2012; **kap. 3**).

Doposud byly v Evropě popsány čtyři odlišné genotypové skupiny patogenu račího moru (Huang *a kol.* 1994; Diéguez-Uribeondo *a kol.* 1995; Kozubíková *a kol.* 2011). Skupina A byla

vždy izolována z nakažených evropských druhů (raka říčního *Astacus astacus* a raka bahenního *Astacus leptodactylus*), zatímco skupiny B, D a E jsou vázány na odlišné severoamerické hostitele (*P. leniusculus*, *P. clarkii* a *O. limosus*). Kmeny *A. astaci* z různých genotypových skupin se mohou lišit ve svých vlastnostech, jako jsou např. klimatické nároky (Diéguez-Uribeondo *a kol.* 1995; Rezinciuc *a kol.* 2014) nebo virulence (Makkonen *a kol.* 2012, 2014; Viljamaa-Dirks *a kol.* 2013, 2016; **kap. 5**).

Rozdíly ve virulenci různých kmenů *A. astaci* byly opakovaně potvrzeny v experimentech s citlivým rakem říčním (Makkonen *a kol.* 2012, 2014; **kap. 5**). Zatímco v případě vysoce virulentních kmenů z genotypových skupin B a E docházelo k úhynu všech nakažených jedinců, infekce se rozvinula významně pomaleji a jen občas způsobila úhyn raků říčních vystavených kmenům z genotypové skupiny A (Makkonen *a kol.* 2012, 2014; **kap. 5**). Vzhledem k tomu, že nedávno doložené latentní nákazy račím morem v různých citlivých hostitelských druzích byly obvykle asociované s kmeny z genotypové skupiny A (viz shrnutí v **kap. 8**), předpokládá se, že jejich snížená virulence by mohla být důsledkem více než stopadesátileté koevoluce s evropskými račími druhy (Jussila *a kol.* 2014).

Mechanismem umožňujícím latentní nákazy *A. astaci* u evropských raků nemusí být pouze snížená virulence patogenu, ale i snížená citlivost hostitelů. Minimálně u dvou neamerických račích druhů, konkrétně palearktického raka bahenního *A. leptodactylus* a australského *Cherax destructor*, to bylo prokázáno laboratorními experimenty (Unestam 1969, 1975, **kap. 6**). Za určitých podmínek mohou takové druhy zřejmě fungovat jako rezervoáry patogenu – to bylo opakovaně prokázáno pro raka bahenního (Kokko *et al.* 2012; Pârvulescu *et al.* 2012; Schrimpf *et al.* 2012; Svoboda *et al.* 2012), ale předpokládáme, že by to mohlo být relevantní i pro případné vysazené populace *C. destructor*. I další sladkovodní desetinožci mohou přispívat k přenosu račího moru na citlivé druhy raků, jak bylo konkrétně prokázáno pro kraba čínského *Eriocheir sinensis* (Schrimpf

a kol. 2014).

– Cíle práce –

Tato disertační práce se zaměřuje na čtyři vzájemně propojená témata: 1) rozšíření a prevalence patogenu račího moru *A. astaci* v populacích jeho původních hostitelů zavlečených do nových oblastí, 2) možné nové způsoby šíření a nové vektory *A. astaci*, 3) genetickou variabilitu patogenu račího moru, 4) patogenicitu *A. astaci* a imunitní odpověď račích hostitelů.

Specifické cíle práce byly následující:

- zhodnotit přítomnost a prevalenci *A. astaci* v nizozemských populacích různých severoamerických druhů raků a dále migrujícího kraba čínského (**kap. 1**), v japonských populacích dvou amerických druhů raků, *P. clarkii* a *P. leniusculus* (**kap. 2**), a dále v nově objevených slovenských populacích raka mramorovaného (**kap. 3**)
- vyhodnotit možnou přítomnost dvou významných patogenů korýšů, *A. astaci* a viru *white spot syndrome*, v račích dostupných na akvariijním trhu v Německu a České republice (**kap. 4**)
- experimentálně vyhodnotit možné vztahy mezi virulencí odlišných kmenů *A. astaci* a charakteristikách imunitní odpovědi nakažených raků říčních *A. astacus* (**kap. 5**)
- experimentálně stanovit míru citlivosti australského raka *Cherax destructor* vůči kmenům patogenu račího moru vyskytujících se ve středoevropských vodách (**kap. 6**)
- experimentálně vyhodnotit citlivost či rezistenci vůči *A. astaci* u dvou asijských druhů sladkovodních krevet, *Macrobrachium dayanum* a *Neocaridina davidi* (**kap. 7**)
- shrnout nedávné pokroky ve výzkumu *A. astaci*, týkající se hostitelského spektra a přenosu patogenu (**kap. 8**)

– Materiál & metodika –

Materiál studovaný v dílčích kapitolách této práce byl následující:

- vzorky z nizozemských populací pěti severoamerických račích druhů (*O. limosus*, *O. cf. virilis*, *P. leniusculus*, *P. clarkii*, *Procambarus cf. acutus*; celkem 216 jedinců) a katadromního kraba čínského (29 jedinců; **kap. 1**)
- vzorky z vybraných japonských populací *P. clarkii* a *P. leniusculus* (54 a 47 jedinců; **kap. 2**)
- vzorky ze třech slovenských populací raka mramorovaného (80 jedinců; **kap. 3**)
- akvarijní druhy raků získané z obchodů v Německu a ČR (celkem 242 jedinců z 19 druhů; **kap. 4**)
- 380 jedinců raka říčního z francouzského chovu vystavené třem kmenům *A. astaci* (z genotypových skupin A, B a E; **kap. 5**)
- 70 jedinců *Cherax destructor* z experimentálního chovu a 36 jedinců raka říčního získané s povolením z přírodní populace vystavené třem kmenům *A. astaci* (viz výše; **kap. 6**)
- dva asijské druhy sladkovodních krevet, *Macrobrachium dayanum* a *Neocaridina davidi* (celkem 62 a 33 jedinců) zakoupené z akvarijních chovů a *A. astacus* z laboratorního chovu (14 jedinců) vystavené kmenu *A. astaci* z genotypové skupiny D (**kap. 7**)

Detekce a charakterizace *A. astaci* v tkáních hostitelů

- pitvy raků a krabů za účelem extrakce tkání, jež by mohly obsahovat mycelium *A. astaci*, tj. měkká kutikula zadečku, uropody a telson, melanizované tkáně (**kap. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**).
- extrakce DNA ze směsi vypitvaných tkání (cca 50 mg) rozdrcených v kapalném dusíku (**kap. 1, 2, 3, 4, 6, 7**) nebo

pomocí ocelových kuliček (**kap. 5**) pomocí DNeasy tissue kit (Qiagen; **kap. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**).

- extrakce DNA z celých těl drobných krevet (**kap. 7**) fenolem a chloroformem
- konvenční PCR a sekvenace amplifikovaných produktů (**kap. 1, 2, 4**) využitím specifických primerů cílících na *internal transcribed spacer* (ITS) ribozomální DNA (Oidtmann *a kol.* 2006). Vzorke s předpokládaným zachytem genomu *A. astaci* (t.j. s příslušnou velikostí PCR produktu vizualizovaného pomocí agarózové elektroforézy) byly purifikovány precipitací s etanolem, sekvenovány a srovnány s referenčními sekvencemi *A. astaci* z GenBank.
- kvantitativní PCR (**kap. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**) dle Vrålstad *a kol.* (2009), s drobnými modifikacemi protokolu pro zvýšení specificity (dle Svobody *a kol.* 2014)
- microsatelitové genotypování (**kap. 2**) za pomoci devíti kodominantních markerů dle Grandjeana *a kol.* (2014)

Detekce viru *white spot syndrome* (WSSV; **kap. 4**)

- DNA izoláty použité i pro detekci *A. astaci* byly analyzovány pomocí *nested* PCR dle Lo *a kol.* (1996). Výsledky PCR byly vizualizovány agarózovou elektroforézou. Předpokládaný výskyt WSSV byl následně potvrzen sekvenací PCR produktu (po etanolové precipitaci) a srovnáním se sekvencemi z GenBank.

COI *barcoding* raků (**kap. 3, 4**)

- 658 bp dlouhý fragment mitochondriálního genu pro podjednotku I cytochrom c oxidázy (COI) byl namnožen pomocí primerů LCO1490 a HCO2198 dle Folmera *a kol.* (1994) a následně osekvenován. Výsledné sekvence byly srovnány s referenčními sekvencemi z GenBank.

Statistické analýzy

- odhad prevalence *A. astaci* ve studovaných populacích severoamerických druhů výpočtem 95% konfidenčních intervalů (podobně jako ve Filipová *a kol.* 2013; **kap. 1, 2**)
- využití následujících statistických testů: Kaplan-Meier survival test (**kap. 5, 6**); Shapiro-Wilk, Bartlett, Tukey HSD, Kruskal-Wallis (**kap. 5**); Mann-Whitney U-test (**kap. 7**).

– Výsledky & diskuse –

Potvrdili jsme přítomnost *A. astaci* v nizozemských populacích několika druhů severoamerických raků stejně jako v jedincích kraba čínského, *Eriocheir sinensis* (**kap. 1**). Pozorovaná variabilita v prevalenci mezi populacemi a druhy odpovídala výsledkům z jiných evropských zemí (např. Kozubíková *a kol.* 2009; Filipová *a kol.* 2013). Střední hodnoty prevalence jsme detekovali v populacích *Orconectes limosus*, *Pacifastacus leniusculus* a *E. sinensis*, patogen byl jen zcela výjimečně nalezen v nizozemských populacích *Procambarus clarkii*. Poprvé jsme potvrdili infekci patogenem račího moru v populacích *Orconectes cf. virilis* (nizozemských i anglických). Po druhu *Orconectes immunis* se jednalo o druhý případ infikovaných jedinců račího druhu, jenž byl introdukovan do Evropy relativně nedávno (Filipová *a kol.* 2013; Schrimpf *a kol.* 2013). Naproti tomu u *Procambarus cf. acutus* se nepodařilo patogen račího moru detekovat navzdory intenzivnímu testování.

Studium vybraných populací dvou severoamerických račích druhů rozšířených v Japonsku, *P. clarkii* a *P. leniusculus*, potvrdilo přítomnost *A. astaci* v této zemi (**kap. 2**). Patogen račího moru byl nalezen v každé studované hostitelské populaci, a to ve střední až vysoké prevalenci. Endemický japonský druh raka *Cambaroides japonicus*, jenž je dle laboratorních experimentů náchylný na račí mor (Unestam 1969), je proto přítomností *A. astaci* ohrožen. Domníváme se, že račí mor mohl již v minulosti přispět k úbytku *C. japonicus*, což ostatně naznačili již Nakata & Goshima (2003).

Tři nové dobře etablované populace partenogenetického raka mramorovaného, *Procambarus fallax* f. *virginalis*, byly potvrzeny z území Slovenska (**kap. 3**). Vzhledem k tomu, že se nacházejí v bezprostřední blízkosti velkých řek v povodí Dunaje, mohou být ohniskem pro expanzi tohoto druhu. Ačkoli ve studovaných slovenských vzorcích raka mramorovaného nebyl patogen račího moru nalezen, v případě kontaktu s jinými nakaženými druhy může dojít k horizontálnímu přenosu *A. astaci*. To bylo potvrzeno u jedinců z akvariálních chovů (Viljamaa-Dirks *a kol.* 2014; **kap. 4**) i v populaci v německém jezeru Moosweiher, kde rak mramorovaný koexistuje s infikovaným rakem pruhovaným (Keller *a kol.* 2014). Pokud se tedy raci mramorovaní rozšíří ze stávajících slovenských populací po toku Dunaje, je jen otázkou času, kdy se setkají s nakaženými hostiteli a začnou dále přenášet račí mor.

Sledování výskytu dvou významných patogenů korýšů (*A. astaci* a *white spot syndrome virus*) v akvariálních racích z německého a českého trhu potvrdilo, že zájmový chov raků může přispívat k šíření těchto nemocí (**kap. 4**). WSSV byl nalezen pouze u třech jedinců australského raka *Cherax quadricarinatus*, ale patogen račího moru byl detekován u osmi amerických a jednoho australského druhu (ve více než čtvrtině zásilek). Naše studie dále potvrdila horizontální přenos *A. astaci* mezi raky od téhož dodavatele, což naznačuje, že i druhy, u nichž by se nákaza nepředpokládala, mohou v akvariálních chovech nemoc chytit. Analýza DNA zakoupených raků prokázala několik případů rozporu mezi udávanou a skutečnou identitou daných taxonů; nesprávné označování prodávaných raků přitom může přispívat k šíření nových nepůvodních druhů i s nimi asociovaných patogenů.

Jedinci původního evropského raka říčního byli vystaveni experimentální infekci třemi kmeny *A. astaci*, jež způsobují masové úhyny na račí mor ve střední a západní Evropě (např. Filipová *a kol.* 2013; Kozubíková-Balcarová *a kol.* 2014). Tyto kmeny patřily do různých genotypových skupin, jak vysoce virulentních (B & E), tak se

sníženou virulencí (A) (**kap. 5**). Intenzita i časový průběh imunitní odpovědi raků se lišily jak mezi různými kmeny *A. astaci*, tak mezi koncentracemi spor (1 a 10 spor ml⁻¹). Virulence kmenu patřícího do genotypové skupiny E (izolované původně z raka pruhovaného) byla testována poprvé, prokázali jsme přitom, že mortalita po expozici tomuto kmenu je zcela srovnatelná s genotypovou skupinou B (z raka signálního).

Experimentální expozice australského druhu *Cherax destructor* dvěma různými koncentracím zoospor *A. astaci* (10 a 100 spor ml⁻¹) od stejných kmenů jako ve výše zmiňované studii potvrdila, že tento hostitelský druh je na račí mor méně citlivý než rak říční (**kap. 6**). Na rozdíl od raků říčních alespoň někteří jedinci *C. destructor* přežili expozici sporám nejméně virulentního kmene *A. astaci* (z genotypové skupiny A) a ačkoli v paralelkách s virulentnějšími kmeny zemřeli všichni raci, *C. destructor* přežíval signifikantně déle než raci říční.

Dva asijské druhy krevet byly exponovány zoosporám kmene *A. astaci* z genotypové skupiny D (**kap. 7**). Na rozdíl od raků říčních krevety nevykazovaly žádnou mortalitu. V případě druhu *Neocaridina davidi* předpokládáme, že časté svlékání přispělo k postupnému snížení množství detekované DNA *A. astaci*. V případě některých nesvlékajících se jedinců a svleček druhu *Macrobrachium dayanum* ale byly detekovány vysoké hodnoty DNA patogenu, což naznačuje, že v tkáních těchto krevet mohl patogen růst.

– Závěry –

Značná variabilita v prevalenci *A. astaci* v populacích různých hostitelských druhů v Nizozemí je zřejmě důsledkem rozdílné historie jejich introdukce (**kap. 1**). Poměrně vysoká prevalence *A. astaci* u raka pruhovaného, nejrozšířenějšího nepůvodního račího druhu v Nizozemí (Soes & Koese 2010), naznačuje, že tento druh je klíčovým rezervoárem patogenu v zemi. Potvrzení, že *O. cf. virilis* je dalším hostitelem *A. astaci* v evropských vodách, zasluhuje pozornost, protože tento druh může potenciálně šířit neznámý kmen či

kmeny *A. astaci*, jež se mohou lišit od aktuálně známých např. virulencí nebo klimatickými nároky.

Podobně jako se to stalo v Evropě, zavlečení amerických raků může vést k nezvratným změnám v místní endemické astakofauně i v Japonsku (**kap. 2**). Je proto zásadní zamezit dalšímu vysazování a šíření severoamerických druhů raků, a tím i potenciálnímu přenosu *A. astaci* či dalších patogenů, ve všech oblastech, kde se vyskytují citlivé račí druhy.

I přítomnost a potenciální šíření partenogenetického raka mramorovaného na Slovensku je hrozbou pro evropské račí druhy (**kap. 3**). Důvodem je jak jeho vysoká schopnost konkurovat původním druhům (Jimenez & Faulkes 2010), tak i potenciál šířit račí mor (Keller *a kol.* 2014; **kap. 4**). Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi rozšířený a populární druh mezi chovateli, jenž byl vysazen do volné přírody na řadě míst Evropy, bylo by velmi vhodné nalézt takové managementové strategie, jež by zabránily nebo omezily jeho další šíření.

Detekce patogenu račího moru v racích chovaných pro okrasné účely (**kap. 4**) potvrzuje, že akvarijní trh, jenž je v současnosti nejdůležitější vstupní branou pro nepůvodní račí druhy do Evropy (Peay 2009), může být i zdrojem šíření račího moru. Patogeny se může z akvárií do volné přírody dostat dvojím způsobem: 1) s vylitou vodou a 2) s infikovaným raky, jež byli vypuštěni z domácích akvárií nebo unikli ze zahradních rybníčků. Zásadní pro omezování tohoto problému je proto vzdělávání veřejnosti, zejména chovatelů, zaměřené na šíření nemocí a invazních druhů z domácích chovů. To je obzvláště důležité v oblastech, kde je chov raků populární zájmovou aktivitou.

Infekce patogenem račího moru významně ovlivňuje imunitní systém raků říčních (**kap. 5**). Čím je kmen *A. astaci* virulentnější, tím rychlejší a bouřlivější je imunitní reakce hostitele. Tato odpověď ale není dostatečná pro zabránění rozvoji nákazy v případě vysoce virulentních kmenů, což vede k vysoké mortalitě nakažených jedinců. Raci říční vystavení zoosporám kmenů *A. astaci* z genotypové

skupiny A mají mortalitu podstatně menší, což naznačuje, že více než stopadesátiletá koexistence hostitelů a tohoto genotypu patogenu v Evropě vedla k jejich koevoluci (Jussila *a kol.* 2014).

Zvýšená odolnost australského raka *Cherax destructor* vůči některým kmenům patogenu račího moru (**kap. 6**) může vést k chronickým nákazám nebo výrazně zpomaleným úhynům. Vzhledem k tomu, že tento druh je schopen úspěšně přezimovat ve středoevropských podmínkách (Veselý *a kol.* 2015; Kouba *a kol.* 2016), a ve své původní australské domovině je ekologicky velmi plastický (Beatty *a kol.* 2005), jeho populace se zřejmě mohou úspěšně usadit i v temperátních oblastech Evropy. Za určitých podmínek by vypuštění tohoto raka mohlo vést i ke vzniku nových rezervoárů pro šíření račího moru.

V experimentech, při nichž byly sladkovodní krevety vystaveny sporám *A. astaci*, nebyly pozorovány úhyny, ale objevily se náznaky růstu mycelia patogenu v jejich tkáních (**kap. 7**). Až případně další experimenty, pokud možno s druhy s nízkou frekvencí svlékání a také s kmeny patogenu o různé virulenci, proto mohou odhalit, jestli mohou krevety sloužit jako dlouhodobé rezervoáry, od nichž se *A. astaci* může přenést na citlivé hostitele.

Recentní rozvoj molekulárních metod pro diagnostiku a genotypování *A. astaci* zásadně posunul výzkum račího moru, zejména pak s ohledem na hostitelské spektrum a mechanismy přenosu jeho patogenu (**kap. 8**). Naše znalosti o biologii tohoto ochranářsky i ekonomicky významného patogenu však mají stále mnoho mezer. Je proto zřejmé, že račí mor bude i nadále v centru pozornosti mnoha výzkumných týmů.

– References / Seznam použité literatury –

- Beatty S, Morgan D, Gill H (2005) Role of life history strategy in the colonisation of Western Australian aquatic systems by the introduced crayfish *Cherax destructor* Clark, 1936. *Hydrobiologia* 549: 219-237
- Chucholl C (2013) Invaders for sale: trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish. *Biological Invasions* 15: 125-141
- Chucholl C, Morawetz K, Groß H (2012) The clones are coming - strong increase in Marmorkrebs [*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginialis*] records from Europe. *Aquatic Invasions* 7: 511-519
- Diéguez-Uribeondo J, Söderhäll K (1993) *Procambarus clarkii* Girard as a vector for the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Aquaculture and Fisheries Management* 24: 761-765
- Diéguez-Uribeondo J, Huang TS, Cerenius L, Söderhäll K (1995) Physiological adaptation of an *Aphanomyces astaci* strain isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Mycological Research* 99: 574-578
- Diéguez-Uribeondo J, Cerenius L, Dyková I, Gelder S, Henntonen P, Jiravanichpaisal P, Lom J, Söderhäll K (2006) Pathogens, parasites and ectocommensals. In: Atlas of crayfish in Europe (ed. by C. Souty-Grosset, D.M. Holdich, P.Y. Noël, J.D. Reynolds & P. Haffner), pp. 131-149. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris
- Filipová L, Petrusek A, Matasová K, Delaunay C, Grandjean F (2013) Prevalence of the Crayfish Plague Pathogen *Aphanomyces astaci* in Populations of the Signal Crayfish *Pacifastacus leniusculus* in France: Evaluating the Threat to Native Crayfish. *PLoS ONE* 8: e70157
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299
- Grandjean F, Vrålstad T, Diéguez-Uribeondo J, Jelić M, Mangombi J, Delaunay C, Filipová L, Rezinciuc S, Kozubíková-Balcarová E, Guyonnet D, Viljamaa-Dirks S, Petrusek A (2014) Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Veterinary Microbiology* 170: 317-324
- Holdich DM, Reynolds JD, Souty-Grosset C, Sibley PJ (2009) A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 394-395: 11

- Hsieh CY, Huang CW, Pan YC (2016) Crayfish plague *Aphanomyces astaci* detected in redclaw crayfish, *Cherax quadricarinatus* in Taiwan. *Journal of Invertebrate Pathology* 136: 117-123
- Huang TS, Cerenius L, Söderhäll K (1994) Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* 126: 1-9
- Jimenez SA, Faulkes Z (2010) Can the parthenogenetic marbled crayfish Marmorkrebs compete with other crayfish species in fights? *Journal of Ethology* 29: 115-120
- Jussila J, Makkonen J, Vainikka A, Kortet R, Kokko H (2014) Crayfish plague dilemma: how to be a courteous killer? *Boreal Environmental Research* 19: 235-244
- Keller NS, Pfeiffer M, Roessink I, Schulz R, Schrimpf A (2014) First evidence of crayfish plague agent in populations of the marbled crayfish (*Procambarus fallax* forma *virginalis*). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 414: 15
- Kokko H, Koistinen L, Harlioğlu MM, Makkonen J, Aydın H, Jussila J (2012) Recovering Turkish narrow clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*) populations carry *Aphanomyces astaci*. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 404: 12
- Kouba A, Petrusek A, Kozák P (2014) Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 413: 5
- Kouba A, Tíkal J, Císař P, Veselý L, Fořt M, Příborský J, Patoka J, Buřič M (2016) The significance of droughts for hyporheic dwellers: evidence from freshwater crayfish. *Scientific Reports* 6: 26569
- Kozubíková-Balcarová E, Beran L, Ďuriš Z, Fischer D, Horká I, Svobodová J, Petrusek A (2014) Status and recovery of indigenous crayfish populations after recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Ethology, Ecology and Evolution* 26: 299-319
- Kozubíková E, Petrusek A, Ďuriš Z, Martín MP, Diéguez-Uribeondo J, Oidtmann B (2008) The old menace is back: recent crayfish plague outbreaks in the Czech Republic. *Aquaculture* 274: 208-217
- Kozubíková E, Filipová L, Kozák P, Ďuriš Z, Martín MP, Diéguez-Uribeondo J, Oidtmann B, Petrusek A (2009) Prevalence of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in invasive American crayfishes in the Czech Republic. *Conservation Biology* 23: 1204-1213

- Kozubíková E, Puky M, Kiszely P, Petrusek A (2010) Crayfish plague pathogen in invasive North American crayfish species in Hungary. *Journal of Fish Diseases* 33: 925-929
- Kozubíková E, Viljamaa-Dirks S, Heinikainen S, Petrusek A (2011) Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague agent *Aphanomyces astaci*. *Journal of Invertebrate Pathology* 108: 214-216
- Lo CF, Leu JH, Ho CH, Chen CH, Peng SE, Chen YT, Chou CM, Yeh PY, Huang CJ, Chou HY, Wang CH, Kou GH (1996) Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 25: 133-141
- Lodge DM, Deines A, Gherardi F, Yeo DCJ, Arcella T, Baldrige AK, Barnes MA, Chadderton WL, Feder JL, Gantz CA, Howard GW, Jerde CL, Peters BW, Peters JA, Sargent LW, Turner CR, Wittmann ME, Zeng Y (2012) Global introductions of crayfishes: evaluating the impact of species invasions on ecosystem services. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43: 449-472
- Longshaw M, Bateman KS, Stebbing P, Stentiford GD, Hockley FA (2012) Disease risks associated with the importation and release of non-native crayfish species into mainland Britain. *Aquatic Biology* 16: 1-15
- Lökkös A, Müller T, Kovács K, Várkonyi L, Specziár A, Martin P (2016) The alien, parthenogenetic marbled crayfish (Decapoda: Cambaridae) is entering Kis-Balaton (Hungary), one of Europe's most important wetland biotopes. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 417: 16
- Makkonen J, Jussila J, Kortet R, Vainikka A, Kokko H (2012) Differing virulence of *Aphanomyces astaci* isolates and elevated resistance of noble crayfish *Astacus astacus* against crayfish plague. *Diseases of Aquatic Organisms* 102: 129-136
- Makkonen J, Kokko H, Vainikka A, Kortet R, Jussila J (2014) Dose-dependent mortality of the noble crayfish (*Astacus astacus*) to different strains of the crayfish plague (*Aphanomyces astaci*). *Journal of Invertebrate Pathology* 115: 86-91
- Matasová K, Kozubíková E, Svoboda J, Jarošík V, Petrusek A (2011) Temporal variation in the prevalence of the crayfish plague pathogen (*Aphanomyces astaci*) in three Czech spiny-cheek crayfish populations. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 401: 14
- Nakata K, Goshima S (2003) Competition for shelter of preferred sizes between

- the native crayfish species *Cambaroides japonicus* and the alien crayfish species *Pacifastacus leniusculus* in Japan in relation to prior residence, sex difference, and body size. *Journal of Crustacean Biology* 23: 897-907
- Novitsky RA, Son MO (2016) The first records of Marmorkrebs [*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis*] (Crustacea, Decapoda, Cambaridae) in Ukraine. *Ecologica Montenegrina* 5: 44-46
- Oidtman B, Geiger S, Steinbauer P, Culas A, Hoffmann RW (2006) Detection of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish by polymerase chain reaction. *Diseases of Aquatic Organisms* 72: 53-64
- Patoka J, Kalous L, Kopecký O (2014) Risk assessment of the crayfish pet trade based on data from the Czech Republic. *Biological Invasions* 16: 2489-2494
- Pârvulescu L, Schrimpf A, Kozubíková E, Cabanillas Resino S, Vrålstad T, Petrussek A, Schulz R (2012) Invasive crayfish and crayfish plague on the move: first detection of the plague agent *Aphanomyces astaci* in the Romanian Danube. *Diseases of Aquatic Organisms* 98: 85-94
- Peay S (2009) Invasive non-indigenous crayfish species in Europe: recommendations on managing them. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 394-395: 3
- Rezinciuc S, Galindo J, Montserrat J, Diéguez-Urbeondo J (2014) AFLP-PCR and RAPD-PCR evidences of the transmission of the pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) to wild populations of European crayfish from the invasive crayfish species, *Procambarus clarkii*. *Fungal Biology* 118: 612-620
- Samardžić M, Lucić A, Maguire I, Hudina S (2014) The first record of the marbled crayfish (*Procambarus fallax* (Hagen, 1870) f. *virginalis*) in Croatia. *Crayfish News* 36: 4
- Schrimpf A, Pârvulescu L, Copilaș-Ciocianu D, Petrussek A, Schulz R (2012) Crayfish plague pathogen detected in the Danube Delta – a potential threat to freshwater biodiversity in southeastern Europe. *Aquatic Invasions* 7: 503-510
- Schrimpf A, Chucholl C, Schmidt T, Schulz R (2013) Crayfish plague agent detected in populations of the invasive North American crayfish *Orconectes immunis* (Hagen, 1870) in the Rhine River, Germany. *Aquatic Invasions* 8: 103-109
- Schrimpf A, Schmidt T, Schulz R (2014) Invasive Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) transmits crayfish plague pathogen (*Aphanomyces*

- astaci*). *Aquatic Invasions* 9: 203-209
- Skov C, Aarestrup K, Sivebæk F, Pedersen S, Vrålstad T, Berg S (2011) Non-indigenous signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* are now common in Danish streams: preliminary status for national distribution and protective actions. *Biological Invasions* 13: 1269-1274
- Soes M, Koese B (2010) Invasive freshwater crayfish in the Netherlands: a preliminary risk analysis. In: Stichting European Invertebrate Survey Nederland (EIS). Bureau Waardenburg B.V., Leiden & Wageningen
- Souty-Grosset C, Holdich DM, Noël PY, Reynolds JD, Haffner P (Eds.) (2006) Atlas of Crayfish in Europe. Patrimoines Naturels, Volume 64. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, 187 pp
- Svoboda J, Kozubíková E, Kozák P, Kouba A, Bahadır Koca S, Diler Ö, Diler I, Polícar T, Petrusek A (2012) PCR detection of the crayfish plague pathogen in narrow-clawed crayfish inhabiting Lake Eğirdir in Turkey. *Diseases of Aquatic Organisms* 98: 255-259
- Svoboda J, Strand DA, Vrålstad T, Grandjean F, Edsman L, Kozák P, Kouba A, Fristad RF, Bahadır Koca S, Petrusek A (2014) The crayfish plague pathogen can infect freshwater-inhabiting crabs. *Freshwater Biology* 59: 918-929
- Torchin ME, Lafferty KD, Dobson AP, McKenzie VJ, Kuris AM (2003) Introduced species and their missing parasites. *Nature* 421: 628-630
- Unestam T (1969) Resistance to the crayfish plague in some American, Japanese and European crayfishes. *Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm* 49: 202-209
- Unestam T (1972) On the host range and origin of the crayfish plague fungus. *Report of the Institute of Freshwater Research, Drottningholm* 52: 192-198
- Unestam T (1975) Defence reactions in and susceptibility of Australian and New Guinean freshwater crayfish to European-crayfish-plague fungus. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 53: 349-359
- Vennerström P, Söderhäll K, Cerenius L (1998) The origin of two crayfish plague (*Aphanomyces astaci*) epizootics in Finland on noble crayfish, *Astacus astacus*. *Annales of Zoology Fennici* 35: 43-46
- Veselý L, Buřič M, Kouba A (2015) Hardy exotics species in temperate zone: Can "warm water" crayfish invaders establish regardless of low temperatures? *Scientific Reports* 5: 16340
- Vey A, Söderhäll K, Ajaxon R (1983) Susceptibility of *Orconectes limosus*

- Raff. to the crayfish plague, *Aphanomyces astaci* Schikora. *Freshwater Crayfish* 5: 284-291
- Viljamaa-Dirks S, Heinikainen S (2006) Improved detection of crayfish plague with a modified isolation method. *Freshwater Crayfish* 15: 376-382
- Viljamaa-Dirks S, Heinikainen S, Torssonen H, Pursiainen M, Mattila J, Pelkonen S (2013) Distribution and epidemiology of genotypes of the crayfish plague agent *Aphanomyces astaci* from noble crayfish *Astacus astacus* in Finland. *Diseases of Aquatic Organisms* 103: 199-208
- Viljamaa-Dirks S, Mrugała A, Kozubíková-Balcarová E, Heinikainen S, Svoboda J, Chucholl C, Petrusek A, Pelkonen S (2014) Crayfish plague isolates from ornamental crayfish trade show genotypic variation. Poster, 20th Symposium of International Association of Astacology (IAA), 22-26.09., Sapporo, Japan
- Viljamaa-Dirks S, Heinikainen S, Virtala A, Torssonen H, Pelkonen S (2016) Variation in the hyphal growth rate and the virulence of two genotypes of the crayfish plague organism *Aphanomyces astaci*. *Journal of Fish Diseases* 39: 753-764
- Vrålstad T, Knutsen AK, Tengs T, Holst-Jensen A (2009) A quantitative TaqMan MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology* 137: 146-155
- Vrålstad T, Johnsen SI, Fristad R, Edsmann L, Strand D (2011) Potent infection reservoir of crayfish plague now permanently established in Norway. *Diseases of Aquatic Organisms* 97: 75-83

– Curriculum vitae –

Name: Agata Mrugała

Born: 19 January 1987

Education:

since 2012 Ph.D. study, Department of Ecology, Faculty of Science,
Charles University in Prague

2009 – 2011 M.Sc. study, Erasmus Mundus Programme in Marine
Biodiversity and Conservation, Universiteit Gent, Belgium
hosting universities:
2009/2010 – Universität Bremen, Germany
2010/2011 – Universidad de Oviedo, Spain

2006 – 2009 B.Sc. study, Oceanography at Uniwersytet Gdański, Poland

Occupation:

since 2016 curator (50% capacity), Department of Zoology, National Museum
in Prague

Research stays:

2014 – 2015 two 3-months long stays at Laboratoire Ecologie et Biologie
des Interactions, Equipe: Ecologie, Evolution, Symbiose,
Université de Poitiers, France

Awards:

2015 second prize for the best student oral presentation during
European Crayfish Conference: Research and Management
in Landau, Germany

2014 first prize for the best student oral presentation during 20th
Symposium of International Association of Astacology in
Sapporo, Japan

2013 first prize for the best student poster during Regional
European Crayfish Meeting in Rovinj, Croatia

– Životopis –

Jméno: Agata Mrugała

Narozena: 19.01.1987

Vzdělání:

od 2012 doktorské studium ekologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

2009 – 2011 magisterské studium, Erasmus Mundus Programme in Marine Biodiversity and Conservation, Universiteit Gent, Belgie

hostitelské univerzity:

2009/2010 – Universität Bremen, Německo

2010/2011 – Universidad de Oviedo, Španělsko

2006 – 2009 bakalářské studium oceánografie, Uniwersytet Gdański, Polsko

Zaměstnání:

od 2016 kurátor (50% úvazek), Zoologické oddělení, Národní museum v Praze

Odborné stáže:

2014 – 2015 dva tříměsíční studijní pobyty v Laboratoire Ecologie et Biologie des Interactions, Equipe: Ecologie, Evolution, Symbiose, Université de Poitiers, Francie

Ocenění:

2015 druhá cena za nejlepší studentskou přednášku, European Crayfish Conference: Research and Management, Landau, Německo

2014 cena za nejlepší studentskou přednášku, 20th Symposium of International Association of Astacology, Sapporo, Japonsko

2013 cena za nejlepší studentský poster, Regional European Crayfish Meeting, Rovinj, Chorvatsko

– List of publications / Seznam publikací –

Peer-reviewed papers / Recenzované články:

- in press** **Mrugała A**, Veselý L, Petrusek A, Viljamaa-Dirks S, Kouba A (in press) May *Cherax destructor* contribute to *Aphanomyces astaci* spread in Central Europe? *Aquatic Invasions*
- 2016** **Mrugała A**, Kawai T, Kozubíková-Balcarová E, Petrusek A (2016) *Aphanomyces astaci* presence in Japan: a threat to the endemic and endangered crayfish species *Cambaroides japonicus*? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, doi: 10.1002/aqc.2674
- Svoboda J, **Mrugała A**, Kozubíková-Balcarová E, Petrusek A (2016) Hosts and transmission of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*: a review. *Journal of Fish Diseases*, doi: 10.1111/jfd.12472
- Miralles L, **Mrugała A**, Sanchez-Jerez P, Juanes F, Garcia-Vazquez E (2016) Potential Impact of Mediterranean Aquaculture on the Wild Predatory Bluefish. *Marine and Coastal Fisheries* 8: 92-99
- Lipták B, **Mrugała A**, Pekárik L, Mutkovič A, Gruľa D, Petrusek A, Kouba A (2016) Expansion of the marbled crayfish in Slovakia: beginning of an invasion in the Danube catchment? *Journal of Limnology* 75: 305-312
- 2015** **Mrugała A**, Kozubíková-Balcarová E, Chucholl C, Cabanillas Resino S, Viljamaa-Dirks S, Vukić J, Petrusek A (2015) Trade of ornamental crayfish in Europe as a possible introduction pathway for important crustacean diseases: crayfish plague and white spot syndrome. *Biological Invasions* 17: 1313-1326
- Becking T*, **Mrugała A***, Delaunay C, Svoboda J, Raimond M, Viljamaa-Dirks S, Petrusek A, Grandjean F, Braquart-Varnier C (2015) Effect of experimental exposure to differently virulent *Aphanomyces astaci* strains on the immune response of the noble crayfish *Astacus astacus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 115-124 (* shared first authorship)
- Chucholl C, **Mrugała A**, Petrusek A (2015) First record of an introduced population of the southern lineage of white-clawed crayfish (*Austropotamobius italicus*) north of the Alps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 416:10
- Kumschick S, Gaertner M, Vilà M, Essl F, Jeschke JM, Pyšek P, Ricciardi A, Bacher S, Blackburn TM, Dick JTA, Evans T, Hulme PE, Kühn I, **Mrugała A**, Pergl J, Rabitsch W, Richardson DM,

Sendek A, Winter M (2015) Ecological impacts of alien species: quantification, scope, caveats and recommendations. *BioScience* 65: 55-63

2014 Tilmans M*, **Mrugała A***, Svoboda J, Engelsma M, Petit M, Soes MD, Oidtmann B, Nutbeam-Tuffs S, Roessink I, Petrusek A (2014) Survey of the crayfish plague pathogen presence in the Netherlands reveals a new *Aphanomyces astaci* carrier. *Journal of Invertebrate Pathology* 120: 74-79 (* shared first authorship)

Svoboda J, **Mrugała A**, Kozubíková-Balcarová E, Kouba A, Diéguez-Uribeondo J, Petrusek A (2014) Resistance to the crayfish plague pathogen, *Aphanomyces astaci*, in two freshwater shrimps. *Journal of Invertebrate Pathology* 121: 97-104

Blackburn TM, Essl F, Evans T, Hulme PE, Jeschke JM, Kühn I, Kumschick S, Marková Z, **Mrugała A**, Nentwig W, Pergl J, Pyšek P, Rabitsch W, Ricciardi A, Richardson DM, Sendek A, Vila M, Wilson JRU, Winter M, Genovesi P, Bacher S (2014) A Unified Classification of Alien Species Based on the Magnitude of their Environmental Impacts. *PLoS Biology* 12(5): e1001850

Jeschke JM, Bacher S, Blackburn TM, Dick JTA, Essl F, Evans T, Gaertner M, Hulme PE, Kühn I, **Mrugała A**, Pergl J, Pyšek P, Rabitsch W, Ricciardi A, Richardson DM, Sendek A, Vila M, Winter M, Kumschick S (2014) Defining the Impact of Non-Native Species. *Conservation Biology* 28: 1188-1194

Conferences/Konference:

2015 **Mrugała A**, Kozubíková-Balcarová E, Chucholl C, Kouba A, Veselý L, Petrusek A (2015) Trade of ornamental crayfish in Europe as a possible introduction pathway for crayfish plague pathogen and its new reservoirs. Oral presentation/prezentace, 5. konference České společnosti pro ekologii, 23-25.10., České Budějovice, Czech Republic

Mrugała A, Veselý L, Petrusek A, Kouba A (2015) Will low winter temperatures and *Aphanomyces astaci* limit *Cherax destructor* survival in Central Europe? Oral presentation/prezentace, European Crayfish Conference: Research and Management, 9-12.04., Landau, Germany

Tilmans M, **Mrugała A**, Svoboda J, Engelsma MY, Petie M, Soes DM, Nutbeam-Tuffs S, Oidtmann B, Roessink I, Petrusek A (2015) Crayfish plague in The Netherlands: filling in some blank spots and unmasking an unknown carrier. Oral presentation/prezentace, European Crayfish Conference: Research and Management, 9-12.04.,

Landau, Germany

Mrugała A, Soes DM, Vukić J, Petrusek A (2015) Resolving taxonomic status of white river crayfish in the Dutch freshwaters. May hybridization affect their invasion potential? Poster/plakát, European Crayfish Conference: Research and Management, 9-12.04., Landau, Germany

2014 **Mrugała A**, Kawai T, Kozubíková-Balcarová E, Petrusek A (2014) *Aphanomyces astaci* presence in Far East Asia may pose a threat to the endemic and endangered crayfish from the genus *Cambaroides*. Oral presentation/prezentace, 20th Symposium of International Association of Astacology (IAA), 22-26.09., Sapporo, Japan

Becking T, **Mrugała A**, Delaunay C, Svoboda J, Raimond M, Viljamaa-Dirks S, Petrusek A, Grandjean F, Braquart-Varnier C (2014) Immune response of naïve crayfish to experimental infection with an introduced pathogen, *Aphanomyces astaci*. Poster/plakát, 20th Symposium of International Association of Astacology (IAA), 22-26.09., Sapporo, Japan

Viljamaa-Dirks S, **Mrugała A**, Kozubíková-Balcarová E, Heinikainen S, Svoboda J, Chucholl C, Petrusek A, Pelkonen S (2014) Crayfish plague isolates from ornamental crayfish trade show genotypic variation. Poster/plakát, 20th Symposium of International Association of Astacology (IAA), 22-26.09., Sapporo, Japan

2013 **Mrugała A**, Tilmans M, Svoboda J, Engelsma M, Petie M, Soes M, Roessink I, Petrusek A (2013) *Orconectes virilis* confirmed as another crayfish plague carrier in the survey of invasive North American crayfish species in the Netherlands. Poster/plakát, Regional European Crayfish Meeting – CrayCro, 26-28.09., Rovinj, Croatia

Kozubíková-Balcarová E, **Mrugała A**, Chucholl C, Vukić J, Cabanillas Resino S, Petrusek A (2013) Aquarium crayfish trade as a possible pathway of crayfish plague and white spot disease spread. Poster/plakát, Regional European Crayfish Meeting – CrayCro, 26-28.09., Rovinj, Croatia

Svoboda J, **Mrugała A**, Kozubíková-Balcarová E, Kouba A, Dieguz-Uribeondo J, Koukol O, Petrusek A (2013) Experimental infection of freshwater shrimps with the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*. Oral presentation/prezentace, Regional European Crayfish Meeting – CrayCro, 26-28.09., Rovinj, Croatia