



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

**Histologické vyhodnocení parazitární zátěže na modelu
Myoxocephalus scorpius a *Gymnocanthus tricuspis* –
Trichodina spp.**

Vypracoval: Klára Komendová
Vedoucí práce: RNDr. Oleg Ditrich CSc.

České Budějovice 2014

Abstrakt

Hlavní náplní práce bylo studium parazitace žaber vranky mořské (*Myoxocephalus scorpius*) a vranky severní (*Gymnocanthus tricuspis*) parazitované nálevníky *Trichodina* spp. Studované vzorky žaber pocházely z ryb odchycených v roce 2011 a 2012 v centrální části Svalbardu (Špicberky), převážně v zátocě Petuniabukta, ve kterých byli také identifikováni parazitičtí endohelminți. Ke kvantifikaci nálevníků byly použity histologické a mikroskopické metody a výsledky byly srovnány s údaji o kondici hostitele a s nálezy endohelminťů.

Hlavním cílem práce bylo potvrdit či vyvrátit hypotézu, že množství nálevníků *Trichodina* spp. koreluje s intenzitou parazitace hostitele endohelminťy a že se vyšší celkový stupeň parazitace odráží sníženou kondici ryb. Dalším cílem bylo zdokonalit se v histologické technice, která zahrnuje fixaci, zalévání, krájení a barvení tkáně a také si osvojit metodu mikroskopické diagnostiky.

K vlastní laboratorní analýze byl použit cenný materiál obsahující žábry mořských vranek. Mořské vranky byly loveny pomocí tenatových sítí nebo při potápění a následně u nich byla změřena jejich délka, celková hmotnost, hmotnost gonád a hmotnost jater. Pomocí parazitologické pitvy se odebraly žábry, které byly, společně s nalezenými endohelminťy, pečlivě fixovány pro pozdější histologické vyšetření a označeny. Mezi nalezenými endohelminťy byla tasemnice *Diplocotyle olrikii* (Cestoda: Spathebothriidea), plerocerkoidy *Tetraphyllidae* gen. spp., střevní motolice *Podocotyle atomon* (Digenea: Opecoelidae) a larvy hlístic (Nematoda: Anisakidae).

Z odebraných žaber se zhotovily histologické preparáty a to tak, že fixované žábry byly nejprve odvodněny ve vzestupné řadě ethanolu, prosyceny xylolem, a zality do parafínu. Krájení tkáňových bločků probíhalo na rotačním mikrotomu. Nakrájené vzorky byly nataženy na podložní sklíčko a vysušeny. Po vysušení následovalo odparafínování, barvení metodou hematoxylin-eozin (za pomoci Mayerova hematoxylinu) a odvodnění. Následně byly preparáty zamontovány do kanadského balzámu a prohlíženy mikroskopem. Preparáty byly prohlíženy mikroskopem Olympus BX51 a Olympus CX 21 s použitím objektivu 20x a 40x.

Trichodiny a endohelminți byli kvantifikováni a počty zaznamenány do tabulek společně s parametry chycených ryb a vypočítanými kondičními koeficienty. Ke stanovení kondice hostitelů byly použity kondiční koeficienty GSI (gonadosomatický index), LSI (hepatosomatický index) a KK (koeficient kondice).

Před vlastním statistickým zpracováním byla data transformována dvěma způsoby tak, aby byly splněny podmínky pro lineární regresní metody, kterými jsou normální rozložení, linearita hodnot a homogenita rozptylu. Pro indexy kondice byla využita arcsinová-odmocninová transformace a pro početnosti parazitů a velikostní údaje logaritmická transformace.

Pro zjištění korelace mezi množstvím jednotlivých parazitů, druhové příslušnosti a pohlaví ryb byla provedena analýza hlavních komponent (PCA) v programu Canoco for Windows. Jejím výstupem byl podíl vysvětlené variability na osách ordinačního grafu, který byl následně vytvořen v programu CanoDraw for Windows. Z ordinačního diagramu byla zřejmá pozitivní korelace mezi všemi kategoriemi parazitů. Mezi tasemnicemi, motolicemi a hlísticemi byla korelace nejtěsnější. Trichodiny byly od endohelminťů značně odchýleny, avšak byla zde patrná pozitivní korelace s hlísticemi. Naproti tomu motolice a tasemnice s trichodinami téměř nekorelovaly. První osa, na kterou měly největší vliv trichodiny a druhová příslušnost vysvětlila 52 % variability, druhá pak 20 %. U samic se vyskytovalo více motolic a tasemnic. Větší prevalence parazitů byla zjištěna u druhu *Myoxocephalus scorpius*.

Druhé statistické testování bylo provedeno ve statistickém programu R, kde se testovaly závislosti indexů kondice na množství parazitů společně s druhovou příslušností a pohlavím ryb. Z výsledků vyplynulo, že přítomnost parazitů neměla na kondici ryb zjevný negativní vliv, naopak kondiční koeficienty se zvyšovaly s narůstajícím počtem parazitů. Je pravděpodobné, že použité indexy nebyly zcela ideálními ukazateli kondice, neboť se v nich odráží především velikost (a přeneseně tím i stáří) ryby. To bylo potvrzeno zjištěnou pozitivní korelací mezi velikostí ryb (respektive celkovou váhou) a intenzitou parazitace. Rozdílné výsledky vyšly u koeficientu kondice (KK), který ukázal trend k negativní závislosti s trichodinami a endohelminťy. Tento trend však nebyl statisticky průkazný.

Klíčová slova: *Myoxocephalus scorpius*, *Gymnocanthus tricuspis*, *Trichodina* spp., endohelmini, gonadosomatický index, hepatosomatický index, koeficient kondice.

Abstract

The main goal of this work was the study of parasitism of a shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) and an arctic staghorn sculpin (*Gymnocanthus tricuspis*) parasitized by ciliates *Trichodina* spp. Studied samples of gill originated from fish caught in 2011 and 2012 in the central part of Svalbard mainly in the bay of Petuniabukta. In the same fish, from which samples of gill were taken, parasitic endohelminths were also identified. Histological and microscopic methods were used for quantification of the ciliates and their prevalence in the samples from individual fish was compared with number of identified helminths and with the physical condition of the host fish.

One of the main aims of this work was to confirm or exclude the hypothesis that the number of the parasitic ciliates *Trichodina* spp. correlates with the intensity of infection with endohelminths and that in general a higher level of parasitism is also reflected by a lower physical condition of fish. Another aim of the work was to improve the theoretical knowledge and the practical skills in histological methods, which included fixation, embedding, cutting and staining of tissues, and to learn the methods of microscopic diagnostics.

For the histological assessment, samples of gills from a shorthorn sculpin were used. These fish were caught using a benthic gill net or during diving and then their length, total weight, weight of gonads and weight of liver were sequentially measured. The gill samples taken during pathological dissection of fish were carefully fixed for subsequent histological examination and labelled. During dissection the parasitic endohelminths were also identified and counted. The tapeworm *Diplocotyle olrikii* (Cestoda: Spathebothriidea), plerocercoids *Tetraphyllidae* gen. sp., a intestinal fluke *Podocotyle atomon* (Digenea: Opecoelidae) and anisakid larvae (Nematoda: Anisakidae) were among the identified parasites.

Histological dissections were made from each gill and these were dehydrated using graded ethanol series, cleared in xylene, and embedded in a paraffin. Sectioning of the paraffin tissue blocks was performed using a rotating microtome. Histological sections

were placed on the microscope slide, dried, deparaffinized, stained with hematoxylin-eosin method (using Mayer's hematoxylin) and dehydrated. Subsequently, the sections were mounted in Canadian balsam and microscopically examined. The sections were examined by the microscopes Olympus BX51 and Olympus CX 21 with objectives 20 x and 40 x.

Trichodines and endohelminths were quantified and their numbers recorded together with parameters of the host fish and their calculated condition factors. The fish condition was estimated using condition factors GSI (gonadosomatic index), LSI (hepatosomatic index) and KK (condition coefficient).

Before the statistical processing, data were transformed in two ways to fulfil conditions for linear regression methods like normal distribution, linearity of values and homogeneity of variance. An arcsine transformation was used for condition factors and a logarithmic transformation for parasites abundance and body size data.

To determine the correlation between the number of the individual parasites, species identity and sex of fish, an analysis of main components (PCA) in program Canoco for Windows was performed. The output of this analysis was proportion of the explained variability and was expressed on axes of the ordination graph created in program CanoDraw. The ordination diagram showed the positive correlation between all categories of parasites with the strongest correlation between tapeworms, flukes and nematodes. Trichodines exhibited a weak positive correlation with nematodes correlation while there was almost no correlation with flukes and tapeworms. The first axis strongly influenced by trichodines and species identity explained about 52 % of the variability, the second axis about 20 %. Females contained more flukes and tapeworms than males. Parasite prevalence was higher for *Myoxocephalus scorpius*.

The second statistical testing was performed by the statistical program R. Using this program condition indexes dependence on the number of parasites, species identity and sex of fish was assessed. The results did not show the negative effect of parasites on the condition of the fish, on the contrary the condition indexes of fish were increasing with increasing number of parasites. It is likely that the used indexes might not be ideal indicators of condition because they reflect mainly the size (and thus age) of fish.

This was confirmed by the positive correlation between the size of fish (and also their total weight) and the intensity of parasitism. Different results were obtained using the condition coefficient (KK), which showed a trend towards a negative dependence on trichodina and endohelminth numbers. However, this trend was not statistically significant.

Key words: *Myoxocephalus scorpius*, *Gymnocanthus tricuspis*, *Trichodina* spp., endohelminths, gonadosomatic index, hepatosomatic index, coefficient condition.

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích dne 11. 8. 2014

.....

Klára Komendová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce doc. RNDr. Olegu Ditrichovi. CSc. za odborné vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Tomáši Tymlovi za trpělivost a cenné rady. Velký dík patří paní laborantce Máše Fučíkové, za pomoc při zpracování vzorků a Mgr. Petru Blabolilovi za odbornou pomoc při statistickém vyhodnocování výsledků.

Obsah

1. Úvod	14
2. Současný stav znalostí	15
2.1. Parazité a parazitismus	15
2.1.1. Nálevníci (Ciliophora)	16
2.1.1.1. Morfologie a diverzita nálevníků	16
2.1.1.2. Klasifikace nálevníků	17
2.1.1.3. Čeleď Trichodinidae	18
2.1.1.3.1. Rod <i>Trichodina</i>	18
2.1.1.3.1.1 <i>Trichodina jadratica</i>	20
2.1.1.3.1.2 <i>Trichodina murmanica</i>	20
2.1.1.3.1.3 <i>Trichodina pediculus</i>	20
2.1.1.3.1.4 <i>Trichodina rectuncinata</i>	20
2.1.1.3.1.5 <i>Trichodina reticulata</i>	21
2.1.1.3.1.6 <i>Trichodina truttae</i>	21
2.1.2. Helmiti	21
2.1.2.1. Kmen Cestoda (tasemnice)	22
2.1.2.1.1. Životní cyklus tasemnic	23
2.1.2.1.2. Patobiologie	23
2.1.2.2. Kmen Trematoda (motolice)	23
2.1.2.2.1. Životní cyklus	24
2.1.2.2.2. Patobiologie	25
2.1.2.3. Kmen Nematoda (hlístice)	25
2.1.2.3.1. Životní cyklus	25
2.1.2.3.2. Patobiologie	26
2.2. Rybí hostitelé parazitů	26
2.2.1. <i>Myoxocephalus scorpius</i>	26

2.2.2 <i>Gymnocanthus tricuspis</i>	27
2.3. Parametry k určení kondice ryb	28
2.3.1. Gonadosomatický index (GSI)	28
2.3.2. Hepatosomatický index (LSI).....	28
2.3.3 Koeficient kondice (KK)	29
2.4. Histologické metody využívané při studiu parazitů.....	29
2.4.1. Fixace	29
2.4.2 Odvodnění a prosycení tkáně	30
2.4.3 Zalévání	30
2.4.4. Krájení	31
2.4.5 Barvení	31
3. Cíl práce a hypotézy	33
3.1 Cíl práce	33
3.2 Hypotézy	33
4. Materiál a metodika.....	34
4.1 Charakteristika zkoumaného materiálu	34
4.2 Odběr a fixace materiálu v terénu	34
4.3 Laboratorní metody	35
4.3.1 Příprava bločků.....	35
4.3.2 Krájení tkáňových bločků.....	36
4.3.3 Barvení a diagnostika preparátů	37
4.4 Statistické vyhodnocení	38
5. Výsledky.....	40
5.1 Laboratorní vyhodnocení výsledků.....	40
5.2 Statistické vyhodnocení výsledků	45
5.2.1 Vyhodnocení korelace mezi parazity	45
5.2.2 Vyhodnocení závislosti kondičních koeficientů na intenzitě parazitace pomocí mnohonásobné lineární regrese	46
5.2.2.1 GSI (Gonadosomatický index).....	46
5.2.2.2 LSI (Hepatosomatický index).....	47

5.2.2.3 KK (Koeficient kondice)	48
5.2.2.4. Velikost ryby	49
5.2.2.5 Celková hmotnost.....	50
6. Diskuse	51
7. Závěr	55
8. Přehled použité literatury	56
9. Přílohy	64

Seznam zkratek

M. s. *Myoxocephalus scorpius*

G. t. *Gymnocanthus tricuspis*

GSI gonadosomatický index

LSI hepatosomatický index

KK koeficient kondice

F female

M male

1. Úvod

Ve vodním prostředí existuje celá řada organismů, které jsou závislé na soužití s rybami. V případě komenzálů toto soužití není pro ryby škodlivé, naproti tomu však působení parazitických organismů ryby může vážně ohrozit. Ve většině případů není malé množství parazitů pro rybu škodlivé, ale pokud jsou ryby ve stresu a je zhoršená kvalita vody, může se parazit přemnožit a způsobit rybám vážné zdravotní problémy. Silně napadené ryby špatně přijímají potravu a ztrácejí kondici a oslabené ryby se tím také stávají citlivějšími k oportunním bakteriálním patogenům ve vodě (Imai et al. 2000).

K nejrozšířenějším rybím symbiontům patří nálevníci a počet jejich známých druhů, u kterých bylo prokázáno, že u ryb způsobují choroby a úhyn, neustále roste (Basson and Van As 2006). Problémem je, že vztah nálevníků k jejich hostitelům je založen na mnohých spekulacích. I neškodný nálevník nalézáný na rybách v masivním množství je často automaticky považován za patogena, ačkoliv je ve skutečnosti jen málo virulentní (Lom a Dyková 1992). V této souvislosti byla vyhodnocena intenzita parazitace nálevníkem rodu *Trichodina*, vyskytujícím se především na žábách mořských ryb, v našem případě u dvou druhů mořských vranek, a dále byla určena intenzita parazitace endohelminty, nalezenými uvnitř těla ryb, především v gastrointestinálním traktu.

Parazitace ryb je nejčastěji vyhodnocována zkoumáním rybích žaber, ploutví, kůže, orgánů či tkání, a to pomocí mikroskopu (světelná mikroskopie, rastrovacího elektronová mikroskopie), klasickými histologickými metodami nebo pomocí molekulárních technik. Přes veškerý pokrok v těchto metodikách však zůstává mikroskopické vyšetření nejlepší dostupnou technikou pro detekci rybích parazitů a tato technika byla také použita v této práci. Popis použitých mikroskopických technik je proto hlavním obsahem metodické části práce, zatímco ostatní metody jsou obsahem části teoretické spolu s informacemi o zkoumaných parazitech, jejich hostitelích a o parametrech pro výpočet kondice ryb.

2. Současný stav znalostí

2.1. Parazité a parazitismus

Parazitismem se rozumí soužití dvou organismů a to parazita a hostitele. Parazit potřebuje k přežití hostitele, ze kterého čerpá živiny a ve většině případů mu škodí (Rohde 2005).

Existují také paraziti (kastrátoři), kteří hostitele nezabijí, ale znemožňují mu množení a snižují jeho kondici. Mezi parazity se v současnosti řadí organismy na všech úrovních, od virů přes bakterie, jednobuněčná eukaryota až po mnohobuněčné organismy. Avšak parazitologie jako taková, se zabývá především eukaryotickými parazity, členovci či červy (Volf, Horák a kol. 2007).

Parazity lze rozdělit do řady kategorií podle nejrůznějších kritérií. Z hlediska životních cyklů dělíme parazity na monoxenní (jednohostitelské) a heteroxenní (vícehostitelské). U heteroxenních parazitů dále rozlišujeme mezihostitele (neprobíhá v nich vlastní sexuální množení, pouze asexuální) a definitivní hostitele (Volf, Horák a kol. 2007).

Z hlediska umístění parazita na hostiteli rozlišujeme endoparazity žijící uvnitř hostitele (tasemnice) a ektoparazity osidlující povrch těla hostitele. Endoparaziti pak mohou být intracelulární (uvnitř buněk) nebo extracelulární (mezi buňkami nebo uvnitř tělních dutin). Existují také obligátní paraziti, kteří bez svého hostitele nejsou schopni života (někteří nálevníci) a fakultativní paraziti, kteří obvykle žijí volně, ale ke svému životu mohou využívat i hostitele (Kořínková 2006).

Můžeme se také setkat s pojmy hyperparazitismus (parazit parazita), larvální parazit (parazitující během jejich larválního vývoje), dočasní a permanentní paraziti, mikroparaziti a makroparaziti. Mezi mikroparazity patří především protista a někteří helminti. Jsou to malé organismy, které se v těle hostitele rychle množí. Infekce může končit smrtí či uzdravením hostitele se vznikem imunity proti opakované infekci.

Oproti tomu makroparaziti (členovci a většina helmintů) se v těle hostitele nemnoží, ale vytvářejí infekční stádia, která se přenášejí na jiné hostitele (Rohde 2005).

Ve vodním prostředí jsou nejvýznamnějšími parazity, které mohou významně ovlivňovat zdraví i kondici ryb včetně těch hospodářsky významných, nálevníci a helminti. Těmto dvěma skupinám byla v dalším textu věnována největší pozornost a to se zvláštním důrazem na zástupce nálevníků čeledi Trichonidae.

2.1.1. Nálevníci (Ciliophora)

Nálevníci (Ciliophora) jsou velice početnou skupinou, patřící do říše Chromalveolata, která skýtá více než osm tisíc druhů (Adl et al. 2012). Jejich velikost se pohybuje v rozsahu od deseti mikrometrů až do čtyř a půl milimetrů.

Žijí v různých symbiotických vztazích s vodními živočichy. Jen těžko lze najít vodního živočicha, který by nebyl osidlován těmito parazity. Mohou působit jako vážný patogen, ale ve většině případů se jedná o komensalismus. Existují i volně žijící druhy, chovající se převážně jako fakultativní paraziti (*Paramoeba*, *Naegleria*). Nálevníci, kteří se chovají jako obligátní parazité a přežívají na úkor hostitele, mohou snižovat jeho životaschopnost nebo mohou dokonce snižovat i jeho populaci (kožovec rybí). K nejvíce infikovaným rybám patří ryby chované člověkem pro komerční použití (Rohde 2005).

2.1.1.1. Morfologie a diverzita nálevníků

Ciliophora mají složitý povrch buňky zvaný kortex, který se skládá z pelikuly a infraciliatury (u některých druhů může chybět). Infraciliatura je fibrilární a mikrotubulární struktura, tvořená bazálními tělisky řasinek. Od každého těliska směřuje dopředu žíhaná kinetodesmální fibrila. Pelikula se skládá z buněčné membrány a kortikálních alveolů, které jsou synapomorfii skupiny Alveolata (Adl et al. 2012)

Nálevníci jsou charakterističtí také přítomností cilií (brv), které pokrývají pelikulu. Cilie jsou uspořádány do podélných řad, které se nazývají kinety a vytvářejí různé struktury vyskytující se především kolem ústního otvoru. Mezi tyto struktury řadíme prstovitý útvar (cirrus) vzniklý adharencí trsu řasinek, dále undulující membránu vniklou adharencí řasinek jedné kinety nebo ploténky z těsně nahloučených cilií tzv. membranely. Tyto membranely vytváří část ústního aparátu. U nálevníků jsou vyvinuta

buněčná ústa (cytostom), která přecházejí v cytofarynx, ve kterém se při pozření potravy tvoří potravní vakuoly. Zbytky potravy odcházejí buněčnou řítí tzv. cytopyge (Volf a Horák a kol. 2007, Lynn 2003).

Většina nálevníků se živí pohlcováním částic (fagotrofové). Někteří zástupci tuto schopnost nemají a přijímají potravu kombinací pinocytózy a osmózy.

Typickým znakem nálevníků je přítomnost dvou funkčně a morfologicky rozdílných typů jader (jaderný dualismus) a také sexuální dělení zvané konjugace, při kterém dochází ke spojení dvou stejných buněk, které si navzájem vymění dvě haploidní jádra.

Nálevníky parazitující na rybách můžeme dělit na ektokomezály (*Apiosoma* spp.), obligátní parazity (*Ichthyophthirius multifiliis*) a existují také paraziti, kteří své chování střídají (*Trichodina* spp.) (Lom a Dyková 1992).

Zajímavým a velmi významným nálevníkem z hlediska životního cyklu je kožovec rybí (*Ichthyophthirius multifiliis*). Tento parazit se vyskytuje u sladkovodních ryb a působí jim závažná onemocnění. Jeho životní cyklus je polymorfní, což znamená, že má několik stádií. Parazitické stádium tzv. trofont napadá žábra a kožní epitelové buňky (napadené ryby mají krupicovitou kůži). Dospělí trofonti opouštějí rybu a začínají se dělit. Tito trofonti obalení cystou se poté rozpadnou a z nich vznikají tominti, kteří když se uvolní z cyst, se stanou teronty a napadají tkáň hostitelů. Tento cyklus se stále opakuje (Lom 2005, Volf a Horák 2007).

2.1.1.2. Klasifikace nálevníků

Současná klasifikace je založena na stavbě somatické infraciliatury, která je viditelná v elektronovém mikroskopu. Zařazení nálevníků do tříd, je tedy poměrně náročné. Tento kmen se dělí na dva podkmeny: Postciliodesmatophora a Intramacronucleata. Podkmen Intramacronucleata doposud zahrnuje devět tříd a devatenáct podtříd. Ve vodním prostředí jsou nerozšířenější symbionti třídy Phyllopharyngea a Oligohymenophorea. Do třídy Oligohymenophorea řadíme podtřídy Scuticociliata (*Mesanothryx*), Apostomatia (*Ascophryx*, *Vampyrophrya*) a Peritrichia (*Trichodina*); (Lynn 2003).

2.1.1.3. Čeleď *Trichodinidae*

Čeleď *Trichodinidae* tvoří více než 200 druhů zahrnutých v 10 rodech. Řadíme sem kromě rodu *Trichodina*, také například rody *Trichodinella*, *Tripartiella*, *Paratrachodina*, *Hemitrichodina*, *Dipartiella*, *Vauchomia* a další (Yemmen et al. 2010).

Tyto obrvené organismy mají v průměru od 50 do 100 mikrometrů. Za normálních podmínek jsou považovány za ektokomenzální (i endokomenzální) symbionty ryb, obojživelníků a bezobratlých (Mitchell 2007).

Charakteristickým znakem je jejich kónický válcovitý tvar těla a na aborální straně umístěný vysoce vyvinutý bazální adhezivní disk. Všechny druhy *Trichodinidae* mají adhezivní disk složený z velice složitých struktur. Jeho součástí je prstenec, kterým nasedají na hostitele (Basson and Van As 2006).

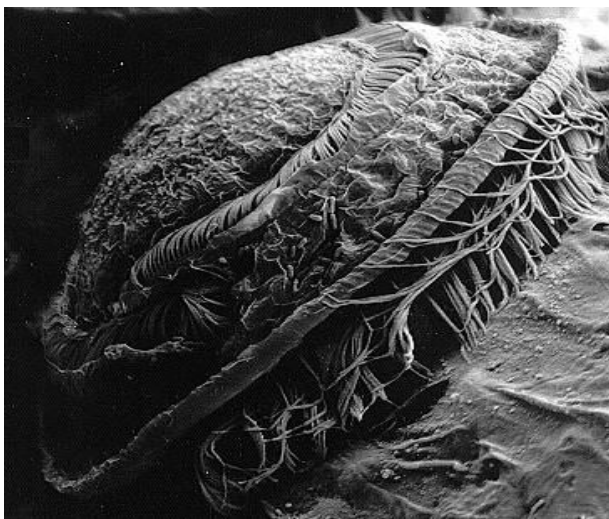
Tento prstenec je složen z různého množství propojených jednotek, obecně označovaných jako zoubky, které jsou velice pevné a skládají se ze tří různých oblastí: distální čepele, centrální části a proximálního paprsku. Při nasednutí na hostitele jsou, jeho epiteliální buňky vtažené do adhezivního disku, který je narušuje (Roberts et al. 2009). Adhezivní disk ovšem nehraje žádnou roli při příjmu potravy. Cytostom, kterým potravu přijímají, je umístěný na opačné straně na tzv. adorální straně (Basson and Van As 2006). Částičky potravy jsou přiváděny otáčivou spirálou složenou z cílů dále do cytostomu a poté do cytopharynxu (Kruger et al. 1995).

2.1.1.3.1. Rod *Trichodina*

Rod *Trichodina* patří k nejhojnějším skupinám symbiontů ve vodním prostředí a mnoho druhů je doposud neznámo. Jejich typickým znakem jsou zoubky skládající se z dobře vyvinutých čepelí, paprsků a centrálních částí. Čepele jsou ploché, rovné nebo a někdy i polokruhové. Paprsky jsou buď ve tvaru ostnu, nebo jehly a mají různou délku.

Adorální spirála je různě dlouhá, obvykle má 360° (v některých případech i 330°) nebo 540°. Zástupce toho rodu lze nalézt na všech kontinentech včetně Antarktidy. *Trichodina* spp. kolonizuje kůži, žábra, gastrointestinální trakt a dokonce i urogenitální trakt (Pessier 2009). Přenos probíhá v zásadě dvěma způsoby. Buď to přímým

kontaktem s infikovaným zvířetem, nebo nepřímým způsobem například kontaminovanou vodou (Kent and Fournie 2007). V akváriích může být ryba nakažena například infikovanými rostlinami nebo při přenosu kapiček aerosolu mezi akvárii (Rohde 2005). Nákaza trichodinami roste v souvislosti s množstvím organického materiálu, který ryby pozřou (Roberts et al. 2009). Způsob přenosu ektoparasitických trichodin močového traktu je neznámý. Tyto druhy můžeme najít v úzkých lumen močového měchýře až u sběrných kanálek ledvin, kde mohou způsobovat olupování epitelu. Předpokládá se, že jsou vylučovány močí a poté se dostávají do močového měchýře jiných ryb. Tyto druhy zpravidla vykazují větší hostitelskou specifitu než většina ektoparasitických forem. Mají četné zoubky, které jsou umístěny blízko sebe a mají úzké čepele (Basson and Van As 2006).



**Obr 1. *Trichodina* spp. zobrazená pomocí SEM
(Zdroj:<http://en.wikipedia.org/wiki/Trichodina>)**

Trichodiny se stávají patogenními v případě, že se pomnoží, což je patrné na kůži a žábrách a obvykle to ukazuje na špatnou kvalitu vody či výživy a na další nepříznivé procesy, které ryby oslabují (Kent and Fournie 2007, Mitchell 2007, Roberts et al. 2009). Jelikož jsou některé trichodiny spojovány s úhynem volně žijících i chovných ryb, jsou již delší dobu předmětem intenzivního zkoumání a v následujícím

textu jsou uvedeny informace o některých zástupcích rodu, vyskytujících se především u mořských ryb.

2.1.1.3.1.1 *Trichodina jadratica*

Trichodina jadratica se běžně vyskytuje na žábrách mořských ryb a zároveň je považován za patogen u úhořů. Patří k menším zástupcům rodu, její adhezivní disk měří od 18 do 35 mikrometrů a zoubkovitý prstenec obsahuje asi 15 až 27 zoubků (Basson and Van As 2006).

2.1.1.3.1.2 *Trichodina murmanica*

Trichodina murmanica je mořský druh s jasným středem v adhezivním disku. Běžně se nachází v Severním Atlantiku, Beringově moři a dalších severských mořích, kde především kolonizuje kůži tresky obecné (*Gadus morhua*) a dalších mořských ryb. Adhezivní disk měří od 40 do 70 mikrometrů a prstenec od 41 do 55 mikrometrů s 25 až 31 zoubky (Basson and Van As 2006).

2.1.1.3.1.3 *Trichodina pediculus*

Trichodina pediculus se vyskytuje nejhojněji na kůži dospělých jedinců a rybiho potěru z oblasti Eurasie a Ameriky. Typickým znakem je diskovitý tvar nebo tvar přesýpacích hodin z bočního pohledu a extrémně dlouhý jehlicovitě-ostrý paprsek. Adhezivní disk má od 46 do 68 mikrometrů a prstenec je velký od 28 do 38 mikrometrů. Počet zoubků se pohybuje mezi 20 až 32 (Hoffman and Lom 1967).

2.1.1.3.1.4 *Trichodina rectuncinata*

Trichodina rectuncinata se vyskytuje na žábrách mořských ryb z čeledi Blenniidae (Slizounovití), Gobiidae (Hlaváčovití) či Syngnathiidae (Jehlovití); (Basson and Van As 2006).

2.1.1.3.1.5 *Trichodina reticulata*

Trichodina reticulata nejvíce osidluje karase obecného a karase stříbřitého, vyskytujícího se v oblasti Euroasie, Severní Ameriky a Filipín. Střed adhezivního disku obsahuje struktury podobné buňkám. Průměr adhezivního disku se pohybuje mezi 31 a 57 mikrometry a prstenec má průměr 20 až 36 mikrometrů. Počet zoubků se pohybuje kolem 21 až 34. Je to parazit, který u těchto druhů ryb způsobuje smrt (Basson and Van As 2006).

2.1.1.3.1.6 *Trichodina truttae*

Trichodina truttae je jedním z největších zástupců tohoto rodu a také jedním z dobře známých patogenů napadajících lososovité ryby (obvykle kůži a zřídka žábry). Vyskytují se v oblasti Jižní Ameriky. Velikost adhezivního disku je 76 až 137 mikrometrů a velikost zoubkovitého prstence je 45 až 72 mikrometrů. Jejich morfologie byla detailně studována pomocí skenovací elektronové mikroskopie (Arthur 1984).

2.1.2 Helminti

Helminti jsou velice různorodá skupina. Mezi helminty jsou zahrnováni zástupci neodermatních platyhelmintů (Trematoda, Cestoda, Monogenea), hlístice (Nematoda) a vrtejši (Acanthocephala). Dále bychom do této skupiny mohli zařadit parazitické ploštěnky (Turbellaria), vířníky (Rotifera), strunovce (Nematomorpha) a další. Z hlediska ontogenetického vývoje jsou helminti velice různorodou skupinou. Kromě vajíček a dospělých jedinců mohou mít i velký počet morfologicky odlišných larválních stádií, která mohou během vývoje využívat několik hostitelů. Můžeme se u nich setkat s přímým cyklem s jediným definitivním hostitelem nebo s dvouhostitelským, tříhostitelským a dokonce i čtyřhostitelským cyklem. Do těchto cyklů tak mohou být zapojeni 1-3 mezihostitelé. Pojem definitivní hostitel znamená organismus, ve kterém dochází k pohlavnímu dospívání a sexuální reprodukci. V mezihostiteli dochází k larválnímu vývoji jedince. Helminti také mohou využívat pro přenos tzv. transportní (paratenické) hostitele, ve kterých se hromadí infekční larvální stadia, ale dále se nevyvíjejí (Volf, Horák a kol. 2007).

2.1.2.1. Kmen Cestoda (tasemnice)

Je známo asi 5000 druhů tasemnic, které parazitují u všech skupin obratlovců, ale nejvyšší počet zástupců řádu tasemnic se nachází u ryb a paryb. V mořském prostředí se vyskytuje více než 1400 druhů. Jedná se většinou o parazity, kteří mají vícehostitelský životní cyklus. Dospělé tasemnice obývají trávicí trakt nebo příležitostně i přidružené orgány obratlovců. Z morfologického hlediska je pro tasemnice typická přední hlavička (skolex) s přichycovacími orgány. Těmito orgány mohou být kruhové přísavky nebo přísavné rýhy (botridie) a u každého řádu je odlišná. Páskovité tělo (strobila) je tvořeno z řady jednotlivých, lineárních článků (proglotid), které obsahují pohlavních orgány (Rohde 2005). Cestoda postrádají trávicí ústrojí a tak absorbují živiny pomocí specializované vnější vrstvy těla tzv. neodermis. Tvoří ji povrchové společenstvo buněk, tzv. syncytium s buněčnými těly zanořenými pod vrstvou svaloviny. Povrch neodermis je pokryt velkým počtem jemných chloupků, tzv. mikrotrichů.

Tasemnice jsou až na výjimky hermafroditi, protože každý článek těla obsahuje jednu i dvě sady samičích a samčích pohlavních orgánů (Rohde 2005). Složité vývojové cykly tasemnic ukazují na jejich velký reprodukční potenciál doprovázený rozsáhlou produkcí vajíček (Caira and Littlewood 2001).

Tasemnice se většinou dělí na dvě skupiny: Cestodaria, které jsou nečlámkované a jsou považovány za předchůdce „pravých tasemnic“, a Eucestoda („pravé tasemnice“), které zahrnují zástupce s člámkovaným tělem (Khalil et al. 1994). Výjimkou jsou pouze řády Caryophyllidea a Spathebothriidea, u kterých články chybí.

U studovaných mořských vranek *M. s. a G. t.* byly nalezeny tasemnice *Diplocotyle olrikii* z řádu Spathebothriidea. Tělo těchto tasemnic je polyzoické, ale strobila není rozdělena proglotidami. Dospělec je většinou malý, délka se pohybuje mezi 10 a 40 mm. Strobila je dlouhá 7-170 mm s maximální šířkou 0,5-3,2 mm, její hlavička je dlouhá 0,4-1,5 mm a široká 0,5-1,4 mm. Vyskytují se v tenkém střevě mořských stěhovavých ryb čeledi Salmonidae, Anarrhichadidae, Cottidae a Pleuronectidae a to především v oblasti Grónska, Severní Ameriky a Evropy (Island, Anglie, Německo, Norsko, Špicberky, Rusko a Barentsovo moře); (Moravec 2004).

2.1.2.1.1. Životní cyklus tasemnic

Všechny tasemnice (kromě *Archigetes* a *Hymenolepis nana*) mají nepřímé vývojové cykly, ve kterých dochází ke střídání hostitelů (Khalil et al. 1994). Na rybí mezihostitele jsou vázány řády Spatheobothridea, Tetraphyllidea a Trypanorhyncha. Dospělec produkuje vajíčka, která se dostávají do vnějšího prostředí, zde dochází k tvorbě první larvy (koracidium) a ta se uvolní do vodního prostředí, kde je pozřena prvním mezihostitelem. V mezihostiteli vzniká procerkoid, který je infekční pro druhého mezihostitele (rybu). Po pozření infikovaného prvního mezihostitele se procerkoid uvolňuje a mění se na plerocerkoid a ten se usazuje v tělní svalovině. Definitivní hostitel se nakazí pozřením mezihostitele nebo paratenického (transportního) hostitele a dochází zde k dokončení vývojového cyklu a tasemnice pohlavně dospívá (Horák a Scholz 1998).

Tasemnice *Diplocotyle olrikii* má dvouhostitelský životní cyklus, jejímž mezihostitelem je korýš ze skupiny Amphipoda a definitivním hostitelem je ryba (Moravec 2004).

2.1.2.1.2. Patobiologie

Účinky dospělých tasemnic na hostitele mohou být od zanedbatelných až po fatální (úhyn). Patogeneze souvisí s morfologií skolexu a velikostí a počtem přítomných červů. Skolex může způsobit změny sliznice, například hyperplasii, metaplazii, ztrátu epitelu, fibrózu, nekrózu a také hemoragii (Williams and Jones 1994). Infekční larvy mohou u jedince způsobit ztrátu hmotnosti, snížení průchodnosti střev, anemii, stres, snížení reprodukce a další problémy (Cake 1978).

2.1.2.2. Kmen Trematoda (motolice)

Tato třída zahrnuje asi 8000 známých většinou endoparazitických platyhelmtů, kteří mají nepřímé životní cykly, zahrnující 1-3 mezihostitele. Mohou parazitovat prakticky ve všech orgánových soustavách a zejména v trávicím traktu, ale i v krevním řečišti, dýchacích cestách a nervové soustavě (Olson et al. 2003).

Tělo motolic má většinou dorzoventrálně zploštělý oválný tvar, alespoň s jednou ústní přísavkou a často i s druhou břišní přísavkou tzv. acetabulem. U některých druhů jsou přísavky nahrazeny jinými strukturami. Motolice jsou stejně jako tasemnice, (s výjimkou Schistosomatidae a některých Didymozoidae) hermafroditi (Volf, Horák a kol. 2007).

Převládajícími čeleděmi infikujícími mořské ryby jsou Acanthocolpidae, Bucephalidae, Cryptogonimidae, Derogenidae, Didymozoidae, Fellodistomidae, Hemiuridae, Lecithasteridae, Lepocrediidae a Opecoelidae (Rohde 2005).

Studované vranky byly parazitovány motolicemi *Podocotyle atomon* z čeledi Opecoelidae. Tyto motolice dosahují délky 0,25 – 0,3 mm a kolonizují tenké střevo ryb (Prokofiev 2001).

2.1.2.2.1. Životní cyklus

Motolice mají komplexní životní cyklus zahrnující několik larválních stádií, které se množí v mezihostiteli (Cribb et al. 2003).

Definitivního hostitele opouští vajíčko nakladené dospělou motolicí (Volf, Horák a kol. 2007). Ve vajíčku vzniká larva (miracidium), která se buď uvolní a pronikne do prvního mezihostitele (měkkýše) nebo zůstane ve vajíčku a mezihostitel ji pozře. Zde probíhá nepohlavní rozmnožování larev (sporocysta, redie) a to je ukončeno tvorbou cercarií. U některých skupin motolic mohou napadat cercarie přímo další obratlovce a u jiných motolic dochází k přeměně cercarií na klidové stádium metacerkarii a ta je následně pozřena definitivním hostitelem. Velmi často se tohoto procesu zúčastňuje i druhý mezihostitel (bezobratlý nebo obratlovec), kterého cercarie napadá a v jeho tkáních vytváří metacerkarie čekající na predátora (Horák 2010).

U motolice *Podocotyle atomon* (čeleď Opecoelidae) je prvním mezihostitelem plž z čeledi Buccinidae, druhým mezihostitelem je korýš ze skupiny Amphipoda a definitivními hostiteli jsou ryby (Prokofiev 2001).

2.1.2.2. Patobiologie

Motolice se živí hlenem v trávicím traktu, epiteliálními buňkami a někdy také krví. Krevní motolice se vyskytují v cévách ryb, kde narušují průtok krve a poškozují cévní stěnu. Zvláště problematická jsou vajíčka, která procházejí hostitelskou tkání a způsobují tak záněty například jater či mozku. Uvolňovány do vnějšího prostředí jsou narušením žaberní tkáně, čímž způsobují svým hostitelům značné problémy (Rohde 2005).

2.1.2.3. Kmen Nematoda (hlístice)

Nematoda jsou jednou z nejrozsáhlejších a nejrozšířenějších skupin helmintů, která zahrnuje více než 40 000 druhů zařazených do 256 čeledí (Anderson 2000). Většina hlístic se je volně žijících a zbývající druhy parazitují na rostlinách a živočiších. Hlístice mají bilaterálně symetrické, válcovité či vřetenovité tělo. Jejich velikost je různá. Nejmenší nematoda mohou být menší než jeden milimetr a největší mohou dosahovat v dospělosti až několik metrů (Roberts and Janovy 2005). Typický je pro ně sexuální dimorfismus a vysoká produkce vajíček, které jsou díky kutikulárnímu obalu velmi odolné proti nepříznivým podmínkám (Rohde 2005).

U studovaných mořských vranek byly nalezeny larvy hlístic čeledi Anisakidae, především rod *Anisakis*. Tento rod obsahuje pouze tři druhové zástupce a to *Anisakis simplex*, *Anisakis typica* a *Anisakis physeteris*. Dospělci parazitují v trávicím traktu (žaludku, tenké střevo) mnoha druhů mořských savců. Mořské ryby (především mořské migrující ryby) jsou napadány pouze larvami těchto parazitů. V evropských mořích se nejvíce vyskytuje *Anisakis simplex*. Tělo tohoto parazita může měřit až 36 mm a pokožka je příčně pruhovaná. Larvy osidlují břišní dutinu a svalovinu, kde jsou obvykle opouzdřené a svinuté do spirály (Moravec 2004).

2.1.2.3.1. Životní cyklus

Nematoda jsou většinou heteroxenní (někteří jedinci jsou monoxenní), se stádií, které migrují tkáněmi hostitele. Produkují značné množství vajíček, která jsou velmi odolná. Z nich se líhnou juvenilní formy, které se několikrát svlékají a dospívají. Jejich

heteroxenní cyklus zahrnuje ryby jako mezihostitele či paratenické hostitele (Couture et al. 2003). Mezihostitel podporuje larvální růst a vývoj do stádia, kdy je hlístice schopna infikovat své definitivní hostitele (Rohde 2005).

Výše zmíněné druhy rodu *Anisakis* mají velmi komplexní životní cyklus. Jejich prvním mezihostitelem je buchanka, druhým pak menší druhy ryb, po jejichž predaci většími rybami přecházejí do nich a definitivním hostitelem jsou mořští savci (kytovci, tuleni)(Woo 2012).

2.1.2.3.2. Patobiologie

Nematoda mohou působit na hostitele benigně, avšak některé druhy mohou být vysoce patogenní například *Capillaria* spp. může u ryb způsobit ztrátu chuti k jídlu, vyhublost, anémii a dokonce i smrt (Kappel et al. 2003).

2.2. Rybí hostitelé parazitů

Tato část obsahuje zmínky o dvou druzích mořských vranek, které byly několikrát využity pro studium parazitace (Kuklin 2012, Khan 2011), a které byly také předmětem této studie.

2.2.1. *Myoxocephalus scorpius*

Myoxocephalus scorpius neboli vranka mořská je mořská ryba patřící do čeledi Cottidae. Její celková délka je obvykle 15-30cm. Nejčastěji se vyskytuje v oblasti Atlantiku. Charakteristické je její protáhlé tělo a velká hlava, která je pokryta velkými i malými trny, které však nemají jedové žlázy. Ústa jsou umístěna dole a jsou téměř vodorovná. Tělo kryje hladká kůže bez šupin. Postraní čára je poměrně dobře znatelná. Hřbetní ploutve jsou dvě, v první je 7 – 11 tvrdých a v druhé je 14 – 17 měkkých ploutevních paprsků. Řitní ploutev je zrcadlově podobná druhé ploutvi hřbetní, má 10 – 14 měkkých paprsků. Prsní ploutve jsou dlouhé, vějířovité, dosahují až k začátku druhé hřbetní a řitní ploutve. Dospělci nemají plynový měchýř, ve vodním sloupci se pohybují minimálně a řadíme je tedy mezi bentické druhy.

Zbarvení může být různé v závislosti na prostředí, nejčastěji šedé nebo hnědé s tmavými skvrnami na hlavě a hřbetě. Na bocích jsou žluté nebo bílé skvrny. Samci jsou zejména na břišní straně výrazně barevnější (světlé skvrny jsou obklopeny různými odstíny žluté a oranžové. Ploutve jsou světlé s tmavými pruhy.

Vranka mořská se živí především malými rybami, korýši nebo jikrami jiných ryb. Vranka mořská žije nejčastěji na bahnitém nebo kamenitém dně nebo v kelpch, kde je velmi dobře maskována (Toušek 2008).



Obr. 2 *Myoxocephalus scorpius*

2.2.2 *Gymnocanthus tricuspis*

Gymnocanthus tricuspis neboli vranka severní je mořská ryba také patřící do čeledi Cottidae. Vyskytuje se především v Severním ledovém oceánu, Severním Atlantiku a kolem pobřeží Norska. Její velikost se pohybuje kolem 25 cm. Má šedou až nahnědlou barvu kůže s tmavými pruhy a světle nebo tmavě zelenými skvrnami. Na ploutvých se střídají světle a tmavě zbarvené pruhy.

Tato vranka je snadno odlišitelná od svých běžnějších příbuzných tvarem horního lícního ostnu. Tento ostn je široký, plochý a je na konci rozvětven do tří krátkých zakončení, zatímco jiné vranky mají zakončení ostnu jednoduché. U vranky severní chybí ostny na horní části hlavy nebo jsou jen krátké a roh skřelí kryjících žábry je zaoblený. Typickým znakem je také velká vzdálenost mezi jejími hřbetními ploutvemi. První hřbetní ploutev má 11-12 ostrých trnů, zatímco druhá má 15-17 měkkých paprsků (Bigelow and Schroeder 1953).

Potrava vranky severní je odlišná. Živí se krevetami, malými vrankami, plži (Gastropoda) nebo mnohoštětinatci (Polychaeta) a nejčastěji osidluje bahňatá dna.



Obr 3. *Gymnocanthus tricuspis*

2.3. Parametry k určení kondice ryb

2.3.1. Gonadosomatický index (GSI)

Gonadosomatický index je používán jako jednoduchý ukazatel reprodukční schopnosti ryb nebo jako ukazatel gonadálního vývoje. Vyjadřuje se procentuálně jako poměr hmotnosti gonád k hmotnosti celé ryby (Gunderson 1997).

$$\text{GSI} = (\text{hmotnost gonád (g)}/\text{hmotnost těla (g)}) \times 100$$

2.3.2. Hepatosomatický index (LSI)

LSI vyjadřuje hmotnost jater k celkové hmotnosti ryby a je ovlivňován množstvím tuku uloženým v játrech. Hmotnost jater odráží jak kvalitu výživy, tak intenzitu růstu ryby, protože se v játrech ukládá přebytečná energie a to ve formě glykogenu (Lambert et al. 2003).

$$\text{LSI} = (\text{hmotnost jater (g)}/\text{hmotnost těla (g)}) \times 100$$

2.3.3 Koeficient kondice (KK)

Tímto koeficientem může být u ryby určité délky odhalena vyšší než obvyklá hmotnost, která je důsledkem přebytku energie. Tento koeficient je také nazýván indexem intenzity růstu (Cubillos and Claramunt 2009).

$$K = (\text{hmotnost (g)}/\text{délka (mm)}^3) \times 100\,000$$

2.4. Histologické metody využívané při studiu parazitů

Jednou z nejpoužívanějších metod pro zkoumání rybích parazitů je klasická histologická technika. Poté co je ryba chycena a usmrcena, následuje vlastní odběr vzorku, který musí být proveden ostrým nástrojem například žiletkou, skalpelem popřípadě ostrými nůžkami. U tupých nástrojů může dojít k rozdrčení tkáně. Tkáň musí být pečlivě fixována vhodným fixačním činidlem, aby nedošlo k autolýze buněk. Po fixaci následuje dehydratace v alkoholu, ekvibrace v xylenu a vlastní zalévání do parafínu, krájení a barvení. Vlastní identifikace se provádí pomocí světelného mikroskopu (Raskovic et al. 2010).

2.4.1. Fixace

Fixací se rozumí rychlé vysrážení (denaturace) bílkovin protoplazmy buněk a tkání pomocí fixačních tekutin. Úkolem fixace je zabránit autolýze buněk a zároveň zachovat strukturu buněk či tkání ve stavu, co nejpodobnějšímu tomu, jaký mají za živa (Maňáková a Seichertová 2002).

Fixační tekutiny by měly co nejlépe zachovat strukturu a barvitelnost tkáně a důležitá je také jejich penetrační schopnost. Doba fixace závisí zejména na druhu fixační tekutiny a velikosti tkáně (Vacek 1996).

Existuje celá řada fixačních tekutin. Vybíráme je cíleně podle druhu vyšetření a podle typu tkáně, protože ne každá fixační tekutina je vhodná pro fixaci všech tkáňových komponent (Jelínek a kol. 2007). Hlavními faktory ovlivňujícími výsledek fixace jsou teplota, pH, osmolarita, koncentrace a penetrační schopnost fixačního

činidla a doba trvání fixace (Bancroft and Stevens 1996). Fixaci dělíme na fyzikální a chemickou.

Fyzikální fixace se provádí pomocí suchého tepla, varu, mrazovou substitucí nebo lyofilizací. U mrazové substituce a lyofilizace dochází jen k částečné denaturaci proteinů, které si zachovávají své antigenní vlastnosti (Čech a Horský 2005). Existuje také fixace pomocí mikrovlnného záření.

K chemické fixaci se používají například aldehydy (formaldehyd, glutaraldehyd), alkoholy (ethanol, methanol), kyseliny (kyselina octová, trichloroctová, pikrová), soli těžkých kovů (oxid osmičelý, chlorid rtuťnatý, dichroman draselný); (Maňáková a Seichertová 2002).

2.4.2 Odvodnění a prosycení tkáně

Většina zalévacích médií není mísitelná s vodou, proto je třeba vzorky nejprve odvodnit a poté prosytit látkou, ve které se zalévací médium rozpouští (Jelínek a kol. 2007).

Odvodnění tkáně se provádí ve vzestupně řadě alkoholů (70%, 80%, 96%, 100% etanol) a prosycení tkáně se provádí nejčastěji pomocí xylyenu nebo acetonu. Doba odvodnění závisí na struktuře a velikosti tkáně, ale většinou se pohybuje kolem jednoho nebo dvou dnů.

Po odvodnění je nutné etanol zcela odstranit, protože se v něm parafín nerozpouští. Proto se provádí prosycování tkáně látkou, která dobře rozpouští parafín a je zároveň mísitelná s alkoholem (benzen); (Vacek 1996).

2.4.3 Zalévání

Poté se může tkáň buďto zmrazit a dále krájet na zmrazovacím mikrotomu nebo se prosytí vhodným zalévacím médiem. Zalévací média se rozdělují na ve vodě nerozpustná (parafín, celoidin, paraplat) nebo ve vodě rozpustná (želatina, celodal); (Čech a Horský 2005). Pro světelnou mikroskopii se nejčastěji používá parafín nebo nitrocelulóza. Parafín by měl být kvalitní přefiltrovaný, nikdy se nepoužívá parafín, který byl používán k prosycování tkáně. Zalévání se provádí v kovových komůrkách

a poté je nutné rychlé ochlazení parafínu. Nakonec se odstraní komůrka a tkáňový bloček je připraven ke krájení (Vacek 1996).

2.4.4. Krájení

Ke zhotovení tenkých histologických preparátů je potřeba tkáňové bločky nakrájet na tenké řezy. Krájení probíhá pomocí mikrotomu (Čech a Horský 2005).

Rozlišujeme mikrotom sáňkový, rotační a kryostat. Sáňkový mikrotom obsahuje těžké sáně opatřené ostrým nožem, který se pohybuje proti tkáňovému bločku a ten je proti němu vysouván o potřebný počet mikrometrů. Naproti tomu na rotačním mikrotomu je nůž pevně uchycen do svorky a proti němu se pohybuje otáčením setrvačnickového kola dobře upevněný tkáňový bloček. Tento typ mikrotomu slouží především ke krájení sériových řezů (Vacek 1996). Pomocí kryostatu se krájejí tkáň zmrazené na nízké teploty v nativním stavu nebo fixované. Kryostat se používá nejčastěji v histochemii (Čech a Horský 2005).

Po nakrájení se řezy přenášejí do zahřáté vodní lázně (obsahuje želatinu) a napínají pomocí pátradel. Poté jsou nataženy na sklíčko a pečlivě usušeny při pokojové teplotě nebo v termostatu.

2.4.5 Barvení

Zhotovený vysušený preparát musí být pečlivě odparafinován, protože barviva obsahují vodu, která by se s parafínem nespojila. Odparafinování se provádí pomocí dvou lázní xylenu. Jelikož se ani xylen ve vodě nerozpouští, je nutno řezy pomocí sestupné alkoholové řady převést do vody a poté následuje samotné barvení.

Barvení spočívá v rozdílné afinitě buněk a tkání, které vážou různá barviva a proto se dají v mikroskopu dobře odlišit. Neobarvené preparáty se dají prohlížet pouze pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem, jinak by nebylo možné rozeznat jednotlivé složky tkání (Vacek 1996).

Nejpoužívanější barvicí metodou je barvení hematoxylin-eosin (HE), kdy odparafinované a zavodněné řezy jsou nejprve barveny roztokem hematoxylinu (barví buněčná jádra), poté jsou vyprány pod tekoucí vodou a nakonec vloženy do roztoku

eosinu. Výsledkem barvení jsou modrá až černá jádra, růžový kolagen a červená cytoplazma.

Po obarvení se musí preparáty zamontovat pomocí montovacího média a přikryt krycím sklíčkem. Montovací médium musí být průhledné, nesmí poškozovat zbarvení tkáně a musí mít vysoký index lomu. Existuje médium mísící se s vodou, u kterého se tkáň neodvodňuje (glycerin), nebo médium nemísící se s vodou a rozpustné v xylenu (kanadský balzám), u něhož je nutné tkáň odvodnit vzestupnou řadou alkoholů (Vacek 1996).

Nabarvený preparát se vyhodnocuje pomocí světelného mikroskopu (Maňáková a Seichertová 2002).

3. Cíl práce a hypotézy

3.1 Cíl práce

1. Ověřit hypotézu o korelaci mezi množstvím nálevníků *Trichodina* spp., vyskytujících se na žábrách ryb, a intenzitou parazitace patogenními endohelmintry (motolice, tasemnice, hlístice).
2. Zjistit korelace mezi stupněm parazitace a kondicí studovaných druhů ryb.
3. Osvojit si a zdokonalit se v histologických technikách, zejména v zalévání tkání, krájení tkáňových bločků na mikrotomu, barvení preparátů, a osvojit si mikroskopickou diagnostiku.

3.2 Hypotézy

- H1: Při zvýšené intenzitě infekce parazity se zvyšuje i intenzita infekce trichodinami.
- H2: Intenzita infekce trichodinami nesouvisí s infekcí ryb parazitickými helminty.
- H3: Intenzita infekce trichodinami a endohelmintry snižuje kondici ryb.
- H4: Kondice ryb měřená gonadosomatickým indexem, hepatosomatickým indexem a koeficientem kondice není intenzitou infekce parazity ovlivněna.

4. Materiál a metodika

4.1 Charakteristika zkoumaného materiálu

Odlov ryb probíhal v roce 2011 a 2012 v centrální části Svalbardu, převážně v zátocě Petuniabukta a v dalších vybraných lokalitách. Pro dosažení dané lokality byl použit motorový nafukovací člun Zodiak. Mezi chycenými rybami z největší části převažovala vranka mořská (*Myoxocephalus scorpinus*) a vranka severní (*Gymnocanthus tricuspis*). Ryby byly loveny dvěma způsoby, a to pomocí tenat nebo při potápění do hloubky až třiceti metrů.

4.2 Odběr a fixace materiálu v terénu

U odchycených ryb byla změřena jejich délka, celková hmotnost, hmotnost gonád, hmotnost jater a dále byly pitvány parazitologickou pitvou s cílem nalezení endohelmintů a odběru žáber, ze kterých se zhotovily histologické preparáty pro identifikaci parazitických nálevníků.

Mezi nejčastějšími nalezenými endohelmintry byla tasemnice *Diplocotyle olrikii* (Cestoda: Spathebothriidea), plerocerkoidy *Tetraphyllidae* gen. sp., střevní motolice (Digenea: Opecoelidae) a larvy hlístic (Nematoda: Anisakidae). Paraziti byli fixováni horkým roztokem (4%) formaldehydu.

Žábry byly fixovány pomocí Davidsonova roztoku (Humason 1962), který obsahoval devět dílů zásobního roztoku a jeden díl kyseliny octové po dobu 24h. Poté byl fixační roztok nahrazen zásobním roztokem (složení viz dále), ve kterém byl materiál fixován delší dobu. Žábry byly přepravovány do České republiky v umělohmotných bločcích, označených číslem odpovídajícím příslušnému číslu ryby a vloženy do 70 % etanolu.

Složení zásobního Davidsonova roztoku:

- Glycerol (200ml)
- Formaldehyd koncentrovaný (400ml)

- Etanol 96% (600ml)
- Destilovaná voda (600ml)

4.3 Laboratorní metody

4.3.1 Příprava bločků

Žábry přivezené do České republiky a fixované v 70% etanolu se nejprve musely odvodnit roztoky s vzrůstající koncentrací etanolu. Ze 70% etanolu se bločky přenesly do 90% etanolu a druhý den ráno se vyměnil za nový 90% etanol. Po 6 hod byly bločky přesunuly do nového 96% alkoholu, kde zůstaly přes noc. Následující postup je popsán v tabulce 1.

Tab 1. Postup pro přípravu bločků

Lázeň	Doba působení
96% EtOH	2 hod
96% EtOH	2 hod
aceton	1 hod
aceton	1 hod
xylén	1 hod
xylén	1 hod
Histoplast I.	přes noc



Obr 4. Zalévací linka TES 99 firmy Medite. Vlevo-chladicí modul, uprostřed-parafinový dispenzer, vpravo-předehřívací modul

Následně byly vzorky prosycovány parafínem (Histoplast-S, Serva), třikrát obměněným po 12 hodinách.

Zalévání do parafínu probíhalo na parafínové zalévací lince TES 99 od firmy Medite, obsahující parafínový dispenzer, nastavitelné přehřívací a chladicí moduly (viz obr. 4). Z umělohmotných bločků se sejmula uzavíratelná část a pinzetou se šetrně vyjmuly části rybích žáber. Do kovových vaniček se pomocí parafínového dispenzoru nanasla malá vrstva horkého parafínu (cca 60°C), do které byly následně žábry přeneseny a pečlivě urovnaný tak, aby se mohly co nejsnadněji nakrájet. Kovová vanička se poté umístila na zmrazovací plochu (umístěna těsně pod dispenzorem), aby se žábra samovolně nepohybovala v parafínu. Následně se vanička překryla druhou částí umělohmotného bločku, označeného číslem ryby a doplnilo se potřebné množství horkého parafínu. Takto připravený tkáňový bloček byl položen na chladicí modul, aby ztuhl. Tímto způsobem byl zpracován všechen materiál. Po zatuhnutí se odstranila kovová vanička a pomocí nože se okrájel přebývající parafín kolem vzorku tak, aby plocha na krájení byla co nejmenší (pro snadnější krájení).

4.3.2 Krájení tkáňových bločků

Krájení tkáňových bločků probíhalo na rotačním mikrotomu HM340 (Microm Heidelberg, viz obr. 5). Z upevněných bločků byl nejprve skrájen přebytečný histoplast, pomocí ostrého nože, do potřebné hloubky (tak aby byla tkáň dobře prokrájená). Poté se krájely tenké řezy o velikosti 6 mikrometrů. Z každého vzorku byly zhotoveny dva preparáty. Každý tkáňový bloček obsahoval buď to jeden nebo dva kusy žáber. V případě že tkáňový bloček obsahoval pouze jeden kus žaber, zhotovovaly se řezy v dvou rozdílných hloubkách (např. první řez byl proveden již na začátku krájení a druhý řez až po větším prokrájení tkáně). Následně byly řezy přeneseny do zahřáté vodní lázně (40 °C) a pomocí pátradel se napnuly a natáhly na podložní sklíčko, které bylo označeno stejným číslem, jako číslo vzorku. Po nakrájení se nechaly řezy schnout 48 hodin při pokojové teplotě.



Obr 5. Rotační mikrotom HM340 (Microm Heidelberg)

4.3.3 Barvení a diagnostika preparátů

Po zaschnutí se preparáty v digestoři odparafinovaly, obarvily a odvodnily (viz Tab 2.). Byl použit Mayerův hematoxylin (Humason 1962), který se společně s eosinem musel vždy před každým barvením pečlivě přefiltrovat.

Tab 2. Barvení hematoxylin-eosin

Lázeň	Čas
xylén	5 min
xylén	5 min
96% alkohol	5 min
96% alkohol	5 min
70% alkohol	5 min
70% alkohol	5 min
destilovaná voda	5 min
hematoxylin	1 min 15s
prát pod tekoucí vodou	10 min
eosin	1 min 15s
destilovaná voda	3x opláchnout
70% alkohol	3x opláchnout
70% alkohol	3x opláchnout
96% alkohol	3x opláchnout
96% alkohol	3x opláchnout

xylén	5 min
xylén	5 min
xylén	5 min
xylén	5 min

Po obarvení se preparáty zamontovaly do kanadského balzámu (nemísí se s vodou, ale rozpouští se v xylenu) a překryly krycím sklíčkem.

K mikroskopické diagnostice byly využity dva světelné mikroskopy a to Olympus CX 21 a Olympus BX51 s chlazenou kamerou DP70 (na tomto mikroskopu byly pořizovány fotografické snímky).

Preparáty byly prohlíženy při zvětšení s použitím objektivu 20x a 40x. Ze dvou preparátů byl prohlížen vždy ten vydařenější. Intenzita parazitace byla určena tak, že na každém kusu tkáně byli spočítáni všichni paraziti *Trichodina* spp. Výsledkem tedy byly vždy dva číselné údaje u jednoho vzorku, ze kterých se vypočítal průměr.

4.4 Statistické vyhodnocení

Před vlastní analýzou údajů byla ověřena distribuce hodnot. Pro splnění požadavku regresních analýz (linearity a homogenity variance) byla data transformována dvěma způsoby. V případě indexů kondice byla použita arcsinová-odmocninová transformace a pro početnosti parazitů a velikostních údajů logaritmická transformace. Při transformaci přirozeným logaritmem byl použit vztah $\ln(x+1)$ u většiny dat s výjimkou počtů tasemnic, kde byl z důvodu malého množství parazitů použit vztah $\ln(10*x+1)$, přičtení čísla jedna bylo použito z důvodu přítomnosti nulových hodnot v souboru. Po transformaci distribuce hodnot odpovídala normálnímu rozdělení. Další úprava spočívala v překódování druhů a pohlaví do kategoriálních proměnných, kdy byla 1 použita pro druh *Myoxocephalus scorpius* a pohlaví samice (F) a opačně 0 pro druh *Gymnocanthus tricuspis* a samce (M).

Vlastní analýza byla provedena ve dvou krocích, každý v jiném programu. Nejprve byl testován vztah mezi četností parazitů vzájemně, společně s druhovou příslušností a pohlavím ryb. Tato analýza byla provedena v programu Canoco for Windows 4.56

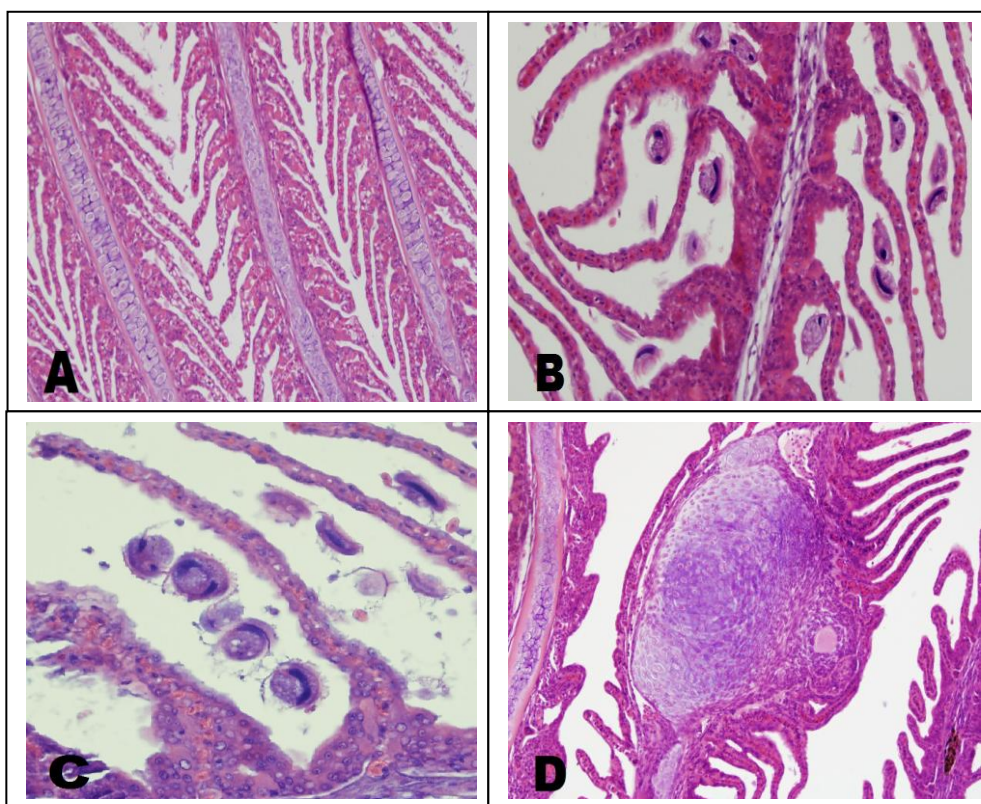
(Ter Braak and Šmilauer, 2002). První nepřímá gradientová analýza byla provedena metodou váženého průměrování a odstraněním trendů (DCA) ukázala na nejdelší hodnotu gradientu 2,61. Jelikož se jedná o hodnotu nižší než 4, v další analýze bylo přistoupeno k lineární metodě – analýza hlavních komponent (PCA). Program byl nastaven škálováním zaměřeným na mezidruhové korelace, skóre druhu poděleno směrodatnou odchylkou a vlastní údaje pro vysvětlované proměnné centrovány. Výstupem analýzy hlavních komponent je množství vysvětlené variability na jednotlivých osách ordinačního prostoru a především graf vytvořený programem CanoDraw for Windows 4.14 (Ter Braak and Šmilauer, 2002).

Druhé statistické testování obnášelo testování závislosti indexů kondice na početnosti parazitů společně s druhovou příslušností a pohlavím ryb. K vlastnímu testu byla zvolena mnohonásobná lineární regrese, ze které lze určit relativní příspěvek každého faktoru, celkový model a především statistickou průkaznost dílčích vlivů. Následně byla ověřena kvalita modelu vynesáním hodnot residuí a ověřením absence odlehlých bodů (Normal Q-Q plot and Residuals vs. Leverage plot). Vyhodnocení bylo provedeno v programu R (R Core Team, 2013).

5. Výsledky

5.1 Laboratorní vyhodnocení výsledků

Jedním z cílů práce bylo procvičení techniky přípravy histologických preparátů. Celkem bylo zpracováno 137 vzorků žaber vranek dvou druhů, *Myoxocephalus scorpius* a *Gymnocanthus tricuspis*, ve kterých pak bylo spočítáno množství parazitů rodu *Trichodina*. Celkem bylo zpracováno 116 kusů ryb druhu *M. s.*, z toho 32 samců a 84 samic, a 21 kusů ryb druhu *G. t.*, z toho 2 samci a 19 samic. Jak je patrné z obr. 6, paraziti byli viditelní jako oválné disky, na příčném řezu s viditelným tmavě modře obarveným vnitřkem buňky, na podélném řezu s viditelným zoubkovaným prstencem. U některých žaberních preparátů bylo napočítáno i více než 300 jedinců, zatímco preparátů, u kterých nebyl zjištěn žádný parazit, byla jen několik.



Obr. 6. Histologické preparáty ze zdravých a parazity napadených žaber vranek. A: žábry zdravé při zvětšení 20x ; B: žábry napadené nálevníkem rodu *Trichodina* při zvětšení 20 x a (C) 40 x; (D) neidentifikovaný, nádoru podobný útvar na chrupavce žáber.

Pro splnění cílů práce bylo dále potřebné provést statistickou analýzu získaných dat. Intenzita zjištěné parazity je uvedena v tabulce 3, v příloze číslo 1 jsou pak obsaženy zjištěné údaje o kondici ryb společně s kondičními koeficienty vypočítanými z těchto údajů.

Tabulka 3. Zjištěná intenzita parazitace trichodinami, tasemnicemi, hlísticemi a motolicemi u mořských vranek *Myoxocephalus scorpius* a *Gymnocanthus tricuspis*.

Číslo vzorku ¹	Druhá příslušnost	Pohlaví ¹	Počet parazitů na žábrech	Počet parazitů v GIT		
			Trichodiny	Tasemnice	Hlístice	Motolice
B 29 (1)	M. scorp.	F	55	0	0	0
B 31 (1,2)	M. scorp.	F	204	0	0	0
B 32 (1)	M. scorp.	F	69	0	6	3
B 33 (2)	M. scorp.	F	291	1	3	6
B 34 (1)	M. scorp.	F	40	0	3	0
B 35 (1)	M. scorp.	F	59	0	2	0
B 38 (2)	M. scorp.	M	394	0	0	3
B 41 (2)	M. scorp.	F	391	0	27	100
B 42 (2)	M. scorp.	F	382	0	6	8
B 43 (1)	M. scorp.	M	510	0	0	0
B 44 (2)	M. scorp.	F	305	0	1	5
B 45 (2)	M. scorp.	F	215	0	1	12
B 59 (2)	M. scorp.	M	9	0	0	0
B 60 (1)	M. scorp.	F	248	0	2	22
B 63 (2)	M. scorp.	F	265	0	14	8
B 64 (1,2)	M. scorp.	F	423	0	15	15
B 66 (1)	M. scorp.	F	328	0	0	18
B 72 (2)	M. scorp.	F	406	0	4	15
B 73 (2)	M. scorp.	F	591	0	6	18
B 75 (2)	M. scorp.	F	96	0	6	8
B 77 (1)	M. scorp.	F	70	0	3	4
B 78 (1)	M. scorp.	F	231	0	4	6
B 81 (1)	M. scorp.	F	199	0	0	17
B 82 (1)	M. scorp.	M	152	0	4	12
B 106 (2)	M. scorp.	F	384	0	1	7
B 153 (2)	M. scorp.	F	3	1	2	23
B 154 (1,2)	M. scorp.	F	1	0	2	2

B 155 (1)	M. scorp.	F	60	1	2	24
B 156 (2)	M. scorp.	F	266	0	4	4
B 157 (2)	M. scorp.	F	5	3	0	3
B 158 (1)	M. scorp.	F	117	0	9	12
B 159 (1)	M. scorp.	F	6	0	9	51
B 160 (2)	M. scorp.	F	320	0	8	2
B 161 (1)	M. scorp.	M	71	0	6	7
B 162 (2)	M. scorp.	F	15	6	1	0
B 163 (1)	M. scorp.	F	425	0	3	5
B 167 (2)	M. scorp.	M	5	0	0	2
B 169 (2)	M. scorp.	M	10	0	0	0
B 177 (1,2)	M. scorp.	M	15.5	0	5	0
B 178 (1)	M. scorp.	F	32	0	0	0
B 179 (2)	M. scorp.	F	24	0	2	4
B 180 (1,2)	M. scorp.	F	7.5	0	1	12
B 181 (1,2)	M. scorp.	M	1.5	0	0	7
B 182 (2)	M. scorp.	M	53.5	0	1	3
B 201 (1,2)	M. scorp.	F	112	1	0	8
B 205 (2)	M. scorp.	F	0	2	1	16
B 207 (1)	M. scorp.	F	103	0	1	17
B 208 (1,2)	M. scorp.	F	615	2	1	67
B 209 (2)	M. scorp.	F	79	0	1	0
D 2 (2)	M. scorp.	F	11	1	9	85
D 3 (1)	M. scorp.	F	145.5	0	110	20
D 6 (2)	M. scorp.	F	176.5	2	11	20
D 7 (1)	M. scorp.	F	601.5	0	4	22
D 11 (1)	M. scorp.	F	277.5	0	2	13
D 12 (1,2)	M. scorp.	F	4	0	0	4
D 13 (1)	M. scorp.	M	587.5	0	2	6
D 14 (2)	M. scorp.	M	299	0	2	0
D 15 (1)	M. scorp.	F	312	0	0	8
D 17 (2)	M. scorp.	F	8.5	0	4	26
D 18 (1,2)	M. scorp.	F	431.5	5	6	12
D 20 (2)	M. scorp.	F	212.5	2	1	4
D 22 (2)	M. scorp.	F	40	0	3	5
D 23 (2)	M. scorp.	M	46	1	4	3
D 25 (1,2)	M. scorp.	M	40	0	0	0
D 68 (1,2)	M. scorp.	M	11.5	0	1	5
D 69 (1,2))	M. scorp.	F	1.5	0	4	0
D 70 (1,2)	M. scorp.	M	9	0	2	7

D 72 (1,2)	M. scorp.	F	12.5	0	5	22
D 74 (1,2)	M. scorp.	F	62	0	17	130
D 75 (1,2)	M. scorp.	M	177.5	5	8	5
D 79 (1,2)	M. scorp.	F	420.5	0	7	9
D 81 (1,2)	M. scorp.	M	11	5	5	10
D 83 (1,2)	M. scorp.	M	510	0	1	1
D 84 (1,2)	M. scorp.	F	44.5	0	5	10
D 90 (1,2)	M. scorp.	F	206.5	1	3	40
D 93 (1,2)	M. scorp.	F	198	0	0	0
D 104 (1,2)	M. scorp.	F	216	0	62	26
D 105 (2)	M. scorp.	F	320	0	7	2
D 106 (1)	M. scorp.	F	295.5	0	17	22
D 107 (1,2)	M. scorp.	F	526	0	7	7
D 108 (1,2)	M. scorp.	F	87	0	8	14
D 109 (1)	M. scorp.	F	63	0	4	17
D 110 (2)	M. scorp.	F	105.5	0	1	0
D 111 (1,2)	M. scorp.	F	200.5	0	4	5
D 112 (1,2)	M. scorp.	F	1.5	0	0	4
D 113 (1,2)	M. scorp.	M	127.5	0	3	12
D 114 (1)	M. scorp.	F	403.5	0	5	0
D 115 (1,2)	M. scorp.	M	11	0	0	16
D 116 (1,2)	M. scorp.	F	1.5	0	0	0
D 117 (1,2)	M. scorp.	M	8.5	0	1	19
D 118 (1,2)	M. scorp.	M	3.5	0	2	2
D 124 (1)	M. scorp.	M	43.5	0	12	6
D 125 (1,2)	M. scorp.	M	191.5	0	5	1
D 126 (2)	M. scorp.	M	0.5	0	3	1
D 128 (1,2)	M. scorp.	M	79	1	1	1
D 129 (1,2)	M. scorp.	F	2	0	2	1
D 131 (1)	M. scorp.	M	309.5	4	4	0
D 134 (1)	M. scorp.	F	350.5	0	4	5
D 135 (1,2)	M. scorp.	M	613	0	3	0
D 137 (1)	M. scorp.	F	148.5	0	7	1
D 139 (1,2)	M. scorp.	M	132.5	0	0	1
D 140 (1,2)	M. scorp.	F	6.5	0	4	20
D 141 (1,2)	M. scorp.	F	41	0	10	6
D 142 (1,2)	M. scorp.	F	12	0	4	1
D 144 (1,2)	M. scorp.	F	89	0	9	32
D 175 (1,2)	M. scorp.	F	24.5	0	15	8
D 183 (1,2)	M. scorp.	M	34.5	0	3	6

D 184 (1,2)	M. scorp.	F	201.5	0	9	0
D 185 (1,2)	M. scorp.	M	172	0	5	3
B 28 (1)	M. scorp.	F	74.5	0	1	6
B 36 (2)	M. scorp.	F	4.5	0	0	3
B 39 (2)	M. scorp.	F	3	0	0	0
B 56 (2)	M. scorp.	F	1.5	0	2	7
B 58 (1)	M. scorp.	F	0	0	1	1
B 76 (2)	M. scorp.	F	57.5	3	4	6
B 152 (2)	M. scorp.	F	4	0	0	3
B 164 (1)	G. tricusp.	F	0	0	0	4
B 166 (1)	G. tricusp.	F	40.5	1	0	1
B 168 (1)	G. tricusp.	F	6	0	0	0
B 170 (2)	G. tricusp.	F	75.5	0	4	0
B 197 (2)	G. tricusp.	F	0	0	0	0
B 198 (2)	G. tricusp.	F	6	0	0	6
B 199 (1)	G. tricusp.	F	0	0	0	12
B 200 (1)	G. tricusp.	F	3	0	2	0
B 202 (1,2)	G. tricusp.	F	0	0	0	63
D 9 (1)	G. tricusp.	F	1.5	0	0	5
D 19 (1)	G. tricusp.	F	2.5	0	0	8
D 24 (1)	G. tricusp.	F	33.5	3	0	0
D 27 (2)	G. tricusp.	F	10	0	0	0
D 28 (2)	G. tricusp.	F	3	0	0	0
D 64 (1,2)	G. tricusp.	F	6	0	0	0
D 66 (1,2)	G. tricusp.	F	3	0	0	7
D 67 (1,2)	G. tricusp.	F	3.5	0	1	4
D 73 (1,2)	G. tricusp.	F	0	0	0	2
D 76 (1)	G. tricusp.	M	0	0	0	0
D 78 (1,2)	G. tricusp.	M	4	0	0	0
D 91 (1,2)	G. tricusp.	F	3.5	0	0	2

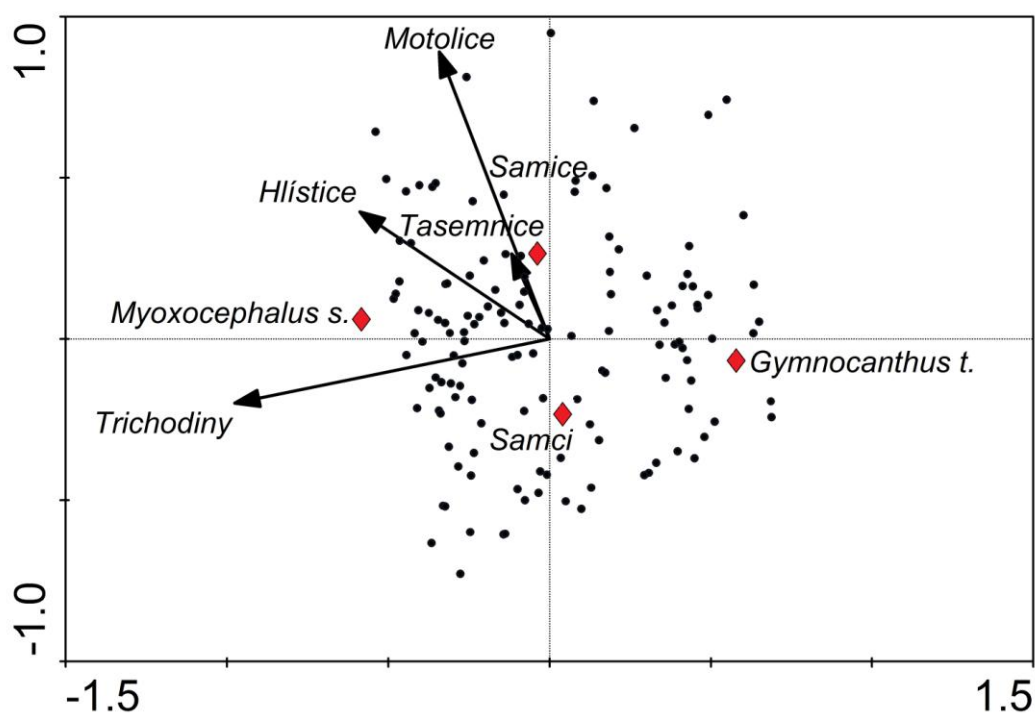
¹Označení jednotlivých ryb, B označuje ryby odchytené v roce 2011 a D v roce 2012.

²Označení pohlaví ryb, M samec, F samice.

5.2 Statistické vyhodnocení výsledků

5.2.1 Vyhodnocení korelace mezi parazity

Z ordinačního diagramu (Obr 7) je zřejmá pozitivní korelace mezi všemi kategoriemi parazitů, což znázorňují šipky, které směřují všechny jedním směrem. Nejtěsnější korelace jsou mezi tasemnicemi, motolicemi a hlísticemi (nejúžší úhel). Naopak značně odchýleny jsou trichodiny, které téměř nejsou s tasemnicemi a motolicemi korelované (pravý úhel) avšak patrná je korelace s hlísticemi. První osa, na kterou mají největší vliv trichodiny spolu s druhovou příslušností vysvětlila 51,7 % variability, druhá pak 19,7 %. Samice mají více motolic a tasemnic než samci, v případě trichodin je rozdíl minimální. Více parazitů bylo zjištěno u druhu *Ms* než u *Gt*.



Obr 7. Ordinační diagram znázorňující výsledky analýzy hlavních komponent (PCA): Černé body znázorňují jednotlivé ryby (nezávislá pozorování v ordinačním prostoru), šipky ukazují trendy nárůstu početnosti parazitů, červené centroidy označují kategoriální proměnné – druhovou příslušnost a pohlaví ryb.

5.2.2 Vyhodnocení závislosti kondičních koeficientů na intenzitě parazitace pomocí mnohonásobné lineární regrese

5.2.2.1 GSI (Gonadosomatický index)

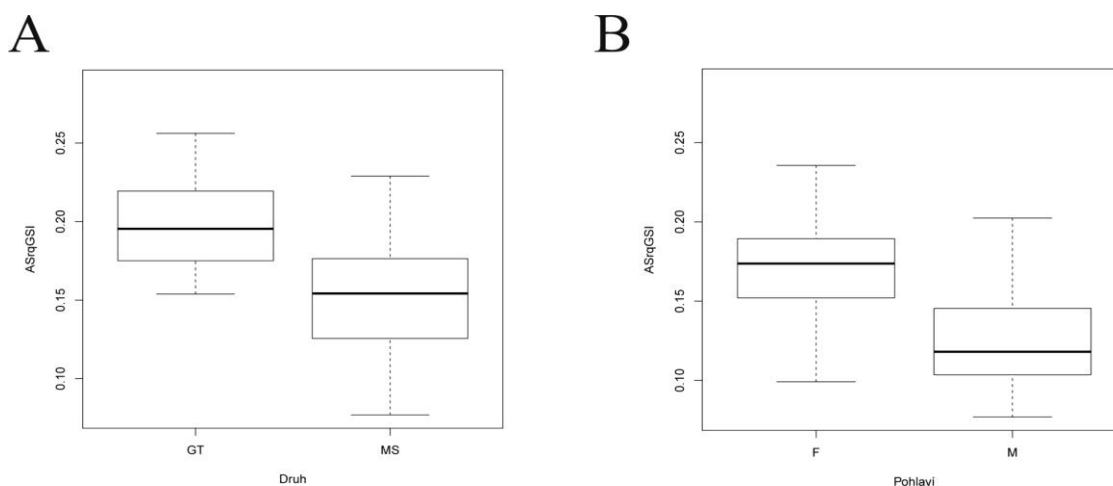
V prvním modelu lineární závislosti GSI na intenzitě parazitace byly zjištěny 4 statisticky průkazné členy (bez průsečíku). Pro tuto práci jsou významné nejen statisticky průkazné členy, ale i trendy v případě početnosti parazitů.

Celkový model pro GSI:

Jednotlivé členy jsou seřazeny sestupně podle poklesu příspěvku k vysvětlené variabilitě. Hvězdičky označují hladinu významnosti konkrétního členu *** pro $<0,001$, ** $<0,01$ a * $<0,05$. Tento plný model vysvětlil více jak 50 % variability, koeficient determinace (R^2) 0,545 a celkově vychází statisticky průkazně $F(6,130)=25,93$, $p<0,001$.

Rovnice: $GSI = 0,151^{***} - 0,063druhMS^{***} + 0,027pohlavíF^{***} + 0,009Motolice^{***} + 0,004Trichodiny^{**} + 0,003Tasemnice + 0,004Hlístice$

Pro ilustraci, že nejen vlastní početnosti parazitů, ale i druhová příslušnost jsou rozhodujícími faktory, bylo rozložení hodnot koeficientu GSI mezi těmito veličinami vyjádřeno pomocí krabicového grafu (box-plot). Z něj jsou patrné nižší hodnoty GSI pro *M.s.* ve srovnání s *G.t.* a pro samce ve srovnání se samicemi.



Obr 8. Statistické rozložení hodnot koeficientů GSI podle druhu (A) a pohlaví (B) vyjádřené pomocí krabicového diagramu. Horizontální linie uvnitř značí medián, spodní a horní hranice označují 1. a 3. kvartil (50% hodnot). Linie vycházející ze střední části grafu kolmo nahoru a dolů (fousky) vyjadřují variabilitu dat pod prvním a nad třetím kvartilem.

5.2.2.2 LSI (Hepatosomatický index)

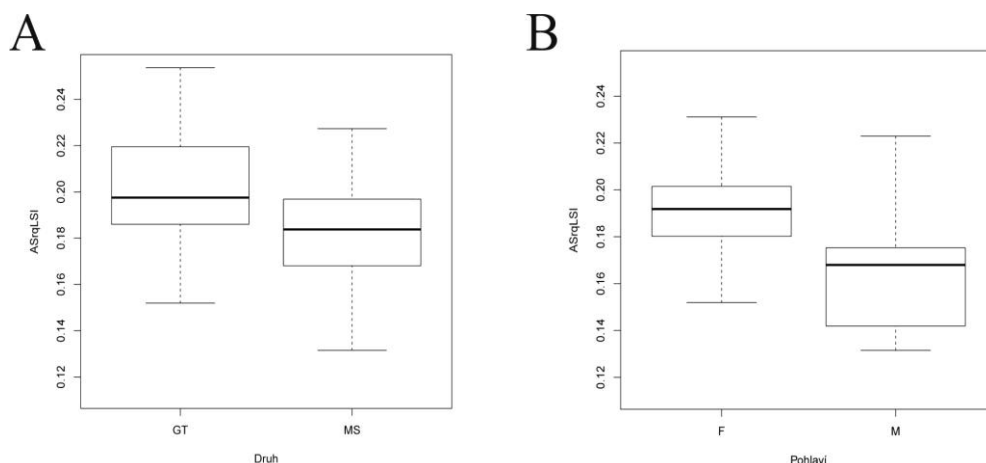
V druhém modelu lineární závislosti LSI na intenzitě parazitace byly zjištěny 3 statisticky průkazné členy (bez průsečíku). Opět mimo hlavních průkazných výsledků jsou důležité i trendy v početnosti parazitů.

Celkový model pro LSI:

Jednotlivé členy jsou seřazeny sestupně podle poklesu příspěvku k vysvětlené variabilitě. Hvězdičky označují hladinu významnosti konkrétního členu *** pro $<0,001$, ** $<0,01$ a * $<0,05$. Tento plný model vysvětlil více jak 30 % variability, koeficient determinace (R^2) 0,333 a celkově vychází statisticky průkazně $F(6,130)=10,84$, $p<0,001$.

Rovnice: $LSI = 0,0178^{***} - 0,029druhMS^{**} + 0,015pohlavíF^{**} + 0,005Motolice^{**} + 0,002Trichodina + 0,003Hlístice + 0,002Tasemnice$

Dále bylo provedeno statistické rozložení hodnot LSI koeficientu, druhu a pohlaví vyjádřené pomocí krabicového grafu (box-plot). Z něj jsou patrné nižší hodnoty LSI pro *M.s.* ve srovnání s *G.t.* a pro samce ve srovnání se samicemi, shodně jako u GSI.



Obr 9. Statistické rozložení hodnot koeficientu LSI podle druhu (A) a pohlaví (B) vyjádřené pomocí krabicového diagramu. Horizontální linie uvnitř značí medián, spodní a horní hranice označují 1. a 3. kvartil (50% hodnot). Linie vycházející ze střední části grafu kolmo nahoru a dolů (fousky) vyjadřují variabilitu dat pod prvním a nad třetím kvantilem.

5.2.2.3 KK (Koeficient kondice)

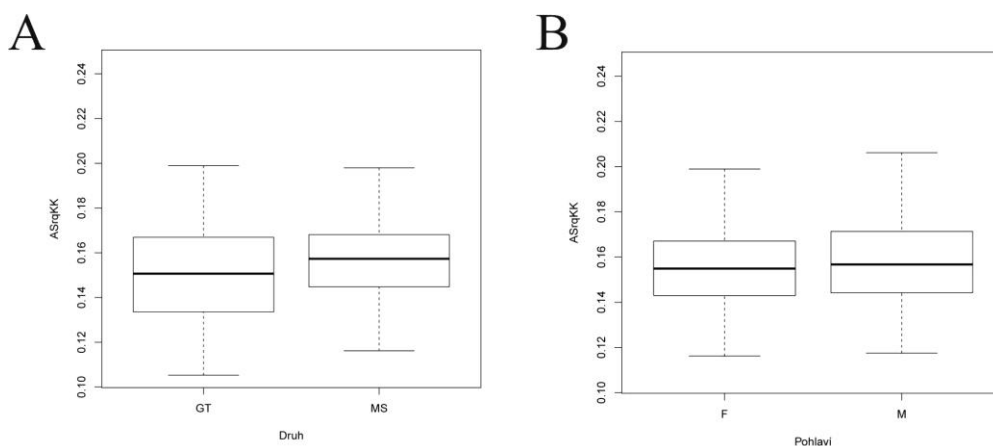
Ve třetím modelu lineární závislosti KK na intenzitě parazitace byl zjištěn 1 statisticky průkazný člen (bez průsečíku). Pro tuto práci jsou významné nejen statisticky průkazné členy, ale i trendy v případě početnosti parazitů.

Celkový model pro KK:

Jednotlivé členy jsou seřazeny sestupně podle poklesu příspěvku k vysvětlené variabilitě. Hvězdičky označují hladinu významnosti konkrétního členu *** pro $<0,001$, ** $<0,01$ a * $<0,05$. Tento plný model vysvětlil méně než 10 % variability, koeficient determinace (R^2) 0,076 a celkově nevychází statisticky průkazně $F(6,130)=1,78$, $p>0,05$.

Rovnice: $KK = 0,155^{***} + 0,016\text{druhMS}^{**} - 0,004\text{Hlístice} - 0,001 \text{Trichodina} - 0,0001\text{Motolice} - 0,001 \text{pohlavíF}$

Dále bylo provedeno statistické rozložení hodnot KK, druhu a pohlaví vyjádřené pomocí krabicového grafu (box-plot). Z něj jsou viditelné nepatrně nižší hodnoty KK u *G.t.* a téměř stejné hodnoty pro samce i samice.



Obr 10. Statistické rozložení hodnot koeficientu K.K. podle druhu (A) a pohlaví (B) vyjádřené pomocí krabicového diagramu. Horizontální linie uvnitř značí medián, spodní a horní hranice označují 1. a 3. kvartil (50% hodnot). Linie vycházející ze střední části grafu kolmo nahoru a dolů (fousky) vyjadřují variabilitu dat pod prvním a nad třetím kvartilem.

Zjištěné výsledky jsou zajímavé, negativní vliv parazitů na kondici není zcela evidentní, proto je nasnadě alternativní vysvětlení, že jde o velikost ryb (přeneseně stáří ryby), jež je hlavním prvkem ve výpočtu GSI a LSI. K ověření této teorie byly dále provedeny testy závislosti velikosti ryby a její celkové váhy na intenzitě parazitace.

5.2.2.4. Velikost ryby

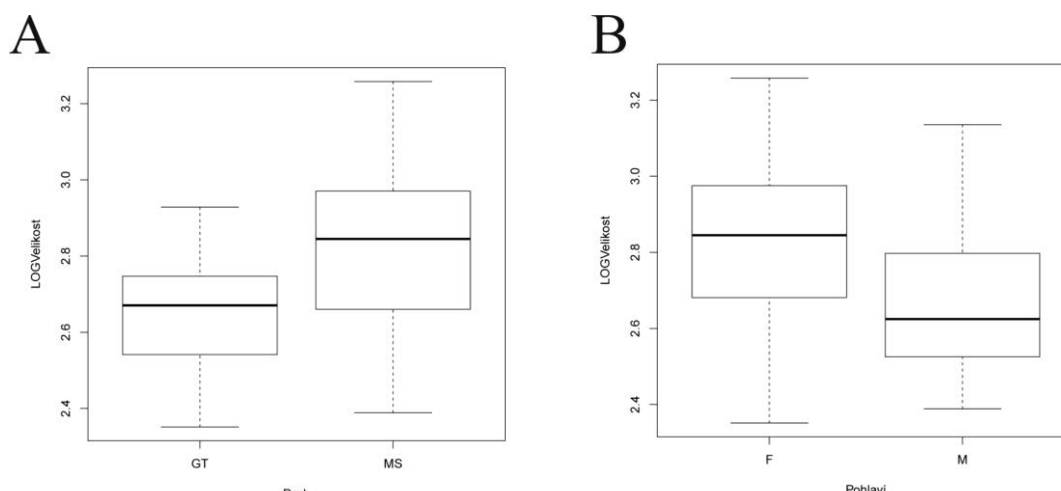
V čtvrtém modelu lineární závislosti velikosti na intenzitě parazitace bylo zjištěno 4 statisticky průkazných členů (bez průsečíku). Pro tuto práci jsou významné nejen statisticky průkazné členy, ale i trendy v případě početnosti parazitů.

Celkový model pro velikost:

Jednotlivé členy jsou seřazeny sestupně podle poklesu příspěvku k vysvětlené variabilitě. Hvězdičky označují hladinu významnosti konkrétního členu *** pro $<0,001$, ** $<0,01$ a * $<0,05$. Tento plný model vysvětlil více jak 50 % variability, koeficient determinace (R^2) 0,573 a celkově vychází statisticky průkazně $F(6,130)=29,12$, $p<0,001$.

Rovnice: $Velikost = 2,390^{***} + 0,153pohlavíF^{***} + 0,032Trichodiny^{***} + 0,045Motolice^{***} + 0,049Hlístice^{**} + 0,015Tasemnice + 0,038druhMS$

Dále bylo provedeno statistické rozložení hodnot velikosti, druhu a pohlaví pomocí krabicového grafu. Z něj jsou viditelné nižší hodnoty u druhu *G.t.* a z druhého grafu jsou patrné nižší hodnoty u samců než u samic.



Obr 11. Statistické rozložení hodnot velikostí podle druhu (A) a pohlaví (B) vyjádřené pomocí krabicového diagramu. Horizontální linie uvnitř značí medián, spodní a horní hranice označují 1. a 3. kvartil (50% hodnot). Linie vycházející ze střední části grafu kolmo nahoru a dolů (fousky) vyjadřují variabilitu dat pod prvním a nad třetím kvartilem.

5.2.2.5 Celková hmotnost

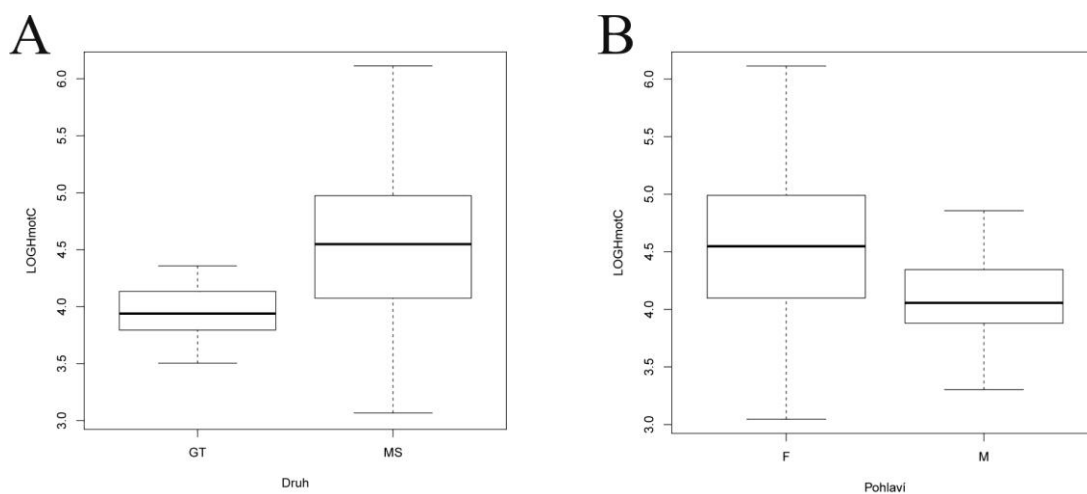
V pátém modelu lineární závislosti celkové hmotnosti na intenzitě parazitace bylo zjištěno 5 statisticky průkazných členů (bez průsečíku). Pro tuto práci jsou významné nejen statisticky průkazné členy, ale i trendy v případě početnosti parazitů.

Celkový model pro hmotnost:

Jednotlivé členy jsou seřazeny sestupně podle poklesu příspěvku k vysvětlené variabilitě. Hvězdičky označují hladinu významnosti konkrétního členu *** pro $<0,001$, ** $<0,01$ a * $<0,05$. Tento plný model vysvětlil více jak 50 % variability, koeficient determinace (R^2) 0,598 a celkově vychází statisticky průkazně $F(6,130)=32,19$, $p<0,001$.

Rovnice: Celková hmotnost = $3,152^{***} + 0,475\text{pohlavíF}^{***} + 0,153\text{Motolice}^{***} + 0,083\text{Trichodiny}^{***} + 0,315\text{druhMS}^{**} + 0,113\text{Hlístice}^* + 0,022\text{Tasemnice}$

Dále bylo provedeno statistické rozložení hodnot celkové hmotnosti, druhu a pohlaví pomocí krabicového grafu. Z něj jsou patrné nižší hodnoty u druhu *G.t.* než u *M.s.* a z druhého grafu jsou patrné nižší hodnoty u samců než u samic.



Obr 12. Statistické rozložení hodnot hmotností podle druhu (A) a pohlaví (B) vyjádřené pomocí krabicového diagramu. Horizontální linie uvnitř značí medián, spodní a horní hranice označují 1. a 3. kvartil (50% hodnot). Linie vycházející ze střední části grafu kolmo nahoru a dolů (fousky) vyjadřují variabilitu dat pod prvním a nad třetím kvartilem.

6. Diskuse

Nálevníci rodu *Trichodina* patří mezi běžné a rozšířené ektokomenzály, osidlující kůži a žábry mořských i sladkovodních ryb. Infikují všechny volně žijící i chované druhy. Obvykle se vyskytují v malém množství a jsou pro hostitele neškodní. Avšak pokud je imunitní systém ryby nějakým způsobem oslaben, může dojít k masivní invazi, která má za následek poškození epiteliálních buněk, narušení funkce žaber a může dojít až k úhynu ryby. Dalším důvodem zvýšeného výskytu trichodin, může být, zejména u chovaných ryb, silné znečištění vody. Například Khan (1991a) zjistil zvýšenou prevalenci a intenzitu trichodin u ryb vystavených ropným uhlovodíkům a předpokládal, že nárůst byl spojen se sníženou hostitelskou rezistencí, způsobenou tímto znečištěním. V důsledku toho jsou brány trichodiny jako dobré ukazatele znečištění vody, zejména eutrofizace. (Yeomans et al 1997; Palm a Dobberstein 1999). Na žábkách mořských vranek žijících na mořských dnech se *Trichodina* spp. vykytuje zcela běžně a to i ve větším množství. Je jen malé procento vranek, u kterých bychom trichodiny vůbec nenalezli. To je nejspíše způsobeno podle Loma a Dykové (1992) sníženou koncentrací rozpuštěného kyslíku ve vodě u dna, což vede k většímu a rychlejšímu množení těchto organismů.

Nálevníci nejsou jedinými parazity, kteří se u ryb vyskytují. Často jsou ryby infikovány také patogenními endohelminty. Helminti využívají ryby buď jako mezihostitele, paratenické hostitele nebo definitivní hostitele. U vranek *M. s.* a *G. t.* byly nalezeny tasemnice *Diplocotyle olrikii* (Cestoda: Spathebothriidea), plerocerkoidy *Tetraphyllidae* gen. sp., střevní motolice *Podocotyle atomon* (Digenea: Opecoelidae) a larvy hlístic (Nematoda: *Anisakidae*). Ačkoliv se u některých vranek vyskytovala také různá vývojová stádia helmintů (např. plerocerkoidy tasemnic), nebyla z důvodu nízké prevalence započítána do údajů o kondici hostitele. Motolice čeledi *Opecoelidae* byly identifikovány na základě morfologie jako jeden druh, pravděpodobně *Podocotyle atomon*.

U odchycených ryb byly zaznamenány jejich biometrické parametry (délka, celková hmotnost ryby, hmotnost gonád a hmotnost jater). Z těchto parametrů byly

vypočítány kondiční indexy, a to především gonadosomatický, který byl vypočítán jako poměr hmotnosti gonád a celkové hmotnosti ryby, dále hepatosomatický, vypočítán z poměru hmotnosti jater a celkové hmotnosti a také kondiční koeficient, který byl vyjádřen poměrem celkové hmotnosti a třetí mocninou celkové délky ryby. Tyto kondiční indexy se používají jako jednoduché a obecné ukazatele fyziologického stavu ryb, ve smyslu relativních ukazatelů skladby těla, tučnosti, krmení, růstu, reprodukční fáze a ukazatelů množství tělní energie (Mills et al. 1985).

Cílem této práce bylo kromě osvojení histologických technik také ověření hypotéz o korelaci mezi množstvím nálevníků rodu *Trichodina* spp. a množstvím endohelmintů (motolic, tasemnic a hlístic) a rovněž mezi stupněm parazitace těmito organismy a kondicí studovaných ryb. Byl předpoklad, že intenzita napadení trichodinami se bude zvyšovat u ryb, které jsou také napadeny endohelmintry a že stupeň parazitace se bude nepříznivě projevovat na kondici ryb.

V případě první hypotézy byla pomocí statistických modelů testována vzájemná korelace mezi jednotlivými parazity, přičemž výsledky potvrdily pozitivní korelaci mezi všemi druhy parazitů. Nejtěsnější korelace byly mezi tasemnicemi, motolicemi a hlísticemi tj. všemi endohelmintry. Množství trichodin pak nejlépe korelovalo s množstvím hlístic.

Protože jsou hlístice rodu *Anisakis* z nalezených endohelmintů nejvíce patogenní z důvodů jejich výskytu téměř ve všech tkáních těla, byl předpoklad, že při jejich zvýšené intenzitě napadení se také zvýší intenzita napadení trichodinami. Tento předpoklad byl potvrzen, i když korelace mezi oběma parazity nebyla nejtěsnější. To mohlo být způsobeno tím, že některé ryby byly pitvány hned po odchycení a některé byly dány do kádí a pitvány druhý den. Trichodiny jsou schopny se za takto krátkou dobu pomnožit, zatímco počet hlístic, které se tak rychle nezmnouží, zůstal stejný. Tasemnice a motolice s trichodinami korelovaly jen velmi omezeně.

Dalšími důležitými aspekty studie byla druhová příslušnost a pohlaví. Více infikované motolicemi a tasemnicemi byly samice, zatímco v případě trichodin byl rozdíl jen minimální. Existuje několik studií, které se také zabývaly vztahem intenzity parazitace a pohlaví. Například Kuhlmergen-Hille (1983) zjistil u sledů stejné délky

nepatrně vyšší intenzitu parazitů u samic než u samců, tento rozdíl však nebyl statisticky testován. Naopak Hemmingsen et al. (2000) ve své práci uvedl významně vyšší prevalenci nematod čeledi *Anisakidae* u samců tresky obecné z oblasti Balsfjord v severním Norsku a navrhl, že možným důvodem by mohly být rozdíly v potravním chování mezi pohlavími. Naproti tomu Davey (1972) našel u sledů podobný stupeň infekce u obou pohlaví. Podle Banninga a Beckera (1978) na základě znalostí o způsobech infekce i o potravním chování samců a samic není možné předpokládat rozdíly v míře infekce mezi nimi. Protože velikost a kondice byly významnými vysvětlujícími proměnnými v jejich analýzách, autoři předpokládají, že sexuální dimorfismus v potravním chování není pravděpodobný. Zuk and McKean (1996) navrhli testosteron jako možnou příčinu vyšší infekce samců, protože tento hormon může potlačovat jejich imunitní odpověď na infekci. Ve vztahu k druhové příslušnosti bylo celkově více parazitů nalezeno u druhu *M. s.* než u *G. t.*, ale příčina není zcela jasná. Mohla by souviset s rozdílnou bionomií obou druhů a s tím spojenou dominantní potravou. Zatímco *M. s.* žije především na kamenitém dně s porosty řas a v potravě se kromě menších ryb objevují především korýši ze skupiny Amphipoda drobní měkkýši. *G. t.* obývá i nezpevněné dno pokryté sedimenty z ledovců a v jeho potravě dominují především krevety a mnohoštětinatci. Právě různonožci (Amphipoda) jsou mezihostitelé tasemnic *Diplocotyle olriki* a druzí mezihostitelé motolic *Podocotyle atomon*.

Výsledky druhé hypotézy nebyly zcela jednoznačné. V případě koeficientů GSI a LSI statistická analýza ukázala pozitivní korelaci ($p < 0,001$) mezi množstvím parazitů a kondicí ryb, což je v rozporu s prostou logikou. Lepší kondici měl, podle koeficientu GSI, druh *G. t.* a samice. Podobné to bylo také u koeficientu LSI. I přes časté používání GSI, je jeho platnost zpochybňována, protože jak gonády, tak somatická hmotnost mohou být variabilní například ve vztahu k životnímu prostředí či maturaci pohlavních žláz (Jons and Miranda 1997). Navíc somatická hmotnost se u jednotlivce často liší nezávisle na hmotnosti vaječnicků.

V případě koeficientu KK, ukázaly výsledky trend k negativní korelaci s množstvím trichodin a endohelminů, ale tento trend nebyl statisticky dostatečně průkazný ($p < 0,05$). Takže ani v tomto případě se nedalo říci, že zvýšené množství

parazitů odráží sníženou kondici ryb. Co se týče druhové příslušnosti a pohlaví ve vztahu k tomuto koeficientu, tak analýza ukázala téměř shodné výsledky pro oba druhy stejně tak pro samce i samice.

Je evidentní, že výše uvedené indexy nebyly zcela dobrými ukazateli kondice ryb, protože se v nich přespříliš odráží velikost ryby (přeneseně stáří). Jinak řečeno, čím větší je ryba, tím je starší a tím dokáže nashromáždit více parazitů. Tuto teorii potvrdily další statistické analýzy závislosti parazitace na velikosti a celkové hmotnosti ryb. Z nich byla také patrná pozitivní korelace mezi oběma faktory a intenzitou parazitace, kdy tyto modely vysvětlily až 50% variability ($p < 0,001$). Z modelů také vyplývá větší hmotnost i velikost u samic druhu *M.s.* Studie zabývající se tímto fenoménem se ve svých výsledcích liší. Například byl zkoumán možný efekt larev *Anisakis* sp. na faktory kondice u mnoha hostitelských druhů ryb (včetně mořských vranek). Petrushevsky a Kogteva (Margolis 1970) zjistili u vranek pocházejících z Bílého moře snížení kondičního koeficientu se vzrůstající intenzitou parazitace larvami *Anisakis* sp. (Woo 2012). Naproti tomu Podolska a Horbowy (2003), kteří studovali vztah mezi kondičním koeficientem a výskytem larev *Anisakis simplex* u Baltského sledě, došli k závěru, že v dobrých nutričních podmínkách mají ryby dobrou kondici i při vysokém výskytu larev. Za těchto podmínek tedy neměla intenzita infekce žádný vliv na kondici. Tento výsledek se shoduje i s našimi závěry.

7. Závěr

1. Pozitivní korelace mezi intenzitou parazitace trichodinami a endohelmintry byla statisticky průkazná především v případě hlístic, u motolic a tasemnic byla tato korelace průkazná méně.
2. Parazitace nálevníky a endohelmintry nesnižuje kondici ryb. V případě indexů GSI a LSI analýza ukázala pozitivní korelace mezi množstvím parazitů a těmito indexy, což lze vysvětlit stářím hostitelů. V případě KK byl prokázán trend k negativní korelaci s parazity. Tento trend však nebyl dostatečně statisticky průkazný.
3. Z výsledků vyplynulo, že použité koeficienty kondice nejsou vhodným měřítkem patogenního působení parazitů a bylo by přínosnější nalézt nějaký spolehlivější ukazatel kondice, který by eliminoval vliv stáří ryby.

8. Přehled použité literatury

ADL, S. M., SIMPSON, A. G. B., LANE, C. E., et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2012, č. 59, s. 429–514.

ANDERSON, R. C. *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission*. 2. edn. Wallingford: CABI Publishing. 2000, 650s. ISBN: 0851994210.

ARTHUR, J. R., MARGOLIS, L. *Trichodina truttae* Mueller, 1937 (Ciliophora: Peritricha), a common pathogenic ectoparasite of cultured juvenile salmonid fishes in British Columbia: redescription and examination by scanning electron microscopy. *Canadian Journal of Zoology*. 1984, č. 62, s. 1842-1848.

BANCROFT, J. D., STEVENS, A. *Theory and practice of histological techniques*. First published. New York: Churchill Livingstone, 1996. 766s. ISBN 0-443-04760-X.

BANNING, B. BECKER, H. B. Long-term survey data (1965–1972) on the occurrence of *Anisakis* larvae (Nematoda: Ascaridida) in herring, *Clupea harengus* L., from the North Sea. *Journal of Fish Biology*. 1978, č. 2, s. 25–33.

BASSON L, VAN AS J. Trichodinidae and Other Ciliophorans (Phylum Ciliophora). In: Woo PTK (ed) *Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoans and Metazoan Infections*. - 2nd ed. Wallingford: CABI Publishing. 2006, s. 154-182.

BIGELOW, H. B., SCHROEDER, W. C., *Fishes of the Gulf of Maine*. Fishery Bulletin of the Fish and Wildlife Service. 1953, č. 53, s. 452.

CAIRA, J. N., LITTLEWOOD, D. T. Worms, Platyhelminthes. In: Levin S. A. (ed.) Encyclopedia of Biodiversity, vol 5. Academic, New York. 2001, s. 863-899.

CAKE, E. W. Larval cestode parasite of edible mollusks of the Northeastern Gulf of Mexico, Gulf Research Reports. 1978, č. 6, s. 1-8.

COUTURE, C., MEASURES, L., GAGNON, J., DESBIENS, C. Human intestinal anisakiosis due to consumption of raw salmon. The American Journal of Surgical Pathology. 2003, č. 27, s. 1167-1172.

CRIBB, T. H., BRAY, R. A., OLSON, P. D., LITTLEWOOD, D. T. J., Life cycle evolution in the Digenea: a new perspective from phylogeny. Advances in Parasitology. 2003, č. 54, s. 197-254.

CUBILLOS, L. A., CLARAMUNT, G. Length-structured analysis of the reproductive season of anchovy and common sardine off central southern Chile. Mar Biol. 2009, č. 156, s. 1673–1680.

ČECH, S., HORSKÝ, D. Přehled obecné histologie. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 140s. ISBN 80-210-3854-3.

DAVEY, T. J. The incidence of *Anisakis* sp. larvae (Nematoda: Ascaridata) in the commercially exploited stocks of herring (*Clupea harengus* L., 1758)(Pisces: Clupeidae) in British and adjacent waters. Journal of Fish Biology. 1972, č. 4, s. 535–554.

GUNDERSON, D. R. Trade-off between reproductive effort and adult survival in oviparous and viviparous fishes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science. 1997, č. 54, s. 990–998.

HEMMINGSSEN, W., HALVORSEN, O., MACKENZIE, K. The occurrence of some metazoan parasites of Atlantic cod, *Gadus morhua* L., in relation to age and sex of the host in Balsfjord, North Norway. *Polar Biology*. 2000, č. 23, s. 368–372.

HOFFMAN, G. L. and LOM, J. Observations on *Tripartiella Bursiformis*, *Trichodina nigra* and a pathogenic trichodinid, *Trichodina fultoni*. *Bulletin of the Wildlife Disease Assotiation*. 1967, č. 3, s. 156-159.

HORÁK, P., SCHOLZ, T. *Biologie helmintů*. Karolinum (skripta). 1998, s. 139.

HORÁK, P., *Motolice – parazitičtí červi s nejkomplicovanějšími životními cykly*, *Živa*. 2010, č. 5, s. 230-232.

HUMASON G. L. *Animal Tissue Techniques*. W. H. Freeman and company. San Francisko. 1962, s. 1-468.

IMAI, S., TSURIMAKI, S., GOTO, E., WAKITA, K. and HATAI, K. *Tetrahymena* infection in guppy, *Poecilia reticulata*. *Fish Pathology*. 2000, č. 35, s. 67-72.

JELÍNEK, R., DOSTAL, M., LIKOVSKY, Z., HALAŠKOVÁ, M., MAŇÁKOVÁ, E., PETERKA, M., PETERKOVÁ, R., TITLBACH, M., VELICKÝ, J., ZEMANOVÁ, Z. *Histologie embryologie*. [online]. 19. 7. 2007 [cit. 2014-03-22] Dostupné z: <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>.

JONS, G. D., MIRANDA, L. E. Ovarian weight as an index of fecundity, maturity, and spawning periodicity. *J Fish Biology*. 1997, č. 50, s. 150–156.

KAPPEL, C. M. O., MEASURES, L., MOELLER, L. N., FORBES, L., GAJADHAR, A. Experimental *Trichinella* infection in seals. International Journal for Parasitology. 2003, č. 33, s. 1463-1470.

KENT, M. L., FOURNIE, J. W. Parasites of fishes, In: Baker DG, editor. Flynn's parasites of laboratory animals, 2nd ed. Ames (IA): Blackwell Publishing, New York. 2007, s 69-110.

KHALIL, L. F., JONES, A., BRAY, R. A. Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates. Wallingford: CABI International, Wallingford. 1994, 751s. ISBN-13: 978-1-84593-571-9.

KHAN, R. A. Chronic exposure and decontamination of a marine sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) to polychlorinated biphenyls using selected body indices, blood values, histopathology and parasites as bioindicators. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 2011, č. 60. s. 479-485.

KHAN, R. A. Mortality in Atlantic salmon (*Salmo salar*) associated with trichodinid ciliates. Journal of Wildlife Diseases. 1991a, č. 27, s. 153–155.

KOŘÍNKOVÁ, K. Obecná parazitologie, distanční opory pro kombinované studium biologie. 1. vydání: Univerzita J. E. Purkyně v Ústí nad Labem, Přírodovědecká fakulta, 2006. 91s. ISBN 80-704-479-82.

KRUGER, J., VAN AS, J. G. And BASSON, L. Observations on the adhesive disc of *Trichodina xenopodos* Fantham, 1924 and *Trichodina heterodontata* Duncan, 1977 (Ciliophora: Peritricha) during binary fission. Acta Protozoologica. 1995, č. 34, s. 203-209.

KUHLMORGEN-HILLE, G. Infestation with larvae of *Anisakis* spec. as a biological tag of herring in sub-division 22, Western Baltic Sea. ICES CM. 1983, č. 11, s. 7.

KUKLIN, V., KUKLINA, M., KISOVA, N., E. Species composition and seasonal dynamics of the helminthofauna of the bullroak (*Myoxocephalus scorpius*, Cottidae) from Kola Bay of the Barents sea. *Zoologičeskij žurnal*. 2012, č. 91, s. 131-137.

LAMBERT, Y., YARAGINA, N. A., KRAUS, G., MARTEINSDOTTIR, G., WRIGHT, P. J. Using environmental and biological indices as proxies for egg and larval production of marine fish. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*. 2003, č. 33, s. 115–159.

LOM, J. Ciliophora (Ciliates). In: Rohde, K. (ED) *Marine Parasitology*. 2005, Wallingford, s. 37-41.

LOM, J., DYKOVÁ, I. Protozoan parasites of fishes. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. Elsevier: Amsterdam. 1992, č. 26, s. 315.

LYNN, D. H. Morphology or molecules: how do we identify the major lineages of ciliates (Phylum Ciliophora)? *European Journal of Protistology*. 2003, č. 39, s. 356-364.

MAŇÁKOVÁ, E., SEICHERTOVÁ, A. *Metody v histologii*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-0230-X.

MARGOLIS, L. Nematode diseases of marine fishes. In: Snieszko, S. F.(ed.) *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*. American Fisheries Society Washington D. C: 1970. s. 190-208.

MILLS, C. A., ELORANTA, A. Reproductive strategies in the stone loach, *Noemacheilus barbatulus*. *Oikos*. 1985, č. 44, s. 341–349.

MITCHELL, M. A. Parasites of amphibians, In: Baker DG, editor. *Flynn's parasites of laboratory animals*, 2nd ed. Ames (IA): Blackwell Publishing. 2007, s. 118-171.

MORAVEC, F. Metazoan parasites of salmonid fishes of Europe, Academia, Praha. 2004, s. 51-360, ISBN 80-200-1189-7.

OLSON, P. D., CRIBB, T. H., TKACH, V. V., BRAY, R. A., LITTLEWOOD, D. T. J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology*. 2003, č. 22, s. 733-755.

PALM, H. W., DOBBERSTEIN, R. C. Occurrence of trichodinid ciliates (Peritricha: Urceolariidae) in the Kiel Fjord, Baltic Sea, and its possible use as a biological indicator. *Parasitology Research*. 1999, č. 85, s. 726-732.

PESSIER, A. J. Edematous frogs, urinary tract disease, and disorders of fluid balance in amphibians. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2009, č. 18, s. 4–13.

PODOLSKA, M., HORBOWY, J. Infection of Baltic herring (*Clupea harengus membras*) with *Anisakis simplex* larvae, 1992-1999: a statistical analysis using generalized linear models. *Journal of Marine Science*. 2003, č. 60, s. 85-93.

PROKOFIEV, V. V. The influence of temperature and salinity on the survival of free living cercariae of the marine trepatodes *Podocotyle atomon* (Opecoelidae) and *Renicola thaidus* (Renicolidae). *Parazitologia*. 2001, č. 35, s. 69-76.

RASKOVIC, B., POLESKIC, V., ZIVIC, I. and SPASIC, M. Histology of carp gills and pond water quality in semiintensive production. Bulgarian Journal of Agricultural Science 2010, č. 23, s. 253-262.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2013.

ROBERTS, H. E, PALMEIRO B, SCOTT W. E., Bacterial and parasitic diseases of pet fish. Veterinary Clinic of North America: Exotic Animal Practice. 2009, č. 12, s. 609–638.

ROBERTS, L. S., JANOBY, J. Foundations of parasitology 7th Edition/International Edition. 2005, s. 45 ISBN: 0071252517

ROHDE, K. Marine Parasitology: Helminths parasites. United Kingdom: CABI. 2005, s. 37-104, ISBN 0 643 09025 8.

TER BRAAK, C. J. F., ŠMILAUER, P., CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca (NY) 2002.

TOUŠEK, A. Živá země [online]. 1. 1. 2008 [cit. 2014-03-19]. Dostupné z <http://zivazeme.cz/atlas-ryb/pulec-ostnity>.

VACEK, Z. Histologie a histologická technika I. část, Avicenum, Praha 1. 1996, s. 264-353, ISBN: 80-7013-201-9.

VOLF, P., HORÁK, P. a kol. Paraziti a jejich biologie. Praha: Triton. 2007, s. 13-16, ISBN 978-80-7387-008-9.

WILLIAMS, H., JONES, A. Parasitic Worms of Fish. *Folia Parasitologica*. 1994, č. 41, s. 38.

WOO, P. T. K., BUCHMANN, K. Fish parasites: pathology and protection. CABI, UK. 2012. s. 400, ISBN: 13: 978-1-84593-806-2.

YEMMEN C., QUILICHINI Y., KTARI M. H., MARCHAND B., BAHRI S. Morphological, ecological, and histopathological studies of *Trichodina gobii* Raabe, 1959 (Ciliophora: Peritrichida) infecting the gills of *Solea egyptica*. *Protistology*. 2010, č. 6, s. 258–263.

YEOMANS, W. E., CHUBB, J. C., SWEETING, R. A. Use of protozoan communities for pollution monitoring. *Parassitologia*. 1997, č. 39, s. 201-212.

ZUK, M., MCKEAN, K. A. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *International Journal for Parasitology*. 1996, č. 26, s. 1009–1024.

9. Přílohy

Příloha 1. Parametry chycených ryb a vypočítané kondiční faktory

Číslo vzorku ¹	Druhov ^á příslušnost	Pohlaví ²	Velikost ryby (cm)	Celková hmotnost (g)	Hmotnost gonád (g)	Hmotnost jater (g)	Fish fitness		
							GSI ³ (%)	LSI ⁴ (%)	K. k. ⁵ (%)
B 29 (1)	M. scorp.	F	16.4	89.67	2.06	3.00	2.30	3.35	2.03
B 31 (1,2)	M. scorp.	F	12.3	64.08	0.92	1.90	1.44	2.96	3.44
B 32 (1)	M. scorp.	F	15.8	185.53	6.33	7.13	3.41	3.84	4.70
B 33 (2)	M. scorp.	F	16.2	153.43	4.90	5.75	3.19	3.75	3.61
B 34 (1)	M. scorp.	F	15.4	92.37	2.18	3.12	2.36	3.38	2.53
B 35 (1)	M. scorp.	F	15.8	91.24	2.13	3.07	2.33	3.36	2.31
B 38 (2)	M. scorp.	M	13.8	57.79	0.64	1.63	1.11	2.82	2.20
B 41 (2)	M. scorp.	F	21.2	209.33	7.39	8.16	3.53	3.90	2.20
B 42 (2)	M. scorp.	F	18.8	136.59	4.15	5.02	3.04	3.68	2.06
B 43 (1)	M. scorp.	M	17.2	83.83	1.80	2.75	2.15	3.28	1.65
B 44 (2)	M. scorp.	F	17.0	99.77	2.51	3.44	2.52	3.44	2.03
B 45 (2)	M. scorp.	F	16.0	106.06	2.79	3.71	2.63	3.50	2.59
B 59 (2)	M. scorp.	M	9.9	57.12	0.61	1.60	1.07	2.80	5.89
B 60 (1)	M. scorp.	F	23.5	337.52	13.10	13.68	3.88	4.05	2.60
B 63 (2)	M. scorp.	F	20.7	248.39	9.13	9.84	3.68	3.96	2.80
B 64 (1,2)	M. scorp.	F	22.5	248.17	9.12	9.83	3.67	3.96	2.18
B 66 (1)	M. scorp.	F	20.8	234.25	8.50	9.23	3.63	3.94	2.60
B 72 (2)	M. scorp.	F	17.1	122.22	3.51	4.40	2.87	3.60	2.44
B 73 (2)	M. scorp.	F	14.9	70.59	1.21	2.18	1.71	3.09	2.13
B 75 (2)	M. scorp.	F	15.6	89.00	2.03	2.97	2.28	3.34	2.34
B 77 (1)	M. scorp.	F	15.1	93.49	2.23	3.17	2.39	3.39	2.72
B 78 (1)	M. scorp.	F	16.4	102.92	2.65	3.57	2.57	3.47	2.33
B 81 (1)	M. scorp.	F	13.3	83.39	1.78	2.73	2.13	3.27	3.54
B 82 (1)	M. scorp.	M	10.1	53.30	0.44	1.43	0.83	2.69	5.17
B 106 (2)	M. scorp.	F	18.7	126.94	3.72	4.61	2.93	3.63	1.94
B 153 (2)	M. scorp.	F	16.8	167.57	5.53	6.36	3.30	3.80	3.53
B 154 (1,2)	M. scorp.	F	16.2	73.96	1.36	2.32	1.84	3.14	1.74
B 155 (1)	M. scorp.	F	20.5	156.35	5.03	5.88	3.22	3.76	1.81
B 156 (2)	M. scorp.	F	14.5	83.83	1.80	2.75	2.15	3.28	2.75
B 157 (2)	M. scorp.	F	16.5	69.24	1.15	2.12	1.66	3.06	1.54
B 158 (1)	M. scorp.	F	20.2	178.12	6.00	6.81	3.37	3.83	2.16
B 159 (1)	M. scorp.	F	20.0	181.49	6.15	6.96	3.39	3.83	2.27

B 160 (2)	M. scorp.	F	16.7	89.45	2.05	2.99	2.29	3.34	1.92
B 161 (1)	M. scorp.	M	13.0	56.89	0.60	1.59	1.05	2.79	2.59
B 162 (2)	M. scorp.	F	12.0	52.85	0.42	1.41	0.79	2.68	3.06
B 163 (1)	M. scorp.	F	16.2	110.55	2.99	3.90	2.70	3.53	2.60
B 167 (2)	M. scorp.	M	11.0	51.51	0.36	1.36	0.70	2.63	3.87
B 169 (2)	M. scorp.	M	13.0	63.85	0.91	1.89	1.43	2.96	2.91
B 177 (1,2)	M. scorp.	M	12.50	57.12	0.61	1.60	1.07	2.80	3
B 178 (1)	M. scorp.	F	14.00	75.75	1.44	2.40	1.90	3.17	3
B 179 (2)	M. scorp.	F	17.00	127.84	3.76	4.65	2.94	3.63	3
B 180 (1,2)	M. scorp.	F	16.50	88.32	2.00	2.94	2.26	3.33	2
B 181 (1,2)	M. scorp.	M	12.00	58.47	0.67	1.66	1.15	2.83	3
B 182 (2)	M. scorp.	M	11.00	55.77	0.55	1.54	0.99	2.76	4
B 201 (1,2)	M. scorp.	F	19.00	139.96	4.30	5.17	3.07	3.69	2
B 205 (2)	M. scorp.	F	17.30	131.88	3.94	4.82	2.99	3.66	3
B 207 (1)	M. scorp.	F	20.70	148.49	4.68	5.54	3.15	3.73	2
B 208 (1,2)	M. scorp.	F	17.40	182.17	6.18	6.99	3.39	3.84	3
B 209 (2)	M. scorp.	F	17.60	140.63	4.33	5.20	3.08	3.70	3
D 2 (2)	M. scorp.	F	17.50	130.55	6.72	3.55	5.15	2.72	2
D 3 (1)	M. scorp.	F	23.50	365.21	12.20	21.09	3.34	5.77	3
D 6 (2)	M. scorp.	F	23.20	203.92	8.26	8.69	4.05	4.26	2
D 7 (1)	M. scorp.	F	22.40	329.37	9.25	9.78	2.81	2.97	3
D 11 (1)	M. scorp.	F	16.90	95.08	2.89	3.90	3.04	4.10	2
D 12 (1,2)	M. scorp.	F	12.00	55.90	1.53	2.16	2.74	3.86	3
D 13 (1)	M. scorp.	M	12.80	52.88	1.40	1.06	2.65	2.00	3
D 14 (2)	M. scorp.	M	10.00	22.55	0.33	0.51	1.46	2.26	2
D 15 (1)	M. scorp.	F	16.60	87.61	1.53	3.26	1.75	3.72	2
D 17 (2)	M. scorp.	F	17.10	134.01	3.54	6.54	2.64	4.88	3
D 18 (1,2)	M. scorp.	F	17.80	133.01	3.50	5.33	2.63	4.00	2
D 20 (2)	M. scorp.	F	15.20	90.98	2.26	3.46	2.48	3.80	3
D 22 (2)	M. scorp.	F	13.20	69.39	1.24	3.12	1.79	4.49	3
D 23 (2)	M. scorp.	M	13.70	64.03	0.67	1.93	1.05	3.01	2
D 25 (1,2)	M. scorp.	M	12.70	52.64	0.86	2.02	1.63	3.84	3
D 68 (1,2)	M. scorp.	M	10.90	20.48	0.27	0.41	1.32	2.00	2
D 69 (1,2))	M. scorp.	F	13.30	41.48	0.70	0.87	1.69	2.01	2
D 70 (1,2)	M. scorp.	M	11.90	35.85	0.65	0.71	1.81	1.98	2
D 72 (1,2)	M. scorp.	F	13.70	87.43	2.10	4.12	2.40	4.71	3
D 74 (1,2)	M. scorp.	F	25.00	450.57	18.64	21.38	4.14	4.75	3
D 75 (1,2)	M. scorp.	M	22.00	251.60	10.16	10.80	4.04	4.29	2
D 79 (1,2)	M. scorp.	F	19.50	180.55	7.35	9.03	4.07	5.00	2
D 81 (1,2)	M. scorp.	M	16.50	96.50	2.56	3.65	2.65	3.78	2

D 83 (1,2)	M. scorp.	M	17.00	127.60	2.46	5.39	1.93	1.87	3
D 84 (1,2)	M. scorp.	F	18.50	143.68	2.70	5.76	1.88	4.01	2
D 90 (1,2)	M. scorp.	F	22.10	252.50	12.54	10.71	4.97	4.24	2
D 93 (1,2)	M. scorp.	F	16.30	102.21	0.89	1.28	0.87	1.25	2
D 104 (1,2)	M. scorp.	F	22.60	306.29	12.30	10.53	4.02	3.44	3
D 105 (2)	M. scorp.	F	21.10	293.15	10.45	9.56	3.56	3.26	3
D 106 (1)	M. scorp.	F	24.00	185.77	4.50	4.99	2.42	2.69	1
D 107 (1,2)	M. scorp.	F	19.50	182.06	4.60	6.18	2.53	3.39	2
D 108 (1,2)	M. scorp.	F	19.20	176.48	5.90	6.81	3.34	3.86	2
D 109 (1)	M. scorp.	F	18.70	169.33	5.82	8.61	3.44	5.08	3
D 110 (2)	M. scorp.	F	15.20	93.45	1.97	2.65	2.11	2.84	3
D 111 (1,2)	M. scorp.	F	12.60	55.69	1.12	1.07	2.01	1.92	3
D 112 (1,2)	M. scorp.	F	13.30	107.12	1.39	2.76	1.30	2.58	5
D 113 (1,2)	M. scorp.	M	15.90	113.72	1.85	3.45	1.63	3.03	3
D 114 (1)	M. scorp.	F	16.40	105.00	2.88	3.25	2.74	3.10	2
D 115 (1,2)	M. scorp.	M	11.40	47.41	0.55	1.19	1.16	2.51	3
D 116 (1,2)	M. scorp.	F	11.90	49.97	0.80	1.03	1.60	2.06	3
D 117 (1,2)	M. scorp.	M	12.80	68.21	0.75	1.17	1.10	1.72	3
D 118 (1,2)	M. scorp.	M	12.40	50.80	0.30	0.99	0.59	1.95	3
D 124 (1)	M. scorp.	M	13.50	43.80	0.69	0.84	1.58	1.92	2
D 125 (1,2)	M. scorp.	M	11.50	30.60	0.25	0.56	0.82	1.83	2
D 126 (2)	M. scorp.	M	14.00	56.66	0.56	1.80	0.99	3.18	2
D 128 (1,2)	M. scorp.	M	12.40	26.20	0.55	0.50	2.10	1.91	1
D 129 (1,2)	M. scorp.	F	11.70	31.85	0.37	0.57	1.16	1.79	2
D 131 (1)	M. scorp.	M	13.00	54.10	0.73	1.62	1.35	2.99	2
D 134 (1)	M. scorp.	F	16.50	126.10	3.80	3.89	3.01	3.08	3
D 135 (1,2)	M. scorp.	M	15.50	89.70	1.00	4.34	1.11	4.84	2
D 137 (1)	M. scorp.	F	17.00	97.20	3.66	2.96	3.77	3.05	2
D 139 (1,2)	M. scorp.	M	16.00	78.30	1.95	2.38	2.49	3.04	2
D 140 (1,2)	M. scorp.	F	14.00	48.00	0.72	1.53	1.50	3.19	2
D 141 (1,2)	M. scorp.	F	13.50	52.16	0.73	1.38	1.40	2.65	2
D 142 (1,2)	M. scorp.	F	12.90	52.96	0.83	1.31	1.57	2.47	2
D 144 (1,2)	M. scorp.	F	19.00	139.20	4.66	5.34	3.35	3.84	2
D 175 (1,2)	M. scorp.	F	17.70	115.36	3.04	4.27	2.64	3.70	2
D 183 (1,2)	M. scorp.	M	16.20	98.33	1.87	4.81	1.90	4.89	2
D 184 (1,2)	M. scorp.	F	21.20	218.67	2.15	6.19	0.98	2.83	2
D 185 (1,2)	M. scorp.	M	15.40	76.11	2.35	1.52	3.09	2.00	2
B 28 (1)	M. scorp.	F	13.40	50.50	1.91	2.04	3.78	4.03	2
B 36 (2)	M. scorp.	F	13.00	50.27	1.89	2.02	3.76	4.01	2
B 39 (2)	M. scorp.	F	16.70	66.59	3.33	3.35	5.00	5.04	1

B 56 (2)	M. scorp.	F	11.70	46.65	1.57	1.72	3.37	3.69	3
B 58 (1)	M. scorp.	F	11.80	46.08	1.52	1.68	3.30	3.64	3
B 76 (2)	M. scorp.	F	17.70	61.26	2.86	2.92	4.67	4.76	1
B 152 (2)	M. scorp.	F	16.00	66.93	3.36	3.38	5.02	5.05	2
B 164 (1)	G. tricusp.	F	14.70	75.42	4.11	4.08	5.45	5.41	2
B 166 (1)	G. tricusp.	F	11.20	42.46	1.20	1.38	2.83	3.25	3
B 168 (1)	G. tricusp.	F	11.70	44.38	1.37	1.54	3.09	3.46	3
B 170 (2)	G. tricusp.	F	14.50	71.34	3.75	3.74	5.26	5.25	2
B 197 (2)	G. tricusp.	F	10.40	43.93	1.33	1.50	3.03	3.41	4
B 198 (2)	G. tricusp.	F	13.50	44.04	1.34	1.51	3.04	3.42	2
B 199 (1)	G. tricusp.	F	13.50	42.34	1.19	1.37	2.81	3.23	2
B 200 (1)	G. tricusp.	F	11.20	44.72	1.40	1.56	3.13	3.50	3
B 202 (1,2)	G. tricusp.	F	14.60	105.78	6.79	6.56	6.42	6.20	3
D 9 (1)	G. tricusp.	F	10.80	32.25	0.21	0.74	0.65	2.29	3
D 19 (1)	G. tricusp.	F	14.10	77.09	6.22	2.79	8.07	3.62	3
D 24 (1)	G. tricusp.	F	13.40	53.36	2.40	2.32	4.50	4.35	2
D 27 (2)	G. tricusp.	F	14.20	57.52	2.59	2.65	4.50	4.61	2
D 28 (2)	G. tricusp.	F	14.60	61.69	2.97	2.91	4.81	4.72	2
D 64 (1,2)	G. tricusp.	F	9.50	20.03	0.47	0.53	2.35	2.65	2
D 66 (1,2)	G. tricusp.	F	14.70	55.82	2.16	2.62	3.87	4.69	2
D 67 (1,2)	G. tricusp.	F	14.40	50.96	1.71	2.23	3.36	4.38	2
D 73 (1,2)	G. tricusp.	F	12.00	43.00	1.21	1.29	2.81	3.00	2
D 76 (1)	G. tricusp.	M	12.80	39.98	1.54	1.45	3.85	3.63	2
D 78 (1,2)	G. tricusp.	M	10.50	21.00	0.54	0.57	2.57	2.71	2
D 91 (1,2)	G. tricusp.	F	15.50	60.94	2.49	3.84	4.09	6.30	2

¹Označení jednotlivých ryb, B označuje ryby odchycené v roce 2011 a D v roce 2012.

²Označení pohlaví ryb, M samec, F samice.

³GSI, gonadosomatický index

⁴LSI, hepatosomatický index

⁵KK, koeficient kondice