

JAK ROZUMIEĆ GATUNEK PASOŻYTA W DOBIE BADAŃ MOLEKULARNYCH?

KATARZYNA NIEWIADOMSKA I TERESA POJMAŃSKA

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, ul Twarda 51/55 00-118 Warszawa

ABSTRACT. A concept of parasite species in the age of molecular studies. The problem of species recognition in relation to parasite organisms is discussed, based on literature data. Taking into account that over 20 species concepts have hitherto been formulated, the choice of characters, which should define a species differs from author to author. Lately the differences in some gene fragments are regarded as one of most important feature for species differentiation. On this basis some lineages, genotypes or strains have been differentiated within some species, but in most cases the respective authors did not decide to elevate these units to the species level. The present paper focuses on the studies on species representing three genera (*Taenia*, *Echinococcus*, *Trichinella*) as they show, especially the complex studies on the species within the genus *Trichinella*, how big material is necessary to formulate any proper conclusion and, on the other hand, that the differences in the DNA sequences cannot be the only characters defining species; some other features (morphological, biological, behavioral) should not be considered redundant.

Key words: molecular data, species concepts.

Termin „gatunek” wprowadził do nauki Reicher już w 1650 roku; w XVIII wieku użył go Linneusz, a ponad 140 lat temu Darwin opublikował swoje dzieło „O powstawaniu gatunków”. Od tego czasu uczeni próbują zdefiniować gatunek na podstawie aktualnego stanu wiedzy, jednak mimo rozwoju wielu nowych technik, nowych idei naukowych, pojęcie gatunku wciąż stanowi trudny do rozwiązania problem. Gatunek jest dość wieloznacznym pojęciem biologicznym; może dotyczyć konkretnej grupy organizmów o taksonomicznej randze gatunku, można go też rozpatrywać jako podstawową kategorię systematyczną. Do końca XX wieku sformułowano ponad 20 koncepcji gatunku (patrz: zestawienie w artykule Jody Hey 2001); w naszym referacie omówimy tylko niektóre z nich, głównie te, które miały większy wpływ na praktykę taksonomiczną. Można je pogrupować na te, które oparte są na wzorcu pokrewieństwa między organizmami, wynikającego ze specjacji, oraz na takie, które koncentrują się wyłącznie na procesach odpowiedzialnych za specjację. Pierwsze są ściśle empiryczne i traktują gatunek jak arbitralną jednostkę taksonomiczną: do nich odnoszą się: morfologiczna, fenetyczna i genetyczna koncepcja gatunku, opierające się głównie na podobieństwie organizmów. Drugą grupę stano-

wią: koncepcja biologiczna i koncepcja gatunku jako systemu rozpoznawczego; u ich podstawy leży możliwość krzyżowania się osobników w obrębie określonej grupy organizmów lub mechanizmy umożliwiające krzyżowanie. Niektóre koncepcje biorą pod uwagę zarówno wzorzec pokrewieństwa, jak i procesy specjacji; do nich należą: monofiletyczna i ewolucyjna koncepcja gatunku oraz związana z nimi koncepcja spójności gatunku. Przedstawimy kilka definicji najważniejszych koncepcji (czerpanych głównie z prac: Krzanowska i wsp. 1995, Lymbery i Thompson 1996 oraz Hey 2001).

Morfologiczna koncepcja gatunku – gatunek, to grupa organizmów o identycznej lub prawie identycznej postaci; jednak za każdym razem trzeba decydować, jaki stopień odrębności morfologicznej jest niezbędny dla wyróżnienia tego taksonu.

Fenetyczna koncepcja gatunku – można uznać za gatunek najmniejsze (najbardziej homogeniczne) skupisko organizmów, które jest rozpoznawalne na podstawie określonego kryterium jako różne od innego takiego skupiska.

Genetyczna koncepcja gatunku – osobniki danego gatunku dzielą wspólną pulę genową z innymi osobnikami w obrębie tego gatunku. Osobniki różnych gatunków nie wymieniają materiału genetycznego.

Diagnostyczna koncepcja gatunku – gatunek jest najmniejszym skupiskiem populacji (płciowych) lub linii (bezpłciowych), które można określić przez unikatową kombinację zespołu cech w porównywalnych osobnikach.

Biologiczna koncepcja gatunku – gatunki są izolowanymi rozrodczo pulami genowymi. W obrębie gatunku przepływ genów nie znajduje żadnych przeszkód, poza barierami zewnętrznymi (geograficznymi) oddzielającymi od siebie poszczególne populacje.

Ekologiczna koncepcja gatunku – każdy gatunek wykorzystuje w swoim środowisku szczególny zestaw zasobów, niszę, i czyni to najskuteczniej w określonym zespole warunków. Dwa gatunki nie mogą dzielić tej samej niszy, ponieważ bardziej skuteczny zwycięży i wyprze słabszego.

Koncepcja gatunku jako systemu rozpoznawczego – za gatunek można uznać populację obejmującą organizmy rozdzielnopłciowe, których dwie płcie potrafią się nawzajem rozpoznać.

Monofiletyczna koncepcja gatunku – gatunek jest najmniejszym taksonem, w którym organizmy są grupowane na podstawie istniejących dowodów monofiletyzmu (zwykle, ale nie tylko, ograniczonych do obecności synapomorfii), czyli stanowią najmniejszą „ważną” linię, wartą formalnego uznania, gdzie „ważne” odnosi się do działania tych procesów, które dominują w wydawaniu potomstwa i utrzymaniu linii ewolucyjnej. Gatunek obejmuje wszystkich potomków określonego przodka, spokrewnionych bliżej między sobą niż z jakimkolwiek osobnikiem z grupy zewnętrznej.

Ewolucyjna koncepcja gatunku – gatunek jest ewolucyjną linią populacji organizmów wywodzących się od wspólnego przodka, zachowujących indywidual-

ność i odrębność od innych takich linii, wykazującą własne tendencje ewolucyjne i mającą historycznie uwarunkowaną przyszłość.

Koncepcja spójności gatunku – gatunek spójny jest ewolucyjną linią, która jest areną działalności podstawowych czynników mikroewolucyjnych, takich jak przepływ genów (jeśli daje się zastosować), dryft genetyczny i dobór naturalny.

Jak widać, niektóre z tych koncepcji oparte są na podobnych przesłankach i wzajemnie się nie wykluczają.

W serii artykułów, które się ostatnio ukazały (LyMBERY i Thompson 1996, Kunz 2002, de Meeus i wsp. 2003, Stevens i Schofield 2003 i inne) rozważana jest wartość i przydatność poszczególnych koncepcji. Przyjmuje się, że koncepcje oparte na cechach morfologicznych, behawioralnych, fizjologicznych lub biochemicznych mają pewne wspólne ograniczenia. W podobnym środowisku dobór naturalny może prowadzić (dzięki zwycięstwu „najlepiej przystosowanego”) do powstania prawie identycznego fenotypu u niespokrewnionych organizmów (zjawisko konwergencji u gatunków polifiletycznych). Biologiczna koncepcja gatunku ma z kolei zastosowanie tylko do organizmów rozmnażających się płciowo, a i w tym przypadku niekiedy tylko w ograniczonym stopniu. U organizmów obojnaczych, głównie pasożytniczych, przy niskim zagęszczeniu populacji może dochodzić do samozapłodnienia, jak na przykład w przypadku tasiemca *Taenia solium*, który zwykle występuje w jelicie żywiciela pojedynczo. Również przywry, szczególnie metacerkarie progenetyczne otoczone cystą w żywicielu pośrednim, nie mają możliwości krzyżowego zapłodnienia. Na innym etapie cyklu rozwojowego przywr digenetycznych, u sporocyst i redii, a także u larw niektórych tasiemców, rozmnażanie partenogenetyczne lub bezpłciowe prowadzi do powstawania klonów.

Wprowadzenie analizy sekwencji DNA do taksonomii otworzyło nowe możliwości rozwiązywania problemów dotyczących gatunku. Szczególnie istotna jest możliwość weryfikacji samodzielności gatunków budzących wątpliwości z powodu braku wyraźnych różnic morfologicznych, biologicznych czy fizjologicznych. Z drugiej strony metoda ta pozwala na badanie zróżnicowania genetycznego w obrębie gatunku. Większość DNA w genomie eukariontów nie koduje ani RNA ani białek i wydaje się, że te sekwencje, zwane neutralnym DNA, nie mają żadnej funkcji i nie podlegają selekcji. Dobór naturalny oddziałuje tylko na fenotyp, natomiast presja selekcyjna nie wpływa na wymianę niektórych nukleotydów. Konwergencyjna ewolucja sekwencji nukleotydowych nie jest możliwa. Dlatego też wykazanie identyczności badanych sekwencji nukleotydowych u dwóch bliskich, ale uważanych za odrębne, gatunków może być wystarczającą podstawą do uznania ich za synonimy. W literaturze mamy wiele przykładów takich decyzji taksonomicznych. Można tu wymienić badania nad gatunkami metacerkarii *Apatemon annuligerum* i *A. gracilis* (Bell i Sommerville 2002), w wyniku których *A. annuligerum* został uznany za młodszy synonim *A. gracilis*.

Szczególnym obiektem badań nad różnorodnością genetyczną pasożytów ważnych z punktu widzenia zdrowia i interesów człowieka były między innymi tasiemce z rodzaju *Taenia* i *Echinococcus* oraz nicienie z rodzaju *Trichinella*.

Kędra i współpracownicy (2001) badali różnorodność genetyczną tasiemca *Taenia hydatigena*, pospolitego pasożyta drapieżnych, głównie Canidae. Ich larwy typu cysticercus występują w wielu żywicielach, między innymi w świniach. Do niedawna nikt nie kwestionował jednorodności tego gatunku. Badania sekwencji mitochondrialnego genu ND1 siedmiu izolatów uzyskanych ze świń z różnych miejscowości w Polsce, jednego izolatu ze świni z Ukrainy i jednego izolatu z psa z Walii wykazały, że nie są one identyczne, a różnice między poszczególnymi izolatami wahały się od 0,4 do 5,5%; największe występowały między izolatami z najbardziej odległych geograficznie miejsc, jak Walia i Ukraina, ale te izolaty pochodziły z innego gatunku żywiciela. Autorzy nie zdecydowali się jednak na wyodrębnienie szczepów w gatunku *Taenia hydatigena*, gdyż uznali materiał za zbyt skąpy do formułowania jakichkolwiek hipotez.

Rodzaj *Echinococcus* obejmuje cztery gatunki: *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *E. oligarthus* i *E. vogeli*. Zostały one opisane na podstawie cech morfologicznych i biologicznych, takich, jak liczba i położenie jąder, położenie otworu płciowego, kształt macicy i budowa cysticerkusa. Żywicielami ostatecznymi tych tasiemców są ssaki drapieżne, głównie Canidae, a żywicielami pośrednimi wiele grup ssaków, w większości związanych z gospodarką człowieka, a także człowiek. Badania genetyczne, zainicjowane przez Bowlesa i współautorów (1992), a prowadzone także przez Kędrę i współpracowników (1999, 2000), oparte były na sekwencjonowaniu mitochondrialnych genów NDI i COI oraz odcinka ITS1 rDNA, a dotyczyły głównie *E. granulosus*, a w mniejszym stopniu *E. multilocularis*. U *E. granulosus* wyróżniono genetycznie odrębne szczepy pochodzące z różnych żywicieli pośrednich (owca, świnia, koń, bydło, bawół, wielbłąd, jeleń, owca tasmańska i inne, również człowiek) i różnych rejonów geograficznych. W sumie wykryto 8 szczepów *E. granulosus* i 3 *E. multilocularis*. Genetyczne różnice między szczepami były często tak duże, jak między każdym z nich, a gatunkami *E. oligarthus* i *E. vogeli*, często nawet znajdowały się poza zakresem występującym między populacjami tego samego gatunku w innym żywicielu. Opracowane na podstawie tych wyników powiązania filogenetyczne między szczepami (w postaci drzew) wykazały parafiletyczność gatunku *E. granulosum*. Według Lymbery'ego i Thompsona (1996) monofiletyczność w obrębie tego gatunku można by osiągnąć albo przez podniesienie wyodrębnionych szczepów do rangi gatunków, albo przez włączenie szczepów *E. multilocularis* do gatunku *E. granulosus*. Rausch, który w latach 60. i 70. minionego stulecia włożył wiele starań w uporządkowanie taksonomii w obrębie rodzaju *Echinococcus*, jest przeciwny podniesieniu szczepów do rangi gatunków, natomiast Thompson i współautorzy (1995) uważają, że w rodzaju *Echinococcus* powinno się znaleźć 7 gatunków: cztery powstałe z *E. granulosus* [szczep świński i wielbłądzi

(*Echinococcus* sp.?), szczep bydłocy (*E. ortleppi*? opisany przez Ortleppa, 1934) szczep koński (*E. equinus*? opisany przez Williamsa i Sweatmana, 1963 jako podgatunek *E. g. equinus*) i szczep owczy, owczy tasmański i bawoli *E. granulosus*, opisany przez Williamsa i Sweatmana, 1963 jako podgatunek *E. g. granulosus*)] oraz *E. multilocularis*, *E. vogeli* i *E. oligarthus*. Tej sugestii autorzy nie doprowadzili jednak do końca. Uznali, że w odniesieniu do niektórych szczepów dysponowano zbyt małą liczbą izolatów. Pewnym problemem jest też fakt, że wszystkie szczepy *E. granulosus* osiągają postać dojrzałą płciowo w tych samych gatunkach żywicieli ostatecznych, zwykle w psach, możliwa jest więc wymiana materiału genetycznego, jeśli w infrapopulacji znajdują się osobniki pochodzące z różnych szczepów.

Problemowi odrębności gatunkowej nicieni w rodzaju *Trichinella* poświęcono chyba najwięcej prac. Już w latach 70. zwrócono uwagę na wewnętrzną niejednorodność gatunku *T. spiralis* (Owen, 1835), który przez długi czas był jedynym przedstawicielem rodzaju. Właśnie wtedy Britov i Boyev (1972) oraz Garkavi (1972) opisali 3 nowe gatunki. Było to impulsem do podjęcia szerokich badań nad tymi pasożytami. Szczególnie cenne są tu prace grupy badaczy włoskich (patrz między innymi: La Rossa i wsp. 1992; Pozio i wsp. 1992a, b, 2002; Pozio i La Rossa 2000), którzy przeprowadzili kompleksowe badania licznych izolatów pozyskiwanych od różnych żywicieli i z różnych rejonów geograficznych. Obok obserwacji morfologicznych prowadzili oni badania biochemiczne (allozymy), genetyczne (rDNA), a także badania eksperymentalne nad biologią rozwoju (liczba larw produkowanych *in vitro* w ciągu 72 g., czas rozwoju komórki-piastunki, wskaźnik zdolności reprodukcyjnej w zwierzętach laboratoryjnych, odporność na zamrażanie, zdolności krzyżowania). Analizowali także pochodzenie izolatów pod kątem kręgu ich żywicieli i zasięgu geograficznego. Wynikiem tych prac było wyodrębnienie w rodzaju *Trichinella* 11 genotypów z których 8 zostało uznanych przez wymienionych autorów za samodzielne gatunki. Są to 4 opisane wcześniej przez innych badaczy: *T. spiralis* (Owen, 1935) (szczep T1), *T. nativa* Britov et Boyev, 1972 (T2), *T. nelsoni* Britov et Boyev, 1972 (T7) i *T. pseudospiralis* Garkavi, 1972 (T4) i 4 nowe: *T. britovi* Pozio et al. 1992 (T3), *T. papuae* Pozio et al. 1999 (T10), *T. murrelli* Pozio et La Rossa, 2000 (T5) i *T. zimbabwensi* Pozio et al. 2002. W odniesieniu do genotypów T6, T8 i T9 nie podjęto jeszcze ostatecznej decyzji, czy są to samodzielne gatunki, czy też szczepy któregoś z wyżej wymienionych.

Stwierdzenie zróżnicowania genetycznego w obrębie wielu gatunków pasożytów spowodowało, że problem zdefiniowania pojęcia gatunku stał się niezwykle aktualny wśród parazytologów. Jak to widzimy na przykładzie rodzaju *Echinococcus*, kryteria genetyczne inaczej grupują gatunki, niż kryteria morfologiczne i biologiczne. Zdaniem Lymbery'ego i Thompsona (1996) podział *E. granulosus* jest potrzebny, a wymaganom Międzynarodowego Kodeksu Nomenklatury Zoologicznej nie trudno sprostać, bo w literaturze można znaleźć taksonomiczne opisy dla wszystkich gatunków pochodnych. Natomiast Rausch (ustne wypowiedzi w cytowanym

artykule Lymbery'ego i Thompsona) uważa, że morfologiczne i biologiczne kryteria, charakteryzujące gatunki, które powstałyby ze szczepów, nie są porównywalne z tymi, które różnią dotychczas wyróżniane 4 gatunki *Echinococcus*. Niewątpliwie porównywalne są kryteria opracowane dla 8 gatunków wyodrębnionych w rodzaju *Trichinella*: morfologiczne, biologiczne, fizjologiczne i genetyczne. Warto tu zwrócić uwagę, że specyficzność względem żywicieli, często brana pod uwagę przez parazytologów przy wyodrębnianiu gatunków, może być pomocnym, ale nie decydującym kryterium. W przypadku *Trichinella* każdy z gatunków ma wprawdzie innego głównego żywiciela, ale żywiciele pomocniczy mogą być wspólni dla kilku gatunków; w przypadku tasiemców z rodzaju *Echinococcus* poszczególne szczepy mają innych żywicieli pośrednich, ale często wspólnych żywicieli ostatecznych.

Zastosowanie kladystyki do systematyki prowadzi w stronę diagnostycznej koncepcji gatunku – może on być diagnozowany przez określoną cechę, mającą podłoże genetyczne. Taka koncepcja, podobnie jak koncepcja fenetyczna, odpowiada jednostkom, które tworzą terminalne taksony w analizie filogenetycznej. Pozostaje jednak pytanie, które cechy należy uznać za diagnostyczne. Przedstawione wyżej wyniki badań i oparte na nich rozważania wskazują, że w przypadkach zróżnicowania gatunku na genetycznie zdefiniowane grupy (szczepy, linie), którym towarzyszą dostrzegalne różnice biologiczne, fizjologiczne i niekiedy morfologiczne, możliwe jest przeniesienie diagnoz gatunkowych na ten poziom. Wymaga to jednak kompleksowych i dokładnych badań; różnice w sekwencji mitochondrialnego DNA nie mogą być jedyną podstawą wyróżniania gatunku.

Zdefiniowanie gatunku, niezależnie od przyjmowanej koncepcji, jest zawsze arbitralną decyzją badacza, który wyznacza zestaw charakteryzujących go cech, a tym samym jego granice. Na ten aspekt zwraca uwagę Kunz (2003), który przypomina, że już Darwin pisał, iż należy traktować gatunki w ten sam sposób co rodzaje, „jedynie jako sztuczne kombinacje utworzone dla naszej wygody”. Od siebie dodaje on, że należy zmienić nasz język i przestać mówić o identyfikacji dobrych, walidnych gatunków, gdyż zawsze mówimy o sztucznej jednostce, powołanej przez nas samych. My od siebie dodamy, że choć niewątpliwie tworzymy sztuczne jednostki, i tworzymy je dla naszej wygody w celu wprowadzenia jakiegoś porządku do nieograniczonej różnorodności biologicznej, to wszechstronne badania powinny zbliżyć nas do ideału – opisu realnie istniejącej w przyrodzie najmniejszej jednostki, nazywanej dawno temu gatunkiem, a której fundamentalną cechą jest wewnętrzne podobieństwo genetyczne oraz zdolność do wydania płodnego potomstwa. Nie wyklucza to możliwości zmienności wywoływanej różnymi czynnikami zewnętrznymi i wewnętrznymi, a prowadzącej do specjacji, czyli powstawania nowych gatunków.

LITERATURA

- Bell A.S., Sommerville C. 2002. Molecular evidence for the synonymy of two species of *Apatemon* Szidat, 1928, *A. gracilis* (Rudolphi, 1819) and *A. annuligerum* (von Nordmann, 1832) (Digenea: Strigeidae) parasitic as metacercariae in British fishes. *Journal of Helminthology* 76: 193-198.
- Bowles J., Blair D., McManus D.P. 1992. Genetic variations within the genus *Echinococcus* identified by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular and Biochemical Parasitology* 54: 165-174.
- Britov V.A., Boyev S.N. 1972. [Taxonomic rank of various strains of *Trichinella* and their circulation in nature]. *Vestnik Akademii Nauk KSSR* 28: 27-32 (in Russian).
- Garkavi B.L. 1972. Species of *Trichinella* isolated from wild animals. *Veterinariya* 10: 90-91.
- Hey J. 2001. The mind of the species problem. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 326-329.
- Kędra A.H., Świdorski Z., Tkach V.V., Dubinski P., Pawłowski Z., Stefaniak J., Pawłowski J. 1999. Genetic analysis of *Echinococcus granulosus* from humans and pigs in Poland, Slovakia and Ukraine. A multicenter study. *Acta Parasitologica* 44: 248-254.
- Kędra A.H., Świdorski Z., Tkach V.V., Rocki B., Pawłowski J., Pawłowski Z. 2000. Variability within NADH dehydrogenase sequences of *Echinococcus multilocularis*. *Acta Parasitologica* 45: 353-355.
- Kędra A.H., Tkach V.V., Swiderski Z., Pawłowski Z. 2001. Intraspecific variability among NADH dehydrogenase subunit 1 sequences of *Taenia hydatigena*. *Parasitology International* 50: 145-148.
- Krzanowska H., Łomnicki A., Rafiński J., Szarski H., Szymura J.M. 1995. Zarys mechanizmów ewolucji. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Kunz W. 2002. When is a parasite species a species? *Trends in Parasitology* 18: 121-124.
- La Rossa G., Pozio E., Rossi P., Murrell K.D. 1992. Allozyme analysis of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *Journal of Parasitology* 78: 641-646.
- Lymbery A.J., Thompson R.C.A. 1996. Species of *Echinococcus*: pattern and process. *Parasitology Today* 12: 486-491.
- Meeus de T., Durand P., Renaud F. 2003. Species concepts: what for? *Trends in Parasitology* 19: 425-427.
- Ortlepp R.J. 1934. *Echinococcus* in dogs from Pretoria and vicinity. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science* 3: 97-108.
- Pozio E., La Rossa G. 2000. *Trichinella murrelli* n. sp: ecological agent of sylvatic trichinellosis in temperate areas of North America. *Journal of Parasitology* 86: 134-139.
- Pozio E., La Rossa G., Rossi P., Murrell K.D. 1992a. Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *Journal of Parasitology* 78: 647-653.
- Pozio E., La Rossa G., Murrell K.D., Lichtenfels J.R. 1992b. Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *Journal of Parasitology* 78: 654-659.
- Pozio E., Foggin C.M., Marucii G., La Rossa G., Sacchi L., Corona S., Rossi P., Mukaratirva S. 2002. *Trichinella zimbabwenis* n. sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe also infecting mammals. *International Journal for Parasitology* 32: 1787-1799.
- Steven J.R., Schofield C.J. 2003. Phylogenetics and sequence analysis – some problems for the unwary. *Trends in Parasitology* 19: 582-588.
- Thompson R.C.A., Lymbery A.J., Constantine C.C. 1995. Variations in *Echinococcus*: Towards a taxonomic revision of the genus. *Advances in Parasitology* 35: 145-176.
- Williams R.J., Sweatman G.K. 1963. On the transmission, biology and morphology of *Echinococcus granulosus equinus*, a new subspecies of hydatid tapeworms in horses in Great Britain. *Parasitology* 53: 391-407.