

Molekuláris biológiai módszerek használata a Lumbricidae és az Enchytraeidae (Annelida) családok taxonómiai problémáinak megoldásában

Cech Gábor

Doktori (Ph.D.) értekezés

ELTE Biológia Doktori Iskola

Iskolavezető: Prof. Dr. Erdei Anna

Zootaxonómia, állatökológia, hidrobiológia Doktori Program

Programvezető: Prof. Dr. Török János

Témavezető: Dr. Dózsa-Farkas Klára

DsC. tudományos tanácsadó, ny. egyetemi tanár

Dr. Csuzdi Csaba

DsC. tudományos tanácsadó, c. egyetemi tanár

Budapest

2011

1. Tartalomjegyzék

1.	Tartalomjegyzék	2
2.	Bevezetés.....	3
3.	Irodalmi áttekintés.....	5
3.1	Az Annelida törzs jellemzői és rendszere	5
3.1.1	A Lumbricidae család jellemzése és rendszere	5
3.1.2	A Lumbricidae családban használt morfológiai bélyegek ismertetése	13
3.1.3	Taxonómiai és biogeográfiai kérdések a Lumbricidae családon belül.....	19
3.1.4	Az Enchytraeidae család	25
3.1.5	Az Enchytraeidae családban használt főbb morfológiai bélyegek ismertetése 27	
3.1.6	A molekuláris vizsgálatokban tanulmányozott Enchytraeidae genuszok rövid jellemzése	34
3.2	A riboszomális gének és alkalmazásuk a filogenetikában	38
3.3	Molekuláris vizsgálatok az Annelida törzsben.....	39
3.3.1	DNS vizsgálatokon alapuló eredmények a földigiliszták taxonómiájában	42
3.3.2	Molekuláris vizsgálatok az <i>Enchytraeidae</i> családban	44
4.	Célkitűzések	48
5.	Anyag és módszer	49
6.	Eredmények és értékelésük	59
6.1	A Lumbricidae család.....	59
6.1.1	A 18S rDNS szekvenciák vizsgálata	59
6.1.2	Az 5,8S rDNS-ITS2 szakasz vizsgálata	63
6.1.3	A 18S rDNS és az 5,8S rDNS-ITS2 szakaszok közös értékelése	70
6.1.4	A Lumbricidae családban alkalmazott fontosabb morfológiai bélyegek értékelése az eredmények tükrében	74
6.2	Az Enchytraeidae család	76
6.2.1	A <i>Bryodrilus</i> , <i>Buchholzia</i> , <i>Enchytronia</i> , és <i>Mesenchytraeus</i> genuszok vizsgálata	76
6.2.2	A <i>Fridericia</i> genusz vizsgálata	81
7.	Összefoglalás.....	94
8.	Kivonat.....	100
9.	Abstract	102
10.	Felhasznált irodalom	104
11.	Függelék	126
12.	Köszönetnyilvánítás	131

2. Bevezetés

Az Annelida törzsbe tartozó Lumbricidae és Enchytraeidae családokban a morfológiai alapú rendszerezés sok esetben nehezen megoldható problémákat vet fel. Egyes bélyegekről nehezen, vagy éppen sehogy sem dönthető el, hogy azok ősi tulajdonságok-e (pleziomorf), illetve újonnan jelentek-e meg az evolúció folyamán (apomorf), sőt, sokszor az sem hogy egyáltalán homológ bélyegek-e. Mindez nehezen ellenőrizhetővé teszi, hogy az egyes leszármazási ágak valóságosak-e. További problémát jelent annak megállapítása, hogy bizonyos karakterek megléte, avagy hiánya elegendő-e a közel rokon fajok megkülönböztetéséhez. Mivel ezekben a taxonokban, az ivarszervek struktúrája kulcsfontossággal bír a rendszerezésben, juvenilis példányoknál sok esetben nem kivitelezhető a faji szintű identifikáció.

A Lumbricidae családon belül kiemelt fontossággal bír az *Allolobophora*, *Aporrectodea*, *Bimastos*, *Eisenia* és a *Dendrobaena* nemekbe tartozó fajok vizsgálata, hiszen ezek a genuszok morfológiai szempontból is teljesen kevertnek tűnnek, bizonyosan polifiletikus taxonok. A 80-as évektől kezdve számos próbálkozás született, amely megpróbálta revideálni a családot, ám ezek a törekvések sorra kudarcot vallottak, mivel csak egy-egy ország, illetve régió faunájának vizsgálatából vontak le következtetéseket az egész Holarktikumban elterjedt családra vonatkozólag (Perel, 1979; Mršić, 1991; Qiu és Bouché, 1998). A problémát tovább súlyosbítja, hogy a revíziók során számos új genuszt vezettek be, amelyek validitása meglehetősen kétséges, ugyanígy a fajnevek között is számos szinonimát lehet találni, ami tovább bonyolítja Lumbricidae család mára összekuszálódott rendszerét.

Az Enchytraeidae családon belül a genuszok többsége morfológiailag és DNS vizsgálatok által megalapozottan is monfiletikusnak tűnik, egymáshoz való viszonyuk tisztázódni látszik. A problémát egy genuszon belül a közel rokon fajok megkülönböztetése okozza. Számos esetben nem dönthető el egyértelműen, hogy a tapasztalt kisebb morfológiai eltérések önálló fajokra utalnak-e, vagy pedig csak fajon belüli variációról van szó. A legtöbb kihívást a számos fajjal rendelkező *Fridericia* genusz tartogatja, ahol sok fajkomplexet tartanak számon a terület taxonómusai, mint például a *F. ratzeli*, *F. bulboides*, *F. aurita* fajcsoportok, amelyeknek közös jellemzőjük a nagyfokú belső, morfológiai heterogenitás (Schmelz, 2003).

A riboszomális gének és az azokat elválasztó spacer szekvenciák vizsgálata bevett módszer a morfológiai alapú rendszerezés kiegészítésére, mivel univerzális elterjedtségűek,

azonkívül konzervatív és variábilis szekvenciájú szakaszok egyaránt megtalálhatóak közöttük (Gerbi, 1985; Hillis és Dixon, 1991). Az általunk használt 18S rDNS és az ITS régiót széleskörűen alkalmazzák filogenetikai vizsgálatokhoz. A 18S rDNS-re jellemző, hogy konzervatívabb, genusz és magasabb rendszertani kategóriáknál megbízható felbontást ad, illetve egyes taxonoknál genuszon belül is alkalmas fajok szétválasztására (Erséus és mtsai, 2000). Azt ITS régió ezzel szemben variábilisabb szekvenciával bír, genusz, faj és alfaj szinten. Ezeknek a lókuszeknek a sikeres alkalmazására találhatunk példákat az Annelida törzsön belül is szép számban (Chen és mtsai, 2002; Gustafsson és mtsai, 2009; Kvist és mtsai, 2010; De Wit és Erséus, 2010; Erséus és mtsai., 2010; De Wit és mtsai. 2011).

Magyarországon a Lumbricidae családnak elismert taxonómusa Dr. Csuzdi Csaba, az Enchytraeidae családnak Dr. Dózsa-Farkas Klára, ami lehetővé tette, hogy doktori munkám fő célkitűzése a vizsgált földigiliszta taxonok filogenetikai viszonyainak feltérképezése, illetve a morfológiailag nehezen szétválasztható televényféreg fajok megkülönböztetése legyen molekuláris módszerek használatával.

3. Irodalmi áttekintés

3.1 Az Annelida törzs jellemzői és rendszere

A gyűrűsférgesek törzse (Annelida) több mint 17000 fajjal az állatok országának fajokban gazdag törzse. Nevüket a testükön végighúzódnó homonóm szelvényekről kapták. A törzsbe tartozó fajok széles körben elterjedtek az egész földön a mélytengerektől kezdve a parti zónákon át a szárazföldi, illetve édesvízi élőhelyekig.

A hagyományos taxonómiai felosztás szerint a gyűrűsférgeseket egyrészt soksertéjűekre (Polychaeta), másrészt kevésertéjűekre (Oligochaeta), illetve módosult gyűrűsférgesekre, piócákra (Hirudinea) oszthatjuk. A modern rendszerek létrejöttében nagy szerepük volt a molekuláris biológiai vizsgálatoknak, amelyek radikálisan megváltoztatták az utóbbi évtizedben a hagyományos rendszert, aminek következtében a piócákat és rokonaikat immár a kevésertéjű férgesek egy alcsoportjának tekintik (Martin, 2001; Siddall és mtsai, 2001; Erséus és Källersjö, 2004; Rousset és mtsai, 2007, 2008; Struck és mtsai, 2007; Marotta és mtsai, 2008), továbbá az oligochaeták a polychaetákon belül is egy oldalági leszármazást jelenítenek meg. Ebben a rendszerben a hagyományosan vett Oligochaeta taxon a Hirudinea nélkül parafiletikusnak minősül, továbbá a Polychaeta is parafiletikus az Oligochaeta nélkül. Szintén a molekuláris vizsgálatoknak köszönhetően az Annelida törzsbe sorolják be immár az ezelőtt önálló törzsként kezelt Pogonophora, Echiura és Sipuncula taxonokat is (McHugh, 1997; Struck és mtsai, 2007).

3.1.1 A Lumbricidae család jellemzése és rendszere

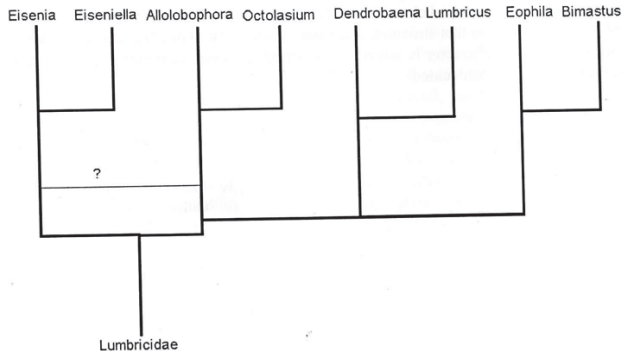
A földigiliszták (Lumbricidae) családjába tartozó fajok a talaj megafaunájának tagjai, méretük 1-70 cm közé esik. Szelvényeiken 8-8 serte található, amelyek elhelyezkedhetnek egyenként, vagy párosával szorosan. A hímivarnyílás legtöbbször a 15. szelvényen van, emögött húzódik a többbrétegű nyereg (clitellum), amely általában párási időszaktól függetlenül megtalálható. Hermafroditák, de önmegtermékenyítésre nem ismerünk adatokat. Szaprofág állatok, a talajban lévő növényi részekkel táplálkoznak. Az ürülékükkel és földalatti járataikkal a talajban lejátszódó dekomponálás fontos résztvevői.

A magyarországi földigiliszta-kutatásnak a 19. századig visszanyúló gazdag hagyományai vannak. Elsőként Örley László foglalkozott a családdal (Örley 1881, 1885), neki köszönhető két ma is érvényes genusz: az *Octolasion* Örley, 1885 és az *Aporrectodea* Örley, 1885. Őt Szűts Andor követte, aki átfogóan elemezte a hazai faunát, és Örley fajlistáját a modern nevezéktanhoz hozzáigazítva és saját gyűjtésekkel kiegészítve 19 faj és varietas leírását és elterjedési adatait közli (Szűts, 1909). A második világháború után új fejezet kezdődött a földigiliszták magyarországi kutatásában. Andrassy István (1955), a neves Nematoda-kutató foglalta össze a Magyarország Állatvilága sorozatban a hazai Annelidákat, majd Zicsi András (1959a, b) kritikailag elemezve az irodalmi adatokat öt éves faunisztikai kutatásai alapján aktualizálta a hazai földigiliszták fajlistáját. Az azóta is változatlan intenzitással folyó faunakutatás eredményeiből nagyszámú publikáció született, s a 80-as években Csuzdi Csaba is bekapcsolódott a kutatásokba. Az eltelt évtizedek hazai kutatásának összegzéseként jelentették meg az „Earthworms of Hungary” című könyvüket (Csuzdi és Zicsi, 2003), amely a hazai fajok teljes listáját, és azok leírását tartalmazza, emellett részletes betekintést nyújt a Lumbricidae családot érintő taxonómiai problémákba és bemutatja a család biogeográfiai sajátosságait.

A Lumbricidae család rendszerezésének történeti áttekintése a morfológia tükrében

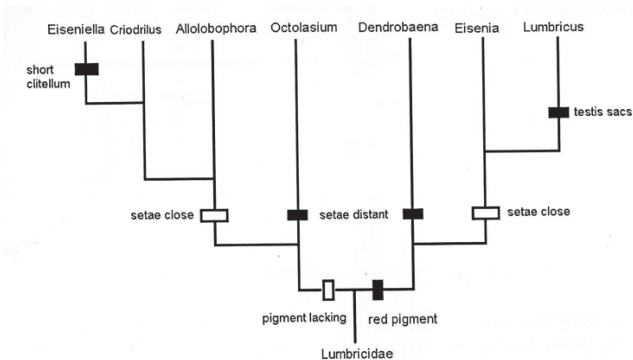
A földigiliszták a nyereggel rendelkező gyűrűsférgék (Clitellata) egyik családját alkotják, rendszertani felosztása egyértelműen az egyik legnagyobb problémát jelenti a kutatóknak. A család rendszerezésekor az első időkben főként olyan morfológiai bélyegeket használtak, mint a test színe és formája, a serték állása, a nyereg és a serdülési dudorok elhelyezkedése. Ennek alapján Eisen (1874) négy nemet különböztetett meg: *Lumbricus* L. 1758, *Allolobophora* Eisen, 1874, *Dendrobaena* Eisen, 1874, *Alurus* Eisen, 1874. Rosa, (1893) és Michaelsen (1900) munkája figyelembe vette az ivarszervek felépítését, így például az ondóhólyagok számának csökkenését valamint a spermatartók nyílásának elhelyezkedését értékelték jelentős taxonómiai bélyegekként. Ezeket a tulajdonságokat kiegészítették a mészmirigyek kialakulásával, a szívek elhelyezkedésével, a megvastagodott disszepimentumok számával. Michaelsen (1900) fent említett műve volt az első teljes Lumbricidae családot átfogó dolgozat, amiben az addig leírt mintegy 250 fajt 5 nembe (*Eiseniella* Michaelsen, 1900, *Eisenia* Malm, 1877, *Octolasion* Örley, 1885, *Lumbricus* L. 1758, *Helodrilus* Hoffmeister, 1845) rendszerezte, továbbá a *Helodrilus* nemen belül 4 alnemet különböztetett meg (*Helodrilus* (*Helodrilus*) Hoffmeister, 1845, *Helodrilus* (*Allolobophora*) Eisen, 1874,

Helodrilus (*Dendrobaena*) Eisen, 1874, *Helodrilus* (*Bimastus*) Moore, 1894). Néhány kisebb változtatással (Michaelson, 1910) a negyvenes évek elejéig széleskörűen használták ezt a filogenetikai alapokon nyugvónak tűnő rendszert (1. ábra), hiszen az időközben nemi rangra emelt alnemekkel együtt (Svetlov, 1924) a 8 genusz világosan elhatárolódott egymástól.



1. ábra: A Lumbricidae rendszere Michaelson (1910) alapján

A giliszták anatómiai felépítésére vonatkozó ismeretek bővülésével egyre inkább fenntarthatatlanná vált ez a főként ivari bélyegeken alapuló rendszer, így például kiderült, hogy az ondóhólyagok száma közel rokon fajoknál, de akár fajon belül is variálhat (Pop, 1941). Pool (1937) a hosszanti izomzat felépítését vizsgálva két nagy csoportot különített el, a tollas, illetve a nyálábos szerkezettel rendelkező fajokat. Pop (1941) részletes revízió alá vetette az egyes nemeket és fajokat. Munkájában a Lumbricidae családot két fő csoportra osztotta a porphyrin alapú pigment megléte illetve hiánya alapján (2. ábra). Az előbbi csoportban a tág sertéállással rendelkező fajokat a *Dendrobaena*, a szűk sertéállású, tanylobikus fejformájúakat a *Lumbricus*, míg az epilobikus fejfelépítésűeket az *Eisenia* nembe sorolta. A pigmentnélküli tág sertéállásúak az *Octolasion*, a szűk sertéállásúak pedig az *Allolobophora*, valamint az *Eiseniella* nemekbe kerültek. Ez utóbbi genusz megkülönböztethető volt a tetraedrikus testvéggel, továbbá az egy szelvényre kiterjedő izomgyomor segítségével. A hosszanti izom felépítése szerint csupán az *Octolasion* és a *Lumbricus* nemek bizonyultak homogénnek (tollas), a többi genuszban mindkét típus fellelhető. Popnak csak a fajok töredékének izomzatáról voltak ismeretei, ezért nem vállalkozott rá, hogy filogenetikailag értelmezze a tollas és nyálábos típusot.

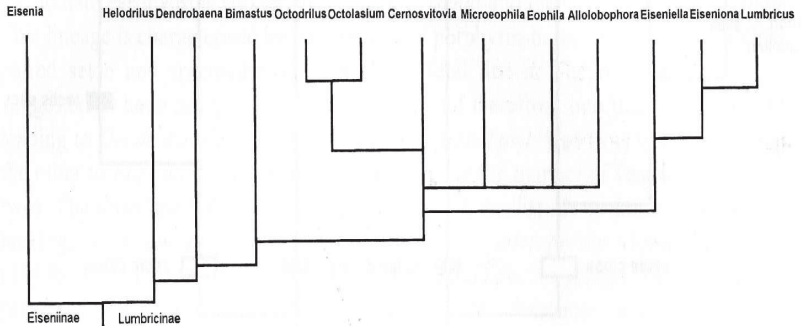


2. ábra: A Lumbricidae rendszere Pop (1941) szerint

A sötét téglalapok az apomorf az üres a pleziomorf bélyegeket jelölik.

Pop rendszerét követő időkben a leírt nemek száma ugrásszerűen megnőtt, a hetvenes évekre mintegy megnégyszereződött (Csuzdi és Zicsi, 2003), azonban filogenetikai alapokon nyugvó rendszert nem tudtak létrehozni. A szerzők sok esetben nem rendelkeztek elegendő összehasonlító anyaggal, gyakran kiragadott bélyegek alapján hajtották végre a család revízióját. A publikált fajok nagyon sok esetben szinonimnak bizonyultak, a fajok leírását sokszor egyetlen példány alapján végezték. Pop munkáján alapulva, azt kis mértékben átalakítva, illetve bővítve Zicsi (1982) egy egyszerűsített rendszert közölt, amely alapvetőnek bizonyult a lumbricidákkal foglalkozó kutatók körében.

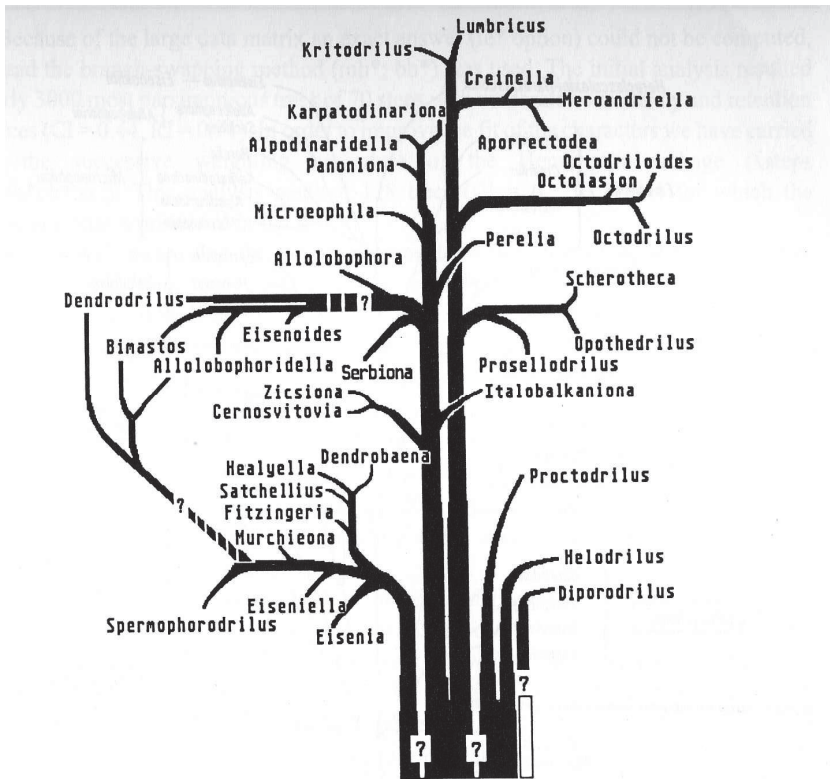
Omodeo (1956) gyűjtőnemek nélküli filogenetikai rendszer kialakítására törekedett (3. ábra). A nyalábos izomzatot pleziomorf, a tollasat pedig apomorf bélyegnek tekintette. Revíziójában új bélyegeket is figyelembe vett, így a mézmirigy divertikulumok felépítését, a kromoszómaszámot, embrionális fejlődési sajátosságokat. Rendszerének alkalmazhatóságát erősen csökkentette, hogy csupán a fajok töredékét sikerült megvizsgálnia, a fajok többségéről csak irodalmi ismeretekkel rendelkezett, amelyek sokszor nélkülözték az újonnan bevezetett bélyegekre vonatkozó adatokat.



3. ábra: Omodeo (1956) rendszere a Lumbricidae családra

Más családokban eredménnyel alkalmazott nefridiális hólyagok alkalmazásra Gates (1975) hívta fel a figyelmet, amit Perel (1976a, 1979) kiterjesztett az addig leírt fajokra, feltételezve, hogy az evolúció folyamán egyre komplikáltabb hólyagtípusok jelentek meg. A nefridiális hólyagok mellett felhasználta még rendszerében a serteállást, a pigmentálttságot, a fejlebeny formáját, a hosszanti izomzatot, illetve még számos bélyeget. Az általa sugallt rendszerben csupán a *Lumbricus*, az *Eisenia*, és az *Allolobophora* (*Svetlovia*) Perel alnem mutatkozott monofiletikusnak, az *Allolobophora* (*Allolobophora*) és a *Dendrobaena* nemek továbbra is igen heterogének maradtak. Revíziójának másik hibája volt, hogy ő is csupán egy szűkebb terület, a Szovjetunió faunája alapján próbált megállapításokat tenni, így sok európai, illetve észak-amerikai nem kimaradt a vizsgálatokból.

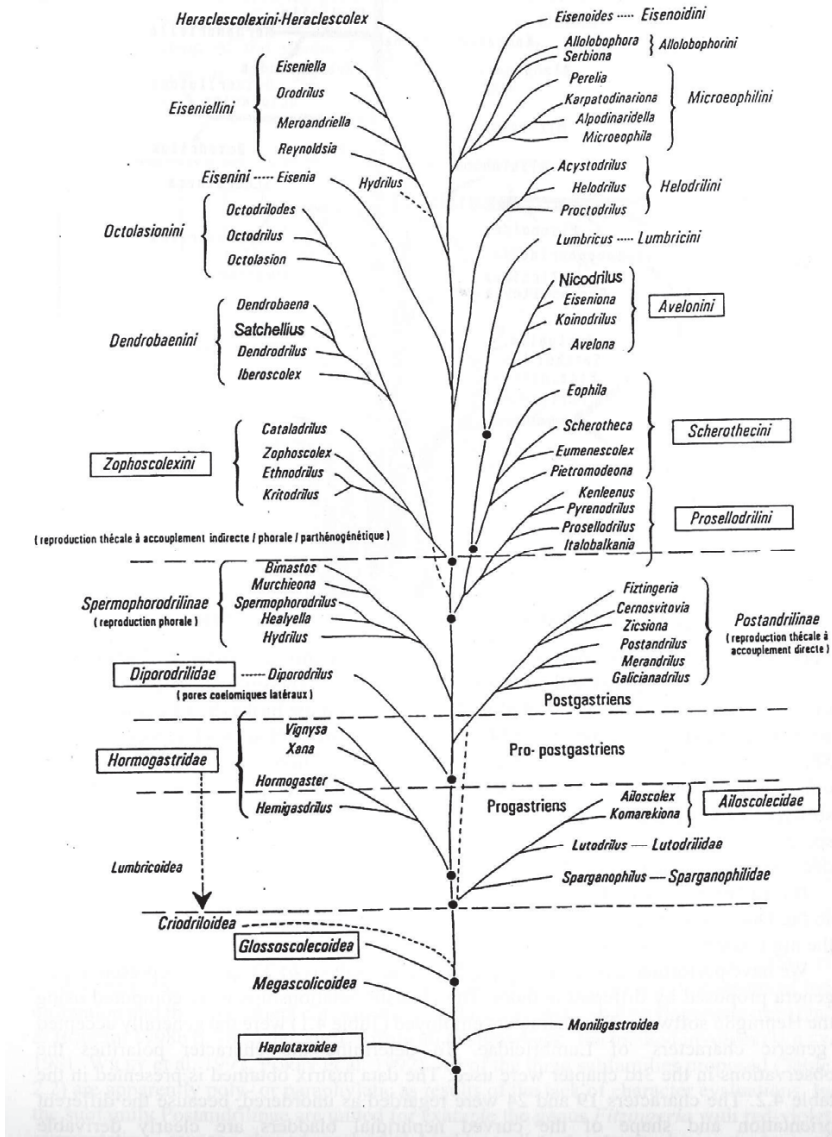
A nyolcvanas évek elején a szisztematikában a kladisztika térnyerése hozott változást, amely a földigiliszták rendszerezésére is kifejtette hatását, megteremtve az igényt egy filogenetikai alapú rendszer felállítására. Ezzel összefüggésben a leginkább zavaros *Allolobophora* és *Dendrobaena* genuszok revíziójára számos lépés irányult (Zicsi 1978, 1981, 1985), de összességében a problémát nem sikerült megoldani. Mršić (1991) vállalkozott az egész család újrendszerezésére (4. ábra), azonban ő is elkövette elődei hibáját, és megint egy szűkebb régió, a Balkán fajai alapján hozott létre átfogó családrevíziót, súlyosbítva ezt azzal, hogy nem foglalkozott a bélyegek súlyozásával, és nélkülözte a modern szisztematika módszereit, aminek következtében para- és polifiletikus taxonok nagy számban fordultak elő rendszerében.



4. ábra: A Lumbricidae család rendszere Mršić (1991) szerint

Ezt a rendszert vette át és alakította tovább Qiu és Bouché (1998) egy újabb családrevízióban, amelyben a nemek közötti rokonsági viszonyok tisztázására is kísérletet tett. A fenetikus klasszifikáció módszereit felhasználva 3 alcsaládot és 16 genust állítottak fel. Mintegy 70 új faj, alfaj és varietas tűnik fel munkájukban, tovább 7 új nem, illetve alnemet vezettek be. Sajnálatos módon ez a rendszer is bővelkedik a poli- és parafiletikus csoportokban, ami a fenetikus módszerek hibájának, így például a súlyozás mellőzésének tudható be. Emellett sajnálatos módon az egész családot felölölő revíziójuk szintén egy szűkebb földrajzi terület, Franciaország földigiliszta faunáján alapult, ennek eredményeiből, kiindulva próbáltak következtetéseket levonni az egész Holarktikumban elterjedt család rokonsági kapcsolataira.

Jól látható, hogy az újabb revíziók inkább csak bonyolították a Lumbricidae család rendszerét (Függelék I.), mintsem áttekinthetőbbé és filogenetikailag megalapozottabbá tették volna, különösen igaz ez Qiu és Bouché (1998) rendszerére (5. ábra), amely használatra alkalmatlannak bizonyult (Csuzdi és Zicsi, 2003). Az azóta eltelt időben nem született átfogó munka a család filogenetikai viszonyainak revidálására. Az eddig elvégzett revíziók mind egy kisebb terület faunáján alapultak, nem meglepő hát, hogy a családon belül a rokonsági viszonyok összekuszálódtak, tovább rengeteg a nem valid genusz, illetve faj. A kilencvenes évek közepére a Lumbricidae család taxonómiájában nagyfokú összevisszaság alakult ki, Qiu és Bouché (1998) munkáját alapul véve ma körülbelül 700 fajnév létezik, amely 63 genusz között oszlik meg.



5. ábra: Qiu és Bouché rendszere (1998)

3.1.2 A Lumbricidae családban használt morfológiai bélyegek ismertetése

A morfológiai bélyegek ismertetése Csuzdi és Zicsi (2003) monográfiáján alapszik.

Külső karakterek

Testméret és szelvényszám

A testméret és a szelvényszám jelentős fajon belüli variációt mutathat, ezért noha a fajok leírásánál közlik ezeket az adatokat, jelentősebb taxonómiai értéket nem tulajdonítanak neki.

Pigmentáció

A földigiliszta fajok jelentős része porfirin alapú, ibolyásvörös pigmentekkel rendelkezik, amely bélyeg evolúciós jelentőségére Pop (1941) hívta fel a figyelmet, továbbá ő maga is sikeresen alkalmazta a *Dendrobaena* és az *Eisenia* genuszok revideálásakor. Ez a karakter azóta szélesen használt a faj feletti csoportok elkülönítésekor.

Fejlebens

A fejlebens (prostomium) dorzálisan borítja a szájnylást, első szelvényhez való kapcsolódása alapján 3 fő típusa különböztethető meg: prolobikus, epilobikus és tanylobikus.

Hátpórusok

A testüreg nyílása a külvilág felé. Az első hátpórus helyzete többnyire állandó, a fajok nagy részénél az 5/6 interszegmentális barázdában található. Némelykor hátratólik a nyereg felé, sőt bizonyos fajoknál hiányozhat is. Korlátozott taxonómiai értékkel bír, mivel egyes fajoknál nagymértékben variálódhat.

Nefridiopórusok

A metanefridium nyílásai a külvilág irányába. Rendszerint a szelvények elülső részén nyílnak. Vertikális mintázata fajokon belül konstans

Hímivarnyílás

Általában a 15. szelvényen található, azonban néhány genusznál (*Fitzingeria*, *Octodriloides*, *Cernovitovia*, *Postandrilus*) a nyeregszelvények felé hátratulódhat. Több szerző (Zicsi 1986, Qiu és Bouché 1998) szünapomorf bélyegnek tekinti, amely a szupraspecifikus csoportok rendszerezésében nagy jelentőséggel bír. Mršič (1991) homoplázikusnak értékeli ezt a bélyeget, továbbá előfordulnak fajon, sőt kivételes esetekben akár egyeden belüli (aszimmetrikus elhelyezkedés) variációk is. Mindezek alapján Perel (1997) megkérdőjelezi az összes olyan genusz (p. *Fitzingeria*, *Octodriloides*) validitását, amelyeket e bélyeg alapján különítettek el. Az elhelyezkedésén kívül, fontos lehet még a hímivarnyílás mérete is, azonban ez a tulajdonság is mutathat variációt fajokon, sőt akár populációkon belül is.

Női ivarnyílás

A női varnyílás legtöbbször csak alig észrevehető pont a 14. szelvényen közvetlenül a *b* serte fölött. Ez alól az *Eiseniella* és a *Healyella* nemek képeznek kivételt, ahol a női ivarnyílás az *a-b* sertesorok között található.

Ondótartó nyílások

Az ondótartók (receptaculum seminis) rendszerint interszegmentálisan nyílnak a nyereg előtt. Általában a *c* vagy a *d* sertesor közelében helyezkednek el, illetve előfordul, hogy eltolódnak a dorzális középvonal felé. A nyílások helyzete fontos bélyeg, Rosa (1893) és Michaelsen (1900) rendszerében a legfontosabb karakterek egyike a genuszok elkülönítésére, azonban Pop (1941) felhívta rá a figyelmet, hogy a nyílások pozíciója sok esetben konvergens fejlődés eredménye, s gyakran nem belül is erős variabilitást mutat.

Nyereg

A nyereg (clitellum) a lumbricida fajok elkülönítésének egyik legfontosabb jellemzője, amely nélkül a faji identifikáció nem lehetséges. Egyes genuszokban (pl. *Aporrectodea*, *Allolobophora*) kiterjedésében 2-3 szelvényes eltolódás még populációkon belül is megfigyelhető. Zicsi (1963) leszögezi, hogy az irodalomban egyes esetekben megmutatózó jelentős mértékű eltérés a nyereg helyzetét illetően annak tudható be, hogy a vizsgálatokat nem teljesen kifejlett állatokon végezték.

Serdülési dudorok (tubercula pubertatis)

A nyereg mellett a serdülési dudorok alkotják az egyik legfontosabb faji bélyeget. Ezek elhelyezkedése, hossza sokszor sokkal stabilabb, mint a nyeregé, és a fejlődésnek már egy korábbi szakaszában kialakul. A serdülési dudoroknak több formája van. Legegyszerűbb esetben egy mirigyes sáv a nyereg szegélyén, de van bonyolultabb felépítésű, ún. szívógödör szerű tubercula is.

Serteállítás

A Lumbricidae családba tartozó fajok szelvényeiken 8 sertét viselnek. A sertesorok egymástól való távolsága nagy jelentőségű a fajfeletti taxonok meghatározásában. Általában a szűk állású sertepárt jelölik meg pleziomorf állapotként, míg a tág, illetve a páratlan sertéállást apomorfként (Pop, 1941; Mršič, 1991). A sertesorokat a ventrális oldaltól indulva betűkkel jelölik (*a, b, c, d*).

Genitális papillák és genitális serték

A genitális papillák mirigyes megvastagodások bizonyos serték körül, ilyenkor a serték is módosulnak genitális sertékké. A papillák taxonómiai szerepe meglehetősen alacsony (Bouché, 1972; Zicsi, 1974; Perel, 1979), mivel számuk és elhelyezkedésük nagyfokú variabilitást mutat populációkon belül, illetve különböző szaporodási ciklusokban egyeden belül is eltérhet.

Belső karakterek

Disszepimentumok

Az érintkező szelvények peritoneum lemezeinek összeolvadásából jönnek létre, a szelvényeket választják el egymástól. Általában hártyszerűek, de a test elején fajra jellemző módon, különböző mértékben megvastagodhatnak.

Szívek

A test elején lévő dorzális és ventrális edényeket köti össze, összhúzóköny filamentumokat is tartalmaznak. Szokásos pozíciójuk a 6.-12. szelvények, de például a *Dendrobaena* nemben belül megfigyelhető a szívek számának redukciója is. Ilyen esetekben az utolsó pár szív helye a 9- vagy a 10. szelvényben van.

Mézmirigyek

A mézmirigyek, más néven Morren-féle mirigyek nagy taxonómiai jelentőséggel bírnak nemcsak a Lumbricidae családban, de a földigiliszták összes családjában. A lumbricidáknál legtöbbször a 10-14. szelvény között helyezkednek el, és vagy közvetlenül nyílnak a nyelöcsöbe, vagy egy kiöblösödésen (mézmirigyzsák) keresztül. A mézmirigyzsák nyílása helyzete szerint lehet laterális, posztero-laterális, valamint, posztero-dorzális.

Lzmos gyomrok

A Lumbricidae családban kisebb a jelentősége, mint más földigilisztá családokban. Szokásos helyül a 17-18. szelvény, de mivel mérete változhat, ebből fakadóan látszólag helyzete is más lehet.

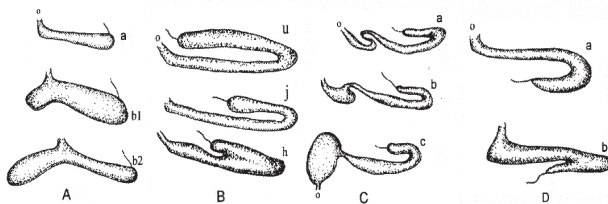
Középbéli redő (typhlosolis)

Taxonómiai szerepe vitatott, Szűts Andor (1913) volt az első, aki taxonómiai szerepet tulajdonított neki. Általában 3 fő típusát különböztetik meg: egyszerű vagy hengeres, kétlebenyes, háromlebenyes. A konzerváció során jelentős változásokat szenvedhet, ami nehezíti az egyes típusok felismerését, így filogenetikai felhasználhatósága problematikus.

Kiválasztórendszer

A Lumbricidae családban a kiválasztórendszert, és azon belül is főleg a húgyhólyagok alakját és felépítését gyakran alkalmazzák filogenetikai következtetések levonására. A kiválasztórendszernek alapvetően 2 típusa fordul elő, az exo- és az enteronefrikus. Az exonefrikus állatoknál a metanefridiumok minden szelvényen külön póruson keresztül nyílnak a külvilágra, az enteronefrikus esetben közös gyűjtőcsatorna van, amelyik a végbélbe torkollik. Az exonefrikus metanefridiumoknak a nefridiopórus előtt lehet egy tágulata, az ún. nefridiális hólyag vagy húgyhólyag. A húgyhólyag igen változatos alakú lehet (6. ábra), a legegyszerűbb esetben csak egy kis zsák. Ennek megnyúlásával alakul ki a kolbász alakú hólyag, amelyből ektális kiöblösödéssel levezethető a piskóta alakú (ún. *octaedra* típusú) nefridiális hólyag. Az entális vég fej vagy fark irányba begömbülve a J- illetve U-alakú hólyagot hozza létre. A nefridiális hólyag ektális, illetve entális görbületei másodlagosan összeolvadhatnak, még bonyolultabb struktúrákat hozva létre. Számos taxonómus (Perel, 1979; Mršić, 1991) nagy fontosságot tulajdonít a különböző hólyagtípusoknak, amelyeket szünapomorfiaként értelmeznek, s az egyes genuszok elválasztó bélyegeként használják.

Csuzdi (2004) kimutatta, hogy a hasonló bélyegek mögött több esetben homoplázia állhat, így kizárólagos alkalmazása polifiletikus csoportok létrehozását eredményezheti.



6. ábra. Nefridiális hólyagok (Csuzdi és Zicsi, 2003).

A = egyszerű zsák típus, a = kolbász alakú, b1, b2 = piskóta alakú (octaedra típus) különböző méretű ektális lebennyel, B = előre hajló hólyag (proclinate) típus u = U alakú, j = J alakú, h = horog alakú, C = szigmoid hólyag, a = a test 7–8. szelvényében, b = a test 10–12. szelvényében c = a nyereg mögött, D = hátra hajló hólyag (reclinate) a = J alakú, b = okarina alakú.

A hosszanti izomzat

Először Pool (1937) mutatott rá a hosszanti izomnyalábok felépítésében észrevehető különbségekre, majd Pop (1941) alkalmazta revíziójában monofiletikus taxonok (pl. *Lumbricus*, *Octolasion*) kialakítására. Két fő típusa létezik, a nyalábos és a tollas szerkezetű, melyeket Pop párhuzamos fejlődési irányoknak tekintett. Az újabb szemlélet (Omodeo, 1956; Perel, 1968; Csuzdi és Zicsi, 2003) szerint a nyalábos a pleziomorf, míg a tollas az apomorf állapot. A kétféle karakter állapot között még meg lehet különböztetni egy átmeneti formát is.

Herék

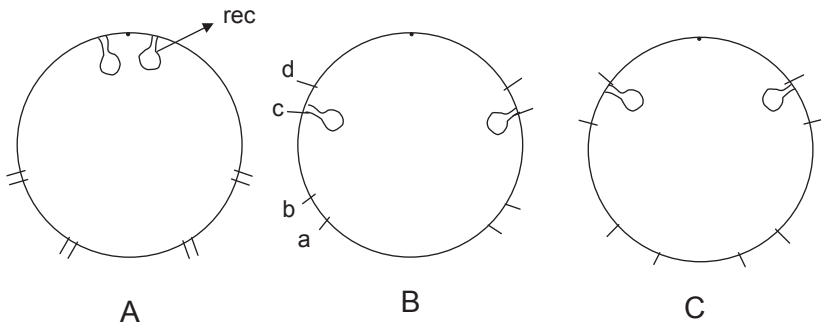
Két pár here az általánosan jellemző, melyek a 10-11. szelvényben találhatóak, ezt holoandrikus állapotnak nevezik. A meroandrikus esetben az egyik pár hiányzik, ez lehet az előlő (metandrikus), illetve a hátulsó (proandrikus) pár egyaránt. A herék redukciója a legtöbb csoportban megfigyelhető.

Ondóhólyagok (*vesicula seminalis*)

A herékben termelődött spermiumok a tárolási helyükre, az ondóhólyagokba kerülnek. Holoandria esetén 2-4 pár ondóhólyag kialakulása figyelhető meg, melyek a 9-12., a 9., 11., 12., illetve 11-12 szelvényben lehetnek. Proandrikus fajoknál a 9., 11. szelvényben, metandrikus fajoknál pedig 10., 12. szelvényben helyezkednek el. Arról, hogy melyik a pleziomorf, illetve az apomorf állapot eltérő vélemények alakultak ki, Pop (1941) a 4 pár ondóhólyagot tekintette primitív bélyegnek, Omodeo (1956) az ellenkezőjét állította. A számba vehető kulcsoportoknál (*Vignisa*, *Ailoscolex*, *Hormogaster*) 2 párat találunk, melyek a 11-12. szelvényben vannak, így valószínűleg ez az ősi állapot, bár nem vethetjük el teljesen, hogy egyes csoportokban ez a 9-12. elrendezés reverziójával alakult ki.

Ondózsákok

Az ondózsákok a heréket borítják, kötőszövetből épülnek fel, és az ondótölcséreket is magukba foglalják. Mivel a konzerváció során könnyen tönkremehet, ez nehezíti taxonómiai felhasználásukat, noha jelenlétük fontos faji bélyeg lehet.



7. ábra: Az ondótartó nyílások és a serték elhelyezkedése a földigilisztáknál.

A = ondótartó nyílások a dorzális középvonal közelében, sertéállás szűk,

B = ondótartó nyílások a c sertesorban, sertéállás tág páros,

C = ondótartó nyílások a d sertesorban, sertéállás tág,

Rec = ondótartó, a,b,c,d a sertesorok jelzései.

Ondótartók (receptacula seminis)

A peritoneum betüremkedései, itt tárolódnak a szaporodás során a partnertől kapott spermiumok. Rosa (1893) és Michaelsen (1900) rendszereiben még fontos határozó bélyeg, amelyet a genuszok elkülönítésére alkalmaztak. Az ondótartók elhelyezkedése (7. ábra) közel rokon fajokban is nagymértékben eltérő lehet (Pop 1941), ezért az ondótartók nyílása alapján történő klasszifikáció polifiletikus taxonokhoz vezethet. Általában a *cd* sertevonall magasságában helyezkednek el, ami vélhetően a plezimorf állapot, ám egyes csoportoknál dorzális irányba eltolódhat, azonban ez a jelenség nagyfokú homopláziát mutat a családon belül. Az ondótartók száma is meglehetősen sok problémát okoz. Leggyakrabban 2 párral találkozhatunk a 9-10. szelvényekben, azonban egyes fajoknál számuk elérheti akár a 10 párt is a 6. és a 18. szelvények között.

Mellékherék

Az ondóvezető (ductus deferens) proximális szakasza néha erősen feltekeredett és egy úgynevezett mellékherét alkot. Erre a bélyegre már Omodeo (1956) felhívta a figyelmet, de a fajleírások többségénél nem fordítanak rá kellő figyelmet, ezért taxonómiai szerepe még tisztázásra vár.

3.1.3 Taxonómiai és biogeográfiai kérdések a Lumbricidae családon belül

Az Allolobophora Eisen, 1873 s.l. genusz

Szoros, páros serteállással rendelkező fajok, általában pigmentáció nélküliek, bár barnás és zöldes színű fajok előfordulhatnak, de sohasem ibolyásvörösek. A fej epilobikus, az első hátpórus az 5/6 interszegmentális barázdában helyezkedik el. A hím ivarnyílása a 15. szelvényen található, nagy, mirigyos udvara sokszor átnyúlik a szomszédos szelvényekre. Ondótartó nyílásaik a *cd* sertesorban vannak, nefridiopórusaik irregulárisak. A 10. 11. szelvényben található szabadon a két pár here, ondóhólyagaik a 9-12. (esetleg 11, 12), 2-5 pár ondótartójuk pedig a 9-13 szelvény között vannak. Mészmirigyzsákok a 10. szelvényben alakulnak ki, húgyhólyagjuk U vagy J alakú lehet előre hajló entális lebennnyel. Hosszanti izomzatuk nyalábos típusú, kivételesen tollas is lehet.

Az *Allolobophora* egy polifiletikus gyűjtőnem, a genuszt Eisen írta le 1874-ben, és mindig is problematikusnak bizonyult a taxonómusok számára. A genusz hosszú és

komplikált történetét tovább nehezíti az a tény, hogy már a kezdetektől fogva nem rendelkezett kijelölt típusfajjal. Az *Allolobophora* nem a sötét pigmentek nélküli, közel álló sertepárokkal rendelkező, 4 spermazsákos, primitív földigiliszták számára lett létrehozva, amelyek spermatéka nyílásai *cd* sertesorban helyezkednek el. A későbbiekben számos nyilvánvalóan egyéb tulajdonságokkal rendelkező fereg is bekerült a nembe, amely pozíciója és a beletartozó fajok számos változáson esett át (Rosa 1893, Michaelsen 1900, Svetlov 1924).

Pop (1941) revíziójában ezt a genust is vizsgálat alá vonta. Könnyen megkülönböztethető fajcsoportok kialakítására törekedett, ezért az *Allolobophora* nembe sorolt minden fajt, amelyik szűk sertéállású volt és kutikulája nem tartalmazott sötét pigmenteket. Pop (1941, 1948) tisztában volt vele, hogy az így létrejött genusz meglehetősen heterogén, sőt előrevetítette, hogy a későbbiekben további genuszok kialakítására lesz szükség, ha majd rendelkezésre állnak a megfelelő kritériumok.

Azóta folyamatos erőfeszítések történtek a gyűjtőnemként is felfogható *Allolobophora* nemben belül monofiletikus taxonok megalkotására (Omodeo, 1956; Bouché, 1972; Gates, 1975; Perel, 1976a; Zicsi, 1981, 1985; Mršić és Sapkarev, 1988; Qiu és Bouché, 1998), de a filogenetikailag megalapozott rendszer továbbra is hiányzik. Mindeközben a kiindulási *Allolobophora* nemből több mint 30 különféle nem és alnem keletkezett, amelyek validitása sok esetben megkérdőjelezhető (Csuzdi és Zicsi, 2003).

Az *Aporrectodea* Örley, 1885 genusz

Ebbe a nembe szűk sertéállású fajok tartoznak, amelyeknél a pigmentáció általában hiányzik, bár előfordulhatnak barnás vagy zöldes színű állatok, azonban sosem ibolyásvörösek. Hosszanti izomzatuk általában tollas szerkezetű, kivételesen nyalábos is lehet. Fejük epilobikus, az első hátpórus helyzete variál. Mészmirigyzsákok a 10. szelvényben lelhetőek fel. Öndőtartó nyílások a *cd* sertesorban találhatóak, a nefridiopórusok egyvonalban vagy irregulárisan helyezkednek el. A két pát here a 10. és a 11. szelvényben található. Húgyhólyagjuk U vagy J alakú, hátra hajló entális lebennyel. Hímivarnyílásuk a 15. szelvényen helyezkedik el, mirigyves udvara átnyúlik a szomszédos szelvényekbe.

Éz a genusz heterogénnek számít, például az *A. dubiosa* (Örley, 1881) (több ibériai fajjal együtt) nyalábos izomzattal rendelkezik.

A *Bimastos* Moore, 1893 genusz

Az észak-amerikai *Bimastos* Moore, 1893 genusz körül meglehetősen sok a bizonytalanság, validitása évtizedeken átívelő vita tárgya (Michaelsen, 1900; Pop, 1941; Muldal, 1952; Gates, 1969; Perel, 1976a; Zicsi, 1981, Omodeo és Rota, 1989; Zicsi és Michalis, 1993). A genuszt Moore (1893) írta le, és olyan férgeket sorolt bele, amelyeknek gyűrű alakú nyergük van, két pár vezikulummal rendelkeznek, továbbá hiányoznak a tuberkulumok és a spermatékák. Később Michaelsen (1900) a *Helodrilus* Hoffmeister, 1845 alnemeként kezelte, valamint néhány tuberkulum és spermatéka nélküli európai fajt is beleolvastott, mint például a *Lumbricus eiseni* Levinsen, 1884; az *Allolobophora syriaca* Rosa, 1893 és az *Allolobophora constricta* Rosa, 1884. Pop (1941) felszámolta a genuszt, fajait a *Dendrobaena* (tág vagy páratlan serteállású fajok) és az *Eisenia* (szűk serteállású fajok) nemekbe helyezte. Omodeo (1956) kísérletet tett a genusz életre keltésére néhány újabb faj leírásával kiegészítve. Mások, például Gates (1969) a genusz meghagyásáért érveltek, és hangsúlyozták endemitását Észak-Amerikában, valamint eliminálták az európai fajokat. A genusz karakterizálásába további bélyegeket vontak be, mint a nefridiális hólyagok alakja és irányultsága, a mészmirigyek struktúrája és pozíciója. Zicsi (1981) szintén szükségesnek érezte a genusz megtartását. Meglátásait a típusfaj, *Bimastos palustris* Moore, 1895 valamint számos Törökországból származó lumbricida megvizsgálására alapozta, ennek következményeképpen a nembe nemcsak az észak-amerikai fajokat helyezte, hanem a balkáni *Spermophorodrilus* Bouché 1975, fajait, illetve az általa vizsgált törökországi fajokat. A genusz az általa fontosként kezelt bélyegek alapján homogénnek tűnt, így például a gyűrű alakú clitellum, két pár vezikulum, tuberkulumok és a spermatéka hiánya, ezenkívül a hímivarnylások ventrális, "postsetalis" elhelyezkedése. Ugyanakkor a heterogenitás volt tapasztalható a mészmirigyek struktúrája és a nefridiális hólyagok tekintetében, valamint biogeográfiai szempontból is problematikus a palearktikus fajok bevonása egy eredendően észak-amerikai nembe.

Omodeo és Rota (1989) a törökországi földigiliszta-fauna vizsgálata során felélesztette a *Spermophorodrilus* nemet, valamint felállította a *Healyella* Omodeo és Rota 1989, genuszt. A szerzők meglátása szerint mindkét nem lényeges karakterekben különbözik a *Bimastos*-tól, bár sajnálatos módon nem részletezik az eltéréseket, csak az egy szelvényvel hosszabban kiterjedő izmosgyomorról tesznek említést. A *Healyella* hasonlóképpen kevés észrevehető különbséget mutat a *Bimastos*-hoz képest, az ivarnylások az *a* és *b* sertesorok közt találhatók, a mészmirigyek pedig nem rendelkeznek laterális divertikulumokkal. Mršić (1991) egész

családot átfogó revíziójában nem vizsgált észak-amerikai fajokat. A *B. palustris* és rokon fajainak nefridiális hólyagjait nem ismerve új alnemet hozott létre az *Allolobophora*-n belül *Allolobophoridella* néven (később nemi rangra emelkedett), amelybe a *Lumbricus eiseni* Levinsen 1884 és az *Allolobophora parva* Eisen, 1874 került, két faj, amelyek besorolása mindig is vita tárgya volt.

A fenti genuszok létrejötte arra inspirálta Zicsit és Michalis-t (1993), hogy újra megvizsgálja a *Bimastos* nem problémáját, majd szinonímnek nyilvánítsa a *Spermophorodrilus* és *Healyella* nemeket, továbbá az *A. eiseni*-t visszahelyezték az *Eisenia* genuszba, de a *A. parva* pozíciójáról nem foglaltak állást. Qiu & Bouché (1998) a *L. eiseni*-t a *Bimastos*-ok közé sorolta, annak ellenére, hogy izomzata nem tollas szerkezetű, ahogy az a *Bimastos* eredeti leírásában szerepel. Az *Allolobophoridella* genuszt megszüntette, a másik három nemet viszont megtartotta, ám a megkülönböztető bélyegekre nem tért ki. Csuzdi és Zicsi (2003) érvelése szerint az *A. eiseni* nem tartozhat a *Bimastos*-ba, lévén inkább az *Eisenia*-ra és a *Dendrobaena*-ra utaló jellegzetességekkel bír. Hangsúlyozzák továbbá a *B. palustris* és a *H. syriaca* (a két nem típusfaja) közti jelentős hasonlóságokat, ugyanakkor nem feledkeznek meg a felmerülő biogeográfiai kételyekről, illetve két jelentős eltérésről, a nefridiális hólyagokról, és az eltérő serteállásról.

A *Dendrobaena* Eisen, 1873 genusz

Sertéik tágan párosak, vagy páratlanul is állhatnak. A *Dendrobaena* nem fajai általában ibolyásvörös pigmenteket hordoznak. Epilobikus fejjel rendelkeznek, az első hátpórus a szokásos 5/6 interszegmentális barázdában nyugszik. A gyakran nagy, mirigyes udvarú hímvivarnyílás a 15. szelvényen van. Ondótartó nyílásaik a *d* sertevonalban, esetleg a dorzálmedián vonal közelében lelhetőek fel. Nefridiopórusaik sorban vagy irregulárisan húzódnak. Hímvivarszerveik közül a 2 pár here a 10., 11. szelvényben, az ondóhólyagok a 9., 11., 12. (néha 11., 12.) szelvényben, két vagy három pár ondótartójuk 9/10., 10/11., (11/12) szelvény között helyezkedik el. Mészmirigyzsákokat találhatunk a (10.), 11., 12. szelvényben, húgyhólyagjuk egyszerű kolbász vagy piskóta alakú, némely fajnál (*D. cognettii* (Michaelsen, 1903), *D. auriculata* (Rosa, 1897)) két karos is lehet. Hosszanti izomzatuk tollas vagy átmeneti (*D. hortensis* (Michaelsen, 1890)), de a nyalábos típus is előfordulhat (*D. veneta* (Rosa, 1886)).

A *Dendrobaena* az egyik legtöbb problémát okozó genusz a lumbricidák körében. A genuszt Eisen írta le 1873-ban a *Dendrobaena boeckii* típusfajjal. Amit később Michaelsen

(1900) egyesített az *Enterion octaedrum* Savigny, 1826 fajjal, továbbá a *Dendrobaena*-t a *Helodrilus* egyik alnemének tartotta. Svetlov (1924) emelte újból genusz rangra, majd Cognetti (1931) már 46 fajt sorolt munkájában a *Dendrobaena* genuszba. A 40-es évek elejére a meghatározások bizonytalansága miatt a genusz teljesen heterogénné vált, ami elodázhatatlanná tette a revízióját, amelyet Pop (1941) vitt véghez. A *Dendrobaena* genuszba a pigmentált, széles serteállású fajok kerültek. Pop revíziójában felhasználta a longitudinális izomzat struktúráját is. A *Dendrobaena*-k közé sorolt fajok variabilitást mutattak ebben a tekintetben, de mivel abban az időben erről a bélyegről csak a fajok egy részénél volt információ, így Pop nem bontotta további alcsoportokra a genuszt. Omodeo (1956) új bélyeg bevezetésével, a mézmirigyek típusaival és azok lokációjával próbálta orvosolni a problémát, amelynek eredményeként a *Dendrobaena* fajok két elkülönülő csoportba estek. Az első csoport tartalmazta azokat a fajokat, amelyeknél a mézmirigyek a 11., 12. szelvénynél (vagy a kettő közül az egyiknél) közvetlenül nyílnak a nyelőcsöbe (*Dendrobaena* alnem), a másik csoportban a mézmirigyek egy divertikulumon keresztül a 10. szelvénynél nyílnak (*Dendrodrilus* alnem). Mindezek ellenére a *Dendrobaena* alnem továbbra is meglehetősen heterogén maradt.

Gates (1975) a *D. mammalis* (Savigny, 1826) fajt új nembe (*Satchellius* Gates, 1975) helyezte, majd Zicsi (1978) a *D. platyura* fajkomplex esetében megállapította, hogy hím ivarnyílások a szokásosnál jóval hátrébb nem a 15. szelvényen, hanem a nyereg kezdeténél találhatóak, aminek következményeként létrehozta a *Fitzingeria* Zicsi, 1978 genuszt. A *D. syriaca* (Rosa, 1893) fajt átsorolta az újonnan revideált észak-amerikai *Bimastos* nembe (Zicsi 1981). Noha ezek jelentős eredmények voltak a *Dendrobaena* genusz revideálásában, még így is több mint 60 faj maradt a nemen belül, amelyek egyaránt heterogének voltak a pigmentációt és a longitudinális izomstruktúrákat tekintve.

Az első részletes revízió (Csuzdi, 1984) konstataulta, hogy a *D. ruffoi* Zicsi, 1970 és *D. osellai* Zicsi, 1970 kongenerikus a *D. calarensis*-szel (Tetry, 1944), és a *Kritodrilus* Bouché, 1972 nembe tartoznak. A revízió további eredményeként négy fajcsoportot lehetett megkülönböztetni:

I. *octaedra* csoport: Kis és közép-termetű férgek tartoznak ide. Az extraoesophagalis véredények hiányoznak, és gyakran az utolsó pár szív a 9 vagy 10. szelvényben található. A longitudinális izomzat tollas szerkezetű, a 11. és a 12. szelvényen jól fejlett mézmirigyek nyílnak közvetlenül a nyelőcsöbe.

II. *schmidti* csoport: Közepes és nagytermetű fajok. Az utolsó pár szív a 11. szelvényben található, az extraoesophagalis edények a 12. szelvényben. A

hímivarnyílások nagy mirigyes átriummal általában benyúlnak a szomszédos szelvényekbe. Tollas szerkezetű izomzat figyelhető meg, a mészmirigyek közvetlenül a 11. és a 12. szelvénybe nyílnak, de általában csak az egyik fejlődik ki közülük teljesen.

III. *byblica* csoport: Kis és középtermet jellemző rájuk. Az utolsó pár szív a 11. szelvényben foglal helyet, az extraoesophagalis edények a 12.-ben. A hímivarnyílások mindig kisméretűek, alig láthatóak. Longitudinális izomzatuk tollas szerkezetet mutat, mészmirigyek többnyire kicsik, közvetlenül a 11. és 12. szelvényen nyílnak.

IV. *veneta* csoport: Kis, valamint nagytermetű állatok. Az utolsó pár szív a 11. szelvényben foglal helyet, az extraoesophagalis edények a 12.-ben. A hímivarnyílásnak jobbára mirigyes átriuma van. A longitudinális izomzat nyalábos képletű, a mészmirigyek közvetlenül a 1/210-11 és a 12. szelvényen, de jó észrevehető tágulat nélkül.

Ákad néhány faj a *Dendrobaena* nemén belül, amely olyan egyedi bélyegekkal rendelkezik, hogy egyik fajcsoportba sem lehetett illeszteni. Ilyen fajok a *D. auriculata* (Rosa, 1897), a *D. cognettii* (Michaelsen, 1903), a *D. mrazeki* (Černosvitov, 1935) és a (*D. alvaradoi* Moreni, Diaz, Cosin & Jesus, 1982).

A *Dendrodrilus* Omodeo, 1956 genusz

Ibolyásvörös pigmentekkel rendelkező, párosan tág serteállású fajok, epilobikus fejjel. Longitudinális izomzatuk tollas szerkezetű, illetve átmeneti formák is fellelhetőek. Hímivarnyílásuk a 15. szelvényen nyílik, apró mirigyes udvarral. Az első hátpórus az 5/6. interszegmentális barázda közelében található. Ondótartó nyílásaik a *c* sertesorban vannak, vagy pedig hiányoznak. A nefridiopórusok irreguláris elhelyezkedésűek. A 10. és 11. szelvényben helyezkedik el a 2 pár here, míg ondóhólyagjaik a 9, 10, 12 (néha 11, 12) szelvényben alakulnak ki, esetleg hiányoznak. Jól fejlett mészmirigyzsákjaik a 10. szelvényben találhatóak, húgyhólyagjuk U alakú, előre hajló entális lebennyel.

A genuszba széles körben elterjedt, peregrin fajok tartoznak, amelyek sokszor parthenogenetikusan szaporodnak, ez együtt szokott járni ivarszerveik (ondótartók, ondóhólyagok) elcsökevényesedésével

Az *Eisenia* Malm, 1877 genusz

A serték szorosan és párosan helyezkednek el. Ibolyásvörös pigmentáció jellemző rájuk. A fej epilobikus kialakulását, első hátpórusuk az 5/6 interszegmentális barázda közelében húzódik. A 15. szelvényen lévő hímvarnyílást mirigyves udvar veszi körül. A nefridiopórusok irreguláris elhelyezkedésűek. A két pár here a 10., 11. szelvényben, az ondóhólyagok a 9-12-ben (néha 11., 12.) a két pár ondótartó a 9/10., és 10/11. szelvényben található. A mézmirigyek a 11., 12. szelvényben vannak, húgyhólyagjuk kolbász alakú. A longitudinális izomzat tekintetben heterogenitást mutat a genusz, nyalábos (pl. *E. lucens* (Waga, 1857) és *E. spelaea* (Rosa, 1901)) és tollas (pl. *E. balatonica* (Pop, 1943) és *E. fetida* (Savigny, 1826)) típusok egyaránt előfordulnak.

3.1.4 Az Enchytraeidae család

Az Enchytraeidae kiterjedt család a Clitellata-n belül, amelybe kistermetű (néhány mm-től néhány cm-ig) fajok tartoznak. Közel 700 fajával benépesíti a legkülönbözőbb szárazföldi és vízi élőhelyeket az egész Földön, nagy valószínűséggel legnépesebb és legelterjedtebb taxon az összes Clitellata-ba sorolt család közül (Erséus, 2005). Találkozhatunk velük tengerparti homokos élőhelyeken, különféle talajokban, de mélytengeri üledékben (Rota és Erséus, 2003; Erséus és Rota, 2003) és gleccserekben is (Hartzell és mtsai, 2005). Észak-Európa faunájáról elmondható, hogy meglehetősen jól ismert (Abrahamsen és Thompson, 1979; Healy, 1979; Nielsen és Christensen, 1959, 1961, 1963; Nurminen 1967, Römbke, 1995; Schmelz és mtsai, 2005). Közép- és Kelet Európa területén kevés feltáró munka készült, csupán a volt Csehszlovákia (Chalupsky, 1988; Schlaghamerský és Pižl, 2009; Schlaghamerský, 2010) és Lengyelország (Kasprzak, 1986) területéről vannak adatok. Dél-Európa faunája ugyancsak kevésbé ismert néhány kivételtől eltekintve, mint Olaszország (Rota, 1995), Spanyolország és Franciaország egyes területei (Gianni, 1976; Healy 1980). Magyarország faunája az 1970-es évekig pár elszórt adatot leszámítva teljesen ismeretlen volt. Dózsa-Farkas Klára kezdett kiemelten foglalkozni a családdal, a hazai fauna mellett figyelmet fordított más országokra is, számos publikációban közölte ide vonatkozó eredményeit. Munkássága révén a hazai enchytraeida fauna nemzetközi viszonylatban jól feltérképezettnek számít (Dózsa-Farkas, 2001).

Filogenetikai helyzetük és családon belüli evolúciós történetük még messze van a teljes megértéstől. Beddard (1895) bazális pozícióba helyezte őket az Oligochaeta/Clitellata-n belül, elkülönítve a többi oligochaeta csoporttól, amely elrendezést a későbbi szerzők is sok esetben megtartották (Michaelsen, 1928; Kasprzak, 1984; Omodeo, 1998), számos munka azonban változtatott a filogenetikai pozíciójukon (Čekanovskaya, 1962; Timm, 1981; Rota, 1994). Egyedül morfológiai bélyegekre hagyatkozva az Enchytraidae-t az ún. „mikrodrilid” családokhoz, (mint például a Phreodrilidae vagy a manapság Naidinae sensu Erséus és mtsai (2008, 2010a) alcsaládba ill. Tubificidae családba sorolt, számos, azelőtt külön családként kezelt fajok összessége) tartották közelállónak (Yamaguchi, 1953; Brinkhurst, 1984; Jamieson, 1988). Coates (1986) tovább menve leválasztotta a Propappus nemet, hogy egy monotipikus családot (Propappidae) alkosson, amely testvércsaládja az Enchytraeidae-nek (Brinkhurst, 1994). Ma inkább úgy tűnik, hogy az ún. „Megadrili” csoporthoz állnak közelebb.

Az Enchytraeidae családon belül a fajmeghatározás, illetve fajok rendszerezése igen sok nehézséggel jár. Fő probléma, hogy a mikroszkópos vizsgálatokat élő állaton kell elvégezni, mivel sok taxonómiai fontos bélyeg csak ilyen állapotban figyelhető meg megfelelően, mivel a szervek élő állapotban igen jellegzetes alakja, illetve szerkezete a fixáció során megváltozhat. Problémát jelenthet, hogy egyes bélyegekből nagy variabilitás figyelhető meg a fajokon belül, máskor meg viszonylag kis morfológiai különbségek is megkülönböztethetnek egymástól fajokat. Figyelembe kell venni azt is, hogy az eddig meg nem talált fajok száma még az alaposan tanulmányozott területeken is magas lehet. Az irodalmi adatok is számos esetben tisztázásra szorulnak módszertani eltéréseik miatt, így például, hogy a fajleírást élő egyedeken végezték-e vagy sem, illetve probléma, hogy az időközbe bevezetett új bélyegeket korábban nem tanulmányozták. Az egyes taxonómusok nézőpontja erősen különbözhet a tekintetben, hogy mely bélyegeket tartják hasznosnak a faji identifikációhoz, illetve mi a kialakított álláspontjuk az intraspecifikus variabilitásról.

3.1.5 Az Enchytraeidae családban használt főbb morfológiai bélyegek ismertetése

A morfológiai bélyegek bemutatása főként Schmelz (2003) és Schmelz és Collado (2010) munkáin alapszik.

Külső karakterek

Testméret

A testméret alapján használatos egy durva felosztás, amely szerint 4 méretcsoport különböztethető meg: kicsi (5-8 mm), közepes (8-14 mm), nagy (14-20 mm) és nagyon nagy (>20 mm). A hosszúság a fixáció során jelentősen csökkenhet.

Szelvényszám

A szelvényszám jelentős fajon belüli variációt mutathat, bár a variáció mértéke fajra jellemző.

Serték

A televényférgnek sertéi szelvényenként 2 ventrális és 2 laterális csomóba rendeződnek. A serték legfontosabb taxonómiai relevanciával bíró tulajdonsága azok száma, amely a preklitelláris és a posztklitelláris szelvényekben, illetve a ventrális és laterális csomókban elterhethet. A serték számán kívül még informatív lehet azok mérete, illetve alakja is,

Testfal

A testfalat a kutikula, az epidermisz, a körkörös izomzat egy rétege, a longitudinális izomzat két rétege (egyeseknél ez jelentős falvastagságot eredményez), valamint a peritoneum építi fel. Ezek közül a kutikula alkalmazható leginkább rendszertani célokra. A kutikula átlagos vastagsága kisebb 1 μm -nél, de néhány fajnál (*F. auritoides*, *F. connata*, *F. maculata*, *F. semisetosa*) meghaladhatja ezt az értéket, egészen 6 μm -ig terjedhet.

Epidermális mirigysejtek

Epidermális mirigysejtek minden szelvényen találhatóak, de legsűrűbben a fejen és az 5-8 szelvényeken, valamint a pygidiumon. A test dorzális részén általában több a mirigysejt, mint a ventrális részen. A leírásokban az epidermális mirigysejtek mindig a nyereg előtti

szelvényekre vonatkoznak. Három tulajdonságot (alak, szín, sejtsorok száma) lehet felhasználni a fajok megkülönböztetésénél, azonban megjegyzendő, hogy itt is található intraspecifikus variabilitás, noha a variabilitás mértéke (hasonlóan a sertékhez) fajra jellemző.

Fej- és hátpórusok

A testüreg nyílása a külvilág felé. A prosztómiumon (0), vagy a prosztómium és az első szelvény találkozásánál (0/1) található az úgynevezett fejpórus, amely az Enchytraeidae családra jellemző. További pórusok nyílhatnak minden interszegmentális barázdában kivéve az első 6 szelvényt, a szelvényenként elhelyezkedő hátpórusok megléte a *Fridericia* nemre jellemző. A fejpórus, illetve a hátpórusok meglehetősen kevés információt nyújtanak a faji identifikációhoz, így ezen a szinten taxonómiai szerepük csekély.

Belső karakterek

Disszepimentumok

A disszepimentumok (röviden szeptumok) a belső szelvényhatárok, amelyek azonban nem választják el teljesen a szelvényeket, a cölómafolyadék nyílásokon keresztül kapcsolatot tart az egyes szelvények között. Taxonómiai célra egyedül a preklitelláris disszepimentumok variáló vastagsága használható fel.

Garat és a garatmirigyek

A garat, illetve a csatlakozó garatmirigyek a táplálékfelvétel szervei a televényférgeknél. Noha a garat nem egyenlő nagyságú minden fajnál, azonban nagyfokú formátlansága miatt nehéz a pontos méreteit megadni. A garatmirigyek a IV., V., VI., és ritkán a VII. szelvényben helyezkednek el (kivételesen néhány fajnál több mirigypár is van a VII-X. szegmentumban is), ventrális és dorzális lebenyből állhatnak. A garatmirigyek alakja kiválóan alkalmazható taxonómiai bélyeget nyújt, amelyek juvenilis példányokon is megfigyelhetők, így például relatív méretük, esetleges dorzális kapcsolódásuk, a ventrális lebenyek megléte, illetve a hiánya, hossza. A VII-X. szelvényben kialakuló garatmirigy megléte ritkasága folytán kitűnő fajmeghatározó bélyeg, amely fajon belül nem variál.

Nefridiumok

A televényférgek nefridiumai szabályos metanefridiumok, amelyek megfelelnek az oligochaeták körében megfigyelhető alapszabásnak. Szelvényenként kettőt találunk belőlük, amelyek ventro-laterálisan helyezkednek el a testüregben a disszepimentumokhoz kapcsolódva. A nefridiumoknak igen nagy figyelmet szenteltek a korai szerzők (Eisen, Bretscher, Friend), majd használatuk majdnem teljesen el lett utasítva (Nielsen és Christensen, 1959; Möller 1971) annak köszönhetően, hogy alakjuk egy állaton belül is változik az anterior és poszterior viszonylatban. Ugyanakkor a preklitelláris nefridiumok nyújthatnak hasznos információkat az identifikációhoz, így azok száma 4-7 pár lehet. A nefridiumok taxonómiai jelentőségével részletesebben Dózsa-Farkas (2010) foglalkozott.

Cölomasejtek

A testüregben szabadon úszó sejtek, melyek funkciója még részben ismeretlen. Két típusukat lehet megkülönböztetni (Hess, 1970; Richards, 1980), a cölóma-mucocyták sejtmaggal rendelkeznek, melyekben egy vezikuláris vagy granuláris szerkezetű mátrix helyezkedik el. A cölóma lenticyták sejtmagnélküli, kisméretű sejtek, melyek csak néhány genusban léteznek. A cölómasejteknek létezik egy harmadik típusa is, a helyhez kötött amoebocyták, amelyek csak szövettani metszeteken figyelhetőek meg.

A cölómasejtekkel kapcsolatban informatív lehet a méretük. A sejtek mérete változhat egy egyedben belül, de ennek mértéke fajspecifikus bélyeg. A coeloma-mucocyták textúrájának alkalmazását Möller (1971) szorgalmazta a *Fridericia* fajok taxonómiájában, 3 sematikus típust kreált, amelyek a juvenilis példányok meghatározását is elősegíthetik. Fajra jellemző a cölómasejtek sűrűsége a testüregben, továbbá a coeloma-mucocyták és coeloma-lenticyták egymáshoz viszonyított aránya is hasznos határozóbélyeg lehet.

Chylus-sejtek

A *Fridericia* fajoknál az intesztinális epitélium néhány szegmentumban úgynevezett chylus-sejteket tartalmaz. Minden egyes sejtben található egy fonálszerű, csillós, vakon végződő csatorna, amely a bélüregbe nyílik. A chylus-sejtek együtt egy ismétlődő, jellegzetes mintázatot képeznek a bélfalon. A helyzetük (mely szegmentumokban és milyen hosszan fordulnak elő) fajspecifikus, preklitelláris lokációja különlegesen jó taxonómiai marker lehet.

Véredényrendszer

Felépítése hasonló az összes fajban. Taxonómiaiilag a dorzális véredény eredete lehet használható, amelyet a legtöbb fajleírásban megadnak. A legtöbb fajnál a posztklitelláris szelvények egyikében ered, de akár genuszbélyeg is lehet a preklitelláris eredés. A vér általában szintelen, de egyes fajoknál (pl. *F. magna* és a *F. ilvana*, *Henlea tolli*, a legtöbb *Lumbricillus* faj stb.) esetében gyengén vöröses, vagy sárgás-zöld is lehet.

Reproduktív szervek

Nyereg

A nyereg számos tulajdonsága jól alkalmazható taxonómiai célokra, így például a klitelláris mirigysejtek jelenléte vagy hiánya ventrálisan, illetve elhelyezkedése dorzálisan, informatív lehet a hyalin és a granulált sejtek eloszlása, miszerint lehetnek különálló sorokban, sűrű sorokban, határozatlan sorokban, valamint hálózatos mintázatban. A legtöbb információt a nyereg ventrális oldala nyújtja. A klitelláris mirigysejtek eloszlásának taxonómiai fontosságát Schmelz (1996), továbbá Rota és Healy (1999) egyaránt hangsúlyozta.

Ondóhólyagok

Az ondóhólyagok a hímivar-sejtek tárolási helyei a XI. szelvény dorzális részében, esetükben taxonómiaiilag releváns információt megléltük, eltűnésük, illetve méretbeni megnövekedésük nyújthat.

Hímivar-sejtek

A hímivar-sejtek méretének megadásával *Fridericia* Michaelsen, 1889 fajok körében már a huszadik század elején találkozhatunk (Issel, 1905), majd Westheide és Graefe (1992) hívta fel rá a figyelmet *Enchytraeus* fajok kapcsán, hogy a sejtmagok hossza hatékony bélyeg lehet az identifikációban, végül Rota (1995) vezette be a fajleírásokba, mint standard karaktert, mivel sejtmagok mérete fajon belül invariábilis.

Spermatölcser

A spermatölcser egyike a klasszikusan használt morfológiai karaktereknek, amely majd minden leírásban előkerül. Általában meg szokás adni a hosszúságát és a szélességét, a

test átmérőjéhez viszonyított relatív hosszát, az alakját (hengeres, körtealakú, orsóalakú stb.), a tölcsér gallérjának magasságát és szélességét.

Hímivarszervek

A hímivarszervek anatómiája igen változó megítélést kapott az évek során: A herék taxonómiai szempontból nem adnak lehetőséget az elkülönítésekre. A hím kopulációsszerv esetében találkozhatunk részletes szövettani vizsgálatokkal, melyek a fajok közti eltérésekre hívják fel a figyelmet (Eisen, 1904; Smith és Welch, 1913; Welch, 1914; Bell, 1936, 1962), ugyanakkor a szerzők nagyobb részénél leírás csak nagyvonalakban érinti, vagy teljesen el is hagyja ismertetésüket. Ennek oka a bonyolult háromdimenziós felépítés, amely élő egyedeken csak nagyon nehezen tanulmányozható, egyes részei alig különböztethetőek meg; szövettani metszetekben ugyanakkor elveszik a térbeli felépítés vizsgálatának lehetősége. A hímivarszervek taxonómiai jelentőségét a frissebb munkák megint előtérbe hozzák (Schmelz, 1996, 1998; Rota és Healy, 1999). A fontos bélyegek közé tartozik a kopulációsszerv általános alakja, mérete (magasság, szélesség, hosszúság), a bursa, amely egyrészt körbe lehet kerítve a mirigyes test által, vagy csak laterálisan fejlődik ki a középen elhelyezkedő mirigyes testhez képest. Egyes fajoknál a spermavezeték atriumban végződik, amihez különböző számú és felépítésű mirigyek csatlakozhatnak. Fajok között eltérhet, fajon belül állandó megjelenésű a bursa hasítékának „mail opening” alakja.

Szubneurális mirigy

Epidermális mirigysejtek aggregációi a hasdúclánchoz kapcsolódva, a felszínre a ventrális sertecsomók között nyílik, közvetlenül az ivarnyílások utáni szegmentumokban. Meglétük, illetve hiányuk lehet jó faji karakter lehet.

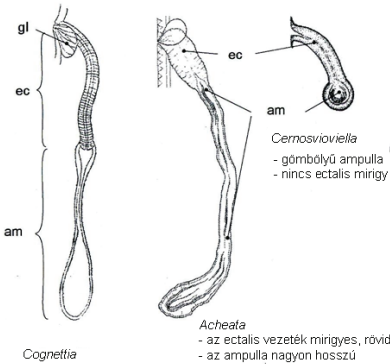
Ondótartó vagy spermatéka (receptaculum seminis)

A kölcsönös megtermékenyítés során a sperma a receptaculum seminis-ben, más néven a spermatékában tárolódik. Az Enchytraeidae család esetében egy pár spermatéka található az V. szegmentumban, és a IV. és V. szelvények közti interszegmentális barázdában nyílik a külvilágra. Parthenogenetikusan szaporodó fajoknál a spermatéka elcsökevényesedhet (pl. *Fridericia reducata* Dózsa-Farkas, 1974, *Enchytraeus varitheatus* Bouguenec és Gianni, 1987, *Fridericia argillae* Schmelz, 2003), illetve el is tűnhet (*Enchytraeus atheatus* Wang, Xie, Liang, 1999). A spermatéka az epidermisz betüremkedésével jön létre, legegyszerűbb formái zsák, zseb vagy palack alakúak, amely aztán többnyire megnyúlik, és ezáltal két részre

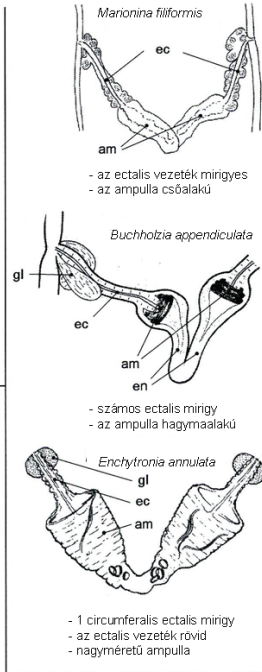
különíthető: ectalis ductus-ra és ampulla-ra. Két fő típus választható szét, az elsőben a betüremkedés a testüregben szabadon lóg, a másik típusnál az ampulla kapcsolatba lép az oesophagus-szal. Egyes genuszokban mindkét szerveződési típus megtalálható. (*Marionina* Michaelsen, 1890, *Mesenchytraeus* Eisen, 1878, *Hemifridericia* Nielsen és Christensen, 1959). A legtöbb enchytraeidánál a spermatéka alakja, felépítése, típusa fontos taxonómiai bélyeg, ez alól azok a taxonok kivételek, ahol a spermatéka felépítése egyszerű, vagy pedig hiányzik. Dózsa-Farkas (2008) szerint ez a szerv a *Fridericia* genusz esetében egyenesen a legfontosabb specifikus karakter.

Bonyolultabb kiképzést mutatnak azok a szabad spermatékák, amelyek az ektális ductus után kiszélesedhetnek, kis bulbus-t képezve, majd újabb szűkülettel rövidebben vagy hosszabban hátrahúzódnak a testüregben (akár a X., XI. szelvényig), ahol spermiumokat tartalmazó ampullát képeznek. Ezek a struktúrák már meglehetősen nagy változatosságot mutatnak ahhoz, hogy a faji determinációhoz felhasználhatóak legyenek. A második típusnál az ampulla proximálisan kapcsolatba lép a nyelőcsővel. Az előző típussal szemben itt már gyakori a divertikulumok kialakulása. A divertikulumok megléte már önmagában is határozó bélyeg lehet, mint például a *Henlea diverticulata* Cejka, 1912 vagy a *H. ehrhorni* Eisen, 1904 esetében. A legváltozatosabb spermatéka formákat a *Fridericia* genusznál találjuk, ahol a legegyszerűbb esetben a spermatéka egy ektális ductus-ból és egy ampulla-ból áll, ami többnyire disztálisan és proximálisan elkülönülő részre osztható. A faji eltérésekhez felhasználható a ductus hossza, vastagsága, az ektális nyíláshoz kapcsolódó mirigyek száma, formája, mérete, valamint az ampullában lévő sperma elhelyezkedése. Különösen jelentősek a divertikulumok a *Fridericia* genusz taxonómiájában, számuk, alakjuk, méretük és elhelyezkedésük néhány kivételtől eltekintve fontos faji bélyeg (Dózsa-Farkas, 2008).

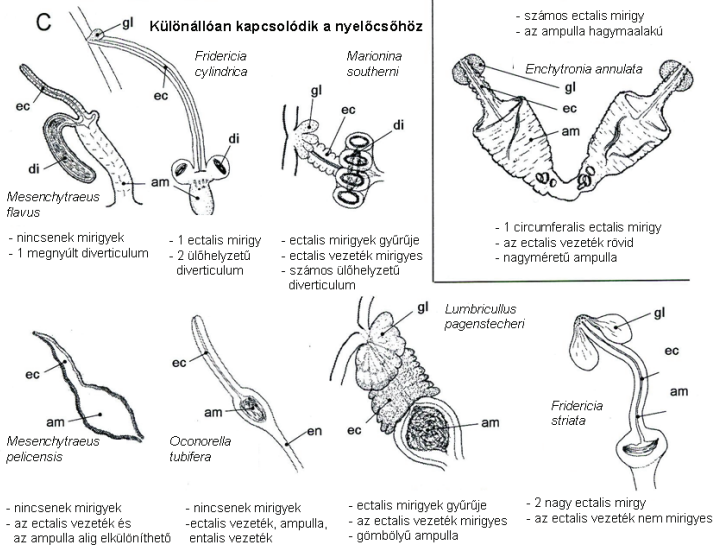
A Szabad, nem kapcsolódik a nyelöcsőhöz



B Kapcsolódik a nyelöcsőhöz, proximálisan összeolvadva



C Különállóan kapcsolódik a nyelöcsőhöz



8. ábra: A spermátéka szerkezete és variációi az Enchytraeidae családban (Schmelz és Collado, 2010)

3.1.6 A molekuláris vizsgálatokban tanulmányozott Enchytraeidae genuszok rövid jellemzése

A *Buchholzia* Michaelsen, 1887 genusz

A *Buchholzia* Michaelsen, 1887 nembe közepes termetű, 10 mm-t ritkán meghaladó férgek tartoznak. Szárazföldi elterjedésűek, savas talajokban nem fordulnak elő. A fejpórus hosszanti hasíték a 0/1 szelvények találkozásánál. Sertéi szigmoid alakúak nodulus nélkül. Az epidermális mirigysejtek általában sűrű, transzverzális sorokban helyezkednek el. Egy pár nyelőcsővi függelék található a IV. szelvényben dorzolaterálisan, a 7/8 szelvények találkozásánál különböző fejlettségű intesztinális divertikulumok adják a genusz legjellemzőbb bélyegét. A dorzális véredény a VII. szelvénytől ered az intesztinális divertikulumoktól anterior pozícióban. A nefridiumok szeptum előtti része kicsi, a tölcser beágyazott az intersticiális szövetbe. A cölómasejtek mindkét típusa, a lentycyták és a mucocyták egyaránt megtalálhatóak. A spermatakák divertikulum nélküliek, az ampullák hagyma-alakúak, proximálisan összeolvadtak.

Európából 4 fajuk ismert, a *B. fallax* Michaelsen, 1887, a *B. simplex* Nielsen és Christensen, 1963, a *B. appendiculata* (Buchholz, 1862) és a *B. subterranea* (Černosvitov, 1937). A *B. subterranea* validitása kétségesnek mondható, hiszen Nielsen és Christensen (1959) szerint a faj eredeti leírása (Černosvitov, 1937) túlságosan hiányos volt, ahhoz, hogy önálló fajként elfogadhassa, Schmelz és Collado (2010) azonban revalidálta a *B. subterranea*-t, ám megjegyzik, hogy nagymértékben hasonlít a *B. simplex*-re.

A *Bryodrilus* Ude 1892 genusz

A *Bryodrilus* Ude, 1892 északi, holarktikus elterjedésű genusz, amely az arktikus, szubarktikus régióban a legfajgazdagabb. A fejpórus 0/1-nél található, sertéi szigmoidok, vagy majdnem egyenesek. Két pár többnyire vese alakú nyelőcsővi függelék található a VI. szelvényben, amelyek közül az egyik dorzolaterálisan, a másik pár pedig ventrolaterálisan helyezkedik el. Intesztinális divertikulumok nem alakulnak ki. A dorzális véredény a klitelláris régióból indul. A nefridiumok szeptum előtti része csak tölcserből vagy még néhány csatornából áll. A cölómasejtek oválisak vagy diszkoid alakúak, csak egy típusuk fordul elő. A spermatakát megnyúlt ektális vezeték jellemzi, az ampulla az egyes fajoknál különböző mértékben szélesedik ki, divertikulumok nincsenek.

Hazánkban eddig két egymáshoz nagyon hasonló faj lett leírva: a *Br. ehlersi*, Ude, 1892 és a *Br. glandulosus* Dózsa-Farkas, 1990. Az utóbbit eredetileg alfajként írták le magyarországi tőzeglápokból (Dózsa-Farkas, 1990), majd Schmelz és Collado (2010) faji rangra emelte.

Az *Enchytronia* Nielsen és Christensen, 1959 genusz

Az *Enchytronia* Nielsen és Christensen, 1959 kevés fajt számláló genusz, kistermetű (2-5 mm) férgeket foglal magába, amelyek szárazföldi elterjedésűek. Sertéi egyenesek, entális irányban horgot képeznek, egy-egy csomóban kettő van belőlük, a legtöbb fajnál a VIII-XII szegmentumban laterálisan hiányoznak. A fejpórus a 0/1 szelvények érintkezésénél található. A garatmirigyek dorzálisan egybeforrak a IV. és az V. szelvényekben, a VI. szelvényben külön állnak és megnyúltak, intesztinális függelék található a VI. szegmentumban. A cölómasejtek gyakran granuláltak, hosszuk eléri vagy meghaladja a serték hosszát. A nefridiumok első párja a 7/8-nál helyezkedik el. A dorzális véredény eredése a nyeregtájékra esik. A himivarnyílásnál kompakt mirigyes bulbus látható, emellett a bursa megtalálható. A spermatakák proximálisan csatlakoznak a nyelőcsőhöz (kivéve *E. longispermatheca*), ektális mirigy és mirigyes ektális vezeték egyaránt jellemző, az ampullákon nincsenek divertikulumok.

A genusz fajai közül Schmelz és Collado (2010) szerint a legproblematisabb az *E. parva* Nielsen és Christensen, 1959, amely a legszélesebben elterjedt, valamint leggyakrabban hivatkozott faj. Szerintük az *E. parva* nagy variabilitást mutat, erre hivatkozva szinonimizálták az *E. minor* Möller, 1971 és az *E. christenseni* Dózsa-Farkas, 1970 fajokat.

A *Mesenchytraeus* Eisen, 1878 genusz

A *Mesenchytraeus* Eisen, 1878 jobbra szárazföldi elterjedésű nem, kevés vízi fajjal, a Holarktikumban honos, a boreális régióban a legnagyobb a fajgazdagság. Itt található a legnagyobb termetű (>60mm) televényférgek (Rota és Brinkhurst, 2000), emellett sok közepes méretű faj is van. A fejpórus a prosztómium csúcsán helyezkedik el. A sertéi szigmoidok, nodulus-szal, legalább a csomók egy részében több mint 3 fordul elő. A nyelőcsövi függelékek és az intesztinális divertikulumok egyaránt hiányoznak. A primer garatmirigyek a IV és V. szelvényekben poszterior irányban kapcsolódnak a szeptumokhoz, a másodlagos garatmirigyek ezzel szemben a szeptumoktól függetlenül állnak, szerkezetük

gyakran diffúz, lebenyes, a nyelőcsőhöz szorosan kapcsolódnak. A dorzális véredény a XIII. szelvénytől vagy hátrábbról kezdődik. A nefridiális anteseptale csak egy tölcsérből áll, a postseptalis részben jól fejlett tekeredő csatornákat láthatunk, az intersticiális szövet igen gyengén fejlett. A cölómasejtek gyakran orsó-alakúak, pontosan kivethető vezikulumokat vagy refraktilis granulomokat tartalmaznak. A spermátölcsér általában kicsi, a vas deferens többnyire rövid, disztálisan vastag falú atriummá szélesedik, sokszor atrialis mirigyek is előfordulnak. A bursa nem hiányzik, sokszor mirigyek veszik körül a burzális hasíték szabálytalan vagy csillag alakú. Ektális mirigyek nincsenek, a spermatakák vagy szabadon állnak a testüregben, vagy kapcsolódnak az oesophagus-hoz és divertikulumok is lehetnek.

Magyarországról eddig 3 fajt sikerült kimutatni: *M. pelicensis* Issel, 1905; *M. kuehnelti* Dózsa-Farkas, 1991; *M. armatus* Levinsen, 1884. Taxonómiai bizonytalanságokkal ebben a genuszban is találkozhatunk, a nagy elterjedésű *M. pelicensis* Issel, 1905 és a hazánkból leírt *M. kuehnelti* Dózsa-Farkas, 1991 csupán a hím kopulációs szerv felépítésében tér el, utóbbinál az atrium jóval szélesebb az ektális vezetéknél, emellett 4, nagy méretű mirigy veszi körül.

A *Fridericia* Michaelsen, 1889 genusz

A *Fridericia* Michaelsen, 1889 a fajokban leggazdagabb nem az Enchytraeidae családon belül 100-at megközelítő valós, és körülbelül kétszer ennyi leírt fajjal. Világszerte elterjedtek, legnagyobb számban a mérsékelt klímájú élőhelyeken fordulnak elő. A nem túl száraz, illetve nem túl savanyú talajokat kedvelik. A *Fridericia* nemre hatványozottan igaz a családon belül, hogy rendszerezése, a fajok meghatározása kényes és avatott szakembert igénylő feladat.

A *Fridericia* nembe tartozó fajok szelvényezetten elhelyezkedő hátpórusokkal, chylussejtekkel, tubiform nyelőcsövi függelékekkel rendelkeznek. E három bélyeg együttes jelenléte valamennyi *Fridericia* fajra jellemző, emellett még számos tulajdonsággal jellemezhető a közepes és nagytermetű férgeket magába gyűjtő genusz. A serték egyenes állásúak entális horoggal, csomónkénti számuk változhat. A fejpórus a prosztómium és az első szelvény találkozásánál nyílik longitudinális hasítékként. A garatmirigyek a IV-VI szelvényekben, néha VII-ben is lehetnek. A nyelőcsövi függelékek ventrolaterálisan szájadzanak a nyelőcsőbe a IV. szelvényben. Intesztinális divertikulumok nincsenek. A dorzális véredény posztklitellárisan ered. A cölómasejtek lenticyták és mucocyták is. Az anteseptale tartalmazza a nefridiális test egy részét, az első pár legtöbb esetben a 6/7

disszipimentumhoz kapcsolódik. Egyes fajokban előfordulhat szubneurális mirigy. A spermatéka nagyon ritkán szabadon álló, legtöbb fajnál kapcsolódik a nyelőcsőhöz. Ektális mirigyek és divertikulumok megléte, száma, illetve hiánya variálódik a fajok között, az ektális vezeték hosszú, az ampullák proximális része egyesülés után, vagy külön külön kapcsolódik a nyelőcsőhöz. A fajok determinálásában legjobban használható bélyeg a spermatéka.

A hátpórusok megléte egyedülállóan jellemző a *Fridericia* nemre. A *Fridericia*-hoz legjobban hasonlító genuszok az *Isosetosa* Xu, Zhang és Jiang, 1989 és a *Timmodrilus* Dózsa-Farkas, 1997, amelyek csak szelvényenkénti hátpórusok hiányában különböznek. Egyetlen faj ismeretes a *Fridericia* genuszon kívül, amely rendelkezik szelvényezett hátpórusokkal, az *Achaeta pigmentosa* (Christensen és Dózsa-Farkas, 2007)

A genusz az utóbbi években alapos revízió esett át (Schmelz, 2003), amely során a morfológiai bélyegek mellett a 34 faj esetében fehérjevizsgálatokat is alkalmaztak, PGM, MDH és EST (foszfoglükomutáz, almasav-dehidrogenáz, észteráz) vizsgálatokat hajtottak végre. A revízió során igyekeztek bevonni minél szélesebb földrajzi területről származó egyedeket. Ennek ellenére még számos megválaszolandó kérdés maradt a nemen belül, amelyek általában egy úgynevezett fajkomplexhez köthetőek, amelyek nagyfokú fajon belül variabilitással jellemezhetőek, és amelyekre a *Fridericia* nem számos példával szolgál.

Az egyik legtöbb problémát felvető faj (fajkomplex), a *Fridericia ratzeli* (Eisen, 1872), amire már Nielsen és Christensen (1959) is felhívja a figyelmet megemlítve, hogy az eddig talált egyedek sok esetben eltérő kromoszómaszámmal rendelkeznek. Hozzáteszi, hogy morfológiai alapon nem lehetséges további csoportokra osztani a fajt, amelyek aztán megalapozottan faji rangot kaphatnának.

A *Fridericia bulboides* Nielsen és Christensen, 1959 szintén ilyen fajkomplexnek tekinthető, az ide tartozó fajok, illetve variációk közös jellemzője, hogy a 2 spermatéka entálishan kapcsolódik, mielőtt egyesülne a nyelőcsővel. Érdemes megjegyezni, hogy számos karakter lehet variábilis a *F. bulboides*-nél, így például a szelvényszám, az észak-amerikai és a különösen a Japánból származó példányok spermatékája nagyobb ektális mirigyekkel rendelkezik (Schmelz 2003). Mindezek alapján felvetődik a kérdés, hogy a *F. bulboides*-ként határoztak meg olyan fergeket is, amelyek esetleg más korábban még le nem írt fajok reprezentánsai, valamint a „bulboides”-alakkörbe tartozó már leírt fajok (pl. *F. semisetosa* Dózsa-Farkas, 1970) esetében is tapasztalható némi bizonytalanság azok validitását illetően.

Hasonló problémákkal lehet szembesülni az „aurita”-fajkomplexnél is. A *Fridericia aurita* Issel, 1905 és a jellegzetes fülszerű spermatéka divertikulumok alapján hozzá morfológiailag nagyon hasonló fajok alkotják az ún. *F. aurita* fajkomplexet, mint például a *F.*

auritoides Schmelz, 2003, illetve eddig még le nem írt fajok, amelyek a múltban feltehetőleg *F. aurita*-ként lettek azonosítva.

Egyes esetekben egyetlen bélyeg is okozhat taxonómiai problémát, mint ahogy azt a *F. maculatiformis* Dózsa-Farkas, 1972 mutatja. A preklitelláris nefridiumok számának variálódása 4 é 5 pár között bizonytalanná teszi, hogy csupán intraspecifikus változatokról van-e szó, avagy két különböző fajjal állunk szemben.

3.2 A riboszomális gének és alkalmazásuk a filogenetikában

Az eukarióta nukleáris riboszomális DNS (rDNS) általában tandem ismétlődő cisztronokba szerveződik. Az rRNS gének egyszerre íródnak át, egyetlen transzkriptumot létrehozva, amely tartalmazza sorrendben az ETS-t (external transcribed spacer), 18S vagy SSU (small subunit) rDNS-t, ITS1-t (internal transcribed spacer) 5,8S rDNS-t, ITS2-t, illetve a 28S vagy LSU (large subunit) rDNS-t. Az átíródott prekurzor-rRNS-eket ún. integenis spacer (IGS) szeparálja (Gerbi, 1985). A riboszomális DNS-nek számos jellegzetes tulajdonsága van, így például a tandem ismétlődő gének, a kódoló és nem kódoló (spacer) régiók közti eltérés a divergencia mértékében, a génkonverzió (concerted evolution), ami lehetővé teszi, hogy a riboszomális géneket széles körben lehessen alkalmazni filogenetikai problémák megoldására, egészen a taxonómiai értelemben vett országoktól a populációkig (Gerbi, 1985; Hillis és Dixon, 1991). A génkonverzió során az ismétlődő egységek egy fajon belül hajlamosak inkább homogenizálódni, mintsem egymástól függetlenül evolválódjanak. A fajon belüli variáció alacsony szintje általában a fajok közti divergencia alacsony szintjéhez kapcsolható (Page és Holmes, 1998). Az olyan molekuláris mechanizmusok, mint a génkonverzió és az egyenlőtlen crossing-over nemcsak ahhoz vezetnek, hogy a DNS szekvenciák kicserélődnek az ismétlődő gének közt, és így szimultán változhatnak, hanem hatással vannak arra is, hogy mely mutációk terjedhetnek el a tandem ismétlődő gének között, és fixálódnak a fajon vagy a populáción belül (Dover, 1982).

A 18S rDNS viszonylag lassan változik az evolúció folyamán bizonyos mitokondriális génekkel (pl. COI) összevetve, ezért alkalmatlannak bizonyulhat alacsony taxonómiai szinteken az elágazások megismerésére (Hillis és Dixon, 1991). A 18S rDNS nem kódol fehérjét, hanem önmagára tekeredik fel, ami kiegyenlítő változásokat vonhat maga után hibát okozva ezzel a filogenetikai analízisben (Wheeler és Honeycutt, 1988). Ezenkívül könnyen lehet alanya az inszercióknak és delécióknak.

A divergencia sebessége meglehetősen nagy mértéke új mutációk megjelenéséhez és elterjedéséhez vezet a riboszomális DNS spacer régióinak esetében, emiatt az ITS szekvenciák népszerűvé váltak közel rokon fajok filogenetikai kapcsolatainak feltérképezésében (Lee és Taylor, 1992; Fritz és mtsai, 1994; Schlötterer és mtsai, 1994; Chen és Miller, 1996; Stothard és mtsai, 1996; Odorico és Miller, 1997; Morgan és Blair, 1998; van Oppen és mtsai, 2000; Weekers és mtsai, 2001; Cutillas és mtsai, 2002; Rojas és mtsai, 2002; Carvalho és mtsai, 2004; Vidigal és mtsai, 2004; Dumont és mtsai, 2005), valamint populációk összevetésére is (Bakker et al, 1992; Kooistra, 1992; Vogler and DeSalle, 1994). A riboszomális DNS evolúciójának összetett mechanizmusa ugyanakkor potenciális problémaforrás lehet az ITS régió alkalmazásakor, ha az új mutációk megjelenésének sebessége, illetve azok homogenizálódása ismeretlen a vizsgált fajok esetében (Dover, 1982; Ohta és Dover, 1983). Amennyiben viszont az új mutációk megjelenésének rátája alacsonyabb, mint a homogenizáció mértéke, akkor homogén vagy közel-homogén ITS variánsok fognak előfordulni a vizsgált faj esetében, éppen ezért az ITS filogenetikai célokra történő alkalmazása nem fog problémát jelenteni (Schlötterer és mtsai, 1994).

3.3 Molekuláris vizsgálatok az Annelida törzsben

Az Annelida törzsben az utóbbi években a molekuláris taxonómiának köszönhetően gyökeres változások következtek be, az Annelida törzsbe kerültek az ezelőtt önálló törzsként kezelt Pogonophora, Echiura és Sipuncula taxonok (McHugh, 1997; Struck és mtsai, 2007; 2008; Dordel és mtsai, 2010). Struck és mtsai (2011) egész törzset felölölő filogenetikai munkájában a fenti taxonok beékelődnek a soksertéjű gyűrűsférgék közé, megkérdőjelezve ezzel a szelvényezettség és a testüreg relevanciáját filogenetikai kérdésekben. A „Polychatea”-ként számontartott taxonok teljes mértékben polifiletikus elrendeződést mutatnak, ezzel szemben a Clitellata megőrizte monofiletikus pozícióját. Törzsfá rekonstrukciójuk alapján az ősi Annelida bélyegek az anterior függelékek (palpus-ok), valamint a belső, támasztó serték és az egyszerű serték voltak.

A Clitellata osztályba körülbelül a gyűrűsférgék egyharmada tartozik. Hagyományosan két taxont különböztettek meg az osztályon belül, az Oligochaeta és a Hirudinea alosztályt, de számos molekuláris vizsgálat arra mutatott, hogy a Hirudinea-t az Oligochaeta-n belülre kell helyezni (Martin, 2001; Siddall és mtsai, 2001; Erséus és Källersjö, 2004; Rousset és mtsai, 2007, 2008; Struck és mtsai, 2007; Marotta és mtsai, 2008), eszerint

az Oligochaeta név a Clitellata-val szinonimmá válik. Bizonyítottak tűnik, hogy a Hirudinea, illetve a Branchiobdellida és az Acanthobdellida taxonok szoros kapcsolatban vannak az Oligochaeta Lumbriculidae családdal (Marotta és mtsai, 2008). Mindazonáltal a Clitellata taxonok bazális filogenetikája jórészt megoldatlan egyelőre (Erséus és Källersjö, 2004; Erséus, 2005; Marotta és mtsai, 2008).

A riboszomális gének használata elterjedtnek számít a gyűrűsférgék molekuláris filogenetikájával foglalkozó közleményekben, emellett még mitokondriális génekkel, leginkább COI-val (citokróom oxidáz I alegység) találkozhatunk nagy számban a filogenetikai témájú publikációk között. A riboszomális gének között a kódoló szakaszok vizsgálatára találhatunk inkább példákat, a nukleáris riboszomális gének mellett számos munka alkalmazza párhuzamosan vagy egyedül a mitokondriális rDNS-eket (12S rDNS, 16S rDNS) is. Erséus és mtsai. (2000) a 18S rDNS-t vizsgálták a Tubificidae család filogenetikai analizésére. Adataik alátámasztották a család monofiletikus voltát szemben néhány korábban morfológiai alapon támasztott kétellyel (Erséus 1987, 1990; Brinkhurst, 1994; Ferraguti és mtsai, 1999), valamint a Tubificinae és a Limnodrilinae alszaládokat is monofiletikusnak találták, ugyanakkor ezt kétségbe vonták a Rhyacodrilinae és a Phallogdrilinae alszaládok esetében. A Naididae család a legközelebbi kapcsolatot a rhyacodrilin férgekkel mutatta, vagyis nem tekinthető önálló családnak, ami megerősíti a korábbi morfológiai megfigyeléseket (Erséus, 1987, 1990, Brinkhurst, 1994), s ezt egy mitokondriális citokróom-oxidázon alapuló munka is előrevetítette (Christensen és Theisen, 1998). Erséus és mtsai (2002) későbbi munkájukban még több faj bevonásával a 18S rDNS-re alapozva újabb bizonyítékokat szolgáltattak a naidid férgek tubificidák közé sorolására, majd ezt Bely és Wray (2004) immár a mitokondrium genomjában található COI-t elemmezve is megerősítette a Naididae családra fókuszáló dolgozatában.

Számos esetben használták a 18S rDNS-t a COI-val együtt, így például a piócák esetében (Apakupakul és mtsai, 1999). Vizsgálataikban a 18S rDNS-t csak korlátozottan tudták használni, mivel a közel rokon fajok esetében nem mutatott elég nagy varianciát ahhoz, hogy leszármazási viszonyaikat megbízhatóan tisztázni lehessen. Ugyanezeket a szakaszokat alkalmazták a Branchiobdellida-k esetében (Gelder és Sidall, 2001), a két génszakasz alkalmazásával sikerült igazolniuk a Branchobdellidae család esetében a monofiletikus eredetet, mindazonáltal megfigyeléseik közé tartozott, hogy a 18S rDNS más taxonokhoz képest viszonylag alacsony genetikai diverzitást mutatott.

Jamieson és mtsai (2002) nukleáris (28S rDNS) és mitokondriális (12S, 16S rDNS) géneket vizsgáltak a Crassilicellata-k közé sorolt féregcsaládok rokonsági viszonyainak

megállapítására, azon belül is a Megascolecidae családra összpontosítva. Adataik egyértelműen igazolják a Crassicitellata Jamieson, 1988 taxon monofiletikus voltát, illetve meglehetősen pontos képet kaptak az egyes családok filogenetikai pozíciójáról, így például az Eudrilidae, Megascolecidae, Octochaetidae és Acantodrilidae családokról. Az alkalmazott lókuszek külön-külön is, illetve kombináltan kiértékelve jó felbontású filogramokat eredményeztek.

A Polychaeta férgek esetében találhatunk példát ITS szekvenciákon alapuló munkára is. Chen és mtsai (2002) sikerrel alkalmazták az ITS régiót *Perinereis* (Polychaeta; Nereididae) fajok evolúciós kapcsolatainak feltárására, valamint új fajok elkülönítésére, amelyek összhangban álltak morfológiai és ökológiai megfigyelésekkel is. Az előző szerzők fontos megállapításai közé tartozik, hogy a *Perinereis* férgek körében az ITS régiót érintő interspecifikus polimorfizmus jóval nagyobb volt az intraspecifikusnál. Figyelemreméltó továbbá, hogy az ITS2 esetében ez a polimorfizmus szignifikánsan nagyobb volt az ITS1-nél, ami más szerzők megfigyeléseivel is egybevágott (Bakker és mtsai, 1992; Schlötterer és mtsai, 1994;).

A Clitellata-n belül is találhatunk példát az ITS régió taxonómiai, illetve filogenetikai célokra történő felhasználására. Gustafsson és mtsai (2009) az édesvizekben honos *Lumbriculus variegatus*-t (Annelida: Clitellata: Lumbriculidae) vetették vizsgálat alá, az ITS mellett még 16S rDNS és COI szekvenciákat elemeztek. A 3 lókuszt vizsgálta ugyanarra az eredményre vezetett, miszerint a *L. variegatus*-nak legalább 2, molekuláris módszerekkel jól elkülöníthető kládja létezik, amelyek ugyanakkor földrajzilag nem különülnek el. A 16S rDNS ezen felül egy harmadik, földrajzilag izolált klád jelenlétét is kimutatta, a másik két lókuszt vizsgálva nem tapasztalták ezeknek az egyedeknek az elkülönülését. Szintén több lókuszt vizsgáltak Kvist és mtsai (2010), az ITS régió mellett még a nukleáris 18S és 28S rDNS, valamint a mitokondriális 12S, 16S rDNS-t és a COI nukleotidsorrendjét is meghatározták a tengeri, kozmopolita *Tubificoides* (Annelida: Clitellata: Tubificidae: Naidinae) fajok filogenetikai kapcsolatainak feltárására. Valamennyi gén vizsgálata egyaránt alátámasztotta a genusz monofiletikus voltát, ezenkívül sikerrel elkülönítettek néhány új fajt is. Az ITS-sel kapcsolatban megállapítható, hogy a különböző fajok nukleotid-szekvenciáiból magas statisztikai megbízhatósággal rendelkező filogenetikai fát sikerült generálni, amely jól alátámasztotta az úgynevezett „kriptikus” *Tubificoides* fajok jelenlétét. Egyes esetekben azonban ennek az egy lókusznak a használata nem lett volna elegendő, így például a *T. benedii* más gének által feltárt két kládja esetében nem mutatott értékelhető variabilitást az

ITS régió. A szerzők általánosságban megállapítják, hogy esetükben az ITS régió variabilitása közepesnek tekinthető a többi általuk vizsgált lókuszhöz viszonyítva.

3.3.1 DNS vizsgálatokon alapuló eredmények a földigiliszták taxonómiájában

Az első lumbricidákra fókuszáló szekvenciavizsgálatok (Pop és mtsai, 2003) három génszakaszt vettek célpontba, a nukleáris 18S rDNS-t, valamint a mitokondriális 16S rDNS-t és citokróm c oxidázt (COI). Bár ez a dolgozat kizárólag Románia területéről származó mintákat vizsgál, több figyelemre méltó megállapítást tesz. A COI-n alapuló analízis alátámasztja az *Octodrilus* genusz homogén voltát, ugyanakkor az *Allolobophora* heterogénnek mutatkozik. Ezzel szemben a 16S rDNS szekvenciák kizárólagos vizsgálata több kládra szakítja az *Octodrilus* nemet. A *Lumbricus terrestris* és az *Eisenia* nembe tartozó fajok helye a 16S rDNS fán megfelel a klasszikus koncepciónak. A 18S rDNS-t dolgozatukban inkább magasabb taxonómiai szintek vizsgálatára tartják alkalmasnak, míg a 16S rDNS és a COI közel rokon fajok filogenetikai viszonyainak tisztázására megfelelő.

16S rDNS-en és COI-on alapuló vizsgálatban Pop és mtsai (2005) az *Allolobophora* nemet vették célpontba, amelyet erősen polifiletikusnak találtak. Mindazonáltal azonosítottak jól definiálható, morfológiai és biogeográfiai értelemben is homogénnek tűnő csoportokat, mint például az *A. dacica* Pop, 1938, *A. mehadiensis* Rosa, 1895, *A. robusta* Rosa, 1895 és a *Cernosvitovia opisthocystis* (Rosa, 1895) alkotta klád. Ezért a hím ivarnyílások helyzetében megfigyelhető különbség ellenére a szerzők valamennyi ebbe a kládba tartozó faj *Cernosvitovia* nembe való sorolását javasolják. Az *Aporrectodea* fajok a 16S rDNS alapján szintén különálló csoportot formáltak a kladogramon, azonban ezt a COI szekvenciák nem támasztották alá.

Alacsonyabb taxonómiai szinten is történtek molekuláris vizsgálatok a *Dendrobaena alpina* (Rosa, 1884) esetében (Csuzdi és mtsai, 2005), ahol megállapítható volt 16S rDNS és COI szekvenciák alkalmazásával, hogy a *D. alpina* faj felbontható egy törzsalakra (*D. a. alpina*), amely az Alpokat, a Déli-Kárpátokat és a Balkánt népesíti be, ezenkívül létezik még a *D. a. alteclitellata* alfaj, amely a Kárpátok keleti és északkeleti részében honos. Ezzel egybevágó morfológiai megfigyelések is, a *D. a. alteclitellata* erősebben pigmentált és nagyobb termetű, mint a törzsalak. Ugyanezen dolgozat igazolja, hogy a Perel (1972) által kétségbevitelt *D. clujensis* Pop, 1938 valid faj, továbbá a *D. attemsii* (Michaelsen, 1902), amely sok alaktani hasonlóságot mutat a *D. alpina*-val, és ezért különállósága kétséges volt

(Pop, 1948; 1964; Pop V. V., 1972), szintén különálló helyet foglalt el filogenetikai fákön, alátámasztva ezzel, hogy külön faj.

Újabb 18S rDNS, 16S rDNS és COI-n alapuló vizsgálataiban Pop és mtsai. (2007) néhány klasszikus morfológiai bélyeget is értékel. Három, a Pop rendszerének alapját alkotó karakterről (izomstruktúra, pigmentáció és serték távolsága) bebizonyítják, hogy esetükben gyakran jöhetnek létre homopláziák, valamint az újabb morfológiai rendszerekben szívesen alkalmazott nefridiális hólyagok is hasonlóak lehetnek egymástól távol eső fajoknál is, mint például az *Eisenia* és *Dendrobaena* fajok.

Pop és mtsai. (2008) 16S rDNS és COI szekvenciák analizálásával felülvizsgálták a rokon *Octolasion* Örley, 1885 *Octodrilus* Omodeo, 1956 és *Octodriloides* Zicsi, 1986 nemeket, és azt a következtetést vonják le, hogy az *Octolasion* és az *Octodrilus* esetében jogos a szétválasztás, ami a spermatékák számán alapszik. Az *Octodriloides* fajok azonban szétszóródnak az *Octodrilus* nem fajai között, vagyis elképzelhetőnek tartják, hogy az *Octodriloides* genusz szükségtelen, a nemet megkülönböztető bélyeg, miszerint a hímivarnyílások a 15. szelvény mögött helyezkednek el, csupán homoplázia, és nem szünapomorfia, ahogy eddig gondolták. Vizsgálataikból az is kiderül, hogy a szűk elterjedési területtel jellemezhető *Octodrilus* fajok három jól felismerhető csoportot képeznek a filogenetikai fákön, egy italo-balkáni, egy pannon, illetve egy dáciikus areával leírható kládot, ráadásul ezekben a csoportokba illeszkednek a hasonló elterjedésű *Octodriloides* fajok is. Főként biogeográfiai kérdéseket igyekeztek megválaszolni következő munkájukban (Pop és mtsai., 2010), ahol a földigiliszta fajokban erősen bővelkedő, sok endemizmusnak otthont adó Erdélyi Szigethegységben előforduló *Octodrilus* és *Dendrobaena* fajokat állították célkeresztbe, molekuláris vizsgálataikhoz továbbra is a COI-t s a 16S rDNS-t alkalmazták. A filogenetikai fákön látható csoportok jól reprezentálták a földrajzi elterjedés alapján képezhető fajok együttesét, így például az *Octodrilus*-ok esetében a hegység mészköves területeit kedvelő *O. frivaldszkyi* (Örley, 1885), *O. aporus* Pop, 1989, *O. permagnus* Pop, 1989 egymáshoz közeli pozícióban találhatóak. A *Dendrobaena* fajoknál, az alpesi, kárpáti és balkáni elemek hoznak létre elkülönülő kládokat. Eredményeik egyszerre tükrözik a morfológiai hasonlóságokat, valamint biogeográfiai fajcsoportokat. Az Erdélyi Szigethegységben előforduló endemizmusok nagy száma, az elkülönülő evolúciós leszármazási vonalak és a fajok elterjedési mintázata erős bizonyítékkal szolgál arra, hogy az Erdélyi Szigethegység jégkorszaki refugium volt, illetve a fajkeletkezés egyik központja lett az elkövetkező időszakban.

Briones és mtsai (2009) 36 lumbricida taxon 16S rDNS-ét és COI génjét szekvenálták meg, a család genuszainak nagyobb része reprezentálva volt vizsgálataikban. A gyűjtőgenuszként ismert *Allolobophora* és *Dendrobaena* nem meglepő módon a szekvenanciaanalízisben is heterogénnek mutatkozott. Az *Eisenia fetida*, és az *E. andrei* világosan elváló kládot alkotott, ugyanakkor a sérteállásukat leszámítva nagyon hasonló *D. veneta* és *D. hortensis* (náluk *E. veneta* és *E. hortensis*) nem illeszkedett közéjük, hanem különálló kládot alkottak. Szintén heterogenitás volt tapasztalható az *Aporrectodea* nemnél, ahol a több fajt felölelő, típusfajt (*Aporrectodea caliginosa trapezoides* (Dugés, 1828)) is magába foglaló kládon kívül szóródott szét, egymástól is szeparálódva az *A. rosea*, *A. limicola* és az *A. ictERICA*, ez utóbbi *Allolobophora*-k közé ékelődve. A *Lumbricus* nem homogén, önálló ágon helyezkedett el, csak a *L. (Allolobophoridella) eiseni* került más pozícióba, a *D. attemsi*, és a *DD. rubidus* testvércsoportjaként. A filogenetikai fákra jellemző, hogy a magas bootstrap értékek erősítik a terminális elágazásokat, viszont a bazális pontoknál alacsony az elágazások támogatottsága, vagyis a fajcsoportok, genuszok egymáshoz viszonyított helyzetről csak óvatos következtetéseket lehet levonni. Noha számos faj pozíciója tisztázódni látszik vizsgálataikból, a szerzők maguk is elismerik, hogy sok esetben megválaszolatlanul maradt a régóta problémát okozó fajok, fajcsoportok helyzete.

Számos munka célja a fajok közti kapcsolatok feltárása helyett az egy fajon belüli genetikai diverzitás feltárása, adott esetben „kriptikus” fajok kimutatása, mint például az *Octolasion lacteum* (Örley, 1881) (Heethoff és mtsai., 2004), *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Pérez-Losada és mtsai., 2005), *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1826) (Cameron és mtsai., 2008) *Allolobophora chlorotica* (Savigny, 1826) (King és mtsai., 2008) *Aporrectodea caliginosa* (Savigny, 1826) (Pérez-Losada és mtsai., 2009) esetében. A szerzők a fajon belüli leszármazási vonalak megvilágítására gyorsan változó lókuszokat alkalmaznak, mint a mitokondriális COI valamelyik alegysége és a 28S rDNS. Fajon belüli heterogenitásra fókuszáló munkák alkalmazhatnak még RAPD-PCR-t (Random Amplification of Polymorphic DNA), ahogy azt láthatjuk *Lumbricus terrestris* L. (Kautenburger, 2006) és az *A. caliginosa* (Lentsch és mtsai. 2006) esetében.

3.3.2 Molekuláris vizsgálatok az *Enchytraeidae* családban

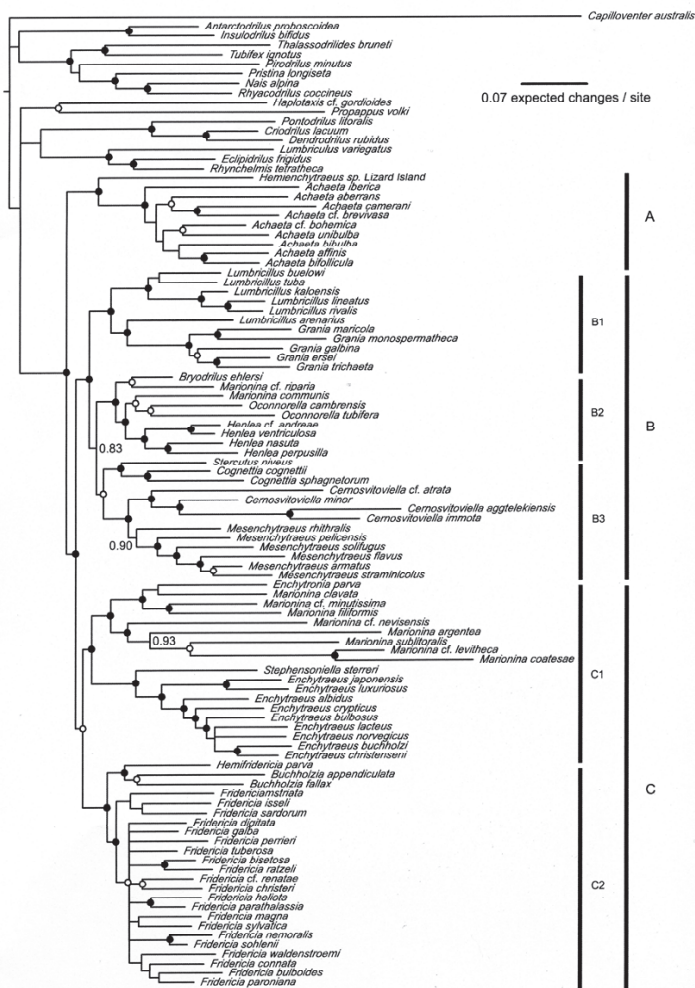
Az Enchytraeidae családban az első molekuláris vizsgálatok enzimek polimorfizmus vizsgálatára irányultak. A *Lumbricillus lineatus* (Müller, 1774) amfimiktikus diploid és

parthenogenetikus szimpatrikus populációinak összehasonlítására multilokusz enzim elektroforézis (MLEE) analízist végeztek el két fehérjére, a foszfoglükóizomerázra és a foszfoglükómutázra (Christensen és mtsai. 1976), majd parthenogenetikus tri- tetra- és pentaploid populációk esetében is megismételték a vizsgálatokat. (Christensen és mtsai. 1978). Szintén fehérje-ujjlenyomat vizsgálatok hívták fel arra a figyelmet, hogy a *Lumbricillus rivalis* (Levensen, 1883) két morfológiailag nagyon hasonló faj együttese (Christensen és Jelnes 1976). Izozimek szeparálása PAGE-IEF (poliakrilamid gélelektroforézis izoelektromos fókuszálással) által sikerült közel rokon *Enchytraeus* Henle, 1837 fajokat szétválasztani (Brockmeyer, 1991; Schmelz és mtsai, 2000). Schmelz (2003) a *Fridericia* genusz tárgyaló revíziójában 34 fajra végzett teljes protein és 3 háztartási enzimet (housekeeper enzyme) (észteráz, foszfoglükómutáz, malát-dehidrogenáz) bevonó izozim vizsgálatot. Jelentős különbségeket, heterogenitást sikerült kimutatnia olyan taxonómiaiag problémás fajok esetében, mint például a *F. maculatiformis*, a *F. bulboides* és a hozzá hasonló *F. semisetosa*, vagy éppen szimpatrikus *F. parathallassia* Schmelz, 2002 populációknál.

Az első enchytraeid fajokra koncentrált DNS-vizsgálatokat Schirmacher és mtsai. (1998) végezték, ahol két morfológiai különbséget alig-alig felmutató faj, az *Enchytraeus variatus* Bouguenec és Gianì, 1987 és az *Enchytraeus crypticus* Westheide és Graefe, 1992 között sikerült RAPD-PCR alkalmazásával genetikai eltérést kimutatniuk. A legutóbbi idők eredményei közé tartozik, hogy Erséus és mtsai (2010b) 3 mitokondriális (12S rDNS, 16S rDNS és COI) és két nukleáris (18S rDNS és 28S rDNS) génszakasz vizsgálatával 14 genusz 86 fajt vizsgálták meg, megvetve ezzel az egész Enchytraeidae család molekuláris filogenetikájának az alapját. Eredményeik megerősítik az Enchytraeidae család monofiletikus voltát, továbbá hogy a legtöbb érvényesnek tekintett genusz (*Achaeta*, *Cognettia*, *Cernovitoviella*, *Mesenchytraeus*, *Oconnorella*, *Henlea*, *Enchytraeus*, *Grania*, *Buchholzia*, *Fridericia*) szintén monofiletikus, kivételt ez alól a parafiletikusnak mutató *Lumbricillus* Ørsted, 1844 képez, és a *Marionina*, amely revízióját annak polifiletikusága miatt sürgetik a szerzők (9. ábra). A *Fridericia* nem vizsgálatukban a szekvenciavizsgálatok által teljes mértékben alátámasztva monofiletikus kládot alkot, emellett azt is megállapítják, hogy a genuszon belüli alacsony felbontás és más genuszokhoz viszonyítva rövid terminális ághosszak valószínűsítik, hogy a nemen belül a közelmúltban egy extenzív radiáció ment végbe. Szintén a család filogenetikájával foglalkozik Christensen és Glenner (2010) munkája, mitokondriális gének, illetve 18S rDNS szekvenciákra alapozva, megállapítják a *Buchholzia* és a *Fridericia* nemekről, hogy azok testvércsoportok, hozzájuk képest az *Achaeta* Vejdovský, 1878 bazálisan helyezkedik el. Szintén testvércsoportoknak bizonyultak

Mesenchytraeus és *Cernosvitoviella* Nielsen és Christensen, 1959, valamint a *Henlea* Michaelsen, 1889 és *Cognettia* Nielsen és Christensen, 1959 genuszok. A családon belül leginkább bazális pozícióba az *Enchytraeus* Henle, 1837 és *Lumbricillus* fajok kerültek. De Wit és mtsai (2011) egyetlen genusz, a *Grania* Southern, 1914 filogenetikájára fókuszálnak számos lókuszt megvizsgálva (18S, 28S, ITS és 12S, 16S, COI), a génszakaszok alapján kapott filogenetikai viszonyok jól megfeleltethetőek voltak egyes morfológiai bélyegek (kopulációs mirigy, serték entális vége) változásával, illetve a fajok földrajzi elterjedésével.

De Wit és Erséus (2010) skandináv *Grania* fajok intraspecifikus varianciáját és filogenetikáját tanulmányozta ITS és COI génszakaszok segítségével. Dolgozatuk számos fontos adatot közöl a két lókuszt alkalmazhatóságáról intra- és interspecifikus vizsgálatokban. A *Grania ovitheca* Erséus, 1977 minták analízise során egy új fajba botlottak, a *Grania occulta* De Wit és Erséus, 2010 elkülönülését egyaránt alátámasztott az ITS és a COI is, valamint morfológiai eltérések is igazolták az új faj leírását. A két gén közötti variabilitás különbségére utalt, hogy a *G. occulta*, illetve a *Grania postclitellochaeta* (Knöllner, 1935) esetében találtak egy-egy állatot, amely a COI alapján elkülönült (de jóval kisebb mértékben, mint a *G. occulta*), ugyanakkor az ITS nem mutatott ki különbséget, továbbá morfológiailag teljesen megegyezők voltak a faj többi egyedével. Rámutatnak, hogy ezek az egyedek elkülönült metapopulációk részei, amit a maternális vonalon öröklődő mitokondriális COI jelez, ugyanakkor nyilvánvalóan létezik génáramlás a metapopulációk között, amire az ITS invariabilitása hívja fel a figyelmet.



9. ábra: Az Enchtraeidae család filogenetikája Ersűs és mtsai (2010) nyomán. Bayesian inference analízis. Fekete körök: 1.00 PP, üres körök: 0.95-0.99 PP.

4. Célkitűzések

A Lumbricidae családon belüli filogenetikai viszonyok feltérképezése 18S rDNS és spacer szekvenciák segítségével, különös tekintettel a morfológiailag heterogén *Dendrobaena*, *Allolobophora*, *Aporrectodea*, *Bimastos* és *Eisenia* genuszokra

A Lumbricidae családon belül alkalmazott morfológiai karakterek értékelése a molekuláris vizsgálatok során kapott eredmények tükrében

Az Enchytraeidae családon belül a kétes validitással rendelkező fajok, mint például a *Buchholzia subterranea*, *Enchytronia christenseni*, *Mesenchytraeus kuehnelti*, *Bryodrilus glandulosus*, felülvizsgálata az ITS régió szekvenciaanalízise által

A *Fridericia* genusz morfológiailag heterogén fajainak, fajkomplexeinek (*F. ratzeli*, *F. bulboides*, *F. aurita*, *F. maculatififormis*) genetikai analízise ITS szekvenciákra alapozva

Az Enchytraeidae családban a faji differenciáció során figyelembe vett morfológiai bélyegek használhatóságának összevetése a molekuláris vizsgálatok eredményeivel

5. Anyag és módszer

Morfológiai vizsgálatok

A vizsgált fajok listája, a mintavételi helyszínek, valamint azok időpontjai, továbbá a gyűjtő személye a Függelékben (Függelék II. és III.) található. A morfológiai vizsgálatok a témavezetők munkáján alapszik. A földigiliszták meghatározását Dr. Csuzdi Csaba végezte, a televényférgeket Dr. Dózsa-Farkas Klára identifikálta. A Lumbricidae család esetében 37 fajból összesen 40 példányt vizsgáltunk meg (9 *Dendrobaena*, 8 *Allolobophora*, 6 *Aporrectodea*, 4 *Bimastos*, 3 *Eisenia*, 2 *Dendrodrilus*, 2 *Cernosvitovia*, 1 *Allolobophoridella*, 1 *Helodrilus*, 1 *Proctodrilus* faj). A minták összeállítása során a taxonómiai értelemben vett problémás genuszokból igyekeztünk válogatni, mint az *Allolobophora*, *Aporrectodea*, *Bimastos*, *Dendrobaena*, *Eisenia*. A gyűjtött fajok nagyobb része Európából származik, de vizsgálatainkba bevontunk észak-ameikai, illetve közel-keleti példányokat is. Az Enchytraeidae családon belül 19 faj 72 példányát tanulmányoztuk (4 *Buchholzia*, 2 *Bryodrilus*, 3 *Enchytronia*, 8 *Fridericia*, 2 *Mesenchytraeus*). Az egyes fajoknál, ahol ez lehetséges volt, igyekeztünk több mintavételi helyről is beszerezni mintákat, adott esetben más európai országokból is.

Molekuláris vizsgálatok

A molekuláris vizsgálatok az ELTE TTK Mikrobiológiai Tanszékének laboratóriumában zajlottak.

DNS izolálás

A molekuláris vizsgálatra szánt lumbricidákat 96%-os alkoholban, az enchytraeidákat lefagyaszttva tároltuk a további felhasználásig. A lumbricidák esetében a bőrizomtömlőkből kivágtunk egy kisebb darabot (Pop és mtsai, 2003), az enchytraeidáknál egész példányt használtunk a DNS-izoláláshoz. A genomális DNS-t Dneasy Tissue Kit-tel (Qiagen, Németország) tártuk fel a gyártó protokolljának megfelelően. A DNS mintákat -20°C-on tároltuk további felhasználásig.

A tisztított DNS detektálása agaróz gélelektroforézissel:

- 1%-os agaróz gélt (Gibco) készítettünk, (1 g agaróz, 10 ml 10xTBE, 90 ml HPLC tisztaságú víz, 5 µl etidium-bromid oldat).
- 5 µl DNS mintát és 3 µl gélt töltőpuffert (30% (V/V) glicerin, 0,25 mM brómfenolkék) kevertünk össze, majd a zsebekbe töltöttük. Molekula méret markerként GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder-t (Fermentas) használtunk.
- 15 percig 100 V-on futtattuk a gélt a 1xTBE pufferben (107,8 g/l TRIS, 55 g/l bórsav, 7,4 g/l EDTA, pH 8,3), majd transzilluminátort használva megfigyeltük a DNS-t a gélben.

A Lumbricidae 18S rDNS szakaszának felszaporítása

A Lumbricidae minták 18S rDNS régiójának felszaporításához Taq polimerázt és 18F35 elnevezésű forward, valamint R1779 elnevezésű reverz általános eukarióta primereket használtunk. Az alkalmazott primerek szekvenciáit és hivatkozásait az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. A PCR reakciókban és szekvenálásban felhasznált primerek szekvenciái és hivatkozásai (Y: C vagy T)

Primer	Szekvencia (5' – 3' irányban)	Hivatkozás
18S rDNS primerek		
18F35	TCT CAA AGA TTA AGC CAT GCA	Struck és mtsai (2002)
18R399	CCC TCT CCG GAA TCG AAC CCT GAT	
18F509	CCC CGT AAT TGG AAT GAG TAC A	
18R772	CTC TAA TTT TTT CAA AGT AAA C	
18R925	GAT CCA AGA ATT TCA CCT CT	
18F997	TTC GAA GAC GAT CAG ATA CCG	
18R1256	AGC TCT CAA TCT GTC AAT CCT	
18F1435	AGG TCT GTG ATG CCC TTA GAT	
18R1779	TGT TAC GAC TTT TAC TTC CTC TA	
ITS primerek		
BD1	GTC GTA ACA AGG TTT CCG TA	Perrot-Minnot (2004)
BD2	TAT GCT TAA ATT CAG CGG GT	Kane és Rollinson (1994)
ETTS1	TGC TTA AGT TCA GCG GGT	
ETTS2	TAA CAA GGT TTC CGT AGG TGA A	Subbotin és mtsai (2001)
TW81	GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC	
AB28	ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT	Cutillas és mtsai (2002)
NC5	GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT	
NC2	TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT	Chen és mtsai. (2002)
r5.8S1	CGA TGA AGA GCG CAG CCA GC	
r5.8S2	CGA TGT TCA ATG TGT YCT GC	

Az egyes PCR reakciók összemérése és az adott reakció hóprofiljának megválasztása az alábbiak szerint történt (Struck és mtsai, 2002):

Felhasznált reagensek:

- 10xPCR puffer (Fermentas) (200 mM TRIS/HCl, 15 mM MgSO₄, 100 mM KCl)
- MgCl₂ oldat (Fermentas) (25 mM)
- dNTP keverék (Fermentas) (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP)
- 18F35 primer (Bio-Science) (3,25 x 10⁻⁴ M) / 18R1779 primer (Bio-Science) (3,25 x 10⁻⁴ M)
- dH₂O
- Taq polimeráz LC (Fermentas) (Low Concentrated, 1 U/μl)

Amennyiben több reakciót végeztünk egymással párhuzamosan, úgy a komponensekből egy Eppendorf csőbe mérve premixet készítettünk a reakciók számának megfelelő mennyiségben. Ezt alaposan vortexeltük, lecentrifugáltuk, majd 0,2 ml-es reakciócsövekbe mértük szét. Ezekhez adtuk hozzá a templát DNS-t, amelynek szükséges mennyiségét az agaróz gélelektroforézist követően állapítottuk meg. A reakciócsöveket ismét alaposan vortexeltük és lecentrifugáltuk. A mintákat ezután Biometra T Personal PCR készülékbe helyeztük és elindítottuk a reakciót. A teljes genomialis DNS denaturálásához szükséges hőmérséklet az általunk használt Taq polimeráz számára túl magas, így azt csak az első lépés után adtuk a reakcióhoz.

A 18S rDNS régió felszaporítása: A PCR reakció összetétele:

10x PCR puffer	5 μl	premixnek összemérve
MgCl ₂	4 μl	
dNTP	10 μl	
18F35	0,5 μl	
18R1772	0,5 μl	
dH ₂ O	24 - 27 μl	
DNS templát	2-5 μl	
Taq pol. (1 U/μl)	1 μl	
Összesen	50 μl	

A PCR reakció hóprofilja:

Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	
Taq polimeráz bemérése	94°C	10 mp	
Denaturáció	94°C	1 perc	40x
Anelláció	50°C	1 perc	
Extenzió	72°C	2 perc	
Végső extenzió	72°C	10 perc	
Hűtés	4°C	∞	

A kapott hozzátételgesen 1750 bázispár (bp) hosszú termékeket agaróz gélelektroforézis segítségével detektáltuk, ugyanúgy, mint az izolált genomális DNS-t. A PCR termékek tisztítására a PCR-M Clean Up System-et (Viogene) használtuk mindenben a gyártó útmutatásainak megfelelően.

Az Lumbricidae ITS szakaszának felszaporítása

A Lumbricidae minták ITS régiójának amplifikálásához több primerkonstrukciót is kipróbáltunk (NC5 és NC2, BD1 és BD2, ETTS1 és ETTS2, TW81 és AB28, 1. táblázat), azonban ezek egyike sem hozott eredményt. Próbálkoztunk az egyes primerkonstrukciók annelációs hőmérsékletének grádiens PCR általi optimalizálásával, a ciklusszám megváltoztatásával, továbbá a fenti primereket nested kombinációban is alkalmaztuk, valamint az egyes forward és reverz primereket vegyesen is kipróbáltuk, de ezen próbálkozások egyike sem vezetett eredményre. Emiatt végül az 5,8S rDNS-ITS2 szakasz vizsgálata mellett döntöttünk az R5.8S1 és BD2 primerek alkalmazásával, az annelációs hőmérsékletet grádiens PCR-rel állítottuk be. .

Az egyes PCR reakciók összemérése és az adott reakció hőprofiljának megválasztása az alábbiak szerint történt:

Felhasznált reagensek:

- 10xPCR puffer (Fermentas) (200 mM TRIS/HCl, 15 mM MgSO₄, 100 mM KCl)
- MgCl₂ oldat (Fermentas) (25 mM)
- dNTP keverék (Fermentas) (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP)
- forward primer (BD1, TW81, NC5) (Bio-Science) (3,25 x 10⁻⁴ M) / reverz primer (BD2, AB28, NC2) (Bio-Science) (3,25 x 10⁻⁴ M)
- dH₂O
- Taq polimeráz LC (Fermentas) (Low Concentrated, 1 U/μl)

Ezekhez adtuk hozzá a templát DNS-t, amelynek szükséges mennyiségét az agaróz gélelektroforézist követően állapítottuk meg. A reakcióelegyeket ismét alaposan vortexeltük és lecentrifugáltuk. A mintákat ezután Biometra T Personal PCR készülékbe helyeztük és elindítottuk a reakciót. Az ITS régió felszaporítása:

A PCR reakció összetétele:

10x PCR puffer	5 µl	primixnek összemérve
MgCl ₂	4 µl	
dNTP	10 µl	
Forward primer	0,5 µl	
Reverse primer	0,5 µl	
dH ₂ O	24 - 27 µl	
DNS templát	2-5 µl	
Taq pol. (1 U/µl)	1 µl	
Összesen	50 µl	

A PCR reakció hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	
Taq polimeráz bemérése	94°C	10 mp	
Denaturáció	94°C	1 perc	35 x
Anelláció	52°C	1 perc	
Extenzió	72°C	1 perc	
Végző extenzió	72°C	10 perc	
Hűtés	4°C	∞	

A hozzávetőlegesen 550 bázispár (bp) hosszú terméket agaróz gélelektroforézis segítségével detektáltuk, ugyanúgy, mint az izolált genomiális DNS-t. A PCR termékek tisztítására ebben az esetben is a PCR-M Clean Up System-et (Viogene) használtuk a gyártó útmutatásainak megfelelően.

Az Enchytraeidae ITS szakaszának felszaporítása

Az Enchytraeidae minták ITS régiójának amplifikálásához több primerkonstrukciót is kiprobáltunk, amelyek hatékonyságukban meglehetősen hasonlóknak bizonyultak. Az alkalmazott primerpárosítások (NC5 és NC2, BD1 és BD2, ETTS1 és ETTS2, TW81 és AB28) szekvenciáit és hivatkozásait az 1. táblázat tartalmazza. Az annelációs hőmérséklet kiválasztásához grádiens pcr-t végeztünk.

Az egyes PCR reakciók összemérése és az adott reakció hőprofiljának megválasztása az alábbiak szerint történt:

Felhasznált reagensek:

- 10xPCR puffer (Fermentas) (200 mM TRIS/HCl, 15 mM MgSO₄, 100 mM KCl)
- MgCl₂ oldat (Fermentas) (25 mM)
- dNTP keverék (Fermentas) (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP)
- forward primer (BD1, TW81, NC5) (Bio-Science) (3,25 x 10⁻⁴ M) / reverz primer (BD2, AB28, NC2) (Bio-Science) (3,25 x 10⁻⁴ M)
- dH₂O
- Taq polimeráz LC (Fermentas) (Low Concentrated, 1 U/μl)

Ezekhez adtuk hozzá a templát DNS-t, amelynek szükséges mennyiségét az agaróz gélelektroforézist követően állapítottuk meg. A reakciócsöveket ismét alaposan vortexeltük és lecentrifugáltuk. A mintákat ezután Biometra T Personal PCR készülékbe helyeztük és elindítottuk a reakciót. Az ITS régió felszaporítása:

A PCR reakció összetétele:

10x PCR puffer	5 μl	primerek összemérvé
MgCl ₂	4 μl	
dNTP	10 μl	
Forward primer	0,5 μl	
Reverse primer	0,5 μl	
dH ₂ O	24 - 27 μl	
DNS templát	2-5 μl	
Taq pol. (1 U/μl)	1 μl	
Összesen	50 μl	

A PCR reakció hőprofilja:

Kezdeti denaturáció	98°C	5 perc	
Taq polimeráz bemérése	94°C	10 mp	
Denaturáció	94°C	1 perc	35 x
Anelláció	52°C	1 perc	
Extenzió	72°C	1 perc	
Végző extenzió	72°C	10 perc	
Hűtés	4°C	∞	

A 950-1000 bp hosszú PCR termékek tisztítására az agaróz gélelektroforézis detektálást követően PCR-M Clean Up System-et (Viogene) használtuk a gyártó útmutatásainak megfelelően.

Szekvenáló reakciók

Az egyes szekvenáló PCR reakciók összemérése és az adott reakció hőprofiljának megválasztása a gyártó protokollja szerint történt:

Felhasznált reagensek:

- Big Dye Terminator Ready Cycle Sequencing Kit AmpliTaq DNS polimerázzal (Perkin Elmer), a kit már összemerve tartalmazza a reakcióhoz szükséges nukleotidokat (dNTP keverék megfelelő mennyiségű fluoreszcens festékkel jelölt dideoxi-nukleotiddal elegyítve), a MgCl₂-ot, valamint egy speciálisan módosított Taq polimerázt (AmpliTaq), ami megfelelő affinitással építteti be a jelölt dideoxi-nukleotidokat is.
- Big Dye Terminator Ready Cycle Sequencing Kit hígító puffere (Perkin Elmer)
- szekvenáló primer (Bio-Science) ($3,25 \times 10^{-4}$ M)
- dH₂O

Mivel több reakciót végeztünk párhuzamosan, a komponenseket egy Eppendorf csöbe mérve premixet készítettünk. Ezt alaposan vortexeltük, lecentrifugáltuk, majd 0,2 ml-es reakciócsövekbe mértük szét. Ezekhez adtuk hozzá a megtisztított, szekvenálásra kész PCR terméket. A reakcióelegyet ismét alaposan vortexeltük és lecentrifugáltuk. A mintákat ezután Biometra T Personal PCR készülékbe helyeztük és elindítottuk a reakciót. A 18S rDNS régió részleges szekvenálása:

A PCR reakció összetétele:

Big Dye	2 µl	premixnek összemerve
Big Dye puffer	3 µl	
dH ₂ O	9 µl	
primer	1 µl	
Templát PCR	5 µl	

A PCR reakció hőprofilja:

Denaturáció	96°C	10 mp	28x
Anelláció	50°C	5 mp	
Extenzió	60°C	4 perc	
Hűtés	4°C	∞	

Az eltérő génszakaszokhoz más-más szekvenáló primereket alkalmaztunk. A Lumbricidae család 18S rDNS-ének esetében a PCR-termék hossza miatt (~ 1800 bp) számos belső primer alkalmazására volt szükség, erre a célra a 18R399, 18F509, 18R772, 18R925,

18F997, 18R1256, 18F1435 jelzésű primereket (1. táblázat) használtuk. A lumbricidák 5,8S rDNS-ITS2 régiójához az R5,8S1, illetve a BD2 vagy AB28 primereket alkalmaztuk. Az enchytraeidák ITS régióját az R5,8S1, R5,8S2, BD1, BD2 (esetleg TW81, AB28, illetve NC5, NC2) primerekkel szekvenáltuk.

A szekvenáló reakció termékének tisztítása:

- A 0,6 ml-es Eppendorf-csőbe az alábbi elegyet mértük:
 - 3 µl 3 M Na-acetát (pH=4,6)
 - 62,5 µl 95%-os etanol
 - 14,5 µl HPLC tisztaságú steril víz
- 20 µl szekvenáló reakció terméket pipettáztunk bele és vortexeltük.
- Ezután 25 percig állni hagyjuk szobahőmérsékleten, majd 20 percig centrifugáltuk 14000 rpm-en. A felülúszót óvatosan leszívtuk pipettával és előtöttük.
- 250 µl 70%-os etanollal mostuk a csapadékot, vortexeltük, majd 10 perces centrifugálás következett.
- A felülúszót óvatosan leszívtuk pipettával, majd vákuumcentrifugában 15 perc alatt beszárítottuk a csapadékot.
- A beszárított terméket 17 µl TSR-pufferbe vettük fel, és a gyártó által megadott protokoll szerint denaturáltuk, majd futtattuk le. Az adatgyűjtést és feldolgozást az ABI PRISM 310 szekvenáló készülékkel végeztük el a Mikrobiológiai Tanszéken, azonban sok esetben a beszárított pelleteteket elküldtük a Szegedi Biológiai Központba, ahol a szekvenciákromatogramját ABI 373A berendezéssel olvasták le.

A szekvenciák kiértékelése

A szekvenciák kiértékelésekor először minden egyes szekvencia kromatogramját ellenőrizni kellett, az esetleges leolvasási hibákat manuálisan kijavítottuk. Mivel minden egyes génszakasz esetében több primerre volt szükség azok szekvenálásához, a következő lépésként ezeket a fragmenteket kellett az átfedő részek révén összeilleszteni. Erre a BioEdit v7.0.5. programot használtuk (Hall, 1999).

Az így kapott, fragmentekből összeállított szekvenciák pozicionális illesztését a MEGA5 programcsomag (Tamura és mtsai, 2011) segítségével végeztük az Enchytraeidae

család és a Lumbricidae család 18S rDNS szekvenciái esetében, erre a programcsomagban megtalálható ClustalW algoritmust (Thompson és mtsai, 1994) használtuk. A Lumbricidae család spacer szekvenciáinak illesztéséhez a MUSCLE algoritmust alkalmaztuk (Edgar, 2004), valamint a Gblock programot használtuk a rosszul illesztett pozíciók kiszekeltálására (Castresana, 2000). A filogenetikai analízishez neighbor-joining (NJ), maximum likelihood (ML) és Bayesian inference (BI) algoritmusokat alkalmaztunk. Az egyes fajok genetikai távolságának megállapítására pairwise distance értékeket számoltunk Tamura-Nei (TrN) szubsztitúciós modell mellett, a gap-ek esetében pairwise deletion megközelítést alkalmaztunk.

A filogenetikai analízis során a megfelelő evolúciós modell kiválasztásához a jModeltest 0.1 (Posada, 2008) programot alkalmaztuk, és az AIC (Akaike Information Criterion; Akaike, 1974) által legjobbnak választott modellt alkalmaztuk.

A Lumbricidae család két lókusának (18S rDNS és 5,8S rDNS-ITS2) együttes analízise során a két gén szekvenciáját egyetlen illesztésbe rendeztük (konkatenát), majd ezt az úgynevezett „superalignment”-et elemeztük. Ennek a megközelítésnek az eredményességét számos publikáció hangsúlyozza, megjegyezve, hogy jobb eredményeket szolgáltat, mint az egyes génfák konszenzus analízise (Gadagkar és mtsai, 2005; Dutilh és mtsai, 2007; Kupczok és mtsai, 2010).

A neighbor-joining módszer esetében a MEGA5 programcsomagban található algoritmust használtuk. Az analízisben a Tamura-Nei (TrN) (Tamura és Nei, 1993) modellt használtuk. A „gap”-ek kezelésére a „pairwise deletion” opciót választottuk. A NJ algoritmus esetében a kapott filogenetikai fák megbízhatóságának megállapítására 1000 ismétléses bootstrap. analízist alkalmaztunk

A maximum likelihood fakesésnél a szubsztitúciós modellek tesztelése után a legmegfelelőbbnek tűnő GTR + G + I (general time reversible) modellt használtuk. A Lumbricidae szekvenciák kiértékelésekor a a phylogeny.fr (Dereeper és mtsai, 2008) által futatott PhyML algoritmust alkalmaztuk (Guindon és Gascuel, 2003), az elágazások támogatottságának kiszámításra az aLRT SH-like (Anisimova és Gascuel, 2006) statisztikai próbát alkalmaztuk. A gap-eket is tartalmazó nukleotidpozíciókat felhasználtuk az analízis során. Az Enchytraeidae családnál a MEGA5-ben megtalálható ML algoritmust alkalmaztuk. A „gap”-ek esetében a partial deletion opciót alkalmaztuk (≥ 50), 1000 bootstrap ismétlés mellett.

A Bayesian inference fa a Topali 2.5 (Milne és mtsai, 2009) programmal készült MrBayes algoritmussal (Ronquist és Huelsenbeck, 2001). A Bayesian fa készítéséhez

MCMCMC (Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo) analízist futtatunk 1000000 generáción keresztül, a mintavételi sűrűség 100 volt, a „burn in”-t 25 %-ra állítottuk, 2 független futtatást végeztünk. A kiválasztott szubsztitúciós modellt a GTR + G + I (general time reversible) volt. A Lumbricidae család 18S rDNS szekvenciáinak kiértékelésére nem végeztünk BI analízist.

A filogenetikai analízishez használt kulcsoportok az alábbiak voltak:

1. A Lumbricidae család 18S rDNS szekvenciái esetében a *Criodrilus lacuum* Hoffmeister, 1845 (Annelida: Clitellata: Criodrilidae) fajt választottuk.
2. A Lumbricidae család 5,8S rDNS-ITS szekvenciái valamint az 18S rDNS és 5,8S rDNS-ITS2 együttes elemzésekor a *Dendrobaena cognettii*-t jelöltük ki, mivel a 18S rDNS fán bazálisan helyezkedett el, továbbá a nem állt rendelkezésre az adott lókuszt szekvenciája a *C. lacuum*, illetve más számbavehető kulcsoport (pl. *Hormogaster sp.*; Annelida: Clitellata) esetében. Emellett egyedi, más földigilisztáktól elütő karakterei miatt is alkalmasnak tartottuk, hogy más földigiliszták kulcsoportjává választottuk.
3. Az Enchytraeidae család ITS régiójának elemzéséhez a *Tubificoides pseudogaster* (Dahl, 1960) és a *Tubificoides benedii* (d'Udekem, 1855) (Annelida: Clitellata: Naididae) fajokat választottuk.
4. A *Fridericia* genusz szekvenciaanalízise során a *Buchholzia fallax* Michaelsen, 1887 enchytraeida fajt választottuk. A *Buchholzia* a *Fridericia* génusszal számos morfológiai hasonlóságot mutat, ugyanakkor az enchytraeida genuszok együttes vizsgálatakor a két genusz egyértelműen szétvált.

6. Eredmények és értékelésük

6.1 A Lumbricidae család

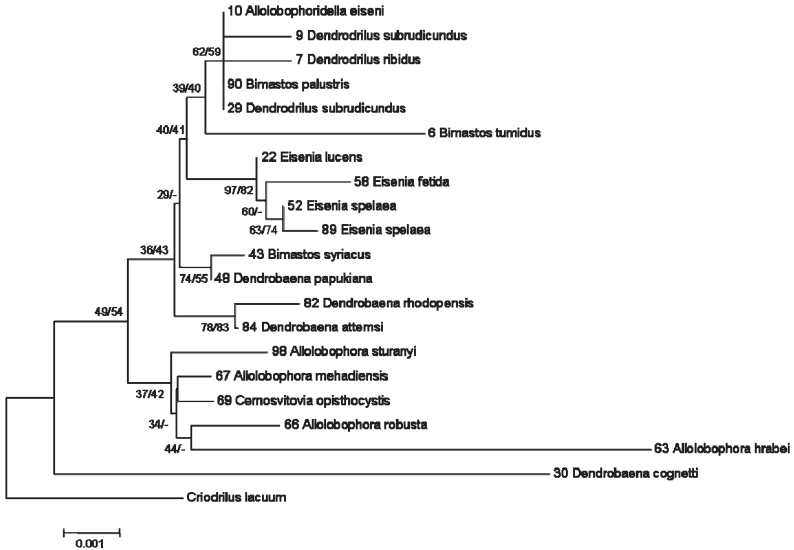
A molekuláris vizsgálatok során összesen 37 földigiliszta faj 18S rDNS-ét szekvenáltuk meg, az *Eisenia spelaea*, *Dendrobaena alpina* és a *Dendrodrilus subrubicundus* esetében 2 példány nukleotidszekvenciáját is megállapítottuk. A PCR-termékek átlagosan 1750 bázispár hosszúságúak voltak. Az 5,8S rDNS-ITS2 szakasz elemzése során ugyanezeket a mintákat analizáltuk, de az *Allolobophora eiseni* és az *Eisenia lucens* esetében nem sikerült az adott szakaszt amplifikálnunk a PCR során. Az 5,8S rDNS-ITS2 szakaszok hossza 500-550 bázispár között változott.

6.1.1 A 18S rDNS szekvenciák vizsgálata

Eredmények

A 18S rDNS szekvenciák az előzetesen vártnál alacsonyabb variabilitást eredményeztek. Az 1806 bázispár hosszúságú illesztésben 1600 bázispár volt konzervatív, 139 nukleotidpozíció volt variábilis, ebből 43 parszimóniailag informatív. A fennmaradó 67 pozícióban gap-ek találhatóak. A 18S rDNS szekvenciavizsgálatok során a fajok rokonsági kapcsolatainak nagy része feloldatlan maradt, amiből leszűrhető, hogy a 18S rDNS nem elégséges egyedül a családon belül a nemek illetőleg a fajok közötti viszonyok feltárására. Ezt a megfigyelést tovább erősítik a filogenetikai fákon látható mérsékelt bootstrap értékek is, ami nyilvánvaló következménye a tapasztalt alacsony variabilitásnak. Az egymásra nagymértékben hasonlító főként *Allolobophora*, *Aporrectodea* és *Dendrobaena* (*A. chlorotica*, *A. molleri*, *A. nematogena*, *A. leoni*, *Ap. sineporis*, *Ap. handlirschi*, *Ap. caliginosa*, *Ap. longa*, *Ap. georgii*, *Ap. limicola*, *D. octaedra*, *D. clujensis*, *D. alpina*, *D. auriculifera*, *D. attemsii*, *D. ganglbaueri*, *C. rebelii*, *H. putricola*, *P. tuberculatus*, *B. sp. nov.*) fajok nem kerültek fel a 18S rDNS fára a könnyebb áttekinthetőség végett, ezek filogenetikai pozíciója teljes mértékben feloldhatatlan a 18S rDNS szekvenciák által. Mindazonáltal a fajok egy kisebb részéről korlátozott mértékben levonható néhány érdekes következtetés a 18S rDNS szekvenciák segítségével is (10. ábra). Az egyes filogenetikai algoritmusok hasonló

topológiájú fákat eredményeztek, csupán a bazális elhelyezkedésű elágazásokban voltak eltérések. A ML által generált fa csupán annyiban tért el, hogy az *Allolobophora-Cernosvitovia* csoporton belül az *A. robusta* és az *A. mehadiensis* egymás testvércsoportjai, továbbá az *A. hrabei* található a klád bazális elágazásában.



10. ábra: 18S rDNS filogenetikai fa NJ algoritmussal generálva.

Az elágazásokban a NJ és a ML bootstrap értékek fel vannak tüntetve. -: Nem támogatott elágazások.

Az NJ és ML filogenetikai algoritmusokkal elvégzett vizsgálat viszonylag magas bootstrap értékek mellett monofiletikusnak mutatta az *Eisenia* genuszt. Az észak-amerikai *Bimastos palustris*, továbbá a *Dendrodriilus rubidus* és *Dd. subrudicundus* és az *Allolobophoridella eiseni* egy kládot alkot, tőlük bazálisán helyezkedik el a szintén észak-amerikai *B. tumidus*. Ezzel szemben a közel-keleti *B. syriacus* elkülönült pozíciót foglal el, és a *Dendrobaena paukiana*-val csoportosult. A *D. attamsi* és a *D. rhodopensis* magas bootstrap mellett egymás testvérfajai. A *Cernosvitovia opisthocystis* az *Allolobophora* fajokkal került egy

csoportba alacsony bootstrap mellett. Az egyedi morfológia tulajdonságokkal rendelkező *Dendrobaena cognettii* bazális helyzetben található a filogenetikai fán a külcsoport mellett.

Értékelés

Az *Eisenia* fajok monofiletikus kládba tömörülése morfológiai szemszögből nézve nem volt egyértelmű, mivel az *E. fetida* esetében tollas, míg az *E. spelaea* és az *E. lucens* esetében nyalábos szerkezetű hosszanti izomzat a jellemző. Pop (1941), valamint Csuzdi és Zicsi (2003) szerint az izomzat típusa fontos paramétere egy genusz monofiliájának, ám úgy tűnik, ezt az állítást gyengíti a nukleotidszekvenciák elemzése. Az *Eisenia* fajok monofiletikus voltát a 16S rDNS és COI szekvenciák is megerősíteni látszanak (Pop és mtsai, 2005; Briones és mtsai, 2009).

Szembetűnő a *Bimastos* nembe tartozó fajok szétválása. A Közel-keleti származású faj (*B. syriacus*) az észak-amerikaiaktól külön ágon helyezkedik el a mediterrán *Dendrobaena papukiana* Mršić, 1988 mellett. Az észak-amerikai fajokat a típusfaj *B. palustris*, továbbá a *B. tumidus* (Eisen, 1874) képviseli. Ez utóbbiak minden esetben távol helyezkednek el a közel-keleti *B. syriacus*-tól. Ez ellentétes Zicsi (1981) *Bimastos* genuszról alkotott koncepciójával, amely az észak-amerikai fajokat egyesítette az anatóliai körkörös nyereggel rendelkező *Dendrobaena* fajokkal. Ebből következőleg ésszerűnek tűnik az anatóliai fajokat az Omodeo és Rota (1989) által javasolt *Healyella* genuszba sorolni. Ezzel szemben az észak-amerikai *Bimastos*-ok a peregrin *Dendrodrilus* fajokkal illetve az *Allolobophoridella eiseni*-vel alkotnak közös monofiliiumot. Az *Ai. eiseni* régóta okoz fejtörést a taxonómusoknak, Pop (1941) az *Eisenia* nembe helyezte, majd Perel (1976a,b) az *Allolobophora*-k közé tette, rámutatva, hogy U-alakú előre irányuló húgyhólyagokkal rendelkeznek. Később Mršić (1990) a pigmentáció, a mézmirigyek pozíciója és a nefridiális hólyagok alakja alapján a Perel (1976) által szintén az *Allolobophora* genuszba sorolt *B. parvus*-szal együtt az újonnan felállított *Allolobophoridella* alnembe különítette el. Azonban, a *B. parvus* (Eisen, 1874) számos a *Bimastos*-ra jellemző bélyeggel jellemezhető, mint például a tollas izomzat (az *A. eiseni* hosszanti izomzata nyalábos) és a gyűrű alakú klitellum. Pop és mtsai. (2007) 16S rDNS-en alapuló szekvenciaanalízisében az *Ai. eiseni* szintén az észak-amerikai *Bimastos* fajok testvércsoportjaként tűnik fel, rámutatva, hogyha nem is egyazon fajról van szó, de a rokonság mindenképp feltételezhető. Mindezek alapján számos érv szól az *Ai. eiseni* a *Bimastos* genuszba történő sorolása mellett az eltérő morfológiai jellegek ellenére is, mint

például a longitudinális izomzat szerkezete, ami az *Eisenia* nem esetében szintén heterogén volt.

Az *Allolobophora hrabei* (Černosvitov, 1935), *A. mehadiensis*, *A. robusta*, *A. sturanyi* Rosa, 1895 és a *Cernosvitovia opisthocystis* közepes vagy alacsony bootstrap értékek mellett egy kládba került. Valamennyi faj úgynevezett dáciai elterjedésű, kivéve az *A. hrabei*-t, amelynek előfordulása meglehetősen szűk helyre korlátozódik, Magyarország, Ausztria és Szlovákia határ régióján. Az *A. robusta* és az *A. mehadiensis* egymásnak közeli rokonai, Mršić (1991) a *Serbiona* nembe egyesítette őket más hasonló morfológiájú fajokkal együtt, míg az *A. sturanyi*-t a szintén újonnan alkotott *Karpatodinariona* nembe helyezte. Mindkét genusz korábban az *Allolobophora* alnemként lett leírva (Mršić és Sapkarev, 1988). A *Serbiona* és a *Karpatodinariona* az eredeti leírás szerint sok bélyegben emlékeztetnek egymásra, így például a nyalábos hosszanti izomzat, a horog alakú nefridiális hólyagok, a mészmirigyek általában a 10. szelvényben található laterális divertikulumokkal, az ondótartók a *c* és *d* sertesorok között nyílnak a külvilágra, továbbá az *Allolobophora*-kra általánosságban jellemző szűk serteállítás, valamint a vörös pigmentek hiánya. Megkülönböztető bélyegeik közé tartoznak, hogy a *Serbiona* fajok klitelluma és a sertülési dudorok a 40. szelvény mögött helyezkednek el. Pop és mtsai (2005) mitokondriális gének vizsgálatával ugyanezt a mintázatot kapták, azzal a különbséggel, hogy náluk az *A. sturanyi* testvérfaja, az *A. dacica* szerepelt. A *Cernosvitovia opisthocystis* az ő esetükben is ezek közé a fajok közé került. A *Cernosvitovia* nem Zicsi érvényben lévő genuszkonceptiója alapján abban tér el az *Allolobophora* nemtől, hogy a hímivarnyílások hátratólnak a nyereg közelébe. A bélyeg homoplázikus voltának lehetőségére már Mršić (1991) is felhívta a figyelmet, s Perel (1997) is elutasította a hímivarnyílások taxonómiai karakterként való alkalmazását, mivel egyes esetekben fajokon belül is található variációt, sőt aszimmetrikus hímivarnyílás elhelyezkedéssel rendelkező példányok is előkerültek. Az *Allolobophora hrabei* némileg elüt morfológiailag a többi fajtól, hiszen tollas izomzattal illetve kétkarú húgyhólyaggal rendelkezik. Ezt az eltérést mutatja a filogenetikai fán elfoglalt helyzete is (hosszú branch, alacsony bootstrap érték).

Észrevehető, hogy a *Dendrobaena cognettii* bazális pozíciót foglal el közvetlenül a kulcsoport mellett. Ez nem meglepő annak ismeretében, hogy a *D. cognettii* meglehetősen egyedi bélyegekkal rendelkezik, így például a *Dendrobaena* fajok többségétől teljesen eltér 2 karral rendelkező nefridiális hólyagja (feltehetően ez a pleziomorf állapot mivel ez figyelhető meg a kulcsoportként használható Hormogastridae családban is) és hiányzó spermatakéja miatt, ellenben a *Dendrobaena* nemre jellemző vörös pigmentációja és tágan álló sertéi vannak.

6.1.2 Az 5,8S rDNS-ITS2 szakasz vizsgálata

Eredmények

Az 5,8S rDNS-ITS2 régió szekenciavizsgálata nagyobb variabilitást mutatott a fajok között, mint amit a 18S rDNS esetében tapasztalhattunk. A 694 bázispár hosszúságú illesztésben 258 bázispár volt konzervatív, amelyek főként az 5,8S rDNS szakaszra koncentráálódtak, 387 nukleotidpozíció volt variábilis, ebből 244 parszimóniálisan informatív, valamint 49 pozícióban gap-ek voltak. A rosszul illesztett pozíciók kiszűrése után (GBLOCK) az illesztés 462 pozícióból állt, amelyből 209 volt konzervatív és 253 variábilis. A lókuszt nagyobb variabilitása tükröződik a filogenetikai fákban is, észrevehető, hogy az egyes ágak statisztikai támogatottsága jóval magasabb, mint amit a 18S rDNS esetében láthattunk, főleg a terminálisabb helyzetű elágazásoknál látható nagymértékű javulás. Az egyes algoritmusokkal végzett analízis nem minden esetben eredményezett ugyanazokat az elágazásokat, a ML eredményeit a 11. ábra szemlélteti, emellett feltüntettem az összes filogenetikai algoritmussal támogatott csomópontokat.

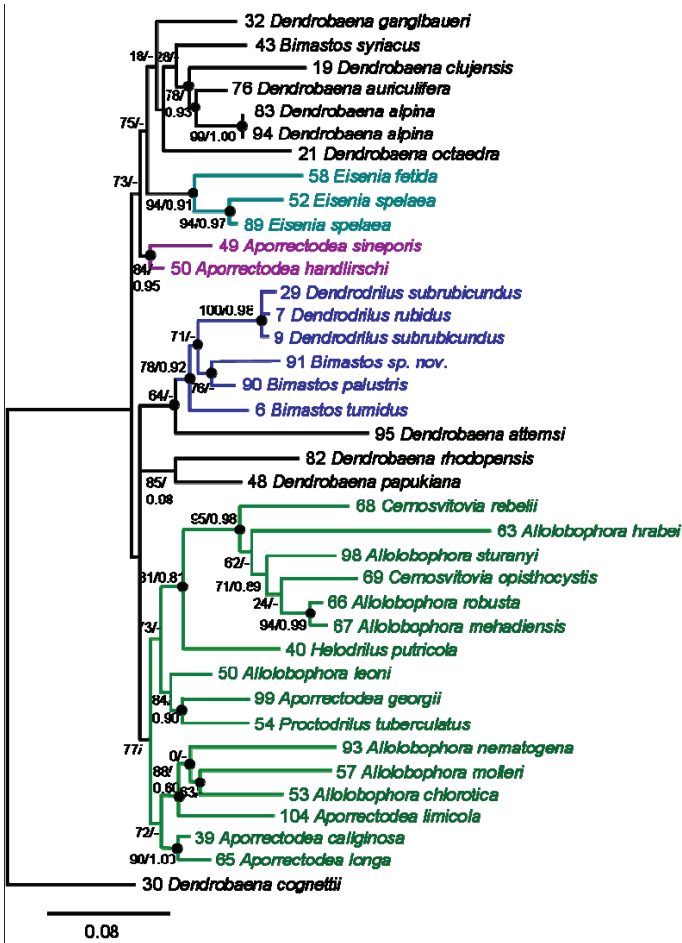
A ML filogenetikai fán megfigyelhető ugyanazoknak a fajoknak a csoportosulása, amelyeket már a 18S rDNS esetében is konstatálhattunk. Így például az *Eisenia* nembe sorolt fajok magas támogatottság mellett képeztek különálló kládot. Szintén monofiletikus csoportot alkot a *B. palustris*, *B. tumidus*, *B. sp. nov.*, *Dd. rubidus* és *Dd. subrubicundus*. Az *Allolobophoridella eiseni* esetében nem sikerült az r5,8S-ITS2 szakaszból PCR-terméket nyerni, így a 18S rDNS alapján elfoglalt filogenetikai helyzetét nem tudjuk megerősíteni. Érdekes módon az előbbiekkal rokonságot nem mutató *D. attemsii* bazílián helyezkedik ehhez a csoporthoz képest. A többi *Dendrobaena* faj két kládba tömörült, az első típusfaj *D. octaedra*-t is magába foglalja, továbbá itt található még a *D. clujensis*, *D. auriculifera*, *D. alpina*, *D. ganglbaueri*, illetve a *B. syriacus*. A balkáni *D. papukiana* és *D. rhodopensis* magas támogatottság mellett alkotnak egy csoportot, ugyanakkor a klád pontos helyzete feloldatlan marad. Az *Ap. sineporis* és az *Ap. handlirschi* kivételével az összes *Allolobophora*, *Aporrectodea* egy kládba került, hozzájuk csatlakozik még, a *C. opisthocystis*, *C. rebelii*, *H. putricola* és *P. tuberculatus*. A csoporton belül megfigyelhetjük az *A. mehadiensis*, *A. robusta*, *A. sturanyi*, *A. hrabei*, *C. opisthocystis* kládját, amit a már a 18S rDNS esetében is láthattunk, kiegészülve a *C. rebelii*-vel. Magas a támogatottsága az *Ap. caliginosa* és az *Ap. longa* kládnak, valamint az *A. chlorotica*, *A. mollerii*, *A. nematogena* és az *Ap. limicola*

csoportosul még egy kládba. Meg kell jegyezni, hogy sem a NJ, sem a BI nem támogatta az *Allolobophora-Aporretodea* összefoglaló kládot. A kládon belüli csoportok a NJ és a BI szerint megegyeznek azzal, amit a ML esetében láthatunk, így a *Cernovitovia* beékelődik az *Allolobophora* fajok közé, az *A. chlorotica*, *A. molleri*, *A. nematogena* és *Ap. limicola* közös csoportot alkot, illetve hozzájuk kapcsolódik az *Ap. caliginosa* és az *Ap. longa*, továbbá az *A. leoni*, *Ap. georgii* és *P. tuberculatus* kapcsolata is kimutatható. Fontos különbség még, hogy az NJ a *H. putricola*-t bazális helyzetbe sorolta, a külcsoporthoz, illetve az *Ap. caliginosa* és az *Ap. longa* az *Ap. handlirschi* és *Ap. sineporis* testvércsoportjaként tűnik fel. A *Dendrobaena* fajok elhelyezkedésében tapasztalhatóak még különbségek a különböző algoritmusok által generált filogramokban, mégpedig a NJ fán a *D. papukiana* nem a *D. rhodopensis* mellé került, hanem önálló pozíciót foglalt el, míg a *D. rhodopensis* a *Dendrobaena*-kat tömörítő kládba került (a *D. octaedra*, *D. alpina*, *D. clujensis*, *D. auriculifera* mellé). A BI két csoportra osztotta a *Dendrobaena* fajokat, az egyikben található a *D. papukiana*, *D. rhodopensis* és a *D. attemsii*, a másodikban pedig a *D. clujensis*, *D. auriculifera* és *D. alpina*, ez a két csoport egy közös kládot formált magas PP érték (0.91) mellett. A *D. octaedra* és a *D. ganglbaueri* helyzete feloldatlan maradt, továbbá a *D. attemsii* nem került a *Bimastos* klád mellé bazálisan, hanem tisztázatlan maradt a pozíciója.

Értékelés

Az *Eisenia* genusz monofiletikusságát a variábilisabb 5,8S rDNS-ITS2 szakasz megerősíti, így a hosszanti izomzat szerkezetében lévő különbségek ellenére ezek a fajok egy genuszba tartoznak. Az *Eisenia* fajokkal nagy morfológiai hasonlóságot mutatnak az általunk nem vizsgált úgynevezett „veneta” csoportba tartozó *Dendrobaena* fajok (pl. *D. veneta*, *D. hortensis*). Az *Eisenia* és a *Dendrobaena* nemek elkülönítése régóta problematikus. Kvavadze (1985) a két nem szoros rokonságát propagálta az izomzat alapján, azonban az *Eisenia* nemben egyaránt megfigyelhető a nyalábos, tollas, illetve az átmeneti típus is (Csuzdi és Zicsi, 2003). A nefridiális hólyagok alakja alapján a *D. veneta* és *D. hortensis* fajok igen hasonlóak az *Eisenia* genusz fajaihoz, azonban eltérnek tőlük a sertéállásban. Amíg az *Eisenia* fajok szűk sertéállást mutatnak a *D. veneta* páratlan a *D. hortensis* tágan páros sertékkal rendelkezik. Ugyanakkor a *Dendrobaena* genuszba sorolás sem tűnik kielégítő megoldásnak, hiszen ezektől a fajoktól is számos morfológiai bélyegben különbözik, mint pl. mézmirigyek ill. nyalábos izomzat. Kvavadze (1985) a kaukázusi *Eisenia grandis* fajcsoport számára a *Dendrodriloides* nemet állította fel, lehet, hogy a *veneta* félék ezzel mutatnak

rokonságot. Briones és mtsai (2009) molekuláris vizsgálatai megerősítették, hogy a *D. veneta* és a *D. hortensis* nem tartozik az *Eisenia* fajok közé.



11. ábra: A Lumbricidae család filogenetikája az 5,8S rDNS-ITS2 szakasz alapján ML algoritmussal. A csomópontokban a ML aLRT értékei és a BI posterior probabilities értékei. -: nem támogatott elágazások. A fekete körök az NJ által támogatott elágazásokat jelentik (bootstrap ≥ 50).

A 3 észak-amerikai *Bimastos* faj, a típusfaj *B. palustris*, a *B. tumidus* és egy még leíratlan faj, a *B. sp. nov.*, továbbá a két *Dendrodrilus* (régebbi forrásokban *Dendrobaena*), a *Dd. rubidus* (Savigny, 1826) és a *Dd. subrubicundus* (Eisen, 1873) közös csoportot formált, hasonlóan a 18S rDNS esetében látottaknál. A 3 *Bimastos* faj egy helyre csoportosulása várható volt, ám a *Dendrodrilus*-ok helyzete magyarázatot igényel. Valamennyi fajnak U-alakú „proclinate” nefridiális hólyagja van, emellett a 10. szelvényben mészmirigy divertikulumokat találhatunk. Csak a sereteállásban és a hosszanti izomzat struktúrájában vehetünk észre különbségeket. A *Bimastos* fajok szűk sereteállásúak és tollas szerkezetű izomzattal rendelkeznek, míg a *Dendrodrilus* fajok tágan páros sereteállásúak, a hosszanti izomzat pedig átmeneti struktúrát mutat. Észre kell venni, hogy a *Bimastos* nem a *Dendrodrilus* fajok nélkül parafiletikusnak tűnik. További érdekesség, hogy míg a 3 szerepeltetett *Bimastos* faj nearktikus elterjedésű, addig a *Dendrodrilus*-okat eredendően palearktikus fajoknak tartják, noha mára az egész világon megtalálhatóak a széthurcolás miatt, így nincs kizárva hogy eredetileg ezek is észak-amerikai elterjedésűek voltak.

A közel-keleti elterjedésű *B. syriacus* (Rosa, 1893) ezzel szemben az észak-amerikai fajoktól teljesen más pozícióban helyezkedik el, a *Dendrobaena*-k közé ékelődve. A faj Zicsi (1981) revíziója alapján került a *Bimastos* genuszba az *Allolobophora* nemből, amit főképpen a gyűrű alakú clitellum hasonlóságára alapozott, ám biogeográfiai szempontból problémássá tette az eredendően észak-amerikai fajokat felölelő genuszt. Omodeo és Rota (1989) új nemet (*Healyella*) hozott létre törökországi vizsgálataik eredményeképpen, aminek típusfaja a *B. syriacus* lett. Revíziójukban kevésbé tárgyalták a *Bimastos*-tól elütő bélyegeket, így az új genusz kevésbé vert gyökeret a használatban. Mindazonáltal két fontos különbséget ki lehet emelni, mégpedig hogy a *Bimastos* szűk sereteállású, és előre hajló U alakú nefridiális hólyagja van, ezzel szemben a *Healyella* tágan páros sereteállású és egyszerű kolbász alakú hólyaggal rendelkezik.

További vita tárgya, hogy a két *Dendrodrilus* taxon fajnak vagy alfajnak vagy csak parthenogenetikusan formának tekinthető-e. Bouché (1972) eltérő morfológiájuk (nyereg hossza, tubercula pubertatis) és különböző ökológiai preferenciájuk okán külön fajként kezeli őket. Ezzel szemben Gates (1975) szerint egyetlen faj alfajairól van szó, ezt az álláspontot számos későbbi szerző is követi (Zicsi, 1982; Mršić, 1991; Csuzdi és Zicsi, 2003). Megemlítendő, hogy létezik még egy harmadik alfaj a *Dd. rubidus tenuis* (noha vizsgálatainkból kimaradt). Csuzdi és Zicsi (2003) megkérdőjelezi a 3 alfaj validitását, mivel parthenogenetikusan szaporodó széles elterjedésű poliploid fajokról van szó. A *Dd. rubidus tenuis*-t egyenesen a nominális alfaj parthenogenetikusan változataként tartják számon. Sims és

Gerard (1999) rámutat, hogy a különböző kromoszómaszámok egybeesnek a különböző alfajokkal, így a *Dd. rubidus rubidus* 34, a *Dd. rubidus subrubicundus* 68, a *Dd. rubidus tenuis* pedig 48 kromoszómával rendelkezik (brit szigetekre vonatkozó adatok), továbbá ugyanazon alfajok más földrajzi lelőhelyen eltérő kromoszómaszámúak lehetnek. Vizsgálatunkban két *Dd. rubidus subrubicundus* és egy *Dd. rubidus rubidus* szerepelt, ezek a filogenetikai fákon keverten helyezkednek el, vagyis elképzelhetővé teszi, hogy indokolatlan az alfaji rang használata. Természetesen ennek az állításnak az igazolásához számos, különböző gyűjtőhelyről származó párhuzamos minta vizsgálata lenne szükséges.

Az *Allolobophora* fajok egy része (*A. robusta*, *A. mehadiensis*, *A. hrabei*, *A. sturanyi*) jól elkülönülő kládba tömörült, és ahogy a 18S rDNS esetében megfigyelhető volt, a *C. opisthocystis* itt is beékelődött közéjük a *C. rebelii*-vel együtt. A *Cernosvitovia* nemet Omodeo (1956) állította fel az *Allolobophora* alnemeként, majd később Zicsi (1981) választotta le az *Allolobophora* nemtől, amit a hímivarnyílások hátratólódásával indokolt, szemben az *Allolobophora* fajokkal, amelyeknél ezek mindig a 15. szelvényen találhatóak. Ugyanez a karakter játszott közre a *Fitzingeria* Zicsi, 1978 *Dendrobaena*-tól való elkülönítésekor (Zicsi, 1978), valamint az *Octodriloides* kiemelésekor az *Octodrilus*-ból (Zicsi, 1986). Pop és mtsai. (2008) 16S rDNS-t és COI-t felhasználva megállapították, hogy az *Octodriloides* fajok szétszóródnak az *Octodrilus*-ok között, nem alkotnak monofilitikus kládot, továbbá valószínűsítik, hogy a hímivarnyílásoknak a 15. szelvény mögé tolódása csupán homoplázia, amely nem alkalmas genuszok szeparálására. Ezzel összhangban áll, amit a *Cernosvitovia*-k esetében láthatunk, hiszen itt is azt tapasztaljuk, hogy a hímivarnyílások pozíciója nem jelöl ki számukra különálló helyet, hanem az *Allolobophora* fajok közé vegyülnek. Ebben a csoportban is megfigyelhető, amit az *Eisenia* fajok esetében láthattunk, hogy a nyálábos és a tollas hosszanti izomzatú fajok nem különülnek el, hiszen az *A. hrabei* tollas izomzattal rendelkezik szemben a kládban található többi fajjal (2. táblázat).

A *Helodrilus putricola* Bouché, 1972 pozíciója az *Allolobophora*-k mellett szintén indokolható. Az *Allolobophora* Michaelsen (1900) rendszerében még a *Helodrilus* alneme volt. Pop (1941) revíziójában már mellőzte ezt a nemet, az ide tartozó fajokat a szűk serteállítás és a pigmentek hiánya alapján jellemzett *Allolobophora*-ba helyezte, majd Omodeo (1956) újra használatba helyezte a genuszt. A *Helodrilus* nem egyik fontos jellemzője, hogy a nefridiális hólyagok hiányoznak, ami megmagyarázza a kládban elfoglalt bazális pozíciójukat. Mindamellettt közös bélyegek is akadnak, amelyek összekapcsolják az *Allolobophora*-val és a *Cernosvitovia*-val, így a már említett szűk serteállítás, az ondótartók a *c* és *d* sertesorok között nyílnak, valamint 10. szelvényben lévő laterális divertikulumokkal rendelkező mészmirigyek.

2. táblázat: A vizsgált *Allolobophora*, *Aporrectodea*, *Cernosvitovia*, *Helodrilus* és *Proctodrilus* fajok legfontosabb morfológiai bélyegei

Fajnév	Nyereg	Serdülési dudorok	Ondóhólyag	Ondótartó	Húgyhólyag	Izomzat
<i>A. chlorotica</i> (Savigny, 1826)	29-37	31, 33, 35	9–12	8/9–10/11 d	U, előre	nyalábos
<i>A. hrabei</i> (Černosvitov, 1935)	29, 30-57, 58, 60	49–53, 54	11, 12	9/10, 10/11 cd	kétkarú	tollas
<i>A. leoni</i> Michaelsen, 1891	25, 26-34	30, 32	11, 12	9/10, 10/11 cd	J, előre + zsák	nyalábos
<i>A. molleri</i> Rosa, 1889	47, 48, 49– 57, 58, 59	50–57	9–12	7/8–8/9 (10/11) d	U alakú hátra	nyalábos
<i>A. mehadiensis</i> Rosa, 1895	35, 36-47, 48	42–47	9–12	9/10, 10/11 cd	U alakú hátra	nyalábos
<i>A. nematogena</i> Rosa, 1903	25, 26-33, 34	29, 30–32, 33	11, 12	9/10, 10/11 cd	J, előre + zsák	nyalábos
<i>A. robusta</i> Rosa, 1895	36-40–58-64	50.51–59-61	9–12	10/11, (11/12) 12/13 cd	U alakú hátra	nyalábos
<i>A. sturanyi</i> Rosa, 1895	28–36	28–36	11, 12	9/10, 10/11, 11/12 12/13 cd	horog alakú	nyalábos
<i>Ap. caliginosa</i> (Savigny, 1826)	25, 26, 29– 34, 35	31–33	9–12	9/10, 10/11 cd	J, hátra	tollas
<i>Ap. georgii</i> (Michaelsen, 1890)	28, 29–35	31, 33	9–12	9/10, 10/11 cd	J, hátra	tollas
<i>Ap. handlirschi</i> (Rosa, 1897)	26, 27–32, 33	½ 28, 28–½ 32	9, 11, 12	9/10, 10/11 cd	J, hátra	tollas
<i>Ap. limicola</i> Michaelsen, 1890	29–35	33-34	9–12	9/10, 10/11 cd	J, hátra	
<i>Ap. longa</i> Ude, 1885	27, 28–35	32–34	9–12	9/10, 10/11 cd	J, hátra	tollas
<i>Ap. sineporis</i> (Omodeo, 1952)	24, 25–30, 31	27–29	9, 11, 12	9/10, 10/11 cd	J, hátra	tollas
<i>C. opisthocyctis</i> (Rosa, 1895)	24, 25-37	25-37	11,12	13/14-18/19 vagy 19/20 cd	horog alakú	N. D.
<i>C. rebelii</i> (Rosa, 1897)	½ 24, 25–31, 32, ½ 33	25, ½ 25, 26, 27–31, 32	9–12	9/10, 10/11 cd	horog alakú	nyalábos
<i>H. putricola</i> Bouché, 1972	½ 23–½ 30	24–28	9–12	9/10, 10/11 cd	hiányzik	nyalábos
<i>P. tuberculatus</i> (Černosvitov, 1935)	25, (26)–33	½ 30, ½ 31– ½ 31, ½ 32	11,12	9/10, 10/11 cd	hiányzik	nyalábos

A *Proctodrilus* nemet Zicsi (1985) írta le, elkülönítésüket az *Allolobophora* nemtől a nefridiális hólyagok hiánya, valamint az enteronefrikus kiválasztórendszer indokolta. A szekvenciavizsgálatok nem igazolják ezt a különállást, hanem beékelődve találjuk az

Allolobophora kládba, az *A. leoni* Michaelsen, 1891 és az *Ap. georgii* (Michaelsen, 1890) mellett. E két fajjal sok hasonló tulajdonságot mutat így például a serteállás, hosszanti izomzat típusa, receptaculum seminis helyzete.

Az *Allolobophora* nem típusfaja az *A. chlorotica* (Savigny, 1826) az *A. molleri* Rosa, 1889-vel, és az *A. nematogena* Rosa, 1903-val, valamint az *Aporrectodea limicola* Michaelsen, 1890-val képez közös kládot, mellettük testvércsoportként az *Aporrectodea longa* Ude, 1885 és az *Ap. caligonosa* (Savigny, 1826) fedezhető fel. Ez utóbbi kettő egymásnak szoros rokonai, morfológiai bélyegekben meglehetősen kevés eltérés mutatkozik a két faj között (a tubercula pubertatis helyzete).

A fent tárgyalt *Allolobophora* és *Aporrectodea* fajok (továbbá *Cernosvitovia*, *Helodrilus* és *Proctodrilus*) az *Ap. handlirschi* és az *Ap. sineporis* kivételével monfiletikus kládot alkottak az ML vizsgálatban, azonban sem az NJ, sem a BI ezt nem támogatta, emiatt csak fenntartással kezelhető. Meg kell azonban jegyezni, hogy ez a csoport megfelel Pop (1941) *Allolobophora*-król alkotott genuszkocepciójának, amely a pigmentáció hiánya, illetve a szűk serteállás szerint definiálta a genuszba tartozó fajokat. Ezen felül még egy fontos közös karakter megfigyelhető ezeknél a fajoknál, a mészmirigyek a 10. szelvényben laterális divertikulumokkal rendelkeznek.

Az *Aporrectodea handlirschi* (Rosa, 1897) és az *Ap. sineporis* (Omodeo, 1952) testvérfajoknak számítanak, így nem meglepő, hogy egymás mellett találhatóak. Közös jellemzőjük, hogy mindkét faj tartalmaz porfirin alapú vörös pigmenteket (szemben a többi vizsgált *Aporrectodea* fajjal). Omodeo (1956) *Eiseniona* néven létrehozott egy genuszt, amelynek típusfaja az *Ap. handlirschi* lett, továbbá más fajok mellett az *Ap. sineporis*-t is ide sorolta.

A *Dendrobaena* fajok meglehetősen nagy széttagozottságot mutatnak, noha az egymással sok alakítani tulajdonságban megegyező fajok egyazon ágakra kerültek. Így például a *D. auriculifera* Zicsi, 1969, *D. alpina* és *D. clujensis*, amelyek morfológiailag szoros kapcsolatban állnak egymással (3. táblázat), továbbá kárpát-medencei elterjedésűek, illetve a *D. papukiana* és *D. rhodpensis* (Černosvitov, 1937) szintén számos hasonló tulajdonsággal bírnak, mindkét faj a Balkánon elterjedt. Valamennyi faj a *D. ganglbaueri* és a *D. cognettii* kivételével az úgynevezett „*octaedra*” csoportba tartoznak, vagyis morfológiailag egybetartoznak. Emellett az egyes algoritmusok bizonyos fajok esetében (*D. attemsi*, *D. octaedra*, *D. papukiana*, *D. ganglbaueri*) különböző topológiát adtak, emiatt értékelésükkel óvatosan kell bánni.

6.1.3 A 18S rDNA és az 5,8S rDNA-ITS2 szakaszok közös értékelése

Eredmények

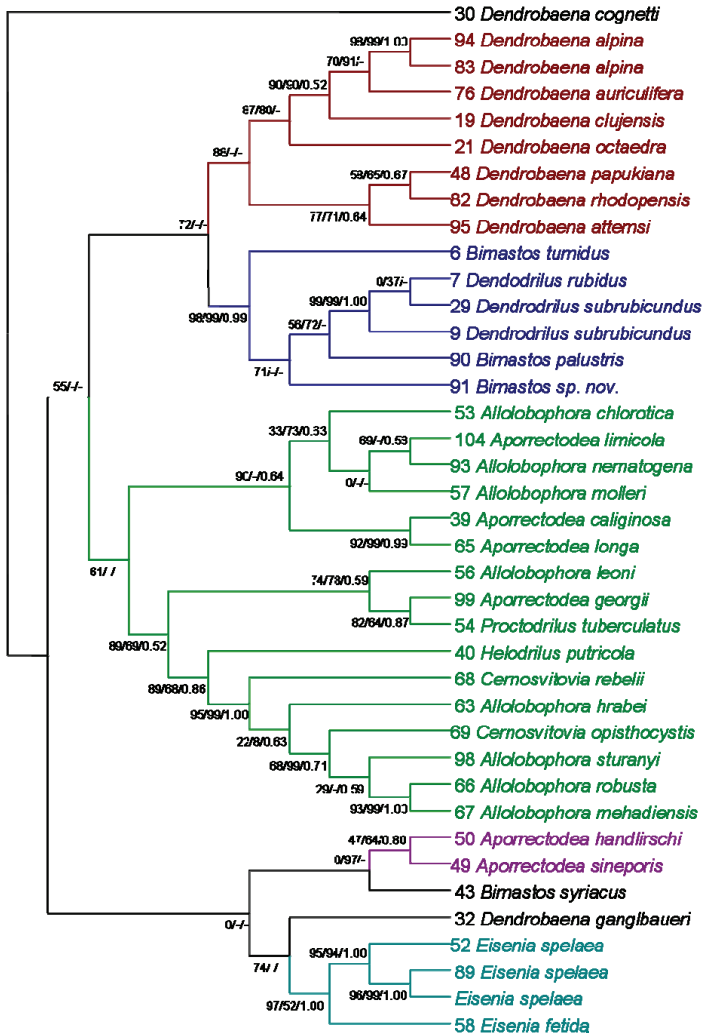
A 18S rDNA és az 5,8S rDNA-ITS2 szakaszok alapján készített közös fán (12. ábra) megfigyelhetőek a fentebb tárgyalt csoportok, ugyanakkor észrevehetőek további kládok, amelyek morfológiai szempontból jól értelmezhetőek. Észrevehető, hogy taxonómiai értelemben a fenti lókuszok közös filogenetikai fája hordozza a legtöbb releváns információt. Az egyes filogenetikai algoritmusok nem minden esetben eredményezték ugyanazokat az elágazásokat, főleg a bazális elágazásokban mutatkoztak különbségek. Általánosságban a ML által számolt fa hordozta a legtöbb filogenetikailag releváns információt. A NJ sok esetben alacsonyabb bootstrap értékeket produkált, illetve bizonyos elágazásokat nem támogatott, a BI nem oldotta fel a bazális elágazásokat. A ML által kalkulált filogenetikai fán feltüntettem a NJ és a BI algoritmusok által számolt bootstrap és posterior probabilities értékeket (ahol megegyeztek az elágazások).

Itt is monofiletikus csoportot alkotnak az *Eisenia* fajok, ahogy az a 18S rDNA és az 5,8S rDNA-ITS2 régió önálló vizsgálatoknál látható volt, tehát valószínűleg ténylegesen egy valid genuszról beszélhetünk az esetükben, ezt a kládot az összes algoritmus megbízhatóan támogatta. Ugyanígy, hasonlóan az eddigiekhez, az összes filogenetikai módszer szerint az észak-amerikai *Bimastos*-ok és a *Dendrodrilus* fajok is együtt helyezkednek el, míg a közeli *B. syriacus*-t nem foglalja magába a klád. Az *Allolobophora* és a belőle leválasztott *Aporrectodea* genusz számos faja egy közös nagy kládot alkot, aminek közepesen a támogatottsága, mindössze az *Aporrectodea sineporis* és az *Ap. handlirschi* található kívül ezen az elágazáson. Észrevehető itt is az *A. robusta*, *A. mehadiensis*, *A. sturanyi*, *A. hrabei*, *C. opisthocystis*, *C. rebelii* monofiletikus csoportja, amelyekhez bazálisan csatlakozik a *H. putricola*. Szintén közös kládot alkot az *A. chlorotica*, *A. molleri*, *A. nematogena* és az *Ap. limicola*, noha ennek a csoportnak meglehetősen alacsony a bootstrap-támogatottsága. Stabílnak látszik ebben az esetben is az *Ap. caliginosa* és az *Ap. longa* kapcsolata, továbbá megfigyelhető még az *A. leoni*, *Ap. georgii* és a *P. tuberculatus* csoportosulása a nagy „*Allolobophora*” kládon belül. Szemben az eddigiekkel a *Dendrobaena* fajok vizsgálata azt mutatja, hogy a vizsgált fajok többsége a típusfaj *D. octaedra*-val együtt egyetlen monofiletikus kládba tömörült magas támogatottság mellett (12. ábra), ez alól a *D. cognettii* és a *D. ganglbaueri* (Rosa, 1894) fajok képeznek kivételt. A NJ és a BI ebben az esetben sem

támogatta a nagy „*Allolobophora-Aporrectodea*” kládot (ellenben a kládon belül észrevehető 3 fő csoportot igen), továbbá a *Dendrobaena* fajok is két egymástól elkülönülő csoportban helyezkednek el, az ML esetében is megfigyelhető *D. attemsi*, *D. papukiana*, *D. rhodopensis*, illetve *D. octaedra*, *D. clujenssi*, *D. alpina*, *D. auriculifera* fajokat tömörítő kládokba. Ezen felül a a BI nem oldotta fel a *D. octaedra* helyzetét. A *D. ganglbaueri* minden esetben a többi *Dendrobaena* fajtól szeparált pozícióba került.

Értékelés

A két lókuszt közös vizsgálata hasonló eredményeket adott, mint az 5,8S rDNS-ITS2 régió önálló elemzése, egy igen fontos különbség látható, miszerint a *Dendrobaena* fajok a *D. cognettii*-től és *D. ganglbaueri*-től eltekintve egyetlen kládba sorolódtak, ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy ezt csak a ML támogatta, a NJ és a BI nem. A *Dendrobaena* fajok többségének egy monofiletikus csoportba rendeződése morfológiailag alátámasztható. Az ide tartozó fajok rendelkeznek a *Dendrobaena* nemre jellemző szünapomorfbélyegekkel: piros pigmentáció, tág sereteállás, kolbász alakú nefridiális hólyagok, mészmirigy kiöblösödések (3. táblázat). Megjegyzendő, hogy biogeográfiai szempontból is egységes a klád, hiszen kárpát-medencei és balkáni fajokat ölel fel. A kládon belül a fajok elhelyezkedésében szintén felfedezhető, hogy további taxonómiai, illetve biogeográfiai szempontok érvényesülnek, így például a *D. papukiana* és a *D. rhodopensis* egymásnak testvérfajai, mindkettő a Balkán földgiliszta faunájához tartozik. A *D. clujensis*, a *D. auriculifera* és a *D. alpina* morfológiailag nagyon hasonlító fajok, azonban eltérő elterjedéssel jellemezhetőek, a *D. clujensis* az Erdélyi Szigethegységben, illetve a Kárpátokban található meg, a *D. auriculifera* az Alpok faunájához tartozik, míg a *D. alpina* jóval szélesebb elterjedésű, azonban az Erdélyi Szigethegységben nem fordul elő. Ez utóbbi fajt korábban próbálták szinonimizálni a *D. clujensis*-szel (Perel 1979), azonban a szekvenciadataink ezt a feltevést nem igazolják, illetve a mitokondriális lókuszek sem (Csuzdi és mtsai, 2005; Pop és mtsai, 2010).



12. ábra: A Lumbricidae család filogenetikája maximum likelihood módszerrel (18S rDNS és 5,8S rDNS-ITS2 lókuszek). Feszített fa az elágazások jobb áttekinthetősége végett. Az elágazásokban a ML aLRT, NJ bootstrap és a BI posterior probabilitás értékek, találhatóak. -: Nem támogatott elágazások.

A kládon kívül maradó két faj közül a *D. cognettii* nemcsak a nemen belül, de az egész családon belül is meglehetősen egyedi bélyegekkkel bír, így vörös pigmentáció és tág serteállás jellemzi, ugyanakkor kétkarú nefridiális hólyagokkal rendelkezik, így nem meglepő, hogy a többi *Dendrobaena* fajtól távol találhatjuk (3. táblázat). A *D. ganglbaueri*-t hosszú ideig a *D. byblica* (Rosa, 1893)-val szinonimizálták, ami egy holomediterrán gyűjtőfaj (Csuzdi és Pavliček, 1999), mígnem Zicsi (1991) újra fel nem elevenítette a fajt a közép-európai példányokra alapozva. Kvavadze (1993) a *D. byblica* és rokon fajai számára felállított egy új genuszt *Omodeoia* néven elkülönítve az ide tartozó fajokat a klasszikus értelemben vett *Dendrobaena*-któl, ebbe a csoportba került a *D. ganglbaueri* is (noha akkor éppen a *D. byblica*-val volt szinonimizálva). A *D. ganglbaueri* az általános *Dendrobaena* tulajdonságoktól eltérő jegyei a klitellum, valamint a tubercula pubertatis előretolódott elhelyezkedése (3. táblázat), a mézsmirigy kiöblösödések hiánya, illetve a kicsiny, alig észrevehető himivarnyítás, így nem annyira meglepő, hogy a filogenetikai fán elkülönült a többi *Dendrobaena* fajtól.

3. táblázat: A vizsgált *Dendrobaena* fajok legfontosabb morfológiai bélyegei

Fajnév	Nyereg	Serdülési dudorok	Ondóhólyag	Ondótartó	Húgyhólyag	Izomzat
<i>D. alpina</i> (Rosa, 1884)	26, 27, 28–33, 34	29, 30–32, 1/2 32, 32	9, 11, 12 (9–12)	9/10, 10/11, 11/12 d	kolbász alakú	tollas
<i>D. attemsi</i> (Michaelsen, 1902)	28, 29–33, 34	30–32	9, 11, 12	9/10, 10/11 d	kolbász alakú	tollas
<i>D. auriculifera</i> Zicsi, 1969	1/2 25, 26–32, 1/2 33, 33	30–32	9–12	9/10, 10/11 c	kolbász alakú	tollas
<i>D. clujensis</i> Pop, 1938	27, 28–33	30–32, 1/n 33	9, 11, 12	9/10, 10/11 d	kolbász alakú	tollas
<i>D. cognettii</i> (Michaelsen, 1903)	32, 33–36, 37	—	11, 12	—	két karos	tollas
<i>D. ganglbaueri</i> (Rosa, 1894)	23, 24–29	25–27	9–12	9/10, 10/11 d	kolbász alakú	tollas
<i>D. octaedra</i> (Savigny, 1826)	28, 29–33, 34	31–33, 1/n 33	9, 11, 12 (9–12)	9/10, 10/11, 11/12 d	kolbász vagy piskóta alakú	tollas
<i>D. papukiana</i> Mršić, 1988	28–34	30–32	11, 12	9/10, 10/11 c	kolbász alakú	tollas
<i>D. rhodopensis</i> (Černosvitov, 1937)	1/2 27, 28–32, 1/2 33	29–31	9, 11, 12	9/10, 10/11 mD	kolbász alakú	tollas

6.1.4 A Lumbricidae családban alkalmazott fontosabb morfológiai bélyegek értékelése az eredmények tükrében

Érdeemes megvizsgálni, hogy azon morfológiai bélyegek megjelenése, amelyeket az elmúlt évtizedekben előszeretettel alkalmaznak a földigiliszták taxonómiájában, mennyire fednek át a szekvenciaanalízisből kapott kládokkal. Megállapítható például hogy a hosszanti izomzat struktúrája nem alkalmas a genuszok elkülönítésére, hiszen láthattuk az *Eisenia* fajok esetében, hogy a kétféle izomzat típusal rendelkező fajok monofiletikus csoportot képeznek, amit Briones és mtsai (2009) megfigyelései is megerősítenek. Hasonlóképpen a tollas izomzatú *Allolobophora hrabei* is beékelődik a nyalábos izomzattal bíró fajok közé. A *Dendrodrilus*-ok átmeneti típusú izomzattal rendelkeznek, míg a *Bimastos* fajok hosszanti izomzata tollas szerkezetű, mégis minden jel szerint közeli rokonai egymásnak. Megjegyzendő, hogy az *Allolobophoridella eiseni* izomzata nyalábos, ennek ellenére számos alaktani sajátosság utal a *Bimastos* fajokkal való rokonságára. Pop (1941) tévesen szinonimizálta ezt a fajt a feltehetően észak-amerikai származású, de Európába is behurcolt *B. parvus*-szal.

A serteállás meglehetősen jól egybeesik a kapott csoportokkal, így például szűk serteállás jellemző az *Allolobophora* kládba került fajokra, beleértve a közöttük szétszóródott *Aporrectodea* fajokat, illetve a *Cernosvitovia*, a *Helodrilus* és a *Proctodrilus* nemeket is. Szintén szűk serteállás jellemzi az *Eisenia* genuszt is. Ugyanakkor a tág serteállású *Dendrobaena* fajok szintén egységes csoportot képeznek. A tágan páros serteállású *Dendrodrilus*-ok valaha a *Dendrobaena* nembe tartoztak (Pop, 1941) mígnem Omodeo (1956) a *Dendrodrilus* alnemet állította fel számukra. Az alnemet később Perel (1976b) önálló genusz rangra emelte.

A pigmentáció meglétének illetve hiányának általában nagy jelentőséget tulajdonítanak a taxonómusok. Érdeemes megfigyelni, hogy az *Aporrectodea* fajok közül egyedül a vörös pigmentációval jellemezhető *Ap. sineporis* és *Ap. handlirschi* fajok maradtak ki az összes többi *Aporrectodea* fajt magába foglaló *Allolobophora* kládból, amelynek minden tagja pigment nélküli. Ezzel szemben a *Dendrobaena* és *Bimastos-Dendrodrilus* csoportokban erősen jelen vannak a porfirin alapú vörös pigmentek, sőt a két génszakasz szekvenciái alapján generált ML fán egymás testvércsoportjai. Molekuláris vizsgálatainkból úgy tűnik, hogy ez bélyeg meglehetősen stabil, jól használható a morfológiai taxonómiában.

A mészmirigyek szintén viszonylag stabil karakternek bizonyultak. A *Dendrobaena* s.l. fajokon belül a 10. szelvényben mészmirigy kiöblösődéssel rendelkező *Dendrodrilus* fajok

egyértelműen a hasonló mészmiriggyel rendelkező *Bimastos* fajokkal alkotnak egy kládot. A mészmirigy kiöblösödésekkel nem rendelkező *D. ganglbaueri* is jól elválik a többi *Dendrobaena*-tól.

Az ondóhólyagok száma igen nagy variabilitást mutat és az egyes karakterállapotok (9–12; 9, 11, 12 ill. 11, 12) egymással párhuzamosan feltűnnek szinte minden kládban, ezért Pop (1941) véleményével egyetértve megállapíthatjuk, hogy szupraspecifikus elkülönítésre nem alkalmazhatók.

A nefridiális hólyagok hiányát általában primitív bélyegként tartják számon (Perel, 1979; Mršić, 1991), ám Csuzdi és Zicsi (2003) felhívja rá a figyelmet, hogy a Lumbricidae család lehetséges külcsoportjai mind rendelkeznek nefridiális hólyagokkal, a *Hormogaster* nemben például visszafelé hajlott kétkaros hólyagokat találhatunk (Rota, 1993). A *Helodrilus* és *Proctodrilus* fajoknál hiányzanak a húgyhólyagok, mégis azt tapasztalhatjuk, hogy ezek a fajok a fejlett nefridiális hólyagokkal bíró *Allolobophora* és *Aporrectodea* fajok között tűnnek fel, ami alátámasztja Csuzdi és Zicsi (2003) kételyeit.

A nefridiális hólyagok alakja igen nagy változatosságot mutathat. Egyes szerzők fontos jelentőséget tulajdonítanak az entális kar pozíciójának, ami alapján a genuszokat kétféle osztják, ugyanakkor mások (Omodeo, 2000; Csuzdi és Zicsi, 2003) ennek fontosságát túlhangsúlyozottnak érzik. Az *Allolobophora* nembe sorolt fajok többnyire J vagy U alakú előre irányuló nefridiális hólyagokkal bírnak, ezzel szemben az *Aporrectodea*-knál hátrafelé irányuló J és U alakú húgyhólyagokat találhatunk, mégis azt láthatjuk, hogy az *Allolobophora* és az *Aporrectodea* fajok nem különülnek el egymástól élesen, ami gyengíti azt a feltételezést, hogy az entális kar orientációja kiemelt jelentőséggel bír.

Úgy tűnik, egyes bélyegek jóval kisebb taxonómiai jelentőséggel bírnak, mint azt korábban gyanították róluk. Ilyen például a hímivarnylás hátratulódása a 15. szelvény mögé, ami alapján több genuszt különítettek el, mint például a *Fitzingeria*-t a *Dendrobaena*-tól (Zicsi, 1978), a *Cernosvitovia*-t az *Allolobophora*-tól (Zicsi, 1981), vagy az *Octodriloides*-t az *Octodrilus*-tól (Zicsi, 1986). Az *Octodriloides* fajok esetében már bizonyítottan tűnik, hogy nem formálnak monofiletikus csoportot, hanem szétszóródnak az *Octodrilus* fajok között (Pop és mtsai, 2008). Ugyanezt tapasztalhatjuk a *Cernosvitovia*-k esetében is, hiszen ezek a fajok beékelődnek az *Allolobophora*-k közé. Mindezek fényében valószínűnek látszik, hogy ez a tulajdonság erősen homoplázikus és nem alkalmas genuszok szeparálására, amint arra már Mršić (1991) is felhívta a figyelmet.

6.2 Az Enchytraeidae család

Összesen 19 faj (2 *Bryodrilus*, 4 *Buchholzia*, 3 *Enchytronia*, 8 *Fridericia*, 2 *Mesenchytraeus*) 72 példányának teljes ITS régiójának nukleotidszekvenciáját határoztuk meg. A munka során nagy hangsúlyt fektettünk a problematikus *Fridericia* nemre, így a minták többsége ebből a genusból került elő. Az Enchytraeidae család fajainak ITS régiója átlagosan 950-1000 bp hosszúságú szekvenciákat eredményezett. A szekvenciák illesztése után a kapott illesztés 1121 bp hosszúságú volt, amelyek közül 281 konzervatív, 813 variábilis és 723 parszimóniailag informatív pozíció volt, a maradék 27 pozícióban gap-ek találhatóak. Az ITS1 (686 bp) és az ITS2 (275 bp) régiók egyaránt nagyfokú variabilitást mutattak, míg az 5.8S rDNS (160 bp) szakasz meglehetősen konzervatív volt (148 konzervatív és 12 variábilis pozíció). Az eltérő matematikai modellekkel generált filogenetikai fák az elágazások nagy részénél megegyező topológiát mutattak, emiatt a megegyező elágazásokban a NJ és a BI támogatottságát is feltüntettem. Az NJ esetében egyetlen különbség mutatkozott, hogy a *F. bulboides* a genuszon belül nem bazális helyet kapott, hanem a *F. semisetosa*, *F. schmelzi*, *F. aurita* és *F. maculatiformis* fajokkal került egy csoportba.

6.2.1 A *Bryodrilus*, *Buchholzia*, *Enchytronia*, és *Mesenchytraeus* genuszok vizsgálata

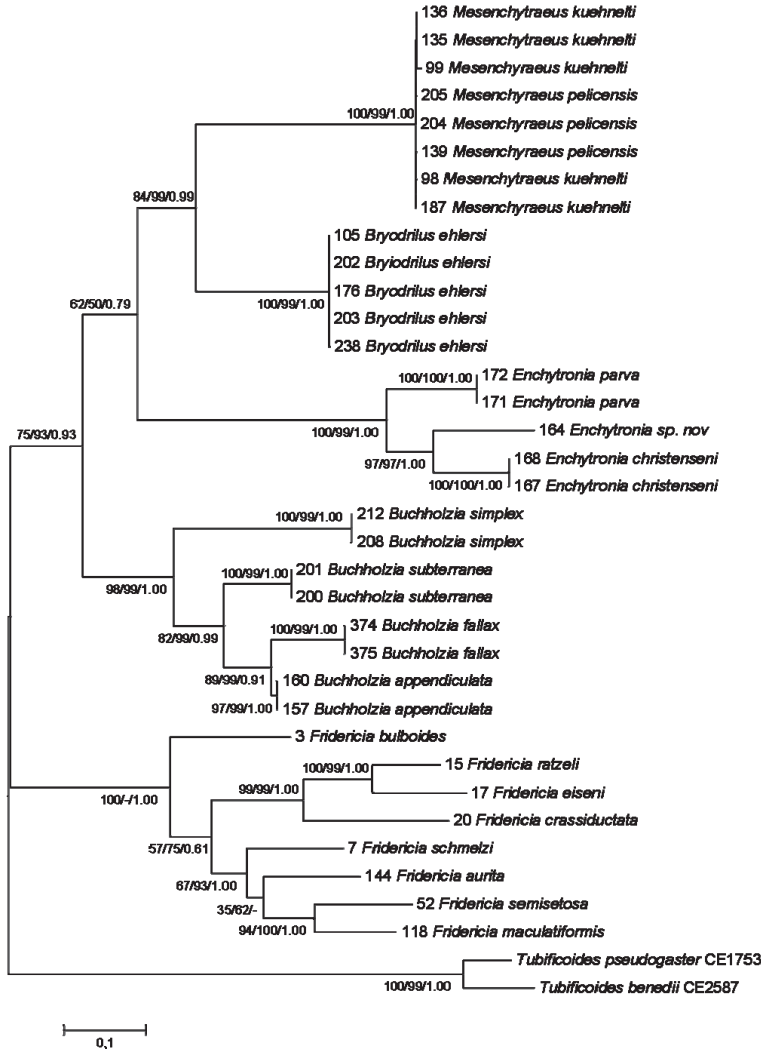
Eredmények

Az egyes vizsgált genuszok valamennyi esetben monofiletikus kládot képeznek, melyek magas, sok esetben maximális bootstrap értékekkel bírnak (13. ábra). Kevésbé támogatott elágazásokkal leginkább a *Fridericia* nemben belül találkozhatunk, illetve az egyes genuszok egymáshoz való pozícióját kijelölő bazálisabb elágazásokban, azonban ezek az értékek sem minimálisak. A négy *Buchholzia* faj teljes mértékben szeparálódott a *Buchholzia* kládon belül, az egyes fajok közti pairwise distance értékek jelentősek, az egyes fajok validitását támasztják alá (4. táblázat). Az egyes fajokon belül nem volt látható variabilitás, azonban fontos megjegyezni, hogy valamennyi *Buchholzia* fajból csak 2-2 párhuzamos mintánk volt, fajonként ugyanarról a lelőhelyről. Az *Enchytronia* nem három faj egyértelműen elvált egymástól, az egyes elágazásokban magas bootstrap értékeket találhatunk, a fajok közti pairwise distance értékek számottevőek (4. táblázat). A gyűjtött

Enchytronia mintákra is igaz, amit a *Buchholzia*-k esetében láthattunk, miszerint a vizsgált fajokból nem állt rendelkezésre sok párhuzamos A *Bryodrilus* genuszon belül két fajt vizsgáltunk (*Br. ehlersi* és *Br. glandulosus*), amelyek az újabb morfológia vizsgálatok szerint egymástól nem megkülönböztethetőek, a gyűjtött példányok minden esetben rendelkeztek a *Br. glandulosus*-t leírás szerint megkülönböztető karakterrel (spermatéka vezetékének külső nyílásánál található mirigyek). Emiatt csak a senior *Br. ehlersi* elnevezés szerepel a dendrogramon. A vizsgálat során a magyarországi példányok mellett a *Br. ehlersi* németországi lelőhelyéről (Németország, 176-os minta) is gyűjtöttünk mintát. A *Bryodrilus* szekvenciák minimális variabilitást mutattak (1 variábilis pozíció, 2 haplotípus). A *Mesenchytraeus* genusz esetében két egymással morfológiai alapon kétségbevonható validitású fajt vizsgáltunk, a *M. pelicensis*-t és *M. kuehnelti*-t. A *M. kuehnelti*-t a hímivarkészülék atriumaiba nyíló mirigyek alapján tér el a korábban leírt *M. pelicensis*-től. A két fajból származó nukleotidszekvenciák egyetlen monofiletikus csoportot eredményeztek, ahol nem tapasztalhattunk szétválást a két taxon között, a lókus variabilitása alacsony volt (0,28% átlagos távolság, 6 variábilis nukleotid-pozíció, 5 haplotípus) annak ellenére, hogy vizsgálatunkba bevontunk olaszországi lelőhelyről származó mintát is (Olaszország, Valdabbiadene).

Értékelés

A minták többsége a *Fridericia* genuszba tartozik, azonban dacára annak, hogy a többi nem aránylag kevés fajjal van feltüntetve, az egyes genuszok (*Fridericia*, *Enchytronia*, *Mesenchytraeus*, *Buchholzia*, *Bryodrilus*) magas bootstrap-értékekkel támogatott monofiletikus kládokat alkotnak, ami egybevégt. Erséus és mtsai. (2010b) mitokondriális (12S rDNS, 16S rDNS, COI) és nukleáris géneken (18S rDNS, 28S rDNS) alapuló vizsgálatával. Munkájukban megjegyzik, hogy a *Fridericia* nem belüli leszármazási viszonyokat nem sikerült feltérképezniük, amit a genusz közelmúltban megtörtént, gyors radiációjával magyaráznak. Ezzel szemben az ITS régió szekvenci-elemzésével készített filogenetikai fákon magas bootstrap-eket láthatunk a terminális helyzetű elágazásokban is, amiből lesűrhető, hogy ez a génszakasz genuszon belül alkalmasabb az alacsonyabb rangú taxonok rokonsági kapcsolatainak feltárására, ami mögött minden bizonnyal az áll, hogy az ITS régió nagyobb része (ITS1 és ITS2) nem kódoló szakasz, és emiatt a nukleotidszekvenciája nagyobb mértékű változásnak van kitéve.



13. ábra: A vizsgált Enchytraeidae fajok filogenetikai viszonyai az ITS régió alapján ML algoritmussal generálva. (A párhuzamos *Fridericia* mintákból csak egy-egy szerepel, részletes bemutatásuk az 13. ábrán). Az elágazásokban a bootstrap (ML), NJ) és a posterior probabilities (BI) értékek láthatóak. -: nem támogatott elágazás.

4. táblázat: A *Buchholzia* és *Enchytronia* fajok gemetikai távolság értékei (pairwise distance)

	<i>B. fallax</i>	<i>B. appendiculata</i>	<i>B. simplex</i>	<i>B. subterranea</i>	<i>E. parva</i>	<i>E. christenseni</i>	<i>E. sp. nov.</i>
<i>B. fallax</i>							
<i>B. appendiculata</i>	0,087						
<i>B. simplex</i>	0,247	0,254					
<i>B. subterranea</i>	0,209	0,120	0,249				
<i>E. parva</i>	0,419	0,399	0,441	0,417			
<i>E. christenseni</i>	0,417	0,431	0,423	0,443	0,196		
<i>E. sp. nov.</i>	0,455	0,444	0,430	0,463	0,229	0,178	

Az *Enchytronia* nemen belül 3 faj lett görcső alá véve, az *E. parva*, az *E. christenseni* és egy eddig le nem írt faj (*E. sp. nov.*). Az *E. christenseni*-t Schmelz és Collado (2010) legújabb munkájában szinonimizálta az *E. parva*-val, mindezt arra alapozva, hogy a megkülönböztető bélyegek szerint nem elégségesek a 2 faj különválasztására. Így például véleményük szerint a szeparált spermatakák az *E. christenseni* esetében nem elég meggyőzőek, mivel a közöttük lévő kapcsolat sokszor nagyon vékony az *E. parva* és az *E. minor* (szintén az *E. parva*-val szinonimizált faj) példányokban is. A preklitelláris nefridiumok számának variálódása, és főképp az intesztinális divertikulumok alakjának variálódása azonban szerintünk nem fajon belüli, hanem fajok közti variációt jelent. Ezért is vizsgáltuk molekuláris módszerekkel a fent említett általunk önállóan gondolt fajt. Az ITS szekvenciák alapján cáfolhatónak tűnik a szinonimizálás jogossága, hiszen az említett két faj számottevő távolságra helyezkedik el egymástól a filogenetikai fák (13. ábra), valamint a két faj közti genetikai távolságok is túl nagyok ahhoz (4. táblázat), hogy egybevonhassuk a két taxont. A nem publikált *E. sp. nov.* hasonlóképpen elkülönül az előbb tárgyalt két fajtól, amint az észrevehető a filogenetikai fáról, továbbá megerősítik a számított pairwise distance értékek is, az *E. parva*-val szemben 22,9%, míg az *E. christenseni*-vel szemben 17,8%. Egy fontos bélyeg (a laterális serték megléte minden szegmentumban) is alátámasztja az *E. sp. nov.* önállóságát az *E. parva*-val és az *E. christenseni*-vel szemben.

A Magyarországon és egyben Európában előforduló *Buchholzia* fajok magas bootstrap támogatással egyértelműen szétváltak, ami jelzi, hogy esetükben valid fajokról van szó. Ez a *B. subterranea*-t illetően volt kétséges, hiszen Nielsen és Christensen (1959) szerint a faj

eredeti leírása (Černosvitov, 1937) túlságosan hiányos volt, ahhoz, hogy önálló fajként elfogadhasssa. Schmelz és Collado (2010) azonban revalidálta a *B. subterranea*-t, ám megjegyzi, hogy nagymértékben hasonlít a *B. simplex*-re. A filogenetikai elemzés, és a számított pairwise distance értékek alapján viszont a két faj egyértelműen elkülönül egymástól (4. táblázat).

A *Mesenchytraeus pelicensis* Nielsen és Christensen, 1959 és a *Bryodrilus ehlersi* Ude, 1892 esete jól megvilágítja, hogy a morfológiai bélyegek alapján történő leírás magában hordozhatja a veszélyt, hogy esetleg szinoním taxonok keletkeznek. A *Mesenchytraeus kuehnelti* Dózsa-Farkas, 1991, valamint a *Bryodrilus glandulosus* (Dózsa-Farkas, 1990) egy-egy lényeges bélyegben térnek el a *M. kuehnelti* és a *B. ehlersi* faj leírásától. Ráadásul mindkét esetben az újonnan leírt faj, illetve alfaj ráadásul a környezettől elzárt kis reliktum élőhelyen, egy *Sphagnum*-lápból került elő, ami valószínűsítette leírásukkor, hogy izolált élőhelyen zajló fajkeletkezésről van szó. A *M. kuehnelti* leírásában a hímivarkészülék atriumaiba nyíló mirigyek szerepelnek, míg a *M. pelicensis* esetében ezt a szervet mirigymentesként, csak egy kiszélesedő tágulatként írták le. A *Br. glandulosus* spermátéka vezetékének külső nyílásánál mirigyek találhatóak, az eredeti fajleírásban ezek a mirigyek nem fordulnak elő. Ezért Dózsa-Farkas (1990) által eredetileg alfajként (*Bryodrilus ehlersi glandulosus*) leírt férget, Schmelz és Collado (2010) faji rangra emelte. A molekuláris vizsgálatra bevontunk magyarországi, illetve azon országokból származó mintákat, ahonnan leírták őket és ahol ezek a fajok a fauna közönséges tagjainak számítanak (a *M. pelicensis* esetében ez Olaszország, a *B. ehlersi* pedig németországi erdőkből lett leírva). Megjegyzendő, hogy a *Bryodrilus* minták esetében a morfológiai vizsgálatok minden esetben kimutatták a *Br. glandulosus*-ra jellemző képleteket (a németországi minta esetében is), így feltételezhető, hogy ez a bélyeg kimaradt a *Br. ehlersi* eredeti leírásakor (ti. nehezen megfigyelhető tulajdonság). A *M. pelicensis* esetében is hasonló a helyzet, az eredeti leírásban feltehetőleg két okból azért nem szerepelnek a megkülönböztetés alapjául szolgáló atriumba nyíló mirigyek, mivel ez a szerv sokszor csak nagyon nehezen észrevehető, illetve, mint a széleskörű morfológiai vizsgálatainkkal igazoltuk, néha hiányzanak vagy csak rudomentálisan vannak jelen.

Az ITS szekvenciák alapján jogosnak tűnik a következtetés, hogy a sem a *M. kuehnelti*, sem a *Br. glandulosus* nem tekinthető külön fajnak. A filogenetikai fáról egyértelműen kivehető, hogy a *M. kuehnelti* példányai beolvadnak a különböző élőhelyről származó *M. pelicensis*-ek közé. A pairwise distance számított értékei ezt még inkább

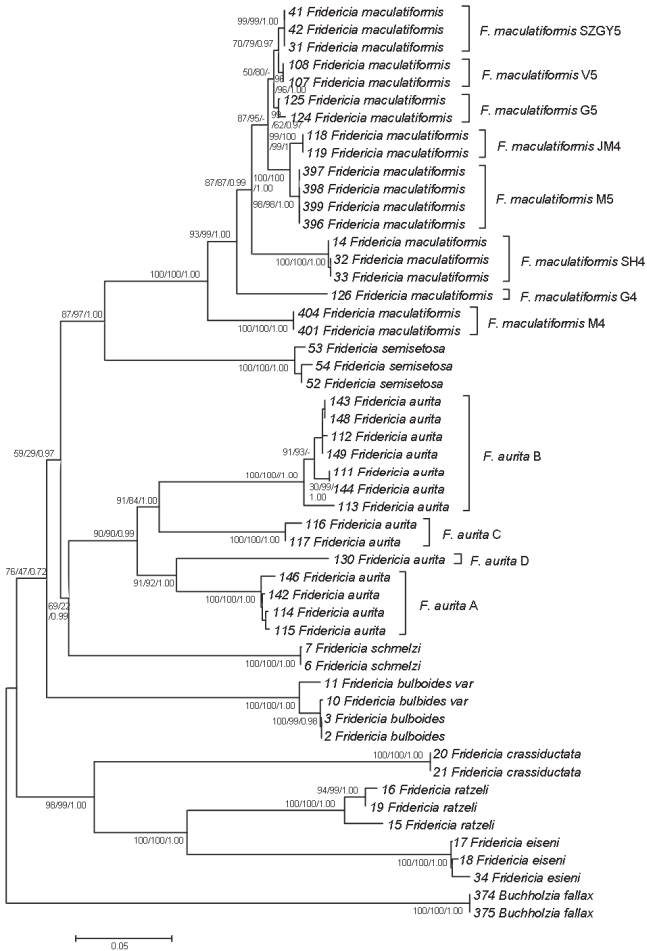
igazolják, a *M. kuehnelti* és a *M. pelicensis* példányok közti átlagos genetikai távolság (0,27%) azonos nagyságrendű a *M. pelicensis*-en belül tapasztalható varianciával (0,28%, 6 variábilis pozíció). Ráadásul jóval kisebb ez az érték, mint amit tapasztalni lehetett a „*F. bulboides*” vagy a „*F. ratzeli*” csoportokban az újonnan leírt, illetve az eredeti fajok között (lásd később). A később tárgyalandó *F. maculatiformis* fajnál az eltérő mintavételi helyekről származó, 4 vagy 5 pár preklitelláris nefridiummal rendelkező példányoknál is magasabb volt a genetikai távolság, pedig ott meglehetősen kétséges volt, hogy tekinthetünk-e másik fajként vagy alfajként az egymástól jól különváló csoportokra. A *B. ehlersi* esetében teljes homogenitást tapasztalhatunk a különböző gyűjtőhelyekről származó minták között, a csoporton belül az átlagos távolság 0,1% alatt marad (1 variábilis pozíció). Mindezeket figyelembe véve az ITS régió analízise nem támasztja alá, hogy a *Br. glandulosus* és a *M. kuehnelti* önálló fajként lenne definiálható, így módon a *M. pelicensis* és a *Br. ehlersi* is morfológiai revízióra szorult (Cech és mtsai, 2011). A szekvenciavizsgálatokból levonható következtetések teljes összhangban állnak a morfológiai megfigyelésekkel.

6.2.2 A *Fridericia* genusz vizsgálata

Eredmények

A *Fridericia* nemen belül több jól elkülönülő csoportot lehet észrevenni (14. ábra). Az egyes elágazásokban látható bootstrap értékek magasak, alátámasztják az egyes fajok validitását. A *Fridericia ratzeli* fajkomplexbe tartozó három faj (*F. ratzeli*, *F. eiseni*., *F. crassiductata*) jól láthatóan elválik egymástól, illetve monofiletikus csoportot alkotnak. A *F. ratzeli* és a *F. eiseni* esetében 3-3 haplotípust kaptunk. A *F. ratzeli* valamennyi példány magyarországi gyűjtőhelyekről származott (Mátra és Budapest), a *F. eiseni* két hazai példánya (Mátra, Budapest) mellett egy Észtországból származót is megszekvenáltunk (Függelék III). A *F. ratzeli* és a *F. eiseni* magyarországi példányai gyűjthetőek voltak ugyanarról a lelőhelyről, ezzel szemben a *F. crassiductata*-t csak a Zempléni-hegységben találtuk meg, ahol viszont a *F. ratzeli* nem fordult elő. A *F. crassiductata*-nak egyetlen haplotípusát sikerült azonosítanunk. A *F. ratzeli* és *F. eiseni* esetében a fajon belüli variabilitás alacsonynak mondható (2,46%, 33 variábilis nukleotidpozíció; 0,86%, 11 variábilis nukleotidpozíció). A fajok közötti pairwise distance értékek ezzel szemben több mint egy nagyságrenddel nagyobbak (25,2 %, 5. táblázat) Az úgynevezett „*bulboides*” alakkörbe

tartozó *F. bulboides*, *F. semisetosa* és *F. schmelzi* ezzel szemben nem alkotott közös kládót, az említett fajok eloszlottak a többi vizsgált *Fridericia* faj között. A *F. bulboides* minták között előfordult egy morfológiai variáns két példánya is, ami azonban nem különült el a törzsalaktól. A *F. bulboides* 4 mintája 3 haplotípust takart két lelőhelyről, a fajon belüli variabilitás alacsony volt (1,53%, 19 variábilis pozíció). A *F. semisetosa* mindhárom példánya ugyanonnan származott, ennek ellenére különböző haplotípust képviseltek, a minták között csekély variabilitás volt tapasztalható (0,76%, 11 variábilis pozíció). A *F. schmelzi*-nek mindössze egyetlen haplotípusát találtuk meg egy lelőhelyről. Három faj között pairwise distance értékek faji elkülönülésre utalnak (5. táblázat). A *F. aurita*-nak 4 morfológiai variánsát vizsgáltuk meg. Sajnos lelőhelyeik nem minden esetben fedtek át, mindegyik típus egy-egy szűkebb mintavételi területről származott, továbbá a *c* típus esetében csupán kettő, míg a *d* típusnál csak egyetlen minta állt rendelkezésünkre. Az *a* és *b* típusok esetében tapasztalható volt némi eltérés a nukleotidszekvenciákban a csoportokon belül. Az *a* típusnál 4 haplotípust kaptunk, a 11 variábilis pozíció 0,67%-os átlagos genetikai távolságot eredményezett a típuson belül. A *b* típus 5 haplotípusa 28 nukleotidpozícióban mutat variabilitást, 1,67%-os átlagos távolsággal. A 4 típus között jóval nagyobb eltérést tapasztalhatunk a szekvenciákban, az egyes típusok különálló kládokat alkotnak, amelyeket nagymértékű szekvenciakülönbség választ el (5. táblázat). A *F. maculatiformis* minták két morfológiai változata a preklitelláris nefridiumok számában tért el (4 vagy 5 pár), összesen 6 helyről sikerült gyűjteni, két mintavételezési helyen (Gerecse és Mezőföld) mindkét típus előfordult. A szekvencianalízis során szétválást tapasztalhattunk a preklitelláris nefridiumok száma alapján, illetve további szeparálódást a lelőhelyek szerint. Az így kapott kládokba tartozó minták többségében egy-egy haplotípust képviselnek. Kivételt csak a Sas-hegyről származó 4 nefridiumos példányok (0,1%, 1 variábilis pozíció) és a Gerecsében gyűjtött 5 nefridiumos példányok képeznek (0,5%, 4 variábilis pozíció). A *F. maculatiformis* típusok között (gyűjtőhely és preklitelláris nefridiumok szerint) a pairwise distance értékek alapján a távolság 1 és 10% között mozgott (5. táblázat).



14. ábra: A *Fridericia* fajok és populációk filogenetikai analízise az ITS régió alapján ML algoritmussal készítve. Az elágazásokban a bootstrap (ML, NJ) és a posterior probabilitások (BI) értékek láthatóak. Rövidítések: **SZGY**: Szent György-hegy, **G**: Gerecse, **V**: Villány, **M**: Mezőföld, **SH**: Sas-hegy, **JM**: Julianna-major, **5**: 5 pár preklitelláris nefridium, **4**: 4 pár preklitelláris nefridium

5. táblázat: A *Fridericia* fajok pairwise distance értékei (baloldal: pairwise distance, jobboldal: szórások) A *Fridericia aurita* esetében a 4 morfológia variáns külön fel lett tüntetve. A *Fridericia maculatifformis*-t a morfológiai variancia és a lelőhelyek szerint is ábrázoltuk. Rövidítések: **SZGY**: Szent György-hegy, **G**: Gerecse, **V**: Villány, **M**: Mezőföld, **SH**: Sas-hegy, **JM**: Julianna-major, **5**: 5 pár preklitelláris nefridium, **4**: 4 pár preklitelláris nefridium. Az azonos alakkörbe tartozó fajok, illetve variánsok megegyező színnel vannak kiemelve.

	<i>F. ratzeli</i>	<i>F. eiseni</i>	<i>F. crassiductata</i>	<i>F. bulboides</i>	<i>F. schmelzi</i>	<i>F. semisetosa</i>	<i>F. aurita A</i>	<i>F. aurita B</i>	<i>F. aurita C</i>	<i>F. aurita D</i>	<i>F. maculatifformis SZGY5</i>	<i>F. maculatifformis G5</i>	<i>F. maculatifformis V5</i>	<i>F. maculatifformis M5</i>	<i>F. maculatifformis SH4</i>	<i>F. maculatifformis JM4</i>	<i>F. maculatifformis G4</i>	<i>F. maculatifformis M4</i>
<i>F. ratzeli</i>		0,019	0,029	0,028	0,031	0,028	0,028	0,029	0,029	0,029	0,028	0,028	0,028	0,027	0,028	0,027	0,030	0,027
<i>F. eiseni</i>	0,252		0,033	0,031	0,034	0,034	0,035	0,034	0,033	0,033	0,033	0,033	0,033	0,032	0,034	0,033	0,034	0,032
<i>F. crassiductata</i>	0,342	0,396		0,032	0,030	0,031	0,032	0,033	0,033	0,032	0,028	0,029	0,028	0,030	0,028	0,030	0,031	0,029
<i>F. bulboides</i>	0,383	0,416	0,434		0,025	0,022	0,023	0,024	0,024	0,026	0,021	0,021	0,020	0,021	0,022	0,021	0,022	0,021
<i>F. schmelzi</i>	0,372	0,406	0,382	0,305		0,021	0,023	0,022	0,022	0,023	0,022	0,021	0,021	0,022	0,022	0,022	0,023	0,023
<i>F. semisetosa</i>	0,385	0,411	0,393	0,305	0,257		0,020	0,023	0,022	0,023	0,019	0,019	0,018	0,020	0,020	0,019	0,020	0,019
<i>F. aurita A</i>	0,354	0,430	0,400	0,287	0,253	0,240		0,015	0,015	0,013	0,020	0,021	0,020	0,021	0,021	0,021	0,022	0,020
<i>F. aurita B</i>	0,384	0,447	0,419	0,301	0,248	0,286	0,175		0,016	0,018	0,023	0,023	0,022	0,024	0,024	0,023	0,024	0,022
<i>F. aurita C</i>	0,369	0,428	0,427	0,301	0,250	0,275	0,149	0,162		0,018	0,021	0,021	0,021	0,022	0,021	0,022	0,023	0,021
<i>F. aurita D</i>	0,355	0,413	0,388	0,330	0,279	0,274	0,131	0,196	0,206		0,023	0,023	0,023	0,024	0,025	0,025	0,025	0,025
<i>F. maculatifformis SZGY5</i>	0,353	0,405	0,376	0,282	0,252	0,207	0,240	0,272	0,245	0,274		0,003	0,003	0,006	0,008	0,006	0,010	0,010
<i>F. maculatifformis G5</i>	0,354	0,406	0,382	0,286	0,248	0,210	0,238	0,271	0,243	0,272	0,010		0,003	0,005	0,009	0,005	0,010	0,010
<i>F. maculatifformis V5</i>	0,350	0,405	0,378	0,282	0,246	0,199	0,238	0,270	0,243	0,275	0,006	0,010		0,006	0,008	0,005	0,010	0,010
<i>F. maculatifformis M5</i>	0,354	0,397	0,389	0,287	0,264	0,217	0,239	0,278	0,252	0,273	0,026	0,022	0,025		0,009	0,004	0,011	0,011
<i>F. maculatifformis SH4</i>	0,363	0,420	0,391	0,297	0,282	0,225	0,244	0,288	0,269	0,290	0,059	0,061	0,056	0,064		0,009	0,011	0,011
<i>F. maculatifformis JM4</i>	0,360	0,410	0,397	0,294	0,264	0,223	0,246	0,284	0,262	0,286	0,027	0,025	0,026	0,011	0,067		0,011	0,011
<i>F. maculatifformis G4</i>	0,381	0,414	0,417	0,315	0,270	0,235	0,264	0,297	0,273	0,301	0,072	0,069	0,071	0,081	0,102	0,085		0,012
<i>F. maculatifformis M4</i>	0,359	0,401	0,397	0,278	0,270	0,210	0,243	0,275	0,252	0,298	0,085	0,085	0,088	0,094	0,109	0,101	0,107	

Értékelés

A filogenetikai analízis során kapott csoportok morfológiai szemszögből is megalapozottnak tűnnek. A *F. ratzeli* (Eisen, 1872), *F. eiseni* Dózsa-Farkas, 2005 és a *F. crassiductata* Dózsa-Farkas és Cech, 2006 mind a „gyűjtőfajként” funkcionáló *F. ratzeli*-ből

lettek leválasztva, morfológiai jellemzőiket a 6. táblázat ábrázolja. A *Fridericia ratzeli* az egyik legtöbb problémát felvető faj a genuszon belül, ahogy azt számos szerző taglalja. Mint korábban már említettem, Nielsen és Christensen (1959) felhívja a figyelmet, hogy az eddig talált egyedeknek sok esetben eltérő kromoszómaszámmal bírnak. Hozzáteszi, hogy morfológiai alapon nem lehetséges további csoportokra osztani a fajt, amelyek aztán megalapozottan faji rangot kaphatnának. Christensen (1961) szexuálisan szaporodó populáción belül parthenogenetikusan szaporodó egyedeket mutat be, tovább bonyolítva ezzel a *F. ratzeli* problematikáját. Schmelz (2003) összefoglaló revíziójában 2 fő, morfológiailag megkülönböztethető formáját tárgyalja. Az elsőbe nagyméretű egyedek tartoznak, amelyek spermatéka divertikulumai elkülönülő üregekkel rendelkeznek, amitket általában sperma tölt ki. Az ektális vezeték számottevően kiszélesedik proximálisan, a XIII. szelvénybe nagyméretű szubneurális mirigy található. A második formakörbe kisebb termetű férgek tartoznak, spermatéka divertikulumaik üreg nélküliek, az ektális vezeték kiszélesedése sokkal kevésbé kifejezett, valamint 3 kisebb szubneurális mirigy foglal helyet XIII., XIV. és XV. szelvényekben. Ezt a két alakot már Chalupský (1992) is megkülönböztette, az első alakra a *F. dura* (Eisen, 1878) fajnevet használta, míg a második csoportot értelmezte *F. ratzeli*-ként. Fehérjemintázat analízisek rávilágítanak, hogy a két alak egymástól genetikailag különböző, ugyanakkor mindkét formán belül további genetikai heterogenitás lelhető fel, ami megerősíti, hogy minkét esetben fajkomplexről lehet beszélni. Schmelz (2003) összegzőképpen megállapítja, hogy a *F. ratzeli* fajcsoporton belül lévő „mikrotaxonok” leválasztására morfológiai vizsgálatok, fehérjemintázat elemzések, valamint további molekuláris markerek együttes alkalmazása szükséges.

A *F. eiseni* leírásakor még csak morfológiai adatok lettek figyelembe véve (Dózsa-Farkas, 2005), azonban a *F. crassiductata* esetében már az ITS régiót célba vevő PCR-RFLP vizsgálatok is alátámasztották a klasszikus alaktani megfigyeléseket, amelyeket kiegészítésként a *F. eiseni*-nél is elvégeztük (Dózsa-Farkas és Cech, 2006). A vizsgált minták, egy kivételével Magyarországról származnak (Függelék III.), ez alól a *F. eiseni*-nek egy észtországi példány kivétel, amely azonban nem mutat számottevő morfológiai eltérést a magyarországi példányoktól, illetve filogenetikai fán elfoglalt helyzet is megegyezik a hazai példányokéval, a pairwise-distance értékek szintén nem mutatnak jelentős eltérést (1,2 %, 8 illetve 10 bp eltérés a két hazai példánnyal szemben).

6. táblázat. A „*F. ratzeli*-csoport”-ba tartozó fajok morfológiai összehasonlítása

	<i>F. ratzeli</i> (Eisen, 1872)	<i>F. eiseni</i> Dózsa- Farkas, 2005	<i>F.</i> <i>crassiductata</i> Dózsa-Farkas és Cech, 2006
Szelvények	50-60	49-61	(38)-40-56
Testhossz/átmérő(mm)	(15)-20- 30/0,7-1	15-19/0,4-0,5	13-20/0,5-0,7
Serték maximális száma	6-8(9) vagy 6	6 vagy 8	10
Nyelőcsővi függelékek	c típus	c típus	c típus
Preklitelláris nefridiumok	5 pár	5 pár	5 pár
Cólmasejtek	a/c típus (40- 60 µm)	a típus (30 µm)	b típus (20- 32µm)
Lenticyták	számos, kicsi	számos, kicsi	apró, ritka (XV)-XVII- XVIII
Dorzális edény kezdete	XVII-XX	XVIII-XXI	
Burzális hasíték	longitudinális, enyhén görbült	T-alakú	longitudinális, transzverzális elemekkel
Spermatólcser	250-500 µm	400-500 µm	250-380 µm
Subneurális mirigy	XIII (vagy hiányzik)	XIII-XIV-XV	XIV-XV-XVI

A *F. crassiductata* belül nem figyelhetünk meg genetikai variabilitást, ami nyilvánvalóan annak köszönhető, hogy a minták egy szűk területről lettek gyűjtve. A *F. eiseni*-n belül egy alacsony 0,86 %-os átlagos távolságot tapasztalhatunk (11 variábilis pozíció), míg a *F. ratzeli*-n belül viszonylag magas 2,46 %-os átlagos genetikai távolságot kaptunk (33 variábilis pozíció). Ennek az lehet az oka, hogy a *F. ratzeli* morfológiailag meglehetősen heterogén faj, ami az örökítőanyagban is tükröződik, emellett parthenogenetikus populációit is számon tartják (Nielsen és Christensen, 1959). A három faj között már jóval nagyobb különbségeket tapasztalhatunk, a *F. crassiductata* helyezkedik el legtávolabb, 34,24%-os, illetve 39,57%-os eltérést mutat a *F. ratzeli*-vel és a *F. eiseni*-vel szemben, az utóbbi kettő között pedig 25,18% az átlagos genetikai távolság. Ezek a különbségek olyan nagy mértékűek, hogy egyértelműen alátámasztják a morfológiai következtetéseket, miszerint különálló fajokról lehet csak szó. Megemlítendő még, hogy a *F. crassiductata* eddig csak a Zempléni-hegység területéről, az avarból volt gyűjthető, ami azonos azzal a biotóppal, amiben a *F. ratzeli* közönséges. Feltételezhető, hogy a *F. crassiductata* a *F. ratzeli* szerepét tölti be ezeken a lelőhelyeken, mivel a *F. ratzeli* noha alkalmanként megtalálható itt is, de együttesen a *F. crassiductata*-val egyszer sem sikerült kimutatni.

A „*F. bulboides*-csoport”-ba tartozó fajok összetartozása a spermateka megegyező morfológiai sajátosságain alapul: a spermateka ampullája hagyma alakú, divertikulumok nem találhatóak, az entális vezeték proximálisan összeolvad és a nyelőcsőbe dorzálisan nyílik. Ebbe a fajcsoportba tartozik a *F. bulboides* Nielsen és Christensen 1959, a *F. semisetosa* Dózsa-Farkas 1970, és a *F. schmelzi* Cech és Dózsa-Farkas, 2005. A fajok morfológiai alapon történő megkülönböztetése ugyanakkor nem mindig nyilvánvaló. A spermatakájukon kívül még számos bélyegben hasonlítanak egymásra, így például a serték száma és alakja, nyelőcsövi függelékek struktúrája, cölömasejtek stb. (7. táblázat).

7. táblázat. A „*F. bulboides*-csoport”-ba tartozó fajok morfológiai összehasonlítása

	<i>F. schmelzi</i> Cech és Dózsa- Farkas, 2005	<i>F. bulboides</i> Nielsen és Christensen, 1905	<i>F. semisetosa</i> Dózsa-Farkas, 1907
Szelvények	34-37	(26)-29-38	(24)-29-34-(39)
Testhossz/átmérő(mm)	5-7,7/0,17-0,29	5-9(12)/0,25	5-7/0,15-0,24
Serték	<u>(2),3,4-(3),2</u> 3,4-(4),2	<u>(1,3),4-4,2</u> 4,(5)-4,2	<u>1,0-0</u> 2,3,4-3,2,1
Mirigyek/szelvények	1	1	
Nyelőcsövi függelékek	<u>a</u> típus	<u>b</u> típus (csavart)	<u>a</u> típus
Preklitelláris nefridiumok	5 pár	5 pár	5 pár
Cölömasejtek	<u>b</u> típus	b típus	b típus
Lenticyták	8-12 µm, ritka	apró, ritka	apró, ritka
Chylus-sejtek (szelvények)	IX-XII (2)	XI-XV (2)	XI-XIII (2)
Dorzális edény kezdete	XIV-XVI	XIII-XVII	XV-XVI
Nyereg	körkörös	körkörös	laterális
Hím kopulációs szerv	kicsi (110 µm) elkülönülő area glareosa	kicsi (110 µm)	variábilis (70-100 µm)
Burzális hasíték	transzverzális	longitudinális	T-alakú
Ondóhólyag	-	XI (apró)	-
Spermatólcser	a test átmérőjének 1/4- e	a test átmérőjének 1/2- 2/3-a	a test átmérőjének 1/2- e
Spermateka	ektális mirigy 20- 30 µm	ektális mirigy 15- 20 µm	ektális mirigy 20- 30 µm

A *Fridericia bulboides* Nielsen és Christensen, 1959-t a többi fajtól megkülönbözteti kis mérete, hosszú feltekercselt nyelőcsövi függelékei, övszerűen húzódo klitelluma, amely sejtei nem alkotnak észrevehetően elkülönülő sorokat, valamint spermatakájának számos tulajdonsága (nagyon hosszú ektális vezeték, ektális mirigye gömbölyded kis-, illetve közepméretű, az ampulla nem tartalmaz divertikulumokat és a két spermateka entális ductusa

egyesülés után torkollik a nyelöcsöbe. Ezeken kívül még további bélyegek segíthetik a faj felismerését (4 serte kötegenként, 5 pár preklitelláris nefridium, szubneurális mirigy hiánya, a bursa hosszanti hasítéka). Számos karakter lehet variábilis, így például a szelvényszám, az észak-amerikai és a különösen a japán példányok spermatékája nagyobb ektális mirigyekkel rendelkezik (Schmelz, 2003). Wang és mtsai (1999) szintén nagy ektális mirigű *F. bulboides*-t írtak le Kínából. Ez az egybeesés jelezheti, hogy további alfaji esetleg faji felbontásra van szükség. A fehérje ujjielenyomatvizsgálatok ausztriai és japán mintákból szintén heterogenitást mutatnak (Schmelz, 2003). Problémát okozhat, hogy több jellegzetes bélyegben (méret, serteszám és a spermatéka típusa) nagyon hasonló több olyan fajhoz, amelyek csak egy-egy bélyegben különböznek.

Az ITS régió szekvenciaanalízise azt mutatja, hogy a vizsgált fajok meglehetősen jól elkülönülnek egymástól, amit valamennyi filogramon (NJ, ML és BI) magas bootstrap értékek támasztanak alá (14. ábra). Hasonlóképpen a pairwise distance értékek is megerősítik ezt az állítást, azaz a szekvenciák elég nagy távolságot mutatnak ahhoz, hogy külön fajként tartsuk számon őket (5. táblázat). A *F. schmelzi* minták egyazon populációból származtak, esetükben emiatt nem tapasztalható variancia, a *F. semisetosa* esetében 0,76%-os átlagos szekvencia eltérés mérsékelt (11 variábilis pozíció), míg a *F. bulboides*-nél az 1,53%-os variancia (19 variábilis pozíció) nagyobb genetikai heterogenitást jelez, de figyelembe kell venni, hogy a *F. bulboides*-ek vizsgálatába olyan példányokat is bevontunk (*F. bulboides* variáns), amelyek néhány tulajdonságukban eltérést mutattak, így például a spermatölcser sokkal hosszabb (240-280 μm), a kopulációs szerv nagyobb (160-200 μm), az epidermisz vastag, mirigyes szerkezetű, a spermatéka ektális vezetékének nyílásánál. A *F. schmelzi*, amint az a filogenetikai fán is látható, erősen távol esik a másik két fajtól, az átlagos pairwise distance a *F. bulboides*-szel szemben 29,03%, a *F. semisetosa*-val szemben 29,48%, a *F. bulboides* és a *F. semisetosa* között 20,70%-os genetikai távolságot számítottunk. Mindegyik faj esetében elegendően nagy a genetikai távolság, így megerősíti a morfológiai adatokból lesűrhető faji szintű elkülönítést. Érdekes módon a „*F. bulboides*-csoport”-ba tartozó fajok nem alkottak külön kládot a filogenetikai fán, mint az látható volt a „*F. ratzeli*-csoport” esetében. Ennek magyarázata lehet az ITS régió nagyfokú variabilitása, ami a gyorsan evolválódó *Fridericia* fajok esetében hajlamos lehet a nukleotid szekvenciákban homopláziákat, illetve reverz mutációkat eredményezni, vagyis a lókuszt szaturálódása megnehezíti a filogenetikai kapcsolatok pontos feltérképezését. Erre figyelmeztetnek a némileg alacsonyabb bootstrap értékek, amelyeket azokban az elágazásokban láthatunk, ahol a „*bulboides*-csoport” fajai vannak. Mindamellettképpen elképzelhető, hogy a „*F. bulboides*-csoport”-ot összekötő, a

spermatékában megfigyelhető morfológiai hasonlóság nem szünapomorf bélyeg, hanem a vonatkozó fajoknál párhuzamosan megjelent sajátosság.

8. táblázat: A *F. aurita* Issel, 1905 típusának eltérő morfológiai bélyegei

	<i>F. aurita</i> a-típus	<i>F. aurita</i> b-típus	<i>F. aurita</i> c-típus	<i>F. aurita</i> d-típus (Hanság)
Szelvéyszám	45-60	50-51	52	45-59
Hossz mm	16-21	17	13	15-25
Sertes szám	2,3,(4) – 3,4 : 4,5 – 4-2	4-5 – 4-2 : 5-6 – 5- 2	4-4-2 : 4 –4-2	2,3 (4)– (3),2 : 3,4 – 4-,2
Epidermális mirigysejtek		áttetsző és barna		3 áttetsző
Oesophagealis mirigy	c-típus	a-típus néhány végső ággal	a-típus	c-típus
Coelomocyták	a-típus	a/b-típus	b-típus	a-típus
Ektális vezeték hossza és szélessége	470 µm / 24-30 µm kis miriggyel	150-180 µm / 29-43 µm több kis, vagy egy nagyobb miriggyel	<u>210 –230 µm / 30 µm mirigy nélkül</u>	450–500 µm/30–40 µm kis miriggyel
szubneuralis mirigy	=	XIII-XIV	=	?
Chylus sejtek	XV-XVII	XV-XVII	IX-X	?
háti edény eredése	XIV-XIX	XIX-XXI	XV	XXI

A *Fridericia aurita* Issel, 1905 és a jellegzetes fülszerű spermatékális divertikulumok alapján hozzá morfológiailag nagyon hasonló fajok alkotják az ún. *F. aurita* fajkomplexet. Vizsgálataink során két eltérő típust találtunk a magyarországi hegyekben (Mecsek és Villányi-hegység), amelyek néhány eltérő tulajdonsággal rendelkeznek (8. táblázat). Ezek közül talán a leginkább szembeötlő az epidermális mirigysejteknel látható különbség, az *a*-típus esetében csak áttetsző mirigysejteket fedezhetünk fel, míg a *b*-típusnál áttetsző és barna mirigyek egyaránt megtalálhatóak. Mivel a *F. aurita* típuspéldánya elveszett (Schmelz, 2003), ezért nem nyíltott lehetőség a saját példányainkkal történő összehasonlításra. A két típus élesen elkülönül a filogenetikai fa szerint, ugyanakkor egy típuson belül nagyfokú homogenitás tapasztalható. Az átlagos genetikai távolság az *a* típuson belül 0,67% (11 variábilis pozíció), míg a *b* típus esetében 1,67% (28 variábilis pozíció). A két típus között a genetikai távolság egy nagyságrenddel meghaladja ezt az értéket, 16,65%-ot kaptunk a csoportok közötti átlagos pairwise distance megállapításakor. Mindezek tükrében valószínűnek tartjuk azt a feltételezést, hogy a *F. aurita* két típusa már szeparálódott, külön fajoknak tekinthetőek. A két fő típuson kívül előkerült egy harmadik típus (*c*-típus) is a Mecsekből, amelynél az epidermális mirigyek hiánya tapasztalható, továbbá a serteszámban is eltérés figyelhető meg (8. táblázat). Az ITS szekvenciák alapján ez a típus is számottevően eltér, a pairwise-distance

értékek (5. táblázat) 14,9-20,1%-nyi eltéréstől tanúskodnak a többi típussal szemben. A *F. aurita* egy példánya az előbbi gyűjtőhelyektől távol eső Hanságból származott (*d*-típus), amely szintén nem illet egyik csoportba sem, nukleotidszekvenciája az *a* és *b* típustól 11,74, illetve 18,88%-ban tért el. Sajnálatos tény, hogy az egyes típusok csak egy-egy szűk lelőhelyről kerültek elő, ami valamelyest gyengíti a fajok szeparálódásáról alkotott hipotézisünket, ugyanakkor azt kis figyelembe kell venni, hogy az *a*, *b* és *c*-típusok mintavételezési helyei átfedtek, vagyis a nagymértékű genetikai heterogenitásért nem lehet a földrajzi távolságot okolni (a *F. eiseni* magyarországi és északmagyarországi példányai között jóval kisebb a genetikai távolság, 1,2 %).

A kötegenként 2 sertével, továbbá két spermátéka divertikulummal rendelkező fajok között a *F. maculatiformis* Dózsa-Farkas, 1972 az egyetlen, amelynek szubneurális mirigye van. További jellemzőik a nagyméretű lenticyták a testüregben, 4 pár preklitelláris nefridium, övszerű nyereg, nagy ondóhólyagok, a spermátéka nyílásánál kiterjedt ektális mirigyek és hosszúkás divertikulumok. A *F. maculatiformis*-nak már korábban előkerült néhány példánya, melyek néhány fontos jellegzetességet nézve elütnek az alaptípustól, így például Chalupský (1992), illetve Rota és Healy (1999) által talált svédországi példányok 4 helyett 5 pár preklitelláris nefridiummal rendelkeznek, nagyobb termetűek és több szelvényük van, klitelláris mirigysejtjeik nincsenek sorokba rendeződve, kutikulájuk vastag.

A magyarországi mintavételek során előkerült mindkét variáció, így a *Fridericia maculatiformis*-ra az eredeti leírás szerint jellemző 4 pár nefridiummal rendelkező típus a Sas-hegyről, a Gerecséből, a Mezőföldről és a Julianna-majorból (Budai-hegység). Emellett azonban megtalálhat volt a másik típus is, amelyik 5 pár nefridiummal rendelkezik, ezek a példányok a Szent György-hegyről, a Villányi-hegységből, a Mezőföldről, illetve a Gerecséből kerültek elő. A filogenetikai fán az összes *F. maculatiformis* példány egy kládba csoportosul magas bootstrap érték mellett. Az egyes lelőhelyekről származó példányok szemmel láthatóan önálló ágakat alkotnak, tehát egy földrajzi barrier nyomán izolációt mindenképpen észre lehet venni. Ugyanakkor az is látható, hogy az 5 pár nefridiummal rendelkező példányok egy ágba tömörülnek, létrehozva ezzel egy monofiletikus kládot, majd ezen a kládon belül láthatjuk a már említett földrajzi lelőhely szerinti szétválást. Figyelemreméltó, hogy az azonos lelőhelyen gyűjtött, de eltérő számú preklitelláris nefridiumokkal rendelkező minták is kétséget kizáróan elkülönültek egymástól a földrajzi egyezés ellenére. A 4 pár nefridiumos egyedek helyzete egymáshoz képest ezzel szemben parafiletikus. A genetikai távolságot kifejező pairwise distance értékek arról tanúskodnak, hogy az egyes típusok között jelentősnek nevezhető a genetikai heterogenitás, nagyobb annál,

mint amit a fajokon belül tapasztalhatunk. Az 5 nefridiummal rendelkező példányok közt a genetikai távolság 0,3-2,5 % között változik, ami megfelel annak az értékeknek, amiket fajokon belül tapasztalhattunk (pl. *F. ratzeli*, *F. eiseni*, *F. schmelzi*, *F. crassiductata*, *F. bulboides*, illetve a *F. aurita* típusai), ellenben ha a 4 pár nefridiumos egyedekhez hasonlítjuk őket, akkor a távolság már 2,9-5-9%. Érdekes módon a julianna-majori 4 pár nefridiumos példányok az 5 párral rendelkező példányok közé ékelődnek, ami gyengíti elképzelésünket az új típus szeparációját illetően. Megjegyzendő, hogy az 5. pár nefridium sokszor igen nehezen figyelhető meg, emiatt szükség lenne további julianna-majori példányok morfológiai és molekuláris vizsgálatára, hogy ki lehessen jelteni, valóban elkülönült fajokról van szó, illetve más gyűjtőhelyekről származó példányok is igazolhatnák vagy cáfolhatnák a szeparációt. Tekintve, hogy két lelőhelyről (Gerecse és Mezőföld) mindkét típus előkerült, az alfaji elkülönítés nem jöhet szóba.

Tanulságos összevetni a genetikai távolságokat más gyűrűsféreg családokban mért ITS-szekvencia távolságokkal. Gustafsson és mtsai (2009) által megfigyelt két *Lumbriculus variegatus* klád között a különbség 1,33% volt, míg kládon belül mindössze 0,15%-os átlagos értéket kaptak. Kvist és mtsai (2010) tengerben élő *Tubificoides* fajokat vetettek össze mitokondriális (COI, 12S, 16S) és nukleáris (28S, 18S, ITS) gének segítségével, ahol is az ITS szekvenciában jelentkező 1,26%-os eltérés már szeparálódott fajokat jelzett, az ITS-szekvenciákból leszűrhető eredményekkel a többi lókuszt vizsgálata is egybecsengett. A Polychaeta altörzsbe tartozó *Perinereis* férgéknél a fajon belüli genetikai távolságok 0 és 1,38% közé estek (Chen és mtsai, 2002). Az enchytraeida *Grania* fajok intraspecifikus varianciája is hasonlóképpen alacsony, ezzel szembe a fajok között jelentős különbségek figyelhetőek meg (De Wit és Erséus, 2010). A fent felsorolt értékek egybevágóak az általunk tapasztaltakkal, az Enchytraeidae család esetében a fajon belüli pairwise distance értékek ritkán haladták meg az 1%-ot azokban az esetekben, amikor morfológiai heterogenitás nem volt tapasztalható, emiatt jogosnak tartjuk az ITS szekvenciák alapján megkülönböztetett fajok és alfajok validitását. A *F. ratzeli* és a *F. bulboides* tűnik ki az egyöntetűnek mondható genetikai homogenitás alól a maga 2,43%, illetve 1,68 %-os értékével, azonban figyelembe kell venni, hogy az említett két faj morfológiailag is meglehetősen heterogén, amely igen sok fejtörést okoz a taxonómusoknak. Ugyanakkor szem előtt kell tartanunk Erséus és mtsai. (2010) több génszakasz vizsgálatán alapuló következtetéseit is, miszerint a *Fridericia* nem a közelmúltban egy viszonylag sebes radiáción esett át, amit jól bizonyít a leírt fajok nagy

száma is, így magyarázatként szolgálhat arra is, ha egy fajon belül a megszokottnál nagyobb genetikai heterogenitást észlelünk.

Érdekes számba vennünk, hogy a molekuláris vizsgálatokból származó adatok milyen mértékben korellálnak az egyes morfológiai bélyegek taxonómiai fontosságával. A spermátéka az egyik legfontosabb szerv rendszerezési szempontból az Enchytraeidae családon belül (Dózsa-Farkas, 2008), ennél a családnál tapasztalhatjuk a Clitellata-n belül a spermátéka legszerteágazóbb morfológiai diverzitását, a családon belül pedig a *Fridericia* nem mutatja a legnagyobb alaktani változatosságot, ahol a spermátéka alakja, struktúrája, típusa a legmeghatározóbb faji bélyeg a nemen belül a legegyszerűbb típusok esetében található egy rövidebb-hosszabb ektális vezeték, valamint egy ampullát, ami proximális és disztális részekre osztható. Sok fajnál a spermátéka kiegészül divertikulumokkal (legalább egy darab). Ezek pozíciója, száma és alakja szintén meghatározó a faji identifikáció során. Az ITS szekvenciák vizsgálatokból kapott eredményeink alátámasztják a spermátékának tulajdonított taxonómiai relevanciát, így a „*F. rartzeli* fajcsoportból” leválasztott *F. esieni* és *F. crassiductata* egymástól megkülönböztethető morfológiájú spermátékával rendelkeznek. A *F. crassiductata* a *F. rartzeli*-nél nagyobb spermátéka mirigyekkel rendelkezik, a *F. esieni* pedig mindkettőtől eltér abban, hogy a divertikulumok mérete variál, valamint a két laterális elhelyezkedésű divertikulum mindig nagyobb a többinél. Ugyanakkor az is nyilvánvaló mind a morfológiából mind a szekvenciadatokból, hogy egyedül a spermátéka vizsgálata nem lehet elegendő a faji differenciációhoz. A „*F. bulboides*” csoportba tartozó fajoknak (*F. bulboides*, *F. semisetosa*, *F. schmelzi*) mindnek azonos struktúrájú a spermátékája, viszont egyértelműen szétválnak a filogenetikai fán, továbbá számos egyéb bélyegben (serték, nyelősövi függelékek, chylus-sejtek pozíciója, burzális hasíték stb.) különböznek egymástól (7. táblázat).

A *Fridericia maculatiformis*-ok esetében látható, hogy a preklitelláris nefridiumok száma (4 vagy 5) alapján szétválnak az egyes populációk még az azonos lelőhelyről gyűjtött példányok esetében is, mint az látható például a Gerecse és Mezőföld területéről származó egyedeknél. A pairwise distance értékek (5. táblázat) esetükben határozott elkülönülésre utalnak, tehát érdemesnek tűnik a preklitelláris nefridiumok számát figyelembe venni a fajleírásoknál, mivel utalhat szeparációra, noha ebben az esetben nem jelenthetjük ki kellő bizonyossággal, hogy valóban faji szintű elkülönülésről van szó. A *Fridericia aurita* mintákat tanulmányozva szembetűnő, hogy az epidermális mirigyekben tapasztalható különbségek,

valamint az ektális vezetékek hossza és a serteszám alapján hasonlóképpen elkülönült kládokat kaptunk. Itt is valószínűsíthető, hogy alfaji vagy faji elkülönülésről lehet szó.

Más esetekben a morfológiai különbségekben megfigyelhető varianciá nem bizonyult elegendőnek a faji diszkriminációhoz, a szekvenca-vizsgálatok nem támasztották alá a *Br. glandulosus*, és a *M. kuehnelti* validitását. A *Bryodrilus*-ok esetében minden megvizsgált példány rendelkezett a *Br. glandulosus* diszkriminatív karakterével (spermatéka vezetékének külső nyílásánál található mirigyek), vagyis itt nem beszélhetünk intraspecifikus varianciáról, viszont fontos megállapítani, hogy régebbi fajleírásokból (pl. *Bryodrilus ehlersi* Ude, 1892) hiányozhat fontos tulajdonságok megemlítése, illetve egyes bélyegek nehéz detektálhatóságuk miatt el is kerülhetik a taxonómus figyelmét. A *Mesenchytraeus*-oknál a *M. kuehnelti* megkülönböztető tulajdonsága (hímivarkészülék atriumaiba nyíló mirigyek) variabilitást mutatott a különböző lelőhelyekről származó példányoknál, viszont az ITS szekvenciák nagymértékű homogenitást mutattak, tehát ebben az esetben valóban intraspecifikus morfológiai varianciáról beszélhetünk. A *F. bulboides* fajon belül találtunk egy variánst, amely több eltérő bélyeggel is rendelkezett (spermatölcsér sokkal hosszabb (240-280 μm), a kopulációs szerv nagyobb (160-200 μm), az epidermisz vastag, mirigyes szerkezetű, a spermatéka ektális vezetékének nyílásánál) a *F. bulboides* alaptípusához képest, azonban szekvenca-vizsgálataink nem mutattak ki különbséget a két variáns között, vagyis itt is inkább intraspecifikus varianciáról van szó.

7. Összefoglalás

Munkám során a Lumbricidae és az Enchytraeidae családot érintő taxonómiai problémákra kerestem válaszokat. A két család esetében némileg eltérő kérdésekkel találkozhatunk. A Lumbricidae családnál jellemzően az egyes genuszok validitása, illetve azok egymáshoz való kapcsolata vet fel számos kérdést, ellenben az Enchytraeidae családban inkább az egymáshoz közel rokon fajok esetében találhatjuk szembe magunkat nehézségekkel, az egyes fajok megkülönböztetése és szétválasztása nagyban függ a morfológiai karakterek súlyozásától.

A földigilisztafajok taxonómiai helyzetének tisztázásához a munka kezdetekor fellelhető irodalom alapján először a 18S rDNS lókuszt kezdtük vizsgálni. Noha a 18S rDNS néhány faj, illetve genusz esetében értékelhető válaszokat adott, már az első szekvenciák kiértékelése után kiderült, hogy önmagában nem lesz elegendő a feltett kérdések megválaszolására, amit a 18S rDNS-nél tapasztalt nagyon kismértékű variabilitás okozott. A 18S rDNS szekvenciavizsgálatokból azonnal látható volt, hogy az *Eisenia* genusz monofiletikus, annak ellenére, hogy a hosszanti izomzat keresztmetszete különböző (tollas és nyalábos) az egyes fajoknál. Hasonlóképpen megbízhatónak tűnt az a megfigyelés miszerint az észak-amerikai *Bimastos* fajok a *Dendrodrilus*-okkal és az *Allolobophoridella eiseni*-vel alkotnak közös kládot, ami jól magyarázható morfológiai bélyegekkel, továbbá biogeográfiai is jól értelmezhető, feltételezve, hogy peregrin a *Dendrodrilus*-ok széthurcolása valójában Észak-Amerikából történt. Ezzel szemben a közel-keleti *Bimastos syriacus* elkülönült az előbbi fajoktól, ami cáfolja a főként a körkörös nyereg hasonlóságára alapozott *Bimastos* genuszba történő sorolását. Szembetűnő volt még a *Cernosvitovia* genusz *Allolobophora*-kkal alkotott közös kládjá, ami megkérdőjelezi, hogy a genusz szeparálására alkalmazott morfológiai karakter, a himivarnyilások nyereg felé történő eltolódása, felhasználható-e az egyes nemek definiálásakor. Már a 18S rDNS vizsgálatokban megmutatkozott a *Dendrobaena cognetti* markáns elválása a többi földigiliszta fajtól, amivel összhangban áll egyedinek mondható morfológiai bélyegeinek kombinációja (2 karral rendelkező nefridiális hólyagja és hiányzó spermatékája, ellenben a *Dendrobaena* nemre jellemző vörös pigmentációja és tágan álló sertéi). Az említett kládok bootstrap-támogatottsága a filogenetikai fákon mérsékeltnek mondható, amit a 18S rDNS lókuszt az előzetesen vártnál lényegesen alacsonyabb variabilitása magyaráz.

A 18S rDNS adatok szolgáltatja információk kiegészítésére és pontosítására a jóval variábilisabb ITS régiót vettük célba. A lókuszt vizsgálata megerősítette a 18S rDNS analíziséből levonható következtetéseket, illetve továbbiakkal egészítette ki. Elmondható, hogy megfelelő alanytűnik a Lumbricidae család filogenetikai kapcsolatainak feltérképezésére, számos további kérdést sikerült tisztázni általa a filogenetikai vizsgálatokban a lényeges elágazási pontokat magas bootstrap értékekkel támogatta. Itt is megfigyelhető volt a monofiletikus *Eisenia* genusz, a *Bimastos*-ok (de a *B. syriacus* nélkül) csoportosulása a *Dendrodriilus*-okkal. Ez utóbbiak (*Dd. rubidus* és *Dd. subrubicundus*) esetében felvetődik, hogy indokolatlan a faji, illetve alfaji megkülönböztetés, amit már morfológiai vizsgálatok is felvetettek. A megjelenésükben észrevehető különbségek feltehetően az eltérő parthenogenetikus formáknak tudhatóak be, ez azonban a mintavételi helytől függően is eltéréseket mutathat. Az egyes *Allolobophora* és *Aporrectodea* fajok kevert elhelyezkedést mutatnak, ami összhangban áll a genusról alkotott polifiletikus koncepcióval. Ahogy azt már láthattuk, a *Cernovitovia* genusz beékelődik az *Allolobophora* kládba, valamint a *Helodrilus putricola* is itt kapott helyett. Ez utóbbi fajt elsősorban a nefridiális hólyagok hiánya különböztet meg az *Aporrectodea* ill. *Allolobophora* fajoktól. Az említett három genusz a különbségek ellenére számos hasonlósággal is rendelkezik, mint pl. a szűk serteállás, az ondótartók a *c* és *d* sertesorok között nyílnak, valamint a mézmirigyek a 10. szelvényben laterális divertikulumokkal rendelkeznek, így nem meglepő, hogy nem találtunk erőteljes szétválást az említett genuszok között. A *Proctodrilus* nem felállítását a nefridiális hólyagok hiánya, valamint az enteronefrikus kiválasztórendszer indokolta, de az eredményeink nem erősítik meg a genusz validitását. Az *Ap. sineporis* és az *Ap. handlirschi* különállása szembevetően a többi *Aporrectodea* fajtól (ill. *Allolobophora*, *Cernovitovia*, *Helodrilus*, *Proctodrilus* fajoktól) élesen megkülönbözteti őket, hogy porfirin alapú vörös pigmentekkel rendelkeznek. Mindez egybecseng azzal a korábbi morfológiai klasszifikációval, amelyben az elkülönülő *Eisenia* nembe sorolták ezeket a fajokat.

A legrobusztusabb eredményeket a két lókuszt együttes vizsgálata szolgáltatja, ami már kielégítő információkat nyújtott a szintén problémás *Dendrobaena* nemről is. A *D. cognettii* továbbra is elkülönült a többi *Dendrobaena* fajtól, ugyanakkor azok a közép-európai és balkáni elterjedésű fajok, amelyek alaktanilag egységes képet mutatnak, a szekvencialízisben is egy ágon helyezkedtek el. Valamennyiükre igaz, hogy rendelkeznek a *Dendrobaena* nemre jellemző szünapomorf bélyegekkel: piros pigmentáció, tág serteállás, kolbász alakú nefridiális hólyagok, mézmirigy kiöblösödések. Ezzel szemben az elkülönülő *D. ganglbaueri* számos olyan tulajdonsággal bír, amelyek különállását indokolják, így

például a klitellum valamint a tubercula pubertatis előretolódott elhelyezkedése, a mészmirigy kiöblösödések hiánya, illetve a kicsiny, alig észrevehető hímvarnyílás. Ez a megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy megfontolandó lenne a 80-as években felállított *Omodeoia* genusz feltámasztása, amelybe a hasonló karakter-együttessel jellemezhető *Dendrobaena* fajokat sorolták, és amelybe a *D. ganglbaueri*-t is illesztették.

A Lumbricidae család taxonómiájában használt morfológiai karakterekről, és azok genuszok szintjén való alkalmazhatóságáról is levonhatóak következtetések. Egyes bélyegek igen nagy változékonyságot mutattak, mint például a nefridiális hólyagok alakja és irányultsága, amelynek korábban nagy jelentőséget tulajdonítottak. A longitudinális izomzat struktúrája egyáltalán nem tükrözi a filogenetikai viszonyokat, monofiletikus csoportok felállítására használhatatlannak tűnik. Az ondóhólyagok száma valamint az ondótartók elhelyezkedése nagymértékben variál, és az egyes karakterállapotok egymással párhuzamosan feltűnnek szinte minden kládban. Alacsony taxonómiai jelentőségűnek tűnik a hímvarnyílás hátratólódása a 15. szelvény mögé, ami alapján több genuszt különítettek el (*Cernovsitovia*, *Fitzingeria*, *Octodriloides*), megalapozottnak tűnik, hogy ez a bélyeg erősen hajlamos a homopláziára.

Ezzel szemben a morfológiai bélyegek egy részéről elmondható, hogy szembetűnően jól egybeesik a szekvenciavizsgálatok alapján kapott kládokkal. Ide tartoznak olyan klasszikus karakterek, mint például a pigmentáció és a serteállítás, illetve az utóbbi időben egyre nagyobb jelentőséggel bíró mészmirigyek. A szűk serteállással jellemezhető *Allolobophora*, *Aporrectodea*, *Cernovsitovia*, *Helodrilus* és *Proctodrilus* fajok monofiletikus csoportot alkottak, továbbá igaz ez a szintén szűk serteállítású *Eisenia* genuszra. Ugyanakkor a tág serteállítású *Dendrobaena* fajok szintén egységes csoportot képeznek. A tágan páros serteállítású *Dendrodrilus*-ok valaha a *Dendrobaena* nembe tartoztak, mígnem előbb alnemi rangra emelték, majd önálló genuszt hoztak létre a számukra. A porfirin alapú vörös pigmentáció megléte vagy hiánya alapján hasonlóképpen jellemezhetők az egyes monofiletikus kládok. Érdeemes megfigyelni, hogy az *Aporrectodea* fajok közül egyedül a vörös pigmentációval jellemezhető *Ap. sineporis* és *Ap. handlirschi* fajok maradtak ki az összes többi *Aporrectodea* és *Allolobophora* fajt magába foglaló kládból, amelynek minden tagja pigment nélküli. Ezzel szemben a *Dendrobaena* és *Bimastos-Dendrodrilus* csoportokra egyaránt jellemző a porfirin alapú vörös pigment megléte. Nem meglepő, hogy a két génszakasz szekvenciái alapján generált ML fán ez a két klád egymás testvércsoportjai. A mészmirigyek viszonylag stabil karakternek bizonyultak az eredmények tükrében. A *Dendrobaena* s.l. fajokon belül a 10. szelvényben mészmirigy kiöblösödéssel rendelkező

Dendrodrilus fajok egyértelműen a hasonló mészmiriggyel rendelkező *Bimastos* fajokkal alkotnak egy kládot. A mészmirigy kiöblösödésekkel nem rendelkező *D. ganglbaueri* is jól elválik a többi *Dendrobaena*-tól.

A televényférgék esetében eleve alacsonyabb szintű taxonómiai kérdésekre kerestük a választ, emiatt a molekuláris vizsgálatokhoz már az elején egy variábilisabb génszakaszt választottunk, az ITS régiót. A lókuszt megfelelően variábilisnak bizonyult a kitűzött célnak, hathatós eszköznek találtuk az egymással szoros kapcsolatban lévő, morfológiailag csak bizonytalanul megkülönböztethető fajok elkülönítésére, emellett a genuszok szintjén is releváns információt hordozott. Az eredményeket magas bootstrap értékek és a genetikai távolságok kellőképpen igazolták. Az általunk vizsgált valamennyi genusz (*Buchholzia*, *Bryodrilus*, *Enchytronia*, *Mesenchytraeus*, *Fridericia*) monofiletikus kládokat képezett a filogenetikai vizsgálatokban, ami megfelel a morfológiai ismereteknek. A szekvenciavizsgálatok eredményei egyaránt vezettek új fajok leírásához, illetve régebbiek revidálásához.

A *Buchholzia* nemen belül a *B. subterranea* és *B. simplex* taxonómiai helyzete volt kétséges, mivel az eredeti leírás számos fontos morfológiai bélyeget nélkülözött esetükben, ezenfelül a két faj közeli rokonai egymásnak. A szekvenciavizsgálatok egyértelműen alátámasztották, hogy a két faj egyértelműen elválik egymástól, illetve a vizsgálatba bevont másik két fajtól, a *B. fallax*-tól és a *B. appendiculata*-tól. Az *Enchytronia* genuszon belül az *E. parva*, az *E. christenseni*, és egy le nem írt faj, az *E. sp. nov.* képezte vizsgálatunk tárgyát. Az *E. christenseni*-t újabban szinonimizálták az *E. parva*-val, mivel a szeparált spermatakák nem tűnnek meggyőző bizonyítéknak a két faj megkülönböztetéséhez. Ugyanakkor az összevonás ellen szól a preklitelláris nefridiumok, és az intesztinális divertikulumok variálása, ami fajok közti variációra utalhat. Az *E. sp. nov.* esetében a markáns különbséget az *E. parva*-tól és az *E. christenseni*-től a laterális serték megléte jelentette, amely minden szegmentumra kiterjed. Az ITS régiót érintő vizsgálatok mindhárom taxon esetében megerősítették azt az álláspontot, hogy szeparálódott fajokról van szó.

Ellenkező következtetésekre jutottunk a *Bryodrilus* és *Mesenchytraeus* fajokat illetően. A *Br. glandulosus*-t spermataká vezetékének külső nyílásánál található mirigyek alapján választották el a *Br. ehlersi*-től. A különböző földrajzi területről gyűjtött *Bryodrilus* minták egységes kládot alkottak az egyes példányok közt alacsony genetikai távolsággal, emiatt a *Br. glandulosus* junior szinonimának tűnt. Ezt kiegészíti egy morfológiai megfigyelés, miszerint az összes gyűjtött példánynál láthatóak voltak a *Br. glandulosus*-ra jellemző mirigyek, tehát

valószínűsíthető, hogy ez a karakter a *Br. ehlersi* fajleírásából kimaradt, ezért e fajt revideálni kellett. Hasonló problémával talákoztunk a *M. kuehnelti* és a *M. pelicensis* fajoknál, itt a különbséget a *M. kuehnelti* leírásában szereplő hímvivarkészülék atriumaiba nyíló mirigyek jelentik. A két faj szintén identikusnak bizonyult, noha a vizsgálatba bevont példányok között egyaránt előfordult mindkét morfológia variáns, amelyek nem estek egybe egyik faj elterjedésével sem. A *M. kuehnelti* ebben az esetben is szinonimnak tűnik a *M. pelicensis*-szel, vagyis revízióra volt szükség a két faj esetében.

A *Fridericia* nem számos esetben szolgáltat példát olyan úgynevezett gyűjtőfajokra, amelyek magukban hordozzák a lehetőséget, hogy a bennük tapasztalt nagyfokú intraspecifikus morfológiai variancia valójában rejtőző fajokat takar. Az egyik ilyen faj közülük a *F. ratzeli*. A munka során két fajt is sikerült leírni, melyek alaktanilag ehhez a gyűjtőfajhoz tartoznak. Az egyik a *F. eiseni* volt, melyet morfológiai alapon már korábban elkülönítettek, a fajleírás jogosságát igazolta az ITS régió vizsgálata, magas bootstrap és meggyőzően nagy genetikai távolság támasztotta alá. A *F. crassiductata* szintén emlékeztetett morfológiailag a *F. ratzeli*-re, ám számos különbség is észrevehető volt kettejük között. A szekvenciaanalízis itt is világossá tette, hogy indokolt az új faj létrehozása.

A *F. bulboides*-t és a rokon fajokat a megegyező spermatéka struktúrájuk alapján rokonítják. Mindamellett, hogy a *F. bulboides* feltehetően magába foglal további mikrotaxonokat, a már leírt fajok, mint például a *F. semisetosa* is igénylik, hogy a morfológiai megfigyelések mellett szekvenciavizsgálatok is alátámasszák validitásukat. Végeredményként azt láthattuk, hogy a *F. semisetosa* döntő mértékben elvált, emellett a *F. schmelzi*-t sikerült még szeparálnunk a *F. bulboides*-től. Egy további *F. bulboides* variáns volt még kimutatható morfológiailag, azonban ebben az esetben az ITS szekvenciák nem igazolták a különállást, jelezve ezzel, hogy nem minden morfológia különbség szolgáltat okot új faj leírására, egyes fajoknál az intraspecifikus variáció számottevő lehet. Meglepő módon mindezek a fajok nem alkottak monofiletikus kládokat, ami egyrészt jelentheti, hogy az ITS régió kudarcot vallott a filogenetikai kapcsolatok feltárásában, másrészt jelezheti, hogy a rokonsági kapcsolatot jelentő hasonlóság a spermatéka struktúrájában mindössze homoplázia a gyorsan evolválódó *Fridericia* nemben.

A *F. aurita*-t szintén gyűjtőfajként tartják számon a taxonómusok. Vizsgálataink során 4 morfológiailag számos tulajdonságban eltérő variánst találtunk. Ezek a variánsok magas bootstrap mellett monofiletikus kládba tömörültek jelezve összetartozásukat, mindazonáltal egymástól is jelentős mértékben elváltak. Indokoltnak látszik feltételezni, hogy ezek a variánsok potenciálisan egymástól divergálódott fajok képviselői.

A *F. maculatiformis* változatok a preklitelláris nefridiumok számában tértek el egymástól, az eredeti fajleírásban szereplő 4 preklitelláris nefridium mellett több lelőhelyről előkerültek 5 párral rendelkező példányok. Ez utóbbiak monofiletikus pozíciót foglaltak el a filogenetikai fán a *F. maculatiformis* kládon belül, a 4 pár nefridiummal bíró példányok parafiletikus helyzetben voltak hozzájuk képest. Figyelemreméltó, hogy egyes lelőhelyeken mindkét típus előfordult, ám nem lelőhely szerint csoportosultak, hanem a preklitelláris nefridiumok száma alapján. Noha a kládon belül tapasztalt genetikai távolságok jelentősnek tűnnek (de alacsonyabbak, mint a fentebb említett csoportokban), óvatosságra int, hogy az Enchytraeidae családból csak korlátozott mértékben, a *Fridericia* nemből viszont nem állnak rendelkezésre korábbi adatok az ITS régió illetően. Emiatt kétségesnek tűnik, hogy megalapozott lenne-e új fajként definiálni az 5 pár preklitelláris nefridiummal rendelkező variánst.

Az eredmények azt sugallják, hogy a *Fridericia* nemen belül jogos az álláspont, miszerint faji szinten az egyik legfontosabb taxonómiai karakter a spermatéka struktúrája, de ugyanilyen fontos a többi morfológiai bélyeg vizsgálata, amelyek szintén lehetnek jelei faji szeparálódásnak. Különösen igaz ez a viszonylag egyszerűbb spermatékával rendelkező genuszok esetében. Mint látható, sok esetben nem elegendő a morfológiai különbségek számbavétele, mivel kétséget kizáróan nem dönthető el, hogy intra- vagy intraspecifikus variációval állunk-e szemben. Az efféle kérdések tisztázásához hasznos eszköznek bizonyult az ITS régió szekvenenciaanalízise, amely variabilitása révén jól értelmezhető eredményeket nyújtott, a morfológiai megfigyelésekkel együttesen alkalmazva kielégítően tisztázhatjuk a taxonómiai bizonytalanságokat.

8. Kivonat

A munka során a Lumbricidae család fajainak filogenetikai viszonyainak megismerésére törekedtünk, valamint az Enchytraeidae családon belüli faji szintű taxonómia kérdések megválaszolására. A problémák megoldására molekuláris biológiai módszereket választottunk, a Lumbricidae családban a 18S rDNS és az 5,8S rDNS-ITS2 szakasz, az Enchytraeidae családban az ITS régió szekvenciaanalízisét.

A Lumbricidae családot érintő vizsgálatok a során a 18S rDNS nagyon alacsony variabilitású szakasznak bizonyult, a filogenetika kapcsolatok feltárása terén csak nagyon korlátozott mértékben volt alkalmazható. Emiatt kellett egy jóval kevésbé konzervatív lókuszt, az ITS régiót is bevonni a kutatásba. Az 5,8S rDNS-ITS2 szakasz már sokkal több magyarázható eredménnyel szolgált, a két lókuszt együttes alkalmazása pedig még használhatóbb filogenetikai eredményeket nyújtott. Sikerült bizonyítani az *Eisenia* genusz monofiletikus voltát, kimutatni a *Bimastos* és *Dendrodrilus* nemek, valamint az *Allolobophora eiseni* szoros kapcsolatát, ugyanakkor a közel-keleti *Bimastos syriacus* elkülönülését. Nyilvánvalóvá vált az *Allolobophora* és *Aporrectodea* genusz polifiletikus volta, valamint megkérdőjeleződött a *Cernosvitovia*, *Helodrilus* és *Proctodrilus* nemek validitása. A *Dendrobaena* genusz esetében a prekonceptciónak megfelelően polifiletikus képet kaptunk, ugyanakkor a klasszikus értelemben vett közép-európai és balkáni fajok monofiletikus kládot alkottak. A szekvenciaanalízis tanúsága szerint a genusz szinten stabilnak mutatkozott a morfológiai bélyegek közül a serteállás, a porfirin alapú vörös pigmentáció és mézsmirigyek struktúrája. Ezzel szemben genusz szinten kevésbé alkalmazhatónak látszik a nefridium anatómiája, az ondóhólyagok elhelyezkedés, a hímivarnyílás hátratólódása.

Az Enchytraeidae családban az ITS régió megbízható eredményeket hozott, az elágazásokban magas bootstrap értékeket mutatott. Segítségével megállapítottuk, hogy a *Bryodrilus glandulosus* és a *Mesenchytraeus kuehnelti* fajok szinonimák a senior fajokkal, a *Br. ehlersi*-vel és a *M. pelicensis*-szel. Más esetekben sikerült igazolnunk megkérdőjelezett fajok validitását, mint a *Buchholzia subterranea* és az *Enchytronia christenseni*, valamint igazolódott az eddig le nem írt *E. sp. nov.* validitása. A *Fridericia* genuszban eredménnyel jártunk fajkomplexek problémáinak tisztázásában. A „*ratzei*”-csoporton belül igazoltuk a *F. eiseni* validitását, emellett egy új fajt is leírtunk *F. crassiductata* néven. Sikerült elkülöníteni a *F. bulboides*-től a *F. schmelzi*-t, valamint valid fajnak bizonyult a már korábban leírt *F.*

semisetosa. A szekvenciaelemzés nem igazolta a *F. bulboides* morfológiai variánsának faji szintű szeparációját. A *F. aurita*-nak négy morfológiai variánsát mutattuk ki, amelyek egyértelműen elváltak az ITS régió vizsgálata szerint. A *F. maculatiformis*-nak megtaláltuk egy 5 pár preklitelláris nefridiummal rendelkező változatát több lelőhelyről, amelyről a molekuláris vizsgálatok alapján felvetődik, hogy megindult a faji izoláció útján.

9. Abstract

The objective of the current work was to reveal the phylogenetic relationships in the family Lumbricidae and address the taxonomic problems of Enchytraeidae at the species level. We applied molecular methods to resolve the above questions. The targeted loci were the 18S rDNA and 5,8S rDNA-ITS2 region in the case of the earthworm family Lumbricidae and the ITS region of the potworms.

The 18S rDNA showed limited resolution at genus level in the family Lumbricidae due to its low variability, which was beneath our previous estimation. Therefore, we had to apply the less conservative ribosomal locus, the 5,8S rDNA-ITS2 region, which proved to be more effective in resolving phylogenetic relationships among the species. The most robust phylogenetic results were produced by the combined analysis of the two loci. We succeeded to prove monophyly of the genus *Eisenia* and demonstrate the close relationship between the genera *Bimastos* and *Dendrodrilus* and *Allolobophora eiseni*, while *Bymastos syriacus* was excluded from this clade as it was expected on morphological grounds. The molecular studies justified the apparent polyphyletic state of *Allolobophora* and *Aporrectodea* genera, and the validity of genera *Cernosvitovia*, *Helodrilus* and *Proctodrilus* has been questioned. The *Dendrobaena* species showed polyphyletic arrangement confirming our preconception, but the Central European and Balkanic species representing the classical *Dendrobaena* genus concept remained monophyletic. Some morphological characters proved to be robust at genus level even on the bases of molecular investigation, like setal ratio, porphyrin based pigmentation and the structure of calciferous glands. Others proved variable and thus more prone to homoplasy like the nephridial bladders, the number of vesicula seminales and the position of male pores.

The ITS region produced reliable results in the family Enchytraeidae, the nodes were supported by high bootstrap values. It helped us to synonymise the species *Bryodrilus glandulosus* and *Mesenchytraeus kuehnelti* with *Br. ehlersi* and *M. pelicensis*. Contrarily, the validity of *Buchholzia subterranea* and *Enchytronia christenseni*, and the recently undescribed *E. sp. nov.* were verified. We succeeded in resolving numerous issues of the problematic *Fridericia* species complexes. Within the „species group *F. ratzei*“, *F. eiseni* proved to be a valid species, and a new species was also discovered, *F. crassiductata*. We managed to separate *F. schmelzi* from *F. bulboides*, moreover *F. semisetosa* was proven to be a valid species. However, sequence analysis did not support the separation the *F. bulboides*

variants from the core species. Four morphological variants of *F. aurita* were found, and all of them were found to be separated from each other based upon sequence analyses. Several specimens of *F. maculatiformis* were collected with five pairs of praeclitellar nephridia. Our molecular studies showed that these specimens are at the beginning of species isolation.

10. Felhasznált irodalom

Abrahamsen, G., Thompson, W. N. (1979) A long term study of the enchytraeid (Oligochaeta) fauna of a mixed coniferous forest and the effects of urea fertilization. *Oikos* 32, 318-327.

Akaike, H., (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19, 716–723.

Anisimova, M., Gascuel, O. (2006) Approximate likelihood ratio test for branches: A fast, accurate and powerful alternative. *Syst Biol.* 55, 539-552.

Andrássy, I. (1955) Gyűrűsférgék I. Annelida I. Magyarország Állatvilága 3(10), 1–59.

Apakupakul, K., Siddall, M. E., Bureson, E. M. (1999) Higherlevel relationships of leeches (Annelida: Clitellata: Euhirudinea) based on morphology and gene sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 12, 350–359.

Bakker, F. T., Olsen, J. L., Stam, W. T., van De Hoek, C. (1992) Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) define discrete biogeographic groups in *Cladophora albida* (Chlorophyta). *J. Phycol.* 28, 839–845.

Beddard, F. E., (1895) A Monograph of the Order Oligochaeta. Clarendon Press, Oxford. 769 pp.

Bell, A. W. (1936) Three new species of *Fridericia* (Enchytraeidae) from California. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 41, 145-164, Pl. 10,11.

Bell, A. W. (1962) Enchytraeids (Oligochaeta) from various parts of the world. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* 81, 158-178.

Bely, A. E., Wray G. A. (2004) Molecular phylogeny of naidid worms (Annelida: Clitellata) based on cytochrome oxidase I. *Mol. Phylogen. Evol.* 30, 50-63.

Bouché, M. B. (1972) *Lombriciens de France. Ecologie et Systematique* INRA Publ. 72-2., Paris 1-671.

Brinkhurst, R. O., (1984) The position of the Haplotaxidae in the evolution of oligochaete annelids. *Hydrobiologia* 115, 25–36.

Brinkhurst, R. O., (1994) Evolutionary relationships within the Clitellata: an update. *Megadrilogica* 5, 109–112.

Briones, M. J. I, Morán, P., Posada, D. (2009) Are the sexual, somatic and genetic characters enough to solve nomenclatural problems in lumbricid taxonomy? *Soil Biol. Biochem.* 41, 2257–2271.

Brockmeyer, V. (1991) Isosymes and general protein patterns for use in discrimination and identification of Enchytraeus species (Annelida, Oligochaeta). *Z. Zool. Syst. Evol.* 29, 343–361.

Cameron, E. K., Bayne, E. M., Coltman, D. W. (2008) Genetic structure of invasive earthworms *Dendrobaena octaedra* in the boreal forests of Alberta: insights into introduction mechanisms. *Mol. Ecol.* 17, 1189–1197.

Carvalho, O. S., Cardoso, P. C. M., Pollanah, M. L., Rumi, A., Roche, A., Berne, E., Müller, G. Caldeira, R. L. (2004) The use of the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism technique associated with the classical morphology for characterization of *Lymnea columella*, *L. viatrix*, and *L. diaphana* (Mollusca: Lymnaeidae). *Mem. I. Oswaldo Cruz* 99, 503–507.

Castresana J. (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol.* 17, 540-552.

Cech, G., Dózsa-Farkas, K. (2005) Identification of *Fridericia schmelzi* sp.n. combining morphological characters and PCR-RFLP analysis. In V., Pop and A., Pop (eds.), *Advances in earthworm Taxonomy II (Annelida: Oligochaeta)*. University Press Cluj University Press.: 99-118.

Cech, G., Boros, G., Dózsa-Farkas, K. (2011) Revision of *Bryodrilus glandulosus* Dózsa-Farkas, 1990 and *Mesenchytraeus kuehnelti* Dózsa-Farkas, 1991 (Oligochaeta: Enchytraeidae) using morphological and molecular data. *Zool. Anz.* (in press)

Čekanovskaya, O. V., (1962) Aquatic Oligochaeta of the U.S.S.R. Akademia Nauk S.S.S.R., Moskva-Leningrad (oroszul). 411 pp.

Černosvitov, L. (1937): Die Oligochaetenfauna Bulgariens. Mitteilungen aus dem Königlich Naturwissenschaftlichen Institut. Sofia 10, 69–92.

Chalupský, J. (1988): Czechoslovak Enchytraeids (Oligochaeta, Enchytraeidae) II. Catalogue of species – Věst. čs. Společ. zool. 52: 81-95.

Chalupský, J. (1992) Terrstrial Enchytraeidae (Oligochaeta) and Parergodrilidae (Polychaeta) from Sweden, with description of a new enchytraeid species. *Zool. Scr.* 21, 133-150.

Chen, C.A., Chen, C.P., Fan, T.Y., Yu, J.K., Hsieh, H.L. (2002) Nucleotide sequences of ribosomal internal transcribed spacers and their utility in distinguishing closely related *Perinereis* Polychaets (Annelida; Polychaeta; Nereididae). *Marine Biotechnology* 4, 17–29.

Chen, C. A., Miller, D .J. (1996) Analysis of ribosomal ITS1 sequences indicates an ancient divergence between Caribbean and Red Sea/Indo-Pacific *Rhodactis* species (Cnidaria; Anthozoa; Corallimorpharia). *Mar. Biol.* 205, 423–423.

Christensen, B. (1961) Studies on cyto-taxonomy and reproduction in the Enchytraeidae. *Hereditas* 47, 387-449.

Christensen, B., Berg, U., Jelnes, J. (1976) A comparative study on enzyme polymorphism in sympatric diploid and triploid forms of *Lumbricillus lineatus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). *Hereditas* 84, 41–48.

Christensen, B., Jelnes, J. (1976) Sibling species in the oligochaete worm *Lumbricillus rivalis* (Enchytraeidae) revealed by enzyme polymorphisms and breeding experiments. *Hereditas* 83, 237–244.

Christensen, B., Jelnes, J., Berg, U. (1978) Long-term isosyme variation in parthenogenetic triploid forms of *Lumbricillus lineatus* (Enchytraeidae, Oligochaeta) in recently established environments. *Hereditas* 88, 65–73.

Christensen, B., Theisen, B. F. (1998) Phylogenetic status of the family Naididae (Oligochaeta, Annelida) as inferred from DNA analyses. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 36, 169–172.

Christensen, B., Dózsa-Farkas, K. (2007): *Achaeta pigmentosa* sp. n. from Borneo – with dorsal pores (Oligochaeta: Enchytraeidae) – Newsletter on Enchytraeidae No. 10: Proceedings of the 7th International Symposium on Enchytraeidae; May 25-28, 2006, Brno, Czech Republic. *Folia Facultatis Scientiarum Naturalium Universitatis Masarykianae Brunensis, Biologia.*, 110, 41-52.

Christensen, B., Glenner, H., (2010) Molecular phylogeny of Enchytraeidae (Oligochaeta) indicates separate invasions of the terrestrial environment. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 48, 208–212.

Coates, K. A. (1986) Redescription of the oligochaete genus *Propappus*, and diagnosis of the new family *Propappidae* (Annelida: Oligochaeta). *Proc. Biol. Soc. Wash.* 99, 417–428.

Cognetti, De Martiis L. (1931) Catalogo die Lumbricidi. *Archivio Zoologico Italiano* 15, 371-443.

Cutillas, C., Oliveros, R., de Rojas, M., Guevera, D. C. (2002) Determination of *Trichurus muris* from murid hosts and *T. arvicolae* (Nematoda) from arvicolid rodents by amplification and sequencing of the ITS1–5.8S–ITS2 segment of the ribosomal DNA. *Parasitol. Res.* 88, 574–582.

Csuzdi, Cs. (1984) A *Dendrobaena* nem revíziója összehasonlító morfológiai és anatómiai vizsgálatok alapján. Diplomamunka, Budapest pp. 84

Csuzdi, Cs. (2004) Towards a Phylogenetic Concept of Lumbricid Systematics. In: Moreno AG, Borges S (szerk.) *Advances in Earthworm Taxonomy (Annelida: Oligochaeta)*. Madrid: Editorial Complutense, 2004. pp. 333-346.

Csuzdi Cs., Zicsi A. (2003) Earthworms of Hungary (Annelida: Oligochaeta, Lumbricidae). *Pedozoologica Hungarica*, 1, 1-271.

Csuzdi Cs., Pop., A. A., Pop, V. V., Wink M., Zicsi, A. (2005) Revision of *Dendrobaena alpina* (Rosa, 1884) species group (Oligochaeta, Lumbricidae) by morphological and molecular methods. . In V., Pop and A., Pop (eds.), *Advances in earthworm Taxonomy II (Annelida: Oligochaeta)*. University Press Cluj University Press.: 119-129.

Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J. M., Gascuel, O. (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465-469.

De Wit, P., Erséus, C. (2010) Genetic variation and phylogeny of Scandinavian species of *Grania* (Annelida: Clitellata: Enchytraeidae), with the discovery of a cryptic species. *J. Zoo. Syst. Evol. Res.* 48, 285–293.

De Wit, P., Rota, E., Erséus, C. (2011) Phylogeny and character evolution in *Grania* (Annelida, Clitellata). *Zool. Scr.* 40, 509-519.

Dordel, J., Fisse, F., Purschke, G., Struck, T. H. (2010) Phylogenetic position of Sipuncula derived from multi-gene and phylogenomic data and its implication for the evolution of segmentation. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 48, 197–207.

Dover, G. (1982) Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299, 111–116.

Dózsa-Farkas, K. (1990) New Enchytraeid species from Sphagnum-bogs in Hungary (Oligochaeta: Enchytraeidae). *Acta Zool. Hung.*, 36, 3-4: 265-274.

Dózsa-Farkas, K. (1991) *Mesenchytraeus kuehnelti* sp. n., a new enchytraeid species (Oligochaeta: Enchytraeidae) from a Sphagnum-bog in Hungary. *Opusc. Zool. Budapest*, 24, 97-101.

Dózsa-Farkas, K. (2001) Az enchytraeida kutatások eredményei Magyarországon. Akadémiai Doktori tézisek. 1-56.

Dózsa-Farkas, K. (2005) *Fridericia eiseni* sp. n., a new enchytraeid species close to the *Fridericia ratzeli* (Eisen, 1872). *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences Biology Ecology* 54, 4: 279–291.

Dózsa-Farkas, K. (2008) Taxonomical importance of spermatheca (receptaculum seminis) with special attention to Enchytraeidae (Annelida: Oligochaeta). In: Pavlíček T. and Cardet P. (Eds.) *Advances in Earthworm Taxonomy III (Annelida: Oligochaeta)*. *Proceedings of the 3rd International Taxonomy Meeting (3rd IOTM), Platres, Cyprus, April 2nd to 6th 2007*. Lefkosia: En Tipis Publications 37-62 .

Dózsa-Farkas, K. (2010) Significance of using nephridia in the taxonomy of family Enchytraeidae, *Advances in Earthworm Taxonomy IV (Annelida: Oligochaeta)*. *Zoology in the Middle East, Supplementum 2*, 41-53.

- Dózsa-Farkas, K., Cech, G. (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.
- Dutilh, B. E., van Noort, V., van der Heijden, R. T. J. M., Boekhout, T., Snel, B., Huynen, M. A. (2007) Assessment of phylogenomic and orthology approaches for phylogenetic inference. *Bioinformatics* 2007, 23, 815-824.
- Dumont, H. J., Vanfleteren, J. R., De Jonckhere, J. F., Weekers, P. H. H. (2005) Phylogenetic relationships, divergence time estimation, and global biogeographic patterns of calopterygoid damselflies (Odonata, Zygoptera) inferred from ribosomal DNA sequences. *Syst. Biol.* 54, 347-362.
- Edgar R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Eisen, G. (1873) Om Skandinaviens Lumbricider. Öfversigt af Kongliga Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar. 30, 43-56.
- Eisen, G. (1874) New Englands och Canadas Lumbricider. Öfversigt af Kongliga Vetenskaps-Akademiens Förhandlingar 31(2), 41-49.
- Eisen, G. (1904) Enchytraeidae of the West Coast of North America. Harriman Alaska Series, New York, 12, 1-126 + 20 pl.
- Erséus C. (1987) Phylogenetic analysis of aquatic Oligochaeta under the principle of parsimony. *Hydrobiologia* 155, 75-89.
- Erséus, C. (1990) Cladistic analysis of the subfamilies within the Tubificidae (Oligochaeta). *Zool. Scr.* 19, 57-63.
- Erséus, C., (2005) Phylogeny of oligochaetous Clitellata. *Hydrobiologia* 535 (536), 357-372.

- Erséus, C., Prestegard, T., Källersjö, M. (2000) Phylogenetic analysis of Tubificidae (Annelida: Clitellata) based on 18S rDNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 15, 381-389.
- Erséus, C., Källersjö, M., Ekman, M., Hovmöller, R. (2002) 18S rDNA phylogeny of Tubificidae (Annelida) and its constituents taxa: Dismissal of Naididae. *Mol. Phylogen. Evol.* 22, 414-422.
- Erséus, C., Rota, E. (2003) New findings and an overview of the oligochaetous Clitellata (Annelida) of the North Atlantic deep sea. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 116, 892–900.
- Erséus, C., Källersjö, M. (2004) 18S rDNA phylogeny of Clitellata (Annelida). *Zool. Scr.* 33, 187-196.
- Erséus, C., Wetzel, M. J., Gustavsson, L., (2008) ICZN rules—a farewell to Tubificidae (Annelida, Clitellata). *Zootaxa* 1744, 66–68.
- Erséus, C., Envall, I., Marchese, M., Gustavsson, L., (2010a) The systematic position of Opistocystidae (Annelida, Clitellata) revealed by DNA data. *Mol. Phylogen. Evol.* 54, 309–313.
- Erséus, C., Rota, E., Matamoros, L., De Wit P. (2010b) Molecular phylogeny of Enchytraeidae (Annelida, Clitellata). *Mol. Phylogen. Evol.* 57, 849–858.
- Ferraguti, M., Erseúus, C., Kaygorodova, I., and Martin, P. (1999) New sperm types in Naididae and Lumbriculidae (Annelida: Oligochaeta) and their possible phylogenetic implications. *Hydrobiologia* 406, 213–222.
- Fritz, G. N., Conn, J., Cockburn, A., Seawright, J. (1994) Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae). *Mol. Biol. Evol.* 11, 406–416.
- Gadagkar, S. R., Rosenber, M. S., Kumar, S. (2005) Inferring species phylogenies from multiple genes: Concatenated sequence tree versus consensus gene tree. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* 304B, 64-74.

Gates, G. E. (1969) On two American genera of the earthworm family Lumbricidae. *J. Nat. Hist.* 9, 305-307.

Gates, G. E. (1975) Contributions to a revision of the earthworm family Lumbricidae XII. Enterion mammale Savigny, 1826 an its position in the family. *Megadrilogica* 2, 1-5.

Gelder, S. R., Siddall, M. E. (2001) Phylogenetic assessment of the Branchiobdellidae (Annelida, Clitellata) using 18S rDNA, mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I and morphological characters. *Zool. Scr.* 30, 215–222

Gerbi, S. (1985). Evolution of ribosomal RNA. In: *Molecular Evolutionary Genetics*, MacIntyre, R.J. (ed). New York, N.Y.: Plenum, 419–517.

Giani, N. (1976) Les Oligochaetes aquatiques du Sud-Quest de la France. *Ann. Limnol.* 12, 2: 107-125.

Guindon, S., Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 52, 696-704.

Gustafsson, D. R., Price, D. A., Erséus, C. (2009) Genetic variation in the popular lab worm *Lumbriculus variegatus* (Annelida: Clitellata: Lumbriculidae) reveals cryptic speciation. *Mol. Phylogen. Evol.* 51, 182-189.

Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.

Healy, B. (1980) Records of Enchytraeidae (Oligochaeta) from Western-France and the Pyrenees. *Bull. Mus. natn.. Hist. nat. Paris* 4,2, sec. A,2: 421-4443.

Heethoff, M., Etzold, K., Scheu, S. (2004) Mitochondrial COII sequences indicate that the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Savigny 1826) constitutes of two lineages differing in body size and genotype. *Pedobiologia* 48, 9–13.

Hess, R. T. (1970) The fine structure of of coelomocytes in the annelid *Enchytraeus fragmentosus*. J. Morph. 132, 335-352.

Hartzell, P. L., Nghiem, J. V., Richio, K. J., Shain, D. H., (2005) Distribution and phylogeny of glacier ice worms (*Mesenchytraeus solifugus* and *Mesenchytraeus solifugus rainierensis*). Can. J. Zool. 83, 1206–1213.

Hillis, D.,M., Dixon, M. T. (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Q. Rev. Biol. 66, 411–453.

Issel, R. (1905) Oligocheti inferiori della fauna italiana. Zool. Jahrb. Anat. 22, 451-476.

Jamieson, B. G. M. (1988) On the phylogeny and higher classification of the Oligochaeta. Cladistics 4, 367–410.

Jamieson, B. G. M., Tillier, S., Joustine, J., Ling, E., James, S., McDonald, K., Hugall, A. F. (2002) Phylogeny of the Megascolecidae and Crassiclitellata (Annelida, Oligochaeta): combined versus partitioned analysis using nuclear (28S) and mitochondrial (12S, 16S) rDNA. Zoosystema 24, 707-734.

Kane, R. A., Rollinson, D. (1994) Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheii*. Mol. Biol. Parasit. 63, 153-156.

Kasprzak, K. (1984) The previous and contemporary conceptions on phylogeny and systematic classifications of Oligochaeta (Annelida). Ann. Zool. Warszawa 38, 205–223.

Kasprzak, K. (1986) Skąposzczety wodne i glebowe II – Polska Akad. Nauk Inst. Zool. Warszawa 1-366

Kautenburger R. (2006) Genetic structure among earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) from different sampling sites in western Germany based on random amplified polymorphic DNA Pedobiologia 50, 257—266

King, R. A., Tibble, A. L., Symondson, O. C. (2008) Opening a can of worms: unprecedented sympatric cryptic diversity within British lumbricid earthworms. *Molecular Ecology* 17, 4684–4698.

Kooistra, W. H. C. F. (1992) Biogeography of *Cladophoropsis membranacea* (Chloropnyta) based on comparisons of nuclear rDNA ITS sequences. *J. Phycol.* 28, 660–668.

Kupczok, A., Schmidt, H. A., von Haeseler, A. (2010) Accuracy of phylogeny reconstruction methods combining overlapping gene data sets. *Algorithms Mol. Biol.* 5, 37.

Kvavadze, E. S. (1985) The Earthworms (Lumbricidae) of the Caucasus. Metsniereba, Tbilisi, 237 pp.

Kvavadze, E. S. (1993): A new genus of earthworms *Omodeoia* gen. nov. (Oligochaeta: Lumbricidae). *Bulletin of the Academy of Sciences of Georgia* 148, 129–134.

Kvist, S, Sarkar, I. N., Erséus, C. (2010) Genetic variation and phylogeny of the cosmopolitan marine genus *Tubificoides* (Annelida: Clitellata: Naididae: Tubificinae). *Mol. Phylogen. Evol.* 57, 687-702.

Lee, S. B., Taylor, J. W. (1992) Phylogeny of five fungus-like protistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Mol. Biol. Evol.* 9, 636–653.

Lentzsch, P., Gollmack, J. (2006) Genetic diversity of *Aporrectodea caliginosa* from agricultural sites in Northeast Brandenburg, Germany. *Pedobiologia* 50, 369–376.

Marotta, R., Ferraguti, M., Erséus, C., Gustavsson, L. M., (2008) Combined-data phylogenetics and character evolution of Clitellata (Annelida) using 18S rDNA and morphology. *Zool. J. Linn. Soc.* 154, 1–26.

Martin, P. (2001) On the origin of the Hirudinea and the demise of the Oligochaeta. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268, 1089–1098.

McHugh, D. (1997) Molecular evidence that echiurans and pogonophorans are derived annelids. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94, 8006–8009.

Michaelsen, W. (1900) *Oligochaeta*. In: *Das Tierreich X*. Friedländer & Sohn, Berlin, pp. 575.

Michaelsen, W. (1910) Zur Kenntnis der Lumbriciden und ihrer Verbreitung. *Annuaire du Musée Zoologique de l'Académie Impériale des Sciences de St. Pétersbourg*. 15, 1-74.

Michaelsen, W., (1928) Clitellata = Gürtelwürmer. Dritte Klasse der Vermes Polymere (Annelida). *Handbuch der Zoologie*, vol. 2. Kükenthal & Krumbach, Berlin, pp. 1–112 (103 figs).

Milne, I., Lindner, D., Bayer, M., Husmeier, D., McGuire, G., Marshall, D. F., Wright, F., (2008) TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics* 25, 126-127.

Moore, H. J. (1893): Preliminary account of a new genus of Oligochaeta. *Zool. Anz.* 16, 333-334.

Morgan, J. A. T., Blair, D. (1998) Trematode and Monogenean rRNA ITS2 secondary structure support a four-domain model. *J. Mol. Evol.* 47, 406–419.

Möller, F. (1971) Systematische Untersuchungen an terricolen Enchytraeiden einiger Grünlandstandorte im Bezirk Potsdam. *Mitt. Zool. Mus. Berlin*, 47: 131–167.

Mršič, N. (1990) Description of a new subgenus, three new species and taxonomic problems of the genus *Allolobophora* sensu Mršič & Šapkarev 1988 (Lumbricidae, Oligochaeta). *Bioloski vestnik Ljubljana* 38, 49-86.

Mršič, N. (1991) Monographs on earthworms (Lumbricidae) of the Balkans. *Academia scientiarum et artium Slovenica, Historia naturalis, Ljubljana*, 31, I: 1-355; II: 356-757.

- Mršič, N., Šapkarev, J. (1988) Revision of the genus *Allolobophora* Eisen 1874 (emend. Pop 1941)(Lumbricidae, Oligochaeta). Acta. Mus. Mac. Sci. Nat., 1(154), 1-38.
- Muldal, S. (1952) A new species of earthworm of the genus *Allolobophora*. Proc. Zool. Soc. London 122, 463-465.
- Nielsen, C. O., Christensen, B. (1959) The Enchytraeidae. Critical revision and taxonomy of European species (studies on Enchytraeidae VII). Nat. Jutl. 8-9, 1-160.
- Nielsen, C. O., Christensen, B. (1961) The Enchytraeidae. Critical revision and taxonomy of European species. Supplement 1. Nat. Jutl. 10, 1-23.
- Nielsen, C. O., Christensen, B. (1963) The Enchytraeidae. Critical revision and taxonomy of European species. Supplement 2. Nat. Jutl. 10, 1-19.
- Nurminen, M. (1967) Faunistic notes on North-European enchytraeids (Oligochaeta). Ann. Zool. Fenn. 4: 567-587.
- Odorico, D., Miller, D. J. (1997) Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5.8S rDNA among five species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): variation consistent with reticulate evolution. Mol. Biol. Evol. 14, 465-473.
- Ohta, T., Dover, G. A. (1983) Population genetics of multigene families that are dispersed into two or more chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4079-4083.
- Omodeo P. (1956) Contributo alla revisione dei Lumbricidae. Arch. Zool. It. 41, 129-242.
- Omodeo, P., (1998) History of Clitellata. Ital. J. Zool. 65, 51-73.
- Omodeo, P., (2000) Evolution and biogeography of megadriles (Annelida, Clitellata). Ital. J. Zool. 67, 179-201.
- Omodeo, P., Rota, E. (1989) Earthworms of Turkey. Boll. Zool. 56, 167-199.

Órley, L. (1881) A magyarországi Oligochaeták faunája. I. Terricolae. Matematikai és Természettudományi Közlemények 16, 562–611.

Órley, L. (1885) A palaearktikus övben élő Terrikoláknak revíziója és elterjedése. Értekezések a Természettudományok Köréből 15, 1–34.

Page, R. D. M., and Holmes, E. C. (1998) *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach*. London: Blackwell.

Perel, T. S. (1968) The structure of muscle bundles in earthworms as systematic and phylogenetic character. *Zoologicheski Zhurnal* 47, 200–211.

Perel, T. S. (1972) Species of the genus *Dendrobaena* in the fauna of the USSR. *Zoologicheski Zhurnal* 51, 1788–1797.

Perel, T. S. (1976a) A critical analysis of the Lumbricidae genera system. *Rev. Écol. Biol. Sol.* 13, 635–643.

Perel, T. S. (1976b) A critical analysis of the system of family Lumbricidae. *Zoologicheski Zhurnal* 55, 823–836.

Perel, T. S. (1979): Range and regularities in the distribution of earthworms of the USSR fauna. Nauka, Moscow, 272 pp.

Perel, T. S. (1997) The earthworms of the fauna of Russia. Nauka, Moscow, 97 pp.

Pérez-Losada, M., Eiroa, J., Mato, S., Dominguez, J. (2005) Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouche, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Pedobiologia* 49, 317–324.

Pérez-Losada, M., Ricoy, M., Jonathon J. C., Domínguez J. (2009) Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 52, 293–302.

Perrot-Minnot, M. J. (2004) Larval morphology, genetic divergence, and contrasting levels of host manipulation between forms of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). Int. J. Parasitol. 34, 45-54.

Pool, G. (1937): *Eiseniella tetraedra* (Sav.) Ein Beitrag zur vergleichenden Anatomie und Systematik der Lumbriciden. Acta Zool-Stockholm 18, 1–110.

Pop, A. A., Wink, M., Pop, V. V. (2003) Use 18S, 16S rDNA and Cytochrome c oxidase sequences in earthworm taxonomy (Oligochaeta, Lumbricidae). Pedobiologia 47, 428-433.

Pop, A. A., Csuzdi, Cs., Wink, M., Pop, V. V. (2005) An attempt to reconstruct the molecular phylogeny of genus *Allolobophora* Eisen, 1874 (sensu lato, Pop, 1941) using 16S rDNA and COI sequences (Oligochaeta, Lumbricidae). In V., Pop and A., Pop (eds.), Advances in earthworm Taxonomy II (Annelida: Oligochaeta). University Press Cluj. pp. 119-129.

Pop, A. A., Cech, G., Wink, M., Csuzdi, Cs., Pop V. V. (2007) Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). Eur. J. Soil Biol. 43, S43-S52.

Pop, A. A., Csuzdi, Cs., Wink, M., Pop, V. V. (2008) Molecular taxonomy and phylogeny of the genera *Octolasion* Örley, 1885, *Octodrilus* Omodeo, 1956 and *Octodriloides* Zicsi, 1986 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on 16S and COI DNA sequences. In: Pavlíček T., Cardet P. (szerk.) Advances in Earthworm Taxonomy III.. Nicosia: Imprinta LTD Nicosia., pp. 109-125.

Pop, A. A., PoP, V. V., Csuzdi, Cs. (2010) Significance of the Apuseni Mountains (the Carpathians) in the origin and distribution of Central European earthworm fauna (Oligochaeta: Lumbricidae). Zoology in the Middle East 49,(S2) 89-110.

Pop, V. (1941) Zur Phylogenie und Systematik der Lumbriciden, Zool. Jahrb. (Syst.). 74, 487-522.

- Pop, V. (1948) Lumbicidele din România. Anal. Acad. Republicii Populare Romane, Sect. Stiinte Geologice, Geografice, Biologice. Ser. A, Mem., 9, 383-506.
- Pop, V. (1964) New faunistic and systematic data on the Romanian Lumbricids (Oligochaeta). Studia Univ. Babeş-Bolyai Cluj, Ser. Biol. 2, 106-116.
- Pop, V. V. (1972) Contributions to the study of Lumbricids (Oligochaeta) from the Retezat National Park. Ocrotirea Naturii, Bucharest. 16, 33-41.
- Posada D. (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Mol. Biol. Evol. 25, 1253-1256.
- Qiu, J. P., Bouché M. B. (1998) Revision des taxons supraspécifiques de Lumbricoidea. Documents Pédozoologiques et limnologiques 3,6, 179-216.
- Richards, S. (1980) The histochemistry and ultrastructure of the coelomocytes of species of *Lumbricillus*, and observation on certain other enchytraeid genera (Oligochaeta: Annelida). J. Zool. Lond. 191, 557-577.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17, 754-755.
- Rojas, M. de, Mora. M.D., Ubeda, J.M., Cutillas, C., Navajas, M. & Guevera, D.C. (2002) Phylogenetic relationships in rhynonyssid mites (Acari: Rhynonyssidae) based on ribosomal DNA sequences: insights for the discrimination of closely related species. Parasitol. Res. 88, 675-681.
- Rosa, D. (1893) Revisione dei lumbricidi. Memoire della Reale Academia delle Scienze di Torino (Serie 2) 43, 399-477.
- Rota, E. (1993) Contribution to the taxonomy of the Hormogastridae (Annelida: Oligochaeta) with description of two new species from southern France. J. Nat. Hist. 28, 27-36.

Rota, E., (1994) Enchytraeidae (Annelida: Oligochaeta) of the Mediterranean Region: A taxonomic and biogeographic study. Doctorate dissertation. National University of Ireland, University College Dublin. 255 pp.

Rota, E. (1995) Italian Enchytraeidae (Oligochaeta). I. Boll. Zool. 62, 183-231.

Rota, E., Healy, B. (1999) A taxonomic study of some Swedish Enchytraeidae (Oligochaeta), with descriptions of four new species and notes on the genus *Fridericia*. J. Nat. Hist. 33, 29-64.

Rota, E., Brinkhurst R. O. (2000) *Mesenchytraeus antaeus*, a new giant enchytraeid (Annelida, Clitellata) from the temperate rainforest of British Columbia, Canada, with a revised diagnosis of the genus *Mesenchytraeus*. The Journal of Zoology, London 252, 27–40.

Rota, E., Erséus, C. (2003) New records of *Grania* (Clitellata, Enchytraeidae) in the Northeast Atlantic (from Tromsø to the Canary Islands), with descriptions of seven new species. Sarsia 88, 210–243.

Rousset, V., Pleijel, F., Rouse, G. W., Erséus, C., Siddall, M. E. (2007) A molecular phylogeny of annelids. Cladistics 23, 41–63.

Rousset, V., Plaisance, L., Erséus, C., Siddall, M. E., Rouse, G. W. (2008) Evolution of habitat preference in Clitellata (Annelida). Biol. J. Linn. Soc. 95, 447–464.

Schirmacher, A., Schmidt, H., Westheide, W. (1998) RAPD-PCR investigations on sibling species of terrestrial Enchytraeus (Annelida: Oligochaeta). Biochem. Syst. Ecol. 26, 35–44.

Schlaghamerský J.; Pižl V. (2009) Enchytraeids and earthworms (Annelida: Clitellata: Enchytraeidae, Lumbricidae) of parks in the city of Brno, Czech Republic. – Soil Organisms 81 (2) 145–173.

Schlaghamerský, J. (2010) The small annelids (Annelida: Enchytraeidae, Rhyacodrilinae, Aeolosomatidae) in soils of three forests in the White Carpathians (Czech Republic). Acta Soc. Zool. Bohem. 74, 103-115.

Schlötterer, C., Hauser, M.-T., von Haeseler, A., and Tautz, D. (1994) Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 11, 513–522.

Schmelz, R. M. (1996) Additional morphological traits facilitate enchytraeid speciesdetermination. *Newsletter on Enchytraeidae*. 5, 45-46.

Schmelz, R. M. (1998) Description of *Fridericia montafonensis* sp. n. (Enchytraeidae, Oligochaeta) from an Austrian meadow. *Mitt. Hamb. Zool. Mus. Inst.* 95, 79-88.

Schmelz, R. M. (2003) Taxonomy of *Fridericia* (Oligochaeta, Enchytraeidae). Revision of species with morphological and biochemical methods. pp. 414, Fig 73. Naturwissenschaftlicher Verein in Hamburg.

Schmelz, R. M., Collado, R., Myohara, M. (2000) A taxonomic study of *Enchytraeus japonensis* (Enchytraeidae, (Oligochaeta): Morphological and Biochemical comparisons with *E. bigeminus*. *Zool. Sci.* 17, 505–516.

Schmelz, R., Arslan N., Bauer B., Wim Didden W., Dózsa-Farkas K. (2005) Estonian Enchytraeidae (Oligochaeta) 2. Results of a faunistic workshop held in May 2004. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences Biol. Ecol.* 54, 255-270.

Schmelz, R. M., Collado, R. (2010) A guide to European terrestrial and freshwater species of Enchytraeidae (Oligochaeta). *Soil Org.* 82, 1-176.

Siddall, M. E., Apakupakul, K., Burreson, E. M., Coates, K. A., Erséus, C., Källersjö, M., Gelder, S. R., Trapido-Rosenthal, H. (2001) Validating Livanow: molecular data agree that leeches, branchiobdellidans and Acanthobdella peledina are a monophyletic group of oligochaetes. *Mol. Phylogen. Evol.* 21, 346–351.

Sims, R. W., Gerard, B. M. (1999) Earthworms. *Synopses of the British Fauna (New series)*. No. 31 The Linnean Society of London and the Estuarine and Coastal sciences Association, London, 169 pp.

Smith, F., Welch, P. S. (1913) Some new Illinois Enchytraeidae. Bull. Ill. St. Lab. Nat. Hist., 9 (12), 615-636 + Pl. 98-102.

Stothard, J. R., Hughes, S., Rollinson, D. (1996) Variation within the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA genes of intermediate snail hosts within the genus *Bulinus* (Gastropoda: Planorbidae). Acta Tropica 61, 19–29.

Struck, T. H., Hessling, R., Purschke, G. (2002) The phylogenetic position of the Aeolosomatidae and Parergodrilidae, two enigmatic oligochaete-like taxa of the ‘Polychaeta’, based on molecular data from 18S rDNA sequences. J. Zool. Syst. Evol. Research 40, 155–163.

Struck, T. H., Schult, N., Kusen, T., Hickman, E., Bleidorn, C., McHugh, D., Halanych, K. M., (2007) Annelid phylogeny and the status of Sipuncula and Echiura. BMC Evol. Biol. 7 (57), 1–11.

Struck, T. H., Nesnidal, M. P., Purschke, G., Halanych, K. M. (2008) Detecting possibly saturated positions in 18S and 28S sequences and their influence on phylogenetic reconstruction of Annelida (Lophotrochozoa). Mol. Phylogenet. Evol. 48, 628–645.

Struck T. H., Paul, C., Hill, N., Hartmann, S., Hösel, C., Kube, M., Lieb, B., Meyer, A., Tiedemann, R., Purschke, G., Bleidorn, C. (2011) Phylogenomic analyses unravel annelid evolution. Nature. 3; 471 (7336), 95-8.

Subbotin S. A., Vierstraete A., De Ley P., Rowe J., Waeyenberge L., Moens M., Vanfleteren J. R. (2001) Phylogenetic relationships within the cyst-forming Nematodes (Nematoda, Heteroderidae) based on analysis of sequences from the ITS region of ribosomal DNA. Mol. Phylogenet. Evol. 21, 1–16.

Szűts, A. (1909): Magyarország Lumbricidái. Állattani közlemények 8, 120–142.

Szűts, A. (1913) Die Archaeo- und Neolumbricinen. Zoologischer Anzeiger 42, 337–351.

Svetlov, P. G. (1924) Beobachtungen über Oligochaeten des Gouvernat Perm. I. Zur Systematik, Fauna und Oekologie der Regenwürmer. Bulletin Institut Res. Biol. Perm 2, 313-328.

Tamura, K., Nei, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Mol. Biol. Evol. 10, 512-526.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol. Biol. Evol. 28, 2731-2739.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673-4690.

Timm, T., (1981) On the origin and evolution of aquatic Oligochaeta. Eesti NSV Tead. Akad. Toim. (Biol.) 30, 174-181.

van Oppen, M. J. H., Willis, B. L., Van Vugt, H. W. J. A., Miller D. J. (2000) Examination of species boundaries in the *Acropora cervicornis* (Scleractinia, Cnidaria) using nuclear DNA sequence analyses. Mol. Ecol. 9, 1363-1374.

Vidigal, T. H. D. A., Spatz, L., Kissinger, J. C., Redondo, R. A. F., Pires, E. C. R., Simpson, A. J. G., Carvalho, O. S. (2004) Analysis of the first and second internal transcribed spacer sequences of the ribosomal DNA in *Biomphalaria tenagophila* complex (Mollusca: Planorbidae). Mem. I. Oswaldo Cruz 99, 153-158.

Vogler, A. P., and DeSalle, R. (1994) Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindella dorsalis*. Mol. Biol. Evol. 11, 393-405.

Wang, H., Xie, Z. C., Liang, Y. L. (1999) Records on Enchytraeidae (Clitellata) from the People's Republic of China. Hydrobiologia 406, 57-66.

Weekers, P. H. H., De Jonckheere, J. F., Dumont, H. J. (2001) Phylogenetic relationships inferred from ribosomal ITS sequences and biogeographic patterns in representatives of the genus *Calopteryx* (Insecta: Odonata) of the West Mediterranean and adjacent West European Zone. *Mol. Phylogen. Evol.* 20, 89–99.

Wheeler, W. C., Honeycutt, R. C. (1988) Paired sequence difference in ribosomal RNAs: Evolutionary and phylogenetic implications. *Mol. Biol. Evol.* 5, 90–96.

Welch, P. S. (1914) Studies on the Enchytraeidae of North America. *Bull. Ill. St. Lab. Nat. Hist.*, 10, 123-211 + Pl. 8-12.

Westheide, W., Graefe, U. (1992) Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta: Annelida) *J. Nat. Hist.* 26, 479-488.

Yamaguchi, H. (1953) Studies on aquatic Oligochaeta of Japan. VI. A systematic report with some remarks on the classification and phylogeny of the Oligochaeta. *J. Fac. Sci., Hokkaido Univ.*, s. 6, *Zool.* 11, 277–341.

Zicsi, A. (1959a) Faunistisch-systematische und ökologische Studien über die Regenwürmer Ungarns. I. *Acta zoologica hungarica* 5, 165–189, 401–447.

Zicsi, A. (1959b) Faunistisch-systematische und ökologische Studien über die Regenwürmer Ungarns. II. *Acta zoologica hungarica* 5, 401–447.

Zicsi, A. (1963) Beobachtungen über die Lebensweise des Regenwurmes *Allolobophora dubiosa* (Örley 1880). *Acta Zool. Hung.* 9, 219–236.

Zicsi, A. (1974) A struktúra és funkció kapcsolata teresztrikus ökoszisztémák földigilisztáinak tevékenysége tükrében. Doktori értekezés, Budapest, 303 pp.

Zicsi, A. (1978) Revision der Art *Dendrobaena platyura* (Fitzinger, 1833) (Oligochaeta: Lumbricidae), *Acta Zool. Hung.* 24, 439-449.

Zicsi, A. (1981) Probleme der Lumbriciden-Systematik sowie die Revision zweier Gattungen (Oligochaeta). *Acta Zool. Acad. Sci. Hungaricae* 27, 431-442.

Zicsi, A. (1982) Verzeichnis der bis 1971 beschriebenen und revidierten Taxa der Familie Lumbricidae (Oligochaeta). *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 28, 421-454.

Zicsi, A. (1985) Über die Gattungen *Helodrilus* Hoffmeister, 1845 und *Proctodrilus* gen. n. (Oligochaeta, Lumbricidae). *Acta. Zool. Acad. Sci. Hungaricae* 31, 275-289.

Zicsi, A. (1986): Über die taxonomischen Problemeder Gattung *Octodrilus* Omodeo, 1956 und *Octodriloides* gen. n. (Oligochaeta: Lumbricidae). *Opuscula zoologica Budapest* 22, 103–112.

Zicsi, A. (1991) Über die Regenwürmer _Ungarns (Oligochaeta: Lumbricidae) mit Bestimmungstabellen der Arten. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Österreich.* 131, 47-74.

Zicsi, A., Michalis, K. (1993) Zwei neue *Dendrobaena*-Arten aus Griechenland (Oligochaeta: Lumbricidae). *Acta Zool. Hung.* 39, 301-310.

11. Fűggelék

Függelék I. A Lumbricidae család osztályozása különböző szerzők munkáiban

Michalisen 1900	Pop 1941	Omodeo 1956	Bouché 1972	Gates 1976	Perel 1979	Zsicsi 1978-1986	Omodeo 1988-1991	Miric 1991	Qu és Bouché, 2000	Csuzdi és Zsicsi, 2003
<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus</i>	<i>Lumbricus</i>
<i>Eisenella</i>	<i>Eisenella</i>	<i>Eisenella</i>	<i>Eisenella</i>	<i>Eisenella</i>	<i>Eisenella</i>	<i>Eisenella</i>	<i>Eisenella</i>	<i>Eisenella</i>	<i>Eisenella</i>	<i>Eisenella</i>
			<i>Octodrilus</i>	<i>Octodrilus</i>		<i>Octodrilus</i>	<i>Octodrilus</i>	<i>Octodrilus</i>	<i>Octodrilus</i>	<i>Octodrilus</i>
<i>Eisenia</i>	<i>Eisenia</i>	<i>Eisenia</i>	<i>Eisenia</i>	<i>Eisenia</i>	<i>Eisenia</i>	<i>Eisenia</i>	<i>Eisenia</i>	<i>Octariolides</i>	<i>Octariolides</i>	<i>Octariolides</i>
								<i>Eisenia</i>	<i>Eisenia</i>	<i>Eisenia</i>
								<i>Allolobophora-sidella</i>	<i>Allolobophora-sidella</i>	<i>Allolobophora-sidella</i>
								<i>Eisenoides</i>	<i>Eisenoides</i>	<i>Eisenoides</i>
			<i>Eophila</i>	<i>Eophila</i>				<i>Eophila</i>	<i>Eophila</i>	<i>Eophila</i>
<i>Helodrilus</i>			<i>Helodrilus</i>	<i>Helodrilus</i>	<i>Helodrilus</i>	<i>Helodrilus</i>	<i>Helodrilus</i>	<i>Helodrilus</i>	<i>Helodrilus</i>	<i>Helodrilus</i>
<i>Dendrobaena</i>	<i>Dendrobaena</i>	<i>Dendrobaena</i>	<i>Dendrobaena</i>	<i>Dendrobaena</i>	<i>Dendrobaena</i>	<i>Dendrobaena</i>	<i>Dendrobaena</i>	<i>Dendrobaena</i>	<i>Dendrobaena</i>	<i>Dendrobaena</i>
			<i>Dendrodrilus</i>	<i>Dendrodrilus</i>	<i>Dendrodrilus</i>	<i>Fitzingeria</i>	<i>Dendrodrilus</i>	<i>Dendrodrilus</i>	<i>Dendrodrilus</i>	<i>Dendrodrilus</i>
								<i>Satchellius</i>	<i>Satchellius</i>	<i>Satchellius</i>
				<i>Kritodrilus</i>	<i>Kritodrilus</i>			<i>Kritodrilus</i>	<i>Kritodrilus</i>	<i>Kritodrilus</i>
								<i>Camaedrilus</i>	<i>Camaedrilus</i>	<i>Camaedrilus</i>
<i>Bimastos</i>		<i>Bimastos</i>		<i>Bimastos</i>		<i>Bimastos</i>	<i>Bimastos</i>	<i>Bimastos</i>	<i>Bimastos</i>	<i>Bimastos</i>
							<i>Spermophorogilia</i>	<i>Spermophorogilia</i>	<i>Spermophorogilia</i>	
<i>Allolobophora</i>	<i>Allolobophora</i>	<i>Allolobophora</i>	<i>Allolobophora</i>	<i>Allolobophora</i>	<i>Allolobophora</i>	<i>Allolobophora</i>	<i>Allolobophora</i>	<i>Allolobophora</i>	<i>Allolobophora</i>	<i>Allolobophora</i>
					<i>Scoloparia</i>			<i>Perelia</i>	<i>Perelia</i>	<i>Perelia</i>
			<i>Nicodrilus</i>	<i>Aporrectodea</i>	<i>Nicodrilus</i>			<i>Nicodrilus</i>	<i>Aporrectodea</i>	<i>Aporrectodea</i>
									<i>Heracenscolex</i>	
									<i>Avetona</i>	
									<i>Marchionia</i>	<i>Marchionia</i>
			<i>Rhodoneta</i>					<i>Critella</i>		
			<i>Sherotheca</i>					<i>Sherotheca</i>	<i>Sherotheca</i>	<i>Sherotheca</i>
									<i>Eumenescolex</i>	
									<i>Pietromedusa</i>	
									<i>Zaphanocolex</i>	
						<i>Cernomyxina</i>	<i>Cernomyxina</i>	<i>Cernomyxina</i>	<i>Cernomyxina</i>	<i>Cernomyxina</i>
									<i>Postandrilus</i>	
									<i>Zicsona</i>	
									<i>Microcephala</i>	
									<i>Finnsonema</i>	
									<i>Karpato-dinaritona</i>	
									<i>Bulobulakuntona</i>	
									<i>Alpodonuridella</i>	
									<i>Dinardella</i>	
									<i>Serhiona</i>	
									<i>Mersvandriella</i>	
			<i>Praxelodrilus</i>						<i>Praxelodrilus</i>	
			<i>Ehndrilus</i>						<i>Ehndrilus</i>	
			<i>Oreodrilus</i>						<i>Oreodrilus</i>	<i>Oreodrilus</i>
			<i>Escutoma</i>						<i>Escutoma</i>	<i>Escutoma</i>

Függelék II. Feldolgozott minták a Lumbricidae családban

Sorszám	Faj	Gyűjtés helye és ideje
6	<i>Bimastos tumidus</i> (Eisen, 1874)	USA, Baltimore, Cross Keys. 2002. 11. 13. Leg. Csuzdi
7	<i>Dendrodrilus rubidus</i> (Savigny, 1826)	USA, Baltimore, Cross Keys. 2002. 11. 13. Leg. Csuzdi
9	<i>Dendrodrilus subrubicundus</i> (Eisen, 1873)	USA, Baltimore, JHU Campus. 2002. 11. 08. Leg. Csuzdi
10	<i>Allolobophora eiseni</i> (Levinsen, 1884)	Magyarország, Bábaapáti. 2002. 06. 13. Leg. Csuzdi
19	<i>Dendobaena clujensis</i> (Pop, 1938)	Románia, Sztána után rét. 2003. 08. 01. Leg. Csuzdi
21	<i>Dendrobaena octaedra</i> (Savigny, 1826)	Románia, Hargita, Szóló patak vizesése. 2003. 07. 30. Leg. Csuzdi
22	<i>Eisenia lucens</i> (Waga, 1857)	Románia, Hargita, Szóló patak vizesése. 2003. 07. 30. Leg. Csuzdi
29	<i>Dendrodrilus subrubicundus</i> (Eisen, 1873)	Románia, Havasrekettye fölött, Székelyjő vizesése. 2003. 08. 01. Leg. Csuzdi
30	<i>Dendrobaena cognettii</i> (Michaelsen, 1903)	Magyarország, Szentmargitfalva. 2004. 04. 10. Leg. Csuzdi
32	<i>Dendrobaena ganglbaueri</i> (Rosa, 1894)	Magyarország, Szentmargitfalva. 2004. 04. 10. Leg. Csuzdi
39	<i>Aporrectodea caliginosa</i> (Savigny, 1826)	Franciaország, Midi Pyrenées, Pereac után erdő. 404 m. 2004. 07. 07. Leg. Csuzdi
40	<i>Helodrilus putricola</i> (Bouché, 1972)	Franciaország, Midi Pyrenées, Pereac után erdő. 404 m. 2004. 07. 07. Leg. Csuzdi
43	<i>Bimastos syriacus</i> (Rosa, 1893)	Izrael, Nahal Tabor. 2004. 02. 21. Leg. T. Pavlicek
48	<i>Dendrobaena papukiana</i> Mršić, 1988	Horvátország, Papuk, Jankovac hágó. 2004. 10. 24. Leg. Murányi Dávid
49	<i>Aporrectodea sineporis</i> (Omodeo, 1952)	Horvátország, Papuk, Jankovac hágó. 2004. 10. 24. Leg. Murányi Dávid
50	<i>Aporrectodea handlirschi</i> (Rosa, 1897)	Magyarország, Mátra, Oroszlánvár. 2005. 05. Leg. Fehér Z.
52	<i>Eisenia spelaea</i> (Rosa, 1901)	Horvátország, Papuk, 2004. 10. 24. Leg. Murányi Dávid
53	<i>Allolobophora chlorotica</i> (Savigny, 1826)	Magyarország, Mezőhegyes. 2005. 06. 3. Leg. Kotschán J.
54	<i>Proctodrilus tuberculatus</i> (Černosvitov, 1935)	Magyarország, Szentmargitfalva. 2004. 04. 10. Leg. Csuzdi
56	<i>Allolobophora leoni</i> Michaelsen, 1891	Magyarország, Bábaapáti. 2005. 06. 03. Leg. Csuzdi
57	<i>Allolobophora molleri</i> Rosa, 1889	Portugália, Azori szk. Sta. Maria. 2004. 04. Leg. A. Zicsi Jr.
58	<i>Eisenia fetida</i> (Savigny, 1826)	Portugália, Azori szk. Sta. Maria. 2004. 04. Leg. A. Zicsi Jr.
63	<i>Allolobophora hrabei</i> (Černosvitov, 1935)	Magyarország, Várbalog. 2004. 06. 16. Leg. Csuzdi
65	<i>Aporrectodea longa</i> (Ude, 1885)	Svájc, Genf. 2003. 04. 10. Leg. Mahunka S.
66	<i>Allolobophora robusta</i> Rosa, 1895	Románia, Herkulesfürdő. 2004. 04. 27. Leg. Csuzdi & Pop
67	<i>Allolobophora mehadiensis</i> Rosa, 1895	Románia, Herkulesfürdő. 2004. 04. 27. Leg. Csuzdi & Pop
68	<i>Cernosvitovia rebelii</i> (Rosa, 1897)	Románia, Herkulesfürdő. 2004. 04. 27. Leg. Csuzdi & Pop
69	<i>Cernosvitovia opisthocystis</i> (Karaman, 1987)	Románia, Herkulesfürdő. 2004. 04. 27. Leg. Csuzdi & Pop
76	<i>Dendrobaena auriculifera</i> Zicsi, 1969	Ausztria, Karawanken, 2005. 10. 07. Leg. kotschán & Dányi
82	<i>Dendrobaena rhodopensis</i> (Černosvitov, 1937)	Bulgaria, Rila Mts. Prava Marica stream 2000 m. 2005. 09.08 Leg. Kotschán
83	<i>Dendrobaena alpina</i> (Rosa, 1884)	Bulgária, Rila, Iskar basin, Dzanka, 2250 m. Leg. Kotschán, 2005. 09. 07.
89	<i>Eisenia spelaea</i> (Rosa, 1901)	Magyarország, Velem, patakpart. 2004. 04. 10. Leg. Csuzdi
90	<i>Bimastos palustris</i> Moore, 1895	USA, MD, Jug Bay, 2005. 10. 29. Leg. Szlávecz K.
91	<i>Bimastos sp. nov.</i>	USA, Jug Bay, 2003. 04. 19. Leg. Szlávecz
93	<i>Allolobophora nematogena</i> Rosa, 1903	Ciprus, Lythorodontas. 2003. 01. 17 Leg. T. Pavlicek
94	<i>Dendrobaena alpina</i> (Rosa, 1884)	Románia, Retezát, Lapusnyik völgy, lücos. 2005. 06. 30. Leg. Csuzdi + Pop
95	<i>Dendrobaena attemsi</i> (Michaelsen, 1902)	Románia, Retezát, Lapusnyik völgy, lücos. 2005. 06. 30. Leg. Csuzdi + Pop
98	<i>Allolobophora sturanyi</i> Rosa, 1895	Románia, Kőhát, Cigánykő, 2005. 09. 21 Leg. Kotschán & Murányi
99	<i>Aporrectodea georgii</i> (Michaelsen, 1890)	Románia, Kőhát, a Szaplonca patak 2005. 06. 30. Leg. Kotschán & Murányi
104	<i>Aporrectodea limicola</i> (Michaelsen, 1890)	USA, MD, Baltimore Cross Keys. 2002. 11. 13. Leg. Csuzdi

Függelék III. Feldolgozott minták az Enchytraeidae családban

Sorszám	Faj	Gyűjtés helye és ideje
2	<i>Fridericia bulboides</i>	Magyarország, Börzsöny 6. 2004. 07. 16.
3	<i>Fridericia bulboides</i>	Magyarország, Börzsöny 6. 2004. 07. 16.
6	<i>Fridericia schmelzi</i>	Magyarország, Börzsöny 1-2. 2004. 04. 17.
7	<i>Fridericia schmelzi</i>	Magyarország, Börzsöny 3. 2004. 04. 17.
10	<i>Fridericia bulboides</i> variáns	Magyarország, Mátra 1. 2004. 11. 03.
11	<i>Fridericia bulboides</i> variáns	Magyarország, Mátra 1. 2004. 11. 03.
14	<i>Fridericia maculatiformis</i> 4 نفر	Magyarország, Sas-hegy 13/b 2004. 10. 28
15	<i>Fridericia ratzeli</i>	Magyarország, Mátra, Markaz 2003. 04. 02.
16	<i>Fridericia ratzeli</i>	Magyarország, Budapest, Remetehegy, 2002. 11. 10.
17	<i>Fridericia eiseni</i>	Magyarország, Zemplén, Mlaka-rét, 2003. 05. 28.
18	<i>Fridericia eiseni</i>	Magyarország, Mátra, Markaz 2003. 04. 03.
19	<i>Fridericia ratzeli</i>	Magyarország, Mátra, Markaz 2003. 04. 02.
20	<i>Fridericia crassiductata</i>	Magyarország, Zemplén, Senyő-völgy, 2000. 04. 20.
21	<i>Fridericia crassiductata</i>	Magyarország, Zemplén, Senyő-völgy, 2000. 04. 20.
31	<i>Fridericia maculatiformis</i> 5 نفر	Magyarország, Szent György-hegy 1/5b 2004. 11. 21
32	<i>Fridericia maculatiformis</i> 4 نفر	Magyarország, Sas-hegy 2004. 12. 06
33	<i>Fridericia maculatiformis</i> 4 نفر	Magyarország, Sas-hegy 2004. 12. 06
34	<i>Fridericia eiseni</i>	Észtország 2004. 08. 24.
41	<i>Fridericia maculatiformis</i> 5 نفر	Magyarország, Szent György-hegy 2005. 04. 13.
42	<i>Fridericia maculatiformis</i> 5 نفر	Magyarország, Szent György-hegy 2005. 04. 13.
52	<i>Fridericia semisetosa</i>	Magyarország, Bakony 7. 2005. 06. 27-28.
53	<i>Fridericia semisetosa</i>	Magyarország, Bakony 7. 2005. 06. 27-28.
54	<i>Fridericia semisetosa</i>	Magyarország, Bakony 7. 2005. 06. 27-28.
98	<i>Mesenchytraeus kuehnelti</i>	Olaszország Valdabbiadene, Monte Cesen 2006. 04. 11.
99	<i>Mesenchytraeus kuehnelti</i>	Olaszország Valdabbiadene, Monte Cesen 2006. 04. 11.
105	<i>Bryodrilus ehlersi</i>	Magyarország, Villány 9. 2006. 04. 04.
107	<i>Fridericia maculatiformis</i> 5 نفر	Magyarország, Villány 13. 2006. 04. 04.
108	<i>Fridericia maculatiformis</i> 5 نفر	Magyarország, Villány 13. 2006. 04. 04..
111	<i>Fridericia aurita</i> b típus	Magyarország, Villány 15. 2006. 06. 26-27.
112	<i>Fridericia aurita</i> b típus	Magyarország, Villány 15. 2006. 06. 26-27.
113	<i>Fridericia aurita</i> b típus	Magyarország, Villány 15. 2006. 06. 26-27..
114	<i>Fridericia aurita</i> a típus	Magyarország, Villány 15. 2006. 06. 26-27.
115	<i>Fridericia aurita</i> a típus	Magyarország, Villány 15. 2006. 06. 26-27..
116	<i>Fridericia aurita</i> c itpus	Magyarország, Pécs 2006. 06. 26-27.
117	<i>Fridericia aurita</i> c itpus	Magyarország, Pécs 2006. 06. 26-27.
118	<i>Fridericia maculatiformis</i> 4 نفر	Magyarország, Julianna-major 2006. 08. 22.
119	<i>Fridericia maculatiformis</i> 4 نفر	Magyarország, Julianna-major 2006. 08. 22.
124	<i>Fridericia maculatiformis</i> 5 نفر	Magyarország, Gerecse7 2006. 10. 02.
125	<i>Fridericia maculatiformis</i> 5 نفر	Magyarország, Gerecse7 2006. 10. 02..
127	<i>Fridericia maculatiformis</i> 4 نفر	Magyarország, Gerecse7 2006. 10. 02..
130	<i>Fridericia aurita</i> d típus	Magyarország, Hanság, Földsziget, töltés 2006. 11. 13.
136	<i>Mesenchytraeus kuehnelti</i>	Magyarország, Mecsek 30. 2006. 11. 16.
142	<i>Fridericia aurita</i> a típus	Magyarország, Villány 15. 2006. 06. 26-27.
143	<i>Fridericia aurita</i> b típus	Magyarország, Villány 15. 2006. 06. 26-27.
144	<i>Fridericia aurita</i> b típus	Magyarország, Villány 15. 2006. 06. 26-27.
146	<i>Fridericia aurita</i> a típus	Magyarország, Villány 15. 2006. 06. 26-27.
148	<i>Fridericia aurita</i> b típus	Magyarország, Mecsek 32. 2006. 11. 16.

Sorszám	Faj	Gyűjtés helye és ideje
149	<i>Fridericia aurita</i> b típus	Magyarország, Mecsek 32. 2006. 11. 16.
157	<i>Buchholzia appendiculata</i>	Magyarország, Gerecse 12b 2006. 11. 21
160	<i>Buchholzia appendiculata</i>	Magyarország, Gerecse 12b 2006. 11. 21
164	<i>Enchytronia sp. n.</i>	Magyarország, Vértes 5, 2007. 10. 18
167	<i>Enchytronia christenseni</i>	Magyarország, Gerecse 1. 2007. 10. 18
168	<i>Enchytronia christenseni</i>	Magyarország, Gerecse 1. 2007. 10. 18
171	<i>Enchytronia parva</i>	Magyarország, Vértes 11. 2007. 10. 18
172	<i>Enchytronia parva</i>	Magyarország, Vértes 11. 2007. 10. 18
176	<i>Bryodrilus ehlersi</i>	Németország, Stambergi tó, erdő, 2008. 03. 10
200	<i>Buchholzia subterranea</i>	Magyarország, Bakony 3. sziklagyep, 2008. 07. 17
201	<i>Buchholzia subterranea</i>	Magyarország, Bakony 3. sziklagyep, 2008. 07. 17
202	<i>Bryodrilus ehlersi</i>	Magyarország, Bakony 2 korhadt fa 2008. 07. 17
203	<i>Bryodrilus ehlersi</i>	Magyarország, Bakony 2 korhadt fa 2008. 07. 17
204	<i>Mesenchytraeus pelicensis</i>	Magyarország, Bakony 2 korhadt fa 2008. 07. 17
205	<i>Mesenchytraeus pelicensis</i>	Magyarország, Bakony 2 korhadt fa 2008. 07. 17
208	<i>Buchholzia simplex</i>	Magyarország, Velem 2008. 09. 07
212	<i>Buchholzia simplex</i>	Magyarország, Velem 2008. 09. 07
238	<i>Bryodrilus ehlersi</i>	Magyarország, Gerecse. 2006. 11. 21.
374	<i>Buchholzia fallax</i>	Olaszország 2010.04. Dózsa-Farkas András
375	<i>Buchholzia fallax</i>	Olaszország 2010.04. Dózsa-Farkas András
396	<i>Fridericia maculatiformis</i> 5 nefr	Magyarország, Mezőföld 6 2009. 09. 22.
397	<i>Fridericia maculatiformis</i> 5 nefr	Magyarország, Mezőföld 6 2009. 09. 22.
398	<i>Fridericia maculatiformis</i> 5 nefr	Magyarország, Mezőföld 6 2009. 09. 22.
399	<i>Fridericia maculatiformis</i> 5 nefr	Magyarország, Mezőföld 6 2009. 09. 22.
401	<i>Fridericia maculatiformis</i> 4 nefr.	Magyarország, Mezőföld 16 2009. 09. 22.
404	<i>Fridericia maculatiformis</i> 4 nefr.	Magyarország, Mezőföld 16 2009. 09. 22.

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretném mindenkinek megköszönni a segítségét, akinek része volt abban, hogy ez a dolgozat elkészülhetett.

Kiemelten köszönettel tartozom:

Dr. Dózsa-Farkas Klárának és Dr. Csuzdi Csabának, témavezetőimnek, a szakmai vezetésért, és bátorításért, valamint kitartásukért és türelmükért,

Dr. Márialigeti Károly tanszékvezető úrnak, hogy a Mikrobiológiai Tanszéken lehetővé tette számomra a munkám elvégzését és azt szakmailag is kísérve mindvégig támogatott,

Boros Gergelynek, akiknek a segítségére mindig számíthattam,

a Mikrobiológiai Tanszék és Állatrendszertani és Ökológiai Tanszék mindenkori dolgozóinak, szakdolgozóinak és doktoranduszainak, akik számtalanszor nyújtottak segítő kezet,

munkatársaimnak az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézetében, hogy mindenben támogattak a dolgozatom befejezése érdekében,

szüleimnek a nélkülözhetetlen támogatást és háttérrel, és hogy végig rendületlenül hittek a munkámban és bennem,

és nem utolsósorban feleségemnek, aki mindvégig mellettem állt, és ösztönzött a dolgozatom elkészítésében.