

Zárójelentés

1. Előzmények

A gubacsképződés az állat-növény kölcsönhatás egyik leglátványosabb formája, amely a rovarok körében is több alkalommal megjelent az evolúció során. Ez utóbbi csoportokban a gubacs képződését alapvetően a rovar szabályozza, mechanizmusa azonban ismeretlen. A gubacs védelmet nyújt az abban fejlődő lárva számára, habár az összetett struktúra adaptív természete szintén nyitott kérdés. Szerkezeti felépítése, helye (növényi szerv: ág, szár, levél, barka stb.) és a gubacsképződés ideje változatos, ám leginkább a gubacsképzőre specifikus (Stone et al 2002, Stone & Schönrogge 2003).

A legváltozatosabb formájú és egyben legbonyolultabb szerkezetű növényi gubacsokat a gubacsdarazsak (Hymenoptera, Cynipoidea, Cynipidae) fajai okozzák. Mintegy 1400 leírt fajukkal a második legnagyobb csoport a gubacsokozó rovarok között. Életmenetük változatos, a csoport egy részére ivaros és ivartalan generációk is jellemzőek, mely során a különböző generációkba tartozó egyedek gyakran más fajokon és növényi szerveken fejlődnek ki. Valószínű, hogy egyes növényevő fémfürkészekhez hasonlóan a gubacsdarazsak is másodlagosan tértek át (vagy vissza) a parazitoid életmódról a fitofág táplálkozásra, monofiletikus eredetűek (Ronquist 1999, Stone et al 2002, Nylander 2004, Stone et al in press).

A gubacshoz a gubacsképző darázon kívül még számos más rovar is kötődik. A gubacsban kifejlődő, különböző rovarcsoportokba tartozó társbérlő (inquilin) rovarok, valamint az általában fémfürkészek közé tartozó parazitoid darazsak egy zárt közösséget alkotnak, melyek kedvelt modelljei különféle ökológiai és evolúciós vizsgálatoknak.

1.1 Taxonómia, filogenetika

A Cynipidae család hat nemzetséget magába foglal magába. Az általában lágyszárú növényeken élő, parafiletikus Aylacini nemzetség (92 faj) a gubacsdarazsak bazális csoportjának tekinthető, melyből morfológiai és DNS vizsgálatok alapján alapvetően két csoportot lehet levezetni. Ezek életmódjukban is különböznek egymástól. Az első csoportba a rózsákon fejlődő Diplolepidini (62 faj), az *Acer* valamint *Nothophagus* gazdanövényen fejlődő Pediaspidini (5 faj), az *Acacia* és *Prosopis* gazdákon élő Eschatocerini (3 faj), valamint a tölgyön gubacsot képző darazsakat magába foglaló Cynipini (kb. 1000 faj) fajai tartoznak (pl. Melika 2006).

Az életmenet tekintetében másik csoportot alkotó társbérlő életmódú fajokat Synergini (159 faj) nemzetségbe sorolják. A társbérlők nem képesek önálló gubacsképzésre, más gubacsdarazsak által okozott gubacsokban fejlődnek. Egy fejlődő gubacsban azonban már képesek lárvakamrát, táplálósövet differenciációt indukálni. Jelenlétük lehet semleges a gubacsképző számára (kommenzalizmus), azonban gyakran darázs gazdájukat elpusztítják, ez utóbbi fajra jellemző sajátosság is lehet. A kapcsolat speciális abban a tekintetben, hogy a gazda és társbérlő viszonylag szoros filogenetikai rokonságban áll egymással – tipikusan mindkettő gubacsdarázs (Cynipidae) – azonban a társbérlők nem közvetlenül gubacsképző gazdájukból származtathatóak, amint például gubacstetveknél tapasztalhatunk (Miller & Crespi 2003). Ennek következtében gazdaspecifitásuk sem egyértelmű.

A Synergini nemzetség evolúciós eredete a mai napig vitatott. Imágó morfológián alapuló filogenetikai elemzések alapján monofiletikus, az Aylacini nemzetség *Diastrophus* és *Xestophanes* nemeihez áll a legközelebb. Azonban az eredmény kis fajszerű elemzésen alapul. Előzetes részletesebb morfológiai és molekuláris filogenetikai eredmények is ellentmondanak ennek (Nylander 2004). Ma egyértelműbbnek tűnik, hogy polifiletikus – a

társbélő életmód többször alakulhatott ki a gubacsdarazsak családján belül, a mi eredményeink is erre utalnak (Ács et al kézirat). A Synergini nemzetség nyolc neme – a speciális dél-afrikai *Roophilus* kivételével, amely *Rhus* fajokon található lepkegubacsban fejlődik – jórészt Holarktikus elterjedésű. A Nyugat Palearktikumban ismert 48 Synergini fajból 29 Magyarországon is megtalálható (Pujade Villar et al 2003, Melika 2006).

1.2 Elterjedés, gazdaspecificitás

A gubacsdarazsak szoros kapcsolatban állnak a gazdanövényükkel, ezáltal biogeográfiájuk is szorosan összefügg azok földrajzi elterjedésével. A gubacsdarazsak alapvetően az északi félteke mérsékelt éghajlatú vagy mediterrán területeire jellemzőek, elterjedésük nagymértékben tükrözi a növény gazdáik földrajzi elterjedését. A Nyugat Palearktikum tölgyfajai két szekcióba sorolhatóak: hozzávetőleg 13 a *Cerris* valamint 16 a *Quercus sensu stricto* szekcióba tartozik. Molekuláris filogenetikai elemzések eredményei alapján a *Quercus* nemzetség két korán szétváló ágának képviselői. A tölgyek jelentős, sokszor domináns alkotói számos Nyugat Palearktikus fás társulásnak. Figyelembe véve a különböző területek Pleisztocén eljegesedésének történetét, valamint talajtípusokban és klimatikus tényezőkben található különbségeket, öt fő tölgy diverzitási centrumot, déli refúgiumot, illetve egy jórészt összefüggő, a refúgiomoktól északra elhelyezkedő régiót tudunk elkülöníteni. 1) Ibériai félsziget és az Atlasz hegység környéke (Maghreb), 2) Appenini félsziget (Itáliai refúgium), 3) Balkán refúgium(ok), 4) Törökország (Anatólia és Taurus hegység) és Levant, 5) Kaukázus, Irak és Irán (Zagros és Alborz hegységek). Délkelet-Magyarország a Balkán régió peremvidékén fekszik ebben a felosztásban (Stone et al in press).

Legújabb eredmények szerint a tölgy gubacsdarazsak (Cynipini) Palearktikus eredetűek, és a nearktikus régióban található diverzitási centrumuk nagy valószínűséggel másodlagos radiáció eredménye – növény gazdájukhoz hasonlóan (Stone et al in press). A tölgy gubacsdarazsak alkotják a Cynipidae legfajgazdagabb csoportját. Magyarországról 11 nembe tartozó 95 tölgy gubacsdarazs faj ismert, ezáltal hazánk fajgazdagsága a legmagasabb Európában, köszönhetően annak is, hogy egyike legrészletesebben feltárt területeknek. A Magyarországon tapasztalt magas fajgazdagság részben azzal is magyarázható, hogy hazánkban mind a két tölgy szekció tagjai képviseltetik magukat, így megtalálhatóak a mindkét generációjukkal a *Quercus sensu stricto* szekció fajaihoz (pl. *Biorhiza*, *Cynips* és *Trigonaspis*, illetve az *Andricus* és *Neuroterus* néhány faja), mindkét szekcióhoz (tölgy szekció váltók, számos *Andricus* és az összes *Callirhytis*) és a *Cerris* szekció fajaihoz kötődő gubacsdarazsak egyaránt. Ez utóbbiba sorolható az *Aphelonyx*, *Dryocosmus* (a szelídgesztenyén élő *Dryocosmus kuriphilus* kivételével), *Plagiotrochus*, *Pseudoneuroterus*, néhány *Neuroterus* és a társbélő, de sajátos gubacsformával rendelkező *Synophrus*.

Az emberi beavatkozás számos ponton hatással van a gubacsdarazsak elterjedésére is. Valószínűleg meghatározó tényező a tölgyerdők eltűnése következtében előálló fragmentáció és populáció méret csökkenés. Másrészt a csertölgy északi és nyugati betelepítései a gazdaváltó fajok elterjedési területének kiterjedését vonták maguk után az elmúlt 400 évben (pl. *Andricus kollari*). A kolonizálást a gubacs kereskedelem is felgyorsította, szinte kibogozhatatlanná téve az elterjedési mintázatot (Stone et al 2007).

Néhány gubacsképző fajra azonban a filogeográfiai rekonstrukció lényegében semmi meglepő eredményt nem hozott. Például az alapvetően mediterrán elterjedésű, gazdaváltó *Andricus quercustozae* Irán-Törökországtól Marokkóig előfordul ma is, minden feltételezett refugiális területen jelen lehetett az utolsó eljegesedés idején (Rokas et al 2003). Legnagyobb változatosságot a törökországi populációk mutatták, és feltehetően az északibb területek kolonizációja is alapvetően innen történhetett („Out of Anatolia” hipotézis). Emellett az eredmények a magyarországi és olaszországi populációk között későbbi génáramlásra

utalnak. Ibéria alapvetően izolált, alacsony genetikai diverzitást mutat. Emellett egy új tölgy gazda faj kolonizációja révén egy genetikailag és biológiailag is jól elkülönülő rassz jött létre. A felvázolt elterjedési történet alapvetően haplotípusok jelenlétén vagy hiányán alapul.

Gazda szerinti differenciáció akár fajképződéshez vezethet, gazda rasszok jelenléte növényevő rovaroknál és parazitoidoknál feltehetően gyakori (pl. Miller & Crespi 2001, Stireman et al 2005). A gazdaváltás a gubacsdarazsaknál ritka esemény (Cook et al 2002). Ez igaz mind a tölgy szekciók, mind a növényi szervek közötti váltásra. Ez alól a *Synophrus* látszólag kivételt képezett, eredményeink azonban több új, gazdanövény szerv specifikus csoportra utalnak (Pénzes et al kézirat).

2. Módszerek.

A molekuláris markerek természetükből adódóan különböző mértékű változatosságot mutathatnak, eltérő evolúciós sebességgel jellemezhetőek egy leszármazási soron belül is. A magi 28S riboszómális RNS-t kódoló szakaszok például a konzervatívabbak közé tartoznak. Gubacsdarazsak esetén a 28S rDNS D2 régiója például nemek, esetleg fajok szintjén mutat megfelelő változatosságot, D1 régiója általában ennél nagyobb időléptékű kérdésekben alkalmazható. A mitokondriális citokróm c oxidáz I alegységének génje vagy a citokróm b (cyt b) ennél lényegesen változatosabb. A gyakorlatban általánosan elfogadott, hogy a molekuláris evolúció specialitásai miatt a molekuláris filogenetikai becslést a morfológiától függetlennek tekintik, a morfológiai és molekuláris alapú filogenetikai következtetések egymás hiányosságait kiegészítik. Molekuláris markerek a filogenetikai és filogeográfiai történeti rekonstrukciók mellett hasznos segédeszköznek bizonyultak az életmenet vizsgálatok során is. Például gazdaváltó gubacsképző fajok különböző generációjának egyedei morfológiailag olyan mértékben különböznek, hogy néha külön nemként kerülnek leírásra (pl. Melika 2006). DNS szekvenciák alapján számos ilyen generációpárt sikerült beazonosítani.

Molekuláris filogenetikai rekonstrukciókhoz a magi 28S rDNS egyes D1-D5 régióinak, illetve a mitokondriális citokróm c oxidáz I alegység (COI) és cyt b gének egy szakaszának szekvenciáját használtuk fel. Részletes protokollra lásd Ács et al 2007. A mitokondriális szekvenciák illesztése általában kézzel is gond nélkül kivitelezhető, a 28S rDNS szakaszok esetében a szerkezeti kényszereket is figyelembe vettük (szerkezet alapján az illesztés kézzel történt a Cynipidae, Figitidae modellekhez). A filogenetikai rekonstrukció alapvetően maximum likelihood (ML) és Bayes módszerekkel történt, a módszerekre való érzékenység teszteléséhez a kapott fák topológiáját távolság alapú (pl. Neighbour joining) és parszimónia alapú módszerekkel kapott eredményekkel minden esetben összevetettük. Bayes és ML rekonstrukcióhoz a megfelelő szubsztitúciós modellt teszteltük eredményeinket (LRT, AIC) alapján választottuk ki. Az elemzéseket általában külön partíciókra bontva (pl. COI, cyt b kodon pozíciók, 28S rDNS stem-loop struktúra, gap kezelése karakterként) is elvégeztük. Felhasznált fontosabb szoftverek: PAUP, PhyML, MrBayes, ClustalX, Modeltest, TNT, Mega, R. Amennyiben fajon belüli változatosság kérdése is felmerült, a filogenetikai szignál meglétét likelihood mapping (Tree Puzzle) és konfidencia hálózatok (Splitstree) segítségével ellenőriztük. A közlés alatt, illetve előtt álló eredményekre részletesebben kitérek.

3. Eredmények

3.1. *Dryocosmus* - *Chilaspis* taxonómia és filogenetika

A gyűjtések során számos, általában ritkának tekintett gubacsképző faj is előkerült, ide tartoznak a tipikusan *Cerris* szekcióhoz kötődő *Dryocosmus* és *Chilaspis*. A csoportra a gazda

specificitása tekintetében sajátos, Európába néhány éve Kínából behurcolt és jelentős károkat okozó szelídgesztenye kártevő, a *Dryocosmus kuriphilus* hívta fel a figyelmet. Másrészt egyedülállóan a *Cerris* szekcióban nearktikus fajokat is magába foglal a csoport. Noha ezzel a fő kutatási iránytól eltértünk, egy későbbi *D. kuriphilus* elleni biológiai védekezésre irányuló pályázat reményében a csoport filogenetikai helyzetét megvizsgáltuk (Ács et al 2007).

Molekuláris filogenetikai és az azt követő morfológiai elemzések alapján a *Chilaspis* nemet a *Dryocosmus*-ba szinonimizáltuk, amely így már egy monofiletikus csoportot alkot, magába foglalva a *D. kuriphilus*-t. Emellett két korábbi *Dryocosmus* fajról kiderült, hogy egy faj életciklusának két különböző stádiumáról van szó (*D. cerriphilus*). Talán a gubacsdarazsak evolúciója szempontjából a legfontosabb eredmény az egységes *Cerris* szekcióba kimutatása: a többi *Cerris* szekcióba tartozó fajjal asszociálódva a gubacsképzők egy korán levált csoportot képeznek, mindössze két gazdanövény váltással (Ács et al 2007).

3.2 Synergini taxonómia és filogenetika

Az első *Synergus umbraculus* eredmények alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a csoport részletes filogenetikai elemzése nélkül nem tudunk továbblépni. Egyrészt a gubacsképzőknél tapasztaltak alapján egyes minták fajsztintet meghaladó genetikai különbségeket mutattak. Másrészt az elmúlt évek Nyugat-Palearktikum jelentős részét lefedő gyűjtéseiből származó minták elemzése során több korábbi diagnosztikai jellemzőről beigazolódott, hogy akár jelentős változatosságot mutathat nagyobb földrajzi léptékben. A morfológiai karakterek részletesebb elemzése Hymenoptera szinten is folyamatban van (Mikó et al 2007), amely hatással van az egyes taxonokban felhasznált karakterek prioritására is. Az új, gyakran már filogenetikai megfontolásokon alapuló karakterek alkalmazása maga után vonta számos faj szinonimizálását vagy új taxonok leírását. Általában a molekuláris markerekkel kapott eredmények további lehetséges komplikációkra hívták fel a figyelmet, amely maga után vonta az alapos morfológiai elemzést (pl. Melika et al 2007, Tavakoli et al 2008).

A gubacsindukcióra nem képes társbélőkről, noha már csak abundanciájuk miatt is meghatározó komponensei a gubacs-közösségnek, nagyon kevés ismerettel rendelkezünk (Sanver & Hawkins 2000). Ennek egyik oka az, hogy határozásuk nagy tapasztalatot igényel. Míg a gubacsképző darázs fajspecifikus gubacsa alapján többé-kevésbé azonosítható, a társbélő ritkán módosítja a gubacs morfológiáját olyan mértékben, hogy akár jelenléte kívülről felismerhető legyen.

Molekuláris elemzések eredményeként kiderült, hogy akár egy tölgyről származó egyazon gubacsból kinevelt, morfológiailag hasonló, egy fajba sorolt egyedek egészen más leszármazási kapcsolatokat mutathatnak. Lehet ez az utolsó eljegesedésre visszavezethető hosszú izoláció következménye, de számos egyéb alternatív magyarázat is elképzelhető. A csoporton (pl. populációkon) belüli és csoportok közötti genetikai távolságok jelentős különbsége gyakran jóval korábban kialakult reprodukív izolációra utal. A Synergini nemzetség Nyugat-Palearktikus fajainak filogenetikai elemzése erre számos példát szolgáltat.

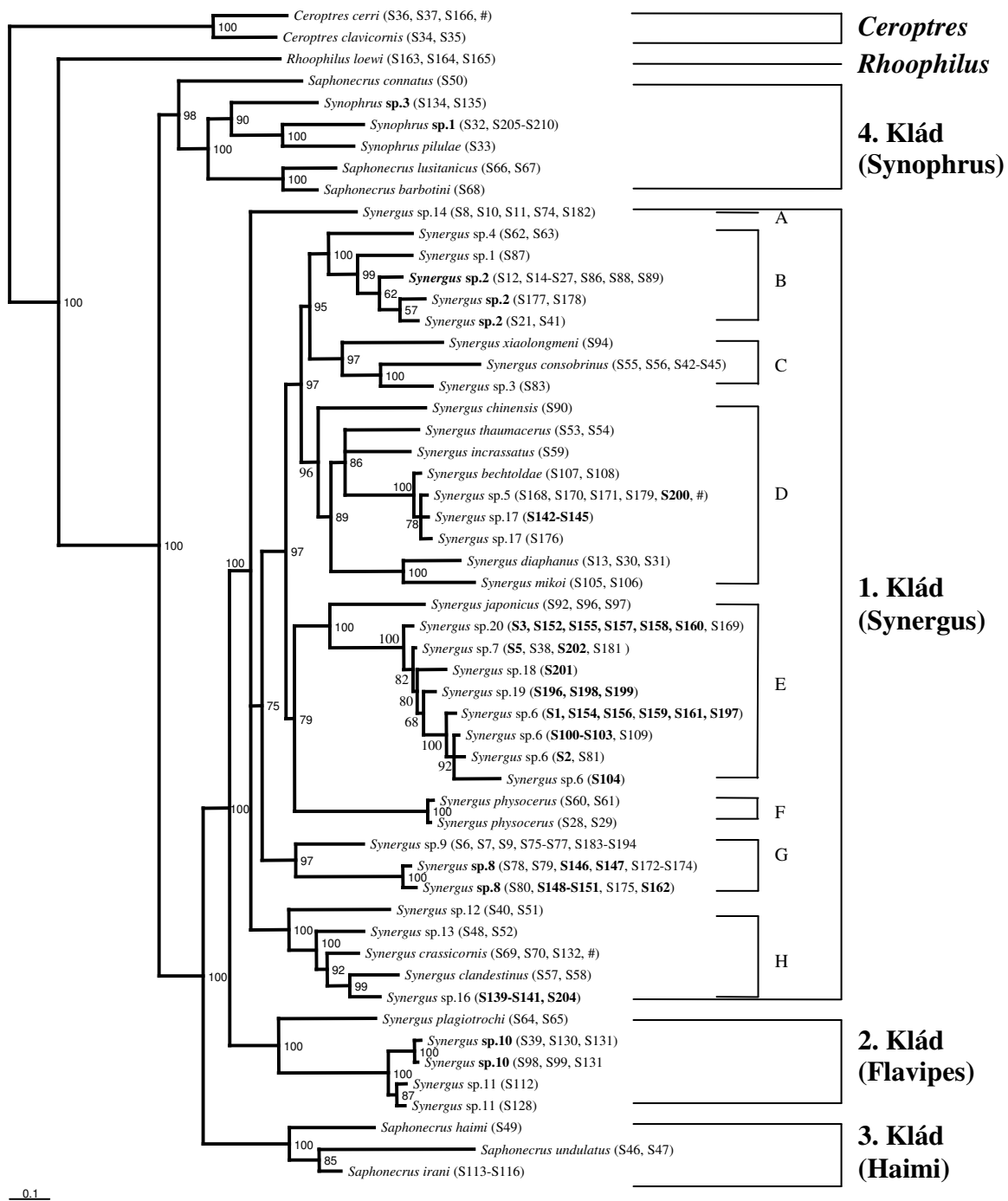
A Synergini Cynipini gazdához köthető négy Nyugat-Palearktikus nemének egyike a *Ceroptres*, amely korábbi elemzések alapján feltehetően független leszármazási sort képez. Célunk ezért elsősorban a problémásabb *Saphonecrus* – *Synergus* – *Synophrus* komplexek filogenetikai kapcsolatainak elemzése. A 45 Nyugat-Palearktikus faj jelentős részét *Synergus* nembe sorolják, a *Saphonecrus* 6 és *Synophrus* 3 leírt faja mellett. A 33 Ny-Palearktikus fajra (185 egyed) kiterjedő analízis elsősorban Magyarországon gyűjtött mintákon alapul. Azonban a morfológia alapján indokoltnak tartott földrajzi változatosság figyelembe vételére, illetve a Magyarországról ismeretlen fajok bevonására további, elsősorban Spanyolország, Algéria, Olaszország, Törökország és Irán területéről származó egyedek is elemzésre kerültek. A

filogenetikai analízis 4 DNS szekvencia szakasz alapján történt: magi 28S rDNS D2 (586 bázispár), illetve a minimális változatosságot mutató D3-D5 (520 bázispár) régiója, mitokondriális COI (660 bázispár) és cyt b (433 bázispár) szakaszok. A szekvenálás után az egyedek jelentős része újra határozásra került az esetleges identifikációs hiba minimalizálására. Lokuszonként külön és különböző kombinációkban több különböző módszerrel végrehajtva az elemzést jórészt kongruens eredményeket kaptunk. A legnagyobb filogenetikai információ tartalommal a COI jellemezhető, amelyet a változatosabb cyt b, majd a faj szinten már kevésbé informatív 28S rDNS D2 követ. A kombinált elemzésben (1. ábra) a bazális filogenetikai kapcsolatokat alapvetően a 28S, a nagyobb kládokon belül viszont már a mitokondriális gének határozták meg. Az egyes csoportokat csak akkor tekinthetjük egy genealógiai fajnak, ha egymással kölcsönösen monofiletikusak. Gyakran előfordul, hogy a morfológiai faj nem alkot monofiletikus egységet: két vagy több különböző morfológiai faj egy csoportot alkot (kis genetikai távolságuk alapján) vagy jelentősen elkülönülő csoportok egy morfológiai fajnak bizonyultak (potenciális kriptikus fajok) (Ács et al kézirat).

Az eredmények a bazális helyzetű *Synophrus* és *Synergus* nemek monofiletikusságát támogatják. A *Synergus* két, morfológiai jellegekben is jól elkülönülő kládra szakad, amelyekből a kisebb 2. (*flavipes*) klád fajai a *Cerris* szekcióhoz kötődnek. Ez utóbbi helyzetében a markerek nem teljesen kongruensek, COI alapján a *Synergus* klád részét képezi, de azon belül különálló klád. A *Saphonecrus* azonban nem monofiletikus. Egy részük a *Synergus* testvércsoportjaként (3. (*haimi*) klád) önálló egység, három faja viszont a 4. (*Synophrus*) kládban található. Ez utóbbiak morfológiai alapon is egyértelműen elkülöníthetőek, így a molekuláris eredményekkel összhangban a *Saphonecrus* nem rövidesen szinonimizálásra kerül a *Synophrus*-ba, a 3. klád pedig egy új genus nevet fog kapni. A *Synergus* kládon belül 8 magas posteriori valószínűséggel elkülönülő egység figyelhető meg (A-H).

Morfológiai és molekuláris eredmények konfliktusának számos oka lehet. A *Synergus* sp.2 (B kládban) azt példázza, hogy a morfológiai alapon különböző fajok DNS szekvenciák alapján egy csoportot alkotnak: a 17 egyed morfológiai alapon 5 fajba sorolható, a COI szekvenciák divergenciája azonban 0,15% alatti. Morfológia oldaláról például a jelenség magyarázata lehet a diagnosztikai jelleg változatossága. Itt mind az öt faj több generációval rendelkezik. Tudjuk, hogy a generációk között jelentős lehet a fenotípusos eltérés, nem zárható ki annak a lehetősége, hogy bizonyos esetekben egyazon faj két generációjáról van szó. Másrészt a DNS szekvenciák hasonlósága vagy divergenciája (génfák) sem feltétlenül tükrözi a fajok filogenetikai kapcsolatait. Leszármazási sorok nem teljes rendeződése vagy az introgresszió hibás konklúziót eredményezhet, de a mitokondriális szakaszok vártnál alacsonyabb változatosságának magyarázatául a populációméret csökkenést sem hagyhatjuk figyelmen kívül: a palacknyak effektus a kisebb effektív populációméretű mtDNS-re jelentősebb. A *Synergus* sp. 2 esetén a magi 28S rDNS és mitokondriális COI szekvenciák némi ellentmondást mutatnak, amely alapján a leszármazási sorok nem teljes rendeződése valószínűsíthető. Mitokondriális szakaszok kis változatossága háttérben egyéb folyamatok is állhatnak.

A *Flavipes* kládba tartozó sp. 10 csoport a *Synergus variabilis* (Irán) és *S. flavipes* (Magyarország) morfológiai alapon egyértelműen elkülöníthető fajokat foglalja magába. A nagy földrajzi távolság ellenére COI szekvencia divergenciájuk mindössze 1,2%, 28S rDNS D2 szekvenciájuk azonos. A csoportra jellemző tipikus fajsintű divergencia értékek (tipikusan COI-ra minimum 2-3%, de esetünkben általában ennek többszöröse) ismeretében ezt sokkal inkább fajon belüli változatosságnak gondolnánk.



1. **Ábra.** Bayes partíciókra bontott elemzés alapján kapott konszenzus fa (partíciók: COI kodon, Cyt b, 28S rDNS D2 stem és loop) a posterior valószínűségekkel (*100). A számok zárójelben a szekvenált egyedek azonosítói. A szövegben néhány megemlített csoportot (*sp.*), illetve a *Synergus umbraculus* egyedeket vastagon kiemeltük. Az *sp.* rövidítés arra utal, hogy a csoporthoz nem rendelhető kizárólagosan fajnév. Az elemzésben az összes Nyugat-Palaearktikumából ismert *Ceroptres* (2) és *Saphonecerus* (6), 2 *Synophrus* és 23 *Synergus* faj szerepel. További Kelet-Palaearktikus fajok: *Synergus japonicus*, *S. chinensis*, *S. xiaolongmeni*.

Nem zárható ki a gondos ellenőrzés ellenére sem az identifikációs hiba lehetősége, például a *S. consobrinus* és *S. thaumacerus* esetén. Nöstényeik nagyon hasonlóak, viszont egyértelműen elkülönülő kládokat alkothatnak (C illetve D kládok), magas csoportok közötti és kis csoporton belüli szekvencia divergenciával. Ez példát szolgáltat arra, hogy a molekuláris alapú identifikáció kis morfológiai különbségeket mutató taxonokban segíthet („DNS Barcoding”), feltéve, hogy a populáción belüli – populációk közötti – fajok közötti változatosság mértéke megfelelően kalibrálva van.

Ennek az ellenkezője is gyakori, amikor egy morfológiai faj magas fajon belüli változatosságot mutat, akár különálló kládokat alkotva. Az elemzés összesen 20 ilyen kriptikus taxonra utal. A *Synophrus* minták esetén a mitokondriális gének 10% feletti páronkénti különbséget mutattak az egyes kládok között. Később ezek a morfológiai elemzések után új fajoknak bizonyultak (lásd alább). 19 egyed volt morfológiai alapon *Synergus hayneanus*-nak határozva, vagy a karakterek tekintetében átmenetet képviselt a *S. reinhardi* vagy *S. umbraculus* felé. A filogenetikai elemzés három nagyobb leszármazási sor 4 csoportjába különítette el őket. (i) *S. sp.* 14 4 egyedéből 2 részben a *S. umbraculus* diagnosztikai morfológiai jellemzőit is hordozza, míg az (ii) *S. sp.* 9 7 ‘hayneanus’ egyedéből 4 a *S. reinhardi*-val mutat hasonlóságot. Az (iii) *S. sp.* 8 14 egyede *S. hayneanus*-nak vagy *S. umbraculus*-nak bizonyult morfológiai alapon. Az *S. sp.* 8 két csoportra bontható magas támogatottsággal, a COI szekvencia 2,6%, a Cyt b 1,3% eltérést mutat, a 28S rDNS D2 azonos. Az (iv) *S. sp.* 6 is tartalmaz egy, a többitől távoli *S. umbraculus* egyedet. Pillanatnyilag tehát az eredmények arra utalnak, hogy a *S. reinhardi*, *S. hayneanus* és *S. umbraculus* egy komplexet alkot, amelyben kriptikus fajok jelenléte várható és elkülönítésük megoldatlan.

Synergus umbraculus (lásd 3.4) az egyik leggyakoribb társbérő faj, 30 feletti ismert gubacsképző (főleg *Andricus*) gazdával. Az analízisben szereplő egyedek magas szekvencia diverzitást mutattak. Tudjuk (lásd *S. hayneanus*), hogy a határozó bélyegek nem megfelelőek az egyértelmű elkülönítésére. Ezért pillanatnyilag a molekuláris alapon felismert kládoké a döntő szó, amelyet majd az egyes kládokba tartozó egyedek sorozatainak felállítása után morfológiai elemzés fog követni. Cyt b adatok alapján a 29 „umbraculus” egyed 10 csoportba sorolható, amelyek a D, E, G és H kládokban találhatóak (*S. sp.* 5-8, *S. sp.* 15-20). Ebből mindössze 3 csoport tartalmazott kizárólag „umbraculus”-t (*S. sp.* 16, *S. sp.* 18, *S. sp.* 19). Az egyedek jelentős része az E kládban található, pillanatnyilag így ez tartható leginkább „umbraculus”-nak, melynek testvérfaja a Kelet-Palaearktikus *Synergus japonicus*. COI és a 28S rDNS D2 ezzel a felosztással kongruens, bár a kisebb felbontás kevesebb osztályt eredményez. Az E klád azonban önmagában extrém magas diverzitással jellemezhető. Ez az átlagos divergenciák alapján részben faj szintű különbségre is utalhat. Az E kládot további minták bevonásával tovább elemeztük.

3.3 *Synophrus* filogenetika

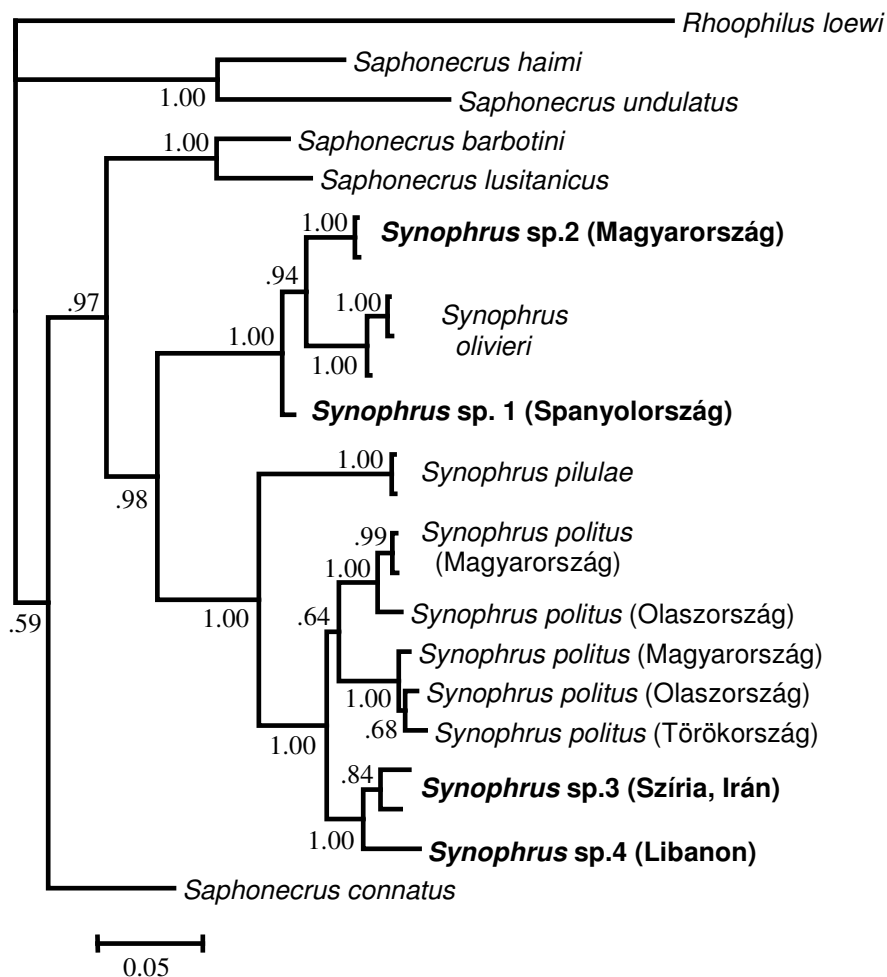
A *Cerris* szekcióhoz kötődő *Synophrus* nem 3 ismert faja több szempontból is kiemelésre érdemes, fontos információkkal szolgálhatnak a társbérő életforma eredetének megértéséhez. Korán levált monofiletikus csoportot alkotnak, több specialitással, ami a gubacsképzőkre emlékeztet. Korai stádiumú gubacsokat támadva gyorsan átveszi a gubacs differenciálódásának irányítását, társbérőként fajspecifikus gubacsformát eredményez. Sokáig a Cynipini-be sorolták, imágó morfológia alapján azonban egyértelműen a Synergini nemzetségben a helye. Gubacsa külső felépítésében jóval egyszerűbb, mint a gubacsképző fajoknál megszokottak. Gubacsképző gazdái alapvetően ismeretlenek (Melika 2006).

Gubacsa előfordulhat levélen, ágon, rügyekben egyaránt – ilyen jellegű gazdaváltás a gubacsképzők körében ritka. Ezért pl. a levél és ág „rasszok” egyértelmű elkülönülését vártuk, bizonyos mértékig származási helytől és recens kolonizációs történettől függetlenül (Pénzes et al kézirat).

A Synergini filogenetikai elemzése során 10,6% COI szekvencia divergenciát mutatott a *Synergus politus* (1. ábra, *Synophrus* sp.1) és *pilulae*, az egyedek a Sopron melletti Szárhalmi erdőből származnak. Hozzávetőleg hasonló távolságra helyezkedik el tőlük az S134 és S135 (Spanyolország) minta (11%), amely szintén fajszintű elkülönülésre utal. Ez utóbbi egyedeket morfológiai alapon sehol nem lehetett egyértelműen besorolni. Ráadásul a harmadik ismert faj, a *Synophrus olivieri* státusza is hosszú ideig bizonytalan volt, a Synergini szintű rekonstrukció elvégzése idején mintánk sem volt belőle. Egy részletesebb, *Synophrus*-ra irányuló hazai mintavétel és több további, a Nyugat-Palearktikum különböző területeiről származó minta alapján végzett filogenetikai elemzés váratlan eredményeket hozott.

A minták Magyarország négy egymástól távoli területéről származnak (Mecsek, Sopron, Bükk, Szeged környéke), illetve további egyedeket vontunk be az elemzésbe Spanyolország, Olaszország, Irán, Libanon és Szíria területéről. Összesen 123 COI és 42 28S rDNS D2 szekvencia került meghatározásra. A spanyolországi kivételével minden területről rendelkezésre állt egy nagyobb populáció sorozat a morfológiai elemzéshez. A molekuláris filogenetikai elemzés alapján a monofiletikus *Synophrus*-on belül több faj is valószínűsíthető (2. ábra). Az elemzést több különböző partícionálással, különböző módszerekkel elvégezve hasonló eredményt kaptunk, amelyet az ezt követő morfológiai elemzés is megerősített. Az iráni *S. olivieri* fajjal két új, leírás alatt álló faj mutat szorosabb kapcsolatot: a Synergini filogenetikában is szereplő spanyol faj *S. sp.1* – újabb példát szolgáltatva az iráni-balkáni és spanyol “fajpárra” – és a magyarországi *S. sp. 2*, amely Szegedről és Sopronból is előkerült. A *S. sp. 3* (Szíria és Irán) és *S. sp. 4* (Libanon) szintén új fajok, monofiletikus egységet alkotva a legjobban ismert *S. politus* fajjal. Ez utóbbi a Bükkben, Mecsekben és Sopronban gyakori, míg Szeged környékén ritka. A *Synophrus pilulae* is távolról ehhez a csoporthoz kapcsolódik, de csak hazai mintákból került elő, itt minden lelőhelyről. A molekuláris filogenetikai eredmények alapján átvizsgált populáció sorozatok az eddigi diagnosztikai karakterek felülbírálatát vonták maguk után.

A 28S rDNS D2 szekvenciák kis változatosságot mutattak, de minden nagyobb klád létezését támogatták. A hazai minták COI szekvenciák alapján kis (<0,6%) változatosságot mutattak *S. pilulae* és *S. sp. 2* (Magyarország) fajokra. Az utóbbi gubacsai levélnyélről, gallyakról és rügyből is előkerültek, de nincs olyan konzervens szekvencia divergencia, ami alapján gubacsképző gazda rasszokra gondolhatnánk. A *S. politus* esetén azonban két nagyobb klád különíthető el (2,1%). Ezek egyik török és olasz mintákat tartalmaz, egyetlen hazai mellett. A másik klád (1,2%) 58 hazai és 8 olasz egyed tartalmaz. A hazaiak jelentős része Sopronból származik, az egyedek rügyekből, levélről és gallyakról gyűjtött gubacsokból lettek kinevelve (Pénzes et al kézirat).



2. Ábra. *Synophrus* fajok Bayes módszerrel rekonstruált filogramja (GTR-I-G modell, külcsoport: *Rhoophilus*) kombinált COI (658 bázispár) és 28S D2 (565 bázispár) szekvenciák alapján, a posterior valószínűség értékekkel. Az új, leírás alatt álló fajok kiemelve.

3.4 *Synergus umbraculus*

Munkánk elsődleges célkitűzése az volt, hogy betekintést nyerjünk a gubacsdarázs inkvilinek genetikai változatosságába. A változatosságot hazai (intenzívebb mintavétellel) illetve nagyobb, filogeográfiai (Európa) léptékben vizsgáljuk. Kérdés a gazdák szerinti genetikai differenciáció (ritka gazdaváltás, gazda rasszok): esetünkben ez lehet gazdanövény (*Quercus* tölgy szekció tagjai, esetleg tölgy fajok) és darázs („gubacs”) gazda (pl. *Andricus* gubacsok) egyaránt. Másrészt a változatosságban nyomot hagy a kérdéses populációk kolonizációs története, amelyre filogeográfia léptékében keresünk magyarázatot.

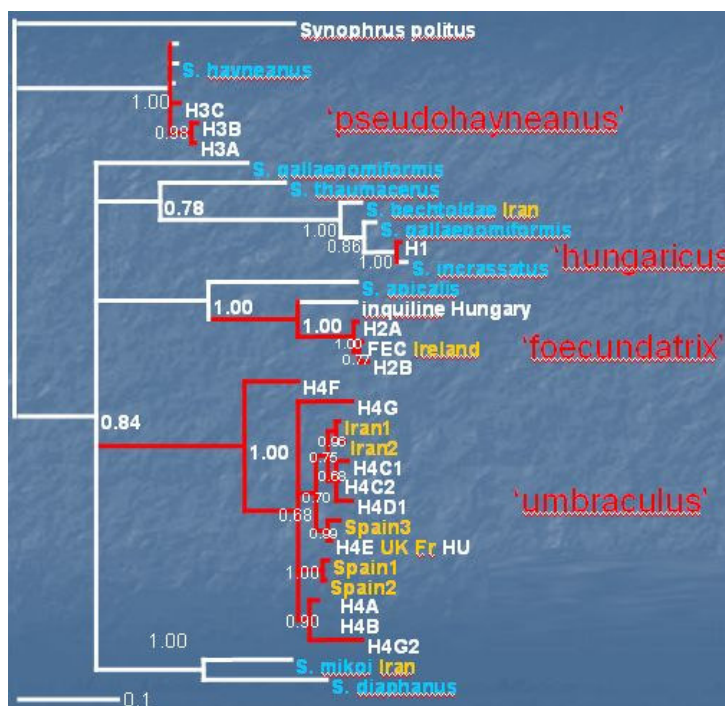
A *Synergus umbraculus* egyike a leggyakoribb, széles elterjedési területtel jellemezhető társbélő fajoknak, ezért választottuk vizsgálataink alanyául. *Quercus* tölgy szekcióhoz kötődését eredményeink is megerősítették: *Cerris* gubacsokból soha nem került

elő. A több ezer hazai, illetve két romániai (K-Bihar, Duna delta) gyűjtőútból hozzávetőleg 300 *S. umbraculus* egyedét neveltünk ki, illetve mintegy 200 lelőhelyről hoztunk mintákat edinburgi utunk során Graham Stone laboratóriumából, a filogeográfiai elemzéshez (Irán-Libanon-Törökország, Olaszország, Spanyolország-Portugália). Ez utóbbi feleslegessé tette a betervezett balkáni gyűjtőutat is. Az intenzív gyűjtések ellenére K-Franciaországból és a Kárpátokon túlról azonban csak parazitoidokat és gubacsképzőket sikerült kinevelni, így az Ny-Palearktikum léptékű filogeográfiai rekonstrukció nem tekinthető teljesnek amennyiben e két régióban a faj előfordul.

A genetikai változatosságot cytb DNS szekvenciákkal jellemeztük. Két primer párral 697 bázispárnyi szakaszt szekvenáltunk, amelyet specifikusan erre a fajra módosítottunk a (CP1, CP2 primerek alapján). A szakasz magába foglalja az általánosan használt 433 bázispárnyi (CB1, CB2 primerek) szakaszt is. A történeti rekonstrukció során kapott nagyobb csoportok néhány, ahol lehetett minél nagyobb földrajzi távolságról származó egyedére a COI és a magi 28S rDNS gén D2 régió DNS szekvenciáit is meghatároztuk.

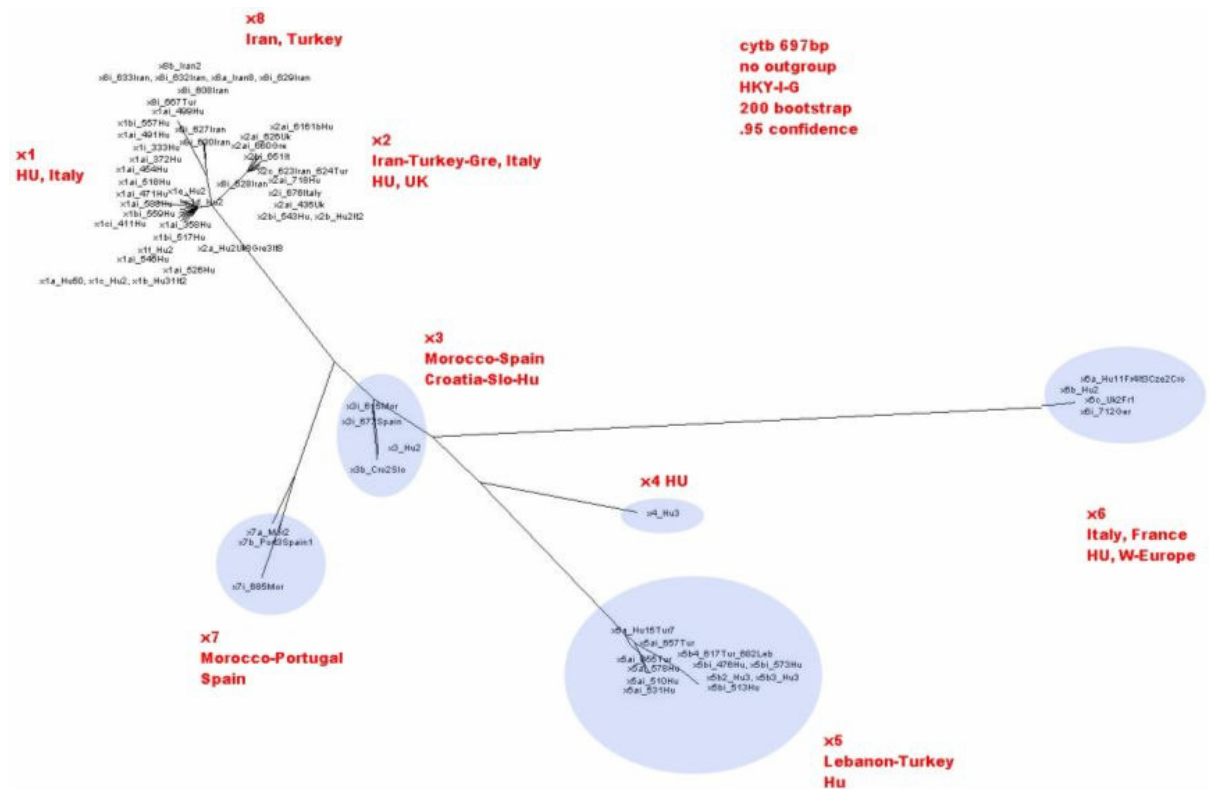
A pályázat keretében mikroszatellit lokuszok karakterizálását is beterveztük, amelyek a fenti kérdések lényegesen nagyobb felbontású elemzését teszik lehetővé. A mikroszatellit screening során nem várt problémával szembesültünk. Az egyéb forrásból megrendelt 20 mikroszatellit klónból (Bioprofile) összesen nyolcra sikerült a PCR reakciót optimalizálni, amelyekre a screening megtörtént. Végeredményben (20 egyed alapján) mindössze 1 lokusz bizonyult megfelelően polimorfnak és megbízhatóan reprodukálhatónak. Tekintettel a sikertelenségre a Bioprofile további 20 klón szekvenciát ígért 2007 tavaszára, amelyet azonban máig nem kaptunk meg. Ezért a 2006-ra opcionálisan tervezett publikáció is elmaradt.

Mint a Synergini filogenetikai rekonstrukcióból kiderült, a *S. umbraculus* a jelenlegi rendszer alapján több kriptikus fajt is tartalmaz (3. ábra). Ezek Magyarországon kívül több helyről is előkerültek. Talán az *Andricus foecundatrix* gazdát érdemes kiemelni, mivel gubacsából kinevelt minden egyed egy önálló kládba sorolható („foecundatrix”), vagyis az eddigi eredmények alapján monofágnek tűnik. Az összes többit több kládba sorolható egyedeket több gazda mellett is megtaláltuk.



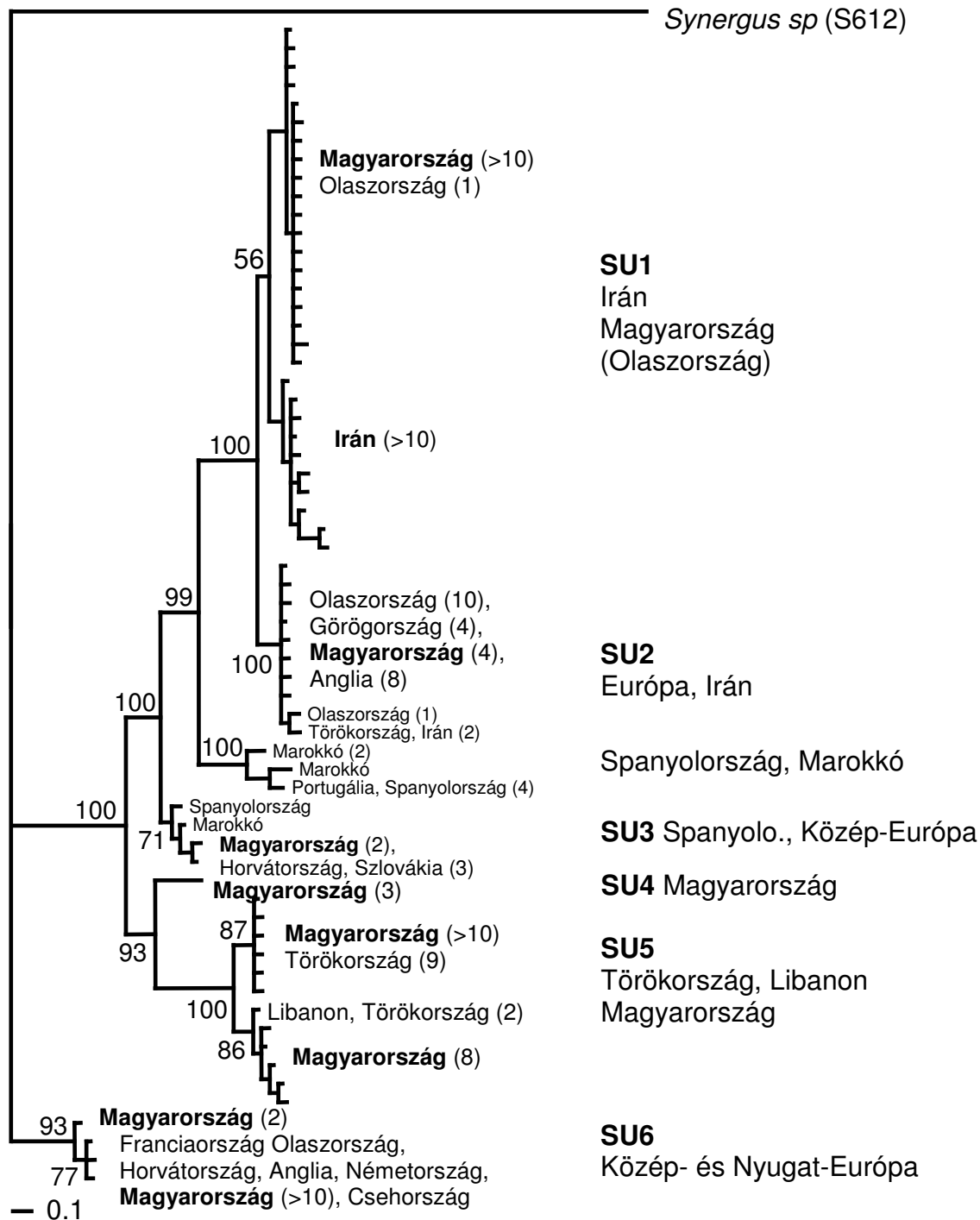
3. Ábra. *Synergus umbraculus* cytb haplotípusok kapcsolatai. Részletes rekonstrukcióra lásd az. 1 ábrát.

20 hazai lelőhelyről 186 (17 gubacs gazda), Ny-Paleraktikum léptékben további 96 egyedből sikerült a cytb szekvenciát meghatározni, amelyek a Synergini rekonstrukció alapján az „umbraculus” csoportba sorolhatóak. Az 55 egyedre rendelkezésre álló COI szekvenciák teljes mértékben kongruensek a cytb eredményekkel. A 47 db 28S D2 szekvencia minimális változatosságot mutatott (2 bp). Ennek kiértékelésétől eltekintettünk, mivel a labor módszerek és a nagy kópiaszámból adódó bizonytalanságok (pl. többszörös csúcsok jelenléte a kromatogramon néhol kimutatható) figyelembevételével ez a hibahatárt súrolja. A magi 28S rDNS D2 kis változatossága és a mitokondriális régiók alapján számolt páronkénti genetikai távolságok a *Synergus* fajtárokra jellemzőknél kisebb, amely alapján az „umbraculus” csoport, mint önálló faj valószínűsíthető. A 95%-os konfidencia hálózat azonban a filogenetikai szignál meglétére utal, ezért filogenetikai módszerekkel elemeztük tovább.



4. Ábra. *Synergus umbraculus* cytb haplotípusok hálózata. 95% konfidencia hálózat (SplitsTree).

A hazai minták haplotípusai több kládban megtalálhatóak (5. ábra) és minden klád számos különböző gazda mellől tartalmaz haplotípusokat. Pusztán a hazai minta elemezve valószínűsíthető a rasszok hiánya, azonban nem zárható ki teljesen figyelembe véve a gazdák filogeográfiai léptékű eloszlását is.

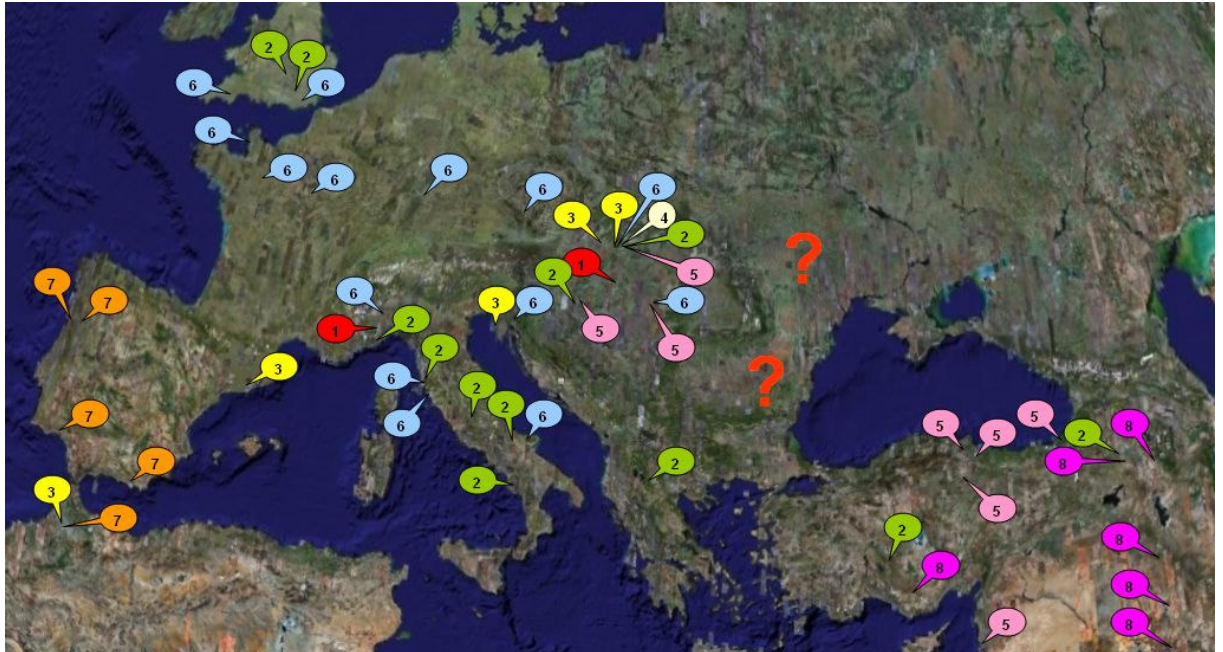


5. Ábra. *Synergus umbraculus* cytb haplotípusok (697 bázispár) filogenetikai kapcsolatai Bayes rekonstrukcióval (GTRIG modell, posteri valószínűségek*100). A lelőhelyeket csak országok szintjén tüntettük fel. SU1-SU6: a hazai mintákat tartalmazó nagyobb kládok. A COI és 28S szekvenciák kongruens eredményt adtak.

Az előzetes eredmények szignifikáns populáció struktúrára (haplotípusok gyakorisága és genetikai távolsága régiók között) utalnak 5 régióba sorolva a hazai mintavételi helyeket (AMOVA, F_{ST}). Ezért a lelőhelyek nem vonhatóak össze, a gazda szerinti differenciációt a lelőhelyek szerinti bontásban kell kiértékelni. Azonban tekintettel a sok gazdára az AMOVA

elemzéstől a gazdák esetén már el kellett tekintettünk. Még a leggyakoribb gazdák (pl. *Andricus kollari*, *A. lucidus*) esetén egy adott mintavételi helyen is előfordulnak alacsony (<10) mintanagyságok, így nincs megfelelő teszt erő. Alternatív megoldás lehet a filogenetikai alapú karakter leképezés, amely kivitelezése folyamatban van.

A hazai minták diverzitása tehát összetett mintázatot mutat, azonban a kolonizációs történet erre részben magyarázatot adhat (6. ábra).



6. Ábra. Nagyobb haplotípus csoportok elterjedése (SUx az 5. ábrán).

A filogenetikai rekonstrukció eredménye az alábbiakat sugallja. 4 nagyobb kládhoz társíthatóak minták a feltételezett elterjedési gócterületekről. Gyakorisági adatokat is figyelembe véve az egyedek jelentős hányada egy önálló iráni kláddal mutat kapcsolatokat (SU1) – azonban pillanatnyilag nincsenek átmenetet képviselő haplotípusok, így a kolonizációs útvonal bizonytalan. A Kárpátok vonalán túl nem találtunk *S. umbraculus* egyedeket. A SU5 balkáni klád haplotípusai szintén gyakoriak hazánkban, ez közelebbi balkáni kapcsolatokra utalhat, de egy libanoni minta is ide esik – viszont semmi más. Feltehetően az olaszországi refúgium hatását illusztrálja a szintén számos hazai mintát tartalmazó, inkább Közép- és Nyugat-európai klád (SU6), melynek haplotípusai sok különböző helyről előkerültek Olaszországtól Franciaországon keresztül Angliáig. De sem a Balkánon, sem Spanyolországban nem fordult elő, önálló bazális kládot képez. A SU2 klád a Balkán és Olaszország mellett hazai és angliai mintákat is tartalmaz, míg a SU4 spanyol és Közép-európai kapcsolatra utal a filogenetikai eredmények alapján, noha a klád képviselői csak hazánkból kerültek elő.

Az eddigi eredmények alapján tehát a *Synergus umbraculus* – pontosabban a *Synergus* E kládja csoportjainak – elterjedését valószínűleg nem a darázs gazda specifitása korlátozza. A *Quercus* szekció fajai között sem válogat, Magyarországon például megtalálható mindhárom ide sorolható tölgyfajon. Elterjedése során feltehetően tölgy gazdait követve számos, számára életmenete tekintetében elfogadható gubacsdarázs fajjal került kapcsolatba. Az életmenet kényszerek természete azonban ismeretlen. Várható, hogy elterjedését így kevesebb barrier korlátozta, mint a gubacsképzőkét. Elterjedési mintázata így sokkal inkább a

parazitoid darazsakra, és nem a gubacsképzőkre emlékeztet, amely beigazolódni látszik – hasonlóan a *Synophrus politus*-hoz, noha annak *Cerris* szekcióhoz való kötődése erősebb elterjedési kényszert jelent. Megfigyelhető például egy izolált spanyol - Észak-afrikai klád, de Közép- és Nyugat-Európa a balkáni, olasz és spanyol refúgiumok hatásának komplex keveréke, amely rovarok körében nem ismeretlen. Többszörös kolonizáció, humán diszperzió további olyan faktorok, amelyeket számításba kell venni. A magas posteriori valószínűség értékek a jelentős kládok közötti genetikai távolságokkal jelentős időbeli eltérésekre utalnak, melyek morfológiai támogatottsága pillanatnyilag ismeretlen.

A fenti témában két diplomadolgozat és TDK dolgozat (Bihari Péter, Bozsóki Zoltán) született. Bihari Péter 2006 évben felvételt nyert a *S. umbraculus* témában az SZTE Biológiai Doktori Iskolába. Az eredmények nemzetközi (6th International Conference of Hymenopterists, Symposium on Conservation and Genesis of the Fauna of the Carpathian Basin) és részben hazai (7. Magyar Ökológus Kongresszus, 2006) konferenciákon is bemutatásra kerültek, illetve egy magyar nyelvű könyvfejezet is megjelent (Melika G, Péntes Zs, Mikó I, Bihari P, Ács Z, Somogyi K, Bozsóki Z, Szabó K, Bechtold M, Fári K, Fehér B, Fülöp D, Csóka Gy, Stone G N 2007 A Kárpát-medence tölgyön élő gubacsdarazsai. in: A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása. szerk: Forró László Magyar Természettudományi Múzeum Budapest pp 165-174).

Az eredmények leközlése folyamatban van. A Synergini filogenetikai rekonstrukció eredménye benyújtás alatt áll (Systematic Biology), hasonlóan a *Synophrus* filogenetikához (Zoologica Scripta). A pályázat gerincét alkotó *S. umbraculus* filogeográfia kiértékelése még nem tekinthető véglegesnek. Benyújtását 2008 tavaszán tervezzük (Molecular Ecology), a tervezett 2007 végéhez képest. További várható közlemény: *S. umbraculus* gazda differenciáció a hazai minták alapján (2008, kiértékelése folyamatban van, a filogeográfiai eredmények függvényében). Elkészült kéziratok:

Melika,G., Pujade-Villar J., Stone G.N., Fülöp D., Péntes Zs. New species of cynipid gallwasps of the genus *Plagiotrochus* Mayr, 1881 from Nepal and Jordan (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini). Submitted to Acta Zool. Hung.

Péntes Zs., Melika G., Bozsóki Z., Bihari P., Tavakoli M., Pujade-Villar J., Mikó I., Fehér B., Fülöp D., Szabó K., Stone G.N. Cynipid inquiline of the genus *Synophrus* Hartig, 1843 (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini): taxonomic and phylogenetic re-appraisal.

Ács Z, Challis R, Melika G, Hayward A, Bihari P, Péntes Zs, Pujade-Villar J, Stone G.N Phylogenetic relationships among western palaeartic species of the oak inquiline gallwasp (Hymenoptera, Cynipidae, Synergini).

Irodalom

Ács Z., Melika G., Péntes Zs., Pujade-Villar J., Stone G. N. (2007): The phylogenetic relationships between *Dryocosmus* - *Chilaspis* and allied genera of oak gallwasps (Hymenoptera, Cynipidae: Cynipini) Syst. Entomol, 32:70-80.

Cook J.M., Rokas A., Pagel M., Stone G.N. (2002) Evolutionary shifts between host oak sections and host-plant organs in *Andricus* gallwasps. Evolution 56:1821-1830.

Melika G. (2006) Gall Wasps of Ukraine. Cynipidae. Vestnik zoologii, supplement 21 (Kiev, Veles), vol. 1-2, 1-300, 301-644.

Melika G., Choi J-Y., Pujade-Villar J., Péntzes Zs., Fülöp, D. (2007) A new species of inquiline cynipid of the genus *Ufo* Melika & Pujade-Villar, 2005 from Korea (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 10:197-200

Mikó, I., Vilhelmsen, L., Johnson, N.F., Masner, L., Péntzes, Zs. (2007) Skeletomusculature of Scelionidae (Hymenoptera: Platygastroidea): head and mesosoma. *Zootaxa*. 1571:1-78.

Miller D.G., Crespi B (2001) The evolution of inquilinism, host-plant use and mitochondrial substitution rates in *Tamalia* gall aphids. 16:731-743.

Nylander J.A. 2004 "*Bayesian Phylogenetics and the Evolution of Gall Wasps*", Ph. D. Thesis, Univ. Uppsala, Uppsala, 40pp.

Pujade-Villar J., Melika G., Ros-Farré P., Ács Z., Csóka G. (2003) Cynipid inquiline wasps of Hungary, with taxonomic notes on the Western Palaearctic fauna (Hymenoptera: Cynipidae, Cynipinae, Synergini). *Folia Entomologica Hungarica* 64:121-170.

Rokas A., Atkinson R.J., Webster L., Stone, G.N. (2003) Out of Anatolia: longitudinal gradients in genetic diversity support a Turkish origin for a circum-Mediterranean gallwasp *Andricus quercustozae*. *Molecular Ecology* 12, 2153–2174.

Ronquist, F. (1999) Phylogeny, classification, and evolution of the Cynipoidea. *Zoologica Scripta* 28:139-164.

Sanver D., Hawkins B. A. (2000) Galls as habitats: the inquiline communities of insect galls. *Basic and Applied Ecology* 1:3-11.

Stireman J.O., Nason J.D., Heard S.B. (2005) Host-associated genetic differentiation in phytophagous insects: general phenomenon or isolated exceptions? Evidence from a goldenrod-insect community. *Evolution* 59:2573-2587.

Stone G.N., Challis R.J., Atkinson R.J., Csóka Gy., Hayward A, Melika G., Mutun S., Preuss S, Rokas A, Sadeghi E., Schönrogge, K. (2007) The phylogeographical clade trade: tracing the impact of human-mediated dispersal on the colonization of northern Europe by the oak gallwasp *Andricus kollari*. *Molecular Ecology* (2007) 16: 2768-2781.

Stone G.N., Schönrogge K. (2003) The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology and Evolution* 18:512-522.

Stone G.N., Schönrogge K., Atkinson R.J., Bellido D., Pujade-Villar J. (2002) The population biology of oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae). *Annu. Rev. Entom.* 47, 633-668.

Stone G.N., Melika G., Csóka G. (eds) (2008) *The oak cynipids of the Western Palaearctic*. London, Ray Society Publisher, in press.

Tavakoli M, Melika G., Sadeghi S.E., Péntzes Zs, Assareh M.A., Atkinson R., Bechtold M, Mikó I, Zargarán M.R., Aligolizade D., Barimani H., Bihari P, Pirozi F, Fülöp D., Somogyi K, Challis R., Preuss S, Nicholls J, Stone G.N. (2008) New species of oak gallwasps from Iran (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini). *Zootaxa* 1699:1-64