

Mecsek • Sopianicum

Földtan, őslénytan, flóra, fauna, természetvédelem

www.mecsek.gportal.hu

2013.07.01.

Szerkesztő: Fazekas Imre

E-mail: fazekas.hu@gmail.com

Magyar vakcsiga (*Bythiospeum hungaricum* (Soós, 1927)) egy szisztematikai probléma vizsgálata genetikai módszerekkel

Angyal Dorottya¹ – Krízsik Virág² – Fehér Zoltán³

¹PE-GK Állattani és Állattenyésztési Tanszék, 8360 Keszthely, Deák Ferenc utca 16.

E-mail: angyal.dorottya@gmail.com

²MTM Molekuláris Taxonómiai Laboratórium, 1083 Budapest, Ludovika tér 2.

³MTM Állattár, 1088 Budapest, Baross utca 13.

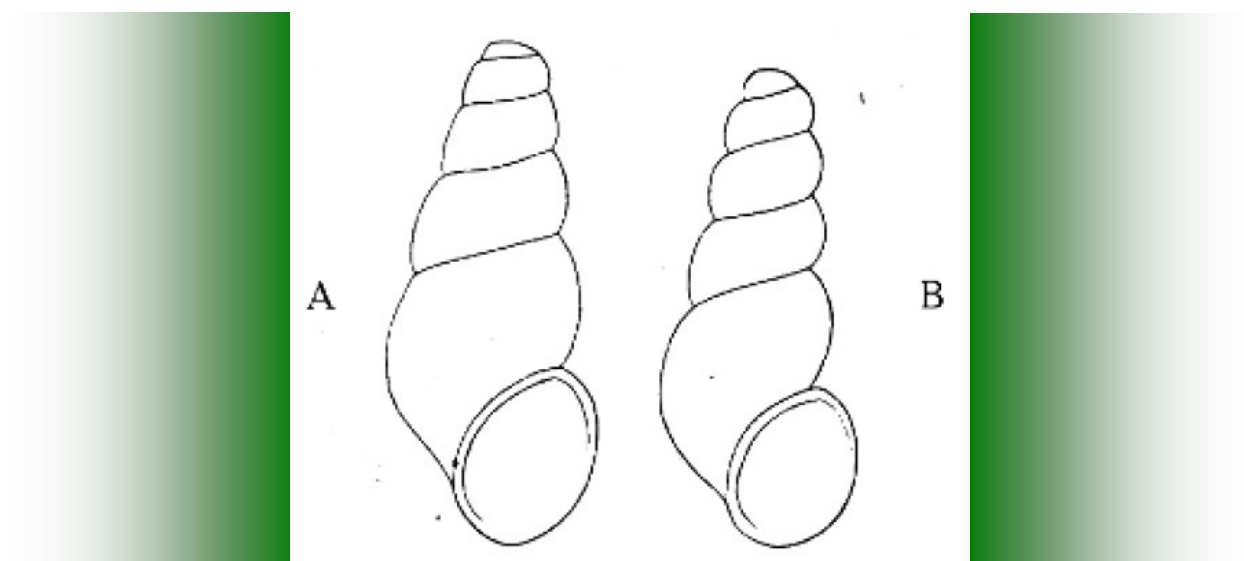
Bevezetés

A Mecsek földalatti vizeinek egyik bennszülött gerinctelen faja a magyar vakcsiga (*Bythiospeum hungaricum* (Soós 1927)) (1. ábra). A fajt Soós Lajos 1927-ben írta le eredetileg *Lartetia hungarica* néven az Abaligeti-barlangból (Soós 1927). 1931-ben újabb vakcsiga egyedek kerültek elő a Nyugat-Mecsek keleti peremén fekvő forrásbarlangból, a Mánfai-kőlyukból. A minta Wágner Jánoshoz került, aki ez alapján új fajt írt le, melynek a *Pala-dilhiopsis gebhardti* H. Wagner, 1931 nevet adta. A két barlangból gyűjtött példányok közötti fő alaktani különbségként a mánfai egyedek héjának kevésbé karcsú alakját találta (Wagner 1931) (2. ábra). 1956-ban a Természettudományi Múzeumban elpusztult a két taxon ott őrzött típusanyaga, ezért egy 1968-ban végzett revízió során Pintér László a *Lartetia*

hungarica fajnak neotípust jelölt ki. A jól körülhatárolható morfológiai különbségek hiányára és a barlangok egymással érintkező vízrendszerére hivatkozva amellettt érvelt, hogy a *P. gebhardti* ezzel konspecifikus (Pintér 1968). E közlemény megjelenése óta azonban vízfestések révén is beigazolódott, hogy a két barlang között nincs hidrológiai összeköttetés. Ezért feltételeztük, hogy az egymástól elszigetelten fejlődő populációk a genom szintjén észlelhető változásokon mehetek keresztül. Az Abaligeti-barlangból és a Mánfai-kőlyukból gyűjtött példányokon végzett molekuláris taxonómiai vizsgálattal szeretnénk volna eldönteni, hogy mekkora a populációk közti genetikai távolság és ez mikori szétválást valószínűsít, illetve, hogy ez alapján a két populáció tekinthető-e külön konzervációbiológiai egységnek vagy akár külön taxonnak.



1. ábra. *Bythiospeum hungaricum* (Soós, 1927) az Abaligeti-barlang patakjából (Leg.: 2010.10.11)



1. ábra. Barlangi csigák. **A)** *Paladilhiopsis* Gebhardti H. Wagn. Mánfai-barlang. **B)** *Paladilhiopsis hungarica* Soós. Abaligeti barlang. (25 × nagyítás.)
Abbé-féle rajzolókészülékkel rajzolta *Kolosváry G. dr.*

2. ábra. A két *Paladilhiopsis* fajt összehasonlító ábra WÁGNER JÁNOS 1942-ben, „Magyarország barlangjainak puhatestű faunája” címen publikált közleményéből (*Barlangvilág*, 1-2).

Anyag és módszer

Az Abaliget-barlangból (3. ábra) és a Mánfai-kőlyukból (4. ábra) gyűjtött, 96%-os etanolban tartósított *Bythiospeum* példányokon (1. táblázat) a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában végeztünk genetikai vizsgálatokat.

Az egyedeket vákuum centrifugával kiszárítottuk (10 perc), majd sztereo-

mikroszkóp alatt eltávolítottuk róluk a héjat. Az állatokat Polycar AT redukáló anyag hozzáadásával porrá törtük. Az így előkészített mintákból a QIAamp DNA Micro Kit segítségével izoláltuk a DNS-t (5. ábra). Az eljárás főbb lépései a sejtek lizálása, a DNS kötődése a QIAamp Min Eluate oszlop membránjához, a membrán lemosása és a DNS adszorbensről való leoldódása. A DNS koncentrációját az egyes mintákban gélelektroforézis

(6. ábra) és nanodrop segítségével ellenőriztük. Ezután polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk a variábilis mitokondriális citokrom-oxidáz I. gén (COI) egy szakaszát. A PCR során forward primerként LCO 1490-t (Folmer et al., 1994), reverse primerként COI-H-t (Machordom et al., 2003) használtuk. A PCR reakciót 25 μ l-ben mértük össze, 0,25mM-os dNTP, 0,4 μ M-os primer, 2mM-os MgCl₂ és 2,128 μ g/ μ l BSA koncentrációt alkalmaz-

va. A reakcióba 50ng DNS-t és 1U Fermentas Dream Taq-ot tettünk. A PCR hőprofilja a következő volt: 94°C 1 perc, majd 41-szer 94°C 1 perc, 40°C 1,5 perc, 72°C 1,5 perc, végül 72°C 6 perc. A Roche High Pure Purification Kit-tel tisztított PCR termékek szekvenálása Big-Dye fluoreszcens szekvenáló kittel ABI 3130-as szekvenátoron történt.

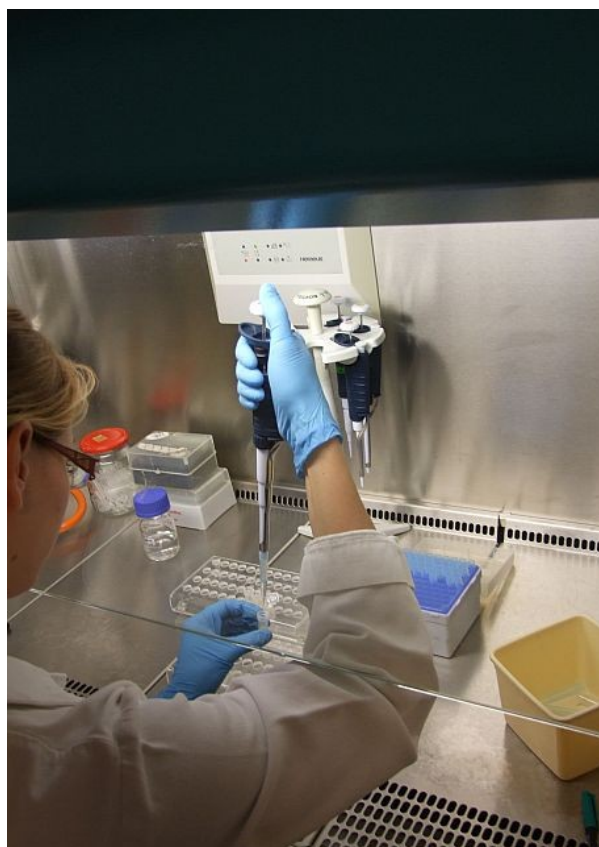
1. táblázat. A 2010. szeptember és 2011. október között gyűjtött *B. hungaricum* minták néhány adata

Gyűjtés dátuma	Barlang neve	Lelöhely a barlangon belül	Mintavétel módja	Példány-szám	Megjegyzés
2010.09.26.	Abaligeti-barlang	főági patak, bejárattól kb. 330 m-re, patakmederben	egyelés hálózással	2	üres házak
2010.09.26.	Abaligeti-barlang	főági patak, bejárattól kb. 440 m-re, patakmederben	egyelés hálózással	1	-
2010.10.11.	Abaligeti-barlang	főági patak, bejárattól kb. 230 m-re, kövek alján és patakmederben	egyelés a kövekről, egyelés hálózással	8	-
2010.10.11.	Abaligeti-barlang	főági patak, bejárattól kb. 330 m-re, patakmederben	egyelés hálózással	1	üres ház
2010.12.22.	Mánfai-kőlyuk	2. számú vízi csapda (felső járat, mesterséges táró, csorgavízgyűjtő csatorna)	vízi csapda	7	-
2011.10.21.	Mánfai-kőlyuk	felső járat, mesterséges táró, csorgavízgyűjtő csatorna aljzatán	egyelés a beton aljzatról	13	a példányok feketék a rájuk rakódott bevo-nattól
2011.10.21.	Mánfai-kőlyuk	alsó járat, járatba leveze-tő létrától 3 m-re, agyagon	egyelés agyagos hordalékról	7	a példányok feketék a rájuk rakódott bevo-nattól

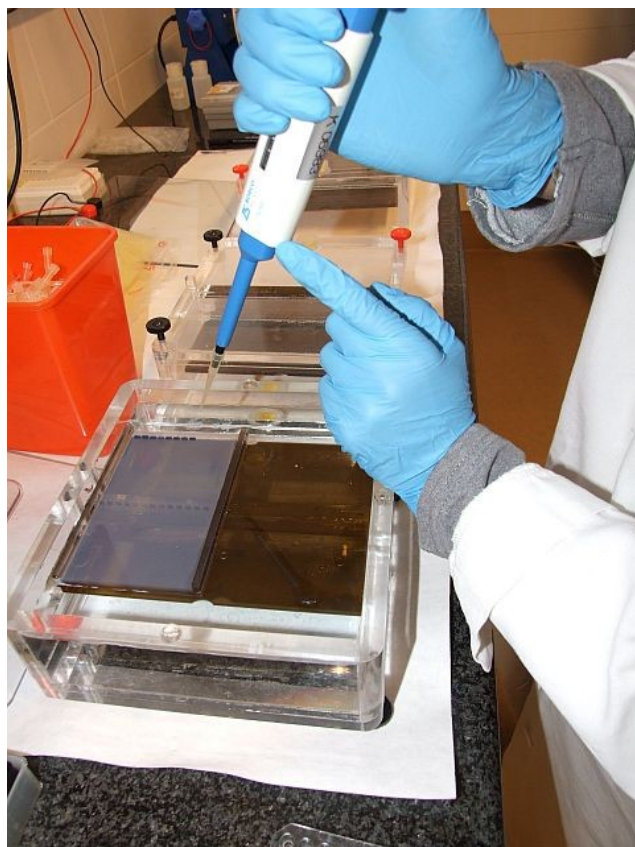


◀ **3. ábra.** A magyar vakcsiga élőhelye a Mánfai-kőlyuk vízmű által hasznosított tárójában

4. ábra. A magyar vakcsiga élőhelye az Abaligetibarlant főági patakjában ▼



5. ábra. DNS izolálás a mintákból



6. ábra. Gélelektroforézis

Eredmények és értékelésük

A szekvencia analízis során a két barlangból származó minták vizsgált COI génszakaszán (639 bp) 44 bázispár eltérést (= 6,9%) tapasztaltunk. Ezek mindegyike szinonim, tehát aminosav változást nem okozó mutáció volt, melyből 7 az 1. kodonpozícióban és 37 a 2. kodonpozícióban lokalizálódott.

A tranzíció: transzverzió arány 40:4. Megfelelő kalibrációs pont nélkül nehéz pusztán a ráta alapján divergencia időt becsülni, de ha a COI mutációs rátáját 1,15% (Albrecht et al., 2006) és 8,6% (Pons et al. 2010) közé becsüljük, akkor a szétválás 3 millió és 0,4 millió év közé, a felső

Pliocén vagy még inkább a Pleisztocén idejére tehető. Habár 6,9% eltérést a COI szekvenciák között már fajszintű különbségnek tartanak a *Hydrobiidae* családon belül (Bichain et al. 2007), a rendelkezésre álló egyetlen génszakasz alapján egyelőre nem mernénk messzemenő taxonómiai következtetéseket levonni. Viszont már most szükséges lenne önálló konzerváció-biológiai egységként kezelni a két populációt és fontosnak tartjuk további vizsgálatok elvégzését (morfometria, további génszakaszok szekvenálása, ökológia) taxonómiai helyzetük tisztázása céljából.

Felhasznált irodalom

- Albrecht, C., Trajanovski, S., Kuhn, K., Streit, B. & Wilke, T. 2006: Rapid evolution of an ancient lake species flock: Freshwater limpets (Gastropoda: Ancyliidae) in the Balkan Lake Ohrid. – *Organisms, Diversity & Evolution* 6: 294–307.
- Bichain, J., Gaubert, P., Samadi, S. & Boisselier-Dubayle, M. 2007: A gleam in the dark: Phylogenetic species delimitation in the confusing spring-snail genus *Bythinella* Moquin-Tandon, 1856 (Gastropoda: Rissosoidea: Amnicolidae). – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 927–941.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. – *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 3: 294–299.
- Marchordom, A., Araujo, R., Erpenbeck, D. & Ramos, M.A. 2003: Phylogeography and conservation genetics of the endangered European Margaritiferidae (Bivalvia: Unionidae). – *Biology – Journal of the Linnean Society* 8: 235–252.
- Pintér, L. 1968: Zur Kenntnis der Hydrobiiden des Mecsek-Gebirges (Ungarn) (Gastropoda: Prosobranchia). – *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 14 (3–4): 441–445.
- Pons, J., Ribera, I., Bertranpetit, J. & Balke, M. 2010: Nucleotide substitution rates for the full set of mitochondrial protein-coding genes in Coleoptera. – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 796–807.
- Soós, L. 1927: Adatok a magyarországi barlangok Mollusca-faunájának ismeretéhez. – *Állattani Közlemények* 24: 163–180.
- Wagner, H. 1931: Vorläufige Mitteilung über die Molluskenfauna der Grotte von Mánfain Südungarn. – *Zoologischer Anzeiger (Leipzig)* 95: 292.