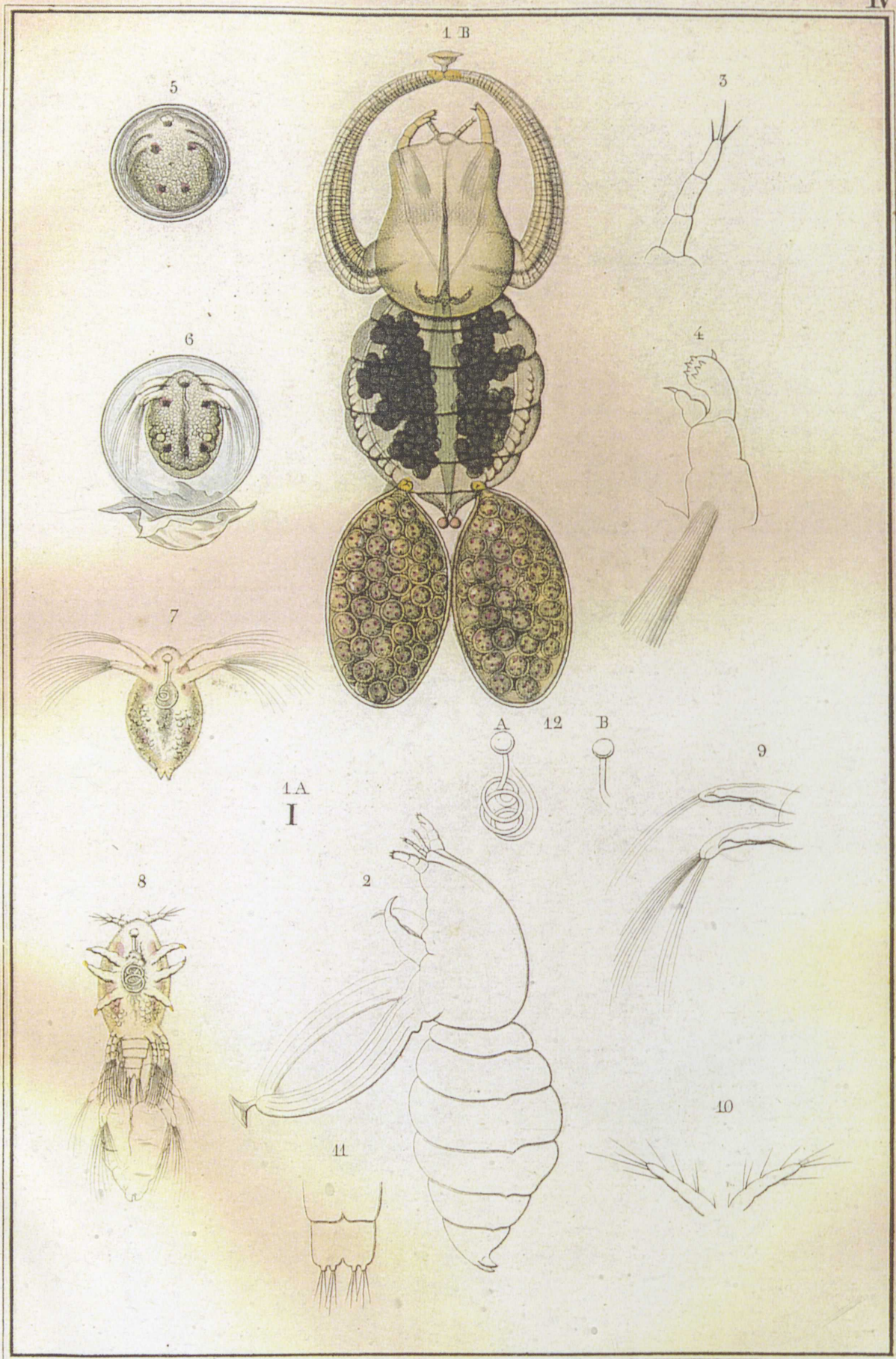


















AKADEMIA ROLNICZA W SZCZECINIE

WYDZIAŁ RYBACTWA MORSKIEGO I TECHNOLOGII ŻYWNOŚCI

Jolanta Kempter

Widłonogi z rodzaju *Achtheres* (Copepoda:  
Lernaeopodidae) – próba wyjaśnienia przynależności  
gatunkowej form pasożytujących u okonia (*Perca  
fluviatilis*) i sandacza (*Sander lucioperca*)

D1053



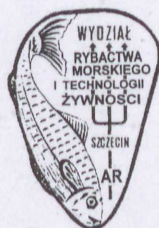
MAN 6094

Rozprawa doktorska

wykonana w Zakładzie Chorób Ryb

Promotor:

Dr hab. Wojciech Piasecki, prof. nadzw.



SZCZECIN 2001

576.895,34 : 597.583,1



AKADEMIA ROLNICZA W SZCZECINIE  
WYBIEŻAŁO RYBNICTWA MORSKIEGO I TECHNOLOGII ŻYWIENIA

Instytut Rybnictwa

Wydawnictwo z zakresu Rybnictwa (Ciepłota)  
Leczenie ryb (Ciepłota) - przywrócenie przynależności  
Ciepłota ryb (Ciepłota) - przywrócenie przynależności  
(Ciepłota) i (Ciepłota)



C2, 57492

D/1053  
D/1053  
D/1053



D, 117 | 2015



## SPIS TREŚCI

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| I WSTĘP                                                                | 1  |
| 1.1 Wpływ pasożytów na żywicieli                                       | 6  |
| 1.2 Skarbowiska systematyczne pasożytów                                | 10 |
| 1.3 Charakterystyka żywicieli                                          | 13 |
| 1.4 Porównanie parazytofauny okonia i sandacza na podstawie literatury | 19 |
| II MATERIAŁ I METODY                                                   | 24 |
| 2.1 Morfologia – metody optyczne                                       | 24 |
| 2.2 Morfologia – skaningowy mikroskop elektroniczny                    | 27 |
| 2.3 Histologia                                                         | 27 |
| 2.4 Badania genetyczne                                                 | 30 |
| 2.4.1 Materiał i metody podstawowe                                     | 30 |
| 2.4.2 Pozytki i przechowywanie włośniogów                              | 30 |
| 2.4.3 DNA                                                              | 31 |
| 2.4.4 Podstawy systemu DNA                                             | 32 |
| 2.4.5 Elektroforeza na żelu agarozowym                                 | 32 |
| 2.4.6 Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym                          | 33 |
| 2.4.7 Amplifikacja przy pomocy metody PCR                              | 34 |
| 2.4.8 PCR                                                              | 34 |
| 2.4.9 PCR                                                              | 35 |
| 2.4.10 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.11 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.12 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.13 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.14 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.15 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.16 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.17 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.18 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.19 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.20 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.21 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.22 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.23 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.24 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.25 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.26 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.27 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.28 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.29 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.30 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.31 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.32 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.33 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.34 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.35 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.36 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.37 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.38 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.39 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.40 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.41 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.42 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.43 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.44 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.45 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.46 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.47 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.48 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.49 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.50 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.51 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.52 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.53 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.54 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.55 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.56 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.57 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.58 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.59 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.60 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.61 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.62 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.63 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.64 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.65 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.66 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.67 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.68 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.69 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.70 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.71 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.72 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.73 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.74 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.75 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.76 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.77 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.78 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.79 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.80 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.81 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.82 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.83 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.84 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.85 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.86 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.87 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.88 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.89 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.90 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.91 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.92 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.93 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.94 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.95 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.96 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.97 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.98 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.99 PCR                                                             | 35 |
| 2.4.100 PCR                                                            | 35 |

Na ręce Pana Prof. Wojciecha Piaseckiego  
 składam serdeczne podziękowania  
 za poświęcony mi czas,  
 życzliwość i wszechstronną pomoc  
 okazaną w trakcie powstawania niniejszej pracy

Autorka







## SPIS TREŚCI

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I WSTĘP</b>                                                         | <b>1</b>  |
| 1.1 Wpływ pasożyta na żywiciela                                        | 6         |
| 1.2 Stanowisko systematyczne pasożyta                                  | 10        |
| 1.3 Charakterystyka żywicieli                                          | 13        |
| 1.4 Porównanie parazytofauny okonia i sandacza na podstawie literatury | 19        |
| <b>II MATERIAŁ I METODY</b>                                            | <b>24</b> |
| 2.1 Morfologia – metody optyczne                                       | 24        |
| 2.2 Morfologia – skaningowy mikroskop elektronowy                      | 27        |
| 2.3 Biometria                                                          | 27        |
| 2.4 Badania genetyczne                                                 | 30        |
| 2.3.1 Materiał i metody podstawowe                                     | 30        |
| 2.3.2 Pozyskanie i przechowywanie widłonogów                           | 30        |
| 2.3.3 DNA                                                              | 31        |
| 2.3.4 Pomiary stężenia DNA                                             | 32        |
| 2.3.5 Elektroforeza na żelu agarozowym                                 | 32        |
| 2.3.6 Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym                          | 33        |
| 2.3.7 Amplifikacja przy pomocy metody PCR                              | 34        |
| 7.1 Program reakcji PCR (układ I)                                      | 34        |
| 7.2 Program reakcji PCR (układ II)                                     | 35        |
| 2.3.8 Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP)            | 36        |
| <b>III WYNIKI</b>                                                      | <b>38</b> |
| 3.1 Morfologia                                                         | 38        |
| 3.2 Biometria                                                          | 61        |
| 3.3 Badania genetyczne                                                 | 69        |







|                        |     |
|------------------------|-----|
| 1.PCR/RFLP (układ I)   | 72  |
| 1.1 Amplifikacja DNA   | 74  |
| 1.2 RFLP               | 76  |
| 2. PCR/RFLP (układ II) | 79  |
| 2.1 Amplifikacja DNA   | 80  |
| 2.2 RFLP               | 81  |
| <b>IV DYSKUSJA</b>     | 83  |
| <b>V WNIOSKI</b>       | 99  |
| <b>VI LITERATURA</b>   | 101 |





## I WSTĘP

Stosunkowo duże i dobrze widoczne pasożytnicze widłonogi występujące w jamie gębowej okonia i sandacza były prawdopodobnie obserwowane przez niemieckich biologów już na początku XIX wieku. Najstarsze okazy tych pasożytów zachowane do dziś w zbiorach Muzeum Przyrodniczego w Berlinie pod numerem ZMB Crust. 898 (Piasecki 1993b) to jedenaście samic zebranych w lipcu 1829 roku z sandacza, *Sander lucioperca*. Okazy te zebrał Carolo Asmund Rudolphi, znany niemiecki przyrodnik i lekarz, który opisał dziesiątki nowych gatunków pasożytów. Wspomniane wyżej widłonogi doczekały się formalnego opisu dopiero trzy lata później. Uczynił to pochodzący z Finlandii doktor Aleksander von Nordmann. Uczony ten o dorobku naukowym porównywalnym do Rudolphiego, sprawował funkcję profesora w Lyceum Richelieu w Odessie jednocześnie pracując naukowo w Berlinie. W 1832 roku ukazało się dwutomowe dzieło von Nordmanna – „Naturgeschichte der wirbellosen Thiere”. W tomie drugim znajdujemy opis nowego gatunku – *Achtheres percarum*. Opis ten jest też równoznaczny z utworzeniem nowego rodzaju (*Achtheres* – ἀχθηρής – uciążliwy, nieznośny). Autor stwierdza, że ten pasożyt występuje u okoni i jazgarzy („am Flußbarsche und Kaulbarsche”), jednak łacińskie nazwy żywicieli użyte przez von Nordmanna to „*Perca fluviatilis* und *P. lucioperca*”.

Praca jest ilustrowana pięknymi miedziorytami, bardzo szczegółowymi jak na owe czasy (patrz wyklejka niniejszej pracy). Książki von Nordmanna zapoczątkowały wzmożone zainteresowanie widłonogami pasożytującymi u ryb. Wzmianki, opisy i ilustracje *Achtheres percarum* pojawiają się kolejno w następujących publikacjach: Burmeister (1833), Krøyer (1838), Milne-Edwards (1940), von Zaddach (1844), Claus (1862), Olsson (1877), Kurz (1877), Basset-Smith (1899), Scott (1901), Brian (1906), Neresheimer (1909), Scott i Scott (1913), Wilson (1915), Stephensen i Ussing (1918)(wg Yamaguti 1963).





Począwszy od 1863 roku pojawiają się inne nowe gatunki nominalne z rodzaju *Achtheres* (wg Yamaguti 1963). Po pierwszej wojnie światowej znacznie wzrasta liczba prac wspominających o obecności widłonogów z rodzaju *Achtheres* u okonia i sandacza (Capart 1944, Dogiel i Bychowski 1939, Geyer 1939a, Geyer 1939b, Geyer 1940, Markiewitsch 1932, Markiewitsch 1934, Markiewitsch 1935, Messjatzeff 1926, Monod i Vladykov 1931, Neresheimer 1909).

Pewnego rodzaju przełom stanowi ukazanie się 3 marca 1901 roku pracy fińskiego przyrodnika Pehra Gadda. Publikacja ta wydrukowana w języku szwedzkim i w dodatku bez ilustracji zawiera opis nowego gatunku nominalnego – *Achtheres sandrae* występującego u sandacza. Gadd był więc pierwszym naukowcem, który zakwestionował koncepcje występowania tego samego gatunku zarówno u okonia jak i sandacza. Gadd był mało znanym naukowcem, jego praca z uwagi na ograniczenia językowe nie dotarła prawdopodobnie do szerszego grona czytelników. Czynniki te i ówczesna niechęć do podważania autorytetów przez mało znanych młodych naukowców, sprawiły, że *A. sandrae* został szybko zaliczony do synonimów *A. percarum* (wg Scott i Scott 1913, Markewitsch 1932, 1934, Yamaguti 1963, Kabata 1979) i prawie całkowicie zapomniany. Jedynym wyjątkiem był Wegener (1909), który wśród pasożytów ryb Prus Wschodnich wymienia obydwa gatunki nominalne. Prawdopodobnie dopiero Gurney (1933) przypomina na nowo o istnieniu *A. sandrae* ale w konkluzji stwierdza, że mimo występowania różnic w ogólnym pokroju ciała (i ich braku w przydatkach) forma z sandacza nie zasługuje jednak na wyróżnienie w postaci osobnego gatunku („it does not seem to require specific rank”). Rozważania Gurneya (1933) spowodowały jednak, że naukowcy zaczęli dopatrywać się morfologicznych różnic nie tylko pomiędzy „tymi samymi” gatunkami pochodzącymi z różnych rejonów, lecz także bytujących u różnych żywicieli.





Fundamentalną pracą której celem była próba wyjaśnienia pozycji systematycznej obydwu form żywicielskich widłonogów z rodzaju *Achtheres* spotykanych na okoniu i sandaczu była bardzo obszerna publikacja Kozikowskiej, Jary i Grabdy (1956). Praca jest zakończona wnioskiem, że obydwie formy żywicielskie reprezentują etap pośredni ewolucyjnego przejścia od rasy do nowego gatunku. Mimo pozornej trafności tego wniosku, podbudowanego bardzo obszernymi badaniami jest to konkluzja spełniająca doskonale oczekiwania zwolenników ewolucyjnej koncepcji gatunku ale nie mogąca na długo zadowolić klasycznych systematyków stojących na gruncie nominalistycznej koncepcji gatunku.

Pomimo, że od opublikowania koncepcji Gadda upłynęło 100 lat (3 kwietnia 1901 r.), nikt do dnia dzisiejszego nie określił jednoznacznie pozycji systematycznej pasożytów z rodzaju *Achtheres* z okonia i sandacza. Jest to oczywiście stwierdzenie bardzo względne, podsumowujące zagadnienie z pozycji nowoczesnych, dostępnych dopiero od niedawna, metod badawczych.

Właśnie pojawienie się nowych metod badawczych skłoniło mnie do podjęcia jeszcze jednej próby ustalenia pozycji systematycznej obu form żywicielskich *Achtheres* pasożytujących u okonia i sandacza w naszych wodach.

Wśród nowych metod badawczych w rękach współczesnych systematyków należy wymienić mikroskopię elektronową, metody biochemiczne, badania biometryczne, molekularne, oraz komputerową analizę danych. Współczesne prace dotyczące taksonomii Copepoda włączają również do metod badawczych elektroforezę enzymatyczną (Wyngaard 2000), analizę kariotypu (McLaren i Marcogliese 1982, Lazzaretto 1983) a także badania w zakresie struktury samego chromosomu (Libertini i Lazzaretto 1992).

Współczesne molekularne techniki genetyczne są stosowane do charakteryzowania struktur populacji oraz identyfikacji gatunków i podgatunków.





Są to głównie:

1. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) wykorzystywana do amplifikacji specyficznych fragmentów mitochondrialnego i jądrowego DNA;
2. PCR połączony z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP);
3. Sekwencjonowanie specyficznych fragmentów DNA.

Bardziej powszechne wprowadzenie technik molekularnych do identyfikacji żywych organizmów nastąpiło po odkryciu przez Kary Mullisa łańcuchowej reakcji polimerazy, dzięki której można powielać *in vitro* i analizować wybrane fragmenty genomu badanego organizmu (Mullis i wsp. 1987, Saiki i wsp. 1985). O powodzeniu i specyficzności tej metody decyduje głównie dobór sekwencji odpowiednich starterów oligonukleotydowych. Sekwencje starterów powinny być zakonserwowane i unikatowe dla oznaczanego(ych) genotypu(ów), gatunku(ów), rodzaju(ów) lub rodziny(n).

W identyfikacji gatunków lub populacji przy zastosowaniu techniki PCR obiera się takie same cele molekularne amplifikacji (zarówno dla innych zwierząt jak i roślin). Najważniejsze cele molekularne amplifikacji DNA, zastosowane do genotypowania to:

- mitochondrialny gen kodujący cytochrom *b*
- mitochondrialny region kontrolny replikacji (*D-loop*)
- mitochondrialny gen kodujący dehydrogenazę *NADH*
- mitochondrialny gen kodujący *ATPazę*
- mitochondrialne geny kodujące *12S* i *16S rRNA*
- jądrowe geny kodujące *18S* i *28S rRNA* i sekwencje międzygenowe *ITS*

Oprócz DNA mitochondrialnego w badaniach filogenetycznych i genotypowych analizuje się sekwencje nukleotydowe jądrowego DNA, głównie geny kodujące *18S* i *28S rRNA* i sekwencje między tymi genami (*ITS*). Wśród prac wykorzystujących metody molekularne do ustalania zależności





systematycznych widłonogów należy wymienić: de Meeüs (1992), Todd i wsp. (1997), Bucklin i wsp. (1998).

Oprócz molekularnych technik genetycznych, nowe możliwości badań w zakresie taksonomii zwierząt i roślin przyniosły nowe metody statystyczne (między innymi analiza skupień – „cluster analysis”) oraz wykorzystanie do obliczeń komputera. Pozwala to na analizowanie wzajemnych zależności między bardzo wieloma zmiennymi – co stanowi narzędzie zupełnie niedostępne w latach 50-tych ubiegłego stulecia.

Należy w tym miejscu wspomnieć także o nowych możliwościach klasycznej taksonomii opartej na wyglądzie zewnętrznym organizmów. Są to między innymi mikroskopia elektronowa. Ponadto Zbigniew Kabata w swoim bogatym dorobku naukowym, wprowadził nowe standardy do badań morfologicznych. Poprzez usystematyzowanie niektórych schematów budowy i wprowadzenie nowych terminów określających różne struktury ciała widłonogów sprawił że opisy morfologiczne stały się bardziej przejrzyste a przede wszystkim porównywalne. Kabata zwrócił ponadto uwagę na pewne elementy budowy, które kilka dziesięcioleci temu nie były brane pod uwagę w rozróżnianiu niższych taksonów

Celem niniejszej pracy jest ustalenie pozycji systematycznej obu form widłonogów reprezentujących rodzaj *Achtheres* pasożytujących u okonia i sandacza. Formy te będą w pracy nazywane roboczo: *Achtheres* „O” (forma z okonia) i *Achtheres* „S” (forma z sandacza). Tam gdzie konieczne jest zastosowanie wspólnej nazwy dla obu form będzie użyte określenie *Achtheres percarum* sensu lato (*A. percarum* s.l.). Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania winny wyjaśnić czy widłonogi z rodzaju *Achtheres* występujące u okonia i sandacza reprezentują jeden i ten sam gatunek (z ewentualnym rozróżnieniem ewentualnych ras czy podgatunków) czy pasożyty te zasługują być może na status odrębnych gatunków.





## 1.1 Wpływ pasożyta na żywiciela

Widłonogi z rodzaju *Achtheres* (ryc. 1, 2, 3, 4) są pospolitymi pasożytami okonia i sandacza. U okonia występują tylko w jamie gębowej na aparacie cedzidłowym, natomiast u sandacza na skrzelach (Jara i Chodyniecki 1999) preferując jednak łuki listków skrzelowych (ryc. 5, 6). Ekstensywność zarażenia sandacza wynosi nierzadko 100%, przy intensywności do 40 pasożytów na jednym łuku skrzelowym (Jara i Chodyniecki 1999). Jak twierdzą Kozikowska, Jara i Grabda (1956) duża inwazja „*Achtheres percarum*” u sandacza może doprowadzić nawet do śnięć.

Pasożyt ten drażniąc i mechanicznie uszkodzając płatki skrzelowe powoduje, że przyjmują one nienaturalne kształty (Prost 1994).

Bezpośrednią przyczyną upośledzającą funkcje tego narządu jest zmniejszenie powierzchni wymiany oddechowej i jonowej, za sprawą obrzęku, deformacji i pokrycia listków skrzelowych dużą ilością śluzu (Jara i Chodyniecki 1999).

Jak twierdzi Kozikowska (1957) narybek okonia do długości całkowitej 5 cm nie jest atakowany przez pasożyta, zaś sandacz pod tym względem wykazuje wyraźny podział na 3 grupy wzrostowe. Narybek do 5 cm długości całkowitej nie jest atakowany, zarażenie osobników od 5 do 12,5 cm wynosi 13,9%, zaś większych 77,7%. Wszystkie osobniki o długości około 20 cm wykazują stuprocentowe zarażenie i wysoką frekwencję pasożyta. W okresie potarłowym zaobserwowano, iż silnie zaatakowane sandacze sną, czego nigdy nie zanotowano u okoni.

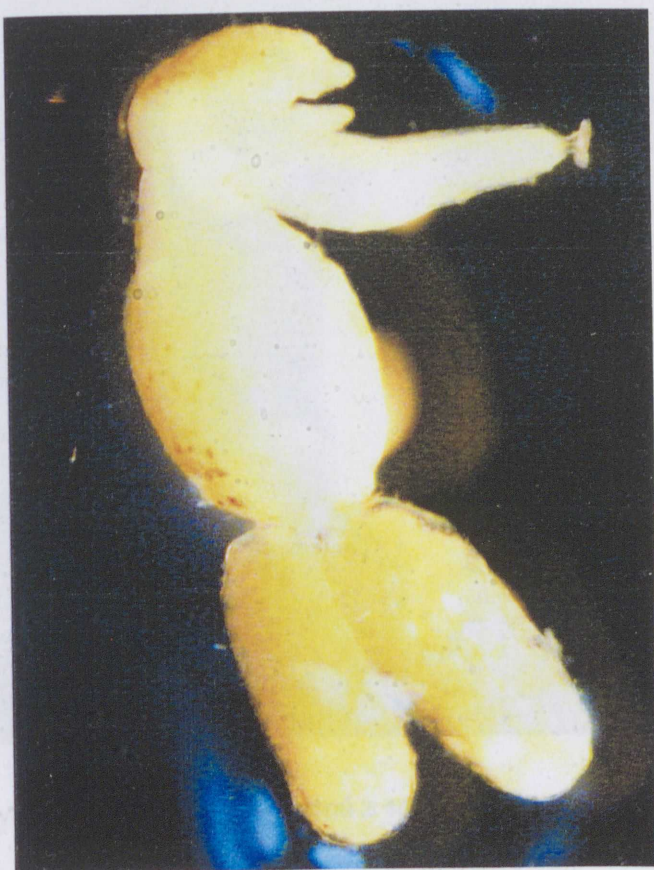
Zważywszy na pospolitość występowania tego pasożyta, wysoki stopień intensywności i ekstensywności zarażenia, oraz brak konkretnych metod skutecznych w zapobieganiu i zwalczaniu achterozy u ryb (oprócz przeprowadzania intensywnych odłowów sanitarnych) należy zdać sobie sprawę







Ryc. 1. *Achtheres* „O” (forma z okonia)–samiec i samica



Ryc. 2 *Achtheres* „O” (forma z okonia)–samią z workami jajowymi







Ryc. 3. *Achtheres* „S” (forma z sandacza)–samica z workami jajowymi



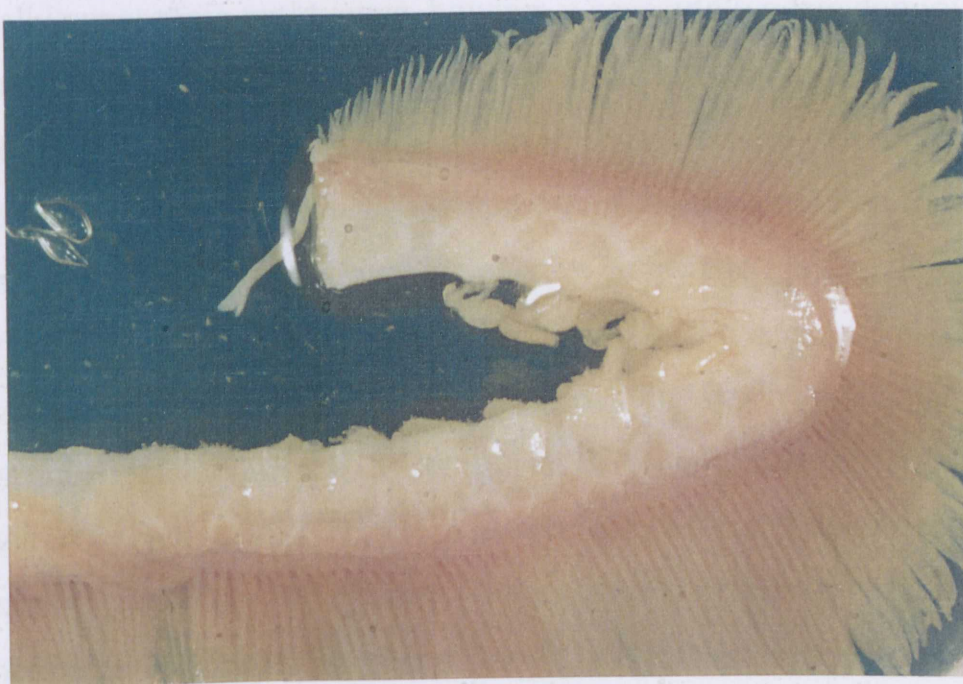
Ryc. 4. *Achtheres* „S” (forma z sandacza)–samica i samiec







Ryc. 5. *Achtheres* „S” trzy łuki skrzelowe z przyczepionymi pasożytami.  
Fot. Andrzej Ociepa



Ryc. 6. *Achtheres* „S” (forma z sandacza)—lokalizacja samic z workami jajowymi na łuku skrzelowym. Fot. Andrzej Ociepa





z niebezpieczeństwa jakie niesie za sobą inwazja widłonogów z rodzaju *Achtheres* dla populacji sandacza i okonia.

## 1.2 Stanowisko systematyczne pasożyta

Systematyka widłonogów pasożytujących na rybach pozostawała przez długi czas nie do końca wyjaśniona. Autorzy uwzględniając różne szczegóły budowy tworzyli coraz to inne modele ich klasyfikacji. Przez długi czas funkcjonował ekologiczny termin „Copepoda parasitica”, który nie stanowił żadnej jednostki systematycznej, lecz był tylko sztucznie wyodrębnioną grupą na podstawie anatomicznych i funkcjonalnych przystosowań tych zwierząt do pasożytniczego trybu życia. W 1852 roku Giesbrecht opierając się na położeniu „głównego połączenia stawowego ciała” podzielił widłonogi na Gymnoplea i Podoplea. U Gymnoplea to główne połączenie znajduje się daleko z tyłu ciała, podczas gdy u Podoplea – bliżej środka ciała. Dla parazytologii ten podział miał niewielkie znaczenie praktyczne, bowiem u pasożytów gdzie dominują gatunki morfologicznie zmienione, o zatartej segmentacji, trudno było ustalić gdzie znajduje się to główne połączenie stawowe ciała. Dopiero dzisiaj wiadomo, że pasożyty powinny być zaliczane do Podoplea. Thorell (1859) klasyfikował widłonogi na podstawie budowy ich aparatu gębowego i podzielił je na trzy grupy: Gnathostoma, Poecilostoma i Siphonostoma. Systematyka Sarsa (1903) polegała na grupowaniu „podobnego z podobnym” bez uwzględniania zależności filogenetycznych. Systematyka Wilsona z roku 1910 opierała się na cechach wtórnych, czyli tych, które są wyrazem adaptacji do zmiennych warunków środowiska. Przełomowym punktem w systematyce Copepoda stała się koncepcja ich klasyfikacji wg Kabaty (1979). Dopiero ten autor doprowadził do stopniowego wypierania sztucznego terminu „Copepoda parasitica” z podręczników akademickich na całym świecie. Kabata wrócił częściowo do koncepcji Thorella z roku 1859 opierając się w swoim systemie na cechach





morfologicznych aparatu gębowego. Przydatność tego kryterium okazała się szczególnie widoczna dopiero przy jego zastosowaniu do gatunków pasożytniczych. Niektóre pasożyty nawet skrajnie różniące się morfologicznie okazały się być bardzo podobne w szczegółach budowy aparatu gębowego. Ponieważ ewolucja widłonogów szła prawdopodobnie różnymi drogami okazało się, że reprezentują one trzy główne typy budowy aparatów gębowych. Kabata wyróżnił siedem podrzędów w obrębie Copepoda, potwierdzając jednocześnie przynależność pasożytów do Podoplea. W jego systemie gatunki pasożytnicze zostały zaliczone do 3 podrzędów: Siphonostomatoida, Poecilostomatoida i Cyclopoida. Mimo, że z biegiem lat konieczne stały się uzupełnienia, związane z nowymi odkryciami to jednak systematyka Kabaty funkcjonuje w ogólnym sensie do dnia dzisiejszego.

W roku 1984 Por, kolejno po nim Dussart (1984), Marcotte (1986), Boxshall (1984) i Ho (1990), sugerowali własne koncepcje kierunków ewolucji widłonogów. W ostatnim czasie pomocnym narzędziem systematyków stała się analiza kladystyczna. Została ona wprowadzona w 1950 roku przez Henniga ale dopiero pod koniec lat sześćdziesiątych jego teoria stała się popularna w krajach anglojęzycznych. Głównym założeniem kladyzmu jest fakt, że wszystkie taksony istnieją w naturze, a proces ich klasyfikacji ma na celu odnalezienie tych taksonów i wyznaczenie granic między nimi.

W roku 1991 Huys i Boxshall przedstawiają nową, pełną systematykę, grupując Copepoda w dziesięć rzędów i wyłaniając 187 rodzin. Badania swoje opierali na analizie kladystycznej, biorąc pod uwagę 54 cechy i testując je na 200 gatunkach.

Na piątej Międzynarodowej Konferencji Kopepodologów w Baltimore (czerwiec 1993 roku) koncepcja Huysa i Boxshalla została publicznie skrytykowana przez Ho, który udowodnił, że nieco inny kladogram powinien ilustrować filogenezę widłonogów. Nowa systematyka Kabaty udoskonalona później przez Huysa i Boxshalla i Ho otworzyła drogę kopepodologom





próbującym uporządkować niższe taksony widłonogów. Siedemnaście rodzin należących do rzędu Siphonostomatoida uporządkował na początku lat 90-tych George Benz z USA w swojej pracy doktorskiej. W roku 1991 Ho poddał analizie kladystycznej 44 rodziny rzędu Poecilostomatoida, zaś trzy lata później uporządkował rząd Cyclopoida z 10-ma rodzinami. W latach 90-tych pojawiać zaczęły się prace rozpatrujące zależności filogenetyczne w obrębie konkretnych rodzin. Dr Greg Deets z Południowej Kalifornii rozpracował rodzinę Eudactylinidae (1988). W roku 1994 Maria Amado i wsp. z Brazylii opublikowali doskonale przygotowaną systematykę rodziny Ergasilidae.

Pozycja systematyczna badanych w niniejszej pracy widłonogów pasożytniczych z rodzaju *Achtheres* według systematyki Huysa i Boxshalla z roku 1991 przedstawia się następująco:

TYP: Arthropoda – Stawonogi

PODTYP: Crustaceomorpha – Skorupiokształtne

GROMADA: Crustacea – Skorupiaki

PODGROMADA: Copepoda – Widłonogi (Milne-Edwards, 1840)

NADRZĄD: Podoplea (Giesbrecht, 1882)

RZĄD : Siphonostomatoidea (Thorell, 1859)

RODZINA: Lernaepodidae (Olsson, 1869)

RODZAJ: *Achtheres* von Nordmann, 1832





### 1.3 Charakterystyka żywicieli

Poznanie biologii ekologii i morfologii okonia i sandacza może pomóc w zrozumieniu wzajemnych zależności między obydwoma formami pasożyta.

**OKOŃ** – *Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758 jest rybą kostnoszkieletową należącą do rzędu okoniokształtnych (Perciformes) i rodziny okoniowatych (Percidae).

Okoń zasiedla prawie całą Europę (ryc. 7), północną Azję, oraz Amerykę Północną. W Europie brak go na Półwyspie Pirenejskim, w środkowych i południowych Włoszech, w Jugosławii (na obszarze dawnej Dalmacji), Albanii, południowej Grecji. Występuje w wąskim pasie północnego wybrzeża Turcji. Nie występuje w Morzu Kaspijskim, jeziorze Bałchasz, rzece Amur i jej południowych dopływach, na Kamczatce i Anadyrze. Wschodnią granicą występowania jest basen rzeki Kołyma (Brylińska 1991). Obecnie w Europie można go znaleźć nawet tam, gdzie kiedyś nie występował, np. w Szkocji (Vastradowski 1976). W Polsce okoń należy do najpospolitszych gatunków ryb (Chrzanowski 1973), zasiedlając na terenie całego kraju niemal wszystkie zbiorniki wodne (Brylińska 1991).



Ryc. 7.

Rozsiedlenie okonia

(Krzykawski i wsp. 1999)





Okoń należy do najpospolitszych ryb strefy umiarkowanej, występując wszędzie tam, gdzie woda nie płynie zbyt szybko i gdzie jest w niej dostatecznie dużo tlenu (Załachowski 1997). Występuje we wszystkich typach jezior, w stawach, można go nawet spotkać w torfiankach. W rzekach występuje prawie na całej ich długości, nie unika wód słonawych (Brylińska 1991).

Gatunek ten nie jest chroniony przez polskie przepisy wędkarskie, bo zjadając ikrę, niszczy narybek innych pożytecznych gatunków i stanowi dla nich konkurencję pokarmową. Jest więc uznawany za chwast rybi (Chrzanowski 1973).

Połowy okonia w Zalewie Wiślanym w roku 1997 stanowiły 5,9% ogólnych połowów rocznych (Borowski i Dąbrowski 1998).

Jego znaczenie gospodarcze jest istotne ze względu na bardzo smaczne mięso. Z drobnych okoni wyrabia się konserwy.

Ciało jego jest ściśnione boczenie, krępe, stosunkowo wysokie. Otwór gębowy duży, końcowy, szczęki sięgają prawie do tylnej krawędzi oka. Na szczękach i kościach podniebienia drobne ząbki. Kość pokrywowa zakończona ostrym kolcem. Tylne krawędź kości pokrywowej prawie równomiernie piłkowana. Dwie płetwy grzbietowe leżą blisko siebie. Pierwsza płetwa wysoka, złożona wyłącznie z promieni twardych, druga – krótsza i niższa o charakterze płetwy miękkiej. Płetwy brzuszne w położeniu piersiowym. Łuska ktenoidalna, pokrywa prawie całe ciało oraz częściowo głowę (Krzykowski i wsp. 1999), jest wyjątkowo twarda, podobna do łuski sandacza (Brylińska 1991). Ciało zielonkawożółte, grzbiet ciemniejszy. Na bokach ciała występuje 5–9 poprzecznych ciemnych smug. W końcowej części pierwszej płetwy grzbietowej widoczna ciemna plama. Płetwy ogonowa, odbytowa i brzuszna czerwone lub czerwono-pomarańczowe. Ubarwienie zależne od siedliska – w strefie przybrzeżnej jezior ryby tego gatunku są jaśniejsze, natomiast w głębszych partiach wód – ciemniejsze.





Niektóre cechy przeliczalne można przedstawić następująco:

D<sub>1</sub> XIII–XVII, D<sub>2</sub> I–III 13–15, A II (7) 8–9 (10), 1.1. 57–77 , sp. br. 14–20

(Krzykawski i wsp. 1999)

Ryba ta osiąga długość 51 cm i nieco ponad 2 kg masy (Krzykawski i wsp. 1999).

Dojrzałość płciową osiąga zwykle w trzecim roku życia, przy długości 12–24 centymetrów. Jaja (12–300 tysięcy) składane są w postaci długich wstęg na roślinności podwodnej, kamieniach lub korzeniach roślin wodnych. Rodzice nie opiekują się jajami. Wylęg następuje po 2–3 tygodniach (Chrzanowski 1973). Świeżo wylęte larwy mierzą 3–6 mm i posiadają woreczek żółtkowy o jajowatym kształcie, zawierający kroplę tłuszczu, co umożliwia im unoszenie się na wodzie (Cihar 1992).

Okoń jest drapieżcą, atakującym w młodości bezkręgowce, później ryby, często własnego gatunku. Żeruje w ciągu dnia (Załachowski 1997). W zbiorniku wykazuje znaczną ruchliwość, a w większych kompleksach jezior, przejawia skłonności do wędrówek, które mają charakter wędrówek rozrodczych lub troficznych (Brylińska 1991). Gatunek ten tworzy przypuszczalnie na obszarze jednego zbiornika różne formy ekologiczne (Krzykawski i wsp. 1999).

Prowadzone w latach 1959–1961 badania nad zróżnicowaniem parazytofauny okonia pochodzącego z różnych punktów badań w jednym zbiorniku (Jezioro Dargin) nasuwają przypuszczenie, że populacja okonia składa się z kilku grup (stad ?), które przez dłuższy czas nie zmieniają strefy przebywania (Wierzbicki 1971). Życie stadne okoni może sprzyjać wzajemnemu zarażaniu się niektórymi pasożytami.





**SANDACZ** – *Sander lucioperca* (Linnaeus, 1758)

(Według Kottellata (1997) oraz Froese i Pauly (2001) rodzaj *Sander* Oken, 1817 uzyskuje priorytet nad: *Stizostedion* Rafinesque, 1820, *Lucioperca* Schinz in Cuvier, 1822, *Lucioperca* Fleming, 1822, *Lucioperca* Cuvier in Cuvier et Valenciennes, 1828 oraz sześcioma innymi nazwami rodzajowymi)

Sandacz jest rybą należącą do tej samej grupy systematycznej co okoń (Perciformes, Percidae).

Obszar występowania sandacza (ryc. 8) rozciąga się obecnie od Jeziora Aralskiego do Pirenejów i od środkowej Skandynawii do północnej Italii. Naturalne występowanie sandacza w Skandynawii ogranicza się do jezior będących pozostałością Morza Ancylusowego (Korycki 1976). W Polsce sandacz występuje w zasadzie na całym obszarze kraju: rzeki, jeziora, zbiorniki zaporowe, Zalew Wiślany (Filuk 1962) i Zalew Szczeciński (Wiktor 1954, Krackiewicz 1969). W zbiornikach zaporowych sandacz występuje z reguły w wyniku wprowadzenia go drogą zarybień (Brylińska 1991).



Ryc. 8.

Rozsiedlenie sandacza

(Krzykawski i wsp. 1999)

Sandacz preferuje zbiorniki wodne, gdzie dno nie jest muliste, a prąd zbyt wartki. Pomimo, że jest to gatunek typowo słodkowodny, może jednak





przebywać, nawet przez dłuższy czas, w morskich wodach przybrzeżnych (Korycki 1976). Sandacz zasiedla głównie dolny bieg rzek, słonawe zatoki morskie oraz stosunkowo płytkie i rozległe jeziora typu sandaczowo-leszczowego (Krzykowski i wsp. 1999).

Jest to jeden z kilku gatunków decydujących o dochodowości rybactwa jeziorowego, zaś jego znaczenie ekonomiczne i ekologiczne stale wzrasta (Wołos 1996).

Połowry sandacza w wodach słonawych Bałtyku od lat wahają się w granicach od 2 do 2,7 tys. ton (w roku 1996 – 2,5 tys. ton), co stanowi 10% światowych połowów sandacza (Błaszczuk 1999). W wodach Zalewu Wiślanego w roku 1997 połowry sandacza stanowiły 26,5% ogólnych połowów (Borowski i Dąbrowski 1999), zaś w wodach Międzyodrza w porównaniu z rokiem 1989 (20 ton) spadły do sześciu ton w latach 1996–98 (Błaszczuk 1999).

Ciało sandacza jest smuklejsze od okonia, przypomina go jednak budową, rozmieszczeniem płetw i szorstką powierzchnią ciała, które pokryte jest grzebykowatymi łuskami (Załachowski 1997). Otwór gębowy duży, końcowy, sięga poza tylną krawędź oka. Na szczękach, kościach podniebiennych występują, oprócz drobnych ząbków, duże zęby w postaci „kłów”. Drobne ząbki znajdują się również na lemieszu. Dwie płetwy grzbietowe są zwykle oddzielone od siebie, pierwsza twarda druga – miękka. Linia naboczna wyraźna, przebiega prosta wzdłuż całego ciała, nachodząc na płetwę ogonową (Krzykowski i wsp. 1999). Łuska sandacza jest ktenoidalna i cienka (Brylińska 1991). Ubarwienie u tego gatunku jest bardzo zróżnicowane. W części grzbietowej zielonawoszare, a w brzusznej białawe. Na bokach ciała na stalowym tle występuje 8–12 ciemnych, poprzecznych smug (Korycki 1976).

Niektóre cechy przeliczalne można przedstawić następująco:

D<sub>1</sub> XIII–XVII, D<sub>2</sub> I–III 19–24, A II (III) (10)11–13, 1.1. 80–97 , sp. br. 13–15

(Krzykowski i wsp. 1999).





Sandacz już w młodości (kiedy jego długość wynosi zaledwie kilkanaście centymetrów) żywi się już rybami różnych gatunków: stynki, ukleje, okonie i jazgarze, lecz zdecydowanie preferuje osobniki o niewielkich rozmiarach (Załachowski 1997). Skład pokarmu u tego gatunku (zarówno narybku jak i ryb dorosłych) nie jest jednakowy dla wszystkich populacji ze wszystkich zbiorników wodnych. Jest on uzależniony od składu gatunkowego bytującej w nim fauny bezkręgowej (Brylińska 1991). Sandacze żerują w czasie dnia lub w porach brzasku i zmroku (Załachowski 1997).

Rozród u sandacza przypada na późną wiosnę i wczesne lato, kiedy to osobniki kojarzą się w pary (Załachowski 1997). Ikra składana jest na dnie żwirowatym lub piaszczystym (Krzykowski i wsp. 1999), po czym samiec pozostaje przy niej aż do wylęgu, nie opuszczając gniazda nawet w obecności człowieka (Załachowski 1997). Sandacz jest rybą trzymającą się określonego terytorium i nie przejawia tendencji do przemieszczania się zbyt daleko od miejsc rozrodu (Brylińska 1991). W rejonie tarliska zaczyna grupować się już w okresie zimy, przebywając w nim do końca czerwca. W okresie letnim rozprasza się po całym zbiorniku wodnym (Bielawski 1997).

Sandacz występujący w Zalewie Wiślanym, i Szczecińskim (Wiktor 1954, Krackiewicz 1969) odznacza się silną tendencją wędrowania, co jest związane z rozproszeniem się w lecie stynki (głównego składnika pokarmu sandacza) (Brylińska 1991).

Możliwość współwystępowania okonia i sandacza w jednym zbiorniku, oraz fakt, że małe okonie są częstym pokarmem sandaczy (Załachowski – informacja ustna) stwarza dodatkowe możliwości zarażenia się pasożytami. Zważywszy jednak na fakt, że okonie do 5 cm nie są atakowane przez *Achtheres* (Kozikowska 1957) bezpośredni kontakt obu gatunków podczas pożerania małych okoni nie stwarza bezpośredniego źródła zarażenia dla sandacza.





## 1.4 Porównanie parazytofauny sandacza i okonia na podstawie literatury

Tabela 1 sporządzona na podstawie literatury obejmuje 101 gatunków pasożytów, z których 29 występuje równocześnie u okonia i sandacza (stanowi to 28,7% parazytofauny „wspólnej” dla obu żywicieli). Należy także zwrócić uwagę, że na siedem gatunków widłonogów zanotowanych u obu żywicieli, aż cztery występują zarówno u okonia jak i u sandacza.

Tab. 1. Porównanie parazytofauny *Sander lucioperca* i *Perca fluviatilis* na przykładzie literatury

| Lp. | Gatunek                                                 | <i>Sander lucioperca</i><br>sandacz | <i>Perca fluviatilis</i><br>okoi |
|-----|---------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 1   | <i>Trypanosoma percae</i> Brumpt, 1906                  |                                     | Jastrzębski (1884a)              |
| 2   | <i>Ichthyobodo necator</i> (Henneguy, 1883) Pinto, 1928 |                                     | Kulwiec (1931)                   |
| 3   | <i>Trypanoplasma</i> spp.                               |                                     | Groba (1973)                     |
| 4   | <i>Eimeria percae</i> (Riviere, 1914)                   |                                     | Jastrzębski (1984b)              |
| 5   | <i>Eimeria tedlai</i> Molnar et Fernando, 1974          |                                     | Jastrzębski (1984b)              |
| 6   | <i>Pleistophora</i> sp.                                 | Waluga, Własow (1988)               |                                  |
| 7   | <i>Myxidium pfeifferi</i> Auerbach, 1908                |                                     | Barkowskaja 1998                 |
| 8   | <i>Myxobolus ellipsoides</i> Thélohan, 1892             |                                     | Pojmańska i wsp. (1980)          |
| 9   | <i>Myxobolus muelleri</i> Bütschli, 1882                | Waluga i Własow (1988)              |                                  |
| 10  | <i>Myxobolus sandrae</i> Reuss, 1906                    | Grabda i Grabda (1971)              | El-Tantawy (1989a, b)            |
| 11  | <i>Myxobolus</i> sp.                                    |                                     | Kozicka (1959)                   |
| 12  | <i>Henneguya creplini</i> (Gurley, 1894)                |                                     | Wierzbicki (1970)                |
| 13  | <i>Henneguya lobosa</i> (Cohn, 1895)                    |                                     | Pojmańska i wsp. (1980)          |
| 14  | <i>Henneguya psorospermica</i> Thélohan, 1895           |                                     | El-Tantawy (1989a, b)            |
| 15  | <i>Henneguya</i> sp.                                    |                                     | Grabda i wsp. (1961b)            |





|    |                                                                    |                                                                      |                                  |
|----|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 16 | <i>Henneguya wolinensis</i> Romuk-Wodoracki, 1990                  |                                                                      | Romuk-Wodoracki (1989)           |
| 17 | <i>Rhabdospora thelohani</i> (Henneguy)                            | Waluga i Własow (1988)                                               |                                  |
| 18 | <i>Chilodonella piscicola</i> (Zacharias, 1894) Jankowski, 1910    | Kazubski i Migąła (1974)                                             | Wierzbicki (1970)                |
| 19 | <i>Erastophrya chattoni</i> Fauré-Fremiet, 1943                    |                                                                      | Skrenty (1999)                   |
| 20 | <i>Capriniana piscium</i> (Bütschli, 1889) Jankowski, 1973         | Waluga i Własow (1988)                                               | Kozicka (1966)<br>Skrenty (1999) |
| 21 | <i>Ichthyophthirius multifiliis</i> Fouquet, 1876                  |                                                                      | Pastuszko i wsp. (1984)          |
| 22 | <i>Apiosoma piscicolum</i> Blanchard, 1885                         | Waluga i Własow (1988)                                               |                                  |
| 23 | <i>Trichodina domerguei</i> f. <i>acuta</i> Lom, 1961              |                                                                      | Pastuszko i wsp. (1984)          |
| 24 | <i>Trichodina nigra</i> Lom, 1960                                  | Kazubski i Pilecka-Rapacz (1981)                                     |                                  |
| 25 | <i>Trichodina</i> sp.                                              |                                                                      | Wierzbicki (1970)                |
| 26 | <i>Trichodina percae</i> Kaschkovsky i Lom, 1979                   |                                                                      | Barkowskaja (1998)               |
| 27 | <i>Trichodina urinaria</i> Dogiel, 1940                            | Kozicka (1959)                                                       | Wierzbicki (1970)                |
| 28 | <i>Trichodinella epizootica</i> (Raabe, 1950)                      | Kozicka (1959)                                                       | Skrenty (1999)                   |
| 29 | <i>Ancyrocephalus paradoxus</i> Creplin, 1839                      | Pojmańska i wsp. (1980)                                              | Wierzbicki (1970)                |
| 30 | <i>Ancyrocephalus percae</i> Ergens, 1966                          |                                                                      | Grabda-Kazubska i wsp. (1987)    |
| 31 | <i>Gyrodactylus</i> sp.                                            | Waluga i Własow (1988)                                               |                                  |
| 32 | <i>Ichthyocotylurus platycephalus</i> (Creplin, 1825) metacerkaria | Niewiadomska (1977)                                                  | Pojmańska i wsp. (1980)          |
| 33 | <i>Ichthyocotylurus variegatus</i> (Creplin, 1825), metacerkaria   | Niewiadomska (1977)                                                  | Niewiadomska (1977)              |
| 34 | <i>Bucephalus polymorphus</i> Baer, 1827 metacerkaria              | Niewiadomska (1977)                                                  | Pojmańska i wsp. (1980)          |
| 35 | <i>Bucephalus polymorphus</i> Baer, 1827                           | Rokicki (1975)                                                       | Ejsymont, (1970)                 |
| 36 | <i>Rhipidocotyle campanula</i> (Dujardin, 1845)                    | Rokicki (1975)<br>Pojmańska i wsp. (1980)<br>Sterud i Appleby (1996) | Pojmańska i wsp. (1980)          |
| 37 | <i>Rhipidocotyle campanula</i> (Dujardin, 1845) metacerkaria       | Kozicka (1958a)                                                      | Ejsymont (1970)                  |





|    |                                                                                           |                                               |                               |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------|
| 38 | <i>Bunodera luciopercae</i> (Müller, 1776) Lühe, 1909                                     | Rokicki (1975)                                | Wierzbicki (1970)             |
| 39 | <i>Phyllodistomum folium</i> (Olfers, 1816) Braun, 1899                                   |                                               | Ejsymont (1970)               |
| 40 | <i>Phyllodistomum</i> sp.                                                                 |                                               | Wyrzykowska (1964)            |
| 41 | <i>Azygia lucii</i> (Müller, 1776) Braun, 1893                                            | Pojmańska i wsp. (1980)                       | Ejsymont (1970)               |
| 42 | <i>Azygia</i> sp.                                                                         |                                               | Milicer (1938)                |
| 43 | <i>Nicolla skrjabini</i> (Ivanitzky, 1928) Dollfus, 1959                                  |                                               | Rokicki (1975)                |
| 44 | <i>Sphaerostomum bramae</i> (Müller, 1776) Lühe, 1909                                     |                                               | Dąbrowska (1970)              |
| 45 | <i>Echinichasmus</i> sp., metacerkaria                                                    |                                               | Niewiadomska (1977)           |
| 46 | <i>Diplostomum baeri</i> Dubois, 1937 metacerkaria                                        |                                               | Niewiadomska (1988)           |
| 47 | <i>Diplostomum</i> sp. metacerkaria                                                       | Niewiadomska (1977)                           | Pojmańska i wsp. (1980)       |
| 48 | <i>Diplostomum spathaceum</i> (Rudolphi, 1819) Braun, 1893 metacerkaria                   | Waluga i Własow (1988)                        | Wierzbicki (1970)             |
| 49 | <i>Tylodelphys clavata</i> (von Nordmann, 1832) Diesing, 1850 metacerkaria                | Niewiadomska (1977)<br>Waluga i Własow (1988) | Wierzbicki (1970)             |
| 50 | <i>Tylodelphys podicipina</i> Kozicka et Niewiadomska, 1960 metacerkaria                  |                                               | Wierzbicki (1970)             |
| 51 | <i>Posthodiplostomum brevicaudatum</i> (von Nordmann, 1832) Wiśniewski, 1958 metacerkaria |                                               | Wierzbicki (1970)             |
| 52 | <i>Posthodiplostomum cuticola</i> (von Nordmann, 1832) Dubois, 1939 metacerkaria          |                                               | Pojmańska i wsp. (1980)       |
| 53 | <i>Ichthyocotylurus pileatus</i> (Rudolphi, 1802) metacerkaria                            |                                               | Grabda-Kazubska i wsp. (1987) |
| 54 | <i>Ichthyocotylurus variegatus</i> (Creplin, 1825) metacerkaria                           |                                               | Grabda-Kazubska i wsp. (1987) |
| 55 | <i>Apatemon annuligerum</i> (von Nordmann, 1832) Odening, 1970 metacerkaria               |                                               | Kozicka (1972)                |
| 56 | <i>Tetracotyle annuligerum</i> (von Nordmann, 1832) Kozicka, 1961 metacerkaria            |                                               | Kozicka (1958)                |
| 57 | <i>Tetracotyle perca-fluviatilis</i> Linstow, 1856                                        |                                               | Adameczyk (1974)              |





|    |                                                                                       |                                   |                                         |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------|
| 58 | <i>Tetracotyle sp.</i> ,<br>metacerkaria                                              |                                   | Kozicka (1953)<br>Grabda i wsp. (1961b) |
| 59 | <i>Apophallus donicus</i> (Skrjabin et<br>Lindtrop, 1919) Price, 1931<br>metacerkaria | Wierzbicka i<br>Wierzbicki (1973) | Wierzbicka i Wierzbicki<br>(1973)       |
| 60 | <i>Brachyphallus crenatus</i> (Rudolphi,<br>1802) Odhner, 1905                        | Rokicki (1975)                    |                                         |
| 61 | <i>Caryophylleus laticeps</i> (Pallas,<br>1781) Lühe, 1910                            | Rokicki (1975)                    |                                         |
| 62 | <i>Triaenophorus crassus</i> Forel, 1880                                              |                                   | Rokicki (1975)                          |
| 63 | <i>Triaenophorus nodulosus</i> (Pallas,<br>1781) Rudolphi, 1819                       |                                   | Grabda-Kazubska i wsp.<br>(1987)        |
| 64 | <i>Trianeophorus nodulosus</i> (Pallas,<br>1781) Rudolphi, 1819<br>plerocerkoid       |                                   | Ejsymont (1970)                         |
| 65 | <i>Eubothrium crassum</i> (Bloch, 1779)                                               |                                   | Romanowski (2000)                       |
| 66 | <i>Bothriocephalus scorpii</i> (Müller,<br>1776)                                      | Rokicki (1975)                    | Rokicki (1975)                          |
| 67 | <i>Diphyllobothrium latum</i> (Linnaeus,<br>1758)<br>plerocerkoid                     |                                   | Romanowski (2000)                       |
| 68 | <i>Diphyllobothrium sp.</i> , plerocerkoid                                            |                                   | Ejsymont (1970)                         |
| 69 | <i>Ligula intestinalis</i> (Linnaeus, 1758)<br>plerocercoid                           |                                   | Wierzbicki (1970)                       |
| 70 | <i>Proteocephalus percae</i> (Müller,<br>1780) Railliet, 1899                         |                                   | Wierzbicki (1970)                       |
| 71 | <i>Proteocephalus sp.</i>                                                             |                                   | Kozicka (1959)                          |
| 72 | <i>Paradilepis scolecina</i> (Rudolphi,<br>1819)<br>larwa                             |                                   | Kozicka (1971)                          |
| 73 | <i>Valipora campylancristota</i><br>(Wedl, 1855)                                      |                                   | Kozicka (1971)                          |
| 74 | <i>Desmidocercella numidica</i> (Seurat,<br>1920) Yorke et Maplestone, 1926<br>larwa  |                                   | Wierzbicki (1970)                       |
| 75 | <i>Camallanus lacustris</i> (Zoega, 1776)<br>Railliet et Henry, 1915                  | Pojmańska i wsp.<br>(1980)        | Ejsymont (1970)                         |
| 76 | <i>Camallanus truncatus</i> (Rudolphi,<br>1814)                                       | Rokicki (1975)                    |                                         |
| 77 | larwa <i>Anisakis simplex</i> (Rudolphi,<br>1809)                                     | Piasecki i Sobecka<br>(1987)      |                                         |
| 78 | <i>Hysterothylacium aduncum</i><br>(Rudolphi, 1802)                                   |                                   | Rokicki (1975)<br>Romanowski (2000)     |
| 79 | <i>Raphidascaaris acus</i> (Bloch, 1779)<br>Railliet et Henry, 1915                   |                                   | Ejsymont (1970)                         |
| 80 | <i>Schulmanella petruschewskii</i><br>(Schulman, 1948)                                |                                   | Skrenty (1999)                          |





|     |                                                                                |                                       |                                                 |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 81  | <i>Neoechinorhynchus rutili</i> (Müller, 1780)                                 | Rolbiecki, Rokicki (1993)             | Wierzbicka, Wierzbicki (1971)                   |
| 82  | larwa <i>Corynosoma strumosum</i> (Rudolphi, 1802) Lühe, 1904                  |                                       | Barkowskaja (1998)                              |
| 83  | <i>Corynosoma semerme</i> (Forssell, 1904) Lühe, 1911, larva                   |                                       | Barkowskaja (1998)                              |
| 84  | <i>Acanthocephalus clavula</i> (Dujardin, 1845) Grabda-Kazubska et Chubb, 1968 |                                       | Milicer (1938)                                  |
| 85  | <i>Acanthocephalus anguillae</i> (Müller, 1780) Lühe, 1911                     |                                       | Ejsymont (1970)                                 |
| 86  | <i>Acanthocephalus lucii</i> (Müller, 1776) Lühe, 1911                         | Rokicki (1975)                        | Ejsymont (1970)                                 |
| 87  | <i>Echinorhynchus salmonis</i> Müller, 1780                                    |                                       | Dąbrowska (1970)                                |
| 88  | <i>Echinorhynchus gadi</i> Zoega in Müller, 1776                               |                                       | Romanowski (2000)                               |
| 89  | <i>Pomphorynchus leavis</i> (Zoega in Müller, 1776)                            | Rolbiecki i Rokicki (1993)            | Romanowski (2000)                               |
| 90  | <i>Hemiclepsis marginata</i> (Müller, 1774)                                    |                                       | Hajduk D., Hajduk Z., (1984)                    |
| 91  | <i>Piscicola geometra</i> (Linnaeus, 1761) Blainville, 1818                    | Waluga, Własow (1988)                 | Wierzbicki (1970)                               |
| 92  | <i>Caspiobdella fadejewi</i> (Epshtein, 1961)                                  |                                       | Bielecki (1990a)                                |
| 93  | glochidium Unionidae gen. sp.,                                                 | Dąbrowska (1970)                      | Niewiadomska (1977)<br>Skrenty (1999)           |
| 94  | <i>Neoergasilus japonicus</i> (Harada, 1930)                                   |                                       | Valtonen (1992)                                 |
| 95  | <i>Ergasilus briani</i> (Markewitsch, 1932)                                    |                                       | Valtonen (1992)                                 |
| 96  | <i>Ergasilus sieboldi</i> von Nordmann, 1832                                   | Kozikowska (1975)                     | Wierzbicki (1970)<br>Tuuha i wsp. (1992)        |
| 97  | <i>Achtheres percarum</i> von Nordmann, 1832                                   | Kozikowska (1975)<br>Piasecki (1993c) | Wierzbicki (1975)<br>Piasecki i Wołoszyn (1991) |
| 98  | <i>Caligus lacustris</i> Steenstrup et Lütken, 1861                            | Piasecki (1993c)                      | Kozikowska (1975)                               |
| 99  | <i>Argulus coregoni</i> Thorell, 1864                                          | Waluga, Własow (1988)                 |                                                 |
| 100 | <i>Argulus foliaceus</i> (Linnaeus, 1758)                                      | Piasecki (1993c)                      | Wierzbicki (1970)                               |
| 101 | Acarina gen sp.                                                                |                                       | Skrenty (1999)                                  |





## II MATERIAŁ I METODY

### 2.1 Morfologia – metody optyczne

Widłonogi z rodziny Lernaepodidae mają bardzo charakterystyczną budowę. Samica w toku ewolucji bardzo dobrze przystosowała się do pasożytnictwa, podczas gdy samce są dużo mniejsze i ich plan budowy i wymiary nie odbiegają wiele od wymiarów i struktury ostatniego stadium larwalnego (Chalimus IV). Z tego też powodu większość badań morfologicznych widłonogów z tej grupy dotyczy właśnie samic.

Ciało żeńskiego przedstawiciela Lernaepodidae po ostatniej lince rośnie nadal powiększając wielokrotnie swoje wymiary. Segmentacja zostaje prawie całkowicie zatarta. W ogólnym planie budowy można wyodrębnić trzy główne części, z których każdy spełnia jedną z podstawowych potrzeb organizmu: cephalothorax (głowotułów) z uwagi na swoje wydłużenie, obecność przydatków gębowych i syfon gębowy – jest odpowiedzialny za odżywianie. Tułów genitalny – jest odpowiedzialny za rozrodczość, zaś „ramiona” (maxille II pary) – za trwały kontakt z żywicielem.

Na przestrzeni ostatnich dziesięcioleci zmieniało się nazewnictwo stosowane do określania części ciała widłonogów pasożytniczych. Wynikało to z trudności znalezienia homologii części ciała silnie przekształconych Lernaepodidae ze skorupiakami wolnożyjącymi. Dopiero obszerna monografia Kabaty (1979) wprowadziła nazewnictwo, stosowane powszechnie do tej pory. Z uwagi na pewne różnice między terminami stosowanymi w literaturze polskiej przez innych autorów, posiłkując się schematem zapożyczonym z Kozikowskiej, Jary i Grabdy (1956) (ryc. 9), zdecydowałam się na uporządkowanie wybranych nazw (Tab. 2).





Tab. 2. Tabela porównująca wybrane nazwy stosowane w pracy Kozikowskiej, Jary i Grabdy (1956) z nazwami używanymi w niniejszej pracy.

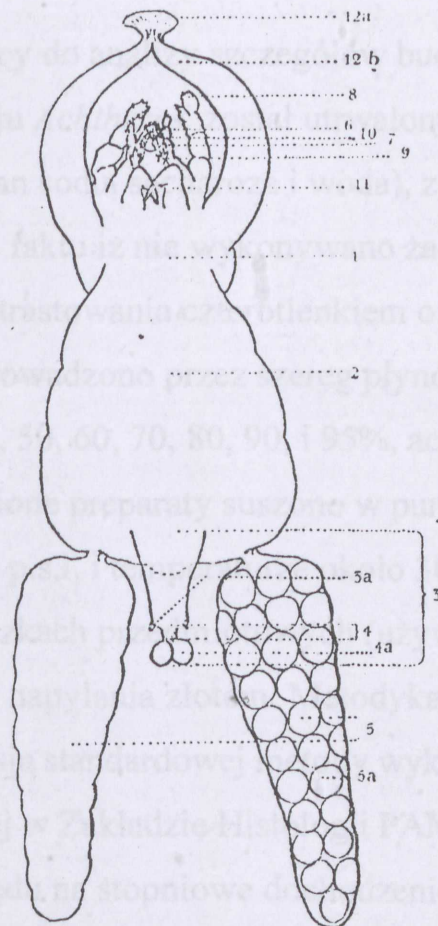
| Kozikowska, Jara i Grabda (1956)<br>(numeracja według ryciny 9) | Nazwy stosowane w niniejszej pracy |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Cephalothorax (głowotułów) (1)                                  | Cephalothorax (głowotułów)         |
| Abdomen (2)                                                     | Tułów genitalny                    |
| Postabdomen (3)                                                 | Wyrostek kopulacyjny (płciowy)     |
| Wyrostek płciowy (4)                                            | (końcówka wyrostka kopulacyjnego)  |
| Zbiornik nasienia (4a)                                          | spermatofor                        |
| Worki jajowe (5)                                                | Worki jajowe                       |
| Ryj (6)                                                         | Stożek gębowy                      |
| przyssawka (12a)                                                | bulla                              |

Niektóre elementy uzbrojenie przydatków powtarzają się u większości przedstawicieli rodziny Lernaeopodidae. Kabata (1966, 1979) zaproponował stosowanie odpowiedniej terminologii i cyfr (ryc.10) do określenia szczegółów budowy różnych przydatków. Od tego czasu terminologia Kabaty jest stosowana w opisach morfologicznych widłonogów z tej grupy. Przyjęto ją również w niniejszej pracy.

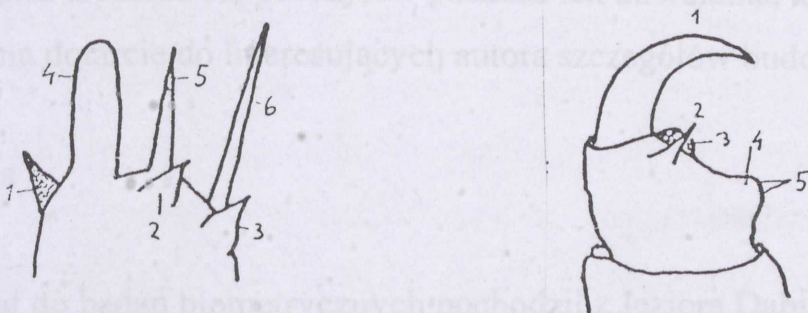
Do obserwacji szczegółów budowy zawieszano wypreparowane narządy gębowe w kropli kwasu mlekowego na szkiełku o specjalnej konstrukcji (Humus i Gooding 1964) używając mikroskopu świetlnego OLYMPUS BX50. Rysunki wykonano przy użyciu przystawki rysunkowej. Do wykonania fotografii o powiększeniach od 1x do 3x wykorzystano aparat cyfrowy Nikon Coolpix 950 sprzężony z mikroskopem stereoskopowym (Nikon SMZ 8000).







Ryc. 9. Schemat budowy *A. percarum* wg Kozikowskiej, Jary i Grabdy (1956)



A

B

Ryc. 10. Schemat uzbrojenia apikalnego A—Anteny I (wg Kabaty 1979) B—endopoditu Anteny II (według Kabaty 1979) (uzupełnione wg Piaseckiego 1987)





## 2.2 Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM)

Materiał służący do analizy szczegółów budowy różniących obie formy widłonogów z rodzaju *Achtheres* został utrwalony w buforze kakodylanowym (o składzie: kakodylan sodu, sacharoza i woda), z dodatkiem aldehydu glutarowego. Wobec faktu iż nie wykonywano żadnych przekrojów zrezygnowano z kontrastowania czterotlenkiem osmu i preparaty bezpośrednio po utrwaleniu przeprowadzono przez szereg płynów odwadniających (etanol o stężeniu 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, i 95%, aceton I, aceton II). Utrwalone i odwodnione preparaty suszono w punkcie krytycznym CO<sub>2</sub>, (przy ciśnieniu rzędu 1100 p.s.i. i temperaturze około 30°C), po czym umieszczono je na specjalnych stoliczkach przedmiotowych (używając kleju SILBER PRINT) i poddano procesowi napyłania złotem. Metodyka, którą zastosowano jest zmodyfikowaną wersją standardowej metody wykonywania preparatów z tkanek człowieka stosowanej w Zakładzie Histologii PAM przez Panią prof. Różewicką i jej zespół. Ze względu na stopniowe dochodzenie do optymalnych warunków przygotowania preparatów do obserwacji w SEM, wprowadzono szereg modyfikacji dotyczących między innymi czasu utrwalania, składu mieszaniny utrwalającej (stosunek buforu kakodylanowego do aldehydu glutarowego), oraz czasu odwadniania. Specyficzny sposób mocowania preparatów, zapobiegał przypadkowemu ułożeniu się pasożytów podczas ich utrwalania, które to nie pozwoliłoby na dotarcie do interesujących autora szczegółów budowy.

## 2.3 Biometria

Materiał do badań biometrycznych pochodził z Jeziora Dąbie. W celu wykluczenia różnic morfologicznych, będących wynikiem przystosowania do specyficznego miejsca bytowania na żywicielu (jama gębowa, bądź skrzela) do pomiarów wykorzystano tylko osobniki *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”





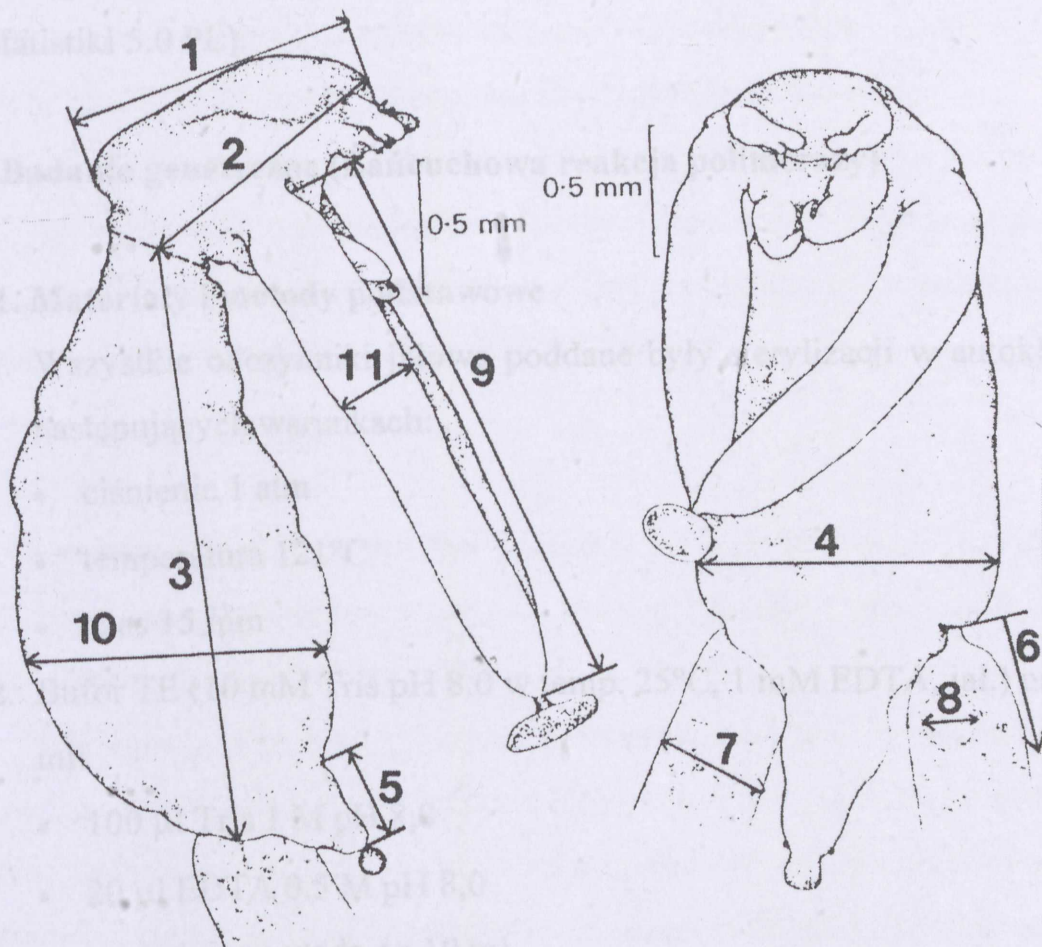
żyjące na skrzelach w postaci dojrzałych samic z wykształconymi workami jajowymi. Chcąc wyeliminować różnice wiekowe materiał zebrano bardzo wcześniej (od 22 kwietnia 1999 roku do 10 maja 1999 roku). Były to widłonogi, które przezimowały na żywicielu, a zatem reprezentowały pokolenie (pokolenia) roku 1998. Do badań morfometrycznych wykorzystano po 100 osobników z każdego żywiciela, wykonując 13 pomiarów według samodzielnie skonstruowanego schematu pomiarowego (ryc. 11). Materiał przechowywano w alkoholu etylowym o stężeniu 75%. U każdego osobnika mierzono: długość płytki głowowej (1), długość głowotułowia (2), długość tułowia genitalnego (3), szerokość całkowitą (4), grubość tułowia genitalnego (10), długość wyrostka kopulacyjnego (5), długość (6) i szerokość (7) worków jajowych, średnicę jaj (8), długość (9) i grubość (11) maxilli II pary, oraz całkowitą długość ciała z wyrostkiem ( $2 + 3 + 5$ ) i bez wyrostka kopulacyjnego ( $2 + 3$ ). W przypadku pomiaru dotyczącego szerokości tułowia genitalnego układano osobnika w położeniu brzuszny. Długość maxilli II pary mierzono do miejsca przyczepu bulli, zaś długość wyrostka kopulacyjnego mierzono bez spermatoforów.

Wszystkich pomiarów dokonywano przy użyciu specjalnej nasadki okularowej (PZO-OK 15 KM). Odczytane dane przeliczono na mm i wprowadzono do arkusza obliczeniowego programu STATISTICA 5.0 PL. Przy stawianiu hipotezy o istnieniu dwóch form widłonogów z rodzaju *Achtheres* pasożytujących u okonia i sandacza pomocna okazała się analiza skupień. Do sporządzenia dendrogramu wybrano losowo 40 osobników (po 20 z każdego żywiciela). Aglomerację przeprowadzono posługując się metodą pojedynczego wiązania w której to odległość między dwoma skupieniami zostaje określona przez odległość dzielącą dwa sąsiadujące obiekty należące do różnych skupień. Odległość między obiektami wyliczano jako miarę euklidesową czyli odległość geometryczną w przestrzeni wielowymiarowej.

W celu określenia cech najbardziej różnicujących obie formy przeprowadzono regresję wielokrotną. Posłużono się metodą regresji krokowej, która wprowadza







Ryc. 11. Schemat pomiarowy samicy widłonoga z rodzaju *Achtheres*  
(wg Kabaty 1979, zmienione) (objaśnienia w tekście)





oddzielnie do równania zmienne niezależne, lub usuwa te zmienne w każdym kroku regresji aż uzyska się najlepszą opcję tego równania (z pomocy do Statistiki 5.0 PL).

## 2.4 Badania genetyczne (Łańcuchowa reakcja polimerazy)

### 2.4.1. Materiały i metody podstawowe

1. Wszystkie odczynniki jałowe poddane były sterylizacji w autoklawie w następujących warunkach:
  - ciśnienie 1 atm
  - temperatura 121°C
  - czas 15 min
2. Bufor TE (10 mM Tris pH 8.0 w temp. 25°C, 1 mM EDTA, jał.) na 10 ml:
  - 100 µl Tris 1 M pH 8,0
  - 20 µl EDTA 0.5 M pH 8,0
  - uzupełniono wodą do 10 ml
3. Tipsy (jał.)
4. Probówki Eppendorfa (jał.)
5. Woda redestylowana (jał.)

### 2.4.2. Pozyskanie i przechowywanie widłonogów z rodzaju *Achtheres* reprezentujących obie formy

Okonie i sandacze zostały odłowione w maju 1997 na Jeziorze Dąbie. Z każdego żywiciela zebrano po 20 osobników *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”. Materiał do badań stanowiły tylko dorosłe samice z wyraźnymi workami jajowymi. Pozyskane osobniki przechowywano przed rozpoczęciem badań w probówkach z 75% alkoholem etylowym. Materiałem do izolacji DNA były worki jajowe, w których jaja wykazywały już wyraźną pigmentację.





Zarówno z okonia jak i sandacza pobrano skrawki wątroby do izolacji DNA ryb. Te próbki DNA ryb poddano także reakcji PCR jako kontrole w celu wykluczenia możliwości „zanieczyszczenia” badanego DNA *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” materiałem genetycznym ich żywiciela. Do badań porównawczych w czerwcu 2000 roku odłowiono leszcze, także z jeziora Dąbie, z których zebrano 20 osobników *Tracheliastes maculatus* – reprezentującego tą samą grupę widłonogów (słodkowodne Lernaeopodidae) – przechowywano je także w 75% alkoholu etylowym).

### 2.4.3. DNA

Do reakcji PCR w przypadku *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” użyto matryc DNA otrzymanych z worków jajowych, zaś w przypadku *T. maculatus* z leszcza DNA – izolowane z całych osobników.

Do izolacji DNA z powyższych materiałów, a także z skrawków wątroby ryb zastosowano zestaw Easy Genomic DNA Prep Plus (A&A Biotechnology, Polska), opierający się na zdolności wiązania się DNA do złóż krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Komórki/tkanki lizowane są w odpowiednim buforze lizującym, zawierającym sole chaotropowe i detergenty niejonowe (bufor LT). Dodatkowo w procesie lizy uczestniczy silna proteaza (Proteinaza K). W tych warunkach dochodzi do lizy komórek i degradacji wszelkich białek. Następnie mieszanina nanoszona jest na minikolumnę ze specjalnym złożem krzemionkowym. DNA przechodząc przez złożo adsorbuje się na nim, podczas gdy zanieczyszczenia przechodzą nie wiążąc się. Po wypłukaniu z kolumny resztek zanieczyszczeń, oczyszczone DNA wymywane jest z kolumny niskojonowymi buforami lub wodą i nadaje się do bezpośredniego wykorzystania bez konieczności precypitacji.

Izolację DNA przeprowadzono dokładnie według procedury producenta zestawu dla tkanek stałych.





#### 2.4.4. Pomiary stężenia DNA

Stężenie DNA matrycowego zawieszonego w buforze TE (pkt. 1) mierzono za pomocą kalkulatora RNA/DNA firmy Pharmacia. Wszystkie roztwory DNA matrycowego doprowadzano do stężenia 5 ng/μl.

#### 2.4.5. Elektroforeza na żelu agarozowym

1. Przygotowano 1,5% żel agarozowy w buforze 1 × TBE. Agarozę rozpuszczono całkowicie w łaźni wodnej lub kuchence mikrofalowej doprowadzając do początku wrzenia.
2. Ostudzono żel do temperatury około 60°C. Dodano roztworu bromku etydyny do końcowego stężenia 0.2 ng /ml objętości żelu.  
Z uwagi na to, że bromek etydyny jest silnym mutagenem – stale stosowano rękawice gumowe i unikano bezpośredniego kontaktu roztworu bromku etydyny ze skórą.
3. Wylano żel na płytę tak, aby ustawiony nad nią grzebień został zanurzony w żelu i spowodował powstanie studzienek.
4. Po zastygnięciu żelu (minimum 5 min) wyjęto grzebień i wstawiono żel do aparatu do elektroforezy.
5. Napełniono aparat buforem 1 × TBE do wysokości 5 mm nad powierzchnią żelu.
6. Próbkę DNA zmieszano z buforem do nanoszenia (tak by objętość tej mieszaniny nie przekraczała objętości studzienki a bufor do nanoszenia stanowił przynajmniej 1/5 tej objętości) i tak przygotowane próbki naniesiono mikropipetą do studzienek żelu.
7. Włączono zasilanie aparatu do elektroforezy (5–10 V na 1 cm długości żelu).
8. Gdy barwnik wniknął wyraźnie w żel agarozowy można przeniesiono żel pod lampę UV i obserwowano drogę migracji DNA (zależną odwrotnie





proporcjonalnie do wielkości fragmentu DNA). Po uzyskaniu pożądanego rozdziału zakończono elektroforezę przez wyłączenie zasilania.

Materiały:

1. bufor 10 × TBE (pH 8.3 w temp 25°C, jał.) na 1000 ml:
  - Tris 108 g
  - kwas borowy 55 g
  - EDTA 9,3 g
  - uzupełniono wodą destylowaną do 1000 ml
2. agaroz (Sigma, USA)
3. roztwór bromku etydyny 5 mg/ml,
4. bufor do nanoszenia próbek na żel:
  - 0,25% błękit bromofenolowy
  - 30% glicerol w wodzie.

#### **2.4.6. Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym**

1. Przygotowano 6% roztwór żelu poliakrylamidowego w buforze 1 x TBE. Z uwagi na to, że poliakrylamid jest silną neurotoksyną – stosowano rękawice gumowe a roztwór wyjściowy przygotowywano pod wyciągiem.
2. Wylano żel między przygotowane płyty, zanurzono grzebień na głębokość około 1 cm żelu i pozostawiono w temperaturze pokojowej na czas polimeryzowania (około 30 min).
3. Po spolimeryzowaniu żelu wyjęto grzebień, studzienki wypłukano buforem 1 x TBE i wstawiono płyty do aparatu do elektroforezy.
4. Aparat napełniono buforem 1 x TBE.
5. Próbkę DNA mieszało z buforem do nanoszenia (1/5 objętości próbki DNA) i naniesiono mikropipetą do studzienek żelu.
6. Elektroforezę prowadzono w warunkach 5–10 V/cm długości żelu.
7. Po uzyskaniu pożądanego rozdziału zakończono elektroforezę.





8. Żel barwiono po wyjęciu z płyt w roztworze bromku etydyny (0,5 µg/ml) przez 15 min.

9. Żel analizowano w świetle UV.

#### Materiały:

1. bufor 10 x TBE,
2. poliakrylamid – roztwór 30%,
  - akrylamid (Sigma, USA) – 29 g,
  - bis-akrylamid (Sigma, USA) – 1 g,
 uzupełnić wodą do 100 ml,
3. nadsiarczan amonu (Sigma, USA), 10 % roztwór,
4. TEMED (Sigma, USA),
5. roztwór bromku etydyny 5 mg/ml;
6. bufor do nanoszenia próbek na żel:
  - 15% Ficoll,
  - 0,25% błękit bromofenolowy.

#### **2.4.7. Amplifikacja przy pomocy metody PCR**

1. Zaprogramowano termocykler na warunki podane niżej.
  2. Przygotowano mieszaninę reakcyjną jak podano poniżej, polimerazę *Pwo* dodano na końcu, użyto specjalnych probówek Eppendorfa (0,5 ml).
  3. Zwirowano w miniwirówce (5000 obrotów/min. przez 20 s).
7. Niezwłocznie wstawiono probówki do termocyklera i uruchomiono odpowiedni program.

#### **7.1. Program (profil termiczno czasowy) reakcji PCR, skład**

##### **mieszaniny reakcyjnej i sekwencje starterów EU5.8S i EU18S**

- profil termiczno czasowy

##### **1. 35 cykli:**

- denaturacja – 60 s, 94°C;





- przyłączanie starterów – 60 s, 56°C;
- wydłużanie – 120 s, 72° C;
- 2. końcowe wydłużanie – 3 min, 72°C.
- mieszanina reakcyjna:
  1. woda – 32,5 µl,
  2. 10x stężony bufor reakcyjny dla termostabilnej polimerazy DNA - 5 µl,
  3. starter EU5.8S – 2 µl,
  4. starter EU18S – 2 µl,
  5. matryca 5 ng/µl – 1µl,
  6. 200 µM dNTP – 5 µl,
  7. MgCl<sub>2</sub> (50 mM) – 2 µl,
  7. termostabilna polimeraza DNA – 0,5 µl (2,5 U)
- sekwencje starterów:
  1. starter EU5.8S (5'-CCATCCAAGTACTAACCAGGC -3') (21 nt)
  3. starter EU18S (5'-GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3') (24 nt)

## 7.2. Program (profil termiczno czasowy) reakcji PCR, skład mieszaniny reakcyjnej i sekwencje starterów 18SF1 i 28SR

- profil termiczno czasowy
  1. 40 cykli:
    - denaturacja – 30 s, 93°C,
    - przyłączanie starterów – 60 s, 48°C,
    - wydłużanie – 120 s, 72° C,
  2. końcowe wydłużanie – 3 min, 72°C.
- mieszanina reakcyjna
  1. woda – 32,5 µl,
  2. 10 x stężony bufor reakcyjny dla termostabilnej polimerazy DNA – 5 µl,





8. starter 18SF1 – 2  $\mu$ l,
  9. starter 28SR – 2  $\mu$ l,
  10. matryca 5 ng/ $\mu$ l – 1  $\mu$ l,
  11. 200  $\mu$ M dNTP – 5  $\mu$ l,
  12.  $MgCl_2$  (50mM) – 2  $\mu$ l,
  7. termostabilna polimeraza DNA – 0,5  $\mu$ l (2,5 U)
- sekwencje starterów:
    1. starter 18SF1 (5'-GCGAAGCATTGCGCAAGAA -3') (19 nt)
    2. starter 28SR (5'-TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT -3') (20 nt)

#### 2.4.8. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP)

Przygotowanie prób.

1. Trawienie przeprowadzono w podanych niżej warunkach odpowiednich dla każdego enzymu restrykcyjnego (tabela 3).
2. Przygotowano w próbkach Eppendorfa mieszaninę reakcyjną jak podano poniżej.

Enzym dodano na końcu. Trawienie przeprowadzono w objętości 20  $\mu$ l.

3. Probówki inkubowano w temperaturze 37°C przez 3 godz.
4. Potrawione próby przechowywano w temperaturze 4°C.
5. 10  $\mu$ l próby i 2  $\mu$ l barwnika naniesiono na 6% żel poliakrylamidowy

Mieszanina reakcyjna ( $V_t = 20 \mu$ l).

1. 10 x stężony bufor rekomendowany dla określonej restryktazy – 2  $\mu$ l.
2. BSA 1mg/ml - zależnie od wymagań enzymu – 2  $\mu$ l.
3. Woda dejonizowana – uzupełnienie do 20  $\mu$ l.
4. Produkty amplifikacji – 15  $\mu$ l.
5. Odpowiedni enzym – 1  $\mu$ l.





Materiały

1. Enzymy restrykcyjne.

Tabela 3. Enzymy restrykcyjne stosowane do RFLP.

| Enzymy restrykcyjne<br>(Fermentas MBI) | Sekwencje rozpoznania          | Bufor do trawienia<br>(Fermentas MBI) |
|----------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| <i>HinfI</i>                           | 5' G↓ANT C 3'<br>3' C TNA↓G 5' | R <sup>+</sup>                        |
| <i>MboI</i>                            | 5' ↓GATC 3'<br>3' CTAG↓ 3'     | R <sup>+</sup>                        |
| <i>AluI</i>                            | 5' AG↓CT3'<br>3' TC↑GA5'       | Y Tango                               |

2. Bufory do trawienia enzymatycznego

Bufor R<sup>+</sup>:

- Tris-HCL (pH 8.5) 100 mM
- MgCl<sub>2</sub> 100 mM
- KCL 100 mM

Bufor Y Tango:

- 33 mM Tris-Hcl (pH 7.9)
- 10 mM MgCl<sub>2</sub>
- 6,6 mM KCL

0,1 mg/ml BSA

BSA (1 mg/ml)





### III WYNIKI

#### 3.1 Morfologia

Wykorzystując mikroskopię optyczną dokonano badań ogólnej budowy ciała obydwu form: *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”. Formy te mają ten sam plan budowy i zbliżone proporcje. Ich ciało właściwe składa się z dwóch głównych części: głowotułowia i tułowia genitalnego (ryc. 2, 3). Głowotułów jest relatywnie krótki. Jego ważnym elementem jest położony terminalnie stożek gębowy (syfon gębowy) złożony z labrum i labium. Wewnątrz stożka znajduje się para mandibuli. Od strony dorsalnej stożka są usytuowane anteny I pary i nieco na zewnątrz, anteny II pary. Po bokach stożka występują maxille I pary. Wymienione powyżej przydatki mają względnie małe wymiary, porównywalne z wymiarami stożka gębowego (ryc. 2). Największe przydatki to maxille II pary usytuowane na środku cephalothoraxu od strony brzusznej (ryc. 11). Zostały one przekształcone w mocne cylindryczne „ramiona”, swoją długością przekraczające dwukrotnie długość całego głowotułowia. Końce „ramion” są zrośnięte z trąbkowatego kształtu bullą. Bulla stanowi narząd czepny dorosłych samic widłonogów z rodziny Lernaeopodidae, kotwiczącą te pasożyty na stałe na powierzchni ciała żywiciela. U podstawy „ramion” znajdują się otwory będące ujściami kanałów maxillarnych – stanowiących ujścia układu wydalniczego widłonogów. Pomiędzy maxillami II pary zlokalizowane są wielokrotnie mniejsze maxillipedia. Tułów genitalny ma całkowicie zatartą segmentację. Jest lekko spłaszczony grzbietobrzusznie i ma trudny do zdefiniowania obły kształt. Przypomina worek z elastycznej grubej kutikuli. Jedyne ślady pierwotnej segmentacji widoczne są w umięśnieniu tułowia (tej cechy nie bierze się obecnie pod uwagę w badaniach systematycznych widłonogów) oraz w obecności szczątkowych odnóży tułowiowych pierwszej i drugiej pary. Odnóży te mają postać krótkich szczecinek. Tułów genitalny jest





tagmą utworzoną przez zrastające się somity tułowia (thoraxu) i kompleksu genitalnego (zaliczanego przez niektórych morfologów również do tułowia). Odwłok (abdomen) u tej grupy widłonogów ulega całkowitemu uwstecznieniu, podobnie jak furka. Bardzo często za odwłok jest uważany wyrostek płciowy z otworami kopulacyjnymi, wystający nieraz daleko poza tylną krawędź ciała.

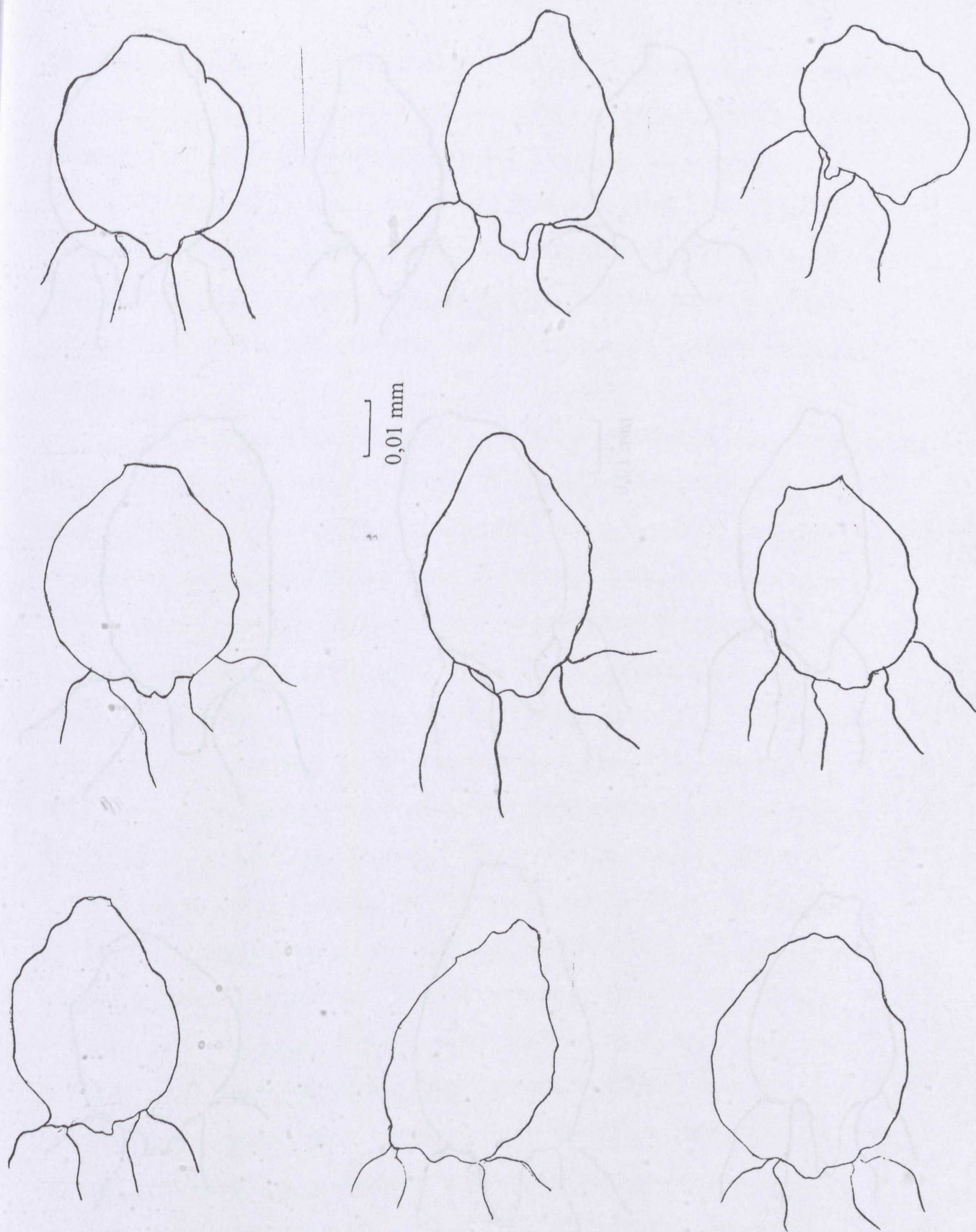
Badane formy *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” różnią się zdecydowanie dwiema cechami budowy ogólnej: kształtem tułowia genitalnego oraz względną wielkością wyrostka kopulacyjnego. Różnice kształtu tułowia są widoczne jedynie w widoku grzbietobrzusznym. Tułów genitalny u *Achtheres* „O”, mimo obłego kształtu wydaje się bardziej kwadratowy (ryc. 12), zaś ten u *Achtheres* „S” – mocno wydłużony. (ryc. 13). Najbardziej jednoznaczną cechą różniącą jest względna długość wyrostka kopulacyjnego. Wyrostek ten jest bardzo krótki u *Achtheres* „O” zaś u *Achtheres* „S” osiąga on wydatne rozmiary.

Badania nad morfologią widłonogów opierają się przede wszystkim na szczegółowej analizie narządów gębowych. Zważywszy na ten fakt przeprowadzono obserwacje kształtu i uzbrojenia wszystkich przydatków głowotułowia u *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”.

**Antena I pary** (czułek I pary) – składa się u obydwu form z trzech segmentów. Na segmencie podstawowym występuje mała szczecina („whip”)(ryc. 14, 15). Segment środkowy uzbrojony jest też w jeden wyrostek – palcowatą szczecinkę („solus”). Segment terminalny u *Achtheres* „O” uzbrojony jest w co najmniej **sześć** szczecin (ryc. 16, 17). Szczeciny zachowują ułożenie typowe dla uzbrojenia anten I pary u przedstawicieli rodziny Leraeopodidae. Głównym elementem jest bardzo długa, położona z boku szczecinka 6. Ma ona grubą, wyraźnie rozszerzoną podstawę. Pozycje centralna na wierzchołku anteny zajmuje grupa czterech szczecin (homologiczna z wyrostkiem 5). Jedna ze



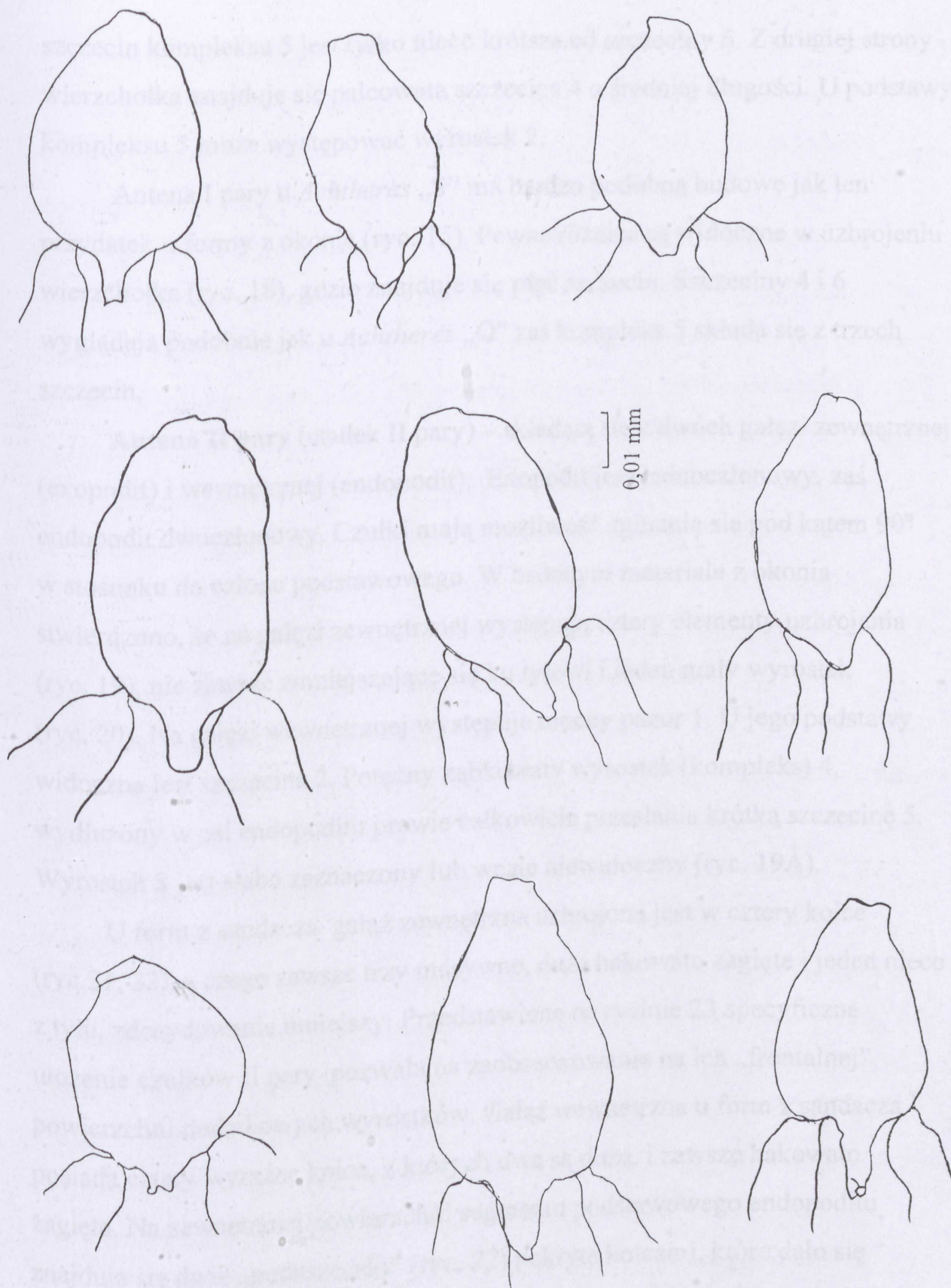




Ryc. 12. *Achtheres* „O” schemat kształtu tułowia genitalnego, dorsalnie (głowotułów i szczęki II pary zostały obcięte) (oryg.)







Ryc. 13. *Achtheres* „S” schemat kształtu tułowia genitalnego, dorsalnie (głowotułów i szczęki II pary zostały obcięte) (oryg.)





szczecin kompleksu 5 jest tylko nieco krótsza od szczeciny 6. Z drugiej strony wierzchołka znajduje się palcowata szczecina 4 o średniej długości. U podstawy kompleksu 5 może występować wyrostek 2.

Antena I pary u *Achtheres* „S” ma bardzo podobną budowę jak ten przydatek u formy z okonia (ryc. 15). Pewne różnice są widoczne w uzbrojeniu wierzchołka (ryc. 18), gdzie znajduje się **pięć** szczecin. Szczeciny 4 i 6 wyglądają podobnie jak u *Achtheres* „O” zaś kompleks 5 składa się z trzech szczecin.

**Antena II pary** (czułki II pary) – składają się z dwóch gałęzi zewnętrznej (exopodit) i wewnętrznej (endopodit). Exopodit jest jednoczłonowy, zaś endopodit dwuczłonowy. Czułki mają możliwość zginania się pod kątem 90° w stosunku do członu podstawowego. W badanym materiale z okonia stwierdzono, że na gałęzi zewnętrznej występują cztery elementy uzbrojenia (ryc. 19), nie zawsze zmniejszające się ku tyłowi i jeden mały wyrostek (ryc. 20). Na gałęzi wewnętrznej występuje mocny pazur 1. U jego podstawy widoczna jest szczecina 2. Potężny ząbkowaty wyrostek (kompleks) 4, wydłużony w osi endopoditu prawie całkowicie przesłania krótką szczecinę 5. Wyrostek 3 jest słabo zaznaczony lub wcale niewidoczny (ryc. 19A).

U form z sandacza gałąź zewnętrzna uzbrojona jest w cztery kolce (ryc. 21, 22), z czego zawsze trzy masywne, duże hakowato zagięte i jeden nieco z tyłu, zdecydowanie mniejszy. Przedstawione na rycinie 23 specyficzne ułożenie czułków II pary pozwala na zaobserwowanie na ich „frontalnej” powierzchni dodatkowych wyrostków. Gałąź wewnętrzna u form z sandacza posiada cztery wyraźne kolce, z których dwa są duże, i zawsze hakowato zagięte. Na zewnętrznej powierzchni segmentu podstawowego endopoditu znajdują się dwie „poduszcзки” (ryc. 22) pokryte kolcami, które dało się zaobserwować dopiero przy powiększeniu x 10.000, o długości około dwóch mikrometrów (ryc. 24). Spośród elementów uzbrojenia endopoditu pazur 1





i szczecina 2 wyglądają podobnie jak u formy z okonia. Wyrostek 3 u podstawy szczeciny 2 jest lepiej widoczny. Drugi podobny wyrostek jest widoczny nieco dalej w stronę kompleksu 4. Ten ostatni jest bardziej zaokrąglony i mniej wydłużony (ryc. 22).

**Maxilla I pary** (szczeka I pary) – u form z okonia zbudowana jest z trzech palczastych wyrostków stanowiących endopodit, z których każdy ma segment podstawowy i silnie zaostrowany segment końcowy. Na wyniosłości osadzony jest masywny kołek stanowiący pozostałość zredukowanego egzopoditu (ryc. 25) a brzeżna część szczęki I pary jest silnie schitynizowana. Przy dużych powiększeniach (x 1.500 i x 2000) zaobserwowano drobnutki, włosowaty wyrostek o długości około ośmiu mikrometrów (ryc. 26, 27).

U form z sandacza (ryc. 28) szczeka I pary ma budowę bardzo podobną, aczkolwiek wyrostki palczaste są zdecydowanie dłuższe i smuklejsze (ryc. 29) niż u form z okonia. W materiale tym nie udało się także zaobserwować małego włosowatego wyrostka.

**Maxilla II pary** (szczeka II pary) – nie zaobserwowano żadnych różnic w budowie i kształcie maxilli II pary u form z okonia i sandacza.

**Mandibula** (żuwaczka) - nie zaobserwowano żadnych szczegółów budowy, które różniłyby *Achtheres* „O” (ryc. 30) i *Achtheres* „S” (ryc. 31). Zawsze żuwaczka posiadała dziewięć ząbków, z których licząc od szczytu pierwszy i drugi były długie, trzeci zdecydowanie nie krótszy (tzw. wtórny ząb), czwarty i piąty o podobnej wielkości jak pierwszy i drugi, zaś ząbki od szóstego do dziewiątego były coraz krótsze.

„Uzębiona” część żuwaczki w materiale z okonia miała długość około 0.03 mm, zaś w materiale z sandacza część ta była zawsze dłuższa (około 0.05mm).

**Maxillipedia** (szczekonóża) – z analizy morfologicznej wynika, że szczekonóża są narządem gębowym, u którego znaleziono najwięcej szczegółów różniących obie formy *Achtheres*. W materiale z okonia ( ryc. 32) zaobserwowano, iż na końcowym członie – subcheli znajduje się mocny pazur,





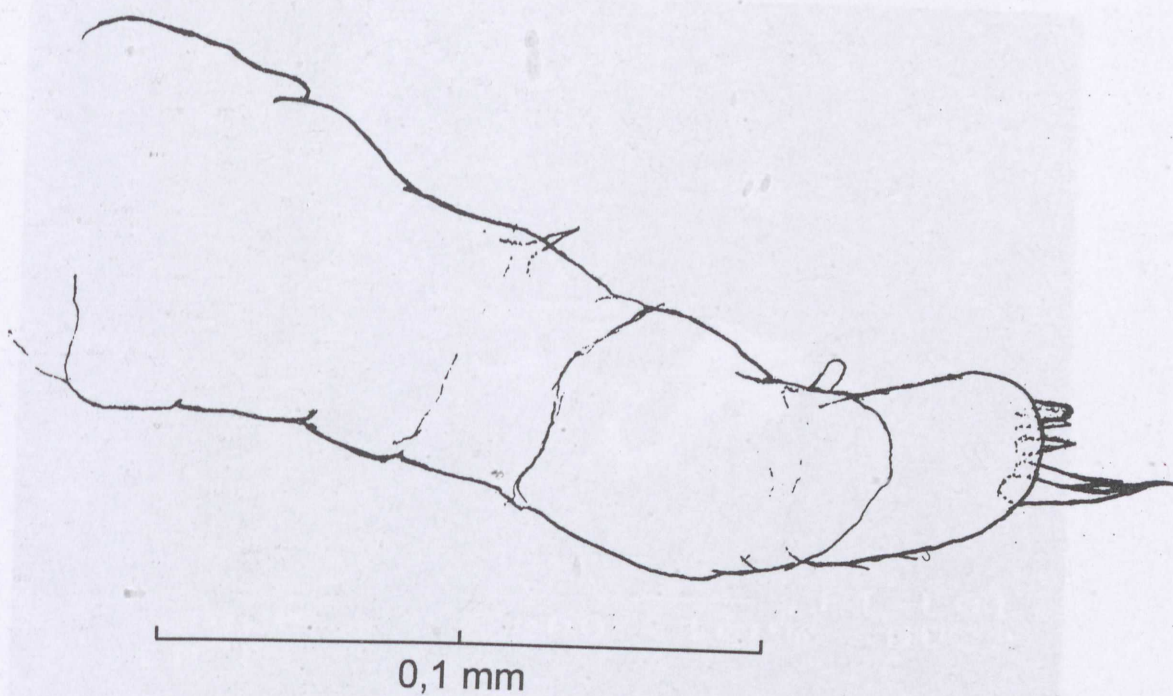
u którego podstawy wyrastają dwa pomocnicze wyrostki pokryte drobnymi zębami. Na wyrostku przylegającym do pazura zęby biegną tylko wzdłuż zewnętrznej krawędzi, zaś wyrostek najmniejszy pokryty jest zębami na całej swojej powierzchni. U podstawy subcheli znajduje się masywny kołek (ryc. 32). Myxa (ryc. 33) wśród osobników z okonia jest mało zróżnicowana. Posiada ona płaszczyznę pokrytą drobnymi kolcami, u szczytu której widoczny jest kołek.

W materiale z sandacza (ryc. 34) u podstawy pazura subcheli znajdują się trzy wyrostki pomocnicze, z których środkowy jest bardzo mały i ostro zakończony. Uzębione wyrostki ułożone są wobec siebie pod większym kątem jak te same wyrostki w formie z okonia.

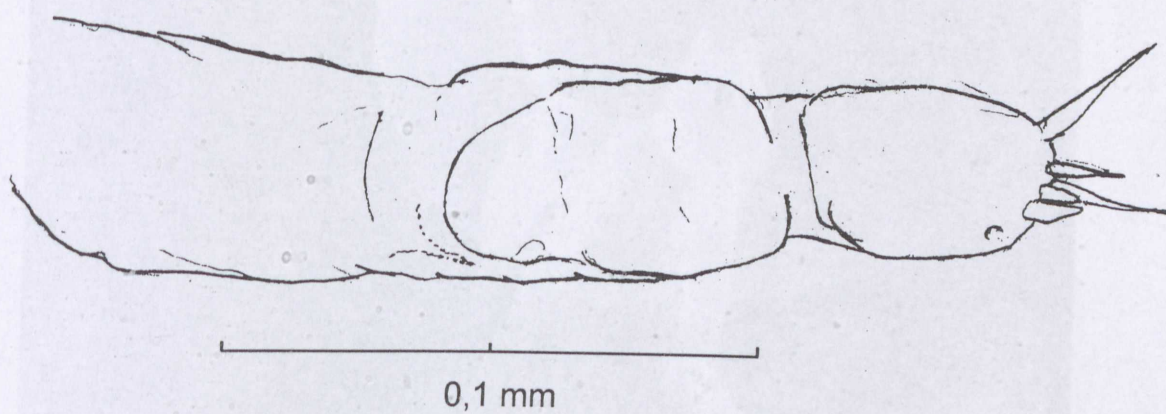
Wyrostek leżący bliżej pazura pokryty jest zębami tylko wzdłuż krawędzi zewnętrznej, zaś wyrostek najbardziej odległy pokryty jest drobnymi zębami biegnącymi wzdłuż krawędzi zewnętrznej i wewnętrznej. Myxa (ryc. 35, 36, 37) charakteryzuje się wśród osobników *Achtheres* „S” dużą zmiennością. Zaobserwowano, że na wzniesieniu znajdują się jeden–dwa kolce, pod którymi usytuowany jest płatowaty twór o krawędziach pokrytych drobnymi zębami. Liczba kolców i kształt płatowatego tworu nieco różnią się wśród poszczególnych osobników *Achtheres* „S”.







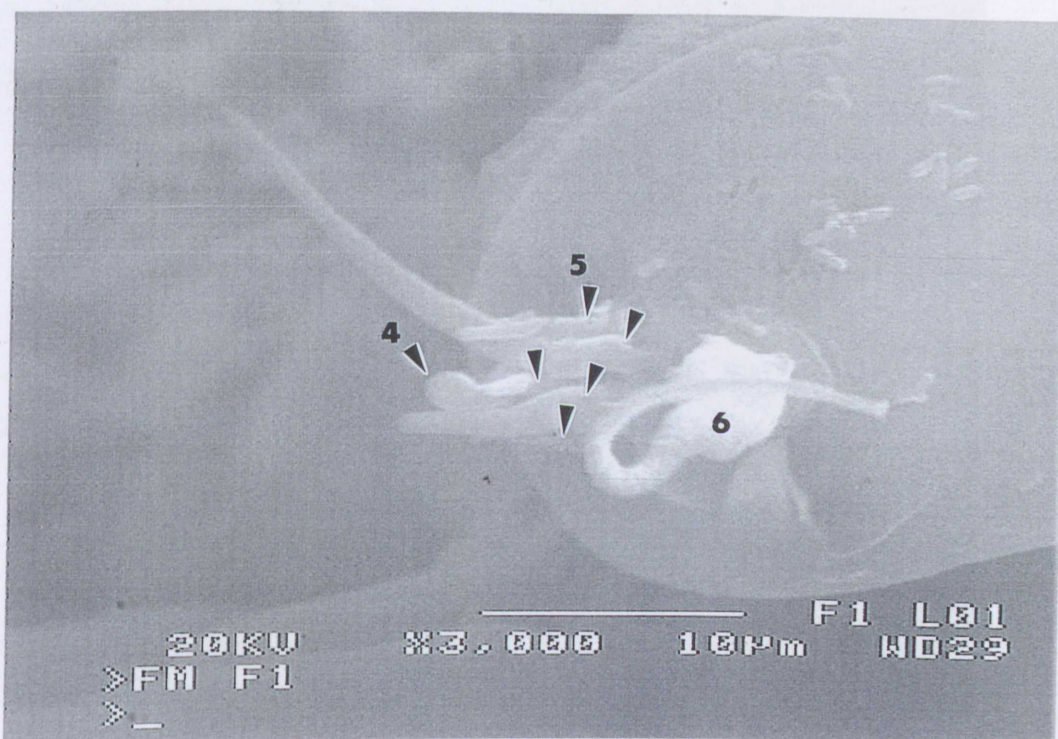
Ryc. 14. *Achtheres* „O”. Antena I pary (x 40) (oryg.)



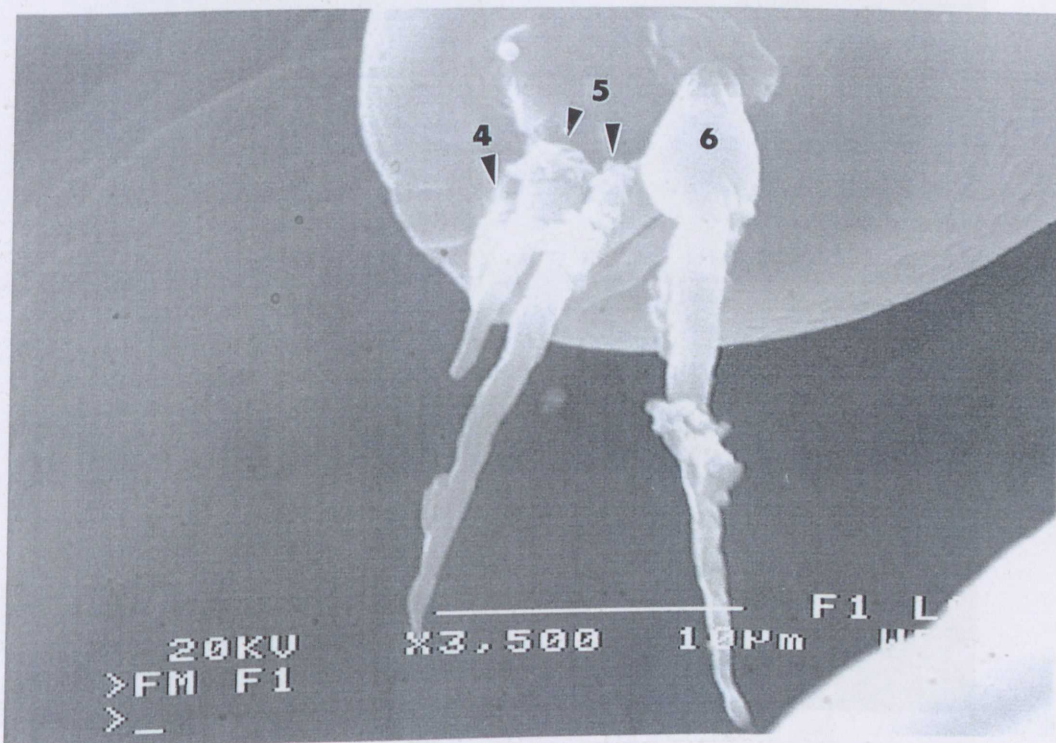
Ryc. 15. *Achtheres* „S”. Antena I pary (x 40) (oryg.)







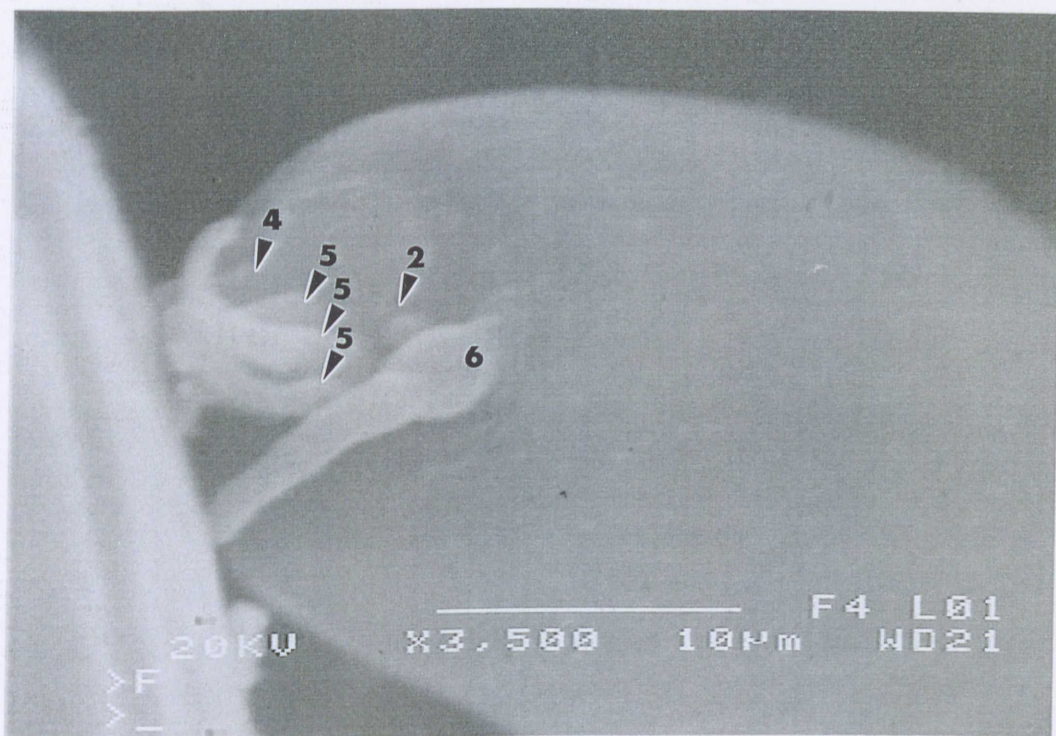
Ryc. 16. *Achtheres* „O”. Uzbrojenie segmentu terminalnego anteny I pary.  
Oznaczenia cyfrowe wg Kabaty (1979), (oryg.)



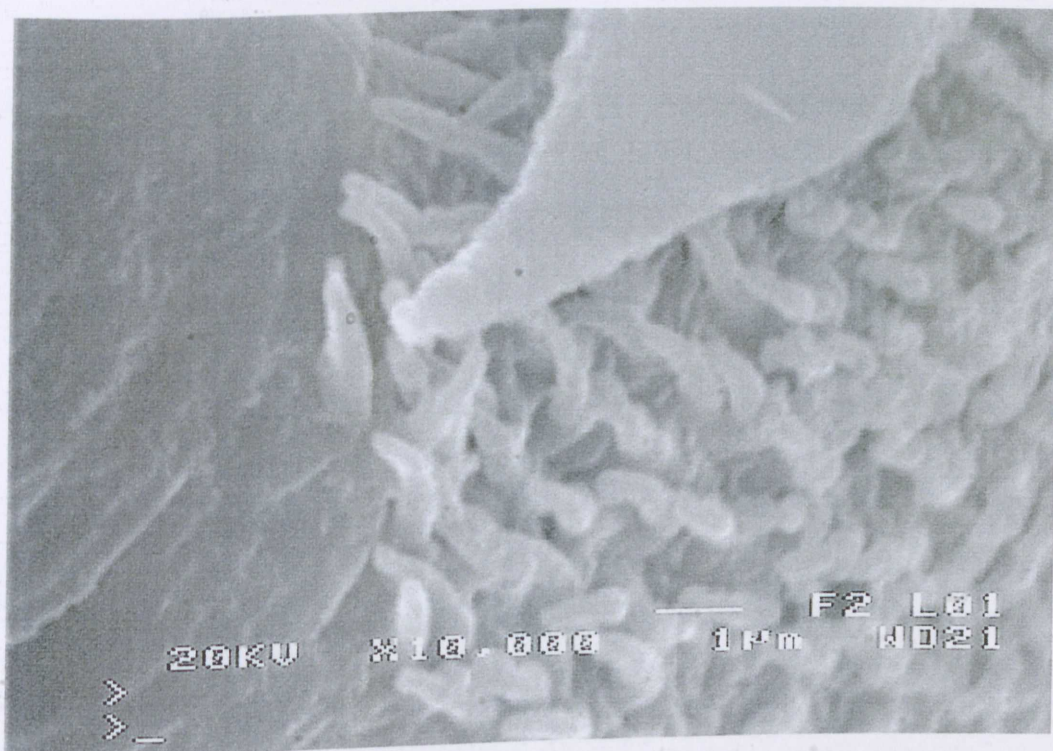
Ryc. 17. *Achtheres* „O”. Uzbrojenie segmentu terminalnego anteny I pary.  
Oznaczenia cyfrowe wg Kabaty (1979), (oryg.)







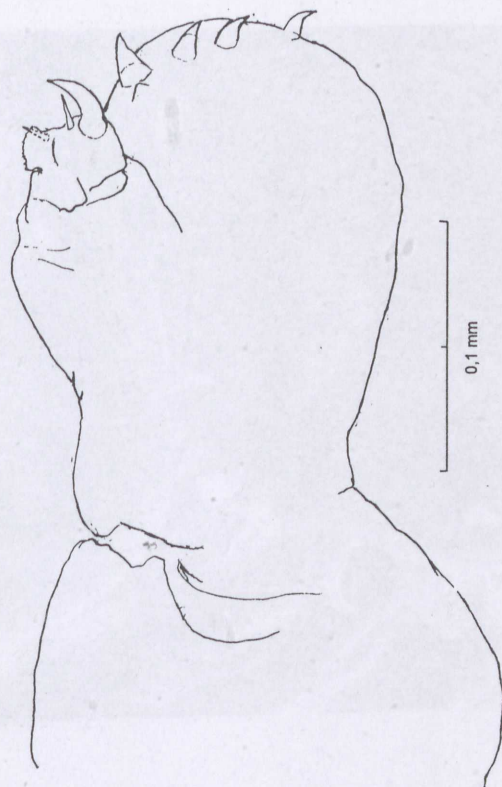
Ryc. 18. *Achtheres* „S”. Uzbrojenie segmentu terminalnego anteny I pary.



Ryc. 24. *Achtheres* „S”. Drobne kolce na “poduszczyce” zewnętrznej płaszczyny endopoditu anteny I pary







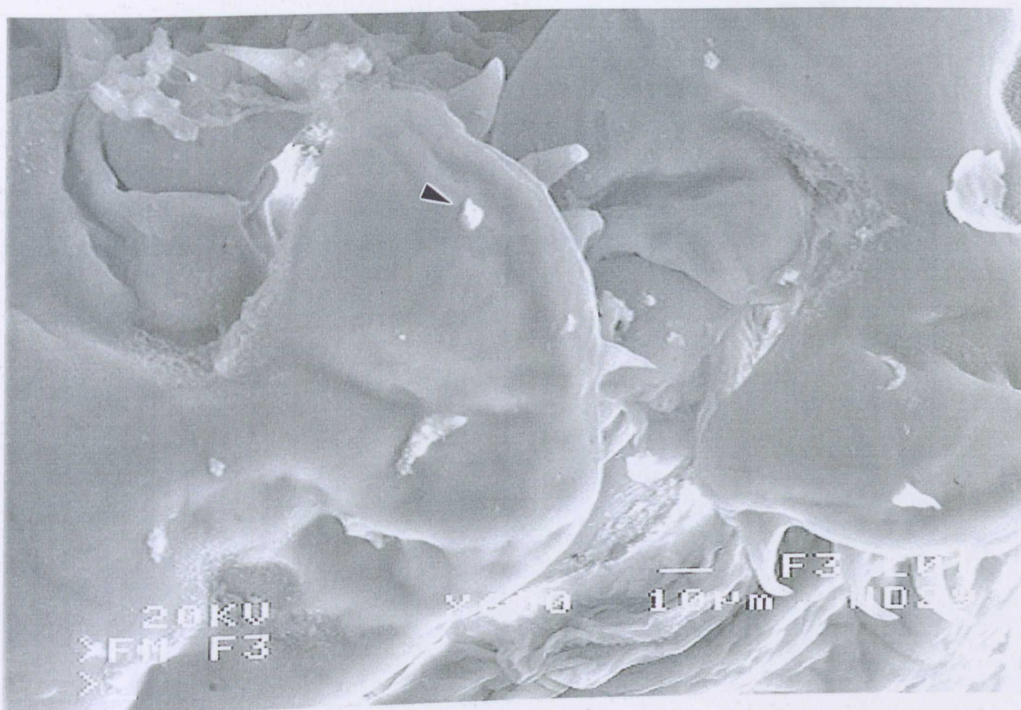
Ryc. 19. *Achtheres* „O”. Antena II pary (x 40) (oryg.)



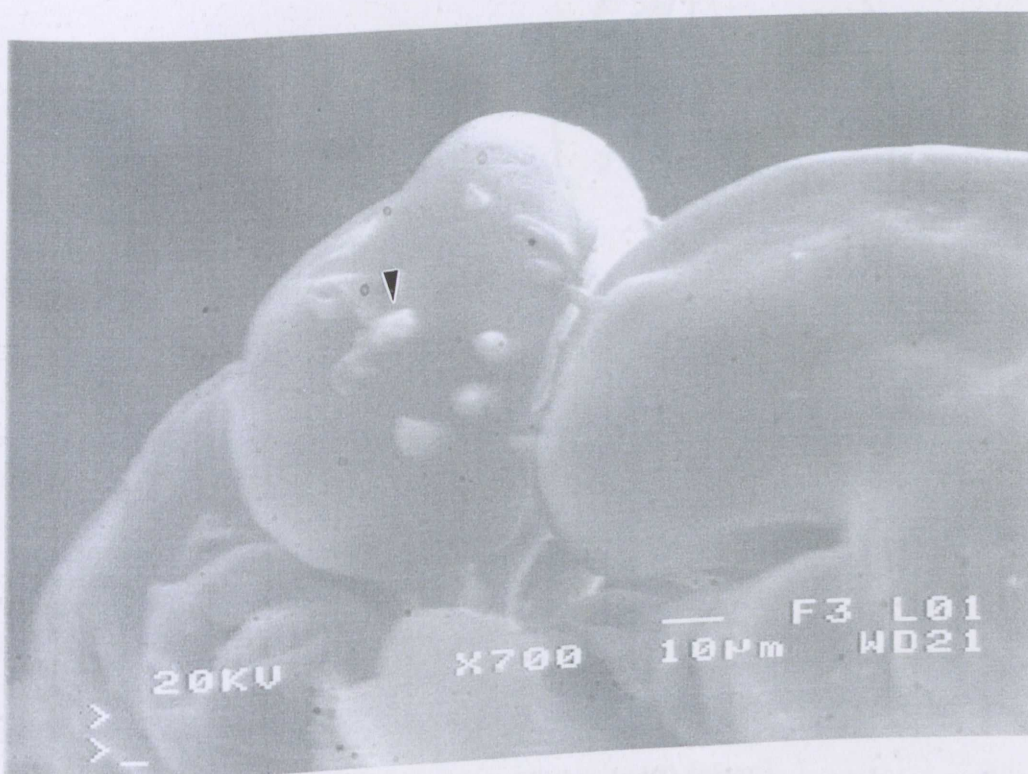
Ryc. 19A. *Achtheres* „O”. Antena II pary – endopodit (x 40) (oryg.)







Ryc. 20. *Achtheres* „O”. Antena II pary.  
Egzopodit z widocznymi kolcami i wyrostkami (oryg.)



Ryc. 23. *Achtheres* „S”. Antena II pary.  
Egzopodit–widoczne kolce i drobne wyrostki (oryg.)

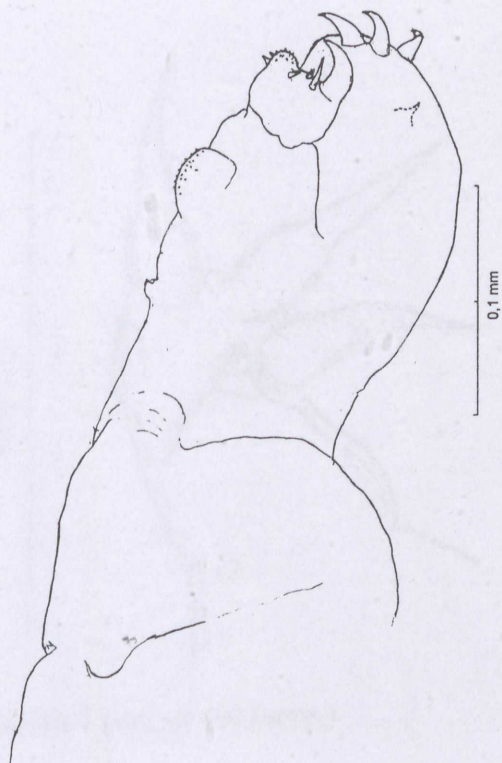


... ..  
... ..  
... ..

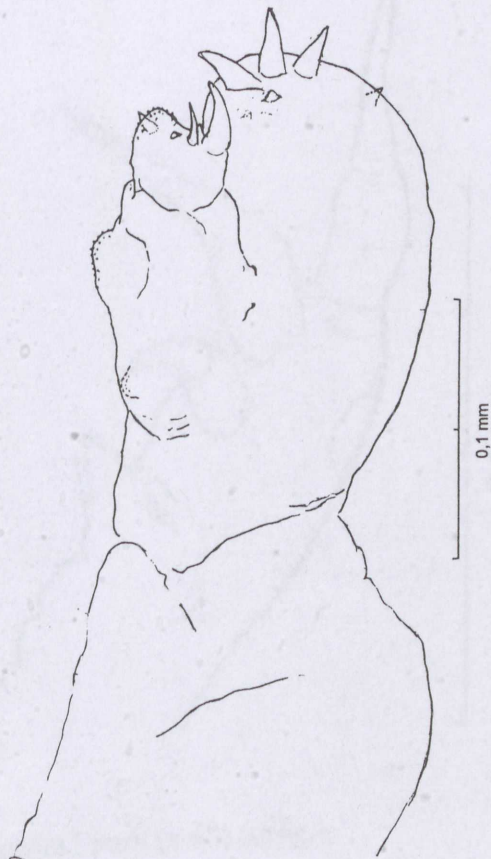


... ..  
... ..  
... ..





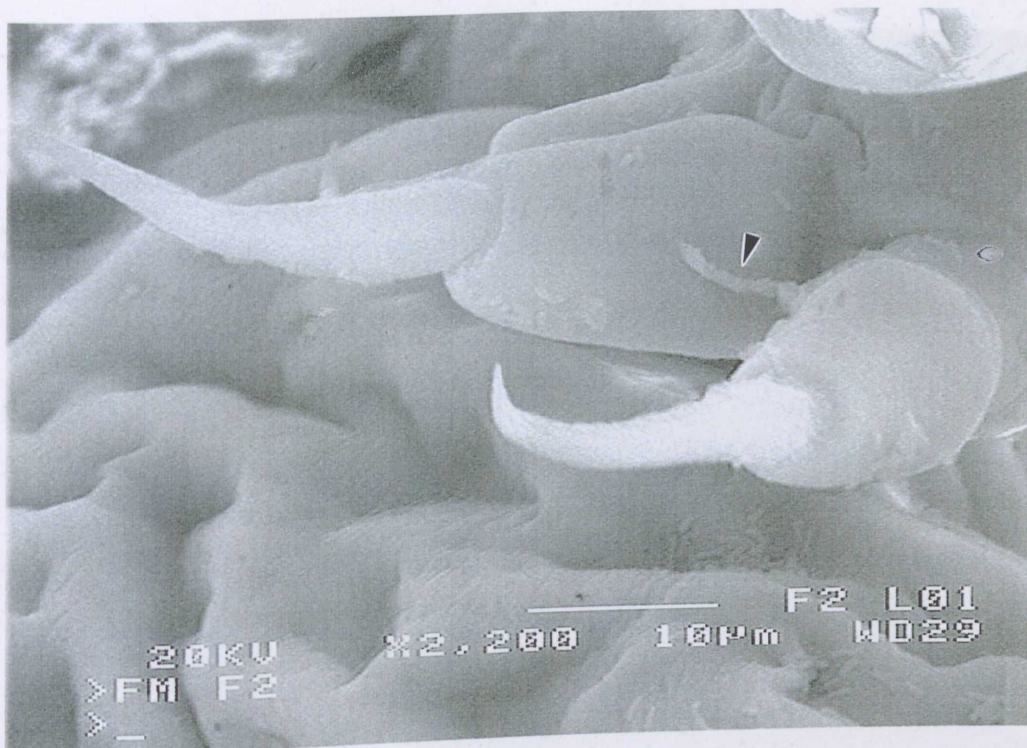
Ryc. 21. *Achtheres* „S”. Antena II pary (x40) (oryg.)



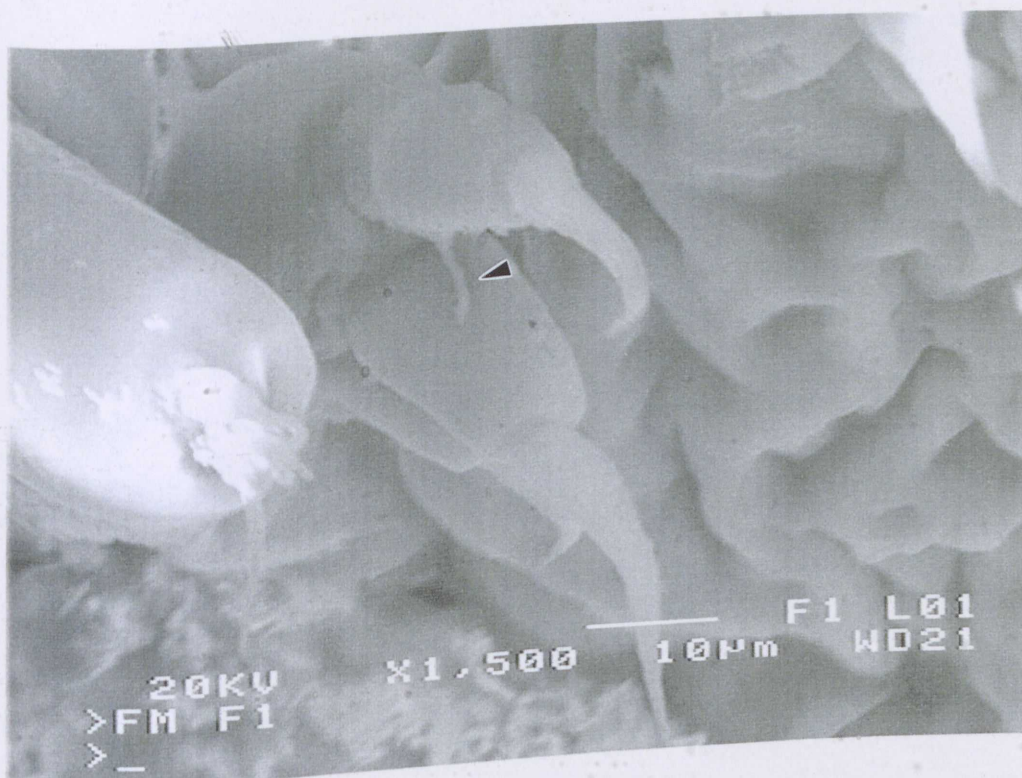
Ryc. 22 *Achtheres* „S”. Antena II pary (x40) (oryg.)







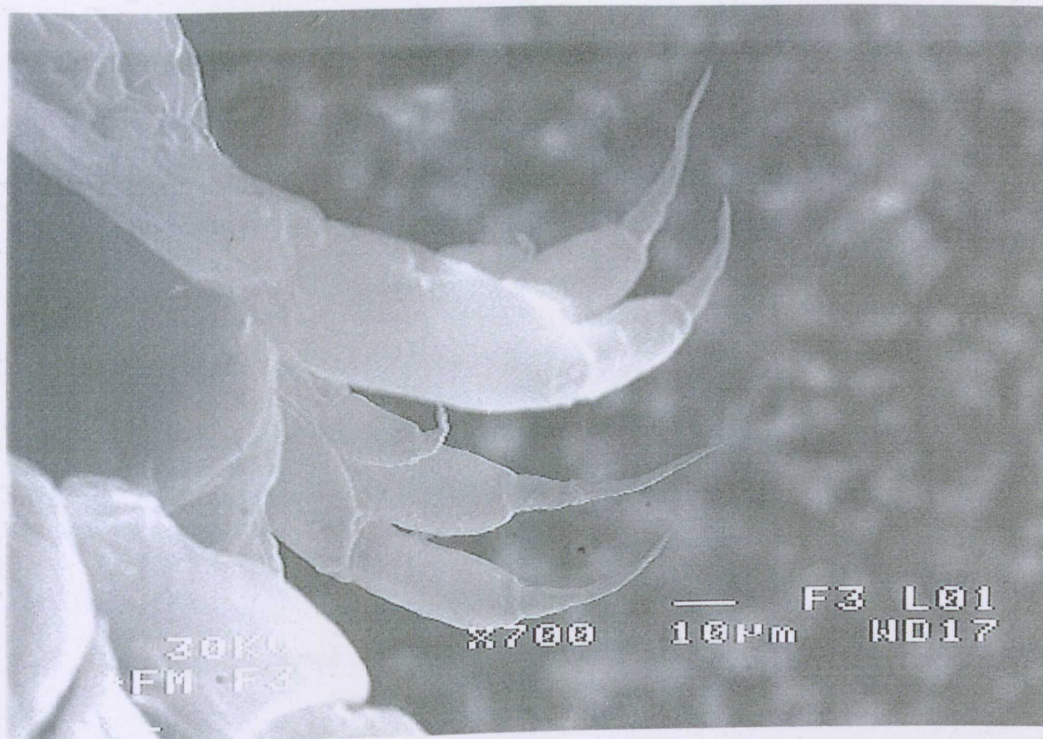
Ryc. 26. *Achtheres* „O”. Maxilla I pary z widocznym wyrastkiem (oryg.)



Ryc. 27. *Achtheres* „O”. Maxilla I pary (oryg.)





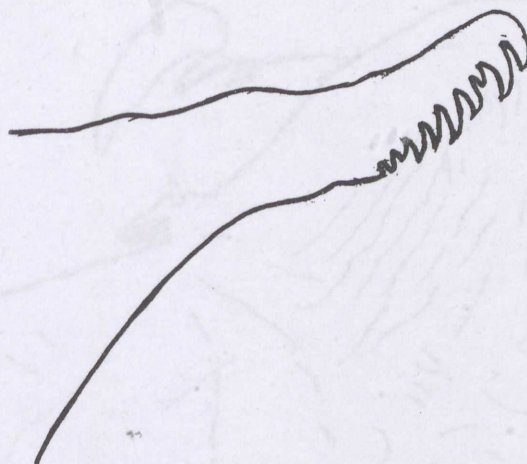


Ryc. 29. *Achtheres* „S”. Maxilla I pary (oryg.)





0,1 mm



Ryc. 30. *Achtheres* „O”. Mandibula (x 40) (oryg.)



0,1 mm

Ryc. 31. *Achtheres* „S”. Mandibula (x 40) (oryg.)







Ryc. 33. *Achtheres* „O”. Maxilipedium. Myxa (x 40) (Pozostała część przydatka ukazana tylko jako kontur) (oryg.)





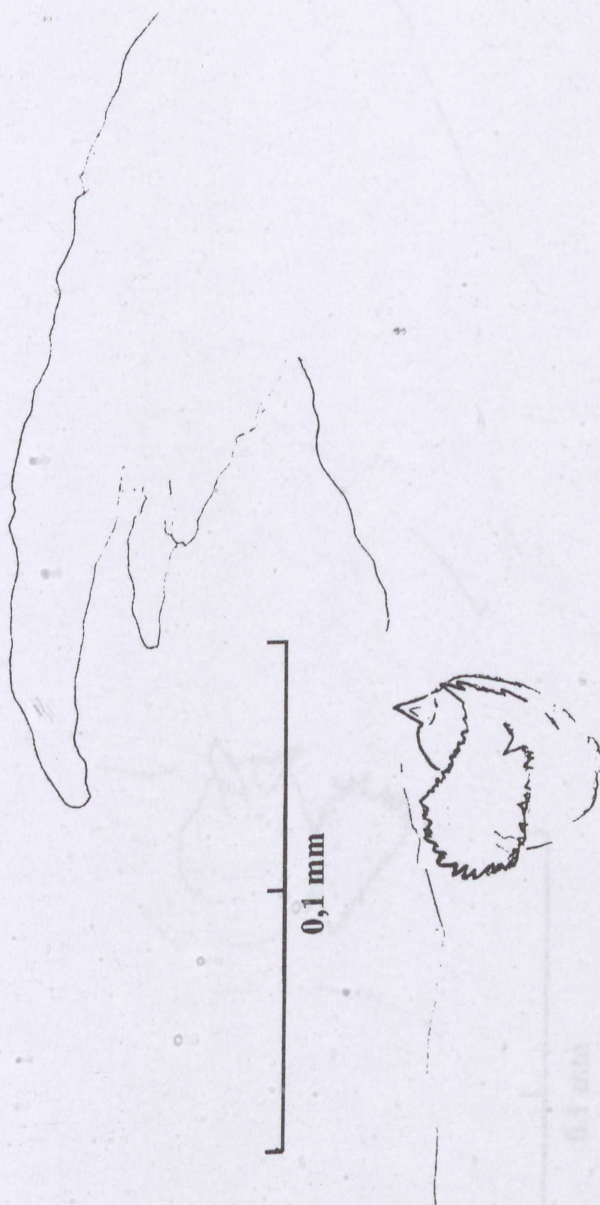


Ryc. 34. *Achtheres* „S”.. Maxilipedium (x 20) (oryg.)

Ryc. 35. *Achtheres* „S”.. Maxilipedium, detail (x 40) (Porosia, 1988, rysunek własny) (oryg.)



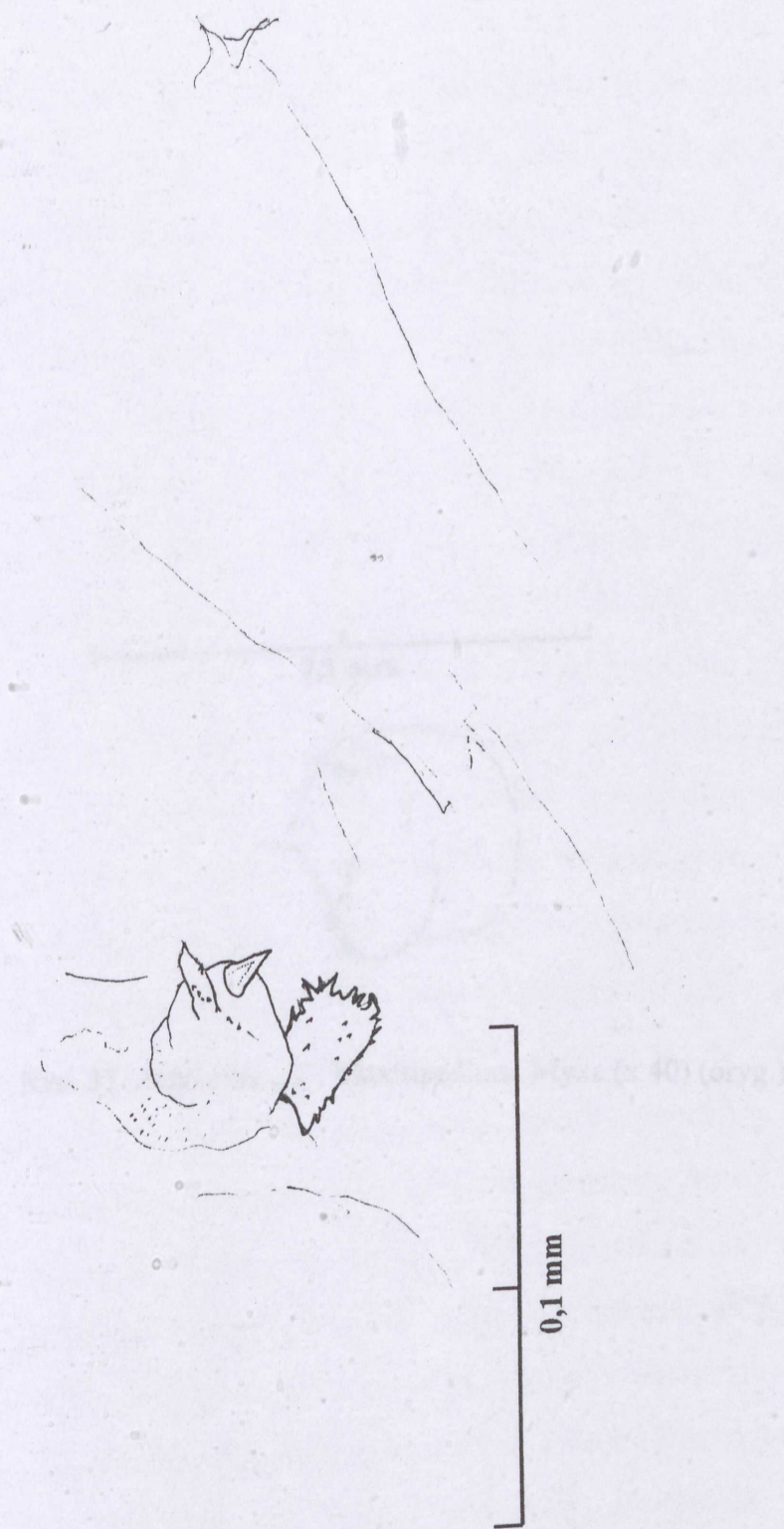




Ryc. 35. *Achtheres* „S”. Maxilipedium. Myxa (x 40) (Pozostała część przydatka ukazana tylko jako kontur) (oryg.)







Ryc. 36. *Achtheres* „S”. Maxilipedium. Myxa (x 40) (Pozostała część przydatka ukazana tylko jako kontur) (oryg.)



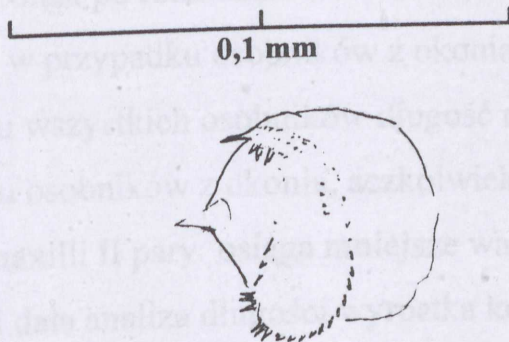


## 2.2 Blumetria

Śrośród 13 pomiarów wykonywanych na każdym osobniku, pięć okazało się istotnymi statystycznie, przy czym zmienną jaką była długość ciała bez wyrostka kopulacyjnego, przyjęto jako zmienną redundantną. Do cech istotnych statystycznie należą: długość maxilli II pary, długość wyrostka kopulacyjnego, długość płytki głowowej, długość głowotulowia, oraz całkowita długość ciała (uporządkowane wg. stopnia istotności). Analizując zmienne istotne statystycznie należy zauważyć, że w przypadku długości całkowitej ciała

(ryc. 38) zakres zmienności u *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” przedstawia się bardzo podobnie, jednak po rozkładzie wartości minimalnej i maksymalnej dla tej cechy widoczne jest, że w przypadku form z okonia były one zdecydowanie

duższe. Wierzchołki wazy (długość maxilli II pary) ma szerszy zakres zmienności u osobników z okonia niż w przypadku form z sandacza. Długość maxilli II pary u sandacza ma szerszy zakres zmienności (ryc. 39). Bardzo interesujące wyniki dała analiza długości wyrostka kopulacyjnego. Analizując rycinę 40 należy zauważyć, że zupełnie inne wartości przyjmuje ta cecha u



Ryc. 37. *Achtheres* „S”. Maxilipedium. Myxa (x 40) (oryg.)

wziętych do *Achtheres* „S”. Wartość maksymalna długości wyrostka kopulacyjnego formy z sandacza odpowiada górnej granicy tej wartości dla środkowych 50% wyników formy z okonia. Świadczy to o szczególnej przydatności tej cechy do rozróżniania obu form pasożytów na poziomie morfologicznym. W przypadku długości płytki głowowej (ryc. 41) należy zwrócić uwagę na bardzo duży zakres zmienności tej cechy w obrębie form z okonia u badanego gatunku pasożyta. Znacznie dłuższa płytka głowowa występuje jednak u *Achtheres* „S”, o czym świadczy wyższa wartość średnia. Długość głowotulowia (ryc. 42) przyjmuje bardzo podobne wartości, jeżeli weźmiemy pod uwagę środkowe 50%





### 3.2 Biometria

Spośród 13 pomiarów wykonywanych na każdym osobniku pięć okazało się istotnymi statystycznie, przy czym zmienna jaką była długość ciała bez wyrostka kopulacyjnego, przyjęto jako zmienną redundantną. Do cech istotnych statystycznie należą: długość maxilli II pary, długość wyrostka kopulacyjnego, długość płytki głowowej, długość głowotułowia, oraz całkowita długość ciała (uporządkowane wg stopnia istotności). Analizując zmienne istotnie statystycznie należy zauważyć, że w przypadku długości całkowitej ciała (ryc. 38) zakres zmienności u *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” przedstawia się bardzo podobnie, jednak po rozkładzie wartości minimalnej i maksymalnej dla tej cechy widać, że w przypadku osobników z okonia były one zdecydowanie dłuższe. Mierzona u wszystkich osobników długość maxilli II pary ma szerszy zakres zmienności u osobników z okonia, aczkolwiek w przypadku form z sandacza długość maxilli II pary osiąga mniejsze wartości (ryc. 39). Bardzo interesujące wyniki dała analiza długości wyrostka kopulacyjnego. Analizując rycinę 40 należy zauważyć, że zupełnie inne wartości przyjmuje ta cecha u wziętych do analizy osobników *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”. Wartość maksymalna długości wyrostka kopulacyjnego formy z sandacza odpowiada górnej granicy tej wartości dla środkowych 50% wyników formy z okonia. Świadczy to o szczególnej przydatności tej cechy do rozróżniania obu form pasożytów na poziomie morfologicznym. W przypadku długości płytki głowowej (ryc. 41) należy zwrócić szczególną uwagę na bardzo duży zakres zmienności tej cechy w obrębie form z okonia u badanego gatunku pasożyta. Znacznie dłuższa płytka głowowa występuje jednak u *Achtheres* „S”, o czym świadczy wyższa wartość mediany. Długość głowotułowia (ryc. 42) przyjmuje bardzo podobne wartości, jeżeli weźmiemy pod uwagę środkowe 50%





wyników, jednak u *Achtheres* „O” zakres zmienności tej cechy jest większy niż u form z sandacza.

Podsumowując analizę statystyczną badań morfometrycznych należałoby stwierdzić, że cechą najbardziej różniącą dwie badane formy jest długość maxilli II pary i długość wyrostka kopulacyjnego.

Po przeprowadzeniu regresji krokowej skonstruowano model, który wykorzystując wszystkie pięć cech istotnych statystycznie, jest w stanie określić z jakiego żywiciela pochodzi anonimowy osobnik widłonoga z rodzaju *Achtheres* („żywiciel 1” – oznacza okonia, „żywiciel 2” – oznacza sandacza). Jak widać w tabeli 4, każdy kolejny krok, to włączenie kolejnej istotnej statystycznie zmiennej. Biorąc pod uwagę tylko długość maxilli II pary już w 54% możemy określić przynależność widłonoga z rodzaju *Achtheres* do okonia lub sandacza. Obliczono, że dopasowanie modelu, (po włączeniu kolejnych czterech zmiennych), wyrażone jako współczynnik  $R^2$  wynosi 75%.

Model regresji wielokrotnej:

$$\text{ŻYWICIEL} = -0,4734 W - 0,4583 M - 0,2233 G + 0,2107 P + 0,1573 D$$

gdzie:

W – długość wyrostka kopulacyjnego ( wielkość 5 na schemacie pom. – ryc.1)

M - długość szczęk II pary (wielkość 9 na schemacie pom. – ryc.1)

G – długość głowotułowia (wielkość 3 na schemacie pom. – ryc.1)

P – długość płytki ciemieniowej (wielkość 1 na schemacie pom. – ryc.1)

D – długość całkowita (będąca sumą wielkości 2, 3 i 5 na schemacie pom. – ryc. 1)

Jeżeli po podstawieniu zmiennych otrzymamy wynik zbliżony do 1 będzie to oznaczało, że badany osobnik pochodził z okonia (z prawdopodobieństwem

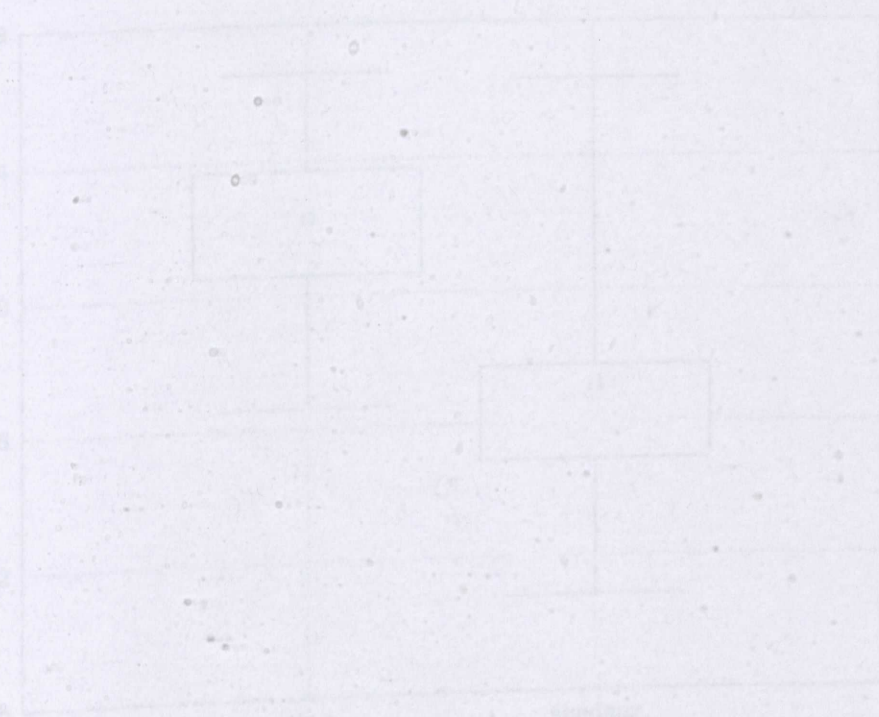




75%). Jeżeli zaś wynik będzie zbliżony do 2, to badany osobnik z takim samym prawdopodobieństwem, pasożytował u sandacza.

W celu ustalenia stopnia podobieństwa obu form *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” zastosowano hierarchiczną metodę aglomeracyjną opartą o zasadę najbliższego sąsiedztwa. Do analizy wybrano losowo 40 samic widłonogów (po 20 z każdego żywiciela). Otrzymany wynik w formie dendrogramu przedstawiono na rycinie 43. Analizowane morfometrycznie osobniki zostały uszeregowane w dwa wyraźne skupienia, przy czym w obrębie pierwszego skupienia zgrupowały się wyłącznie osobniki *Achtheres* „S”, zaś drugie skupienie utworzyli tylko przedstawiciele *Achtheres* „O”. Na dendrogramie brak jest osobników o cechach pośrednich, co pozwala stwierdzić, że pod względem morfometrycznym *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” różnią się jednoznacznie.

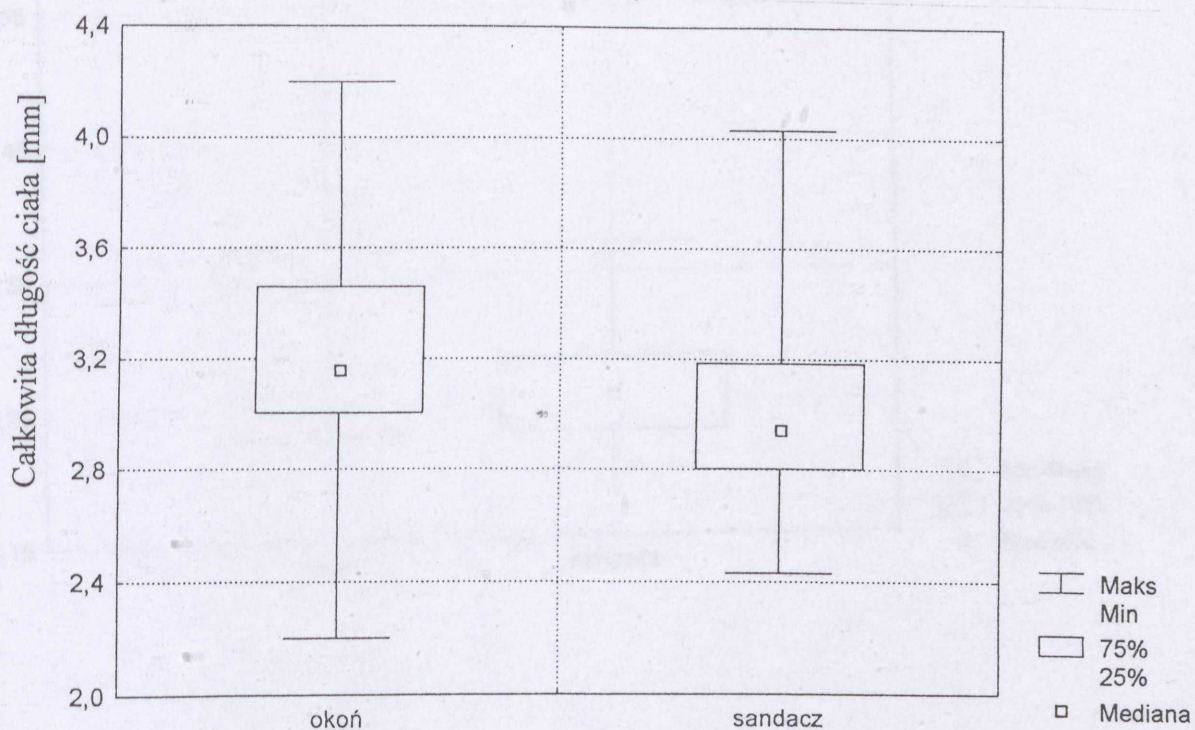
Ryc. 43. Dendrogram przedstawiający podobieństwo morfometryczne samic *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”.



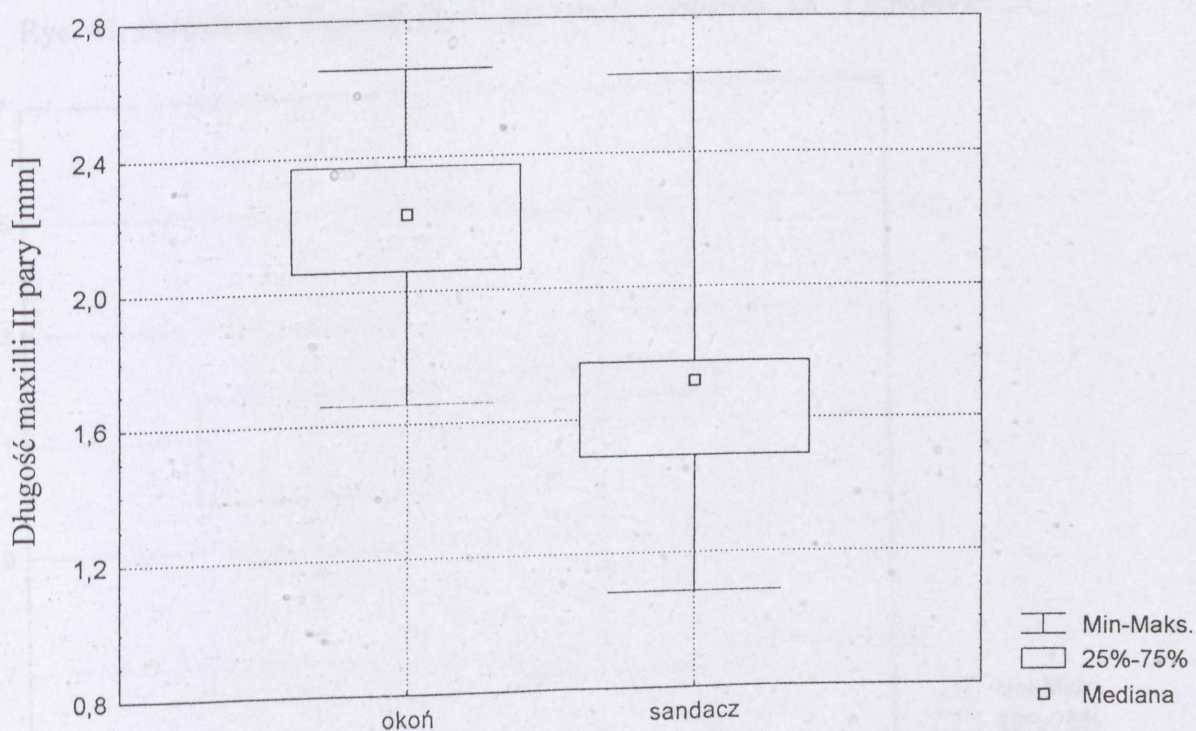




Ryc. 38. Porównanie całkowitej długości ciała *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”



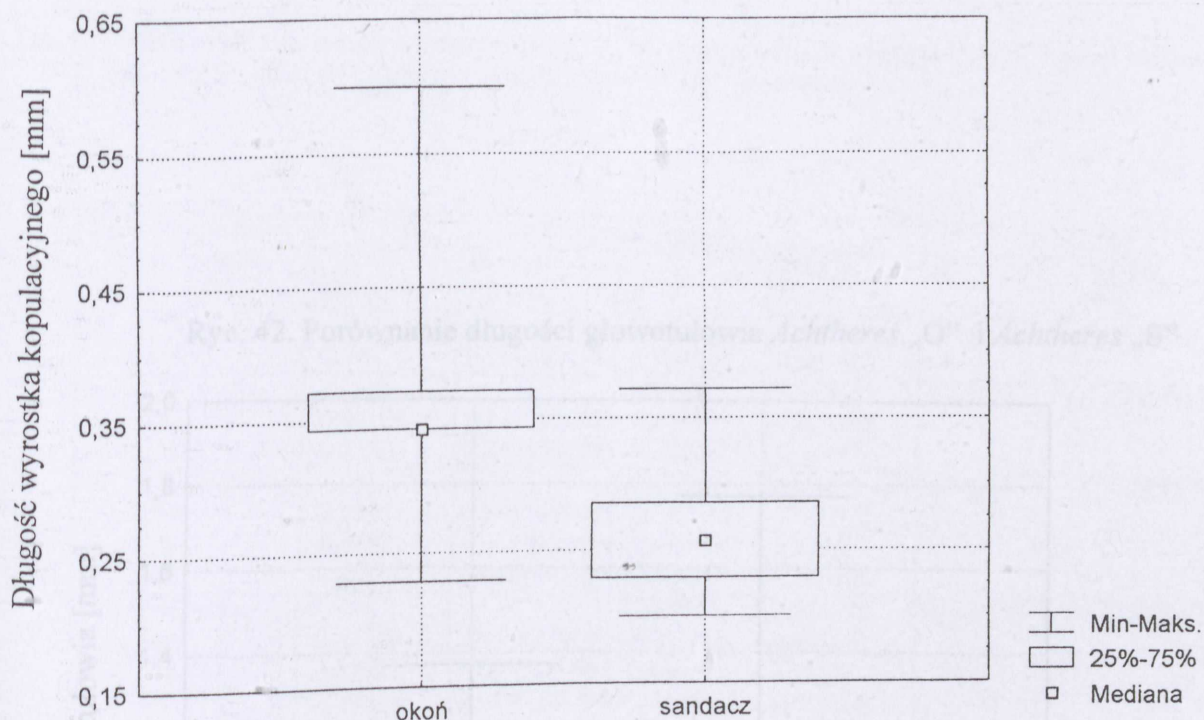
Ryc. 39. Porównanie długości maxilli II pary *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”







Ryc. 40. Porównanie długości wyrostka kopulacyjnego *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”



Ryc. 41. Porównanie długości płytki głowowej *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”

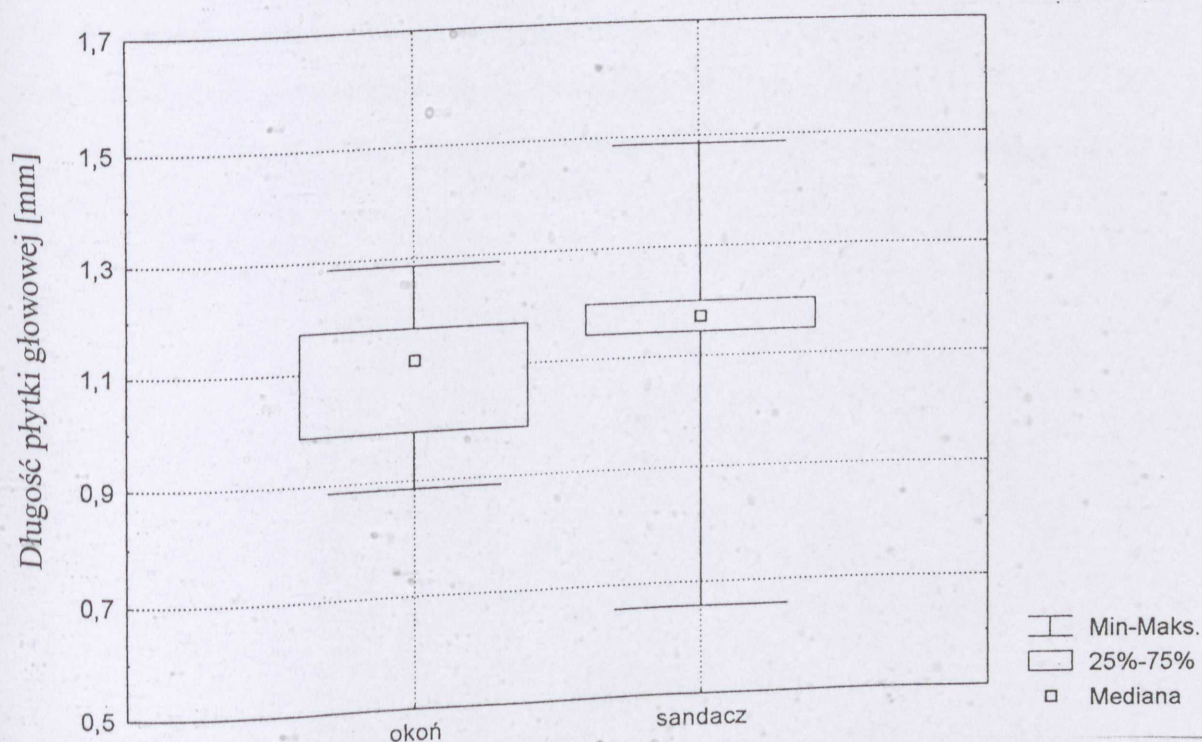
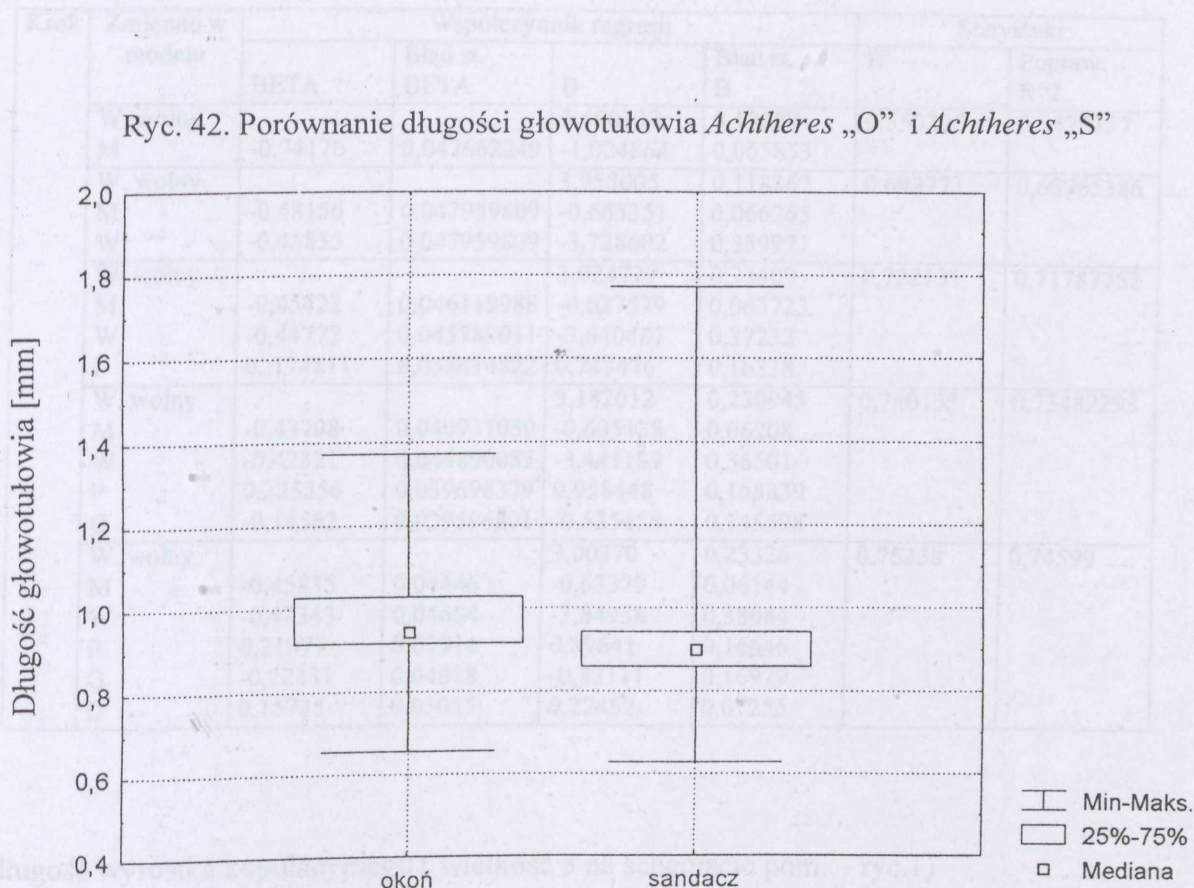






Tabela 4. Wartości współczynnika determinacji ( $R^2$ ) i współczynników ( $B$ ) w polaryzacji regresji krzywej (zmienna D - długość całkowita - została pominięta jako redundantna).







Tab. 4. Wartości istotnych, standaryzowanych (BETA) i bezwzględnych (B) współczynników regresji krokowej. (zmienna D – długość całkowita – została pominięta jako redundantna).

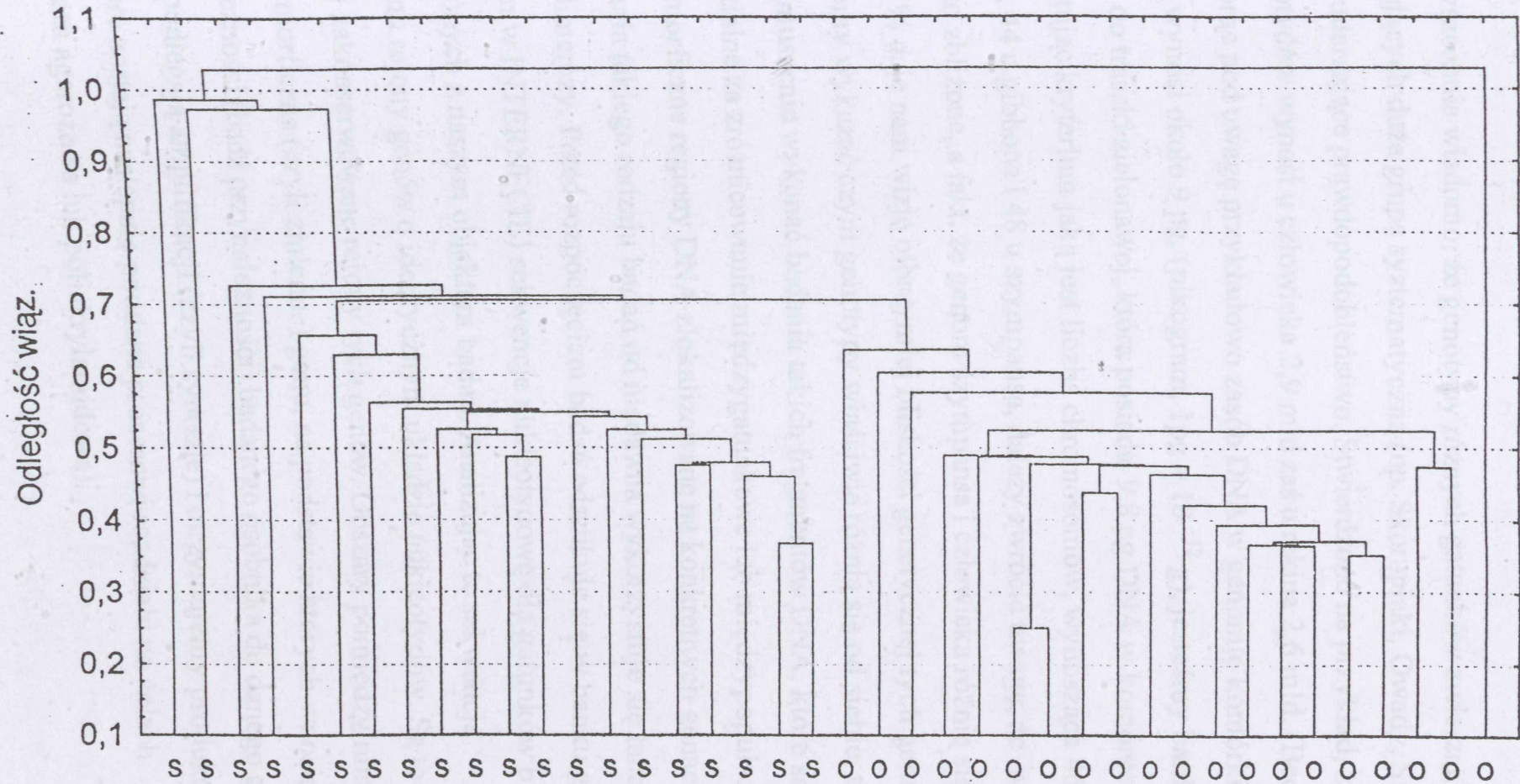
| Krok | Zmienne w modelu | Współczynnik regresji |               |           |            | Statystyki     |                        |
|------|------------------|-----------------------|---------------|-----------|------------|----------------|------------------------|
|      |                  | BETA                  | Błąd st. BETA | B         | Błąd st. B | R <sup>2</sup> | Popraw. R <sup>2</sup> |
|      | W. wolny         |                       |               | 3,490139  | 0,13008    | 0,550205       | 0,5479337              |
|      | M                | -0,74176              | 0,047662249   | -1,024864 | 0,065853   |                |                        |
|      | W. wolny         |                       |               | 3,958005  | 0,118367   | 0,692773       | 0,68965386             |
|      | M                | -0,48156              | 0,047959809   | -0,665351 | 0,066265   |                |                        |
|      | W                | -0,45855              | 0,047959809   | -3,728602 | 0,389971   |                |                        |
|      | W. wolny         |                       |               | 3,024727  | 0,23409    | 0,722131       | 0,71787752             |
|      | M                | -0,45422              | 0,046119988   | -0,627579 | 0,063723   |                |                        |
|      | W                | -0,44772              | 0,045789011   | -3,640487 | 0,37232    |                |                        |
|      | P                | 0,174811              | 0,038414822   | 0,743476  | 0,16338    |                |                        |
|      | W. wolny         |                       |               | 3,182012  | 0,230945   | 0,740153       | 0,73482293             |
|      | M                | -0,43798              | 0,044931059   | -0,605138 | 0,06208    |                |                        |
|      | W                | -0,42321              | 0,044890083   | -3,441189 | 0,36501    |                |                        |
|      | P                | 0,225356              | 0,039698379   | 0,958448  | 0,168839   |                |                        |
|      | G                | -0,14562              | 0,039596801   | -0,535455 | 0,145598   |                |                        |
|      | W. wolny         |                       |               | 3,00370   | 0,23326    | <b>0,75238</b> | 0,74599                |
|      | M                | -0,45835              | 0,04446       | -0,63329  | 0,06144    |                |                        |
|      | W                | -0,47343              | 0,04684       | -3,84958  | 0,38084    |                |                        |
|      | P                | 0,21077               | 0,03914       | 0,89641   | 0,16646    |                |                        |
|      | G                | -0,22331              | 0,04618       | -0,82111  | 0,16979    |                |                        |
|      | D                | 0,15735               | 0,05085       | 0,22452   | 0,07255    |                |                        |

- W – długość wyrostka kopulacyjnego ( wielkość 5 na schemacie pom. – ryc.1)
- M - długość szczęk II pary (wielkość 9 na schemacie pom. – ryc.1)
- G – długość głowotułowia (wielkość 3 na schemacie pom. – ryc.1)
- P – długość płytki głowowej (wielkość 1 na schemacie pom. – ryc.1)
- D – całkowita długość ciała (będąca sumą wielkości 2, 3 i 5 na schemacie pom. – ryc. 1)





Diagram dla 40 przyp.  
 Pojedyncze wiązanie  
 Odległości euklidesowe



Ryc. 43. Dendrogram skonstruowany dla form *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”.  
 (Statistica PL.)





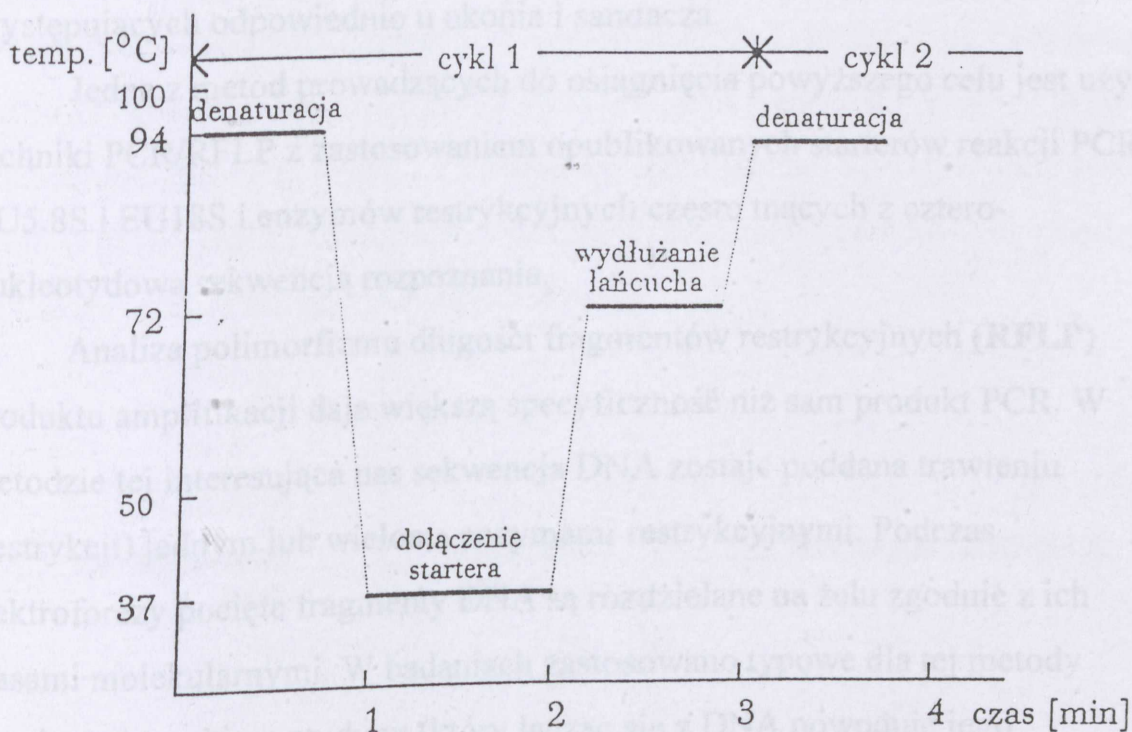
### 3.3 Badania Genetyczne

Powszechnie wiadomo, że genotypy różnych gatunków zwierząt, reprezentujących dużą grupę systematyczną (np. Skorupiaki, Owady, Ssaki), wykazują uderzające prawdopodobieństwo. Stwierdzono na przykład, że liczba par nukleotydów wynosi u człowieka 2,9 mld zaś u rekina 2,6 mld. (Bednarczuk 1984). Biorąc pod uwagę przykładowo zasób DNA w genomie komórki, który u człowieka wynosi około 9 pg, (pikogram,  $1\text{ pg} = 10^{-12}\text{ g}$ ), jesteśmy bardzo „zbliżeni” do traszki zielonawej, która posiada 9,8 pg DNA w komórce. Wykorzystując kryterium jaką jest liczba chromosomów, wynosząca 46 u człowieka, 44 u gibbona i 48 u szympansa, należy zwrócić uwagę, że wielkości te są bardzo zbliżone, a fakt, że genom szympansa i człowieka różnią się między sobą o 1,3 % daje nam wizję olbrzymiej bliskości genetycznej tych gatunków. Jeżeli chcemy wykazać czym genotypy właściwie różnią się od siebie, to jesteśmy zmuszeni wykonać badania takich fragmentów DNA, które są odpowiedzialne za zróżnicowanie międzygatunkowe lub międzypopulacyjne (czyli polimorficzne regiony DNA zlokalizowane na konkretnych genach). Do wykonywania takiego rodzaju badań od niedawna wykorzystuje się łańcuchową reakcję polimerazy. Przed rozpoczęciem badań odszukuje się w banku genów (dostępnym w INTERNECIE) sekwencje nukleotydowe dla gatunków blisko spokrewnionych z naszym obiektem badań. Analizując te sekwencje odnajdujemy rejony genów o identycznym układzie nukleotydów. Są to najbardziej zakonserwowane rejony tych genów. Obszary pomiędzy nimi to rejony polimorficzne (czyli zmienne) genu, na podstawie których wnosimy o nieprzynależności (bądź przynależności) badanego osobnika do danego gatunku. Rejony te podlegają amplifikacji (czyli syntezie) i otrzymujemy produkty reakcji, które zostają następnie poddane procesowi rozdziału na żelach (elektroforeza agarozowa lub poliakrylamidowa).





1994). Polimeraza jest odporna na działanie tak wysokiej temperatury w jakiej zachodzi reakcja, ponieważ pochodzi ona z bakterii *Thermus aquaticus* (stąd nazwa Taq-polimeraza) żyjącej w gorących źródłach i wobec tego nie traci aktywności nawet przy 92°C (Kofta 1997). Te trzy etapy reakcji PCR (ryc.44) trwające przez określony czas nazywa się cyklem. Powtórzenia takich cykli prowadzi w efekcie do amplifikacji DNA (czyli do syntezy DNA) (Kur 1994a).



Ryc. 44. Przykład profilu termicznego cyklu w reakcji PCR (Kur 1994a)

Nie ma więc przesady w stwierdzeniu, iż ta bardzo czuła (wystarczy tylko jedna cząsteczka DNA) a zarazem bardzo specyficzna (daje genetyczny „odcisk palca” każdego organizmu) i szybka reakcja zrewolucjonizowała biologię – dając nowoczesne narzędzie do wszechstronnych badań.





# 1. Badanie zastosowania uniwersalnych starterów eukariotycznych EU5.8S i EU18S do genotypowania widłonogów *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” techniką PCR/RFLP (Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych)

Podstawowym celem niniejszej części pracy było skonstruowanie prostego narzędzia diagnostycznego, wykorzystującego techniki genetyki molekularnej, do różnicowania osobników *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” występujących odpowiednio u okonia i sandacza.

Jedną z metod prowadzących do osiągnięcia powyższego celu jest użycie techniki PCR/RFLP z zastosowaniem opublikowanych starterów reakcji PCR EU5.8S i EU18S i enzymów restrykcyjnych często tnących z czternukleotydową sekwencją rozpoznania.

Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) produktu amplifikacji daje większą specyficzność niż sam produkt PCR. W metodzie tej interesująca nas sekwencja DNA zostaje poddana trawieniu (restrykcji) jednym lub wieloma enzymami restrykcyjnymi. Podczas elektroforezy pocięte fragmenty DNA są rozdzielane na żelu zgodnie z ich masami molekularnymi. W badaniach zastosowano typowe dla tej metody barwienie bromkiem etydy (który łącząc się z DNA powoduje jego fluorescencję w świetle ultrafioletowym) i rozdział na żelu agarozowym. Obserwowane na żelach charakterystyczne układy prążków, odpowiadające pozycjom zajmowanym przez poszczególne klasy fragmentów DNA, nazywa się profilem trawienia lub restryktogramem (Brylińska 2000).

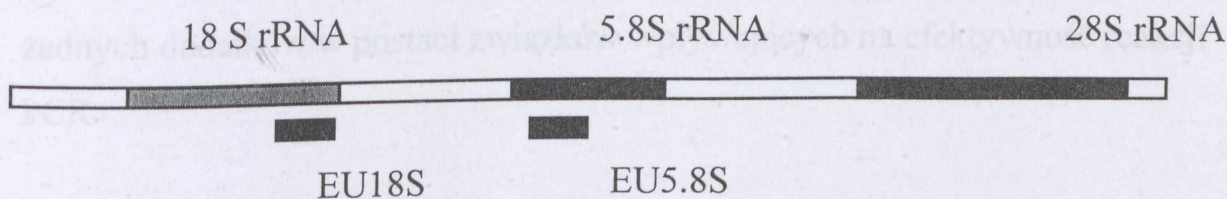
Połączenie dwóch metod PCR i RFLP wykorzystuje się między innymi do różnicowania między blisko spokrewnionymi organizmami lub allelami (polimorfizm sekwencji, który daje różną lokalizację miejsc restrykcyjnych w produkcie amplifikacji każdego z organizmów lub allelu). Dobór enzymu restrykcyjnego do cięcia produktu PCR dyktuje nam sam produkt. Z praktycznego punktu widzenia należy wybrać taki enzym restrykcyjny, który





tworzy fragmenty restrykcyjne o różnej długości tak, aby wszystkie mogły zostać rozdzielone na tym samym żelu agarozowym lub poliakrylamidowym (Kur 1994a)

Wybrane startery EU5.8S i EU18S są uniwersalnymi starterami eukariotycznymi, dającymi dodatni wynik amplifikacji PCR z każdym DNA organizmów eukariotycznych, zarówno roślin jak i zwierząt. Startery te są komplementarne do najbardziej zakonserwowanych ewolucyjnie genów w przyrodzie. Starter EU5.8S jest komplementarny do 5' końca genu kodującego 5.8S rRNA, natomiast starter EU18S jest komplementarny do 3' końca genu kodującego 18S rRNA (rys. 45). Pomiędzy tymi genami zlokalizowany jest polimorficzny region DNA, dający szansę na uzyskanie różnicowania międzygatunkowego lub też między-populacyjnego.



#### Sekwencje starterów:

**EU 5.8S :** 5' - TGA TCA ATG TGT CCT GCA ATT CAC - 3'

**EU 18S :** 5' - GAG GAA GTA AAA GTC GTA ACA AGG - 3'

Ryc. 45. Schemat eukariotycznego regionu DNA kodującego rybosomalne RNA wraz z lokalizacją genów i starterów użytych do reakcji PCR.

Podstawowym wymogiem przy zastosowaniu reakcji PCR w diagnostyce jest jej specyficzność, czyli powstawanie wyłącznie zamierzonych produktów bez powielania niespecyficznych artefaktów. Otrzymywanie niespecyficznych





produktów, będących wynikiem dołączania starterów do niezamierzonych miejsc na matrycy, całkowicie eliminuje układ PCR z zastosowania w diagnostyce. Wraz ze wzrastającą długością startera maleje prawdopodobieństwo przyłączenia go do matrycowego DNA w miejscu innym niż zaplanowane, dlatego też długość starterów stosowanych w diagnostycznym PCR powinna być nie mniejsza niż 18 nukleotydów (nt). Przyjmuje się, że w dużych genomach, np. ludzkim, czy też widłonogów, prawdopodobieństwo przypadkowego powtórzenia się sekwencji 18 nukleotydowej jest praktycznie niemożliwe. Długość wybranych starterów EU5.8S i EU18S (21/24 nt) dobrze odpowiada wymogom specyficzności reakcji PCR.

Z powodu braku przesłanek o specjalnych zapotrzebowaniach reakcji, na którykolwiek z substratów, ustalono skład mieszaniny reakcyjnej o standardowych stężeniach jonów magnezowych (2 mM), dNTP (200  $\mu$ M) i starterów (0,5  $\mu$ M). Planowany skład mieszaniny reakcyjnej nie zawierał żadnych dodatków w postaci związków wpływających na efektywność reakcji PCR.

### 1.1. Amplifikacja DNA

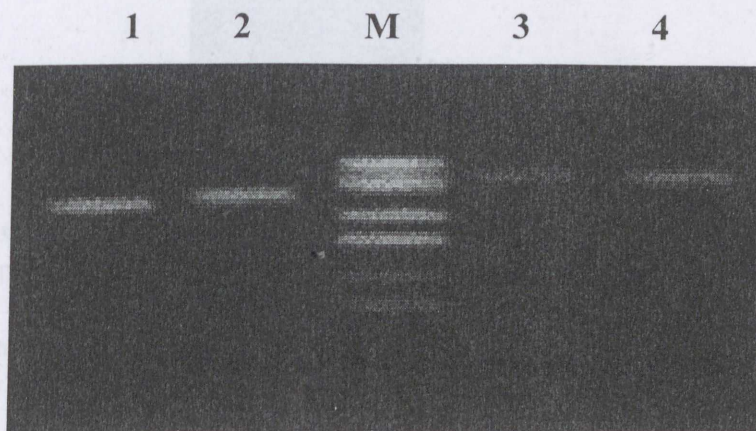
Przy użyciu starterów EU5.8S i EU18S i zastosowanego profilu termiczno - czasowego reakcji PCR uzyskano wydajną amplifikację dla badanych widłonogów. Mieszaninę 5  $\mu$ l produktów PCR z buforem do nanoszenia rozdzielano elektroforetycznie przez 1 h na 1,5% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny. Jako wzorca wielkości DNA w rozdziale elektroforetycznym użyto DNA plazmidu pKO3 ciętego enzymem *HinfI* uzyskując długości fragmentów restrykcyjnych tak jak pokazano na ryc. 49.

Produkt reakcji PCR był wielkości około 800 par zasad (pz). dla *Achtheres* „O” (ryc. 46, ścieżka 1) i około 850 pz dla *Achtheres* „S” (ryc. 46, ścieżka 2). Wielkość produktów PCR uzyskanych na matrycach DNA okonia i sandacza była taka sama i wynosiła około 900 pz (ryc. 46, ścieżki 3–4).





Wielkość produktu reakcji PCR uzyskanego na matrycy DNA z *Tracheliastes maculatus* – blisko spokrewnionego widłonoga reprezentującego inny rodzaj – oszacowano na około **600** pz (ryc. 47).



Ryc. 46. *Achtheres* „O”, *Achtheres* „S”, – okoń i sandacz – rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji uzyskanych z starterami EU5.8S i EU18S

Ścieżki:

1 – produkt PCR *Achtheres* „O”;

2 – produkt PCR *Achtheres* „S”;

3 – produkt PCR okonia;

4 – produkt PCR sandacza;

M – marker wielkości DNA – DNA plazmidu pKO3 trawione *Hinf*I: od góry: 1008, 883, 615, 517, 466, 396 pz

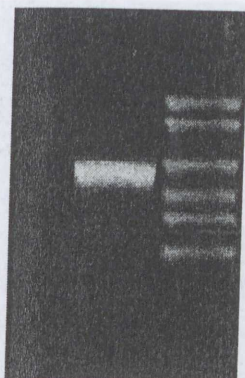
## 4.2. RFLP

Po przeprowadzeniu reakcji PCR oraz sprawdzeniu elektroforetycznym powstających produktów, zampifikowane DNA poddano analizie RFLP z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *Hinf*I (trawienie pojedynczoolewicy DNA na fragmenty o określonej sekwencji nukleotydowej) – tab. 31. Jak pokazano na ryc. 48, uzyskany wzór fragmentów restrykcyjnych (krótkie fragmenty DNA uzyskane po zadziałaniu enzymu restrykcyjnego) produktu PCR *Achtheres* „S” (ryc. 48, kreska 1, cztery fragmenty różni się znacznie od uzyskanego dla *Achtheres* „O” (ryc. 48, kreska 2, dwa fragmenty).





1 M



Ryc. 47. *Tracheliastes maculatus* – rozdział elektroforetyczny produktów amplifikacji uzyskanych z starterami EU5.8S i EU18S

Ścieżki:

1 – produkt PCR *T. maculatus* z leszcza;

M – marker wielkości DNA – DNA plazmidu pKO3 trawione *HinfI*: od góry: 1008, 883, 615, 517, 466, 396 pz

Na podstawie rozdziału elektroforetycznego (ryc. 46) stwierdzono, że w wyniku amplifikacji z starterami EU5.8S i EU18S powstają specyficzne produkty PCR. Nie stwierdzono obecności żadnych niespecyficznych produktów amplifikacji, czy też artefaktów innego pochodzenia (brak innych niż zamierzone prążków na żelu agarozowym). Potwierdziło to użyteczność zastosowanych starterów do eksperymentu oraz specyficzność reakcji PCR.

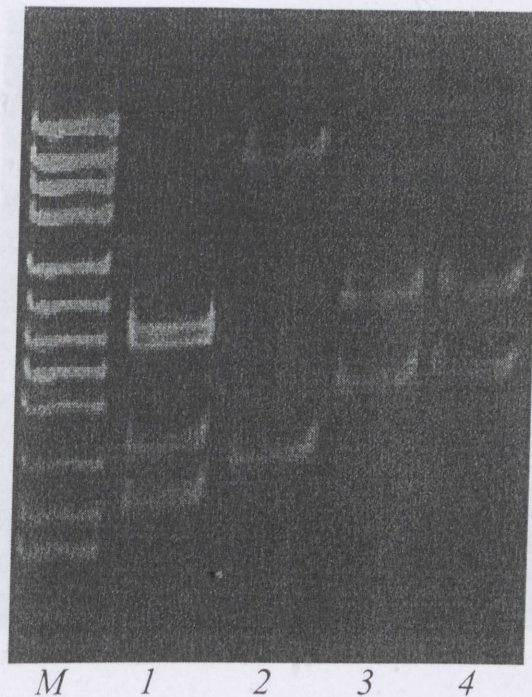
## 1.2. RFLP

Po przeprowadzeniu reakcji PCR oraz sprawdzeniu elektroforetycznym powstałych produktów, zamplifikowane DNA poddano analizie RFLP z zastosowaniem enzymu restrykcyjnego *HinfI* (tnącego pojedynczoniciowy DNA na fragmenty o określonej sekwencji nukleotydowej – tab. 3).

Jak pokazano na ryc. 48, uzyskany wzór fragmentów restrykcyjnych (krótkie fragmenty DNA uzyskane po zadziałaniu enzymu restrykcyjnego) produktu PCR *Achtheres* „S” (ryc. 48, ścieżka 1, cztery fragmenty) różni się znacznie od uzyskanego dla *Achtheres* „O” (ryc. 48, ścieżka 2, dwa fragmenty).







Ryc. 48. *Achtheres* „O”, *Achtheres* „S”, – okoń i sandacz – przykładowy rozdział elektroforetyczny fragmentów restrykcyjnych *Hinf*I trawienia produktów amplifikacji uzyskanych z starterami EU5.8S i EU18S (RFLP)

Ścieżki:

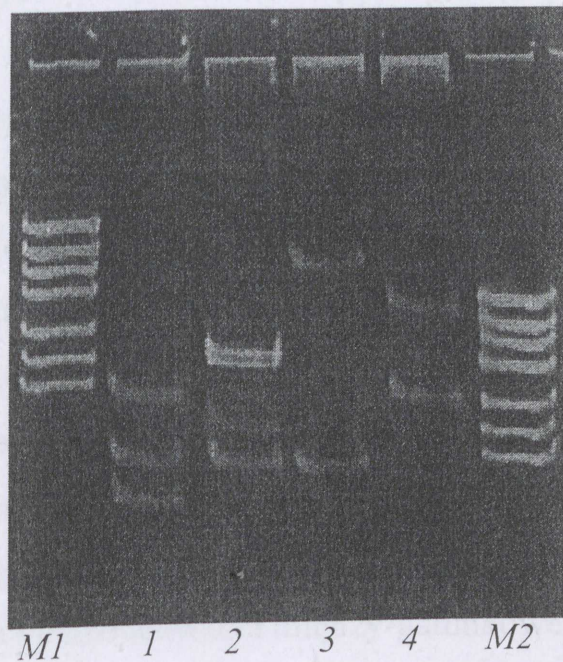
- 1 – produkt PCR *Achtheres* „S” trawiony *Hinf*I;
- 2 – produkt PCR *Achtheres* „O” trawiony *Hinf*I;
- 3 – produkt PCR sandacza trawiony *Hinf*I;
- 4 – produkt PCR okonia trawiony *Hinf*I;

M – marker wielkości DNA: od góry; 1008, 883, 615, 517, 489, 466, 404, 396, 331, 242, 190, 147, 111, 110 pz

Wyniki otrzymane dla *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” porównano w tym samym układzie z *T. maculatus* izolowanych z leszcza. Jak pokazano na ryc. 49 (ścieżka 1), otrzymano odmienny wzór fragmentów restrykcyjnych dla tego widłonoga, co potwierdza użyteczność zaproponowanego testu do różnicowania gatunków widłonogów.







Ryc. 49. *Tracheliastes maculatus*, *Achtheres* „O”, *Achtheres* „S”, – okoń i sandacz – przykładowy rozdział elektroforetyczny fragmentów restrykcyjnych *HinfI* trawienia produktów amplifikacji uzyskanych z starterami EU5.8S i EU18S (RFLP)  
Ścieżki:

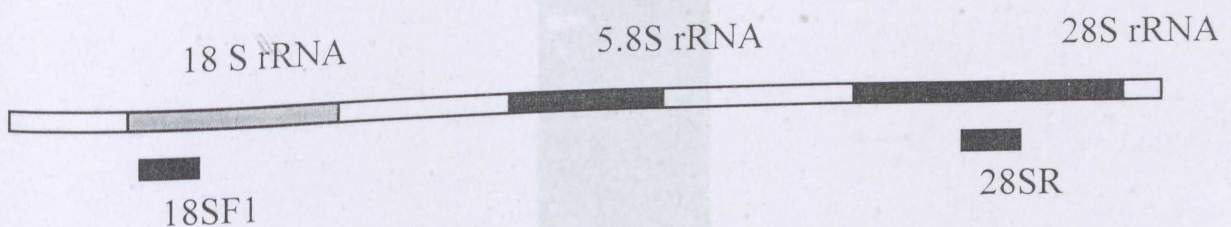
- 1 – produkt PCR *T. maculatus* z leszcza trawiony *HinfI*;
- 2 – produkt PCR *Achtheres* „S” trawiony *HinfI*;
- 3 – produkt PCR *Achtheres* „O” trawiony *HinfI*;
- 4 – produkt PCR okonia trawiony *HinfI*;
- M1 – marker wielkości DNA – DNA plazmidu pKO3 trawione *HinfI*: 1008, 883, 615, 517, 466, 396 pz;
- M2 – marker wielkości DNA – DNA plazmidu pUC19 trawione *MspI*: od góry: 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110 pz





## 2. Badanie zastosowania starterów 18SF1 i 28SR do genotypowania widłonogów z rodzaju *Achtheres* techniką PCR/RFLP

Zaprojektowano sekwencje nukleotydowe starterów 18SF1 i 28SR tak, aby w wyniku amplifikacji otrzymywać stosunkowo duże fragmenty DNA, około 1800–2000 pz. Te startery powinny być także uniwersalne, dając pozytywny wynik amplifikacji PCR z każdym DNA organizmów eukariotycznych, zarówno roślin jak i zwierząt. Starter 18SF1 jest komplementarny do 5' końca genu kodującego 18S rRNA, natomiast starter 28SR jest komplementarny do środkowej części genu kodującego 18S rRNA (ryc. 50). Pomiędzy tymi genami zlokalizowany jest polimorficzny region DNA, dający szansę na uzyskanie różnicowania między-gatunkowego lub też między-populacyjnego.



### Sekwencje starterów:

**18SF1:** 5' - GCGAAGCATTGCGCAAGAA - 3'

**28SR:** 5' - TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT - 3'

Ryc. 50. Schemat eukariotycznego regionu DNA kodującego rybosomalne RNA wraz z lokalizacją genów i starterów użytych do reakcji PCR





## 2.1. Amplifikacja DNA

Przy użyciu starterów 18SF1 i 28SR i zastosowanego profilu termiczno - czasowego reakcji PCR (Materiał i metody) uzyskano pożądaną, specyficzną amplifikację dla badanych widłonogów. Produkt reakcji PCR był wielkości około 1800 pz dla wszystkich testowanych próbek DNA widłonogów (pochodzących z okonia i sandacza).

Wszystkie próby amplifikowane były w identycznym składzie mieszaniny reakcyjnej o objętości 50  $\mu$ l i tych samych warunkach reakcji. Mieszaninę 5  $\mu$ l produktów PCR z buforem do nanoszenia rozdzielano elektroforetycznie przez 1 h na 1,5% żelu agarozowym w obecności bromku etydyny. Jako wzorca wielkości DNA w rozdziale elektroforetycznym użyto DNA faga lambda trawionego restryktazą *Hind*III (Ryc. 51). *Hind*III – jest enzymem restrykcyjnym klasy II, pochodzącym z *Haemophilus influenzae*, o następującej rozpoznawanej sekwencji: A/AGCTT.



Ryc. 51. *Achtheres* „O”, *Achtheres* „S”, – okoń i sandacz – rozdzał elektroforetyczny produktów amplifikacji uzyskanych z starterami 18SF1 i 28SR  
Ścieżki:

1 – produkt PCR *Achtheres* „O” ;

2 - produkt PCR *Achtheres* „S” ;

M – marker wielkości DNA – DNA faga lambda trawione *Hind*III: od góry: 23 130, 9 416, 6557, 4361, 2322, 2027 pz

Na podstawie rozdziału elektroforetycznego (ryc. 51) stwierdzono, że w wyniku amplifikacji z starterami 18SF1 i 28SR powstają specyficzne produkty





PCR. Nie stwierdzono obecności żadnych niespecyficznych produktów amplifikacji, czy też artefaktów innego pochodzenia (brak innych niż zamierzone prążków na żelu agarozowym).

## 2.2. RFLP

Po przeprowadzeniu reakcji PCR oraz sprawdzeniu elektroforetycznym powstałych produktów, zamplifikowane DNA poddano analizie RFLP z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych *MboI*, *AluI* i *HinfI*. Jak pokazano na ryc. 52, uzyskane wyniki wskazywały na trawienie produktów PCR wszystkimi testowanymi enzymami restrykcyjnymi. Wzory restrykcyjne produktów PCR uzyskanych na matrycach izolowanych z *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” były różne dla wszystkich testowanych enzymów restrykcyjnych.

Ryc. 52. *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” – lapon i sandacz – porównanie wzorów restrykcyjnych produktów PCR trawionych enzymami *MboI*, *AluI* i *HinfI*. Trawienie produktów PCR uzyskanych z matrycami 18SP1 i 28SP2 (RFLP).

Legenda:

1 – produkt PCR *Achtheres* „O” trawiony *MboI*

2 – produkt PCR *Achtheres* „S” trawiony *MboI*

3 – produkt PCR *Achtheres* „O” trawiony *AluI*

4 – produkt PCR *Achtheres* „S” trawiony *AluI*

5 – produkt PCR *Achtheres* „O” trawiony *HinfI*

6 – produkt PCR *Achtheres* „S” trawiony *HinfI*

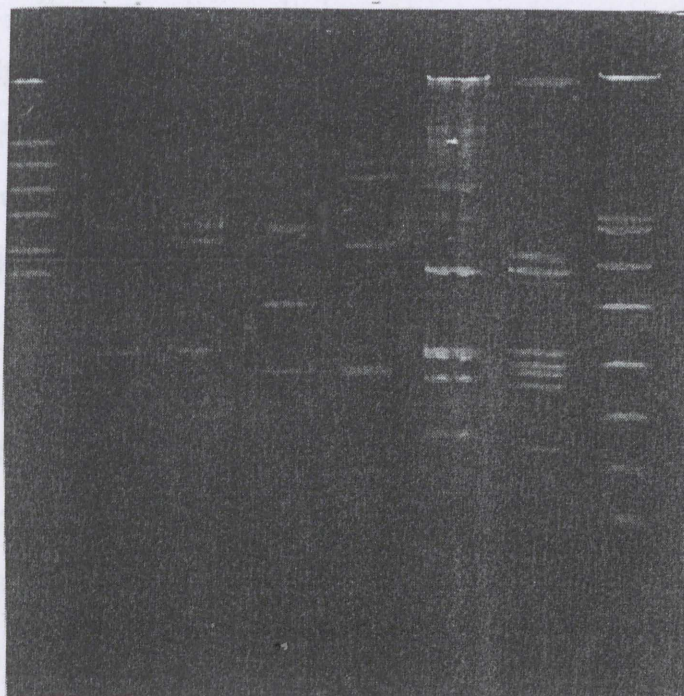
M1 – marker wiązania DNA – DNA plazmidu pSO4 trawione *HinfI*: 1302, 483, 513, 517, 466, 396 pb

M2 – marker wiązania DNA – DNA plazmidu pUC19 trawione *MspI*: od góry 501, 483, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110 pb

Analiza otrzymanych wyników wskazuje, że zastosowanie techniki PCR-RFLP daje możliwość łatwego odróżnienia osobników *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”.







Ryc. 52. *Achtheres* „O”, *Achtheres* „S”, – okoń i sandacz – przykładowy rozdział elektroforetyczny fragmentów restrykcyjnych *Mbo*I, *Alu*I i *Hinf*I trawienia produktów amplifikacji uzyskanych z starterami 18SF1 i 28SR (RFLP)

Ścieżki:

1 – produkt PCR *Achtheres* „O” trawiony *Mbo*I;

2 – produkt PCR *Achtheres* „S” trawiony *Mbo*I;

3 – produkt PCR *Achtheres* „O” trawiony *Alu*I;

4 – produkt PCR *Achtheres* „S” trawiony *Alu*I;

5 – produkt PCR *Achtheres* „O” trawiony *Hinf*I;

6 – produkt PCR *Achtheres* „S” trawiony *Hinf*I;

M1 – marker wielkości DNA – DNA plazmidu pKO3 trawione *Hinf*I: 1008, 883, 615, 517, 466, 396 pz;

M2 – marker wielkości DNA - DNA plazmidu pUC19 trawione *Msp*I: od góry: 501, 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111, 110 pz

Analiza otrzymanych wyników wskazuje, że zastosowanie techniki PCR/RFLP daje możliwość łatwego odróżnienia osobników *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”.





## IV DYSKUSJA

Celem niniejszej pracy, jak zaznaczono we wstępie, jest ustalenie czy widłonogi z rodzaju *Achtheres* pasożytujące u okonia i sandacza reprezentują jeden i ten sam gatunek, czy być może są to dwie odrębne rasy, podgatunki, czy może gatunki. Istnieją różne koncepcje gatunku: koncepcja typologiczna, nominalistyczna, biologiczna i ewolucyjna (Mayr i Aschlock 1991).

Niezależnie od indywidualnego podejścia do problemu konkretnego badacza problem zdefiniowania odrębności gatunkowej wydaje się bardzo subiektywny. Nikt do tej pory nie określił jednoznacznie gdzie znajduje się granica pomiędzy gatunkiem a podgatunkiem, czy między podgatunkiem a rasą. Grupy naukowców zajmujące się poszczególnymi grupami zwierząt czy roślin działają w obrębie określonej konwencji, zwyczajowo definiującej niektóre problemy. Posłużmy się przykładem kopepodologii a szczególnie tego jej działu, który zajmuje się widłonogami pasożytującymi u ryb. Można z dużym przybliżeniem stwierdzić, że naukę tę znacząco usystematyzował Z. Kabata. Przedtem problemy związane z tą grupą zwierząt były traktowane bardzo indywidualnie przez różnych badaczy. Oczywiście we wcześniejszym okresie powstało wiele wybitnych prac (między innymi: von Nordmann 1832, Brian 1906, Wegener 1910, Scott i Scott 1913, Wilson 1915, Gurney 1933, Kozikowska, Jara i Grabda 1956, Markievič 1956, Grabda i Grabda 1969) ale dopiero Kabata (1979) zaczął sprowadzać tego rodzaju badania do wspólnego mianownika narzucając standardy badań systematycznych. Systematyka pasożytniczych widłonogów opiera się obecnie, w zasadzie wyłącznie na ich budowie zewnętrznej a gatunki reprezentujące ten sam rodzaj rozróżnia się w oparciu o różnice w budowie i uzbrojeniu przydatków. Bardzo rzadko blisko spokrewnione gatunki odróżnia się na podstawie ich ogólnego kształtu ciała. Współcześni kopepodolodzy równie niechętnie wyróżniają osobne podgatunki czy rasy w swoich opisach morfologicznych. W obrębie Copepoda, praktycznie



nie opisywano gatunków bliźniaczych powszechnie wyodrębnianych wśród owadów. Można przypuszczać, że wynika to z faktu, że widłonogi są zdecydowanie najbardziej zróżnicowaną morfologicznie grupą pasożytów. Dla przykładu nicienie (Nematoda) porównane z widłonogami, wydają się bardzo mało zróżnicowane morfologicznie. Dopiero niedawno zauważono, że niektóre gatunki nominalne nicieni z rodziny Anisakidae reprezentują w rzeczywistości więcej jak jeden gatunek. Te nowo odkryte gatunki bliźniacze są nie do odróżnienia tradycyjnymi metodami morfologicznymi. Różnią się jednak szczegółami biologii, czasem żywicielami pośrednimi, a podstawowa różnica to ich odmienność genetyczna potwierdzona metodami molekularnymi (Szostakowska 1998, Nascetti i wsp. 2000).

Zainteresowanie na poziomie molekularnym gatunków z różnych grup systematycznych wzrasta bardzo szybko. Na ostatnim VIII European Multicolloquium of Parasitology (EMOP), które odbyło się w Poznaniu w roku 2000, cała sesja była przeznaczona tylko na prace związane z zastosowaniem metod molekularnych w parazytologii (Matejusova i wsp. 2000, Kijewska i wsp. 2000, Berrilli i wsp. 2000).

W ostatnich dwóch dziesięcioleciach badania systematyczne widłonogów i opisy nowych gatunków, szczególnie w rodzinie Lernaeopodidae mają układ formalny naśladujący prace Kabaty i uwzględniający głównie budowę i uzbrojenie przydatków. Prac, które podchodzą do problemu kompleksowo i wielotorowo jest mało. Bardzo dobrym przykładem jest wspomniana wcześniej publikacja Kozikowskiej, Jary i Grabdy (1956). Brakuje jednak prac naukowych uwzględniających oprócz tradycyjnych metod również mikroskopię elektronową, biologię molekularną czy biometrię popartą obliczeniami komputerowymi. Niniejsza praca stanowi próbę wypełnienia tej luki. Przeprowadzone badania wykazały, że obydwie formy żywicielskie widłonogów występujących u okonia i sandacza różnią się kształtem tułowia genitalnego.





U *Achtheres* „S” tułów genitalny, w widoku dorsalnym, jest owalny i wyraźnie wydłużony, podczas gdy u *Achtheres* „O” jest on w równym stopniu zaokrąglony ale zdecydowanie krótszy i krępy (o szerokości większej jak długość). To, że obie formy *Achtheres* różnią się kształtem ciała zauważyli już wcześniejsi badacze. Problem ten jest potraktowany najobszerniej przez Kozikowską, Jarę i Grabdę (1956). Autorzy ci zauważyli, że u formy z okonia, tułów, ma kształt zbliżony do kwadratu lub prostokąta (który jest nieco szerszy jak dłuższy). Natomiast u formy z sandacza tułów genitalny da się wpisać w trapez, którego wysokość jest większa od podstawy. Wyniki badań wyżej cytowanych autorów są w sensie ogólnym zgodne z obecnie stwierdzonymi prawidłowościami. Możliwość wpisania kształtu tułowia w figury geometryczne takie jak prostokąt czy trapez wydaje się jednak zbyt daleko idącym wnioskiem.

Kolejną ważną cechą zaobserwowaną w niniejszych badaniach wydaje się równie łatwo zauważalna względna wielkość wyrostka kopulacyjnego samicy. U formy z okonia jest on bardzo mały i nieznacznie tylko wystaje poza tylną krawędź tułowia genitalnego, zaś u formy z sandacza jest on potężny i wystaje bardzo daleko poza tylną krawędź ciała, między workami jajowymi. Również i ta cecha różnicująca obie formy widłonogów była obserwowana przez Kozikowską, Jarę i Grabdę (1956). Dopiero obecnie możliwa jest jednak właściwa ocena znaczenia tej różnicy w systematyce tej grupy widłonogów. Mając do dyspozycji opublikowaną w ostatnich dziesięcioleciach literaturę przedmiotu należy stwierdzić, że powyższa cecha jest niezwykle ważna dla taksonomii gałęzi słodkowodnej *Lernaeopodidae*. Najbardziej interesującą pracą jest rewizja rodzaju *Salmincola* Wilson, 1915 przeprowadzona przez Kabatę (1966). Autor ten przeniósł do tego rodzaju wiele gatunków nominalnych należących wcześniej do *Achtheres*. Jedną z ważniejszych cech leżących u podstaw wyodrębnienia obydwu rodzajów jest według Kabaty (1966) względna wielkość wyrostka kopulacyjnego. U przedstawicieli rodzaju









*Salmincola* jest on słabo wyodrębniony i stanowi praktycznie niezauważalne uwypuklenie ciała, natomiast u widłonogów z rodzaju *Achtheres* wyrostek ten jest dobrze wykształcony. Jeżeli porównamy względną wielkość wyrostka kopulacyjnego u przedstawicieli *Salmincola* oraz *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” to można zaryzykować twierdzenie, że wyrostek u *Achtheres* „O” reprezentuje stan pośredni między *Salmincola* a *Achtheres* „S”. Jeżeli uznaliśmy względną wielkość wyrostka za cechę, która legła u podstaw odróżniania dwóch rodzajów zatem wydaje się jak najbardziej uzasadnione, że uznamy ta samą cechę jako jeden z wiarygodnych parametrów odróżniających odrębne gatunki (w rodzaju *Achtheres*).

Oprócz różnic w ogólnej budowie ciała badanych pasożytów zaobserwowano także pewne różnice w budowie i uzbrojeniu ich przydatków.

Pierwszym w kolejności przydatkiem jest antena I pary. U obydwu form ma ona budowę typową dla przedstawicieli rodziny Lernaeopodidae. Czułki te u blisko spokrewnionych gatunków wyglądają prawie tak samo i mogą się różnić tylko uzbrojeniem apikalnym. Kabata (1979) zdefiniował schemat tego uzbrojenia wprowadzając nawet oznaczenia cyfrowe dla poszczególnych szczecin i wyrostków. W niniejszych badaniach stwierdzono obecność sześciu elementów na wierzchołku anteny I pary u *Achtheres* „O”, a tylko pięciu u *Achtheres* „S”. Kozikowska, Jara i Grabda (1956) stwierdzili, iż u obu form *Achtheres* („O” i „S”) na końcowym segmencie występują zawsze 4 szczecinki a obok nich stwierdza się obecność małego ząbka. Autorzy powyższej pracy przytaczają dokładną analizę budowy anteny I pary obserwowaną przez innych autorów, z której wynika, iż tylko w przypadku Geyera (1939) opis jest „prawie zgodny” z opisem autorów. Założenie, że można odróżniać gatunki na podstawie uzbrojenia apikalnego anteny I pary (Kabata 1979) nie wydaje się dobrze uzasadnione. Elementy tego uzbrojenia są tak małe, że trudno je badać nie tylko w dobrym mikroskopie optycznym ale nawet przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego. Poza tym często się zdarza, że





niektóre z nich ulegają uszkodzeniu. Dlatego też, mimo, że zaobserwowane schematy uzbrojenia są cechą różniącą *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” to jest to cecha niejednoznaczna w interpretacji i dlatego nie może być praktycznie stosowana w systematyce.

Anteny II pary okazały się bardzo istotnym elementem mogącym służyć jako narzędzie do rozpoznawania form *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”, aczkolwiek zarys ich budowy jest zawsze taki sam. Potwierdza to słuszność wybrania przez Kabatę (1963) właśnie anten II pary jako struktury odgrywającej decydującą rolę w taxonomii Clavellinae, należących również do rodziny Lernaepodidae. Typy anten II pary w tej rodzinie są dość różne, od anten typowych dla stadium kopepodit (schemat A wg Kabaty 1979) i formy bardziej prymitywnej (schemat D) jaką reprezentuje przykładowo *Tracheliastes*, po ich ewolucyjnie wyższe stadium rozwoju (schemat B, C) odpowiadające ogólnym zarysom budowie anteny II pary u *Achtheres*. W trakcie niniejszych badań stwierdzono, że egzopodit anteny II pary jest bardzo podobny u obydwu form *Achtheres* („O” i „S”) i na jego podstawie trudno byłoby odróżniać te formy. U formy z okonia egzopodit jest bardzo szeroki i zaokrąglony podczas gdy u formy z sandacza jest on bardziej wydłużony. Różnice te są analogiczne do różnic w kształcie tułowia genitalnego obu form. Kozikowska, Jara i Grabda (1956) poświęcili sporo uwagi strukturze gałęzi zewnętrznej tego przydatka dokonując jednocześnie szczegółowego porównania z opisami innych badaczy. Z obserwacji wyżej wspomnianych autorów wynika, iż antena II pary u *Achtheres* „O” ma cztery kolce na egzopodicie, które zmniejszają się ku stronie zewnętrznej. Stwierdzenia tego nie udało się potwierdzić w niniejszych badaniach. Zaobserwowano rzeczywiście cztery kolce, lecz nie było regułą owe zmniejszanie się ich w kierunku zewnętrznej strony egzopoditu. Cytowani autorzy zauważyli, że cztery kolce egzopoditu u *Achtheres* „S” są mniejsze jak u formy z okonia, zaś sama gałąź jest masywniejsza.

Uzbrojenie endopoditu jest typowe dla tej grupy widłonogów (ryc. 10b)





i u *Achtheres* „O” różni się od struktur zaobserwowanych u *Achtheres* „S” najbardziej w strukturze kompleksu 4. U formy z okonia jest on silnie wydłużony w osi anteny o kształcie wydłużonego prostokąta, zaś u formy z sandacza jest on wydatnie zaokrąglony i bardziej rozbudowany terminalnie. Dodatkowym elementem wzbogacającym opis tego przydatku są „mini-kolce” o długości około 2 mikrometrów w dwóch miejscach na gałęzi wewnętrznej (ryc. 24). Kabata (1979), na ilustracjach będących uzupełnieniem opisu gatunku *Achtheres percarum* s. l. przedstawia nieco odmienne struktury w owych miejscach rysując tam regularne i zdecydowanie rzadsze, niż w obserwacjach własnych, wyrostki (może to być uproszczenie wynikające z przyjętej konwencji ilustracyjnej). Istotne różnice w obserwacjach poszczególnych autorów mogą być spowodowane pochodzeniem materiału z różnych rejonów Europy i jeziora Bajkał (Kozikowska, Jara i Grabda, 1956), co przemawiałoby za pewną zmiennością geograficzną w obrębie tych struktur (ewentualnie należałoby wziąć pod uwagę niedokładności w obserwacjach u poszczególnych autorów).

Nie zauważono żadnych różnic w liczbie, kształcie ani wielkości poszczególnych ząbków podczas badań mandibuli na materiale z okonia i sandacza. Podobny wniosek wyciągnęli Kozikowska, Jara i Grabda (1956). Na rysunku mandibuli formy *Achtheres percarum* s.l. zamieszczony w pracy Gurneya (1933), przedstawiono nieco inny kształt i rozmieszczenie poszczególnych ząbków. Są one zdecydowanie bardziej ostre i występują w liczbie ośmiu sztuk. Obserwacje własne autora dotyczące występowania dziewięciu ząbków, oraz ich kształtu i rozmieszczenia są zgodne z badaniami Kabaty (1979).

Budowa maxilli I pary w badanym materiale z okonia i sandacza jest bardzo podobna i odpowiada ogólnemu schematowi budowy tych przydatków w większości przedstawicieli rodziny Lernaeopodidae. W niniejszych badaniach zaobserwowano małą szczecinkę u podstawy jednego z palczastych wyrostków (szczecin) endopoditu u formy z sandacza. Szczecinki takiej nie udało się





zaobserwować u form z okonia (ryc. 27). Spekulacje na temat liczby wyrostków i niezbyt zgodnych opisów maxilli I pary u *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” przedstawia dokładnie Markiewitsch (1932).

Pomimo braku znaczących różnic w szczegółach budowy, kształt maxilli I pary u *Achtheres percarum* s.l. (bez zaznaczenia żywiciela) wg Geyera (1939), Kozikowskiej, Jary i Grabdy (1956), oraz wg Kabaty (1979), nie jest taki sam. Różnice te mogą wynikać ze zmienności osobniczej lub z różnic międzypopulacyjnych.

Maxilipedia najbardziej różnicują obie formy pasożytów z rodzaju *Achtheres* występujących u okonia i sandacza. U badanych w niniejszej pracy osobników, zauważono różnice w liczbie i strukturze kolców pomocniczych u podstaw pazura subcheli, oraz w budowie myxy na korpusie maxilipedium. U *Achtheres* „O” zaobserwowano dwa kolce pomocnicze, podczas gdy u *Achtheres* „S” – trzy. Kozikowska, Jara i Grabda (1956) nie podają własnego opisu, komentując jedynie, iż budowa tych przydatków jest zgodna z opisem Markiewitscha (1932). Zamieszcza on we wspomnianej pracy rysunek szczękonoży, różniący się zdecydowanie od obserwacji dokonanych w trakcie niniejszych badań. W opisie brak jest jakiegokolwiek wzmianki o występowaniu w materiale z sandacza trzech (badania własne) a nie dwóch kolców pomocniczych u podstawy subcheli. Geyer (1939) nadmienia o występowaniu na materiale z sandacza małej powierzchni pokrytej hakami w liczbie od ośmiu do dziesięciu sztuk. Prawdopodobnie jest to odpowiednik myxy, która rzeczywiście u osobników z sandacza posiada dwa dobrze wykształcone kolce i stosunkowo duży płatowaty narząd, którego jedynie krawędzie pokryte są drobnymi ząbkami. Myxa okazała się najbardziej zmienna częścią maxilipediów w materiale pochodzącym z sandacza. Praktycznie trudno jest jednoznacznie ustalić kształt owego płatowatego narządu (ryc. 35, 36, 37), oraz liczbę kolców (jeden lub dwa). Trudno powiedzieć, czy owa zmienność jest procesem ewolucyjnym i jesteśmy świadkami wykształcania się nowego typu





„myxy – sandaczowej”, czy jest jedynie wyrazem zmienności osobniczej tego narządu w obrębie jednego gatunku.

Metody biometryczne są szeroko stosowane zarówno w systematyce kręgowców (Krzykowski i wsp. 1999a, Więcaszek i wsp. 1999, Krzykowski i wsp. 2000) jak i bezkręgowców (Drzycimski 1967, Drzycimski 1968, Drzycimski 1968a, Gajardo i wsp. 1998, Serwotka 1999, Piasecki i wsp. 2000). Ich zastosowanie w badaniach widłonogów było bardzo ograniczone (Barnes i Barnes 1953, Grigg i wsp. 1985) i tylko w nielicznych przypadkach dotyczyło widłonogów pasożytniczych (Kozikowska, Jara i Grabda, 1956, Piasecki i wsp. 2000).

Gajardo i wsp. (1998) porównuje dwie reprodukcyjnie izolowane populacje *Artemia* (Anostraca: Artemidae), stosując także przez siebie skonstruowany schemat pomiarowy. Wyznacza on 8 cech, wśród których jest długość całkowita i długość odwłoka, jednak wyniki opiera na 30 dojrzałych osobnikach (po 15 z każdej płci). W prezentowanej pracy badania biometryczne oparto wyłącznie na samicach, ponieważ zgodnie ze stwierdzeniem Kozikowskiej, Jary i Grabdy (1956) dopiero w tym momencie następuje rozszczepienie morfologiczne obu form pasożyta. Jest to oczywiście związane z faktem, że dopiero samice prowadzą w pełni pasożytniczy tryb życia. Materiał do badań biometrycznych jest przeważnie utrwalony (50% kwas octowy – Gajardo i wsp. (1998), lub alkohol – Wyngaard 2000), ponieważ należy go zawsze zebrać w możliwie krótkim czasie, tuż po przezimowaniu. Unika się wówczas różnic wiekowych i istnieje duże prawdopodobieństwo, iż zebrany materiał reprezentuje jedno pokolenie. Kozikowska, Jara i Grabda (1956) zwracają szczególną uwagę na takie czynniki jak: warunki środowiska, wiek pasożyta, umiejscowienie na żywicielu, itp. odgrywające równie istotną rolę, w uzyskaniu prawidłowego obrazu morfologicznego, jak rzetelne pomiary poparte rachunkiem statystycznym.





„myxy – sandaczowej”, czy jest jedynie wyrazem zmienności osobniczej tego narządu w obrębie jednego gatunku.

Metody biometryczne są szeroko stosowane zarówno w systematyce kręgowców (Krzykowski i wsp. 1999a, Więcaszek i wsp. 1999, Krzykowski i wsp. 2000) jak i bezkręgowców (Drzycimski 1967, Drzycimski 1968, Drzycimski 1968a, Gajardo i wsp. 1998, Serwotka 1999, Piasecki i wsp. 2000). Ich zastosowanie w badaniach widłonogów było bardzo ograniczone (Barnes i Barnes 1953, Grigg i wsp. 1985) i tylko w nielicznych przypadkach dotyczyło widłonogów pasożytniczych (Kozikowska, Jara i Grabda, 1956, Piasecki i wsp. 2000).

Gajardo i wsp. (1998) porównuje dwie reprodukcyjnie izolowane populacje *Artemia* (Anostraca: Artemidae), stosując także przez siebie skonstruowany schemat pomiarowy. Wyznacza on 8 cech, wśród których jest długość całkowita i długość odwłoka, jednak wyniki opiera na 30 dojrzałych osobnikach (po 15 z każdej płci). W prezentowanej pracy badania biometryczne oparto wyłącznie na samicach, ponieważ zgodnie ze stwierdzeniem Kozikowskiej, Jary i Grabdy (1956) dopiero w tym momencie następuje rozszczepienie morfologiczne obu form pasożyta. Jest to oczywiście związane z faktem, że dopiero samice prowadzą w pełni pasożytniczy tryb życia. Materiał do badań biometrycznych jest przeważnie utrwalony (50% kwas octowy – Gajardo i wsp. (1998), lub alkohol – Wyngaard 2000), ponieważ należy go zawsze zebrać w możliwie krótkim czasie, tuż po przezimowaniu. Unika się wówczas różnic wiekowych i istnieje duże prawdopodobieństwo, iż zebrany materiał reprezentuje jedno pokolenie. Kozikowska, Jara i Grabda (1956) zwracają szczególną uwagę na takie czynniki jak: warunki środowiska, wiek pasożyta, umiejscowienie na żywicielu, itp. odgrywające równie istotną rolę, w uzyskaniu prawidłowego obrazu morfologicznego, jak rzetelne pomiary poparte rachunkiem statystycznym.





Należy się w tym miejscu zastanowić, które cechy budowy zewnętrznej uznamy za cechy diagnostyczne a które z nich odrzucimy np. ze względu na duże zróżnicowanie w obrębie tego samego gatunku. W toku niniejszych badań stwierdzono, że następujące wymiary ciała samic *Achtheres* są statystycznie istotne: długość maxilli II pary, długość wyrostka kopulacyjnego, długość płytki głowowej, długość głowotułowia, oraz całkowita długość ciała.

Występuje tu pewna niezgodność z badaniami Kozikowskiej, Jary i Grabdy (1956) którzy stwierdzili, że u *A. percarum* s.l. długość „ramion”, długość „odwłoka” (czyli tułowia genitalnego), liczba i średnica jaj są cechami niediagnostycznymi. Trudno zrezygnować z uwzględnienia w badaniach biometrycznych średnicy jaj, kiedy Belmonte (1998) w swojej pracy przedstawia ścisłą zależność pomiędzy morfologią jaj u Calanoida a ich przynależnością do poszczególnych gatunków. Swoje badania opiera na 7 gatunkach z rodzajów *Acartia*, *Paracartia* i *Pteriacartia*, biorąc zawsze do analizy po 15 jaj z każdego gatunku. Efektem tej pracy jest powstanie mini-kłucza do oznaczania siedmiu gatunków na podstawie średnicy i struktury powierzchni jaj. Analizując wyniki tej pracy zdecydowałam się na ujęcie cechy jaką jest „średnica jaj”, w schemacie pomiarowym konstruowanym dla widłonogów z rodzaju *Achtheres*. Przypuszczałam iż, może to być jedna z istotniejszych cech różniących obie badane przeze mnie formy tego pasożyta. Analiza wyników tych pomiarów wykazała, iż jaja u formy widłonoga pasożytującego na okoniu są mniejsze niż jaja u formy z sandacza. Różnice okazały się jednak nieistotnymi statystycznie i dlatego ta cecha nie znalazła zastosowania w skonstruowanym modelu regresji.

Kolejna cecha niediagnostyczna, jaką jest wg Kozikowskiej, Jary i Grabdy (1956), „długość odwłoka” (czyli długość tułowia genitalnego) jest trudna do porównania z badanym obecnie schematem. Autorzy podają, że jako odwłok u *A. percarum* rozumieją zredukowane i zmienione odcinki tułowia i „właściwego odwłoka” (czyli odpowiednika odwłoka u wolnożyjących





widłonogów). U *Achtheres* podobnie jak u większości przedstawicieli rodziny Lernaeopodidae odwłok jest całkowicie zredukowany. Najprawdopodobniej w pracy Kozikowska, Jara i Grabda (1956) pod pojęciem „odwłoka” rozumieli wyrostek płciowy. W niniejszych badaniach biometrycznych do pomiarów włączono trzy zmienne definiujące kształt „odwłoka” czyli tułowia genitalnego u dwóch badanych form: szerokość tułowia genitalnego w położeniu osobnika „na wznak”, grubość tułowia genitalnego (mierzone w ułożeniu bocznym) oraz długość (zaznaczona na schemacie pomiarowym numerem 3). Z uwagi na to, że żadna z tych zmiennych nie okazała się istotna statystycznie należy przypuszczać, iż podstawowe wymiary tułowia genitalnego nie mogą służyć jako cecha różnicująca obie formy pasożyta. Dyskusyjną kwestią jest długość „ramion”, czyli długość maxilli II pary, mierzona w przypadku badań własnych od podstawy do bulli (zmienna 9 na ryc. 11). Pewna część badaczy odnosi się sceptycznie do badań biometrycznych. Geyer (1939), dla przykładu twierdzi, że wielkość pasożytów może być na tyle różna, że tworzenie nowych gatunków na podstawie wykonania pomiarów *A. percarum* s.l. z różnych żywicieli jest bezpodstawne. Potwierdza swoją tezę cytatem z pracy Markiewitscha (1932), który wg Geyera wyjaśnił już dostatecznie brak znaczenia różnic w wielkości poszczególnych części ciała do tworzenia nowych gatunków w obrębie rodzaju *Achtheres*. Bardzo jednoznacznie określa swój stosunek do badań biometrycznych Frost (1989), twierdząc, iż *Pseudocalanus moultoni* i *P. newmani* różnią się wielkością („*P. moultoni* jest większy, grubszy”), ale sama wielkość nie może być cechą diagnozującą nam te gatunki jak twierdzi Bucklin i wsp. 1998.

Analiza skupień zastosowana w niniejszej pracy wykazała, że wszystkie badane osobniki *Achtheres* „O” są bardziej podobne do innych osobników *Achtheres* „O” niż do osobników *Achtheres* „S” – i odwrotnie – wszystkie osobniki *Achtheres* „S” są bardziej podobne do innych osobników





*Achtheres* „S” jak do osobników *Achtheres* „O”. Świadczy o tym wystąpienie dwóch wyraźnych skupień na dendrogramie. Analiza skupień jest metodą często stosowaną w badaniach, w których została postawiona teza o występowaniu różnorodności form w obrębie jednego gatunku (Heese 1985), lub też w badaniach dotyczących analizy systematycznej ryb (Tieriechin 1980, Jermochin 1984) (wg Heese 1985). W pracach z dziedziny oceanologii metoda ta znalazła zastosowanie w określaniu podobieństw na przykład w gęstości mejobentosu w obrębie różnych stacji badawczych Zatoki Pomorskiej (Rokicka-Praxmayer i wsp. 1998), lub badaniach biomasy makrobentosu w odniesieniu do różnych stacji badawczych położonych w Bałtyku Zachodnim (Radziejewska i Masłowski 1995). Chojnacki (1976) wykorzystuje statystyczną metodę podobieństwa do oceny tendencji skupiskowych zooplanktonu.

Heese (1985) zastosował metodę analizy skupień do sporządzenia dendrogramu w celu ustalenia stopnia podobieństwa dwóch form siei z Zatoki Pomorskiej. Założył on występowanie formy „typica” i formy „gibbosa”, jednak uzyskany przez tego autora dendrogram stanowią cztery skupienia z dużą liczbą osobników o cechach mieszanych stanowiących formy pośrednie. Wyniki otrzymane przez Hessego (1985) wykazują istnienie pewnych różnic morfologicznych między badanymi formami siei. Różnice te były jednak zbyt mało jednoznaczne aby usprawiedliwić nadanie formom „typica” i „gibbosa” znaczenia taksonomicznego. Różnice wykazane poprzez analizę skupień w niniejszej pracy upoważniają do stwierdzenia, w oparciu o analizowane cechy pomiarowe, że *Achtheres* „O” różni się zdecydowanie od *Achtheres* „S”.

Omawiane narzędzie badawcze jest dostępne dopiero od niedawna i dlatego Kozikowska, Jara i Grabda (1956) i Kozikowska (1957) nie mieli wygodnych narzędzi badawczych do kwantyfikacji wyciągniętych przez siebie wniosków.

Nowe narzędzie badawcze jakie stanowią obecnie szczegółowe badania genetyczne otworzyły szansę bardziej obiektywnego określenia wzajemnej relacji między *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”.





Dzięki odkryciu w roku 1985 przez K. Mullisa Łańcuchowej Reakcji Polimerazy (PCR), za którą osiem lat później został wyróżniony Nagrodą Nobla w dziedzinie chemii, ostatnie lata przyniosły wiele nowości dotyczących analizy jakościowej i ilościowej DNA bezkręgowców. Trudności na jakie jest narażony każdy genetyk, to izolacja materiału (DNA), ponieważ zawodzą tu wszystkie powszechnie stosowane protokoły izolacji dla ludzi i zwierząt wyższych. Problem ten poruszają w swojej pracy Schizas i wsp. (1997), przedstawiając modyfikacje metod izolacji DNA dla niższych Metazoa, wprowadzone przez cały zespół badaczy z Uniwersytetu w Karolinie (USA). Trudności te przypuszczalnie związane są z „zabrudzeniem” materiału, czyli ciągłym kontaktem z grzybami, bakteriami i innymi czynnikami (jak w przypadku materiału niniejszej pracy – skrzela żywiciela, mające ciągły kontakt ze środowiskiem wodnym) mogącymi być powodem zajścia zjawiska kontaminacji (polegającego na dostaniu się do mieszaniny reakcyjnej obcego, niepożądanego materiału genetycznego znajdującego się praktycznie wszędzie). W procesie pozyskiwania materiału genetycznego z obydwu form widłonogów z rodzaju *Achtheres* uznano za konieczne także przeprowadzenie izolacji DNA zarówno z wątroby okonia jak i sandacza, celem możliwości sprawdzenia, czy otrzymany materiał nie jest zanieczyszczony przez DNA ryby. Dało to pewność, że w dalszych etapach przeprowadzania reakcji PCR amplifikowano materiał genetyczny widłonogów a nie ich żywicieli.

W badaniach własnych, przy użyciu uniwersalnych starterów eukariotycznych EU5.8S i EU18S otrzymano różne produkty amplifikacji: około 800 par zasad dla *Achtheres* „O” i około 850 pz dla *Achtheres* „S”. Jeszcze bardziej wyraźnie różnił się wzór fragmentów restrykcyjnych w analizie RFLP (*Achtheres* „O” – cztery fragmenty; *Achtheres* „S” – dwa fragmenty). Startery 18SF1 i 28SR dały co prawda produkt amplifikacji o podobnej wielkości dla obydwu form (1800 pz) ale przy zastosowaniu techniki RFLP,





każdy z zastosowanych enzymów restrykcyjnych (*MboI*, *AluI* i *HinfI*) dał różniący się układ prążków dla *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”.

W badaniach własnych, których wyniki opisano wcześniej, zdecydowano się na skorzystanie z uniwersalnych starterów eukariotycznych, które ze względu na czteronukleotydową (czyli częstą) sekwencję rozpoznawania przy dużym genomie widłonogów nie dają praktycznie prawdopodobieństwa przypadkowego powtórzenia się żadnej sekwencji. Dotychczas opublikowano niewiele prac dotyczących badań molekularnych. Ponadto większość z nich dotyczy jednak widłonogów wolnożyjących. Przy bliższym przyjrzeniu okazuje się, że nie wszystkie badania są w pełni wiarygodne. Dla przykładu Lindeque i wsp. (1999) w swojej pracy dotyczącej rozróżniania gatunków z rodzaju *Calanus* przy użyciu metod molekularnych pracuje na starterach komplementarnych do genu 16S rRNA (a nie jak w niniejszych badaniach 18S rRNA). Wydaje się to błędem metodycznym zważywszy, iż gen 16S rRNA nie istnieje u eukariontów. Przypuszczalnie doszło tu do izolacji materiału genetycznego bakterii zasiedlających osobniki *Calanus* a nie badanych widłonogów i nastąpiła amplifikacja materiału genetycznego owych prokariotów.

Bardzo interesującym elementem pracy Bucklina i wsp. (1998) jest pozyskanie materiału wyjściowego do amplifikacji nie tylko z dorosłych osobników *Calanus*, lecz także z poszczególnych stadiów rozwojowych (jaja, naupliusy i copepodity). Wspomniane już wcześniej problemy z pozyskiwaniem DNA od widłonogów skłoniły autorów tej pracy do użycia starterów specyficznych dla gatunków *Pseudocalanus moultoni* i *P. newmani* (Copepoda, Calanoida), co dało w efekcie możliwość amplifikacji DNA bez wcześniejszej jego ekstrakcji. Podczas takiej amplifikacji „sygnał” w rozdziale elektroforetycznym daje tylko DNA określonego gatunku widłonoga, pozostałe DNA obcych organizmów obecne w reakcji nie pozostawia żadnego „śladu” na żelu. W niniejszych badaniach nie było możliwe pominięcie procesu ekstrakcji





DNA, ponieważ nie znane są specyficzne startery dla jakiegokolwiek gatunku z rodzaju *Achtheres*.

Trudności w porównaniu wyników, w zastosowaniu reakcji PCR/RFLP do identyfikacji gatunków, wynikają z bardzo skromnej literatury w tym zakresie. Opublikowane dotychczas prace opierające się na metodach molekularnych stosowanych w kopepodologii to przede wszystkim określanie różnic genetycznych w obrębie populacji, czego przykładem jest praca Todd i wsp. (1997). Porównują oni w niej dwie populacje *Lepeophtheirus salmonis*, pasożytniczego widłonoga zarówno dzikich jak i hodowlanych populacji łososi.

Uzupełniając powyższe rozważania pragnę dodać, że w roku 1998 przeprowadziłam wstępne badania nad ustaleniem kariotypów widłonogów z rodzaju *Achtheres* pasożytujących na okoniu i sandaczu (Kempter i Piasecki 1998). W toku tych badań ustalono, że liczba chromosomów u *Achtheres* „S” wynosi  $2n = 32(?)$ . Wyniki powyższe mają charakter wstępny. Badania nad kariotypami są bardzo pracochłonne a wyciągnięcie wiarygodnych wniosków wymaga wielokrotnych powtórzeń. Żywicielskie ryby pochodziły z Trzebieży a nie jak w przypadku materiału niniejszej pracy z jeziora Dąbie. Jest to na tyle ważne, iż aby oszacować liczbę chromosomów należy przeliczyć je na około stu preparatach z dobrze widocznymi płytkami metafazowymi pochodzącymi z różnych osobników. W przypadku pasożytów ryb, powinny one być zebrane z kilku różnych zbiorników wodnych.

Odkrycie reakcji PCR i pojawienie się zupełnie nowych metod spowodowało w ciągu ostatnich 15 lat lawinowy wzrost liczby naukowców stosujących owe metody rutynowo w swoich badaniach. Myślę, że równie szybko wzrośnie liczba ichtiopatologów posługujących się technikami molekularnymi i wówczas da to większe możliwości porównania i skonfrontowania wyników. Nie należy jednak zapominać, iż podstawą w taksonomii pasożytów jest morfologia i wszystkie inne badania mogą stanowić wartościowe uzupełnienie obserwacji nad kształtem, rozmiarami i szczegółami





budowy poszczególnych narządów i struktur u Copepoda. Dodatkowych „kłopotów” dostarcza niemożliwość postawienia jednoznacznej granicy pomiędzy takimi taksonami jak rasa, podgatunek, gatunek ewoluujący, czy „ustabilizowany” gatunek.

Krzanowska i wsp. (1997) w „Zarysie mechanizmów ewolucji” zauważają, że pod każdym względem (izolacja rozrodcza, zróżnicowanie morfologiczne, ekologiczne czy molekularne) obserwujemy w przyrodzie zmienność o charakterze ciągłym, a powstawanie gatunków jest procesem dynamicznym i zawsze możemy mieć do czynienia z populacjami znajdującymi się na różnych etapach specjacji. Jak już wcześniej wspomniano granica między rasą i podgatunkiem, czy podgatunkiem a gatunkiem jest trudna do zdefiniowania i może być bardzo subiektywna. U badanych form *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” zaobserwowano różnice, które wskazują, że proces specjacji zaczął się już dawno i że jest bardzo zaawansowany (dla zwolenników ewolucyjnej koncepcji gatunku) lub zakończony (dla zwolenników ewolucyjno-nominalistycznej koncepcji gatunku). Opisane różnice w budowie przydatków, kształcie i proporcjach ciała a szczególnie w DNA tych widłonogów pozwalają na jednoznaczne odróżnienie tych dwóch form żywicielskich. Jeżeli porównamy widłonogi z rodzaju *Achtheres* pasożytujące u okonia i sandacza z widłonogiem *Tracheliastes polycolpus* von Nordmann, 1832 występującym u jазia i płoci (Kabata 1979) oraz *Tracheliastes maculatus* Kollar, 1835 atakującym leszcza (Piasecki 1987) dojdziemy do wniosku, że zakres różnic morfologicznych tych dwóch ostatnich gatunków jest porównywalny z zakresem różnic zaobserwowanych między *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” w trakcie niniejszych badań. Jeżeli zatem wspomniane formy *Tracheliastes* występujące u leszcza i jазia są uznawane (od początku) za odrębne gatunki to dwie badane formy *Achtheres*, o których wiadomo dodatkowo, że różnią się też genetycznie, jak najbardziej zasługują na status osobnych gatunków. Zarówno z tekstu oryginalnego opisu (von Nordmann 1832) jak i zdeponowanych okazów





(Piasecki 1993b) wynika, że berliński uczony w swoim opisie miał na myśli przede wszystkim formę z okonia. Nie wiemy na pewno jaka była inna ryba, na której pasożyt miałby rzekomo występować – sandacz czy jazgarz? Dlatego też uzasadnione wydaje się aby nazwa *Achtheres percarum* von Nordmann, 1832 była stosowana w odniesieniu do gatunku pasożytującego u okonia, podczas gdy dla gatunku z sandacza uzasadnione wydaje się przywrócenie zapomnianej już nazwy *Achtheres sandrae* Gadd, 1901.





## V WNIOSKI

1. Osobniki *Achtheres* „S” mają bardziej wydłużony tułów genitalny niż osobniki *Achtheres* „O”, oraz zdecydowanie większy wyrostek kopulacyjny.
2. Przeprowadzenie szczegółowych obserwacji budowy i struktury przydatków głowowych u obu form badanych widłonogów pozwoliło na stwierdzenie, że *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” różnią się wyraźnie kształtem i szczegółami uzbrojenia anten I pary, anten II pary oraz maxilipediów.
3. Analiza statystyczna wyników pomiarów wykazała przydatność takich cech jak: długość maxilli II pary, długość wyrostka kopulacyjnego, długość płytki głowowej, długość głowotułowia i całkowita długość ciała do identyfikacji dwóch form *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”.
4. Skonstruowany model matematyczny bazujący na wszystkich pięciu cechach istotnych statystycznie pozwala na jednoznaczne zidentyfikowanie form *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”. Sprawdzalność modelu wynosi 75%.
5. Dendrogram utworzony w oparciu o badania biometryczne, wykazał obecność dwóch wyraźnych skupień. Fakt ten pozwala na stwierdzenie, że formy *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” wyraźnie się różnią proporcjami ciała.





## VI LITERATURA

6. Technika PCR/RFLP daje możliwość **jednoznacznego** odróżnienia osobników reprezentujących formy *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”.
7. Układy ze starterami EU5.8S i EU18S oraz 18SF1 i 28SR, mogą być zastosowane jako układy identyfikacji osobników reprezentujących formy *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S”.
8. Wzory restrykcyjne produktów PCR uzyskanych na matrycach izolowanych z form *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” były różne dla **wszystkich** testowanych enzymów restrykcyjnych.
9. W oparciu o badania morfologiczne, morfometryczne, oraz molekularne techniki genetyczne identyfikacji gatunków można stwierdzić, że badane formy żywicielskie *Achtheres* „O” i *Achtheres* „S” reprezentują **dwa różne gatunki**. Dla gatunku z okonia uzasadnione wydaje się stosowanie nazwy *Achtheres percarum* von Nordmann, 1832, podczas gdy dla gatunku z sandacza uzasadnione wydaje się przywrócenie zapomnianej już nazwy *Achtheres sandrae* Gadd, 1901.







## VI LITERATURA

1. **Adamczyk L.H.**, 1974: Nowe i rzadkie w faunie Polski gatunki pożytyków ryb. *Annales Universitatis Marie Curie-Skłodowska Lublin – Polonia Sectio C.*, **29**, 9: 107–117.
2. **Amado M. E., J. -s. Ho, C. E. Falavigna da Rocha**, 1995: Phylogeny and biogeography of the Ergasilidae (Copepoda, Poecilostomatoida), with reconsideration of the taxonomic status of the Vaigamidae. *Contributions to Zoology*, **65** (4): 233–243.
3. **Barkovskaja B.B.**, 1998: Izmenienienije parazitofauny okunia *Perca fluviatilis* i plotvy *Rutilus Rutilus* – Newskoj Guby Finskogo Zaliva za dlitelnyj promezutok vremeni. *Parazitologija*, **32**, 1: 52–58.
4. **Barnes H., M. Barnes**, 1953: Biometry of the copepod *Calanus finmarchicus* (Gunn.) in stages V and VI. *J. Mar. Ass. U. K.*, **32**: 305–313.
5. **Basset-Smith**, 1899: Systematic Description of Parasitic Copepoda found on the Fishes with an Enumeration of the known Species. *Proc. Zool. Soc.* **2**: 438–507.
6. **Bednarczuk B.**, (red.), 1994: Tablice biologiczne. Wydawnictwo Adamantan, Warszawa.
7. **Belmonte G.**, 1998: The egg morphology of 7 Acartiidae species: a preliminary survey of the ootaxonomy of Calanoida. *Journal of Marine Systems*, **15**: 35–39.
8. **Berrilli F., S. D. Amelio, L. Rossi**, 2000: Genetic variation in *Sarcoptes scabiei* from different hosts. *Acta Parasitologica*, **45** (3), 154.
9. **Bielawski S.**, 1977: Rozmieszczenie sandaczy w jeziorze Jeziorak. *Bibl. Uniw. W. M. Olsztyn* (wg Brylińska 1991)





10. **Bielecki A.**, 1990: *Caspiobdella fadejewi* (Epshtein, 1961) (Hirudinea, Piscicolidae) gatunek pijawki nowy dla fauny Polski. Przegląd Zoologiczny, **34**, 1: 95–99.
11. **Błaszczyk P.**, 1999: Biologiczno-eksploatacyjna charakterystyka sandacza *Stizostedion lucioperca* (L., 1758) poławianego w wodach Międzyodrza. Rozprawa doktorska. Akademia Rolnicza w Szczecinie.
12. **Borowski W., H. Dąbrowski**, 1998: Zasoby ryb i rybołówstwo Zalewu Wiślanego w 1997 r. Raporty MIR 1997, Gdynia 111–124.
13. **Boxshall G.A.**, 1984: Phylogeny of Mormonilloida and Siphonostomatoida. Proceedings of the Second International Conference on Copepoda, Ottawa, Canada, 13–17 August, 173–176.
14. **Brian A.**, 1906: Copepodi parassiti dei pesci d'Italia, Stab. Tipo-Litografico R. Istituto Sordomuti, Genova, pp.186.
15. **Brylińska M.**, (red.) 2000: Ryby słodkowodne Polski. Wydanie Nowe, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
16. **Brylińska M.**, 1991: Ryby słodkowodne Polski. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
17. **Bucklin A., A.M. Bentley, S.P. Franzen**, 1998: Distribution and relative abundance of *Pseudocalanus moultoni* and *P. newmani* (Copepoda: Calanoida) on Georges Bank using molecular identification of sibling species. Marine Biology, **132**: 97–106.
18. **Burmeister H.**, 1833: Beschreibung einiger neuen oder weniger bekannten Schmarotzerkrebse nebst allgemeinen Betrachtungen über die Gruppe, welcher sie angehören. Acta Acad. Caes. Leop. Carol. Nat. Cur. **17**: 3–68.
19. **Capart T.A.**, 1944: Notes sur les copepodes parasites. II Bull. Mus. Hist. Nat. Belg. **20**, 22: 1–4.





20. **Chojnacki J.**, 1976: Ocena tendencji skupiskowych zooplanktonu na podstawie liczebności, suchej masy i wartości energetycznej. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Szczecinie, **60**: 13–30.
21. **Chrzanowski Z.**, 1973: Mały słownik zoologiczny. Ryby. Wiedza Powszechna, Warszawa.
22. **Cihar J.**, 1992: Przewodnik. Ryby słodkowodne. Multicko, Warszawa.
23. **Claus C.**, 1862: Über den Bau und die Entwicklung von *Achtheres percarum*. Zeitschr. Wiss. Zool., **11**(3): 287–308.
24. **Dąbrowska Z.**, 1970: Fish parasites of the Vistula River near Warszawa. Acta parasit. pol., **17**, 21: 189–193.
25. **De Meeüs T.**, 1992: Genetic heterogeneity within populations of *Lepeophtheirus europaensis* (Copepoda: Caligodae) parasitic on two host species. Intern. J. for Parasitology, **22**, 8: 1179–1181.
26. **Deets G. B.**, 1988: Phylogenetic analysis of the Eudactylinae (Crustacea: Copepoda: Siphonostomatoida), with description of two new genera. Proc. Biol. Soc. Wash., **101** (2): 317–339.
27. **Dogiel W.A., B.E. Bychowski**, 1939: Parazity ryb Kaspijskiego Moria. Izd. Akad. Nauk ZSSR, Moskva-Leningrad.
28. **Drewa G.**, (red.) 1995: Podstawy genetyki dla studentów i lekarzy. Wyd. Volumed, Wrocław.
29. **Drzycimski I.**, 1967: Zwei neue Cletodidae (Copepoda Harpacticoida) aus dem Westnorwegien Küstengebiet. Sarsia, **29**: 199–206.
30. **Drzycimski I.**, 1968 a: Drei neue Harpacticoida aus Westnorwegien, Sarsia, **36**: 55–64.
31. **Drzycimski I.**, 1968 b: *Metahuntemennia* Smirnov und *Apodella* Por (Copepoda, Harpacticoida) mit beschreibung einer neuen Art aus dem Westnorwegien Küstengebiet. Sarsia, **31**: 127–130.
32. **Drzycimski I.**, 1968: Neue Harpacticoida (Copepoda) aus dem Westnorwegien Küstengebiet. Sarsia, **31**: 15–24.





33. **Drzycimski I.**, 1976 a: Zwei neue Harpacticoidea (Copepoda) aus dem Westnorwegien Küstengebiet. *Sarsia*, **30**: 75–82.
34. **Ejsymont L.** 1970: Parasites of common burbot, *Lota lota lota* (L), from the river Biebrza. *Acta parasit. pol.*, **17**, 22: 195–201.
35. **El-Tantawy S.A.M.** 1989a: Myxosporidia pasożytujące u ryb z jezior Dgół Wielki i Warniak (Pojezierze Mazurskie). I. Przegląd pasożytów. *Acta parasit. pol.*, **34**, 3: 203–219.
36. **El-Tantawy S.A.M.** 1989b: Myxosporidia pasożytujące u ryb z jezior Dgół Wielki i Warniak (Pojezierze Mazurskie). II. Zarażenie ryb. *Acta parasit. pol.*, **34**, 3: 22 –233.
37. **Filuk** 1962: Prace MIR, A, 11: 225–274 (wg Brylińska M., 1991)
38. **Froese R., D. Pauly.**(Red.) 2001: FishBase. World Wide Web electronic publication. [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org), 30 January 2001.
39. **Frost B. W.**, 1989: A texonomy of the marine calanoic copepod genus *Pseudocalanus*. *Can. J. Zool.* **67**: 525–551.
40. **Gadd P.**, 1901: Nagra forut obeskrifna, parasitiskt lefvande Copepoder. *Medd. Soc. Fauna Flora fenn.*, **27**: 98–100.
41. **Gajardo G., N. Colihueque, M. Parraguez, P. Sorgeloos**, 1998: International study on *Artemia* LVIII. Morphologic differentiation and isolation of *Artemia* populations from South America. *Int. Journ. of Salt Lake Research* **7**: 133–151
42. **Geyer F.**, 1939a: Einige Beobachtungen über parasitische Copepoden von Balaton – Fischen. *Fragm. Faun. Hung.* **2**, 2: 24–27.
43. **Geyer F.**, 1939b: Über parasitische Lernaepodidaen von Balaton– Fischen (Ungarn). *Zool. Anz. Bd.* **127**: 145–159.
44. **Geyer F.**, 1940: Beobachtungen über parasitische Copepoden. Nachträge und Berichtungen. *Fragm. Faun. Hung.* **3**, 1: 9–14.





45. **Giesbrecht W.**, 1892: Systematik und Faunistik der pelagischen Copepoden des Golfes von Neapel und des angrenzenden Meeres – Abschnitte. Fauna flora Golf. Neapel, 19: IX – 831 (wg Kabaty 1979).
46. **Grabda E., J. Grabda** 1971: Badania nad *Myxobolus sandrae* Reuss, 1906 (Myxosporidia, Myxobolidae) – pasożytem sandacza – *Lucioperca lucioperca* (L.) – w Polsce. Roczniki Nauk Rolniczych, Seria H. **93**, 2: 13–30.
47. **Grabda-Kazubska B., B. Baturo-Warszawska, T. Pojmańska**, 1987: Dynamika zarażenia ryb pasożytami w jeziorach Dgał Wielki i Warniak w związku z introdukcją ryb roślinożernych. Acta parasit. pol., **32**, 1: 1–28.
48. **Grigg H., L. J. Holmes, S.J. Bardwell**, 1985: Seasonal observations on the biometry and development in copepodite stage V of *Calanus finmarchicus* from the Firth of Clyde. Marine Biology, Berlin, **88** (1): 73–83.
49. **Groba J.** 1973: Experimentally increased fish stock in the pond type lake Warniak. V. Parasites of fish. Ekologia Polska, **21**, 31: 505–518.
50. **Gurney R.**, 1933: British fresh-water Copepoda. The Ray Society, London.
51. **Hajduk D., Z. Hajduk**, 1984: Fauna Hirudinea środkowego i dolnego odcinka rzeki Biebrzy i jej starorzeczy. Wiad. parazyt., **30**, 2: 241–248.
52. **Heese T.**, 1985: Charakterystyka morfologiczna i biologiczna siei *Coregonus lavaretus* (L., 1758) Zatoki Pomorskiej. Rozprawa doktorska, Akademia Rolnicza, Szczecin.
53. **Ho J.-s.**, 1990: Phylogenetic analysis of Copepod orders. Journal of Crustacean Biology, **10** (3): 528–536.
54. **Ho J.-s.**, 1991: Phylogeny of Poecilostomatoida: a major order of symbiotic copepods. [w:] Uye S. I., S. Nishida, J.-s. Ho (red.). Proceedings of the Fourth International Conference on Copepoda. Bulletin of Plankton Society of Japan, Special Volume: 25–48.





55. **Hums A.G., R.U., Gooding**, 1964: A method for studying the external anatomy of Copepoda. *Crustaceana*, **6**, 3: 238–240.
56. **Huys R., G.A. Boxshall**, 1991: Copepod evolution. The Ray Society, London.
57. **Jara Z., A. Chodyniecki**, 1999: *Ichtiopatologia*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej, Wrocław.
58. **Jastrzębski M.**, 1984a: Polimorfizm świdrowców *Trypanosoma* Gruby, 1841 występujących we krwi karasia srebrzystego (*Carassius auratus gibelio* (Bloch), okonia (*Perca fluviatilis* L.) i jazgarza (*Acerina cernua* (L.)). *Wiadomości parazytologiczne*, **30**, 2: 171–181.
59. **Jastrzębski M.**, 1984b: Coccidiofauna of cultured and feral fishes in fish farms. *Wiadomości Parazytologiczne*, **30**, 2: 141–163.
60. **Kabata Z.**, 1963: The second antenna in the taxonomy of Clavellinae (Copepoda, Lernaepodidae). *Crustaceana*, **6**, 1: 5–14.
61. **Kabata Z.**, 1966: *Brachiella chevreuxii* van Beneden, 1891 (Copepoda, Lernaepodidae); a taxonomic problem. *Crustaceana*, **10**, 1: 98–108.
62. **Kabata Z.**, 1977: Evolution and systematics of parasitic copepoda. The Third Invitational Wardle Lecture, delivered at the Annual Meeting of the Canadian Society of Zoologists in Victoria, B.C. on Tuesday, May 10. 1977.
63. **Kabata Z.**, 1979: *Parasitic Copepoda of British Fishes*. The Ray Society, London.
64. **Kazubski S.L., K. Migala**, 1974: Studies on the distinctness of *Chilodonella cyprini* (Moroff) and *Ch. hexasticha* (Kiernik) (Chlamydodontidae, Gymnostomatida), Ciliate parasites of fishes. *Acta Protozoologica*, **13**, 3: 9–40.
65. **Kazubski S.L., M. Pilecka-Rapacz**, 1981: Morphological variability of *Trichodina nigra* Lom (Ciliata, Peritrichida), a parasite of *Lucioperca lucioperca* (L.) from Szczecin Gulf. *Acta Protozoologica*, **20**, 1: 103–107.





66. **Kempton J., W. Piasecki**, 1998: Karyotypes of three nominal species of Lernaepodid Copepods (Crustacea) parasitic on freshwater Fishes. PTP 18<sup>th</sup> Congres Abstracts, Wiadomości Parazytologiczne **44**, 3.
67. **Kijewska A., G. Węgrzyn, K. Ogawa, J. Rokicki**, 2000: RFLP analysis of *Anisakis simplex* rDNA from worms isolated from different geographical regions. Acta Parasitologica, **45** (3), 190.
68. **Kofta W.**, 1997: Podstawy inżynierii genetycznej. Wydaw. Prószyński i Spółka, Warszawa.
69. **Korycki A.**, 1976: Sandacz. PWRiL, Warszawa.
70. **Kottelat M.**, 1997: European freshwater fishes. Biologia 52, Suppl. **5**: 1–271.
71. **Kozicka J.** 1953: Pasożyty ryb w jeziorze Tajty. Rocz. Nauk roln. D, **67**: 171–186.
72. **Kozicka J.** 1971: Larwy tasiemców z rodziny Dilepididae Fuhrmann, 1907, pasożytujące w rybach słodkowodnych w Polsce. Acta parasit. pol., **19**, 6: 81–93.
73. **Kozicka J.**, 1958: Diseases of fishes of Družno Lake (Parasitofauna of the biocenosis of Družno Lake – part VII). Acta parasit. pol., **6**, 20: 393–432.
74. **Kozicka J.**, 1959: Parasites of fishes of Družno Lake (Parasitofauna of the biocoenosis of Družno Lake – part VIII). Acta parasit. pol. **7**, 1: 1–72.
75. **Kozikowska Z.**, 1957: Skorupiaki pasożytnicze (Crustacea parasitica) Polski. Część I. Pasożyty ryb wód ujściowych Odry. Zoologica poloniae, **8**: 217–270.
76. **Kozikowska Z.**, 1975: *Ergasilus sieboldi* Nordm., przystosowanie pasożyta do morfologii i biologii żywiciela oraz uzupełnienie danych o występowaniu innych gatunków pasożytniczych skorupiaków na terenie Mazur i Warmii. Acta Universitatis Wratislaviensis. Prace zoologiczne, **7**: 3–40.





77. **Kozikowska Z., Z. Jara, E. Grabda**, 1956: *Achtheres percarum* Nordm. u okonia i sandacza (próba wyjaśnienia wzajemnego stosunku form: *percarum* i *sandrae*). *Zoologica Poloniae*, 7: 219–260.
78. **Kraczkiewicz W.**, 1969: *Przegl. Zool.* 13: 191–195 (wg Brylińska M., 1991)
79. **Krøyer H.**, 1838: Om snyltekrebse, isaer med hensyn til den danske fauna. *Naturh. Tidsskr.*, 2: 8–52, 131–157.
80. **Krzanowska H., A. Łomnicki, J. Rafiński, H. Szarski, J. M. Szymura**, 1997: *Zarys mechanizmów ewolucji*. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa.
81. **Krzykawski S., B. Więcaszek, S. Keszka, A. Antoszek**, 1999: Systematyka kragłoustych i ryb. Skrypt Akademii Rolniczej, Szczecin
82. **Krzykawski S., M. Uciechowski, S. Keszka, B. Więcaszek**, 1999a: Biometric analysis of spined loach *Cobitis taenia* (L.) from the lake Głębokie in Szczecin (NW Poland). *International Conference Loaches of the Genus Cobitis and Related Genera. Abstract Book*, Brno, 21.
83. **Krzykawski S., S. Keszka, M. Uciechowski, B. Więcaszek**, 2000: Mensural and meristic characters of spined loach *Cobitis taenia* (Pisces: Cobitidae) from West pomerania (NW Poland). *Folia Zool.* 49 (1): 241–248.
84. **Kulwiec Z.**, 1931: Kostjaza w polskich gospodarstwach karpiowych. *Przegląd ryb.*, 4, 9–10: 194–197.
85. **Kur J.**, 1994: *Podstawy inżynierii genetycznej: teoria, ćwiczenia, testy*. Skrypt Politechniki Gdańskiej, Gdańsk.
86. **Kur J.**, 1994a: *Metody diagnostyczne oparte na analizie DNA (PCR)*. Materiały kursu organizowanego przez Katedrę Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej oraz DNA-Gdańsk we współpracy z A&A Biotechnology.





87. **Kurz W.**, 1877: Studien über die Familie der Lernaepodiden. Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig.
88. **Lazzaretto I.**, 1983: Karyology and chromosome evolution in the genus *Tisbe* (Copepoda). *Crustaceana* **45** (1), 85–95.
89. **Libertini A., I. Lazzaretto**, 1992: Location of nucleolus organizer regions (NORs) in karyotypes of three sibling species of *Tisbe* of the “*gracilis*” group, (Copepoda, Harpacticoida). *Rend. Fis. Acc. Lincei*, **9**, 3: 67–73.
90. **Lindeque P.K., R.P. Harris, M.B. Jones, G.R. Smerdon**, 1999: Simple molecular method to distinguish the identity of *Calanus* species (Copepoda: Calanoida) at any developmental stage. *Marine Biology* **133**: 91–96.
91. **Marcotte B. M.**, 1986: Phylogeny of the Copepoda Harpacticoida. [w:] Schriever G., H. K. Schminke, C.-t. Shih (red.). *Proceedings of the Second International Conference on Copepoda*, Ottawa, Canada, 13–17 August, 1984. *Syllogeus* **58**: 186–190.
92. **Markevič A.P.**, 1956: Parazitičesije veclonogije ryb ZSSR. Izdatielstvo Akademii Nauk Ukrainskoj SSR, Kijew.
93. **Markewitsch A.P.**, 1932: Bemerkungen über die Systematik einiger Vertreter der Gattung *Achtheres* v. Nordmann 1832. *Zoologischer Anzeiger*, **99**: 31–41.
94. **Markewitsch A.P.**, 1934: Die Schmarotzerkrebse der Fische der Ukraine. *Annales Musei Zoologici Polonici*, **10**, 12: 223–251.
95. **Markewitsch A.P.**, 1935: Die Schmarotzerkrebse der Fische aus dem Kontschseegebiet (Karelien). *Memoranda Societatis pro Fauna et Flora Fennica, Helsingforsiae*, **11**: 40–47.
96. **Matejusova I., C. Cunningham, M. Gelnar**: 2000: Molecular diversity of gyroductylids. *Acta Parasitologica*, **45** (3), 155.





97. **Mayr E., P. Aschlock**, 1991: Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, inc. 475.
98. **McLaren i.A., D. J. Marcogliese**, 1982: Similar nucleus numbers among copepods. Can. J. Zool., **61**: 721–724.
99. **Messjatzeff I.**, 1926: Parasitische Copepoden aus dem Baikal-See. Archiv f. Naturgeschichte, **92**, 120–134.
100. **Milicer W.**, 1938: Über die parasitischen Wurmer aus den Fischen des Wigrysees. Arch. Hydrobiol. I Ryb., Suwałki, **11**: 96–117.
101. **Milne-Edwards M.**, 1840: Histoire Naturelle des Crustaceas. Librairie Encyclopédique de Roret, Paris.
102. **Monod Th., V. Vladykov**, 1931: Sur quelques copepodes parasites provenant de la Russie Sous-Carpathique (Tschecoslovaquie). Ann. De Parasit. He et comp. **9**, 3: 202–224.
103. **Mullis K.B., F.A. Faloona**, 1987: Specyfic synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. Method Enzymol. **155**: 335–350.
104. **Nascetti G., S. Mattiucci, R. Cianchi, B. Berland, L. Bullini, L. Paggi**, 2000: Genetic relationships among *Contracaecum* spp. (Nematoda: Anisakidae), parasites of cormorants and pelicans of the Boreal Region. Acta Parasitologica, **45** (3), 153.
105. **Neresheimer E.**, 1908: Studien über Süßwasser – Lernaeopodiden. Ber. Kgl. Bayr. Biol. Versuchstation, München.
106. **Neresheimer E.**, 1909: Copepoda in der Süßwasserfauna Deutschlands, II Teil: Die parasitischen Copepoden **11**: 339–397.
107. **Niewiadomska K.** 1977: Pasożyty wylęgu i narybku niektórych gatunków ryb z jezior konińskich. Roczniki Nauk Rolniczych, Seria H. **97**, 4: 45–59.
108. **Niewiadomska K.** 1988: Metacerkarie *Diplostomum* (Digenea) z ryb jezior Dgół Wielki i Warniak: *D. numericum* sp.n. oraz *D. baeri*





- Dubois, 1937 wraz z uwagami o synonimie tego gatunku. *Acta parasit. pol.*, **33**, 1: 7–24.
109. **Von Nordmann A.**, 1832: *Mikrographische Beiträge zur Naturgeschichte der wirbellosen Thiere*. Gedruckt and verlegt bei G. Reimer, Berlin.
  110. **Olsson P.**, 1877: *Prodromus faunae copepodorum parasitantium Scandinaviae*. *Acta Univ. Lund.*, 5: 1–49.
  111. **Pastuszko J., M. Jastrzębski, M. Kłoczewska**, 1984: Rola chwastu rybiego w rozprzestrzenianiu inwazji pasożytniczych w karpowych gospodarstwach stawowych. *Wiad. parazyt.*, **30**, 2: 223–227.
  112. **Piasecki W.**, 1987: Cykl rozwojowy *Tracheliastes maculatus* Kollar, 1835 (Copepoda; Siphonostomatoida; Lernaepodidae). Rozprawa doktorska. Akademia Rolnicza w Szczecinie.
  113. **Piasecki W.**, 1993b: The types of Copepoda Parasitic on Fishes Deposited in the Zoological Museum Berlin. *Mitt. Zool. Berl.* 69, **1**: 165–173.
  114. **Piasecki W.**, 1993c: Crustacean parasites from three fish species from the Odra River estuary, Poland. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, **23**, 1: 77–87.
  115. **Piasecki W., A. Wołoszyn**, 1991: Masowa inwazja *Achtheres percarum* von Nordmann, 1832 (Copepoda, Siphonostomatoida, Lernaepodidae) u okonia *Perca fluviatilis* L. w wodach ujściowych Odry. *Materiały XVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego*, Poznań, 27.
  116. **Piasecki W., E. Sobecka**, 1987: Przypadki występowania patogennych dla człowieka larw nicieni *Anisakis simplex* w sandaczach *Stizostedion lucioperca* (L.) poławianych w wodach ujściowych Odry. *Materiały XV Zjazdu Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego*. Katowice, 24–26 września 1987, s. 97.





117. **Piasecki W., J. Wierzbicka, J. Kempter**, 2000: A new Monogenean species parasitic on gills of bigmouth sole, *Hippoglossina stomata* Steindachner, 1876 from Southern California. *Acta Ichthyologica et piscatoria*, **30** (1): 127–134.
118. **Pojmańska T., B. Grabda-Kazubska, Kazubski S.L., J. Machalska, K. Niewiadomska**, 1980: Parasite fauna of five fish species from the Konin lakes complex, artificially heated with thermal effluents, and from Gopło lake. *Acta parasit. pol.*, 27, **38**: 319–357.
119. **Prost M.**, 1994: Choroby ryb. Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych, Lublin.
120. **Radziejewska T., J. Masłowski**, 1995: Macro- and meiobenthos of the Arkona Basin (western Baltic Sea): differential recovery following hypoxic events. *The Responses of Marine Organisms to Their Environments. Proceedings of 30<sup>th</sup> European Marine biology Symposium*, U.K., 251–262.
121. **Rokicka-Praxmayer J., T. Radziejewska, H. Dworczak**, 1998: Meiobenthic communities of the Pomeranian Bay (southern Baltic): effects of proximity to river discharge. *Oceanologia*, 40 (3), 243–260.
122. **Rokicki J.** 1975: Helminths fauna of fishes of the Gdańsk Bay (Baltic Sea). *Acta Parasitologica Polonica*, **23**, 2: 37–84.
123. **Rolbiecki L., J. Rokicki**, 1996: Parasitic Metazoa of pike-perch (*Stizostedion lucioperca* L.) in the Gulf of Gdańsk. *Estuarine ecosystems and species. Proceedings of the 2-nd International Symposium held in Gdańsk*, 73–85.
124. **Romanowski P.**, 2000: Parazytofauna okonia *Perca fluviatilis* L. z Zatoki Pomorskiej. Praca Magisterska. Akademia Rolnicza w Szczecinie.
125. **Romuk-Wodoracki D.** 1989: *Henneguya wolinensis* n.sp. (Myxosporea) from perch *Perca fluviatilis* L. from Szczecin firth, Poland. *Acta Ichth. Piscat.*, **20**, 2: 91–96.





126.     **Saiki R.K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim**, 1985: Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**: 1350–1354.
127.     **Sars G.O.**, 1903: Copepoda Calanoida. An account of the Crustacea of Norway, with short descriptions and figures of all the species, **4**: I – IV, 1-171 (wg Kabaty 1979).
128.     **Schizas N.V., G.T. Street, B.C. Coull, G.T. Chandler, J.M. Quatro**, 1997: An efficient DNA extraction method for small metazoans. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **6**, 4: 381–383.
129.     **Scott T.**, 1901: Notes on some parasites of fishes. 19th Ann. Rep. Fish. Bd. Scotl. 120–153 (wg Yamaguti 1963).
130.     **Scott T., A. Scott**, 1913: The British Parasitic Copepoda. Vol. 1 Copepoda parasitic on Fishes. Printed for the Ray Society, London.
131.     **Serwotka J.**, 1999: Rozważania na temat biologii, morfologii i ekologii kolcogłowa *Pomphorhynchus leavis* (Müller, 1776) na tle własnych badań nad występowaniem tego gatunku u storni (*Platichthys flesus* L.) z Zatoki Pomorskiej. Praca magisterska, Akademia Rolnicza, Szczecin.
132.     **Skrenty K.**, 1999: Parazytofauna okonia *Perca fluviatilis* z jeziora Miedwie. Praca Magisterska, Akademia Rolnicza w Szczecinie.
133.     **Sterud E., C. Appleby**, 1996: Parasites of common asp (*Aspius aspius*), bream (*Abramis brama*) and zander (*Stizostedion lucioperca*) from the River Nitelva, South-Eastern Norway. *Bull. Scand Soc Parasitol.*, **6**, 2: 134–138.
134.     **Szostakowska B., P. Myjak, J. Kur**, 1998: Molecular studies on *Hysterothylacium aduncum* and other Nematode species (Ascaridida, Anisakidae) isolated from Baltic Sea Fish. *Wiadomości Parazytologiczne*, **44**: 490.





135. **Thorell T.**, 1859: Kännedom om Krustaceer. Som Lefva i Arter af Slaget Ascidia L.
136. **Todd C.D., A.M. Walker, K. Wolff, S.J. Northcott, A.F. Walker., M.G. Ritchie, R. Hoskins, R.J. Abbott, N. Hazon**, 1997: Genetic differentiation of populations of the copepod sea louse *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer) ectoparasitic on wild and farmed salmonis around the coasts of Scotland: Evidence from RAPD markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **210**: 251–274.
137. **Tuuhah., E.T. Valtonen, J. Taskinen**, 1992: Ergasilid copepods as parasites of perch *Perca fluviatilis* and roach *Rutilus rutilus* in central Finland: seasonality, maturity und environmental influence. *J. Zool. Lond.* **228**: 405–422.
138. **Vastradovsky J.**, 1976: Ryby i przynęty. PWRiL, Warszawa.
139. **Waluga D., T. Własow**, 1988: Występowanie pasożytów u leszcza (*Abramis brama* L.), płoci (*Rutilus rutilus* L.) i sandacza (*Stizostedion lucioperca* L.) we Włocławskim zbiorniku zaporowym na rzece Wiśle. *Wiad. parazyt.*, **34**, 1: 65 – 75.
140. **Wegener G.**, 1910: Die Ektoparasiten der Fische Ostpreußens. *Schriften der Physikalisch-ökonomischen Gesellschaft zu Königsberg in Preußen.*
141. **Węgleński P.**, (red.) 1996: Genetyka molekularna. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
142. **Wierzbicka J., K. Wierzbicki**, 1973: Metacerkarie z rodzaju *Apophallus* Lühe, 1909 (Trematoda: Heterophyidae) na Zachodnim Pomorzu Polski. *Acta Ichth. Piscat.*, **3**, 1: 75–89.
143. **Wierzbicki K.**, 1970: The parasite fauna of perch, *Perca fluviatilis* L., of Lake Dargin. *Acta Parasitologica Polonica*, **18**, 5: 45–55.





144. **Wierzbicki K.**, 1971: The effect of ecological conditions on the parasite fauna of perch *Perca fluviatilis* L. on Lake Dargin. *Ekologia polska* **19**, 5: 73–86.
145. **Więcaszek B., A. Paszko, A. Retmańczyk**, 1999: Biomorphometry of small sand eel *Ammodytes tobianus* L. (Pisces: Ammodytidae) from Gdańsk Bay. 16<sup>th</sup> Baltic Marine Biologists Symposium, Klaipeda, Lithuania, 97.
146. **Wiktor J.**, 1954: *Prace MIR*, 7: 49–61 (wg Brylińska M., 1991)
147. **Wilson C. B.**, 1910: The classification of the copepods. *Zool. Anz.*, **35**: 609–620.
148. **Wilson C. B.**, 1915: North American parasitic Copepods belonging to the Lernaeopodidae, with a revision of the entire family. Government printing Office, Washington.
149. **Wołos A.**, [red.] 1996: Sandacz, gospodarka rybacka, eutrofizacja. Materiały seminarium „Sandacz-gospodarka rybacka-eutrofizacja” Ostrowiec k. Wałcza, 6–7 czerwca 1995. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Śródlądowego, Olsztyn-Kortowo (79 stron).
150. **Wyngaard G.**, 2000: The contributions of Ulrich K. Einsle to the taxonomy of the copepoda. *Hydrobiol.*, **417**: 1–10.
151. **Wyngaard G.A., E.M. Rasch**, 2000: Patterns of genome size in the copepoda. *Hydrobiologia* **417**: 43–56.
152. **Wyrzykowska B.**, 1964: Trematodes and cestodes of fishes in the Zegrzyński reservoir. *Acta parasit. pol.*, **12**, 16: 151–164.
153. **Yamaguti S.**, 1963: Parasitic copepoda and branchiura of fishes. Interscience Publishers, 1104.
154. **Von Zaddach G.**, 1844: *Synopseos Crustaceorum Prussicorum prodromus. Regiomonti.* (wg Kozikowska 1957).
155. **Załachowski W.**, 1997: *Ryby.* Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa.

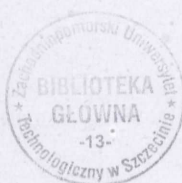




## **Podziękowania**

*Pracownikom Zakładu Chorób Ryb za stworzenie wspaniałej atmosfery w pracy. Panu dr inż. Stanisławowi Lenartowi z Politechniki Szczecińskiej za udostępnienie skaningowego mikroskopu elektronowego. Panu Prof. Józefowi Kurowi i Pani Dr Beacie Krawczyk z Politechniki Gdańskiej za udostępnienie laboratorium do badań molekularnych, oraz poświęcony czas, pomoc metodyczną i życzliwe uwagi podczas mojego pobytu w Gdańsku. Przedsiębiorstwu handlowo-produkcyjnemu „Certa 2” a w szczególności Panu Stanisławowi Kwiatkowi za uprzejmość i życzliwość.*

*Mężowi i dzieciom za wyrozumiałość.*

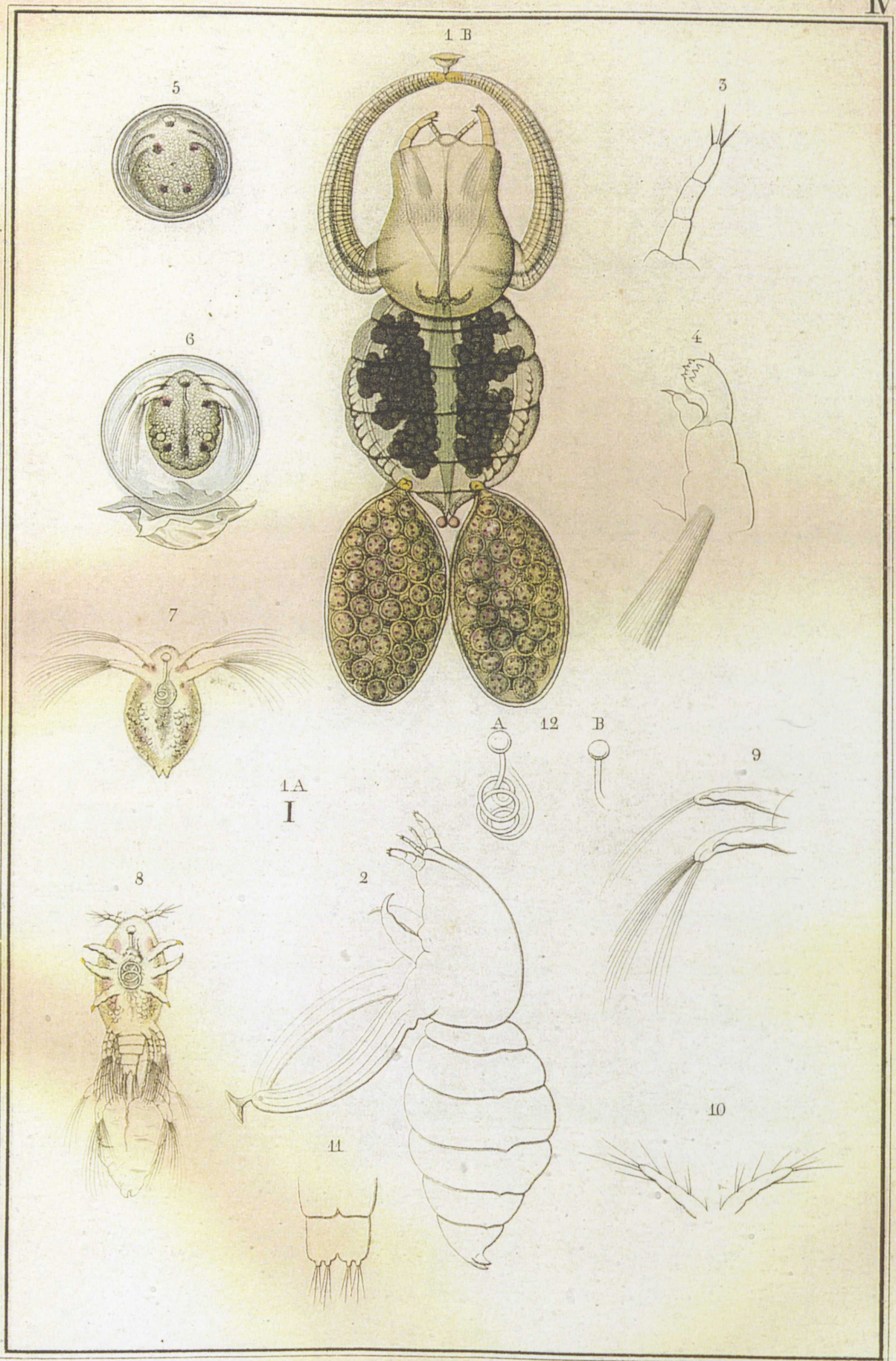




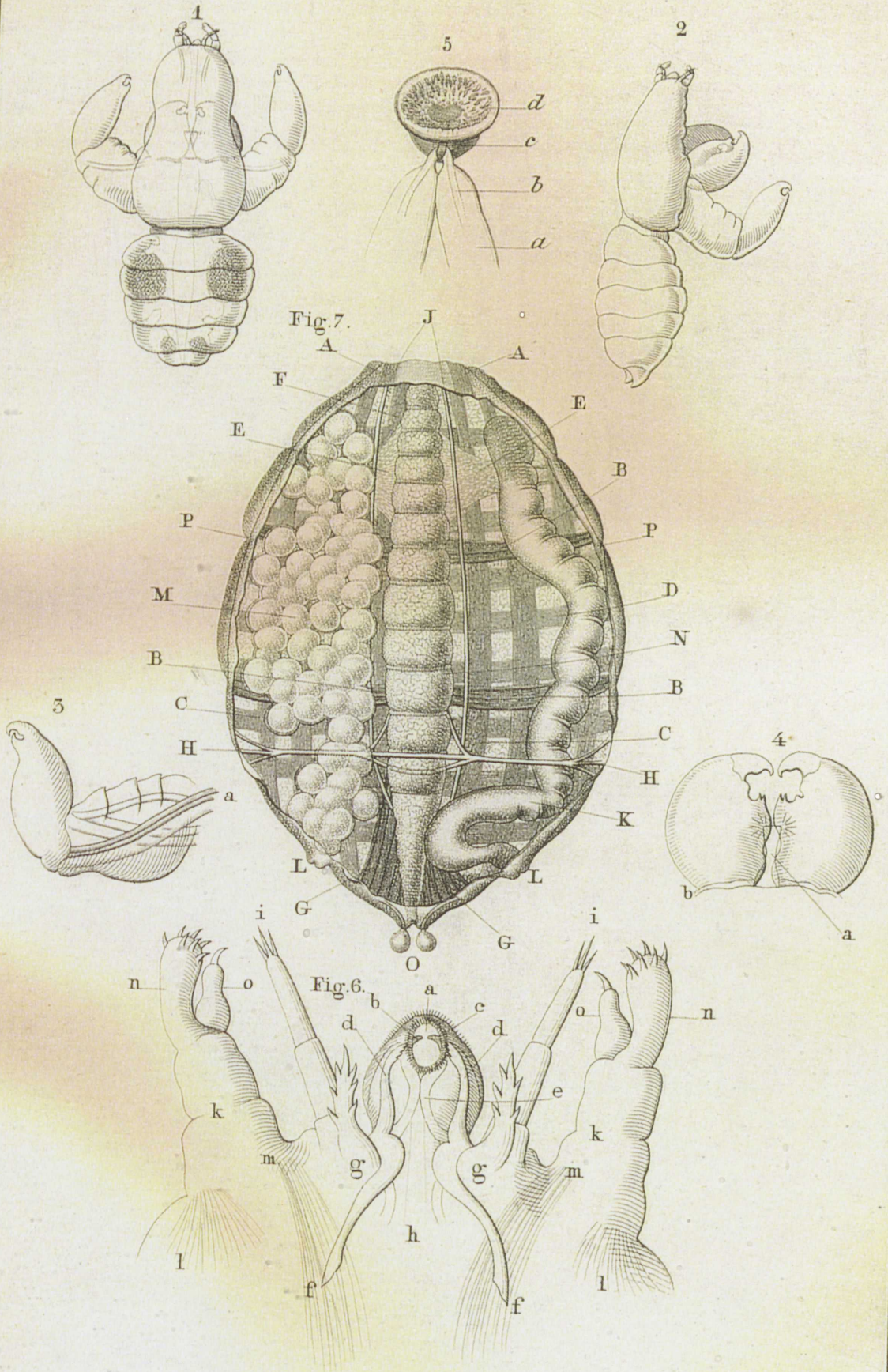














Biblioteka Główna  
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu  
Technologicznego w Szczecinie

CZ .57492



001-057492-00-0