

UNIVERSITATEA „ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE BIOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE

Taxonomia integratoare a speciilor de *Torymus* Dalman și *Ormyrus*
Westwood (Hymenoptera: Torymidae, Ormyridae) asociate cu
cinipide galigene (Hymenoptera: Cynipidae)

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:
Dr. Habil. Mircea-Dan Mitroiu

Student-doctorand:
Ionela-Mădălina Viciriuc

IAȘI
2022

Cuprins

| | |
|--|----|
| Introducere generală..... | 3 |
| 1. Taxonomia integratoare a speciilor de <i>Torymus</i> Dalman (Hymenoptera: Torymidae) asociate cu cinipidul invaziv <i>Dryocosmus kuriphilus</i> Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae)..... | 4 |
| 1.1. Diversitatea genetică și morfologică la <i>Torymus sinensis</i> Kamijo..... | 5 |
| 1.1.1. Introducere | 5 |
| 1.1.2. Material și metode | 5 |
| 1.1.3. Rezultate | 7 |
| 1.1.4. Discuții..... | 9 |
| 1.2. <i>Torymus sinensis</i> și speciile indigene apropiate | 11 |
| 1.2.1. Introducere | 11 |
| 1.2.2. Materiale și metode | 11 |
| 1.2.3. Rezultate | 12 |
| 1.2.3.1. Cheia speciilor de <i>Torymus</i> care parazitează <i>Dryocosmus kuriphilus</i> în Europa..... | 15 |
| 1.2.4. Discuții..... | 15 |
| 2. Taxonomia integratoare a speciilor de <i>Ormyrus</i> Westwood (Hymenoptera: Ormyridae) asociate cu cinipide galigene pe stejari | 15 |
| 2.1. Introducere | 15 |
| 2.2. Materiale și metode..... | 16 |
| 2.4. Discuții | 18 |
| 2.5. Studiu de caz <i>Ormyrus nitidulus</i> Fabricius..... | 18 |
| Concluzii generale..... | 20 |
| Bibliografie | 22 |

Introducere generală

În cadrul unui program de combatere biologică îndreptat împotriva cinipidului invaziv al castanului comestibil *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu implementat la Institutul de Cercetări Agronomice (Franța, Nisa), *Torymus sinensis* Kamijo a fost introdus pentru a reduce populațiile acestuia. Principala activitate desfășurată în Franța a fost cea de a documenta posibilele efecte negative nedorite apărute asupra comunității native de *Torymus* ca urmare a introducerii unei specii exotice. În timpul caracterizării complexului de parazitoizi ai lui *D. kuriphilus* din punct de vedere genetic și morfologic, atenția a fost îndreptată și spre genul *Ormyrus*. Cu doar două specii semnalate, *Ormyrus pomaceus* (Geoffroy) și *O. nitidulus* (Fabricius), analizele moleculare arătau o diversitate mai mare în ceea ce privește numărul de specii.

Pentru studiul acestor taxoni, teza de doctorat a fost împărțită în două capitole mari. Prima parte tratează “parcursul” agentului de combatere biologică *T. sinensis* în Franța, analize populaționale și relațiile acestuia cu comunitățile de *Torymus* indigene, iar pentru prima dată această specie a fost inclusă într-o cheie de determinare cu utilizare în Europa. În a doua parte, subiectul principal este cel de diversitate specifică a genului *Ormyrus*, dar cu accent pe speciile care parazitează cinipidele galigene pe stejari și castanul comestibil.

Principalele obiective ale lucrării de doctorat sunt:

O.I.a Caracterizarea biometrică a exemplarelor din complexul „*beneficus-sinensis*”;

O.I.b Detectarea semnalelor moleculare ale hibridizării istorice în cadrul complexului;

O.I.c Documentarea diversității moleculare a complexului „*beneficus-sinensis*” în Europa;

O.II.a Delimitarea speciilor de *Ormyrus* și stabilirea relațiilor filogenetice dintre acestea;

O.II.b Caracterizarea integratoare a specimenelor din genul *Ormyrus* obținute în creșteri și compararea acestora cu tipurile din colecția Muzeului de Istorie Naturală din Viena, Austria și din Paris, Franța.

Pentru atingerea obiectivelor în această teză, am desfășurat activitățile de cercetare atât în cadrul Grupului de Cercetare în Diversitatea și Filogenia nevertebratelor din cadrul Facultății de Biologie (UAIC), cât și în cadrul Echipei RDLB - Cercetare și Dezvoltare în Control Biologic, Institutul de Cercetare Agronomică din Sophia Antipolis.

1. Taxonomia integratoare a speciilor de *Torymus* Dalman (Hymenoptera: Torymidae) asociate cu cinipidul invaziv *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae)

Introducere

Originar din China, *Dryocosmus kuriphilus* a fost introdus accidental pentru prima dată în Japonia în 1941, unde a devenit un dăunător major al castanilor comestibili (Murakami, 1997). Acest dăunător a fost apoi detectat în Coreea în 1958 (Cho și Lee, 1963), în America de Nord în 1974 (Payne și colab., 1976), în Nepal în 1999 (Aebi și colab., 2006) și în Europa (Italia) în 2002 (Brussino și colab., 2002). La aproximativ 15 ani de la prima sa raportare în Europa, acest dăunător s-a răspândit în zonele cu *Castanea sativa* Miller din aproape toată Europa, colonizând 25 de țări (EPPO, 2007; Avtzis și colab., 2018).

Pentru controlul populației invazive din Japonia, în 1975 a fost implementat un program de combatere biologică utilizând *Torymus sinensis* ca auxiliar, cu un control vizibil după 8-10 ani de la introducerea (Murakami și colab., 1977; Ôtake și colab., 1984; Moriya și colab., 2003). În urma acestui succes, *T. sinensis* a fost apoi introdus în S.U.A. (Rieske, 2007), Italia (Quacchia și colab., 2008), Franța (Borowiec și colab., 2014), Slovenia, Croația și Ungaria (Matošević și colab., 2015), precum și mai recent în Portugalia (A. Bento, comunicare personală), Spania (Nieves-Aldrey și colab., 2019) și partea asiatică a Turciei (Doğanlar și Senan, 2018).

La scurt timp după introducerea auxiliarului *T. sinensis* în Japonia au fost identificați indivizi hibridi între acesta și *T. beneficus* Yasumatsu și Kamijo, parazitoid indigen cu trăsături morfologice și ecologice foarte apropiate. În același timp, pentru *T. beneficus* au fost identificate două ecotipuri: ecotipurile timpuriu și târziu (TbE, eng. early și TbL, eng. late), având o diferență de o lună între vârfurile de emergență. Masculii nu pot fi separați pe baza caracterelor morfologice și doar lungimea ovipozitorului pare să diferențieze femelele de *T. sinensis* de *T. beneficus* (Ôtake, 1987; Aoto și Murakami, 1992). Cu un ovipozitor mai scurt și prolificitate mai scăzută (Moriya și colab., 1992), *T. beneficus* a fost înlocuit de *T. sinensis* prin competiție și introgresie din zonele în care este prezent *D. kuriphilus* (Yara și colab., 2007).

Indivizii de *T. beneficus* sunt rari în zilele noastre, recent, doar o femelă și un mascul au fost găsiți parazitând *Dryocosmus murakamii* Ide și Abe (Matsuo și colab., 2021).

În Europa au fost raportate nouă specii native de *Torymus* atacand *D. kuriphilus*: *T. auratus* (Müller) (Speranza și colab., 2009; Muru și colab., 2020; Kos și colab., 2015), *T. erucarum* (Schrank) (Speranza și colab., 2009), *T. fastuosus* Boheman (Kos și colab., 2021), *T. flavipes* (Walker) (Speranza și colab., 2009; Aebi și colab., 2007; Kos și colab., 2015), *T. nobilis* Boheman (Kos și colab., 2021), *T. notatus* (Walker) (Gil-Tapetado și colab., 2021), *T. formosus* (Walker) (Kos și colab., 2015), *T. geranii* (Walker) (Kos și colab., 2015), *T. scutellaris* (Walker) (Quacchia și colab. 2012). Cu toate acestea, nu au fost identificați indivizi hibridi în natura, dar mai mult decât atât, nu a fost observată nicio compatibilitate de reproducere în laborator între *T. sinensis* și cele câteva specii native testate de *Torymus* (Ferracini și colab., 2017; Quacchia și colab., 2014).

Cuvinte cheie: taxonomie integratoare, *Torymus sinensis*, hibridizare, filogenie multilocus, ADN barcoding, *Ormyrus*

1.1. Diversitatea genetică și morfologică la *Torymus sinensis* Kamijo

1.1.1 Introducere

Rezultatele acestei părți care tratează diversitatea morfologică și moleculară a agentului de combatere biologică *Torymus sinensis* au fost deja publicate în colaborare cu cercetători de la Institutul de Cercetări Agronomice Franța, Laboratorul pentru Biosecuritate din cadrul Academiei chineze de Științe agricole, Laboratorul Biodiversității solului din Elveția și Grupul de Cercetare în Diversitatea și Filogenia nevertebratelor din cadrul UAIC Iași, România (Viciriuc și colab., 2021).

1.1.2. Material și metode

Material biologic

Specimenele au provenit din trei regiuni geografice: (i) China, zona nativă atât pentru *D. kuriphilus*, cât și pentru *T. sinensis*, (ii) Japonia, prima zonă de translocare pentru *T. sinensis* și zona natală pentru *T. beneficus* și (iii) Europa (Italia și Franța), a doua zonă de translocare. Indivizii de *T. sinensis* din China au fost colectați pe *D. kuriphilus* din Hebei pe *Castanea*

mollissima Blume și indivizii japonezi de *T. sinensis* în Tsukuba pe *Castanea crenata* Sieb. și Zucc. Specimenele italiene au fost colectate în trei locații (Piemont, Sardinia și Toscana) pe *Castanea sativa* Miller. Majoritatea exemplarelor franceze au fost colectate pe *D. kuriphilus* în cadrul programului de control biologic clasic care acoperă 69 de situri (majoritatea ariei de răspândire a castanilor cultivați și naturali din Franța) cu o eșantionare plurianuală (2011–2018) (Borowiec și colab., 2018 pentru detalii).

Colectarea datelor moleculare

În acest studiu au fost utilizați patru markeri moleculari : (i) gena mitocondrială Oxidaza Citocromului C, subunitatea I (COI) cu două regiuni suprapuse amplificate cu primerii LCO1490/HCO2198 (Folmer și colab. 1994) și COI pF2/COI 2437d (Simon și colab., 1994; Kaartinen și colab. (2010); (ii) gena care codifică proteina nucleară Wingless (Wg), (iii) gena care codifică proteina nucleară Enolaza (Eno) care include doi introni (regiuni variabile) și trei exoni (regiuni conservate); (iv) distanțierul ribozomal intern transcris 2 (ITS2).

Pe baza setului de date COI am implementat o serie de teste bazate pe un aliniament de 413 perechi de baze precum: parametrii genetici standard ai populației, numărul de haplotipuri (h), diversitatea haplotipurilor (Hd), diversitatea nucleotidelor (π), numărul de situsuri polimorfe (S) și numărul total de mutații (Eta), testul D al lui Tajima (Tajimas'D; Tajima, 1989) și F -urile lui Fu (Fu 's F_s ; Fu, 1997). Utilizând frecvența haplotipurilor am analizat varianța moleculară (AMOVA) cu 10 000 de permutări.

Caracterizare morfologică

Pentru analizele morfometrice am selectat 46 de femele și 45 de masculi pentru care am măsurat 19 caractere, respectiv 23. Pentru *T. beneficus* am măsurat doar paratipuri, patru femele și patru masculi din cadrul laboratorului Entomology Laboratory, Ehime University (Japonia). Observațiile și măsurătorile caracterelor morfologice au fost realizate fie folosind microscopul digital Keyence VHX-2000 sau microscopul Leica M205C cuplat cu un software de procesare a imaginilor Leica Application Suite v.4.0 (Leica microsystems GmbH). Datele au fost analizate folosind analiza multivariată a rapoartelor (MRA) utilizând scriptul pentru programul R publicat Baur și Leuenberger (2011).

1.1.3. Rezultate

Diversitatea haplotipurilor COI

Pe baza setului de date COI pentru 796 de indivizi am identificat 45 de haplotipuri (Figura 1). Analizele filogenetice au dus la observarea a două clustere moleculare monofiletice. Primul cluster conține haplotipurile H23 și H44 și secvențele de *T. beneficus* TbE depuse de Yara (2006) în GenBank. Al doilea cluster grupează secvențele obținute în acest studiu cu cele de *T. sinensis* și *T. beneficus* TbL din Yara (2006).

În Franța, 0,54% din indivizii de *T. sinensis* colectați au mitocondrii de *T. beneficus* ecotipul devreme (TbE) iar 2,19% au mitocondrii de *T. beneficus* ecotipul târziu (TbL). Distanța *p* calculată între clusterurile moleculare este de 5,3% pentru *T. sinensis* – *T. beneficus* TbE și 2,5% pentru *T. sinensis* – *T. beneficus* TbL. Regiunile franceze cu cel mai mare număr de haplotipuri sunt Provence (31 de haplotipuri), Ron-Alpi – Occitanie (28 de haplotipuri) și Corsica (19 haplotipuri).

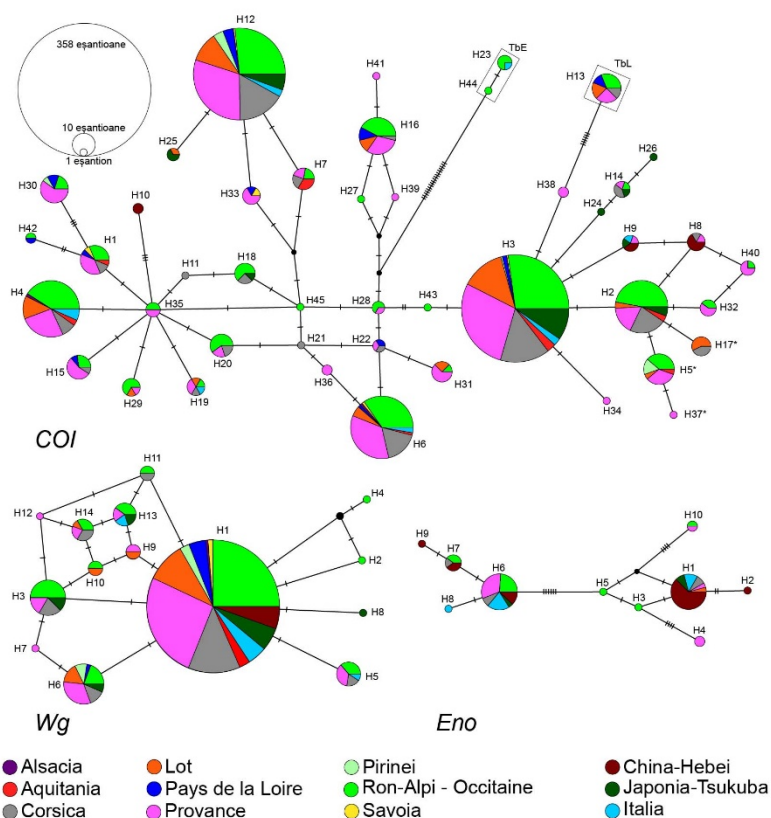


Figura 1. Rețele de haplotipuri generate pe baza a trei markeri genetici: COI, Wg și Eno. Cele trei rețele conțin haplotipuri prezente în Franța, Italia, China și Japonia. Culorile indică haplotipuri din diferite țări sau regiuni franceze. Pentru fiecare haplotip dimensiunea cercului este proporțională cu frecvențele observate. H – haplotip; H* – haplotipuri cu o substituție de aminoacid. TbL – haplotipuri derivate din ecotipul târziu de *T. beneficus*; TbE – haplotipuri derivate din ecotipul timpuriu de *T. beneficus*.

În Italia, diversitatea haplotipurilor este mare și similară cu Franța, $Hd = 0,85$ când haplotipurile introgresate de *T. beneficus* TbE sunt incluse, sau $Hd = 0,831$ când acestea sunt excluse. Populațiile investigate din China ($Hd = 0,714$, $\pi = 0,009$) și Japonia ($Hd = 0,679$, $\pi = 0,01$) au o diversitate mai mică comparativ cu cele europene.

Rezultatele testelor Tajima D și Fu's F_s efectuate utilizând secvențele COI au fost negative în mai multe cazuri, indicând un exces de alele rare care ar putea rezulta dintr-o populație cu o rapidă expansiune după un blocaj genetic (colapsul populației). Analizele AMOVA pe baza frecvențelor haplotipurilor arată că majoritatea variabilității genetice se regăsește în interiorul populației (99,1%/99,11%) și mult mai puțin între populații (0,9%/0,89%).

Diversitatea ITS2

Dintre cei 46 de indivizi de *T. sinensis* care au fost secvențiați pentru ITS2 în acest studiu, 40 au genotipul 0/0, cinci genotipul -2/-2 și un individ are un genotip diferit de toate cele raportate deja de Yara (2006), care corespunde cu (CT₅)-(AG₃), denumit 0*/0* (practic are un CT mai mult și un AG mai puțin decât genotipul 0/0).

Diversitatea lui Wg și Eno

Folosind secvențele Wg obținute de la 283 de indivizi, am identificat 14 haplotipuri (Figura 1). Cel mai comun haplotip este H1, urmat de H3 și H6. H1 este distribuit în toate zonele incluse în studiu, în timp ce H3 și H6 au fost detectate doar în Franța și Japonia.

În urma analizelor efectuate pe 44 de indivizi, am identificat 10 haplotipuri pe Eno (Figura 1). Haplotipurile H1 și H6 sunt cele mai reprezentate și au fost găsite în toate zonele studiate (China, Japonia, Italia și Franța); ambele haplotipuri comune au același număr de conexiuni. Nu am detectat haplotipuri divergente care ar putea indica introgresie.

Filogenia multilocus

În filogeniile multilocus obținute, indivizii de *T. sinensis* cu ADN mitocondrial de *T. beneficus* TbE nu mai formează un clad molecular distinct, fiind incluși în schimb în interiorul clusterului molecular principal *T. sinensis*.

Analiza multivariată a raporturilor (MRA)

Rezultatele morfologice au arătat o suprapunere puternică atât pentru femele, cât și pentru masculi. Indivizii de *T. sinensis* din Franța au prezentat o variabilitate morfologică mare. Doar paratipurile femele de *T. beneficus* și *T. sinensis* din China sunt bine separate și se pot diferenția folosind, raportul între al doilea segment funicular *versus* lungimea metabazitarsului și raportul între ovipozitor *versus* lungimea mezosomei. Pentru masculi, se poate utiliza raportul dintre spațiul malar *versus* lungimea primului segment funicular și lungimea capului *versus* lungimea celui de-al doilea segment funicular.

1.1.4. Discuții

Variabilitatea genetică a indivizilor de *T. sinensis*

Conform lui Ôtake și colab. (1984), în Japonia au fost introduși din China un număr mare de specimene *T. sinensis*, iar programul de introducere în Italia a fost făcut folosind 2117 exemplare importate din Japonia (Quacchia și colab., 2008). Acesta ar fi fost importul unic de *T. sinensis* din Asia și acești indivizi sunt astfel fondatori ai populațiilor europene. Valorile D -ul din testul Tajima și F -urile lui Fu, în unele cazuri fiind negative, pot fi un indiciu al unui blocaj genetic (bottleneck) din trecut al populației urmat apoi de recuperarea acesteia. Cu toate acestea pentru introducerea în Europa *T. sinensis* a trecut prin cel puțin trei evenimente în care trebuie să fi avut loc blocaje genetice (bottleneck): în timpul introducerii în Japonia din China, la introducerea în Italia din Japonia și în Franța din Italia.

O diversitate genetică în populațiile de *T. sinensis* crește probabilitatea succesului controlului biologic împotriva dăunătorului *D. kuriphilus* deoarece o populație diversă genetic are probabil șanse mai mari de a controla populația dăunătorului pe termen lung. În Franța, cea mai mare diversitate a haplotipurilor și cea mai mare diversitate nucleotidică au fost înregistrate în Pays de la Loire ($Hd = 0,9$, $\pi = 0,017$); cele mai scăzute valori ale diversității haplotipurilor au fost înregistrate în Pirinei ($Hd = 0,673$) și cele mai mici valori ale diversității nucleotidelor în Corsica și Aquitania ($\pi=0,01$). Diversitatea populației analizate din China este una scăzută, $Hd = 0,714$ și $\pi = 0,009$.

Rezultatele testului AMOVA arată o lipsă a diferențierii genetice între populațiile franceze, dar asta a fost de așteptat deoarece indivizii introduși fac parte din același stoc (italian).

Identitatea lui *T. beneficus* TbL și TbE

Ipoteza este că *T. beneficus* TbL face parte din *T. sinensis*, fiind pur și simplu indivizi cu ovipozitor scurt. Ei au fost clasificați ca atare din cauza variabilității mari a lungimii tecii ovipozitorului la *T. sinensis*. În plus, longevitatea și perioada de pre-ovipozitare sunt similare pentru *T. beneficus* TbL și *T. sinensis*, cu excepția faptului că *T. sinensis* este capabil să depună de aproximativ patru ori mai multe ouă (Piao și Moriya, 1992). Acestea indică faptul că *T. beneficus* TbL ar putea fi o linie distinctă de *T. sinensis* cu ovipozitor mai scurt și origine necunoscută și fiind mai puțin prolific și mai puțin eficient (Piao și Moriya, 1992; Yara și colab., 2012) a fost exclus prin concurență.

Dovezi de hibridizare

În acest studiu nu au fost găsite dovezi pozitive pentru hibridizare între *T. sinensis* cu specii europene de *Torymus*. Toate secvențele obținute în acest studiu au fost în concordanță pentru cele trei gene nucleare (Eno, Wg și ITS2) și mitocondriale (COI). Singura excepție a fost detectarea secvențelor COI corespunzătoare lui *T. beneficus* TbE la unele exemplare care pe baza celorlalte gene nucleare și analiza morfometrică sunt *T. sinensis*. Cu toate acestea, hibridizarea a avut loc înainte de introducerea lui *T. sinensis* în Europa.

Caracterele distinctive între *T. beneficus* și *T. sinensis*

Analiza morfometrică nu a reușit să separe paratipurile de *T. beneficus* de indivizii europeni de *T. sinensis* sau exemplarele de *T. sinensis* cu haplotipuri de *T. beneficus* TbE din cauza variabilității mari a specimenelor de *T. sinensis*. Paratipurile de *T. beneficus* sunt bine separate în analiza PCA de *T. sinensis* colectat în China, iar indivizii de *T. sinensis* colectați în Japonia și Franța se poziționează între aceștia. Lungimea ovipozitorului folosit de Kamijo (1982) și de autorii ulteriori pentru a separa *T. beneficus* de *T. sinensis* este discriminatorie numai dacă *T. sinensis* european nu este luat în considerare pentru că variabilitatea în aceste populații a fost mare. Singura diferență între cele două specii este cantitativă și se referă la lungimea antenelor (Kamijo, 1982; Viciriuc și colab., 2021).

1.2. *Torymus sinensis* și speciile indigene apropiate

1.2.1. Introducere

Până în prezent, nu a fost observată nicio semnalare de hibridizare între *T. sinensis* și vreun *Torymus* european pentru indivizii colectați pe teren. Chiar dacă nu au fost identificate semne de hibridizare cu specii native, au fost efectuate cercetări suplimentare. Acest studiu este o continuare a celui anterior prin care îmi propun să identific paraziții nativi din genul *Torymus* care atacă *Driocosmus kuriphilus* în Franța pentru a identifica cele mai apropiate specii indigene care ar putea fi candidate pentru hibridizarea intraspecifică. Studiile anterioare s-au bazat pe două gene care sunt utilizate de obicei în delimitarea speciilor, și anume COI și ITS2 (Yara, 2004; Yara, 2006), iar scopul este să folosesc, de asemenea, și alți markeri utilizați în reconstrucțiile filogenetice. De asemenea, propun o cheie de identificare pentru a facilita identificarea speciilor native de *Torymus* semnalate până acum pe *D. kuriphilus* în toată Europa, pentru a sprijini programele de monitorizare a cinipidului castanului comestibil și ai paraziților săi.

1.2.2. Materiale și metode

Materialul biologic

Au fost colectate diverse gale induse de cinipide pe specii din genul *Quercus* și *Rosa*, precum: *Biorhiza pallida* (Olivier) generația sexuată, *Cynips longiventris* Hartig generația asexuată și *Diplolepis rosae* (Linnaeus) din Franța, în zece locații: Aynac, Campile, Conteville, Fozières, La-Garde-Freinet, Lutterbach, Malmerspach, Rignac, Rians și Saint-Cassien. În România au fost colectate gale din două situri din Botoșani și Iași. Cea mai mare parte din paraziții nativi francezi au fost obținuți din *D. kuriphilus* pe *Castanea sativa* în cadrul programului de control biologic francez din care au fost obținuți anterior indivizii de *Torymus sinensis*.

Caracterizarea moleculară

Similar studiului anterior și în acest studiu au fost utilizați patru markeri moleculari : (i) gena mitocondrială oxidaza citocromului c, subunitatea I (COI); (ii) gena nucleară care codifică wingless (Wg), (iii) gena nucleară Enolaza (Eno); (iv) distanțierul ribozomal intern transcris 2 (ITS2).

Analiza datelor moleculare

Pentru toți markerii reconstrucțiile filogenetice au fost efectuate folosind resursa publică pentru deducerea arborilor filogenetici mari, CIPRES Science Gateway v.3.1. În același timp, setul de date a fost concatenat și analizat atât cu o metodă de verosimilitate maximă (ML), cât și cu o metodă de inferență bayesiană. Distanțele p dintre taxoni au fost calculate pentru toți markerii moleculari folosind rate uniforme între situsuri și eliminarea datelor lipsă între perechi de secvențe.

Caracterizare morfologică

Pregătirea și observarea specimenelor

După extracția AND-ului, toate speciile au fost uscate folosind hexametildisalizan (HMDS; Cowan 1995). Observațiile și măsurătorile caracterelor morfologice au fost realizate asemănător studiului anterior. Am folosit în principal exemplare din speciile de *Torymus* colectate pe *D. kuriphilus* în Franța (*T. auratus*, *T. flavipes*, *T. notatus* și *T. sinensis*), precum și specii colectate pe alte cinipide galigene pe stejar (*T. affinis*, *T. cyaneus* și *T. geranii*). În cheia de determinare am inclus și speciile de *Torymus* care atacă *D. kuriphilus* în Europa: *T. fastuosus*, *T. nobilis*, *T. formosus*, *T. erucarum* și *T. scutellaris*. Acestea provin din colecția personală a lui Richard Robinson Askew (UK).

Analiza datelor

Pentru analizele morfologice, primul pas a fost definirea unei axe izometrice de mărime (izosize), apoi efectuarea unui PCA pentru formă (adică un PCA în spațiul tuturor rapoartelor). Am efectuat un spectru al rapoartelor PCA și un spectru de alometrie a rapoartelor pentru a vizualiza rapoartele care explică cea mai mare parte a variației și cele care arată cea mai mare cantitate de alometrie. În cele din urmă, am aplicat extractorul de rapoarte LDA pentru a obține o listă de rapoarte care discriminează cel mai bine grupurile identificate anterior după PCA pentru formă.

1.2.3. Rezultate

Parazitoizi nativi

Am identificat patru specii de *Torymus* care atacă *D. kuriphilus* în Franța: *T. auratus*, *T. flavipes*, *T. notatus* și *T. rubi* (Schrank). Pentru prima dată *T. rubi* (o femelă) a fost raportată pe *D. kuriphilus*. Mai mult, în timpul colectării de gale induse de cinipide indigene pentru a

avea o mai bună acoperire a faunei de *Torymus*, am identificat o femelă de *T. sinensis* parazitând *Biorhiza pallida* generația sexuată.

Rezultatele moleculare

În vederea stabilirii relațiilor filogenetice între *T. sinensis* și speciile indigene am folosit secvențele din studiul anterior pentru *T. sinensis*, *T. auratus* și *T. geranii*. Pentru același grup de markeri moleculari (COI, Wingless, Enolaza și ITS2) am adăugat secvențe obținute de la diferiți taxoni apropiați filogenetic (*T. notatus*, *T. cyaneus*, *T. rubi*, *T. flavipes*, *T. bedeguaris*), dar și folosiți ca outgroup (*Glyphomerus stigma*).

COI

Reconstrucția filogenetică realizată a permis discriminarea tuturor speciilor de *Torymus* identificate anterior folosind caractere morfologice. Cladul *sinensis* este împărțit în două, majoritatea indivizilor de *T. sinensis* și unii de *T. sinensis* cu ADN mitocondrial de *T. beneficus* (TbE). Cladul *sinensis-beneficus* este soră cu unul care conține *T. notatus*, *T. cyaneus* și *T. rubi*. Distanța genetică p dintre secvențele de *Torymus sinensis* și cele derivate din *T. beneficus* este relativ mică, de doar 5,8%. Speciile native care sunt cele mai apropiate de *T. sinensis* sunt *T. rubi* (9,9%), *T. geranii* (10,3%) și *T. auratus* (10,4%).

Wingless

În filogenia bazată pe informațiile genei de codificare nucleară Wingless cladul *T. sinensis* nu este divizat și este soră cu *T. cyaneus*, iar cei doi formează un monofilum cu *T. notatus*. Acest marker genetic nu poate face discriminări între specii foarte apropiate, cum ar fi *T. auratus* și *T. geranii*. *Torymus notatus* (2%) și *T. cyaneus* (3,7%) sunt speciile native cele mai apropiate de *T. sinensis* pe baza acestui marker.

Enolaza

În filogenia bazată pe setul de date pentru Enolaza, clusterul *T. sinensis* este sora lui *T. notatus*, iar cele două specii se grupează în continuare cu *T. cyaneus*. Speciile native cele mai apropiate de *T. sinensis* sunt *T. notatus* cu o valoare p de 1,5% urmată de *T. geranii* și *T. auratus* cu 3,3% și, respectiv, 3,7%.

ITS2

Folosind informațiile furnizate de secvențele de ITS2, în filogenia realizată cladul care conține *T. sinensis* este soră cu *T. notatus*. *Torymus cyaneus* nu mai este aproape de ei, grupându-se cu *T. auratus* și *T. geranii* (acestea fiind din nou distincte), *T. rubi*, *T. bedeguaris*

și *T. flavipes*. De asemenea, cele mai apropiate specii de *T. sinensis* sunt *T. notatus* și *T. cyaneus* cu o distanță *p* de 14,1% și respectiv 17,2%.

Filogenia multi-locus pentru *T. sinensis* și speciile apropiate

După concatenare, au fost testate numeroase modele evolutive și diverse scheme de partiționare. Analizele filogenetice discriminează fără ambiguitate speciile europene de *Torymus* precum și a complexului „*beneficus-sinensis*”, oferind o bază sigură pentru delimitarea speciilor, caracterizarea morfologică și identificarea caracterelor diagnostice. *Torymus notatus* și *T. cyaneus* sunt speciile cele mai apropiate filogenetic cu complexul „*beneficus-sinensis*”.

Rezultatele morfometrice

Ca urmare a analizei PCA pentru formă, atât pentru femele, cât și pentru masculi, prima componentă este cea mai discriminatoare; toate speciile native pot fi discriminate de *T. sinensis* de-a lungul acestei axe (Figura 2 A femele și 2 B masculi), cu excepția *T. notatus* care prezintă o suprapunere puternică cu *T. sinensis*. Pentru ambele sexe, graficele de dispersie ale axei izometrice (de mărime) față de primul PC pentru formă indică faptul că *T. sinensis* prezintă cea mai mare variabilitate în dimensiune și că această specie este în medie mai mică decât alte specii native, cu excepția lui *T. notatus*.

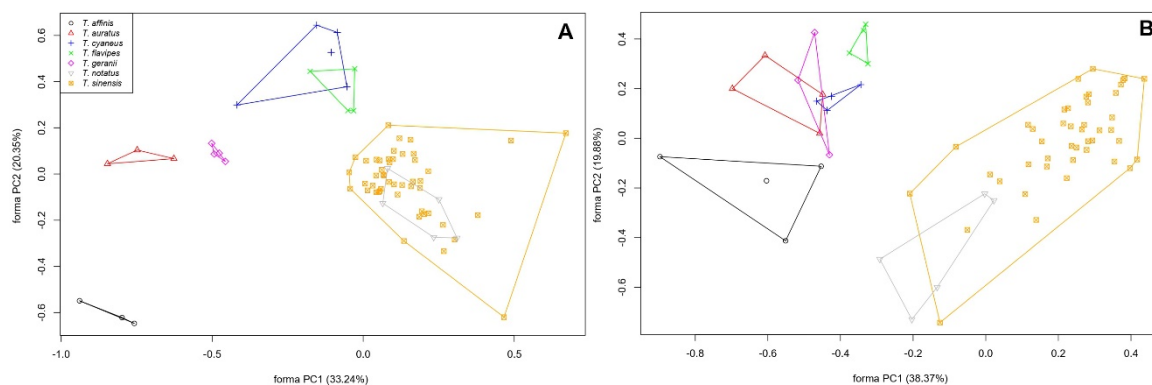


Figura 2. Rezultatele analizei multivariate a rapoartelor (MRA) pentru speciile de *Torymus* identificate în acest studiu. (A) prima componentă versus a doua componentă pentru femele; (B) prima componentă versus a doua componentă pentru masculi.

1.2.3.1. Cheia speciilor de *Torymus* care parazitează *Dryocosmus kuriphilus* în Europa

Pentru realizarea unei chei de determinare cu utilizare în Europa am inclus speciile de *Torymus* obținute din gale de *D. kuriphilus* în Franța (*T. auratus*, *T. flavipes*, *T. notatus* și *T. sinensis*) și cele identificate în alte țări europene (*T. fastuosus*, *T. nobilis*, *T. formosus*, *T. erucarum* și *T. scutellaris*), precum și speciile colectate pe alte cinipide galigene pe stejar (*T. affinis*, *T. cyaneus* și *T. geranii*), dar apropiate filogenetic cu *T. sinensis*. Principalele caractere incluse în cheie sunt la nivelul antenei, capului din vedere dorsală, mezoscutelum, mesopleuron, propodeum, gaster, picioarele posterioare și aripa posterioară.

1.2.4. Discuții

Patru specii native de *Torymus* care parazitează *D. kuriphilus* au fost identificate până acum în Franța: *T. auratus*, *T. flavipes*, *T. notatus* și *T. rubi*. În același timp, de la apariția în Europa a cinipidului castanului comestibil, alte patru specii indigene decât cele detectate în Franța au fost semnalate în Europa: *T. fastuosus*, *T. erucarum*, *T. nobilis* și *T. scutellaris*. Cu excepția lui *T. rubi*, semnalată pentru prima dată pe această gazdă, celelalte sunt specii comune pentru cinipidele inductoare de gale pe stejari (Askew și colab., 2013).

Datele filogenetice și morfologice arată că *T. notatus*, indigen în Europa, semnalat în Franța (acest studiu) și Spania (Gil-Tapetado și colab., 2021) pe *D. kuriphilus*, are cea mai mare probabilitate de a hibridiza cu agentul de control biologic *T. sinensis*. Pe lângă asemănarea morfologică, au și aceeași perioadă de zbor (Pogolotti și colab., 2019). Împart aceeași gazdă, *D. kuriphilus*, dar și alte specii de cinipide precum: *Andricus aries*, *A. curator*, *A. cydoniae*, *A. inflator*, *A. kollari*, *A. lignicolus*, *A. polycerus* și *B. pallida*, unde *T. sinensis* a fost semnalat în ultima perioadă (Ferracini și colab., 2017).

2. Taxonomia integratoare a speciilor de *Ormyrus* Westwood (Hymenoptera: Ormyridae) asociate cu cinipide galigene pe stejari

2.1. Introducere

Taxonomia familiei Ormyridae nu este pe deplin rezolvată, chiar dacă Zerova și Seryogya (2006) identifică 34 de specii pentru regiunea Palearctică. Studiul a fost realizat doar

pe baza caracterelor morfologice, iar o abordare integratoare este necesară. Prezența speciilor criptice pentru *Ormyrus pomaceus* (Geoffroy) și *O. nitidulus* (Fabricius) a fost identificată de către Kaartinen și colab. (2010), același lucru fiind subliniat și de José Luis Nieves-Aldrey (Muzeul Național de Științe ale Naturii - Madrid, date nepublicate).

Genul *Ormyrus*

Speciile de *Ormyrus* din regiunea Palearctică au fost clasificate în două grupe de specii: grupul *diffinis* (femele fără carenă mediană pe gaster) și grupul *orientalis* (femele cu carenă mediană pe gaster) (Zerova și Seryogia, 2006). Pentru regiunea Palearctică Zerova și Seryogia (2006) semnalează 34 de specii de *Ormyrus*, 23 din grupul de specii *diffinis* și 11 din grupul *orientalis*.

2.2. Materiale și metode

Zona de studiu și colectarea materialului entomologic

În vederea obținerii materialului entomologic, în perioada 2011-2018 am colectat o serie de gale induse de diferite specii din tribul Cynipini. Pe lângă această metodă, speciile au fost colectate în egală măsură cu fileul entomologic și capcana Malaise. Zona de studiu este reprezentată de: România (13 localități), Franța (8 localități), Italia, Bulgaria, Ungaria și Coreea de Sud (din câte o localitate).

Extracția și amplificarea ADN-ului

Pentru extracția ADN-ului am folosit o metodă nedistructivă adaptată pentru extracția din insecte mici pentru a evita distrugerea acestora, fiindcă aceleași specimene sunt folosite și pentru analizele morfologice.

Reactivi și condiții pentru reacția PCR

În vederea amplificării regiunii standard „DNA barcode” (Hebert și colab., 2003) am utilizat primerii: LCO 1490 și HCO 2198 dezvoltați de Folmer și colab. (1998), iar pentru unele exemplare la care reacția de secvențiere a eșuat am folosit primerii COI pF2 și COI 2437d.

Delimitarea speciilor cu ajutorul metodelor bioinformatic

Reconstrucția filogenetică a fost realizată pe portalul CIPRES *SCIENCE GATEWAY* folosind programul RAXML – HPC2 XSEDE (Stamatakis, 2014). Distanța genetică *p-distance* între grupurile de specii și în interiorul grupurilor de specii a fost calculată în programul Mega.6.06 (Kumar și colab., 2018).

Caracterizarea morfologică a specimenelor

În urma extracției ADN, toate exemplarele au fost uscate utilizând hexametildisalizan (HMDS; Cowan, 1995). Toți adulții au fost identificați utilizând cheia de determinare propusă de Zerova și Seryogina (2006) pentru fauna de Ormyridae din regiunea Palearctică. Observațiile și măsurătorile caracterelor morfologice au fost efectuate folosind lupa binoculară Leica S6. Imaginile au fost realizate folosind microscopul Leica M205C cuplat cu un software de procesare a imaginilor Leica Application Suite v.4.0 (Leica microsystems GmbH), imaginile compozite au fost produse cu Zerene Stacker, iar contrastul și luminozitatea au fost ajustate în Adobe Photoshop 2020.

2.3. Rezultate

Reconstrucția filogenetică

În reconstrucția filogenetică au fost delimitate trei claduri moleculare principale care corespund cu grupurile de specii astfel: un clad pentru grupul *Ormyrus diffinis* și alte două claduri corespunzător grupului de specii *O. orientalis*.

Delimitarea speciilor în baza markerilor moleculari

Algoritmul PTP a delimitat 28 de posibile specii cu valori ale probabilității cuprinse între 0,081 – 1. Dintre acestea 17 corespund cu specii din grupul de specii *O. orientalis* și 11 din grupul de specii *O. diffinis*.

Distanțele p interspecifice. Grupurile au fost realizate după delimitarea utilizând algoritmul PTP. Valorile pentru distanțele p interspecifice se încadrează în intervalul 2,16%–20,93%. Distanțele p intraspecifice în interiorul grupurilor identificate sunt cuprinse între 0,34% și 3,36%.

Caracterizare morfologică

Deoarece subiectul acestui studiu este cel de taxonomie integratoare a speciilor din genul *Ormyrus* asociate cu cinipidele galigene pe stejari, implicit castan comestibil, am caracterizat din punct de vedere morfologic doar reprezentanți din grupul de specii *orientalis*. Mai mult decât atât, pentru fiecare specie moleculară identificată am ales 2 femele pentru a surprinde mai bine variabilitatea, iar acolo unde cladul molecular a fost reprezentat prin puțini indivizi am ales doar o femelă. Nu am caracterizat morfologic reprezentanți din speciile moleculare

unde erau doar masculi deoarece până în prezent separarea speciilor din acest gen se face doar pe baza caracterelor femele și holotipurile sunt, de asemeni, doar femele.

Am realizat descrieri pentru 8 specimene tip depuse la Muzeul de Istorie Naturală din Viena, Austria, pentru compararea cu materialul deținut în vederea identificării.

2.4. Discuții

Analizele filogenetice

Reconstrucția filogenetică delimitează speciile din genul *Ormyrus* cu strategii de parazitare ușor diferite, astfel grupul *O. diffinis* este separat de grupul *O. orientalis*. Speciile din grupul *O. diffinis* parazitează în gale induse de diptere sau cinipide pe plante erbacee, iar cele din grupul *O. orientalis* parazitează pe lângă gazdele grupului *O. diffinis* și cinipide galigene arboricole pe stejari sau castani comestibili (familia Fagaceae).

Pentru regiunea Palearctică au fost semnalate 11 specii din grupul *orientalis* (Zerova și Seryogina, 2006) în acest studiu am identificat 17 posibile specii. Pentru grupul de specii *O. diffinis* am identificat 11 posibile specii, Zerova și Seryogina semnalând 23 de specii pentru regiunea Palearctică.

Analizele morfologice

Deoarece taxonomia acestui grup nu este pe deplin cunoscută, identificarea morfologică a fost realizată utilizând ultima revizie taxonomică (Zerova și Seryogina, 2006). Singurul grup molecular căruia i s-a putut atribui un nume binomial cert a fost Specia moleculară 12, identificată ca *O. nitidulus*. Din cele 8 specimene tip din colecția de la Viena, 5 (*O. aerosus* Förster, *O. blandus* Förster, *O. viridanus* Förster, *O. placidus* Förster și *O. prodigus* Förster) ce sunt sinonime cu *O. pomaceus* la o prima observație se poate constata că cel puțin două sinonime, *O. aerosus* și *O. blandus* sunt cel mai probabil specii distincte și au fost sinonimizate greșit.

2.5. Studiu de caz *Ormyrus nitidulus* Fabricius

În vederea stabilirii distribuției și realizării rețelei de haplotipuri am utilizat secvențele de COI de la 93 de indivizi, iar regiunea selectată a avut lungimea de 544 perechi de baze. În plus, pentru confirmarea relației dintre indivizi, am utilizat și markerul nuclear ribozomal ITS2

(distanțierul 2 transcris intern), propus de Zao și colab. (2010) ca și marker alternativ pentru “cod de bare”. Numărul de secvențe a fost de 87, din care 24 au fost furnizate de către Graham Stone, Profesor în ecologie de la Universitatea din Edinburgh.

Rezultate utilizând markerul COI

Pentru setul de date mitocondrial am identificat 81 de haplotipuri cu 88 de situri variabile și un număr total de mutații de 111 (Σ), diversitate haplotipică de 0,993 (H_d) și diversitatea nucleotidică de 0,03594 (π). Cele mai multe haplotipuri, 96% reprezintă haplotipuri unice cu foarte multe conexiuni, până la 18, și dispuse înspre exteriorul rețelei. Din rețeaua de haplotipuri nu se poate identifica un haplotip dominant din care să derive alte haplotipuri. Rețeaua de haplotipuri realizată cu secvențele markerului mitocondrial COI nu poate reface traseele de migrație a acestei specii.

Rezultate folosind markerul ITS2

Setul de date nuclear a fost constituit din 87 de secvențe cu lungimi de la 400 până la 414 perechi de baze. Au fost identificate 10 haplotipuri (Figura 3) cu 10 situri variabile și o diversitate haplotipică de 0,470 (H_d). Numărul total de mutații fiind de 10 (Σ), iar diversitatea nucleotidică de 0,14943 (π).

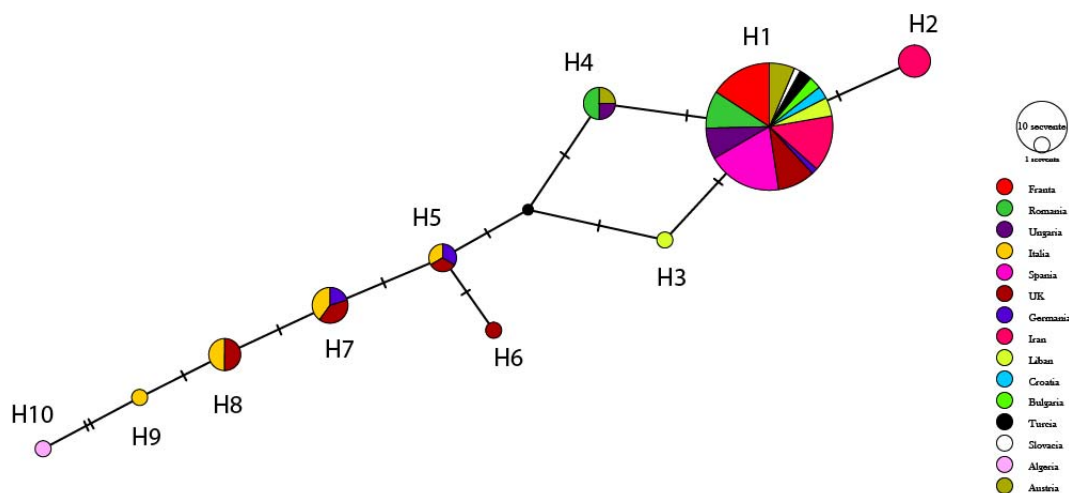


Figura 3. Rețeaua de haplotipuri generată pe baza markerului genetic ITS2. Culorile indică haplotipuri din diferite țări. Pentru fiecare haplotip dimensiunea cercului este proporțională cu frecvențele observate. H – haplotip.

Haplotipul 1 este cel mai frecvent și grupează secvențe de la 63 de indivizi cu distribuție în toate țările eșantionate, singurele excepții fiind Algeria și Italia. Din acesta derivă alte 3 haplotipuri cu frecvență mai redusă, de 1 și respectiv 4 indivizi. Haplotipul 2 și 3 au fost

identificate doar în Iran și respectiv Liban. Țările cu diversitate mare a haplotipurilor sunt UK în care se regăsesc un număr de 5 haplotipuri și Italia cu 4 haplotipuri.

Caracterizare morfologică

Caracterizarea morfologică pentru masculii speciei *Ormyrus nitidulus* este realizată pentru prima dată. Deoarece identificarea acestora a fost realizată utilizând caracterele morfologice pentru femele a fost posibilă corelarea indivizilor conspecifici masculi și femeli doar utilizând datele moleculare. După o caracterizare morfologică amănunțită au fost identificate și variații morfologice care sunt în strânsă dependență cu mărimea individului, astfel, pentru indivizii cu dimensiuni mici cele mai multe variații sunt la nivelul antenei și a coloritului.

Atât masculii, cât și femelele prezintă un grad mare de plasticitate morfologică. Femelele variază și ele în dimensiune, ducând implicit la o variație a coloritului, dar și la diferențe ale sculpturii metasomei și diferențe la nivelul antenei. La femele de dimensiuni mai mici predomină coloritul închis; sculptura mai puțin evidențiată; la nivelul antenei se reduc drastic perii de pe flagelomere; se modifică lungimea flagelomerelor.

Concluzii generale

Pe baza secvențelor de COI am identificat haplotipuri aparținând celor două ecotipuri pentru *Torymus beneficus* (ecotipul timpuriu TbE și târziu TbL), la indivizii de *T. sinensis* din Europa. Stocul importat din Italia în Franța pentru controlul speciei invazive *Dryocosmus kuriphilus* este *T. sinensis* ușor introgresat cu ambele ecotipuri de *T. beneficus*.

Rezultatele testului AMOVA arată lipsa diferențierii genetice între populațiile franceze, dar acest lucru era de așteptat deoarece indivizii introduși de *T. sinensis* fac parte din același stoc (toți au fost importați din Italia).

Pe baza analizelor morfometrice, *T. sinensis* pur din China și speciile din seria de tip de *T. beneficus* din Japonia pot fi separate pe baza a 4 rapoarte (pentru femele: lungimea celui de-al doilea segment funicular *versus* lungimea mezobasitarsus, lungimea ovipozitorului *versus* lungimea mezosomei; pentru masculi: spațiul malar *versus* lungimea primului segment funicular, lungimea capului *versus* lungimea celui de-al doilea segment funicular).

Speciile native de *Torymus* care au fost identificate parazitând *D. kuriphilus* în Franța sunt *T. auratus*, *T. flavipes*, *T. notatus* și *T. rubi*. Dintre acestea, *T. rubi* reprezintă prima semnalare pentru comunitățile de *Torymus* instalate pe *D. kuriphilus*.

Rezultatele moleculare și morfologice confirmă că *T. notatus* poate fi un candidat pentru hibridizarea interspecifică cu *T. sinensis*.

Diversitatea specifică pentru genul *Ormyrus* în comunitatea de parazitoizi în gale de cinipide galigene a fost subestimată la doar două specii: *O. pomaceus* și *O. nitidulus*, întrucât în acest studiu am identificat însă 18 posibile specii moleculare. Dintre acestea 11 sunt asociate cu cinipide galigene pe stejari și castan comestibil, 2 cu cinipide galigene pe plante erbacee și 5 au biologie necunoscută, dar grupate în același clad molecular.

Markerul mitocondrial COI poate fi folosit în cazul genului *Ormyrus* pentru separare interspecifică, dar acesta nu poate reface traseele de migrare cel puțin la *O. nitidulus*. Markerul nuclear ITS2 poate fi folosit ca alternativă pentru reconstrucții filogeografice, fiind cazul pentru specia moleculară 12, identificată ca *O. nitidulus*.

Cu toate că taxonomia acestui grup de specii este incertă și complicată, a fost totuși posibilă identificarea morfologică cu certitudine doar a unui grup molecular (specia moleculară 12) fiind *O. nitidulus*, în același timp această specie prezintă un grad mare de plasticitate morfologică.

Bibliografie

- Aebi A., Schönenberger N., Melika G., Quacchia A., Alma A., Stone G.N. (2007). Native introduced parasitoids attacking the invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. EPPO Bulletin, 37:166–171.
- Aoto. I., Murakami Y. (1992). Dispersion of a *Torymus (Syntomaspis) sinensis* population in Fukuoka Prefecture (Hymenoptera: Torymidae). Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu, 38:193–196. (în Japoneză cu sumarul în Engleză).
- Askew R.R., Melika G., Pujade-Villar J., Schoenrogge K., Stone G.N., Nieves-Aldrey J.L. (2013). Catalogue of parasitoids and inquilines in cynipid oak galls in the West Palaearctic. Zootaxa, 3643:1–133.
- Avtzis D.N., Melika G., Matošević D., Coyle D.R. (2018). The Asian chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*: a global invader and a successful case of classical biological control. Journal of Pest Science, 92:107–115.
- Baur H., Leuenberger C. (2011). Analysis of ratios in multivariate morphometry. Systematic Biology, 60:813–825.
- Borowiec N., Thaon M., Brancaccio L., Warot S., Vercken E., Fauvergue X., Ris N., Malausa J.C. (2014). Classical biological control against the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Hym. Cynipidae) in France. Plant Protection Quarterly, 29:7–10.
- Borowiec N., Thaon M., Brancaccio L., Cailleret B., Ris N., Vercken E. (2018). Early population dynamics in classical biological control: establishment of the exotic parasitoid *Torymus sinensis* and control of its target pest, the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*, in France. Entomologia Experimentalis et Applicata, 166: 367–379.
- Brussino G., Bosio G., Baudino M., Giordano R., Ramello F., Melika G. (2002) Pericoloso insetto esotico per il castagno europeo. Informatore agrario, 58:59–62.
- Cho D.Y., Lee S.O. (1963). Ecological studies on the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu and observations on the chestnut trees by its insect. Korean Journal of Applied Entomology, 2:47–54.
- Cowan D.P. (1995). Another method of drying chalcids. Chalcid Forum, 18:4–5.
- Doğanlar M.K., Senan Savaş K. (2018). Studies on release methods of *Torymus sinensis* (Hymenoptera: Torymidae), parasitoid of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, into Turkey from Italy. Acta Horticulturae, 1220:109–112.
- EPPO. (2007) *Dryocosmus kuriphilus* found in the south of France (Alpes-Maritimes). Disponibil la: www.eppo.org (Accesat: 10 April 2022).
- Ferracini C., Bertolino S., Bernardo U., Bonsignore C.P., Faccoli M., Ferrari E., Lupi D., Maini S., Mazzon L., Nugnes F., Rocco A., Santi F., Tavella L. (2017). Do *Torymus sinensis* (Hymenoptera: Torymidae) and agroforestry system affect native parasitoids associated with the Asian chestnut gall wasp?. Biological Control, 121:36–43.

- 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.
- Gil-Tapetado D., Cabrero-Sañudo F.J., Gómez J.F., Askew R.R., Nieves-Aldrey J.L. (2021). Differences in native and introduced chalcid parasitoid communities recruited by the invasive chestnut pest *Dryocosmus kuriphilus* in two Iberian territories. *Bulletin of Entomological Research*, 111:307–322.
- Kaartinen R., Stone G.N., Hearn J., Lohse K., Roslin T. (2010). Revealing secret liaisons: DNA barcoding changes our understanding of food webs. *Ecological Entomology*, 35:623–638.
- Kamijo K. (1982). Two new species of *Torymus* (Hymenoptera, Torymidae) reared from *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera, Cynipidae) in China and Korea. *Kontyû*, 50:505–510.
- Kos K., Kriston E., Melika G. (2015). Invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae), its native parasitoid community and association with oak gall wasps in Slovenia. *European Journal of Entomology*, 112:698–704
- Kos K., Lacković N., Melika G., Matošević D. (2021). Diversity and surge in abundance of native parasitoid communities prior to the onset of *Torymus sinensis* on the Asian chestnut gall wasp (*Dryocosmus kuriphilus*) in Slovenia, Croatia and Hungary. *Journal of Forestry Research*, 32: 1327–1336.
- 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.
- Matošević D., Lacković N., Melika G., Kos K., Franić I., Kriston É., Bozsó M., Seljak G., Rot M. (2015). Biological control of invasive *Dryocosmus kuriphilus* with introduced parasitoid *Torymus sinensis* in Croatia, Slovenia and Hungary. *Periodicum Biologorum*, 117:471–477.
- Matsuo K., Ide T., Yara K., Matsunaga K., Gyoutoku N., Higashiura Y., Yukawa J., Abe Y., Moriya S. (2021). Discovery of a native host of *Torymus beneficus* (Hymenoptera: Torymidae), with description of a new *Dryocosmus* (Hymenoptera: Cynipidae). *Applied Entomology and Zoology*, 56:451–463.
- Moriya S., Inoue K., Shiga M., Mabuchi M. (1992). Interspecific relationship between an introduced parasitoid, *Torymus sinensis* Kamijo, as a biological control agent of the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, and an endemic parasitoid, *T. beneficus* Yasumatsu et Kamijo. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 27:479–483.
- Moriya S., Shiga M., Adachi I. (2003). Classical biological control of the chestnut gall wasp in Japan. In: *Proceedings of the 1st International Symposium on Biological Control of Arthropodes*, Honolulu, Hawaii, 14–18 January 2002. USDA Forestry Service, 407–415.
- Murakami Y., Umeya K., Ono N. (1977). A preliminary introduction and release of a parasitoid (Chalcidoidea, Torymidae) of the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Cynipidae) from China. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 21:197–203.

- Muru D., Borowiec N., Thaon M., Ris N., Viciriuc I.M., Warot S., Vercken E. (2020). The open bar is closed: restructuration of a native parasitoid community following successful control of an invasive pest. *Peer Community Journal*, 1.
- Nieves-Aldrey J.L., Gil-Tapetado D., Gavira O.N., Boyero J.R., Polidori C., Lombardero Blanco M.J., D., Reydel Castillo C., Rodríguez-Rojo M.P., Vela J.M., Wong M.E. (2019). *Torymus sinensis* Kamijo, a biocontrol agent against the invasive chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu in Spain: its natural dispersal from France and first data on establishment after experimental releases. *Forest Systems*, 28, e001.
- Ôtake A. (1987). Comparison of Some Morphological Characters among Two Strains of *Torymus beneficus* Yasumatsu et Kamijo and *T. sinensis* Kamijo (Hymenoptera: Torymidae). *Applied Entomology and Zoology*, 22:600–609.
- Ôtake A., Moriya S., Shiga M. (1984). Colonization of *Torymus sinensis* Kamijo (Hymenoptera: Torymidae), a parasitoid of the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae), introduced from China. *Applied Entomology and Zoology*, 19:111–114.
- Payne J.A., Green R.A., Lester C.D. (1976). New nut pest: an oriental chestnut gall wasp in North America. *Annual report of the Northern Nut Growers Association*, 67:83–86.
- Piao C. Moriya S. (1992). Longevity and oviposition of *Torymus sinensis* Kamijo and two strains of *T. beneficus* Yasumatsu et Kamijo (Hymenoptera: Torymidae). *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 36:113–118.
- Pogolotti C., Cuesta-Porta V., Pujade-Villar J., Ferracini C. (2019). Seasonal flight activity and genetic relatedness of *Torymus species* in Italy. *Agricultural and Forest Entomology*, 21:159–167.
- Quacchia A., Moriya S., Bosio G., Scapin I., Alma A. (2008) Rearing, release and settlement prospect in Italy of *Torymus sinensis*, the biological control agent of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*. *BioControl*, 53:829–839.
- Quacchia A., Ferracini C., Nicholls J.A., Piazza E., Saladini M.A., Tota F., Melika G., Alma A. (2012). Chalcid parasitoid community associated with the invading pest *Dryocosmus kuriphilus* in north-western Italy. *Insect Conservation and Diversity*, 6: 114–123.
- Quacchia A., Moriya S., Askew R., Schönrogge K. (2014). *Torymus sinensis*: biology, host range and hybridization. In *II European Congress on Chestnut*, 1043:105–111.
- Rieske L.K. (2007). Success of an exotic gallmaker, *Dryocosmus kuriphilus*, on chestnut in the USA: a historical account. *EPPO Bulletin*, 37:172–174.
- Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87:651–701.
- Speranza S., Stacchiotti M., Paparatti B. (2009). Endemic parasitoids of *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu (Hymenoptera: Cynipidae) in Central Italy. In: *IV International Chestnut Symposium*. 844:421–42

- Stamatakis A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30:1312–1313.
- Viciriuc I.M., Thaon M., Moriya S., Warot S., Zhang J., Aebi A., Nis N., Fusu L., Borowiec N. (2021). Contribution of integrative taxonomy to tracking interspecific hybridisations between the biological control agent *Torymus sinensis* and its related taxa. *Systematic Entomology* 46:839–855.
- Yara K. (2006). Identification of *Torymus sinensis* and *T. beneficus* (Hymenoptera: Torymidae), introduced and indigenous parasitoids of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae), using the ribosomal ITS2 region. *Biological Control*, 36:15–21.
- Yara K., Sasawaki T., Kunimi Y. (2007). Displacement of *Torymus beneficus* (Hymenoptera: Torymidae) by *T. sinensis*, an indigenous and introduced parasitoid of the chestnut gall wasp, *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae), in Japanese chestnut fields: Possible involvement in hybridization. *Biological Control*, 42:148–154.
- Yara K., Matsuo K., Sasawaki T., Shimoda T., Moriya S. (2012). Influence of the introduced parasitoid *Torymus sinensis* (Hymenoptera: Torymidae) on *T. koreanus* and *T. beneficus* as indigenous parasitoids of the chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* (Hymenoptera: Cynipidae) on chestnut trees in Nagano Prefecture, Japan. *Applied Entomology and Zoology*, 47: 55–60.
- Zerova M.D., Seryogina L.Y. (2006). Review of Palearctic Ormyridae (Hymenoptera, Chalcidoidea) with description of two new species. *Vestnik Zoology*, 40: 27–40.