

# O HYBRYDYZACJI HERMAFRODYTYCZNYCH DŹDŹOWNIC. CZY WARTO TO BADAĆ?

On the hybridization of hermaphroditic earthworms.  
Is it worth to investigate it?

Barbara Płytycz (Kraków)

## Streszczenie

Blisko spokrewnione hermafrodytyczne dżdżownice *Eisenia andrei* i *Eisenia fetida* zdolne do samozapłodnienia posłużyły do laboratoryjnej rekonstrukcji wprowadzenia genów odpowiedzialnych za gatunkowo specyficzną fluorescencję płynu celomatycznego *E. andrei* do genomu *E. fetida* za pośrednictwem hybryd międzygatunkowych. Okazało się, że gatunki te mogą stanowić niekontrowersyjny i wygodny model do śledzenia procesów specjacji w czasie rzeczywistym. Hermafrodytyzm i hybrydyzacja są (lub były) powszechne u wielu gatunków roślin i zwierząt, łącznie z *Homo sapiens*.

## Abstract

Closely related hermaphroditic earthworms *Eisenia andrei* and *Eisenia fetida* capable to self-fertilization have been used for laboratory reconstruction of introgression of gene/s responsible for species-specific fluorescence of coelomic fluid of *E. andrei* to the genome of *E. fetida* via interspecific hybrids. It turned out that these species might be uncontroversial and convenient models for real-time studies on processes of speciation. Hermaphroditism and hybridization are (or have been) common in several species of plants and animals, including *Homo sapiens*.

## Wstęp

W roku 2022 nagroda Nobla w dziedzinie medycyny lub fizjologii przypadła szwedzkiemu ewolucjonście Svante Pääbo za wykrycie w genomie człowieka fragmentów DNA naszych wymarłych kuzynów – neandertalczyków, którym zawdzięczamy niektóre typy pigmentacji i cechy fizjologii, w tym podatność lub oporność na pewne schorzenia [np. 46]. Doszło do tego na drodze kojarzenia się zamieszkujących te same tereny par *Homo neanderthalensis* z *Homo sapiens*, czyli hybrydyzacji tych blisko spokrewnionych gatunków [5, 39]. Nie jest to zjawisko odosobnione w królestwie roślin i zwierząt [8]. Przedstawię tu nasze badania nad hybrydyzacją dwóch gatunków dżdżownic, które podjęliśmy z ciekawości w trakcie realizacji projektu dotyczącego cech szczególnych układu odpornościowego tych zwierząt znakomicie przystosowanych do życia w środowisku glebowym, obfitującym w patogeny [19, 26, 27, 43, 44]. Wyniki nie są zgodne ze szkolną definicją gatunku...

## Dżdżownice

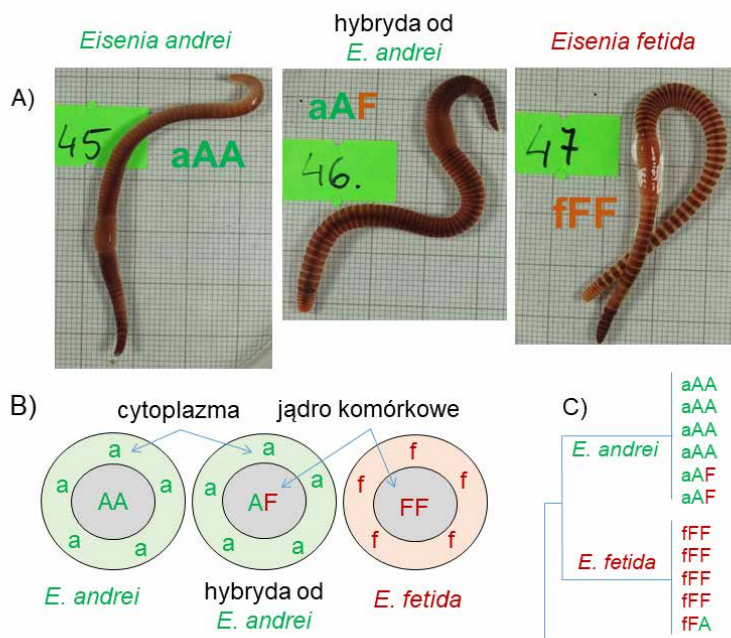
Spośród żyjących w Polsce ponad 20 gatunków dżdżownic (Annelida; Lumbricidae), wędkarzom znane są rosówki (*Lumbricus terrestris*), podczas orki ptaki polują na białawe *Aporrectodea caliginosa*, wydobyte na powierzchnię odwróconych skib gleby, w ogrodach można znaleźć żółtawe *Allolobophora chlorotica*, a w przyzmacach obornika i kompostu żyje *Dendrobaena veneta* oraz kłębią się kompostowce z rodzaju *Eisenia* sp., którym zawdzięczamy płynny biohumus powszechnie wykorzystywany do nawożenia roślin balkonowych. Na świecie opisano już ponad 670 gatunków tych glebowych skąposzczetów przyczyniających się do napowietrzania i nawożenia gleby, które są ważne w łańcuchu pokarmowym i stanowią cenne źródło białka w niektórych skupiskach ludzkich; mają zastosowania w kompostowaniu materii organicznej i są intensywnie badane pod kątem substancji odpowiedzialnych za ich zdolność przetrwania w glebie obfitującej w przeróżne patogeny, co czyni je kandydatami do

zastosowania w biomedycynie i farmakoterapii [18, 19, 26, 27, 35, 44].

We współpracy z naukowcami z Walii, Francji i Węgier, szukaliśmy odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób układ odpornościowy kilkunastu gatunków dżdżownic pozyskanych ze środowisk naturalnych lub z hodowli laboratoryjnych radzi sobie z patogenami i skażeniem środowiska [37, 43]. Najłatwiejsze do hodowli w warunkach laboratoryjnych były kompostowce z rodzaju *Eisenia* sp. (znane jako ‘dżdżownice kalifornijskie’), jednak pojawił się kłopot przy rozróżnieniu jednolicie ubarwionych ‘czerwonych robaków’ *Eisenia andrei* od prążkowanych (‘tygrysich’) *Eisenia fetida*, gdyż u wielu okazów niektóre cechy taksonomiczne, łącznie ze wzorem pigmentacji, mają charakter pośredni (Ryc. 1A).

plazmą matczynej komórki jajowej, ‘a’ dla *E. andrei* i ‘f’ dla *E. fetida* [41], oraz markerowych sekwencji jądrowego DNA [25, 34], ‘A’ specyficznych dla *E. andrei* i ‘F’ dla *E. fetida*. Zatem okaz czystego gatunku *E. andrei* ma genotyp aAA (okaz nr 45), czysty *E. fetida* ma genotyp fFF (okaz nr 47), a okaz nr 46 to hybryda rozwijająca się z komórki jajowej *E. andrei* zapłodnionej przez plemnik *E. fetida* (Ryc. 1A, B).

Uproszczone drzewo filogenetyczne *E. andrei* i *E. fetida* (Ryc. 1C) posiada dwie wyraźnie rozdzielone gałęzie skupiające okazy o mitochondrialnym DNA ‘a’ lub ‘f’, czyli o cytoplazmie charakterystycznej, odpowiednio, dla komórek jajowych *E. andrei* lub *E. fetida*, co nie daje możliwości wykrycia mieszańców. Dopiero przypisanie do każdego okazu dwóch sekwencji jądrowego DNA, ‘AA’, ‘FF’, ‘AF’



**Ryc. 1. Charakterystyka dżdżownic *Eisenia andrei* i *Eisenia fetida* i ich mieszańców.** A) Sylwetki *E. andrei* o genotypie aAA (nr 45), *E. fetida* o genotypie fFF (nr 47) oraz hybrydy (mieszańca) aAF (nr 46). B) Schematy komórek *E. andrei*, *E. fetida* oraz hybrydy z komórki jajowej *E. andrei*; ich haploidalne sekwencjami ‘a’ lub ‘f’ mitochondrialnego DNA są zlokalizowane w cytoplazmie komórek; w jądrze znajdują się allele ‘A’ i/lub ‘F’ diploidalnego DNA jądrowego o sekwencjach gatunkowo-specyficznych. C) Uproszczone drzewo filogenetyczne *E. andrei* i *E. fetida* skonstruowane w oparciu o gatunkowo specyficzne sekwencje mitochondrialnego DNA. Sekwencje mitochondrialne ‘a’ lub ‘f’ wskazują, czy komórka jajowa pochodzi od *E. andrei* czy *E. fetida*. Sekwencje jądrowego DNA ‘A’ lub ‘F’ ujawniają okazy czystych gatunków *E. andrei* (aAA) lub *E. fetida* (fFF) oraz hybrydy wywodzące się z komórek jajowych *E. andrei* (aAF) lub *E. fetida* (fFA).

### Czyżby to były mieszańce?

Rozstrzygającym było genotypowanie dżdżownic z użyciem DNA wyizolowanego z amputowanych (i łatwo regenerujących [27, 45]) kilku segmentów ogonowych. Genotypujemy na podstawie gatunkowo specyficznych sekwencji haploidalnego mitochondrialnego DNA dziedziczonego wraz z cyto-

lub ‘FA’, z których pierwsza pochodzi z komórki jajowej, a druga z zapładniającego ją plemnika, daje możliwość wskazania dżdżownic czystego gatunku *E. andrei* (aAA), *E. fetida* (fFF) oraz mieszańców pochodzących od matki *E. andrei* (aAF) lub od matki *E. fetida* (fFA) (Ryc. 1C).

## Rozmnażanie się dżdżownic hermafrodytycznych

Jak większość Lumbricidae, dżdżownice z rodzaju *Eisenia* wyposażone są w funkcjonujące równocześnie gonady męskie (jądra) i żeńskie (jajniki), są zatem hermafrodytami (obojnakami) równoczesnymi o zapłodnieniu krzyżowym, któremu u badanych przez nas dżdżownic towarzyszyło samozapłodnienie. Kopulacja okazów dojrzałych płciowo polega na specyficznym ułożeniu się dżdżownic (Ryc. 2A), umożliwiającym wzajemną wymianę spermy gromadzonej się w spermatekach partnerów, czyli zbiornikach przystosowanych do długiego przetrzymywania żywotnych plemników. Partnerzy rozłączają się i po kilku dniach każdy z nich z wydzieliną tzw. siodełka formuje rodzaj mufki przesuwej się od siodełka dogłowowo, do której uwalniane są komórki jajo-

po kilku tygodniach (Ryc. 2B), zaś dojrzałość płciową osiągają po kilku miesiącach, na co ma wpływ gatunek i temperatura zewnętrzna.

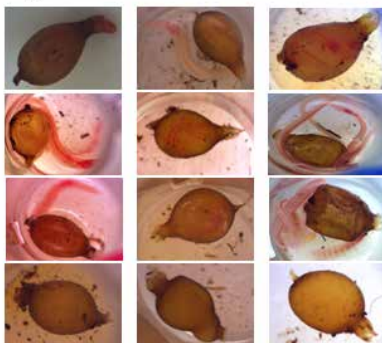
Do eksperymentu posłużyły świeżo wylęgnięte (dziewicze) okazy *E. andrei* (aAA) i *E. fetida* (fFF), które hodowaliśmy w osobnych pojemnikach z ziemią w wewnątrzgatunkowych parach kontrolnych oraz w międzygatunkowych parach eksperymentalnych aAA+fFF. Prawie wszystkie pary okazów tego samego gatunku (aAA+aAA lub fFF+fFF) dały liczne potomstwo pierwszego pokolenia, liczniejsze u *E. andrei* niż u *E. fetida*, natomiast kokonów nie było w większości pojemników z parami mieszanymi lub pojawiały się tam kokony sterylne; jednak niektóre pary aAA+fFF dały żywe potomstwo genotypowane jako czyste *E. andrei* (aAA) lub *E. fetida* (fFF), ewidentnie powstałe w wyniku sa-

A)



Fot. A.J. Morgan

B)



Fot. A. Podolak

Ryc. 2. A) Fragmenty ciała kopulujących okazów *Eisenia fetida* (fot. A.J. Morgan). B) kokony *E. fetida* z wylęgającymi się dżdżownicami. Fot. Agnieszka Podolak.

we tego właśnie okazu (pełniącego zatem rolę matki) oraz plemniki (partnera i własne) zdeponowane w jej spermatece. Zsunęta mufka zamyka się w kokon, w którym komórki jajowe 'aA' okazu budującego kokon są zapłodnione przez plemniki partnera ('F') albo plemniki własne ('A'), prawdopodobnie domieszane do nich podczas kopulacji w służącym partnerów (Ryc. 2A), choć nie można wykluczyć zapłodnienia własnych komórek jajowych już w jamie ciała! Tak powstałe zygoty aAF i aAA, a następnie powstałe z nich embriony, rozwijają się w obrębie kokonu, co można obserwować pod mikroskopem stereoskopowym (lupą). Młode dżdżownice zdolne do samodzielnego życia opuszczają kokon

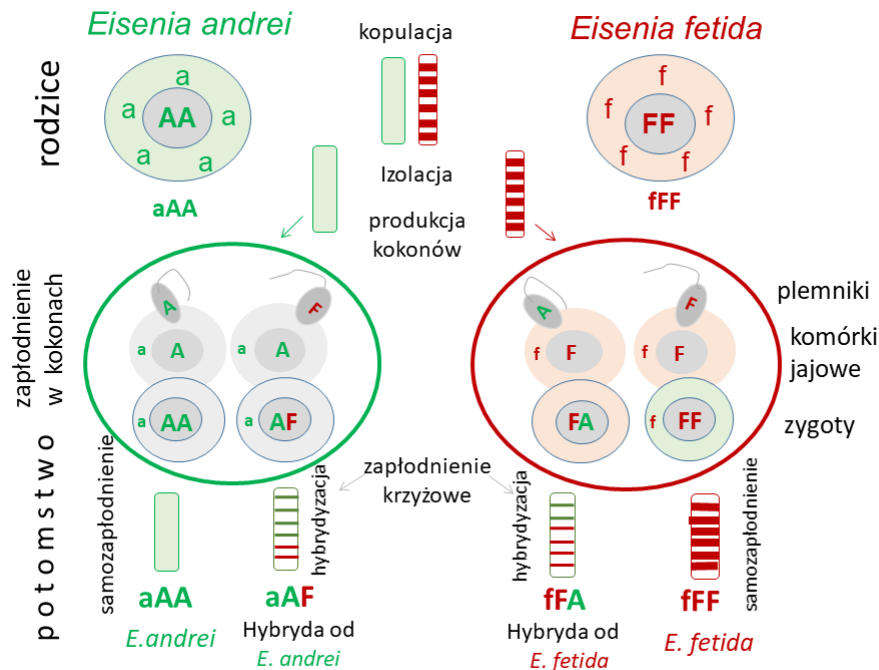
mozapłodnienia komórek jajowych przez własne plemniki tego okazu oraz hybrydy zapłodnione krzyżowo przez plemniki partnera z danej pary (Ryc. 3). Teoretycznie wśród hybryd powinny być okazy aAF (z komórek jajowych *E. andrei* zapłodnionych przez plemniki od *E. fetida*) oraz fFA (z komórek jajowych *E. fetida* zapłodnionych przez plemniki *E. andrei*) (Ryc. 3), lecz tych ostatnich nie stwierdziliśmy w pierwszym pokoleniu w trakcie kilkuletnich eksperymentów. Mamy tu więc do czynienia z hybrydyzacją jednokierunkową, gdy komórki jajowe 'aA' *E. andrei* są zapłodnione przez plemniki 'F' okazu *E. fetida* [28, 29].

## Czy hybrydy są płodne?

Aby odpowiedzieć na to pytanie, w trakcie kilkuletnich eksperymentów nad potomstwem par aAA+fFF genotypowaliśmy blisko 600 okazów pod względem genów mitochondrialnych i jądrowych i udowodniliśmy płodność niektórych mieszańców aAF z trzech kolejnych pokoleń [30]. Hybrydy fFA,

że w obrębie kokonu może dojść do samozapłodnienia lub zapłodnienia krzyżowego komórek jajowych twórcy kokonu (Ryc. 3 i 4).

Hybryda aAF produkuje komórki jajowe ‘aA’ i ‘aF’ oraz plemniki ‘A’ i ‘F’. Samozapłodnienie takiego okazu może doprowadzić do pojawienia się czterech rodzajów potomstwa: aAA, aAF, aFA, aFF (Ryc. 4), a zapłodnienie krzyżowe daje albo aAA



**Ryc. 3. Schemat kojarzenia okazów *E. andrei* (aAA) i *E. fetida* (fFFmm).** Kopulująca para; produkcja kokonów, w obrębie których dochodzi do zapłodnienia komórek jajowych przez plemniki tego samego okazu (samozapłodnienie) lub partnera (zapłodnienie krzyżowe). Wśród potomstwa pierwszego pokolenia mogą się pojawić osobniki aAA i fFF pochodzące z samozapłodnienia oraz hybrydy (mieszańce) aAF z kokonów *E. andrei* i hybrydy fFA z kokonów *E. fetida*.

praktycznie niepłodne, pojawiły się dopiero w potomstwie mieszańców aAF z dżdżownicami czystego gatunku rodzicielskiego fFF [18, 29, 30].

Dżdżownice z kolejnych pokoleń izolowaliśmy tuż po wylęgu, aby – po genotypowaniu – kojarzyć je w sposób kontrolowany w parach hybryda+hybryda albo hybryda z gatunkiem rodzicielskim *E. andrei* (Ryc. 4A) lub *E. fetida* (Ryc. 4B) (są to tzw. krzyżówki wsteczne). W pudełkach z parami dwóch hybryd pojawiały się wprawdzie kokony, lecz nie doczekaliśmy się wylęgu. Wylęg pojawiał się natomiast w potomstwie par aAF z aAA (Ryc. 4A) i aAF z fFF (Ryc. 4B). Tuż po pojawieniu się pierwszych kokonów (co dowodziło odbytej przynajmniej jednej kopulacji), przekładaliśmy osobniki dorosłe do dwóch niezależnych pojemników z nową ziemią i zajmowaliśmy się wylęgiem ze złożonych tam kokonów; dzięki takiej procedurze znaleźliśmy rodzica wytwarzającego kokon z jego własnymi komórkami jajowymi i plemnikami zdeponowanymi w jego spermatece; wiedzieliśmy już,

o aFA lub aAF i aFF (Ryc. 4A). Jednak komórki jajowe ‘aF’ i powstające z nich zygoty aFA i aFF wykazują tzw. konflikt cytoplazmatyczno-jądrowy, czyli niezgodność genomu mitochondrialnego i jądrowego, który uniemożliwia lub utrudnia prawidłowy rozwój embrionalny [16, 47], co na Ryc. 4 oznaczono przez zaciemnienie fragmentu schematu (Ryc. 4A i 4B). W naszym materiale spotkaliśmy nieliczne okazy genotypowane jako aFF, obumierające wkrótce po wylęgu.

W potomstwie partnera aAA pojawiają się kolejne okazy aAA powstałe skutkiem samozapłodnienia lub zapłodnienia krzyżowego oraz krzyżowo zapłodniona hybryda aAF (Ryc. 4A).

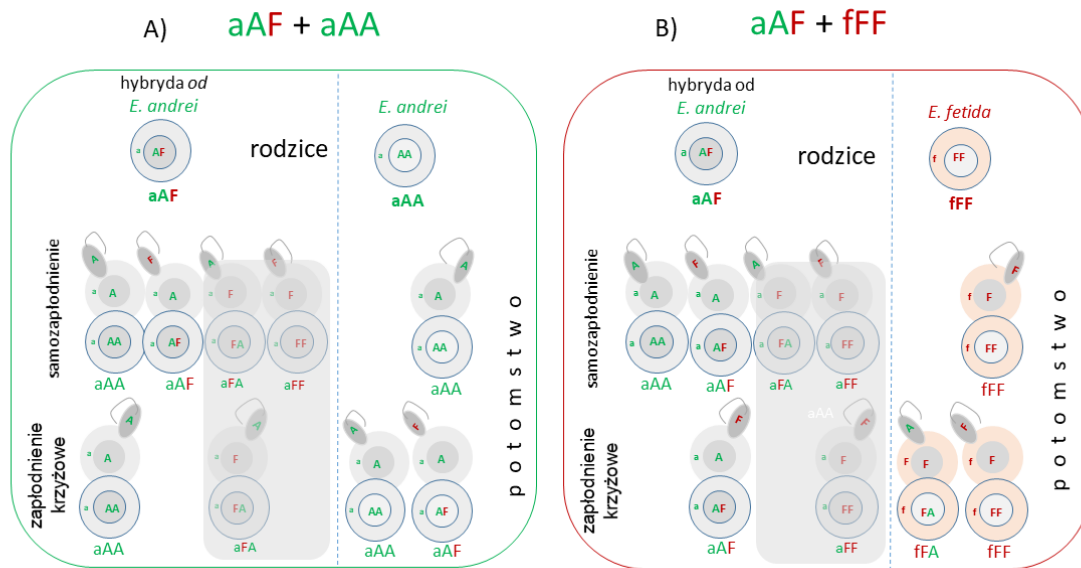
Partner fFF ma w potomstwie dżdżownicę fFF powstałą przez samozapłodnienie oraz kolejny okaz fFF zapłodniony krzyżowo. W potomstwie rodzica fFF **pojawia się po raz pierwszy hybryda fFA**, powstała przez zapłodnienie komórki jajowej ‘fF’ tego okazu przez plemnik ‘A’ pochodzący od hybrydy aAF (Ryc. 4B).



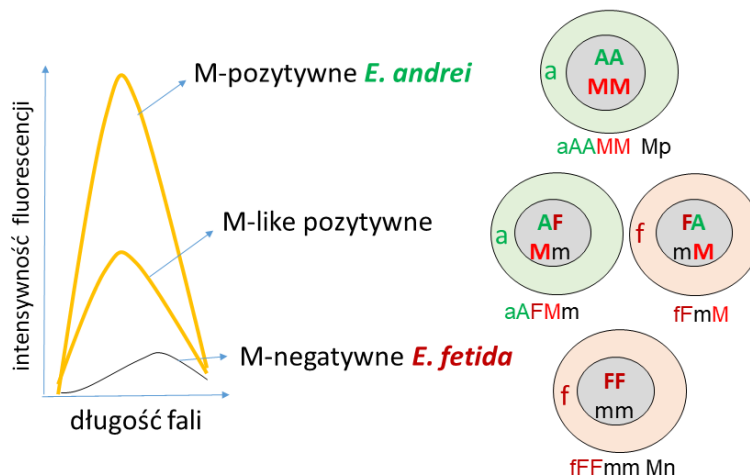
Podsumowując, za wyjątkiem hybrydy fFA, hybrydy aAF oraz potomne okazy aAA i fFF mogą powstawać albo na skutek samozapłodnienia lub zapłodnienia krzyżowego, czego nie rozstrzyga stosowane tu genotypowanie z użyciem gatunkowo-specyficznych sekwencji A lub F; może to jednak wyjaśnić zastosowanie kolejnych markerów jądrowych, zwanych mikrosatelitami (12).

### Fluorofor M jako molekularny marker *Eisenia andrei*

Nowe światło na znaczenie hybrydyzacji *E. andrei* z *E. fetida* rzuciło śledzenie obecności tzw. fluoroforu M u hodowanych przez nas dżdżownic. Do wszystkich eksperymentów wybieraliśmy okazy najbardziej typowe pod względem pigmentacji



Ryc. 4. Różnorodność potomstwa krzyżówek wstecznych hybryd aAF: A) z *E. andrei* (aAA); B) z *E. fetida* fFF, powstałe na drodze samozapłodnienia lub zapłodnienia krzyżowego. Zaciemniono okazy o obniżonej żywotności. Opis w tekście.



Ryc. 5. Schemat widm fluorescencji płynu celomatycznego M-pozytywnych (Mp) *E. andrei*, M-negatywnych (Mn) *E. fetida*, i widma M-podobnego (M-like) oraz hipotetyczny zapis genów odpowiedzialnych za fluorescencję próbek płynu celomatycznego od czystych gatunków aAAMM i fFFmm oraz ich mieszańców aAFMm, fFmM.

Z pokolenia na pokolenie w naszych hodowlach było coraz mniej płodnych par aAF+aAA lub aAF+fFF i malała też liczebność ich potomstwa [30]. **Może zatem hybrydyzacja nie odgrywa zbyt istotnej roli w ewolucji gatunku?**

i w wielu przypadkach wspomagaliśmy się markerem molekularnym znanym od roku 2003, gdy Albani i współpracownicy [3] wykryli, że – pobudzone odpowiednimi falami światła – próbki płynu nieinwazyjnie pobranego z jamy ciała (celomy) dżdżownicy ujawniają u *E. andrei* bardzo charakterystyczne widmo fluorescencji, którego brak u *E. fetida* [3] (Ryc. 5).

Początkowo przypuszczano, że źródłem fluorescencji, czyli fluoroforem, jest metyl-hydroksy-umbelliferon, substancja o aktywności antydrobnoustrojowej [3], stąd stosowany w cyklu artykułów skrót ‘fluorofor M’ [28, 29, 30, 36, 37, 40]. Zastosowanie kolejnych metod badawczych ujawniło, że fluoroforem obecnym u *E. andrei* jest chinazolina (quinazolina) i jej pochodne [15, 33], której przypisuje się cytotoksyczność oraz działanie antynowotworowe i przeciwbakteryjne [11, 13, 14], lecz nadal posługujemy się terminem ‘fluorofor M’, zakorzenionym już w literaturze. Z użyciem urządzenia zwanego spektrofluorymetrem charakterystyczne widma fluoroforu M wykrywa się bez trudu w płynie nieinwazyjnie pobranym z celomy *E. andrei*, natomiast brak ich u *E. fetida* (Ryc. 5A); my jednakże dość wcześnie wykryliśmy odstępstwa od tej prawidłowości [28, 29, 36, 40].

Do eksperymentów wybieraliśmy M-pozytywne okazy wyjściowe aAA o bardzo wyraźnych widmach M, toteż założyliśmy, że są one dominującymi homozygotami ‘MM’ pod względem genu kodującego czynnik (enzym?) warunkujący pojawienie się charakterystycznego „świecenia” w płynie celomatycznym; M-negatywne okazy fFF pozbawione takiego widma uznaliśmy za homozygoty recesywne ‘mm’. W pierwszym pokoleniu potomstwa tych dżdżownic oczekiwaliśmy samozapłodnionych M-pozytywnych aAAMM i M-negatywnych fFFmm oraz M-pozytywnych hybryd aAFMm. I tak się właśnie stało. Jak już wiadomo, w pierwszym pokoleniu potomstwa par *E. andrei* i *E. fetida* nie pojawiły się teoretycznie spodziewane mieszańce fFAMM z widmami podobnymi do M (M-like). (Ryc. 5B)

Ku naszemu zaskoczeniu, w trakcie badanych przez nas typowych *E. andrei* (aAA) trafiły się dwa okazy bez tego fluoroforu (co się stało?!), natomiast charakterystyczne widma M (lub widma nieco zmodyfikowane, M-podobne) pojawiały się u niektórych prążkowanych dżdżownic genotypowanych jako *E. fetida* (fFF) [28, 29, 36, 40]. Czyżby to były mieszańce? A może to *E. fetida* po ‘przechwyceniu’ (introgresji) genu odpowiedzialnego za obecność fluoroforu?

### Skąd się wzięły M-negatywne *E. andrei* i M-pozytywne *E. fetida*?

Odpowiedź na te pytania była najtrudniejszą (ale i najciekawszą!) częścią omawianego tu cyklu badań. Okazało się, że wystarczy założyć, że geny odpowiedzialne za pojawienie się w celomie fluoroforu M dziedziczą się niezależnie od genów jądrowych

zawierających gatunkowo specyficzne markerowe sekwencje ‘A’ lub ‘F’. Wówczas należy przyjąć, że ‘typowa’ hybryda aAFMm produkuje aż cztery rodzaje komórek jajowych: ‘aAM’, ‘aAm’, ‘aFM’ i ‘aFm’ oraz cztery rodzaje plemników: ‘AM’, ‘Am’, ‘FM’ i ‘Fm’. Wzorem genetyków, można zaadoptować dla okazów hermafrodatycznych klasyczną szachownicę do analizowania cech dziedziczonych niezależnie. Na polach szachownicy odnajdujemy efekty połączenia konkretnych komórek jajowych z konkretnymi plemnikami (Ryc. 6).

W przypadku samozapłodnienia dżdżownicy aAFMm (Ryc. 6A), w polu B2 jest **poszukiwany M-negatywny okaz *E. andrei* (aAAMm)**, powstały przez zapłodnienie komórki jajowe ‘aAm’ hybrydy przez jej własny plemnik ‘Am’! W polu D2 odnajdujemy natomiast M-negatywną hybrydę aAFmm, której nie zidentyfikowaliśmy wśród testowanych dotychczas dżdżownic. Przyciemnione wiersze 3. i 4. na rycinie 5A pokazują okazy o niskiej żywotności ze względu na wspomnianą już niezgodność genomu jądrowego i mitochondrialnego. [16, 47] (Ryc. 6A)

Hybryda aAFMm daje potomstwo w krzyżówkach wstecznych z okazami aAAMM i fFFmm (Ryc. 6B). Jak poprzednio, pomijamy okazy o niezgodności genomu jądrowego z mitochondrialnym (wiersze 3 i 4 Ryc. 6B). Okazy z kolumn A i B szachownicy dotyczące potomstwa aAFMm z aAAMM ukazują powiększanie się puli mieszańców aAFMM/Mm, lecz nie przybliżają nas do zrozumienia transferu allelu ‘M’ od *E. andrei* do *E. fetida*, natomiast w potomstwie pary aAFMm z fFFmm (kolumny C i D szachownicy) znajdujemy **okaz fFFmM z allelelem M!** (pole C7), którego płyn celomatyczny w spektrofluorymetrze ujawnia fluorescencję M-podobną. Tu pojawiają się też dwie hybrydy fFA z komórek jajowych ‘fFm’ od fFFmm, jedna M-like pozytywna (pole C5), a druga M-negatywna (pole C6 szachownicy). Pojawia się też, po raz drugi, M-negatywna hybryda aAFmm (pole F2) (Ryc. 6B).

Szachownica na Ryc. 6C ujawnia potomstwo osobnika fFFmM w parze z fFFmm (kolumny AB) i skutki samozapłodnienia tej dżdżownicy (kolumny C-F). Skojarzenie fFFmM z typowym M-negatywnym okazem fFFmm wzbogaca pulę M-like pozytywnych dżdżownic *E. fetida*. Czyli jeden okaz fFFmM wrzucony do pudełka z kłębiącymi się tam typowymi M-negatywnymi fFFmm rozpropaguje wśród nich allel ‘M’! Co więcej, wiemy już, że obecność partnera prowokuje samozapłodnienie u dżdżownic. W wyniku samozapłodnienia dżdżownicy fFFmM (patrz: kolumny C-F Ryc. 6C) znajdujemy trzy nowe okazy fFFMm/mM oraz dwa

(A)		samozapłodnienie aAFMm				
gamety		plemniki				
		A M	A m	F M	F m	
		A	B	C	D	
komórki jajowe	aA M	1	aAA MM	aAA Mm	aAF MM	aAF Mm
	aA m	2	aAA mM	aAA mm	aAF mM	aAF mm
	aF M	3	aFA MM	aFA Mm	aFF MM	aFF Mm
	aF m	4	aFA mM	aFA mm	aFF mM	aFF mm

(B)		aAFMm	aAAMM	ffFmm		
gamety		k. jajowe	plemniki	k. jajowe	plemniki	
		aA M	A M	ff m	F m	
		A	B	C	D	
komórki jajowe	aA M	1		aAA MM		aAF Mm
	aA m	2		aAA mM		aAF mm
	aF M	3		aFA MM		aFF Mm
	aF m	4		aFA mM		aFF mm
plemniki	A M	5	aAA MM			ffa mM
	A m	6	aAA mM			ffa mm
	F M	7	aAF MM			fff mM
	F m	8	aAF mM			fff mm

(C)		ffFmM	ffFmm	samozapłodnienie ffFmM			
gamety		k. jajowe	plemniki	k. jajowe	plemniki		
		ff m	F M	ff m	F M		
		A	B	C	D		
komórki jajowe	ff M	1		fff Mm		fff MM	fff Mm
	ff m	2		fff mm		fff mM	fff mm
plemniki	F M	3	fff mM		fff MM	fff mM	
	F m	4	fff mm		fff Mm	fff mm	

Ryc. 6. Szachownica ilustrująca potomstwo hermafrodytycznych dżdżownic z dwoma cechami dziedzicznymi niezależnie przystosowana do okazów hermafrodytycznych. (A) Potencjalne potomstwo samozapłodnionej hybrydy aAFMm; (B) potomstwo hybrydy aAFMm z okazem rodzicielskim aAAMM (kolumny A i B) lub z okazem ffFmm (kolumny C i D); (C) potomstwo dżdżownicy ffFmM z okazem ffFmm (kolumny A i B) lub pojawiające się na drodze samozapłodnienia ffFmM (kolumny C-F). Zaciemniono okazy o obniżonej żywotności. Ważne: Oczywiście, allele M/m hipotetycznego genu odpowiedzialnego za obecność lub brak charakterystycznej fluorescencji można w tej szachownicy podmienić przez allele dowolnego genu ujawniającego swą obecność u jednego z badanych gatunków.

‘świecące’ M-pozytywne (ffFMM) dżdżownice *E. fetida*!!! Jeden z nich powstał w wyniku zapłodnienia komórki jajowej ‘fFM’ okazu ffFmM przez plemnik ‘FM’ okazu ffFmM (pole E1 szachownicy), a drugi przez zapłodnienie komórki jajowej ‘fFM’ rodzica ffFmM przez plemnik ‘FM’ rodzica ffFmM (pole C3 szachownicy). Zatem, dzięki hybrydyzacji, nastąpiła **introdukcja (wprowadzenie) genu odpowiedzialnego za fluorofor M z *E. andrei* do *E. fetida* i jego rozprzestrzenianie się u tego gatunku.**

**Czy obecność fluoroforu M jest przydatne dla *Eisenia andrei*?** Czy może mieć jakiś związek z większą rozrodczością *E. andrei* niż *E. fetida* [10, 31, 32]? Czy jego pojawienie się w organizmie *E. fetida* przynosi dżdżownicom korzyści, czy może szkody? Te pytania są nadal otwarte.

**Czy *Eisenia andrei* i *Eisenia fetida* są odrębnymi gatunkami?**

Przed laty uważano, że gatunek *Eisenia foetida* (z taką właśnie pisownią) posiada dwie formy barwne, okazy jednolicie czerwone i okazy prążkowane, którym po latach nadano rangę podgatunków. Dopiero w roku 2005 pojawiła się praca zespołu Jorge Domingueza z Hiszpanii dowodząca, że *E. andrei* i *E. fetida* są dwoma odrębnymi gatunkami

biologicznymi, między którymi istnieje bariera rozrodcza, gdyż nie udało się pozyskać potomstwo par mieszanych *E. andrei*+*E. fetida* z różnych okolic Hiszpanii i Brazylii. Okazy te nie były zdolne do hybrydyzacji [7] ani nie ujawniały hybrydyzacji w trakcie genotypowania z użyciem gatunkowo specyficznych sekwencji [7, 25], choć wcześniejszy badacz sugerował taką możliwość nie tylko na podstawie wzoru pigmentacji [42], lecz również składu metabolitów w płynie celomatycznym [4, 20].

Nasze wyniki jednoznacznie ujawniły istnienie hybrydyzacji i przepływ genów między *E. andrei* i *E. fetida* pochodzącymi z laboratoriów i naturalnych populacji Francji, Polski i Węgier.

Kolejna różnica między dżdżownicami badanymi w Hiszpanii i w Polsce polega na tym, że okazy „hiszpańskie” hodowane w izolacji były zdolne do samozapłodnienia [6], czego nie zaobserwowaliśmy w krakowskich i rzeszowskich doświadczeniach podczas ponad rocznej izolacji dziewięciu dżdżownic hodowanych w oddzielnych pojemnikach z ziemią [30, 31].

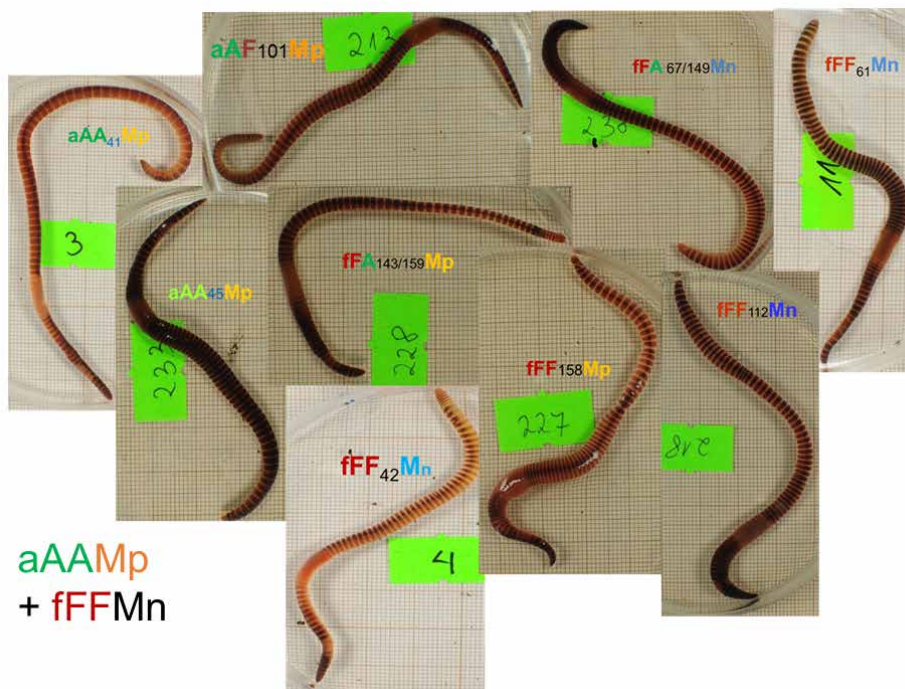
Zestawienie tych wyników dowodzi, że *E. andrei* i *E. fetida* należą do gatunków, których bliskie populacje mogą się ze sobą krzyżować dając płodne potomstwo, lecz tracą tę zdolność w miarę narastania różnic genetycznych populacji żyjących w odosobnieniu,

w szczególności tych hodowanych w laboratoriach. Badane przez nas dżdżownice nie pasują do szkolnych definicji gatunku jako grupy osobników o wspólnym pochodzeniu, mogących się ze sobą swobodnie krzyżować dając płodne potomstwo (definicja rozrodcza), czy też jako grupy osobników o wspólnej puli genowej odrębnej od innych gatunków, przy braku przepływu genów pomiędzy gatunkami (definicja genetyczna) [48]. Nic więc dziwnego, że ciągle są kłopoty ze sformułowaniem precyzyjnej definicji gatunku biologicznego. Prawdopodobnie jest to niemożliwe...

Wyniki naszych eksperymentów rzucają zatem nowe światło na ewolucję *Eisenia* sp. i otwierają pole do dalszych badań nad hybrydyzacją (dlaczego niektóre pary są do niej zdolne, a inne nie?) i nad samozapłodnieniem (czy dochodzi do niego dopiero w kokonie, czy może już w organizmie matki?).

natomiast samozapłodnienia u okazów hodowanych od wylęgu w izolacji, u których niekiedy (choć bardzo rzadko) pojawiały się kokony sterylne. W przypadku badanych przez nas dżdżownic, zachowania godowe oraz rozród dziewiczych okazów inicjowała dopiero obecność partnera własnego gatunku (*E. andrei* z *E. andrei* lub *E. fetida* z *E. fetida*) lub gatunku blisko spokrewnionego (*E. andrei* z *E. fetida*), lecz nie dżdżownicy z obcego rodzaju, np. *Dendrobaena veneta*, co przetestowano w przypadku par *E. andrei* z *D. veneta* [31].

Teoretycznie samozapłodnienie może występować u wszystkich gatunków obupłciowych. Hermafrodytyzm (obojnactwo) [49] jest częste u bezkręgowców, np. u tasiemca (u którego samozapłodnienie jest uzasadnione trybem życia) czy u ślimaków lądowych i pierścienic, wśród nich dżdżownic. Hermafrodytyzm potencjalnie występuje u wszystkich kręgowców,



Ryc. 7. Sylwetki dziewięciu okazów indywidualnie numerowanych dżdżownic *Eisenia andrei* (aAA), *Eisenia fetida* (fFF) oraz hybryd pochodzących od *E. andrei* (aAF) lub od *E. fetida* (fFA); każdy okaz posiada w płynie celomatycznym fluorofor M (Mp) lub go nie ma (Mn); dżdżownice te są spokrewnione z wyjściową parą aAAMp + fFFMm [29].

### Hermafrodytyzm i samozapłodnienie u dżdżownic a inne gatunki

Ciekawym zjawiskiem jest udowodnione tu samozapłodnienie okazów rodzicielskich towarzyszące hybrydyzacji i krzyżówkom wstecznym z okazami gatunków rodzicielskich. Zapewne takie samo zjawisko dotyczy par wewnątrzgatunkowych *E. andrei* z *E. andrei* lub *E. fetida* z *E. fetida*, co da się eksperymentalnie przetestować. Nie zaobserwowaliśmy

a ujawnia się na przykład u licznych gatunków ryb, zmieniających płęć w ciągu życia (hermafrodyty sekwencyjne); usunięcie jąder ropuchy indukuje rozwój jajników, a więc zmianę płci; z jaja żółwia rozwija się albo samiec albo samica, w zależności od temperatury otoczenia [49]. Termin hermafrodytyzm wywodzi się z mitologii greckiej od imienia syna Hermesa i Afrodyty, który łączył w jednym ciele cechy męskie i żeńskie; tacy ludzie są wśród nas [2, 21].



## Hybrydyzacja w królestwie zwierząt

Nasuwa się pytanie, czy hybrydyzacja wymuszona przez nas eksperymentalnie u *E. andrei* i *E. fetida* przez wspólną hodowlę par różnogatunkowych partnerów bez możliwości napotkania dżdżownic własnego gatunku zachodzi również w naturze? Wyniki badania skandynawskich dżdżownic *E. andrei* i *E. fetida* z naturalnych stanowisk ujawniają w ich genomie ślady dawnych hybrydyzacji [17]. Oba gatunki żyją w powierzchniowych warstwach gleby; w naturze *E. andrei* wybiera kompost i nawóz, a *E. fetida* raczej ściółkę leśną, lecz często tworzą one wspólne kolonie w przyzmacz kompostu, co sprzyja hybrydyzacji [9].

Zjawisko hybrydyzacji jest powszechne wśród roślin i to dzięki niemu otrzymujemy okazy o pożądanym cechach. W królestwie zwierząt ogólnie znaną hybrydą jest bezpłodny muł, czyli mieszańiec powstały ze skrzyżowania klaczy konia i ogiera osła. Żubroń to mieszańiec żubra i bydła domowego, a wilczak – mieszańiec wilka i psa [50]. Hybrydy są zazwyczaj bezpłodne, ale niektóre mieszańce, w skali ewolucyjnej, dały początek nowym gatunkom [1, 8, 38]. Istnieje nawet koncepcja, że hybrydyzacja

jest jednym z głównych motorów specjacji, czyli powstawania gatunków [22, 23].

Podobnie do sytuacji u *Eisenia* sp., hybrydy różnych gatunków mogą dawać płodne potomstwo z jednym z gatunków rodzicielskich i za ich pośrednictwem pula genetyczna gatunku-biorcy może zostać wzbogacona o geny charakterystyczne dla gatunków pokrewnych [np. 24]. Za takie odkrycie odnośnie naszego gatunku nagrodę Nobla otrzymał w roku ubiegłym Svante Pääbo, specjalizujący się w genetyce ewolucyjnej, który kierował pracami nad genomami neandertalczyka oraz człowieka z Jaskini Denisonowej [46]. Okazało się, że genom *Homo sapiens* posiada liczne fragmenty genów naszych wymarłych krewnych, co świadczy o więzach rodzinnych skutkujących hybrydyzacją naszych przodków ze współczesnymi im gatunkami hominidów [5, 39].

## Podziękowania

Dziękuję serdecznie wszystkim Koleżankom i Kolegom, współautorom cytowanych prac, którzy uczestniczyli w omawianych tu eksperymentach finansowanych przez NCN (2016/23/B/NZ8/00748) i przez Uniwersytet Jagielloński (K/ZDS/005405).

## Bibliografia:

1. Adavoudi R., Pilot M. (2022) Consequences of Hybridization in Mammals: A Systematic Review. *Genes*, 13: 50.
2. Ainsworth C. (2015) Sex redefined. *Nature*, 518: 288-291.
3. Albani J. R., Demuyne S., Grumiaux F., Leprêtre A. (2003) Fluorescence fingerprints of *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*. *Photochemistry and Photobiology* 78, 599-602.
4. Bundy J. G., Spurgeon D. J., Svendsen C., Hankard P.K., Osborn D., Lindon J. C., Nicholson J. K. (2002) Earthworm species of the genus *Eisenia* be phenotypically differentiated by metabolic profiling. *FEBS Letters*, 521: 115-120.
5. Defus A. (2022) Długa historia sapiensowsko-neandertalskich relacji. *Alma Mater*, 236: 46-50.
6. Dominguez J., Velando A., Aira M., Monroy F. (2003) Uniparental reproduction of *Eisenia fetida* and *E. andrei* (Oligochaeta: Lumbricidae): evidence of self-insemination. *Pedobiologia*, 47: 530-534.
7. Dominguez J., Velando A., Ferreira A. (2005) Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1986) and *Eisenia andrei* Bo-uche (1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? *Pedobiologia*, 49: 81-87.
8. Dubey S., Dufrenoy Q. (2017) An extinct vertebrate preserved by its living hibridogenetic descendants. *Scientific Reports* 7: 12768.
9. Dvořák J., Mančíková V., Pižl V., Elhottová D., Silerová M., Roubalová R., Skanta F., Procházková P., Bilej M. (2013) Microbial environment affects innate immunity in two closely related earthworm species *Eisenia andrei* and *Eisenia fetida*. *PLoS One*, 8: 11.
10. Elvira C., Dominguez J., Briones M. J. (1996) Growth and reproduction of *Eisenia andrei* and *E. fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) in different organic residues. *Pedobiologia*, 40: 377-384.
11. Jafari E., Khajouei M. R., Hassanzadeh F., Hakimelahi G. H., Khodarahmi G.A. (2016) Quinazolinone and quinazoline derivatives: recent structures with potent antimicrobial and cytotoxic activities. *Research Pharmacological Sciences*, 11: 1–14.

12. Jaskulak M., Rorat A., Vandenbulcke F., Pauwels M., Grzmil P., Plytycz B. (2022) Polymorphic microsatellite markers demonstrate hybridization and interspecific gene flow between lumbricid earthworm species, *Eisenia andrei* and *E. fetida*. PLOS ONE, 17: 2.
  13. Karan R., Agarwal P., Sinha M., Mahato N. (2021) Recent Advances on Quinazoline Derivatives: A Potential Bioactive Scaffold in Medicinal Chemistry. Chemical Engineering, 7: 73.
  14. Kavitha K., Srinivasan N., Haribabu Y. (2018) A review on quinazolinone and its derivatives with diverse biological activities. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 7: 628-649.
  15. Kruk J., Dziurka M., Plytycz B. (2019) Identification of new fluorophores in coelomic fluid of *Eisenia andrei* earthworms. PLoS One. 14: 3.
  16. Ma H., Marti Gutierrez N., Morey R., Van Dyken C., Kang E, Hayama T. et al. (2016) Incompatibility between nuclear and mitochondrial genomes contributes to an interspecies reproductive barrier. Cell Metabolism, 24: 283–294.
  17. Martinsson S., Erséus C. (2018) Hybridisation and species delimitation of Scandinavian *Eisenia* sp. (Clitellata: Lumbricidae). European Journal of Soil Biology, 88: 41–47.
  18. Mazur A. I., Klimek M., Morgan A. J., Plytycz B., (2011) Riboflavin storage in earthworm chloragocytes and chloragocyte-derived eleocytes and its putative role as chemoattractant for immunocompetent cells. Pedobiologia, 54S: S37-S42.
  19. Morgan A.J. Earthworms. Nature Gardeneres. Osmia Publ. Ltd. 2004
  20. Oien N., Stenersen J. (1984) Esterases of earthworms – III. Electrophoresis reveals that *Eiseniafetida* (Savigny) is two species. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 78:277-282.
  21. Ostrer H. (2014) Disorders of sex development (DSDs): an update. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 99: 1503-1509.
  22. Payseur B. A., Rieseberg L. H. (2016) A genomic perspective on hybridization and speciation. Molecular Ecology, 25: 2337-2360.
  23. Pennisi E. (2016) Shaking up the tree of life. Science, 354: 6314.
  24. Pereira C. S. A., Aboim M. A., Collares-Pereira M. J. (2014) Introgressive hybridization as a promoter of genome reshuffling in natural homoploid fish hybrids (Cyprinidae, Leuciscinae). Heredity, 112: 343-350.
  25. Pérez-Losada M., Eiroa J., Mato S., Domínguez J. (2005) Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. Pedobiologia, 49: 317-324.
  26. Plytycz B., Morgan A.J. (2011) Riboflavin storage in earthworm chloragocytes/eleocytes in an eco-immunology perspective. Invertebrate Survival Journal, ISJ, 8: 199-2011.
  27. Plytycz B., Bigaj J., Falniowski A., Morgan A. J. (2016) Unexpected results and open questions from experiments on regeneration in lumbricid worms. Invertebrate Survival Journal, ISJ, 13: 315-325.
  28. Plytycz B., Bigaj J., Osikowski A., Hofman S., Falniowski A., Panz T., Grzmil P., Vandenbulcke F. (2018a) The existence of fertile hybrids of closely related model earthworm species, *Eisenia andrei* and *E. fetida*. PLoS ONE. 13: 1-18.
  29. Plytycz B., Bigaj J., Panz T., Grzmil P. (2018b) Asymmetrical hybridization and gene flow between *Eisenia andrei* and *E. fetida* lumbricid earthworms. PLoS ONE. 13: 1-16.
  30. Plytycz B., Bigaj J., Rysiewska A., Osikowski A., Hofman S., Podolak A., Grzmil P. (2020) Impairment of reproductive capabilities in three subsequent generations of asymmetric hybrids between *Eisenia andrei* and *E. fetida* from French, Hungarian and Polish laboratory colonies. PLoS ONE, 15: 7.
  31. Podolak A., Kostecka J., Hofman S., Osikowski A., Bigaj J., Plytycz B. (2020) Annual reproductive performance of *Eisenia andrei* and *E. fetida* 2 in intra- and einter-specific pairs and lack of reproduction of isolated virgin earthworms. Folia Biologica (Krakow) 68: 1-6.
  32. Reinecke A. J., Viljoen S. A. (1991) A comparison of the biology of *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Biology and Fertility of Soils, 11: 295-300.
  33. Rochfort S., Wyatt M. A., Liebeke M., Southam A. D., Viant M. R., Bundy J. G. (2017) Aromatic metabolites from the coelomic fluid of *Eisenia* earthworm species. European Journal of Soil Biology, 78: 17-19.
  34. Rombke J., Aira M., Backeljau T., Breugelmanns K., Dominguez J., Funke E., Graf N., Hajibabaei M., Perez-Losada M., Porto P.G., Schmelz R., Vierna J., Vizcaino A., Pfenninger M. (2016) DNA barcoding of earthworms (*Eisenia fetida/andrei* complex) from 28 ecotoxicological test laboratories. Applied Soil Ecology, 104: 3-11.
-

35. Rorat A., Suleiman H., Grobelak A., Grosser A., Kacprzak M., Płytycz B., Vandenbulcke F. (2016) Interactions between sewage sludge-amended soil and earthworms--comparison between *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* composting species. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 3026-3035.
36. Rorat A., Kachamakova-Trojanowska N., Jozkowicz A., Kruk J., Cocquerelle C., Vandenbulcke F., Santocki M., Płytycz B. (2014) Coelomocyte-derived fluorescence and DNA markers of composting earthworm species. *Journal of Experimental Zoology A, Ecology, Genetics, Physiology*, 321: 28-40.
37. Roubalová R., Płytycz B., Procházková P., Navarro Pacheco N. I., Bilej M. (2018) Annelida: Environmental interactions and ecotoxicity in relation to the earthworm immune system. In: *Advances in Comparative Immunology* (ed. Cooper E.L.), Springer International Publishing AG, part of Springer Nature, pp. 933-951.
38. Runemark A., Vallejo-Marin M., Meler J. (2019) Eukaryote hybrid genome. *PLOS Genetics*, 15: 11
39. Ryszkiewicz M. (2022) Jak żyła nenandertalska rodzina? *Polityka* 46: 54-58.
40. Santocki M., Falniowski A., Płytycz B. (2015) Restoration of experimentally depleted coelomocytes in juvenile and adult composting earthworms *Eisenia andrei*, *E. fetida* and *Dendrobaena veneta*. *Applied Soil Ecology*, 104: 163-173
41. Sato M., Sato K. (2013) Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833: 1979-1984.
42. Sheppard P. S. (1988) Specific differences in cocoon and hatchling production in *Eisenia fetida* and *E. andrei*. In: Edwards CA, Neuhauser EF (Editors), *Earthworms in Waste and Environmental Management*. SPB, The Hague, p. 83–92.
43. Suleiman H., Rorat A., Grobelak A., Grosser A., Milczarek M., Płytycz B., Kacprzak M., Vandenbulcke F. (2017) Determination of the performance of vermicomposting process applied to sewage sludge by monitoring of the compost quality and immune responses in three earthworm species: *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* and *Dendrobaena veneta*. *Bioresource Technology*, 241: 103-112.
44. Swiderska B., Kedracka-Krok S., Panz T., Morgan A.J., Falniowski A., Grzmil P., Płytycz B. (2017) Lysoenin family proteins in earthworm coelomocytes – Comparative approach. *Developmental and Comparative Immunology*, 67: 404-412.
45. Takacs V., Molnar L., Klimek B., Gałuszka A., Morgan A.J., Płytycz B. (2016) Exposure of *Eisenia andrei* (Oligochaeta; Lumbricida) to cadmium polluted soil inhibits earthworms maturation and reproduction but not restoration of experimentally depleted coelomocytes or regeneration of amputated segments. *Folia Biologica (Kraków)*, 64: 275-284.
46. Zeberg H., Pääbo S. (2021) A genomic region associated with protection against severe COVID-19 is inherited from Neandertals. *PNAS* 118: 9.
47. Zhang C., Montooth K.L., Calvi B. R. (2017) Incompatibility between mitochondrial and nuclear genomes during oogenesis results in ovarian failure and embryonic lethality. *Development*, 144: 2490-2503

### Źródła internetowe

48. Gatunek [https://pl.wikipedia.org/wiki/Gatunek\\_\(biologia\)](https://pl.wikipedia.org/wiki/Gatunek_(biologia))
49. Hermafrodytyzm <https://pl.wikipedia.org/wiki/Hermafrodytyzm>
50. Mieszaniec <https://pl.wikipedia.org/wiki/Mieszaniec>