

Analiza pokrewieństwa sześciu gatunków przywr z rodzaju *Diplostomum*

Zdzisław Laskowski

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Różnorodności Biologicznej Pasożytów (Pracownia Biologii, Systematyki i Zoogeografii Helmintów) Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, obroniona 19.05. 2003 r.

Promotor: Prof. dr hab. Krzysztof Zdzitowiecki

Recenzenci: Dr hab. Jan Kwiatowski, prof. UW

Dr hab. Vasyl Tkach

Streszczenie

Celem pracy była weryfikacja dotychczasowych ustaleń dotyczących odrębności sześciu gatunków *Diplostomum* (*D. mergi*, *D. parviventosum*, *D. baeri*, *D. pseudospathaceum*, *D. spathaceum*, *D. paracaudum*) oraz analiza pokrewieństw między nimi przy pomocy technik genetyki molekularnej. Cele te osiągnięto wykorzystując analizę sekwencji ITS1 i analizę RAPD.

Otrzymany fragment ITS1 sześciu badanych gatunków rodzaju *Diplostomum* ma długość od 577bp (*D. baeri*) do 586 bp (*D. parviventosum*). Uzyskane sekwencje zostały wysłane do „GenBanku” gdzie otrzymały następujące numery: *Diplostomum paracaudum* (Warszawa) AF419272, *D. pseudospathaceum* (Warszawa) AF419273, *D. baeri* (Warszawa) AF419274, *D. spathaceum* (Warszawa) AF419275, *D. spathaceum* (Kosewo) AF419276, *D. parviventosum* (Warszawa) AF419277, *D. parviventosum* (Kosewo) AF419278, *D. mergi* (Warszawa) AF419279.

W materiale pochodzącym z pojedynczych metacerkarii oraz cercarii/sporocyst produkty PCR były jednoprzątkowe. Jest to druga grupa przywr, u której, podobnie jak u przedstawicieli rodzaju *Echinostoma* (Morgan i Blair 1995), nie stwierdzono występowania sekwencji repetytywnych. Stopień zmienności sekwencji ITS1 pomiędzy poszczególnymi gatunkami z rodzaju *Diplostomum* jest zbliżony do obserwowanego w rodzaju *Ichthyocotylurus* oraz u przedstawicieli rodzaju *Echinostoma*.

Dwie analizy filogenetyczne (maksymalnego uprawdopodobnienia – ML i największej parsymoni – MP) przywr z rodzaju *Diplostomum* wykonane na podstawie sekwencji ITS1, dały podobne wyniki. Wśród badanych gatunków stwierdzono występowanie dwóch wyraźnie oddzielonych grup. Do jednej grupy należy *D. pseudospathaceum* i *D. paracaudum*, do drugiej *D. spathaceum*, *D. parviventosum* i *D. mergi*. Pozycja *D. baeri* jest zmienna. W zależności od rodzaju przeprowadzonej analizy gatunek ten lokalizuje się w jednej lub drugiej grupie. Badania większej

liczby gatunków z rodzaju *Diplostomum* mogą wykazać, że nie jest on związany z żadną z tych grup, o czym świadczy niski współczynnik Bootstrap dla obu analiz (MP i ML) w przypadku dwóch gatunków (*A. gracilis* i *I. platycephalus*), użytych jako gatunki zewnętrzne (outgroup). Wskazuje na to też wynik analizy cech morfologicznych *D. baeri*, szczególnie jego cercarii (Niewiadomska i Laskowski 2002), a także wyraźne różnice w biologii i w cyklu życiowym pomiędzy nim a innymi analizowanymi gatunkami. Można stwierdzić, że analizowane gatunki należą do trzech odrębnych grup: pierwszą tworzą *D. pseudospathaceum* i *D. paracaudum*, drugą – *D. spathaceum*, *D. parviventosum* i *D. mergi*, a *D. baeri* jest jedynym przedstawicielem trzeciej.

Wszystkie analizowane gatunki *Diplostomum* wydają się być bardzo blisko spokrewnione. Stwierdzono bowiem, że różnice w składzie nukleotydowym są między nimi bardzo małe. Pod względem morfologicznym poszczególne stadia rozwojowe tworzą prawie nierozróżnialne grupy, układające się na różne sposoby („mozaika”), w zależności od analizowanego stadium rozwojowego. Najbliższe wynikom analizy ITS1 są cechy morfologiczne cercarii (Niewiadomska i Laskowski 2002).

Diplostomum spathaceum i *D. parviventosum* okazały się prawie identyczne pod względem składu nukleotydowego. Sekwencja ITS1 *D. parviventosum* jest o 7 nukleotydów dłuższa od tej sekwencji u *D. spathaceum*. Różniący oba gatunki fragment znajduje się na 3' końcu sekwencji *D. parviventosum* i występuje tylko u tego gatunku. Dlatego nie był uwzględniony w analizach filogenetycznych. Biorąc pod uwagę brak bezpośredniego wpływu przystosowawczej mutacji w tym regionie DNA, można stwierdzić, że oba te gatunki są bardzo blisko spokrewnione. Obserwowane w analizie RAPD różnice genetyczne, jak i różnice morfologiczne, mogą być odzwierciedleniem procesów przystosowawczych *D. parviventosum*. Wykazuje on specyficzność w stosunku do II żywiciela pośredniego, którym jest kiełb (*Gobio gobio*). W warunkach laboratoryjnych nie udało się uzyskać metacercarii tego gatunku zarażając gupiki, karpie i amury. Metacercarie *D. parviventosum* uzyskano z kielbi zarażonych w warunkach naturalnych. Z pozostałych gatunków (*D. pseudospathaceum*, *D. paracaudum*, *D. mergi* i *D. spathaceum*), których cercarii użyto do laboratoryjnego zarażenia ryb, otrzymano metacercarie. Również żywiciel ostateczny – tracz nurogęś (*Mergus merganser*) – jest specyficznym żywicielem dla *D. parviventosum*. Prawie identyczny skład nukleotydowy ITS1 i jednocześnie duże różnice zarówno w budowie morfologicznej metacercarii i postaci dorosłej, jak i różne wzory RAPD *D. spathaceum* i *D. parviventosum* sugerują, że oba te gatunki są bardzo blisko spokrewnione, a obserwowane różnice mogą wynikać ze zmian spowodowanych specjalizacją w stosunku do II żywiciela pośredniego i żywiciela ostatecznego.

Badania RAPD przeprowadzone na metacercariach pochodzących z zarażenia naturalnego wykazały, że uzyskanie w pełni powtarzalnych wyników jest w praktyce bardzo trudne, lub wręcz niemożliwe. W związku z tym, analizę RAPD ograni-

czono do potwierdzenia odrębności genetycznej *D. spathaceum* i *D. parviventosum*. Analiza RAPD potwierdziła genetyczną odrębność tych dwóch gatunków.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że wszystkie badane gatunki są bardzo blisko spokrewnione i układają się w trzy grupy (analiza ITS1).

Stwierdzono małą przydatność techniki RAPD do określania przynależności gatunkowej metacerkarii pochodzących z zarażenia naturalnego.