

TÁRSBÉRLŐ GUBACSDARAZSAK FILOGENETIKÁJA ÉS FILOGEOGRÁFIÁJA

Ph.D. értekezés tézisei

Bihari Péter

Témavezető: Dr. Péntes Zsolt

SZTE TTIK Biológia Doktori Iskola
MTA SZBK Genetikai Intézet

Szeged
2011

Bevezetés

Az ízeltlábúak törzsejlesztése során többször is megjelent a gubacsindukálás képessége, amely speciális kapcsolatot feltételez a rovar és gazdanövénye között. A gubacsképzők közül az egyik legnagyobb fajszámmal és egyben legváltozatosabb gubacsmorfológiával jellemezhető csoport a gubacsdarazsak (Hymenoptera: Cynipidae) családja. A Cynipidae fajok által indukált gubacsok egy jellegzetes életközösséggel bírnak, melyben a gubacsképző lárváján kívül társbélrlők (inkvilinek), parazitoidok és hiperparazitoidok is fejlődhetnek. A tölgygubacsok a közösségek szerkezetére és evolúciójára irányuló vizsgálatok kedvelt modelljei, mivel viszonylag zártak és így könnyen mintázhatóak.

A Cynipidae család egy tribuszának tagjai az evolúció során elvesztették gubacsindukáló képességüket (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini), fitofág lárvájuk más gubacsképző fajok mellett társbélrlőként fejlődik. Azonban az ide sorolható fajok egyedei is képesek a növényi szövetek differenciációjának módosításával saját lárvakamrát kialakítani a gubacsban és sajátos táplálószövet differenciációt indukálni. A Synergini tribuszba jelenleg hozzávetőleg 176 faj sorolható, melyből 48 a Nyugat-Palearktikumban is megtalálható. Ismert, hogy a Kárpát-medence gubacsdarazs faunája kiemelkedően gazdag, emellett molekuláris alapú vizsgálatok is kimutatták néhány gubacsindukáló tölgy gubacsdarazs faj magas fajsztintú genetikai változatosságát.

A gubacsdarazsakkal foglalkozó tanulmányok jelentős része elsősorban a gubacsképzőkre és parazitoidjaikra összpontosít, míg a társbélrlőkről kevesebb ismerettel rendelkezünk, noha abundanciájuk és diverzitásuk miatt meghatározó komponensei a gubacsözösségnek. Számos filogenetikai és taxonómiai kérdés tisztázatlan az inkvilinellek kapcsolatban, melyek megválaszolásához a molekuláris filogenetika alkalmas eszköz lehet a morfológiai alapú vizsgálatok mellett. Gubacsdarazsak esetén gyakran használt molekuláris markerek a magi 28S D2 lokusz, valamint a mitokondriális citokróom oxidáz I alegység (COI) és a citokróom b (cytb) gén szakaszok szekvenciája. Tapasztalatok alapján a 28S D2 géusz szinten, utóbbi két mitokondriális marker fajon belül mutat megfelelő változatosságot.

Az általunk tanulmányozott egyik társbérő csoport a csertölgyhöz (*Quercus cerris*) köthető *Synophrus* génusz (Hymenoptera: Cynipidae: Synergini), mely több szempontból is kiemelésre érdemes. A *Synophrus* nőtény korai fejlődési stádiumú gubacsba petézik, majd gyorsan átveszi a gubacs differenciálódásának szabályozását és kiszorítja a gubacsdarázs 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. 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.

Vizsgálataink másik célpontja a *Synergus umbraculus* Olivier, 1791 társbérő faj volt, mely a Synergini tribusz legnépesebb és egyben taxonómiai szempontból leginkább problémás génuszának tagja. E faj az egyik legelterjedtebb tölgygubacs inkvilin a Nyugat Palearktikumban, széles gazdaspecificitású, főleg *Andricus* (Hymenoptera: Cynipidae: Cynipini) fajok aszexuális gubacsiban fejlődik. Már korábban is sejthető volt, hogy a *S. umbraculus* kriptikus fajok komplexe, ezt a sejtést egy a Synergini tribusz molekuláris alapú filogenetikai rekonstrukcióját célzó vizsgálat nemrég megerősítette. Ebben a vizsgálatban a morfológiai alapon *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.

Célkitűzések

A *Synophrus* génuszra vonatkozó vizsgálatunk fő célja a génuszon belüli filogenetikai kapcsolatok tisztázása volt molekuláris markerek használatával.

A *Synergus umbraculus*-ra vonatkozóan célunk elsősorban a kárpát-medencei populáció genetikai diverzitásának felmérése és 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 a feltételezett refúgiális terület bevonásával.

Alkalmazott módszerek

Mintavétel

Magyarország 4 területén csertölglyről gyűjtöttünk *Synophrus* gubacsokat: délnyugaton (Mecsek hegység), északnyugaton (Soproni hegység), északkeleten (Bükk hegység) és délkeleten (Szeged környékén). A gubacsok elhelyezkedését a növényen lejegyeztük, kategóriákba soroltuk. A Nyugat Palearktikum más területeiről származó további, nem általunk gyűjtött *Synophrus* egyedeket is bevontunk a vizsgálatba.

Spanyolországtól Iránig, 55 mintavételi helyről származó *Synergus umbraculus* egyedeket kaptunk lefedve a feltételezett nyugat palearktikumi refúgiális régiókat és a gubacsdarázs gazdák széles skáláját. Hazánk területén a 18 mintavételi helyet jelöltünk ki, céljainknak megfelelően. A gubacsokból karantén alatt neveltük ki a darazsakat, majd 96%-os etanolban tároltuk az egyedeket további felhasználásig.

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, vagy egy egyszerű Chelex alapú eljárást használtunk. A test fennmaradó részeit félretettük későbbi morfológiai vizsgálatok elvégzése céljából, illetve bizonyító példányak.

A *Synophrus* génusz vizsgálatában a mitokondriális COI gén 658 bázispárnyi szakaszát minden egyedre, míg a magi 28S D2 lokusz 565 bázispárnyi szakaszát az egyedek egy részére polimeráz láncreakcióval (PCR) felszaporítottuk. *Synergus umbraculus* esetén a mitokondriális cytb gén 697 bázispárnyi szakaszát minden egyedre, míg a COI és 28S D2 gének 658, illetve 489 bázispárnyi szakaszát az egyedek egy részére PCR-rel felsokszoroztuk. A tisztított PCR terméket megszekvenáltuk.

A *Synophrus* 28S D2 szekvenciák összes gap pozícióját úgy rögzítettük, hogy kongruensek legyenek a *Cynipini* szekvencia illesztésekkel. Az illesztett

szekvenciában a gap-eket 14 különböző bináris karakterként kódoltuk. A Synerginii tribuszból a következő rokon fajok szekvenciáit használtuk fel egy másik vizsgálatunkból: *Saphonecrus haimi*, *Saphonecrus undulatus*, *Saphonecrus connatus*, *Saphonecrus barbotini*, *Saphonecrus lusitanicus* és *Rhoophilus loewi*.

A szekvenciák elemzése

Synophrus **génusz** esetén a filogenetikai rekonstrukcióhoz a 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 filogenetikai becslést Bayes alapú módszerrel végeztük (MrBayes 3.1.2) 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 gap-ekkel.

Synergus umbraculus esetén a teljes statisztikai elemzést kizárólag a cytb szekvenciákra végeztük el az alábbiak szerint. A populáción belüli variabilitást a következő mérőszámokkal jellemeztük: haplotípusok száma, egyedi haplotípusok száma, Nei géndiverzitás, nukleotid diverzitás és kétféle genetikai távolság. Ugyanezekkel a mérőszámokkal jellemeztük az egyes haplocsordok diverzitását is.

A fa alapú filogenetikai rekonstrukciós módszerek alkalmazhatóságának tesztelése után a cytb haplotípusok közötti leszármazási kapcsolatokat Bayes alapú módszerrel becsültük meg a BEAST 1.4.8 szoftverrel “születés-halál” (birth-death) priort és molekuláris órát (strict clock) alkalmazva. Az adatainkra legjobban illeszkedő nukleotid szubsztitúciós modellt (GTR+I+G) használva, az elemzést kodon pozíciók szerint partícionálva végeztük el. A szekvencia divergencia kalibrálásához a széles körben használt 1.15% szekvencia divergencia/millió év/leszármazási vonal értéket használtuk. A haplocsoportok egy részére statisztikus parszimónia hálózatot készítettünk azok kapcsolatának tisztázása céljából.

A térbeli genetikai differenciációt AMOVA módszerrel vizsgáltuk, amihez kétféle genetikai távolságot vettünk alapul: (i) a szekvenciák közötti nem korrigált

páronkénti távolságot (p-távolság) és (ii) a páronkénti patrisztikus távolságot. A tölgygubacs gazda specificitás tesztelésére szintén AMOVA-t végeztünk.

Eredmények és értékelés

Synophrus génusz

- Molekuláris filogenetikai eredményeink és a diagnosztikus morfológiai karakterek ezt követő újraértékelése alapján további négy, tudományra új faj került leírásra: *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 balkán/kisázsia-ibéria 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 elkülönültni 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.

Synergus umbraculus

- 239 cytb szekvencia alapján 8 haplocsoportot tudunk 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 fő oka a különböző leszármazási sorok jelenléte. A haplocsoportok földrajzi elterjedése és más régiókkal közös haplotípusok jelenléte egyértelműen alátámasztja, hogy hazánk keveredési zónának tekinthető, melyet több alkalommal és több refúgium felől is kolonizáltak populációk. Emellett hazánkra egy endemikus haplocsoport dominanciája is jellemző. AMOVA eredményeink és közös haplotípusok jelenléte alapján a magyar populáció főleg az olasz és az észak-európai (UK) régióval mutat kapcsolatot.
- Annak ellenére, hogy a kárpát-medencei populáció genetikai diverzitása kiemelkedő, AMOVA eredményeink alapján ez a diverzitás csak csekély mértékben struktúrált térben. Ehhez hasonló mintázatot mutattak ki az *Andricus quercustozae* és az *A. quercuscalicis* gubacsindukáló darazsakra is.

- A tölgygubacs gazda szerinti differenciációt 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.
- A Nyugat Palearktikum filogeográfiai elemzése jelentős mértékű genetikai differenciációra 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, leszármazási vonalakkal jellemezhető (H8, illetve H7 és H3 haplocsoportok). Ezzel szemben az Alpok vélhetőleg nem képez jelentős földrajzi 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 sajátágok hasonlítanak a gubacsközösség más tagjaira jellemző mintázatokhoz, azonban vizsgálatunk az első, amely egy inkvilin gubacsdarázs genetikai diverzitását elemzi.

Közlemények jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- **Bihari P**, Sipos B, Melika G, Fehér B, Somogyi K, Stone GN és Péntzes Zs. 2011. Western Palearctic phylogeography of an inquiline gallwasp, *Synergus umbraculus*. *Biological Journal of the Linnean Society* **102**:750-764 IF: 2.04.
- Péntzes 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 és 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, Péntzes Zs, Pujade-Villar J, Nieves-Aldrey JL, Schönrogge K és 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, Péntzes 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 és 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 és 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, Péntzes Zs, Mikó I, **Bihari P**, Ács Z, Somogyi K, Bozsóki Z, Szabó K, Bechtold M, Fári K, Fehér B, Fülöp D, Csóka Gy és Stone GN. A Kárpát-medence tölgyön élő gubacsdarazsai. Könyvfejezet. A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása - A Kárpát-medence állattani értékei és faunájának kialakulása, 2007, Budapest.