

**UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI**  
**FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE**  
**ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ**

---

**TEZĂ DE DOCTORAT**

**Munții Carpați ca refugiu cumulativ:  
studii de caz ale unor grupuri  
endemice de țânțari (Diptera:  
Pediciidae)**



---

**Student Doctorand: Avar-Lehel DÉNES**

---

**Coordonator științific: Prof. Dr. Nicolaie DRAGOȘ**

---

**CLUJ-NAPOCA**  
**2019**

# Cuprins

<b>Lista abrevierilor</b> .....	1
<b>I. Introducere</b> .....	2
<b>1. Importanța Munților Carpați ca refugiu și centru de speciație</b> .....	2
1.1. Mecanismele care au influențat biodiversitatea Europei .....	2
1.2. Importanța Carpaților în context biogeografic .....	3
<b>2. Caracterizarea generală a tipulidelor (Diptera, Tipuloidea) cu accent pe familia Pediciidae</b> .....	7
2.1. Tipuloidea – remarci generale .....	7
2.2. Clasificarea Tipuloidelor .....	8
2.3. Familia Pediciidae .....	8
2.4. Pediciidae în România și în Carpați .....	10
<b>3. Citocrom-oxidaza I ca marker molecular în taxonomie și filogeografie</b> .....	12
3.1. Markerii mitocondriali .....	12
3.2. Sistemul Barcoding of Life .....	13
<b>II. Obiectivele studiului</b> .....	15
<b>III. Materiale și metode</b> .....	16
<b>1. Colectarea indivizilor</b> .....	16
<b>2. Metode moleculare</b> .....	23
2.1. Secvențializarea în Sistemul BOLD .....	23
2.2. Extracția ADN-ului genomic .....	24
2.3. Amplificarea secvențelor <i>mtCOI</i> .....	24
2.4. Purificarea produșilor PCR .....	25
2.5. Secvențializarea .....	25
2.6. Analiza secvențelor .....	26
2.7. Analiza datelor moleculare .....	26
<b>3. Metode morfologice</b> .....	26
3.1. Analiza variabilității morfologice .....	26
3.2. Măsurători morfometrice și analizarea datelor .....	26
<b>IV. Istoria evolutivă complexă în zona Carpatică, bazată pe diversitatea și distribuția complexului de specii micro-endemice <i>Pedicia (Crunobia) staryi</i></b> .....	27
<b>1. Remarci generale</b> .....	27
1.1. Grupul de specii <i>P. staryi</i> .....	28
1.2. Obiectivele studiului .....	29
<b>2. Materiale și metode</b> .....	30
2.1. Analiza datelor moleculare .....	30

2.1.1. Structura spațială genetică .....	30
2.1.2. Diversitatea genetică moleculară .....	31
2.1.3. Analizele filogenetice .....	31
2.1.4. Estimarea perioadei de divergență .....	32
2.2. Metode morfologice .....	33
2.2.1. Analiza variabilității morfologice .....	33
2.2.2. Măsurători morfometrice și analiza datelor .....	33
<b>3. Rezultate</b> .....	<b>35</b>
3.1. Rezultatele secvențializării .....	35
3.2. Gruparea spațială și diversitatea genetică inter și intra specifică în cazul speciilor endemice carpatine .....	35
3.3. Analizele filogenetice .....	38
3.4. Diferențierea micromorfologică .....	41
3.5. Descrierea unităților taxonomice diferențiate.....	47
3.5.1. <i>Pedicia (Crunobia) apusenica</i> Ujvárosi și Starý, 2003 .....	47
3.5.2. <i>saryiR2</i> – redefinită ca <i>Pedicia (Crunobia) saryi</i> Savchenko, 1978 .....	49
3.5.3. <i>saryiR1</i> – descrisă ca <i>Pedicia (Crunobia) carpianica</i> Kolcsár, Keresztes și Dénes 2016 .....	51
3.5.4. <i>saryiG</i> – descrisă ca <i>Pedicia (Crunobia) costobocica</i> Kolcsár, Keresztes și Dénes 2016 .....	52
3.5.5. <i>SaryiB</i> – descrisă ca <i>Pedicia (Crunobia) roxolanica</i> Kolcsár, Keresztes și Dénes 2016 .....	54
3.6. Estimarea perioadei diferențierilor .....	55
<b>4. Discuții</b> .....	<b>56</b>
4.1. Relații filogenetice în cadrul grupului de specii <i>P. saryi</i> .....	56
4.2. Diversitatea genetică moleculară în Carpați .....	58
4.3. Natura cumulativă a refugiului din Carpați .....	60
<b>V. Revizuirea genului <i>Dicranota</i> Zetterstedt, 1838 (Diptera, Pediciidae) în regiunea Carpatică</b> .....	<b>63</b>
<b>1. Remarci generale</b> .....	<b>63</b>
1.1. Genul <i>Dicranota</i> Zetterstedt, 1838 .....	64
1.1.1. Subgenul <i>Ludicia</i> Hutson și Vane-Wright, 1969 .....	65
1.1.2. Subgenul <i>Paradicranota</i> Alexander, 1934 .....	66
1.2. Obiectivele studiului .....	67
<b>2. Materiale și metode</b> .....	<b>68</b>
2.1. Analiza datelor moleculare .....	68
2.1.1. Analize filogenetice .....	68

2.1.2. Diversitatea genetică moleculară.....	69
2.2. Metode morfologice.....	69
2.2.1. Analiza variabilității morfologice.....	69
<b>3. Rezultate.....</b>	<b>70</b>
3.1. Filogenia genului <i>Dicranota</i> Zetterstedt, 1838.....	70
3.2. Divergențe în subgenul <i>Paradicranota</i> și descrierea unei specii noi.....	74
3.2.1. Variabilitatea genetică moleculară.....	74
3.2.2. Diferențiere morfologică și descrierea speciei noi <i>Dicranota (P.) distincta</i> .....	78
3.3. Revizia taxonomică a complexului <i>Dicranota (Ludicia) lucidipennis</i> – Descrierea a noi specii <i>Dicranota (Ludicia)</i> .....	82
3.3.1. Variabilitatea genetică moleculară.....	82
3.3.2. Descrierea unităților taxonomice diferențiate.....	86
<b>4. Discuții.....</b>	<b>91</b>
4.1. Poziția taxonomică a subgenului <i>Ludicia</i> Hutson și Vane-Wright, 1969 pe baza secvențelor markerului <i>mtCOI</i> .....	91
4.2. Diversitate criptică și rolul Carpaților și a Regiunii Balcanice ca refugiu și centru de speciație.....	92
<b>VI. Concluzii finale.....</b>	<b>94</b>
<b>Referințe.....</b>	<b>96</b>
<b>Mulțumiri.....</b>	<b>112</b>
<b>Performanța științifică.....</b>	<b>113</b>
<b>Lista lucrărilor științifice incluse în teză.....</b>	<b>113</b>
<b>Lista lucrărilor științifice neincluse în teză.....</b>	<b>113</b>
<b>Lista participărilor la conferințe.....</b>	<b>114</b>
<b>Anexe.....</b>	<b>115</b>
<b>Anexa 1. Datele colectării și informațiile suplimentare ale specimenelor studiate.....</b>	<b>115</b>
<b>Anexa 2. Statisticile sumare pentru fiecare caracter morfologic măsurat al speciilor din complexul "<i>saryi</i>".....</b>	<b>128</b>
Anexa 2.1. <i>Pedicia (Crunobia) apusenica</i> Ujvárosi și Starý, 2003.....	128
Anexa 2.2. <i>Pedicia (Crunobia) saryi</i> Savchenko, 1978.....	129
Anexa 2.3. <i>Pedicia (Crunobia) carpiatica</i> Kolcsár, Keresztes și Dénes 2016.....	130
Anexa 2.4. <i>Pedicia (Crunobia) costobocica</i> Kolcsár, Keresztes și Dénes 2016.....	131
Anexa 2.5 <i>Pedicia (Crunobia) roxolanica</i> Kolcsár, Keresztes și Dénes 2016.....	132

## Lista abrevierilor

AMOVA	Analiza ierarhică a varianței moleculare
BI	Algoritmul Bayesian Inference
BIN	Barcode Index Number
BOLD	Barcode of Life Data System
BP	Probabilitatea Bootstrap
CCW	Catalogue of the Cranfly of the World
COI	Citocrom-oxidaza I
GTR	Modelul General Time Reversible
KOH	Hidroxid de potasiu
LGM	Maxima ultimei glaciațiuni
MJN	Rețeaua Median Joining
ML	Algoritmul Maximum Likelihood
MOTU	Unitate taxonomică operațională moleculară
<i>mtCOI</i>	Markerul mitocondrial al Citocrom-oxidazei I
<i>mtDNA</i>	Acid dezoxiribonucleic mitocondrial
Mts	Munții
Mya	Milioane de ani în urmă
OTU	Unitate taxonomică operațională
pb	Perechi de baze
PCA	Analiza componentelor principale
PCR	Reacția în lanț a polimerazei
PP	Probabilitatea posterioară
SD	Deviația Standard

### Keywords:

BOLD, diversitate criptică, taxonomie integrativă, *mtCOI*, speciație.

# I. Introducere

## 1. Importanța Munților Carpați ca refugiu și centru de speciație

### 1.1. Mecanismele care au influențat biodiversitatea Europei

Timp de câteva decenii glaciațiunile cuaternare au fost considerate mecanismele cele mai importante care au influențat biodiversitatea și procesele de speciație din Europa. Cu toate acestea, multe dintre speciile endemice europene au un caracter relictar și pot fi datate din Epoca Miocenă sau Pliocenă. Originea și evoluția unor astfel de specii este legată de evenimentele orogene alpine din Europa Centrală, sau de repetatele faze de expansiune și regresie ale Mării Paratethys din Miocen, cu climatul arid care a dus la fragmentarea pădurilor (Habel și Assmann, 2010), sau de vulcanismul din era Pliocenă care a provocat enclave izolate, având ca rezultat speciații accelerate asemănătoare celei insulare (Pop și colab., 2010).

Existența mai multor refugii criptice la nord, în afara regiunii mediteraneene tradiționale, a fost confirmată de mai multe rezultate moleculare și morfologice (Bálint și colab., 2011), arătând că mediile acvatice stenoterme reci ale văilor adânci și a zonelor izvoarelor au furnizat condiții climatice stabile, făcând posibilă supraviețuirea chiar și în condițiile dure ale perioadei de glaciațiune maximă (Schmitt și Varga, 2012).

### 1.2. Importanța Carpaților în context biogeografic

Importanța munților Carpați în contextul biogeografic al diversității europene se datorează poziției geografice, mărimii, altitudinii mai mici, fragmentării și complexității geomorfologice. Datorită poziției central europene, biodiversitatea acestei zone muntoase a fost influențată de regiunile alpine, arctice, mediteraneene și chiar și asiatice. Numărul mare de organisme autohtone cu caracter relictar și liniile genetice vechi pot fi corelate cu izolarea insulară a diferitelor lanțuri montane (Dénes și colab., 2016a).

Speciile aparținând familiei Pediciidae trăiesc în habitatele semi-acvatice de-a lungul cursurilor de apă montane (Keresztes și colab., 2011). Deoarece se limitează în cea mai mare parte la altitudini mai mari, ele prezintă, de asemenea, o distribuție disjunctă, insulară și pot fi organisme model de interes pentru studierea istoriei evolutive a speciilor semi-acvatice din Munții Carpați.

## 2. Caracterizarea generală a tipulidelor (Diptera, Tipuloidea) cu accent pe familia Pediciidae

### 2.1. Tipuloidea – remarci generale

Tipuloidea este unul dintre cele mai diverse grupuri de diptere, cu 15527 de specii aparținând la 709 genuri și subgenuri din patru familii (Oosterbroek, 2019). Acestea sunt un grup cosmopolit, larg răspândit, cu o distribuție ce variază de la regiunea arctică până la ecuator și de

la zonele marine până la munții înalți de până la 5600 m în anumite regiuni (Alexander și Bayers, 1981).

## **2.2. Clasificarea Tipuloidelor**

Prima abordare integrativă a filogeniei acestui grup a fost realizată de către Petersen și colab. (2010), care au combinat analizele a 100 de caractere morfologice ale larvelor și adulților, cu analiza secvenței genei 28S ARN-ului ribozomal și a regiunii CPS a genei CAD. Pe baza acestor rezultate Tipuloidea este împărțită în două familii: Pediciidae și Tipulidae.

## **2.3. Familia Pediciidae**

Oosterbroek (2006) descrie o serie de caracteristici morfologice specifice care disting membrii familiei Pediciidae de alte specii. Dimensiunea lor este foarte variabilă, de la foarte mici de 5 mm la unele specii de Dicranota, până la un corp mult mai mare de 35 mm la unele specii aparținând genului *Pedicia*. Corpul, antenele, picioarele și aripile lor sunt alungite și lungi, așa cum este caracteristic aproape tuturor membrilor grupului Tipuloidea. Între unitățile oculare, pot fi observate fire de păr scurte la toți membrii familiei. Venația aripilor lor are, de asemenea, câteva caracteristici distinctive (Dienske, 1987).

## **2.4. Pediciidae în România și în Carpați**

În 1998, Ujvárosi a demarat o cercetare intensă pentru a evalua fauna Pedicidelor din zona Munților Carpați din România și a constatat că habitatele cele mai potrivite pentru aceste specii din Munții Carpați sunt zonele umede și zonele mlăștinoase acoperite de păduri unde există o diversitate ridicată, cu comunități abundente, și regiunile izvoarelor montane unde se găsesc mai multe specii endemice rare (Ujvárosi, 2005). Acest lucru este confirmat de descrierea speciei *Pedicia apusenica* din Munții Apuseni (Ujvárosi și Starý, 2003). În 2010 Ujvárosi și colab. au observat două linii divergente în cazul speciei *Pedicia occulta* (Meigen, 1830) în Carpați, care au condus la descrierea unei noi specii noi pe baza rezultatelor morfologice și moleculare, pe care au numit-o *Pedicia fusca* (Ujvárosi & Bálint, 2012). Combinând datele morfologice și analiza secvențelor COI, o diversitate criptică a fost constatată și în cazul speciei *P. staryi* (Dénes și colab., 2016a,b).

# **3. Citocrom-oxidaza I ca marker molecular în taxonomie și filogeografie.**

## **3.1. Markerii mitocondriali**

Markerii moleculari de la nivelul genomului mitocondrial reprezintă cele mai frecvent utilizate instrumente, bazate pe secvențe ADN, în taxonomia moleculară și studiile filogenetice. Aceștia au mai multe proprietăți care îi fac adecvați și uzuali în astfel de studii: numărul mare de copii prezente într-o celulă, ceea ce le face relativ ușor de izolat și analizat, moștenirea maternă (Sato și Sato, 2013), și rata de evoluție relativă rapidă (Avisé, 2009).

### 3.2.Sistemul Barcoding of Life

În 2003, Hebert *și colab.* au propus un fragment de 648 perechi de baze (pb) a citocrom-oxidazei I (COI) ca marker universal adecvat pentru studiul molecular al speciilor de animale, deoarece este una dintre cele mai conservate gene codificatoare a genomului mitocondrial, prin urmare, existând mai multe amorse robuste și universale care pot fi utilizate în studii taxonomice și filogenetice pentru un spectru larg de specii de animale (Folmer *și colab.*, 1994). Aceste trăsături au făcut markerul *mtCOI* o alegere potrivită pentru utilizarea universală, ducând la succesul sistemului Barcode of Life Data System (BOLD, <http://www.boldsystems.org>; Sujeevan și Hebert, 2007).

Algoritmul “Refined Single Linkage (RESL) Analysis” (Ratnasingham și Hebert, 2013), este folosit pentru a atribui un cod (Barcode Index Number; BIN) fiecărei secvență care anterior a fost grupată. De asemenea, sistemul ia în considerare unitățile taxonomice bazate pe morfologie și recalculează pragurile cu fiecare secvență nou adăugată pentru a asigura gruparea cât mai exactă a secvențelor (Ratnasingham și Hebert, 2013).

## II. Obiectivele studiului

Scopul cel mai important al acestei lucrări este de a confirma importanța Munților Carpați ca refugiu cumulativ și centru de speciație pentru speciile din familia Pediciidae (Diptera). Studiile care tratează această problemă, vizând alte grupuri de insecte din regiune sunt încă puține, deși lucrările biogeografice existente sugerează importanța Carpaților ca centru de biodiversitate europeană. Studiile bazate pe morfologie și numărul de specii endemice acvatice și semiacvatice sugerează necesitatea unei abordări integrative, care să includă și studiul diversității genetice moleculare. Analizele de genetică moleculară din acest studiu au fost efectuate utilizând secvențele markerului *mtCOI* și sunt discutate în două studii de caz axate pe trei grupuri de Pediciide. În primul studiu am analizat diferențierile moleculare și morfologice precum și diversitatea criptică a grupului de specii *Pedicia (Crunobia) staryi* Savchenko, 1978. În al doilea studiu focusul principal a fost genul *Dicranota*, în special la diversitatea observată în cadrul subgenului *Paradicranota* Alexander, 1934 și a speciei *Dicranota (Ludicia) lucidipennis* (Edwards, 1921) din subgenul *Ludicia* Hutson și Vane-Wright, 1969.

Un alt scop al acestei teze a fost testarea utilității markerului *mtCOI* în testarea ipotezelor taxonomice prin testarea poziției subgenului *Ludicia (Dicranota)*, un grup a cărui poziție taxonomică în interiorul familiei Pediciidae este încă intens dezbătută.



### **III. Materiale și metode**

#### **1. Colectarea indivizilor**

Specimenele utilizate în acest studiu au fost colectate cu ajutorul unor plase sau cu mâna de-a lungul pâraielor și a izvoarelor, și au fost depozitate în etanol 96% în Colecția de Diptere din cadrul Facultății de Biologie și Geologie a Universității Babeș-Bolyai, Cluj-Napoca, România. În total 360 de indivizi au fost colectați din toată Europa, din luna mai până în august între 2007-2018, și au fost analizate în două studii de caz separate.

#### **2. Metode moleculare**

Secvențele analizate în această teză au fost obținute prin două metode diferite, în laboratoare independente. Experimentele de laborator și secvențializarea pentru un număr mare de indivizi a fost realizată ca parte a sistemului BOLD în Centrul Canadian de Barcoding, al Universității din Guelph. Secvențe adiționale au fost produse ca urmare a analizelor efectuate în Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe al Universității Babeș Bolyai.

##### **2.1. Secvențializarea în Sistemul BOLD**

Toate exemplarele au fost fotografiate și au fost încărcate în sistemul BOLD, împreună cu informații suplimentare privind clasificarea lor taxonomică și datele de colectare. Două sau trei picioare de la fiecare individ au fost colectate și au fost încărcate în plăci cu 96 de godeuri conținând 30 μl de etanol de 96%. Ulterior, probele au fost trimise la Centrul Canadian de Barcoding (Wilson, 2012) pentru secvențializare. Secvențele rezultate și fișierele adiționale au devenit disponibile prin intermediul sistemului BOLD (<http://www.boldsystems.org>) sub denumirea de Tipuloidea ale Europei [EUTIP].

##### **2.2. Extracția ADN-ului genomic**

ADN-ul a fost extras din probele de țesut toracic folosind kitul DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) urmând protocolul de extracție standard pentru țesutul animal. Puritatea și concentrația ADN-ului genomic și concentrația a fost estimată cu ajutorul spectrofotometrului de tip NanoDrop 1000.

##### **2.3. Amplificarea secvențelor mtCOI**

Secvențele *mtCOI* au fost amplificate într-un volum de reacție de 50 μl utilizând perechea de amorse LCO1490 / HCO2198.

##### **2.4. Purificarea produșilor PCR**

Produșii PCR au fost încărcăți pe un gel de agaroză de 1%, fragmentul de interes fiind purificat utilizând kitul Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA).

## **2.5. Secvențializarea**

Secvențializarea produșilor de PCR a fost efectuată la MacroGen Europe (Amsterdam, The Netherlands), folosind amorsa standard LCO1490.

## **2.6. Analiza secvențelor**

Cromatogramele secvențelor au fost vizualizate cu ajutorul programului Trev (Staden Package; Bonfield *și colab.*, 2002) pentru verificarea calității și au fost corectate manual. Secvențele obținute au fost aliniat în BioEdit 7 (Hall, 1999) folosind algoritmul Clustal W.

## **2.7. Analiza datelor moleculare**

Analiza secvențelor a presupus determinarea numărului de poziții polimorfe, numărul de haplotipuri, diversitatea haplotipică (h) și a nucleotidelor (p) prin intermediul soft-ului DnaSP (Librado și Rozas, 2009).

# **3. Metode morfologice**

## **3.1. Analiza variabilității morfologice**

Organele genitale masculine au fost macerate în hidroxid de potasiu (KOH) de 10% timp de 10-12 minute pentru a relaxa și a deschide structurile genitale. Acestea au fost așezate pe un pat din sticlă fină sub glicerol și au fost analizate folosind un stereomicroscop Olympus SZ61 echipat cu o camera foto Canon 650D și un adaptor LM Digital SLR (Micro Tech Lab, Austria).

## **3.2. Măsurători morfometrice și analizarea datelor**

Măsurătorile morfometrice au fost realizate în programul Gimp 2 ([www.gimp.org](http://www.gimp.org)) pe baza fotografiilor aparatului genital al masculilor. Terminologia caracteristicilor este bazată pe cea folosită de Dienske (1987).

## **IV. Istoria evolutivă complexă în zona Carpatică, bazată pe diversitatea și distribuția complexului de specii micro-endemice *Pedicia (Crunobia) staryi***

### **1. Remarci generale**

Biodiversitatea unei regiuni și numărul de taxoni endemici este influențată de vârsta geologică a regiunii respective și reflectă condițiile locale din trecut și cele din prezent (Varga, 2010). Prin urmare, speciile semi-acvatice adaptate la un climat răcoros, cum sunt membrii complexului de specii *Pedicia (Crunobia) staryi*, sunt organisme model corespunzătoare pentru studierea și înțelegerea proceselor istorice care au influențat diversitatea sistemelor montane într-un mediu relativ stabil (mediul al izvoarelor), pe perioade mai mari decât glaciațiile pleistocene.

#### **1.1. Grupul de specii *P. staryi***

Grupul de specii *Pedicia (Crunobia) staryi* a fost stabilit de Savchenko în 1986, care a delimitat grupul „*littoralis*” cu doar doi spini pe gonostil, și a grupat celelalte specii, cu mai mult de doi astfel de spini în grupul „*staryi*”. Înainte de studiul prezentat în această teză, schema de clasificare a acestui complex de specii a cuprins cinci unități taxonomice: *Pedicia (C.) apusenica* Ujvárosi și Starý, 2003, *P. (C.) lobifera* Savchenko, 1986, *P. (C.) staryi* Savchenko, 1978, *Pedicia (C.) spinifera* Starý, 1974 și *P. (C.) straminea* Meigen, 1838. *Pedicia lobifera*, *P. staryi* și *P. apusenica* sunt endemice în Carpați și Munții Apuseni. În munții din Bulgaria sunt înlocuiți de *P. spinifera*. Ultimul membru al acestui grup, *P. straminea* este larg răspândit în diferite habitate semi-acvatice la diferite altitudini pe tot teritoriul Europei (Oosterbroek, 2019).

#### **1.2. Obiectivele studiului**

Scopul acestui studiu de caz a fost de a analiza variațiile moleculare și morfologice inter și intraspecifică din cadrul complexului *Pedici staryi*, pentru a identifica potențialul diversității criptice, concentrându-se în special asupra speciilor endemice carpatice. De asemenea, am studiat importanța Munților Carpați ca refugiu și centru de speciație prin analizarea istoriei evoluției acestor specii.

### **2. Materiale și metode**

Au fost studiați 152 indivizi aparținând grupului *P. staryi*: 83 aparținând speciei *P. staryi*, 17 *P. apusenica*, 9 *P. lobifera*, 6 *P. spinifera* și 37 *P. straminea*.

#### **2.1. Analiza datelor moleculare**

Secvențele au fost obținute din sistemul BOLD sau generate în Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe al Universității Babeș Bolyai prin metoda prezentată în descrierea generală.

### 2.1.1. *Structura spațială genetică*

Gruparea spațială a indivizilor a fost implementată în cazul speciilor carpatice autohtone din grupul *P. staryi*. Programul BAPS, 6 (Corander, Sirén, și Arjas, 2007) a fost utilizat pentru a detecta structura populațiilor și pentru a identifica principalele haplogrupuri ale celor trei specii endemice.

### 2.1.2. *Diversitatea genetică moleculară*

O analiză ierarhică a varianței moleculare (AMOVA; Excoffier, Smouse, și Quattro, 1992) a fost efectuată în Arlequin, 3.5 (Excoffier și Lischer, 2010). Populațiile au fost structurate în două grupuri corespunzând statutului taxonomic actual al speciilor, și în cinci grupuri sugerate de analiza structurii populației. Proporția diferențelor genetice (*p*-distance) a fost calculată între grupuri, folosind programul Mega X (Kumar *et al.*, 2018).

### 2.1.3. *Analizele filogenetice*

Relațiile filogenetice au fost determinate cu ajutorul algoritmilor Maximum Likelihood (ML), Bayesian inference (BI) și cu o rețea de haplotipuri (Median Joining Network - MJN).

### 2.1.4. *Estimarea perioadei de divergență*

Informațiile cu privire la filogenie și timpul de divergență al nodurilor au fost deduse cu ajutorul programului BEAST, 1.7.4 (Drummond și Rambaut, 2007) folosind metoda Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC), cu procesul de speciație setat pe tipul Yule (Steel și McKenzie, 2001). Din cauza lipsei fosilelor pentru aceste grupuri, valoarea de  $0.0177 \pm 0.00119$  a fost utilizată ca rată a substituției (Papadopoulou *et al.*, 2010).

## **2.2. Metode morfologice**

### 2.2.1. *Analiza variabilității morfologice*

Aspectul morfologic al indivizilor și caracteristicile morfologice ale aparatului genital la masculi au fost examinate prin metoda prezentată în capitolul general.

### 2.2.2. *Măsurători morfometrice și analiza datelor*

În cazul complexului de specii *P. staryi*, pe lângă analiza morfologică generală, au fost măsurate 11 caractere micromorfologice de la nivelul aparatului genital al masculilor. Comparația variabilelor măsurate s-a realizat cu testul Mann-Whitney U în SPSS 17.0. (Chicago: SPSS Inc). O analiză a componentelor principale (PCA) fost calculată și reprezentată grafic cu funcția *prcomp* în programul R (R Core Development Team, 2016).

### 3. Rezultate

#### 3.1. Rezultatele secvențializării

Secvențele *mtCOI* au avut o lungime de 658 perechi de baze, cu un număr total de 471 pb după excluderea pozițiilor lipsă. Din cele 130 de poziții polimorfice 129 au fost informative din punct de vedere parsimonomic, rezultând 44 haplotipuri cu diversitate haplotipică de 0,938 și diversitate nucleotidică de 0,08633.

#### 3.2. Gruparea spațială și diversitatea genetică inter și intra specifică în cazul speciilor endemice carpatine

Programul BAPS a definit șase grupuri. *P. lobifera* și *P. apusenica* formează două grupuri bine separate, cu *P. lobifera* distribuită în Carpații Orientali și *P. apusenica* prezentă numai în Apuseni. Indivizii *P. staryi* individuals formează patru grupuri genetice separate cu două haplogrupuri în Munții Rodnei (*staryiR1*; *staryiR2*), un al treilea prezent în Munții Gutâi (*staryiG*) și ultimul în Munții Bucegi (*staryiB*).

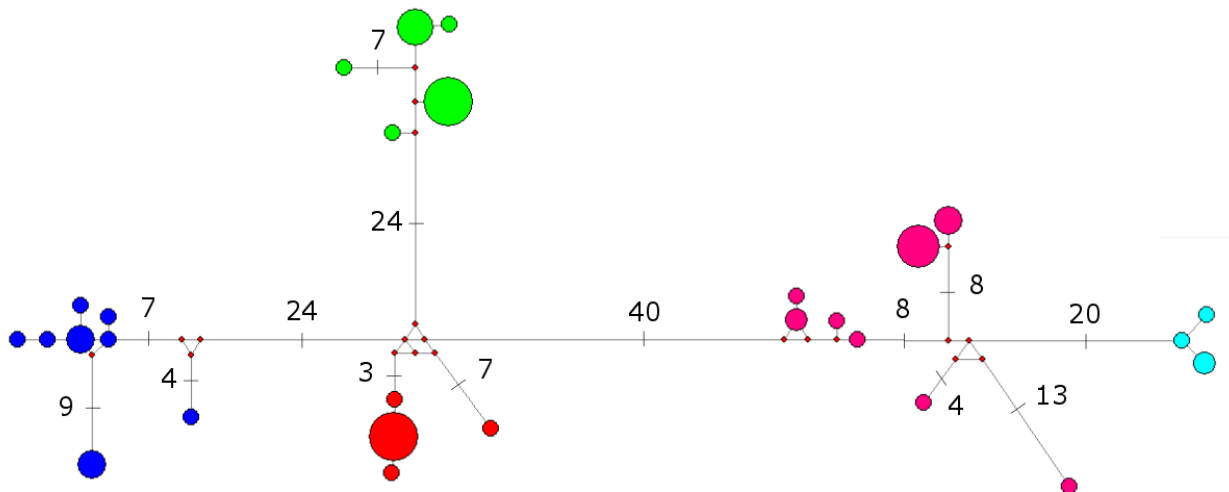
AMOVA a arătat cea mai mare variație atunci când gruparea *a priori* s-a bazat pe cele cinci structuri sugerate de analiza BAPS, cu cea mai mare diversitate explicată prin variația dintre cele cinci grupuri (79.55%), urmată de variația la nivelul populației (15.05%). Cea mai mare distanță genetică de 9.10% a fost calculată între *staryiR1* și *staryiB*, urmată de distanța dintre *staryiR1* și *staryiR* (8.98%). Toate distanțele sunt mai mari decât pragul de 2% considerat limita universală a speciilor, cu cea mai mică distanță de 4.86% între *staryiR1* și *staryiG*.

#### 3.3. Analizele filogenetice

Ambii algoritmi (ML și BI) au generat arbori cu topologii similare, arătând un grup de specii *P. staryi* monofiletic, dar fără suport statistic ridicat. Toate liniile genetice sunt bine separate cu un sprijin statistic puternic. Cea mai scurtă rețea MJN are un numărul estimat de 153 mutații și confirmă prezența celor patru linii bine separate ale speciei *P. staryi* (Fig. 1).

#### 3.4. Diferențierea micromorfologică

PCA ilustrează trei grupuri bine separate (*staryiR1*, *staryiG* și *staryiR2*) pe baza primelor două componente (PC1 și PC2). Indivizii care corespund liniei *staryiB* se suprapun cu celelalte trei grupuri, dar sunt bine separate pe baza altor caractere, fiecare caracter măsurat arătând diferențe semnificative între unul sau mai multe grupuri studiate.



**Fig. 1.** Rețeaua MJN; cercurile reprezintă diferitele haplotipuri; numerele de pe ramuri arată pașii mutaționali dintre haplotipuri; culorile reprezintă cele cinci grupuri: *P. apusenica* (roșu), *staryiG* (albastru), *staryiR1* (roz), *staryiR2* (verde), *staryiB* (albastru închis).

### 3.5.Descrierea unităților taxonomice diferențiate

Toate aceste rezultate sugerează necesitatea unei revizii taxonomice, prin urmare, *P. staryi* a fost redefinit ca o specie corespunzătoare liniei *staryiR2* iar celelalte trei linii au fost descrise ca specii noi în Dénes și colab. (2016b).

#### 3.5.1. *Pedicia (Crunobia) apusenica* Ujvárosi și Starý, 2003

Număr de acces BOLD: EUTIP718 - 720 și EUTIP725. BIN: AAF8237

Specie mare de culoare portocalie gălbuie (Fig. 2-A). **Masculul** are lungimea de 14–15 mm, lungimea aripii 13–15 mm, antenele cu lungimea de 1.9–2.1 mm. **Femela** are lungimea de 15 mm; lungimea aripii este de 9 mm.

#### 3.5.2. *staryiR2* – redefinită ca *Pedicia (Crunobia) staryi* Savchenko, 1978

Număr de acces Gen Bank: KT983907 - KT983910; Număr de acces BOLD: EUTIP709. BIN: ACL4087.

Specie mare de culoare portocalie gălbuie (Fig. 2-B). **Masculul** are lungimea de 13–16 mm, lungimea aripii 13–15 mm. **Femela** are lungimea de 16.5–17 mm, lungimea aripii este de 12–13 mm, iar antenele de 1.7 mm.

3.5.3. *staryi*R1 – descrisă ca *Pedicia (Crunobia) carpianica* Kolcsár, Keresztes și Dénes 2016

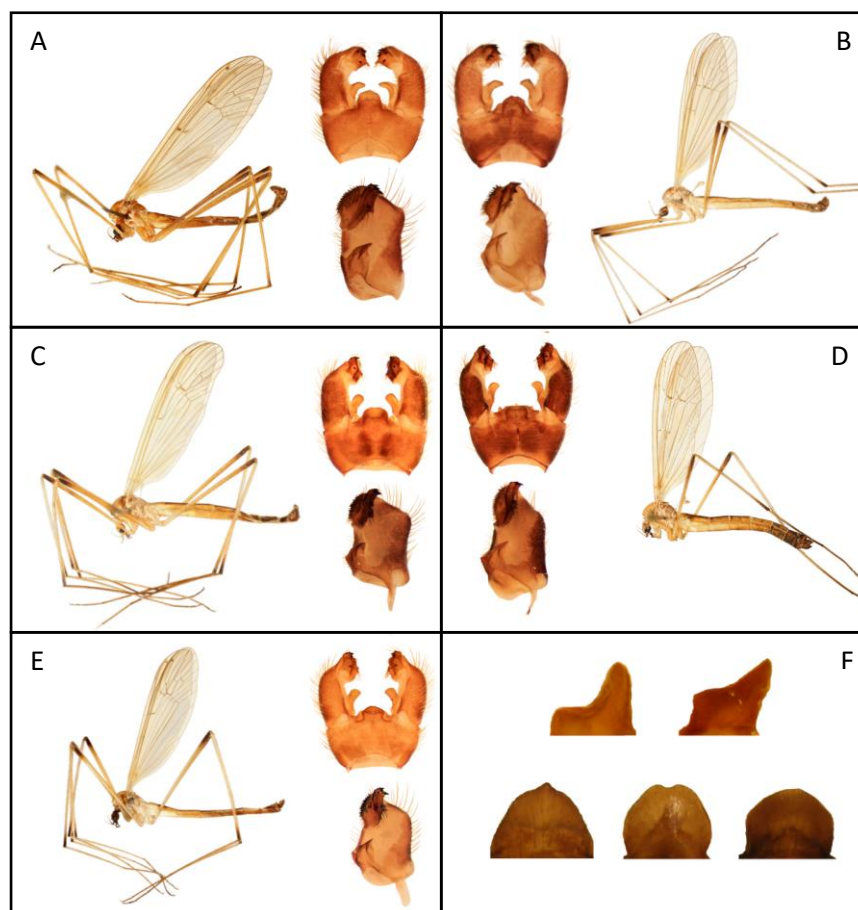
Număr de acces GenBank: KT983904 - KT983906; Număr de acces BOLD: EUTIP095, EUTIP096, EUTIP475, EUTIP478 - EUTIP480. BIN: AAD6568, AAD6569 ABA7405, ABA7406.

Specie mare de culoare portocalie gălbuie (Fig. 2-C). **Masculul** are lungimea de 13–17 mm, lungimea aripii 13.5–17 mm, antenele de 1.9–2.1 mm. **Femela:** necunoscută.

3.5.4. *staryi*G – described as *Pedicia (Crunobia) costobocica* Kolcsár, Keresztes și Dénes 2016

Număr de acces BOLD: EUTIP695, EUTIP698 și EUTIP708. BIN: ACL4088.

Specie de mărime medie, de culoare portocalie gălbuie (Fig. 2-D). **Masculul** are lungimea de 10–14 mm, lungimea aripii 11–14.5 mm, antenele de 1.7 mm. **Femela** are lungimea de 12 mm, lungimea aripii este de 11 mm, iar antenele de 1.6 mm. Culoare generală galbenă.



**Fig. 2.** Masculul adult văzut din lateral, partea interioară a gonocoxitului din lateral și structura genitală: *P. apusenica* (A); *P. staryi* (B); *P. carpianica* (C); *P. costobocica* (D); *P. roxolanica* (E). Panoul F: lobul gonocoxitului din lateral (rândul de sus) *P. roxolanica* (stânga) și restul speciilor (dreapta); lobul din unghi dorzal *P. apusenica* (stânga) celelelalte specii (centru și dreapta). Pozele de la A la E făcute de Levente Péter Kolcsár.

3.5.5. *StaryiB* – descrisă ca *Pedicia (Crunobia) roxolanica* Kolcsár, Keresztes și Dénes 2016

Număr de acces Gen Bank: KT983903; Număr de acces BOLD: EUTIP669, EUTIP670, EUTIP691 - 694 și EUTIP710. BIN: AAD6568.

Specie mare de culoare portocalie gălbuie (Fig. 2-E). **Masculul** are lungimea de 13–15 mm, lungimea aripii 13–14.5 mm, antenele de 1.6–1.9 mm. **Femela** necunoscută.

### 3.6. Estimarea perioadei diferențierilor

Pe baza datării moleculare s-a estimat că *P. spinifera* a apărut cu aproximativ 10,16 milioane de ani în urmă, iar strămoșul comun al speciilor autohtone din Carpați s-a diferențiat de *P. straminea* 8,65 milioane de ani în urmă. În plus, aceasta a indicat că *P. lobifera* s-a diferențiat 7.10 milioane de ani în urmă față de celelalte cinci specii endemice. Grupul format de *P. carpianica* și *P. costobocica* s-a separat de celelalte trei specii în urmă cu 5.81 milioane de ani, iar *P. carpianica* și *P. costobocica* s-au despărțit în urmă cu 2.65 milioane de ani. *Pedicia apusenica* și *P. roxolanica* s-au diferențiat de *P. staryi* 4.80 milioane de ani în urmă, iar ele s-au despărțit acum 4.07 milioane de ani.

## 4. Discuții

### 4.1. Relații filogenetice în cadrul grupului de specii *P. staryi*

Cele trei specii nou descrise, *P. costobocica*, *P. carpianica* și *P. roxolanica* pot fi în mod clar atribuite grupului de specii „*staryi*” sensu Savchenko (1986) deoarece au mai mult de doi spini negri pe partea superioară a gonostilului. Analizele filogenetice bazate pe secvențele de ADN mitocondrial indică faptul că grupul *P. staryi* este o unitate monofiletică, aspect ce este în concordanță cu ipotezele taxonomice ale lui Savchenko (1986).

### 4.2. Diversitatea genetică moleculară în Carpați

Strămoșul speciilor endemice din Munții Carpați a apărut în urmă cu 8.65 milioane de ani, separarea de *P. straminea* fiind datorată probabil condițiilor subtropicale în care speciile adaptate la frig au fost limitate la zonele de pădure din regiunile muntoase (Kvaček și colab., 2006). *Pedicia lobifera* s-a diferențiat în urmă cu 7.1 milioane de ani, acest eveniment putând fi explicat printr-o altă aridificare (van Dam, 2006), dar poate fi și rezultatul izolării într-o enclavă insulară în timpul expansiunii mării Paratethys (Pop și colab., 2010). Diversificarea celorlalte cinci linii a început cu criza de salinitate mesiană, circa 5.81 milioane de ani în urmă, când *P. carpianica* și *P. costobocica* s-au separat de celelalte trei specii. Și celelalte evenimente de speciație pot fi legate de climatele uscate din perioadele respective (van Dam, 2006). La sfârșitul erei Pliocene climatul global a început să se răcească, ducând la începutul glaciațiunilor. Drept urmare diferențierea dintre *P.*



*carpianica* și *P. costobocica* (2.88 milioane de ani în urmă) poate fi legată de aceste evenimente climatice.

#### **4.3.Natura cumulativă a refugiului din Carpați**

Majoritatea speciilor microendemice recent descoperite în Carpați sunt elemente rithrale extrem de specializate concentrate în apropierea izvoarelor stenoterme reci, prezentând un grad important de diversitate încă nedescoperită. Modelul cumulativ și distribuția unor astfel de specii endemice cu distribuție limitată, subliniază importanța masivelor montane în păstrarea diversității acvatice autohtone. Centrele de diversificare în cazul mai multor specii endemice din Carpați sunt partea de nord a Carpaților Orientali (Czarnahora-Maramures-Rodnei), Carpații Meridionali (Munții Bucegi) și Munții Apuseni.

## V. Revizuirea genului *Dicranota* Zetterstedt, 1838 (Diptera, Pediciidae) în regiunea Carpatică

### 1. Remarci generale

Insectele acvatice prezintă un grad înalt de endemism cu caracter insular în sistemul european alpin, cu un număr considerabil de specii criptice, datorită presiunii selective a mediului acvatic și a distribuției fragmentate a habitatelor corespunzătoare (Bálint și colab., 2011). Astfel, sunt necesare revizuirii taxonomice integrative, bazate pe divergențe moleculare și morfologice pentru identificarea acestor grupuri autochtone încă necunoscute (Dénes *et al.*, 2016a).

#### 1.1. Genul *Dicranota* Zetterstedt, 1838

Datorită lipsei reviziilor bazate pe investigații de genetică moleculară, există pentru genul *Dicranota* există un număr mare de scheme de clasificare contradictorii care țin cont doar de caractere morfologice. În acest studiu am folosit clasificarea propusă de Catalogul Pediciidelor lumii (Oosterbroek, 2019), unde un număr de 11 subgenuri sunt recunoscute până acum, din care doar 5 sunt prezente în zona de vest a Palearctului: *Dicranota* Zetterstedt, 1838 cu 4 specii; *Ludicia* Hutson și Vane-Wright, 1969 cu 4 specii; *Paradicranota* Alexander, 1934 cu 29 de specii; *Plectromyia* Osten Sacken, 1869 cu 1 specie și *Rhaphidolabis* Osten Sacken, 1869 cu 1 specie.

##### 1.1.1. Subgenul *Ludicia* Hutson și Vane-Wright, 1969

Subgenul *Ludicia* a fost delimitat pe baza caracteristicilor speciei *Tricyphona* (*Amalopsis*) *lucidipennis* cunoscut astăzi ca *Dicranota* (*Ludicia*) *lucidipennis* (Edwards, 1921). Brindle (1963) a transferat speciile *D. (L.) claripennis* (Verrall, 1888) și *D. (L.) lucidipennis* (Edwards, 1921) în genul *Dicranota* pe baza venației aripilor și ale caracteristicilor larvelor. Vane-Wright (1969) a ridicat acest grup la nivel de subgen, subliniind că pe baza caracteristicilor specimenelor adulte, ele diferă și de speciile *Pedicia* (*Tricyphona*) și de cele *Dicranota sensu lato*.

*Dicranota* (*Ludicia*) *lucidipennis* a fost descrisă de Edwards în 1921 ca fiind *Tricyphona lucidipennis* pe baza culorii generale negre și a morfologiei specimenelor adulte. Mai târziu *Pedicia* (*Tricyphona*) *luteicolor* a fost identificată în Balcani și descrisă de către Alexander în 1975, având o culoare maronie mai deschisă, precum și unele diferențe în structurile genitale masculine. După reexaminarea holotipului mascul al acestei specii, Starý (2007) a considerat că ea este identică cu *D. (L.) lucidipennis*. Recent o formă și mai deschisă la culoare a fost colectată pentru prima dată în Carpați (Kolcsár *et al.*, 2014) arătând necesitatea testării ipotezelor taxonomice a complexului *D. lucidipennis* utilizând o abordare bazată pe markeri moleculari.

### 1.1.2. *Subgenul Paradicranota Alexander, 1934*

Speciile care aparțin subgenului *Paradicranota* se disting de toate celelalte Pediciidae pe baza mărimii mici, adesea între 5-8 mm și antenelor cu doar 10-11 flagelomere scurte în cazul ambelor genuri.

### 1.2. *Obiectivele studiului*

Scopul acestui studiu de caz a fost evaluarea utilității secvențelor *mtCOI* în testarea ipotezele taxonomice din cadrul genului *Dicranota*, concentrându-ne în principal asupra poziției subgenului *Ludicia* în familia Pediciidae. Identificarea diversității ciptice pe baza secvențelor *mtCOI* a fost, de asemenea, un obiectiv important al acestei analize, în special pentru a testa paradigma de refugiu în interiorul refugiului în cazul de *Dicranote*, restrânse în zona Carpatic.

## 2. Materiale și metode

Un număr total de 221 indivizi au fost analizați în acest studiu.

### 2.1. Analiza datelor moleculare

Secvențele au fost obținute din sistemul BOLD sau generate în Institutul de Cercetări Interdisciplinare în Bio-Nano-Științe al Universității Babeș Bolyai prin metoda prezentată în descrierea generală.

#### 2.1.1. *Analize filogenetice*

Relațiile filogenetice dintre subgenurile și speciile din genul *Dicranota* au fost calculate cu algoritmi BI și ML.

În cazul *D. (L.) lucidipennis* pe lângă cei doi arbori, a fost generată și o rețea de haplotipuri cu programul NETWORK, 4.6.1.0 (Bandelt, Forster, și Röhl, 1999).

#### 2.1.2. *Diversitatea genetică moleculară*

Distanțele genetice (*p*-distance) au fost calculate între speciile *Paradicranota*, pentru a verifica diferențierea liniei ABA7291. Această distanță a fost, de asemenea, calculată pentru grupurile majore arătate de arborii filogenetici în cazul speciei *D. (L.) lucidipennis* folosind programul Mega X (Kumar și colab., 2018).

## 2.2. Metode morfologice

### 2.2.1. *Analiza variabilității morfologice*

Aspectul morfologic al indivizilor și caracteristicile morfologice de la nivelul aparatelor genitale ale masculilor au fost examinate prin metodele descrise anterior în capitolul Metode generale.

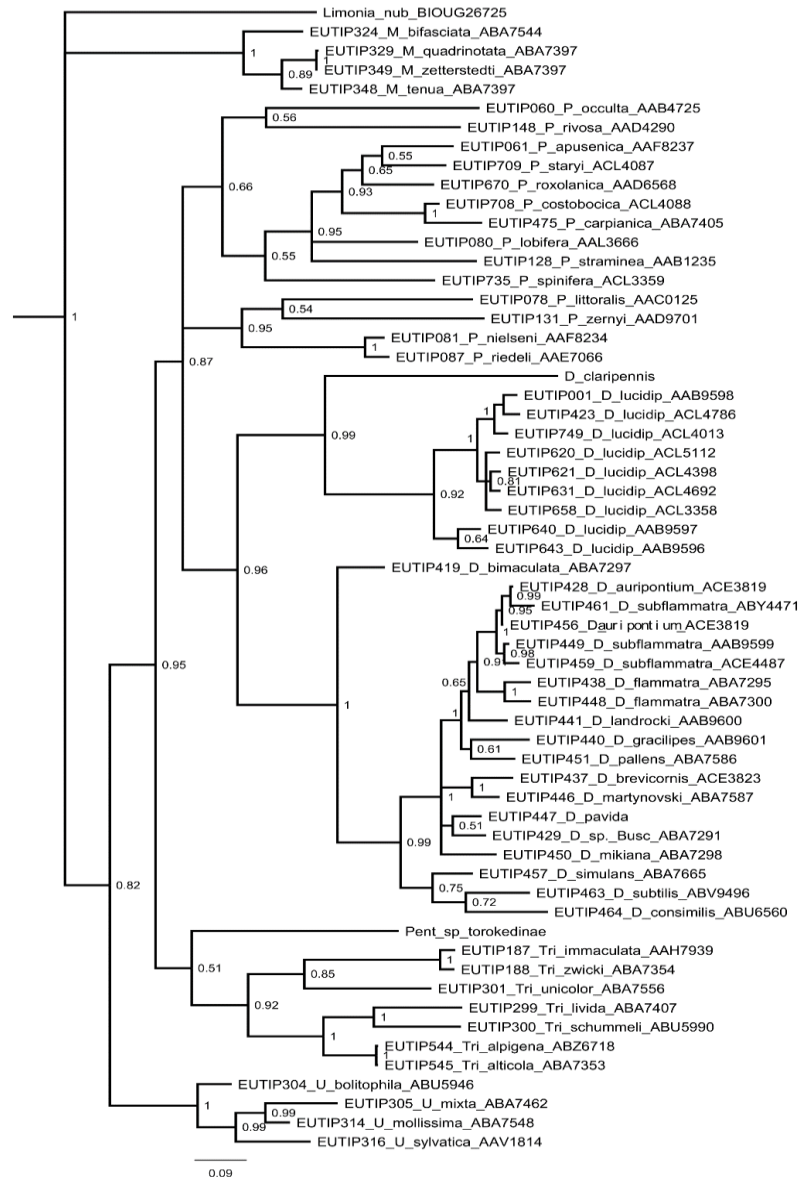
În cazul speciei *D. (L.) lucidipennis* 260 indivizi au fost analizați cu atenție pentru a identifica potențiale variații nerecunoscute până în momentul de față.

### 3. Rezultate

#### 3.1. Filogenia genului *Dicranota* Zetterstedt, 1838

Arborele filogenetic construit cu algoritmul BI (Fig 3) arată că *Ula* este cel mai vechi gen dintre Pediciide. Speciile *Tricyphona* sunt grupate împreună cu o bună susținere statistică (PP = 1), și prezintă afinități genetice față de singura specie *Pentacyphona* din acest studiu. Genul *Dicranota* este un grup monofiletic bine diferențiat (PP = 1), cele trei genuri reprezentate în acest studiu formând și ele grupuri taxonomice definite semnificativ din punct de vedere statistic. *Dicranota claripennis* și *D. lucidipennis*, cele două specii care au reprezentat subgenul *Ludicia*, sunt grupate în cea mai veche linie aparținând *Dicranota* (PP = 0.99). *Dicranota lucidipennis* este reprezentată de 9 linii genetice diferite care vor fi analizate într-o secțiune ulterioară.

Subgenul *Dicranota* este reprezentat în acest studiu numai de *D. bimaculata*, care pare să fie soră a grupului format de speciile *Paradicranota* (PP = 0.99). Datorită divergențelor observate în cazul speciilor *Paradicranota*, un nou arbore a fost generat în care am inclus toate secvențele care aparțin acestui subgen.

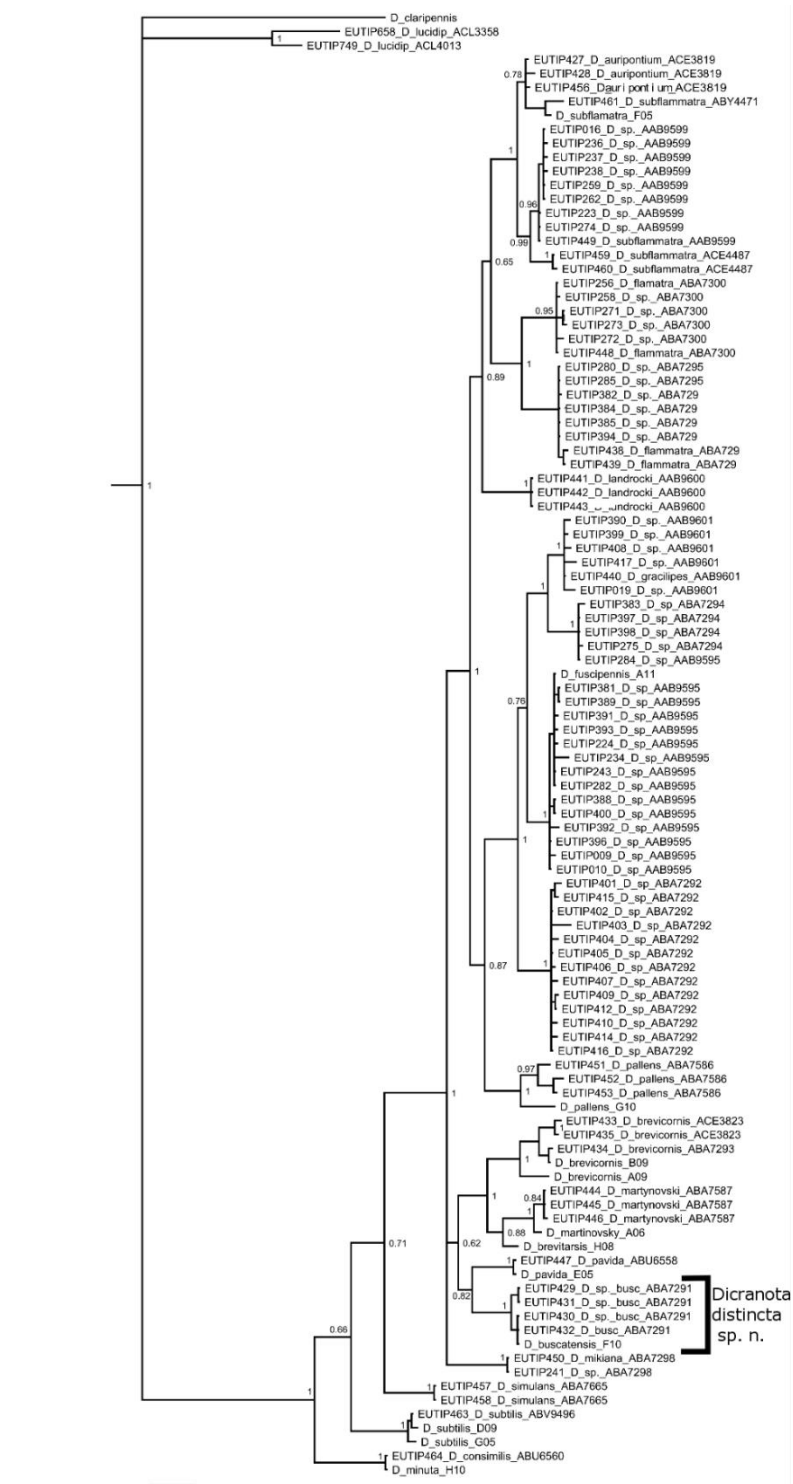


**Fig. 3.** Arborele BI al speciilor *Dicranota* Zetterstedt, 1838, cu includerea celorlalte specii de Pediciidae. Valorile nodurilor reprezintă PP.

### 3.2. Divergențe în subgenul *Paradicranota* și descrierea unei specii noi

#### 3.2.1. Variabilitatea genetică moleculară

Ambii arbori filogenetici (ML și BI-Fig. 4) arată grupuri bine definite și sprijinite pentru toate speciile incluse în acest studiu. Secvențele provenite de la larve (marcate ca: D\_sp\_BIN) sunt grupate împreună cu adulții. Linia ABA7291 este reprezentată de indivizi bine diferențiați dar care nu sunt descriși în literatura de specialitate din punct de vedere morfologic. Această linie este asociată cu cea a speciei *Dicranota pavida* (Haliday, 1833), cu o distanță genetică de 3.75% și cu o distanță medie de 5.64% în comparație cu restul speciilor din acest subgen.



**Fig. 4.** Arborele BI construit pe baza speciilor *Paradicranota*. Valorile nodurilor reprezintă PP

### 3.2.2. Diferențiere morfologică și descrierea speciei noi *Dicranota (P.) distincta*

Analiza morfologică s-a axat pe exemplarele liniei genetice ABA7291, deoarece aceștia au fost descriși până acum, iar analiza lor morfologică a indicat existența unor trăsături distincte. Descrierea caracteristicilor speciei noi este prezentată comparativ cu cea a speciei *D. pavida* pe baza rezultatelor genetice.

***Dicranota (P.) distincta* sp. n.**

Număr de acces BOLD: EUTIP429 – EUTIP432; BIN: ABA7291

*Material:* Holotip mascul, patru paratipuri masculi: România, Stațiunea Muntele Băișorii, 1279 m, Munții Gilău., Buscat, 24. 05. 2008, leg. Keresztes L.

Alte materiale: 4 masculi, : România, Stațiunea Muntele Băișorii, 1520 m, Munții Gilău., Buscat, 12.05.2012, leg. Kolcsár L-P.; 1 mascul, 2 femele, Șesuri, Munții Rodnei, Bistrița Aurie, 17.05.2014, leg. Keresztes L. și Kolcsár L-P.

*Diagnostic:* Specia nouă face parte din subgenul *Paradicranota* pe baza antenelor scurte cu 10 flagellomere rotunjite și a venației aripilor. Specia este cea mai apropiată din punct de vedere molecular de *D. (P.) pavidă* (Haliday, 1833), dar distinctă prin caracterele aparatului genital masculin, mai ales prin forma parginilor celui de al 9-lea tergite și lobul gonostilului (Fig. 5-G).

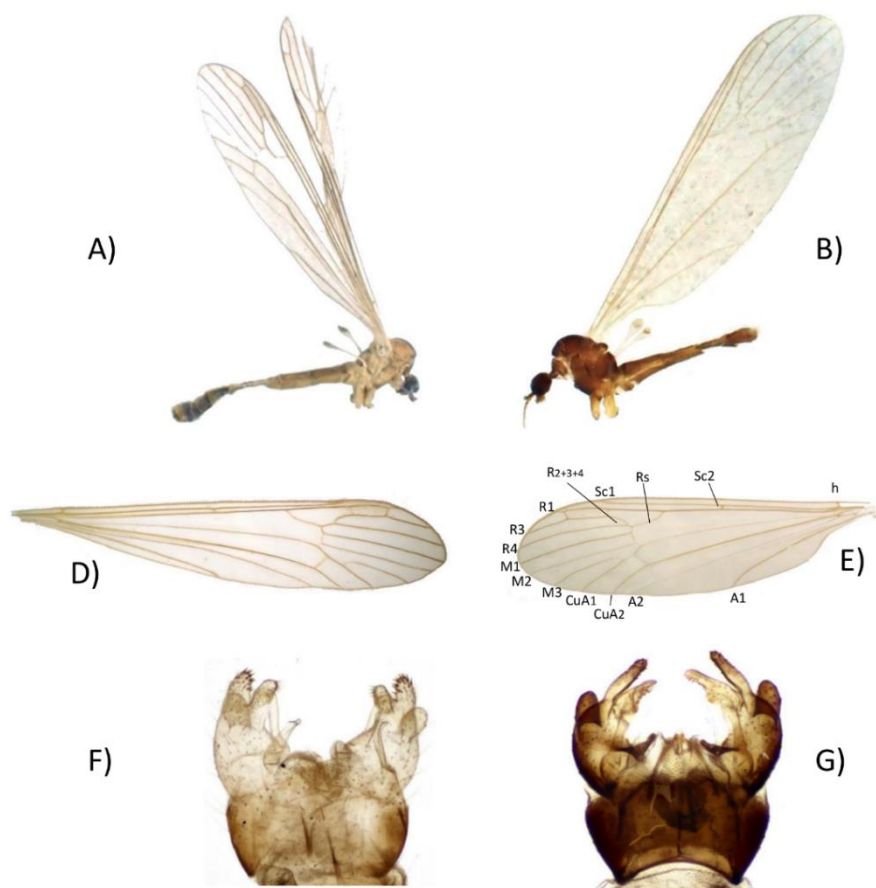
*Descriere:* Masculul: Corpul maro închis uniform, 5.5-6 mm. Capul maro închis, aproape negru. Antenele cu 12 segmente, scapusul și pedicelul maro deschise, flagellomerele maro închise la culoare. Primul segment flagelar lungit, cu o lungime aproape dublă ca comparativ cu cel de al doilea segment. Următoarele segmente aproape globulare.

Toracele maroniu închis. Praescutum cu trei dungi longitudinale distincte, slab strălucitoare, maro închis. Lobul de pe scutum cu două pete descise bine separate. Aripile clare, cu stigma slab evidențiată (Fig. 5-D). Venele de un maroniu deschis. Venația similară cu cea observată la ceilalți membri ai subgenului. Abdomenul maro închis uniform. Aparatul genital al masculilor maro închis, gonocoxitul și gonostilul maro deschis (Fig. 5-D).

Gonocoxitul cu un lob apical bine dezvoltat. Interbaza bine dezvoltată. Gonostylul exterior asemănător unui lob dar alungit, strâns strâns în mijloc și conic la vârf. Gonostylul interior puțin asemănător cu cel al speciei *D. auripontium*, bine dezvoltat, și puternic excizat în mijloc cu o carină oblică ascuțită. Femela: Aspectul general asemănătoare cu cel al masculului. Cerci masivi, maro închis, ușor curbați în sus.

*Etimologie:* Epitetul speciilor *distincta* tradusă ca “foarte diferit” și a fost format după adjectivul Latin *distincta*.

*Ecologia și distribuția:* Specia are o distribuție disjunctă în Munții Apuseni (Buscat) și în Carpații Orientali (Munții Rodnei, Tarcău și Poiana Mărului), ambele refugii glaciare bine cunoscute în cazul insectelor acvatice din Carpați, cu un număr mare de specii endemice. Specimenele aparținând acestei specii au fost colectate la începutul primăverii, imediat după topirea zăpezii la altitudini mari de-a lungul izvoarelor montane reci.



**Fig. 5.** Mascul adult, aripă și aparat genital masculin al speciei *D. pavidus* (A, D și F), și al speciei *D. distincta* (B,E și G). Poza E also arată numele venelor majore ale aripii. Pozele făcute de Lujza Keresztes



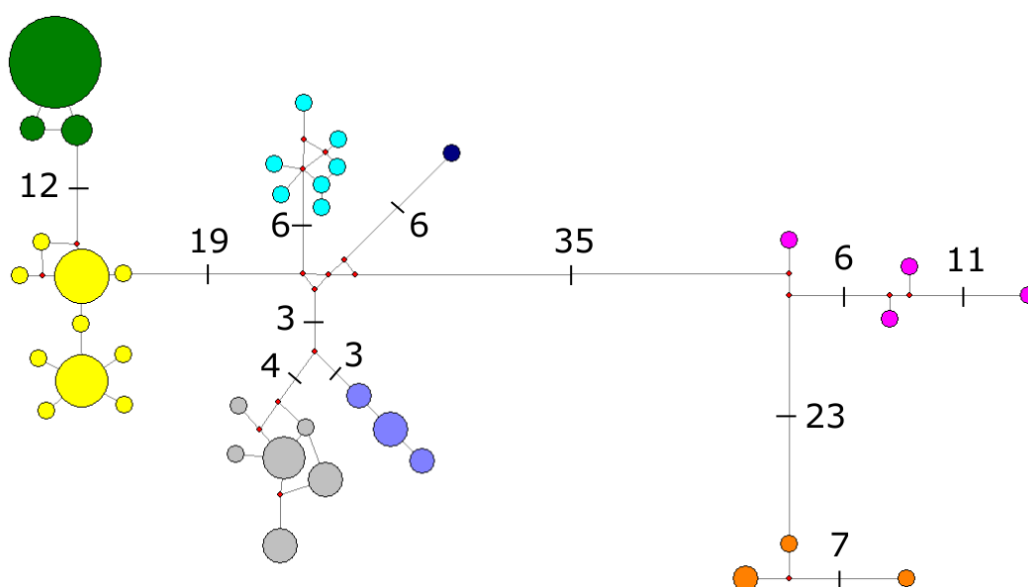
### 3.3. Revizia taxonomică a complexului *Dicranota (Ludicia) lucidipennis* – Descrierea a noi specii *Dicranota (Ludicia)*

#### 3.3.1. Variabilitatea genetică moleculară

Arborii filogenetici generați arată opt linii genetice *D. lucidipennis* bine diferențiate. Grupul cel mai exterior este reprezentat de AAB9596 și AAB9597 din Alpii Germai, Francezi, Elvețieni și Austrieci. Ambele reprezintă linii genetice bine separate, cu o distanță genetică de 5.36%. Restul liniilor formează două grupuri, de asemenea bine diferențiate. Unul reprezentat de două BIN-uri din Munții Carpați și Alpii Italiani, cu un sprijin puternic (PP = 1, BP = 96%; separate de o distanță genetică de 2.76%). Cea de-a doua este reprezentată de patru BIN-uri din Balcani (PP = 0.71, BP = 0.50%; separate de o distanță genetică medie de 2.57%). Diferențierea celor opt linii evolutive este evidențiată și de rețeaua MJN (Fig. 6).

#### 3.3.2. Descrierea unităților taxonomice diferențiate

Analiza morfologică a arătat, de asemenea, caracteristici clar distincte între BIN-urile observate.



**Fig. 6.** MJN; cercurile reprezintă diferitele haplotipuri; numerele de pe ramuri arată pașii mutaționali dintre haplotipuri; culorile reprezintă cele opt BIN-uri: AAB9598 (galben); ACL4786 (verde); ACL5112 (albastru deschis); ACL3358 (albastru închis); ACL4692 (mov); ACL4398 (gri); AAB9596 (portocaliu); AAB9597 (roz).

### **Redescrierea speciei *Dicranota (Ludicia) lucidipennis* (Edwards, 1921)**

*Material:* AAB9598

*Descrierea:* Capul gri închis cu antene aproape la fel de lungi ca toracele, având 17 segmente negre, al doilea segment mai puțin mai deschis la culoare. Toracele gri, praescutum cu patru dungă negre strălucitoare, cu perechea din mijloc apropiată sau parțial fuzionată, scutellum puțin mai deschis. Abdomenul închis, partea ventrală a aparatului genital puțin mai deschisă la culoare, maronie, roșie sau gălbuie (Fig. 7-A). Aripile aproape clare, destul de larg, unghiul anal bine marcat (Fig. 7-D).

Pe jumătatea distală, un câmp păros este vizibil de-a lungul venelor (lipsește la *D. (L.) claripennis*). Lungimea aripii de 10-12 mm. Picioarele maronii, cu femurul mai deschis în partea distală. Partea distală a celui de al 9lea tergite mai mult sau mai puțin dreaptă, fără colțuri bine dezvoltate. Gonocoxitul are spinule pe lobul apical dorsal. Vârful interbazei rotunjit și curbat spre interior terminându-se într-un ghimpe orientat puțin în sus. (Fig. 7-C). Gonostilul exterior asemănător unui lob, păros, gonostilul interior digitiform (Fig. 7-B).

*Ecologie și distribuție:* Forma "*lucidipennis*" este larg răspândită în partea centrală și vestică a Europei.

### ***Dicranota (Ludicia) luteipennis* (Alexander, 1975), stat. n.**

*Pedicia (Tricyphona) luteicolor* Alexander, 1975

*Material:* Liniile Balcanice; BIN: ACL5112, ACL4692, ACL4398, ACL3358.

*Descriere:* Aspect general asemănător cu cel al *D. (L.) lucidipennis*, dar mai mică (7-9 mm) și de culoare maroniu deschis. Capul gri gălbui, antenele cu 16 segmente, scapul și pedicelul maroniu deschis, restul segmentelor au culoare maro închis (Fig. 7-E). Praescutum maroniu deschis, cu dungă de mijloc mai închise la culoare roși-maronii lungi, dungile laterale mai scurte, scutum galben. Aripă înguste și mai scurte decât cele ale speciei *D. (L.) lucidipennis*, gălbuie, cu venație galben închisă (Fig. 7-H). Lungimea aripilor 8-9 mm. Picioare galbene închise la culoare la capetele tibiei. Abdomenul maroniu deschis, mai deschis la culoare în partea centrală. Aparatul genital închis la culoare, cu capătul distal drept, fără colțuri laterale evidente. Gonocoxit cu un lob apical bine dezvoltat. Gonostilul exterior asemănător unui lob, gonostilul interior în formă de lamă, aplatizată lateral cu foarte mici setae la marginea inferioară (Fig. 7-F). Interbaza ovală terminându-se într-un ghimpe orientat puțin în jos (Fig. 7-G).

***Dicranota (Ludicia) praedicta sp. n.***

BIN: ACL4786.

*Material:* Holotip mascul, doua paratipuri masculi.

*Locația de origine:* România, Păltiniș, Bătrâna și Munții Rodnei., 1657 m, 2014.06.01. leg. Keresztes L.

*Diagnostic:* Similar speciei *D. (L.) luteipennis* dar se diferențiază printr-o colorație galbenă și prin forma aparatului genital masculin, mai ales prin forma interbazei.

*Descriere:* Masculul are o lungime de 8 mm. Capul mai întunecat contrastează cu corpul gălbui (Fig. 7-I). Capul gri, partea anterioară a vertexului gri închis, partea posterioară mai deschisă, dar cu o formă închisă în zona centrală. Antenele cu 16 segmente. Scapus maro închis, pedicel maro deschis, restul segmentelor negre. Toracele galben deschis. Praescutum cu trei dungi maro, cea din mijloc este mai lungă și mai lată, cele laterale mai scurte, ovale, apropiate de partea posterioară. Pleura galbenă. Aripile de 9 mm, gălbui, cu venație galben închisă (Fig. 7-L). Picioare cu coxa galbenă, femurul galben cu capete maronii închise. Abdomen portocaliu gălbui, mai închis la capăt. Aparatul genital similar cu cel al speciei *D. (L.) luteipennis*, dar diferit prin forma interbazei, aceasta având forma unui cap de câine (Fig. 7-K). Femela: necunoscută.

*Entomologia:* Epitetul *praedictus* poate fi tradus ca “prezicere” și a fost format pe baza adjaectivului *Latin praedictus*.

*Ecologia și distribuția:* Specia este distribuită în câteva enclave restrânse din Carpați, în Munții Rodnei și Cibin, ambele refugii glaciare bine cunoscute în cazul insectelor acvatice din Carpați, cu un număr mare de specii endemice. Indivizii acestei specii au fost colectați la începutul verii la altitudini mari.

***Dicranota (Ludicia) repentinus sp. n.***

BIN: AAB 9596, AAB 9597.

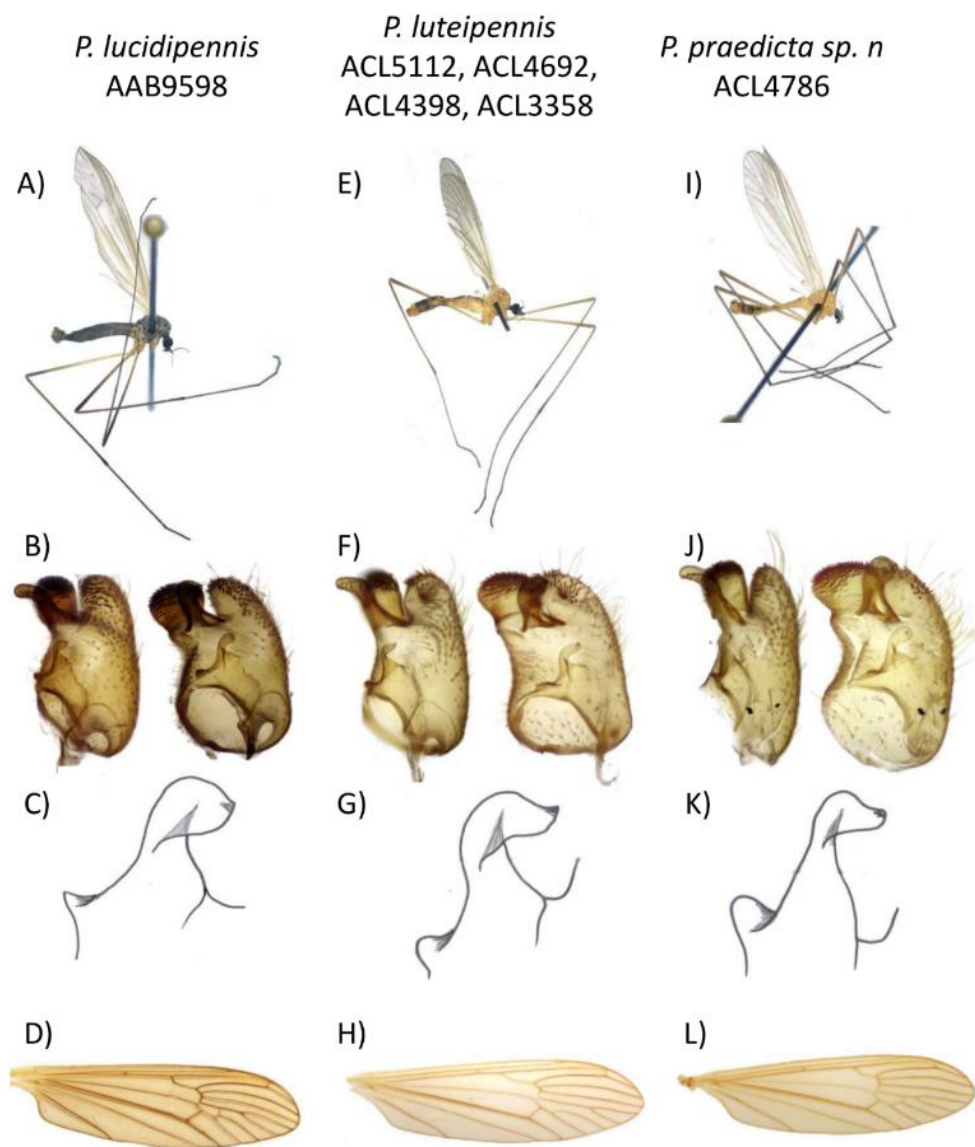
*Material:* Holotip mascul, 1 paratip mascul.

*Locația de origine:* La Grande Croix, Parcul Național Vanoise, Rhone-Alps, Franța, 1727 m, 2012.06.30. leg. M. Bálint.

*Diagnostic:* Asemănător cu *D. (L.) lucidipennis*, dar diferit prin culoarea maronie și prin forma ovală a interbazei.

*Descriere:* Masculul are lungimea de 10 mm. Capul negru-gri. Antenele cu 17 segmente. Scapul maro închis, pedicel maroniu, flagele negre. Toracele galben maroniu. Praescutum cu patru dungi maronii, dungile de mijloc sunt mai mult sau mai puțin unite, cele două din lateral, mai scurte, triunghiulare apropiate de partea posterioară. Aripa de 10 mm, transparentă, cu venație maronie. Picioare cu coxa maro deschisă, femurul maroniu, mai închis la capete. Abdomenul roșu-portocaliu, Ultimele două segmente de culoare maro închis. Aparatul genital galben, asemănător

cu cel al speciei *D. (L.) lucidipennis*, dar diferă în forma interbazei, care are forma unui cap de pasăre. Femela: necunoscută.



**Fig. 7.** Mascul adult *P. lucidipennis*, *P. luteipennis* and *P. praedicta sp. n* (A, E, I), gonocoxit și gonostil (B, F, J) interbaza (C, G, K), aripa (D, H, L). Pozele și desenul create de Lujza Keresztes.

*Entomologia:* Epitetul *repentinus* se traduce ca “neașteptat” și a fost format pe baza adjectivului Latin *repentinus*.

*Ecologia și distribuția.* Specia a fost colectată în Parcul Național Vanoise, în Alpii Francezi la 1727 m la începutul verii.

## 4. Discuții

### 4.1. Poziția taxonomică a subgenului *Ludicia* Hutson și Vane-Wright, 1969 pe baza secvențelor markerului *mtCOI*

Acesta este primul studiu care analizează poziția subgenului *Ludicia* cu metode moleculare. Pe baza secvențelor markerului *mtCOI*, aceasta face parte din genul *Dicranoata* (PP = 96), dar formează un grup distinct, diferențiat, iar diferențele morfologice evidente a acestor specii sugerează necesitatea unei revizuirii taxonomice mai aprofundate, cu includerea tuturor subgenurilor cu o abordare bazată pe mai mulți markeri.

### 4.2. Diversitate criptică și rolul Carpaților și a Regiunii Balcanice ca refugiu și centru de speciație

*Dicranota (L.) lucidipennis* arată tipare asemănătoare cu alte grupuri acvatică și semi-acvatică, cu distribuție largă (Schmitt și Varga, 2012). Prezența speciei în Apuseni și în Carpații Orientali sugerează cel puțin un posibil refugiu al acestei specii undeva în partea de nord a bazinului Transilvaniei. Prezența acestui refugiu este confirmată și de specia *Paradicranota* nou descrisă, *Dicranota (P.) distincta* care este distribuită în regiunea Apuseni și Rodnei.

*Dicranota (L.) praedicta* sp. n. este, de asemenea, endemică și este întâlnită în Carpații Orientali și în partea estică a Carpaților Meridionali. Distanța genetică mică și similaritatea morfologică dintre *D (L.) lucidipennis* și *D. (L.) praedicta* sp. n. sugerează că procesul de speciație a avut loc cel mai probabil cândva în timpul glaciațiunilor, la fel ca în cazul speciilor *Pedicia (Crunobia) costobocica* Kolcsár, Keresztes și Dénes 2016 și *Pedicia (Crunobia) carpianica* Kolcsár, Keresztes și Dénes 2016 (Dénes și colab., 2016a,b). Toate aceste specii prezintă modele deja observate la alte Diptere (Ujvárosi și Bálint, 2012) și la Trichoptere (Pauls și colab., 2009) confirmând importanța sistemului montan carpatin ca refugiu și centru de speciație pentru diversitatea acvatică și semi-acvatică.

## VI. Concluzii finale

Această teză oferă dovezi cu privire la importanța Munților Carpați ca fiind unul dintre hotspoturile de biodiversitate ale Europei. Analizele morfologice și de genetică moleculară efectuate în cadrul acestor studii a condus la descoperirea și descrierea a șase specii noi, dintre care cinci sunt endemice în Carpați. Toate rezultatele acestei teze confirmă rolul Carpaților ca centru de specie, și datorită istoriei evolutive îndelungate între grupurile analizate, aceste rezultate evidențiază caracterul de refugiu cumulativ al regiunii.

Rezoluția datelor genetice (*mtCOI*) a fost suficient de bună pentru a clarifica incertitudinile cu privire la poziția subgenului *Lucidia*. Analizele genetice comparative au ilustrat faptul că aceasta reprezintă o ramură înrudită cu toate celelalte specii *Dicranota*.

Modelul cumulativ al diversității și al distribuției speciilor endemice investigate în această teză, subliniază importanța zonelor montane în conservarea diversității acvatice autohtone. Centrele specifice pentru diversificarea mai multor specii endemice din Carpați se află în partea de nord a Carpaților Orientali (Chornohora-Maramureș-Rodnei), în Carpații Meridionali (Bucegi), și în Munții Apuseni. Lucrarea de față subliniază importanța ridicată a habitatelor acvatice reci-stenoterme din munții Carpați în conservarea diversității criptice. Ca urmare, viitorul acestor specii endemice extrem de specializate va depinde de gestionarea corespunzătoare a acestor ecosisteme unice în Europa

## Referințe

- Alexander CP. 1975.** New or little-known crane flies from Iran. I. (Diptera: Tipulidae). *Journal of the New York Entomological Society* **82**: 279–284.
- Alexander CP & Bayers GW. 1981.** Tipulidae. In: McAlpine JF, Peterson B V., Shewell GE, et al., eds. *Manual of Nearctic Diptera. Volume 1*. Ottawa, Ontario: Institute, Biosystematics Research, 153–190.
- Avise JC. 2009.** Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* **36**: 3–15.
- Bálint M, Ujvárosi L, Theissinger K, Lehrian S, Mészáros N & Pauls SU. 2011.** The Carpathians as a Major Diversity Hotspot in Europe. In: Zachos FE, Habel JC, eds. *Biodiversity Hotspots*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 189–205.
- Bandelt HJ, Forster P & Röhl A. 1999.** Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 37–48.
- Bonfield JK, Beal KF, Betts MJ & Staden R. 2002.** Trev: A DNA trace editor and viewer. *Bioinformatics* **18**: 194–195.
- Brindle A. 1963.** The natural groups of the British Pediciini (Dipt., Tipulidae). *Entomologists Monthly Magazine* **98**: 234–237.
- Corander J, Sirén J & Arjas E. 2007.** Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computational Statistics* **23**: 111–129.
- van Dam JA. 2006.** Geographic and temporal patterns in the late Neogene (12–3 Ma) aridification of Europe: The use of small mammals as paleoprecipitation proxies. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **238**: 190–218.
- Dénes AL, Kolcsár LP, Török E & Keresztes L. 2016a.** Phylogeography of the micro-endemic *Pedicia staryi* group (Insecta: Diptera): evidence of relict biodiversity in the Carpathians. *Biological Journal of the Linnean Society* **119**: 719–731.
- Dénes AL, Kolcsár LP, Török E & Keresztes L. 2016b.** Taxonomic revision of the carpathian endemic *Pedicia (Crunobia) staryi* species–group (diptera, pediciidae) based on morphology and molecular data. *ZooKeys* **2016**: 81–104.
- Dienske JW. 1987.** An illustrated Key to the Genera and Subgenera of the Western Palaearctic Limoniidae (Insecta: Diptera), Including a Description of the External Morphology. *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde* **A-409**: 1–52.
- Drummond AJ & Rambaut A. 2007.** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* **7**: 214.
- Excoffier L & Lischer HEL. 2010.** Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**: 564–567.

- Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM. 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 M, Hoeh W, Lutz R & Vrijenhoek R. 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **3**: 294–299.
- Habel J & Assmann T. 2010.** *Relict species: phylogeography and conservation biology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Hall TA. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*: 95–98.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL & DeWaard JR. 2003a.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **270**: S596–S599.
- Keresztes L, Kolcsár LP, Török E & Dénes AL. 2011.** The spring dwelling dipteran genus *Pedicia* Latreille in the Carpathian area: diversity, divergence and distribution – case studies. In: Ujvárosi L, Markó B, eds. *The Carpathians as speciation centres and barriers: from case studies to general patterns*. Cluj-Napoca, Romania: Cluj University Press, 83–112.
- Kolcsár LP, Dénes AL, Török E & Keresztes L. 2014.** Comparing morphological diversity with genetic structuring in the case of the *Dicranota (Ludicia) lucidipennis* (Edwards, 1921) (Diptera: Pediciidae). *8th International Congress of Dipterology, Potsdam, Abstract volume*.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K. 2018.** MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**: 1547–1549.
- Kvaček Z, Kováč M, Kovar-Eder J, Doláková N, Jechorek K, Parashiv V, Kováčová M & Ľubomír S. 2006.** Miocene evolution of landscape and vegetation in the Central Paratethys. *Geologica Carpathica* **57**: 295–310.
- Librado P & Rozas J. 2009.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**: 1451–1452.
- Oosterbroek P. 2006.** *The European families of the Diptera. Identification, diagnosis, biology*. Utrecht: KNNV-Uitgeverij.
- Oosterbroek P. 2019.** Catalogue of the Craneflies of the World (Diptera, Tipuloidea: Pediciidae, Limoniidae, Cylindrotomidae, Tipulidae).
- Papadopoulou A, Anastasiou I & Vogler AP. 2010.** Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 1659–1672.
- Pauls SU, Theissinger K, Ujvarosi L, Bálint M & Haase P. 2009.** Patterns of population



structure in two closely related, partially sympatric caddisflies in Eastern Europe: historic introgression, limited dispersal, and cryptic diversity 1. *Journal of the North American Benthological Society* **28**: 517–536.

**Petersen MJ, Bertone MA, Wiegmann BM & Courtney GW. 2010.** Phylogenetic synthesis of morphological and molecular data reveals new insights into the higher-level classification of Tipuloidea (Diptera). *Systematic Entomology* **35**: 526–545.

**Pop V. 1997.** Earthworm-vegetation-soil relationships in the Romanian Carpathians. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 223–229.

**Pop AA, Pop V & Csuzdi C. 2010.** Significance of the Apuseni Mountains (the Carpathians) in the origin and distribution of Central European earthworm fauna (Oligochaeta, Lumbricidae). *Advances of the 4th International Oligocheta Taxonomy Meeting Supplement*: 89–110.

**Ratnasingham S & Hebert PDN. 2013.** A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. *PLoS One* **8**: e66213.

**Ronikier M. 2011.** Biogeography of high-mountain plants in the Carpathians: an emerging phylogeographical perspective. *Taxon* **60**: 373–389.

**Sato M & Sato K. 2013.** Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* **1833**: 1979–1984.

**Savchenko EN. 1986.** Limoniid-flies (Introduction and subfamilies of Pediciinae and Hexatominae). *Fauna Ukrainy* **14**: 1–380.

**Schmitt T & Varga Z. 2012.** Extra-Mediterranean refugia: The rule and not the exception? *Frontiers in Zoology* **9**: 22.

**Sedivá A, Janko K, Slechtová V, Kotlík P, Simonović P, Delic A & Vassilev M. 2008.** Around or across the Carpathians: colonization model of the Danube basin inferred from genetic diversification of stone loach (*Barbatula barbatula*) populations. *Molecular Ecology* **17**: 1277–1292.

**Starý J. 2007.** Nomenclatural changes in West Palaearctic Limoniidae and Pediciidae (Diptera), II. *Casopis Slezskeho Musea v Opava* **56**: 23–36.

**Steel M & McKenzie A. 2001.** Properties of phylogenetic trees generated by yule-type speciation models. *Mathematical Biosciences* **170**: 91–112.

**Sujevan R & Hebert P. 2007.** BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*: 355–364.

**Ujvárosi L. 2005.** Limoniidae and Pediciidae (Insecta: Diptera) assemblages along mountainous streams: additions to assess the biodiversity in wet habitats in Carpathians, Romania. *Acta Biologica Debrecina Oecologica Hungarica* **13**: 233–248.

- Ujvárosi L & Bálint M. 2012.** Discovery of the second European *Amalopsis* species: an integrative survey of the widespread *Pedicia* (*Amalopsis*) *occulta* (Meigen, 1830)(Insecta, Diptera, Pediciidae). *Zootaxa* **28**: 1–28.
- Ujvárosi L, Bálint M, Schmitt T, Mészáros N, Ujvárosi T & Popescu O. 2010.** Divergence and speciation in the Carpathians area: patterns of morphological and genetic diversity of the crane fly *Pedicia occulta* (Diptera: Pediciidae). *Journal of the North American Benthological Society* **29**: 1075–1088.
- Ujvárosi L & Starý J. 2003.** A new *Pedicia* (*Crunobia*) from Romania and other four species new to the countrys fauna (Diptera: Pediciidae). *Entomologica Romanica* **7**: 45–50.
- Varga Z. 2010.** Extra-Mediterranean Refugia, Post-Glacial Vegetation History and Area Dynamics in Eastern Central Europe. In: Habel JC, Assmann T, eds. *Relict Species: Phylogeography and Conservation Biology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 57–117.
- Wilson JJ. 2012.** DNA Barcodes for Insects. In: Kress WJ, Erickson DL, eds. *DNA Barcodes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Springer Science+Business Media, 17–46.