

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie



Bakalářská práce

**Diverzita larválních stádií tasemnic čeledi
Gryporhynchidae (Cestoda: Cyclophyllidea)
z cichlidních ryb (Perciformes: Cichlidae)
jižní Afriky**

Lucie Uhrová

Školitel: Prof. RNDr. Tomáš Scholz, CSc.

Školitel-specialista: RNDr. Jan Brabec, Ph.D.

České Budějovice 2016

Uhrová L. 2016: Diverzita larválních stádií tasemnic čeledi Gryporhynchidae (Cestoda: Cyclophyllidea) z cichlidních ryb (Perciformes: Cichlidae) jižní Afriky.

[Diversity of larval stages of the family Gryporhynchidae (Cestoda: Cyclophyllidea) in cichlid fish (Perciformes: Cichlidae) from southern Africa. Bc. Thesis, in Czech]- 34 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice.

Annotation:

This thesis represents a morphological and the first molecular phylogenetic survey of the larval stages of tapeworms of the family Gryporhynchidae (Cestoda: Cyclophyllidea) from the cichlid fish (Perciformes: Cichlidae) from three African countries (Burundi, South Africa, Zimbabwe).

Tato práce byla částečně financována z grantového projektu GA ČR č. P505/12/G112 (European Centre of Ichthyoparasitology; spoluřešitel T. Scholz).

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 Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích 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 22. dubna 2016

.....
Lucie Uhrová

PODĚKOVÁNÍ

Velice ráda bych poděkovala zejména svým školitelům Tomášovi Scholzovi a Janu Brabcovi za odborné vedení práce, rady, velkou trpělivost a podporu. Mé poděkování patří také Ivě Přikrylové a Šárce Mašové za sběr materiálu, dále pak Romanovi Kuchtovi, Martině Borovkové, Blance Škoríkové, Kateřině Leštinové a Janě Roháčové za praktické rady, podporu a přátelskou atmosféru v laboratoři helmintologie. Na závěr bych ráda poděkovala celé své rodině za podporu a trpělivost.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2. 1. Charakteristika čeledi Gryporhynchidae	2
2. 2. Morfologie	2
2. 3. Životní cykly	3
3. CÍLE PRÁCE	5
4. MATERIÁL A METODIKA	6
4. 1. Studovaný materiál	6
4. 2. Morfologicko-taxonomické studium	7
4. 3. Molekulárně-fylogenetická analýza	8
4. 3. 1. Izolace DNA, PCR amplifikace a sekvenování	8
4. 3. 2. Fylogenetická analýza	9
5. VÝSLEDKY	11
5. 1. Systematický přehled zjištěných tasemnic čeledi Gryporhynchidae z cichlidních ryb	11
5. 2. Přehled rybích mezihostitelů a jejich larev čeledi Gryporhynchidae	23
5. 3. Molekulární fylogeneze	24
6. DISKUZE	26
7. ZÁVĚR	29
8. ABSTRACT	30
9. LITERATURA	31

1. ÚVOD

Tasemnice (Platyhelminthes: Cestoda) jsou bezobratlí, výhradně parazitičtí živočichové. Jde o cizopasníky, kteří mají ve většině případů vícehostitelské životní cykly. Jejich výskyt byl prokázán u všech skupin obratlovců včetně člověka. Dospělce nalézáme téměř výhradně v zažívacím traktu (střevě), zatímco larvy mohou být nalezeny v různých orgánech (Roberts a Janovy 2000). S více než 6000 popsányými druhy jsou tasemnice jednou z neúspěšnějších skupin helmintů (Waeschenbach a kol. 2012). Nejpočetnější zastoupení má řád Cyclophyllidea van Beneden, 1900, do kterého řadíme i druhy rodů *Taenia* Linnaeus, 1758 a *Echinococcus* Rudolphi, 1801, jejichž larvy mohou způsobit závažná lidská onemocnění (cysticerkóza, hydatidóza, alveokokóza).

Jednou z čeledí řádu Cyclophyllidea je čeleď Gryporhynchidae, jejíž zástupci byli dlouhou dobu řazeni do čeledi Dilepididae (Bona 1975, 1994). Údaje týkající se druhové diverzity, životních cyklů, hostitelské specifčnosti a zeměpisného rozšíření zástupců této čeledi cizopasíci u rybožravých ptáků řádu Ciconiiformes byly shrnuty v monografii Bony (1975), ale novější údaje prakticky chybějí s výjimkou prací o dospělých a larvách těchto tasemnic v Mexiku (Scholz a kol. 2002, 2004; Ortega-Olivares a kol. 2008).

Na rozdíl od dospělců je znalost larválních stádií cizopasíci ve sladkovodních rybách značně neúplná a z velké míry omezená na Paleartickou a Nearctickou zoogeografickou oblast (Scholz a kol. 2004). Údaje o larvách čeledi Gryporhynchidae z ryb Afriky jsou velmi řídké (Khalil a Polling 1997), přestože recentní nálezy larev těchto tasemnic v rybách rovníkové a jižní Afriky naznačují poměrně bohatou faunu těchto parazitů.

Náplní této bakalářské práce je přispět k lepšímu poznání diverzity zástupců čeledi Gryporhynchidae ve sladkovodních rybách Afriky na základě taxonomického zpracování nových materiálů získaných z Burundi, Jihoafrické republiky a Zimbabwe. Dalším cílem je posouzení jejich příbuzenských vztahů za pomoci metod molekulární fylogenetiky.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2. 1. Charakteristika čeledi Gryporhynchidae

Tasemnice čeledi Gryporhynchidae (Cestoda: Cyclophyllidea) byly dlouho řazeny do čeledi Dilepididae Railliet et Henry, 1909 (viz Bona 1975, 1994). Tito cizopasníci dospívají ve střevě rybožravých ptáků (např. zástupcích řádu Ciconiiformes) a jejich životní cyklus zahrnuje 2 mezihostitele – planktonní korýše a sladkovodní nebo brakické ryby (Bona 1975).

Základními identifikačními znaky na úrovni druhu jsou počet, tvar a velikost háčků nejen dospělých tasemnic, ale i larev (Bona 1975, Scholz a kol. 2004). Na základě morfologických a molekulárních studií byla v souladu s návrhem Spaské a Spaského (1973) potvrzena platnost vyčlenění z čeledi Dilepididae jako samostatné čeledi (Mariaux 1998, Hoberg a kol 1999; <http://tapeworms.uconn.edu/cyclophyllidean/gryporhynchidae.html>).

Larvální stadia čeledi Gryporhynchidae jsou známa již od první poloviny 19. století, kdy von Nordmann (1832) popsal *Gryporhynchus pusillus* ze sladkovodních ryb (viz Baer a Bona 1960, Bona 1975). Většina literárních údajů se však týká pouze tří druhů vyskytujících se v Palearktické oblasti: *Neogryporhynchus cheilancristrotus* (Wedl, 1855), *Paradilepis scolecina* (Rudolphi, 1819) a *Valipora campylancristrota* (Wedl, 1855). Později byli z rybích mezihostitelů popsáni zástupci dalších rodů – *Amirthingamia* Bray, 1974, *Cyclusteria* Fuhrmann, 1901, *Dendrouterina* Fuhrmann, 1912, *Glossocercus* Chander, 1935, *Neogryporhynchus* Baer et Bona, 1960, *Paradilepis* Hsü, 1935, *Parvitaenia* Burt, 1940 a *Valipora* Linton, 1927 (viz Scholz a kol. 2004).

2. 2. Morfologie

Tělo tasemnic čeledi Gryporhynchidae je malých až středních rozměrů, s maximální délkou až 10 cm. Na povrchu skolexu jsou přítomny 4 svalnaté, kruhové přísavky. Rostelární aparát je většinou svalově-žláznatý se zatažitelným rostelem (chobotkem), na kterém jsou umístěny ve dvou řadách sklerotizované háčky. U háčků rozlišujeme tři základní části: rukojeť (handle), výběžek (guard), ostří (blade). Strobila obsahuje 3 až několik desítek kraspedotních proglotid. U dospělců jsou pro klasifikaci důležité znaky pohlavní soustavy. Proglotidy jsou hermafroditické, obsahující současně samčí i samičí pohlavní orgány.

Typickým znakem většiny zástupců je vysoký počet varlat (až několik desítek) a absence semenných váčků (<http://tapeworms.uconn.edu/cyclophyllidean/gryporhynchidae.html>). Důležitá je poloha genitálního póru, velikost a stavba cirového vaku a otrnění kopulačního orgánu, ciru, který je pokryt mikrotrichy (tzv. spinitrichy podle klasifikace Chervy 2002). Podle umístění těchto trnů lze určit některé druhy (Bona 1975). Mezi další znaky řadíme vzájemnou pozici vagíny a cirového vaku. U zralých proglotid zabírá většinu jejich prostoru děloha (Bona 1975, 1994). Její struktura se mění při dozrávání vajíček. Dalším důležitým znakem je také tvar dělohy a počet vajíček v jednotlivých shlucích neboli kapsulách (Bona 1975).

Kromě stavby pohlavní soustavy u dospělých tasemnic je druhová identifikace zástupců čeledi založena na počtu, velikosti a tvaru rostelárních háčků, které se nacházejí v apikální části skolexu (Bona 1975, 1994, Scholz a kol. 2001). Tyto háčky jsou ve většině případů plně zformovány již u larválních stádií v rybách (výjimkou je hyalinní část rukojeti u některých zástupců, např. druhů rodu *Neogryporhynchus*, u kterých tato část plně dorůstá až u dospělých tasemnic). Proto lze určit i larvy druhů této čeledi bez znalosti stavby pohlavní soustavy na rozdíl od larev (metacestod) ostatních skupin tasemnic cizopasících v rybách, které nemají sklerotizované struktury. Metodickým problémem však může být špatná fixace larev, kdy nejsou háčky po stlačení skolexu v jedné rovině a nejsou tedy dobře viditelné či měřitelné.

2. 3. Životní cykly

Vývojové cykly zástupců čeledi Gryporhynchidae nejsou dosud dostatečně známe a existující údaje jsou značně omezené (Beveridge 2001, Scholz a kol. 2004). Podrobnější údaje o výskytu, vývojových cyklech, hostitelské specifitě, lokalizaci a zeměpisném rozšíření existují pouze u tří zástupců cizopasících v palearktické oblasti. Životními cykly těchto zástupců čeledi se zabývala Jarecka (1970a, b), která popsala vývoj druhů *Neogryporhynchus cheilancristrotus*, *Paradilepis scolecina* a *Valipora campylancristrota* v prvním mezihostiteli. U tasemnic zmíněných druhů, studovaných v Polsku, slouží planktonní klanonožci (vznášivky) druhu *Eudiptomus graciloides* jako první mezihostitel (Jarecka 1970a, b). U druhu *N. cheilancristrotus* byl vhodným prvním mezihostitelem i klanonožec *Mesocyclops oithonoides*. Sysolyatina-Andakulova (1979) uvádí z bývalého Sovětského svazu jako dalšího mezihostitele druhu *V. campylancristrota* dalšího klanonožce (vznášivku) druhu *Arctodiptomus salinus*.

Klanonožci se nakazí požitím kulovitého infekčního vajíčka, jehož průměr je 65–72 μm u druhu *V. campylancristrota*, 48–54 μm u *P. scolecina* a 130–160 μm u *N. cheilancristrotus*. Vajíčka obsahují oválnou onkosféru, tzv. hexakant, nesoucí tři páry embryonálních háčků. Larva, která se poté vyvíjí uvnitř klanonožce, se nazývá podle Jarecké (1970) cercoscolex a podle Chervy (2002) merocercoid, což je acystická larva s cercomerem, acetabulárním typem vychlípeného skolexu, který je opatřen 20 háčky (dvě řady po deseti) stejného tvaru jako u dospělé. Larva druhu *V. campylancristrota* má oválný tvar a velikost 250 \times 190 μm . Délka větších háčků je 24–26 μm , menších 10–12 μm . U druhu *N. cheilancristrotus* má larva velikost 120 \times 110 μm . Délka větších rostelárních háčků je 53 μm , menších 35 μm . U druhu *P. scolecina* jsou větší háčky dlouhé 85–90 μm a menší 66–69 μm . Vchlípení (invaginace) skolexu je finální fází při vývoji larvy (Jarecka 1970a, b).

Druhým mezihostitelem, případně paratenickým hostitelem, jsou u tasemnic čeledi Gryporhynchidae ryby ze sladkých a brakických vod (Scholz a kol. 2004). Larvální stadia najdeme u zástupců mnoha rybích řádů, např. Acipenseriformes, Atheriniformes, Clupeiformes, Cypriniformes, Gasterosteiformes, Scorpaeniformes, Siluriformes. Kaprovité ryby (Cypriniformes: Cyprinidae) jsou nejčastějšími druhými mezihostiteli se 47 druhy, u kterých byly nalezeny larvy. Po vniknutí larvy do druhého mezihostitele migrují larvy do žlučníku (např. *V. campylancristrota*), lumenu střeva (např. *N. cheilancristrotus*), jater (např. *Paradilepis scolecina*) nebo mesenteria (Scholz a kol. 2004, Ortega-Olivares a kol. 2014).

Definitivním hostitelem jsou rybožraví ptáci, nejčastěji druhy řádu Ciconiiformes, Accipitriformes, Pelecaniformes a Suliformes (Bona 1975, Ortega-Olivares a kol. 2014). Druh *Glossocercus chelodinae* (MacCallum, 1921) byl dokonce popsán ze sladkovodní australské želvy *Chelodina expansa* (Pichelin et al. 1998).

3. CÍLE PRÁCE

1. Morfologicko-taxonomické zpracování tasemnic čeledi Gryporhynchidae nalezených v afrických sladkovodních rybách (Perciformes: Cichlidae) ze tří států jižní Afriky (Burundi, Jihoafrické republiky a Zimbabwe).
2. Posouzení fylogenetických vztahů těchto tasemnic pomocí analýzy sekvencí části genu kódujícího velkou podjednotku ribozomální RNA (28S rDNA).
3. Analýza druhového složení a hostitelské specifičnosti studovaných larev.

4. MATERIÁL A METODIKA

4. 1. Studovaný materiál

Tabulka 1: Přehled vyšetřených ryb (Perciformes; Cichlidae).

DRUH	ZEMĚ/ LOKALITA	DATUM	MATERIÁL		
			GAP ¹	ETOH ²	4%F ³
<i>Bathybates graueri</i>	Burundi / rybí trh	25. 9. 2013	233/1	233/1	-
<i>Bentochromis tricoti</i>	Burundi / rybí trh	4. 9. 2013	39/ 1	39/1	-
<i>Haplochromis acidens</i>	Zimbabwe / jezero Chivero	23. 8. 2012	72/ 7	-	-
	Zimbabwe / jezero Chivero	24. 8. 2012	70/ 6	70/6	70/6
<i>Ophthalmothilapia nasuta</i>	Burundi / Magara	9. 9. 2013	98/ 2	-	-
<i>Oreochromis niloticus</i>	Zimbabwe / jezero Chivero	23. 8. 2012	68/ 7	68/7	-
<i>Pseudocrenilabrus philander</i>	Jihoafriická republika / Barbespan	27. 10. 2014	C1/ 14– C11/ 14	C1/ 14– C4/ 14	-
	Jihoafriická republika / Barbespan	2015	C1/ 15– C8/ 15	C1/ 15– C8/ 15	-
	Zimbabwe / jezero Kariba	17. 8. 2012	12/7	12/7	-
	Zimbabwe / jezero Chivero	23. 8. 2012	68/7	68/7	-
		23. 8. 2012	74/23	74/23	-
		24. 8. 2012	78/24	78/24	-
		24. 8. 2012	82/25	-	-
		24. 8. 2012	84/26	84/26	-
		24. 8. 2012	85/27	85/27	-
		24. 8. 2012	89/30	89/30	-
	24. 8. 2012	91/31	91/31	-	

<i>Tilapia sparmanii</i>	Zimbabwe / jezero Chivero	20. 8. 2012	54/30	54/30	54/30
		24. 8. 2012	76/1	76/1	76/1
		24. 8. 2012	77/7	77/7	77/7
		24. 8. 2012	-	79/8	-
		24. 8. 2012	90/10	90/10	-
		24. 8. 2012	92/11	92/11	-
<i>Trematocara unimaculatum</i>	Burundi / rybí trh	4. 9. 2013	26/1	26/1	-

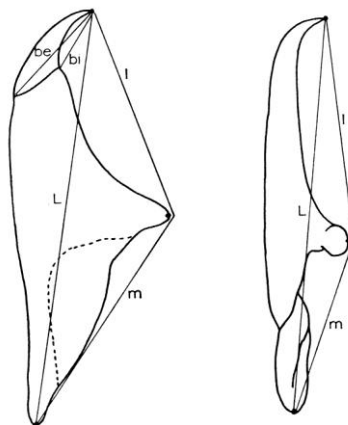
Vysvětlivky: 1 – glycerin-amonium pikrát, 2 – 96% alkohol, 3 – 4 % roztok horkého formaldehydu

4. 2. Morfologicko-taxonomické studium

Výsledky jsou založeny na morfologicko-taxonomické analýze materiálu larválních stádií tasemnic čeledi Gryporhynchidae, který byl získán parazitologickým vyšetřením sladkovodních ryb ve třech afrických státech (Burundi, Jihoafrická republika a Zimbabwe). Přehled vyšetřených ryb, u kterých byly zjištěny larvy, je uveden v Tabulce 1. Materiál z Jihoafrické republiky, Zimbabwe a Burundi byl poskytnut Ivou Přikrylovou a Šárkou Mašovou z Masarykovy univerzity v Brně. Identifikace jednotlivých druhů byla provedena především na základě monografie Bony (1975) a článku (review) Scholze a kol. (2004).

Nalezená larvální stádia byla fixována 96% alkoholem a část horkým formalinem (4% roztokem formaldehydu). Skolex některých jedinců byl fixován po stlačení krycím sklem pomocí směsi glycerin-amonium pikrátu (Scholz a kol. 2004) pro lepší pozorování a měření rostelárních háčků.

Veškerý materiál byl studován mikroskopem Olympus BX51 s diferenciálním interferenčním kontrastem podle Nomarského. Ilustrace byly zhotoveny pomocí kreslicího zařízení a fotografie byly pořízeny pomocí digitální kamery Olympus 5XC-3 v programu Quick Photo; stejným způsobem byly rovněž získány rozměry studovaných struktur, zejména rostelárních háčků. Byly měřeny následující rozměry háčků:



Obr. 1. Měření rostelárních háčků (L – délka háčku, I – délka ostří, m – délka rukojeti) (upraveno podle Bony 1975).

Larvy byly identifikovány na základě rozměrů a tvarů rostelárních háčků, a to především podle monografie zástupců čeledi Dilepididae z ptáků řádů Ciconiiformes (dnes řazen do čeledi Gryphynchidae) (Bona 1975), dále podle prací autorů Baer a Bona (1960) a Scholz a kol. (2002, 2004).

4. 3. Molekulárně-fylogenetická analýza

4. 3. 1. Izolace DNA, PCR amplifikace a sekvenování

K izolaci DNA byly použity vzorky tkáně parazitů fixované v 96% etanolu (viz Tabulka 1). Genomová DNA byla extrahována pomocí komerčně dostupného kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) dle návodu výrobce s tím rozdílem, že závěrečná eluce byla provedena 100 μ l pufru AE. Následně byla izolovaná DNA skladována při -20 $^{\circ}$ C.

Částečné sekvence (domény D1–D3) genu kódujícího velkou podjednotku ribosomální RNA (28S rDNA) byly amplifikovány metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) za využití primerů LSU5 (TAG GTC GAC CCG CTG AAY TTA AGC) a 1500R (CGA AGT TTC CCT CAG GAT AGC) původně publikovanými v práci Olson a kol. (2003). Reakční směs byla připravena v celkovém objemu 25 μ l a obsahovala: 5 μ l 5 \times GoTaq Flexi Buffer (Promega), 2 mM MgCl₂, 2,5 μ g BSA (Promega), 200 μ M dNTPs (Promega), 200 nM forward primeru, 200 nM reverse primeru, 0,5 U GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega) a 2 μ l genomové DNA. Tato směs byla do konečného objemu 25 μ l doplněna dvakrát destilovanou vodou.

Amplifikace genu byla provedena v přístroji T100 Thermocycler (Bio-Rad) za následujících podmínek: počáteční denaturace 95 °C/2 min, 35 cyklů 95 °C/30 s, 60 °C/45 s, 72 °C/1,5 min a závěrečná elongace trvala 5 minut při 72 °C.

Úspěšnost PCR reakce byla zkontrolována elektroforeticky na 1% Tris-Acetate-EDTA (TAE) agarózovém gelu obsahujícím fluorescenční barvivo GelRed (Biotium) v přibližném poměru 1 : 1 000 000. Na gel bylo nanášeno vždy 2 µl PCR produktu smíchaného s 0,5 µl 6× gel loading puffru (H₂O roztok obsahující 0,25% bromphenol blue, 0,25% xylene cyanol, 30% glycerol). Pro zjištění velikosti produktu byl použit marker GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas).

Přítomnost a velikost PCR produktů byla detekována na UV transiluminátoru. Fotodokumentace gelů byla pořizována pomocí digitální kamery a přiloženého počítačového programu Gel Logic 112 Imaging System (Carestream Molecular Imaging).

Pozitivní PCR produkty byly přečištěny enzymaticky, dle protokolu původně publikovaného v práci Werle a kol. (1994), přidáním 6.75 U Exonuclease I (Fermentas) a 1,5 U FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific) ke zbývajícím 23 µl PCR produktu a inkubací při 37 °C/40 min, 80 °C/20 min.

Sekvence PCR produktů byla provedena metodou Sangerova sekvenování firmou GATC Biotech (Konstanz, Německo). PCR produkty byly sekvenovány z obou stran pomocí PCR primerů LSU5 a 1500R a vnitřních primerů 300F (CAA GTA CCG TGA GGG AAA GTT G), 400R (GCA GCT TGA CTA CAC CCG), 900F (CCG TCT TGA AAC ACG GAC CAA G) a ECD2 (CTT GGT CCG TGT TTC AAG ACG GG) (Littlewood a kol. 2000, Olson a kol. 2003). Konsenzuální sekvence PCR amplikonů byly vytvořeny a manuálně zkontrolovány pomocí programu Geneious 8.1.7 (Biomatters). Identita sekvencí byla ověřena pomocí Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) přes webové rozhraní National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nih.gov/BLAST/).

4. 3. 2. Fylogenetická analýza

Nově charakterizované sekvence byly doplněny o sekvence druhů, sloužících jako referenční skupiny (outgroups) *Mesocestoides corti* Hoeppli, 1925 (Cyclophylidea) (AF286920) a *Nippotaenia chaenogobii* Yamaguti, 1939 (Nippotaenidea) (AF286933) stažených z NCBI databáze. Multiple sequence alignment byl vytvořen pomocí algoritmu E-INS-i programem MAFFT 7.017 (Katoh a Standley 2013) implementovaným v programu Geneious. Výsledný alignment byl zkontrolován a všechny nejednoznačně přiřazené pozice byly vyřazeny z následných analýz.

Fylogenetická analýza byla provedena metodou maximum likelihood (ML) v programu PHYML 2.2.0 (Guindon a Gascuel 2003) implementovaným v programu Geneious. První předběžný strom byl zkonstruován metodou neighbour-joining a nejlepší strom byl následně vyhledán pomocí heuristic search metodou subtree pruning and regrafting (SPR). Použitý evoluční model byl GTR + I + Γ . Statistická podpora vnitřních větví byla vyjádřena hodnotami bootstrapu (100 opakování). Výsledný strom byl vizualizován v programu FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

5. VÝSLEDKY

5. 1. Systematický přehled zjištěných tasemnic čeledi

Gryporhynchidae z cichlidních ryb

Amirthalingamia macracantha (Joyeux et Baer, 1935) Bray, 1974 (Obr. 2)

Popis: Larvy podlouhlé, délky 3–5 mm. Skolex se čtyřmi kruhovitými přísavkami a rostelem s dvaceti masivními háčky tří velikostí. V horní řadě najdeme 10 háčků dvou rozměrů čtyři háčky velké (délka 465–475 μm) a šest menších (délka 420–430 μm). Dolní řada nese deset nejmenších háčků (258–270 μm) stejného tvaru a velikosti.

Rybí mezihostitelé: *Haplochromis acidens* (napaden 1 jedinec z 2 vyšetřených), *Pseudocrenilabrus philander* (2/8), *Tilapia sparrmanii* (1/6).

Lokalizace: játra.

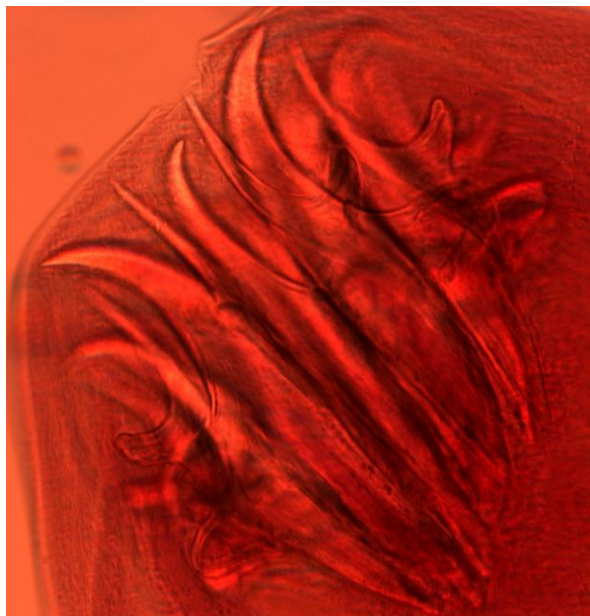
Země: Zimbabwe.

Studovaný materiál: 4 \times GAP (*Haplochromis acidens*, *Pseudocrenilabrus philander*, *Tilapia sparrmanii*), 3 \times ETOH (*Pseudocrenilabrus philander*, *Tilapia sparrmanii*).

Molekulární data: Byly získány sekvence dvou jedinců: u vzorku číslo 89/30 délky 1554 párů bazí (bp), 54/3 délky 1635 bp.

Komentář: Studovaný materiál byl zařazen do monotypického rodu *Amirthalingamia* na základě tvaru robustních háčků (Obr. 2) tří velikostí, což je u tasemnic čeledi Gryporhynchidae výjimečné. Tento druh popsali jako *Paradilepis macracantha* v roce 1935 Joyeux a Baer z kormoránů *Phalacrocorax africanus* (typový hostitel) a *P. carbo* z Mali (Joyeux a Baer 1935). Bray (1974) ustanovil pro tento druh nový rod, *Amirthalingamia*. Larvální stádia popsal Bray (1974) z cichlidní ryby *Tilapia nilotica* (= *Oreochromis niloticus*). Tato tasemnice se vyskytuje výhradně v Africe.

Byly získány sekvence dvou jedinců tohoto druhu, o němž dosud neexistují žádná molekulární data.



Obr. 2. Háčky larvy tasemnice *Amirthalingamia macracantha* z *Tilapia sparrmanni*, Zimbabwe.

***Neogryporhynchus lasiopeius* Baer et Bona, 1960** (Obr. 3)

Popis: Larvy měřící 0,9–1,2 mm s masivním skolexem, čtyřmi kruhovými přísavkami a rostelem, které nese 10 větších (délka 41–47 μm) a 10 menších (délka 26–29 μm) háčků. Velké háčky mají krátkou mírně zahnutou rukojeť a delší, v horní části zahnutou čepel s vystouplým hrbolem. Menší háčky jsou úzké, rovné a v horní části zahnutou čepelí.

Rybí mezihostitelé: *Oreochromis niloticus* (1/1), *Pseudocrenilabrus philander* (7/28), *Tilapia sparrmannii* (3/6), *Trematocara unimaculatum* (1/1).

Lokalizace: lumen střeva.

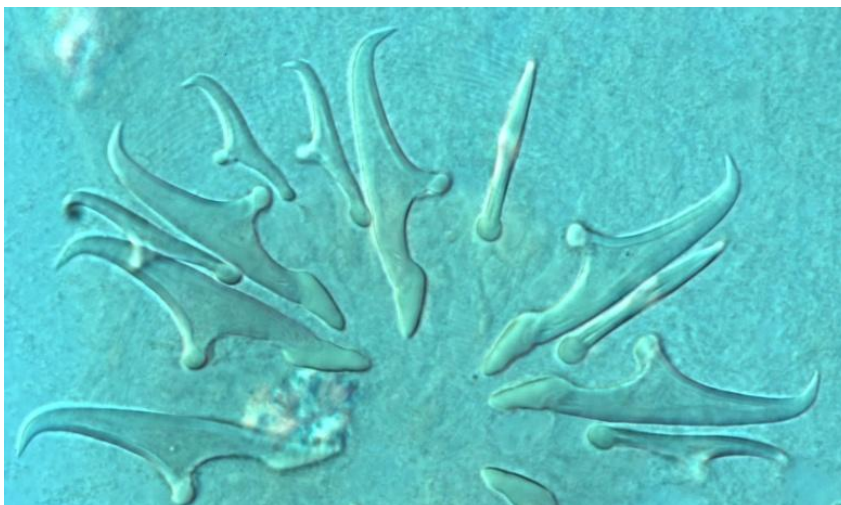
Země: Burundi, Jihoafrická republika, Zimbabwe.

Studovaný materiál: 12 \times GAP (*O. niloticus*, *P. philander*, *T. sparrmannii*, *T. unimaculatum*); 7 \times ETOH (*O. niloticus*, *P. philander*, *T. sparrmannii*, *T. unimaculatum*).

Molekulární data: nepodařilo se získat žádné sekvence tohoto druhu, z žádného ze sedmi vzorků fixovaných v alkoholu.

Komentář: Studovaný materiál byl identifikován podle tvaru a velikosti jednotlivých háčků, které jsou středního vzrůstu s menší, v horní části zahnutou čepelí a vystouplým hrbolem

(Obr. 3). Tento druh byl poprvé popsán Baerem a Bonou v roce 1960 z volavky *Ardea purpurea* (typový hostitel) ve Francii a doposud byl nalezen v palearktické zoogeografické oblasti a v Africe. Larvální stádia tohoto druhu byla nalezena poprvé v rybách viz Tabulka 3.



Obr. 3. Háčky larválního stádia tasemnice *Neogryporhynchus lasiopeius* z *Pseudocrenilabrus philander*, Jihoafrická republika.

***Paradilepis delachauxi* (Fuhrmann, 1909) Joyeux et Baer, 1935** (Obr. 4)

Popis: Larvy se skolexem se čtyřmi kruhovitými přísavkami a rostelem s 10 většími (délka 125–132 μm) a 10 menšími (délka 90–96 μm) háčky. Charakteristické pro tento druh jsou především menší háčky, které jsou masivní s krátkým, zahnutým ostřím a robustním hrbolem.

Rybí mezihostitelé: *Haplochromis acidens* (1/2), *Pseudocrenilabrus philander* (2/8).

Lokalizace: játra.

Země: Zimbabwe.

Studovaný materiál: 3 \times GAP (*H. acidens*, *P. philander*); 2 \times ETOH (*H. acidens*, *P. philander*).

Molekulární data: nepodařilo se získat žádné sekvence tohoto druhu, z žádného vzorku fixovaného v alkoholu.

Komentář: Studovaný materiál byl identifikován podle velikosti a tvaru robustních háčků na skolexu, které jsou velké s kratší, ostřeji zahnutou čepelí a masivním hrbolem (Obr. 4). Druh

byl popsán v roce 1909 Fuhrmannem podle dospělců z kormorána *Phalacrocorax africanus* jako *Oligorchis delachauxi* Fuhrmann, 1909. Joyeux a Baer (1935) druh přeřadili do rodu *Paradilepis* jako novou kombinaci *Paradilepis delachauxi*. Tento druh se vyskytuje pouze v Africe.



Obr. 4. Háčky larválního stádia tasemnice *Paradilepis delachauxi* z *Haplochromis acidens*, Zimbabwe.

***Paradilepis maleki* Khalil, 1961** (Obr. 5)

Popis: Larvy mají na skolexu čtyři kruhové přísavky a rostelum s deseti většími (délka 94–99 μm) a deseti menšími (délka 64–70 μm) háčky. Vyznačují se především úzkou, dlouhou čepelí a charakteristickým masivnějším hrbolem, pomocí kterému rozeznáme tento druh od druhu *Paradilepis scolecina*.

Rybí mezihostitel: *Bentochromis tricoti* (1/1), *Pseudocrenilabrus philander* (5/18).

Lokalizace: játra, žlučník.

Země: Burundi, Jihoafrická republika.

Studovaný materiál: 6 \times GAP (*B. tricoti*, *P. philander*); 4 \times ETOH (*B. tricoti*, *P. philander*).

Molekulární data: Byly získány sekvence tří jedinců: u vzorku číslo C5/15 délky 1645 bp, C4/14 délky 1690 bp, C2/15 délky 1603 bp.

Komentář: Studovaný materiál byl identifikován podle tvaru a velikosti háčků. Pro ty je specifické dlouhé, úzké, lehce zahnuté ostří a charakteristický masivnější hrbol u velkých háčků (Obr. 5). Tento druh byl popsán Khalilem v roce 1961 z ibisa *Threskiornis aethiopicus* (Pelecaniformes) v Súdánu (Bona 1975). Tento druh byl dosud nalezen pouze v Africe. Larvální stádia z ryb byla nalezena poprvé viz Tabulka 3.



Obr. 5. Háčky larválního stádia tasemnice *Paradilepis maleki* z *Pseudocrenilabrus philander*, Jihoafrická republika.

***Paradilepis scolecina* (Rudolphi, 1819) Hsü, 1935** (Obr. 6)

Popis: Larvy mají na skolexu čtyři kruhové přísavky a rostelum s deseti většími (délka 132–136 μm) a deseti menšími (délka 75–81 μm) háčky, které se vyznačují dlouhým, zahnutým ostřím a užším, vystouplým hrbolem, díky kterému rozeznáme tento druh od druhu *Paradilepis maleki*.

Rybí mezihostitel: *Pseudocrenilabrus philander* (2/19).

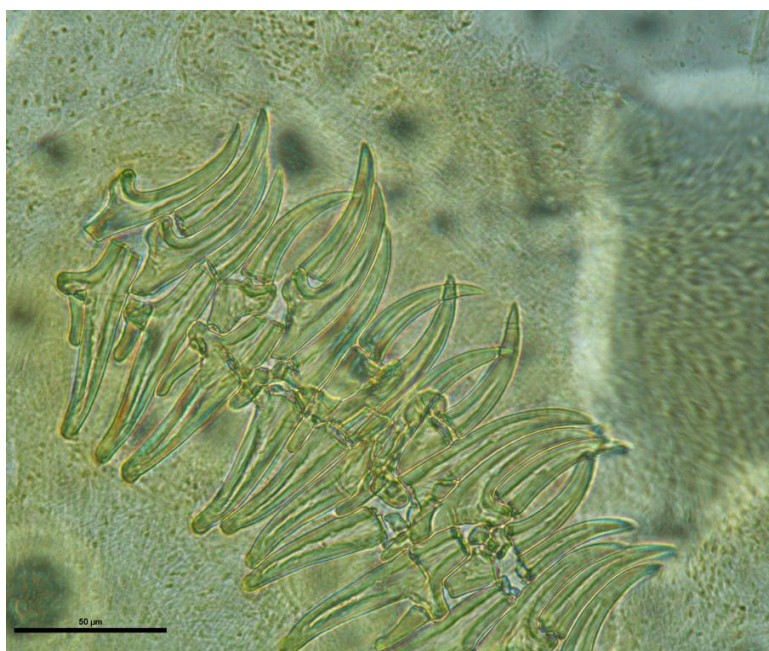
Lokalizace: játra, mesenterium.

Země: Jihoafrická republika.

Studovaný materiál: 2 \times GAP (*P. philander*); 2 \times ETOH (*P. philander*).

Molekulární data: Byly získány sekvence dvou jedinců: u vzorku číslo C4/15 délky 1698 bp, C1/15 délky 1748 bp.

Komentář: Studovaný materiál byl identifikován podle tvaru a velikosti háčků, které jsou dlouhé, úzké s dlouhým, lehce zahnutým ostřím (Obr. 6). K druhové identifikaci slouží především menší, vystouplý hrbol, jehož tvar je pro tento druh typický. Tento druh byl popsán jako *Taenia scolecina* z kormorána *Phalacrocorax carbo* (pod jménem *Pelecanus carbonis*) Rudolphim (1819). Dospělci se vyskytují v Evropě, Africe, Asii a Austrálii u kormoránů (Matevosyan 1963; Ryzhikov a kol. 1985, Schmidt 1986). Larvální stádia byla v Africe zaznamenána z ryb poprvé viz Tabulka 3.



Obr. 6. Háčky larvy tasemnice *Paradilepis scolecina* z *Pseudocrenilabrus philander*, Jihoafrická republika.

***Parvitaenia samfya* Mettrick, 1967** (Obr. 7)

Popis: Larvy mají na skolexu čtyři kruhové přísavky a rostelum s deseti většími (délka 45–49 μm) a deseti menšími (délka 27–29 μm) háčky. Ty se vyznačují především delší, užší a v horní části zahnutou čepelí a rovnou rukojetí.

Rybí mezihostitel: *Bathybates graueri* (1/1), *Pseudocrenilabrus philander* (3/28), *Tilapia sparrmanii* (2/6).

Lokalizace: lumen střeva.

Země: Jihoafrická republika, Zimbabwe.

Studovaný materiál: 6× GAP (*P. philander*, *B. graueri*); 5× ETOH (*P. philander*, *B. graueri*).

Molekulární data: Byly získány sekvence pěti jedinců: u vzorku číslo C9/14 délky 1523 bp, C8/14 délky 1519 bp, 77/7 délky 1557 bp, 85/27 délky 1675 bp a 76/1 délky 1516 bp

Komentář: Studovaný materiál byl identifikován podle tvaru a velikosti háčků, především podle užší a dlouhé, v horní části zahnuté čepele a úzkého, vystouplého hrbole (Obr. 7). Tento druh byl popsán Mettrickem v roce 1967 podle dospělců z volavek *Ardea purpurea* a *Ardeola ralloides* v Zambii (Mettrick 1967). Larvální stádia byla poprvé nalezena v kaprovi (*Cyprinus carpio*) v Mozambiku (Scholz a kol. 2008).



Obr. 7. Háčky larválního stádia tasemnice *Parvitaenia samfyia* z *Pseudocrenilabrus philander*, Zimbabwe.

***Parvitaenia* sp.** (Obr. 8)

Popis: Larvy mají na skolexu čtyři kruhové přísavky a rostelum s deseti většími (délka 52–58 μm) a deseti menšími (délka 36–40 μm) háčky. Ty se vyznačují tvarem charakteristickým pro rod *Parvitaenia* Burt, 1940 (viz Bona 1975). Jsou to úzké, dlouhé háčky s vystouplým hrbolem a v horní části zahnutou, dlouhou čepelí (Obr. 8). Délkou však neodpovídají žádným, dosud identifikovaným druhům tohoto rodu (Scholz a kol. 2004).

Rybí meziphostitel: *Pseudocrenilabrus philander* (3/28).

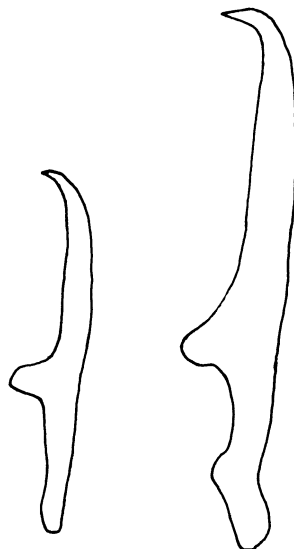
Lokalizace: lumen střeva.

Země: Jihoafrická republika.

Studovaný materiál: 3× GAP (*P. philander*); 3× ETOH (*P. philander*).

Molekulární data: Byly získány sekvence tří jedinců: u vzorku číslo C6/14 délky 1666 bp, C10/14 délky 1597 bp a C5/14 délky 1645 bp.

Komenář: Studovaný materiál byl zařazen do rodu *Parvitaenia* na základě tvaru háček, které jsou specifické pro tento rod, avšak jejich velikost neodpovídá žádnému druhu tohoto rodu.



Obr. 8. Háčky larválního stádia tasemnice *Parvitaenia* sp. z *Pseudecrenilabrus philander*, Jihoafrická republika.

***Valipora campylancristrota* (Wedl, 1855) Baer at Bona, 1960** (Obr. 9)

Popis: Larvy mají na skolexu čtyři kruhové přísavky a rostelum s deseti většími (délka 23–30,5 µm) a deseti menšími (délka 10–16,5 µm) háčky. Ty jsou charakteristické velmi malým vzrůstem (Scholz a kol. 2001). Čepel je v horní části silně zahnutá.

Rybí mezihostitel: *Pseudocrenilabrus philander* (2/28).

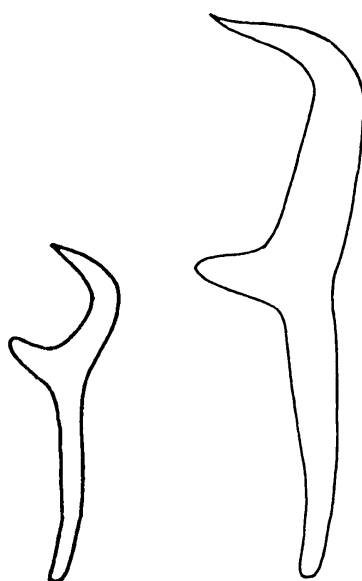
Lokalizace: žlučník.

Země: Jihoafrická republika.

Studovaný materiál: 2× GAP (*P. philander*); 2× ETOH (*P. philander*).

Molekulární data: Byla získána jedna sekvence: a to u vzorku čísla C3/15 o délce 1526 bp.

Komentář: Studovaný materiál byl identifikován podle tvaru a velikosti háčků, především podle úzké, obloukovitě v horní části silně zahnuté čepele, která je specifická pro tento druh (Scholz a kol. 2001) (Obr. 9). Tento druh popsal Wedl v roce 1855 jako *Taenia campylancristrota* z volavky *Egretta garzetta* v Zambii. Baer a Bona (1960) druh přesunuli do rodu *Valipora* a tato kombinace je dnes obecně přijímána (Bona 1994). Tyto tasemnice se vyskytují především v palearktické zoogeografické oblasti (Scholz a kol. 2004). V Africe je nález larválního stádia zaznamenán poprvé viz Tabulka 3.



Obr. 9. Háčky larválního stádia tasemnice *Valipora campylancristrota* z *Pseudocrenilabrus philander*, Jihoafrická republika.

***Valipora minuta* (Coil, 1950) Baer et Bona, 1960** (Obr. 10)

Popis: Larvy měřící 1–1,6 mm mají na skolexu čtyři kruhovitě přísavky a rostelum s deseti většími (délka 35–39 μm) a deseti menšími (délka 19–21 μm) háčky. Ty se vyznačují především malou velikostí a úzkou, obloukovitou čepelí a rovnou rukojetí.

Rybí mezihostitelé: *Ophthalmotilapia nasuta* (1/1), *Pseudocrenilabrus philander* (2/28).

Lokalizace: lumen střeva.

Země: Burundi, Jihoafrická republika.

Studovaný materiál: 3 \times GAP (*O. nasuta*, *P. philander*); 2 \times ETOH (*P. philander*).

Molekulární data: Byla získána jedna sekvence: u vzorku číslo C11/14 délky 1656 bp.

Komentář: Studovaný materiál byl identifikován podle tvaru a velikosti háčků, které se vyznačují malým vzrůstem a obloukovitou, úzkou čepelí (Obr. 10). Tento druh popsal Coil v roce 1950 z volavky *Butorides virescens* v USA (Coil 1950). Tento druh je především v Severní Americe. Z Afriky je tento druh uveden poprvé viz Tabulka 3.



Obr. 10. Háčky larválního stádia tasemnice *Valipora minuta* z *Ophthalmotilapia nasuta*, Burundi.

Tabulka 2: Měření rostelárních háček larválních stádií tasemnic čeledi Gryporhynchidae.

Druh	Počet háčků	Velké háčky (µm)				Malé háčky (µm)				Zdroj
		Délka	Čepel	Rukojeť	Čepel/rukojeť poměr	Délka	Čepel	Rukojeť	Čepel/rukojeť poměr	
<i>Amirthalingamia macracantha</i>	(4 + 6) +10	448–480 465–475	272–296 170–280	240–296 230–280	1,00–1,16 1,00–1,18	240–290 258–270	157–184 150–172	144–160 130–145	0,98–1,11 1,15–1,2	1, 2, nová data
<i>Neogryporhynchus lasiopeius</i>	10 + 10	41–47	21–25	21–25	0,80–1,11	26–29	12–14	14–18	0,68–1	nová data
<i>Paradilepis delachauxi</i>	10 + 10	125–132	61–72	64–68	0,95–1,10	90–96	38–46	54–58	0,7–0,8	nová data
<i>Paradilepis scolecina</i>	10 + 10	101–115 132–134	55–60 70–77	50–55 62–64	1,10–1,20 1,12–1,23	75–81 74–81	45–50 38–41	40–43 36–39	1,1–1,2 0,94–1,13	2, nová data
<i>Paradilepis maleki</i>	10 + 10	94–99	59–66	31–37	1,61–1,77	64–70	34–41	28–31	1,06–1,33	nová data
<i>Parvitaenia samfyia</i>	10 + 10	45–49	24–28	21–25	1,04–1,20	27–29	13–15	15–16	0,88–0,94	4, nová data
<i>Parvitaenia</i> sp.	10 + 10	52–58	33–37	20–22	1,64–1,85	36–40	20–23	17–19	1,16–1,35	nová data
<i>Valipora campylancristrota</i>	10 + 10	23–30,5	9–14,5	14–18,5	0,60–0,91	10–16,5	3,5–6	8–12	0,34–0,56	2, 3
<i>Valipora minuta</i>	10 + 10	36–40 35–38	15,5–19 16–17	21–24,5 20–23	0,60–0,88 0,7–0,8	18–21,5 20–21	5,5–8,5 7–8	12–15,5 12–14	0,46–0,59 0,57–0,58	3, nová data

1 – Bray (1974), 2 – Scholz a kol. 2004, 3 – Scholz and Salgado-Maldonado (2001), 4 – Haasová (2009).

Tabulka 3: Přehled larválních stádií tasemnic čeledi Gryporhynchidae z Afriky.

DRUH	ZEMĚ	MEZIHOSITEL (RYBY)	ZDROJ
<i>Amirthalingamia macracantha</i> (Joyeux et Baer, 1935)	Súdán, Zimbabwe	<i>Haplochromis acidens</i> , <i>Oreochromis niloticus</i> , <i>Pseudocrenilabrus philander</i> , <i>Tilapia zillii</i> (Perciformes)	Bray 1974, nová data
<i>Cyclustera magna</i> (Baer, 1959)	Keňa, Súdán, Kongo, Zimbabwe	<i>Labeo horie</i> (Cypriniformes), <i>Oreochromis niloticus</i> , <i>Tilapia zillii</i> (Perciformes)	Scholz a kol. 2004; Haasová 2009
<i>Cyclustera</i> sp.	Mozambik	<i>Cyprinus carpio</i> (Cypriniformes)	Scholz a kol. 2008
<i>Neogryporhynchus lasiopeius</i> Baer et Bona, 1960	Burundi, Jihoafrická republika, Zimbabwe	<i>Oreochromis niloticus</i> , <i>Pseudocrenilabrus philander</i> , <i>Tilapia sparrmanii</i> , <i>Trematocara unimaculatum</i> (Perciformes)	nová data
<i>Neogryporhynchus</i> sp.	Senegal	<i>Barbus macrops</i> (Cypriniformes)	Haasová 2009
<i>Paradilepis delachauxi</i> (Fuhrmann, 1909)	Jihoafrická republika, Zambie, Zimbabwe	<i>Haplochromis acidens</i> , <i>Oreochromis macrochir</i> , <i>Pseudocrenilabrus philander</i> (Perciformes)	Gibson a kol. 2005, nová data
<i>Paradilepis scolecina</i> (Rudolphi, 1819)	Jihoafrická republika	<i>Pseudocrenilabrus philander</i> (Perciformes)	nová data
<i>Paradilepis maleki</i> Khalil, 1961	Burundi, Jihoafrická republika	<i>Bentochromis tricoti</i> , <i>Pseudocrenilabrus philander</i> (Perciformes)	nová data
<i>Paradilepis urceina</i> Bona 1975	Súdán	<i>Barbus</i> sp. (Cypriniformes), <i>Oreochromis niloticus</i> (Perciformes)	Haasová 2009
<i>Parvitaenia macropeos</i> (Wedl, 1855)	Senegal, Kongo	<i>Hemichromis letourneuxi</i> , <i>Oreochromis niloticus</i> (Perciformes)	Haasová 2009
<i>Parvitaenia purpurea</i> Johri, 1959	Keňa	<i>Oreochromis niloticus</i> (Perciformes)	Haasová 2009
<i>Parvitaenia samfyia</i> Mettrick, 1967	Jihoafrická republika, Kongo, Senegal, Zimbabwe	<i>Bathybates graueri</i> , <i>Pseudocrenilabrus philander</i> , <i>Tilapia nilotica</i> , <i>T. sparrmanii</i> , (Perciformes)	Haasová 2009, nová data
<i>Parvitaenia</i> sp.	Jihoafrická republika	<i>Pseudocrenilabrus philander</i> (Perciformes)	nová data
<i>Valipora ardeolae</i> (Singh, 1952)	Senegal	<i>Schilbe intermedius</i> (Siluriformes)	Haasová 2009
<i>Valipora campylancristrota</i> (Wedl, 1855)	Jihoafrická republika, Kongo	<i>Pseudocrenilabrus philander</i> (Perciformes)	nová data
<i>Valipora minuta</i> (Coil, 1950)	Burundi, Jihoafrická republika	<i>Ophthalmotilapia nasuta</i> , <i>Pseudocrenilabrus philander</i> , <i>Tilapia sparrmanii</i> (Perciformes)	nová data

5. 2. Přehled rybích mezihostitelů a jejich larev čeledi

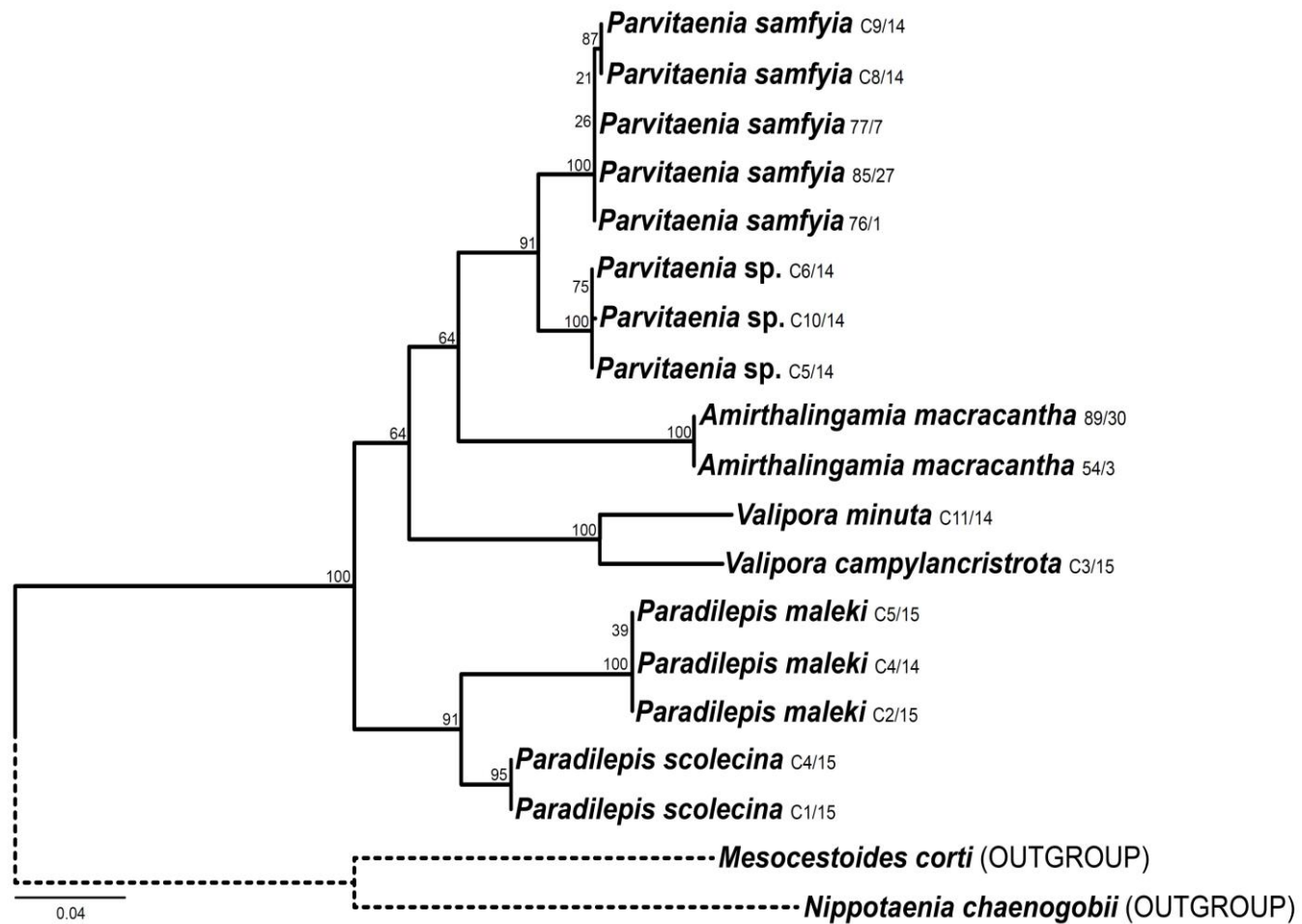
Gryporhynchidae (řazeno abecedně a podle jednotlivých zemí původu)

RYBÍ MEZIHOSTITEL	ZEMĚ	PARAZIT
	Burundi	
<i>Bathyabates graueri</i> (Steindachner, 1911)		<i>Parvitaenia samfyia</i> Mettrick, 1967
<i>Benochromis tricoti</i> (Poll, 1948)		<i>Paradilepis maleki</i> Khalil, 1961
<i>Ophthalmothilapia nasuta</i> (Poll et Matthes, 1962)		<i>Valipora minuta</i> (Coil, 1950)
<i>Trematocara unimaculatum</i> Boulenger, 1901		<i>Neogryporhynchus lasiopeius</i> Baer et Bona, 1960
	Jihoafriická republika	
<i>Pseudocrenilabrus philander</i> (Weber, 1897)		<i>Neogryporhynchus lasiopeius</i> Baer et Bona, 1960
		<i>Paradilepis scolecina</i> (Rudolphi, 1819)
		<i>Paradilepis maleki</i> Khalil, 1961
		<i>Parvitaenia samfyia</i> Mettrick, 1967
		<i>Parvitaenia</i> sp.
		<i>Valipora campylancristota</i> (Wedl, 1855)
		<i>Valipora minuta</i> (Coil, 1950)
	Zimbabwe	
<i>Haplochromis acidens</i> Greenwood, 1967		<i>Amirthalingamia macracantha</i> (Joyeux et Baer, 1935)
		<i>Paradilepis delachauxi</i> (Fuhrmann, 1909)
<i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758)		<i>Neogryporhynchus lasiopeius</i> Baer et Bona, 1960
<i>Pseudocrenilabrus philander</i> (Weber, 1897)		<i>Amirthalingamia macracantha</i> (Joyeux et Baer, 1935)
		<i>Neogryporhynchus lasiopeius</i> Baer et Bona, 1960
		<i>Paradilepis delachauxi</i> (Fuhrmann, 1909)
		<i>Parvitaenia samfyia</i> Mettrick, 1967

5. 3. Molekulární fylogeneze

Celkově bylo získáno sedmnáct sekvencí 28S rDNA zástupců sedmi druhů a čtyř rodů gryporhynchidních tasemnic o délce 1516 až 1748 bp. Za účelem výběru nejvhodnější taxonomické skupiny pro určení kořene čeledi Gryporhynchidae byly sekvence zástupců této čeledi zkombinovány se sekvencemi 28S rDNA zástupců ostatních čeledí řádu Cyclophyllidea dostupných z databáze NCBI a fylogeneticky analyzovány. Výsledný ML fylogenetický strom (výsledky nezobrazeny) jasně podpořil monofyletický status čeledi Gryporhynchidae podpořený absolutními hodnotami bootstrapu, zároveň ale jasně nedefinoval fylogenetickou pozici čeledi mezi ostatními skupinami řádu Cyclophyllidea. Proto byly jako outgroup použity sekvence tasemnic *Mesocestoides corti* (Mesocestoididae) (AF286920) a *Nippotaenia chaenogobii* (Nippotaenidea) (AF286933), které jsou z předchozích fylogenetických prací (např. Waeschenbach a kol. 2007, 2012) známé jako skupiny blízké příbuzné řádu Cyclophyllidea.

Fylogenetické vztahy uvnitř čeledi Gryporhynchidae jsou zobrazeny na Obr. 11. Zástupci všech jednotlivých druhů tvoří jasné, statisticky vysoce podpořené, monofyletické linie. Všechny rody zastoupené více než jedním druhem (*Paradilepis*, *Parviaenia*, *Valipora*) tvoří také přirozené monofyletické skupiny podpořené relativně vysokými hodnotami bootstrapu. Na základě ML analýzy 28S rDNA v současnosti dostupných zástupců gryporhynchidních tasemnic rod *Parvitaenia* tvoří sesterskou skupinu rodu *Amirthingamia* a tato dvojice dále sesterskou skupinu rodu *Valipora*. Statistická podpora těchto vnitřních uzlů je ale relativně nízká (Obr. 11), a proto nelze fylogenetické vztahy těchto rodů považovat za spolehlivě objasněné.



Obr. 11. Výsledný ML fylogenetický strom čeledi Gryporhynchidae se statistickými podporami bootstrapu.

6. DISKUZE

Materiál použitý pro morfologicko-taxonomickou a molekulárně-fylogenetickou studii tasemnic čeledi Gryporhynchidae, která je první detailnějším pokusem o poznání diverzity této skupiny v afrických rybách, byl nasbírán ve třech státech jižní Afriky (Burundi, Jihoafrická republika a Zimbabwe). Jednotlivé druhy byly identifikovány podle tvaru a velikosti rostelárních háčků na základě údajů v monografii Bony (1975) a článku (review) Scholze a kol. (2004), kteří shrnuli údaje o larválních stádiích zástupců této čeledi v rybách.

Celkem bylo vyšetřeno 8 druhů rybích mezihostitelů (*Bathybates graueri*, *Bentochromis tricoti*, *Haplochromis acidens*, *Ophthalmotilapia nasuta*, *Oreochromis niloticus*, *Pseudocrenilabrus philander*, *Tilapia sparrmanii* a *Trematocara unimaculatum*) z čeledi Cichlidae (Perciformes). Na základě morfologicko-taxonomické a molekulárně-fylogenetické analýzy nalezených larválních stádií byla zjištěna přítomnost devíti druhů tasemnic čeledi Gryporhynchidae (*Amirthalingamia macracantha*, *Neogryporhynchus lasiopeius*, *Paradilepis delachauxi*, *P. scolecina*, *P. maleki*, *Parvitaenia samfyia*, *Parvitaenia* sp., *Valipora campylancristrota* a *V. minuta*). U šesti druhů larválních stádií z ryb byl tento nález první na africkém kontinentě (*N. lasiopeius*, *P. scolecina*, *P. maleki*, *Parvitaenia* sp., *V. campylancristrota*, *V. minuta*), z toho dva druhy těchto tasemnic jsou v Africe zaznamenány poprvé (*Parvitaenia* sp., *V. minuta*). Tři druhy larválních stádií gryporhynchidních tasemnic byly nalezeny v rybách vůbec poprvé (*N. lasiopeius*, *P. maleki*, *Parvitaenia* sp.).

V Africe je nyní známo celkem dvacet tři druhů dospělců sedmi rodů čeledi Gryporhynchidae a šestnáct druhů larválních stádií těchto tasemnic z ryb (Bona 1975, Gibson a kol. 2005, Haasová 2009, Scholz a kol. 2004, 2008). Z druhů nalezených v rybách v této práci se pouze v Africe vyskytuje pět druhů (*A. macracantha*, *P. delachauxi*, *P. maleki*, *P. samfyia* a *Parvitaenia* sp.), zatímco ostatní druhy mají širší areál rozšíření (Bona 1975).

Dosud bylo zaznamenáno dvacet pět druhů larválních stádií gryporhynchidních tasemnic a osm dalších druhů nebylo možné zařadit do druhu (patrně se jedná o taxony nové pro vědu): *Cyclusteria* sp., *Glossocercus* sp., Gryporhynchidae gen. sp., *Neogryporhynchus* sp., *Neovalipora* sp., *Paradilepis* sp., *Parvitaenia* sp., *Valipora* sp. Největší diverzita je v neotropické zoogeografické oblasti (především Mexiku), kde bylo nalezeno devatenáct druhů larválních stádií (Scholz a kol. 2001, Gibson a kol. 2005, Ortega-Olivares a kol. 2014). V palearktické zoogeografické oblasti se v rybách vyskytují larvální stadia

pouze tří druhů gryporhynchidních tasemnic (*N. cheilancristrotus*, *P. scolecina*, *V. campylancristrota*), ale jejich životní cyklus, hostitelská specifická a ekologie jsou u nich popsány nejpodrobněji ze všech známých druhů. Naopak dospělců bylo v této zoogeografické oblasti zaznamenáno až dvacet druhů. Zmíněný rozdíl v počtu dospělců a larev je obtížné vysvětlit, protože množství ryb vyšetřených na přítomnost parazitů v Evropě je mimořádně vysoké. V nearktické zoogeografické oblasti bylo naproti tomu nalezeno jedenáct druhů larválních stádií (Gibson a kol. 2005, Scholz a kol. 2004).

Porovnání morfologie rostelárních háček larev z cichlid v Africe neukázalo zásadnější rozdíly proti konspecifickým larvám z jiných oblastí, ale detailní srovnávací studie nebyla z časových důvodů provedena.

Byly získány sekvence 28S rDNA celkem sedmi druhů gryporhynchidních tasemnic (*A. macracantha*, *P. scolecina*, *P. maleki*, *P. samfyia*, *Parvitaenia* sp., *V. campylancristrota* a *V. minuta*), jedná se o první molekulárně-fylogenetickou studii zástupců této čeledi. Výsledná topologie ML fylogenetického stromu podporuje monofyletický status všech studovaných rodů a druhů. Příbuzenské vztahy jednotlivých rodů však nemohou být na základě analýzy 28S rDNA považovány za spolehlivě objasněné z důvodu nízké statistické podpory těchto vnitřních uzlů.

Fylogenetická analýza 28S rDNA považuje sesterský vztah rodu *Parvitaenia* a *Amirthalingamia* za pravděpodobnější než alternativní topologické scénáře. Zástupci druhého rodu však mají nápadně robustní háčky, čímž se více podobají druhům rodu *Paradilepis*. Definitivními hostiteli obou rodů jsou rybožraví ptáci řádu Pelecaniformes. Podle definitivních hostitelů a morfologických vlastností by se tedy sesterský vztah rodu *Amirthalingamia* a *Paradilepis* jevil logičtější. Naopak druhy rodu *Parvitaenia* a *Valipora* mají háčky menších rozměrů a jako definitivního hostitele využívají rybožravé ptáky řádu Ciconiiformes (Bona 1975).

Z tkáně fixované pro molekulární studii se podařilo získat DNA vhodnou pro PCR amplifikaci pouze ze dvou států jižní Afriky. Z Burundi se z obdrženého materiálu fixovaného v alkoholu nepodařilo získat intaktní DNA. Tento problém pravděpodobně signalizuje nevhodně provedenou fixaci či uchování materiálu. Z materiálu ze Zimbabwe se podařilo získat sekvence dvou ze čtyř identifikovaných druhů tasemnic, z Jihoafrické republiky byla osekvenována většina nalezených druhů.

Fauna larev tasemnic této čeledi je nepochybně mnohem bohatší než ukazují dosavadní literární zdroje. Důvodem může být malá pozornost, která je věnována těmto larvám. Ty se nejčastěji vyskytují v tělní dutině, mesenteriu nebo vnitřních orgánech a při studiu zaměřeném výhradně na střevní cizopasníky tak nejsou larvy většinou zaznamenány.

Zásadní může být také nedostatečná znalost o možnosti výskytu larev v daném meziphostiteli (rybě). Jak tato práce potvrzuje, gryporhynchidní tasemnice hojně využívají jako svého meziphostitele cichlidní ryby. Avšak specifická larev na daný druh ryby není zatím možné jednoznačně určit, neboť většina studovaných ryb byla téměř vždy napadena více druhy larev. Výjimku tvoří tasemnice pocházející z Burundi, jelikož každý ze čtyř nalezených druhů využíval jako meziphostitele jiný druh cichlidní ryby. Naopak v Jihoafrické republice bylo v jediném druhu meziphostitele (*Pseudocrenilabrus philander*) nalezeno až sedm druhů gryporhynchidních tasemnic. Tento zástupce byl však odchytáván při parazitologických sběrech nejčastěji a je více rozšířený než vyšetření, endemitičtí rybí zástupci z Burundi.

Absence údajů o larvách gryporhynchidních tasemnic v afrických sladkovodních rybách (fauna brakických druhů dosud nebyla prakticky vůbec studována) neumožňuje srovnávání s nově získanými údaji. Jedinou oblastí, která vykazuje podobě vysokou diverzitu těchto rybích tasemnic je Mexiko. Bohužel žádné další molekulární data ostatních zástupců gryporhynchidních tasemnic (druhy rodů *Cyclusteria*, *Glossocercus*, *Neogryporhynchus*, *Paradilepis*, *Parvitaenia* a *Valipora*) nebyly dosud publikovány, což nedovoluje posoudit fylogenetické vztahy této čeledi napříč celým areálem jejich geografického rozšíření.

7. ZÁVĚR

Z morfologicko-taxonomické a molekulárně-fylogenetické studie vyplývá, že osm druhů ryb vyskytujících se na africkém kontinentu může sloužit jako mezipřenosník minimálně devíti druhů tasemnic čeledi Gryporhynchidae (*Amirthalingamia macracantha*, *Neogryporhynchus lasiopeius*, *Paradilepis delachauxi*, *P. scolecina*, *P. maleki*, *Parvitaenia samfyia*, *Parvitaenia* sp., *Valipora campylancristrota* a *V. minuta*). Šest druhů larválních stádií bylo v rybách v Africe nalezeno poprvé (*N. lasiopeius*, *P. scolecina*, *P. maleki*, *Parvitaenia* sp., *V. campylancristrota* a *V. minuta*), z toho dva druhy těchto tasemnic jsou na africkém kontinentě zaznamenány poprvé (*Parvitaenia* sp., *V. minuta*). Tasemnice určená jako *Parvitaenia* sp. nejspíše představuje nový, dosud nepopsaný druh. Za pomoci metod molekulární fylogeneze bylo osekvenováno sedm druhů čtyř rodů tasemnic této čeledi a potvrzena monofylie tří rodů. Jedná se o první molekulární fylogenezi této skupiny vůbec.

V budoucnu bude třeba věnovat větší pozornost možnému výskytu larev u dalších skupinách ryb. Zásadní je rovněž správná fixace larev pro morfologické studium (stlačením skolexu) a získání dalších molekulárních údajů.

8. ABSTRACT

Diversity of larval stages of cestodes of the family Gryporhynchidae (Cestoda: Cyclophyllidea) in cichlid fish (Perciformes: Cichlidae) from southern Africa

Tapeworms of the family Gryporhynchidae (Cestoda: Cyclophyllidea) are cosmopolitan parasites of fish-eating birds such as herons, ibises and cormorants. Gryporhynchids are unique among cyclophyllidean cestodes in using fish as their second intermediate hosts; planktonic crustaceans (copepods) serve as the first intermediate hosts. Even though the first species currently placed in this family, *Paradilepis scolecina*, was described as early as in 1819, the present knowledge of the taxonomy, life cycles and ecology of gryporhynchids and pathogenic influence of larvae on their fish hosts is rather limited. In this study, gryporhynchid larvae (metacestodes) found in cichlids from three African countries (Burundi, South Africa and Zimbabwe) have been studied. Based on the size and shape of rostellar hooks, the following nine species of five genera have been recognised (species marked with an asterisk are reported from fish for the first time): *Amirthingamia macracantha* (Joyeux et Baer, 1935), **Neogryporhynchus lasiopeius* Baer et Bona, 1960, *Paradilepis delachauxi* (Fuhrmann, 1909), *Paradilepis scolecina* (Rudolphi, 1819), **Paradilepis maleki* Khalil, 1961, *Parvitaenia samfyia* Mettrick, 1967, **Parvitaenia* sp., *Valipora campylancristrota* (Wedl, 1855) and *Valipora minuta* (Coil, 1950); most of these species are also reported from Africa for the first time. A phylogenetic analysis of newly obtained 28S rDNA gene sequences of seven species of four genera confirmed the monophyletic status of all genera and brought first molecular insights into the interrelationships of the group. The present study indicates still poorly described species diversity of gryporhynchid larvae in freshwater fish in Africa.

9. LITERATURA

Baer J. G., Bona F. V. 1960: Révision des Cestodes Dilepididae Fuhrm., 1907 des Ardéiformes. Note préliminaire. *Bolletino del Istituto e Museo di Zoologico dell'Università di Torino* 6: 91–143.

Beveridge I. 2001: The use of life cycle characters in studies of the evolution of cestodes. In: D. T. J. Littlewood et R. A. Bray (Eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Systematics Association Special Volume Series 60, Taylor et Francis, London, UK, pp. 250–256.

Bona F. V. 1975: Etude critique et taxonomique des Dilepididae Fuhrman, 1907 (Cestoda) Parasites des Ciconiiformes. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma, 750 pp.

Bona F. V. 1994: Family Dilepididae Railliet & Henry, 1909. In: L. F. Khalil, A. Jones, R. A. Bray (Eds) *Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 445–554.

Bray R. A. 1974: A new genus of dilepidid cestode in *Tilapia nilotica* (L., 1758) and *Phalacrocorax carbo* (L., 1758) in Sudan. *Journal of Natural History* 8: 589–596.

Coil W. H. 1950: The genus *Ophiovalipora* Hsü, 1935, (Cestoda: Dilepididae) with the description of *Ophiovalipora minuta* sp. nov. from the green heron (*Butorides virescens* L.). *Journal of Parasitology* 36: 55–61.

Gibson D. I., Bray R. A., Harris E. A. 2005: Host-Parasite Database of the Natural History Museum, London. <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/scientific-resources/taxonomy-systematics/host-parasites/>.

Guindon S., Gascuel O. 2003: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.

Haasová I. 2009: Tasemnice čeledi Gryporhynchidae z Afriky. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 44 pp.

Hoberg E. P., Jones A., Bray R. A. 1999: Phylogenetic analysis among the families of the Cyclophyllidea (Eucestoda) based on comparative morphology, with new hypotheses for coevolution in vertebrates. *Systematic Parasitology* 42: 51–73.

- Chervy L. 2002:** The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Systematic parasitology* 52: 1–33.
- Jarecka L. 1970a:** Life cycle of *Valipora campylancristota* (Wedl, 1855) Baer and Bona 1958–1960 (Cestoda–Dilepididae) and the description of cercoscolex – a new type of cestode larva. *Bulletin de l'Academie Polonaise des Science, Classe II*, 18: 99–102.
- Jarecka L. 1970b:** On the life cycle of *Paradilepis scolecina* (Rud., 1819) Hsü, 1935, and *Neogryporhynchus cheilancristotus* (Wedl, 1855) Baer and Bona, 1958–1960 (Cestoda – Dilepididae). *Bulletin de l'Academie Polonaise des Sciences, Classe II*, 18: 159–163.
- Joyeux C., Baer J. G. 1935:** Notices helminthologiques. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 60: 482–501.
- Katoh K., Standley D. M. 2013:** MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 30: 772–780.
- Khalil L.F., Polling L. 1997:** Check List of the Helminth Parasites of African Freshwater fishes. University of the North Republic of South Africa, South Africa, 161 pp.
- Littlewood D. T. J., Curini-Galletti M., Herniou E. A. 2000:** The interrelationships of Proseriata (Platyhelminthes: Seriata) flatworms tested with molecules and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16: 449–466.
- Matevosyan E. M. 1963:** Dilepidoidea – Tapeworm Heminths of Domestic and Wild Animals. Essentials of Cestodology, Volume 3. Publ. *House of the Academy of Sciences of the USSR*, Moscow, 688 pp. (In Russian).
- Mariaux J. 1998:** A molecular phylogeny of the Eucestoda. *Journal of Parasitology* 84: 114–124.
- Mariaux J.:** <http://tapeworms.uconn.edu/cyclophyllidean/gryporhynchidae.html>.
- Mettrick D. F. 1967:** Some cestodes from Ardeiformes and Charadriiformes in central Africa. *Revue de Zoologie et Botanique Africaine* 75: 333–362.
- Ortega-Olivares M. P., Barrera-Guzmán A. O., Haasová I., Salgado-Maldonado G., Guillén-Hernández S., Scholz T. 2008:** Tapeworms (Cestoda: Gryporhynchidae) of fish-eating birds (Ciconiiformes) from Mexico: new host and geographical records. *Comparative Parasitology* 75: 182–195.

Ortega-Olivares M. P., García-Prieto L., García-Varela M. 2014: Gryporhynchidae (Cestoda: Cyclophyllidea) in Mexico: species list, host distribution and new records. *Zootaxa* 3795: 101–125.

Olson P. D., Cribb T. H., Tkach V. V., Bray, R. A., Littlewood D. T. J. 2003: Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology* 33: 733–755.

Pichelin S., Cribb T. H., Bona F. V. 1998: *Glossocercus chelodinae* (MacCallum, 1921) n. comb. (Cestoda: Dilepididae) from freshwater turtles in Australia and a redefinition of the genus *Bancroftiella* Johnston, 1911. *Systematic Parasitology* 39: 165–181.

Ryzhikov K. M., Ryšavý B., Khokhlova I. G., Tolkacheva L. M., Korniyushin V. V. 1985: Helminths of Fish-Eating Birds of the Palaearctic Region II. Cestoda and Acanthocephales. Academia, Prague, 412 pp.

Roberts L. S., Janovy J. 2000: Foundations of Parasitology. 6th edition. McGraw-Hill, Dubuque, Iowa, 670 pp.

Scholz T., Boane C., Saraiva A. 2008: New metacestodes of gryporhynchid tapeworms (Cestoda: Cyclophyllidea) from carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) from Mozambique, Afrika. *Comparative Parasitology* 75: 315–320.

Scholz T., Bray R. A., Kuchta R., Řepová R. 2004: Larvae of gryporhynchid cestodes (Cyclophyllidea) from fish: a review. *Folia Parasitologica* 51: 131–152.

Scholz T., Kuchta R., Salgado-Maldonado G. 2001: Cestodes of the family Dilepididae (Cestoda: Cyclophyllidea) from fish-eating birds in Mexico: survey of species. *Systematic Parasitology* 52: 171–182.

Scholz T., Salgado-Maldonado G. 2001: Metacestodes of the family Dilepididae (Cestoda: Cyclophyllidea) parasiting fishes in Mexico. *Systematic Parasitology* 49: 23–40.

Schmidt G. D. 1986: CRC Handbook of Tapeworm Identification. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 675 pp.

Spassky A. A., Spasskaya L. P. 1973: New subfamily Gryporhynchinae, subfamily (Cestoda: Dilepididae). *Izvestiya Akademii nauk Moldavskoi SSR* 9: 56–59.

Syslovatina-Andakulova N. A. 1979: The life cycle of the cestode *Dilepis unilateralis*.
Parazity i bolezni ryb, Moscow, 23: 135-148. (In Russian.)

Waeschenbach A., Webster B. L., Littlewood D. T. J. 2012: Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with large fragments of mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 834–847.

Werle E., Schneider C., Renner M., Völker M., Fiehn W. 1994: Convenient singlestep, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research* 22: 4354–4355.

