

# Türkiye’de Has Kefal (*Mugil cephalus*) Balıklarının Pullarını Enfekte Eden *Myxobolus episquamalis* Üzerine İlk Moleküler Veriler

*First Molecular Data on Myxobolus episquamalis (Myxozoa: Myxosporrea) Infecting the Scale of Grey Mullet (Mugil cephalus) from Turkey*

Emrah Şimşek

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

Cite this article as: Şimşek E. Türkiye’de Has Kefal (*Mugil cephalus*) Balıklarının Pullarını Enfekte Eden *Myxobolus episquamalis* Üzerine İlk Moleküler Veriler. Türkiye Parazit Derg 2019;43(3): 135-42.

## ÖZ

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, Türkiye’nin Karadeniz kıyılarında yakalanan has kefal (*Mugil cephalus*) balıklarındaki *Myxobolus* türlerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyonlarını ortaya koymaktır.

**Yöntemler:** Kasım 2017 ve Şubat 2018 tarihleri arasında Türkiye’nin Karadeniz kıyılarında yakalanan toplam 104 adet kefal balığı marketlerden satın alınarak klasik morfolojik yöntemler ve ileri moleküler tanı yöntemleri kullanılarak *Myxobolus* cinsindeki parazitler yönünden incelenmiştir.

**Bulgular:** İncelenen 104 balık örneğinden toplam üç tanesinin pulları büyük ve beyaz renkli plasmodialar ile enfekte bulunmuş ve enfeksiyon oranı %2,8 olarak belirlenmiştir. Morfolojik incelemede *Myxobolus episquamalis* olarak teşhis edilen myxosporların 18S rRNA gen bölgesinin DNA dizi analizleri gerçekleştirilerek genetik olarak tür bazında teşhisi sağlanmıştır. Oval yapıda olan myxosporların uzunluğu 8,6 (7,8-9,4) µm, genişliği 6,7 (6,1-7,3) µm, kalınlığı ise 4,7 (4,1-5,3) µm olarak belirlenmiştir. Armut benzeri bir yapıda olan iki polar kapsülün 4,2 (3,7-4,6) µm uzunluğunda ve 2,2 (2,1-2,4) µm genişliğinde olduğu görülmüştür. Polar filamentin uzunluğu ise 27-51 µm aralığında belirlenmiştir. *M. episquamalis* ES-2018-ERU izolatının (MK012069) 18S rRNA geninin nükleotid dizilimi GenBank’a Tunus (AY129312) ve Güney Kore’den (JF810537; KC733437) kaydedilen *M. episquamalis* izolatları ile sırasıyla %99,8 ve %100 benzerlik göstermiştir. ES-2018-ERU izolatu ile farklı ülkelerden kefal balıklarında teşhis edilen *Myxobolus* türleri arasındaki nükleotid sekans farklılıklarının (%) ikili karşılaştırmaları ise %9,9-14,8 aralığında belirlenmiştir.

**Sonuç:** Bu çalışma ile Türkiye karasularında bulunan has kefallerin (*Mugil cephalus*) pullarını enfekte eden *M. episquamalis* türünün varlığı moleküler olarak ilk kez bildirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Myxobolus episquamalis*, *Mugil cephalus*, 18S rRNA, Türkiye

## ABSTRACT

**Objective:** The aim of the present study was to show the morphologic and molecular characterization of *Myxobolus* species in grey mullet (*Mugil cephalus*) caught from the Black Sea coasts of Turkey.

**Methods:** A total of 104 grey mullets caught from Turkish Black Sea coasts were obtained from fish markets between November 2017 and February 2018 and were examined for the presence of *Myxobolus* by using morphological and advanced molecular diagnostic methods.

**Results:** Totally, three out of 104 fish specimens were found to be infected with large and white coloured plasmodia and the prevalence was determined as 2.8%. The myxospores were morphologically identified as *Myxobolus episquamalis*, confirmed by using sequence analyses of their 18S rRNA gene regions. The shape of myxospores was oval and they were 8.6 (7.8-9.4) µm in length, 6.7 (6.1-7.3) µm in width and 4.7 (4.1-5.3) µm in thickness. Measurement of two pyriform polar capsules were 4.2 (3.7-4.6) µm in length and 2.2 (2.1-2.4) µm in width. The length of polar filament was determined as 27-51 µm. Nucleotide sequences of the 18S rRNA gene of the ES-2018-ERU isolate (MK012069) found in our study showed 99.8% and 100% similarity with *M. episquamalis* isolates submitted to GenBank from Tunisia (AY129312) and South Korea (JF810537; KC733437), respectively. Pairwise genetic distance (%) between ES-2018-ERU isolate and the other *Myxobolus* species which were identified in mullets from various countries were determined as 9.9-14.8%.

**Conclusion:** This study provides first molecular data on *M. episquamalis* found in the scale of the grey mullets (*Mugil cephalus*) from Turkey.

**Keywords:** *Myxobolus episquamalis*, *Mugil cephalus*, 18S rRNA gene, Turkey



Geliş Tarihi/Received: 28.05.2019 Kabul Tarihi/Accepted: 11.06.2019

**Yazar Adresi/Address for Correspondence:** Emrah Şimşek, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

**Tel/Phone:** +90 505 700 78 85 **E-Posta/E-mail:** emrhsmk@hotmail.com **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-0492-9840

## GİRİŞ

Myxozoan parazitler dünya genelinde oldukça yaygın olup ekosistemin önemli bileşenleri olarak kabul edilmektedirler (1). Myxozoan alt şubesinin önemli bir kısmını oluşturan Myxosporean parazitler ilk olarak Jurine (2) tarafından rapor edilmiş olup taksonomileri ise ilk kez Bütschli (3) tarafından oluşturulmuş ve Sporozoa’lar içinde Myxosporidia şubesinde yer almışlardır. Günümüzde ise Myxozoan’lar, metazoan parazitler içerisinde sınıflandırılmışlardır (4). Sistematik içerisinde Cnidaria şubesinde yer alan bu parazitler Myxosporea ve Malacosporea olmak üzere iki sınıfa ayrılmışlardır (5). Myxosporean’lar, yaşam döngülerini tamamlamak için hem omurgalı hem de omurgasız konak kullanmaktadırlar. Actinospor dönemi omurgasız ara konakta, myxospor dönemi ise omurgalı konakta gelişmektedir (4). Myxozoan enfeksiyonları balık çiftliklerinde ve kuluçkahanelerde hastalıklara yol açarak ve bunun yanı sıra balıkların market kalitelerini düşürerek büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bazı türlerle (*Kudoa septempunctata*) enfekte balık etini çiğ ya da az pişmiş olarak tüketen immün sistemleri baskılanmış insanlarda da birtakım semptomlar (kusma, ishal vb.) oluşabilmektedir (1,6). Myxosporea sınıfındaki en yaygın cins olan *Myxobolus* cinsinde 850’den fazla tür tanımlanmış olup bu parazitler balıkların deri, solungaç, yüzgeç, karaciğer, böbrek, gonad ve sindirim sistemi gibi birçok doku ve organlarına yerleşerek önemli patolojik bozukluklara sebep olmaktadır (7). *Myxobolus* cinsinde, bilimsel otoriteler tarafından kabul görmüş ve sıklıkla tercih edilen tanı yöntemleri kullanılarak her geçen gün yeni türler tanımlanmaya devam etmekte ve literatüre kazandırılmaktadır (8-11).

Geçmiş yıllarda *Myxobolus* türlerinin sınıflandırılmalarında ve teşhislerinde yalnızca myxosporlarının morfolojik yapılarından yararlanıldığı ancak morfolojik benzerliklerden dolayı birtakım zorlukların yaşandığı ve hatalı tür tanımlamalarının yapıldığı vurgulanmaktadır. Morfolojik olarak benzer myxosporların tür bazında ayrımlarının ancak uygun laboratuvarlarda deneysel enfeksiyonlar ile yapılabileceği fakat bu sürecin zaman alıcı ve karmaşık olduğu belirtilmektedir (12-14). Dünya literatürüne yeni girecek ve morfolojik olarak benzer özellikler gösteren türlerin tanımlamalarının yapılabilmesi için genel kabul gören morfolojik ve ileri moleküler tanı yöntemlerinin kombine bir şekilde kullanılması aynı zamanda konak türü, habitatı ve parazitin yerleşim gösterdiği doku ve organın belirlenmesi gerekmektedir (5,14-16). Myxosporean türlerin tanımlanmasına ve filogenetik yapılanmalarının ortaya konmasına yönelik yürütülen moleküler tabanlı çalışmalarda small subunit (SSU) gen bölgesi sıklıkla tercih edilen ve en yaygın kullanılan gen bölgesidir (5,10,11,16).

Türkiye’de yapılan çalışmalara bakıldığında *Myxobolus* türlerinin yaygınlığını ve popülasyon dinamiğini ortaya koyacak sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Farklı habitatlar ve balık türlerinde yalnızca myxospor morfolojisine dayalı yapılan çalışmalarda *M. exiguus*, *M. cyprinicola*, *M. muelleri*, *M. episquamalis*, *M. ichkeulensis* ve *M. asymmetricus* türleri rapor edilmiştir (17-21). Yine bazı çalışmalarda cins düzeyinde bildirimler de bulunmaktadır (22-26). Bunun yanı sıra ülkemizde diğer cinslere ait bazı türlerde (*Sphaerospora elegans*, *Myxobilatus gasterostei*, *Sphaeromyxa sevastopoli*, *Ortholinea*

*divergens*, *Myxidium parvum*, *Ceratomyxa merlangi* ve *Myxidium gadi*) rapor edilmiştir (21,27,28).

Türkiye’de, *Myxobolus* türlerinin teşhisinde dünya genelinde bilimsel otoriteler tarafından kabul görmüş morfolojik-histopatolojik ve moleküler tanı yöntemlerinin birlikte kullanıldığı ilk çalışma Pekmezci ve ark. (8) tarafından siraz balıklarında (*Capoeta tinca*) gerçekleştirilmiş olup bu çalışmada yeni bir *Myxobolus* türü keşfedilmiş ve *M. anatolicus* tür ismiyle literatüre kazandırılmıştır. Yine *M. scardinii* türü kızılkanat balıklarında (*Scardinius erythrophthalmus*) morfolojik-histopatolojik ve moleküler tanı yöntemleri kullanılarak ilk kez yeniden tanımlanmıştır (29). Tatlı su ekosisteminde bulunan türlerden farklı olarak kefallerde (*Liza saliens*) *M. parvus* türü morfolojik ve moleküler olarak teşhis edilmiştir (30). *Mullus barbatus ponticus* balık türünde ise morfolojik ve moleküler tanı yöntemleriyle yeni bir *Ortholinea mullusi* türü rapor edilmiştir (31). Yine *Neogobius melanostomus* ve *Atherina hepsetus* balıklarında *Kudoa niluferi* ve *K. anatolica* türleri morfolojik ve moleküler olarak karakterize edilmiştir (32).

Tüm bunlar dikkate alındığında 850’den fazla türün tanımlandığı *Myxobolus* cinsinde yer alan türlerin, Türkiye’de varlığının, dağılımının ve moleküler karakterizasyonlarının ortaya konulması oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışmada da has kefal (*Mugil cephalus*) balıklarının enfekte eden *Myxobolus* türlerinin yaygınlığının, morfolojik ve moleküler karakterizasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada bulunan *M. episquamalis* türü Türkiye’de ilk kez morfolojik ve moleküler tanı yöntemleri kullanılarak rapor edilmiştir.

## YÖNTEMLER

### Balık Örneklerinin Toplanması ve Parazitolojik Muayene

Kasım 2017 ve Şubat 2018 tarihleri arasında Karadeniz kıyılarında yakalan toplam 104 adet has kefal (*Mugil cephalus*) balık örneği yerel balıkçılardan satın alınarak uygun taşıma koşullarında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Su Ürünleri ve Hastalıkları Laboratuvarı’na getirilmiştir. Balıkların farklı doku ve organlarına yerleşim gösteren Myxosporea sınıfındaki *Myxobolus* türlerinin oluşturduğu kist benzeri plasmodiaların araştırılmasında Lom ve Dyková (33) tarafından tanımlanan yöntemler kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm balıkların ilk olarak yüzgeçleri ve deri yüzeyleri çıplak gözle ve stereo mikroskop (Olympus SZX10 Tokyo, Japonya) altında incelendikten sonra solungaç yayları tek tek çıkartılarak içerisinde fizyolojik tuzlu su bulunan petri kaplarına alınmış ve plasmodialar açısından incelenmiştir. İç organlara yerleşebilen *Myxobolus* türlerinin belirlenebilmesi için tüm balıkların nekropsileri gerçekleştirilmiş ve organlar plasmodia enfeksiyonu yönünden değerlendirilmiştir. Kaslara yerleşebilen türler için ise kas dokularından ezme preparatlar hazırlanmıştır. Bunun yanı sıra beyne yerleşen türlerin tespiti için her bir balığın beyne çıkartılarak incelenmiştir. Çalışma esnasında plasmodia tespit edilen dokuların fotoğrafları çekildikten sonra plasmodialar dikkatli bir şekilde dokulardan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra bu plasmodialar steril ince uçlu bistüri yardımıyla üzerinde bir damla fizyolojik tuzlu su bulunan lam üzerinde patlatılmış, açığa çıkan myxosporların bir kısmı morfolojik incelemeler için gliserin jel içerisinde

preparat haline getirilmiş kalan kısmı ise moleküler analizlerde kullanılmak üzere %70'lik alkol içerisinde saklanmıştır. Preparatları hazırlanan myxosporların morfolojik ölçüm ve analizleri Olympus DP73 kamera ataçmanlı Olympus BX43 (Tokyo, Japonya) ışık mikroskopunda Lom ve Arthur'un (34) belirttiği kriterlere göre yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen balıklar yerel balıkçılardan satın alındığı için etik kurul onayına gerek yoktur. Hasta onayı alınmamıştır.

### **Myxobolus Örneklerinden Genomik DNA İzolasyonu**

Yüzde 70'lik etil alkol içerisinde saklanan myxospor örnekleri santrifüj yardımıyla çöktürülerek üstte kalan alkol uzaklaştırılmıştır. Ardından genomik DNA (gDNA) ekstraksiyon kiti (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) kullanılarak gDNA ekstraksiyonları gerçekleştirilmiştir. Myxosporlara ait gDNA'lar moleküler çalışmalarda kullanılmaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

### **Small Subunit (SSU) 18S Ribozomal RNA (rRNA) Gen Bölgesinin Amplifikasyonu**

Örneklerden izole edilmiş olan gDNA ekstraktları myxosporların SSU 18S ribozomal RNA (rRNA) geninin yaklaşık 900 bp kısmını amplifiye eden MycospecF (5'-TTCTGCCCTATCAACTWGTG-3') ve MycospecR (5'-GGTTTCNC DGRGGGMCCAAC-3') primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizine tabii tutulmuştur (35). PCR reaksiyon karışımı 25 µL final konsantrasyonda; 12,5 µL ticari master mix (Maxima Hot Start PCR Master Mix, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 10 µM her bir primer ve 10-50 ng gDNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR cihazında protokoller 95 °C'de 4 dk; 30 siklus, denatürasyon: 95 °C'de 30 sn, bağlanma: 48 °C'de 30 sn, uzama: 72 °C'de 1 dk ve final uzama: 72 °C'de 10 dk olacak şekilde belirlenmiştir. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µL) SafeView™ (Applied Biological Materials Richmond, BC, Canada) ile boyanmış %1,5'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak, jel dökümantasyon sisteminde (Quantum CX5, Vilber Lourmat, France) görüntülenip analiz edilmiştir.

### **DNA Dizisi (sekans) ve Filogenetik Analizleri**

PCR ürününün saflaştırılması ve forward-reverse primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanması MacroGen, Amsterdam firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirilmiştir. Çift yönlü DNA dizisi elde edilen izolata ait kromotogramlar analiz edildikten sonra Geneious 11.0.2 yazılımı ile forward-reverse dizilimler birleştirilmiş ve *Myxobolus* türüne ait final dizilimler elde edilmiştir (36). Elde edilen sekansların tür teşhisleri için BLASTn analizleri yapıldıktan sonra GenBank'a farklı coğrafik bölgelerden kaydedilmiş ve kefal balıklarının enfekte eden diğer *Myxobolus* türleri ile MEGA 6.0 genetik yazılımı üzerinden çoklu hizalamaları yapılarak tür içi ve türler arası nükleotid farklılıkları belirlenmiştir (37).

Filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde MEGA 6.0 genetik yazılım programı kullanılarak Maximum-Likelihood (ML) metodu uygulanmıştır (37). Bu aşamada Akaike bilgi kriterlerine göre sekans evrimi için en uygun DNA modelin belirlenmesinde MEGA 6.0 genetik yazılımından yararlanılmış ve filogenetik ağacın oluşturulmasında General Time Reversible + Gamma distributed with Invariant sites (GTR+G+I) modeli kullanılmıştır (37). Nükleotid sekans farklılıklarının (%) ikili karşılaştırmaları

ise Kimura two-parameter modeli kullanılarak belirlenmiştir (38). Karakterizasyonu sağlanan tüm izolatların GenBank kayıtları sağlanmıştır. *Ceratomyxa shasta* (erişim no: AF001579) dış dal olarak kullanılmıştır. *M. episquamalis* izolatının 18S rRNA geninin nükleotid dizilimleri GenBank'a kaydedilerek erişim numarası (MK012069) alınmıştır.

## **BULGULAR**

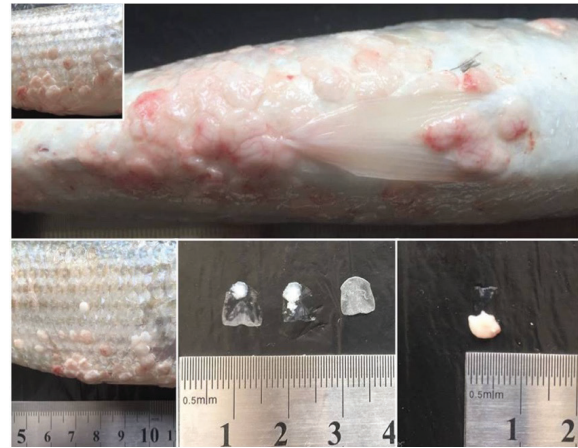
### **Morfolojik Analiz Sonuçları**

Örneklenen 104 balığın parazitolojik muayeneleri sonucunda 3 tanesinin sadece pullarında olmak üzere kist benzeri plasmodialarla enfekte olduğu belirlenmiştir. Enfekte balıkların pullarının önemli bir kısmının plasmodialarla kaplı olduğu ve vücut yüzeyinde geniş lezyonlar olduğu görülmüştür. Bazı pulların neredeyse ½'sinin plasmodia ile kaplı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).

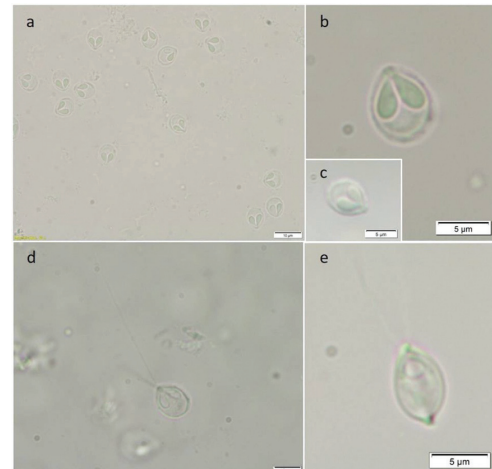
### ***Myxobolus episquamalis* Egusa, Maeno & Sorimachi, 1990 (Şekil 2)**

**Konak:** Has Kefal Balığı (*Mugil cephalus*)

**Lokalite:** Karadeniz, Türkiye



**Şekil 1.** Has Kefalin (*Mugil cephalus*) pulları üzerine yerleşen plasmodialar ve oluşturduğu lezyonlar



**Şekil 2.** a) *Myxobolus episquamalis* myxosporları, ölçek: 10 µm (b-c) Myxosporun ön yüzü, (d) Polar filamente sahip spor, (e) Myxosporun yan yüzü, ölçek: (a) 10 µm; (b,c,d,e) 5 µm



**Materyal:** Myxosporlardan gliserin jel kullanılarak hazırlanan kalıcı preparatlar Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Su Ürünleri ve Hastalıkları Anabilim Dalı’nda saklanmaktadır. İzolatın 18S rRNA gen bölgesine ait nükleotid dizilimleri MK012069 erişim numarası ile GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

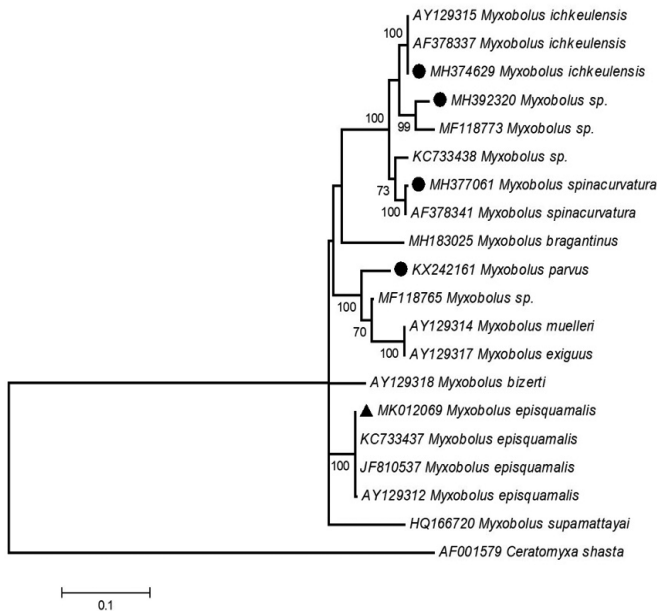
**Enfeksiyon alanı:** Pul (Şekil 1).

**Trofozoit:** Farklı büyüklükteki (3-8 mm) plasmodialar özellikle pullar üzerinde çplak gözle kolaylıkla tespit edilebilmektedir (Şekil 1).

**Enfeksiyon oranı:** %2,8 (104 Kefal balığının 3’ü enfekte)

**Myxospor ölçümleri:** Myxosporlar oval şekilli olup, apekse doğru incelenerek küt sonlanır. Sporlar 8,6 (7,8-9,4) µm uzunluğa, 6,7 (6,1-7,3) µm genişliğe ve 4,7 (4,1-5,3) kalınlığa sahiptir. Polar kapsüller 4,2 (3,7-4,6) µm uzunluk ve 2,2 (2,1-2,4) µm genişlikte olup armut şeklindedir. Erişkin myxosporlarda tespit edilen polar filamentin uzunluğu ise 27-51 µm aralığında belirlenmiştir (Tablo 1, Şekil 2).

Çalışmada bulunan *M. episquamalis* myxosporlarının morfolojik özellikleri ve ölçümleri farklı coğrafik bölgelerden rapor edilen izolatlarla karşılaştırılmış ve benzer oldukları görülmüştür (Tablo 1). Aynı zamanda tespit edilen izolatın morfolojik özellikleri kefal balıklarının (*M. cephalus*) enfekte eden diğer *Myxobolus* türlerinin myxospor morfolojik özellikleri ile de karşılaştırılmış ve Tablo 1’de verilmiştir.



**Şekil 3.** Kefal balıklarının enfekte eden *Myxobolus* türleri arasındaki filogenetik ilişkiler. *Myxobolus* türlerinin 18S rRNA veri setinin filogenisinde GTR+G+I modelini temel alan Maximum-Likelihood (ML) analiz yöntemi kullanılmıştır. *Ceratomyxa shasta* (AF001579) dış grup olarak kullanılmıştır. İzolatlar GenBank erişim numaraları ile birlikte verilmiştir. Bu çalışmada saptanan izolat üçgen sembolü ile gösterilirken, Türkiye’den rapor edilen diğer izolatlar yuvarlak sembolü ile işaretlenmiştir. Ölçek çizgisi %0,1 farklılığı göstermektedir. Bootstrap testinde birbirleri ile ilişkili taksonların filogenetik ağaçtaki %70 üzeri tekrar yüzdeleri gösterilmiştir

## Moleküler Analiz Sonuçları

Çalışmada bulunan izolatın 18S rRNA gen bölgesine ait 847 bp uzunluğundaki sekans dizilimleri elde edilmiştir. Morfolojik incelemede *M. episquamalis* olarak teşhis edilen izolatın 18S rRNA gen bölgesine ait sekans dizilimlerinin BLASTn analizleri sonucunda tür bazında konfirmasyonu yapılmış ve izolat GenBank’a MK012069 erişim numarası ile kaydedilmiştir. Gerçekleştirilen analizler sonucunda ES-2018-ERU izolatı Güney Kore’de kefal balıklarından bulunan *M. episquamalis* izolatları (JF810537; KC733437) ile %100 benzer iken, Tunus’tan rapor edilen izolatla (AY129312) %99,8 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Farklı coğrafik alanlardan GenBank’a kaydedilen *M. episquamalis* izolatları filogenetik ağaçta kendi aralarında monofiletik bir grup oluşturmuştur (Şekil 3). 18S rRNA veri setinde karşılaştırılan *M. episquamalis* izolatlarının genetik uzaklıkları %0,0-0,2 aralığında hesaplanmıştır (Tablo 2). ES-2018-ERU izolatının, kefalleri (*M. cephalus*) enfekte eden diğer *Myxobolus* türleri ile genetik uzaklığı ise %9,9-14,8 olarak saptanmıştır (Tablo 2).

## TARTIŞMA

Cnidaria şubesinde yer alan ve dünya genelinde yaygınlık gösteren Myxozoon parazitler, balıklarda oluşturdukları hastalıklardan ve balıkların market kalitelerini etkilemelerinden dolayı ekonomik kayıplara sebep olabilmektedirler (1,5). Aynı zamanda bazı Myxozoon türleri halk sağlığı açısından da öneme sahiptir (1,6). Bu parazitler, Myxosporea ve Malacosporea olmak üzere iki önemli sınıfa ayrılmışlardır (5). Geçmiş yıllarda, Myxosporea sınıfında yer alan *Myxobolus* türlerinin sınıflandırılmalarında ve tür tanımlamalarında yalnızca myxosporların morfolojik özelliklerinden yararlanılmış ancak benzerliklerden dolayı birtakım zorluklar yaşanmıştır (12-14). Yeni *Myxobolus* türlerinin tanımlanmasında, morfolojik olarak benzer türlerin ayrımında ve taksonomik revizyonlarda konvensiyonel tanı yöntemlerinin mutlaka moleküler yöntemlerle desteklenmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Bunlara ilaveten mutlaka konak türü, habitatu, parazitin yerleşim gösterdiği doku ve organ da belirtilmelidir (5,14-16).

Bu çalışmada, Türkiye’nin Karadeniz kıyılarında yakalanan has kefal (*M. cephalus*) balıklarında *Myxobolus* enfeksiyonu tespit edilmiş ve Türkiye’de, kefalleri enfekte eden *M. episquamalis* türü üzerine moleküler ve geleneksel morfolojik tanı yöntemlerinin birlikte kullanıldığı ilk veriler ortaya konmuştur. Enfekte olarak tespit edilen balıkların vücut yüzeyinde oluşan lezyonların daha önce belirtildiği gibi market kalitelerini etkileyebileceği görülmüştür. *M. episquamalis* enfeksiyonu kefal balıklarından daha önce Japonya, Tunus, Avustralya ve Senegal gibi ülkelerden myxospor morfolojisine dayalı olarak rapor edilmiştir (39-42). Bununla birlikte Kore (GenBank erişim no: JF810537/ KC733437) ve Tunus (GenBank erişim no: AY129312) gibi ülkelerden ise moleküler olarak rapor edilmiş olup, bu parazitin tip konağının has kefal (*M. cephalus*) balıkları olduğu belirtilmiştir (43-47). Nitekim *Myxobolus* türlerinin birçoğunun konak, doku ve organ spesifitelerinin yüksek olduğu bilinmektedir (48). Farklı coğrafyalardan bildirilen *M. episquamalis* myxospor morfolojileri ile bu çalışmada bildirdiğimiz izolatın myxospor morfolojisi karşılaştırıldığında benzer oldukları görülmüştür. Kefal balıklarından birçok *Myxobolus* türü rapor edilmiş olmasına rağmen yalnızca *M. episquamalis* ve *M. supamattayai* türlerinin

**Tablo 1.** Kefal balıklarının (*Mugil cephalus*) enfekte eden *Myxobolus* türlerinin myxosporların morfolojik özelliklerinin ve ölçümlerinin karşılaştırılması (\*Pulları enfekte eden diğer farklı tür; \*\**M. cephalus* türünü enfekte eden diğer türler)

Tür	Myxospor			Polar kapsül			Polar filament			Konak			Ülke	Kaynak
	Uzunluk	Genişlik	Kalınlık	Uzunluk	Genişlik	Uzunluk	Uzunluk	Genişlik	Uzunluk	Lokalizasyon	Konak	Ülke		
<i>M. episquamalis</i>	8,6 (7,8-9,4)	6,7 (6,1-7,3)	4,7 (4,1-5,3)	4,2 (3,7-4,6)	2,2 (2,1-2,4)	27-51	Pul/yüzgeç dibi	<i>M. cephalus</i>	Türkiye	Mevcut çalışma				
<i>M. episquamalis</i>	8,6 (7,5-9,5)	6,8 (6-7,5)	5,1 (4,5-5,5)	4,4 (3,8-5)	2,2 (2-3)	31,2 (25-44)	Pul	<i>M. cephalus</i>	Japonya	(39)				
<i>M. episquamalis</i>	8,5 (8-9)	6,5 (6-7)	-	4 (3,5-4,5)	2 (1,5-2,5)	-	Pul	<i>M. cephalus</i>	Tunus	(40)				
<i>M. episquamalis</i>	9,2 (8,8-10)	6,4 (6,2-6,8)	4,9 (4,7-5)	4,1	2,1-2,6	48-58	Pul	<i>M. cephalus</i>	Avustralya	(41)				
<i>M. episquamalis</i>	8,17±0,29 (8-9)	5,92±0,21 (5-6)	-	4,03±0,14 (4-4,5)	2,17±0,07 (2-3)	-	Pul/yüzgeç	<i>M. cephalus</i>	Senegal	(42)				
<i>M. episquamalis</i>	8,3 (7,68-8,38)	5,93 (5,63-6,23)	4,95 (4,75-5,15)	3,97 (3,6-4,34)	2,3 (1,78-2,28)	-	Pul	<i>M. cephalus</i>	Türkiye	(20)				
<i>M. episquamalis</i>	7 (6,2-7,6)	5,2 (4-6,2)	-	3,5 (2,5-4,5)	2 (1,6-2,3)	-	Pul	<i>M. cephalus</i>	Kore	(43)				
* <i>M. supamattayai</i>	6,6±0,32 (6,2-7)	6,5±0,21 (6,2-7)	-	3,5±0,13 (3,4-3,6)	2±0,09 (1,9-2,2)	12-15	Pul	<i>Valamugil seheli</i>	Tayland	(44)				
** <i>M. bizerti</i>	14,25±0,22	14,25±0,22	-	6,5±0,54	5,75±0,27	45-50	Solungaç filamenti	<i>M. cephalus</i>	Tunus	(40)				
** <i>M. ichkeulensis</i>	13,5±0,54	12,5±0,54	-	5,5±0,54	4,25±0,27	45-63	Solungaç kemeri	<i>M. cephalus</i>	Tunus	(40)				
** <i>M. spinacurvatūra</i>	10,5-12,5	9-11	-	3,5-5	2,5-3,5	22-43	Mezenteriyum, beyin, solungaç	<i>M. cephalus</i>	Japonya	(45)				
** <i>M. goensis</i>	9,7 (9,5-10,5)	6,6 (6-7,5)	-	5,3 (4,5-6)	2,4 (2-3)	-	Solungaç	<i>M. cephalus</i>	Hindistan	(46)				

pullarda enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (39,40,44,46,47,49). Çalışmada tespit ettiğimiz myxosporun morfolojik özellikleri *M. supamattayai* türünün myxospor morfolojik özellikleriyle karşılaştırıldığında ise birtakım farklılıkların olduğu belirlenmiştir. *M. episquamalis* myxosporu oval şekilde olup apekse doğru incelenerek küt sonlanırken *M. supamattayai* myxosporu elipsoidal yapı göstermektedir. İlaveten, morfolojik yapıların ölçümleri karşılaştırıldığında ise *M. episquamalis* türünün daha büyük olduğu görülmüştür.

Morfolojik analizler sonucunda elde ettiğimiz tüm veriler ileri moleküler tanı yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır. Myxosporean türlerin moleküler karakterizasyonlarının ve filogenetik yapılarının ortaya çıkarılmasında SSU gen bölgesi şu an için en uygun belirteç olarak kabul edilmektedir (5,16). SSU gen bölgesine ait sekanslar kullanılarak ilk kapsamlı filogenetik analizler Kent ve ark. (50) tarafından yapılmış olup DNA bazlı filogeni ile myxospor morfolojisine dayalı sınıflandırmaların arasındaki tutarsızlıklar belirlenmiştir. Myxozoan parazitlerin SSU gen bölgesine ait veri setleriyle gerçekleştirilen filogenetik analizlerde dört ana kökenin (tatlı su Myxosporean, deniz Myxosporean, Malacosporea ve Sphaerosporid) olduğu ortaya konmuştur (5). Tüm bunlar dikkate alınarak çalışmada bulunan izolatın 18S rRNA gen bölgesine ait 847 bp uzunluğundaki sekans dizimleri elde edilmiştir. Myxospor morfolojisine göre *M. episquamalis* olarak tanımlanan izolatın 18S rRNA gen bölgesine ait sekans dizimlerinin, farklı ülkelerden GenBank veri tabanına kayıtlı *Myxobolus* izolatlarıyla gerçekleştirilen BLASTn analizleri sonucunda tür bazında doğrulaması yapılmıştır. Analizler sonucunda ES-2018-ERU isimli izolatımız Güney Kore’de kefal balıklarından bulunan *M. episquamalis* izolatları (GenBank erişim no: JF810537/KC733437) ile %100 benzerlik gösterirken, Tunus’tan rapor edilen izolatla (Genbank erişim no: AY129312) %99,8 benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca filogenetik analizler sonucunda *M. episquamalis* izolatlarının kendi aralarında monofiletik grup oluşturduğu saptanmıştır. Kim ve ark.’nın (43) yaptıkları çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde 18S rRNA veri setinde kullanılan *M. episquamalis* izolatlarının genetik uzaklıkları %0,0-0,2 aralığında hesaplanmıştır. ES-2018-ERU izolatı (MK012069) ile kefal balıklarından izole edilmiş diğer *Myxobolus* türleri arasındaki genetik uzaklık ise %9,9-14,8 olarak belirlenmiştir. Ancak, her ne kadar SSU rDNA sekans dizimleri morfolojik olarak benzer Myxosporean türlerin ayırımında güçlü bir araç olarak kabul edilse de, hangi düzeydeki DNA dizi farklılıklarının tür içi veya arası olarak belirlenebileceğinin hala net olmadığı vurgulanmaktadır (5,51).

**Tablo 2.** Kefal balıkların enfekte eden *Myxobolus* türlerinin 18S rRNA gen bölgesinin nükleotit sekans farklılıklarının (%) ikili karşılaştırmaları

No	Erişim numarası/tür	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1)	ES-2018-ERU*																			
2)	(KC733437) <i>Myxobolus episquamalis</i>	0,0																		
3)	(JF810537) <i>Myxobolus episquamalis</i>	0,0	0,0																	
4)	(AY129312) <i>Myxobolus episquamalis</i>	0,2	0,2	0,2																
5)	(AY129318) <i>Myxobolus bizerti</i>	9,9	11,3	11,3	11,8															
6)	(KC733438) <i>Myxobolus</i> spp.	11,8	13,1	13,1	14	16,7														
7)	(AY129317) <i>Myxobolus exiguus</i>	12	18	18	18,7	20,5	22,3													
8)	(AY129314) <i>Myxobolus muelleri</i>	12	18	18	18,7	20,5	22,4	0,0												
9)	(AY129315) <i>Myxobolus ichkeulensis</i>	12	14,1	14,1	14,6	17	6,3	21,3	21,4											
10)	(AF378337) <i>Myxobolus ichkeulensis</i>	12,0	14,1	14,1	14,6	17	6,3	21,3	21,4	0,0										
11)	(KX242161) <i>Myxobolus parvus</i> **	12,2	15,7	15,7	16,1	18,1	20,3	15,6	15,4	20,5	20,5									
12)	(MH374629) <i>Myxobolus ichkeulensis</i> **	12,3	12,3	12,3	12,4	13,6	5,2	13,1	13,3	0,1	0,1	13,7								
13)	(MF118765) <i>Myxobolus</i> spp.	12,6	10,3	10,3	11	10,7	12,4	4,4	4,3	12,2	12,2	6,6	13							
14)	(MH377061) <i>Myxobolus spinacurvatura</i> **	12,7	12,5	12,5	12,7	13,2	4,5	13,5	13,6	4,9	4,9	14,2	4,7	13,7						
15)	(AF378341) <i>Myxobolus spinacurvatura</i>	13	15,6	15,6	15,8	17,2	5,4	22,4	22,5	5,9	5,9	21,2	4,9	12,7	0,9					
16)	(MF118773) <i>Myxobolus</i> spp.	13,3	10,6	10,6	11,2	11,9	6,2	12,9	12,9	5,3	5,3	13,9	5,7	13,1	7,6	6,6				
17)	(MH392320) <i>Myxobolus</i> spp.**	13,8	14,2	14,2	14,3	14,7	7,5	13,7	13,7	5	5	15,2	4,4	14,7	7,7	8,1	4,4			
18)	(HQ166720) <i>Myxobolus supamattayai</i>	14,4	23,2	23,2	24,6	22,5	26	22,2	22,2	24	24	25,6	16,1	12,6	16,1	25	15	18,2		
19)	(MH183025) <i>Myxobolus bragantinus</i>	14,8	11,6	11,6	11,8	13,1	12,8	13,6	13,6	13,3	13,3	14,2	16,8	13,3	16	12,9	14,1	18,4	14,8	0,0

\* Çalışmada bulunan izolat; \*\* Türkiye’den GenBank veri tabanına kayıtlı izolatlar

## SONUÇ

Bu çalışma, Türkiye’de kefal balıklarında *M. episquamalis* enfeksiyonları üzerine klasik morfolojik yöntemler ile ileri moleküler tanı tekniklerinin kombine bir şekilde kullanıldığı ilk çalışma olup, *M. episquamalis* türünün moleküler karakterizasyonu ilk kez ortaya konmuştur. Günümüze kadar 850’den fazla türün tanımlandığı *Myxobolus* cinsinin Türkiye sularındaki popülasyon genetik yapısının tam olarak anlaşılacak gerçek resmin ortaya konulması için morfolojik ve moleküler tanı yöntemlerinin birlikte kullanıldığı bütünlendirici taksonomik yaklaşımlar temelinde çok daha geniş bir coğrafyada ve mümkün olduğunca farklı balık türünde multidisipliner çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir.

### \* Etik

**Etik Kurul Onayı:** Çalışmaya dahil edilen balıklar yerel balıkçılardan satın alındığı için etik kurul onayına gerek yoktur.

**Hasta Onayı:** Hasta onayı alınmamıştır.

**Hakem Değerlendirmesi:** Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

**Finansal Destek:** Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Okamura B, Gruhl A, Bartholomew JL. An introduction to Myxozoan evolution, ecology and development. In: Okamura, B, Gruhl A, Bartholomew JL, editors. Myxozoan Evolution, Ecology and Development. Switzerland: Springer International Publishing; 2015.p.1-20.
- Jurine LL. Histoire des poissons du Lac Léman. Mém. Soc. Phys. Hist. Nat; 1825.
- Bütschli O. Myxosporidien. Zoologischer Jahresbericht für 1881;1:162-4.
- Lom J, Dyková I. Myxozoan genera: definition and note on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. Folia Parasitol (Praha) 2006;53:1-36.
- Fiala I, Bartošová-Sojková P, Whipps CM. Classification and phylogenetics of Myxozoa. In: Okamura, B, Gruhl A, Bartholomew JL, editors. Myxozoan Evolution, Ecology and Development. Switzerland: Springer International Publishing; 2015.p.85-110.
- Sugita-Konishi Y, Sato H, Ohnishi T. Novel foodborne disease associated with consumption of raw fish, olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Food Safety Commission, Cabinet Office, Government of Japan 2014;2:141-50.
- Eiras JC, Zhang J, Molnár K. Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporidia, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. Syst Parasitol 2014;88:11-36.
- Pekmezci GZ, Yardımcı B, Yılmaz S, Polat N. *Myxobolus anatolicus* spp. nov. (Myxozoa) infecting the gill of Anatolian khrumulya *Capoeta tinca* (Cyprinidae) in Turkey. Dis Aquat Organ 2014;109:213-22.
- Borzák R, Molnár K, Cech G, Papp M, Deák-Paulus P, Székely C. Description of two new species of *Myxobolus*



- Bütschli, 1892, *M. peleci* n. spp. and *M. cultrati* n. spp., detected during an intensive mortality of the sibel, *Pelecus cultratus* (L.) (Cyprinidae), in Lake Balaton, Hungary. Syst Parasitol 2016;93:667-77.
10. Zhang B, Zhai Y, Liu Y, Gu Z. *Myxobolus pseudowulii* spp. n. (Myxozoa: Myxosporea), a new skin parasite of yellow catfish *Tachysurus fulvidraco* (Richardson) and redescription of *Myxobolus voremkhai* (Akhmerov, 1960). Folia Parasitol (Praha) 2017;64:030.
  11. Lövy A, Smirnov M, Brekhman V, Ofek T, Lotan T. Morphological and molecular characterization of a novel myxosporean parasite *Myxobolus bejeranoi* n. spp. (Cnidaria: Myxosporea) from hybrid tilapia in Israel. Parasitol Res 2018;117:491-9.
  12. Shulman SS. Order myxosporidia. In: Pavlovskii, EN. editör. Key to Parasites of Freshwater Fishes of the USSR, Israel program for scientific translations. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR: Moscow; 1964.p.56-155.
  13. Shulman SS. Myxosporidia of the USSR. Nauka Publishers, Moscow, Department of Interior and National Science Foundation (U.S), Zoologicheskii institut (Akademii a nauk SSSR), Washington; 1988.
  14. Molnár K, Székely Cs, Hallet SL, Atkinson SD. Some remarks on the occurrence, host-specificity and validity of *Myxobolus rotundus* Nemeček, 1911 (Myxozoa: Myxosporea). Syst Parasitol 2009;72:71-9.
  15. Molnár K. Comments on the host, organ and tissue specificity of fish myxosporeans and on the types of their intrapiscine development. Parasitologia Hungarica 1994;27:5-20.
  16. Atkinson SD, Bartošová-Sojtková P, Whipps CM, Bartholomew JL. Approaches for characterising Myxozoan species. In: Okamura, B, Gruhl A, Bartholomew JL, editors. Myxozoan Evolution, Ecology and Development. Switzerland: Springer International Publishing; 2015.p.111-23.
  17. Altunel FN. Parasitism on mullets (*Mugil* spp.). EgeJFAS 1983;Series B:364-78.
  18. Sağlam N. Keban Baraj Gölünden yakalanan balıklarda görülen eksternal parazitlerin incelenmesi (tez). Elazığ: Frat Üniv. 1992.
  19. Umur S, Pekmezci GZ, Beyhan YE, Gurler AT, Acici M. First record of *Myxobolus muelleri* (Myxosporea: Myxobolidae) in flathead grey mullet *Mugil cephalus* (Teleostei, Mugilidae) from Turkey. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2010;57:205-7.
  20. Özak AA, Demirkale I, Cengizler I. Two new records of *Myxobolus Butschli*, 1882 (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae) species from Turkey. Turk J Zool 2012;36:191-9.
  21. Özer A, Özkan H, Güneydağ S, Yurakhno V. First report of several Myxosporean (Myxozoa) and Monogenean parasites from fish species off Sinop Coasts of the Black Sea. Turk J Fish Aquat Sc 2015;15:1-2.
  22. Burgu A, Oğuz T, Körting W, Güralp N. İç Anadolu'nun bazı yörelerinde tatlı su balıklarının parazitleri. Etlik Vet Mikrobiyol Derg 1988;3:143-65.
  23. Aydoğdu A, Yıldırımhan HS, Altunel FN. İznik gölü kadife balıklarının (*Tinca tinca* L.,1758) parazitleri üzerine bir çalışma. Türkiye Parazit Derg 1996;20:261-70.
  24. Aydoğdu A. İznik Gölü sazan balıklarının (*Cyprinus carpio* L.,1758) Platyhelminth parazitlerini belirlemeye yönelik çalışmalar (tez). Bursa: Uludağ Univ. 1997.
  25. Pekmezci GZ, Yardımcı B, Bölükbaş CS, Özpiçak M, Yılmaz S, Polat N. Morphological and histopathological studies of *Myxobolus* spp. in *Squalius cephalus* from the Ladik Lake Samsun, Turkey. In: Duman F, editör. Ecology Symposium; 11-13 May 2017; Kayseri: Turkey;2017.p.680.
  26. Pekmezci GZ, Yardımcı B, Bölükbaş CS, Özpiçak M, Yılmaz S, Polat N. *Myxobolus* spp. infecting the gill filaments of *Perca fluviatilis* in Ladik Lake, Samsun, Turkey: morphological and histopathological data. In: Duman F, editör. Ecology Symposium; 11-13 May 2017; Kayseri: Turkey;2017.p.686.
  27. Özer A. Türkiye'deki dikence balığında (*Gasterosteus aculeatus* L., 1758) görülen *Sphaerospora elegans* Thelohan, 1892 ve *Myxobolus gasterostei* Davis, 1944 (Phylum: Myxozoa) enfeksiyonları. Turk J Zool 2003;27:161-7.
  28. Özer A, Yurakhno V, Öztürk T, Kornychuk YM. Myxosporean parasites of *Ceratomyxa merlangi* and *Myxidium gadi* in whiting *Merlangius merlangus*: a comparative epizootiological analysis based on samples from two localities off southern and northern coasts of the Black Sea. Parasitol Res 2017;116: 2463-9.
  29. Pekmezci GZ, Yardımcı B, Yılmaz S. Supplementary studies and the first molecular data on *Myxobolus scardinii* Reuss, 1906 (Myxozoa: Myxosporea) infecting the gill filaments of rudd, *Scardinius erythrophthalmus* (L.). Parasitol Res 2015;114:3619-25.
  30. Özer A, Gürkanlı CT, Özkan H, Acar G, Çiftçi Y, Yurakhno V. Molecular characterization and morphological aspects of *Myxobolus parvus* (Myxozoa) from *Liza saliens* (Mugilidae) off the Turkish Black Sea Coasts. Parasitol Res 2016;115:3513-8.
  31. Gürkanlı CT, Okkay S, Çiftçi Y, Yurakhno V, Özer A. Morphology and molecular phylogeny of *Ortholinea mullusi* spp. nov. (Myxozoa) in *Mullus barbatus* from the Black Sea. Dis Aquat Organ 2018;127:117-24.
  32. Özer A, Okkay S, Gürkanlı CT, Çiftçi Y, Yurakhno V. Two novel myxosporean parasites in Black Sea fishes: *Kudoa niluferi* spp. nov. and *Kudoa anatolica* spp. nov. (Cnidaria: Myxosporea). Dis Aquat Organ 2018;128:225-33.
  33. Lom J, Dyková I. Protozoan Parasites of Fishes. Netherland: Elsevier; 1992;26:315pp.
  34. Lom J, Arthur JR. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxospore. J Fish Dis 1989;12:151-6.
  35. Fiala I. The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. Int J Parasitol 2006;36:1521-34.
  36. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 2012;28:1647-9.
  37. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 2013;30:2725-9.
  38. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 1980;16:111-20.
  39. Egusa S, Yukio Maeno Y, Sorimachi M. New Species of Myxozoa, *Myxobolus episquamalis* spp. nov. Infecting the Scales of the Mullet, *Mugil cephalus* L. Fish Pathology 1990;25:87-91.
  40. Bahri S, Marques A. Myxosporean parasites of the genus *Myxobolus* from *Mugil cephalus* in Ichkeul lagoon, Tunisia: description of two new species. Dis Aquat Organ 1996;27:115-22.
  41. Rothwell JT, Virginia JL, Callinan RB, Nicholls PJ, Langdon JS. Occurrence of cutaneous infections of *Myxobolus episquamalis* (Myxozoa: Myxobolidae) in sea mullet, *Mugil cephalus* L, in Australia. Aust Vet J 1997;75:349-52.
  42. Diamanka A, Fall M, Diebakate C, Faye N, Toguebaye BS. Identification of *Myxobolus episquamalis* (Myxozoa, Myxobolidae) in flathead mullet *Mugil cephalus* (Pisces, Teleostei, Mugilidae) from the coast of Senegal (eastern tropical Atlantic Ocean). Acta Adriat 2008;49:19-23.
  43. Kim WS, Kim JH, Jang MS, Jung SJ, Oh MJ. Infection of wild mullet (*Mugil cephalus*) with *Myxobolus episquamalis* in Korea. Parasitol Res 2013;112:447-51.
  44. U-Taynapun K, Penprapai N, Bangrak P, Mekata T, Itami T, Tantikitti C. *Myxobolus supamattayai* n. spp. (Myxosporea:Myxobolidae) from Thailand parasitizing the scale pellicle of wild mullet (*Valamugil seheli*). Parasitol Res 2011;109:81-91.
  45. Maeno Y, Sorimachi M, Ogawa K, Egusa S. *Myxobolus spinacarvatura* n. spp. (Myxosporea: Bivalvulida) parasitic in deformed mullet, *Mugil cephalus*. Fish Pathol 1990;25:37-41.
  46. Eiras JC, D'Souza J. *Myxobolus goensis* n. spp. (Myxozoa, Myxosporea, Myxobolidae), a parasite of the gills of *Mugil cephalus* (Osteichthyes, Mugilidae) from Goa. India Parasite 2004;11:243-8.

47. Bahri S, Andree KB, Hedrick RP. Morphological and phylogenetic studies of marine *Myxobolus* spp. from Mullet in Ichkeul Lake, Tunisia. *J Eukaryot Microbiol* 2003;50:463-70.
48. Molnár K, Eszterbauer E. Specificity of infection sites in vertebrate hosts. In: Okamura, B, Gruhl A, Bartholomew JL, editors. *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Switzerland: Springer International Publishing; 2015.p.295-313.
49. Lom J, Dykova I. Studies on protozoan parasites of Australian fishes: III. Species of genus *Myxobolus* Bütschli, 1882. *Eur J Protistol* 1994;30:431-9.
50. Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin RH, et al. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J Eukar Microbiol* 2001;48:395-413.
51. Liu XH, Voronin VN, Dudin AS, Zhang JY. Morphological and molecular characterization of *Myxobolus mucosus* spp. n. (Myxosporea: Myxobolidae) with basifilamental sporulation in two cyprinid fishes, *Rutilus rutilus* (L.) and *Leuciscus leuciscus* (L.) in Russia. *Parasitol Res* 2016;115:1297-304.