

# Úvod do terénní zoologie bezobratlých

jaro 2017

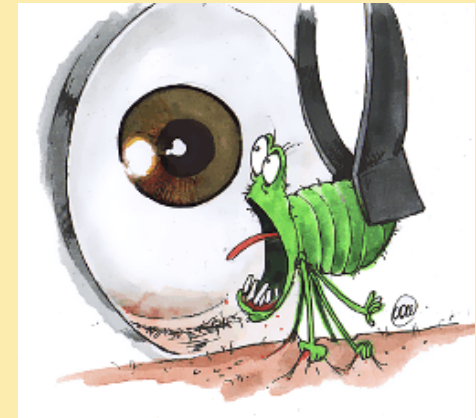
## PARAZITOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ RYB se zaměřením na sběr helmintů



Kateřina Francová

Mária Seifertová

[kfranc@sci.muni.cz](mailto:kfranc@sci.muni.cz)



# PARAZITOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ RYB

Ryby pro parazitologické vyšetření: nejlépe živé a čerstvě ulovené (držené v původní nebo odstáté vodě)

1. **Usmrcení ryby:** omráčení úderem do hlavy a přestřižení páteře  
→ přenesení do pitevné misky s vodou (povrch těla nesmí oschnout!)

2. **Záznam údajů:**

druh ryby,

délka (celková, standardní),

hmotnost, (pohlaví, stáří)

(+ foto s identifikačním číslem)



3. **DNA vzorek tkáně hostitele** (ploutev, svalovina)

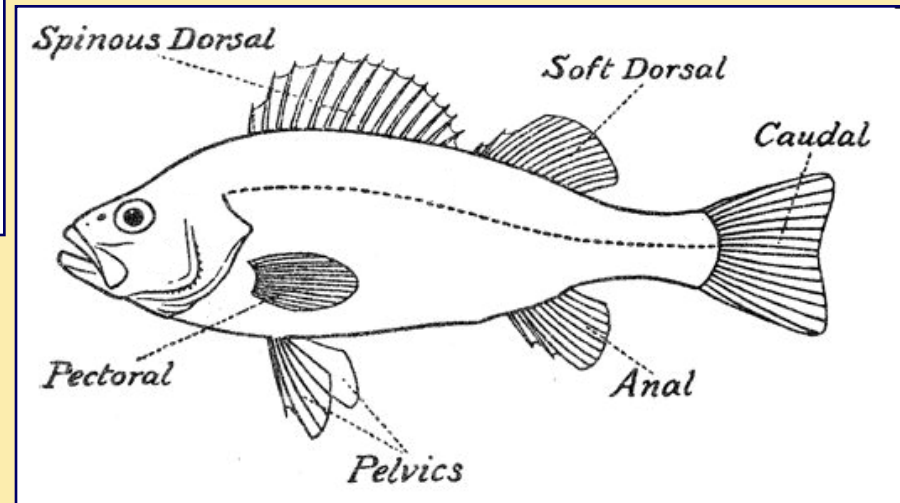
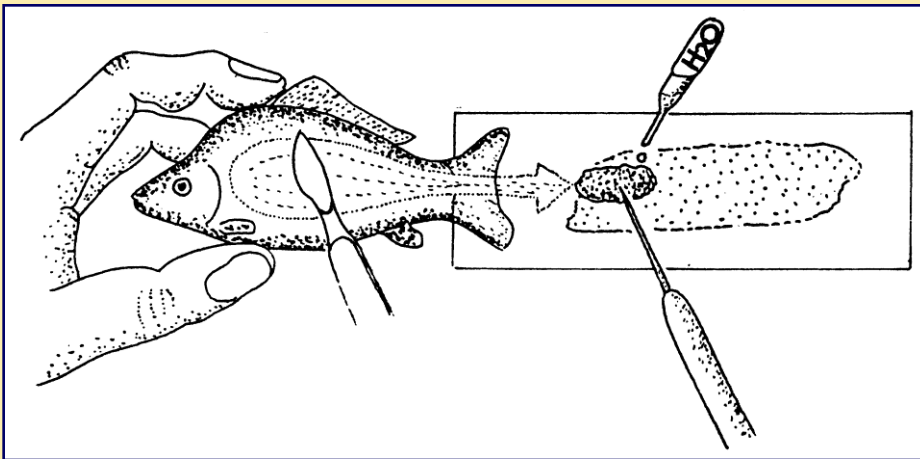
4. **Zevní prohlídka ryby (makroskopicky):** pijavky, koryši

5. **Parazitologická pitva**

# Parazitologická pitva

## A. Povrch těla

- seškrab slizu s povrchovými vrstvami kůže do Petriho misky s vodou
- prvoci, Monogenea, *Posthodiplostomum* (Digenea), korýši



## B. Ploutve

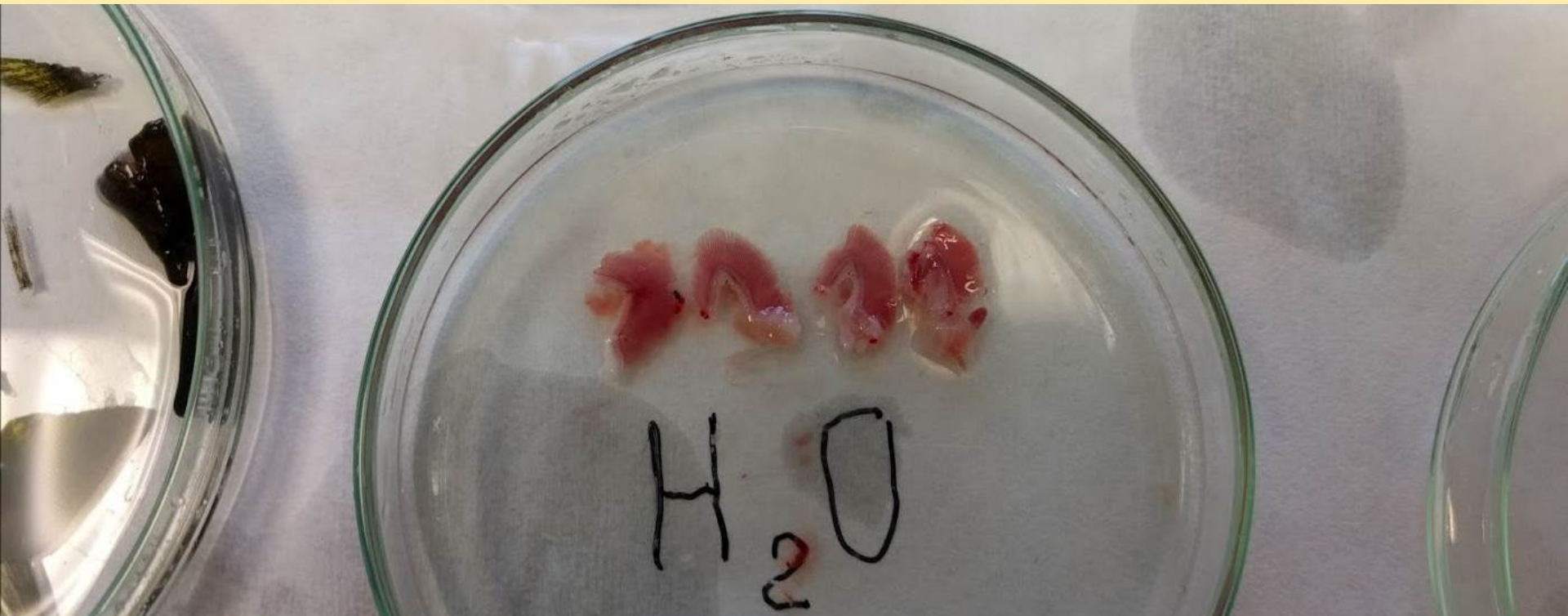
- odstřížení ploutví → Petriho miska s vodou
- prvoci, Monogenea, metacerkárie, glochidie

## C. Nosní jamky

- vypeparování → miska s vodou
- *Dactylogyrus nasalis* (Monogenea)

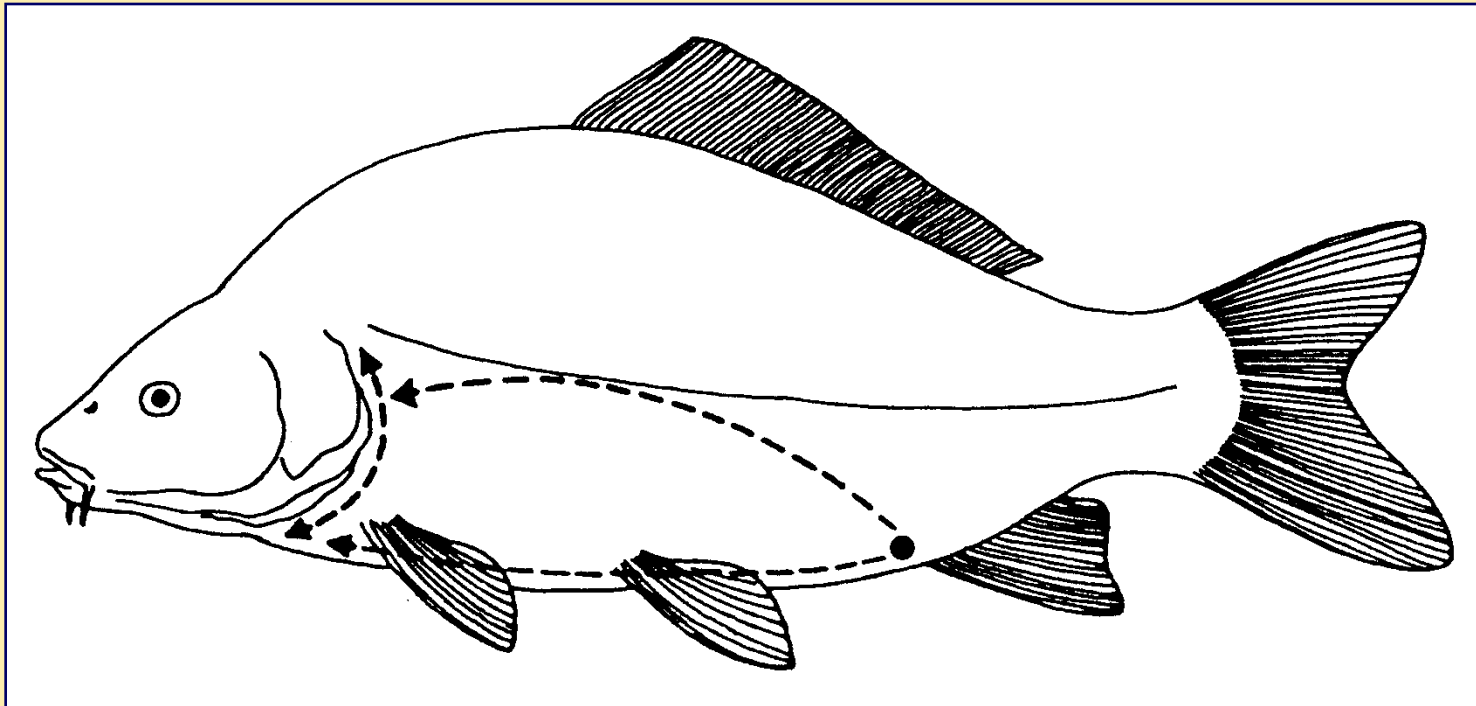
## D. Žábry, žaberní dutina, dutina ústní

- odstřížení skřelí → izolace jednotlivých žaberních oblouků (celý žaberní aparát) → Petriho miska s vodou
- prvoci, Monogenea, metacerkárie, korýši, glochidie



## E. Orgány dutiny tělní

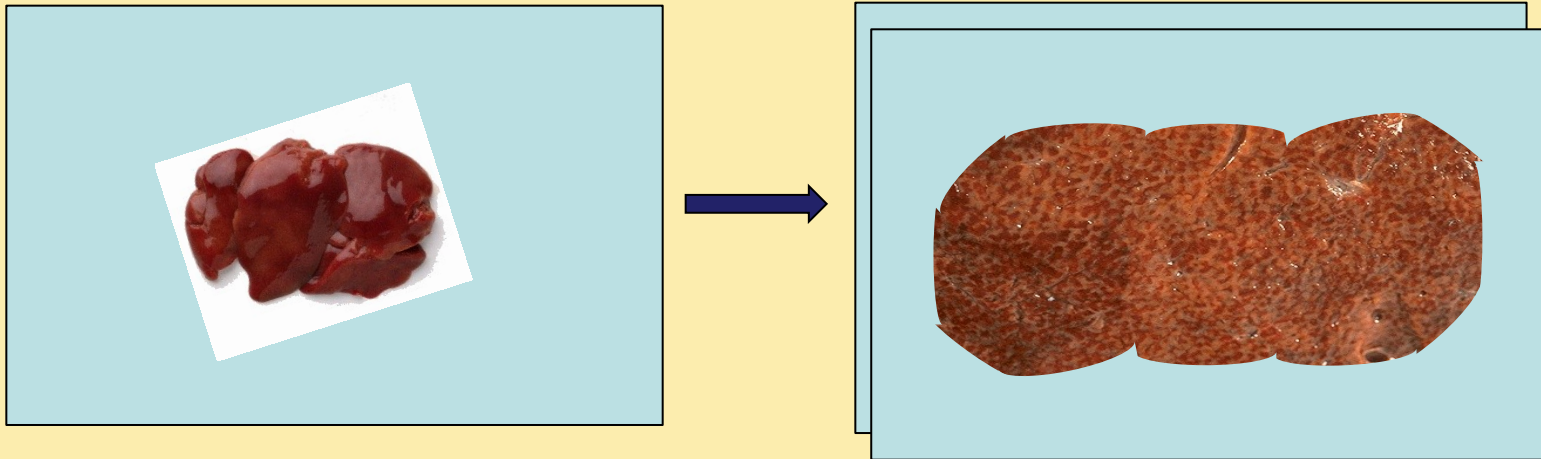
- otevření a prohlídka dutiny tělní: hlístice (*Philometra*), larvální stadia tasemnic (*Ligula*)
- přenesení jednotlivých orgánů do misek s fyziologickým roztokem (0,65% NaCl)
- seškrab vnitřních stěn dutiny tělní



## Vyšetření orgánů

- nejprve prohlídka zevní strany (cysty)

A. kompaktní orgány (játra, slezina, ledviny, ...) → **kompresní metoda** (rozmáčknutí mezi dvěma skly – nejlépe miskami)



B. orgány s dutinou (žaludek, střevo, žlučník, plynový měchýř, srdce)

→ **rozstřížení** nebo roztrhání, poté možno i kompresní metoda

→ prohlídka vnitřní stěny a obsahu

## F. Ostatní orgány

Oko: - vyjmutí oční bulvy do misky s fyziologickým roztokem  
- vyšetření sklivce (*Tylodelphys*) a čočky (*Diplostomum*)  
- roztrhání, kompresní metoda

Mozek: - odstřížení lebečního krytu, kompresní metoda

# Příprava cizopasníků pro druhovou determinaci: Trematoda, Cestoda, **Acanthocephala (!)**

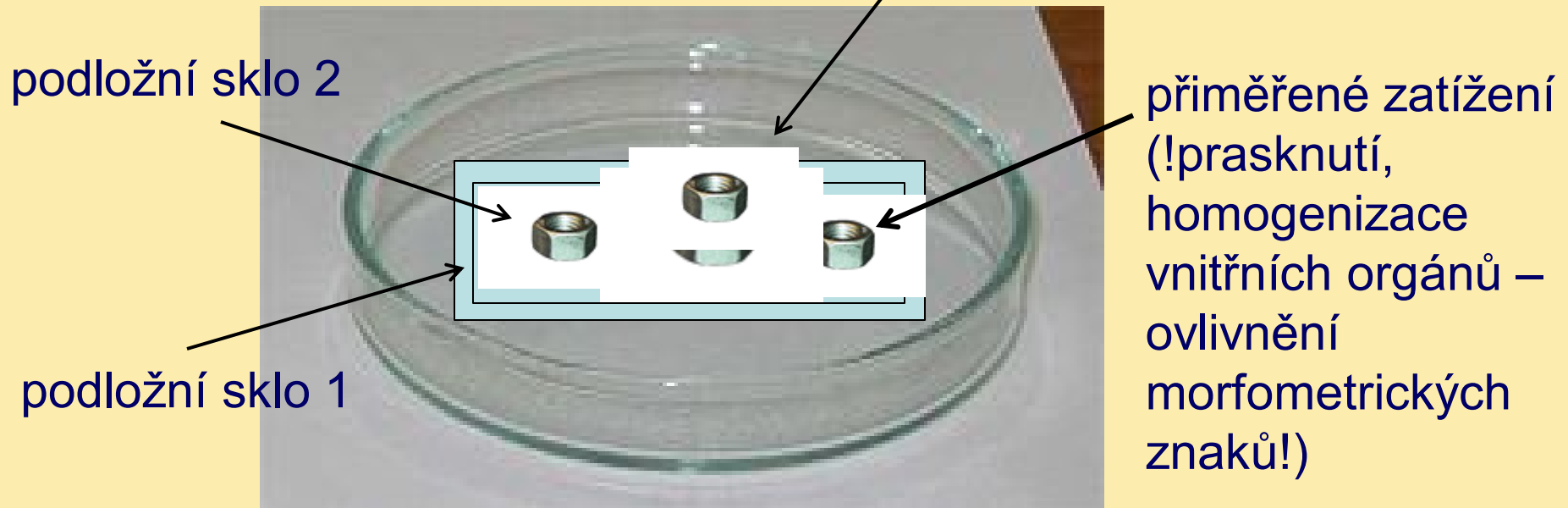
- **fixace:** 4% formaldehyd nebo 70% ethanol – „**naplocho**“ (viz také následující slajd)

**NEBO horkým 4% formaldehydem** (viz fixace hlístic dále;

možné pouze u Trematoda a Cestoda; Acanthocephala - puchýřky)

- **barvení:** železitý acetokarmín (IAC)

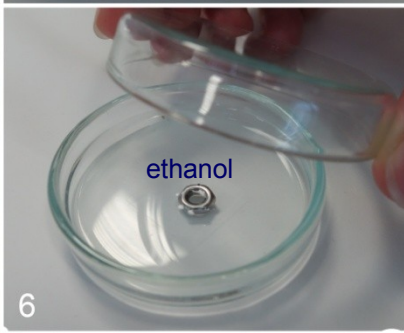
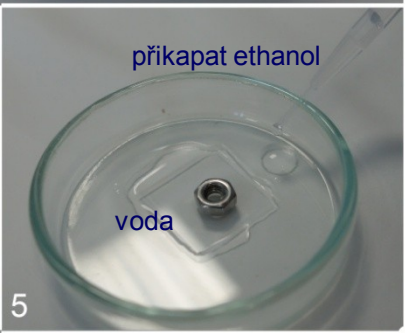
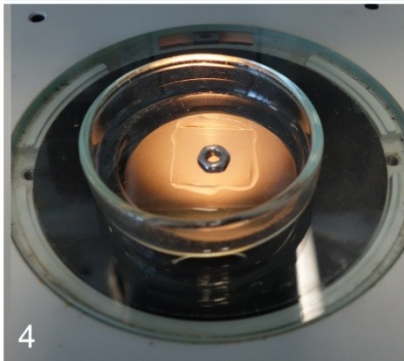
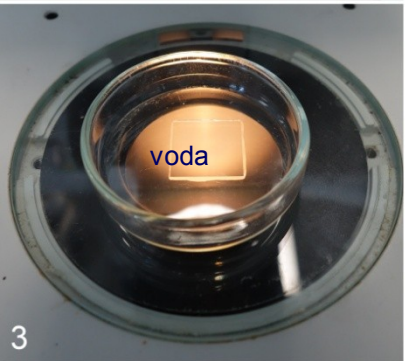
- montování do kanadského balzámu





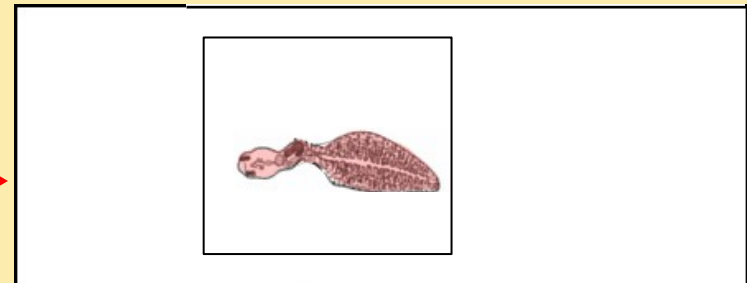
# Postup fixace „naplocho“ pomocí lehkého tlaku krycího skla

(možno použít i pro Monogenea, Diplozoidae (tělo mimo haptor), což je zde ilustrováno)



Fixace při mírném zatížení (→ narovnaný, lehce zploštělý, nikoliv však prasklý jedinec) a následné barvení jedince umožňuje optimální pozorování taxonomicky významných struktur. Jedinci mohou být barveni ihned po fixaci nebo mohou být skladováni ve fixáži (volně v eppendorfce) a barveni později...

barvení a montování do uzavíracího media



# Příprava cizopasníků pro druhovou determinaci: Nematoda (Cestoda, Trematoda, Monogenea)

- **fixace:** 4% formaldehyd zahřátý na 80°C → **natažení těla**, přenesení do ependorfy – uchování
- **projasnění:** směs glycerinu a vody (1:5)
- montování do glycerin-želatiny

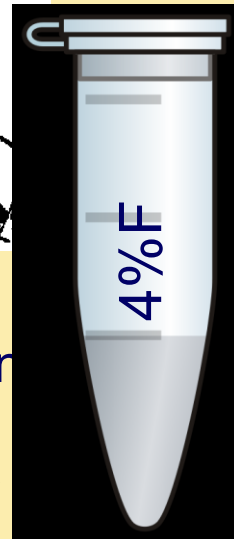
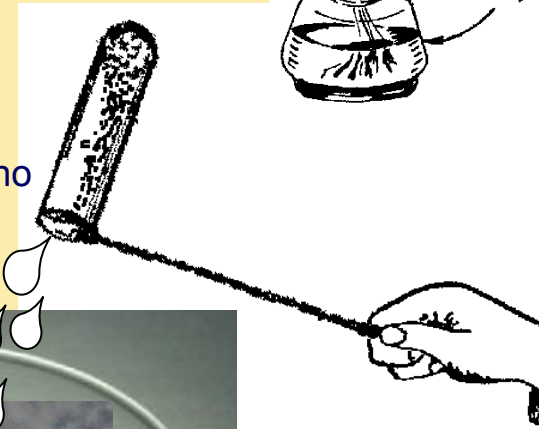
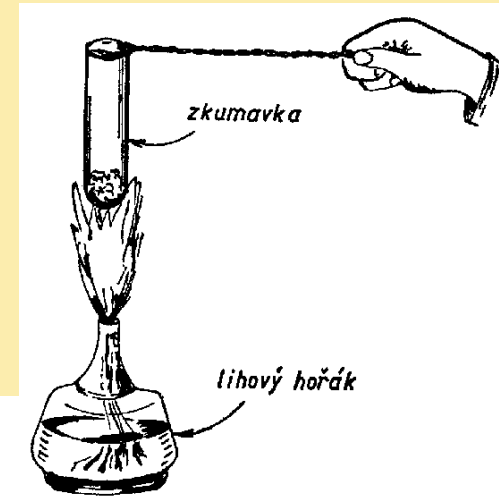
1. Sběr hlístic do fyziologického roztoku v hodinovém sklíčku



2. Zalití hlístic horkým 4%F (po odstranění přebytečného množství fyz. roz.)



3. Přenesení hlístic do ependorfy



# Čtverzubec zelený – import z JV Asie

*Dichotomyctere nigroviridis* (syn. *Tetraodon nigroviridis*)

**Čeľad:** čtverzubcovití (Tetraodontidae)

**Místo původního rozšíření:** JV Asie (lehce brakické prostředí!)

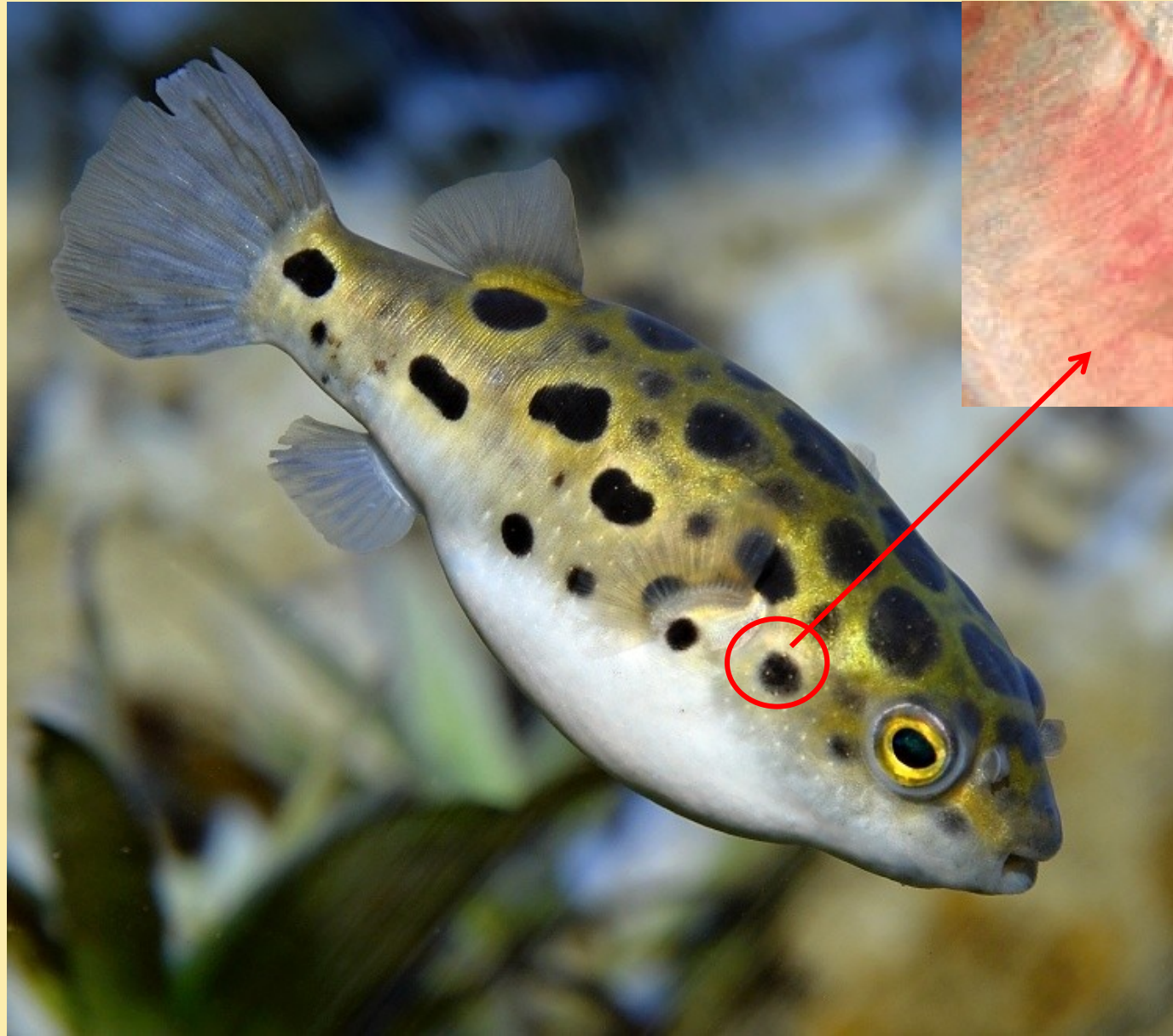
**Potrava:** masožravec – živá/mražená (šneci, nítěnky, korýši,...) vločkové krmivo

**Délka života:** cca 5-8 let



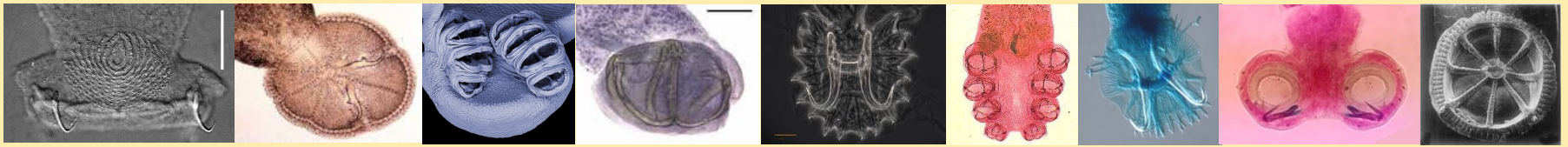
nafouknutí v případě pocitu ohrožení

# Čtverzubec jako HOSTITEL monogeneí (žábrolístů)



**žaberní paraziti**

**Monogenea  
(Platyheminthes)**



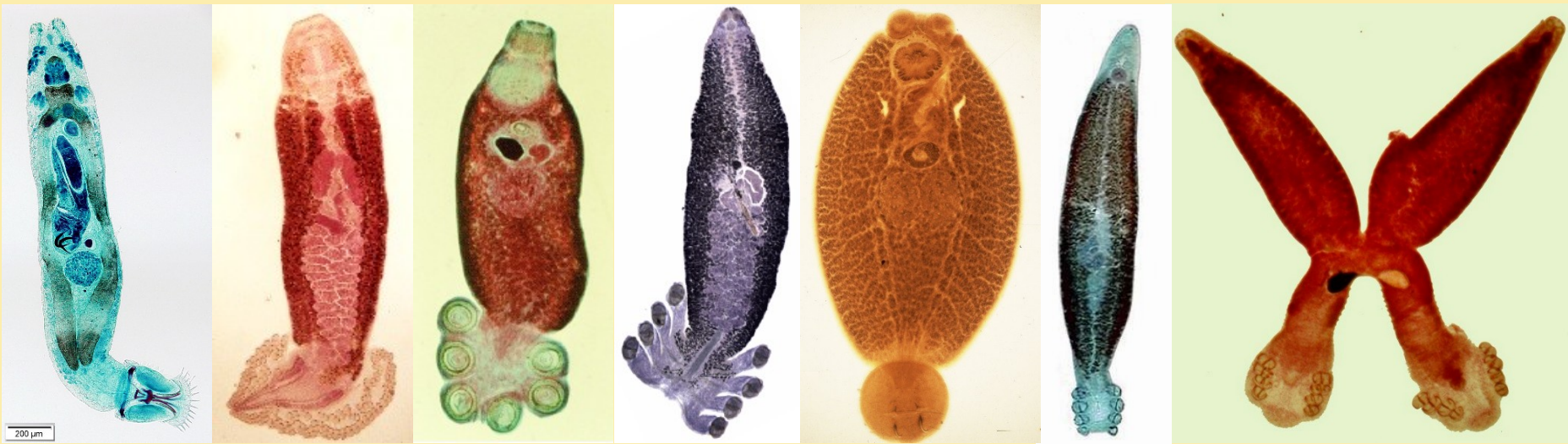
## MONOGENEA

**Kmen:** ploštěnci (Platyhelminthes)

### Způsob života

V drtivé většině případů se jedná o **ektoparazity** vodních živočichů, jejich **vývoj je přímý**, na rozdíl od ostatních parazitických ploštěnců **nemají žádné mezipostitele**. Jejich **larva** se nazývá **oncomiracidium**, je vybavená množstvím háčků a dvěma páry **fotoreceptorů**. Po přichycení se na **žábry** či kůži hostitele se postupně přetváří v dospělého.

Vzácně (u 5% zástupců) se může jednat i o **endoparazity**, ti potom parazitují v močovém měchýři, močovodu, případně střevech **obojživelníků**, nebo **ryb**. Dospělí jedinci mají přichycovací hlavové orgány a koncový přichytný terč - **haptor**. Utváření **haptoru** je důležité z hlediska **taxonomie** jednotlivých druhů.



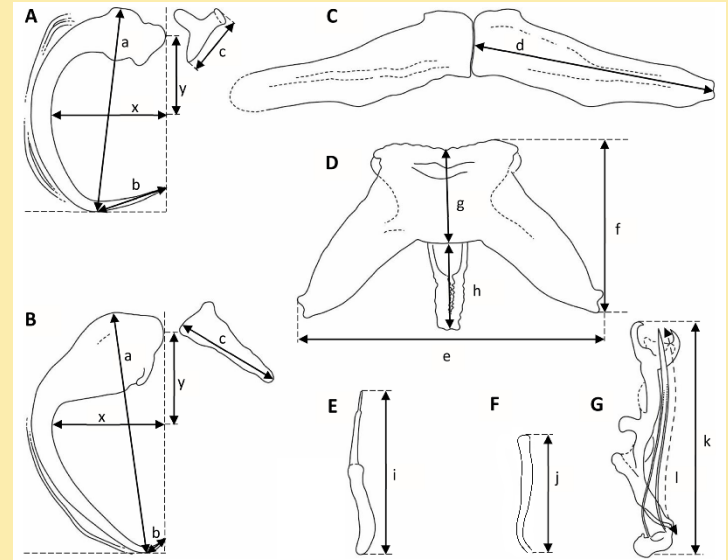
# Monogenea - taxonomie

- snažíme se identifikovat nalezené jedince a zařadit je do již známých taxonů (např. druhů, rodů, čeledí)
- v případě nalezení dosud neznámého druhu následuje jeho popis a pojmenování

**sklerotizované přichytné háčky haptoru a sklerotizované části reprodukční soustavy = důležité identifikační znaky**

nutno na vhodně **fixovaném jedinci** pozorovat, zakreslit, změřit

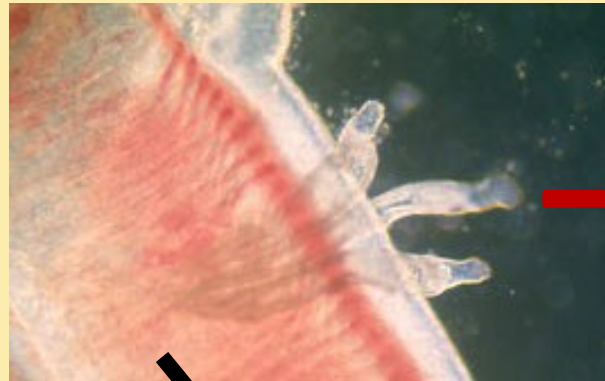
**metoda úplného roztlačení červa až k prasknutí**



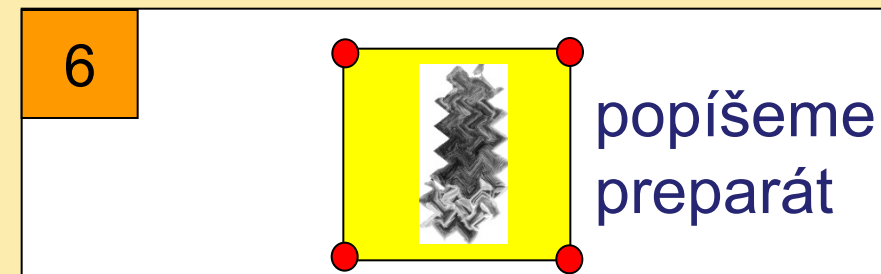
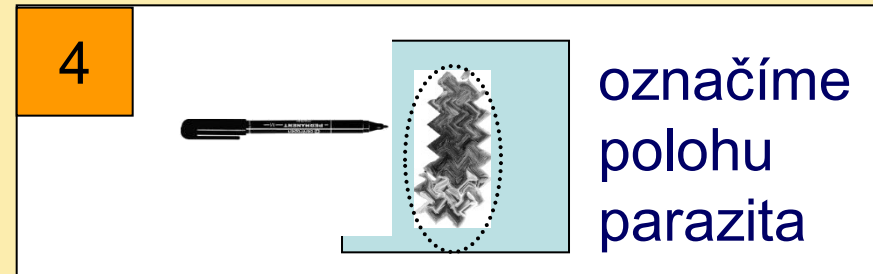
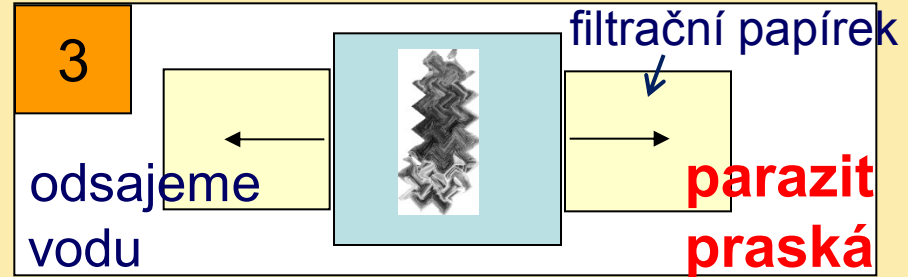
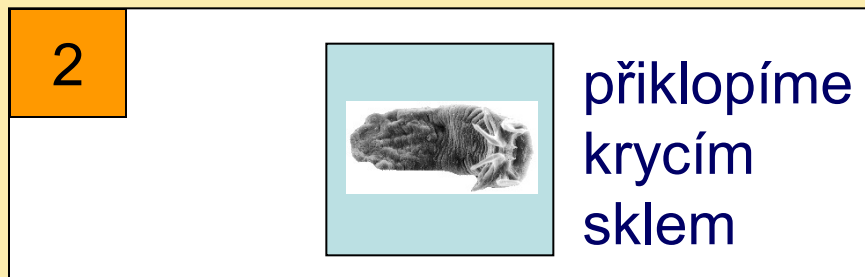
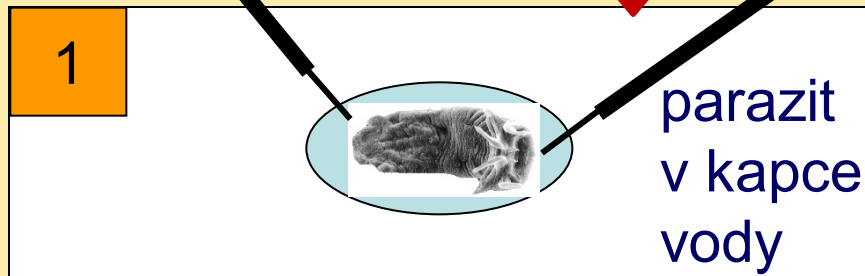
**haptor**

# VÁŠ ÚKOL – zhotovení preparátu

- pod preparačním stereomikroskopem hledáme na žábrách monogenea
- parazita přeneseme na podložní sklo...



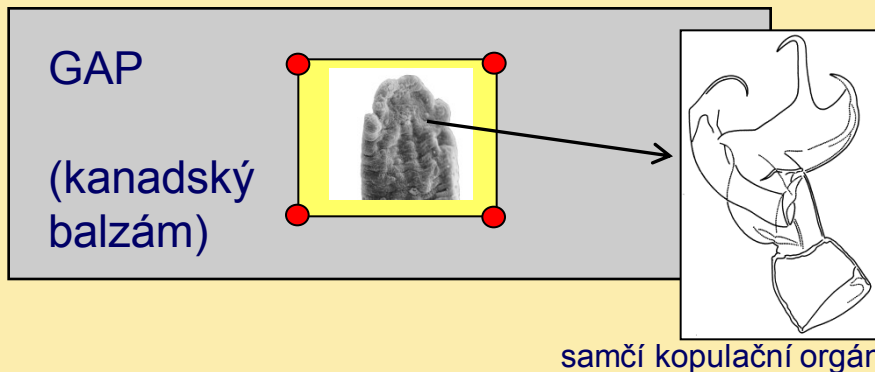
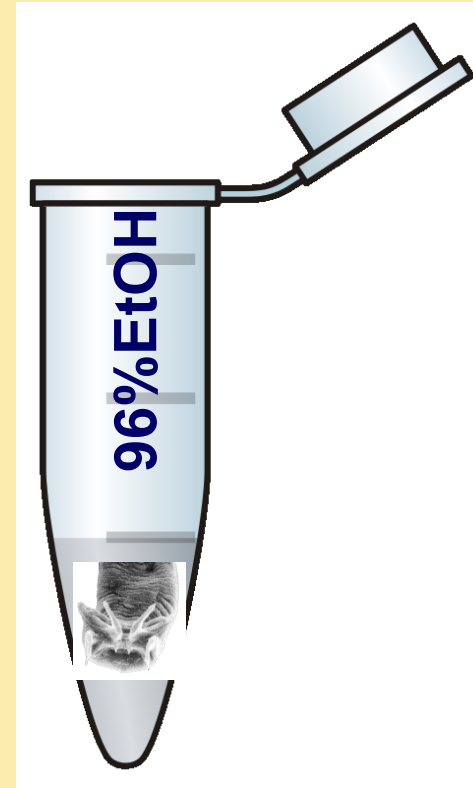
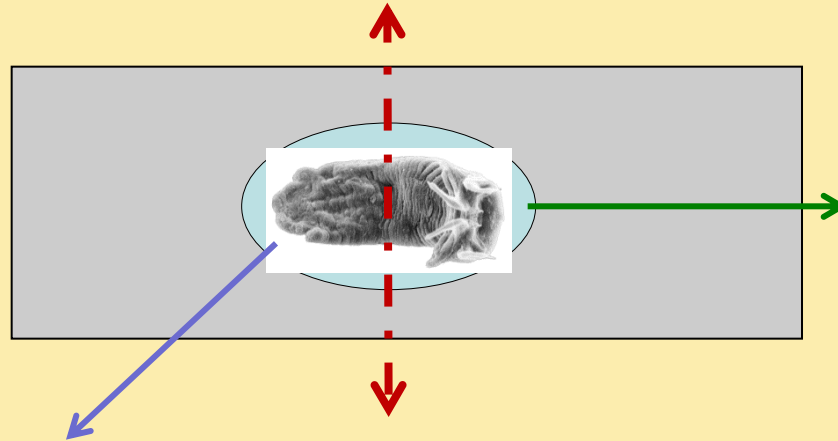
Monogenea  
přeneseme  
pomocí jehel  
do kapky  
vody na  
podložním  
skle



# Zpracování monogeneí pro analýzu DNA

→ rozdělení jedince na dvě části pomocí tenkých jehel

Část nesoucí důležité morfologické znaky (sklerotizované struktury) je zcela roztláčena a fixována v GAP pro následnou morfologickou identifikaci. Později může být také převedena do kanadského balzámu (trvalý preparát – vhodné k uložení do muzea).

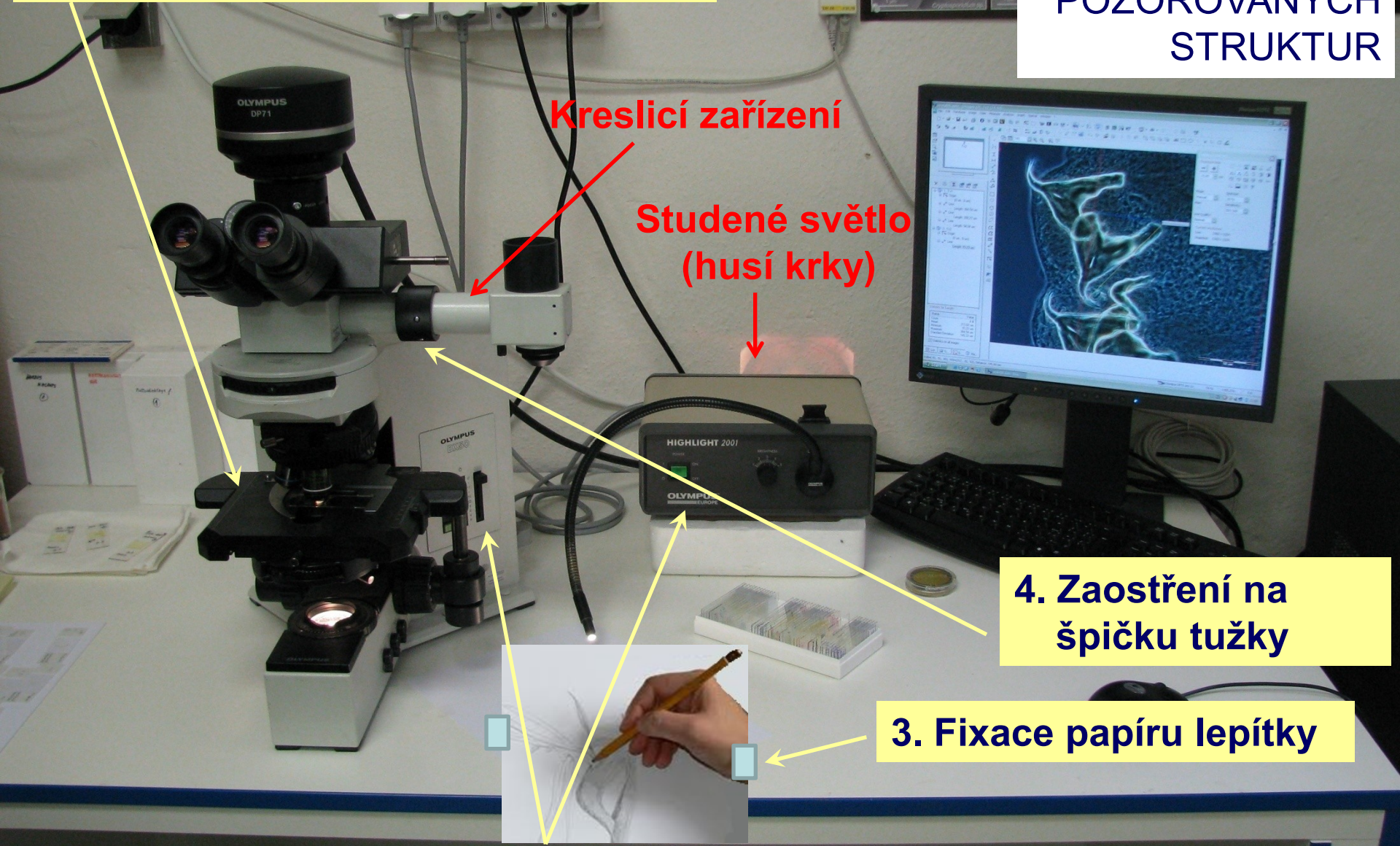


Druhá část je uložena v 96% alkoholu pro izolaci DNA. Získaná genová sekvence je uložena v databázi GenBank.



# 1. Zaostření na pozorovaný objekt

# KRESLENÍ POZOROVANÝCH STRUKTUR



Kreslicí zařízení

Studené světlo  
(husí krky)

4. Zaostření na  
špičku tužky

3. Fixace papíru lepítky

2. Optimální nastavení (poměr) intenzity vnitřního (mikroskop) a vnějšího osvětlení (husí krky)