

Identyfikacja molekularna oraz zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe pasożytniczych nicieni z rodziny Anisakidae

Joanna Dzido

Rodzina Anisakidae obejmuje nicienie o heteroksenicznym cyklu życiowym związanym ściśle ze środowiskiem morskim. Spożycie mięsa zawierającego larwy tych pasożytów może wywołać u człowieka reakcję alergiczną lub chorobę. Identyfikacja stadiów larwalnych tych pasożytów jest trudna i możliwa często jedynie z wykorzystaniem metod molekularnych. Badania biochemiczne pozwoliły na wykrycie w obrębie Anisakidae licznych gatunków kryptycznych, które różnią się zasięgiem występowania, biologią i patogennością.

Przedstawiona praca jest kontynuacją wieloletnich badań prowadzonych w Katedrze Zoologii Bezkręgowców, których jednym z celów jest opracowanie „klucza” molekularnego do identyfikacji przedstawicieli Anisakidae w oparciu o analizę PCR–RFLP fragmentów rybosomalnego DNA obejmujących ITS1–5.8S–ITS2.

Przebadano pod kątem występowania Anisakidae ryby, ssaki oraz ptaki z rejonów polarnych. W dostępnym materiale stwierdzono obecność dziewięciu gatunków z rodziny Anisakidae, z których trzy należą do *Anisakis simplex* (*A. simplex*, *A. pegreffii*, *A. simplex* C), cztery to *Contracaecum* (*C. mirounga*, *C. osculatum* A, *C. osculatum* B, *C. osculatum* C), a dwa *Pseudoterranova* (*P. decipiens* E, *P. bulbosa*). Dla *Contracaecum* spp. oraz *Pseudoterranova* spp. opracowano metodę identyfikacji z wykorzystaniem kombinacji odpowiednio trzech (TaqI, RsaI, XbaI) oraz czterech (TaqI, RsaI, HhaI, MboI) enzymów restrykcyjnych.

Jądrowe rybosomalne DNA Anisakidae, charakteryzuje się relatywnie dużym zakonserwowaniem ewolucyjnym, przez co zastosowanie tego markera do identyfikacji bardzo blisko spokrewnionych gatunków oraz badania relacji wewnątrzgatunkowych jest ograniczone. Jednym z celów tej pracy było wytypowanie markerów, które charakteryzowałyby się wyższym zróżnicowaniem, a jako cel molekularny wybrano mtDNA.

W fazie wstępnej badań przetestowano przydatność wybranych fragmentów mtDNA do analizy zróżnicowania wewnątrzgatunkowego oraz identyfikacji gatunkowej przedstawicieli Anisakidae. Przeprowadzone badania wykazały, że w obrębie gatunku *A. simplex* s.s., który uważany był za jednorodny genetycznie w całym zasięgu swojego występowania, można wyróżnić dwie subpopulacje. Badania wstępne pozwoliły również stwierdzić przeszło czterokrotnie wyższe zróżnicowanie nukleotydowe pomiędzy

arktycznymi przedstawicielami *C. osculatum* w badanych genach mitochondrialnych w porównaniu z sekwencjami ITS1–5.8S–ITS2 tych gatunków. Jednocześnie stwierdzono, że polimorfizm wewnątrzgatunkowy w badanych genach jest zdecydowanie niższy aniżeli zróżnicowanie międzygatunkowe (K2P = 0,01–0,03 vs. K2P = 0,06–0,12).

Obiecujące wyniki badań wstępnych stały się przyczyną rozszerzenia analiz na pozostałe geny mitochondrialnego DNA. W efekcie uzyskano sekwencje i opisano genomy mtDNA pięciu gatunków Anisakidae: *A. simplex* s.s., *A. simplex* C, *C. osculatum* A, *C. osculatum* B oraz *C. osculatum* C. Łącznie uzyskano 19 cząsteczek mitochondrialnego DNA o średniej długości 13 850 pz. Przeprowadzono analizę zróżnicowania sekwencji wszystkich badanych gatunków, ze szczególnym uwzględnieniem gatunku *A. simplex* s.s.

Dla arktycznych przedstawicieli kompleksu *C. osculatum* największą dywergencję nukleotydową stwierdzono w genach kodujących ND4 (10,1%), CYTB (9,8%), CO3 (9,5%), ND5 (8,7%) i ND1 (9,0%), natomiast dla kompleksu *A. simplex* w genach kodujących ND1 (6,8%), CYTB (6,7%) oraz ND5, CO3, ND2, ND4 (6,0%). Wytypowane markery mogą być potencjalnie użyteczne do identyfikacji gatunków, których rozróżnienie na podstawie do tej pory dostępnych sekwencji było niemożliwe.

Analizując zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe *A. simplex* s.s. stwierdzono, że gen ND1 jest potencjalnie najbardziej użyteczny do badań populacyjnych *A. simplex* s.s. W kolejnym kroku uzyskano fragmenty sekwencji tego genu dla 49 osobników *A. simplex* s.s. pozyskanych z 12 gatunków ryb odłowionych z Morza Bałtyckiego, Morza Barentsa, Cieśniny Davisa, Morza Beringa, Morza Ochockiego oraz wód u wybrzeży Alaski. Stwierdzono istotne zróżnicowania pomiędzy próbkami z Atlantyku i Pacyfiku (FST = 0,532, $p < 0,0001$), natomiast nie wykazano dalszej struktury wewnątrz każdej z tych grup, związanej czy to z gospodarzem, czy też z akwem, z którego pochodziły. Analiza sekwencji wykazała, że różnorodność nukleotydowa w obrębie grupy pacyficzej ($\pi = 0,025$) jest przeszło dwukrotnie wyższa w porównaniu z grupą atlantycką ($\pi = 0,012$).

Na podstawie uzyskanych sekwencji mtDNA przeprowadzono również analizę filogenetyczną badanych gatunków. Analiza pokazała, że przedstawiciele *Anisakis* spp. i *Contracaecum* spp. grupują się razem z wysokim wsparciem statystycznym. W przeprowadzonych analizach *A. simplex* C był grupą zewnętrzną dla *A. simplex* s.s. i *A. pegreffii* z wysokim wsparciem statystycznym. Dane zebrane odnośnie *C. osculatum* C pokazały, że gatunek ten najbardziej różni się od pozostałych przedstawicieli kompleksu *C. osculatum*.