



Szegedi Tudományegyetem

Biológia Doktori Iskola

Természettudományi

és Informatikai Kar



MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

TÁRSBÉRLŐ GUBACSDARAZSAK FILOGENETIKÁJA ÉS FILOGEOGRÁFIÁJA

Ph.D. értekezés

Bihari Péter

Témavezető:

Dr. Pénzes Zsolt,

egyetemi docens,

SZTE TTIK, Ökológiai Tanszék,

tudományos munkatárs,

MTA SZBK, Genetikai Intézet

2011

Szeged

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	4
Gubacsok és gubacsdarazsak (Cynipidae).....	4
Inkvilin gubacsdarazsak (Synergini)	6
A <i>Synophrus</i> génusz	11
<i>Synergus</i> fajok.....	13
Gazdaspecifikus genetikai differenciáció	14
Filogeográfia	15
Célkitűzések.....	18
Anyag és módszer	19
<i>Synophrus</i>	19
Gyűjtés	19
DNS izolálás, amplifikálás, szekvenálás és a szekvenciák összeállítása.....	21
A szekvenciák elemzése	22
<i>Synergus umbraculus</i>	23
Gyűjtés	23
DNS izolálás, amplifikálás, szekvenálás és a szekvenciák illesztése.....	24
Statisztikai módszerek	25
Eredmények.....	29
<i>Synophrus</i>	29
Molekuláris filogenetika és diverzitás	29
<i>Synergus umbraculus</i>	32
Szekvencia és haplotípus variabilitás	32
Filogenetikai elemzés és a haplocsoportok jellemzése.....	36
Statisztikus parszimónia hálózat	39
Genetikai differenciáció.....	41
Gazda szerinti genetikai differenciáció.....	42
Diszkusszió.....	43

<i>Synophrus</i>	43
Filogenetika.....	43
Gubacs alak és elhelyezkedés	45
<i>Synergus umbraculus</i>	45
Filogeográfia	45
<i>A genetikai diverzitásbeli mintázatok hasonlósága a gubacs közösség tagjai között</i>	45
<i>A Kárpát-medence genetikai diverzitása</i>	47
<i>Az észak-európai Synergus umbraculus populáció eredete</i>	48
Gazda specificitás	48
Közlemények jegyzéke	50
Köszönetnyilvánítás	52
Irodalomjegyzék	53
Összefoglaló	63
Summary	67
Függelék	71

Bevezetés

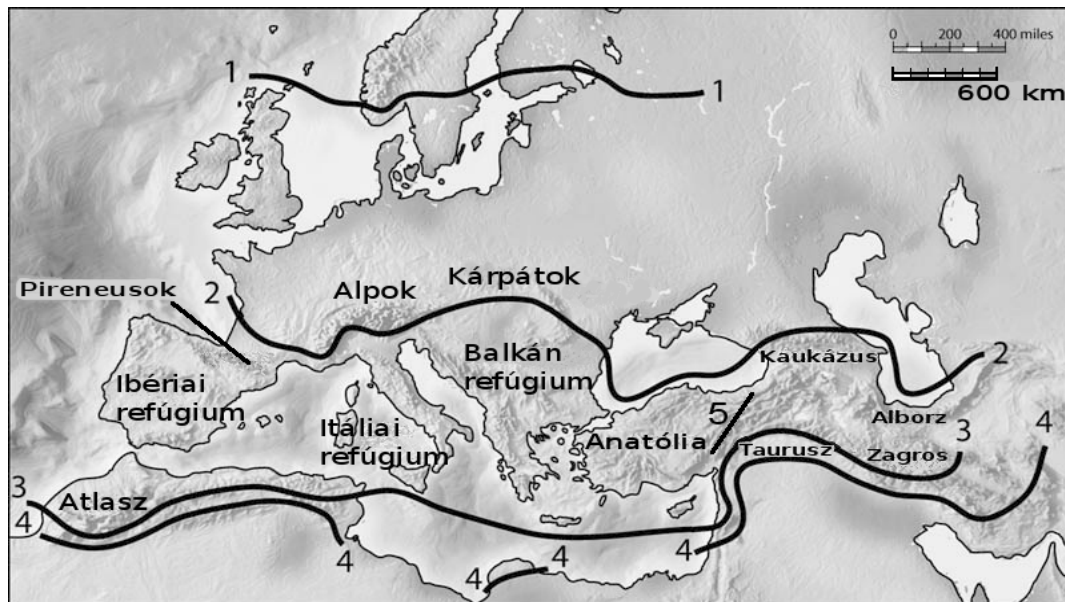
Gubacsok és gubacsdarazsak (Cynipidae)

A gubacs növényi szövetek rendellenes differenciációja, melyet valamilyen élő szervezet aktivitása okoz. A rovarok körében a gubacsindukálás képessége többször kialakult az evolúció során, eddig hozzávetőleg 13000 gubacsképző rovarfajt írtak le (Dreger-Jauffret és Shorthouse, 1992). Köztük a gubacsdarazsak (Hymenoptera: Cynipidae) az egyik legnépesebb csoport, körülbelül 1400 fajuk ismert, rendkívül változatos gubacsfelépítéssel és gazdanövény kapcsolatokkal jellemezhetőek (Ronquist és Liljeblad, 2001; Stone és Schönrogge, 2003; Melika, 2006).

A Cynipidae család különleges helyet foglal el egy 75%-ban parazitoidokat magában foglaló családsorozatban, mivel tagjai valamennyien növényevők. A Cynipidae család fajainak többsége tölgyfajokon (*Quercus*) képez gubacsot, ezeket nevezzük összefoglalóan tölgygubacsdarazsaknak (Cynipini). A fitofág rovarok között a tölgygubacsdarazsak rendkívül konzervatívnak tekinthetők a növényi gazda specificitás szempontjából (Stone és mtsi, 2009). A gubacsdarázs és a gazdanövénye közti kölcsönhatás szoros, általában specifikus a gazda fajcsoportra és a szervre egyaránt. A Cynipini fajok által indukált gubacs formája általában fajspecifikus a gubacsképzőre, emiatt egyes esetekben a darázs könnyen meghatározható a gubacs alapján (Melika, 2006). Mindez azt jelenti, hogy a gubacs jellegzetességei (formája, szerkezete, felszíni képződményei) a cynipid darázs kiterjesztett fenotípusának tekinthetőek (Stone és Schönrogge, 2003). A rovarokra, így a gubacsdarazsakra jellemző gubacsindukció mechanizmusa pillanatnyilag ismeretlen (Stone és Schönrogge, 2003), az azonban bizonyos, hogy a gubacsdarázs lárva képes ezt a folyamatot kontrollálni, és a növényt arra kényszeríteni, hogy számára lárvakamrát és endospermium szerű táplálószövetet hozzon létre, amelyben, illetve amelyből táplálkozhat fejlődése során.

A Cynipini fajok további sajátága az összetett, ciklikusan szüznemző életciklus: tavasszal ivaros generációjuk, nyár végén illetve ősszel ivartalan, partenogenetikus generációjuk fejlődik. A két nemzedék egyedei és az általuk képzett gubacsok morfológiája, illetve növényi gazdáik is jelentősen eltérhetnek egymástól. Manos és mtsi (1999) molekuláris filogenetika alapján a *Quercus* subgenus-t a következő 4

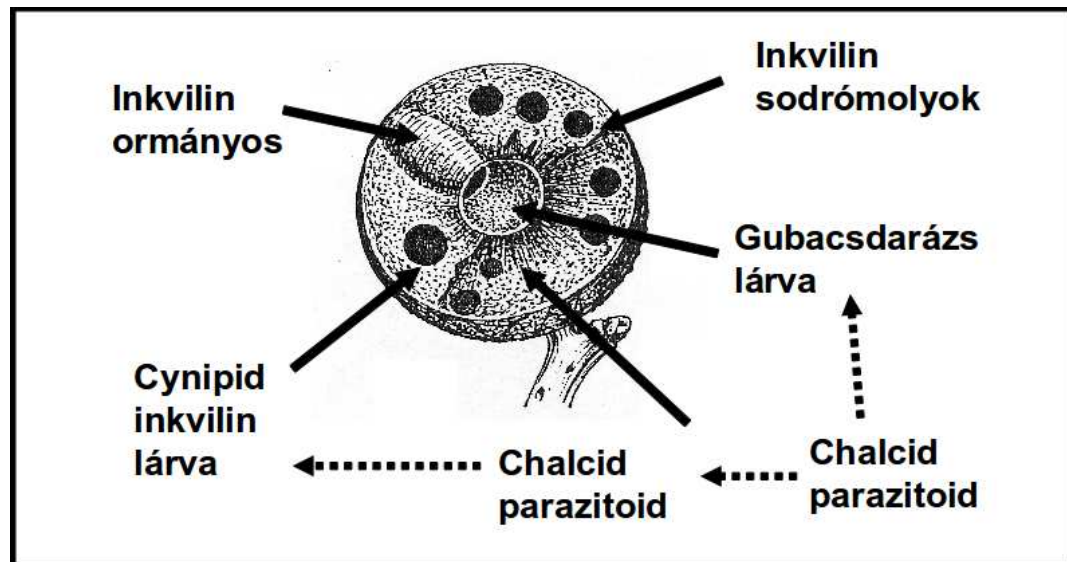
szekcióra osztották: *Cerris*, *Lobatae*, *Quercus sensu stricto* és *Protobalanus*. A Nyugat Palearktikumban csak a *Cerris* és a *Quercus sensu stricto* szekcióba sorolható fajok élnek. A tölgygubacsdarazsak között számos *Andricus* faj és *Callirhytis* fajok obligát módon váltogatják gazdájukat. Az *Andricus* fajok nagy részének ivaros generációja a *Cerris* szekció valamely faján (pl. *Quercus cerris* – csertölgy) fejlődik, az ivartalan generáció pedig a *Quercus sensu stricto* szekció valamely faján fejlődik (pl. *Quercus robur* – kocsányos tölgy, *Quercus petraea* – kocsánytalan tölgy, *Quercus pubescens* – molyhos tölgy). *Callirhytis* fajok esetén mindez fordítva történik. A két tölgyszekció elterjedése ilyen módon meghatározza ezen fajok elterjedését a Nyugat Palearktikumban (1. ábra). A csertölgy természetes elterjedési területe humán behatásra az elmúlt 500 évben jelentősen kibővült: észak felé Dániáig és Skóciáig, nyugat felé Franciaország atlanti partjáig.



1. ábra A *Quercus* subgenus szekcióinak természetes elterjedési területe a Nyugat Palearktikumban. A subgenus *Quercus sensu stricto* szekciójának elterjedési területe az 1. és 3. vonalak közé esik. A *Cerris* szekció elterjedésének határait a 2. és 4. vonalak jelölik. Csak a 2. és 3. vonalak közé eső területen található meg mindkét szekció együtt. Az 5. vonal az Anatóliai Diagonál hozzávetőleges helyét mutatja. Stone és mtsi (2007) nyomán, módosítva.

A gubacsok egy jellegzetes, zárt és fajgazdag közösségnek adnak otthont, melyben a gubacsképző lárváján kívül parazitoid darazsak (Bailey és mtsi, 2009) és

növényevő társbélők (inkvilinek) is fejlődhetnek (2. ábra). Ez utóbbiak szintén a gubacs szöveteit fogyasztják, de önmaguk képtelenek a gubacsindukcióra (Ronquist, 1994; Ács és mtsi, 2010). A tölgygubacs közösségek számos ökológiai és evolúciós vizsgálat modellrendszerei (Hayward és Stone, 2005; Bailey és mtsi, 2009; Stone és mtsi, 2009). Az inkvilinek gyakoriak, ezért szerepük jelentős a közösség táplálkozási hálózatában (Schönrogge és mtsi, 1996a, b; Stone és mtsi, 2002). Annak ellenére, hogy a társbélők a közösség szerves részét képezik (Askew, 1961; Stone és mtsi, 2002) és jelentős mértékben hozzájárulnak annak komplexitásához, ezekről tudunk a legkevesebbet (Sanver és Hawkins, 2000; Ács és mtsi, 2010).



2. ábra A gubacsközösség tagjai és trofikus kapcsolataik. A tömör nyilak a gubacsban tipikusan elfoglalt helyre mutatnak, míg a szaggatott nyilak a trofikus kapcsolatok irányát jelölik.

Inkvilin gubacsdarazsak (Synergini)

A Cynipidae családon belül a fajok mintegy 15%-a elvesztette gubacsindukáló képességét, más fajok által képzett gubacsokban fejlődik társbélőként (Ronquist, 1994, Melika, 2006). Ezeket az inkvilin gubacsdarazsakat a Synergini tribuszba soroljuk (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini). Jellemzőjük, hogy a növényi szövet differenciációját módosító képességük megmaradt, képesek lárvakamrát és az azt bélelő

táplálószövetet létrehozni, akárcsak gubacsképző gazdáik.

A társbérő életformát általában a kommenzalizmus egy típusának tekintik, mely átmenet képez a parazitizmus és a mutualizmus között (Askew, 1971). A synergini inkvilinek gubacsképző gazdáik (pl. Cynipini) közeli rokonai. A társbérőségnek ezt a típusát agasztoparazitizmusnak nevezzük (Ronquist, 1994). Egy ettől független osztályozás szerint, a gubacsdarázs gazda lárvájára gyakorolt hatás alapján az inkvilineket három csoportra oszthatjuk (Duffet, 1968; Melika, 2006): (i) letális inkvilinek, melyek minden esetben a gubacsdarázs lárvát halálát okozzák; (ii) nem-letális inkvilinek, melyek sosem pusztítják el a gazdát és (iii) fakultatív inkvilinek, melyeknél lárvájuk lokalizációja döntő a gazdára gyakorolt hatást tekintve. Ha a társbérő petéit a gubacsdarázs lárvakamrájának közvetlen közelébe rakja és lárvái gyorsabban fejlődnek, ez a gazda lárvá pusztulásához vezethet. A synergini inkvilinek is növényevők, mint gubacsdarázs gazdáik, a gazda lárvá mortalitás oka tehát a táplálék elvonása, ezért ezt tekintjük trofikus kapcsolatnak. Ugyanaz a társbérő faj egy bizonyos gazda gubacsban letálisként viselkedhet, míg más gazda faj gubacsában nincs negatív hatással annak fejlődésére.

Néhány társbérő képes befolyásolni a gubacs méretét és/vagy alakját is (Pujade-Villar, 1991; Shorthouse, 1980). Ezek közül a *Synophrus* fajok arról nevezetesek, hogy sokáig gubacsindukálóknak tartották őket, gubacsdarázs gazdájukat sem sikerült sokáig azonosítani (Melika, 2006). A *Synophrus* fajok egyértelműen társbérők (morfológia és molekuláris taxonómia alapján is: Ronquist, 1994), melyek jelentős, a gubacsképzőkhöz hasonló mértékben képesek megváltoztatni a gazda gubacs kinézetét, formáját.

A Synergini tribusz tagjai csak ivaroson szaporodnak, körükben a nemzedékváltás ismeretlen. Nem letális fajoknál a kifejlett egyedek általában a darázs gazda kirepülését követően hagyják el a gubacsot, majd párzás után a nőtények fejlődésük viszonylag korai stádiumában levő gubacsokba rakják petéiket. Az ilyen gubacsok szövetei feltételezhetően még képlékenyek, ami előnyt jelent a társbérő számára (Stone és mtsi, 2002). Minimálisak az ismereteink arról a mechanizmusról, mellyel az inkvilin nőtény megtalálja és kiválasztja a peterakáshoz megfelelő gubacsot – hasonlóan a növényi szövet speciális differenciációját előidéző mechanizmushoz.

Számos Synergini inkvilin faj gyakori Európában. Elterjedésük követi gubacsdarázs és tölgy gazdáik elterjedését. A legnagyobb területen megtalálható

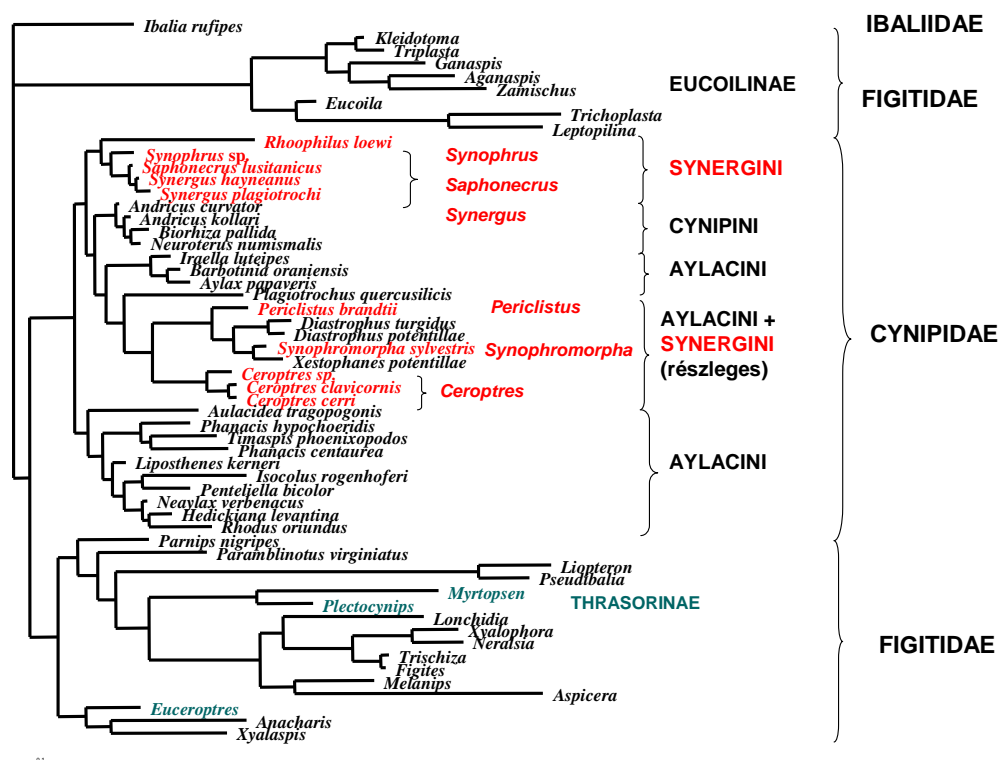
inkvilinek általában generalisták a gubacsdarázs gazdáikra nézve. Számos *Ceroptres* és *Synergus* faj széles gubacsdarázs gazdakörrel rendelkezik, például a *Synergus gallaeipiformis* 45 különböző tölgygubacs gazdához és 6 gazdanövényhez köthető, és Nyugat-Európától egészen Oroszország legkeletibb részéig fellelhető. Azonban taxonómiai bizonytalanságok miatt és a synergini inkvilinekre vonatkozó újabb eredmények alapján ez módosulhat (Ács és mtsi, 2010).

A Synergini tribuszon belül az inkvilineket jelenleg 8 génuszra osztjuk:

- *Ceroptres* Hartig, 1840,
- *Periclistus* Förster, 1869,
- *Rhoophilus* Mayr, 1881,
- *Saphonecrus* Dalla Torre & Kieffer, 1910,
- *Synergus* Hartig, 1840,
- *Synophromorpha* Ashmead, 1903,
- *Synophrus* Hartig, 1843 és
- *Ufo* Melika & Pujade, 2005.

Számos taxonómiai és filogenetikai kérdés tisztázatlan a tribuszra vonatkozólag. Sok esetben bizonytalanok a fajhatárok (pl. *Synergus umbraculus* és *Synergus hayneanus* között), de a génuszok leszármazási kapcsolatai sem tekinthetők tisztázottnak. Morfológiai jellemzők alapján monofiletikusnak tartották ezt a csoportot, amely vélhetőleg a parafiletikus, lágyszárúakon gubacsot indukáló *Aylacini* csoportból származik (Ronquist, 1994). Ezen belül legközelebbi rokonai a *Diastrophus* és *Xestophanes* rendek (Ronquist, 1994; Ronquist és Liljeblad, 2001; Liljeblad, 2002; Nylander és mtsi, 2004a). Ezzel szemben a molekuláris filogenetikai eredmények arra utalnak, hogy ez az inkvilin csoport nem monofiletikus, hanem 3 független leszármazási vonalra osztható: (i) a rózsafélékhez kötődő *Synophromorpha-Periclistus* csoport, (ii) a tölgyhöz kötődő *Ceroptres* génusz és (iii) a *Synergus* komplex, amely a szintén tölgyhöz kötődő *Synophrus*, *Saphonecrus* és *Synergus* génuszokból, valamint az Afrikában *Rhus* fajokon élő *Rhoophilus* génuszból áll (Nylander és mtsi, 2004a; Melika,

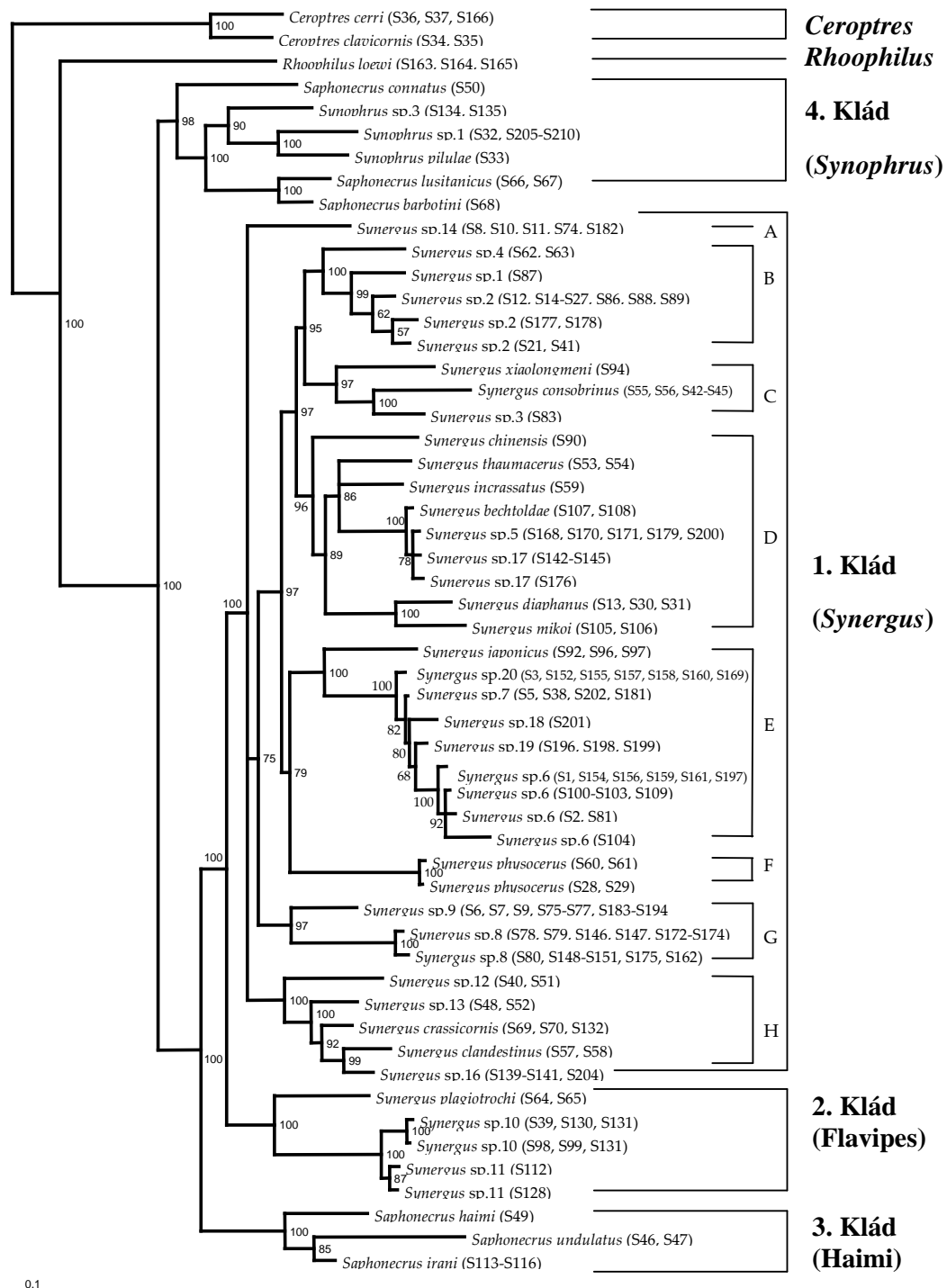
2006; Van Noort és mtsi, 2007; Péntzes és mtsi, 2009; Ács és mtsi, 2010) (3. ábra).



3. ábra A Cynipidae, Figitidae és Ibalidae családok leszármazási viszonyait mutató 28S rDNS szekvencia alapú filogenetikai fa. Piros színnel jelöltük a Synergini tribusz 3 csoportjának fajait. Melika (2006) nyomán.

A *Synophrus-Saphonecrus-Synergus* leszármazási sort jelenleg négy alcsoportra osztjuk (Melika, 2006): (i) *Synergus* – ide tartozik a *Synergus* fajok többsége; (ii) a *flavipes* csoport – néhány Nyugat Palearktikus *Synergus* fajt sorolunk ide, melyek a *Cerris* szekcióhoz kötődnek; (iii) a *haimi* csoport – 3 *Saphonecrus* faj tartozik ide (*S. undulatus*, *haimi* és *irani*), melyek szintén a *Cerris* szekcióhoz kötődnek és (iv) az előbbieket testvércsoportját képező, egy feltehetően korán elkülönülő ágat képviselő *Synophrus* csoport, melyhez néhány *Saphonecrus* fajt is sorolunk (Melika, 2006; Ács és mtsi, 2010; 4. ábra).

A *Synophrus-Saphonecrus-Synergus* leszármazási vonalon belül két csoportot elemeztünk, a *Synophrus* génuszt és a *Synergus* génusz egy fáját.



4. ábra A Synergini tribusz rokonsági viszonyait szemléltető Bayes alapú konszenzus fa COI, cytb és 28S D2 stem és loop szekvenciák alapján. Melika (2006) nyomán.

A *Synophrus* génusz

A tölgygubacs inkvilinek között talán a *Synophrus* fajok biológiájáról tudunk a legkevesebbet, beleértve a gubacsdarázs gazda kapcsolataikat, de földrajzi elterjedésük, taxonómiájuk és filogenetikai viszonyaik is kérdésesek (Melika, 2006). Eredetileg gubacsindukálóként írták le őket (Hartig, 1840), később morfológia alapján sorolták át a fajokat a Synergini társbérlek közé (Ronquist, 1994). Inkvilin életmódjukra a következő megfigyelés utal: Pujade-Villar és mtsi (2003) figyelték meg, hogy *S. politus* egyedek fejlődtek ki a nyár folyamán olyan gubacsokból, melyek az *Andricus burgundus* rügygubacsai helyén, feltehetően azokból alakultak ki. Ezek tipikus *S. politus* gubacsok, gömbszerűek, de szabálytalan alakúak és erősen elfásodottak, ami teljesen eltér az *A. burgundus* gubacsoktól.

A *Synophrus* fajok jellemzője a gazda gubacs fejlődésének jelentős megváltoztatása, amely egyedi sajátosság a tölgygubacs inkvilinek között. A *Synophrus* társbérlek mindig letális a rovar gazdára nézve. Ez feltehetően azzal magyarázható, hogy az inkvilin lárva sokkal gyorsabban fejlődik, lárvakamrája vagy kamrái egyszerűen elfoglalják a helyet. Ezek után a *Synophrus* lárva által kontrollált, továbbfejlődő gubacs morfológiája specifikussá válik az adott *Synophrus* fajra, akárcsak a tölgygubacsdarázsok esetében. A *Synophrus politus* vélhetőleg nem specifikus az *A. burgundus*-ra, ezzel magyarázható az a tény is, hogy a *S. politus* ott is tömegesen fordul elő, ahol *A. burgundus* nem él. Az újabb eredmények arra utalnak, hogy számos gubacsdarázs rendelkezik rejtett szexuális generációval, melynek gubacsai morfológiailag megkülönböztethetetlenek az *A. burgundus*-tól (Stone és mtsi, 2008). Feltehetően ezek a fajok is szolgálhatnak gazdaként a *Synophrus* fajoknak.

Minden ismert *Synophrus* faj a *Cerris* tölgysekciohoz kötődik, főként a Nyugat-Palearktikumban elterjedtek. Azon gubacsok morfológiája, mérete és lokalizációja, melyekből *Synophrus* egyed nevelhető ki, igen változatos (5. ábra). Ezt a változatosságot magyarázhatja az, hogy az inkvilin sokféle gubacsdarázs gazda fajt támad. Ez kézenfekvőnek tűnik, mivel a gubacsindukáló általában specifikus a növényi szervre (Cook és mtsi, 2002), a különböző növényi részekben fejlődő *Synophrus* gubacsok tehát más-más gubacsdarázs gazdától származhatnak. Másrészt ismert, hogy a gubacs morfológia jellegzetességeit a gubacsdarázs lárvája kontrollálja (Stone és Cook, 1998), emiatt az is lehetséges, hogy különböző *Synophrus* fajok, vagy leszármazási

vonalak más-más irányba terelik a gubacsok fejlődését, ami a gubacs morfológia változatosságát eredményezheti.



5. ábra *Synophrus* fajokra jellemző különböző gubacsváltozatok. 1. *Synophrus pilulae*, 2. *S. politus*, 3. *S. olivieri*, 4. *S. hungaricus*.

Vizsgálatainkat megelőzően 3 Nyugat Palearktikus *Synophrus* fajt tartottak számon: *S. pilulae* Houard, 1911, *S. politus* Hartig, 1843 és *S. olivieri* Kieffer, 1898. A génusz fajgazdagsága azonban régóta vitatott kérdés. Molekuláris filogenetikai eredmények arra utalnak, hogy a *Synophrus* fajok egy monofiletikus egységként különíthetők el, e klád testvércsoportját pedig a *Saphonecrus* génusz egy alcsoportja alkotja (4. ábra). A *Synophrus* fajok így a *Synophrus-Saphonecrus-Synergus* csoport egy korai divergenciájú leszármazási vonalának recens képviselői (Melika, 2006).

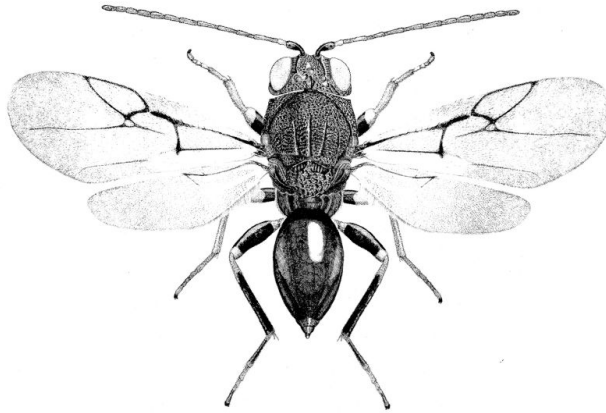
***Synergus* fajok**

A *Synophrus-Saphonecrus-Synergus* leszármazási vonalon belül legtöbb fajjal a *Synergus* génusz rendelkezik (4. ábra). Világszerte körülbelül 100 fajuk él, ebből hozzávetőleg 34 ismert a Nyugat Paleaarktikumban (Melika, 2006). Növényi gazdájuk túlnyomórészt valamilyen lombhullató *Quercus* faj. Mayr (1872) a *Synergus* génuszt morfológiai alapon két szekcióra osztotta. A morfológiai jellegek mellett egyes biológiai sajátosságok is alátámasztották a két szekció meglétét. Az I. szekció fajainak közös jellemzője, hogy évente többnyire egy generációjuk fejlődik (univoltin), és csak ritkán letálisak a gubacsdarázs gazdára nézve. Ezzel szemben a II. szekcióban túlsúlyban vannak az évente két generációval rendelkező (bivoltin) és javarészt letális fajok. Ez utóbbi szekcióra még az is jellemző, hogy az ide sorolható fajok esetén a két generáció egyedei között jelentős a morfológiai különbség, tovább növelve a csoport taxonómiai bizonytalanságát.

Sok esetben csak egy fajkomplex azonosítható, ezen belül a fajok megkülönböztetése problémás, nincsenek jó diagnosztikus külső morfológiai jellegek. Az is sejthető volt, hogy bizonyos széles gazdaspecificitású fajok vélhetőleg kriptikus fajok komplexei (pl. *Synergus umbraculus*, *S. hayneanus*, *S. pallipes*: Melika, 2006). Mindezek szükségessé tették a génusz, illetve a tölgygubacs inkvilinek alaposabb filogenetikai vizsgálatát. Ács és mtsi (2010) molekuláris filogenetikai eredményei arra utalnak, hogy a fent említett Mayr szekciók mesterségesek, nem monofiletikusak, vagyis nincsenek összhangban a valós leszármazási kapcsolatokkal. Ezen kívül megerősítette kriptikus fajok kimutatásával azt a korábbi sejtést is, miszerint a Synergini csoport taxonómiai revízióra szorul, a diagnosztikai karaktereket át kell értékelni.

Egyike a problémás fajoknak a *Synergus umbraculus* Olivier, 1791, (6. ábra) mely az egyik legelterjedtebb tölgygubacs inkvilin a Nyugat Palearktikumban. Egy, vagy két generációja fejlődik évente más tölgygubacs darázsok gubacsaiban, kizárólag a *Quercus* génusz *Quercus sensu stricto* szekciójának fajain. Széles gazdaspektrumú, több mint 30 féle tölgygubacsból sikerült eddig kinevelni, leggyakrabban *Andricus* fajok aszexuális gubacsaiban fejlődik (Melika, 2006). Ács és mtsi (2010) eredményei alapján, amit jelenleg morfológiai alapon *S. umbraculus*-nak gondolunk, az molekuláris filogenetika alapján 4 különálló egység (MOTU, Molecular Operational Taxonomic

Unit). Ezek közül a *S. umbraculus*-ként meghatározott minták több, mint 90%-át a monofiletikus 19-es MOTU (Ács és mtsi, 2010) tartalmazza. A továbbiakban ez tekintjük a *S. umbraculus* fajnak.



6. ábra *Synergus umbraculus* Olivier, 1791. Készítette: Foki Éva.

Gazdaspecifikus genetikai differenciáció

Herbivor és élősködő életmódot folytató rovarok diverzifikációja szimpatrikus körülmények között is végbemehet (Berlocher és Feder, 2002). Ez magyarázhatja azt a tekintélyes fajszerű diverzitást, amely így a különböző élőhelyekre, állati gazdákra (pl. parazitáknál), vagy növényi gazdákra (pl. fitofág rovaroknál) specializálódásnak a következménye. Számos fitofág rovar számára a gazdanövény az élőhelyet, a szaporodás helyét és az egyetlen táplálékforrást is jelenti egyben, így a gazda szerinti differenciáció az ökológiai fajképződés tipikus példája (Downie és mtsi, 2001). A gazdára történő specializáció genetikai differenciációt is eredményez, mivel a különböző gazdákra specializálódó leszármazási sorok között a génáramlás korlátozott. Ezeket a gazda specifikus leszármazási sorokat nevezzük gazda rasszoknak (“host race”), amely például egy parazita vagy fitofág élőlény genetikailag (és morfológiailag) elkülönült, szimpatrikus vagy allopatrikus populációit jelenti, melyek különböző gazdán élnek (Dres és Mallet, 2002).

A gazdanövény specifikus differenciáció (host associated differentiation, HAD) gyakori gubacsindukáló rovarok közt. A rovar és a gazdanövény közötti kapcsolat igen

szoros, hiszen az állatnak a növény biokémiai rendszerét befolyásolva kell a növényt speciális képződmények (lárvakamra, táplálósövet) létrehozására kényszerítenie (Stireman és mtsi, 2005). A gazdák változatossága ezért kényszert jelenthet a herbivorok változatosságára. Ugyanezekből az okokból kifolyólag azt várjuk, hogy az inkvilinek esetében is előfordulhat HAD a növényi gazdára nézve, mivel ezek is képesek a növényi szövetek módosítására.

Olyan trofikus kapcsolatok esetén is várható gazda szerinti differenciáció, ahol a kapcsolat valamilyen specializációt, szinkronizációt igényel (Forbes és mtsi, 2009). A társbérllőnek a gubacsképző gazda életciklusával is szoros szinkronban kell lennie, hogy a megfelelő időben megtalálhassa a peterakásra alkalmas stádiumban levő gubacsokat. A Nyugat Palearktikumban azokon a területeken él a legtöbb gubacsdarázs gazda faj, ahol a két tölgyszekció elterjedési területe átfed (1. ábra), például a Kárpát-medencében. Kizárólag ezeken a területeken fordulnak elő a komplex gazdaváltással jellemezhető gubacsindukáló *Andricus* fajok, melyek gubacsai kiemelkedően gazdag életközösségeknek adnak otthont (Melika, 2006). Ilyen módon a gazda szerinti szimpatrikus differenciáció lehetősége adott. Ugyanakkor ismert, hogy magas az évenkénti és térbeli variabilitás egy éven belül, akár a szomszédos fák között is jelentős lehet az eltérés a különböző gubacsdarázs gazdák előfordulási gyakoriságában. A különböző *Andricus* fajok gubacsai igen változatosak. Méretükben, külső és belső jellegeikben jelentősen eltérnek egymástól, ami befolyásolhatja a parazitoidok támadási gyakoriságát (Stone és Schönrogge, 2003; Bailey és mtsi, 2009). Ez alapján feltételezhetjük, hogy az inkvilinek peterakási sikerét is befolyásolhatják a gubacs külső jellegei. Például a gubacs keménységét tekintve, amely adaptáció lehet a parazitoidok ellen (Stone és Schönrogge, 2003), a következő sor állítható fel: *Andricus lucidus* < *A. lignicolus* < *A. infectorius* < *A. kollari*, amiben az utolsó a legkeményebb. Ezen kívül külső tüskék és ragacsos bevonat jelenlétében/hiányában is eltérőek ezek a gubacsok. Ezek az *Andricus* fajok hazánkban is gyakoriak.

Filogeográfia

Számos különböző tér és időléptékű folyamat formálja a közösségek és azok tagjainak diverzitását. Ezek közül a földtörténeti Negyedidőszak jégkorszakainak a

Nyugat Palearktikum élővilágára, egyes fajok genetikai változatosságára gyakorolt hatása az egyik legrészletesebben vizsgált probléma (Hewitt, 1999; Schmitt, 2007). A lehülés, a jégtaarók kiterjedésével a mérsékelt égövi fajokat déli refúgiumokba számúzta. Ezek a területek Dél-Európában elsödlegetesen az Ibériai félsziget, Appenini félsziget és a Balkán voltak (Hewitt, 1999) (1. ábra). Feltehetöen számos populáció kipusztult a megfelelő élettér eltünése miatt az egyes jégkorszakok során (Thomas és mtsi, 2004). Az utolsó jégkorszakot követöen a refúgiumok populációi népesítették újra be Európa többi részét (Hewitt, 1999; Schmitt, 2007). Egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy a jól ismert dél-európai refúgiumokon kívül léteztek “kriptikus” refúgiumok északabbra is, ahol a mikroklíma ezt lehetővé tette (Deffontaine és mtsi, 2005; Ursenbacher és mtsi, 2006). Ezen területek kevésbé voltak jól körülhatárolhatóak és sűrűn lakottak, azonban kiemelkedő a szerepük az újra felmelegedő európai területek rekolonizációjában (Stewart és Lister, 2001; Varga, 2008; Provan és Bennett, 2008).

A Cynipidae család gubacsképzöivel kapcsolatban is rendelkezünk ismeretekkel a Negyedidöszak populáció-kiterjedéseire vonatkozólag. Tudjuk, hogy (i) az ibériai refúgium populációi általában genetikailag jól elkülönülnek és alacsonyabb diverzitásúak az appenini populációhoz képest; (ii) Észak-Európa újra benépesítése elsösorban Közép-Európa felöl történt és nem Ibéria felöl (Rokas és mtsi, 2001; Stone és mtsi, 2007). Az is valószínűsíthető, hogy egy – a jégkorszakokhoz köthető populáció-mozgásokat megelőző – kelet-nyugat irányú elterjedés is volt, melynek forrása – jelenlegi ismereteink szerint – az ösi, nagy genetikai diverzitású Anatóliai-fennsík és a mai Irán területe (Rokas és mtsi, 2003; Challis és mtsi, 2007; Stone és mtsi, 2007, Lohse és mtsi, 2010), azonban még távolabbi keleti forrás sem zárható ki. Ezt az elméletet “Out of Anatolia” hipotézisként tartjuk számon, amely értelmében gubacsdarázs leszármazási vonalak diverzifikációs központja a mai Törökország és Irán területe lehetett. Jóval kevesebb ismerettel rendelkezünk a gubacsközösség másik két szintjéről, a parazitoidokról és a társbérlökröl. Az eddig tanulmányozott parazitoidokra hasonló nagyléptékű filogeográfiai mintázat jellemző, mint a gubacsindukáló gazdáikra (Hayward és Stone, 2006, Nicholls és mtsi, 2010b), de egyes esetekben jelentös eltéréseket tapasztalunk: például a *Megastigmus stigmatizans* ibériai populációi átjutottak a Pireneusokon és benépesítették Franciaországot (Hayward és Stone, 2006).

A Kárpát-medence gubacsdarázs faunája igen sokszínű és viszonylag jól tanulmányozott (Melika, 2006). Néhány gubacsindukáló faj genetikai diverzitásáról is

rendelkezünk ismeretekkel. (Stone és Sunnucks, 1993; Rokas és mtsi, 2003). Stone és Sunnucks (1993) az *A. quercuscalisis* faj esetén 7 polimorf allozim marker alapján Magyarország és Ausztria magas genetikai diverzitásáról számol be. Ez a diverzitás azonban nem struktúrált, a genetikai variabilitás térbeli differenciációja páronkénti F_{ST} értékek alapján csekély mértékű. Rokas és mtsi (2003) citokróm b DNS szekvenciák és allozim markerek elemzésével az *A. quercustozae* gubacsdarazsat vizsgálta. Eredményei szerint a magyar populáció, a török után, a második legmagasabb szekvencia diverzitással jellemezhető. Allozim markerek alapján kimutatta, hogy a magyar populáció homogén, azonban két veszprémi minta az olasz, két soproni pedig a délnyugat török csoporttal mutat rokonságot. Eddig egyetlen tölgygubacs inkvilinről sem készült molekuláris alapú filogeográfiai vizsgálat.

A tölgygubacs közösség genetikai vizsgálatok egyik modellje, mert viszonylag zárt (így könnyen mintázható), és több trofikus szintet foglal magába (gazdanövény, gubacsindukálók és társbérlők, parazitoidok, hiperparazitoidok), melyek genetikai diverzitásbeli mintázatai összevethetőek. Egy ilyen összehasonlításból olyan jelenségekre következtethetünk, mint például arra, hogy mennyire szorosak a fajok közötti asszociációk, mennyire gyakoriak a gazdaváltások, gazdacserék, mennyire követik az egyes trofikus szintek képviselői egymást elterjedésük során térben és időben – vagyis mennyire összehangolt az egyes trofikus szintek evolúciója. Ez összefüggést mutathat a Negyedidőszak éghajlatváltozásaival összefüggő flóra, és az ehhez kötött herbivór fauna kényszerített vándorlásaival is.

Egy közösség trofikus kapcsolatainak tanulmányozásához elengedhetetlen, hogy az azt alkotó fajok azonosítása egyértelmű legyen. Ehhez sok esetben molekuláris filogenetikai vizsgálatokra is szükség lehet, amely a morfológia alapú osztályozás mellett egy függetlennek tekintett eljárás a leszármazási kapcsolatok becslésére.

Célkitűzések

Két inkvilin taxont választottunk ki részletesebb elemzésre. Kérdéseink illetve céljaink az alábbiak:

A Synophrus filogenetika:

- A génusz filogenetikai kapcsolatainak tisztázása.

A Synergus umbraculus genetikai változatossága:

- A kárpát-medencei populációk genetikai diverzitásának elemzése.
- *A genetikai diverzitás értelmezése: kolonizációs történet.* Arra a kérdésre keressük a választ, hogy a feltételezett dél-európai refúgiális régiók figyelembe vételével milyen filogeográfiai mintázat jellemző a fajra. Célunk ezáltal a Kárpát-medencét rekolonizáló populációk forrásának azonosítása.
- *A genetikai diverzitás értelmezése: gubacsképző gazdák szerinti differenciáció.* Az inkvilin leszármazási sorok jelenlegi elterjedését befolyásolja a preferált növény és gubacsképző gazdák elterjedése. Gazda rasszok kialakulhatnak egyes gubacsképző gazdákra, ezért céljaink közé tartozik a gazda szerinti differenciáció mértékének becslése is néhány gyakori gubacsdarázs gazdára vonatkozólag.

Anyag és módszer

Synophrus

Gyűjtés

Magyarország 4 területén csertölggyről (*Quercus cerris*) gyűjtöttünk *Synophrus* gubacsokat: délnyugaton (Mecsek hegység), északnyugaton (Soproni hegység), északkeleten (Bükk hegység) és délkeleten (Szeged környékén). Ezeket a mintavételi régiókat egymástól legalább 200 km választja el. A gubacsokat elhelyezkedésük alapján a következő kategóriákba soroltuk: (i) csúcsrügyön vagy oldalrügyön található, (ii) fiatal hajtáson található, (iii) a levél főerén, vagy a levélnyélen található és (iv) a levélalapon található. A gubacsokból karantén alatt neveltük ki a darazsakat, majd 96%-os etanolban tároltuk az egyedeket további felhasználásig. A Nyugat Palearktikum más területeiről származó további *Synophrus* egyedeket is bevontunk a vizsgálatba (1. táblázat). Mivel az egyes kategóriák (gyűjtés helye, gubacs elhelyezkedése) minta elemszáma között jelentős különbségek voltak, illetve a különböző jellegek egyértelműen hozzá rendelhetőek egyes leszármazási sorokhoz (lásd eredmények), ezek összehasonlítását célzó statisztikai elemzést nem végeztünk.

A vizsgálatban felhasznált egyedek a következő intézmények gyűjteményeiben találhatóak meg: Magyar Természettudományi Múzeum Állattára, Budapest (Csősz Sándor); University of Barcelona, Spanyolország (Julie Pujade-Villar); Vas Megyei Talaj- és Növényvédelmi Szolgálat, Tanakajd (Melika George). A fajok leírását Melika George, Mikó István és Juli Pujade-Villar végezte (Pénzes és mtsi, 2009).

Faj	Gazdanövény (Quercus)	Növényi szerv	Gyűjtési hely	28S D2	COI
<i>Synophrus politus</i>	<i>Q. cerris</i> <i>Q. cerris</i> <i>Q. cerris</i> <i>Q. cerris</i> <i>Q. suber</i> <i>Q. suber</i> ismeretlen	levél, rügy, hajtás	DK Magyarország (2) DNy Magyarország (15) ÉNy Magyarország (34) ÉK Magyarország (8) Olaszország, Piombino (1) Olaszország, Savoria (8) Törökország, Madenli (1)	5 EF583954 (EF487223) 1 (EF487223) 6 (EF487223) 1 (EF487223)	58 EF579701 – EF579709 (EF486971) 1 EF579711 8 EF579712 1 EF579710
<i>S. pilulae</i>	<i>Q. cerris</i>	rügy	DK Magyarország (10) DNy Magyarország (5) ÉNy Magyarország (2) ÉK Magyarország (1)	8 EF583958 (EF487224)	17 EF579713 – EF579716 (EF486972)
<i>S. olivieri</i>	<i>Q. brantii</i> és <i>Q. libani</i>	-	Irán, Lorestan (4) Irán, Kordestan (3)	1 EF583959 1 EF583959	4 EF579725 3 EF579726 – EF579727
<i>S. hungaricus</i>	<i>Q. cerris</i>	hajtás (rügy, levélnyel)	DK Magyarország (12) ÉNy Magyarország (1)	3 EF583960 1 EF583960	13 EF579717 – EF579721
<i>S. libani</i>	<i>Q. cerris</i> ? vagy <i>Q. ithaburensis</i> ?	-	Libanon (2)	2 EF583957	2 EF579724
<i>S. hispanicus</i>	<i>Q. suber</i>	-	Spanyolország (1)	(EF487225)	(EF486974)
<i>S. syriacus</i>	<i>Q. libani</i> <i>Q. libani</i> <i>Q. ithaburensis</i> ?	-	Irán, Kurdistan (3) Irán, Kermanshah (1) Szíria (3)	1 EF583956 1 EF583956 3 EF583955	3 EF579722 1 EF579722 3 EF579723

1. táblázat A molekuláris filogenetikai analízisben felhasznált *Synophrus* fajok. A “28S D2” és “COI” oszlopokban az új és zárójelben a letöltött szekvenciák GenBank azonosítóját, valamint az adott szekvenciával jellemezhető egyedek számát adtuk meg. A “Gyűjtési hely” oszlop a minták lelőhely szerinti eloszlását mutatja, zárójelben az adott lelőhelyhez rendelhető citokróm oxidáz szekvenciák számát adtuk meg. ? = kérdéses gazda.

DNS izolálás, amplifikálás, szekvenálás és a szekvenciák összeállítása

DNeasy Tissue Kit-tel (QIAGEN) izoláltunk DNS-t 1-3 lábból, követve a gyártó ízeltlábúakra vonatkozó utasításait. A test fennmaradó részeit félretettük későbbi morfológiai vizsgálatok elvégzése céljából, illetve bizonyító példánynak.

A mitokondrális citokróm oxidáz I alegység (COI) 658 bázispárnyi szakaszát a HCO-2198 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' és LCO-1490 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' (Folmer és mtsi, 1994) primereket alkalmazva szaporítottuk fel. A magi 28S D2 gén 565 bázispárnyi szakaszát a főbb kládokból kiemelt egyedekre felszaporítottuk a D2F és D2R primereket használva (D2F: 5'-CGTGTTGCTTGATAGTGCAGC-3' és D2R: 5'-TCAAGACGGGTCCTGAAAGT-3', Hancock és mtsi, 1988). A PCR reakciókat 50 µl végtérfogóban végeztük 2 µl templát DNS-t, 5 µl 10X Taq puffert (Fermentas), 4 µl MgCl₂-t (25 mM, Fermentas), 1 µl dNTP-t (10 mM, Fermentas), 0.6-0.6 µl primert (10 pM), 0.4 µl Taq polimerázt (5u/µl, Fermentas) és desztillált vizet felhasználva. A PCR reakciókat egy PTC-200 DNA Engine (MJ Research) készüléken végeztük a következő program alapján: első lépés 94 °C két percig, majd 35 ciklus (94 °C fél percig, 50 (COI) illetve 45 °C (28S D2) 1 percig, 72 °C másfél percig), végül 72 °C 10 percig. A kapott PCR termékből 5 µl-t 1%-os agaróz gélen elektroforetizálva ellenőriztük a reakció sikerességét. A PCR terméket SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) és *E. coli* exonukleáz elegyével tisztítottuk. 20 µl PCR termékhez 6.5 µl SAP mixet adtunk, amely 1 µl SAP-ot (1u/µl, Fermentas), 2 µl 10X SAP puffert (Fermentas), 1.5 µl *E. coli* ExoI exonukleázt (20u/µl, Fermentas) és 2 µl 10X ExoI puffert tartalmazott. Ezután a mintákat 40 percig 37 °C-on, majd 20 percig 80 °C-on inkubáltuk. Bizonyos esetekben a PCR terméket közvetlenül gélből tisztítottuk Ultrafree-DA kittel (Millipore) a gyártó utasításait követve. A minták nagy részénél (az összes 28S D2 és a COI 90%-a) a tisztított PCR terméket mindkét irányból megszekvenáltuk, ehhez ABI BigDye v3.1 Terminator Cycle Sequencing kittet használtunk (Applied Biosystems), majd a kapott terméket egy ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) típusú kapilláris szekvenátoron futtatuk. A kromatogramokat a Staden Package (Staden és mtsi, 2000) programcsomaggal állítottuk össze. Az új haplotípusokat a GenBank adatbázisába hozzáférhetővé tettük (EF583954-EF583960 és EF579701-EF579727, 1. táblázat).

További 4 *Synophrus* COI szekvenciát használtunk fel a GenBank

adatbázisából: egy-egy észak-magyarországi *S. politus* és *S. pilulae*, egy spanyolországi *S. hispanicus* és egy Algériából származó *Synophrus* minta (gazda: *Q. suber*, 2001; EF486973) szekvenciáját. A Synergini tribusból a következő rokon fajok szekvenciáit használtuk fel egy másik vizsgálatunkból (Ács és mtsi, 2010): *Saphonecrus haimi* (EF486879, EF487126), *Saphonecrus undulatus* (EF486882, EF487132), *Saphonecrus connatus* (EF486878, EF487125), *Saphonecrus barbotini* (EF486877, EF487124), *Saphonecrus lusitanicus* (EF486880, EF487130) és *Rhoophilus loewi* (EF486875, EF487122).

A szekvenciák elemzése

A 28S D2 szekvenciákat a ClustalX v1.83 (Thompson és mtsi, 1994) szoftverrel illesztettük először az alapértelmezett beállításokkal, majd tovább finomítottuk a maximális hasonlóság elérése érdekében. Az összes gap pozícióját úgy rögzítettük, hogy kongruensek legyenek a Cynipini szekvencia illesztésekkel (Nylander és mtsi, 2004b). Az 565 bázispárnnyi illesztett szekvenciában a gap-eket 14 különböző bináris karakterként kódoltuk Simmons és Ochoterena (2000) gap kódolási eljárása alapján (simple gap coding). A COI szekvenciák illesztése egyértelmű volt, mivel az összes szekvencia ugyanolyan hosszú, és nem tartalmaz gap-et (658 bp). Fehérjére lefordítva ellenőriztük, hogy kódoló szekvenciák lehetnek-e. A minták mintegy 10%-nál egy rövidebb COI szakaszt használtunk (kb 480 bp), azonban ezeket a mintákat csak a fő leszármazási vonalak azonosítására használtuk, mivel az eredmények alapján ez elegendőnek bizonyult a besoroláshoz. Csak a teljes hosszúságú COI haplotípusokat használtuk fel a fajon belüli diverzitás számolásához és a filogenetika becsléséhez.

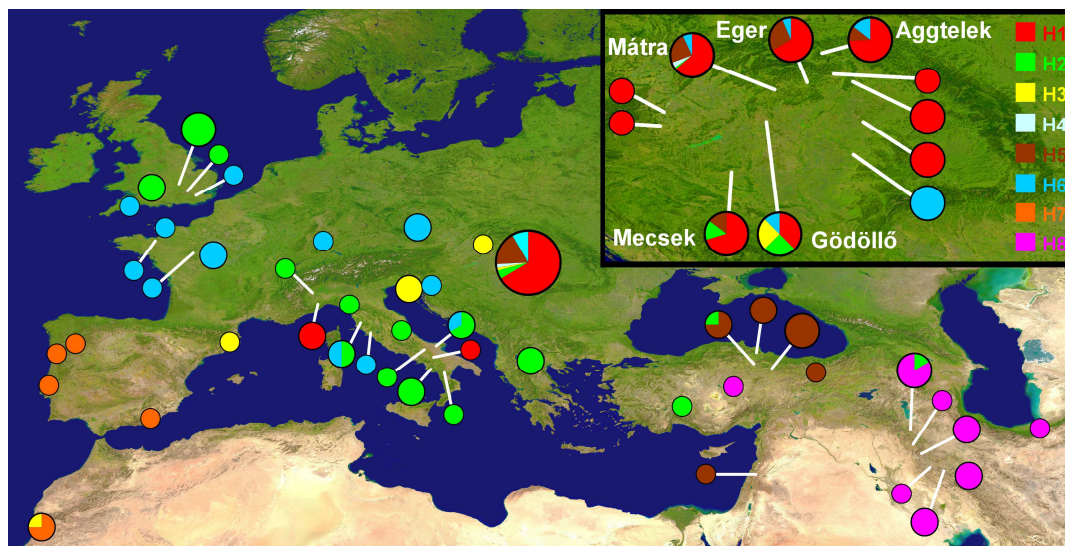
A filogenetikai rekonstrukcióhoz a megfelelő szubsztitúciós modellt a MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004c) szoftverrel választottuk ki. A filogenetikai becslést Bayes alapú módszerrel végeztük (MrBayes 3.1.2, Ronquist és Huelsenbeck, 2003) a következő kombinációknak megfelelően: COI, COI kodon pozíciók alapján partícionálva, 28S D2 gap partícióval és anélkül, valamint kombinált COI – 28S D2 gap nélkül – 28S D2 gapekkel. Minden elemzésben a partíciókra vonatkozó paramétereket egymástól függetlennek tekintettük, beleértve a ráta paramétereket is, amelyek becslése a rekonstrukció része. A 28S D2 gapeket restriktív adatként definiáltuk, a szoftver

kézikönyve által javasolt eljárást követve. Az analízis során a fák terének elemzésére két független futtatást végeztünk, egyenként 4 párhuzamosan futó láncsal. A láncokat kétmillió generációig futtattuk, minden századikat mintázva, az első 750 000 generációt burn-in-nek tekintve. A Markov-láncok konvergenciája minden elemzésben kielégítő volt. Az eltérések szórása 0.007 alatt maradt, illetve a PSRF (potential scale reduction factor) statisztika értéke az 1.000-1.002 tartományban volt minden paraméterre. Más módszerekkel is nagyon hasonló (kongruens topológia) eredményt kaptunk, így csak a Bayes alapú analízis eredményeit tárgyaljuk. (Az egyéb módszerek/szoftverek: maximum likelihood analízis/PhyML szoftver (Guindon és Gascuel, 2003); maximum parszimónia és neighbour joining/MEGA3 (Kumar és mtsi, 2004)).

Synergus umbraculus

Gyűjtés

Graham N. Stone gyűjtéséből Spanyolországtól Iránig, 55 mintavételi helyről származó *S. umbraculus* egyedeket kaptunk, lefedve az összes vélt nyugat palearktikumi refúgiumot és a gubacsdarázs gazdák széles skáláját (7. ábra, 1. függelék). Hazánk területén a gyűjtést mi végeztük, további 18 hellyel bővítve a mintavételi pontok számát. Így a mintavétel, céljainknak megfelelően, Magyarországon volt a legintenzívebb, lehetővé téve a genetikai diverzitás térbeli mintázatának és az esetleges gazdaspecifikus differenciáció vizsgálatát. A gubacsokat egyenként fiolákba helyeztük, és karantén alatt neveltük ki a darazsakat, melyeket ezután 96%-os etanolban -20 °C-on tároltunk további felhasználásig. Morfológiai alapon történő határozás után az egyedeket MOTU-khoz rendeltük a magi 28S D2, valamint a mitokondriális citokróm oxidáz és citokróm b gének szekvencia-információi alapján, mivel ez Ács és mtsi (2010) alapján elegendőnek bizonyult azok azonosításához.



7. ábra *Synergus umbraculus* mintavételi helyek a Nyugat Palearktikumban. A színes körök egy, vagy több, egymáshoz közeli mintavételi helyet és a helyre jellemző citokróm b haplocsoport eloszlást jelölik. A jobb felső sarokban a Kárpát-medence kinagyított képe látható.

DNS izolálás, amplifikálás, szekvenálás és a szekvenciák illesztése

Minden felhasznált egyedre megszekvenáltunk a citokróm b (cytb) gén egy 697 bázispár hosszúságú szakaszát. Azért a cytb szakaszt választottuk, mert korábbi munkák (Ács és mtsi, 2010) azt mutatták ki, hogy a tölgygubacs inkvilinek esetében a fajon belüli variabilitás erre a vizsgált markerre a legnagyobb. Másrészt így fennáll a lehetősége annak, hogy eredményeinket összehasonlítsuk számos gubacsindukáló darázsra vonatkozó adattal (Hayward és Stone, 2006; Challis és mtsi, 2007; Stone és mtsi 2007; Stone és mtsi 2009), melyek ugyanezen a markeren alapulnak. Minden fő cytb haplocsoportból kiválasztottunk néhány egyedet, melyek COI (658 bp, n=18) és 28S D2 (489 bp, n=15) génszakaszát is megszekvenáltuk annak érdekében, hogy ellenőrizzük a cytb haplocsoportokkal kongruens mintázatot mutatnak-e. Feltételezzük, hogy ha kongruensek az egyes génekre vonatkozó génfák, ezek egyben a populációk történetét tükrözik.

DNS izolálást egyrészt a DNeasy Tissue Kit-tel (QIAGEN), másrészt egy olcsó, de hatékony chelex alapú módszerrel végeztünk (Hayward és Stone, 2006). A mitokondriális citokróm b gén egy 697 bp hosszúságú szakaszát a CP1B/CP2C primer

párral polimeráz láncreakcióban (PCR) szaporítottuk fel (CP1B 5'-AAT TTT GGA TCT CTT TTA GG-3', CP2C 5'-GGT ATT TGT TTA ATT ATT CAA A-3'). Ezt a primer párt speciálisan *Synergus umbraculus*-ra terveztük a Harry és mtsi (1998) által közölt CP1/CP2 primerek módosításával. Ez a cytb fragment lefedi azt a 433 bp hosszú szakaszt, melyet számos gubacsdarázs esetében sikeresen használtak (pl. Rokas és mtsi, 2001, 2003; Challis és mtsi 2007; Stone és mtsi 2007, CB1 és CB2 primerek). A COI (658 bázispár) és 28S D2 (489 bázispár) markerek amplifikálásához ugyanazokat a primerpárokat használtuk, mint a *Synophrus* esetében.

A polimeráz láncreakciókat (PCR) 25 µl végtérfogatban hajtottuk végre 0,25 µl (5U/µl) Taq DNS polimeráz (Fermentas), 2,5 µl 10X Taq puffer, 2,0 µl MgCl₂ (25 mM), 0,5 µl dNTP (10mM), 0,5-0,5 µl primerek (20 pmol), 2,0 µl templát DNS és 16,75 µl desztillált víz felhasználásával. A primerek hibridizálási hőmérséklete 28S D2-re 45 °C, COI-ra 50 °C, cytb-re 46 °C volt. A PCR terméket 1%-os agaróz gélen futtattuk, a gélből Millipore Ultrafree®-DA kittel visszaizoláltuk, majd a PCR terméket szekvenáltattuk (MWG-Biotech AG). A haplotípusok DNS szekvenciáit a GenBank adatbázisába hozzáférhetővé tettük (GU386377-GU386442, 1. függelék).

A szekvenciák illesztését a ClustalX v1.83 (Thompson és mtsi, 1994) programmal végeztük. A cytb szekvenciák illesztése egyértelmű volt, nem tartalmaztak gap-et, fehérjére lefordítva sincs okunk feltételezni, hogy esetleg magi másolatok. A teljes statisztikai elemzést kizárólag a cytb szekvenciákra végeztük el (lásd alább). A COI és 28S D2 génszekvenciák filogenetikai rekonstrukcióját a Mega 4 (Tamura és mtsi, 2007) programmal végeztük, minimum evolúció módszert és maximum composite likelihood modellt használva. A COI régió 93 polimorf pozíciót tartalmazott és egyértelműen támogatta a cytb marker által rekonstruált leszármazási vonalakat. A 28S D2 szekvenciák alacsony variabilitást mutattak, mindössze 3 haplotípust találtunk.

Statisztikai módszerek

Adataink konvertálását és egyszerűbb számításokat az R 2.9.0 (R Development Core Team, 2009) programmal végeztük. A populáción belüli variabilitást a következő mérőszámokkal jellemeztük: haplotípusok száma, egyedi haplotípusok száma (amely csak egy mintában fordul elő), Nei géndiverzitás (h), nukleotid diverzitás (π) és kétféle

genetikai távolság (lásd alább). A diverzitás indexek becsléséhez a DnaSP 5.00.07 (Librado és Rozas, 2009) programot használtuk. Ugyanezekkel a mérőszámokkal jellemeztük az egyes haplocsoportok diverzitását is. Az egyes földrajzi régiókra vonatkozó mintanagyságok jelentősen különböznek, ezért a gén és nukleotid diverzitás értékek hasonlóságát nem teszteltük.

A fa alapú filogenetikai rekonstrukciós módszerek alkalmazhatóságát a SPLITSTREE 4.8 (Huson és Bryant, 2006) programmal teszteltük. Ez 95%-os megbízhatósági szintű hálózattal történt, a szoftverben rendelkezésre álló legösszetettebb modellt használva (HKY+I+G – Hasegawa-Kishino-Yano modell invariábilis pozíciókkal és gamma eloszlással), ez állt legközelebb a modellszelekciós eljárás által is javasolt modellhez (lásd alább). A megbízhatóságot 200 bootstrap ismételéssel, valamint NeighbourNet és “equal angle splits” módszerrel vizsgáltuk. A cytb haplotípusokból ily módon generált hálózat nem tartalmazott multifurkációkat a főbb haplocsoportok tekintetében, ami arra utal, hogy erős filogenetikai szignál van az adatokban, támogatva a fa alapú módszerek használhatóságát.

A haplotípusok közötti leszármazási kapcsolatokat Bayes alapú módszerrel becsültük meg a BEAST 1.4.8 (Drummond és Rambaut, 2007) szoftverrel “születés-halál” (birth-death) priort és molekuláris órát (strict clock) alkalmazva. Ez utóbbi a divergencia idők becslése miatt volt szükséges. Az adatainkra legjobban illeszkedő nukleotid szubsztitúciós modellt (General Time Reversible modell invariábilis pozíciókkal és gamma eloszlással - GTR+I+G) a MrModeltest 2.3 (Nylander, 2004c) programmal választottuk ki. Az elemzést kodon pozíciók szerint partícionálva végeztük. A szekvencia divergencia kalibrálásához a széles körben használt 1.15% szekvencia divergencia/millió év/leszármazási vonal értéket használtuk (Brower, 1994). A ráta alkalmassága vitatható, pusztán azért használjuk, mert lehetőséget ad arra, hogy eredményeinket összevethessük korábbi gubacsdarazsokra és parazitoidjaikra vonatkozó munkákkal, melyek szintén a Brower-féle rátán alapulnak (pl Challis és mtsi, 2007, Hayward és Stone, 2006). A BEAST futásokat 50 millió generációig folytattuk, minden tízezredik generációból vettünk mintát. A Markov-láncok konvergenciáját az ESS (effective sample size) értékek alapján a Tracer 1.4 (Rambaut és Drummond, 2007) programmal ellenőriztük. Az egyes futások eredményeit a LogCombiner eszközzel egyesítettük, az első 10%-ot burn-in-nek tekintve. A haplocsoportok egy részére (H1, H2, H8, részleteket lásd az Eredmények részben) statisztikus parszimónia hálózatot

készítettünk – 95% összeköttetési határral a TCS program segítségével (Clement és mtsi, 2000) – azok kapcsolatának tisztázása céljából.

A térbeli genetikai differenciációt két léptékben vizsgáltuk. Egyrészt a 73 mintavételi helyet 6 régióba soroltuk az ismert refúgiumok alapján: az Ibériai-félsziget és Marokkó (Ibéria, egyedszám (n=9), Olaszország (n=20), a Kárpát-medence (n=158), Törökország és Libanon (TL, n=13), Irán (n=18), valamint a Brit-szigetek (UK, n=11) mint északi posztglaciális populáció (7. ábra, 2. táblázat). A Francia- és Németországból (együtt FG, n=6), valamint Görögországból (n=4) származó mintákat a régió szintű statisztikai elemzésben nem használtuk fel az alacsony minta elemszám miatt. 3 Horvátországból származó mintát az olasz régióhoz soroltunk az olaszokkal egyező haplotípus miatt, feltételezve, hogy az Alpok a fő fizikai barrier ebben a régióban. Az egyetlen libanoni mintát Törökországhoz soroltuk a haplotípusok azonossága miatt. Az iráni és a török régió különválasztását az indokolta, hogy az Anatóliai Diagonál e két régió között húzódik (1. ábra).

Másrészt Magyarországot a következő 5 régióra osztottuk, hogy a genetikai variabilitást ebben a térléptékben is elemezhessük: Mecsek (n=27), Gödöllő (n=8), Mátra (n=69), Eger (n=15) és Aggtelek (n=27) (7. ábra, 3. táblázat). Több magyarországi minta kimaradt ebből az elemzésből, mert egyik régióba sem sorolható be egyértelműen.

A genetikai differenciációt AMOVA módszerrel (Analysis of Molecular Variance, Excoffier és mtsi, 1992) vizsgáltuk, amihez kétféle genetikai távolságot vettünk alapul: (i) a szekvenciák közötti nem korrigált páronkénti távolságot (p-távolság) és (ii) a páronkénti patrisztikus távolságot. Az utóbbit a BEAST eredményeként kapott fa alapján, a Patristic szoftverrel (Fourment és Gibbs, 2006) számoltuk ki. A távolságok elemzését R-ben végeztük. Az AMOVA számításokat az R VEGAN 1.15-2 csomagjának (Oksanen és mtsi, 2009) “ADONIS” függvényével végeztük el. A térbeli heterogenitás szignifikanciájának tesztelése permutációs tesztekkel történt, 5000 random permutációt alkalmazva, illetve 1000 permutációt végeztünk a páronkénti összehasonlítások során. A variancia komponensek becslése során a populációkat egy csoportba soroltuk, a Φ_{ST} becslése ez alapján történt (Excoffier és mtsi, 1992; Weir, 1996, a legegyszerűbb hierarchikus szerkezetet tételezve fel).

A tölgygubacs gazda specificitás tesztelésére szintén AMOVA-t végeztünk.

Sajnos a több éven keresztül végzett intenzív hazai mintázás ellenére sem sikerült a különböző régiókból származó gubacsokból elegendő *Synergus umbraculus* egyedeket kinevelni ahhoz, hogy a gazdaspecificitást és a térbeli genetikai differenciációt együtt tesztelhessek. Így a gazdaspecificitás tesztet csak a Mátra régióból származó azon mintákra végeztük el (n=55), melyeknél a gubacs gazda azonosítása egyértelmű volt. A következő 4 gubacsdarázs faj aszexuális generációjának gubacsaiból származó *S. umbraculus* egyedeket használtuk fel: *Andricus infectorius* (n=7), *A. kollari* (n=15), *A. lucidus* (n=15) és *A. lignicolus* (n=18). Az összes gazdaspecificitás vizsgálatba bevont gubacs rügy eredetű.

Eredmények

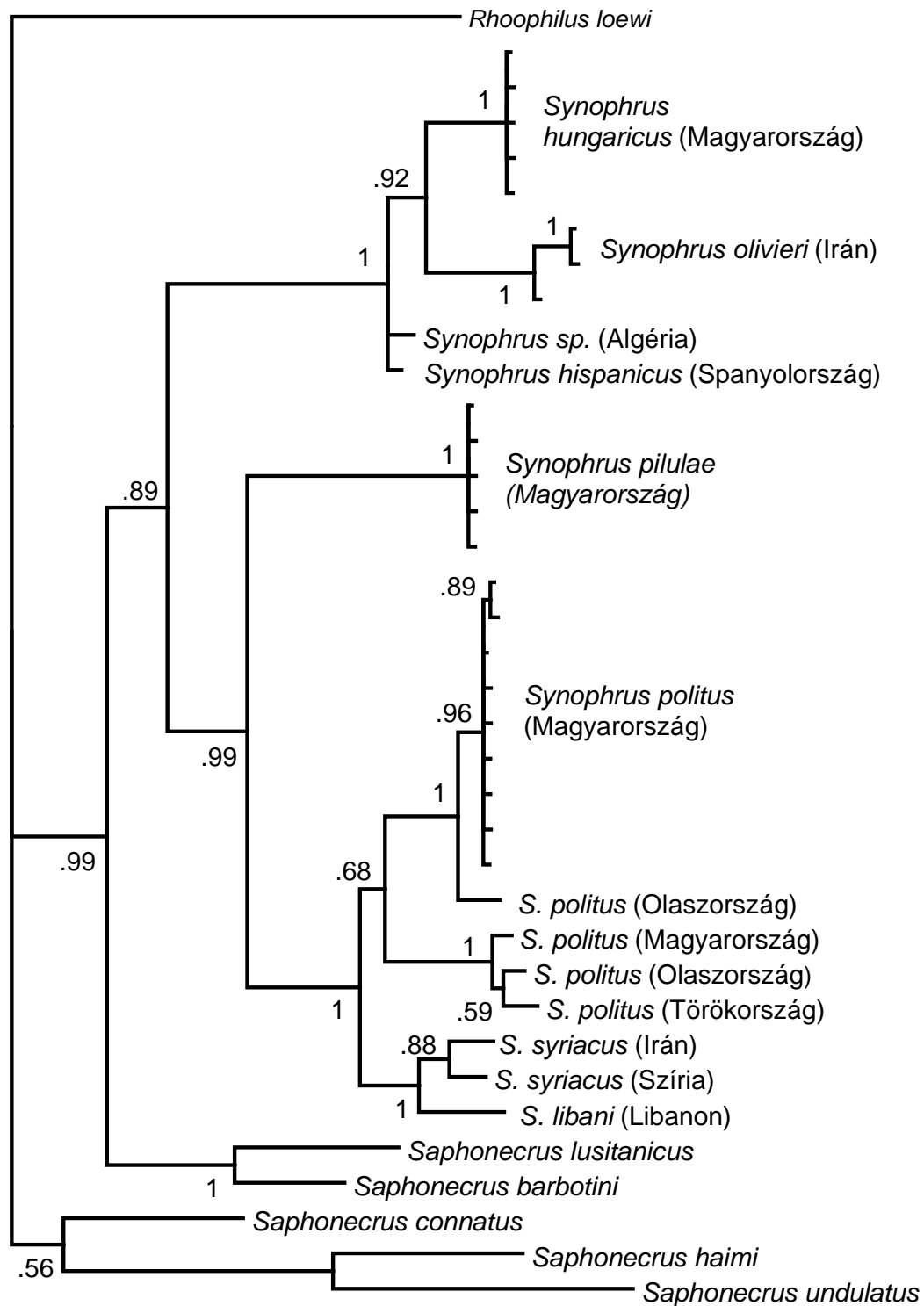
Synophrus

Molekuláris filogenetika és diverzitás

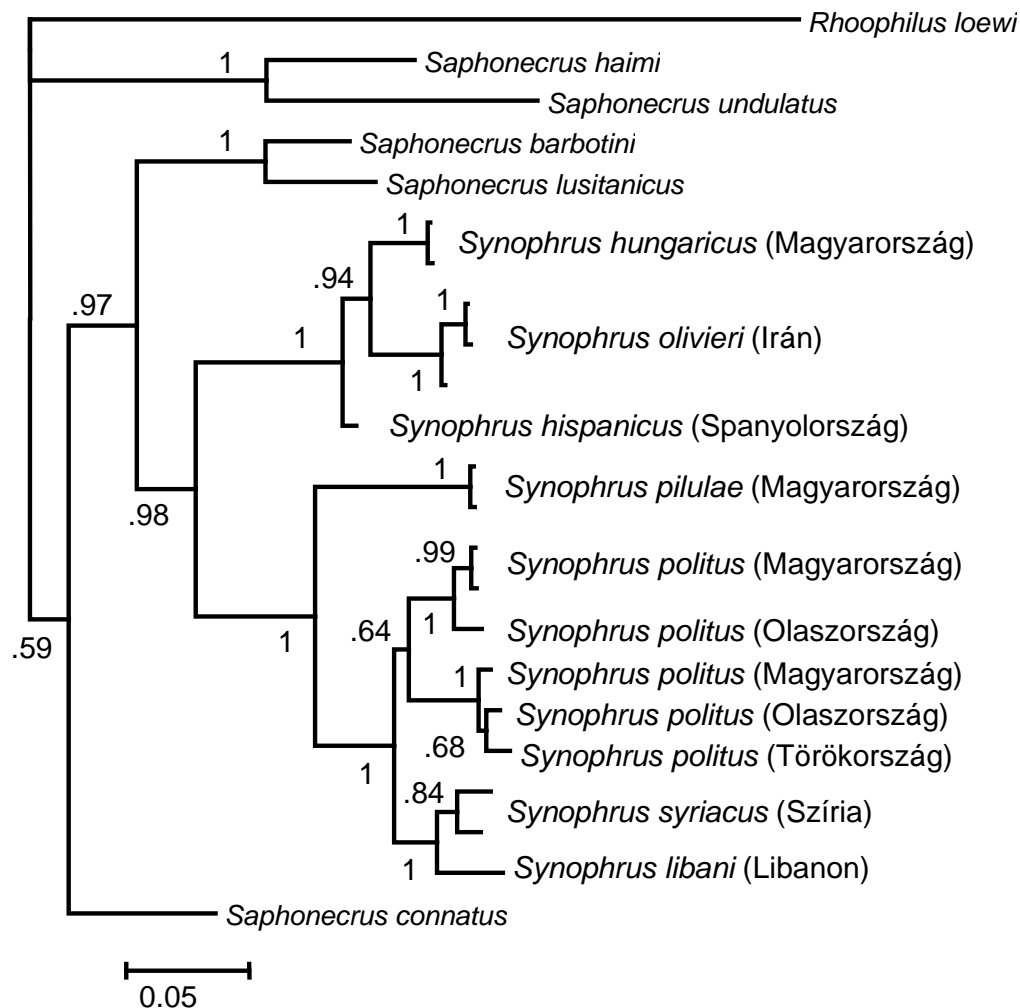
A szekvencia analízishez összesen 118 COI és 37 28S D2 szekvenciát használtunk fel (1. táblázat). A MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004c) szoftver által javasolt GTR+I+G (General Time Reversible modell invariábilis pozíciókkal és gamma eloszlással) szubsztitúciós modellt használtuk a COI adatokra, SYM+I (Szimmetrikus modell invariábilis pozíciókkal) modellt a 28S D2 szekvenciákhoz. A COI szekvenciák a *Synophrus* génusz monofiletikusságát támogatják, és magas megbízhatósági értékkel további csoportok elkülönítését teszik lehetővé (8. ábra).

A mindkét lokuszt alapul vevő filogenetikai rekonstrukció az eddig leírt 3 *Synophrus* faj (*S. pilulae*, *S. politus*, *S. olivieri*) mellett további új fajok jelenlétét támasztja alá (9. ábra). Ezen tudományra új fajok elkülönítése és leírása, új diagnosztikus morfológiai karakterek megállapításával és határozókulcs felállításával megtörtént, az önálló leszármazási sorokat a molekuláris filogenetika is alátámasztotta (Pénzes és mtsi, 2009), vagyis a molekuláris filogenetikai rekonstrukcióban elkülönülő bizonyos leszármazási vonalak faji státuszt nyertek. Az új fajok: *Synophrus hungaricus* Melika és Mikó, 2009, *S. libani* Melika és Pujade-Villar, 2009, *S. syriacus* Melika, 2009 és *S. hispanicus* Pujade-Villar, 2009. A morfológiai és taxonómiai munkát George Melika, Mikó István és Juli Pujade-Villar végezte. Ezen dolgozat tárgyát csak a molekuláris filogenetikai eredmények képezik.

A COI filogenetika alapján (8. ábra) két csoport különíthető el. Az elsőbe tartoznak a *S. hispanicus*, *S. hungaricus* és *S. olivieri* fajok, a másodikba pedig a *S. pilulae*, *S. politus*, *S. libani* és a *S. syriacus*. A *Synophrus syriacus* és *S. libani* testvércsoportok, és együtt monofiletikusak a *S. politus* fajjal, míg a *S. pilulae* egy korábbi divergenciájú leszármazási sort képvisel, testvérfaja az előbbi csoportnak. A 28S D2 szekvenciák alacsony diverzitást mutattak, mindössze öt haplotípust tudunk elkülöníteni a génuszon belül. A COI alapján elkülönült *S. olivieri* – *S. hispanicus* – *S. hungaricus* leszármazási vonal ugyanazzal a 28S D2 haplotípussal jellemezhető.



8. ábra A *Synophrus*, *Saphonecrus* és *Roophilus* génuszok citokróm oxidáz alapú filogenetikája. 50% majority-rule konszenzus fa, amely Bayes analízissel, a nem partícionált adatszettel alapján készült. Kulcsoportnak a *Roophilus loewi* fajt tekintettük. Az elágazási pontok felett a posterior valószínűség értékeket tüntettük fel.



9. ábra A *Synophrus*, *Saphonecrus* és *Rhoophilus* génuszok 50% majority-rule konszenzus fája, mely Bayes analízissel, a nem partícionált citokróm oxidáz, a 28S D2 és a 28S D2 gap adatok kombinált analízisével készült. A gyökér pozícióját a *Rhoophilus loewi* fajt használva határoztuk meg. Az elágazási pontok felett a posterior valószínűség értékeket tüntettük fel.

A *S. libani* két szubsztitúcióban tért el a *S. politus*ra jellemző haplotípustól. Az iráni *S. syriacus* minták egy bázispárnyi különbséget mutattak attól a haplotípustól, mely az összes szíriai *S. syriacus*, valamint a török, olasz és magyar *S. politus* mintákra jellemző. A *S. pilulae* minták egy egyedi haplotípussal rendelkeznek. Amint az az egyes filogenetikai fák hasonlósága alapján sejthető volt, a COI, D2 és D2 gap adatok kombinált analízise a COI-hoz hasonló topológiát eredményezett (9. ábra). A COI szekvenciák kodon pozíció szerinti partícionálása nem befolyásolta a kapott fa

topológiáját.

A fajon belüli szekvencia variabilitást COI-ra a szegregáló pozíciók százalékos arányával becsültük. Ez a *S. olivieri* szekvenciákra 1.4%, 2.6% az iráni és szíriai *S. syriacus* szekvenciákra, melyek között egy gapnyi különbség is volt 28S D2 tekintetében. Általában véve a fajon belüli variabilitás Magyarországon jóval alacsonyabb volt, kevesebb, mint 0.6% *S. pilulae* és *S. hungaricus* esetében.

A *Synophrus politus* leszármazási vonalon belül két alcsoport különíthető el, melyek közötti szekvencia divergencia 2.1%. Az egyik alcsoportba a török, olasz (Piombino) és egy magyar minta tartozik. A másikba 58 magyar és 8 olasz (Savoria) egyed sorolható, ez utóbbiak szekvenciája teljesen azonos. A magyar minták 1.2% variabilitást mutattak, de feltehetően ez nem magyarázható a földrajzi elhelyezkedéshez, sem a növényi szervhez köthető mintázattal. Az összes magyarországi mintavételi helyen ugyanazok a haplotípusok domináltak. Azonban a kérdés vizsgálatához a mintavétel nem adekvát, ezért nem is teszteltük. A legtöbb szubsztitúció parszimónia tekintetében nem informatív (8. ábra).

Szekvencia adataink a *Saphonecrus* fajok két csoportra osztását támogatják (8. ábra, 9. ábra). (i) A *Saphonecrus lusticianus* és *S. barbotini* képezi a *Synophrus* leszármazási vonal testvércsoportját. (ii) A *Saphonecrus haimi* és *S. undulatus* alkotja a másik csoportot, melynek a többihez való viszonya a jelen analízisben nem tisztázható, csak úgy, mint a *Saphonecrus connatus* faj filogenetikai viszonya. Későbbi vizsgálataink (Ács és mtsi, 2010) a fenti két csoport létét megerősítették, azonban a *S. connatus* faj helyzete továbbra is bizonytalan maradt.

Synergus umbraculus

Szekvencia és haplotípus variabilitás

A 239 cyt b szekvencia alapján 66 különböző haplotípust tudtunk elkülöníteni, ez protein szinten 29 haplotípusnak felel meg (2. táblázat). A vizsgált 697 bázispárnyi szakaszon 119 pozíció volt variábilis, ebből 94 volt parszimónia informatív (9 pozíció 3, további 2 pozíció 4 négy állapottal). A fenti 119 pozícióból 84 (71%) volt tranzíció. A teljes haplotípus diverzitás 0.916 (szórás (SD) =0.010), a nukleotid diverzitás 0.036

(SD=0.0018) volt. A DNS szinten elkülöníthető 66 haplotípusból 43 (65%) egyedi volt, vagyis csak egy adott egyedben azonosítottuk, míg az öt leggyakoribb haplotípus a minták 60%-át (n=144) jellemezte. A nyugat palearktiki régiók szintjén a haplotípus diverzitás látszólag a mintanagyságnak megfelelően alakult, 40 haplotípust találtunk a Kárpát-medencében, 4-10 haplotípust Iránban, Olaszországban, Törökországban, az ibériai régióban és az Egyesült Királyságban. Az egyes régiókra vonatkozó géndiverzitás értékek 0.500 és 0.852 közé, a nukleotid diverzitás értékek 0.007 és 0.032 tartományba estek (2. táblázat).

Régiók szintjén a haplotípusok földrajzi eloszlása jelentős genetikai differenciációra utal. Olaszország kivételével a haplotípusok több, mint fele egyedi volt egy adott régióra, ezek közül 14 (n=86, 36%) több egyedben, de csak egy régióban volt jelen. 9 haplotípus (n=110, 46%) több régióban is jelen volt, ezek közül egy (ht05) négy régióban, egy (ht04) háromban és hét másik két régióban. Az ibériai régióknak egyetlen másik régióval közös haplotípusa sem volt. Ezzel szemben Olaszország és a Kárpát-medence 6 közös haplotípussal jellemezhető. Törökország és Irán mindössze egy közös haplotípussal rendelkezik. Az Egyesült Királyságban tizenegyből hét egyedre a gyakori ht05 haplotípus volt jellemző és egy közös haplotípusa (ht09, n=2 az Egyesült Királyságban) volt a szomszédos francia-német régióval.

A Kárpát-medencén belül a géndiverzitás ($h=0.766-0.943$) és nukleotid diverzitás ($\pi=0.020-0.035$) értékek hasonlóak voltak az egyes régiókban, és viszonylag magasak a Nyugat Palearktikum régióihoz viszonyítva (3. táblázat). Az öt kárpát-medencei régióban (n=146) összesen 37 haplotípust találtunk, melyek közül 22 (59.5%) csak egy adott mintára volt jellemző, míg további 6 csak egy területen, de 2-3 mintában volt jelen. A Kárpát-medence számos megosztott haplotípussal rendelkezik mind saját régióit, mind a többi nagyobb régiót figyelembe véve (összesen n=110, 75.3%). A 9 megosztott kárpát-medencei haplotípus közül a leggyakoribb (ht01, n=49) minden kárpát-medencei régióban jelen volt, de sehol máshol a Nyugat Palearktikumban. A kárpát-medencei minták jelentős hányada (n=58, 39.73%) jellemezhető megosztott haplotípussal, köztük a szintén gyakran tekinthető ht04 és ht05 haplotípusokkal (n=11). A második leggyakoribb haplotípust (ht02, n=33 a Kárpát-medencében) 4 hazai régióban megtaláltuk és 2 példányban Olaszországban is, míg a harmadik leggyakoribb haplotípus (ht03, n=22 a Kárpát-medencében) szintén 4 hazai régióban és nagy számban (n=7) Törökországban is jelen volt.

	Összes	FG	GR	KM	IM	IR	IT	TL	UK
Minta nagyság	239	6	4	158	9	18	20	13	11
Mintavételi helyek száma	73	5	3	21	6	7	17	9	6
Haplocsoportok száma	8	1	1	6	2	2	4	3	2
Haplotípusok száma	66	3	2	40	5	10	8	6	4
Egyedi haplotípusok száma	43	1	1	24	3	7	2	3	2
Szegregáló pozíciók száma	119	2	1	100	29	19	67	53	52
Az összes mutációk száma	132	2	1	110	30	19	67	55	52
Haplotípus (gén) diverzitás (SD)	0.916 (0.010)	0.600 (0.215)	0.500 (0.265)	0.852 (0.020)	0.806 (0.120)	0.810 (0.093)	0.842 (0.060)	0.718 (0.128)	0.600 (0.154)
Nukleotid diverzitás x100 (SD)	3.603 (0.181)	0.096 (0.040)	0.072 (0.038)	3.182 (0.257)	1.706 (0.397)	0.436 (0.130)	3.236 (0.636)	2.056 (0.882)	2.400 (1.095)
Páronkénti különbségek átlaga	25.11	0.67	0.50	22.18	11.89	3.04	22.58	14.33	16.73
Patrisztikus távolság átlaga x100	5.12	0.12	0.17	4.55	2.36	0.72	5.22	2.39	3.92

2. táblázat A *Synergus umbraculus* citokróm b szekvenciákra vonatkozó genetikai diverzitás értékek a Nyugat Palearktikum egyes régióira. Rövidítések: “FG” – Franciaország és Németország; “GR” – Görögország; “KM” – Kárpát-medence; “IM” – Ibéria és Marokkó; “IR” – Irán; “IT” – Olaszország; “TL” – Törökország és Libanon; “UK” – Egyesült Királyság; “SD” szórás.

	Összes	Aggtelek	Eger	Gödöllő	Mátra	Mecsek	A	B
Minta nagyság	146	27	15	8	69	27	138	123
Mintavételi helyek száma	10	1	1	1	4	3	9	8
Haplocsoportok száma	6	3	3	4	5	3	5	5
Haplotípusok száma	37	9	10	5	20	12	35	31
Egyedi haplotípusok száma	22	4	3	1	10	4	21	17
Szegregáló pozíciók száma	97	76	74	65	85	51	92	90
Az összes mutációk száma	107	82	80	65	94	56	102	100
Haplotípus (gén) diverzitás (SD)	0.847 (0.022)	0.766 (0.068)	0.943 (0.040)	0.857 (0.108)	0.845 (0.030)	0.855 (0.048)	0.844 (0.022)	0.831 (0.025)
Nukleotid diverzitás x100 (SD)	3.075 (0.264)	3.082 (0.715)	3.462 (0.777)	3.438 (0.918)	3.323 (0.347)	2.009 (0.541)	3.044 (0.273)	3.013 (0.292)
Páronkénti különbségek átlaga	21.43	27.15	26.70	20.28	23.87	26.63	21.21	21.00
Patrisztikus távolság átlaga x100	4.32	5.58	5.59	4.21	4.81	5.44	4.25	4.23

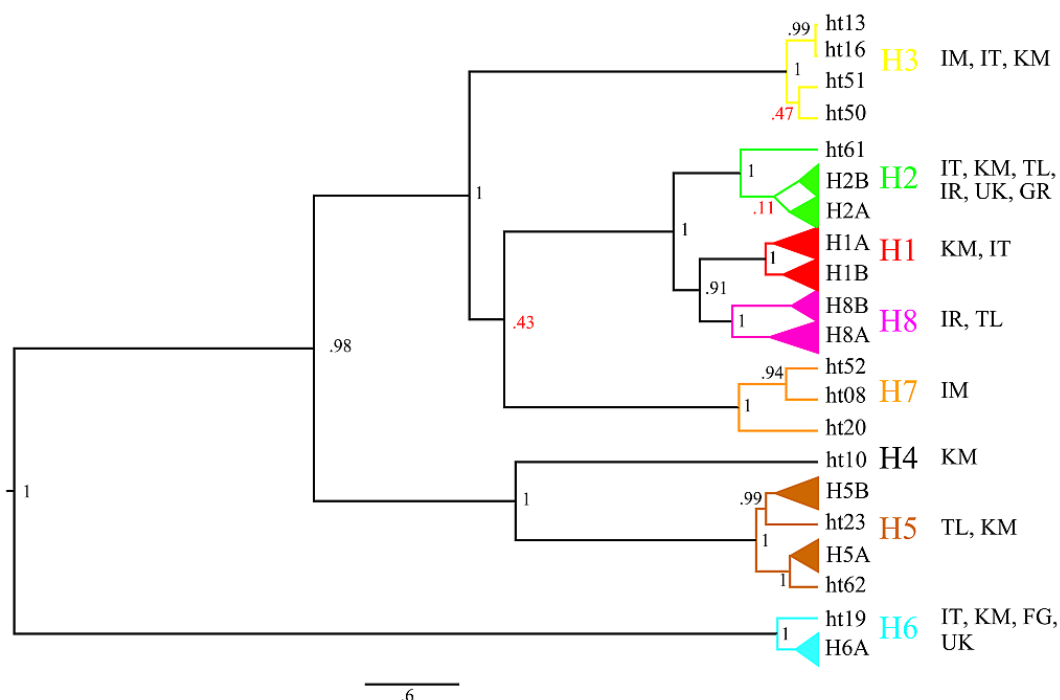
3. táblázat A *Synergus umbraculus* citokrómban b szekvenciákra vonatkozó genetikai diverzitás értékek a Kárpát-medence egyes régióira. “A”-val jelöltük azt az adathalmazt, mely csak az Aggtelek, Eger, Mátra és Mecsek régiókat foglalja magában. “B”-vel az Aggtelek, Mátra és Mecsek régiókat tartalmazó adathalmazt jelöltük. “SD” – szórás.

Filogenetikai elemzés és a haplocsoportok jellemzése

Elemzésünk 8 fő cytb haplotípus csoportot (haplocsoportot, H1-H8, 10. ábra, 4. táblázat) különített el, melyek támogatottsága magas (posteriori valószínűség, $pp > 0.99$) a filogenetikai rekonstrukcióban. Az egyes mintákra és haplotípusokra vonatkozó haplocsoport szerinti besorolás az 1. függelékben található. A haplocsoportok közötti kapcsolatok magas megbízhatósággal rekonstruálhatóak ($pp > 0.91$) egy kivétellel: a H3, H7 és (H1, H2, H3) csoportok közötti viszony bizonytalan ($pp = 0.43$). A fa topológiája alapján 3 csoport különíthető el a divergencia sorrendje tekintetében, melyek a főbb refúgiumokkal hozhatók összefüggésbe. Az első csoportot a H6 haplocsoport alkotja, mely a legkorábban elkülönülő ág. Mindössze 4 haplotípus tartozik ide, azonban számos helyről előkerültek ($n=27$, 4. táblázat, 7. ábra) Olaszország, a Kárpát-medence és Nyugat-Európa területén; az összes francia és német minta ebbe a csoportba tartozik. A második csoport egy Balkán-Kárpát-medence leszármazási vonalnak tekinthető, melyet a H4 ($n=3$, 1 haplotípus hazánkban) és H5 ($n=38$) haplocsoportok alkotnak. A H5 haplocsoportba tartozik az a ht03 haplotípus is, mely mind Törökországban, mind a Kárpát-medencében gyakori. A harmadik csoportot pedig az összes többi haplocsoport alkotja.

A H3 és H7, két, vélhetőleg afro-ibériai eredetű csoport. A H3 haplocsoportba ($n=7$) észak-spanyol (ht51), észak-afrikai (Marokkó, ht50), kárpát-medencei (ht16, Gödöllő, $n=2$), valamint olasz és kárpát-medencei (ht13, $n=3$) haplotípusok tartoznak. A H7 haplocsoport ($n=7$) az ibériai régióban endemikus, csak Ibéria nyugati és déli részén és Marokkóban találtuk meg. A H3, H7 és a H1-H2-H8 csoportok közötti leszármazási viszony bizonytalan.

A H1-H2-H8 csoporton belül ($n=157$) a H2 leszármazási vonal ($n=33$) az ibériai és a francia-német régió kivül minden más területen megtalálható és magába foglalja a már említett ht05 haplotípust, ami Olaszországban a legjellemzőbb haplotípus. Ezzel szemben a H8 ($n=18$) haplocsoport főként Irán és Törökország (1 minta) területén fordul elő. A H1 leszármazási vonal ($n=106$) a Kárpát-medencében fordul elő tömegesen, valamint 3 mintában Olaszországban is. A H1 haplocsoportba tartozik a két leggyakoribb haplotípus (ht01, ht02).



10. ábra A *Synergus umbraculus* citokróm b haplotípusok ultrametrikus filogenetikai fája. Az analízist a BEAST szoftverrel végeztük, kodon partícionált GTR+I+G modellt és molekuláris órát (strict clock) használva. Az elágazási pontok felett a posterior valószínűség értékeket tüntettük fel; a 0.90-nél kisebb értékeket pirossal kiemeltük. A lépték az időt mutatja millió években Brower (1994) becslését alapul véve (1.15% szekvencia divergencia/millió év/leszármazási vonal). A nagyszámú haplotípust tartalmazó alcsoportokat egyszerűsítve jelöltük. Ugyanazt a színkódolást használtuk, mint a 7. ábránál, a haplocsoportok nevei mellett az elterjedést is feltüntettük. Rövidítések: “FG” – Franciaország és Németország; “GR” – Görögország; “KM” – Kárpát-medence; “IM” – Ibéria és Marokkó; “IR” – Irán; “IT” – Olaszország; “TL” – Törökország és Libanon; “UK” – Egyesült Királyság.

Az afro-ibériai H7 és az iráni H8 csoportok nukleotid diverzitása (4. táblázat) magasabb, mint a jóval elterjedtebb H6 és H2 csoportoké. A bazálisan elkülönült H6 jellemezhető a legalacsonyabb diverzitással.

A filogenetikai elemzés alapján elmondhatjuk, hogy míg az afro-ibériai H7 és az iráni H8 endemikus haplocsoportok, addig más régiókban számos széles elterjedésű haplocsoport is megtalálható (Kárpát-medence: H1-6, Olaszország: H1-3, H6), amely a magas régió diverzitást magyarázhatja (2. táblázat). Olaszország és a Kárpát-medence 4 különböző közös haplocsoporttal rendelkezik, Törökország és a Kárpát-medence közös H5 haplotípusokkal, Törökország és Irán pedig egy közös H2 haplotípussal jellemezhető.

	Összes	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8
Minta nagyság	239	106	33	7	3	38	27	7	18
Régiók száma	8	2 KM, IT	6 IT, KM, TL, IR, UK, GR	3 IM, IT, KM	1 KM	2 TL, KM	4 IT, KM, FG, UK	1 IM	2 IR, TL
Haplotípusok száma	66	21	11	4	1	12	4	3	10
Haplotípus (gén) diverzitás (SD)	0.916 (0.010)	0.693 (0.034)	0.663 (0.090)	0.810 (0.130)	0	0.661 (0.086)	0.390 (0.112)	0.667 (0.160)	0.810 (0.093)
Szeggregáló pozíciók száma	119	20	11	5	0	14	4	13	12
Az összes mutációk száma	132	21	11	5	0	15	4	13	12
Nukleotid diverzitás x100 (SD)	3.603 (0.181)	0.135 (0.013)	0.160 (0.033)	0.287 (0.091)	0	0.498 (0.074)	0.081 (0.028)	0.806 (0.209)	0.371 (0.085)
Páronkénti különbségek átlaga	25.11	0.94	1.12	2	0	3.47	0.56	5.62	2.59
Patrisztikus távolság átlaga x100	5.12	0.46	0.35	0.24	0	0.46	0.12	0.64	0.61

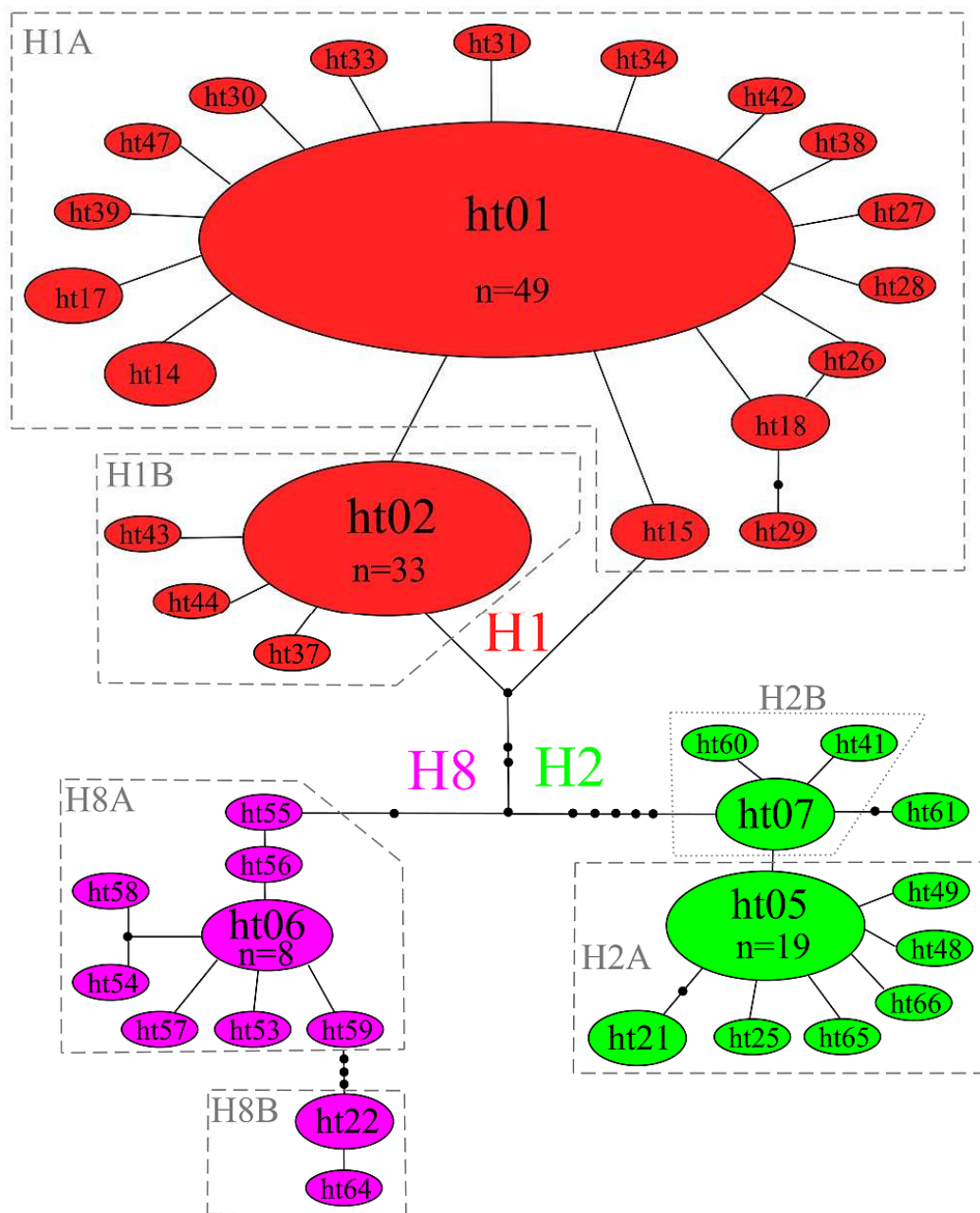
4. táblázat A *Synergus umbraculus* citokróm b haplocsoportok genetikai diverzitása. Rövidítések: “FG” – Franciaország és Németország; “GR” – Görögország; “KM” – Kárpát-medence; “IM” – Ibéria és Marokkó; “IR” – Irán; “IT” – Olaszország; “TL” – Törökország és Libanon; “UK” – Egyesült Királyság; “SD” szórás.

Statisztikus parszimónia hálózat

A három fiatalabb divergenciájú haplocsoport (H1, H2, H8, $n_{\text{össz}}=157$) haplotípusait és ezek rokonsági viszonyait egy statisztikus parszimónia hálózattal is elemeztük (11. ábra). E három haplocsoportra vonatkozó cytb szekvenciákban összesen 47 variábilis pozíciót találtunk, melyek 80% tranzíció, és csak egyben volt többszörös szubsztitúció megfigyelhető, így a parszimónia feltételei feltehetően nem sérülnek számottevő mértékben. A hálózat a H1, H2 és H8 haplocsoportok differenciációját több elméleti (vagyis nem mintázott) haplotípuson keresztül valószínűsíti. A haplocsoportok közötti rokonsági viszonyok a filogenetikai rekonstrukcióhoz hasonlóak (10. ábra). A H1 csoportot két alcsoportra oszthatjuk (H1A és H1B), melyeket egy mutációs lépés választ el egymástól. A H1A alcsoport központi haplotípusa egyben a leggyakoribb haplotípus (ht01) is, a H1B központi haplotípusa a második leggyakoribb ht02. Mindkét központi haplotípusból általában egy szubsztitúció távolságra találhatóak a további haplotípusok. Ez alól csak a ht29 képez kivételt, mely 3 lépésnyire van a ht01-től. Az összes H1 haplotípus jelen van a Kárpát-medencében és a két Olaszországban kimutatott H1 haplotípus is: a ht02, mely két mintát és a ht14, mely egy mintát jellemez.

A haplotípus hálózat alapján a H1 haplocsoport közelebb van az iráni H8-hoz, mint a H2-höz. A H8 csoportra komplexebb mintázat és nagyobb szekvencia divergencia jellemző, ami a filogenetikai elemzésen is látható (10. ábra).

Hasonlóan a H1 haplocsoporthoz, a H2-re is jellemző két alcsoport (H2A és H2B) és egy-egy központi haplotípus jelenléte (ht05, ht07), melyek egymástól egyetlen mutációs lépésre vannak, és belőlük elágazva egy vagy néhány lépésre található az alcsoport többi haplotípusa. A ht05 (H2A) a legelterjedtebb haplotípus valamennyi közül (Egyesült Királyság, Kárpát-medence, Olaszország, Görögország), míg a ht07 (H2B) megosztott a Kárpát-medence és Olaszország között. A legtöbb haplotípus a ht05-ből származtatható, és szinte az egész Nyugat Palearktikumban megtalálható: a ht66 és ht65 az Egyesült Királyságban, a ht25 Görögországban, a ht21 Törökországban és Iránban, a ht48 és ht49 a Kárpát-medencében. Ezzel szemben a H2B alcsoport valamennyi tagja kizárólag Olaszországban és a Kárpát-medencében fordul elő: ht07 mindkét régióban, a ht41 hazánkban, a ht60 és ht61 Olaszországban. Filogenetika alapján a H1-H2-H8 csoportok közül előbb a H2 csoport különült el.



11. ábra A *Synergus umbraculus* citokróm b haplotípusok statisztikus parszimónia hálózata a H1, H8 és H2 haplocsoportokra. A vonalakon levő fekete pontok a szoftver által becsült, de nem mintázott köztes haplotípusokat jelölik. Az ellipszisek mérete az adott haplotípus gyakoriságára utal. A szaggatott vonalakkal körülhatároltak olyan alcsoportokat jelölnek, melyek meglétét a filogenetikai analízis is támogatja (10. ábra). Ugyanazt a színekódolást használtuk, mint a 7. és 10. ábránál.

Genetikai differenciáció

A Nyugat Palearktikum régiói közötti szignifikáns fixációs index $\Phi_{ST}=0.200$ ($p<0.01$) patrisztikus távolsággal számolva, míg eltérő pozíciók száma alapján $\Phi_{ST}=0.246$ ($p<0.01$). Ezek az értékek a genetikai variabilitás fent elemzett térbeli differenciációját igazolják. Ugyanakkor a variabilitás jelentős része – 80% patrisztikus távolság alapján, 75.4% eltérő pozíciók száma alapján – az egyes régiókon belüli különbségeknek köszönhető. A régiók közötti páronkénti Φ_{ST} értékek igen hasonlóak voltak függetlenül a számoláshoz használt távolság módszertől, ezért csak azokat tárgyaljuk, melyeket az eltérő pozíciók száma alapján számoltunk (5. táblázat). A legmagasabb páronkénti értékeket az Ibéria és Törökország összehasonlítása ($\Phi_{ST}=0.653$, $p<0.01$), az Ibéria és Irán ($\Phi_{ST}=0.888$, $p<0.01$), valamint az Anatóliai Diagonál két oldala közti Törökország és Irán ($\Phi_{ST}=0.839$, $p<0.01$) összehasonlítás alapján kaptunk. Ezzel szemben viszonylag alacsony értékeket kaptunk a Kárpát-medence, Olaszország, Egyesült Királyság régiók bármely kombinációjára ($\Phi_{ST}<0.086$, $p=0.032-0.67$).

	KM	IM	IR	IT	TL	UK
KM		0.261	0.169	0.069	0.380	0.086
IM	0.244		0.888	0.361	0.653	0.462
IR	0.115	0.807		0.295	0.839	0.364
IT	0.051	0.249	0.198		0.510	≈ 0.0
TL	0.341	0.728	0.845	0.454		0.573
UK	0.054	0.335	0.226	≈ 0.0	0.530	

5. táblázat AMOVA eredmények a Nyugat Palearktikum régióira. Az átló feletti páronkénti Φ_{ST} értékeket eltérő pozíciók száma alapján, míg az átló alattiakat patrisztikus távolság alapján számoltuk. A $p=0.05$ szignifikancia szint mellett nem szignifikáns Φ_{ST} értékeket dőlt betűvel jelöltük. Rövidítések: “FG” – Franciaország és Németország; “GR” – Görögország; “KM” – Kárpát-medence; “IM” – Ibéria és Marokkó; “IR” – Irán; “IT” – Olaszország; “TL” – Törökország és Libanon; “UK” – Egyesült Királyság.

A genetikai variabilitás térbeli differenciációja jóval kevésbé volt kifejezett a Kárpát-medencén belül, mint a Nyugat Palearktikum egyes régiói között. A Kárpát-medence mind az 5, vagy csak 4 (Gödöllő nélkül), vagy csak 3 (Gödöllő és Eger nélkül) régiója között számolt páronkénti Φ_{ST} értékek minden esetben alacsonyak, a különbségek nem szignifikánsak ($\Phi_{ST}<0.026$, $p=0.097-0.373$). A Mecsek régió mutatta a legnagyobb differenciációt a páronkénti összehasonlításokban, amint ez földrajzi

helyzete alapján várható is (6. táblázat).

	Eltérő pozíciók száma					Patrisztikus távolság			
	R ²	Variancia%	Φ_{ST}	p		R ²	Variancia%	Φ_{ST}	p
Aggtelek vs Mátra	0.011	0.045	0.000	0.340		0.015	1.031	0.010	0.234
Aggtelek vs Mecsek	0.027	1.659	0.017	0.304		0.046	5.293	0.053	0.089
Mátra vs Mecsek	0.025	3.566	0.036	0.094		0.025	3.407	0.034	0.092

6. táblázat AMOVA eredmények a Kárpát-medence régióra eltérő pozíciók száma és patrisztikus távolság alapján. A variancia (%) a csoportok közötti variancia százalékos aránya a teljes (csoportok közötti és csoporton belüli) variációhoz képest.

Gazda szerinti genetikai differenciáció

A Mátra régió mintáin elvégzett elemzés nem mutatott szignifikáns eltérést a négy leggyakoribb rovar gazda gubacsából kinevelt *Synergus umbraculus* egyedek között. A teljes variabilitás mindössze 2-5%-a köthető a gazdák közti különbségekhez (eltérő pozíciók száma alapján $\Phi_{ST}=0.022$, $p>0.1$, patrisztikus távolság alapján $\Phi_{ST}=0.051$, $p>0.1$, 7. táblázat).

	Eltérő pozíciók száma			Patrisztikus távolság		
	Df	R ²	Variancia (%)	Df	R ²	Variancia (%)
Gazda	3	0.071	2.24	3	0.092	5.096
Maradék	51	0.929	97.76	51	0.908	94.903
Összes	54			54		
F: 1.305, p=0.258, Φ_{ST} : 0.022			F: 1.716, p=0.114, Φ_{ST} : 0.051			

7. táblázat A mátrai gubacsdarázs gazdákra vonatkozó AMOVA eredmények. Mind az eltérő pozíciók száma, mind a patrisztikus távolság alapján kapott eredményeket feltüntettük. A variancia (%) a csoportok közötti variancia százalékos aránya a teljes (csoportok közötti és csoporton belüli) variációhoz képest.

Diszkusszió

Synophrus

Filogenetika

A Cynipidae csoportban a morfológiai jellemzőkön és molekuláris adatokon alapuló filogenetikai rendszer számos ponton eltér (Nylander és mtsi, 2004a, b; Ács és mtsi, 2007). A nagyobb változatosságot mutató szekvenciák gyakran nagyobb felbontást eredményeznek, a nem kongruens eredmények a kérdéses taxon revízióját vonhatják maguk után. A Nyugat Palearktikumban korábban 3 fajt különítettek el a *Synophrus* génuszban. Új minták, molekuláris filogenetikai elemzésünk és a diagnosztikus morfológiai karakterek ezt követő újraértékelése 4 további tudományra új faj leírását eredményezték: *Synophrus hungaricus* Melika és Mikó, 2009, *S. libani* Melika és Pujade-Villar, 2009, *S. syriacus* Melika, 2009 és *S. hispanicus* Pujade-Villar, 2009. Ennek megfelelően hazánk faunája egy inkviline fajjal bővült (*Synophrus hungaricus*), amely ezidáig csak Magyarországról ismert.

A molekuláris filogenetika nem csak új csoportokra hívta fel a figyelmet, a leszármazási kapcsolatok – amelyek már a morfológiai elemzések alapján is vitatottak voltak – is átértékelődtek. Eredményeink alátámasztják azt a feltevést, miszerint minden *Synophrus* faj, valamint a *Saphonecrus barbotini* Pujade-Villar és Nieves-Aldrey, 1985 és a *Saphonecrus lusitanicus* Tavares, 1902 monofiletikus egységet alkot. A *Saphonecrus*, mint önálló monofiletikus egység további fenntartását azonban sem a morfológiai, sem a szekvencia adatok nem támogatják. Ennek megfelelően két *Saphonecrus* faj, a *Saphonecrus lusitanicus* és a *Saphonecrus barbotini* feltehetően átsorolásra kerül a *Synophrus* génuszba.

Ács és mtsi (2010) eredményei ugyanezt a csoportosítást támogatják. Mindhárom általuk vizsgált lokusz (cytb, COI és 28S D2) alapján a *Synophrus* génusz monofiletikus, a *Saphonecrus* fajok pedig három csoportra oszlanak: (i) *S. connatus*, (ii) *S. barbotini* és *lusitanicus* és (iii) *S. undulatus*, *S. haimi* és *S. irani*. E három csoport, valamint a *Synophrus* fajok filogenetikai kapcsolata azonban Ács és mtsi (2010) alapján sem egyértelmű, mivel a különböző génfák erre vonatkozólag nem teljesen kongruensek. Például a *S. connatus* helyzete is bizonytalan. A kérdés

megválaszolásához több független morfológiai és molekuláris információra lenne szükség. A nevezéktant érintő változtatások az eddig ismert összes *Saphonecrus* faj (Abe és mtsi, 2007) vizsgálatával együtt folyamatban vannak (Melika, személyes közlés).

A *Synophrus* génusz molekuláris filogenetikai eredményeink alapján két leszármazási vonalra osztható: (i) *S. hispanicus* - *hungaricus* – *olivieri*, valamint (ii) *S. pilulae* – *politus* – *libani* – *syriacus*. Molekuláris adatok alapján az első leszármazási vonalhoz sorolható az egyetlen algériai minta is (8. ábra), mely paratölgyről (*Quercus suber*) származik. Ebben a csoportban jól elkülönül Irán (*S. olivieri*), Közép-Európa (*S. hungaricus*) és Ibéria (*S. hispanicus*), illetve a *Synophrus hispanicus* és a *S. olivieri* ibériai és iráni fajpárnak tekinthető. A második leszármazási vonalban is felismerhető földrajzi mintázat a fajok elterjedését illetően. A *S. pilulae* Közép Európára jellemző, míg e faj testvércsoportját alkotó leszármazási vonalba iráni/szír, libanoni és török/közép-európai fajok tartoznak. A *S. syriacus* (Irán és Szíria) és *S. libani* (Libanon) monofiletikus egységet képez, amely magas támogatottsággal elkülönül a török/közép-európai *S. politus*-tól.

A *S. politus* COI és 28S D2 adatok alapján is két alcsoportra osztható, az egyik klád török, olasz és magyar mintákat is tartalmaz, a másikba tartozik a magyar minták többsége és azonos haplotípussal jellemezhető 8 olasz minta. Az alcsoportok elterjedésével összefüggő filogeográfiai mintázat részletes elemzése azonban további vizsgálatot igényel. A tagoltság okát kereshetjük például a földrajzi távolságban (isolation by distance), és/vagy a gazdák közötti különbségekben, beleértve a tölgyfajt és a gazda darazsat is (lásd alább). Eredményeink azt sugallják, hogy egyedül a növényi gazda különbséggel nem magyarázható a genetikai differenciáció, mivel Magyarországon csak a csertölgy áll rendelkezésre gazdaként, mégis jelen van mindkét alcsoport. E két alcsoport jelenléte hazánkban arra utal, hogy a Kárpát-medence *Synophrus politus* populációja mind egy feltételezett appennini, mind egy balkáni refúgiummal összefüggésbe hozható. Ehhez hasonló filogeográfiai mintázat jellemző például az *Andricus quercustozae* (Rokas és mtsi, 2003) és az *Andricus coriarius* (Challis és mtsi, 2007) gubacsképzőkre, de ezt kaptuk a *Synergus umbraculus*-ra is, ami arra utalhat, hogy a Pleisztocén jégkorszakok az egész tölgyhöz kötődő gubacsdarázs faunára hasonló hatással lehettek.

Gubacs alak és elhelyezkedés

Sokféle formájú és elhelyezkedésű gubacsból neveltünk ki *Synophrus* egyedeket (5. ábra). Annak ellenére, hogy sok a megválaszolatlan kérdés a *Synophrus* génusz gazdanövény kapcsolatait illetően, néhány dolog tisztázódni látszik. Bizonyos alakú gubacsok egyértelműen kapcsolhatóak egyes szekvencia alapon elkülöníthető leszármazási sorokhoz, amiből arra következtethetünk, hogy a gubacs morfológia az ide sorolható fajok kiterjesztett fenotípusának tekinthető (Stone és Cook, 1998), nem a gubacsdarázs gazda jellemzőjének. A gubacs morfológia ilyen mérvű módosítása a tölgygubacs inkvilinek körében egyedülálló.

Két alapvetően eltérő gubacsforma különíthető el a *Synophrus* génuszban. Az első típus a *S. hispanicus* – *hungaricus* – *olivieri* csoportra jellemző szabálytalan formájú duzzanat fiatal hajtásokon, ágakon. Ezen a csoporton belül a *S. olivieri* többkamrás gubacs közelebbi rokonságban van a *S. hungaricus* hajtás-gubacsával, mint a *S. hispanicus* egykamrás, gömbszerű gubacsával. A második gubacstípus a *S. pilulae* – *politus* – *syriacus* csoportra jellemző többnyire szabályosan gömbszerű rügygubacs. Nagyon ritkán *S. politus* egyedek a levélnyélen, vagy a levél főéren képződött gubacsokból is kinevelhetőek. Mivel a gubacs lokalizációját a gubacsot indukáló nőtény darázs peterakási preferenciája határozza meg, a *S. politus*-ra jellemző ilyenfajta diverzitás arra utalhat, hogy a *S. politus* több gubacsindukáló darázs fajt is támad.

Synergus umbraculus

Filogeográfia

A genetikai diverzitásbeli mintázatok hasonlósága a gubacs közösség tagjai között

A *Synergus umbraculus* fajra kapott eredményeink egy mitokondriális gén szekvencián alapulnak, amelyről feltételezzük, hogy a populációk kapcsolatait, jellemzőit tükrözi. A hagyományos filogeográfia logikáját követtük (Avise, 2000), azonban a következtetéseket óvatosan kell kezelni – ahogy számos egyéb,

mitokondriális szekvenciákon alapuló vizsgálat eredményét is (pl. Hayward és Stone, 2006; Ursenbacher és mtsi, 2006). Adatsorunk kifejezett genetikai struktúrára utal a Nyugat Pakearktikumra vonatkozólag, egyes régiók saját, a régióra specifikus leszármazási vonalakkal jellemezhetőek (Irán és Ibéria). A legnagyobb diverzitást a Kárpát-medencében találtuk, ami részben a mintázás sajátosságainak is köszönhető. A Kárpát-medence jelentős diverzitásának alapvető oka a különböző leszármazási sorok jelenléte. Közös haplotípusok jelenléte és a páronkénti Φ_{ST} értékek Olaszország és a Kárpát-medence szoros kapcsolatára utalnak. Ennek oka lehet recens diszperzió, vagy az ősi polimorfizmus jelenleg is zajló rendeződése. Kevésbé szoros kapcsolatot mutattunk ki a Kárpát-medence és Törökország között, ezzel szemben erősen elkülönül Ibéria Közép-Európától (Olaszország, Kárpát-medence). A H3 és H7 haplocsoportokba mindössze 3 nem ibériai minta sorolható, ezek Olaszországból és a Kárpát-medencéből kerültek elő. Mindezek a sajátos mintázatok párhuzamba állíthatóak a gubacs közösség más tagjainál tapasztaltakkal. Például az *Andricus* és *Biorhiza* gubacsindukálók (Rokas és mtsi, 2001, 2003; Stone és mtsi, 2001, 2007; Challis és mtsi, 2007), a *Cecidostiba* (Lohse és mtsi, 2010) és *Megastigmus* (Nicholls és mtsi, 2010a, b) parazitoid darazsak hasonló biogeográfiai és diverzitás mintázatot mutatnak. Ezen kívül a *S. umbraculus* az *Andricus quercustozae* és az *A. caputmedusae* gubacsdarazsakkal is mutat hasonlóságot az Anatóliai Diagonált érintő erős elkülönülés tekintetében (Rokas és mtsi, 2003, Mutun, 2010a, b), amely számos más fajra is ismert (Ekim és Guner, 1986; Kaya és Raynal, 2001). A *S. umbraculus* esetében a Kárpát-medencében a genetikai diverzitás homogenitását tapasztaltuk, ami az *Andricus quercuscalicis* gubacsindukáló darázsra is jellemző (Stone és Sunnucks, 1993).

Bizonyos sajátosságok tekintetében a *S. umbraculus* eltér a gubacsközösség más részletesen elemzett tagjaitól. Az eddig megvizsgált *Andricus* gubacsdarazsak és a *Megastigmus dorsalis* parazitoid esetén az iráni és török mintákra bazális divergencia és magas szekvencia diverzitás jellemző. Kalibrált molekuláris óra alapján valószínűsíthető, hogy a keleti, Irán-Törökország régió lehetett a Pleisztocén előtti és a jégkorszakok utáni populáció kiterjedések forrása, melyek révén Európa északibb területei újra benépesültek (Rokas és mtsi, 2003; Challis és mtsi, 2007; Stone és mtsi, 2007; Nicholls és mtsi, 2010b). Ez a hipotézis a gubacsdarazsak körében az “Out of Anatolia” hipotézisként ismert (“anatóliai eredet” hipotézise), ami az Irán-Törökország régiót jelöli meg a gubacsdarazs leszármazási vonalak diverzifikációs központjaként

(Stone és mtsi, 2009). *S. umbraculus* esetében ez a mintázat csak részben ismétlődik meg, mivel a bazális divergenciájú haplocsoportok – H6 (Olaszország és a Kárpát-medence), H5 (Kárpát-medence és Törökország), H4 (Kárpát-medence) – közép-európai és török mintákat foglalnak magukban, de a török mintákat is tartalmazó H5 csak későbbi divergencia következménye (10. ábra). A divergencia sorrendje szerint ezeket követik az ibériai/közép-európai (H3) és ibériai (H7) haplocsoportok, majd a H2, mely az első, amelybe (egyetlen) iráni minta is tartozik. Végül a H1 és H8 haplocsoportok különülnek el egymástól, utóbbiba sorolható az összes többi iráni minta.

A Kárpát-medence genetikai diverzitása

Eredményeink alapján elmondható, hogy a Kárpát-medence kiemelkedő fontosságú terület a genetikai diverzitás szempontjából. A Nyugat Palearktikumában kimutatott 8 haplocsoport közül 6 megtalálható itt, melyek között endemikusak és széles elterjedésűek is vannak. Csak az Ibériára jellemző H7 és az iráni H8 hiányzik innen. Ennek a kiemelkedő diverzitásnak különböző okai lehetnek. Egyrészt lehetséges, hogy számos más fajhoz hasonlóan a Kárpát-medence egy keveredési zóna (Hewitt, 1999; Comps és mtsi, 2001), melyet az utolsó jégkorszakot követően több refúgiumból is kolonizáltak populációk Olaszországból, a Balkánról illetve Törökországból. Másrészt az is elképzelhető, hogy e régió refúgiumnak is tekinthető a vizsgált fajra nézve, ahogy az más fajokkal kapcsolatban ismert (Deffontaine és mtsi, 2005; Ursenbacher és mtsi, 2006; Provan és Bennett, 2008). Fosszilis pollenelemzések arra utalnak, hogy lombhullató fák is túlélhették az utolsó glaciális maximumot a Kárpát-medencében, kedvező mikroklímájú, déli lejtőkön (Willis és mtsi, 2000; Willis és van Andel, 2004). A gubacsdarázs populációk az ilyen erdőkben vagy a közeli Balkánon túlélhettek, ahonnan igen gyorsan újra benépesíthették a területet a melegebb interglaciálisok ideje alatt. Ezt a feltevést látszik alátámasztani a Kárpát-medencére jellemző H1 haplocsoport jelenléte, illetve dominanciája e területen, ami arra utalhat, hogy a hazai H1 populáció forrása az általunk mintázott területekhez közel esik. Olaszországból, a Balkánról, Törökországból, Erdélyből és a Kárpát-medencétől keletre levő területek jóval részletesebb mintázása szükséges ahhoz, hogy megállapíthassuk, mik a kárpát-medencei diverzitás forrásai, és mi az endemikusnak tekinthető H1 haplocsoport elterjedési területének határa.

Számos közös haplotípus jelenléte és így az AMOVA analízis eredménye is azt támasztja alá, hogy Olaszország és a Kárpát-medence genetikailag nem különül el élesen egymástól, ellentétben a Közép-Európa – Ibéria elkülönüléstől. Ez arra utal, hogy az Alpokon való átjutás nem jelentett különösebb akadályt a gubacsdarazsak számára, vagy képesek voltak kikerülni az Alpok hegyláncait délkelet felől.

Az észak-európai Synergus umbraculus populáció eredete

Eredményeink arra utalnak, hogy Észak-Európa benépesítése Közép-Európa felől történhetett nyugati irányú kiterjedéssel, és nem Ibéria felől. A H2 és H6 haplocsoportok találhatóak meg Németország, Franciaország és az Egyesült Királyság területén, amelyek Ibériából hiányoznak, viszont főként Olaszországban és kisebb mértékben a Kárpát-medencében elterjedtek. Ez a mintázat hasonló más gubacsdarazsaknál tapasztaltakhoz (Stone és Sunnucks, 1993; Rokas és mtsi, 2001, 2003; Stone és mtsi, 2001, 2007).

Gazda specificitás

A gazda specifikus differenciáció a fajképződés egyik fontos tényezője lehet a növény-növényevő és a gazda-parazita rendszerekben (Abrahamson és mtsi, 2001; Baer és mtsi, 2004; Forbes és mtsi, 2009). Az inkvilin gubacsdarazsak képesek a gazdanövény szöveteit módosítani, hogy a táplálkozásukhoz szükséges körülményeket biztosítsák (Askew, 1961; Ronquist, 1994, Sanver és Hawkins, 2000). A gubacs különböző jellemzői hatással lehetnek az inkvilin darázs peterakási sikerére. Ilyenek lehetnek például a gubacs külső parenchimájának jellegzetességei (pl. ragacsos felszín), a lignifikáció mértéke, vagy a gubacs falvastagsága. Ezekről már ismert, hogy a parazitoidok peterakási sikerét befolyásolhatják (Bailey és mtsi, 2009). A gubacs ezen tulajdonságait a gubacsdarázs kontrollálja (kivétel a *Synophrus* génusz fajai), és gyakran fajspecifikusak, ami alapján nem zárható ki olyan inkvilin rasszok megjelenése, melyek hasonló típusú gubacsokat részesítenek előnyben. Eredményeink nem támasztják alá ilyen rasszok jelenlétét a Kárpát-medencében, azonban további mintázás szükséges ahhoz, hogy ezt az eredményt a vizsgált fajra általánosíthassuk. Az egyik lehetséges magyarázat a gazdaspecifikus differenciáció hiányára az lehet, hogy az inkvilin darázs a

gubacsot egy olyan korai fejlődési stádiumában keresi fel, amikor a gubacs felépítésének jellegzetességei és a felszíni struktúrák még nem kifejezettek, így a gazda fajok még nem térnek el ebben a tekintetben. Ezen kívül meghatározó lehet az is, hogy általában magas az évenkénti és fák közötti ingadozás a gubacsok számában és azok típusában (Crawley és Aktheruzzaman, 1988; Crawley és Long, 1995). Ennek ellenére számos gazdaspecifikus inkvilin ismert (pl. *Synergus consobrinus*, *S. dacianus*), ami azt feltételezi, hogy bizonyos inkvilin fajok különbséget tudnak tenni a gubacsdarázs gazdák, illetve gubacsaik között.

Közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- **Bihari P**, Sipos B, Melika G, Fehér B, Somogyi K, Stone GN, Péntes Zs. 2011. Western Palearctic phylogeography of an inquiline gallwasp, *Synergus umbraculus*. *Biological Journal of the Linnean Society* **102**:750-764 IF: 2.04.
- Péntes Zs, Melika G, Bozsóki Z, **Bihari P**, Mikó I, Tavakoli M, Pujade-Villar J, Fehér B, Fülöp D, Szabó K, Bozsó M, Sipos B, Somogyi K, Stone GN. 2009. Systematic re-appraisal of the gall-usurping wasp genus *Synophrus* Hartig, 1843 (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini). *Systematic Entomology* **34**: 688-711 IF: 2.467.

Egyéb közlemények

- Ács Z, Challis RJ, **Bihari P**, Blaxter M, Hayward A, Melika G, Csóka Gy, Péntes Zs, Pujade-Villar J, Nieves-Aldrey JL, Schönrogge K, Stone GN. 2010. Phylogeny and DNA barcoding of inquiline oak gallwasps (hymenoptera: Cynipidae) of the Western Palearctic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **55**: 210-225 IF: 3.556.
- Tavakoli M, Melika G, Sadeghi S, Péntes Z, Assareh M, Atkinson R, Bechtold M, Mikó I, Zargaran M, Aligolizade D, Barimani H, **Bihari P**, Fülöp D, Somogyi K, Challis R, Preuss S, Nicholls J, Stone GN. 2008. New Species of Oak Gallwaps from Iran (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini). *Zootaxa* **1699**: 1-64 IF: 0.740.
- Álmos PZ, Horváth S, Czibula Á, Raskó I, Sipos B, **Bihari P**, Béres J, Juhász A, Janka Z, Kálmán J. 2008. H1 tau haplotype-related genomic variation at 17q21.3

as an Asian heritage of the European Gypsy population. *Heredity* **101**: 416–419.
IF: 3.823.

- 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 GN. A Kárpát-medence tölgyön élő gubacsdarazsai. Könyvfejezet. A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása - A Kárpát-medence állattani értékei és faunájának kialakulása, 2007, Budapest.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt köszönöm témavezetőmnek, Dr. Pénzes Zsolt egyetemi docensnek a lehetőséget, hogy csoportjában dolgozhattam, valamint a teljes körű támogatást, türelmet és útmutatást, ami munkámhoz és e dolgozat létrejöttéhez nélkülözhetetlen volt.

Köszönettel tartozom az SZBK Genetika Intézetének doktori munkám támogatásáért. Hálás vagyok a Molekuláris Biodiverzitás csoport minden volt munkatársának, különös tekintettel Dr. Sipos Botondnak, Szabó Krisztiánnak, Dr. Somogyi Kálmánnak, Bozsóki Zoltánnak, Bozsó Miklósnak, Fehér Balázsnak és Fülöp Dávidnak a terep- és labormunkában nyújtott segítségükért és azért a baráti légkörért, amiben öröm volt dolgozni.

Köszönöm Melika Georgenak a határozásban nyújtott segítségét és Graham N. Stone-nak, hogy mintáikat rendelkezésemre bocsájtotta, és azt, hogy bizalmukba fogadtak. Mindketten lehetőséget biztosítottak számomra, hogy bepillantást nyerjek kiemelkedő szakmai tevékenységükbe, amiből sokat tanulhattam.

Köszönet illeti Dr. Márk Lászlót, aki következetes érdeklődésével számtalanszor emlékeztetett rá, hogy mi a feladatom. Ez nagyban hozzájárult ahhoz, hogy eljutottam idáig. Hálás vagyok közeli barátaimnak is, akik segítettek, hogy épp ésszel átvészeljem a mélypontokat, és mindvégig ösztönöztek.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családom kitartó támogatását, ami lehetővé tette egyetemi és posztgraduális tanulmányaimat, és azt, hogy mindvégig hagyták, hogy a saját fejem után menjek.

Irodalomjegyzék

- Abe Y, Melika G, Stone GN. 2007. The diversity and phylogeography of cynipid gall-wasps (Hymenoptera, Cynipidae) of the Oriental and Eastern Palearctic regions, and their associated communities. *Oriental Insects* 41: 169-212.
- Abrahamson WG, Eubanks MD, Blair CP, Whipple AV. 2001. Gall flies, inquilines and goldenrods: a model for host-race formation and sympatric speciation. *American Zoologist* 41: 928-938.
- Ács Z, Challis R, Bihari P, Péntes Z, Blaxter M, Hayward A, Melika G, Pujade-Villar J, Nieves-Aldrey JL, Schönrogge K, Graham NS. 2010. Phylogeny and DNA barcoding of inquiline oak gallwasps (Hymenoptera: Cynipidae) of the Western Palearctic. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 210-225.
- Ács Z, Melika G, Péntes Zs, Pujade-Villar J, Stone GN. 2007. The phylogenetic relationships between *Dryocosmus*, *Chilaspis* and allied genera of oak gall wasps (Hymenoptera, Cynipidae: Cynipini). *Systematic Entomology* 32(1): 70—80.
- Askew RR. 1961. On the biology of the inhabitants of oak galls of Cynipidae (Hymenoptera) in Britain. *Transactions of the Society for British Entomology* 14: 237-268.
- Askew RR. 1971. *Parasitic insects*. Heinemann Educational Books, London.
- Avice JC. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press
- Baer CF, Tripp DW, Bjorksten TA, Antolin MF. 2004. Molecular phylogeography of a parasitoid wasp (*Diaeretiella rapae*): no evidence of host-associated lineages. *Ecology* 13: 1859–1869.
- Bailey R, Schönrogge K, Cook JM, Melika G, Csóka G, Thúroczy C, Stone GN. 2009. Host niches and defensive extended phenotypes structure parasitoid wasp communities. *PLoS Biology* 7: e1000179.

- Berlocher SH, Feder JL. 2002. Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? *Annual Review of Entomology* 47: 773–815.
- Brower AVZ. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 6491–6495.
- Challis RJ, Mutun S, Nieves-Aldrey J-L, Preuss S, Rokas A, Aebi A, Sadeghi E, Tavakoli M, Stone GN. 2007. Longitudinal range expansion and cryptic eastern species in the western Palaearctic oak gall wasp *Andricus coriarius*. *Molecular Ecology* 16: 2103–2114.
- Clement M, Posada D, Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1660.
- Comps B, Gömöry D, Letouzey J, Thiébault B, Petit RJ. 2001. Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonisation in the European beech. *Genetics* 157: 389–397.
- Cook JM, Rokas A, Pagel M, Stone GN. 2002. Evolutionary shifts between host oak sections and host-plant organs in *Andricus* gallwasps. *Evolution* 56: 1821–1830.
- Crawley MJ, Long CR. 1995. Alternate bearing, predator satiation and seedling recruitment in *Quercus robur*. *Journal of Ecology* 83: 683–696.
- Crawley MJ, Aktheruzzaman M. 1988. Individual variation in the phenology of oak trees and its consequences for herbivorous insects. *Functional Ecology* 2: 409–415.
- Deffontaine V, Libois R, Kotlík P, Sommer R, Nieberding C, Paradis E, Searle JB, Michaux JR. 2005. Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology* 14: 1727–1739.
- Downie DA, Fisher JR, Granett J. 2001. Grapes, galls, and geography: the distribution of

- nuclear and mitochondrial DNA variation across host plant species and regions in a specialist herbivore. *Evolution* 55: 1345- 1362.
- Dreger-Jauffret F, Shorthouse JD. 1992. *Biology of Insect-Induced Galls*, Oxford: Oxford University Press.
- Dres M, Mallet J. 2002. Host races in plant-feeding insects and heir importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 357: 71-492.
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Duffet GH. 1968. Some new interrelationships of Hymenoptera over-wintering within the galls of *Andricus kollari* (Hartig). *Entomological Monthly Magazine* 105: 1259-1261.
- Ekim T, Guner A. 1986. The Anatolian Diagonal: fact or fiction? *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh Series B Biological Sciences* 89: 69-77.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Folmer O, Black MB, Hoch W, Lutz RA, Vrijenhock RC. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- Forbes AA, Powell THQ, Stelinski LL, Smith JJ, Feder JL. 2009. Sequential sympatric speciation across trophic levels. *Science* 323: 776-779.
- Fourment M, Gibbs MJ. 2006. PATRISTIC: a program for calculating patristic distances and graphically comparing the components of genetic change. *BMC Evolutionary Biology* 6: 1.
- Hancock JM, Tautz D, Dover GA. 1988. Evolution of the secondary structures and compensatory mutations of the ribosomal RNAs of *Drosophila melanogaster*.

- Molecular Biology and Evolution* 5: 393–414.
- Harry M, Solignac M, Lachaise D. 1998. Molecular evidence for parallel evolution of adaptive syndromes in fig-breeding *Lissocephala* (Drosophilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 542-551.
- Hartig T. 1840. Über die Familie der Gallwespen. *Zeitschrift für Entomologie (Germar)* 2: 176-209.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*: 52: 696–704.
- Hayward A, Stone GN. 2006. Comparative phylogeography across two trophic levels: the oak gall wasp *Andricus kollari* and its chalcid parasitoid *Megastigmus stigmatizans*. *Molecular Ecology* 15: 479-489.
- Hayward A, Stone GN. 2005. Oak gall wasp communities: Evolution and ecology. *Basic and Applied Ecology* 6: 435-443.
- Hewitt GM. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87–112.
- Huson DH, Bryant D. 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254-267.
- Kaya Z, Raynal DJ. 2001. Biodiversity and conservation of Turkish forests. *Biological Conservation* 97: 131-141.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

- Liljeblad J. 2002. *Phylogeny and Evolution of Gall Wasps (Hymenoptera: Cynipidae)*. Doctoral Dissertation, Department of Zoology, Univ. Stockholm, Stockholm.
- Lohse K, Sharanowski B, Stone GN. 2010. Quantifying the Pleistocene history of the oak gall parasitoid *Cecidostiba fungosa* using twenty intron loci. *Evolution* 64: 2664-2681.
- Manos PS, Doyle JJ, Nixon KC. 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 333-349
- Mayr G. 1872. Die Einmiethler der mitteleuropaischen Eichengallen. *Verhandlungen des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien* 22: 669-726.
- Melika G. 2006. *Gall Wasps of Ukraine, Cynipidae*. Kyiv: Vestnik zoologii.
- Mutun, S. 2010a. Intraspecific genetic variation and phylogeography of the oak gall wasp *Andricus caputmedusae* (Hymenoptera: Cynipidae): effects of the Anatolian Diagonal. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 56: 153-172.
- Mutun, S. 2010b. Intraspecific genetic diversity of the oak gall wasp *Andricus lucidus* (Hymenoptera: Cynipidae) populations in Anatolia. *Turkish Journal of Zoology* in press.
- Nicholls JA, Fuentes-Utrilla P, Hayward A, Melika G, Csóka G, Nieves-Aldrey J-L, Pujade-Villar J, Tavakoli M, Schönrogge K, Stone GN. 2010a. Community impacts of anthropogenic disturbance: natural enemies exploit multiple routes in pursuit of invading herbivore hosts. *BMC Evolutionary Biology* 10:322
- Nicholls JA, Preuss S, Hayward A, Melika G, Csóka G, Nieves-Aldrey J-L, Askew RR, Tavakoli M, Schönrogge K, Stone GN. 2010b. Concordant phylogeography and cryptic speciation in two Western Palaearctic oak gall parasitoid species complexes. *Molecular Ecology* 19: 592–609.
- Nylander JAA, Buffington ML, Liu Z, Nieves-Aldrey JL, Liljeblad J, Ronquist F. 2004a. Molecular Phylogeny and Evolution of Gall Wasps. Pp. 40 in Nylander, J.A. (ed). "Bayesian Phylogenetics and the Evolution of Gall Wasps", Ph. D. Thesis, Univ. Uppsala, Uppsala.

- Nylander JAA, Ronquist F, Huelsenbeck JP, Nieves-Aldrey JL. 2004b. Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology* 53: 47-67.
- Nylander JAA, 2004c. *MrModeltest* v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O'Hara B, Simpson GL, Solymos P, Stevens HH, Wagner H. 2009. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 1.15-2. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Pénzes Z, Melika G, Bozsóki Z, Bihari P, Mikó I, Tavakoli M, Villar J-P, Fehér B, Fülöp D, Szabó K, Bozsó M, Sipos B, Somogyi K, Stone GN. 2009. Systematic re-appraisal of the gall-usurping wasp genus *Synophrus* Hartig, 1843 (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini). *Systematic Entomology* 34: 688-711.
- Provan J, Bennett KD. 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 564-571.
- Pujade-Villar J. 1991. Contribució al coneixement dels cinípids cecidògens dels arbres i arbusts de Catalunya dels cinípids associats a aquests i dels seus paràsits. Doctoral Dissertation, University of Barcelona, Barcelona, Spain.
- Pujade-Villar J, Melika G, Ros-Farré P, Àcs 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.
- Rambaut A, Drummond AJ. 2007. *Tracer* v1.4. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rokas A, Atkinson RJ, Webster L, Stone GN. 2003. Out of Anatolia: longitudinal gradients in genetic diversity support a Turkish origin for a circum-Mediterranean gall wasp *Andricus quercustozae*. *Molecular Ecology* 12: 2153-2174.
- Rokas A, Atkinson R, Brown G, West SA, Stone GN. 2001. Understanding patterns of genetic diversity in the oak gall wasp *Biorhiza pallida*: demographic history or a

- Wolbachia* selective sweep? *Heredity* 87: 294-305.
- Ronquist F. 1994. Evolution of parasitism among closely related species: phylogenetic relationships and the origin of inquilinism in gall wasps (Hymenoptera, Cynipidae). *Evolution* 48: 241–266.
- Ronquist F, Liljeblad J. 2001. Evolution of the gall wasp – host plant association. *Evolution* 55: 2503-2522.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- R Development Core Team. 2009. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Sanver D, Hawkins BA. 2000. Galls as habitats: the inquiline communities of insect galls. *Basic and Applied Ecology* 1: 3–11.
- Schmitt T. 2007. Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* 4: 11.
- Schönrogge K, Stone GN, Crawley MJ. 1996a. Alien herbivores and native parasitoids: rapid development of guild structure in an invading gall wasp, *Andricus quercuscalicis* (Hymenoptera: Cynipidae). *Ecological Entomology* 21: 71–80.
- Schönrogge K, Stone GN, Crawley MJ. 1996b. Abundance patterns and species richness of the parasitoids and inquilines of the alien gall former *Andricus quercuscalicis* Burgsdorf (Hymenoptera: Cynipidae). *Oikos* 77: 507-518.
- Shorthouse JD. 1980. Modification of galls of *Diplolepis polita* by the inquiline *Periclistus pirata*. *Bulletin de la Societe Botanique de France Actualites Botaniques* 127: 79-84.
- Simmons MP, Ochoterena H. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* 49: 369-381.

- Staden R, Beal KF, Bonfield JK. 2000. The Staden package, 1998. *Methods in Molecular Biology* 132: 115-130.
- Stewart JR, Lister AM. 2001. Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 608-613.
- Stireman JO, Nason JD, Heard SB. 2005. Host associated genetic differentiation in phytophagous insects: general phenomenon or isolated exceptions? Evidence from a goldenrod insect community. *Evolution* 59(12): 2573-2587
- Stone GN, Atkinson RJ, Rokas A, Csóka G, Nieves-Aldrey J-L. 2001. Differential success in northwards range expansion between ecotypes of the marble gallwasp *Andricus kollari*: a tale of two lifecycles. *Molecular Ecology* 10: 761-778.
- Stone GN, Atkinson RJ, Rokas A, Nieves-Aldrey J-L, Melika G, Ács Z, Csóka G, Hayward A, Bailey R, Buckee C, McVean GAT. 2008. Evidence for widespread cryptic sexual generations in apparently purely asexual *Andricus* gallwasps. *Molecular Ecology* 17: 652-665.
- Stone GN, Challis RJ, Atkinson RJ, 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 gall wasp *Andricus kollari*. *Molecular Ecology* 16: 2768-2781.
- Stone GN, Cook JM. 1998. The structure of cynipid oak galls: patterns in the evolution of an extended phenotype. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265: 979-988.
- Stone GN, Hernandez-Lopez A, Nicholls JA, di Pierro E, Pujade-Villar J, Melika G, Cook JM. 2009. Extreme host plant conservatism during at least 20 million years of host plant pursuit by oak gall wasps. *Evolution* 63: 854-869.
- Stone GN, Schönrogge K. 2003. The adaptive significance of insect gall morphology. *Trends in Ecology Evolution* 18: 512-522.
- Stone GN, Schönrogge K, Atkinson RJ, Bellido D, Pujade-Villar J. 2002. The population biology of oak gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae). *Annual Reviews of Entomology*

47: 633–668.

Stone G, Sunnucks PJ. 1993. The population genetics of an invasion through a patchy environment: the cynipid gallwasp *Andricus quercuscalicis*. *Molecular Ecology* 2: 251–268.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596–1599.

Thomas CD, Cameron A, Green RE, Bakkenes M, Beaumont LJ, Collingham YC, Erasmus BFN, Ferreira de Siqueira M, Grainger A, Hannah L, Hughes L, Huntley B, van Jaarsveld AS, Midgley GF, Miles L, Ortega-Huerta MA, Townsend Peterson A, Philips OL, Williams SE. 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427: 145–148.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. Clustal-W - Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.

Ursenbacher S, Carlsson M, Helfer V, Tegelström H, Fumagalli L. 2006. Phylogeography and Pleistocene refugia of the adder (*Vipera berus*) as inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology* 15: 3425–3437.

Van Noort S, Stone GN, Whitehead VB, Nieves-Aldrey JL. 2007. Biology of *Rhoophilus loewi* (Hymenoptera: Cynipoidea: Cynipidae), with implications for the evolution of inquilinism in gall wasps. *Biological Journal of the Linnean Society* 90: 153–172.

Varga Z. 2008. Mountain coniferous forests, refugia and butterflies. *Molecular Ecology* 17: 2101–2106.

Weir BS. 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*, Sunderland: Sinauer Assoc. Inc.

Willis KJ, Rudner E, Sümegi P. 2000. The full-glacial forests of Central and Southern

Europe. *Quaternary Research* 53: 203-213.

Willis KJ, van Andel TH. 2004. Trees or no trees? The environments of Central and Eastern Europe during the Last Glaciation. *Quaternary Science Reviews* 23: 2369-2387.

Összefoglaló

Az ízeltlábúak között többször is kialakult a gubacsindukálás képessége az evolúció során. A gubacsképzők közül az egyik legnagyobb és egyben a legváltozatosabb csoport a gubacsdarazsak (Hymenoptera: Cynipidae) családja. A Cynipidae magába foglal egy tribuszt, melynek tagjai az evolúció során elvesztették gubacsindukáló képességüket (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini), lárvájuk más gubacsképző fajok mellett társbérlőként (inkvilin) fejlődik. Ezen fajok képesek a növényi szövetek differenciációjának módosításával saját lárvakamrát kialakítani a gubacsban, és sajátos táplálószövet differenciációt indukálni.

A tölgygubacsok egy jellegzetes, viszonylag zárt életközösséget rejtenek, melyben a gubacsképző lárváján kívül társbérlők, parazitoidok és hiperparazitoidok is élhetnek. Ezek közül a legkevésbé kutatott és ismert trofikus szint a társbérlők szintje. Ennek egyik oka az lehet, hogy a Synergini fajok határozása nehéz feladat, nagy tapasztaltot igényel. A Synergini tribusz hozzávetőleg 176 fajt számlál, melyből 48 a Nyugat Palearktikumban is megtalálható. Számos filogenetikai és taxonómiai kérdés tisztázatlan a társbérlőkkel kapcsolatban, melyek megválaszolásához molekuláris filogenetikai elemzésre is szükség lehet a morfológiai alapú vizsgálatok mellett. Gubacsdarazsak esetén gyakran használt molekuláris markerek a magi 28S D2 lokusz, valamint a mitokondriális citokróm oxidáz I alegység (COI) és a citokróm b (cytb) lokuszok. A 28S D2 génusz szinten, utóbbi két mitokondriális marker fajon belül mutat megfelelő változatosságot.

Az általunk tanulmányozott egyik társbérlő csoport a *Synophrus* génusz (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini), mely több szempontból is kiemelésre érdemes. A *Synophrus* nőtény korai fejlődési stádiumú gubacsba petézik, majd gyorsan átveszi a szabályozást, kiszorítva a gubacsdarazs gazdát, amely többnyire ismeretlen. A *Synophrus* fajok az inkvilin darazsak között egyedülálló módon fajspecifikus gubaccsal jellemezhetőek, melynek mérete, morfológiája és lokalizációja azonban jelentős változatosságot mutat. Vizsgáltunk fő célja a génuszon belüli filogenetikai kapcsolatok tisztázása volt 28S D2 és COI markerek használatával.

Vizsgálatunkat megelőzően a Nyugat Palearktikumban 3 *Synophrus* faj volt

ismert: a *S. pilulae* Houard, 1911, a *S. politus* Hartig, 1843, és a *S. olivieri* Kieffer, 1898. Molekuláris filogenetikai eredményeink és a diagnosztikus morfológiai karakterek ezt követő újraértékelése alapján további négy, tudományra új fajt írtak le: *Synophrus hungaricus* Melika és Mikó, 2009, *S. libani* Melika és Pujade-Villar, 2009, *S. syriacus* Melika, 2009 és *S. hispanicus* Pujade-Villar, 2009.

Az általunk rekonstruált molekuláris filogenetika alapján az összes nyugat palearktikus *Synophrus* faj egy monofiletikus egységet alkot. A vizsgálatunkba bevont *Saphonecrus* fajok ezzel szemben nem monofiletikusak. A *Synophrus* génusz testvércsoportját a *Saphonecrus lusitanicus* és *Sa. barbotini* fajpár alkotja, míg a *Sa. haimi* és *Sa. undulatus* fajpár, valamint a *Sa. connatus* fajok egy ettől elkülönült leszármazási vonalat képeznek. A *Sa. connatus* filogenetikai helyzete bizonytalan.

A *Synophrus* génusz fajai két leszármazási vonalra oszthatóak: a (i) *S. hispanicus* – *hungaricus* – *olivieri*, valamint a (ii) *S. pilulae* – *politus* – *libani* – *syriacus* csoportokra. Az első csoportba egy spanyol (*S. hispanicus*) egy közép-európai (*S. hungaricus*) és egy iráni/török (*S. olivieri*) faj tartozik, újabb példát szolgáltatva egy iráni-spanyol fajpárra. A második leszármazási vonalban is megfigyelhető ehhez hasonló földrajzi elkülönülés, amennyiben a *S. syriacus* (Irán és Szíria) és a *S. libani* (Libanon) fajok egy monofiletikus egységet alkotnak, melynek testvércsoportját a szélesebb elterjedésű (Magyarország, Olaszország, Törökország) *S. politus* faj alkotja. A *S. pilulae* képezi a *S. politus*, *S. syriacus* és *S. libani* fajok testvércsoportját, elterjedési területe Közép-Európa.

A *Synophrus* génusz fentebb említett két leszármazási vonala gubacsmorfológia alapján is elkülönülni látszik. Az első csoportra (*S. hispanicus* – *hungaricus* – *olivieri*) fiatal hajtásokon megjelenő szabálytalan formájú duzzanat jellemző. A *S. olivieri* gubacsa többkamrás. A második csoportra (*S. pilulae* – *politus* – *libani* – *syriacus*) többnyire szabályosan gömbszerű rügygubacs jellemző. A *S. politus* gubacsok lokalizációja változatos. Mivel a gubacs lokalizációt a gubacsindukáló faj nőtényének peterakási preferenciája határozza meg, ezt a változatosságot kétféleképpen magyarázhatjuk: (i) a gubacsdarázs gazda többféle növényi szervén képez gubacsot, vagy (ii) a *S. politus* több gazdafajt is támad, melyek különböző növényi szervekhez köthetőek.

Vizsgálataink másik célpontja a *Synergus umbraculus* Olivier, 1791 társbérő faj

volt, mely a Synergini tribusz legnépesebb és taxonómiai szempontból leginkább problémás génuszának tagja. E faj az egyik legelterjedtebb tölgygubacs inkvilin a Nyugat Palearktikumban, széles gazdaspecifitását, főleg *Andricus* (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini) fajok aszexuális gubacsaiban fejlődik. Már korábban is sejthető volt, hogy a *S. umbraculus* kriptikus fajok komplexe, ezt a sejtést egy, a Synergini molekuláris alapú filogenetikai rekonstrukcióját célzó vizsgálat nemrég megerősítette. E tanulmány alapján a morfológiailag *S. umbraculus*-ként meghatározott egyedek 4 különálló MOTU-ba sorolhatók, melyek közül a minták java részét tartalmazó monofiletikus csoportot tekintjük a *S. umbraculus* fajnak, és ez képezte vizsgálatunk tárgyát. Ismert, hogy a Kárpát-medence gubacsdarázs faunája kiemelkedően gazdag, emellett molekuláris alapú vizsgálatok is kimutatták néhány gubacsindukáló Cynipini faj magas fajsztű diverzitását. Célunk elsősorban a kárpát-medencei populáció genetikai diverzitásának elemzése volt, figyelembe véve a kolonizációs történet és a gubacsképző gazdák szerinti differenciáció hatását is. Emellett célunk volt egy Nyugat Palearktikum léptékű filogeográfiai elemzés elvégzése az összes feltételezett refúgiális terület bevonásával.

239 cytb szekvencia alapján 8 haplocsoportot tudtunk elkülöníteni (H1-H8), melyek közül 6 megtalálható hazánkban is. A COI marker ezt a csoportosítást megerősítette, míg a 28S D2 marker nem biztosított megfelelő felbontást. A Kárpát-medence kiemelkedő genetikai diverzitását mutattuk ki, melynek egyik oka a mintázás sajátágaiban keresendő. A kiemelkedő diverzitás fő oka azonban a különböző leszármazási sorok jelenléte. A haplocsoportok földrajzi elterjedése és más régiókkal közös haplotípusok jelenléte alapján feltételezzük, hogy hazánk keveredési zónának tekinthető, melyet több alkalommal és több refúgium felől is kolonizáltak populációk. Emellett hazánkra egy endemikus haplocsoport dominanciája is jellemző. Erős kapcsolatot mutattunk ki Olaszország és Magyarország között, valamint kisebb mértékben hazánk és Törökország között is.

Annak ellenére, hogy a kárpát-medencei populáció genetikai diverzitása kiemelkedő, AMOVA eredményeink alapján ez a diverzitás csak csekély mértékben struktúrált térben. Ehhez hasonló mintázatot az *Andricus quercustozae* és az *A. quercuscalicis* gubacsindukáló darazsak esetén is sikerült már kimutatni.

A tölgygubacs gazda szerinti differenciációt a több évig tartó és részletes

mintázás ellenére csak egy területen (Mátra régió), a négy leggyakoribb gubacsdarázs gazda (*Andricus lucidus*, *A. lignicolus*, *A. infectorius*, *A. kollari*) figyelembe vételével tudtuk vizsgálni. Gazda rasszok jelenlétét nem sikerült kimutatnunk AMOVA alapján, azonban ennek az eredménynek az általánosításához kiterjedtebb mintázásra lenne szükség.

A Nyugat Palearktikum filogeográfiai elemzése kifejezett genetikai struktúra jelenlétére utal, noha ezt megfelelő óvatossággal kell kezelnünk, mivel vizsgálatunk mindössze egyetlen, mitokondriális markeren alapul. Az Anatóliai Diagonál és a Pireneusok hatása a Törökország – Irán illetve az Ibéria – Közép-Európa elkülönülés alapján jól kivehető, az iráni és az ibériai populáció saját, diagnosztikus leszármazási vonalakkal jellemezhető (H8, illetve H7 és H3 haplocsoportok). Ezzel szemben az Alpok vélhetőleg nem képez jelentős barriert, mivel az olasz és a magyar populációk szoros kapcsolatát sikerült kimutatnunk. Eredményeink továbbá arra utalnak, hogy Németország, Franciaország és a Brit szigetek posztglaciális benépesítése Közép-Európa felől történhetett. Ezekről a területekről az ibériai régióra jellemző haplotípusok teljesen hiányoznak. Mindezek a filogeográfiai sajátosságok hasonlítanak a gubacsközösség más tagjaira jellemző mintázatokhoz, azonban vizsgálatunk az első, amely egy inkvilin gubacsdarázs genetikai diverzitását elemzi.

Summary

Gall induction has evolved many times among arthropods. Gall wasps (Hymenoptera: Cynipidae) comprise one of the most species-rich and diverse groups of gallers and are special in many ways. All cynipid gall wasps are phytophagous, although they belong to the superfamily Cynipoidea which are mainly endoparasitic insects. Within the Cynipidae, a group of species (comprising the inquiline tribe Synergini) has lost the ability to induce galls, but are obligate inhabitants of galls induced by other species. These herbivorous inquilines are also able to modify the differentiation of plant tissues of galls to form larval chambers within which the larvae feed on highly specialized nutritive plant tissues.

Cynipid galls represent a habitat and food resource for a relatively closed community of arthropods, in which parasitoid, hyperparasitoid and inquiline species may also be found beside the gall inducers. The least known and studied trophic level of the oak gall community is the inquilines. One of the underlying causes may be that the taxonomic identification of Synergini species is difficult and requires a lot of experience. The tribe Synergini includes about 176 species of which 48 is present in the Western Palearctic. A number of important taxonomic and phylogenetic issues remain unresolved for cynipid inquilines, and in order to address them, molecular phylogenetic analyses may be needed besides the morphological re-appraisal of diagnostic species-level characters. Previous works on gall wasps have shown that a fragment of the nuclear 28S D2 expansion segment is applicable for species level differentiation, while the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) and cytochrome b (cytb) genes are useful for within species studies.

One of the inquiline groups we have studied in detail is the genus *Synophrus* (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini), which is notable in many respects. *Synophrus* species attack host galls at a very early stage of gall development, grow faster than the host larva, which is finally eliminated because of food deprivation and is therefore unknown. *Synophrus* larvae 'hijack' gall development and cause species-specific gall morphology, which is unusual among inquilines. However, there is significant diversity in the morphology, size and location of *Synophrus* galls. Our main goal was to assess

phylogenetic relationships within the genus using nuclear (28S D2) and mitochondrial (COI) sequence information.

Previously, three Western Palearctic *Synophrus* species were recognized: *S. pilulae* Houard, 1911, *S. politus* Hartig, 1843, and *S. olivieri* Kieffer, 1898. Based on our molecular phylogenetic results and subsequent re-appraisal of diagnostic morphological characters four additional new species have been established: *Synophrus hungaricus*, Melika and Mikó, *S. libani*, Melika and Pujade-Villar, *S. syriacus*, Melika and *S. hispanicus*, Pujade-Villar.

Our dataset support the monophyly of all Western Palearctic *Synophrus* species but reject monophyly of the studied *Saphonecrus* species. The genus *Synophrus* and *Saphonecrus barbotini* together with *Sa. lusitanicus* are sister groups, while *Sa. connatus* and the *Sa. haimi* – *Sa. undulatus* species pair form a separate lineage. The affiliation of *Sa. connatus* remains unresolved.

Two lineages come out as strongly supported within *Synophrus*, one comprising *S. hispanicus* – *hungaricus* – *olivieri* and the other comprising *S. pilulae* – *politus* – *libani* – *syriacus*. In the first lineage each species represents a distinct geographic region and they form species pairs. For example *S. hispanicus* (Spain) and *S. olivieri* (Iran, Turkey) can be regarded as an Iberian-Iranian/Turkish species pair. In the second lineage, *S. syriacus* (Iran, Syria) and *S. libani* (Lebanon) form a monophyletic group, which is the sister group of the more widely dispersed *S. politus* (Hungary, Italy, Turkey). *S. pilulae* (Hungary, Austria) forms the sister group of these three species of the second lineage.

The two lineages mentioned above can be differentiated on the basis of gall morphology as well. Species of the first lineage (*S. hispanicus* – *hungaricus* – *olivieri*) emerge from irregular swellings in twigs. *S. olivieri* has multilocular galls. Species of the second lineage (*S. pilulae* – *politus* – *libani* – *syriacus*) emerge from more regularly spherical bud galls. The location of *S. politus* galls shows considerable variation. Because gall location is determined by the oviposition preference of the females of the host gall wasp species, this variation suggests either that host gall wasp species show occasional variation in preferred gall induction sites, or that *S. politus* attacks different host gall wasp species, inducing galls in different locations.

The other object of our study was the inquiline species *Synergus umbraculus* Olivier, 1791, which belongs to the largest and most problematic genus of the Synergini, the genus *Synergus*. This species is widely distributed in the Western Palearctic and has a wide range of cynipid hosts, but most frequently develops in the asexual galls of *Andricus* species (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini). Previously it was hypothesized that *S. umbraculus* is a complex of cryptic species. This was confirmed in a recent study focusing on the sequence-based phylogenetic reconstruction of the tribe Synergini. In this recent study it was demonstrated that, as currently recognized on the basis of morphology, *S. umbraculus* comprises four distinct molecular taxa (MOTUs). In the present study, we examine a single monophyletic lineage that includes > 90% of the sequenced individuals, and refer to it as *S. umbraculus*. It is known that the gall wasp fauna of the Carpathian Basin is rich, and sequence-based studies reported high within- species genetic diversity in a number of gall-inducing cynipid species. Our main goal was to analyze the genetic diversity of the *S. umbraculus* population of the Carpathian Basin, considering the effects of Quaternary glaciations and possible cynipid host-associated differentiation (HAD). Besides, we wanted to examine phylogeographic patterns across the Western Palearctic in an analysis incorporating samples from all putative southern glacial refugia.

Based on 239 cytb sequences 8 haplotype groups can be defined (haplogroups, H1-H8), of which 6 are present in the Carpathian Basin. COI sequences supported the same subdivision, while 28S D2 sequences showed low variability. Perhaps reflecting our sampling effort, we found the highest genetic diversity in the Carpathian Basin, but the main cause of the significant genetic diversity is the presence of different haplogroups. Based on the spatial distribution of haplogroups and the presence of shared haplotypes with other regions we assume that the Carpathian Basin is an admixture zone, which was repeatedly colonized from different sources in the past and present interglacials. We also found an endemic haplogroup in Hungary. Shared haplotypes and pairwise Φ_{ST} values support strong genetic affinity between Italy and the Carpathian Basin and, to a lesser extent, between the Carpathian Basin and Turkey.

Although the genetic diversity is high in the Carpathian Basin, AMOVA showed low population substructure. This pattern parallels those seen in the cynipid gall inducers *Andricus quercustozae* and *A. quercuscalicis*.

Despite targeted sampling, we were unable to rear balanced samples from the same set of hosts in replicate sites, excluding joint analysis of host association and spatial structure. We therefore tested for HAD using samples from the Mátra region ($N = 55$) of the Carpathian Basin only, considering the four most common cynipid hosts (*Andricus lucidus*, *A. lignicolus*, *A. infectorius*, *A. kollari*). AMOVA showed no sign of HAD but further sampling is required to test the generality of this result.

Our data suggest considerable genetic structure across the Western Palearctic, although it is important to emphasize that the present study is based on a single mitochondrial locus and therefore, the inferences of the associated species tree must be made with caution. Regionally diagnostic lineages in each of Iberia (H7 and H3) and Iran (H8), and pairwise Φ_{ST} values indicate strong divisions between Iberia and Central Europe, and between Iran and Turkey, which may be related with the mountain ranges of the Pyrenees and the Anatolian Diagonal. In contrast, we found strong genetic affinity between Italy and the Carpathian Basin, which suggests that the Alps do not prevent gall wasp dispersal. Our data support the colonization of Germany, France and the United Kingdom by westward expansion from Central Europe and not from Iberia, since haplogroups associated with Iberia (H3, H7) are not present in these northern postglacial populations. These patterns in many ways parallel those seen in other components of the oak gall wasp community, including gall inducers and their parasitoids.

Függelék

1. függelék A *Synergus umbraculus* mintákra vonatkozó adatok táblázata. A “Régió” oszlopban mind a Nyugat Palearktikum, mind a Kárpát-medence régióit jelöltük. A régiókód nélküli mintákat kihagytuk a térbeli struktúrára vonatkozó vizsgálatokból. A tölgy, illetve gubacsdarázs gazdát nem minden esetben sikerült pontosan meghatározni, ezeket a megfelelő oszlopban kérdőjellel jelöltük, és az ilyen mintákat kihagytuk a gazdaspecificitást célzó vizsgálatokból. A lelőhelyet jelölő hosszúsági és szélességi adatokat tizedes fok (DD, decimal degrees) formájában adtuk meg.

Templát	Haplotípus	Haplocsoport	Tölgy faj (Quercus)	Gubacs (Andricus)	Regió	Gyűjtési hely	Szélesség	Hosszúság	GenBank Accession number
537	HT01	H1	petraea	lignicolus	CB	Kőszeg	47.38	16.55	GU386377
535	HT01	H1	pubescens	lignicolus	CB	Zemplén	48.36	21.37	GU386377
539	HT01	H1	pubescens	lignicolus	CB, Aggtelek	Aggtelek	48.47	20.5	GU386377
522	HT01	H1	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386377
523	HT01	H1	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386377
524	HT01	H1	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386377
556	HT01	H1	pubescens	lucidus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386377
558	HT01	H1	pubescens	lucidus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386377
560	HT01	H1	pubescens	lucidus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386377
530	HT01	H1	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Szőlősdárdó	48.44	20.63	GU386377
533	HT01	H1		lignicolus	CB, Aggtelek	Szőlősdárdó	48.44	20.63	GU386377
550	HT01	H1		lignicolus	CB, Aggtelek	Szőlősdárdó	48.44	20.63	GU386377
553	HT01	H1		lignicolus	CB, Aggtelek	Szőlősdárdó	48.44	20.63	GU386377
554	HT01	H1		lignicolus	CB, Aggtelek	Szőlősdárdó	48.44	20.63	GU386377
566	HT01	H1	petraea	lucidus	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386377
567	HT01	H1	petraea	infectorius	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386377
367	HT01	H1	robur	kollari	CB, Gödöllő	Gödöllő	47.6	19.35	GU386377
10045	HT01	H1	robur	lignicolus	CB, Gödöllő	Gödöllő	47.6	19.35	GU386377
22296	HT01	H1	robur	infectorius	CB, Gödöllő	Gödöllő	47.6	19.35	GU386377
527	HT01	H1	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátra, Sár-hegy	47.8	19.97	GU386377
528	HT01	H1	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátra, Sár-hegy	47.8	19.97	GU386377
529	HT01	H1	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátra, Sár-hegy	47.8	19.97	GU386377
500	HT01	H1	petraea	glutinosus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386377
501	HT01	H1	petraea	?infectorius	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386377
503	HT01	H1	petraea	?infectorius	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386377
511	HT01	H1	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386377
514	HT01	H1	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386377
722	HT01	H1	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386377
726	HT01	H1	petraea	kollari	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386377
344	HT01	H1	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386377
346	HT01	H1	pubescens	kollari	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386377
347	HT01	H1	pubescens	kollari	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386377
385	HT01	H1	petraea	infectorius	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386377
459	HT01	H1	petraea	glutinosus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386377
467	HT01	H1	petraea	kollari	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386377

582	HT01	H1	petraea	glutinosus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386377
589	HT01	H1	petraea	kollari	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386377
591	HT01	H1	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386377
719	HT01	H1	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386377
721	HT01	H1	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386377
406	HT01	H1	pubescens	lucidus	CB, Mátra	Szentkút	47.49	17.49	GU386377
542	HT01	H1	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Orfű	46.14	18.15	GU386377
475	HT01	H1	robur	?infectorius	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386377
477	HT01	H1	robur	?infectorius	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386377
486	HT01	H1	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386377
487	HT01	H1	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386377
492	HT01	H1	pubescens	lucidus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386377
494	HT01	H1	robur	lucidus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386377
580	HT01	H1	pubescens	polycerus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386377
453	HT02	H1		lignicolus	CB	Debrecen	47.58	21.63	GU386378
575	HT02	H1	pubescens	quercustozae	CB	Fertőrákos	47.72	16.65	GU386378
536	HT02	H1	pubescens	lignicolus	CB	Zemplén	48.36	21.37	GU386378
520	HT02	H1	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386378
521	HT02	H1	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386378
545	HT02	H1	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386378
549	HT02	H1	pubescens	lignicolus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386378
555	HT02	H1	petraea	lucidus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386378
515	HT02	H1	petraea	lignicolus	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386378
564	HT02	H1	petraea	lucidus	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386378
568	HT02	H1	petraea	infectorius	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386378
525	HT02	H1	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátra, Sár-hegy	47.8	19.97	GU386378
723	HT02	H1	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátra, Sár-hegy	47.8	19.97	GU386378
466	HT02	H1	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386378
502	HT02	H1	petraea	?infectorius	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386378
720	HT02	H1	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386378
461	HT02	H1	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386378
463	HT02	H1	petraea	infectorius	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386378
468	HT02	H1	petraea	glutinosus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386378
469	HT02	H1	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386378
583	HT02	H1	petraea	infectorius	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386378
585	HT02	H1	petraea	infectorius	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386378
592	HT02	H1	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386378

594	HT02	H1	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386378
540	HT02	H1	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Orfú	46.14	18.15	GU386378
410	HT02	H1	?pubescens	dentimitratus	CB, Mecsek	Pécs	46.07	18.23	GU386378
482	HT02	H1	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386378
488	HT02	H1	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386378
489	HT02	H1	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386378
490	HT02	H1	pubescens	lucidus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386378
493	HT02	H1	robur	lucidus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386378
638	HT02	H1		quercustozae	IT	ITALY, Moiola	44.32	7.39	GU386378
714	HT02	H1		quercustozae	IT	ITALY, Moiola	44.32	7.39	GU386378
716	HT03	H5	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386379
516	HT03	H5	petraea	lignicolus	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386379
563	HT03	H5	petraea	lucidus	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386379
507	HT03	H5	petraea	kollari	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386379
512	HT03	H5	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386379
330	HT03	H5	pubescens	kollari	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386379
334	HT03	H5	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386379
345	HT03	H5	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386379
357	HT03	H5	pubescens	kollari	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386379
359	HT03	H5	robur	lucidus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386379
584	HT03	H5	petraea	infectorius	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386379
593	HT03	H5	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386379
725	HT03	H5	petraea	kollari	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386379
483	HT03	H5	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386379
484	HT03	H5	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386379
671	HT03	H5		panteli	TL	TURKEY, Beybesli	41.05	35.88	GU386379
675	HT03	H5		infectorius	TL	TURKEY, Beybesli	41.05	35.88	GU386379
711	HT03	H5		quercustozae	TL	TURKEY, Elev, Sivas-karacayir area	39.91	37.01	GU386379
656	HT03	H5		lucidus	TL	TURKEY, Niksar	40.59	36.95	GU386379
672	HT03	H5		infectorius	TL	TURKEY, Niksar	40.59	36.95	GU386379
665	HT03	H5		lucidus	TL	TURKEY, Suluova	40.82	35.63	GU386379
613	HT03	H5		coriarius	TL	TURKEY, Tokat	40.31	36.54	GU386379
698	HT04	H6		quercuscalicis	CB	CZECH REPUBLIC, Ceske Budejovice	48.97	14.47	GU386380
699	HT04	H6		quercuscalicis	CB	CZECH REPUBLIC, Ceske Budejovice	48.97	14.47	GU386380
415	HT04	H6	?robur	kollari	CB	Gyula	46.64	21.27	GU386380

455	HT04	H6		hungaricus	CB	Gyula	46.64	21.27	GU386380
447	HT04	H6		quercuscalicis	CB, Aggtelek	Aggtelek	48.47	20.5	GU386380
717	HT04	H6	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386380
576	HT04	H6		quercustozae	CB, Aggtelek	Szőlősdó	48.44	20.63	GU386380
577	HT04	H6		quercustozae	CB, Aggtelek	Szőlősdó	48.44	20.63	GU386380
572	HT04	H6	petraea	lignicolus	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386380
400	HT04	H6	robur	quercuscalicis	CB, Gödöllő	Gödöllő	47.6	19.35	GU386380
505	HT04	H6	petraea	kollari	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386380
506	HT04	H6	petraea	kollari	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386380
462	HT04	H6	petraea	kollari	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386380
662	HT04	H6	robur	quercuscalicis	IT	CROATIA, Karlovac	45.5	15.57	GU386380
647	HT04	H6		dentimitratus	IT	ITALY, Capalbio Campo Cane	42.51	11.57	GU386380
681	HT04	H6		dentimitratus	IT	ITALY, Gargano	41.76	15.83	GU386380
637	HT04	H6		quercustozae	IT	ITALY, Massa Maritima	43.05	10.9	GU386380
642	HT04	H6		kollari		France, Coutances	49.05	-1.45	GU386380
644	HT04	H6		kollari		France, Foret de Berce	47.78	0.38	GU386380
702	HT04	H6		quercuscalicis		France, Nogent-sur-Vernisson, arboretum	47.83	2.7	GU386380
713	HT04	H6		quercuscalicis		France, Nogent-sur-Vernisson, arboretum	47.83	2.7	GU386380
456	HT05	H2	?robur	infectorius	CB, Mecsek	Orfű	46.14	18.15	GU386381
478	HT05	H2	robur	?infectorius	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386381
650	HT05	H2		caputmedusae	IT	ITALY, Assergii	42.42	13.5	GU386381
674	HT05	H2		dentimitratus	IT	ITALY, Castagnola	44.41	9.99	GU386381
653	HT05	H2		panteli	IT	ITALY, Felitto (Cilento)	40.37	15.24	GU386381
636	HT05	H2	pubescens	quercustozae	IT	ITALY, Molio,	40.09	15.77	GU386381
648	HT05	H2		lucidus	IT	ITALY, Monte St Angelo	41.71	16	GU386381
679	HT05	H2		panteli	IT	ITALY, Monte St Angelo	41.71	16	GU386381
678	HT05	H2		caputmedusae	IT	ITALY, Piedmont	45.05	7.51	GU386381
437	HT05	H2		grossulariae	UK	UK, Ascott-under-wychwood	51.86	-1.57	GU386381
700	HT05	H2		quercuscalicis	UK	UK, Farnham Park	51.55	-0.61	GU386381
704	HT05	H2		grossulariae	UK	UK, Farnham Park	51.55	-0.61	GU386381
701	HT05	H2		quercuscalicis	UK	UK, Maidenhead Thicket	51.52	-0.77	GU386381
703	HT05	H2		grossulariae	UK	UK, Maidenhead Thicket	51.52	-0.77	GU386381
706	HT05	H2		grossulariae	UK	UK, Maidenhead Thicket	51.52	-0.77	GU386381
705	HT05	H2		quercuscalicis	UK	UK, Pinkneys Green	51.53	-0.76	GU386381
658	HT05	H2		coriarius		Greece, Florina	40.78	21.4	GU386381
614	HT05	H2		quercustozae		Greece, Pisoderi	40.79	21.28	GU386381

664	HT05	H2		coronatus		Greece, Pisoderi	40.79	21.28	GU386381
610	HT06	H8		insana	IR	IRAN, Golestan	37.12	55	GU386382
634	HT06	H8		quercustozae	IR	IRAN, Kermanshah, Gahvareh	34.34	46.42	GU386382
709	HT06	H8		quercustozae	IR	IRAN, Kermanshah, Gahvareh, Sar-pol-zahab	34.46	45.48	GU386382
616	HT06	H8		quercustozae	IR	IRAN, Lorestan	33.86	48.21	GU386382
607	HT06	H8		askewi	IR	IRAN, Piran Shahr	36.73	45.19	GU386382
609	HT06	H8		askewi	IR	IRAN, Piran Shahr	36.73	45.19	GU386382
621	HT06	H8		askewi	IR	IRAN, Piran Shahr (West Azerbaijan)	36.73	45.19	GU386382
710	HT06	H8		lucidus	IR	IRAN, Sar Dasht, Rabat station (West Azerbaijan)	36.15	45.48	GU386382
10067	HT07	H2	robur	lignicolus	CB, Gödöllő	Gödöllő	47.6	19.35	GU386383
416	HT07	H2	?robur	hungaricus	CB, Mecsek	Orfú	46.14	18.15	GU386383
680	HT07	H2		Cynips quercus	IT	ITALY, Cilento	40.24	15.34	GU386383
635	HT07	H2		quercustozae	IT	ITALY, Gildone	41.51	14.75	GU386383
618	HT08	H7	faginea	quercustozae	IM	PORTUGAL, Cabeça Gorda	39.19	-9.26	GU386384
620	HT08	H7	faginea	quercustozae	IM	PORTUGAL, Paredes	41.2	-8.33	GU386384
619	HT08	H7	faginea	quercustozae	IM	PORTUGAL, Sobreiro de Cima	41.84	-7.06	GU386384
602	HT08	H7		grossulariae	IM	SPAIN, Sta Fe de Mondújar	36.97	-2.53	GU386384
707	HT09	H6		kollari	UK	UK, Bovey Tracey	50.58	-3.68	GU386385
708	HT09	H6		kollari	UK	UK, Faggs Wood	51.075	0.83	GU386385
641	HT09	H6		kollari		France, St. Malo	48.65	-2.02	GU386385
361	HT10	H4	petraea	infectorius	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386386
371	HT10	H4	petraea	conglomeratus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386386
464	HT10	H4	petraea	conglomeratus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386386
547	HT11	H5	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386387
519	HT11	H5	petraea	lignicolus	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386387
496	HT11	H5	petraea	glutinosus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386387
504	HT12	H5	petraea	?infectorius	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386388
509	HT12	H5	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386388
21775	HT12	H5	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386388
673	HT13	H3		infectorius	CB	SLOVAKIA, Sikenicka	47.93	18.68	GU386389
639	HT13	H3		quercustozae	IT	CROATIA, Istria	45.31	14.01	GU386389
640	HT13	H3		quercustozae	IT	CROATIA, Istria	45.31	14.01	GU386389
569	HT14	H1	petraea	kollari	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386390
724	HT14	H1	petraea	kollari	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386390
652	HT14	H1		seckendorffi	IT	ITALY, Monte Vulture	40.95	15.63	GU386390

331	HT15	H1	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386391
541	HT15	H1	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Orfú	46.14	18.15	GU386391
362	HT16	H3	robur	hungaricus	CB, Gödöllő	Gödöllő	47.6	19.35	GU386392
382	HT16	H3	robur	infectorius	CB, Gödöllő	Gödöllő	47.6	19.35	GU386392
570	HT17	H1	petraea	lignicolus	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386393
561	HT17	H1	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386393
586	HT18	H1	petraea	kollari	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386394
579	HT18	H1	pubescens	?polycerus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386394
348	HT19	H6	petraea	infectorius	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386395
587	HT19	H6	petraea	kollari	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386395
686	HT20	H7		panteli	IM	MOROCCO, Azrou	30.36	-9.46	GU386396
687	HT20	H7		panteli	IM	MOROCCO, Azrou	30.36	-9.46	GU386396
623	HT21	H2		megalucidus	IR	IRAN, Piran Shahr (West Azerbaijan)	36.73	45.19	GU386397
624	HT21	H2		theophrastae	TL	TURKEY, Beysehir	37.67	31.72	GU386397
631	HT22	H8		askewi	IR	IRAN, Kordestan, Marivan	35.52	46.17	GU386398
622	HT22	H8		lucidus	IR	IRAN, Piran Shahr (West Azerbaijan)	36.73	45.19	GU386398
682	HT23	H5			TL	LEBANON, Ras el maten, Lamartine valley	33.86	35.62	GU386399
617	HT23	H5	infectoria	quercustozae	TL	TURKEY, Yeniyol	39.9	39.4	GU386399
712	HT24	H6		quercuscalicis		Germany, Ludwigsburg	48.9	9.19	GU386400
660	HT25	H2		corruptrix		Greece, Arnissa	40.8	21.83	GU386401
333	HT26	H1	robur	lucidus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386402
358	HT27	H1	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386403
372	HT28	H1	pubescens	conficus	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386404
411	HT29	H1	?robur	lucidus	CB	Borsod	48.3	20.7	GU386405
454	HT30	H1		kollari	CB	Debrecen	47.58	21.63	GU386406
471	HT31	H1	petraea	coriarius	CB, Mátra	Mátra, Sár-hegy	47.8	19.97	GU386407
476	HT32	H5	pubescens	?infectorius	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386408
491	HT33	H1	pubescens	lucidus	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386409
499	HT34	H1	petraea	glutinosus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386410
510	HT35	H5	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386411
513	HT36	H5	petraea	lucidus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386412
517	HT37	H1	petraea	lignicolus	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386413
518	HT38	H1	petraea	lignicolus	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386414
526	HT39	H1	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátra, Sár-hegy	47.8	19.97	GU386415
531	HT40	H5	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Szölősdó	48.44	20.63	GU386416

543	HT41	H2	robur	lignicolus	CB, Mecsek	Orfú	46.14	18.15	GU386417
546	HT42	H1	petraea	lignicolus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386418
557	HT43	H1	pubescens	lucidus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386419
559	HT44	H1	pubescens	lucidus	CB, Aggtelek	Jósvafő	48.48	20.55	GU386420
573	HT45	H5	petraea	lignicolus	CB, Eger	Eger	47.9	20.37	GU386421
578	HT46	H5	robur	sternlichti?	CB, Mecsek	Pécsvárad	46.17	18.4	GU386422
588	HT47	H1	petraea	kollari	CB, Mátra	Mátrafüred	47.83	19.97	GU386423
6161	HT48	H2	?robur	coriarius	CB, Gödöllő	Gödöllő	47.6	19.35	GU386424
718	HT49	H2	petraea	lignicolus	CB, Mátra	Mátra, Sás-tó	47.843	19.96	GU386425
615	HT50	H3		quercustozae	IM	MOROCCO, Azrou	30.36	-9.46	GU386426
677	HT51	H3		kollari	IM	SPAIN, Montseny (Barcelona)	41.76	2.39	GU386427
685	HT52	H7		panteli	IM	MOROCCO, Azrou	30.36	-9.46	GU386428
608	HT53	H8		askewi	IR	IRAN, Piran Shahr	36.73	45.19	GU386429
627	HT54	H8		curtisii	IR	IRAN, Lorestan, Ghelaie	33.86	48.21	GU386430
628	HT55	H8		curtisii	IR	IRAN, Kordestan, Marivan	35.52	46.17	GU386431
629	HT56	H8		lucidus	IR	IRAN, Kermanshah, Sar Pol Zahab	34.46	45.48	GU386432
630	HT57	H8		sternlichti	IR	IRAN, Lorestan, Ghelaie	33.86	48.21	GU386433
632	HT58	H8		lucidus	IR	IRAN, Kordestan, Marivan	35.52	46.17	GU386434
633	HT59	H8		sternlichti	IR	IRAN, Lorestan, Ghelaie	33.86	48.21	GU386435
651	HT60	H2		coronatus	IT	ITALY, Piombino	42.92	10.52	GU386436
676	HT61	H2		coriarius	IT	ITALY, Moio della Civitella	40.24	15.27	GU386437
655	HT62	H5		coriarius	TL	TURKEY, Suluova	40.82	35.63	GU386438
657	HT63	H5		coriarius	TL	TURKEY, Beybesli	41.05	35.88	GU386439
667	HT64	H8		seckendorffi	TL	TURKEY, Külüce	39.27	34.83	GU386440
436	HT65	H2		grossulariae	UK	UK, Ascott-under-wychwood	51.86	-1.57	GU386441
626	HT66	H2		lucidus	UK	UK, Ascott-under-wychwood	51.86	-1.57	GU386442

2. függelék A *Synergus umbraculus* citokróm b haplotípusokra számolt 95% megbízhatósági szintű hálózat, melyet a Splitstree szoftverrel készítettünk. NeighbourNet módszert és equal angle split transzormációt használtunk, 200 bootstrap ismétléssel. Az ábrán csak a haplocsoport neveket tüntettük fel.

