

**Relicte, martori ai unor procese evolutive complexe ale ecosistemelor montane din Carpați: procese istorice și tendințe viitoare"** cod proiect: PN-II-ID-PCE-2012-4-0595,  
nr. contract: 50/ 02.09.2012

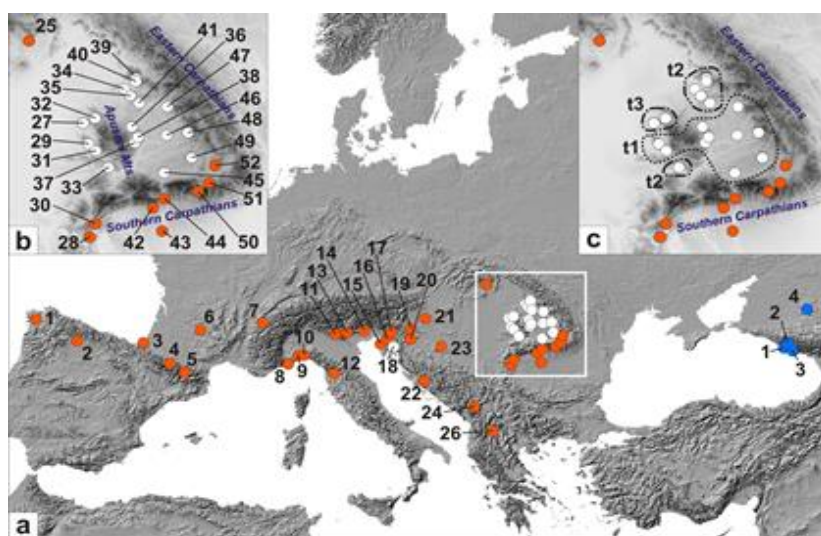
**Rezultate științifice sintetizate pentru anul 2014**

În conformitate cu obiectivele și activitățile asumate pentru anul 2014 au fost obținute următoarele rezultate prevăzute în planul de realizare a proiectului pentru anul în curs. Rezultatele vor fi sintetizate după cum urmează:

**1. Speciile de plante ținte**

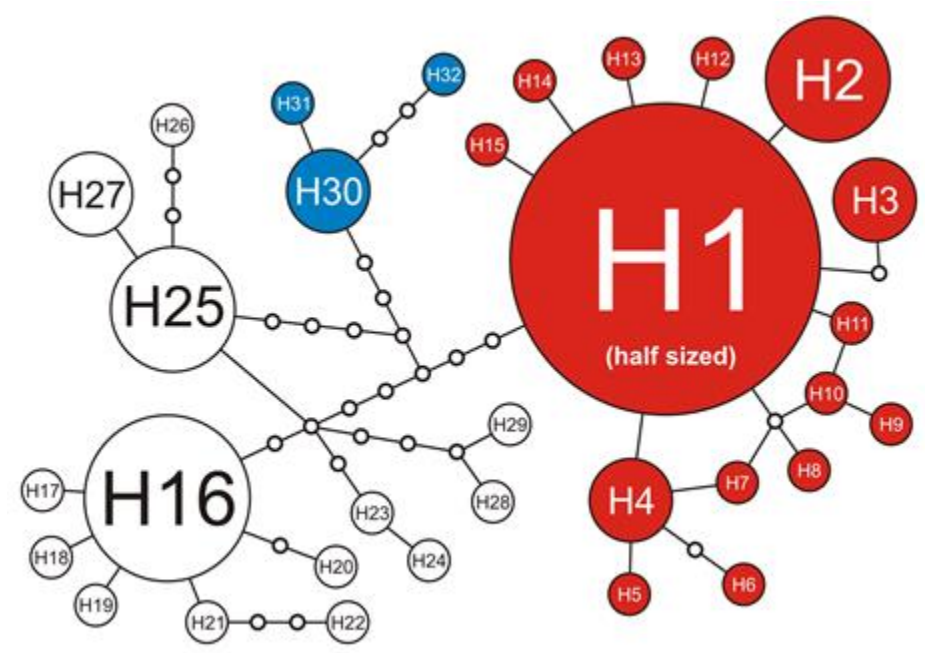
Studiile noastre recente de filogeografie moleculară au confirmat statutul de relict terțiar al liniei genetice aparținătoare speciei *Erythronium dens-canis* în România. Acest fapt ne-a determinat să includem acest taxon pe lista speciilor de plante țintă în cadrul proiectului (pe lângă speciile *Hepatica transsilvanica* și *Campanula carpatica*). Cu toate că specia *E. dens-canis* are o distribuție vastă în partea sudică a Europei, linia genetică transilvană a speciei recent descoperită poate fi interpretată drept o entitate cu caracter endemic și relictar.

În cursul anului 2014 în cadrul unei colaborări internaționale am realizat o eșalonare a speciei *E. dens-canis* în arealul speciei colectând date genetice de la un număr de 52 de populații din Europa și patru populații ale speciei înrudite *Erythronium caucasicum* (specia din urmă fiind folosită ca *outgroup* în studiu) (Fig. 1). Pentru analiza filogeografică am secvențiat câte două regiuni necodificatoare de plastidă din câte un individ al fiecărei populații eșantionate. Cele două regiuni selectate (spațiatorii intergenerici (IGS) rpl32-trnL și rps15-ycf1) au fost alese în urma testării a opt markeri cloroplastici (rpl32-trnL IGS, rps15-ycf1 IGS, ycf1-rrn5 IGS, ndhA Intron, ndhG-ndhI IGS, psaC-ndhG IGS, ccsA-ndhD IGS, ndhF-rpl32 IGS) pe baza studiului realizat de Scarcelli et al. (2011). Am determinat haplotipurile pe baza analizei combinate ale secvențelor aparținând celor două regiuni, iar după aceea am generat rețele și filogenii ale haplotipurilor. Reconstrucția rețelei haplotipurilor pe baza parcimoniei maxime a dat trei clusteri (Fig. 2): 1) un cluster mai omogen care conține haplotipuri provenite din plante colectate în marea parte a arealului speciei cu excepția Transilvaniei. Acest cluster are o structură tipică de stea în care haplotipul cel mai comun central este legat prin puține mutații cu haplotipuri mai rare. 2) al doilea cluster este mult mai structurat față de clusterul prezentat anterior și conține haplotipuri provenite aproape în exclusivitate din Transilvania; 3) iar al treilea cluster conține haplotipuri din Caucaz (corespunzătoare taxonului *E. caucasicum*).

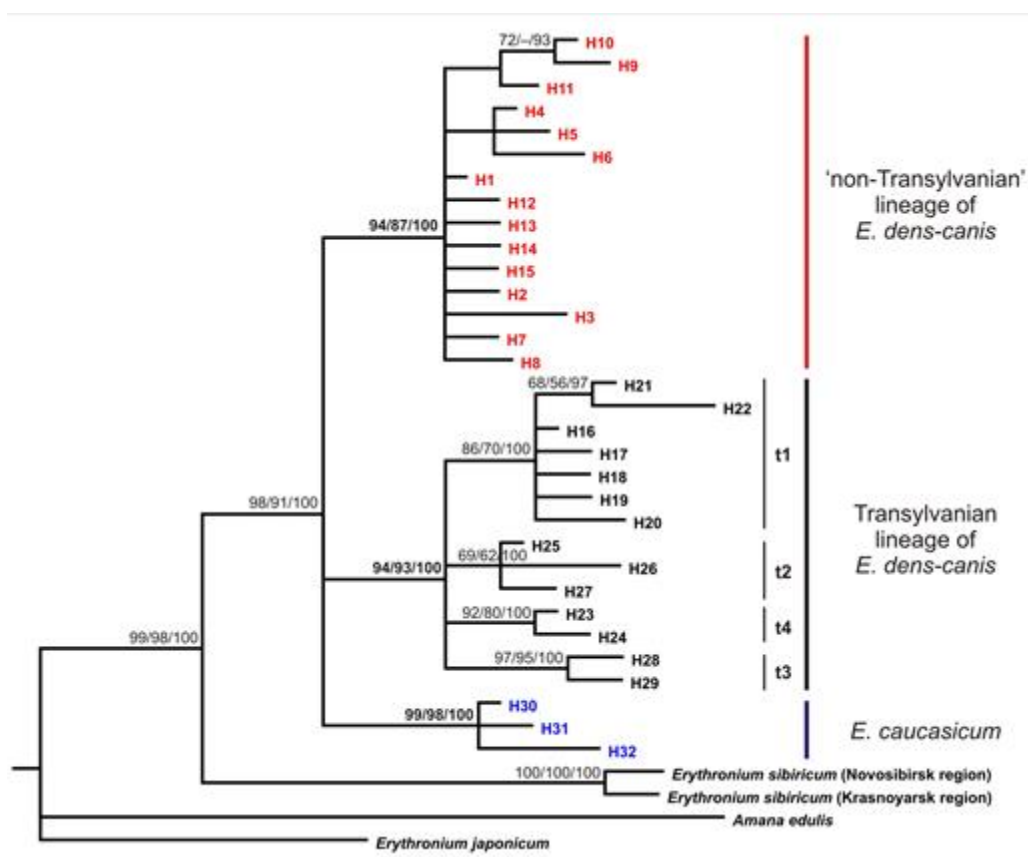


**Fig. 1.** Originea geografică a probelor analizate în cadrul studiului filogeografic pe *E. dens-canis* (a, b). Culoarea cerculețelor indică linia genetică căreia îi aparțin probele analizate (roșu: linia 'non-transilvană' a

speciei *E. dens-canis*, alb: linia transilvană a speciei *E. dens-canis* și albastru: *E. caucasicum*). c. Distribuția probelor aparținând celor trei subclade (t1, t2, t3) ale cladei transilvane de *E. dens-canis* (Figură preluată după Bartha et al. (2014b))



**Fig. 2.** Rețeaua de haplotipuri de *E. dens-canis* generată pe baza parcimoniei maxime. Codurile de culoare corespund celor din Fig. A. Mărimea cercurilor este proporțională cu numărul probelor pe care ele le conțin. Cercurile mici (fără număr) reprezintă haplotipuri ipotetice sau ne-eșantionate. (Figură preluată după Bartha et al. (2014b))

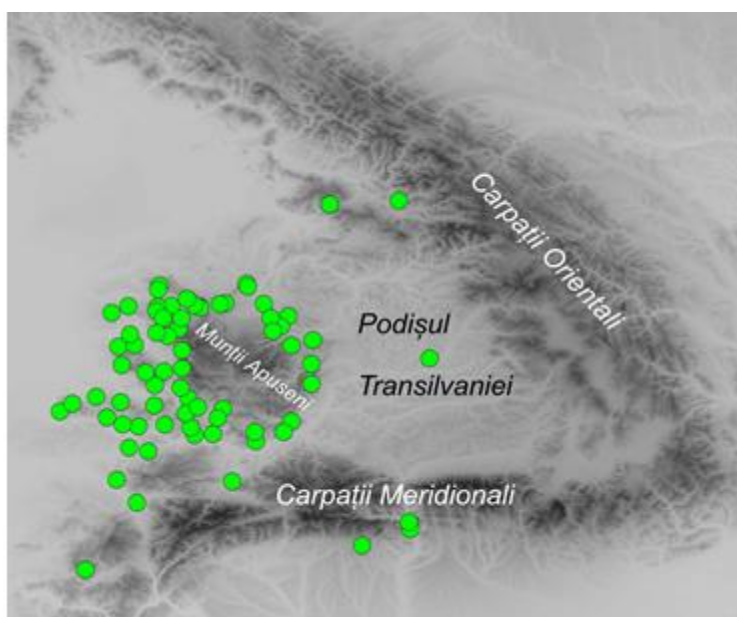


**Fig. 3.** Arborele filogenetic consens *majority-rule* al haplotipurilor de *E. dens-canis* generat pe baza metodei Bayesiene. Numerele adiacente ramurilor reprezintă procente Bootstrap (*Maximum Likelihood* și *Maximum Parsimony*) și probabilități Bayesiene ulterioare. (Figură preluată după Bartha et al. (2014b))

Clusterii întâlniți în cazul rețelei au fost redați în formă de clade de către analiza filogenetică a haplotipurilor (Fig. 3). Cladele sunt bine susținute statistic însă gradul de înrudire dintre ele a rămas nerezolvată întrucât ele formează o politomie. În timp ce clada transilvană a haplotipurilor conține patru sub-clade susținute statistic de la moderat la bine, clada non-transilvană a haplotipurilor nu prezintă nici o structurare semnificativă.

Putem afirma deci că evoluția genului *Erythronium* din Europa a fost determinată de alopatrie în care atât barierele climatice cât și cele geografice au contribuit la formarea liniilor genetice. În timpul perioadelor glaciare Carpații Meridionali și Orientali – fiind parțial glaciați (Ronikier 2011) – au acționat ca bariere fizice, iar Câmpia Panonică a acționat ca barieră climatică pentru formarea cladei transilvane a speciei mezofile *E. dens-canis*. Gradul de înrudire nerezolvată între cele trei clade sugerează că ele s-au desprins demult, probabil în Terțiarul târziu. Această afirmație este susținută și de ceasuri moleculare generate pe baza diferitelor rate de substituții nucleotidice (Bartha et al. 2014b).

Subcladele cladei transilvane indică scenariul 'refugiu în refugiu' în care M-ții Apuseni par să aibă un rol de partiționare (Fig. 1/c). Pentru testarea acestei ipoteze în primăvara anului 2014 am efectuat o eșantionare mai densă a speciei *E. dens-canis* în jurul Munților Apuseni (Fig. 4). Obiectivele acelei cercetări a fost 1) delimitarea potențialelor microrefugii glaciare în partea estică a Bazinului Carpatic, 2) identificarea populațiilor cu un grad înalt de diversitate genetică (relevante pentru conservare), 3) evaluarea distribuției geografice a subcladelor t1, t2, t3 și să investigarea unor subclade adiționale care pot determina unități de conservare filogenetică (*phylogenetic conservation units*) și 4) revizuirea statutul taxonomic al taxonului *E. dens-canis* var. *niveum*.



**Fig. 4.** Locația populațiilor de *E. dens-canis* din care s-au prelevat probe în primăvara anului 2014.

Prelevarea probelor de *E. dens-canis* a fost întreprinsă între 01.03.–18.05.2014. S-a pus accent pe colectări pe întregul perimetru al Munților Apuseni, și în alte puncte din Bazinul Carpatic. S-a colectat un număr de 15 probe/populație, respectiv fragmente de frunze din 15 indivizi, aflați la o distanță minimă de 15 m. Probele au fost conservate și păstrate în silicagel. S-au prelevat probe aparținând la 72 de populații (Fig. 4). S-a făcut izolarea ADN genomic dintr-un exemplar din fiecare populație. S-a folosit cca. 20 mg material uscat, și s-a lucrat cu kitul Analytic Jena, conform protocolului. Concentrațiile de ADN obținute au fost între 100-400 ng/μl. Izolarea ADN a fost urmată de amplificarea regiunilor de plastidă *rpl32-trnL* și *rps15-ycf1* și verificarea produșilor PCR pe gel de agaroză. Toate cele 72 probe au dat benzi clare pe gel. Produșii PCR au fost trimiși pentru secvențare la MacroGen Inc. Secvențele obținute sunt de bună calitate și analiza lor este în curs de procesare. Analiza unui singur individ din fiecare populație eșantionată va furniza informații referitoare la poziția filogenetică a populațiilor. Pe baza acestei informații vom selecta populații din care vom analiza în decursul anului 2015 mai mulți indivizi cu scopul evaluării gradului de variabilitate

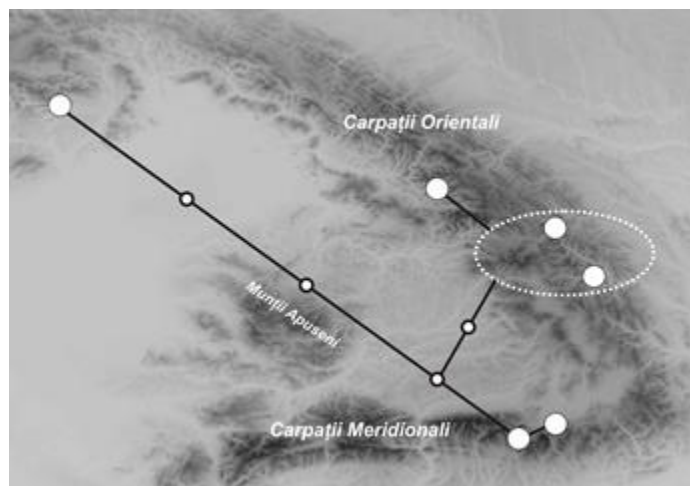
genetică a populațiilor. Concomitent cu amplificarea a celor două regiuni de plastidă, am testat 'amplificabilitatea' a 11 markeri nucleari testați recent și de Day et al. (2014) într-un studiu de filogenie moleculară la genul *Fritillaria*. Dintre cei 11 combinații de amorse amplificarea regiunii RPB2 (polimeraza ARN II) a dat benzi clare pe gel de agaroză. Secvențarea a câtorva ampliconi de RPB2 de *Erythronium* este în curs de procesare iar potrivirea acestei regiuni ca marker de filogeografie la această specie urmează să fie testată după ce primele secvențe ne vor sta la dispoziție.

Pentru a doua specie țintă – *Hepatica transsilvanica* – a fost necesară clarificarea statutului speciei înainte de studiul filogeografic propriu zis. Deși considerat ca fiind o specie cu caracter relictar, pe baza caracterelor morfologice și a numărul de cromozomi, *Hepatica transsilvanica* a fost demult suspectat ca fiind un hibrid alotetraploid al speciilor *H. nobilis* și *H. falconeri* însă această ipoteză nu a fost încă testată folosind metode moleculare adecvate. Pentru acest scop am secvențiat regiunea genică nucleară *low-copy* At103 din trei probe ale speciei (provenite din trei populații diferite aflate în zonele îndepărtate ale arealului speciei) respectiv din câte o probă ale speciilor potențiale de părinte *H. nobilis* și *H. falconeri*. S-au putut observa două tipuri de variații nucleotidice în alinierea secvențelor în ceea ce privește *H. transsilvanica*. Una care este specifică speciei (fiind consistentă între populații: pozițiile 82, 106, 211, 289 din Tabelul 1) iar a doua care diferă între populațiile speciei (pozițiile 73, 133, 181, 253 din Tabelul 1). Pozițiile nucleotidice din secvențele *H. transsilvanica* care prezintă un *pattern* aditiv între speciile părinte – așa zise vârfuri duble în cromatogramele secvențelor – sunt consistente între populațiile speciei care confirmă originea hibridă a speciei *H. transsilvanica* (Tabel 1). Diferențele nucleotidice care nu sunt consistente (fie că poartă un *pattern* aditiv sau nu) pot fi importante în filogeografia speciei pe care urmează să testăm în etapa următoare a proiectului.

**Tabel 1.** Poziții de nucleotide variabile în alinierea secvențelor At103 ale speciilor și populațiilor *Hepatica*. Siturile prezentând un polimorfism aditiv au fost codificate conform codurilor IUPAC iar cele care susțin originea hibridă a speciei *H. transsilvanica* sunt evidențiate în gri. (Tabel preluat și modificat după Bartha et al. (2014a))

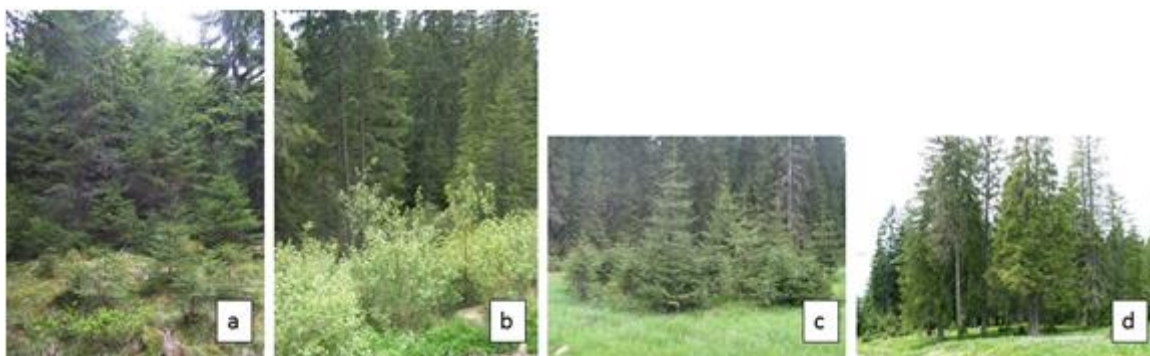
probe	poziții nucleotidice									
	73	82	106	133	145	181	184	211	253	289
<i>H. falconeri</i>	A	G	T	A	C	C	T	C	G	C
1 <i>H. transsilvanica</i> pop.	A	R	Y	R	C	C	C	Y	S	Y
2 <i>H. transsilvanica</i> pop.	R	R	Y	G	C	C	C	Y	G	Y
3 <i>H. transsilvanica</i> pop.	R	R	Y	R	C	Y	C	Y	G	Y
1 <i>Hepatica nobilis</i> pop.	A	A	C	A	C	C	C	T	G	T
2 <i>Hepatica nobilis</i> pop.	A	A	C	A	Y	C	C	T	G	T

Pentru a treia specie țintă cu statut relictar, *Campanula carpatica* am efectuat o analiza filogeografică preliminară folosind regiunea de plastidă rpl32-trnL. Am secvențat acest marker în probe provenite din regiunile diferite ale Carpaților (Fig. 5). Rezoluția rețelei de haplotipuri construită pe baza parsimoniei maxime indică că markerul respectiv poate fi folosită pentru studiul filogeografic la această specie pe care vom valorifica în etapa următoare a proiectului.



**Fig. 5.** Rețeaua de haplotipuri de *Campanula carpatica* generată pe baza parcimoniei maxime utilizând secvențe rpl32-trnL. Cercurile mari reprezintă haplotipuri (respectiv originea lor geografică) iar cercurile mici reprezintă haplotipuri ipotetice. O linie dintre două cercuri reprezintă un pas mutațional (date nepublicate).

2. Analiza speciei de curculionid endemic cu caracter relictar, *Otiorhynchus (Elechranus) remotegranulatus* au fost organizate în prima fază în direcția clarificării arealului speciei și au fost investigate habitate montane din etajul pădurilor de molid din Carpați. Dintre habitatele investigate, au fost semnalate populații de *Otiorhynchus (Elechranus) remotegranulatus* doar în păduri de molid de tip *Oxalo-Piceetum* din localitățile: Muntele Băișorii, 1280 m altitudine (Fig. 6.a.b.c.); Molhașul Mare, 1160 – 1231 m alt. (Fig. 6. c); Padiș, 1300 m alt. (Fig. 6. d) și Mărișel, 1237 m alt. Aceste **păduri de molid de tip *Oxalo-Piceetum*** au atât porțiuni închegate cât și porțiuni rărite, unde întâlnim și exemplare de *Fagus sylvatica*. Au numeroase luminișuri cu vegetație ierboasă joasă, tufe de ferigi și puietși de molid și fag, cât și un strat subarbutiv bine reprezentat, alcătuit din afin (*Vaccinium myrtillus*) și merișor (*V. vitis-idaea*). Umiditatea ridicată a favorizat puternica dezvoltare a covorului de mușchi. În aceste luminișuri se mai întâlnesc tufe de arbuști și arbori tineri: *Rubus idaeus*, *Betula pendula*, *Alnus incana* și *Sorbus aucuparia*. Aceste specii lemnoase apar și de-a lungul pâraielor, care străbat aceste molidișuri.



**Fig. 6.** Păduri de molid, *Oxalo-Piceetum*: **a. b.** Muntele Băișorii; **c.** Molhașul Mare (Munții Bihor), **d.** Padiș (Munții Bihor).

Datele mai sus au fost utilizate pentru a întocmi harta de raspândire a speciei *O. remotegranulatus* (Fig.7). Această specie endemică în România este prezentă doar în Transilvania, cele mai multe semnalări fiind din Munții Apuseni, în special în Munții Bihor (Parcul National Apuseni) și Muntele Băișorii.



**Fig. 7.** Răspândirea speciei *Otiorhynchus remotegranulatus* (puncte galbene – colectări noi, puncte verzi – date bibliografice).

Pe baza observațiilor noastre pe teren putem sintetiza datele ecologice și biologice ale speciei după cum urmează. *O. (Elechranus) remotegranulatus* este o specie montană, colectată în păduri de molid sau de amestec de molid cu fag, cât și în pajiștile și poienile vecine cu aceste păduri. Este o specie polifagă întâlnită pe *Picea abies*, *Rubus idaeus*, *Salix caprea* și *Fagus silvatica*. Am observat prezența unui număr ridicat de indivizi mai ales pe *Picea abies* și pe *Rubus idaeus*. Am găsit această specie pentru prima dată pe zmeur. De asemenea am observat că adulții preferă indivizii tineri de *Picea abies*. Pe baza datelor colectării cantitative putem afirma că specia este rară, întâlnită sporadic în habitatele caracteristice. Într-o locație indivizii sunt de regulă grupați pe foarte puține exemplare din plantele gazdă, dar într-un număr ridicat de indivizi, în restul habitatului lipsind chiar dacă plantele gazdă sunt prezente. De regulă specia este prezentă la aproximativ 5-10 m. distanță față de pâraiele din zona respectivă. Mai rar indivizii dintr-o populație sunt răspândiți uniform, dar atunci pe o plantă sunt foarte puține exemplare, motiv pentru care sunt greu de observat. Adulții sunt activi în perioada aprilie-august, această specie ajunge la un maxim populațional în lunile mai-iunie. Populații cu număr ridicat de indivizi au fost găsite în **Munții Bihor**: Valea Gârda Seacă, Padiș și Molhașul Mare (Parcul Național Apuseni), în apropierea izvoarelor situate mai sus de Stațiunea Muntele Băișorii și în **Munții Gilău**: localitatea Mărișel. La această specie până în prezent nu se cunoaște stadiul de ou, larvă și pupă. Noi am găsit ouă în interiorul femelelor colectate dar nu și în natură. Se cunoaște din literatură (Dieckmann, 1980; Rheinheimer și Hassler, 2010; Sprick, 2012) că larvele curculionidelor din genul *Otiorhynchus* se hrănesc cu organele subterane ale plantelor gazdă, deci se dezvoltă în sol, iar pupele de asemenea se formează în sol. Identificarea larvelor și pupelor vor fi efectuate în faza următoare a proiectului prin investigarea rădăcinilor de molizi tineri sau de zmeur, iar pupele vor fi identificate prin studierea solului din apropiere.

Pe baza materialului biologic colectat în cursul anului 2014 am studiat **variabilitatea caracterelor morfologice** la diferite populații ale speciei, fiind o specie apteră, sedentară. În anul 2014 am efectuat o analiză morfometrică la specia *O. remotegranulatus*. Scopul acestei analize a fost determinarea unor eventuale diferențe intraspecifice privind unele caracterele morfometrice la indivizii aparținătoare unor populații diferite, și eventualele corelații ale acestor diferențe cu unele parametri ecologici și biotici (ca de ex. ca planta gazdă), altitudinea la care se dezvoltă populațiile, date climatice. Pentru această analiză am colectat între 10 și 70 de adulți din 6 populații aparținând ambelor sexe, în total 180 de exemplare. În analizele morfometrice am utilizat unele (4) caractere de lungime pentru o analiză de morfometrie clasică, și 15 puncte de referință pe locuri fixe, și ușoare de identificat pe insectele preparate (fig 8). Pentru preparare am uscat insectele colectate, fiind conservate anterior în alcool etilic cu concentrație de 96%, și am montat indivizii pe plăci de plastic transparente cu partea dorsală în sus. Pentru analiza morfometrică am realizat fotografiile cu ajutorul unei camere fotografice montate pe o lupă binoculară la o magnificație fixă (40X). Pentru crearea unor fișiere specifice am utilizat programul "tps Utility program", versiunea 1.58; pentru măsurarea caracterelor și montarea punctelor de referință am utilizat programul "tpsDig" versiunea 2.17, iar pentru analiza statistică am folosit programul "MorphoJ" versiunea 1.06c. Rezultatele noastre arată că în limitele arealului de răspândire specia *O. remotegranulatus* (Fig. 8 a, b), prezintă o anumită

variabilitate morfologică. La indivizii din populațiile cercetate am constatat diferențe privind culoarea corpului. Majoritatea masculilor sunt de culoare maronie-negricioasă (Fig. 8. b ), iar majoritatea femelelor sunt maroniu-roșcate (Fig. 8. a ). Există și femele mai închise la culoare având coloritul asemănător cu al masculilor. Femelele au în general cuticula mai subțire, iar masculii cuticula mai puternic sclerificată. Femelele mai închise la culoare au de asemenea cuticula mai sclerificată. Există și dimorfism sexual masculii având corpul și elitrele mai înguste decât femelele. De asemenea abdomenul masculilor este mai îngust fiind ventral ușor convex, iar abdomenul femelelor este mai lățit fiind ventral ușor concav. Scleritele abdominale la masculi prezintă o bordură în partea posterioară. Femelele mai închise la culoare se aseamănă ca habitus cu masculii, dar scleritele abdominale nu prezintă bordură posterioară evidentă, iar la disecție se observă clar că sunt femele: au ovare și ovipozitor.

Fig. 8. Exemplare tipice de *Otiorhynchus remotegranulatus*. Femelă (a) și mascul (b)

Femele cu caractere asemănătoare masculilor am observat și la alte specii de *Otiorhynchus*, dar care la noi au populații partenogenetice, de exemplu *Otiorhynchus (Nihus) scaber* (Linnaeus 1758), *O. (Majetnecus) lepidopterus* (Fabricius, 1794) sau chiar și la curculionide din alte genuri cum ar fi *Strophosoma melonogrammum* (Forster 1771). Pentru a determina diferențele dintre caracterele morfologice dintre diferite populații am utilizat Analiza Componentelor Principale (PCA, fig. 9 a), Analiza Variațelor Canonice (CVA, fig. 9 b) și Analiza de Discriminanță (DA, Fig. 10.). Prin aceste analize am observat diferențe între caracterele a câte două populații (DA), dar nu am observat diferențe concludente între toate populațiile studiate (PCA, CVA).



Fig. 8. Caracterele morfologice folosite la analizele statistice (a) și punctele de referință (landmarks) folosite la analizele de morfometrie geometrică (b)

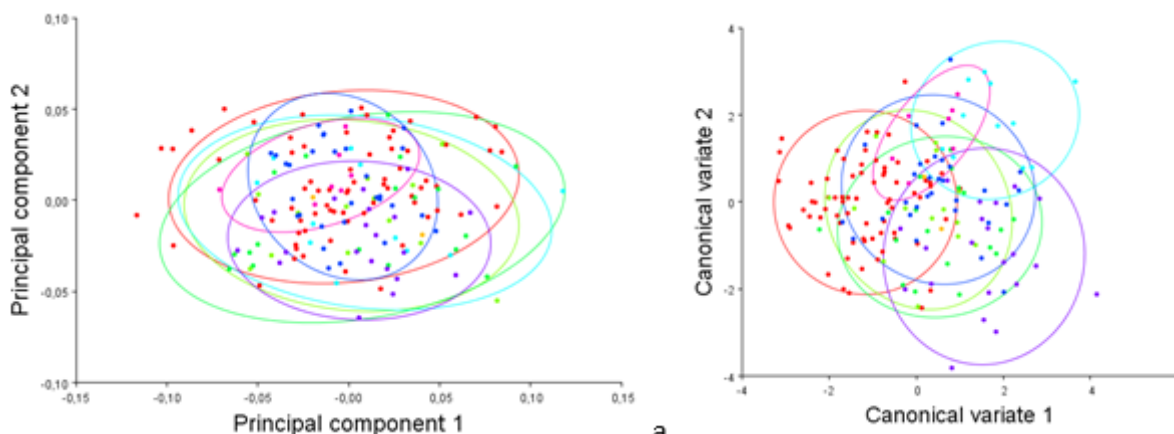


Fig. 9. Distanța grafică între populațiile de *O. remotegranulatus* rezultând din (a) Analiza Componentelor Principale (PCA) și (b) Analiza Variațelor Canonice (CVA).

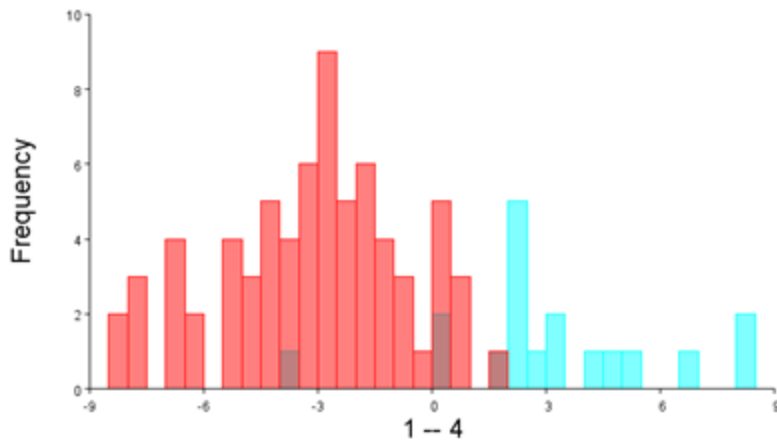
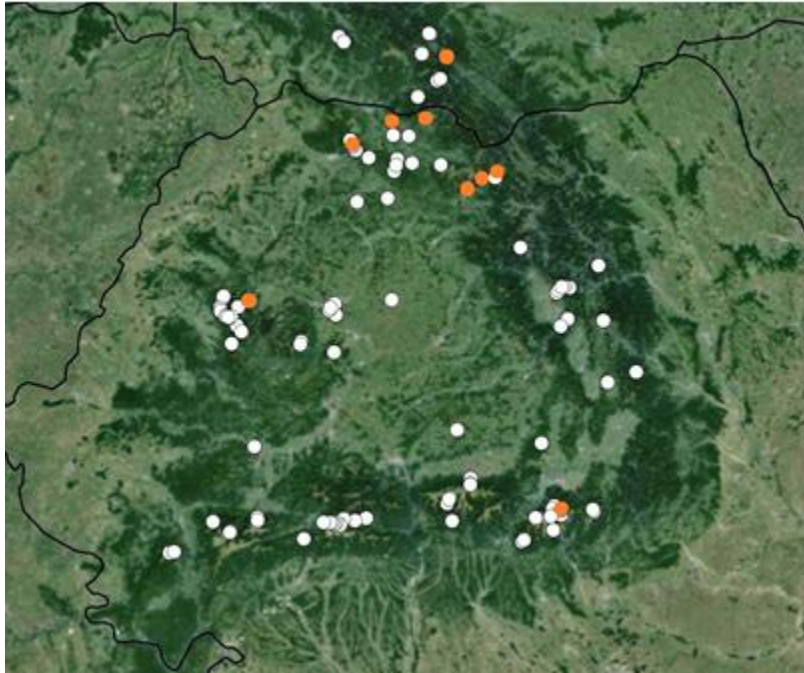


Fig. 10. Distanța grafică între două populații de *O. remotegranulatus* rezultând din Analiza de Discriminanță

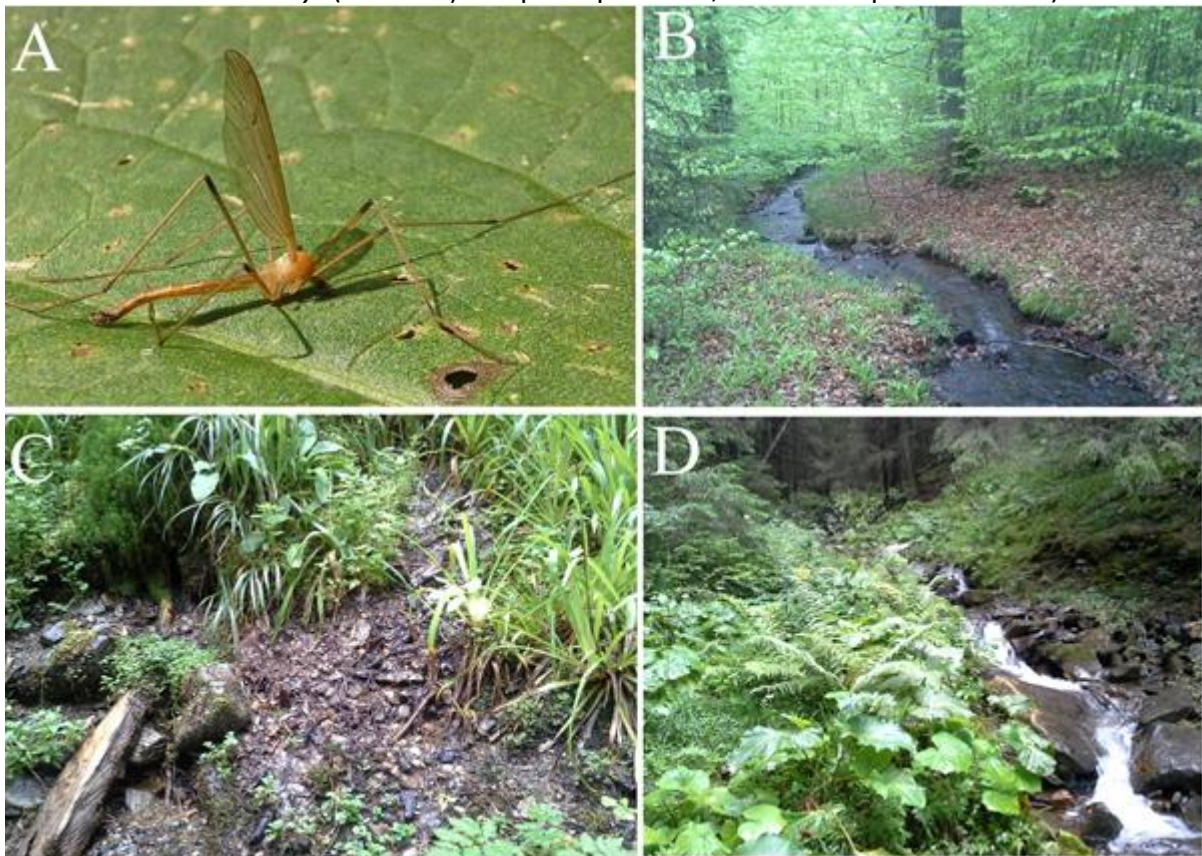
În concluzie putem afirma că specia de curculionid cercetată este răspândită doar în Carpații Occidentali, în România. Arealul mai restrâns al speciei *O. remotegranulatus* Stierl. este un argument în favoarea caracterului ei relictar. La specia cercetată există o variabilitate morfologică evidentă privind forma și coloritul corpului, manifestată mai pregnant la femele. Masculii sunt mai zvelți și au corpul de culoare maronie-negricioasă, iar femelele au corpul mai lățit, culoarea acestora variază de la maro-roșcat la maro-negricios. Analizele morfometrice nu au arătat diferențe clare între caracterele morfologice ale indivizilor aparținând de diferite populații. Prin observațiile efectuate pe teren am adus contribuții noi referitoare la ecologia și biologia speciei *O. remotegranulatus*, precum plantele gazdă: *Picea abies*, *Rubus idaeus* și perioada în care sunt activi adulții: Mai-August, cu maximum populațional în Mai-Iunie. Specia are de regulă o distribuție insulară, pe molizi tineri sau tufe de zmeur la 5-10 m. distanță de pâraiele din zonă.

**3. Testarea statutului de relict terciar al grupului de specii de diptere din genul *Pedicia*, complexul *staryi* endemic pentru Munții Carpatici.** În cursul anului 2014 au fost colectați un număr de 59 indivizi din 10 populații cu care am completat datele faunistice deja existente în baza noastră de date alcătuită încă în anul 2013. Aceste probe au fost colectate din Carpații Orientali (8 populații), Munții Apuseni (1 populație) și Carpații Meridionali (1 populație). Au fost identificate în total un număr de aproximativ 100 de localități din România și Ucraina cu habitate corespunzătoare cu nevoile ecologice ale speciilor, dar nu în toate stațiile am reușit colectarea speciilor respective (fig 11). Dintre populații identificate în cursul anului 2014 numai o singură populație a fost cunoscută până acum, restul de 9 populații au fost identificate pentru prima dată de noi în Carpați. Speciile au fost colectate din mai până la sfârșitul lunii august la altitudini cuprinse între 450 – 1350 m. Au fost identificate habitatele speciilor țintă, acestea fiind izvoare sau pâraie mici stenoterme sau zona mlăștinoasă în jurul izvoarelor limnocrene din pădurile de fag sau de molid (fig. 12).





**Fig 11.** Localitățile cercetate în 2014 în vederea identificării populațiilor aparținătoare grupului de specii *Pedicia staryi* (cercu roșu – specia prezentă, cerc alb – specia absentă)



**Fig. 12.** A) *Pedicia staryi*, mascul, B-D habitatele speiei: B) Munții Gutin, C) Bucegi, D) Bucovel (Ucraina)

După prelevarea probelor, indivizii au fost conservați în alcool absolut și prelucrat în vederea analizelor genetice. Analiza genetică a populațiilor aparținătoare grupului de specii *staryi* au fost realizate la un număr de 126 indivizi aparținătoare la următoarele specii: 17 indivizi *P. apusenica*, 9 indivizi de *P. lobifera*, 57 indivizi de *P. staryi*, 37 indivizi de *P. straminea* și 6 indivizi de *P. spinifera*. Ultima specie am folosit ca outgroup în analizele noastre de filogeografie. Extragerea de ADN, amplificarea cu ajutorul reacției de polimerizare în lanț (PCR) și secvențierea am realizat folosind protocoalele institutului “Canadian Centre for DNA Barcoding”. Secvențierea AND-ului mitocondrial, mai exact a secvențelor Citocrom-Oxidazei-c I (COI) a fost realizată cu ajutorul perechilor de amorse LepF1/LepR1 sau dacă acestea

nu au funcționat, au fost folosite amorsele LCO1490\_t1/HCO2198\_t1, LepF1/C\_ANTMR1D, MLepF1/HCO2198\_t1, MLepF1/LepR1 și LepF1/MLepR1.

Secvențele au fost aliniat în programul Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013), iar diversitatea nucleotidelor, numărul haplotipurilor și diversitatea acestora a fost analizată cu programul DNAsp 5 (Librado & Rozas, 2009). Relațiile filogenetice dintre cele cinci specii au fost analizate cu ajutorul algoritmilor Bayesian Inference în programul BEAST și Maximum Likelihood în programul Seaview 4 (Gouy, Guindon & Gascuel, 2010). Modelul de substituție a nucleotidelor a fost ales cu ajutorul programului jModeltest (Guindon & Gascuel, 2003; Darriba *et al.*, 2012). Dintre 88 modele testate pentru secvențele noastre utilizate cel mai adesea s-a dovedit a fi modelul de evoluție Hasegawa, Kishino și Yano (HKY) cu o distribuție gamma invariabilă. Pe baza acestor modele am calibrat un ceas molecular pentru a testa statutul relictar al speciilor endemice din complexul *P. staryi*.

Din cauza lipsei unor fosile de referință, pentru datarea moleculară privind apariția diferitelor linii evolutive care formează în prezent complexul de specii *P. staryi* din Carpați am folosit o rată de mutație de  $0.0177 \pm 0.00119$  corespunzând unei valori de 3.54% schimbare pe milion de ani (Papadopoulou, Anastasiou, & Vogler, 2010). Structurile genetice a celor trei specii endemice din munții Carpați au fost analizate în detaliu prin analiza grupării spațiale a indivizilor cu ajutorul programului BAPS 6 (Bayesian Analysis of Population Structure; Corander, Sirén & Arjas, 2007). Acest model combină stațiile de colectare a indivizilor cu datele moleculare pentru a identifica linii genetice diferențiate între diferite regiuni geografice. Relația dintre haplotipurile ale celor două specii carpatine foarte asemănătoare din punct de vedere morfologic (*P. apusenica* și *P. staryi*) au fost în continuare analizate prin generarea unei rețele de haplotipuri cu ajutorul programului NETWORK 4.6.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com/netwinfo.htm>; Brändle *et al.*, 2007), și prin analiza ierarhică a varianței moleculare (AMOVA) în programul Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

Lungimea secvențelor aliniat a fost de 658 perechi de baze. Dintre cele 130 poziții polimorfice 129 informative din punct de vedere al parsimoniei rezultând într-un număr de 36 haplotipuri, cu o diversitate de 0.938. Analizele filogenetice au avut ca rezultat generarea a doi arbori filogenetici cu topologii asemănătoare (Fig. 13). Grupul de specii *P. staryi* este monofiletic în cadrul genului *Pedicia* însă nu are un suport statistic satisfăcător. În interiorul grupului de specii studiat *P. spinifera* și *P. straminea* formează două grupuri monofiletice bine diferențiate cu suport statistic mare. Dintre aceste două specii înrudite *P. straminea* stă la baza grupului format de cele trei specii endemice din Carpați. Aceste specii endemice au o structurare genetică diferită, *P. lobifera* formează un grup bine diferențiat atât morfologic, cât și genetic, însă *P. staryi* împreună cu *P. apusenica* alcătuiesc un grup foarte heterogen genetic, identificând în urma analizelor statistice un număr de cinci linii genetice bine diferențiate (cu posibile specii criptice încă nedescrise). Consecințele taxonomice ale acestor rezultate vom analiza în etapa următoare a proiectului.

Rezultatul datării moleculare este speculativă datorită lipsei calibrării bazate pe fosile, însă datele noastre sunt foarte asemănătoare cu rezultatul unor alți studii referitoare la specii acvatice și semiacvatice din această regiune, și sunt strâns legate de perioadele geologice caracterizate cu un nivel scăzut al precipitației care au avut ca efect o aridizare generală și o fragmentare a pădurilor continue din Miocen și Pliocen (Kotlík & Berrebi, 2002; Pabijan, Wandycz, & Hofman, 2013). Datorită acestor schimbări ale ecosistemelor terciare la sfârșitul Miocenului apariția strămoșului speciilor carpatine (*P. lobifera*, *P. staryi* și *P. apusenica*) putem data la cca. 8.56 milioane de ani (Fig. 13). Aceste specii sunt adaptate la temperaturi scăzute, așadar condițiile climatice mai calde din era Miocenă au contribuit probabil la diferențierea acestui grup în zona regiunii montane din jurul Parathetysului Central, cu un microclimat favorabil, mai umed. Așadar cele 3 specii carpatine endemice aparținătoare complexului *staryi* pot fi considerate specii cu caracter relictar, cel mai apropiat strămoș comun al lor diferențiind la sfârșitul Miocenului.

Analiza grupării spațiale a indivizilor arată existența a șase grupuri bine diferențiate atât din punct de vedere genetic cât și din punct de vedere al izolării genetice (Fig. 14), *P. staryi* fiind reprezentat de patru grupuri, unul din Munții Bucegi, unul din Munții Gutin și două din Munții Rodnei. Aceste grupuri sunt confirmate de asemenea și de rezultatele rețelei de haplotipuri (Fig. 15), respectiv de analiza ierarhică a varianței moleculare, care arată cea mai mare variație atunci când liniile genetice din cadrul speciei *P. staryi* sunt considerate separat (Tabel 2).

Tabel 2. Rezultatul analizei hierarhice a varianței moleculare.

Group composition	Among groups	Among population	Within populatio	Fsc	Fst	Fct
5 lineages	79.55	5.40	15.05	0.26	0.84	0.79
2 species	6.59	77.80	15.61	0.83	0.84	0.06

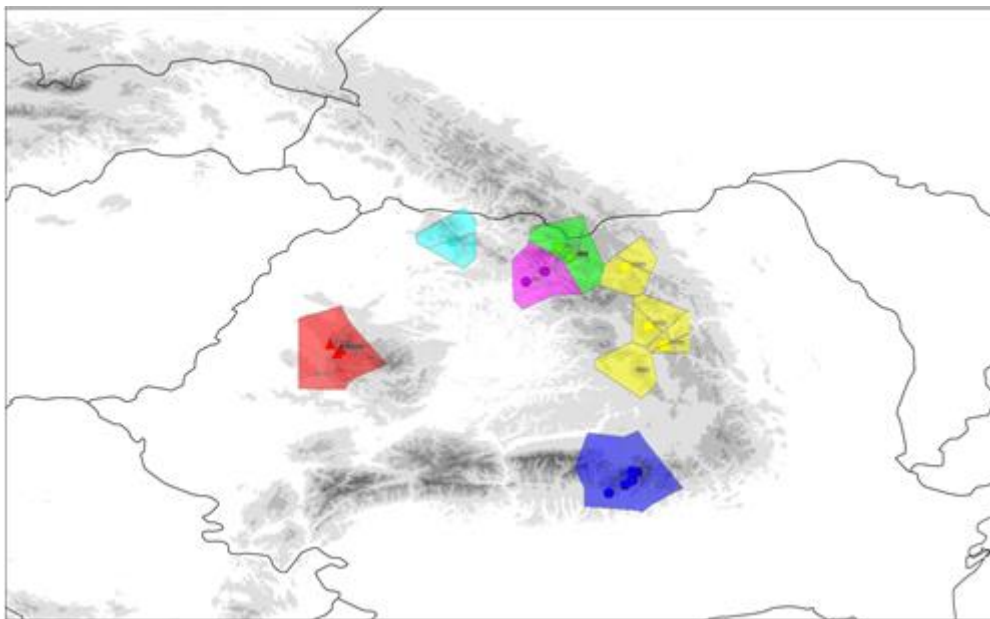
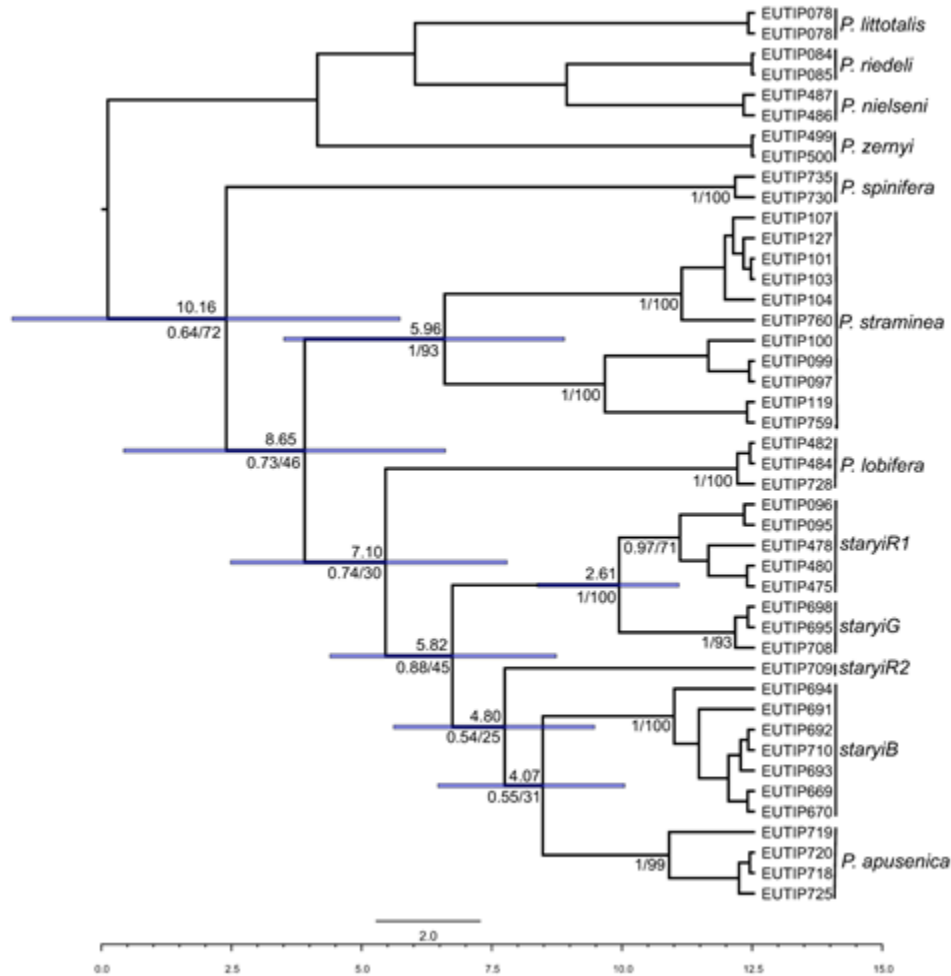


Fig. 11 Arborele filogenetic construit cu algoritmul Bayesian Inference in programul BEAST. Valorile de sub crengi arată susținerea statistică a nodurilor. Valorile aflate deasupra arată estimarea divergenței nodurilor in milioane de ani.

Fig. 12 Analiza grupării spațiale a indivizilor proiectată pe harta Munților Carpați. Culorile reprezintă cele șase grupuri: *P. apusenica* (roșu), *saryiG* (albastru deschis), *saryiR1* (mov), *saryiR2* (verde), *saryiB* (albastru închis) and *P. lobifera* (galben).

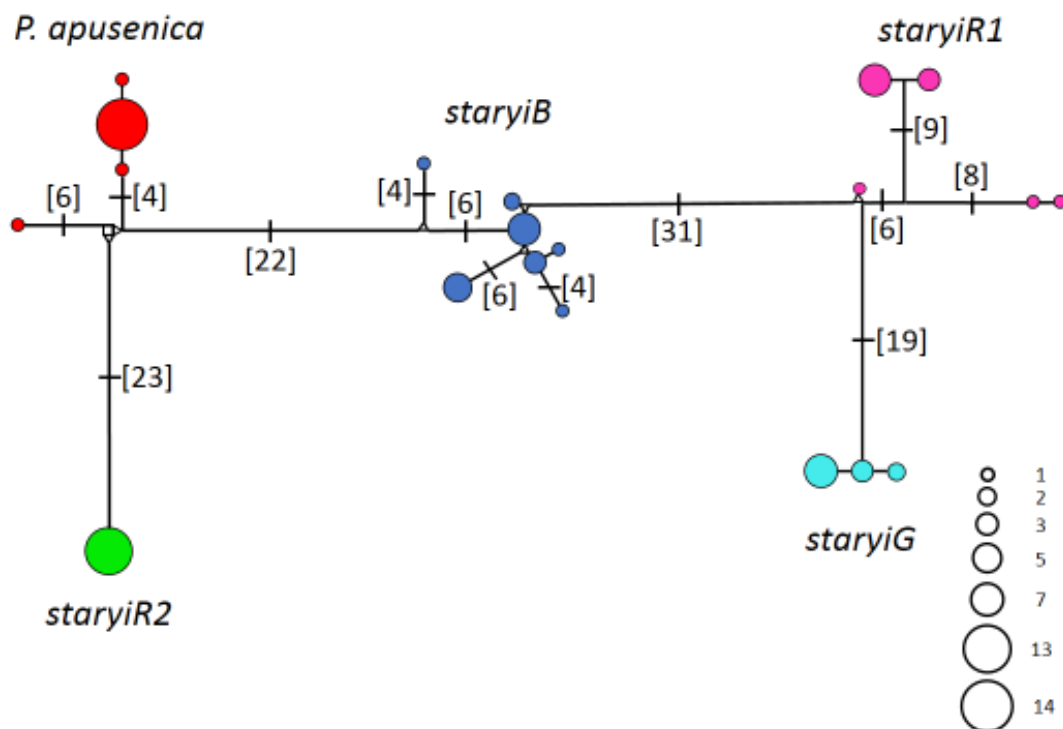


Fig. 13 Rețeaua de haplotipuri arătând cele patru linii genetice ale speciei *P. saryi* și grupul reprezentat de haplotipurile speciei *P. apusenica*

Pe baza acestor rezultate sintetizate mai sus în cursul anului 2014 am publicat 10 articole științifice, din care 3 articole BDI și 6 articole ISI.

Articole publicate în 2013 și aparute în 2014:

1. **Kolcsár L-P., Török, E., Keresztes L.** (2013): Craneflies (Diptera, Tipuloidea) and phantom craneflies (Diptera, Ptychopteridae) fauna around a metropolis (Cluj-Napoca, Romania). *Biologia, Acta Scientiarum Transylvania*, 21 (1): 66-78.
2. **Macalik K, Tamas R., Kolcsár L-P., Keresztes L.** (2013): Present status of *Syringa josikaea* Jacq. Ex Rchb., an endemic species which contributes to the biodiversity of the flora of the Carpathians. *Studia UBB Biologia* 58: 31-40. **Revista BDI.**
3. **Török, E., Kolcsár L-P., Keresztes L.** (2013): An annotated list of Tipulidae (Insecta, Diptera) from Romania. *Entomologica romanica* 18: 15-20. **Revista BDI.**

Articole publicate în 2014:

1. **Bartha L, Macalik K, Keresztes L** (2014a) Molecular evidence for the hybrid origin of *Hepatica transsilvanica* (Ranunculaceae) based on nuclear gene sequences. *Studia UBB Biologia* 59:55-62. **Revista BDI.**
2. **Bartha L, Sramkó G, Volkova PA, Surina B, Ivanov AL, Banciu LH** (2014b) Patterns of plastid DNA differentiation in *Erythronium* (Liliaceae) are consistent with allopatric lineage divergence in Europe across longitude and latitude. *Plant Systematics and Evolution* (second review with major revisions). **IF. 1,154**
3. Csata, E., Erős, K., **Markó, B.** (2014): Effects of the ectoparasitic fungus *Rickia wasmannii* on its ant host *Myrmicascabrinodis*: changes in host mortality and behavior. *Insectes Sociaux* 61(3), doi: 10.1007/s00040-014-0349-3 . **IF: 1,33**

4. Dénes A-L., **Kolcsár L-P., Keresztes L.** (2014): Phylogeography of the micro-endemic *Pedicia staryi* group (Insecta, Diptera): evidence on relic biodiversity in the Carpathian Area. *Biological Journal of the Linnean Society* (second review with major revisions). **IF. 2,535.**
5. Previšić A., Graf W., Vitecek S., Kučinić M., Bálint M., **Keresztes L.,** Pauls S.U. & J. Waringer (2014) Cryptic diversity of caddisflies in the Balkans: the curious case of *Ecclisopteryx* species (Trichoptera: Limnephilidae). *Arthropod Systematics & Phylogeny* (accepted for publication). **IF: 1,062**
6. **Török, E., Kolcsár L-P., Dénes A-L., Keresztes L.** (2014): Morphologies tells more than molecules in the case of *Ptychoptera albimana* (Fabricius, 1787) species (Diptera, Ptychopteridae). *North Western Journal of Zoology* (accepted for publication). **IF. 0,7.**
7. Waringer J., Graf W., Balint M., Kucinic M., Pauls S., Previsic A., **Keresztes L.,** Ibrahim H., Zivic I., Bjelanovic K., Krapac V., Vitecek S. (2014): Larvar morphology and phylogenetic position of *Drusus balcanicus*, *Drusus botosaneanui*, *Drusus serbicus* and *Drusus tenellus* (Trichoptera, Limnephilidae, Drusinae). *European Journal of Entomology* (accepted for publication). **IF. 1,076.**

Am participat la următoarele conferințe naționale și internaționale cu un număr de 7 prezentări orale și 3 postere.

Comunicare orală:

1. **Bartha L,** Sramkó G, Volkova PA, Surina B, Ivanov AL, Banciu HL (2014). Transylvanian basin: novel extra – Mediterranean refuge and source of diversity for the temperate herb *Erythronium dens-canis* (Liliaceae). BioDivEvo2014. 15th Annual Meeting of the Society of Biological Systematics (GfBS) held in concert with the 22nd International Symposium “Biodiversity and Evolutionary Biology” of the German Botanical Society (DBG). **24-27 March**, Dresden, Germany (comunicare orală)
2. **Bartha L.** (2014). Studii de filogeografie și filogenie moleculară la speciile eurasiatice de *Erythronium* L. Sesiunea de comunicări științifice "D. Brândză" ediția a XX-a. **8 noiembrie**, București (comunicare orală).
3. **Dénes AL, Kolcsár LP, Keresztes L** (2014): *The molecular genetic and morfometric analysis of Carpathian microendemic species: the Pedicia staryi Savch. species group (Diptera, Pediciidae).* 15<sup>th</sup> Biology Days, **4-6 aprilie**, Cluj-Napoca, Romania (comunicare orală)
4. **Dénes AL, Kolcsár LP, Keresztes L** (2014): *Complex evolution of aquatic and semi aquatic habitats in the Carpathians: case study of the micro-endemic Pedicia staryi group (Insecta, Diptera).* 1<sup>st</sup> Central European Symposium for Aquatic Macroinvertebrate Research, **10-13 aprilie**, Szarvas, Ungaria (comunicare orală)
5. **Dénes AL, Kolcsár LP, Keresztes L** (2014): The role of the Carpathians as cumulative refugia: a case study of the relic-endemic crane fly, *Pedicia staryi* Savchenko, 1986 group (Diptera, Pediciidae). 8th International Congress of Dipterology, **10-15 august**, Potsdam, Germania (comunicare orală)
6. **Teodor L.,** Vlad Milin (2014) „Contribuții la cunoașterea unor curculionide endemice din România (Curculionidae: Entiminae)” Al XXIV-lea Simpozion național SLR, 26-27 aprilie Cluj-Napoca “Cunoașterea, protecția și conservarea insectelor din România”, Facultatea de Biologie și Geologie, Universitatea Babeș-Bolyai (prezentare orală).
7. **Teodor L.,** Vlad Milin. (2014) „Some endemic weevils in Romania (Curculionidae: Entiminae)” autori: A 8-a Întâlnire Internațională a Institutului CURCULIO (8-th International Meeting of the CURCULIO Institute), organizată în Slovacia (localitatea Sturovo și împrejurimi) în perioada 17-24.05. (prezentare orală).

Postere:

1. **Kolcsár, L.P., Dénes A.L., 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, **10–15 August**, Potsdam (Germany) (poster)
2. **Macalik K, Bartha L, Keresztes L** When ploidy meets nuclear gene data: a textbook example of allotetraploidy in the genus *Hepatica* (Ranunculaceae). *BioDivEvo2014. 15th Annual Meeting of the Society of Biological Systematics (GfBS) held in concert with the 22nd International Symposium*

*“Biodiversity and Evolutionary Biology” of the German Botanical Society (DBG), 24-27 March, Dresden, Germany* (poster)

3. **Török, E., Kolcsár, L.P., Dénes A.L., Keresztes, L.** (2014) The European widespread *Ptychoptera albimana* Fabricius, 1787 (Diptera: Ptychopteridae): deep morphological divergences, low genetic variability. 8th International Congress of Dipterology, **10–15 August**, Potsdam (Germany) (poster)

Am obtinut **premiul III. la conferinta internationala 8th International Congress of Dipterology**, organizată între 10–15 August, în Potsdam (Germania cu posterul avand ca titlu: *The European widespread Ptychoptera albimana Fabricius, 1787 (Diptera: Ptychopteridae): deep morphological divergences, low genetic variability.*

Totodata a fost dezvoltată și încărcată cu informații actualizate site-ul proiectului, care poate fi accesata la adresa: <http://granturi.ubbcluj.ro/carpathianrelics/>.