

ARTYKUŁY PRZEGLĄDOWE

EWOLUCJA I SYSTEMATYKA NICIENI W OPARCIU O BADANIA MOLEKULARNE

ANNA OKULEWICZ I AGNIESZKA PEREC

Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. Przybyszewskiego 63, 51-148 Wrocław

ABSTRACT. Evolution and systematics of nematodes based on molecular investigation. The use of molecular phylogenetics to examine the interrelationships between animal parasites, free-living nematodes, and plant parasites versus traditional classification based on morphological-ecological characters was discussed and reviewed. Distinct differences were observed between parasitic nematodes and free-living ones. Within the former group, animal parasites turned out to be distinctly different from plant parasites. Using small subunit of ribosomal RNA gene sequence from a wide range of nematodes, there is a possibility to compare animal-parasitic, plant-parasitic and free-living taxa. Nowadays the parasitic nematodes expressed sequence tag (EST) project is currently generating sequence information to provide a new source of data to examine the evolutionary history of this taxonomic group.

Key words: evolution, molecular data, Nematoda, systematics.

Nadal powszechnie przyjęta jest klasyfikacja nicieni powstała w oparciu o cechy morfologiczne pasożytów i różnicowanie ekologiczne żywicieli (Okulewicz 1994, Okulewicz i Lonc 2001). Obecnie najczęściej stosowana jest systematyka według Andersona (1988), w której typ Nematoda podzielony jest na dwie gromady – *Adenophorea* i *Secernentea* (Chitwood i Chitwood 1974). Wśród *Adenophorea* wyróżnia się dwa rzędy – *Chromadorida* i *Enoplida*. Gatunki należące do *Chromadorida* to nicienie morskie, wolno żyjące. W rzędzie *Enoplida* występują zarówno formy wolno żyjące w wodach słonych, słodkich, glebie jak i pasożytujące u kręgowców. Wśród *Enoplida* wyróżnia się podrząd *Dorylaimina* (formy glebowe a także pasożytnicze), a w nim 4 nadrodziny: *Dioctophymatoidea*, *Trichinelloidea*, *Muspiceoidea* – pasożyty kręgowców oraz *Mermithoidea* – pasożyty bezkręgowców, głównie owadów. Gromada *Secernentea* dzieli się na 7 rzędów: *Tylenchida*, *Rhabditida*, *Oxyurida*, *Rhigonematida*, *Ascaridida*, *Spirurida* i *Strongylida*. W rzędzie *Tylenchida* na 10 rodzin trzy zawierają wyłącznie formy pasożytnicze (pasożyty bezkręgowców, głównie owadów i pijawek), pozostałe to nicienie glebowe i pasożyty roślin.

Rząd *Rhabditida* obejmuje tylko kilka rodzin wyłącznie pasożytniczych, w pozostałych obok nicieni glebowych saprofitycznych występują pasożyty. Nicienie te pasożytują w bezkręgowcach, rzadziej są pasożytami kręgowców. Z nicieni rhabditopodobnych wywodzą się 4 rzędy pasożytów zwierząt: *Oxyurida*, *Ascaridida*, *Spirurida*, *Strongylida*, a także *Rhigonematida* występujące u Diplopoda. Nicienie z rzędu *Oxyurida* pasożytują u licznych przedstawicieli kręgowców i bezkręgowców. Sądzi się, że te, które występują u kręgowców wywodzą się od przodków pasożytujących w owadach. *Ascaridida* są pasożytami ryb, płazów, gadów, ptaków i ssaków. W rzędzie *Spirurida* wyróżnia się dwa podrzędy: *Camallanina* – pasożyty ryb, płazów i gadów, oraz *Spirurina* – pasożytujące głównie u ptaków i ssaków. *Strongylida* występują przede wszystkim u ptaków i ssaków, rzadziej u płazów i gadów.

Zdaniem Andersona (2000) u kręgowców pasożytują przede wszystkim przedstawiciele *Secernentea* i uważa się, że linia „rhabditoidalna” dała początek około 92% wszystkich pasożytniczych nicieni występujących u zwierząt kręgowych.

Filogeneza nicieni w oparciu tylko o cechy morfologiczne budzi wątpliwości. Według Magenti’ego (1983) i Andersona (1992) obie gromady *Adenophorea* i *Secernentea* są pochodzenia monofiletycznego i wywodzą się od wspólnego przodka. Natomiast inni autorzy (Adamson 1987, Lorenzen 1994, Malachov 1994) sugerowali, że *Adenophorea* są pochodzenia parafyletycznego i dały początek *Secernentea*. Zróżnicowanie ekologiczne nicieni w obrębie każdej z klas potwierdza ten pogląd.

Brak dowodów kopalnych utrudnia dokonanie właściwej rekonstrukcji filogenezy nicieni, dlatego dla porównania poszczególnych taksonów zastosowano filogenetyczny marker, którym mogą być geny rRNA. Geny rRNA znalezione zostały u wszystkich organizmów i zachowują tam wspólną funkcję. Są wykorzystywane do ustalania pochodzenia od gatunku do poziomu królestwa. W każdym genomie występują w wielokrotnych kopiach. Na przykład *Ceanorhabditis elegans* – nicienie wolno żyjący, modelowy obiekt badań genetycznych, posiada 55 zestawów genów rRNA.

W oparciu o badania sekwencji podjednostek rRNA genów wielu taksonów nicieni, przeprowadzone na przestrzeni kilkunastu lat, dokonano analizy współzależności w obrębie tego typu (Blaxter i wsp. 1998, 2000; Blaxter 2001). W efekcie badań wyłonił się zarys ewolucji nicieni odmienny od ogólnie przyjętego, ale odpowiadający nowym koncepcjom kladystycznym opartym na analizach morfologicznych (Andrassy 1976, Malachov 1994). Dokonany został podział nicieni na trzy duże taksony, a tym samym istnienie dwóch tradycyjnych – „*Adenophorea*” i „*Secernentea*” nie znalazło poparcia. W nowym ujęciu typ Nematoda dzieli się na 3 taksony – odpowiadające kladom I, II oraz C&S (*Chromadorida* & *Secernentea*), w którym wyróżnia się klad III, IV i V (Rys.1a). We wszystkich kladach znajdują się przedstawiciele dotychczasowej gromady *Adenophorea*, w związku z tym nie może ona być monofiletyczna. Klad III wywodzi się z *Chromadorida*.

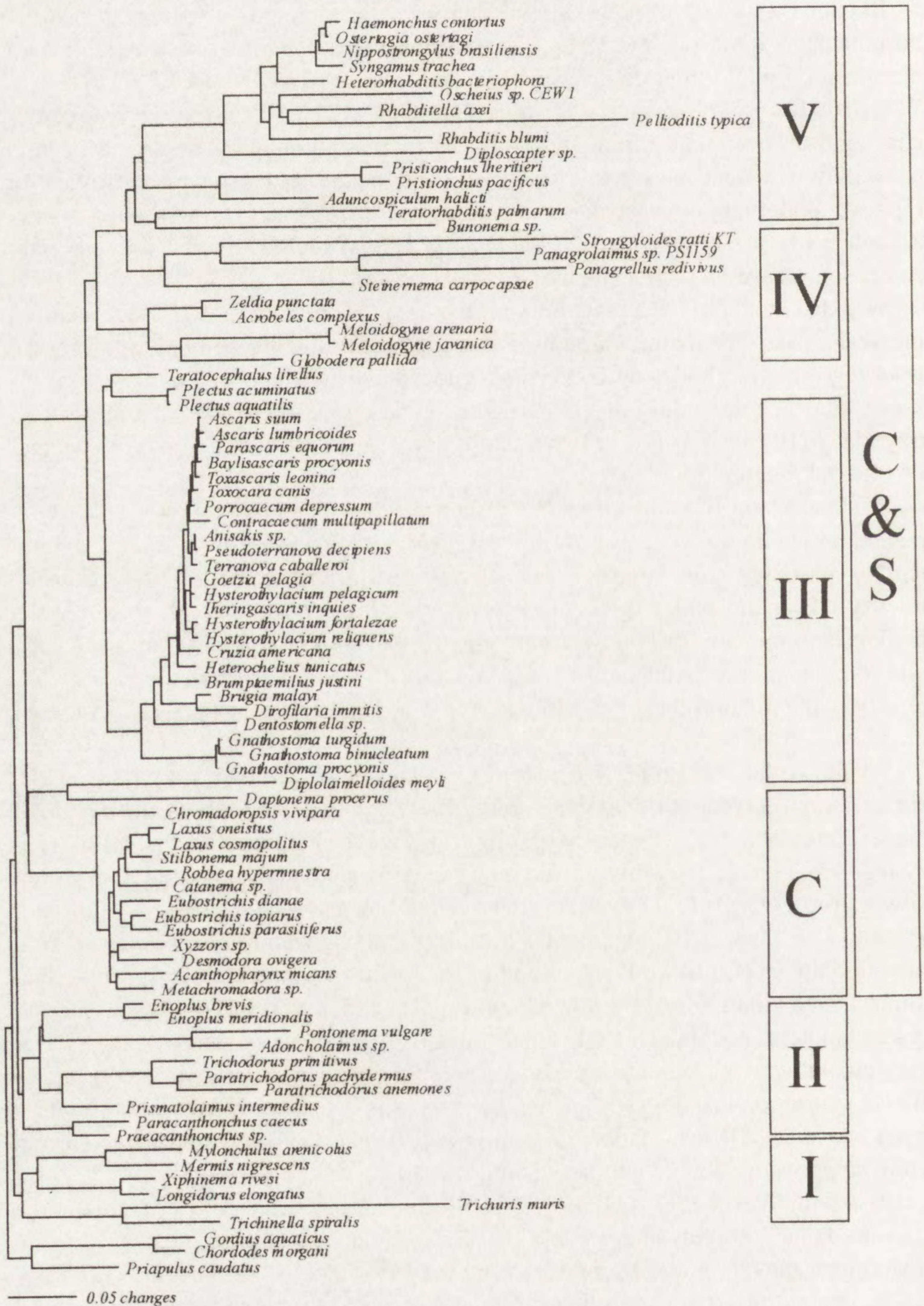
Blaxter i wsp. (2000) na podstawie analizy sekwencji małych podjednostek rybosomalnego RNA przypuszczają, że powstawanie pasożytnictwa u nicieni było niezależnie i miało miejsce przynajmniej w 6 grupach **IAAP 1-IAAP 6** (Rys. 1b). W kladzie I są zlokalizowane – *Trichocephalida* (**linia IAAP 1**) – pasożyty kręgowców, oraz *Mermithida* (**linia IAAP 2**), które w stadium larwalnym pasożytują u owadów. Te dwie pasożytnicze grupy zwierząt nie są taksonami siostrzanymi i prawdopodobnie powstawanie pasożytnictwa przebiegało u nich niezależnie. Z kladem I związane są również *Mononchida* i *Dorylaimida* – nicienie wolno żyjące i pasożytujące na roślinach.

W skład kladu II wchodzi *Enoplida* oraz *Triplonchida*, zawierające gatunki morskie i pasożyty roślin. Natomiast kład C&S jest nowym zbiorczym taksonem w którego skład wchodzi morskie i nieliczne lądowo-wodne *Chromadorida* oraz taksony należące uprzednio do „*Secernentea*”. Następnie *Secernentea* dzielą się na trzy klady (III, IV i V) nowej konstrukcji, zawierające zarówno pasożyty zwierząt i roślin, jak i gatunki wolno żyjące.

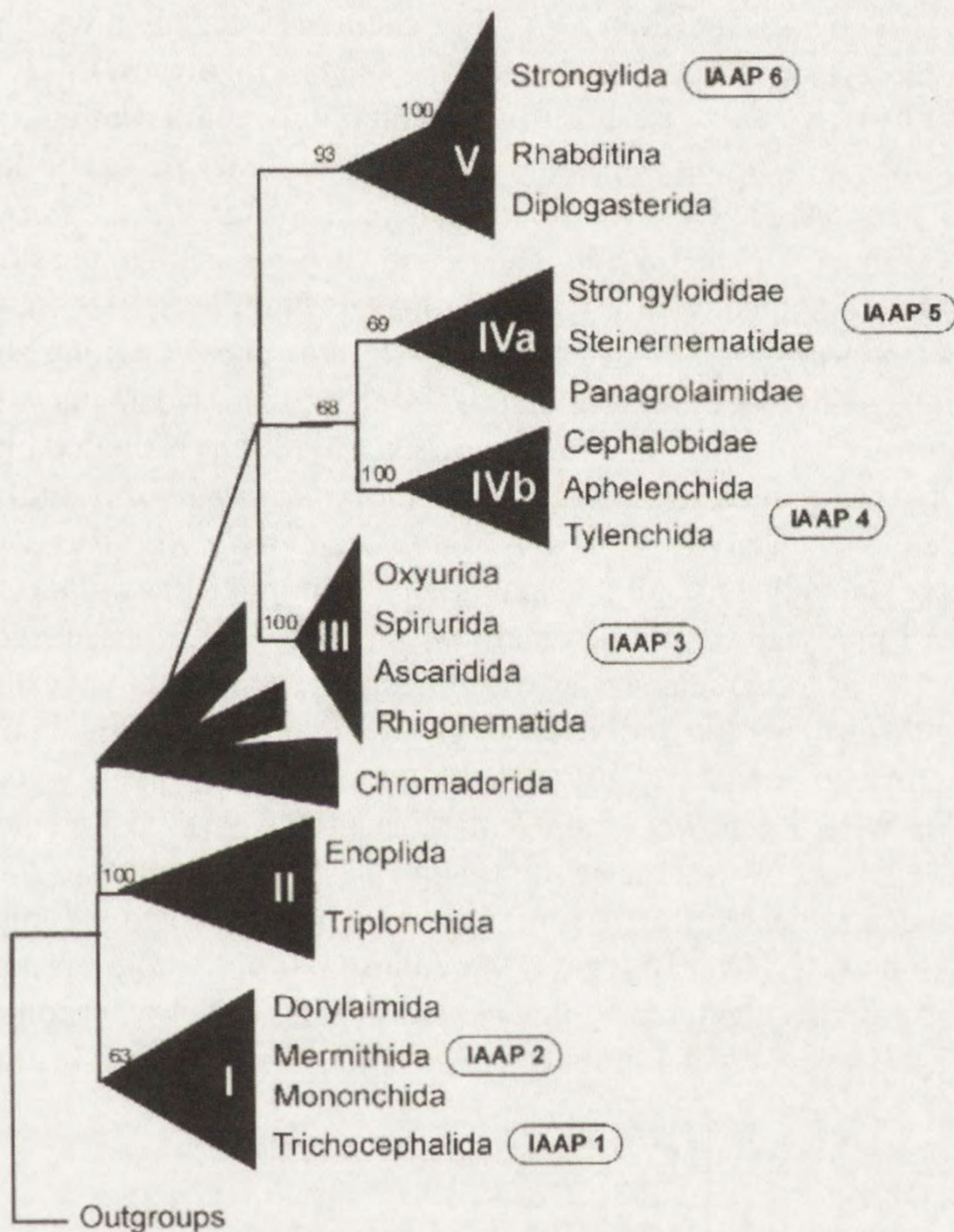
W skład kladu III – **linia IAAP 3** wchodzi tylko nicienie pasożytujące u zwierząt, należące do tradycyjnych rzędów *Ascaridida*, *Spirurida*, *Oxyurida* i *Rhigonematida* (pasożyty krocionogów). Jest to nowe powiązanie, o niewielkich różnicach między taksonami pod względem genetycznym. We wcześniejszych spekulacjach podkreślano jedynie ściśle powiązania między *Ascaridida* i *Spirurida* oraz *Oxyurida* i *Rhigonematida* (Anderson 1984, Malachov 1994). Należące tu nicienie cechuje olbrzymia różnorodność morfologiczna, żywicielska, oraz dotycząca biologii i cykli rozwojowych.

Wyniki badań wskazują, że *Spirurida* jest taksonem parafiletycznym zaś *Ascaridida* monofiletycznym. Natomiast monofiletyczność *Oxyurida* i *Rhigonematida* nie jest udowodniona. Blaxter i wsp. (2000) uważają, że na prześledzenie filogenezy tego kladu znaczący wpływ będą miały dodatkowe badania, szczególnie gatunków z grupy *Oxyurida*. Dotychczasowe poglądy na ewolucję i powstawanie pasożytnictwa w kladzie III sugerowały niezależne pochodzenie od glebowych form rabditoidalnych (Chitwood i Chitwood 1974, Adamson 1987, Malachov 1994). Natomiast molekularna analiza powstawania pasożytnictwa wskazuje także alternatywną hipotezę: pochodzenia od form związanych ze środowiskiem wodnym; pasożyty ewoluowały od wodnych *Plectida*, przodków *Monhysterida*. Ta grupa przedstawia „taksonomiczną wyspę”. Charakterystyczną cechą pasożytów umiejscowionych w kladzie III jest tendencja do migracji tkankowej, z wyjątkiem *Oxyurida*, które są prawdopodobnie ich przodkami.

Pasożytnictwo w tej grupie postępowało dwiema niezależnymi drogami. Linia „askaroidalna” utrzymywała się środowisku wodnym, gdzie nicienie rozwijały się u wodnych stawonogów i zdobywały ryby jako żywicieli ostatecznych. Wraz z pojawieniem się płazów, gadów i ssaków następowało stopniowe przechodzenie od nicieni heterosenicznych związanych ze środowiskiem wodnym do lądowych mo-



Rys. 1 a. Molekularna filogeneza Nematoda w oparciu o SSU (Blaxter i wsp. 2000)



Rys. 1 b. Molekularna filogeneza Nematoda w oparciu o SSU (Blaxter i wsp. 2000)

noksenicznych. Było to spowodowane stopniowym zmniejszaniem się liczby pośrednich i rezerwuarowych żywicieli w środowisku wodnym. Drugą drogą ewolucji postępowały nicienie *Spirurida* (i prawdopodobnie *Rhigonematida*); jest to linia z udziałem lądowych stawonogów. *Spirurida* mogą okazać się taksonem ułomnym ponieważ należące tu nadrodziny *Filaroidea*, *Dracunculoidea* i *Gnathostomatoidea*, jak wykazała analiza SSU rRNA, wykazują mniejszy stopień podobieństwa (Nadler 1995).

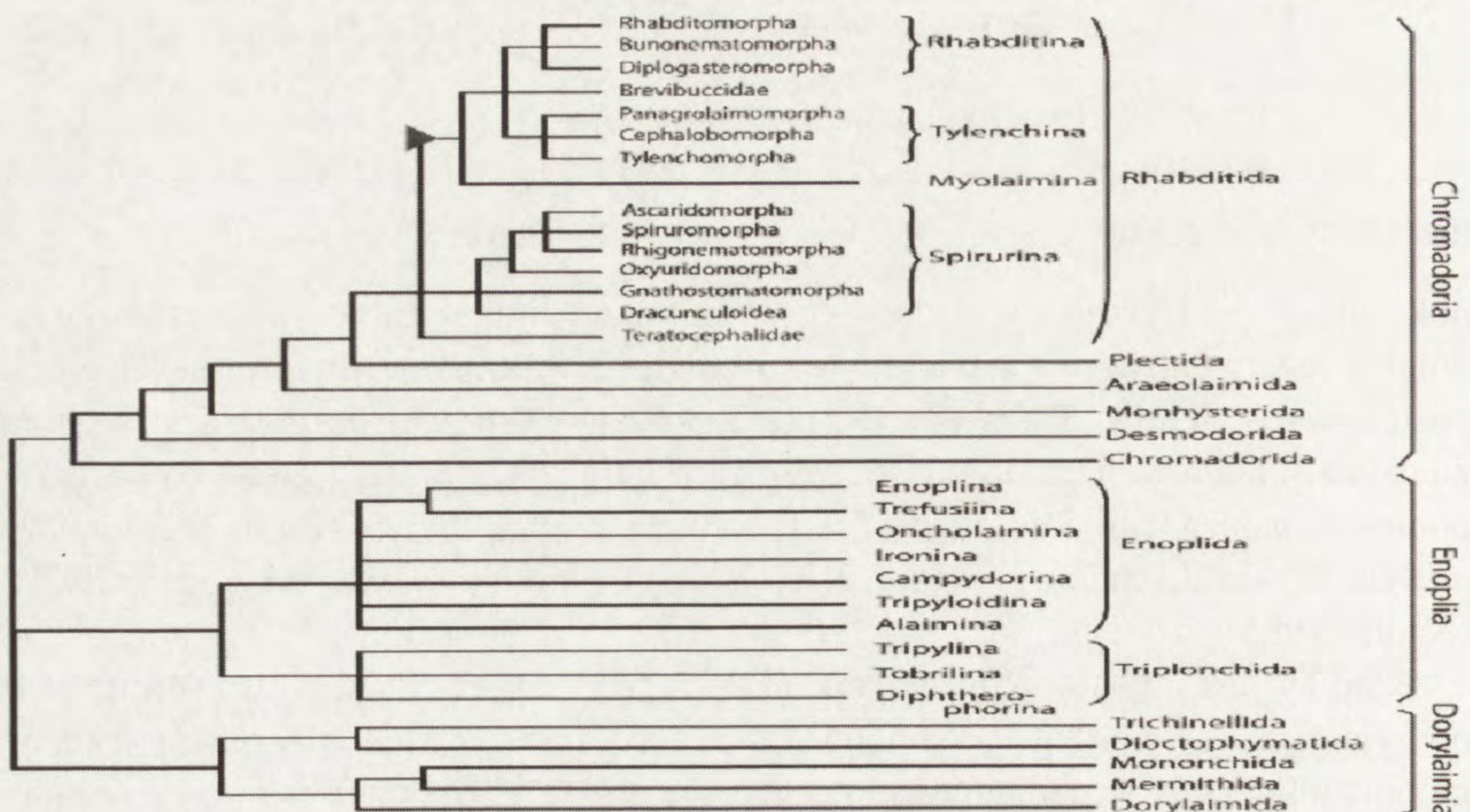
Klad IV jest nowatorskim powiązaniem pasożytów zwierząt, roślin i form wolno żyjących. Jest bardziej zróżnicowany genetycznie niż klad III i dlatego można go podzielić na dwie podjednostki (Dorris i wsp. 1999). Zawiera wolno żyjące *Cephalobida*, pasożyty roślin i owadów *Tylenchida*, także mikrobifagi *Aphelenchida* (**linia IAAP 4**) oraz entomopatogenne, związane symbiotycznie z bakteriami *Ste-*

nermatidae i *Strongyloididae* (**linia IAAP 5**) z charakterystycznym występowaniem pokolenia wolno żyjącego i pasożytniczego (pasożyty kręgowców).

Klad V (**linia IAAP 6**) zawiera zarówno wolno żyjące mikrobifagi, jak i pasożyty bezkręgowców (*Diplogasterida* i *Rhabditina*) oraz pasożyty kręgowców (*Strongylida*). Przedstawicielem *Rhabditina* jest *Caenorhabditis elegans*. Należące do tego kladu gatunki są bardzo odmienne genetycznie i analiza z zastosowaniem SSU rDNA wykazała między nimi znaczne różnice (Fitch i wsp. 1995).

W najnowszej pracy De Leya i Blaxtera (w druku) przedstawiony został nowy podział systematyczny w obrębie Nematoda. Poprzez zestawienie danych dotyczących cech morfologicznych z drzewami molekularnymi typ Nematoda podzielono na dwie grupy: *Chromadorea*, gdzie wyróżniono *Chromadoria* oraz *Enoplea*, w której wydzielone zostały dwa taksony: *Enoplia* i *Dorylaimia* (Rys. 2).

Nowoczesne metody biologii molekularnej i genomiki pozwalają obecnie na wyszukiwanie i porównywanie sekwencji par nukleotydów u poszczególnych gatunków, przez co przyczyniają się do weryfikacji pozycji systematycznej, a także prześledzenia historii ewolucyjnej badanej grupy organizmów. U nicieni, jako niejednorodnej grupie organizmów ze względnie dużymi genomami, wyodrębnienie pojedynczej sekwencji genowej „reprezentatywnego nicienia” jest niemożliwe. Do poznania sekwencji genów używa się sekwencji EST (Parkinson i wsp. 2003). EST-y są to krótkie odcinki genów (do 700 bp) uzyskane przypadkowo z komplementarnego DNA (klonów cDNA) (Blaxter 1999, Johnson 1999). Program poznania sekwencji EST-ów różnych gatunków nicieni prowadzony jest przy współpracy genomicznych grup University of Edinburgh, Wellcome Trust Sanger Institute w UK



Rys. 2. Filogeneza Nematoda wg De Leya i Blaxtera (w druku)

oraz Genome Sequencing Center, St. Louis, MO, USA. W projekcie generowane są sekwencje ponad 30 różnych gatunków nicieni. Łącznie z sekwencjami opracowanymi dla *Cenorhabditis elegans* (Kohara 1996) program wygenerował obecnie 400 000 sekwencji EST-ów, które dostępne są w internetowych bazach danych, głównie NemaGene i NEMABASE (www.nematode.net; www.nematodes.org). Przedstawiciele gatunków wybranych do sekwencjowania to zarówno gatunki wolno żyjące, jak i pasożyty roślin i zwierząt, pochodzące z czterech spośród pięciu kładów nicieni (Blaxter 1998, Dorris 1999).

Aktualnie (04.2004) w bazie danych GenBanku zawierających sekwencje nukleotydów w genomach Eukaryota, wśród całkowicie zbadanych gatunków jest jeden gatunek nicienia wolno żyjącego – *C. elegans*. Genom tego gatunku został zbadany już w 1998 roku. Składa się z 20 433 genów zlokalizowanych na 6 chromosomach i zawiera 100 274 bp. Poznane są całkowicie genomy mitochondrialne kilku gatunków pasożytniczych:

Ascaris suum (NC 001327 liczący 14 284 bp – Aug 25, 1999); *Onchocerca volvulus* (NC 001861 – 13 747 bp – Aug 25, 1999); *Trichinella spiralis* (NC 002681 – 16 706 bp – Feb 2, 2001); *Ancylostoma duodenale* (NC 003415 – 13721 bp – Feb 21, 2002); *Necator americanus* (NC 003416 – 13 605 bp – Feb 21, 2002); *Brugia malayi* (NC 004298 – 13657 bp – Sep 25, 2002); *Cooperia oncophora* (NC 004806 – 13 636 bp – May 15, 2003); *Strongyloides stercoralis* (NC 005143 – 13 758 bp – Oct 29, 2003); *Dirofilaria immitis* (NC 005305 – 13 814 bp – Jan 2, 2004).

Zastosowanie technik biologii molekularnej umożliwia dokonywanie analizy klasyfikacji nicieni i śledzenie ewolucji pasożytnictwa tej grupy.

LITERATURA

- Adamson M. 1987. Phylogenetic analysis of the higher classification of the nematoda. *Canadian Journal of Zoology* 65: 1478-1482.
- Anderson R.C. 1984. The origin of zooparasitic nematodes. *Canadian Journal of Zoology* 62: 317-328.
- Anderson R.C. 1988. Nematode transmission patterns. *Journal of Parasitology* 74: 3-45.
- Anderson R.C. 1992. Nematode parasites of vertebrates. Their development and transmission (CAB International, Wallingford, UK).
- Anderson R.C. 2000. Nematode Parasites of Vertebrates – their development and transmission. 2nd ed. Ontario, Canada.
- Andrassy J. 1976. Evolution as a basis the systematization of nematodes. Akad. Kiado, Budapest.
- Blaxter M.L. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71-75.
- Blaxter M.L. 1999. Parasitic helminth genomics. *Parasitology*. 118: 39-51.
- Blaxter M.L. 2001. Molecular analysis of nematode evolution. Parasitic Nematodes. CAB International.
- Blaxter M.L., De Ley P., Garey J.R., Liu L.X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J.R., Mackey L.Y., Dorris M., Frisse L.M., Vida J.T., Thomas W.K. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71-75.

- Blaxter M., Dorris M., De Ley P. 2000. Patterns and processes in the evolution of animal parasitic nematodes. *Nematology* 2: 43-55.
- Chitwood B.G., Chitwood M.B. 1974. Introduction to Nematology. Baltimore, MD, USA. University Park Press.
- De Ley P., Blaxter M.L. (0000). A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. *Nematology* (in press).
- Dorris M., De Ley P., Blaxter M.L. 1999. Molecular analysis of Nematoda diversity and the evolution of parasitism. *Parasitology Today* 15: 188-193.
- Fitch D.H.A., Bugaj-Gaweda B., Emmonns S.W. 1995. 18 S ribosomal gene phylogeny for some Rhabditidae related to *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology and Evolution* 12: 346-358.
- Johnson D.A. 1999. Genomics and the biology of parasites. *Bioessays* 21: 131-147.
- Kohara Y. 1996. Large scale analysis of *C. elegans* cDNA. *Tanpakushitsus Kakusan Koso* 41: 715-720.
- Lorenzen S. 1994. The phylogenetic systematics of free-living nematodes. The Ray Society London.
- Maggenti A.R. 1983. Nematode higher classification as influenced by the species and family concepts. In: *Concepts in nematode systematics* (Eds. A.R. Stone, H.M. Platt, L.F. Khalil), London, UK, Academic Press: 25-40.
- Malachov V.V. 1994. Nematodes. Structure, development, classification and phylogeny. Smithsonian Institution Press. Washington.
- Nadler S.A. 1995. Advantages and disadvantages of molecular phylogenetics: a case study of ascariid nematodes. *Journal of Nematology* 27: 423-432.
- Okulewicz A. 1994. Powstawanie pasożytnictwa u nicieni i kształtowanie się układów pasożytywicieli. *Wiadomości parazytologiczne* 40: 35-43.
- Okulewicz A., Lonc E. 2001. Nowe/stare poglądy na systematykę i filogenezę nicieni (Nematoda), ze szczególnym uwzględnieniem *Ascaridida*, *Ascaridoidea*. *Wiadomości Parazytologiczne* 47: 261-268.
- Parkinson J., Mitreva M., Hall N., Blaxter M., McCarter J.P. 2003. 400 000 nematodes ESTs on the Net. *Trends in Parasitology* 19: 283-286.

Zaakceptowano do druku 30 maja 2004