

# AZ ERDÉLYI ORSÓCSIGÁK (*ALOPIA* GÉNUSZ) FEJLŐDÉSTÖRTÉNETÉNEK FELTÁRÁSA MOLEKULÁRIS MÓDSZEREK ALKALMAZÁSÁVAL

Fehér Zoltán

PhD,  
Magyar Természettudományi Múzeum Állattár  
feher@nhmus.hu

Szekeres Miklós

PhD,  
MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Növénybiológiai Intézet  
szekeres@brc.hu

A taxonómia meglehetősen régi tudomány. Nagyjából egyidős az emberiségnek azzal az igényével, hogy rendszerezze, csoportokba sorolja az őt körülvevő élővilágot. Ennek el- lenére távolról sem idejétmúlt diszciplína, hiszen ezen alapul a szupraindividuális biológia valamennyi ága (például: ökológia, környezetvédelmi biológia, biogeográfia, evolúciobiológia), és a modern biológia más terü- letein is megkerülhetetlen a vizsgált szervez- tek rendszertani hovatartozásának, rokonsá- gi viszonyainak, fejlődéstörténetének pontos ismerete. Alkalmazott tudományként fontos egyes biológiailag aktív vegyületeket termelő élőlények körének kiválasztásában (Larsen et al., 2005), hatóanyagokra hasonlóan reagáló fajok azonosításában (Diverio et al., 1996), vagy speciális életfunkciók (például hormoná- lis szabályozó mechanizmusok) fejlődéstör- téneti hátterének felderítésében (Alabadi et al., 2009; Cheon et al., 2013).

A tradicionális taxonómia elsősorban alak- tani bélyegek alapján osztályozott, ami a pu- hatestűek (*Mollusca*) esetében főleg a héj és az ivarszervek morfológiáját jelentette. Bizo-

nyos kérdésekre azonban, mint amilyen a látható jegyeik alapján el nem különíthető „rejtett” (kriptikus) fajkomplexek problémája, vagy a homológ (azaz a törzsfajődés során megőrzött) és homoplasztikus (konvergens fejlődés nyomán kialakult) karakterek meg- különböztetése, a klasszikus megközelítés nem adhatott választ. Ehhez szükség volt arra az utóbbi évtizedekben végbement komoly módszertani fejlődésre, melynek során a klasszikus morfológia mellett teret nyert a geometriai morfometria (Adams et al., 2013), az ökológiai modellezés (Zimmermann et al., 2010), és a molekuláris alapú módszerek. Mindezek együttes alkalmazása az integrált taxonómia korszakának kezdetét jelentette.

Molekuláris módszereket az 1960-as évek óta alkalmaznak a taxonómiában. A kezdeti fehérjemintázaton, illetve DNS–DNS–hib- ridizáción alapuló technikákat mára szinte teljesen felváltották az egyes kitüntetett DNS- szakaszok nukleotida szekvenciáinak össze- hasonlításán alapuló módszerek. Ezek az el- járások azon a feltételezésen alapulnak, hogy a homológ DNS-szakaszok közös őstre vezet-

hetők vissza (koaleszcencia), és eltérésük mértéke a szétválásuk óta eltelt idő függvénye. Mindezekből következően a molekuláris törzsfákra úgy tekintenek, mint amelyek a valós leszármazási viszonyokat hűen tükrözik, a genetikai távolságok alapján pedig következtetni lehet a rokoni kapcsolatokra, sőt – állandó mutációs rátát feltételezve – még az evolúciós események (szétválások) hozzávetőleges idejére is (Avice, 2004). Fontos alkalmazási terület még az ún. DNS-*barcoding*, ahol nem a filogenetikai kapcsolatok feltárása az elsődleges cél, hanem ismeretlen eredetű minták faji azonosítása. Ez egy, az ismert fajok többségét reprezentáló szekvencia-adatbázison alapul (URL1), amellyel összevethető a még besorolatlan mintákból származó szekvenciák. Erre a célra néhány kitüntetett mitokondriális, vagy – növényeknél – a kloroplasztisz eredetű rövid DNS-szakaszokat (ún. *barcoding markereket*) használnak (Hebert et al., 2003). A DNS-analízis taxonómiai alkalmazásának népszerűségét és rohamos térnyerését mi sem jelzi jobban, mint a génbanki adatbázisokban elérhető adatmennyiség exponenciális növekedése. A tárolt DNS-szekvenciák száma 2013 novemberében már meghaladta a 168 milliót.

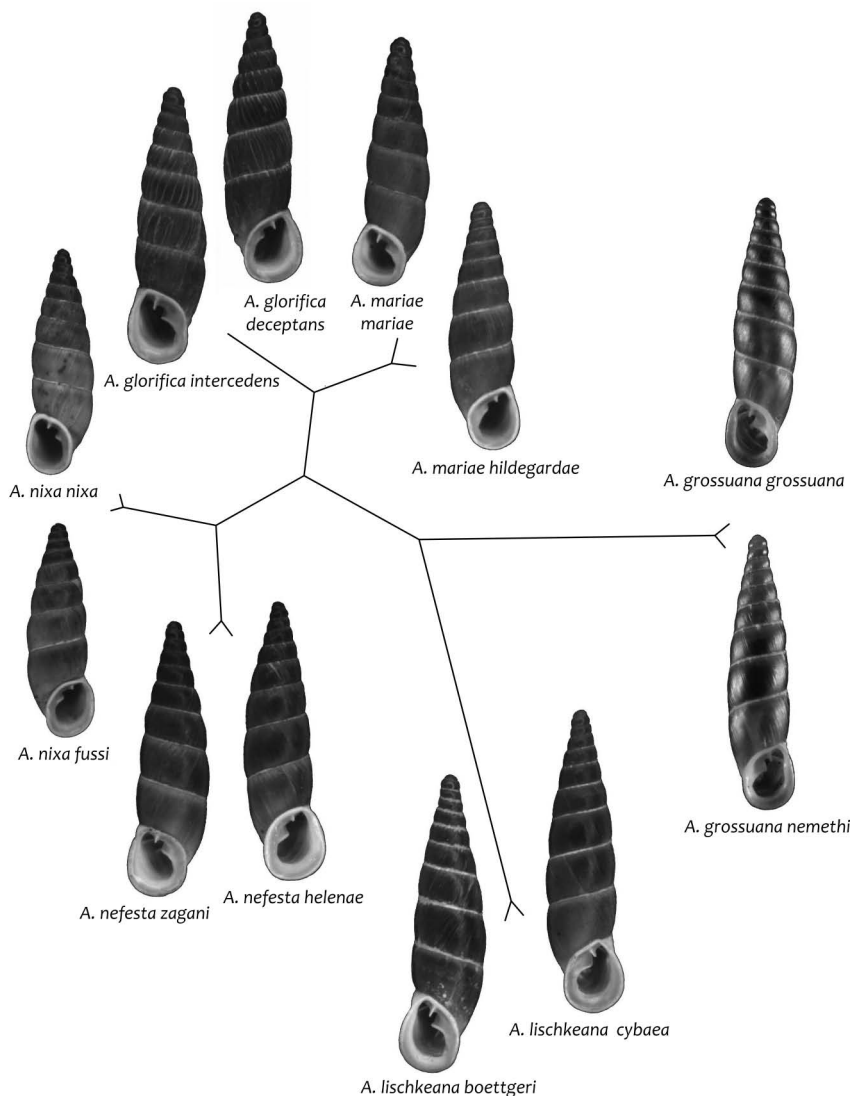
A Magyar Természettudományi Múzeum vezető szerepet tölt be a Kárpát-medencei biodiverzitás kutatásában. Itt található a Kárpát-medence állat- és növényvilágát reprezentáló legnagyobb gyűjtemény. A tradicionális taxonómiai megközelítés mellett 2005 óta széles körű molekuláris taxonómiai vizsgálatokkal is foglalkozunk. Az egyik közelmúltban befejezett projekt egy fejlődésbiológiai és természetvédelmi szempontból egyaránt figyelemre méltó csoport, az erdélyi orsócsigák (*Alopi*a génusz) molekuláris filogenetikai rekonstrukciója volt, amelyre e nemzetség folyamatban

lévő revíziójához volt szükség (Fehér et al., 2013).

Az *Alopi*a-elterjedés súlypontja a Déli-Kárpátokban van, előfordulási területe magában foglalja a Keleti-Kárpátokat és az Erdélyi-szigethegységet, és egy távoli izolált alak révén elér a Gömör–Tornai-karszt területéig is. Fajai meredek, csupasz mészkősziklákon élnek, ahol számukra a mikroflóra táplálékot, a sziklarepedések pedig bújóhelyet nyújtanak. Élőhelyi igényük miatt foltszerűen terjedtek el, és a sziklalakó csigák többségére jellemző módon a génusz sok, kis elterjedésű taxonból áll. A *Fauna Europaea* lista (Bank, 2013) hetvenhárom *Alopi*a alfajt sorol fel. A csoportot az teszi igazán különlegessé, hogy ismert alfajai között van huszonhárom olyan is, amelyeknek a héja nem az orsócsigákra általánosan jellemző módon balra, hanem ellenkező irányba, azaz jobbra csavarodik. Ráadásul hat olyan jobbra csavarodó taxon is ismert, amelyeknek van balra csavarodó tükörképi párja, tehát ezek az alakok a csavarodási iránytól eltekintve morfológiailag teljesen megegyeznek. A tükörképi párok tagjai földrajzilag egymáshoz közel, de elkülönülten terjedtek el, balos és jobbos példányok együttes előfordulására legfeljebb csak e területek keskeny érintkezési övezeteiben akad példa. Miközben a génuszon belül az alfajok határait illetően jobbára konszenzus van, az egyes alfajok rokonsági kapcsolatait, és leginkább a tükörképi párok rendszertani megítélését illetően több mint száz évre visszanyúló vita dúl. Az egyik nézet szerint a génusz törzsfajlódése során csak egyszer történt csavarodási irány (kiralitás-) váltás, hiszen közismert, hogy a csigáknál a csavarodási irány nagyon stabil jelleg, és annak megfordulása igen ritka evolúciós esemény. A jobbos taxonok viszonylag nagy számát azzal magyarázzák, hogy a forduló

lás a csoport törzsejlődésének korai szakaszában történt, majd ettől kezdve a továbbiakban a balra és a jobbra csavarodó két kládusz egymástól függetlenül diverzifikálódott. Ennek az irányzatnak a követői a balos és jobbos taxonokat külön fajokba sorolják, és a tükör-

képi párok tökéletes hasonlóságát csak extrém morfológiai konvergenciának tudják be (Kimakowicz, 1894; Grossu, 1981; Nordsieck, 2008). A másik tábor álláspontja szerint a tükörképi párok morfológiai egyezése a közeli rokonság bizonyítéka, ami azt jelzi, hogy ezek



1. ábra • A tükörképi *Alopia* taxonpárok és pozíciójuk a filogenetikai fán. A törzsfá ún. gyökértelen fa, amelyet eredetileg az összes alfajból származó minta bevonásával rekonstruáltunk, majd a jobb áttekinthetőség kedvéért a hat tükörképi pár kivételével a fa többi ágát eltávolítottuk.

a taxonok a közelmúltban történt kiralításváltások következtében jöttek létre (Bielz, 1861; Wagner, 1913; Soós, 1943; Szekeres, 2007). Tehát a vita tárgya tulajdonképpen az, hogy a csavarodási irány homológ, avagy homoplasztikus bélyeg-e. Ez a probléma azért maradhatott ennyi időn keresztül megoldatlan, mert e kérdés eldöntésére a taxonómia klasszikus eszköztára nem volt alkalmas.

Arra számítottunk, hogy egy viszonylag változékony DNS-szakasz szekvenciaadatainak összehasonlítása révén eldönthető lesz, hogy az azonos irányba csavarodó taxonok ténylegesen közeli rokonai-e egymásnak, avagy sem. Emellett azt is szeretttük volna megbecsülni, hogy mikor keletkezhetett az *Alopi*a génusz, mikor váltak szét a főbb intragenerikus fejlődési ágak. Választásunk a leggyakrabban vizsgált *barcoding* szakaszra, a mitokondriális citokróm oxidáz génre esett, miután ez az a DNS-szakasz, amelyikről az *Alopi*a rokongénuszai tekintetében a legtöbb szekvenciaadat állt rendelkezésre. Mintát vetünk az összes ismert alfaj reprezentatív populációból, és ezek alapján rekonstruáltuk a génusz molekuláris törzsfáját. Az *Alopi*a génusszal rokon sziklalakó orsócsigák nagyrészt dél-európai elterjedésűek. Ezek génuszon belüli genetikai variabilitása nagyobb mértékű, mint amit az *Alopi*a esetében találtunk. Ez arra utal, hogy az *Alopi*a nemzetség a balkáni rokonainál fiatalabb kialakulású, radiációjának kezdete valamikor a korai vagy középső pleisztocén időszakra tehető. Eredményeink azt mutatták, hogy a jobbra, illetve balra csavarodó alfajok nem alkotnak monofiletikus fejlődési vonalat (*i. ábra*). ADNS-szekvenciákból származtatott törzsfá alapján a génusz törzsfejlődése során számos alkalommal, leg-

alább tizenháromszor fordult a kiralítás. Emiatt az európai csigáknál egyedülálló tulajdonság miatt azt feltételezzük, hogy egy olyan csoportra bukkantunk, amelynél a kiralítás genetikai determináltsága a csigáknál eddig ismertekhez képest kevésbé stabil.

A törzsfá alapján az is nyilvánvaló, hogy a tükörképi taxonpárok egymásnak igen közeli rokonai, miután a vizsgált szekvenciákban ezek közt nagyfokú, 96–100% egyezést találtunk. Ez azt jelzi, hogy a tükörképi párok a fajkeletkezés korai fázisában lévő fiatal taxonok, és egy filogenetikai alapon nyugvó rendszerben ezeket egy fajba tartozó, külön alfajokként kell kezelnünk. Emiatt szükséges lesz a génusz revíziója.

A fenti vizsgálatunk jó példa arra, miként alkalmasak a molekuláris markerek alapján rekonstruált törzsfák olyan problémák megoldására, amelyeknél a taxonómia klasszikus módszerei önmagukban nem elégségesek. Jó szolgálatot tehetnek a homológ és homoplasztikus morfológiai jegyek közti különbségtételben, támpontként szolgálhatnak rokonsági kapcsolatok feltárásánál, fajhatárok pontos kijelölésénél, valamint egyes fejlődési ágak időbeni szétválásának meghatározásánál is. Csodaszernek ugyanakkor a molekuláris filogenetikai analízis sem tekinthető: mint bármely más módszernek, ennek is megvan a maga korlátai. Összességében azt mondhatjuk, hogy mára a molekuláris markerek vizsgálata olyan fontos módszerré vált a taxonómia eszköztárában, amely jól kiegészíti, de nem helyettesítheti a tradicionális, morfológiai alapú vizsgálatokat a taxonómiában.

Kulcsszavak: *puhatestű, csiga, Alopi*a, taxonómia, filogenetika, DNS, citokróm oxidáz

## IRODALOM

- Adams, Dean C. – Rohlf, F. J. – Slice, D. E. (2013): A Field Comes of Age: Geometric Morphometrics in the 21<sup>st</sup> Century. *Hystrix*. 24, 7–14.
- Alabadi, David – Blazquez, M. A. – Carbonell, J. – Ferrandiz, C. – Perez-Amador, M. A. (2009): Instructive Roles for Hormones in Plant Development. *International Journal of Developmental Biology*. 53, 1597–1608.
- Avise, John C. (2004): *Molecular Markers, Natural History, and Evolution* (Second Edition). Sinauer, Sunderland, MA
- Bank, Ruud A. (2013): *Fauna Europaea: Gastropoda*. Fauna Europaea version 2.6 • <http://www.faunaeur.org>
- Bielz, Eduard Albert (1861): Vorarbeiten zu einer Fauna der Land- und Süßwasser-Mollusken Siebenbürgens. *Verhandlungen und Mitteilungen des Siebenbürgischen Vereins für Naturwissenschaften zu Hermannstadt*. 12, 83–179. • [http://www.landesmuseum.at/pdf\\_frei\\_remote/VerhMittNaturwissHermannstadt\\_12\\_0013-0016.pdf](http://www.landesmuseum.at/pdf_frei_remote/VerhMittNaturwissHermannstadt_12_0013-0016.pdf)
- Cheon, Jinyeong – Fujioka, S. – Dikles, B. P. – Choe, S. (2013): Brassinosteroids Regulate Plant Growth through Distinct Signaling Pathways in *Selaginella* and *Arabidopsis*. *PLoS ONE*. 8, e81938.
- Diverio, Silvana – Goddard, P. J. – Gordon, I. J. (1996): Use of Long-acting Neuroleptics to Reduce the Stress Response to Management Practices in Red Deer. *Applied Animal Behavior Science*. 49, 83–88.
- Fehér Zoltán – Németh L. – Nicoară, A. – Szekeres M. (2013): Molecular Phylogeny of the Land Snail Genus *Alopi*a (Gastropoda: Clausiliidae) Reveals Multiple Inversions of Chirality. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 167, 259–272.
- Grossu, Alexandru V. (1981): *Gastropoda Romaniae. Ordo Stylomatophora 3. Suprafamilie Clausiliacea și Achatina*. Bucharest: Univrsitatea din București.
- Hebert, Paul D. N. – Cywinska, A. – Ball, S. L. – deWaard, J. R. (2003): Biological Identifications through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 270, 313–321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218
- Kimakowicz, Mauritius von (1894): Prodromus zu einer Monographie des Clausilia-Subgenus *Alopi*a H. et A. Adams. *Verhandlungen und Mitteilungen des Siebenbürgischen Vereins für Naturwissenschaften zu Hermannstadt*, 43, 19–58.
- Larsen, Thomas O. – Smedsgaard, J. – Nielsen, K.F. – Hansen, M.E. – Frisvad, J.C. (2005): Phenotypic Taxonomy and Metabolite Profiling in Microbial Drug Discovery. *Natural Product Reports*. 22, 672–693. DOI: 10.1039/B404943H
- Nordsieck, Hartmut (2008): The System of the Genus *Alopi*a H. & A. Adams 1855 (Gastropoda: Stylommatophora: Clausiliidae). *Mitteilungen der Deutschen Malakozoologischen Gesellschaft*. 79–80, 7–18.
- Soós Lajos (1943): A Kárpát-medence Mollusca-faunája (*Mollusca Fauna of the Carpathian Basin*). Akadémiai, Budapest
- Szekeres Miklós (2007): Four New Subspecies of *Alopi*a H. & A. Adams 1855 (Gastropoda, Pulmonata: Clausiliidae). *Schriften zur Malakozoologie*. 23, 7–18.
- Wagner, Antoni J. (1913): Die Familie der Clausiliidae. In: Rossmässler, Emil Adolf. *Rossmässler's Iconographie der Land- & Süßwasser-Mollusken*, 21. Kreidel, Wiesbaden • <https://archive.org/details/iconographie-der121341913ross>
- Zimmermann, Niklaus E. – Edwards, T. C. – Graham, C. G. – Pearman, P. B. – Svenning, J.-C. (2010): New Trends in Species Distribution Modelling. *Ecography*, 33, 985–989. DOI: 10.1111/j.1600-0587.2010.06953.x

URL: [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)