

Standard DNS technikák tesztelése
fajhatárok felismerésére és jellemzésére a szőrös
szemű iszapszúnyogok (*Pediciidae*, Diptera,
Insecta) esetében

SZERZŐ:

KOLCSÁR LEVENTE-PÉTER, BABEŞ-BOLYAI TUDOMÁNYEGYETEM, BIOLÓGIA-
GEOLÓGIA KAR, ÖKOLÓGIA ÉS KÖRNYEZETVÉDELEM SZAK, III. ÉV, KOLOZSVÁR

TÉMAVEZETŐ:

DR. UJVÁROSI LUJZA, EGYETEMI ADJUNKTUS, BABEŞ-BOLYAI
TUDOMÁNYEGYETEM, BIOLÓGIA-GEOLÓGIA KAR, MAGYAR BIOLÓGIA ÉS
ÖKOLÓGIA INTÉZET, KOLOZSVÁR

KÜLDŐ INTÉZMÉNY: XV. ERDÉLYI TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA (ETDK)

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3
1.1. Standard DNS szekvenciák használata	3
1.2. Szőrös szemű iszapszúnyogok.....	5
1.2.1. Rendszerezésük és elterjedésük	5
1.2.2. A Pediciidae fajok szaporodásbiológiája.....	7
2. Célkitűzés.....	11
3. Hipotézisek és predikciók	11
4. Anyag és módszerek.....	13
4.1. Genetikai vizsgálatok.....	13
4.2. Morfológiai vizsgálatok	14
5. Eredmények	15
5.1. Standard DNS technikák tesztelése a fajok elkülönítésére.....	15
5.2. Kriptikus diverzitás vizsgálata a <i>Dicranota</i> génusz fajai esetében.....	16
5.3. A lárva-kifejlett társítás.....	18
5.4 A lárvák morfológiai összehasonlítása.....	23
6. Összefoglaló.....	27
7. Köszönetnyilvánítás.....	27
8. Irodalom.....	28

1. Bevezetés

1.1. Standard DNS szekvenciák használata

Századunkban a taxonómiának két nagy kihívásnak kell eleget tennie. Elsősorban egy minőségi kihívásnak, amely a taxonhatárok pontosabb lehatárolását és jellemzését feltételezi, valamint az illető taxon esetében a lehető legteljesebb biológiai információk feltárását nyújtja, integratív módon. Másrészt a jelenlegi kihalási ráta és biodiverzitási krízis a bioszféra teljes biodiverzitásának feltárását egyre sürgetőbbé teszi. Óriási igény van az eddig ismeretlen taxonok azonosítására és leírására (Padial és mtsai. 2010, Pires és Marinomi 2010). A két elvárás gyakran ellentétes módszerek bevezetését eredményezik (pl. a tudományra új fajok leírását nem követi a teljes elterjedési területre vonatkozó alapos morfometriai, elterjedési és genetikai adatok feltárása). Ezt elkerülendő, a taxonómia egyre inkább interdiszciplináris jelleget ölt, amely igyekszik integrálni a klasszikus morfológia alapú fajleírást (múzeumi példányok morfológiai összehasonlító vizsgálata), a statisztikai alapú morfometriai összehasonlításokkal, térinformatikai rendszerekkel (GIS) a faj elterjedési területeinek feltárására, az elektronikus fajazonosításokkal (e-típusok), különböző genetikai markerek használatával (pl. standard mtDNS szakaszok), különböző egyedfejlődési stádiumok morfológiai jellemzőivel, szaporodásbiológiai és ökológiai jellemzőkkel (Padial és mtsai. 2010). A modern taxonómiai módszerek a DNS alapú módszerek bevezetésével a biológiai sokféleség eddig ismeretlen oldalát (kriptikus diverzitás) is képes feltárni, amelyre a klasszikus morfológiai alapú taxonómia nem képes. Ezen kívül a különböző DNS szekvenciáknak fontos szerepük van a rokonsági viszonyok, leszármazási fák készítésében, amely szintén fontos része a rendszerező taxonómiának (Zhou és mtsai. 2007).

A DNS alapú taxonómia esetében gyakran alkalmaznak általános markereket, az állatok esetében ez különböző mitokondriális DNS szakaszokat jelentenek. A mitokondriális DNS sokkal több másolatban van jelen a sejtekben, és a kisebb töredezett szekvenciákat könnyebb kivonni és helyre állítani, mint a nagyobb genomi DNS-t. Az egyik legfontosabb tulajdonsága, ami alkalmassá teszi fajok elkülönítésére az, hogy 5-10-szer nagyobb különbségeket találunk a mitokondriális DNS szakaszokban két faj között, mint ugyanazon fajok genomi DNS-e között. Taxonómiai értelemben igen előnyös tulajdonsága, hogy fajon belüli variabilitása alacsony, valamint a populációkban sokkal kevesebb mitokondriális allélt találhatunk, mint genomit

(Stoeckle és mtsai. 2005). Ezen felül hiányoznak vagy nagyon kevés számban találunk intronokat, így a mutációk többsége kiszelektálódik.

Napjainkban a mtDNS univerzálisan használható a különböző állatfajok taxonómiai jellemzésére (Stoeckle és mtsai. 2005). Mivel a mitokondriumi DNS számos kódoló hordoz, többek között 13 fehérjét, 2 riboszomális-RNS-t és 22 transzfer-RNS-t kódoló szakaszt, amelyek egymáshoz viszonyított helye igen eltér a különböző csoportok esetében. Ezért a mitokondriális citokróm c-oxidáz I génjének 5' végi (COI) fehérje kódoló szakaszát választották, mivel ezen DNS szakasz kevés és univerzálisan használható primerrel könnyen kinyerhető egy viszonylag rövid 658 bázispár hosszúságú szakaszban (standard mtDNS vagy DNS vonalkód rendszer). Fontos tulajdonsága, hogy sokkal nagyobb a szakaszon belüli változatosság, mint riboszomális RNS-eket kódoló szakaszokban. A COI-n belül találunk könnyen mutálódó, illetve konzervatív szakaszokat is, amelyek lehetővé teszik molekuláris vizsgálatokra. A kinyert szakaszokat könnyű összehasonlítani, különböző molekuláris tesztekkel, melyre számos programot fejlesztettek ki (Stoeckle és mtsai. 2005, Zhou és mtsai. 2007, Padial és mtsai. 2010, Pires és Marinomi 2010).

A COI szekvenciák által felállított rokonsági fák nagy hasonlóságot mutattak a morfológiai és egyéb genetikai törzsfákkal az eddig vizsgált legtöbb taxonok esetében (Pauls és mtsai. 2010).

Bizonyos esetekben azonban – ha a fajok csak nemrég váltak szét (például a Hawaii-szigeten élő ecetmuslicák vagy a Galápagos-szigetén élő Darwin-pintyek) – a mitokondriális DNS nem használható fajok elkülönítésére (Petren és mtsai. 2005). Ugyancsak nem használható a mitokondriális DNS fajok elkülönítésére, ha a fajok gyakran hibridizálódnak (introgresszió), vagy a populációk szétválását nem követte a genetikai struktúrák végleges elkülönülése (részleges genetikai szóródás). Ezen kívül bizonyos tengeri rózsza és korall fajok esetében igen csekély eltéréseket találtak a mtDNS szekvenciák összehasonlításakor (Stoeckle és mtsai. 2005).

Ma már egyre gyakrabban használják különböző gerinces és gerinctelen állatcsoportok esetében a mtDNS COI génjének különböző bázispár hosszúságú szakaszait (Ujvárosi és Bálint 2012). Ellenben növények esetében a különbségek kimutatására leginkább a cpDNS-t, illetve különböző genomi DNS szerkvenciákat (mikroszatellitek) használnak.

A lárvákat kifejlettekkel való társításoknál a DNS szekvenciák alkalmazása mára már elfogadott technika, bár ezt még csak kevés taxon esetében használták, mint például a tegzeseknél (Trichoptera) (Pauls és mtsai. 2010, Zhou és mtsai. 2007).

1.2. Szőrös szemű iszapszúnyogok

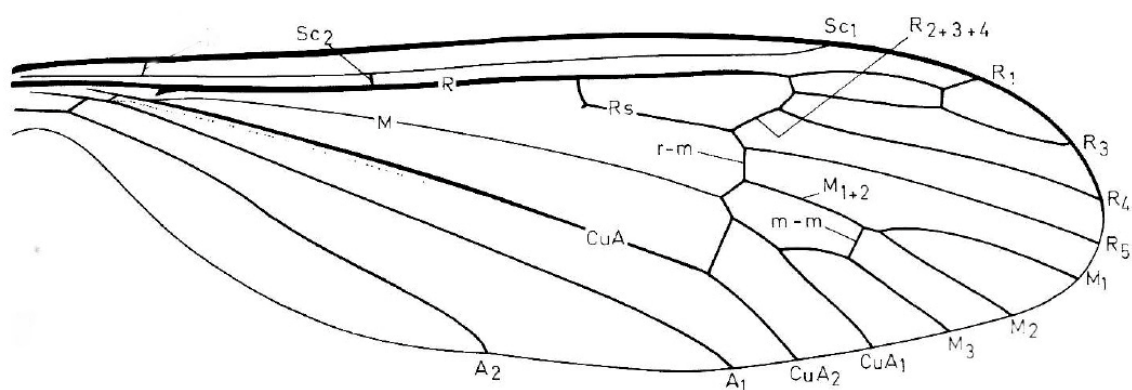
1.2.1. Rendszerezésük és elterjedésük

A szőrös szemű iszapszúnyogok (Pediciidae) a lószúnyogszerűek (Tipuloidea) kis csoportja, viszonylag kevés fajjal. Az ismert 10 génuszba 490 elismert faj tartozik ebből a Nyugat-Paleartikus régióból 77 fajuk jelzett 5 génuszból (*Pedicia*, *Dicranota*, *Trichyphona*, *Nasiternella*, *Ula*). Romániából 41 fajuk ismert (Ujvárosi 2005, Oosterbroek 2012). Rendszerezésük nem egységes az egész világon. Először Brindle (1963) választotta külön a *Pediciini* alcsaládot a lárva jellegek alapján (a ma ismert *Pediciinae* alcsaládot). Később Starý, 1992-ben a kifejlett egyedek alapján család szintre emelte a szőrös szemű iszapszúnyogokat. Jelen dolgozatban is ezt a rendszerezést követjük (Oosterbroek 2006). Az első integratív módszerekre épülő filogenetikai vizsgálat 2009-ben született. Ez a kutatás morfológiai jellegekre (lárva, báb, imágó) és nukleáris génszekvenciákra (CAD és 28 rDNS) épül. Ennek alapján Petersen és mtsai két családot különítettek el. A Tipuloidae főcsaládon belül az ősi jellegeket mutató Pediciidae és a többi családot, alcsalád szintjén magába foglaló Tipulidae-t (Petersen és mtsai 2009). A család fajai kevésbé kutatottak, sokszor a fajhatárokat nehéz megállapítani a hiányos morfológiai leírások miatt. Az újabb morfológiai és genetikai vizsgálatok egy eddig ismeretlen, kriptikus faj (*Pedicia (Amalopsis) fusca* Ujvárosi és Bálint, 2012) jelenlétét tárták fel, az Európában széles körben elterjedt *Pedicia (Amalopsis) occulta* faj esetében (Ujvárosi és Bálint 2012).

Oosterbroek (2006) számos morfológiai jelleget jelöl meg, amelyek alapján lehetséges a Pediciidae fajok elkülönítése a többi lószúnyogszerűtől. A fajok mérete igen változatos, a kisebb fajoktól (*Dicranota*, ~5 mm) egészen termes fajokig (*Pedicia*, 37 mm). Nagy összetett szemeik vannak, viszont pontszemeket nem találunk. Az összetett szemek ommatídiumai között rövid szőröket találunk, amelyről a család az angol - Hairy-eyed Crane flies -, illetve magyar nevét kapta. Sajátos morfológiai bélyeg, hogy a szárnyon az Sc_1 ér túlnő az Rs elágazásán, Sc_2 megrövidült, és a középér (M) négyfelé ágazik, valamint az $Sc-R$ keresztér az Rs eredése előtt figyelhető meg (1. ábra), kivételt ez alól a *Pedicia (Pedicia) rivosarivosa* faj jelent,

amelynek Sc-R kereszt túlnyúlhat az Rs eredésén (Oosterbroek 2006, Stary 1992). További fontos bélyeg a lábszáron található 1-2 kitines tüske (Starý és Barták 2000).

Az Uliinae és Pediciinae alcsaládok egymástól a szárny szőrözöttségében térnek el. Míg az Uliinae alcsalád esetében sűrűn szőrözött szárnyakat találunk, addig a Pediciinae alcsalád esetében ez a szőrözöttség hiányzik. Az Uliinae alcsalád pontos helyzete a morfológiai jellegek alapján nem volt tisztázott, amíg a genetikai vizsgálatok (28 rDNS és CAD) alapján egyértelműen a Pediciidae család egyik alcsaládja (Petersen és mtsai. 2010).



1. ábra. Pediciidae család fajainak szárnyerezete (*Dicranota* sp. szárny) **C** = szegélyér, **Sc** = szegély alatti ér, **Sc₁** = szegély alatti ér felső ága, **Sc₂** = szegély alatti ér alsó ága, **R** = sugárér, **Rs** = sugárér disztális ága, **R₁-R₅** = sugárér ágai, **r-m** = sugár-közép-keresztér, **M** = középér, **M₁-M₅** = középér ágai, **m-m** = közép-keresztér, **Cu** = könyökér, **A** = hónaljér, **CuA₁-CuA₂** = a könyök-hónaljér közös ága, **A₁-A₂** = hónalj ér (Dienske 1987).

1.2.2. A Pediciidae fajok szaporodásbiológiája

A kétszárnyúak (Diptera) rendjébe tartozó teljes átalakulással fejlődő rovarokra jellemzően, életciklusukban 4 stádiumot különítünk el: pete, lárva, báb, imágó.

1.2.2.1 Peték

Világos színű, megnyúlt petéket a nőtények a nedves talajba rakják. A peték legtöbbször csak vékony peteburokkal körülvettek. A petékből a lárvák néhány napon belül kelnek ki (Brindle 1963).

1.2.2.2 Lárvák

Négy lárva stádiumot különíthetünk el, amelyek közül az első 3 stádium viszonylag rövid az utolsóhoz képest. A negyedik lárva stádium után bábozódnak be a lárvák. A lárvakor hossza változó, találunk évente többször repülő fajokat ezen belül is 1 év alatt kifejlődőket (*Dicranota* (*Dicranota*) *bimaculata*) melynek lárvai 1 év alatt fejlődnek ki, de két eltolódott repülési csúccsal, illetve 1 évnél kevesebb idő alatt kifejlődő fajokat, (*Dicranota* (*Dicranota*) *guerini*) amelyek esetében 1 éven belül több generáció váltja egymást. Egyik generáció tavasztól-nyárvégéig, másik nyárvégétől-tavaszig tart (Elliott 1983).

A fajok csupán 2%-nak ismert a lárva alakja, életmódjukról való ismeretek is igen hiányosak (Oosterbroek 2012, Ujvárosi és mtsai 2010, Crisp és Lloyd 1954).

1.2.2.2.1. A lárvák morfológiai jellemzői

A lárvák általában világos színűek, fehéres-sárgák ritkábban szürkés, világos barnás színűek. Testük megnyúlt, hengeres, feji részüknél elkeskenyedők. A jól fejlett (hemicephal), kitinizálódott fejtokot találunk, melyet a lárvák képesek visszahúzni az első torszelvénybe (Brindle 1963, 1967, Oosterbroek és Theowald 1991). Lárvák metapneusztikus légzőrendszerrel rendelkeznek (légző nyílás csak a lárva utolsó potroh szelvényén található), az anális végnél két spirákulummal (légzőmezővel), melyet két lebeny vesz körül a *Pediciinae* alcsalád esetében, míg az *Ula* génusz fajainál 5 lebenyt találunk. Az anális nyílást általában 2-4 anális lebeny veszi

körül, amelyek hossza a fajok esetében változó. A potroh szelvényeken mászást segítő képleteket találunk. *Dicranota* génusz esetében két karom koszorúban végződő állabakat, a III-VIII potrohszelvényen. Míg a *Pedicia*, *Tricyphona*, *Nasiternella* és az *Ula* fajok esetében változó számú mászást segítő dörzsfelületet, melyek a potrohszelvényeken kereszt irányú, megvastagodott kinövések (Oosterbroek and Theowald 1991, Gelhaus 2008, Ujvárosi et al. 2010).

1.2.2.2.2. Táplálkozásuk

Találunk köztük korhadékevőket (*Tricyphona*, *Nasiternella*), gombaevőket (*Ula*) illetve ragadozókat is (*Tricyphona*, *Dicranota*, *Pedicia*) (Krivosheina 2009, Gelhaus és Byers 2008).

1.2.2.2.3. Élőhelyük

Dicranota fajok lárvái áramló vizek közelében találhatók, homokba fúródva vagy vízinövények, mohák között megbújva, de mindig a parti zónában. A *Pedicia* fajokat hegyvidéki, dombvidéki források környékén, elmocsarasodó, iszapos területeken, mohapárnák közt találjuk. Mindkét génusz fajai élőhelyük fontos ragadozói (Brindle 1963, 1967, Crisp és Lloyd 1954). Gyakran több fajt is megtalálunk egymás közelében, ezek alapján a táplálék felosztás megtörténik közöttük. *Tricyphona* és *Nasiternella* génusz fajait nedves, bomló avarban, korhadozó fákban valamint mohapárnák alatt találjuk (Krivosheina 2009, Gelhaus és Byers 2008). *Ula* génusz fajai a talajban lévő gomba fonalakkal táplálkoznak, ritkábban a gombák termő testében is megtaláljuk őket (Ujvárosi 2005, Krivosheina 2011).

1.2.2.2.4 Ökológiai szerepük

Fontos szerepet töltenek be a táplálék láncban, fontos táplálékai számos más gerinctelen fajnak, halaknak, kétélűeknek és madaraknak. A források elmocsarasodó területeinek csúcsragadozóinak is tekinthetők a *Pedicia* génusz fajai, melyek jól alkalmazkodtak ezen területekhez (Ujvárosi és mtsai 2010).

1.2.2.3 Báb

A bábállapot hossza változó, általában 5-12 napig tart. Színezetük a világossárgától a szürkés- barnásig terjed, a báb feji és anális része általában eltérő színű. A *Pedicia*, *Trichyphona* és *Dicranota* génuszok fajai selyemgubót készítenek maguknak, amelyet különböző törmelékekkel borítanak be, ezzel álcázva magukat. A bábokat mindig a víztől távolabb, moha párnákban, az iszapban vagy a homokban találjuk, de minden esetben a vízszint fölött. A bábokon a protonal szarv (a trachea nyílások helye) változó alakú, a *Trichyphona* génusz esetében rövidek és szélesek, a *Pedicia* (*Pedicia*) *rivosa rivosa* faj esetében lapítottak, a *Dicranota* génusz esetében rövid kúpszerű, míg az *Ula* génusz fajainak hosszú megnyúlt. A nemek megkülönböztethetők bábállapotban. A nőtények anális szegmense általában megnyúltabb, ceruzahegy alakú, és nem találunk rajta tüskét, míg a hímek utolsó potrohszelvénye tompább és jól fejlett kinövéseket, tüskét találunk rajta (Brindle 1963, 1967, Gelhaus és Byers 2008).

1.2.2.4 Imágó

Imágók megnyúlt lábakkal, csápokkal és szárnyakkal rendelkeznek, méretük igen változó az 5-37 mm-es méret tartományban. A nőtények mindig nagyobbak a hímeknél. Élethosszuk változó, 4-5 naptól 1-2 hétig terjed. Imágó korban már nem táplálkoznak, legfeljebb harmatot, nektárt szívogathatnak. A fajok többségénél az emésztőrendszer visszafejlődött, csökevényes akárcsak a szájszervek. Kültakarójuk vékony, könnyen kiszáradnak ezért a magasabb páratartalmú helyeken találjuk őket, mint patakpartok magas-kórós társulásai. Az *Ula* génusz fajait erdőkben, főleg fenyvesekben és bükkösökben találjuk, ahol mohapárnákon pihennek. A *Pedicia* génusz esetében gyakran megfigyelhető, hogy az egyedek a növényeken mászkálva keresik egymást, első pár lábukat tapogatásra használva (saját megfigyelés). Bizonyos esetben a hímek „legényest” járnak, amikor is egy kimagasló pont fölött gyűlnek össze és ott fel-le repkednek, ezzel csalogatva oda a nőtényeket. A párzást követően a nőtények 1-2 napon belül lerakják a petéiket, nedvesebb talajba, mohapárnákba, iszapba vagy a kisebb patakok esetében a parti régióba (Gelhaus és Byers 2008).

A két alcsaládot (Uliinae és Pediciinae) a szárnyon lévő sűrű szőrök jelenléte vagy hiánya alapján, valamint a lárvák esetében az ördögálarcot körülvevő lebenyek száma alapján (Uliinae 5 lebeny, Pediciinae 2 lebeny) különítik el. Míg a génuszokat, algénuszokat általában a szárnyerezet alapján. A génuszok elkülönítése során a lárvakori bélyegeket is figyelembe vesznek, mint a légző korongot körül vevő lebenyek száma és hossza, a mászó képletek típusa és száma, valamint a fejtök különböző morfológia jellegei (Brindle 1963, Oosterbroek és Theowald 1991). A kifejlett egyedeket a szárnyerezet és -mintázat, a test színezettsége alapján különítik el, valamint a hímek esetében a ivarszervi függelékeik a legfontosabb fajbélyegek, míg a nőstények esetében még nincs kidolgozott határozókulcs a tojócső és a cercusok alakjára nézve (Brindle 1967, Stary 1992, Savchenko 1986c).

A Brindle 1963-ban különítette el először a *Pedicia*, *Trichyphona* és *Dicranota* lárvákat génusz szinten. Figyelembe véve a mászást segítő képletek típusát (állábak vagy dörzsfelületek), az ördög álarcot körülvevő lebenyek hosszúságát. Ezt követően kevés átfogóbb tanulmány készült a Pediciidae család lárváiról és azok is ritkán tartalmaztak új információkat (Alexander és Byers 1981, Reusch 1988, Gelhaus 2008), csupán 1-2 lárv leírása történt meg kinevelés valamint kizárásos alapon (Podeniene 2003, Krivosheina 2009, Reuach és Oosterbroek 1997), a fajbélyegek kiválasztásánál nem történt meg a többi fajjal való pontos összehasonlítás. Ezen csoport esetében genetikai alapú lárv-kifejlett társítás, valamint összehasonlító morfológiai vizsgálatok még nem történtek.

2. Célkitűzés

Fő célkitűzéseink:

1. Megvizsgálni, hogy a standard DNS technikák mennyire használhatók a Pediciidae család esetében a Kárpátok térségéből leírt fajok elkülönítésére.
2. Kriptikus diverzitás vizsgálata a *Dicranota* génusz fajai esetében.
3. Lárvaalakok társítása a kifejlett egyedekkel DNS szekvenciák segítségével, a *Pedicia* és *Dicranota* génuszok esetében (a Kárpátok térségében élő fajoknál).

3. Hipotézisek és predikciók

Célkitűzéseink alapján a következő hipotéziseket fogalmaztuk meg.

1. Első számú célkitűzés: Standard DNS szekvenciák tesztelése

Hipotézis 1: Morfológiailag nehezen elkülöníthető fajok esetében a mtDNS szekvenciák sem strukturálódnak.

Predikció1: Azért nem találunk genetikai különbségeket közel rokon fajok esetében, mert nem is beszélhetünk két külön fajról, csak a fajon belüli morfológiai változatokról.

Predikció2: A COI mtDNS szekvenciák nem alkalmasak ezen csoport esetében a fajok szétválasztására.

Hipotézis 2: Morfológiailag nehezen elkülöníthető fajok esetében a mtDNS szekvenciák egymástól szétváló csoportokat mutatnak ki.

Predikció: A fajok régóta szétváltak egymástól, a mtDNS-ükben lévő különbségeket nem követte számottevő morfológiai változás.

2. Kettes számú célkitűzés: Kriptikus diverzitás vizsgálata

Hipotézis 1: Nincs kriptikus diverzitás a fajokon belül.

Predikció 1: A Pediciidae család esetében a mitokondriális COI szekvenciák nem használhatóak a kriptikus diverzitás kimutatására.

Predikció 2: Nincs elég mintánk a fajok különböző populációból, ezért a kis mintaszám miatt nem sikerült kimutatni változatosságot.

Hipotézis 2: Genetikai diverzitást lehet találni egyes fajok populációi között.

Predikció: A fajon belüli populációk régóta elszigetelődtek egymástól, ennek következtében genetikailag elkülönült csoportokról beszélhetünk.

3. Hármasszámú célkitűzés: Lárva-imágó társítás

Hipotézis 1: A lárvalakokat lehet genetikailag társítani az imágókhoz, viszont ezen fajok egymástól morfológiailag nem különíthetők el.

Predikció 1: A szőrös szemű iszapszúnyogok esetében a lárvakori alakok nagyon ősi jellegeket őriztek meg, amelyek a fajok szétválásával sem változtak.

Predikció 2: A lárvák igen apró, eddig fel nem tárt bélyegek alapján különülnek el egymástól, amelyet a felületes morfológiai vizsgálatok nem mutattak ki.

Hipotézis 2: A lárvák a standard DNS technikák segítségével társíthatók, és a fajok egymástól morfológiai jellegeikben is eltérnek.

Predikció: Vannak olyan morfológiai jellegek, amelyek alapján lehetséges a lárvák fajszintű határozása.

4. Anyag és módszerek

4.1. Genetikai vizsgálatok

A vizsgálat során a Pediciidae családból tartozó imágókat gyűjtöttünk be amelyek 4 génuszból (*Pedicia*, *Dicranota*, *Tricyphona* és *Ula*) származtak. Lárvékat a *Pedicia*, *Dicranota* valamint a *Trichyphona* génuszokból sikerült gyűjteni., A begyűjtött imágókat és lárvékat morfológiai és genetikai módszerekkel vizsgáltuk. A begyűjtött példányok közül 497 példányt küldtünk Kanadába, ahol a DNS vonalkódzási projekt - Barcode of Life Data Systems (EUTIP – Tipuloidea of Europe projekt) – keretében elvégezték a citokróm c-oxidáz I 5' végi 658 bázispár hosszúságú szakaszának a szekvenálását. Az elküldött 497 példány 87.2% esetében sikerült COI DNS szekvenciákat kivonni, ebből 328 esetben sikerült 650 bp-nál hosszabb szakaszokat kinyerni. A *Dicranota* génusz esetében 133 példányból származó szekvencia közül 86 származott lárvékból. Az imágók esetében 16 fajból sikerült megfelelő hosszúságú szekvenciákat kinyerni. A *Pedicia* génuszból 11 fajnak történt meg a szekvenáltatása, összesen 144 szekvenciából 29 lárvékból származott. Az *Ula* génusz esetén 4 fajból 13 példányból sikerült megfelelő hosszúságú szekvenciát izolálni, míg a *Tricyphona* génusz esetében 45-öt 7 fajból, itt 2 szekvencia származott lárvékból. Összesen 12 ország területéről származtak a gyűjtött Pediciidae imágók és lárvák.

A molekuláris vizsgálatokhoz az irodalomban már használt és ajánlott módszereket használtuk. A MEGA 5 nevű program segítségével szerkesztettük a molekuláris fákat (Zhou és mtsai 2007, Pauls és mtsai 2010). Vizsgálataink során a fák megrajzolásánál szomszéd-összevonó (Neighbor-Joining) módszert használtunk, mivel ezen összehasonlítás érzékeny a fa végső elágazásaira, így jól használható szétváló csoportok azonosítására. A molekuláris fák szerkesztésekor Kimura 2 paraméteres modellt használtuk, ami a báziscserék közül csak a tranzíciós-tranzverziós különbségeket veszi figyelembe és egyenlők a bázisgyakoriságok. Az elágazások „helyességét” bootstrap módszerrel vizsgáltuk, 10.000-es ismétléssel. Azért használtuk a bootstrap módszert, hogy megvizsgáljuk az elágazások egy visszatevése

mintavételezés során a vizsgálatban, hányszor adták ugyanazt az eredményt. A nagyszámú ismétlésre az eredmények pontossága miatt volt szükség. Az elágazások időbeli sorrendjének a megállapításra kül csoportot választottunk minden génusznál . Kül csoportba olyan közelrokon fajokat választottunk, amelyek közeli rokonai a vizsgált csoportnak, de nem tartoznak bele (nem alkotnak monofiletikus csoportot velük).

A fajhatárok elkülönítésére Zhou és mtsai 2007-ben kidolgozott rendszerét használtuk, akárcsak a lárva társítások esetébe.

4.2. Morfológiai vizsgálatok

Az imágók esetében a hím genitáliát (ivarszervi függeléket) tanulmányoztuk. Az egyed potroh-csúcsát levágtuk, majd ezt 10%-os KOH oldatban, vízfürdőn kb. 10 percig forraltunk. Ezt háromszor átmostuk, először vízzel, majd kétszer 70%-os alkohollal. Tanulmányozásig alkoholban vagy glicerinben tároltuk. A morfológiai jellegeket Olympus SZ61 binokuláris nagyítóval vizsgáltuk (30-100-szoros nagyításon).

A lárvák esetében a fejtokokat vizsgáltuk, amely során a fent leírt módszert használtuk a megfelelő előkészítéshez. A lárvák fejkapszuláiról és a melljük helyezett milliméteres pappírról egy Olympus SP500UZ digitális fényképezőgéppel készítettünk képeket, amelyeket a Gimp 2.6 képszerkesztő programmal vizsgáltuk. A lárvák esetében a következő jellegeket vizsgáltuk: a légzőkorongokat és azt körülvevő lebenyek alakját és hosszát, a mozgást elősegítő képleteket, valamint a fejtokok alakját és a rajta található különböző szájszervi függelékeket (rágók, állkapcsok, felsőajak formája, hiposztómális lemez alakja, a prementum mintázatát), az antennák alakját valamint érzőszőrök helyzetét.

5. Eredmények

5.1. Standard DNS technikák tesztelése a fajok elkülönítésére

A szomszéd-összevonó módszerrel, Kimura 2 paraméteres modellt használva és az elágazások helyességét 10.000 ismétlés mellett (bootstrap módszer) molekuláris fákat szerkesztettünk. A fákon azon elágazásokat tekintettük helyesnek, amelyeket legalább 75 fölötti bootstrap értékek támasztották alá. Ezen belül is két csoportot különítettünk el. Első csoport a gyengén alá támasztott csoport, amely esetében a bootstrap értékek 75-90 között voltak. A másik erősen alátámasztott csoportba a 90-100 bootstrap értékekkel alátámasztott elágazások kerültek (Zhou és mtsai 2007, Pauls és mtsai 2010).

A vizsgálatok során a félrehatározott vagy egyéb okok miatt a BOLD System rendszere által kiszűrt szekvenciákat nem vettük bele az elemzésekbe.

A fajhatárok és a kriptikus diverzitás tesztelése során adatsorainkba nem vettük be a lárvákat csupán a kifejlett alakokat, követve Zhou és mtsai által felállított módszert a fajhatárok elkülönítésére. A *Dicranota* génusz esetében külcsoporthként a *Pedicia* génuszba tartozó *Pedicia* (*Crunobia*) *stary* fajcsoport két fajt vettük a *P. (C.) stary* és a *P. (C.) apusenica*-t.

Molekuláris vizsgálataink alapján magas bootstrap értékekkel (>90) alátámasztott elágazásokat találtunk a *Dicranota* (*Dicranota*) *bimaculata* (bootstrap érték (a továbbiakban: BÉ) = 100), *Dicranota* (*Paradicranota*) *simulans* (BÉ=100), *D. (P.) martynovoski* (BÉ=100), *D. (P.) landrocki* (BÉ=100), *D. (P.) pallens* (BÉ=100) és a *D. (P.) brevicornis* (BÉ=99) fajok esetében. A *D. (P.) gracilipes*, *D. (P.) pavida*, *D. (P.) mikiana* és a *D. (P.) consimilis* esetében csupán egy kifejlett hím példánynak a szekvenciájával rendelkezünk. Viszont ezen fajok is a taxonazonosító fán külön leváló ágakat képeznek. A taxonazonosító fán zölddel jelölt leágazások jelölik a genetikailag is elkülönülő fajokat (3. ábra).

A *D. (P.) subflammatra*, illetve *D. (P.) auripontium* esetében nem sikerült a morfológiailag különböző fajokat megerősíteni. Egyik faj sem válik szét elágazó csoportokra. A

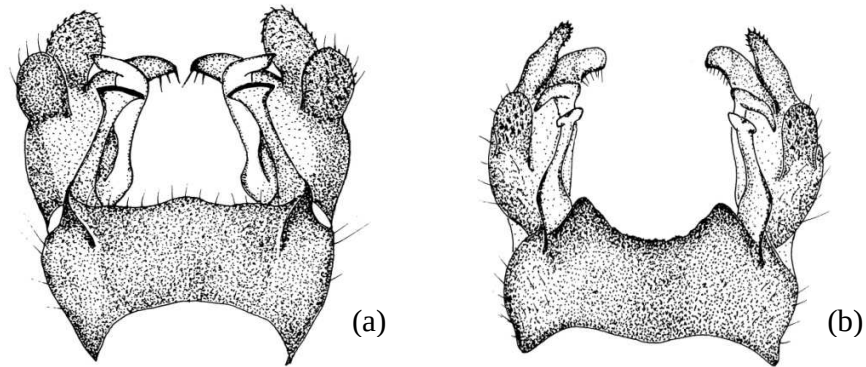
3. ábrán megvastagított (fekete szín) elágazás jelöli. Ennek magyarázata lehet, hogy az általunk használt COI mtDNS szekvenciák nem alkalmasak e fajcsoport szétválasztására. Feltevésünk helyességének vizsgálatához további példányokra, valamint más szekvenciák használatára lesz szükség a továbbiakban.

5.2. Kriptikus diverzitás vizsgálata a *Dicranota* génusz fajai esetében

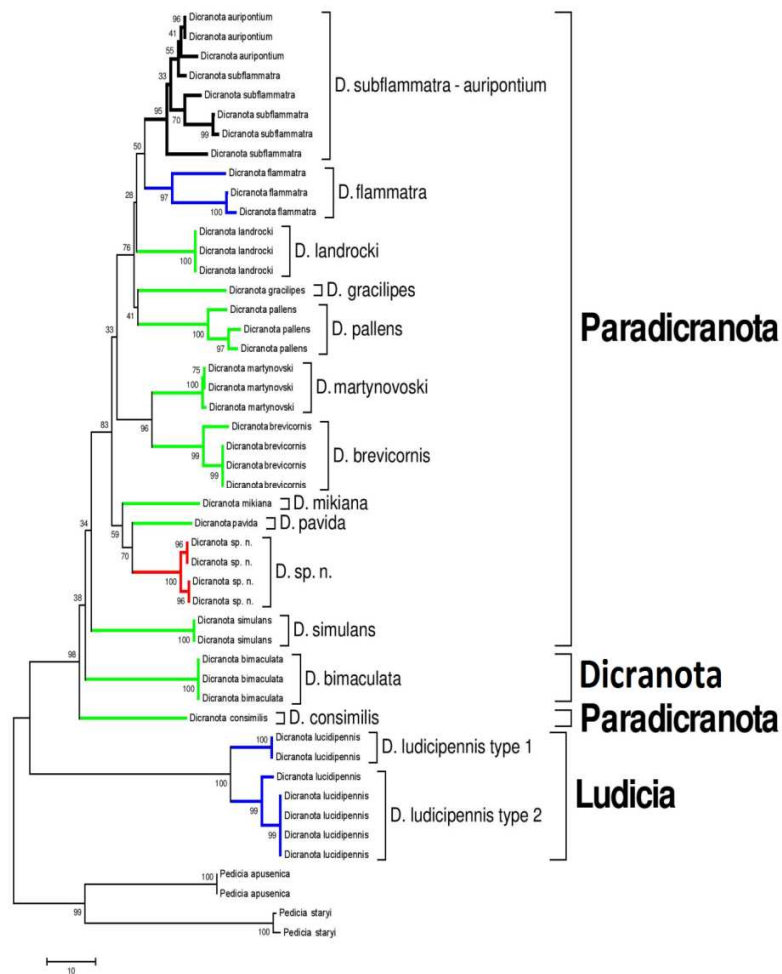
A *Dicranota* (*Ludicia*) *ludicipennis* és a *Dicranota* (*Paradicranota*) *flammatra* fajok esetében kiemelkedő kriptikus diverzitást véltünk felfedezni, melyeket magas bootstrap értékek is alátámasztanak (100 illetve 97). Az előzetes morfológiai vizsgálatok nem mutattak ki különbségeket a fajok esetében a két genetikailag elkülönülő csoport között. A szekvenciák közötti divergencia teszteléséhez további példányokra lesz szükség. Az 3. ábrán kézzel jelölt elágazások jelölik a kriptikus diverzitással rendelkező fajokat.

Molekuláris vizsgálatok során sikerült egy morfológiailag is jól elkülönülő, a tudomány számára ismeretlen fajt azonosítani az Erdélyi Szigethegységből, melyet magas bootstrap érték is alá támaszt (100). Az összehasonlító morfológiai vizsgálataink során a *D. (P.) brevicornis* formacsoport tagjának véltük az ivarszervi struktúrák vizsgálatakor. A 2. ábrán a *D. (P.) brevicornis* és az általunk beazonosított új faj hím ivarszervi függeléke látható, viszont a molekuláris vizsgálatok alapján a faj a *D. (P.) mikiana* formakörhöz csatlakozik, (3. ábra kék színnel jelölve).

Bár a szomszéd-összevonó módszer nem alkalmas filogenetikai leszármazások pontos felderítésére, mégis látszik, hogy a *Ludicia* algénusz (jelen esetben a Kárpátok térségében egyedül előforduló faj) a *Dicranota* (*Ludicia*) *ludicipennis* élesen elkülönül a *Dicranota* génusz másiktól (egymástól viszont el nem különülő) *Dicranota* és *Paradicranota* algénuszoktól. Ezt a morfológiai vizsgálataink is alá támasztják.



2. ábra Ivarszeri függelékek (a) *Dicranota (Paradicranota) brevicornis*, (b) *Dicranota (Paradicranota) sp. n.*



3. ábra. Taxonazonosító fa (szomszéd összevonó módszerrel, Kimura 2 paraméteres modell, 10.000 ismétlés) a *Dicranota* génusz kifejlett egyedei alapján.

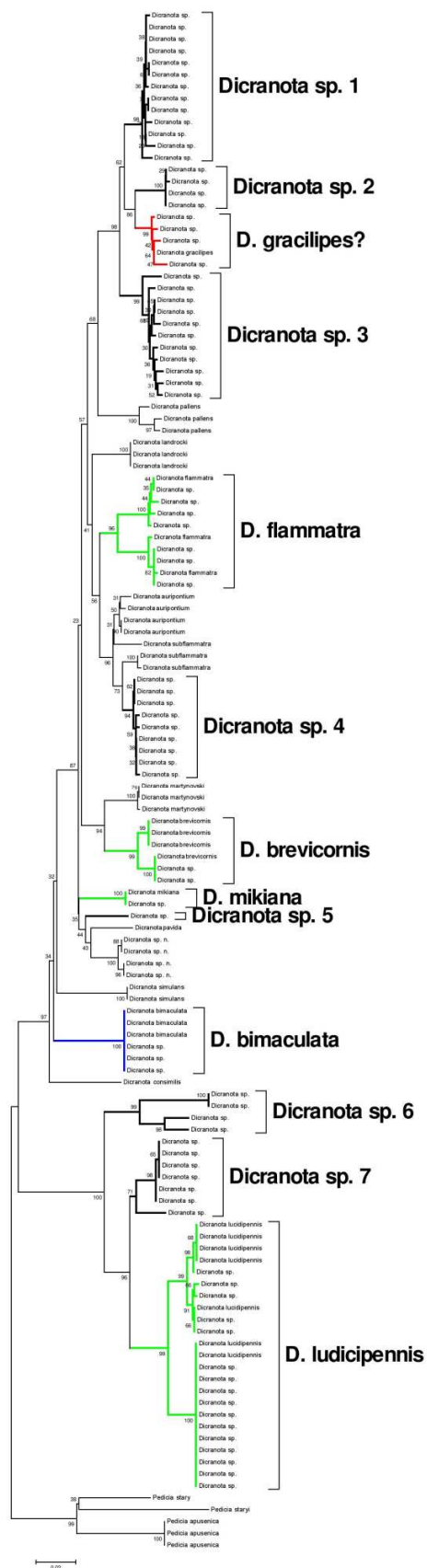
5.3. A lárva-kifejlett társítás

A lárvtársítások esetében Zhou és mtsai (2007) és Pauls és mtsai (2010) által a tegzesekre kidolgozott módszerét használtuk a lárvák társítására. Abban az esetben fogadtunk el egy társítást ha: 1) kritérium - a lárva a kifejlett egyeddel azonos haplotípusba tartozott, 2) kritérium - ha a fajhatáron belül csatlakozott a fához és ezt csatlakozást 75-nél nagyobb bootstrap értékek támasztották alá. A lárvtársítást nem fogadtuk el, ha lárva a fajhatáron kívülre esett a leváló ágak esetében is.

Ennek alapján 5 fajnak sikerült társítani a lárváját, ebből 4 eddig ismeretlen lárva alakot találtunk. A *Dicranota (Dicranota) bimaculata* lárva a szakirodalomból ismert volt (Crisp és Lloyd 1954, Elliott 1988), a 4. ábrán kék színnel jelölve. A *Dicranota (Paradicranota) flammata*, *D. (P.) mikiana*, *D. (P.) brevicornis*, valamint a *D. (Ludicia) ludicipennis* fajok lárváit sikerült elsőként társítani. A *D. (P.) mikiana* és *D. (P.) brevicornis* fajok esetében az 1) kritérium alapján, míg a másik két faj esetében (*D. (P.) flammata* (BÉ=96), *D. (L.) ludicipennis* (BÉ=100)) a 2) kritérium alapján társítottuk a lárvákat (a 4. ábrán zöld színnel jelölt elágazások). Ez utóbbi két faj esetében egységes fajként kezeltük a két leváló kriptikus diverzitást mutató csoportokat is, mivel az alaposabb lárvmorfológiák figyelembe vételével sem sikerült különbségeket találni.

A *D. (P.) gracilipes* faj esetében nem fogadtuk el a társítást, mivel az összes lárva a fajhatáron kívülre esett, valamint az utolsó elágazás esetében alacsony BÉ=47 értéket kaptunk (4. ábrán piros színnel jelölt rész). De minden bizonnyal további kifejlett, illetve lárvákból származó szekvenciák segítségével lehetséges lesz e faj esetében is a helyes társítás.

Hét olyan elkülönülő ágat sikerült azonosítani (4. ábra), amelyeket lárvák alkotnak, amelyek esetében nem rendelkezünk imágókból származó COI szekvenciákkal, mivel eddig nem sikerült az összes Kárpátok térségében előforduló *Dicranota* fajt begyűjteni. További fajokból származó szekvenciák segítségével biztosan sikerül e fajok lárváit is társítani.



4. ábra. Taxonazonosító fa (szomszéd összevonó módszerrel, Kimura 2 paraméteres modell, 10.000 ismétlés) a *Dicranota* génusz társított lárvái alapján.

A *Pedicia* génusz fajhatárait más munkák keretében sikerült igazolni genetikailag és morfológiailag is (Mészáros 2009, Csepregi 2010, Dénes-Avar 2012, Ujvárosi és mtsai 2009, Ujvárosi és Bálint 2012), így e részt dolgozatomban részletesebben nem tárgyalom.

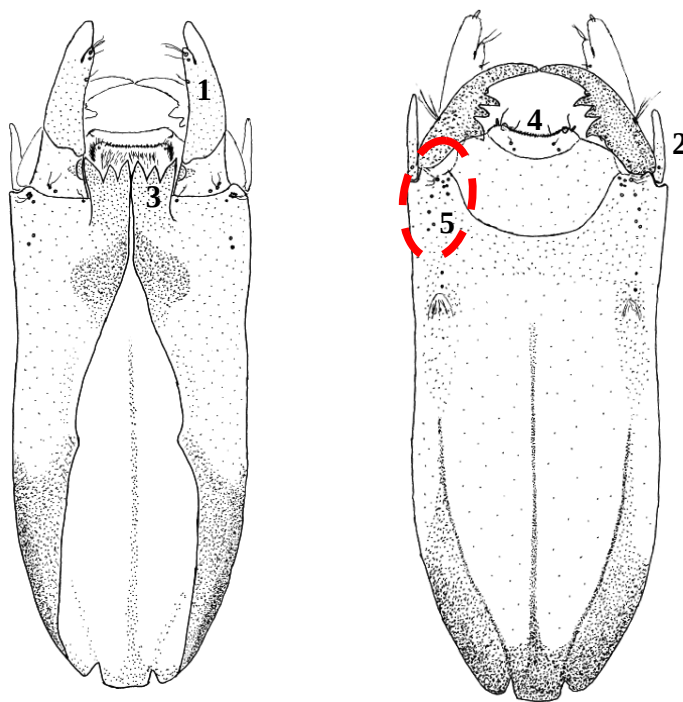
A *Pedicia* génuszba tartozó 5 fajnak sikerült a lárváját társítani a standard DNS szekvenciák segítségével. Ebből a *Pedicia (Pedicia) rivosa rivosa* faj lárvája az irodalomból ismert, viszont a társítást sikerült genetikai adatokkal is alátámasztani (5. ábrán kékkel jelölve). Négy eddig ismeretlen lárva alakot sikerült genetikailag társítani a fent leírt kritériumok alapján. A *Pedicia (Amalopsis) fusca* (BÉ=100), *P. (A.) occulta* (BÉ=99), *P. (Crunobia) litoralis* (BÉ=100) és a *P. (C.) zernyi* (BÉ=98) fajok esetében. Ezeket a 5. ábrán zöld színnel kiemelt elágazások jelölik.

A *Pedicia* génusz esetében is találtunk a lárvák által meghatározott két ágat, amely esetében nem csatlakozik egy imágó szekvenciája se (az 5. ábrán feketével kiemelt részek). Ebben az esetben sem rendelkezünk a Kárpátok térségében elterjed összes faj szekvenciájával. További gyűjtések szükségesek ezen génusz esetében is.

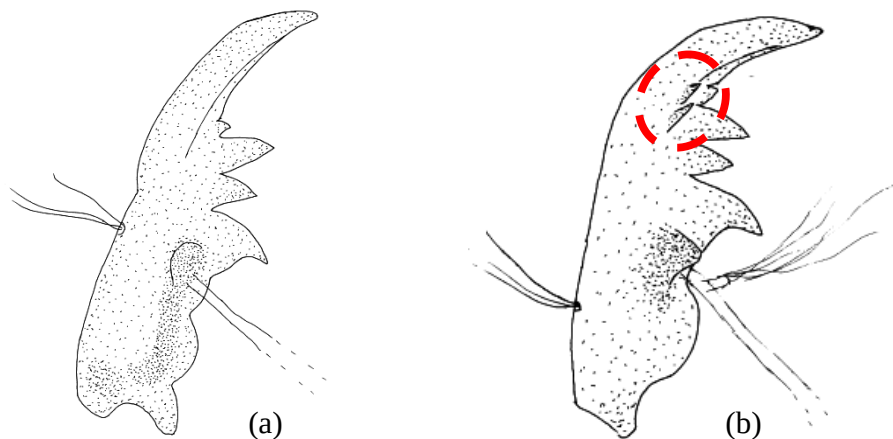
5.4 A lárvák morfológiai összehasonlítása

A begyűjtött és társított lárvák esetében is több bélyeget figyelembe véve, valamint az eddigi irodalmi feljegyzéseket felhasználva a génuszok elhatárolására fontos bélyegek a következők: a ördögálcot körülvevő két lebeny hossza, a mászást segítő képletek típusa (állábak vagy dörzsfelületek), az állkapcsok (maxilla) hossza és alakja (6. ábra 1. jelleg), az antennák hossza (6. ábra 2. jelleg).

Vizsgálataink során először sikerült olyan, morfológiai jellegeket találni, amelyek segítségével lehetséges a *Pedicia* és *Dicranota* algénuszok egymástól való elkülönítése, fontos bélyegek a fent említettek mellett a rágók alakja (7. ábra), a rágókon jelenlévő másodlagos fogak jelenléte vagy hiánya (7. ábra pirossal jelölt jelleg), a hiposztómális lemez alakja (6. ábra 3. jelleg), a prementum mérete és mintázata (8. ábra), valamint a lárv testének szőrözöttsége.



6. ábra. *Dicranota (Ludicia) ludicipennis* fejtoka balra dorzális és jobb ventrális nézetből. 1 – állkapocs (maxilla), 2 – antenna, 3- hiposztómális lemez, hiposztómális fogakkal, 4 – felső ajak, 5 ézőszőrök



7. ábra. Balra (a) *D. (Ludicia) ludicipennis* rágója, jobbra (b) *D. (Paradicranota) sp.* rágója jelölve a másodlagos fogak jelenléte



8. ábra. *D. (Paradicranota) sp.* prementuma, jelölve a rajta található mintázat

Az alábbiakban egy rövid határozó kulcsot adok meg a *Dicranota* és *Pedicia* algénuszainak elkülönítésére.

Dicranota génusz esetébe:

1. A rágókon hiányoznak a másodlagos fogak, a rágó alakja a 7. ábrán (a) látható, a hiposztómális lemez két oldalán nem találunk járulékos fogakat, a prementum szélességének és a hiposztómális lemez szélességének a hányadosa 0,85 körüli *Ludicia* algénusz

2. A rágókon jelen vannak a másodlagos fogak (7. *ábra* (b)), a hiposztómális lemezen találunk járulékos fogakat, a prementum dorzális oldalán két oldalt ábrán látható mintázattal (8. *ábra*), a prementum szélességének és a hiposztómális lemez szélességének a hányadosa 0,70 körüli.....3
3. A lárva teste és a ördögálarc két lebenye közepesen vagy erősen szőrözött, a lebenyek közepesen hosszúak *Paradicranota* algénusz
4. A lárva gyengén szőrözött, az ördögálarc két lebenye hosszú és alig szőrözött*Dicranota* algénusz

Pedicia génusz esetében

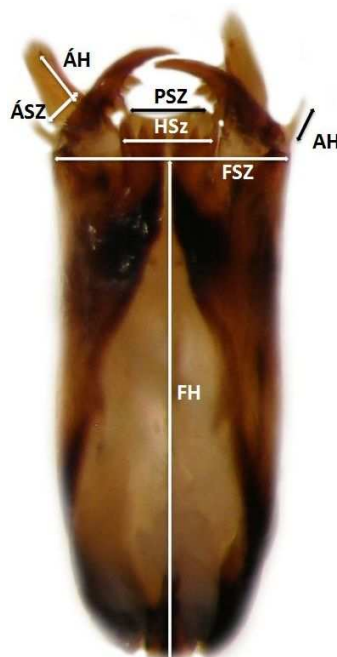
1. Dörzsfelületeket a V-VII szegmenseken találunk. A szelvényezetség nehezen kivehető, csak a V-ik szelvénytől jól megfigyelhető. A légzőnyílások igen aprók,*Amalopsis* algénusz
2. A IV-VII-ig terjedő szegmenszen találunk dörzsfelületet, ezek jól fejlettek. A test szelvényezetség jól megfigyelhető. A légző nyílások nagyobbak (így sem túlságosan).....3
3. A hiposztómális lemez két oldalán kiszélesedő, vagy félhold alakú járulékos élleket találunk.....*Crunobia* algénusz
4. A hiposztómális lemez két oldalán nem figyelhető meg járulékos él. A lárvák nagy termetűek*Pedicia* algénusz

A fajsztintú határozásban eddigi megfigyeléseim alapján igen apró morfológiai jellegek szükségesek. Mint a prementum alakja és mintázottsága (8. *ábra*), a felsőajak (labrum) alakja és rajta található érzőszőrök és pappillák helyzete (6. *ábra* – 4 jelleg), valamint a fejtok ventrális és dorzális oldalán található érzőszőrök száma és helyzete (6. *ábra* – 5 jelleg). Ezen bélyegek többsége csak mikroszkópos nagyítás (100-400X) mellett vizsgálható.

Úgy a *Pedicia*, mind a *Dicranota* génuszba tartozó fajok fajsztintú határozásához még jóval több társított lárva egyedre lesz szükség, mivel bizonyos esetekben kevés számú és több lárva stádiumban lévő lárvánk van. A megfelelő bélyegek megtalálásához, mindenképp szükséges a Kárpátok térségében élő fajok legalább 80-90%-nak a társítása.

Morfológiai méréseket is végeztem 7 jelleg esetében. A következő részeket mértem le: a fejtok hossza és szélessége, a hiposztómális lemez szélessége, a prementum szélessége, az állkapcsok hossza és szélessége valamint az antennák hossza (9. ábra). Viszont a kevés sikeres társítás miatt, valamint kis mintaszám miatt e mért eredmények statisztikai elemzése még várat magára.

Az viszont elmondható, hogy, statisztikailag nem, de megfigyelések és mérések alapján a *Dicranota* génusz esetében elmondható, hogy a *Ludicia* algénusz esetében a prementum/hiposztómális lemez arány (0,85 – 16 lemért lárva alapján) mint az ebben a jellegben egymástól szét nem váló *Dicranota* és *Paradicranota* génuszok esetében ahol ez az arány 0,7 körüli 7 lemért lárva alapján. Viszont ennek a különbségnek statisztikai elemzéséhez további példányokra lesz szükség.



9. ábra. *Dicranota* (*Ludicia*) *ludicipennis* fejtokja ventrális nézetből, feltüntetve a mért morfológiai jellegekkel (**AH** – antenna hossz, **ÁH** – állkapocs hossz, **ÁSZ** – állkapocs szélesség, **FH** – fejtok hossz, **FSZ** – fejtok szélesség, **HSz** – hiposztómális lemez szélessége, **PSZ** – prementum szélessége).

6. Összefoglaló

Eredményeink alapján elmondható, hogy:

1. A standard COI mtDNS szekvenciák alkalmasak a Pediciidae család fajainak elhatárolására, ez alól kivételt csak a *Dicranota subflammatra* – *D. auripontium* fajkomplex jelent.
2. Genetikai elemzések során sikerült kriptikus diverzitást kimutatni a *Dicranota* génusz két faja esetben, valamint egy a tudomány számára ismeretlen, morfológiailag is elkülönülő fajt sikerült kimutatni az Erdélyi Szigethegységből.
3. Molekuláris módszerek alkalmasak a lárva-kifejlett társításra a Pediciidae család esetében is, ez alapján 8, eddig ismeretlen lárva alakot sikerült társítani.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, dr. Ujvárosi Lujzának a szakmai útmutatásokért, Valérie Lévesque-Beaudin-nak az Ontariói Biológiai Intézetből, a kanadai Guelph Egyemről, a standard mtDNS kinyerésében nyújtott segítségért. Váncsa Évának és Bálint Miklósnak a begyűjtött lárvákért és kifejlett imágókért, valamint Török Edinának a dolgozat megírásában nyújtott segítségéért.

8. Irodalom

1. Alexander, C.P.; Byers, G.W. (1981) Tipulidae. *Manual of Nearctic Diptera*. (szerk. McAlpine, J.F.), Vol. 1. Agriculture Canada, Monograph **27**: 153-190. Research Branch, Toronto
2. Brindle, A. (1963) The natural groups of the British Pediciini (Diptera, Tipulidae). *Entomologist's Monthly Magazine*. **98**, 234–237.
3. Brindle, A. (1967) The larvae and pupae of the British Cylindrotominae and Limoniinae (Diptera, Tipulidae). *Transactions of the Society of British Entomology*, **17**, 151–216.
4. Byers, G.W.; Gelhaus, J.K. (2008) Tipulidae. *An introduction to the aquatic insects of North America* (szerk. Merritt, R.W.; Cummins, K.W.; Berg, M.B.) 773-800. Kendall/Hunt, Dubuque
5. Csepregi, J. (2010) *A Pedicia (Crunobia) stary Savchenko, 1978 (Insecta, Diptera, Pediciidae) fajcsoport a Kárpátokban*. Államvizsga dolgozat, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár.
6. Dénes-Avar, L. (2012) *A Pedicia (Crunobia) littoralis fajcsoport integratív taxonómiai vizsgálata*. Magiszteri dolgozat, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár.
7. Dienes, J. W. (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, Ser. A*, **409**, 1-52.
8. Elliott, J. M. (1983) Life Cycle and Growth of *Dicranota bimaculata* (Schummel) (Diptera : Tipulidae). *Entomologist's Gazette*, **34**, 291-297.
9. Krivosheina, M. G. (2009) On the morphology and ecology of the previously unknown larva of the short-palped crane fly *Nasiternella varinervis* (Zetterstedt, 1851) (Diptera, Pediciidae). *Entomological Review*, **89**, 1055-1058.
10. Krivosheina, N. P. (2011) New data on the larval morphology of limoniid flies of the genus *Ula* (Diptera, Pediciidae). *Entomological Review*. **91**, 432-443
11. Mészáros, N. (2009) *Phylogenetic analysis of the genus Pedicia (Diptera, Pediciidae) from the Carpathians, based on molecular sequence data -preliminary results-*.

Master of Science Thesis, Cell Biology and Molecular Biotechnology, Babeş-Bolyai University, Faculty of Biology and Geology, Cluj Napoca.

12. Lindner, E. (1959) Beitrage zur Kenntnis der Larven der Limoniidae (Diptera). *Zeitschrift fur Morphologie und Okologie der Tiere* **48**, 209-319.
13. Oosterbroek, P. and Theowald, B. (1991) Phylogeny of the Tipuloidea based on characters of larvae and pupae (Diptera, Nematocera) with an index to the literature except Tipulidae. *Tijdschrift voor Entomologie*, **134**, 211–267.
14. Oosterbroek, P., (2006) The European families of the Diptera. *Identification, diagnosis, biology*, pp. 6-205. KNNV Publishing, Utrecht.
15. Oosterbroek, P. (2012) Catalogue of the Crane flies of the World (Insecta, Diptera, Nematocera, Tipuloidea). – Elérhető: <http://ip30.eti.uva.nl/ccw/>, verzió: 2012.április. 17.
16. Padial, J. M., Miralles A., De la Riva I. and Vences M. (2010) *The view integrative future of taxonomy*, Frontiers in Zoology, 7: 16.
17. Pauls, S. U., Blahnik, R. J., Zhou, X., Wardwell, C. T., and Holzenthal, R. W. (2010) DNA barcode data confirm new species and reveal cryptic diversity in Chilean Smicridea (Smicridea) (Trichoptera:Hydropsychidae). *Journal of the North American Benthological Society*, **29**, 1058-1074.
18. Petersen, M.J.; Bertone, M.A.; Wiegmann, B.M.; Courtney, G.W. (2010). Phylogenetic synthesis of morphological and molecular data reveals new insights into the higher-level classification of Tipuloidea (Diptera). *Systematic Entomology*. **35**, 526-545.
19. Petren, K, Grant, P. R., Grant, B. R., Keller, L. F. (2005) Comparative landscape genetics and the adaptive radiation of Darwin's finches: the role of peripheral isolation. *Molecular Ecology*, **14**, 2943-2957.
20. Pires, A.C. and Marinoni, L (2010) DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. *Biota Neotrop* 10(2), 339-346
21. Podeniene, V. (2003) Morphology and ecology of the last instar larvae of the crane flies (Diptera, Tipulomorpha) of Lithuania. Summary of Doctoral dissertation Vilnius University, Biomedical Sciences, Zoology, 1-35. Vilnius

22. Reusch, H. (1988) *Untersuchungen zur Faunistik, Phanologie und Morphologie der Limoniidae im Niedersächsischen Tiefland (Insecta, Diptera, Nematocera)*. 1-154
Ph.D disszertáció. Hamburg-i Egyetem, Hamburg.
23. Savchenko, E. N. (1986) Komary-limoniidy [Limoniid-flies]. (General description, subfamilies Pediciinae and Hexatominae). *Fauna Ukrainy*, **14**, 1-380.
24. Starý, J. (1992) Phylogeny and classification of Tipulomorpha, with special emphasis on the family Limoniidae. *Acta Zoologica Cracoviensia*, **35**, 11-36.
25. Starý, J. and Barták, M. (2000) Pediciidae, *Folia Fac. Sci. Nat. Univ. Masaryk. Brun., Biol.*, **104**, 37-40.
26. Stoeckle, M., P. E. Waggoner, J. H. Ausubel, (2005) Barcoding Life, illustrated Goals, Rationale, Results:
<http://phe.rockefeller.edu/barcode/docs/TenReasonsBarcoding.pdf>.
27. Ujvárosi, L. (2005) Additions to the Cylindrotomidae, Limoniidae and *Pediciidae* species (Diptera) in Romania and Bulgaria. *Entomol. rom.*, **10**: 65-70.
28. Ujvárosi, L., Bálint, M., Mészáros, N. & O. Pop, (2009) Genetic diversity with morphological imprints among *Pedicia (Amalopsis) occulta* (Meigen, 1830) (Diptera, *Pediciidae*) populations in the Carpathian area: preliminary result. *Lauterbornia*, **68**, 47-58.
29. Ujvárosi, L., Kolcsár, L. P., Bálint, M. & M. Ciprian (2010) *Pediciidae* larvae (Insecta, Diptera) in the Carpathian Basin: preliminary results and further perspectives. *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung*, **21**, 233-246.
30. Ujvárosi, L. and 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*, **3189**, 1-28.
31. Zhou, X., K.M. Kjer and J.C. Morse (2007) Associating larvae and adults of Chinese Hydropsychidae caddisflies (Insecta: Trichoptera) using DNA sequences. *Journal of the North American Benthological Society*, **26**, 719-742.