

# MOLEKULÁRIS MÓDSZEREK SZEREPE MORFOLÓGIAILAG KÖZELÁLLÓ ENCHYTRAEIDA (*ENCHYTRAEIDAE*, *ANNELIDA*) FAJOK TAXONÓMIAI PROBLÉMÁINAK MEGOLDÁSÁBAN

Dózsa-Farkas Klára

az MTA doktora,  
ELTE Állattrendszertani és Ökológiai Tanszék  
kdozsafarkas@gmail.com

Boros Gergely

PhD, MTA Ökológiai Kutatóközpont Ökológiai  
és Botanikai Kutatóintézet, Vácrátót  
henlea@gmail.com

Felföldi Tamás

PhD, ELTE Mikrobiológiai Tanszék  
tamas.felfoldi@gmail.com

Cech Gábor

PhD, MTA Agrártudományi Kutatóközpont  
Állatorvos-tudományi Intézet Halkórtani  
és Parazitológiai Témacsoport  
cech@freemail.hu

## Bevezetés

Az *Enchytraeidae* család (televényférgek) a gyűrűsférgek (*Annelida*) törzsébe tartozó kisebb testű (0,2 mm – 2–3 cm nagyságú), többnyire fehéres színű férgeket foglal magába. Kivételesen ismerünk 10–17 cm hosszú (például: *Mesenchytraeus grandis*, Eisen 1904, *M. anteeus* Rota & Brinkhurst, 2000) és pigmentált (*M. franciscanus* Eisen, 1904, *M. melanocephalus* Christensen & Dózsa-Farkas, 1999), akár fekete színű *M. solifugus* (Emery, 1898) fajokat is Alaszkából. Jelentőségük szaprofág voltuk mellett abban van, hogy gyakran igen magas egyedszámban található (maximális egyedszámuk elérheti a 300 000 egyed/m<sup>2</sup>-t is), minden földrészen és szinte minden életterben élnek a trópusoktól a sarkkörökig, a tengerektől a gleccserek borította

magas hegyekig. A család harminc génuszának 690 elfogadott faja van, de ez a szám folyton növekszik.

Taxonómiájukban, rendszerezésükben, rokonsági viszonyaik feltárásában, mint majdnem minden állatcsoportban, napjainkban előtérbe kerültek a molekuláris biológiai vizsgálatok. Ennek oka, hogy ily módon feltárhatjuk az *Enchytraeidae* család génuszainak és fajainak egymáshoz való, valamint a többi gyűrűsféreghez viszonyított filogenetikai kapcsolatát. Cél továbbá annak felmérése, hogy a fajok morfológiai bélyegeinek variálása mennyire intraspecifikus vagy interspecifikus jellemzőként használható a fajok elkülönítésében, továbbá szinonimákat állapíthatunk meg, fajkomplexeket szüntethetünk meg, valamint kriptikus speciációk felfedése válik lehetővé.

Az *Enchytraeidae* családban az első molekuláris vizsgálatok enzimpolimorfizmusra irányultak (Christensen et al., 1976). Hasonló eredményeket ért el Volker Brockmeyer (1991), illetve Rüdiger M. Schmelz és munkatársai (2000), akik izozimek elkülönítése révén közel rokon *Enchytraeus* fajokat választottak szét. Schmelz (2003) a *Fridericia* gényt felölelő monografikus munkájában 34 fajra végzett teljes protein- és három enzim (észteráz, foszfoglükomutáz és malát-dehidrogenáz) vizsgálatot. Jelentős heterogenitást sikerült kimutatnia egyes taxonómiai problémás fajok esetében. Bent Christensen és Henrik Glenner (2010) molekuláris filogenetikai problémákra 4977 bázispár lefedéssel nukleáris- és mitokondriális gének analízisét vetette egybe bizonyos morfológiai bélyegekkel. Ezáltal érdekes új rokonsági kapcsolatok tudott kimutatni egyes génuszok között.

Talán a legjelentősebbek a Christer Erséus és munkatársai 2010-ben közzölt munkájában közzétett eredmények. Ők három mitokondriális (12S rDNS, 16S rDNS és COI) és két nukleáris (18S rDNS és 28S rDNS) génszakaszt vizsgálva tizennégy génusz nyolcvanhat fajának filogenetikai összehasonlítását végezték el. Eredményeik megerősítették az *Enchytraeidae* család monofiletikuságát, továbbá rámutattak arra is, hogy a génuszok is monofiletikusak. Kivételt képezett a *Lumbri-cillus* génusz, amelyet parafiletikusnak találtak, valamint felvetették a *Marionina* génusz revíziójának sürgősségét, éppen polifiletikus volta miatt. Megállapították továbbá, hogy a *Fridericia* génuszban amelltt, hogy monofiletikus kláduszt alkot, a génuszon belüli alacsony felbontás és más génuszokhoz viszonyítva kisebb genetikai távolságok miatt feltelezhető a közelmúltban végbement nagymértékű szétterjedés.

A molekuláris vizsgálatok alkalmazása kezd elterjedni az új fajok leírásának területén is, így például Pierre De Wit és Christer Erséus (2010) a mitokondriális COI- és a nukleáris ITS-régió szekvenálása és összehasonlítása alapján írta le új fajként a kizárólag tengerben élő génuszból a *Grania occultát*.

#### *Hazai kutatások és eredmények*

Az enchytraeida-kutatás hazánkban több mint negyven éve folyik, ez idő alatt hatvan új fajt, három alfajt és három új génuszt írtunk le a világ különböző részeiről, ezen belül a hazai faunából tizenöt génuszból kilencvenhat fajt mutattunk ki, amelyek közül huszonegy a tudományra nézve is új volt. Mivel a taxonómiai munka során az enchytraeidák morfológiai identifikálásában nagyon sok (> 30) bélyeg kombinációját használjuk, egyes esetekben nehéz eldönteni, hogy az eltérő struktúrák önálló fajokra utalnak, vagy intraspecifikus variációról van-e szó. Mivel ez a probléma többször is előkerült, vizsgálatainkban a hangsúlyt ezek megoldására fektettük. A hasonló fajok elkülönítésében, illetve morfológiai bélyegeikben kissé eltérő fajok azonosságának megállapításában a morfológiai és a molekuláris módszereket mindig együttesen alkalmaztuk. Az ITS-régió, valamint a COI szekvenálása, valamint ezek többféle filogenetikai rekonstrukciós módszerekkel történő kiértékelése többnyire megoldotta a taxonómiai nehézségeket.

A következőkben néhány ilyen probléma sikeres megoldásáról számolunk be.

1. A *Fridericia bulboides* csoportba tartozó négy faj biztos elkülönítését a feltűnően hasonló felépítésű *spermatheca* teszi problémássá. A morfológiai eltérések alapos felülvizsgálatához segítségül hívtuk a PCR-RFLP-technikát, és végül az ITS-régió restrikciós

enzimekkel való emésztésével sikerült megfelelően elkülöníteni a fajokat egy tudományra új faj (*Fridericia schmelzi*) leírása mellett (Cech – Dózsa-Farkas, 2005). A későbbiekben szekvenciaanalízist is végeztünk, ami megerősítette az előző eredményeket.

2. Ugyanakkor a *F. bulboidesen* belül két morfológiailag meglehetősen eltérő (ami a spermatoölcsér, a *penialis bulbosus* eltérő méretében és a *spermatheca* kivezető járatánál kialakuló mirigyek megjelenésében mutatkozó) variánst találtunk, azonban sem a PCR-RFLP, sem a szekvenciaelemzés nem mutatott ki lényeges különbséget közöttük. Ezúttal is bebizonyíthatjuk, hogy nem minden morfológiai különbség jelez faji divergenciát, ilyenkor fajon belüli (*intraspecifikus*) variációval állunk szemben.

3. Hasonlóan, az előbbi technika segítségével sikerült a *F. ratzeli* csoporton belül három nagyobb termetű, hasonló típusú *spermatheca*-val rendelkező faj biztos szétválasztása, aminek eredményeképpen két tudományra új faj (*F. eiseni*, *F. crassiductata*) leírását is adtuk (Dózsa-Farkas – Cech, 2006).

4. Az 1980-as évek végén kutatásokat folytattunk hazai tőzeg- (*Sphagnum*-) lápokon, így a keleméri *Kismohoson* is. Ennek eredményeképpen Dózsa-Farkas Klára leírt egy új *Mesenchytraeus* fajt (*M. kuhneli*), valamint egy új alfajt (*Bryodrilus ehlersi glandulosus*). Ez utóbbit 2010-ben *B. glandulosus* néven faji rangra emelték. Mindkét esetben egy-egy eltérő morfológiai bélyeg képezte az új taxon kialakítását. A *B. glandulosus*-nál ezt a bélyeget a *spermatheca* ectalis nyílásánál előforduló mirigyek megléte jelentette (a *B. ehlersinél* ennek hiánya), a *Mesenchytraeus kuhnelinél* pedig a hímvárvezeték végső kiszélesedő részét alkotó atriumba torkolló négy atrialis mirigy alkotta, amely a hozzá közelálló *M.*

*pellicensis* fajnál a leírás szerint hiányzott. Akkoriban úgy véltük, hogy ezek a morfológiai különbségek a környezetétől teljesen eltérő kis tőzegmohaláplban jégkorszak utáni (*posztglaciális*) izolált fejlődés eredményeképp alakulhattak ki. Az idők során egyre több fémeg került elő mindkét taxonból, szélesebb geográfiai elterjedési körből. Alapos vizsgálattal kiderült, hogy a más kutatók által *B. ehlersinek* tartott példányok esetében is mindig megtalálhatók az ektális mirigyek, csak alkalmanként nehezen láthatók. A két *Mesenchytraeus* fajnál pedig a négy mirigy megléte, részleges vagy teljes hiánya variálódó bélyeg, ráadásul ez is nehezen észlelhető. Felmerült tehát a fajok összevonásának esetleges szükségessége. A probléma megoldását a molekuláris vizsgálatok eredményei adták. Ebben az esetben is az ITS-régió szekvenálását végeztük el. Mindkét faj esetében minimális változatosság volt tapasztalható az ITS-szekvenciákban, mindössze néhány eltérő (1–5) nukleotid fordult elő a megközelítőleg ezer bázispár hosszú szekvenciákban. Ennek alapján mindkét esetben fajrevíziót és szinonimizálást hajtottunk végre (Cech et al., 2012).

5. Két morfológiailag látszólag jelentősen eltérő faj (*Bryodrilus librus* és *B. parvus*) faji azonosságának igazolására (*szinonimizálására*) a citokróm oxidáz I alegységét (COI) vizsgáltuk meg. A *B. parvus*-t Grönlandról írták le 1970-ben. Az eddigi adatok szerint ezt a fajt tipikus északi, holarktikus elterjedésűnek mondhattuk. A *B. librus*-t Dániából írták le 1959-ben *Marionina libra* néven, s később tették át a *Bryodrilus* génuszba. Mindkét faj lényegében észak-európai előfordulásának mutatkozott. Ennek ellenére a *B. librus* 2009-ben előkerült Magyarországról, a Kiskunság területéről, majd 2010-ben a Mezőföldön is megtaláltuk a *B. parvussal* együtt. Feltűnt a

két faj nagyfokú hasonlósága (3–4 mm hossz, jellegzetes azonos nyelőcsövi kitérőmúrák, azonos méretű és alakú spermatozóák, jellegzetes ragacsos anyagot termelő bőrmirigyek megléte, ami miatt mindkét taxon talajszemcsékkel borított), de egy eddig fontosnak tartott bélyegben különböztek. A *B. parvus* esetében a két *spermatheca* egyesülés után a nyelőcsőbe torkollik, a *B. librus* esetében pedig, a nevének megfelelően, szabadon lóg a testüregben. Ezért a különböző helyekről (a hazai példányok mellett a Spitzbergákról, a kanadai arktikus szigetvilágból, Alaszkából, Grönlandról és Szibériából rendelkezésünkre álló élő és/vagy fixált állatok tanulmányozásával egy időben férgekét küldtünk a *Canadian Centre for DNA Barcoding*-nak molekuláris biológiai vizsgálatokra is. Ennek eredményeképp megállapítható volt, hogy a két faj azonos. A genetikai távolságokat összehasonlítva egymással és két másik *Bryodrilus* fajjal, megállapítható volt, hogy a magas interspecifikus értékekkel szemben (21,6%, illetve 22,6%) a két fajnak tartott egyedek a klaszteren belül is keverednek, és az átlagos klaszteren belüli variancia pedig csekély, mintegy 2,6%. A magyarországi *B. librus*, illetve *parvus*-nak tartott egyedek pedig genetikailag egyáltalán nem különültek el. Ezzel a molekuláris biológiai igazolással aztán a *B. parvus*-t a *B. librus* szinonimjaként revidáltuk (Dózsa-Farkas et al., 2012).

6. Végül még egy egészen friss kutatási eredményről is szeretnénk beszámolni, amit a kanadai arktikus szigetvilágból (Bank Island) leírt, és ott endemikusnak vélt faj a *Hemifridericia bivesiculata* Christensen és Dózsa-Farkas, 2006) váratlan hazai felbukása hívott életre. A génuszba mindössze két faj tartozik, az előbb említett faj és a *H. parva* Nielsen és Christensen, 1995; utóbbi a Hol-

arktiszból szélesebben elterjedt, így hazánkban is. A két faj első megközelítésben nagyon hasonló: 2–3 mm hosszúak, coelomocyták és spermatozóái is azonos méretűek és alakúak. Megegyeznek egy másik, az *enchytraeidák* körében igen ritka bélyegben is: mindkettőnél fejlett sertéket találunk a nyeregszelvényben (XII), még hozzá ventrálisán is. A *H. bivesiculata* csak a kettős hólyagszerű nyelőcsövi kitérőmúrák (*bivesiculata* elnevezés!) alapján különítődött el, amely a másik fajnál hiányzik. A biztos faji elkülönítés megállapítására a *H. bivesiculata* hazai példányait, amelyeket a Mezőföldről és a Kiskunságból gyűjtöttünk, valamint a típusokat, a *H. parva* esetében pedig földrajzilag távoli populációkból (így Alaszkából, az ausztriai Rax-hegységből, továbbá a Kiskunságból és Bátorligetről) származó élő és fixált egyedeket tanulmányoztuk morfológiailag, valamint ITS-szekvenálást hajtottunk végre. Az ITS-vizsgálatok eredményei alapján megállapítható volt, hogy a két faj közel rokon volta mellett, önálló fajoknak tekinthető, és sikerült további morfológiai bélyegkülönbségeket is feltárni. Ilyen az agy eltérő alakja, a hasi serték száma és elhelyezkedése, és a háti véredény eredésének eltérő volta. Eredményeinkről hamarosan elkészül a tudományos cikk is.

#### Kitekintés

A fentiekből közvetlenül is következik, hogy a molekuláris biológiai módszerek a további taxonómiai munka nélkülözhetetlen részévé kell válnanak. A kutatók úgy képzelik, hogy a jövőben a szekvenciaalapú identifikáció révén a molekuláris vizsgálatok használhatók lesznek ökológiai, diverzitásbiológiai kutatások céljaira is, nagymennyiségű talajmintákból kinyert (akár ivaréretlen állapotú) férgek azonosításával.

Ennek eléréséhez most a cél az egységes módszerek kidolgozása. Schmelz és munkatársai indítottak el napjainkban egy projektet, amely arra irányult, hogy megfelelő célszekvenciát találjanak a televényférgék egységes molekuláris azonosítására, aminek első eredményeit a közelmúltban ismertették egy előadásban (Rüdiger M. Schmelz szóbeli közlése alapján). Vizsgálatainkban négy gént vettek górcső alá, a COI-t, a 18S rDNS-t, az ITS-régiót, valamint a H3 hiszton fehérje génjét. Céljukhoz 200–300 bázispár hosszúságú szakaszokat kerestek, amelyeket általánosan lehetne használni az *Enchytraeidae* családon belül. A jövőbeli kutatásokra a H3-gént ajánlották, mivel megfelelő variabilitással bír, és metodikailag is könnyebben kivitelezhető, ugyanakkor megjegyzendő, hogy eddig

egyetlen szekvenciát sem publikáltak erről a génről az Enchytraeidae család köréből.

Fontosnak tartjuk megjegyezni: ahhoz, hogy ne csak számozott férgek jelentsék az eredményt, hanem mögöttük ismerjük az egyes fajokat is, előbb elengedhetetlenül szükség lenne megbízható specialisták előzetes taxonómiai munkájára is, ily módon remélhetően a taxonómusok munkája ismét méltó elismertséget fog elérni. Ezen munka alapján aztán nemzetközi együttműködésben megfelelő adatbázist lehet és kell létrehozni.

Kulcsszavak: *gyűrűsférgék, televényférgék, morfológia, molekuláris filogenetika, enzim-polimorfizmus, mitokondriális DNS, nukleáris DNS, PCR-RFLP-technika, fajrevíziók, új fajok Magyarországról*

## IRODALOM

- Brockmeyer, Volker (1991): Isozymes and General Protein Patterns for Use in Discrimination and Identification of *Enchytraeus* Species (Annelida, Oligochaeta). *Zeitschrift für Zoologische Systematik und Evolutionsforschung* 29, 343–361. DOI: 10.1111/j.1439-0469.1991.tb00457.x
- Cech Gábor – Dózsa-Farkas Klára (2005): Identification of *Fridericia schmelzi* sp.n. Combining Morphological Characters and PCR-RFLP Analysis. In: Pop, Victor – Pop, Antonina (eds.): *Advances in Earthworm Taxonomy II (Annelida: Oligochaeta)*. Cluj University Press, 99–118.
- Cech Gábor – Boros G. – Dózsa-Farkas K. (2012): Revision of *Bryodrilus glandulosus* (Dózsa-Farkas, 1990) and *Mesenchytraeus kuehneli* Dózsa-Farkas, 1991 (Oligochaeta: Enchytraeidae). *Zoologischer Anzeiger – Journal of Comparative Zoology*. 2513, 253–262. DOI:10.1016/j.jcz.2011.09.005
- Christensen, Bent – Berg, U. – Jelnes J. (1976): A Comparative Study on Enzyme Polymorphism in Sympatric Diploid and Triploid Forms of *Lumbicillus lineatus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). *Hereditas*. 84, 41–48. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1976.tb01194.x • <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1976.tb01194.x/pdf>
- Christensen, Bent – Glenner, Henrik (2010): Molecular Phylogeny of Enchytraeidae (Oligochaeta) Indicates Separate Invasions of the Terrestrial Environment. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 48, 208–212. DOI: 10.1111/j.1439-0469.2009.00558.x
- De Wit, Pierre – Erséus, Christer (2010): Genetic Variation and Phylogeny of Scandinavian Species of *Grania* (Annelida: Clitellata: Enchytraeidae), with the Discovery of a Cryptic Species. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 48, 285–293. DOI: 10.1111/j.1439-0469.2010.00571.x
- Dózsa-Farkas, Klára – Cech, Gábor (2006): Description of a New *Fridericia* Species (Oligochaeta: Enchytraeidae) and Its Molecular Comparison with two Morphologically Similar Species by PCR-RFLP. *Zootaxa*. 1310, 53–68. • <http://www.mapress.com/zootaxa/2006/zootaxa1310p068f.pdf>
- Dózsa-Farkas, Klára – Porco, D. – Boros G. (2012): Are *Bryodrilus parvus* Nurminen, 1970 and *Bryodrilus librus* (Nielsen and Christensen, 1959) (Annelida: Enchytraeidae) Really Different Species? A Revision Based on DNA Barcodes and Morphological Data. *Zootaxa*. 3276, 38–50. • <http://www.mapress.com/zootaxa/2012/zootaxa3276p050f.pdf>
- Erséus, Christer – Rota, E. – Matamoros, L. – De Wit, P. (2010): Molecular Phylogeny of Enchytraeidae (Annelida, Clitellata). *Molecular Phylogenetics and*

*Evolution*. 57, 849–858. doi: 10.1016/j.ympcv.2010.07.005

Schmelz, Rüdiger M. (2003): *Taxonomy of Fridericia (Oligochaeta, Enchytraeidae)*. Revision of Species with Morphological and Biochemical Methods: Abhandlung des Naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg (ed. Otto Kraus). No 38. DOI:10.1016/j.pedobi.2004.03.001

Schmelz, Rüdiger M. – Collado, R. – Myohara, M. (2000): A Taxonomic Study of *Enchytraeus japonensis* (Enchytraeidae, (Oligochaeta): Morphological and Biochemical Comparisons with *E. bigeminus*. *Zoological Science*. 17, 505–516. DOI:10.2108/0289-0003(2000)17[505:ATSOEJ]2.o.CO;2 • <http://www.bioone.org/doi/full/10.2108/0289-0003%282000%2917%5B505%3AATSOEJ%5D2.o.CO%3B2>

