Populacijska dinamika i genetička struktura ribljih nametnika kukaša (Acanthocephala) kao pokazatelj stabilnosti vodenog ekosustava

Irena Vardić Smrzlić

Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za akvakulturu i patologiju akvatičnih organizama

OKOLIŠ

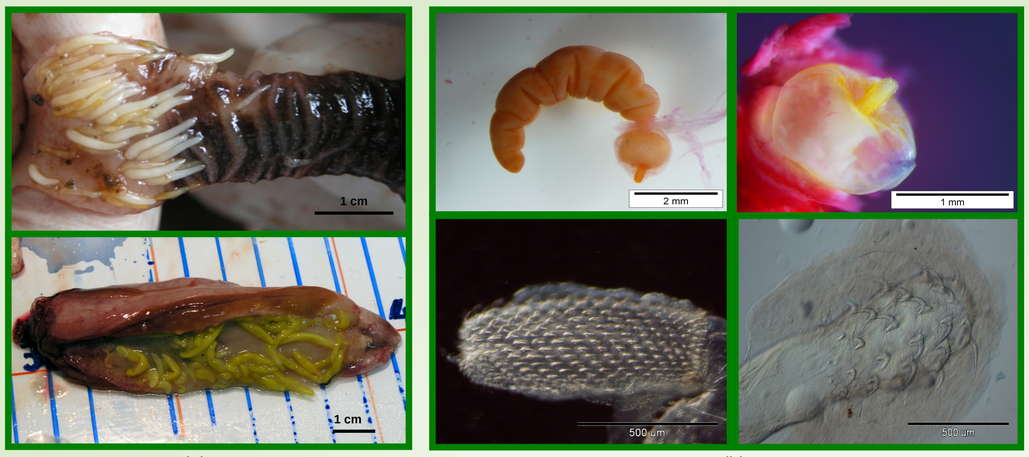
UVOD

Nametnici su sastavni dio svakog ekosustava i predstavljaju osnovni faktor globalne bioraznolikosti. Nametnici riba pokazuju ekstremnu raznolikost i značajni su biološki indikatori migracijskih puteva riba, trofičkih i filogenetičkih međuodnosa, kao i zagađenja i eutrofikacije (Lafferty, 2008; Marcogliese, 2005). Pripadnici koljena kukaša (Acanthocephala) su slabo istraženi crijevni nametnici (Slika 1) koji u novije vrijeme postaju predmetom istraživanja zbog interesantnih karakteristika i mogućih primjena:

1. kao mogući indikatori zagađenja u vodenom okolišu
2. imaju manipulacijski učinak na međudomadare (račiće)
3. imaju potencijalno patogeni učinak na krajnje domadare (ribe)
4. imaju moguću primjenu u liječenju autoimunih i alergijskih bolesti ljudi

SVRHA ISTRAŽIVANJA

1. ***Odrediti rasprostranjenost kukaša iz riba u hrvatskim rijekama***
2. ***Determinirati vrste kukaša morfološki i DNA biljezima***
3. ***Istražiti unutarpopulacijske i međupopulacijske razlike kukaša***
4. ***Bioraznolikost kukaša analizirati u kontekstu stabilnosti ekosustava***

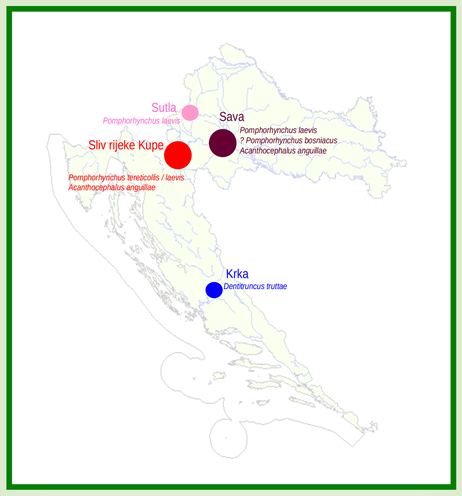


(a) (b)

Slika 1. (a) Kukaši vrste *D. truttae* na prijelazu srednjeg u stražnje crijevo (gore lijevo) i kukaši vrste *P. laevis* u srednjem dijelu crijeva (dolje lijevo); (b) Morfološke karakteristike različitih vrsta kukaša: *P. laevis*, *D. truttae*, *A. anguillae* pod lupom i svjetlosnim mikroskopom

METODE

- **Uzorkovanje**:
  Rijeka Krka: 647 jedinki riba 13 različitih vrsta, tri godine uzorkovanja, 5 lokaliteta
  Rijeka Sutla: 172 jedinke klena (*Squalius cephalus*), dvije godine, 6 lokaliteta
  Rijeka Sava: 289 jedinki klena (*S. cephalus*), dvije godine uzorkovanja, 5 lokaliteta
  Slivno područje rijeke Kupe: 78 jedinki 15 različitih vrsta riba, jednokratna uzorkovanja
- **Morfološka analiza crijevnih nametnika kukaša**
  Bojanje alum karminom ili Semichon kiselim karminom, te mjerenje morfoloških biljega mikropreparatom pod svjetosnim mikroskopom
- **Genetička analiza kukaša**
  Molekularni biljezi: podjedinica I citokrom c oksidaze (COI), regije unutrašnjih razmaknica rRNA (ITS1 i ITS2), te 18S rRNA (Perrot-Minnot, 2004)
- **Provjera pseudogena gena COI**
  ►Analiza polimorfizma konformacije jednolančane DNA u gelu poliakrilamida (SSCP)
  ►Određivanje sljedova nukleotida odsječka gena COI



Slika 2. Rasprostranjenost nađenih kukaša u pojedinim rijekama

REZULTATI

✓ U istraženim rijekama pronađeno je 5 vrsta kukaša: *Dentitruncus truttae*, *Pomphorhynchus laevis*, *Pomphorhynchus tereticollis*, *Acanthocephalus anguillae* i hipotetski *Pomphorhynchus bosniacus* (Slika 2).

✓Ukupno je morfološki analizirano 56 jedinki kukaša (Slika 1) i to: 24 jedinke vrste *D. truttae*, 17 jedinki vrste *P. laevis* (12 iz rijeke Sutle, pet iz rijeke Save), 5 jedinki vrste *P. tereticollis* i 10 vrste *A. anguillae*.

✓ Ukupno je gentičkim biljezima analizirano: 54 sljedova nukleotida odsječka gena COI kukaša, 40 sljedova nukleotida regije ITS i 38 sljedova nukleotida 18S RNA.

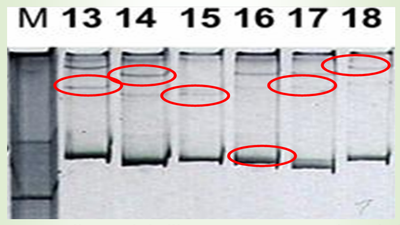
✓ Za vrstu *D. truttae* u rijeci Krki po prvi puta napravljena je genetička analiza na razini mtDNA i jezgrinih biljega. Dobiveni rezultati potvrđuju dosadašnju sistematsku kategorizaciju vrste *D. truttae* u porodicu Illiosentidae (Slika 3a).

✓ Za vrstu *P. laevis* iz rijeke Sutle i Save pokazana je velika sličnost (98%-100%) sljedova nukleotida gena COI, bez obzira na lokalitet (Slika 3b). Izuzetak je činio jedan haplotip (JAS129) koji je imao 64 varijabilna nukleotidna mjesta, te je pokazivao 10% razlike u sastavu nukleotida i jasno izdvajanje u odvojenu genogrupu. Ovaj haplotip je hipotetski determiniran kao *P. bosniacus*, koji je opisan u srednjem toku rijeke Save. U rijeci Kupi genetički je determiniran *P. tereticollis,* budući da je ovu vrstu teško identificirati na temelju morfoloških svojstava.

✓ U rijeci Savi na svim istraživanim lokalitetima je barem tijekom jednog uzorkovanja pronađena vrsta *A. anguillae*. Ona je također identificirana u patulajstom somiću (*Ictalurus nebulosus*) i linjku (*Tinca tinca*) iz rijeke Kupe, a identificirana je morfološki (Tablica 3).

✓ Različiti klonovi s ugrađenom DNA gena COI vrste *P. laevis* pokazali su velike razlike tijekom analize metodom SSCP (Slika 4). Određivanjem njihovih sljedova nukleotida potvrđena je prisutnost pseudogena COI u vrste *P. laevis* (Tablica 1).

✓ Najveća učestalost zaraze riba kukašima nađena je u rijekama Sutli i Savi (Slika 5).
✓ Učestalost kukaša u ribama rijeke Krke i Save nije ovisila o sezoni uzorkovanja (Tablica 2).
✓ Najveći broj zaraženih riba pronađen je na uzvodnim lokalitetima sve tri rijeke



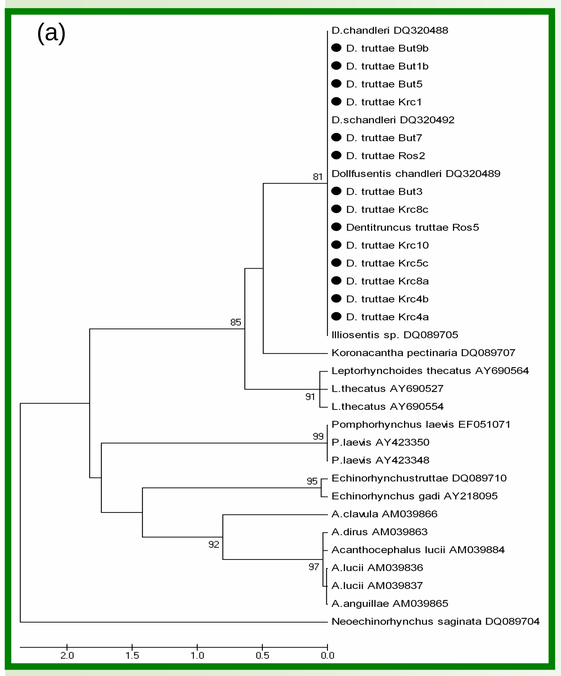
Slika 4. Analiza odsječka gena COI *P. laevis* iz različitih klonova metodom SSCP, crveno istaknuti različiti produkti - *pseudogeni*

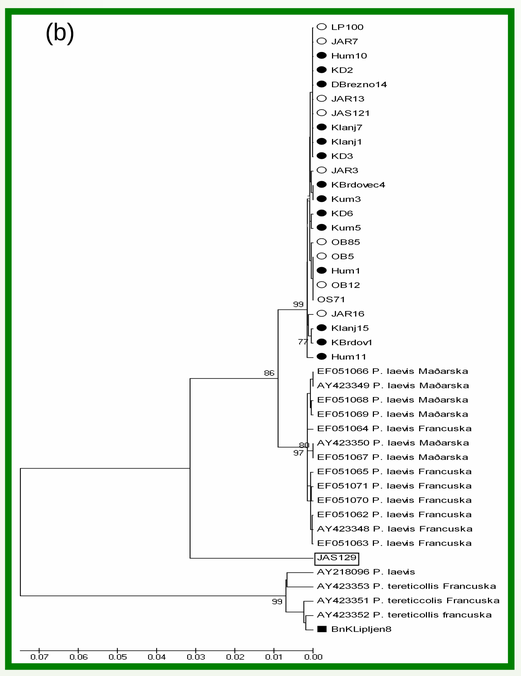
Tablica 1. Matrica sličnosti pseudogena COI gena vrste *P. laevis*, ID-identični

	Sava1	Sava2	Sava3	Sava4
Sava1	ID	0,437	0,415	0,417
Sava2	0,437	ID	0,437	0,437
Sava3	0,415	0,437	ID	0,998
Sava4	0,417	0,437	0,998	ID

✓ Hipoteze o životnim ciklusima nađenih kukaša na temelju dobivenih rezultata i literaturnih podataka o prisutnosti međudomadara (račića) u istraživanim rijekama:

P. laevis →Gammarus sp.→*S. cephalus*
A. anguillae→Asellus sp.→ *S. cephalus*
D. truttae→ Gammarus balcanicus / Echinogammarus sp.→S. truttae i O. mykiss.
P. tereticollis (P. laevis)→Echinogammarus sp.→*S. truttae*
P. bosniacus→ Gammarus sp.→ *S. cephalus*

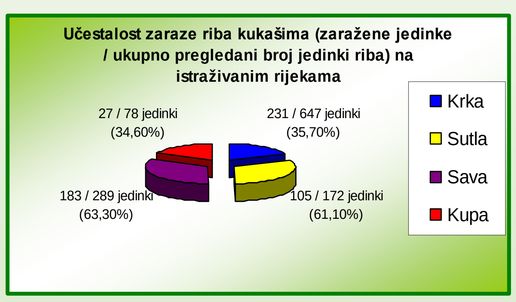




Slika 3. Položaj kukaša u filogenetskom stablu dobivenom na temelju sljedova nukleotida odsječka gena COI metodom Neighbour-Joining (bootstrap < 70 nisu prikazane, 2000 ponavljanja), (a) *D. truttae*, (b) *P. laevis;* ○,●, ■ - različiti haplotipovi, JAS129 - *P. bosniacus*

Tablica 2. Učestalost kukaša u ribama rijeke Krke po sezonama

Lokalitet	Učestalost kukaša u crijevima pregledanih riba (%) / broj pregledanih riba										
	2005.			*2006.*				*2007.*			*2008.*
	travanj	*svibanj*	*rujan*	*veljača*	*lipanj*	*rujan*	*prosinac*	*travanj*	*srpanj*	*studeni*	*travanj*
Izvor Krke	**90** (10)	**70** (10)	**41,7** (12)	**80** (5)	**92,3** (13)	**100** (10)	**70** (10)	**85,7** (14)	**100** (10)	**55,6** (9)	**75** (8)
Krka iza Knina	**60** (10)	**57,1** (7)	**95,8** (24)	**42,9** (14)	**100** (8)	**100** (10)	**100** (10)	**50** (10)	**100** (10)	**80** (5)	**80** (5)
Brljan	**0** (4)	**12,5** (8)	**66,7** (6)	**-***	**0** (10)	**100** (10)	**60** (10)	**80** (10)	**50** (10)	**-***	**80** (10)
Manastir Krka	**11,1** (9)	**-***	**0** (2)	**-***	**0** (14)	**0** (3)	**0** (6)	**0** (12)	**0** (10)	**0** (2)	**0** (7)
Iznad Roškog slapa	**0** (10)	**0** (6)	**0** (6)	**0** (2)	**0** (10)	**22,2** (9)	**0** (8)	**7,1** (14)	**40** (5)	**75** (4)	**0** (9)
Visovac	**0** (5)	**0** (7)	**0** (5)	**-***	**0** (14)	**0** (10)	**0** (10)	**0** (8)	**10** (10)	**-***	**-***
Skradinski buk	**5,3** (19)	**0** (7)	**0** (26)	**-***	**0** (12)	**0** (10)	**0** (10)	**14,3** (14)	**0** (11)	**0** (22)	**0** (7)



Slika 5. Učestalost zaraze riba kukašima na četiri rijeke u Hrvatskoj

Tablica 3. Vrste kukaša nađene u 6 vrsta riba po učestalosti

Vrsta ribe	Vrsta kukaša	Učestalost kukaša u ribama (%), n-broj riba			
		Krka	Sutla	Sava (2006 g.)	Kupa
Klen	*P. laevis*	-	61,10% (n=172)	38,14% (n=142)	23,08% (n=13)
	P. tereticollis	-	-	-	23,08% (n=13)
	A. anguillae	-	-	35,32% (n=142)	15,38% (n=13)
Potočna pastrva	*D. truttae*	72,86% (n=280)	-	-	-
	P. tereticollis	-	-	-	77,80% (n=9)
Kalifornijska pastrva	*D. truttae*	86,96% (n=23)	-	-	-
	P. tereticollis	-	-	-	100% (n=1)
Linjak	*A. anguillae*	-	-	-	50,0% (n=2)
Lipljen	*P. tereticollis*	-	-	-	80,0% (n=5)
Patuljasti somić	*A. anguillae*	-	-	-	100% (n=1)

ZAKLJUČCI

1. Pronađene vrste kukaša u istraživanim rijekama u direktnoj su vezi s vrstom ribe-domadara, i posredno račića-međudomadara, kao prethodnika u trofičkom lancu. Rodovi *Pomphorhynchus* i *Acanthocephalus* dominantni su za ribe (npr. klen) iz rijeka crnomorskog slijeva, dok su pastrve iz rijeke Krke (Jadranski slijev) bile invadirane samo jednom vrstom, *D. truttae* (Tablica 3).
2. Zajednice kukaša pokazivale su stabilnost, bez većih sezonskih razlika. To ukazuje na dugoročno stabilne uvjete u istraženim ekosustavima, jer su ribe i njihovi nametnici biološke sonde koje prve reagiraju na zagađenja i druge promjene (Kennedy, 2006).
3. Iako se gen COI pokazao kao najbolji genetički biljeg u određivanju varijabilnosti unutar iste vrste, zbog prisutnosti pseudogena treba biti oprezan te izbjegavati upotrebu univerzalnih početnica u reakcijama PCR i/ili koristiti mitohondrijsku DNA ili RNA kao početni kalup.
4. Daljnja istraživanja pokušati će utvrditi mehanizme izbjegavanja imunološkog odgovora riba te mehanizme akumulacije metala kod identificiranih vrsta kukaša

LITERATURA
1. Kennedy CR (2006) Ecology of Acanthocephala. Cambridge University Press
2. Lafferty KD, Allesina S, Arim M, Briggs CJ, De Leo G, Dobson AP, Dunne JA, Johnson PT et al. (2008) Parasites in food webs: the ultimate missing links. Ecol Lett 11: 533-546
3. Marcoglieses DJ (2005) Parasites of the superorganism: are they indicator ors of ecosystem health? Int J Parasitol 35: 705-716
4. Perrot-Minnot, MJ (2004) Larval morphology, genetic divergence and contrasting levels of host manipulation between forms of P. laevis (Acanthocephala). Int J Parasitol 34: 45-54

ZAHVALA

Ovo istraživanje financirano je od strane projekata: MZOŠ (098-0982934-2752), SARIB (FP6/EU), MPRRR (Praćenja stanja slatkovodnog ribarstva rijeke Sutle i Kupe) te Ihtioloških istraživanja rijeke Krke (Nacionalni park "Krka"). Zahvaljujem se voditelju teme dr. sc. Eminu Teskeredžiću i svim članovima laboratorija LAPAO za pomoć pri uzorkovanju.