

Kutatási jelentés

A KTVF: 12478-4/2014 számú engedély alapján a Molnár János-barlangban (4762-5) 2014-ben végzett biológiai kutatási munkáról.

Kutatásvezető:
Hosszú Attila

Kutatásvezető helyettes:
Müllner László

Kutatásban közreműködők:

Balázs Gergely tudományos munkatárs
Angyal Dorottya tudományos munkatárs
Brankovits Dávid tudományos munkatárs
Bajnok Róbert barlangi búvár
Bauer Zoltán barlangi búvár

A 2014-es évben 61 merülést hajtottunk végre a Vakrákok kutatása céljából,
mely merülések a kutatási naplóban rögzítésre kerültek.

Előzmények:

A 2013-ban végzett kutatásokból egyértelműen kiderült, hogy a Molnár János-barlang a korábban kimutatott *Niphargus thermalis* DUDICH, 1941 vakbolharák fajon kívül további két Amphipoda-, egy Isopoda- és egy Neotaenioglossa fajnak ad otthont. A fajok pontos beazonosítása további vizsgálatokat igényelt. A 2014-es évben elsősorban genetikai vizsgálatokat végeztünk, a filogenetikai helyzetek tisztázásának érdekében. A korábban begyűjtött minták elemzése jelen kutatási jelentés készítésekor fajonként eltérő feldolgozási szinten van.

Módszerek:

A Malacostraca egyedek faji szintű meghatározásához tárgylemezes preparátumokat készítettünk. A preparátumok elkészítése során a nemzetközileg elfogadott protokollt követtük (fehérjék eltávolítása KOH oldatban, mézsók eltávolítása a kültakaróból HCl-ban és desztillált vízben, festés chlorazol black és glicerin keverékével, végtagok, szájszervek preparálása és glicerin-zselatinba-ágyazása sztereomikroszkóp alatt). A *Niphargus* fajok esetében az elkészült preparátumok morфомetriai feldolgozását alysis work 5.0 programmal történik, míg az *Asellus aquaticus* egyedek mérésénél az erre alkalmasabb ImageJ 1.47 szoftvert használjuk. A molekuláris vizsgálatok során az különböző felbontások elérésének érdekében, konzervatívizmusukban eltérő markereket alkalmaztunk (28S, H3, COI) a különböző vizsgálatokhoz illeszkedve, olykor fajonkénti eltérésekkel. A használt primerek és PCR ciklusok fajonként lettek optimalizálva a megfelelő minőségű kromatogramok érdekében. A morfológiai vizsgálatokat a Magyar Természettudományi Múzeum Állattárában és az Eötvös Lóránd Tudományegyetem Állatrendszertani és Ökológiai Tanszékén, míg a genetikai vizsgálatokat a Ljubljani Egyetem Barlangbiológiai Tanszékének Genetikai Laboratóriumában (Oddelek za Biologijo, Biotehniška Fakulteta, Univerza v Ljubljani) és a Florida International University Brackem-Grissom Laboratóriumában végezzük.

Eredmények:

A 10 egyedén végzett morfológiai elemzés során megállapítást nyert, hogy a barlangban illetve a Malom-tóban megtalálható *N. thermalis* egyedek nem mutatnak konzekvens morfológiai eltérést a *N. hrabei* S. KARAMAN, 1932 jellemző jegyeitől. A 2013-as év genetikai vizsgálatait kiegészítendő a COI marker vizsgálatát irányoztuk elő. A vizsgálandó génszakasz a primerkötő locuson variabilitást mutat, ezért a megfelelő minőségű kromatogramokhoz, az eddig használtaktól eltérő primerpár alkalmazására, illetve az új primerhez igazodó PCR optimalizálás volt szükséges. A próbaszekvenálások eredményei biztatóak, de a fellépő technikai problémák miatt, a végleges eredmények a jelentés készítésének időpontjában nem álltak rendelkezésre. A meglévő részadatok elemzése azt mutatja, hogy a faj, a nyilvánvalóan nagyon közeli rokon (valószínűsíthető a két faj azonossága) *N. hrabei* mellett, a *N. dudichi* HANKO, 1924 és a *N. hungaricus* MÉHELY 1937 fajokkal mutat viszonylag közeli rokonságot. A 2014-es évben nagy hangsúlyt fektettünk a megfigyelő merülésekre, melyek során megerősítést nyert az a korábbi feltételezés, hogy a faj a barlangon belül jellemzően a thermocline zónákban fordul elő. A faj állandó barlangi jelenléte egyértelmű, az viszont csak további, az eddigieknél részletesebb molekuláris vizsgálatokkal dönthető el, hogy a barlangi és a tavi populáció milyen mértékű izolációt mutat, illetve mekkora a populációk közötti génáramlás mértéke. A Malom-tóban élő populáció esetében aggodalomra adott okot a korábban tapasztalt alacsony egyedszám. A MTA ÖK Duna-kutató Intézetének munkatársaival egyeztetve kipróbáltunk egy –általuk Amphipoda fajokra széles körben alkalmazott- befogási módszert, melynek eredményeképpen a Malom-tóból, a korábbinál megnyugtatóan nagyobb denzitás volt kimutatható.

A további két előforduló *Niphargus* faj esetében nem történt jelentős előrelépés. Az egyik feltételezett fajnál mostanra az általunk előírányzott szekvenciák mindegyike rendelkezésre áll. Ezek szerint a faj a *N. molnari* fajhoz áll legközelebb. A *N. molnari* esetében végzett, 107 taxon adatainak bevonásával készült törzsfa alapján, ez nagyon korai elkülönülési ágat jelent a genus többi ismert fajához képest. Az ősi elkülönülés miatt feltételezhető az élőhely korai kolonizációja. A másik feltételezett faj molekuláris vizsgálata során technikai nehézségek voltak, melyeket a korábban alkalmazott protokollok átalakításával sikerült csak megoldani. A felmerült nehézségek miatt a jelentés készítésének időpontjában nem álltak rendelkezésre a faj filogenetikai helyzetének, és a két faj rokonsági viszonyainak tisztázásához szükséges adatok.

Az *Asellus aquaticus* LINNAEUS, 1758 a barlangban nagy számban fordul elő, és két változatát lehet elkülöníteni. Az egyik változat teljesen felszíni jegyeket mutat, míg a másik változat erősen troglomorph megjelenésű. Mind tudományos, mind természetvédelmi szempontból fontos kérdés a két változat különállásának mértéke. A troglomorphizmus lehet ugyan fenotipusos variancia eredménye, de valószínűbb a genotipusos eltérés. Amennyiben a genetikai izoláltság kimutatható, abban az esetben a speciáció egy igen érdekes esettel állunk szemben. A génáramlás mértékének felméréséhez statisztikailag értelmezhető mintaszámú szekvenciára van szükség megfelelő markerekre vizsgálva (12S, 16S, COI). A vizsgálatba szükséges bevonnunk a Malom-tóban élő egyedeket, és legalább egy, földrajzilag távolabb lévő populáció egyedét. Az ilyen léptékű molekuláris vizsgálat a megfelelő mennyiségű munka befektetésén túl jelentős költségeket von maga után. A vizsgálat anyagi feltételeinek megteremtése egyelőre sikertelen volt, de az előkészítő vizsgálatokat megkezdjük.

A Molnár János-barlangban előforduló *Bythiospeum* genusba tartozó csigafaj morfológiai alapon történő beazonosítása nem járt sikerrel. Ilyen esetekben megoldást a molekuláris módszerek alkalmazása jelentheti. A faji szintű beazonosításra a széles körben alkalmazott COI marker (barcoding szekvencia) a legalkalmasabb. A barlangból gyűjtött egyedek szekvenciáinak elemzése azt mutatja, hogy a legközelebbi rokonságban két németországi fajjal (*Bythiospeum suevicum* (GEYER,1905) *Bythiospeum quenstedti* (WIEDERSHEIM, 1873)) állnak. Mivel ezektől a fajktól mindössze egyetlen bázisbár különbség mutatkozik, ezért feltételezhetően ugyanazokról a fajokról van szó. A kétséges taxonómiai helyzet feloldását a *Bythiospeum oshanovae* L. PINTÉR 1968 molekuláris vizsgálata jelentheti. A *B. oshanovae* egyetlen szigetközi lelőhelyről ismert, ráadásul ez a lelőhely csak megfelelő Duna-vízállásnál hozzáférhető, ezért az egyedek begyűjtése nehéz feladat volt. Jelenleg a begyűjtött minták genetikai vizsgálata zajlik.



Niphargus thermalis



Niphargus sp.



Niphargus sp.



Asellus aquaticus, troglomorph változat



Asellus aquaticus, felszíni változat



Bythiospeum sp.

A jelentést készítette:

Balázs Gergely

ELTE, Állatrendszertani és Ökológiai Tanszék, Viselkedésökológiai Kutató Csoport

Angyal Dorottya

Magyar Természettudományi Múzeum, Állattár

Budapest, 2015. január 30.