

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

**Filogenia multilocus a tribului Dorcadionini (Coleoptera,
Cerambycidae): o reevaluare taxonomică și implicații pentru
biogeografie și diversitatea specifică**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

Conf. dr. habil. Mircea Dan MITROIU

Student-doctorand:

Florina Georgiana CABA

Iași

2025

CUPRINS

INTRODUCERE	4
1. GRUPUL STUDIAT ȘI ASPECTE PRIVIND TAXONOMIA MOLECULARĂ	5
1.1. Tribul Dorcadionini	5
Istoria taxonomiei și sistematicii tribului Dorcadionini	5
1.2.1. DNA barcoding – coduri de bare ADN	5
1.2.2. Delimitarea speciilor pe baza unui singur locus	6
1.3. Hibridizarea ca antagonist și promotor al speciației	6
1.4. Studii de filogenie moleculară în subfamilia Lamiinae și tribul Dorcadionini	6
1.5. Markeri moleculari utilizați și justificarea acestora	7
2. MATERIALE ȘI METODE	8
Eșantionarea și speciimenele analizate	8
Extracția ADN-ului	8
Amplificarea markerilor prin PCR	8
Purificarea produșilor de PCR	9
Secvențierea și verificarea secvențelor	9
Analizele filogenetice și reconstrucția rețelelor de haplotipuri	9
Calibrarea ceasului molecular pentru obținerea arborelui ultrametric	10
Delimitarea speciilor pe baza unui singur locus (<i>COI</i> , fragmentul standard pentru DNA-barcoding)	10
3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	11
3.1. Obținerea și analiza codurilor de bare ADN la speciile de Dorcadionini din România și din țările învecinate	11
3.1.1. Rezultate	11
Aliniamentele	11
Analiza filogenetică	12
Partajarea de haplotipuri	13
Divergență și „barcoding gap”	13
Abordări pentru delimitarea speciilor	14
3.1.2. Discuții	15
Reconstrucția filogenetică utilizând un singur locus (gena mitocondrială <i>COI</i>)	15
Hibridizarea și partajarea haplotipurilor	16
Problema valorilor mici ale distanțelor interspecifice	16

Diferențierea genetică a subspeciilor	17
Analiza detaliată a cazurilor de discordanță mitocondrială-morfologică	18
<i>Dorcadion aethiops</i> și <i>D. fulvum</i>	18
<i>Dorcadion axillare</i> , <i>D. murrayi</i> și <i>D. pusillum</i>	18
<i>Dorcadion decipiens</i>	21
<i>Dorcadion equestre</i>	22
<i>Dorcadion lugubre</i> și <i>D. lineatocolle</i>	23
3.2.1. Rezultate	23
Aliniamentele și rețelele de haplotipuri	23
Analiza filogenetică	24
Distanțe genetice	25
3.2.2. Discuții.....	25
Taxonii parentali	25
Date genetice ale hibridului	26
Taxonomia lui <i>Dorcadion lugubre lugubre</i>	26
Evoluția reticulată în tribul Dorcadionini.....	27
3.3. Reconstrucția filogeniei tribului Dorcadionini utilizând mai mulți loci mitocondriali și nucleari.	28
3.3.1. Rezultate	28
Alinamente utilizate pentru testarea monofileiei triburilor Dorcadionini, Lamiini și Monochamini	28
Alinamente utilizate pentru analiza relațiilor filogenetice în interiorul tribului Dorcadionini	29
Gradul de exhaustivitate a setului de date	30
Analiza filogenetică individuală a markerilor moleculari	31
Testarea monofileiei triburilor Dorcadionini, Lamiini și Monochamini	33
Filogenia tribului Dorcadionini: mitocondrial vs nuclear	34
Filogenia tribului Dorcadionini: date concatenate	36
3.3.2. Discuții.....	37
Triburile Dorcadionini, Lamiini și Monochamini nu sunt monofiletice.....	37
Filogenia tribului Dorcadionini: genomul mitocondrial și nuclear sunt concordante.....	39
Clasificarea generică și subgenerică a tribului Dorcadionini pe baza filogeniei multilocus.....	40
CONCLUZII	42
BIBLIOGRAFIE	45

INTRODUCERE

Ordinul Coleoptera din care face parte și familia Cerambycidae este unul dintre cele mai diverse grupuri taxonomice având peste 390000 de specii descrise, însă numărul real este foarte greu de estimat (Bouchard *et al.* 2017). Familia Cerambycidae este una din cele mai mari familii din ordin – estimările fiind între 4000 și 5000 de genuri (Wang, 2017). Cerambycicidele sunt separate în 9 subfamilii, iar ~90% din specii sunt clasificate în subfamiliile Lamiinae și Cerambycinae (Rossa & Goczał, 2021).

Majoritatea taxonilor din familia Cerambycidae sunt concentrați în două subfamilii: Lamiinae cu peste 20000 de specii și Cerambycinae cu peste 11000 de specii, cele două subfamilii acoperind peste 90,5% din diversitatea familiei. Cele mai bogate în specii sunt 5 genuri din subfamilia Lamiinae: *Pterolophia* Newman; *Glenea* Newman; *Sybra* Pascoe; *Dorcadion* Dalman și *Exocentrus* Dejean (Rossa & Goczał, 2021).

Tribul Dorcadionini este un grup hiperdivers, reprezentând aproape 40% din cerambycicidele din Europa (Sama, Dascălu & Pessarini, 2010), iar în România membrii grupului sunt bioindicatori pentru habitate de stepe ponto-sarmatice nealterate antropic, acesta fiind la nivelul Uniunii Europene un habitat prioritar, ce se întâlnește aproape exclusiv în România (Kirschner *et al.*, 2020; Török *et al.*, 2016), de aceea studierea acestor insecte este importantă.

Filogenia acestui grup este puțin studiată – principalele aspecte abordate fiind de caracterizare atât din punct de vedere morfologic cât și genetic a grupurilor superioare tribului Dorcadionini, fără detalii în interiorul său (de Santana Souza *et al.*, 2020; Farrell, 1998; Giannoulis *et al.*, 2020; Hendrich *et al.*, 2015; Soydabaş-Ayoub & Uçkan, 2024). O altă problemă ce necesită atenție este existența unor incertitudini în privința monofiliei grupului (tribul Dorcadionini ar putea fi o grupare artificială, bazată pe morfologie convergentă datorată ecologiei similare și pierderii capacității de zbor).

Teza are ca scop principal reconstrucția filogeniei tribului Dorcadionini, pentru a avea o înțelegere cât mai completă asupra relațiilor interspecifice și evoluției grupului. Aceasta ne poate arăta dacă istoria evolutivă se reflecta sau nu în clasificarea actuală care are o istorie destul de sinuoasă. Clasificarea taxonilor inferiori tribului a suferit foarte multe modificări bazate predominant pe similaritate morfologică, dar fără analize filogenetice (bazate fie pe morfologie, fie pe ADN).

1. GRUPUL STUDIAT ȘI ASPECTE PRIVIND TAXONOMIA MOLECULARĂ

1.1. Tribul Dorcadionini

Grupul luat în studiu face parte din subfamilia Lamiinae din familia Cerambycidae a ordinului Coleoptera; Lamiinele reprezintă diviziunea cea mai bogată în specii în cadrul familiei Cerambycidae, cu peste 21000 de specii cunoscute (Giannoulis *et al.*, 2020) diverse atât morfologic cât și coloristic. Dorcadionini este un trib care cuprinde aproximativ 915 de taxoni (specii și subspecii) (Danilevsky & Lazarev, 2025) și este larg răspândit în sudul regiunii Palearctice, începând cu Peninsula Iberică (genul *Iberodorcadion* Breuning) până în Peninsula Koreană (genul *Eodorcadion* Breuning). Reprezentanții grupului sunt adaptați la habitate deschise precum golurile din zona alpină, zonele de stepă și silvostepă. Adulții se hrănesc cu frunze de graminee (*Poaceae*), iar larvele trăiesc în sol și mănâncă rădăcini de graminee. Sunt specii de dimensiuni relativ mici, începând de la 8 mm până la 31 mm.

Istoria taxonomiei și sistematicii tribului Dorcadionini

În prezent, taxonomia tribului Dorcadionini este stabilă nemaifiind propuse modificări majore din 2005 și 2007 când în două lucrări consecutive, Danilevsky, Kasatkin & Rubenyan (2005) și Danilevsky & Kasatkin (2007), pe baza structurii endofalusului la aproximativ 130 de taxoni descriu subgenuri noi, propun sinonimii, introduc un nou gen în trib și fac modificări de rang taxonomic. Tribul Dorcadionini actualmente include 6 genuri și 12 subgenuri după Danilevsky & Lazarev (2025).

1.2.1. DNA barcoding – coduri de bare ADN

Premisa de bază a DNA barcoding-ului este că putem diferenția speciile după o secvență de ADN scurtă, deoarece variația genetică interspecifică este mai mare decât variația genetică intraspecifică (Hebert *et al.*, 2003), iar pentru analizarea datelor, se utilizează metode de grupare (clustering) și evaluarea distanțelor intra- și interspecifice (Hajibabaei *et al.*, 2007). Diferența dintre cea mai mică distanță interspecifică și cea mai mare distanță intraspecifică se numește ”barcoding gap” și se situează, de obicei, în jurul valorii de 2-3% (Hebert, Ratnasingham & De Waard, 2003). Lipsa acestei diferențe poate fi cauzată de mai multe fenomene: prezența hibridizării și a introgresiei în lotul analizat – fiind nevoie de analize suplimentare (Hebert *et al.*, 2003), prezența speciilor criptice, specii incipiente, erori de identificare a specimenelor sau lipsa unei baze de date exhaustive.

1.2.2. Delimitarea speciilor pe baza unui singur locus

Metodele de delimitare a speciilor utilizând o singură genă pot fi împărțite în trei categorii mari (Flot, 2015) în funcție de criteriul pe care îl utilizează pentru a identifica speciile: metode care se bazează pe distanțe interspecifice – ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery, Puillandre *et al.*, 2012) și ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning, Puillandre, Brouillet & Achaz, 2021); metode care se bazează pe existența alelelor comune – rețelele de haplotipuri (haplowebs, Flot, Couloux & Tillier, 2010) și metode bazate pe arbori filogenetici – GMYC (generalized mixed Yule-coalescent, Pons *et al.*, 2006 și Fontaneto *et al.*, 2007) și PTP (Poisson tree processes, Zhang *et al.*, 2013) (Dellicour & Flot, 2018).

1.3. Hibridizarea ca antagonist și promotor al speciației

În sens larg, hibridizarea naturală este reproducerea dintre indivizi ce provin din populații distincte din punct de vedere genetic, rezultând o singură generație sau mai multe generații de hibrizi. Din punct de vedere taxonomic, aceste populații pot aparține la specii diferite (hibridizare interspecifică) sau pot fi din aceeași specie (hibridizare intraspecifică) dacă aceste populații sunt descrise și denumite ca subspecii (Chan, Hoffmann & van Oppen, 2019). În cele mai recente studii despre hibridizare în Coleoptera, s-au observat cazuri de introgresie, detectate pe baza discordanței dintre fenotip și markerii genetici (mitochondriali și/sau nucleari). În cadrul tribului Dorcadionini, au fost raportați câțiva indivizi hibrizi descriși pe bază de caractere morfologice. Pentru acest trib, se pare că hibridizarea este posibilă și între specii mai îndepărtate filogenetic.

1.4. Studii de filogenie moleculară în subfamilia Lamiinae și tribul Dorcadionini

Primul studiu ce analizează filogenia subfamiliei Lamiinae din punct de vedere molecular cu o abordare multilocus este publicat de către de Santana-Souza *et al.* (2020). Ulterior, Ashman *et al.* (2022) publică prima analiză filogenetică a lamiinelor din Australia și Asia. Mai apoi, Soydabaş-Ayoub & Uçkan (2024) publică o analiză filogenetică multilocus a lamiinelor din estul bazinului mării Marmara, Turcia. Monofilia subfamiliei Lamiinae și a triburilor din acest grup este analizată de către Li *et al.* (2024) utilizând 158 genoame mitochondriale de la 11 subfamilii de cerambicidae. Cel mai recent, Song *et al.* (2025) publică o analiză bazată pe date filogenomice, unde au inclus Lamiinae din 12 triburi. Acest articol precum cele din urmă, confirmă rezultatele lui de Santana-Souza *et al.* (2020) și sugerează sinonimizarea tribului Monochamini cu tribul Lamiini.

1.5. Markeri moleculari utilizați și justificarea acestora

Pentru a avea o imagine cât mai clară și detaliată a evoluției acestui grup, am utilizat pentru reconstrucția filogenetică markeri moleculari cu evoluție rapidă pentru a delimita specii recente și pentru a surprinde evenimente relativ noi din punct de vedere evolutiv, dar și markeri cu evoluție lentă pentru a reconstrui evenimente filogenetice vechi și pentru a verifica relațiile dintre taxonii supraspecifici (subgenuri și genuri). Fragmentele de gene mitocondriale (*COI* și *Cytb*) și Spațiatorul Intern Transcris 2 (*ITS2*) ce este un fragment de ADN ribosomal noncodant sunt markeri moleculari cu evoluție rapidă, iar markerii nucleari în copie unică – din cauza faptului că sunt fragmente de gene codificatoare – *Wingless*, *Histona 3* și *Elongation Factor 1 α* sunt markeri moleculari cu evoluție lentă, de asemenea și fragmentele de gene ribosomale *18S* și *28S* au tot o evoluție lentă.

2. MATERIALE ȘI METODE

Eșantionarea și speciemenele analizate

Materialul utilizat în acest studiu a fost adunat începând din 2007, majoritar de către cercetător dr. M.-M. Dascălu dar și alți colaboratori, din Ucraina, Ungaria, Republica Moldova, Bulgaria, Grecia, Cehia, Azerbaidjan, China, Kazahstan, Iran, Georgia, Armenia, Turcia, Rusia și Croația. Lista completă cu cele 263 speciemen este prezentată în Tabelul 2.1 din teză, iar 17 dintre aceste speciemen au fost eliminate din analiză deoarece nu au putut fi amplificate și analizate.

Extracția ADN-ului

Atunci când s-a lucrat cu țesut muscular și gonade ce au fost păstrate în etanol 96% ADN-ul a fost extras utilizând rășina chelatoare Chelex® 100 (Bio-Rad Laboratories) după metoda descrisă în Fusu & Ribes (2017). ADN-ul a fost extras și din speciemenele uscate dintr-un picior disecat de la specimen cu tot cu coxă, utilizând o metodă nedistructivă bazată pe protocolul kit-ului de la Qiagen – DNeasy Blood & Tissue după descrierea din Cruaud *et al.* (2019). Piciorul utilizat este apoi lipit înapoi pe specimenul voucher corespunzător.

Amplificarea markerilor prin PCR

Probele au fost amplificate utilizând reacții standard de 25 μl cu perechile de primeri din Tabelul 2.2 din teză. În funcție de calitatea țesutului unele probe au fost amplificate din nou cu o cantitate diferită de soluție de ADN (între 1 și 6 μl), sau am adăugat în reacție 6,25 μl per probă de trehaloză 25% pentru îmbunătățirea reacției, iar pentru unele probe ce aveau ADN-ul degradat am utilizat LongAmp® Taq 2× Master Mix de la NEB pentru a asigura o reacție mai eficientă. Am realizat și reacții de amplificare de tip semi-nested PCR pentru a obține ampliconi scurți de *28S* și *COI*. De asemenea, am realizat și reacții de amplificare de tip nested pentru a obține secvențe mai scurte de *ITS2*, utilizând doi primeri originali pentru o serie de probe. În urma reacțiilor de amplificare, au fost efectuate electroforeze de verificare, unde am observat că, pentru o parte dintre probe s-au amplificat și pseudogene care după migrarea în gel de agaroză 1% apar ca benzi duble. Pentru aceste probe am efectuat extracția ampliconilor din gel cu ajutorul unui kit de extracție din gel de agaroză (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit de la Zymo Research). După utilizarea kitului am reamplificat probele utilizând o reacție PCR standard, 8 μl din apliconii purificați din gel ca matriță de asemenea, am scăzut și numărul de cicluri ale reacției de amplificare de la 40 la 15 sau 20 de cicluri.

Purificarea produşilor de PCR

Înainte de secvenţiere, ampliconii trebuie să fie purificaţi, pentru asta, am folosit un protocol de purificare ce utilizează PEG (polietilenglicol) optimizat după Paithankar & Prasad (1991). Pentru a mări eficienţa protocolului am adăugat 1 µl de LPA (poliacrilamidă liniară, 5 µg/µl) pentru probele mai slabe, pentru a mări masa ampliconilor care astfel vor precipita mai uşor.

Secvenţierea şi verificarea secvenţelor

Secvenţierea (Sanger) a fost efectuată la laboratoarele Macrogen Europe (Amsterdam, Olanda). Fluorogramele secvenţelor au fost corectate cu programele PreGap şi Gap din pachetul Staden (Bonfield, Smith & Staden, 1995), iar secvenţele de *ITS2* ce au prezentat poziţii cu vârfuri duble în fluorograme, caracteristice indelurilor heterozigote au fost corectate şi reconstruite manual, prin comparaţie cu alte secvenţe homozigote şi utilizând Indelligent v.1.2 (Dmitriev & Rakitov, 2008) pentru poziţiile ambigue. Alinierea seturilor de secvenţe a fost efectuată cu algoritmul Clustal W integrat în MEGA v.7 şi MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) şi cu MAFFT v.7 (Kato & Standley, 2013) pentru secvenţele de *ITS2* din cauza prezenţei indelurilor caracteristice acestui marker. În cazul *ITS2* a urmat şi o verificare manuală a aliniamentului.

Pentru setul de secvenţe de *COI* am calculat distanţele intra- şi inter- specifice cu MEGA utilizând atât modelul Kimura cu 2 parametri (K2P distances) cât şi distanţa-*p* (*p*-distances) după recomandările autorilor Srivathsan & Meier (2012).

Codurile secvenţelor şi aliniamentele au fost verificate mai întâi cu SequenceMatrix (Vaidya, Lohman & Meier, 2011) şi apoi am asamblat matrici de nucleotide concatenate utilizând Mesquite v.3.70 (Maddison & Maddison, 2021).

Analizele filogenetice şi reconstrucţia reţelelor de haplotipuri

Pentru setul de date *COI*, anterior analizelor filogenetice gradul de saturaţie al substituţiilor a fost determinat cu programul DAMBE v.7 (Xia, 2018). Anterior analizelor filogenetice aliniamentul a fost delimitat după poziţia codonilor iar cel mai potrivit model de substituţie şi cea mai bună variantă de partiţionare au fost identificate folosind Partition Finder 2 (Lanfear *et al.*, 2016)

Analizele filogenetice Maximum Likelihood au fost efectuate utilizând programele RAxML-NG v.0.9.0 (Kozlov *et al.*, 2019) şi IQTree (Minh *et al.*, 2020). Suportul pentru noduri a fost estimat pe bază de pseudo-replicări bootstrap (BP) cu un criteriu automat de bootstop. Pentru analiza BI am utilizat BEAST v.1.10.4 (Suchard *et al.*, 2018) şi MrBayes

v.3.2.6 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Convergența parametrilor a fost evaluată cu Tracer v.1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018). Arborii filogenetici rezultați au fost importați în FigTree v.1.4.4 (A. Rambaut, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) și TreeViewer (Bianchini & Sánchez-Baracaldo, 2024) apoi editați cu Adobe Illustrator, Inkscape și Adobe Photoshop.

Am reconstruit rețelele de haplotipuri pentru markerii moleculari cu PopART v.1.7 (Leigh & Bryant, 2015) utilizând metoda de parcimonie statistică maximă (metoda TCS) (Clement, Posada & Crandall, 2000). Când au existat indeluri informative într-un aliniament *ITS2* au fost codate drept caractere adiționale (prezent, absent sau necunoscut) în FastGap v.1.2 (Borchsenius, 2009) utilizând sistemul de codificare propus de Simmons & Ochoterena (2000).

Calibrarea ceasului molecular pentru obținerea arborelui ultrametric

Estimarea perioadei în care a avut loc diversificarea tribului Dorcadionini, a fost efectuată utilizând BEAST v.1.10.4. Modelul folosit pentru a determina modulul de ramificare a fost modelul Yule și un model coalescent cu mărimea populației constantă aplicat setului complet de date.

Valoarea prealabilă (eng. prior) a mediei uclld (uclld.mean) a distribuției logaritmice normale a fost setată în timp real la 0.011 situsuri substituite la un milion de ani per linie de descendență, cu o deviație standard de 0.003, pentru a obține o distribuție cu un interval de confidență 95% de 0.006-0.018. Mediana distribuției este foarte apropiată de valoarea ratei de divergență raportată de Brower (1994) de 2,3% la un milion de ani (adică 0,0115 situsuri substituite per linie de descendență). Această abordare a fost utilizată de Marshall *et al.* (2016) pentru a calibra ceasul molecular pentru cicade deoarece nu existau estimări publicate ale ceasului molecular pentru acestea.

Delimitarea speciilor pe baza unui singur locus (*COI*, fragmentul standard pentru DNA-barcoding)

Am utilizat două metode de delimitare a speciilor pe baza unui singur locus, mai exact, General Mixed Yule Coalescent (GMYC) (Fontaneto *et al.*, 2007) și Poisson Tree Processes (PTP) (Zhang *et al.*, 2013). Pentru GMYC, am folosit implementarea din R (Ezard, Fujisawa & Barraclough, 2014) pe arborele ultrametric obținut în BEAST utilizând modelul coalescent cu dimensiunea populației constante pentru tot setul de date. Pentru PTP, am folosit serverele oferite de către autori (disponibile la <https://species.h-its.org/> și <https://mptp.hits.org/#/>) pe arborele obținut cu RAxML-NG (PTP nu are nevoie de un arbore ultrametric).

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

3.1. Obținerea și analiza codurilor de bare ADN la speciile de Dorcadionini din România și din țările învecinate

Datele prezentate în acest capitol au fost publicate în Dascălu, Caba & Fusu (2022).

La acea dată aproape nici o specie a tribului Dorcadionini nu avea codul de bare ADN publicat și disponibil public, cu excepția speciei *Iberodorcadion fuliginator* (Linnaeus). Aceasta a fost secvențiată în timpul proiectelor BFB și GBOL (Hendrich *et al.*, 2015; Rulik *et al.*, 2017).

Mai multe specii sunt reprezentate de mai mult de o singură subspecie, permițând verificarea utilității DNA barcoding la un nivel subspecific. Fiind incapabile de zbor aceste specii au capacități scăzute de dispersie (Baur *et al.*, 2005; 2020) și prin urmare, sunt predispuse la a prezenta o structură filogeografică, ceea ce ar putea fi o problemă pentru tehnicile de delimitare moleculară (Moritz & Cicero, 2004; Mutanen *et al.*, 2012; Sukumaran & Knowles, 2017). În concluzie, Dorcadionini sunt un bun model pentru testarea succesului codurilor de bare ADN și delimitarea speciilor pe baze moleculare.

3.1.1. Rezultate

Aliniamentele

Pentru analiza eficienței codurilor de bare ADN (DNA-barcoding) am obținut 152 de secvențe de la 24 de specii de Dorcadionini. Pentru 6 specii politipice, am obținut coduri de bare ADN de la 2 sau 3 subspecii diferite (Tabel 2.1 din teză), prin urmare, setul nostru de date acoperă 33 de taxoni ai căror coduri de bare ADN au fost generate pentru prima dată și două secvențe care au fost minate din GenBank. Secvențele obținute, mai puțin 4 dintre ele, au lungimea completă de 658 de pb (secvențele incomplete au între 629 și 654 pb). Aliniamentul are 249 de situsuri variabile și 229 de situsuri informative pentru parcimonie. Analiza saturației substituțiilor a arătat o valoare mică a saturației ($p < 0,00001$ pentru 32 de taxoni atât pentru arbori simetrici cât și asimetrici).

Pentru 28S (care a fost secvențiat selectiv, acolo unde s-a observat discordanță mitocondrială-morfologică), aliniamentul este format din 29 de secvențe, cu o lungime care variază de la 783 pb până la 842 pb și cu un indel de 1 sau 2 nucleotide la speciile folosite ca outgroup. Există 20 de situsuri variabile și 8 situsuri informative pentru parcimonie. Pentru ITS2 (de asemenea secvențiat selectiv), aliniamentul are 31 de secvențe cu o lungime de 636 pb cu indelurile incluse, iar secvențele variază de la 507 pb la 523 pb. Acest

aliniment conține 3 specimene heterozigote reprezentate de 2 haplotipuri fiecare, având astfel mai multe secvențe decât cel pentru 28S. Acest set de date este mult mai informativ decât cel ce conține secvențele pentru 28S, cu 112 situsuri variabile și 78 informative pentru parcimonie.

Analiza filogenetică

Ambii arbori filogenetici, atât BI cât și ML, bazați pe *COI* au topologii similare, cu câteva excepții notabile (Figurile 3.1., și 3.2. din teză). În arborele BI, *D. decipiens* (Germar) este specie soră pentru cladul ce conține *D. pusillum* Küster nominotipic în timp ce în arborele ML, *D. decipiens* se află în interiorul acestui clad. Cladul soră pentru cladul *D. decipiens* + *D. murrayi* + *D. pusillum* este cel cu *D. axillare axillare* Küster în arborele ML, iar în arborele BI este cel cu *D. scopolii* (Herbst). Poziția speciei *D. tuleskovi* Heyrovský variază foarte mult în cei doi arbori.

Majoritatea speciilor sunt monofiletice, cu câteva excepții. În arborele BI, toate secvențele de *D. pusillum pusillum* Küster sunt în același clad (cu toate că acesta include și o secvență de *D. pusillum ochrolineatum* Dascălu și 3 de *Dorcadion axillare moldavicum* Dascălu & Fusu), iar *D. pusillum vasiliscus* Dascălu și celelalte secvențe de *D. pusillum ochrolineatum* sunt incluse într-un clad cu *D. murrayi* Küster. În arborele ML, *D. pusillum pusillum* nu este monofiletic, speciile din Ucraina (Od14 și Od09) fiind reprezentate ca o linie bazală distinctă și specia este parafiletică în relație cu *D. murrayi* și *D. decipiens*.

Dorcadion axillare axillare este monofiletic în ambii arbori, cu toate că *D. axillare moldavicum* este polifiletic fiind inclus în *D. murrayi* și *D. pusillum pusillum*. Un specimen, care a fost identificat inițial ca *D. lineatocolle* Kraatz și mai apoi ca *D. lugubre* Kraatz (linPro1001), este grupat cu *D. lineatocolle* în loc de *D. lugubre lugubre*.

Ambii arbori au 3 claduri cu suport statistic ridicat (notate cu 1, 2 și 3 în Fig. 3.1. și 3.2. din teză) chiar dacă relațiile dintre speciile din aceste claduri variază în cele două variante de arbori (ML și BI). Primul clad are o probabilitate posterioară egală cu 1 și un suport bootstrap de 95%, al doilea clad are de asemenea o probabilitate posterioară egală cu 1 și cu un suport bootstrap de 100%, iar al treilea clad are o probabilitate posterioară de 0,97 dar un suport bootstrap de 50%.

În arborele filogenetic construit cu secvențe de 28S este prezent doar al doilea grup (Fig. 3.1. din teză) însă aliniamentul are puține situsuri variabile. În arborele nuclear concatenat (Fig. 3.1. din teză) sunt reprezentate ambele grupuri cu suport statistic ridicat măcar pe unul dintre arbori. Nici o specie din al treilea grup nu a fost secvențiată pentru

markeri nucleari, deoarece acestea nu au fost implicate în cazuri de discordanță mitocondrială–morfologică. Similar cu cazul arborilor *COI*, membrii subgenului *Carinatodorcadion* sunt așezați în interiorul subgenului *Cribridorcadion* cu suport bootstrap de 99% și o probabilitate posterioară de 1, însă speciile care erau reprezentate ca polifiletice sau parafiletice în arborele *COI*, în arborele nuclear concatenat sunt monofiletice (Fig. 3.1. din teză). O excepție o reprezintă specia *D. etruscum* (Rossi) [sensu Pesarini & Sabbadini (2007)], care este distinctă în arborele *COI* dar apare conspecific cu *D. lugubre* în arborii nucleari. În plus, specimenul de *D. lugubre* - linPro1001 ce este reprezentat în același clad cu *D. lineatocolle* în arborele *COI*, este heterozigot pentru *ITS2* și este reprezentat de două ori în arbore, o alelă grupându-se cu *D. lugubre*, iar alta cu *D. lineatocolle* (Fig. 3.1. din teză).

Partajarea de haplotipuri

În arborii filogenetici *COI* (Figura 3.1. și 3.2. din teză) *D. murrayi*, *D. pusillum* și *D. axillare* au haplotipuri comune, doar trei subspecii fiind însă implicate în acest fenomen: *D. pusillum ochrolineatum*, *D. pusillum vasiliscus* și *D. axillare moldavicum*.

În rețeaua de haplotipuri (Figura 3.3. din teză), *D. murrayi* este despărțit de *D. pusillum pusillum* prin doar 4 substituții, iar celelalte 2 specii sunt mai divergente: minim 19 substituții separă *D. axillare axillare* atât de *D. murrayi* cât și de *D. pusillum pusillum*, pe când *D. decipiens* se află la 12 substituții distanță de *D. pusillum pusillum*. Cinci specimene de *D. pusillum ochrolineatum* și *D. pusillum vasiliscus* au mitocondrii din același haplogrup ca și *D. murrayi*. La specimenele de *D. pusillum vasiliscus* am detectat doar mitocondrii de *D. murrayi*, pe când unul din specimenele de *D. pusillum ochrolineatum* – puSG03, are același haplotip ca cel al subspeciei nominotipice. Toate cele 16 specimene de *D. axillare moldavicum* analizate au mitocondrii capturate de la alte specii: de la *D. murrayi* (majoritatea populațiilor, 13 specimene) sau de la *D. pusillum pusillum* (populația de la Chircești, specimenele axCh1201, axCh1202, axCh1203). În ambele cazuri acestea prezintă cel mai comun haplotip al speciei donatoare de mitocondrii.

Divergență și „barcoding gap”

Distanțele medii intraspecifice K2P (Kimura cu 2 parametri) bazate pe *COI* variază între 0,04% la *D. aethiops* până la 1,61% la *D. equestre*, urmate de 1,53% la *D. lugubre* și 1,34% pentru *D. axillare* (Tabel 3.1 și 3.3). Distanța medie interspecifică variază de la 0,62% între *D. pusillum* și *D. murrayi*, până la 16,85% între *D. holosericeum* și *I. fuliginator* (Tabel

3.1. și 3.3. din teză). Suprapunerea dintre aceste valori arată că nu există barcoding gap – un interval liber între distanțele medii intraspecifice și interspecifice (Figura 3.5. din teză).

Suprapunerea este și mai mare dacă comparăm distanța maximă intraspecifică, ce poate avea o valoare de 5,8% la *D. equestre*, 3,65% la *D. axillare*, 2,79% la *D. lugubre*, 2,17% la *D. pedestre* și 1,38% la *D. aethiops* (Tabel 3.5. și 3.6. din teză). Valoare maximă are o mai mare importanță pentru delimitarea moleculară a speciilor decât valoare medie, ce poate fi influențată (micșorată) de includerea în analiză a mai multor secvențe identice sau foarte similare. O problemă similară, ce mărește artificial barcoding gap, este utilizarea distanțelor medii interspecifice în loc de cele minime (Meier, Zhang & Ali, 2008).

Când taxonii ce au haplotipuri capturate ca urmare a hibridizării sunt scoși din analiză, cea mai mică și cea mai mare valoare a distanței medii intraspecifice rămân neschimbate, însă variabilitatea moleculară scade semnificativ pentru *D. lugubre* la 0,36% și pentru *D. axillare* la 0,40%. Valoarea pentru cea mai mică distanță medie interspecifică (cea dintre *D. pusillum pusillum* și *D. murrayi*) crește la 0,77%, dar rămâne tot foarte mică și comparabilă cu valoarea unei distanțe intraspecifice; următoarea valoare mică interspecifică (cea dintre *D. murrayi* și *D. axillare*) crește semnificativ de la 0,9% la 3,2% (Tabel 3.2. și 3.4. din teză). Prin urmare, după ce am eliminat introgresia din analiză, intervalul unde valorile distanțelor intraspecifice și interspecifice se suprapun este mai mic, cu numărul cazurilor incerte scăzând de la 16 la 4 (pătratele albastre și roșii de pe zona gri din Figura 3.5. din teză).

Abordări pentru delimitarea speciilor

Când comparăm diferitele modele folosite pentru delimitarea speciilor cu morfologia și taxonomia curentă (Figura 3.2. din teză), se pare că dintre cele două abordări, PTP grupează secvențele mai des, de multe ori nejustificat dar uneori corect: *Dorcadion equestre* este recunoscut cu această analiză ca o singură specie, cu excepția secvențelor de *D. equestre reclinatum*. *Dorcadion murrayi* și subspecia nominotipică de *D. pusillum* sunt considerate ca fiind aceeași specie de modelul PTP, iar *D. decipiens* este considerat și el aceeași specie cu cele două în modelul mPTP. Grupul *D. aethiops*, *D. etruscum*, *D. pedestre* și *D. kozanii* după mPTP este considerat o singură specie. Metoda PTP originală a supradivizat nejustificat datele analizate într-un singur caz, într-o situație în care toate celelalte metode au delimitat secvențele ca pe o singură specie în mod corect (conform morfologiei): PTP a delimitat o pereche de secvențe bazale colectate din mijlocul arealului de distribuție a speciei *D. tauricum* ca pe o altă specie potențial distinctă.

În mod contrar, metoda GMYC a supradivizat nejustificat datele, mai ales varianta cu praguri multiple, care a identificat ca o specie diferită câteva secvențe bazale dar nu în mod deosebit divergente de *D. pusillum ochrolineatum*, *D. scopoli*, *D. equestre equestre* și *N. exornatum* (Fig 3.2., GMYCm din teză). În mod inexplicabil, metoda cu praguri multiple a dat rezultate mai bune decât metoda cu prag unic, identificând corect o secvență bazală de *D. fulvum* ca fiind conspecifică cu celelalte (Fig. 3.2., GMYCs și GMYCm din teză).

3.1.2. Discuții

Reconstrucția filogenetică utilizând un singur locus (gena mitocondrială *COI*)

Analiza saturației cu substituții a secvențelor de *COI* indică o saturație limitată indicând că aliniamentul este informativ și că arborii filogenetici rezultați au un grad ridicat de confidență. Un alt indiciu că reconstrucțiile filogenetice reflectă evoluția grupului este buna corelație între arborii reconstruiți și o parte din grupurile de specii deja recunoscute pe baze morfologice. Se poate deci afirma că utilizarea secvențelor *COI* este adecvată pentru reconstrucții filogenetice în cadrul tribului Dorcadionini. În funcție de tipul de analiză BI utilizată (MrBayes sau BEAST), *Iberodorcadion* și *Dorcadion* sunt claduri surori, iar *Neodorcadion* este un clad separat (Figura 3.2) sau *Iberodorcadion* și *Neodorcadion* sunt claduri surori. Membrii subgenului *Cribridorcadion* sunt împărțiți în 3 claduri indiferent de metoda de reconstrucție filogenetică aplicată (BI sau ML).

Primul clad cuprinde doar specii incluse de către Pesarini & Sabbadini (2007) în grupul de specii *Dorcadion minutum* sau specii asemănătoare morfologic (*D. axillare*, *D. decipiens*, *D. litigiosum*, *D. murrayi*, *D. pusillum*). Rezoluția este slabă pentru cele trei specii implicate în schimbul de haplotipuri (*D. axillare*, *D. murrayi*, *D. pusillum*). Grupul a fost identificat și în arborele *ITS2* și în cel concatenat nuclear, cu toate că am folosit mai puține specii și specimene pentru acești arbori decât pentru arborele *COI*.

Al doilea clad este format din specii la care cel puțin masculii sunt caracterizați de lipsa pubescenței dense de pe elitre și care fac parte din grupurile de specii *D. etruscum*, *D. kozanii* și *D. pedestre* propuse de Pesarini & Sabbadini (2007, 2010). Surprinzător, dar în acest clad sunt incluse și ambele specii ale subgenului *Carinatodorcadion* prezente în acest set de date: *D. fulvum* și *D. aethiops*, secvențele acestora fiind astfel așezate în interiorul subgenului *Cribridorcadion*. Aceste specii nu formează un grup monofiletic, ci *D. aethiops* este mai apropiat de *D. pedestre*, *D. etruscum* și *D. kozanii*, iar *D. fulvum* este separat (Figura 3.1. și 3.2. din teză). Distanța medie interspecifică dintre *D. aethiops* și *D. etruscum* este de

3,43% iar dintre *D. aethiops* și *D. kozanii* este de 2,66% (Tabel 3.1. din teză). Această valoare este semnificativ mai mică decât valoarea distanței maxime intraspecifice de la *D. equestre* (5,8%) și apropiată de cea de la *D. pedestre* (2,77%) (Tabel 3.5. și 3.6). În arborele bazat pe gena 28S, *D. aethiops*, *D. fulvum*, *D. etruscum*, *D. lineatocolle* și *D. lugubre* formează o politomie. Arborele nu are rezoluție deoarece, contrar așteptărilor acest marker molecular este prea conservat. În arborele nuclear concatenat, *D. aethiops* este soră cu *D. fulvum*, conform morfologiei lor cât și a clasificării lor în același subgen, indicând originea hibridă a speciei *D. aethiops*.

În al treilea clad din arborele *COI* sunt reprezentate celelalte specii din subgenul *Cribridorcadion* din acest studiu, însă acest grup este foarte heterogen, deoarece este format din puține specimene din multe grupuri de specii. De exemplu, poziția speciei *D. tuleskovi* (grupul de specii *Dorcadion peloponesium*) variază foarte mult între arborele ML și BI.

Hibridizarea și partajarea haplotipurilor

Existența haplotipurilor comune pentru mai multe specii poate avea mai multe explicații. Acest fenomen poate fi rezultatul unui eveniment de speciație recentă, separarea incompletă a liniilor filetice (eng. incomplete lineage sorting) sau rezultatul unei hibridizări introgressive (Funk & Omland, 2003; Sloan, Havird & Sharbrough, 2017; Toews & Brelsford, 2012; Wirtz, 1999). Pentru speciile *D. murrayi*, *D. pusillum* și *D. axillare*, discordanța dintre morfologie și informația genetică mitocondrială este prezentă doar în zone unde arealele lor se suprapun (Fig. 3.6). Specimenele de *D. pusillum* și *D. axillare*, din populații din zone ce se află în afara arealului de distribuție a speciei *D. murrayi* (*D. pusillum pusillum* din Republica Moldova și Ucraina și *D. axillare axillare* din Bulgaria) sunt genetic distincte; specimenele din România (unde arealele celor 3 specii se suprapun) au aceleași haplotipuri ca *D. murrayi*. Existența unei corelații biogeografice pentru aceste discordanțe demonstrează că ele sunt rezultate în urma unei diferențieri în izolare urmată de contact secundar și hibridizare și nu separării incomplete a liniilor filetice (Toews & Brelsford, 2012). Din acest motiv, atribuim modelul de distribuție a variabilității genetice fenomenului de hibridizare între trei specii inițial alopatrice.

Problema valorilor mici ale distanțelor interspecifice

Introgresia este doar unul dintre factorii care complică identificarea moleculară sau stabilirea relațiilor taxonomice în tribul Dorcadionini. Chiar dacă introgresia urmată de captură mitocondrială este eliminată din analiză (Tabel 3.2. și 3.4. din teză) nu putem discerne între structurarea geografică a speciilor sau prezența unor specii distincte folosind

doar moleculele pentru că unele perechi de specii au distanțe interspecifice foarte mici. Un prag de 2–3% a fost sugerat ca o valoare ce indică o divergență de nivel specific (Mutanen *et al.*, 2012; Ratnasingham & Hebert, 2007, 2013; Smith, Fisher & Hebert, 2005). În studiul nostru, anumite secvențe de la specii bine cunoscute și clar diferențiate morfologic nu sunt suficient de distincte genetic conform pragului menționat anterior. Valorile distanței dintre specii sunt relativ mici pentru grupul *D. aethiops*, *D. pedestre* și *D. kozanii* (2,66 – 2,88%) și chiar mult mai mici pentru *D. murrayi*, *D. pusillum pusillum* și *D. decipiens* (0,77 – 2,38%). Aceste distanțe sunt comparabile sau chiar mai mici decât cele mai mari distanțe intraspecifice pentru unele specii: *D. equestre* (5,8%) și *D. pedestre* (2,17%) (Tabel 3.1, 3.5 și 3.6. din teză).

Diferențierea genetică a subspeciilor

Cu privire la posibilitatea de a distinge subspeciile cu ajutorul codurilor de bare ADN, am observat atât cazuri în care subspecii sunt distincte genetic dar și cazuri în care acestea sunt identice. *Dorcadion equestre* are o substructură genetică pronunțată ce urmează aceeași structură ca subspeciile acceptate; pentru speciile *D. axillare* și *D. pusillum*, chiar dacă subspeciile sunt diferite din punct de vedere genetic de subspeciile nominotipice, diferențierea nu este din cauza divergenței genetice ci din cauza faptului că s-au format prin introgresie.

Celelalte 3 specii la care am analizat mai mult de o subspecie nu au avut practic nici o diferență între secvențele subspeciilor. Pentru *D. fulvum*, am analizat indivizi din 5 țări, cu reprezentanți pentru trei subspecii, dar nu am găsit nici o substructură geografică. O situație similară este și în cazul speciei *D. aethiops*, la care specimene colectate din zone îndepărtate (România și Grecia) ce acoperă 3 subspecii sunt identice genetic. Pentru *Iberodorcadion perezii* am inclus doar câte un specimen per subspecie, ele fiind colectate dintr-o zonă de contact. Diferențele morfologice în acest din urmă caz sunt mult mai pronunțate decât cele dintre subspeciile de *D. fulvum* sau *D. aethiops*, iar ele sunt considerate specii distincte sau subspecii, în funcție de autor (Hernández, 2000; Tomé, 2004, 2012), însă secvențele *COI* sunt aproape identice. Divergențe genetice mici între secvențele *COI* a unor taxoni nu reprezintă automat dovada conspecificității (din cauza posibilității introgresiei și a capturii mitocondriale) și am considerat *I. perezii hispanicum* și *I. perezii ghilianii* ca subspecii în mod arbitrar folosind clasificarea lui Danilevsky & Lazarev (2025). Dacă le-am considera specii separate, am avea încă un caz de hibridizare introgresivă și discordanță între informația mitocondrială și cea morfologică.

Analiza detaliată a cazurilor de discordanță mitocondrială-morfologică

Dorcadion aethiops* și *D. fulvum

Dorcadion aethiops face parte din subgenul *Carinatodorcadion*, însă are ADN-ul mitocondrial mai apropiat de o specie încă necunoscută din subgenul *Cribridorcadion* decât de *D. (Carinatodorcadion) fulvum*, ce face parte din același subgen. Până la Pesarini & Sabbadini (2007), populațiile de *D. aethiops* din Grecia au fost considerate specii distincte: *Dorcadion propinquum* Breuning (descrisă din apropierea orașului Kozani) și *Dorcadion majoripenne* Pic, cu localitatea tip în apropierea Salonicului (Breuning, 1962). Conform lui Danilevsky (2014), ambii taxoni sunt subspecii valide, iar o a treia subspecie, *D. aethiops strumense* Danilevsky, a fost descrisă din sudul Bulgariei.

Astfel, conform distribuției geografice acceptate a subspeciilor, speciunile analizate sunt *D. aethiops propinquum* (aeVe01 din munții Vermion), *D. aethiops strumense* din munții Kerkini (aeKe01 și aeKe02 ce au fost colectați de la aproximativ 10 km de localitatea tip din sudul Bulgariei) și subspecia nominotipică *D. aethiops aethiops* ce a fost colectată din România (Tabelul 2.1. din teză). Datele noastre moleculare susțin tratarea *D. propinquum* ca subspecie de *D. aethiops* și nu ca o specie distinctă (secvențe *COI* identice). Codurile de bare ADN pentru toate cele 3 subspecii colectate de pe o arie geografică întinsă, discrepanța dintre genitalia masculă și secvențele *ITS2* ce plasează *D. aethiops* într-un subgen și secvențele *COI* care poziționează *D. aethiops* în alt subgen, pot fi explicate cel mai bine de captura mitocondrială de la o specie necunoscută din subgenul *Cribridorcadion*. Morfologia corpului este și ea asemănătoare cu unele specii din subgenul *Cribridorcadion* care nu prezintă pubescență elitrală.

Dorcadion fulvum distribuit pe un areal comparabil cu *D. aethiops*, este mult mai variat genetic. Cele trei subspecii analizate nu pot fi totuși diferențiate utilizând codurile de bare ADN întrucât nu sunt suficient de divergente. Confirmăm astfel prezența subspeciei nominotipice în România, la vest de Carpați, bazându-ne doar pe morfologie. Prezența subspeciei la noi în țară a fost citată de Zamoroka (2019a) pe baza datelor de distribuție.

Dorcadion axillare*, *D. murrayi* și *D. pusillum

Dorcadion axillare, *D. murrayi* și *D. pusillum* reprezintă un caz interesant de hibridizare urmat de captură mitocondrială. ADN-ul mitocondrial a întregesat foarte mult în cele 3 specii, chiar dacă fluxul de gene nucleare rămâne relativ restricționat. În absența unor date genomice extensive, ne bazăm concluziile pe diferențele morfologice clare dintre cele 3 specii (ceea ce indică un flux orizontal restrâns de alele nucleare). Acest lucru este

confirmat și de arborele nuclear concatenat (28S+ITS2) și cel COI ce arată o discrepanță citoplasmatico-nucleară. Secvențele de 28S și ITS2 sunt diferite între *D. murrayi* și *D. axillare axillare*, cele de *D. axillare moldavicum* fiind grupate împreună cu secvențele subspeciei nominotipice, spre deosebire de secvențele COI (figurile 3.1. și 3.2. din teză). Secvențele de 28S sunt identice pentru subspecia nominotipică de *D. pusillum* și *D. murrayi*, cea mai probabilă explicație fiind separarea recentă a celor două specii. Secvențele de ITS2 sunt identice sau foarte asemănătoare pentru subspeciile de *D. pusillum* și distincte de secvențele de *D. murrayi*. Atât morfologia, cât și analiza genelor nucleare (Figura 3.1. din teză) confirmă ca *D. axillare moldavicum*, *D. pusillum ochrolineatum* și *D. pusillum vasiliscus* sunt într-adevăr subspecii ale speciilor *D. axillare* și *D. pusillum* cum au fost descrise original și nu subspecii de *D. murrayi*.

Aria de distribuție a speciei *D. axillare* se extinde din Bulgaria spre sudul României și continuă în nord-estul României, unde a fost descrisă o subspecie separată, *D. axillare moldavicum* (Dascălu & Fusu, 2012) (Figura 3.6. din teză). În arborii COI din acest studiu, populațiile celor două subspecii nu sunt grupate împreună: *D. axillare axillare* formează un grup distinct, iar *D. axillare moldavicum* este plasat între secvențele de *D. murrayi* și *D. pusillum*. Majoritatea populațiilor au mitocondrii de *D. murrayi*, în afară de populația de la Chircești ce are mitocondrii de *D. pusillum pusillum* (Figura 3.3. din teză). Această populație a fost considerată tranzițională de către Dascălu & Fusu (2012). În toate localitățile în care este prezentă subspecia *D. axillare moldavicum*, inclusiv în localitatea tip, *D. murrayi* nu este prezent. Podișul Bârladului, o zonă compact împădurită până nu demult (Figura 3.6. din teză), funcționează ca o barieră geografică care împiedică răspândirea speciei *D. murrayi* spre nord (*D. axillare* a traversat totuși cumva spre nord). În acest context, probabilitatea ca *D. axillare moldavicum* să fie un hibrid de primă generație este zero. Informațiile noi dobândite despre introgresie, explică originea caracterelor folosite de către Dascălu & Fusu (2012) pentru a diferenția *D. axillare moldavicum* de subspecia nominotipică. Corpul mai mare și mai alungit și spinii de pe pronot mai lungi sunt caractere ce provin cel mai probabil de la *D. murrayi*. Deoarece subspecia are o origine hibridogenă, preferăm să considerăm acest taxon ca o subspecie și nu ca o specie diferită (*Dorcadion moldavicum*) conform Danilevsky & Lazareav (2025).

La majoritatea speciilor animale, mitocondriile sunt transmise următoarei generații de către femele. O posibilă explicație a transferului mitocondrial unidirecțional este capacitatea de mobilitate diferită a celor două sexe în Dorcadionini. Masculii sunt mai mobili

decât femelele, cum a fost arătat pentru *Iberodorcadion fuliginator* de către Baur *et al.* (2005), astfel posibilitatea ca aceștia să traverseze o barieră geografică cum este fluviul Dunărea este mai mare. Ipoteza noastră este că masculi izolați de *D. axillare axillare* ce au migrat din teritoriul unde este astăzi Bulgaria, s-au întâlnit și s-au împerecheat cu femele de *D. murrayi*, o specie ce se întâlnește la nord de Dunăre. Chiar dacă câteva femele de *D. axillare axillare* au migrat și ele spre nord, mitocondriile transmise următoarei generații au fost pierdute cel mai probabil din cauza derivei genetice sau sunt rare și deci greu de detectat. Cele mai multe cazuri documentate de hibridizare la animale sunt explicate de către principiul lui Hubbs, ce postulează că rata de acceptare a partenerilor din altă specie este corelată cu raritatea indivizilor conspecifici (Willis, 2013). În plus, după cum a demonstrat Richmond (2014) pentru *Drosophila*, este posibil ca împerecheri între femele de *D. axillare axillare* și masculi de *D. murrayi* să nu fie posibile din cauza diferenței de marime a genitaliilor, *D. axillare axillare* fiind o specie mult mai mică.

În contrast cu *D. axillare*, cele două subspecii de *D. pusillum* endemice pentru România au arealul de distribuție suprapus complet cu cel al *D. murrayi* (Figura 3.6); cu toate acestea destul de frecvent populațiile sunt separate (nu se găsesc ambele specii în același loc), deoarece *Dorcadion pusillum* preferă pajiștile cu soluri sărăturate din lungul râurilor mici, pe când *D. murrayi* preferă un habitat stepic și deluros (Dascălu, 2018 și Dascălu comunicare personală). Din acest motiv, în localitatea tip pentru *D. pusillum ochrolineatum*, nu a fost găsită și specia *D. murrayi*, iar în localitatea tip pentru *D. pusillum vasiliscus*, *D. murrayi* este prezent, însă nu exact în aceeași suprafață de teren (Dascălu, 2018 și Dascălu comunicare personală). În Pădurea Spătaru, ambele specii se găsesc în același habitat și populațiile de aici reprezintă un grup hibrid, unde introgresia este un fenomen care are loc în mod activ. Hibridizarea a fost probabil accelerată de antropizarea habitatelor și micșorarea acestora.

Similar cu subspecia *D. axillare moldavicum*, caracterele morfologice folosite de Dascălu (2018) pentru a diferenția subspeciile *D. pusillum vasiliscus* și *D. pusillum ochrolineatum* de subspecia nominotipică sunt cel mai probabil derivate de la *D. murrayi*: reducerea liniilor dorsale și humeral elitrare și a petelor negre dar și antene mai închise la culoare.

Speciile *D. murrayi* și *D. pusillum pusillum* ce au generat taxonii hibridogenici *D. pusillum vasiliscus* și *D. pusillum ochrolineatum*, sunt foarte apropiate din punct de vedere genetic. Distanța dintre *D. murrayi* și *D. pusillum pusillum* este de doar 0,77% fiind cea mai

mică dintre toate speciile analizate. Totuși, aceste specii nu sunt asemănătoare morfologic și din acest motiv suspectăm că un alt eveniment de hibridizare a avut loc în trecut, ducând astfel la o similaritate atât de mare a secvențelor de ADN a celor două specii. Pe durata oscilațiilor climatice din Pleistocen cel mai probabil s-a ajuns la o expansiune considerabilă a arealului acestor specii urmat de o micșorare a arealului. În timpul simpatriei o specie a capturat mitocondriile celeilalte specii, iar mai apoi ele au devenit alopatrice și s-au diferențiat genetic, până când s-au reîntâlnit în perioada interglacială prezentă când au hibridizat din nou.

Dat fiind ușurința cu care aceste specii pot hibridiza, ne putem întreba dacă sunt într-adevăr specii distincte. Un argument în favoarea considerării lor ca specii diferite este forma endofalusului, cu caracteristici distincte pentru fiecare specie (Dascălu, 2018; Dascălu & Fusu, 2012); un alt argument este diferența de habitus și culoare dintre acești taxoni. Bazat pe datele biogeografice, *D. axillare* este o specie balcanică (Dascălu & Fusu, 2012), arealul de distribuție al speciei *D. pusillum* coincide cu stepa Ponto-Caspică (Dascălu, 2018), iar *D. murrayi* este întâlnit aproape exclusiv pe teritoriul României (Figura 3.6). Prin urmare, este foarte posibil ca cele 3 specii să fi evoluat în alopatrie, iar suprapunerea arealelor de distribuție este recentă, cauzată de colonizarea unor noi areale după sfârșitul ultimei Glaciațiuni (Taberlet *et al.*, 1998). Deoarece erau populații alopatrice inițial, mecanisme care să oprească hibridizarea nu au evoluat, dar ar putea apărea (Mallet, 2005) acum că ele sunt parțial simpatrice. Introgresia continuă dintre cele trei specii este întârziată de către două bariere geografice: râul Prut și fluviul Dunărea. Chiar dacă *D. pusillum* și *D. axillare* le-au traversat, a treia specie, *D. murrayi*, nu a putut trece de aceste bariere decât foarte rar și nu a colonizat zonele la sud și est de România. Singura localitate din afara teritoriului României unde *D. murrayi* a fost semnalat este o localitate din Serbia, aproape de Dunăre (Ilić & Ćurčić, 2015) (Figura 3.6. din teză).

Dorcadion decipiens

Statutul taxonomic al speciei *D. decipiens* bazat pe date moleculare este neclar. Am inclus un singur specimen în această analiză, el fiind plasat ca specie soră cu *D. pusillum* doar în analizele BI (Figura 3.2. din teză). În analizele ML (Figura 3.1. din teză), secvența de *D. decipiens* este așezată între secvențele de *D. pusillum*, dar pe un ram lung. Probabil din această cauză, în analiza PTP secvențele de *D. pusillum* nominotipic din Ucraina și *D. decipiens* sunt clar două specii distincte; analiza mPTP include *D. pusillum*, *D. decipiens* și *D. murrayi* în aceeași specie. În analiza GMYC, *D. decipiens* este mereu inclus

printre secvențele de *D. pusillum* nominotipic; chiar dacă pe arborele filogenetic speciile sunt reciproc monofiletice (Figura 3.2. din teză) și sunt separate de 12 substituții, de 3 ori mai multe decât între *D. murrayi* și *D. pusillum pusillum* (Figura 3.3. din teză). Din punct de vedere morfologic, *D. decipiens* are un model de pubescență similar cu cel al subspeciei nominotipice de *D. pusillum*, dar este mult mai mare ca dimensiune și mai alungit, similar cu *D. murrayi*. Distanțele medii interspecifice dintre *D. decipiens* și aceste două specii este între 2–3% (Tabel 3.2 și 3.4. din teză), adică la pragul dintre variabilitatea intraspecifică și distanțele interspecifice.

Dorcadion equestre

Nu am putut include în analiza moleculară specimene din localitatea tip a speciei *D. equestre* (specimenele aveau ADN-ul degradat). Specia a fost descrisă din ”sudul Rusiei,, care la sfârșitul secolului 18 putea fi și Ucraina din prezent, unde specia este destul de răspândită (Zagaykevich & Puchkov, 2009), însă această specie este prezentă și în sudul Rusiei europene din prezent (Plavilstshikov, 1958). Nu există întreruperi în distribuția speciei în Ucraina, NE României și Republica Moldova, dar există o discontinuitate între zona menționată anterior și populațiile din Câmpia Română (Valahia) și Transilvania, localitatea tip pentru *D. equestre transsilvanicum* (Figura 3.7. din teză). Întreruperea în distribuție, de-a lungul coastei Iașilor a fost generată cel mai probabil de Podișul Bârladului, aceasta fiind o zonă puternic împădurită, mai ales în trecut. Din cauza divergenței genetice foarte mari între specimenele din aceste două areale, am inclus specimenele din NE României și Republica Moldova în subspecia nominotipică și nu în *D. equestre transsilvanicum* așa cum este propus de Danilevsky & Lazarev (2025) dar și de Pesarini & Sabbadini (2010). La aceste specimene, caracterele de diferențiere pentru cele două subspecii — carena dorsală și prezența petelor negre în pubescența de fond (Pesarini & Sabbadini, 2013) — sunt mai similare cu specimenele din Ucraina (afirmație bazată pe 9 specimene din colecția M.M Dascălu) decât cu cele din sudul României.

Când am utilizat GMYC pentru delimitarea speciilor, *D. equestre transsilvanicum* este considerat specie distinctă de specimenele pe care le-am identificat ca făcând parte din subspecia nominotipică. Cele două grupuri (*D. equestre transsilvanicum* și subspecia nominotipică) sunt separate de minim 7 substituții (Fig. 3.3. din teză). În analiză am inclus și un specimen din Dobrogea, dintr-o zonă la sud de Dunăre. Acest specimen este considerat doar de analiza GMYC cu praguri multiple ca fiind o specie separată și ca făcând parte din *D. equestre equestre* după analiza GMYC cu un singur prag (Figura 3.2., GMYCs și

GMYCm din teză). Analiza PTP nu delimitează *D. equestre transsilvanicum* și subspecia nominotipică ca două specii diferite (fig 3.2, PTP și mPTP din teză). Un rezultat comun al tuturor metodelor este delimitarea *D. equestre reclinatum* ca o specie distinctă, deoarece este la fel de divergentă față de subspecia nominotipică ca *D. aethiops* față de *D. fulvum* de exemplu. Deoarece pentru această analiză am avut doar un individ din această subspecie cu o secvență provenită din alt studiu (Giannoulis *et al.*, 2020), o analiză în care sunt incluși mai mulți indivizi ar putea micșora diferența dintre subspecii. O valoare a distanței intraspecifice mare a fost observată și la alte 16 specii de cerambicide europene (Hendrich *et al.*, 2015; Rougerie *et al.*, 2015).

Dorcadion lugubre* și *D. lineatocolle

Secvențele de *COI* a speciei *D. lugubre* sunt împărțite în două claduri, cu o secvență grupată cu *D. lineatocolle*. Specimenul poziționat greșit este mai mic decât dimensiunea caracteristică speciei, având o dimensiunea mai apropiată de *D. lineatocolle* (Figura 3.8. din teză). Acest specimen este heterozigot pentru markerul *ITS2*, având un haplotip care se grupează cu *D. lugubre* și unul care se grupează cu *D. lineatocolle* (Figura 3.1). Conform lui Danilevsky (2014), speciile de *D. lugubre* din Valea Struma din Bulgaria sunt atribuite subspeciei *D. lugubre minkovae*. Individul de *D. lugubre* cu haplotip mitocondrial de *D. lineatocolle* și secvențe de *ITS2* ce corespund cu ambele specii (*D. lugubre* și *D. lineatocolle*) provine exact din acea zonă (satul Promachonas din Grecia, din zona unde râul Struma intră în defileul Roupel). După analizele moleculare și morfologie, considerăm că specimenul linPro1001 este un hibrid dintre *D. lugubre lugubre* sau *D. lugubre minkovae* și *D. lineatocolle*, specie prezentă în zona de unde specimenul a fost colectat (Minkova, 1961).

3.2.1. Rezultate

Aliniamentele și rețelele de haplotipuri

Pentru cele 15 specimene de *Dorcadion lineatocolle*, ambele subspecii de *D. lugubre* și individul hibrid au fost obținute seturi complete de câte șapte secvențe pentru fiecare specimen.

Aliniamentul de *ITS2* are 521 de poziții din care 23 dintre acestea sunt variabile, una singură din ele nefiind informativă. Din cauza indelurilor lungimea secvențelor variază între 508 și 512 nucleotide. Am observat patru indeluri de o singură nucleotide, un indel de două nucleotide și patru indeluri de trei nucleotide. Două indeluri de o singură nucleotidă sunt suprapuse cu două indeluri de trei nucleotide. *Dorcadion lugubre minkovae* este separat de

două substituții de *D. lugubre lugubre*, iar ambele subspecii sunt foarte divergente de *D. lineatocolle*. Hibridul este heterozigot, cu câte o alelă de la fiecare din speciile parentale.

În aliniamentul *Wingless* există 469 de poziții, cu 12 poziții variabile din care 11 sunt informative. Cei 3 taxoni sunt distincți însă *D. lugubre minkovae* apare mai apropiat de *D. lineatocolle* decât de *D. lugubre lugubre* (4 mutații comparativ cu 7 mutații). Individul hibrid este heterozigot pe unele poziții variabile ale acestui marker molecular, având o alelă de *D. lugubre minkovae* și o alelă de *D. lineatocolle*.

Aliniamentul *Elongation Factor-1 α* are 348 de poziții iar 4 dintre ele sunt variabile și informative. *Dorcadion lugubre minkovae* este mai apropiat de *D. lineatocolle* (o mutație) decât de *D. lugubre lugubre* (două mutații). În plus, cele două subspecii de *D. lugubre* au și haplotipuri comune, iar individul hibrid este homozigot cu ambele alele de la *D. lineatocolle*.

Există 328 de poziții în aliniamentul de *Histona 3* cu o singură poziție variabilă și informativă. Cele două subspecii de *D. lugubre* au același haplotip și sunt separate de *D. lineatocolle* de o singură substituție. Hibridul este heterozigot cu câte o alelă de la ambii taxoni parentali.

În aliniamentul *28S* există 842 de poziții din care 3 sunt variabile dar noninformative. Majoritatea specimenelor au același haplotip comun, însă mai există alte 4 haplotipuri reprezentate de 1-2 indivizi separate de câte o mutație. Individul hibrid este homozigot și aparține haplotipului cel mai comun.

Markerii moleculari mitocondriali amplificați sunt relativ similari din punct de vedere informativ. Aliniamentul *COI* are 658 de poziții, din care 67 sunt variabile, cu doar una din acestea noninformativă. Aliniamentul *Cytochrom b* are 433 de poziții, din care 43 variabile, cu doar două dintre ele noninformative. Datorită numărului mare de substituții din aceste alinamente, cele două gene mitocondriale nu au fost utilizate pentru a reconstrui rețele de haplotipuri ci au fost analizate doar din punct de vedere filogenetic.

Analiza filogenetică

Arborii filogenetici mitocondriali (ML și BI) – Fig. 3.10 și Fig. 3.11. (din teză) reconstruiți utilizând secvențele concatenate ale markerilor *COI* și *Cytb* au topologii similare, unde secvențele de *D. lugubre minkovae* sunt separate într-un clad distinct și foarte divergent cu valoarea probabilității posterioare (PP) de 1 și suport bootstrap (BP) de 100%. *Dorcadion lugubre* și *Dorcadion lineatocolle* sunt poziționate în două claduri surori distincte, iar hibridul este inclus în cladul ce grupează toate secvențele de *D. lineatocolle*. Specimenele de *D. lugubre lugubre* sunt foarte similare din punct de vedere genetic, iar

specimenele de *D. lineatocolle* prezintă variabilitate mare. În arborele ML suportul pentru nodurile *D. lineatocolle* și *D. lugubre lugubre* este dat de valoarea BP egală cu 72% pentru ambele, iar pentru arborele BI nodurile au valorile PP de 0,74 și 1. Singura diferență dintre arborii ML și BI este în interiorul cladului *D. lineatocolle*, însă acestea sunt secvențe pe ramuri foarte scurte. Cei trei taxoni sunt monofiletici în ambele variante de arbori filogenetici, iar *D. lugubre lugubre* este mai similar din punct de vedere genetic cu *D. lineatocolle* decât cu *D. lugubre minkovae*.

În arborii filogenetici nucleari concatenați (ML și BI) Fig. 3.10 și 3.11. (din teză) reconstruiți utilizând cei 5 markeri moleculari, taxonii parentali sunt grupați în două clade distincte. *Dorcadion lugubre* și *D. lineatocolle* sunt monofiletici, unde *D. lugubre lugubre* și *D. lugubre minkovae* sunt plasați în același clad în concordanță cu taxonomia bazată pe morfologie. Cele două claduri, atât în arborele ML cât și în cel BI, sunt susținute de valori bootstrap de 100% și respectiv valori PP egale cu 1. Individul hibrid apare în ambele claduri în arborii filogenetici deoarece este heterozigot pentru toți markerii moleculari nucleari cu excepția *EF-1a*. Topologiile arborilor filogenetici ML și BI sunt foarte similare, *D. lugubre lugubre* este monofiletic (BP=100, PP=1), iar *D. lugubre minkovae* apare ca parafiletic.

Distanțe genetice

Distanțele genetice intraspecifice bazate pe *COI* pentru speciile de *D. lineatocolle* variază între 0 și 1,82% (Tabel 3.7., Tabel 3.8. din teză), având o variabilitate relativ mare între speciile din localități diferite (Tabel 3.8. din teză). Pentru taxonul *D. lugubre lugubre* distanțele intraspecifice sunt foarte mici, între 0 și 0,46%, cel mai probabil deoarece toți indivizii au fost colectați din aceeași zonă și fac parte din aceeași metapopulație. Cele două specime de *D. lugubre minkovae* au același haplotip și distanța genetică dintre acestea și *D. lugubre lugubre* este de 7,3%, valoare relativ mare. Conform rezultatelor unei căutări BLAST, cel mai apropiat taxon de *D. lugubre minkovae* este *Dorcadion aethiops* (Tabel 3.7. din teză).

3.2.2. Discuții

Taxonii parentali

Arealul speciilor parentale ale hibridului este limitat la Peninsula Balcanică. Ambele specii sunt prezente în Bulgaria, Grecia și Macedonia, dar *D. lineatocolle* are o distribuție mai largă, fiind prezent și în Albania și Serbia și Muntenegru (Danilevsky & Lazarev, 2025). Conform autorilor Pesarini & Sabbadini (2010), *D. lineatocolle* este singura specie din grupul *lineatocolle*, iar *D. lugubre lugubre* și *D. lugubre minkovae* fac parte din grupul

etruscum, cu o distribuție preponderent în Peninsula Balcanică. Aceeași autori (Pesarini & Sabbadini 2007, 2010) au făcut schimbări în taxonomia și nomenclatura acestui grup de specii (grupul *etruscum*), îndeosebi sinonimizând mai mulți taxoni și coborând rangul mai multor specii la subspecii. Speciile *Dorcadion parinfernale* Breuning, *D. minkovae*, *D. thessalicum* și *D. lugubre* (sensu Pesarini & Sabbadini, 2007, 2010), similare din punct de vedere morfologic, sunt considerate de Danilevsky (2020) ca taxoni vicarianți fiind astfel considerate subspecii de *Dorcadion lugubre*. În acest studiu am utilizat taxonomia conform cu Danilevsky (2020). Relativ recent, o altă variantă a taxonomiei grupului *etruscum* a fost propusă de Lazarev (2023) dar nu am luat-o în considerare, deoarece mai mulți taxoni sinonimizați de către acest autor sunt distincți din punct de vedere molecular (Dascălu, Caba & Fusu, 2022; Caba & Dascălu, 2024; capitolul 3.3. al acestei teze).

Date genetice ale hibridului

Hibridul are haplotipul mitocondrial de *D. lineatocolle*, ceea ce indică identitatea speciei materne, mai exact acest individ hibrid a rezultat din împerecherea unei femele de *D. lineatocolle* cu un mascul de *D. lugubre minkovae*. Pentru aproape toți markerii moleculari nucleari, hibridul este heterozigot (cu o singură excepție – *EF-1α*), având alele de la ambele specii parentale (Fig 3.12. din teză). În arborele filogenetic nuclear concatenat, individul hibrid este poziționat în mijlocul cladului *D. lineatocolle*, dar este bazal în cladul *D. lugubre*, o cauză probabilă este faptul că hibridul este homozigot pentru markerul molecular *EF-1α*, ambele alele fiind de *D. lineatocolle*. Această situație sugerează că individul parental *D. lugubre minkovae* prezenta urme de introgresie și astfel putem avea o posibilă explicație de ce hibridul este mai similar cu *D. lineatocolle*.

Taxonomia lui *Dorcadion lugubre lugubre*

Abordarea integrativă în analiza acestui individ hibrid și a speciilor lui parentale a dus la descoperirea unor noi perspective privind taxonomia speciei *D. lugubre*, care diferă în funcție de autorii ce au abordat acest subiect (Danilevsky, 2020; Lazarev, 2023; Pesarini & Sabbadini, 2007, 2010).

Dorcadion lugubre lugubre reprezintă încă un caz de discordanță între morfologie și datele moleculare, situații recent descoperite în tribul Dorcadionini (Dascălu, Caba & Fusu., 2022 și capitolul 3.1; Karpiński, Gorrington & Cognato, 2023). Arborele filogenetic nuclear este în concordanță cu morfologia și taxonomia, cele două subspecii de *D. lugubre* fiind grupate, însă în arborele filogenetic mitocondrial, *D. lugubre minkovae* este separat de *D. lugubre lugubre*, subspecia nominotipică fiind grupată cu *D. lineatocolle* iar distanța

genetică dintre cei doi taxoni este mică (Fig 3.10. din teză). Rangul taxonomic de subspecie pentru *D. lugubre minkovae* (după Danilevsky, 2020) este susținut de genele nucleare – toate speciile de *D. lugubre* sunt plasate în același clad cu divergență minimă. În plus, structura endofalusului celor două subspecii este identică. În rețelele de haplotipuri reconstruite pentru fiecare marker molecular, cele două subspecii de *D. lugubre* sunt foarte similare dar distincte în rețeaua *ITS2*, iar în rețelele *H3* și *EF-1 α* au alele în comun. *D. lugubre minkovae* este mai apropiat de *D. lineatocolle* (patru substituții) decât de *D. lugubre lugubre* (șapte substituții) în rețeaua reconstruită cu secvențele *Wg*. În analiza markerilor mitocondriali se poate observa că *D. lugubre lugubre* este apropiat de *D. lineatocolle* chiar dacă sunt distincți, distanța minimă dintre cei doi taxoni pe *COI* fiind de 2,58% (Fig 3.10., Tabel 3.7. din teză), valoare situată la pragul dintre variabilitatea intraspecifică și cea interspecifică. Comparativ, cea mai mare valoare intraspecifică dintre speciile de *D. lineatocolle* este 1,82% (Fig 3.10., Tabel 3.7. din teză). Aceste discrepanțe indică posibile evenimente de hibridizare și evoluție reticulată în istoria acestor taxoni. Putem afirma datorită divergenței mari de la nivelul ADN-ului mitocondrial că introgresia în acest caz nu este recentă sau în desfășurare.

În ciuda divergenței mari pentru markerul molecular *COI*, considerăm *lugubre* și *minkovae* subspecii deoarece morfologia endofalusului este identică pentru ambele și pentru că secvențele markerilor moleculari nucleari sunt identice sau foarte similare. Morfologia și ADN-ul nuclear au prioritate deoarece ADN-ul mitocondrial poate trece bariera dintre specii și poate induce astfel în eroare cum am arătat aici și în capitolul anterior.

Evoluția reticulată în tribul Dorcadionini

Din punct de vedere mitocondrial, *D. lugubre minkovae* este foarte divergent față de subspecia nominotipică (7,1%) ceea ce înseamnă că ele ar reprezenta teoretic două specii foarte diferite și total distincte [după Hebert *et al.* (2003) conform cărora, valoarea distanței genetice pentru *COI* între două specii este mai mare de 2-3%]. Astfel, am căutat în GenBank secvențe similare cu secvențele noastre de *D. lugubre minkovae*, iar rezultatul cel mai apropiat au fost secvențele de *D. aethiops* discutate în capitolul anterior unde am postulat că *D. aethiops* a capturat mitocondrii de la un taxon necunoscut din subgenul *Cribridorcadion*, dovada fiind poziția acestora în arborele filogenetic *COI*. Încă nu puteam determina cu exactitate taxonul de la care a capturat mitocondrii *D. aethiops*, însă putem confirma că acest taxon este din aceeași linie mitocondrială ca și *D. lugubre minkovae*, deoarece *D. aethiops*

și *D. lugubre minkovae* au o similaritate de 97,57% (2,43% divergență) fiind taxoni soră în arborele din Figura 3.13 (din teză).

Cu toate că încă nu avem datele pentru a dovedi originea hibridă a genomului nuclear, nu putem considera o simplă coincidență faptul că morfologia externă a celor doi taxoni este atât de similară. O explicație alternativă este că *D. aethiops* este un taxon stabil ce a capturat mitocondrii (Bonnet *et al.*, 2017) dar această ipoteză este incompletă deoarece nu clarifică motivul asemănării izbitoare a morfologiei externe cu *Dorcadion lugubre minkovae* care nu poate fi explicată decât de introgresia și a unor gene nucleare. Chiar dacă *D. aethiops* este o specie hibridogenă intersubgenetică, clasificarea taxonomică a acestei specii este corectă deoarece aceasta se bazează pe structura genitaliei masculine (Breuning, 1943b; Danilevsky, Kasatkin & Rubenyan, 2005) care este tipică pentru subgenul *Carinatodorcadion*.

3.3. Reconstrucția filogeniei tribului Dorcadionini utilizând mai mulți loci mitocondriali și nucleari.

3.3.1. Rezultate

Alinamente utilizate pentru testarea monofiliei triburilor Dorcadionini, Lamiini și Monochamini

Am construit o matrice multilocus pentru a determina monofilia tribului Dorcadionini, unde am construit un aliniament cu 27 de secvențe originale cu minim câte un reprezentant din fiecare gen și subgen inclus în tribul Dorcadionini (au fost alese speciile cu cât mai mulți markeri) și 40 de secvențe importate din GenBank (Tabel 2.4. din teză).

Aliniamentul *Citocrom oxidaza subunitatea I* are o lungime de 1548 pb (cele mai scurte secvențe au 418), fără inserții/deleții, cu 870 de situsuri conservate, 678 de situsuri variabile și 587 situsuri informative pentru parcimonie.

Aliniamentul *Citocrom b* are o lungime de 1143 pb fără inserții/deleții (cele mai scurte secvențe au 403 pb), cu 644 situsuri conservate, 496 situsuri variabile și 395 situsuri informative pentru parcimonie.

Aliniamentul *Elongation factor-1 α* are o lungime de 1326 pb (cele mai scurte secvențe au 203 pb) cu 4 până la 25 inserții/deleții (în intron), cu 980 situsuri conservate, 338 situsuri variabile și 202 situsuri informative pentru parcimonie.

Aliniamentul *Wingless* are o lungime de 480 de pb (cele mai scurte secvențe au 431 de pb), cu 6 sau 9 inserții/deleții (multiplu de 3, indicând că se păstrează cadrul de citire), cu 288 situsuri conservate, 184 situsuri variabile și 145 situsuri informative pentru parcimonie.

Aliniamentul *Histona 3* are o lungime de 328 de pb (cele mai scurte secvențe au 225 și 285 de pb), fără inserții/deleții, cu 210 situsuri conservate, 118 situsuri variabile și 95 situsuri informative pentru parcimonie.

Aliniamentul *ITS2* are o lungime de 677 pb (cele mai scurte secvențe au 512 pb), cu 116 – 235 inserții/deleții (cum este de așteptat de la o secvență non codantă), cu 264 de situsuri conservate, 342 situsuri variabile și 215 situsuri informative pentru parcimonie.

Aliniamentul *28S* are o lungime de 1445 pb (cele mai scurte secvențe au 334 pb) cu 32 – 125 inserții/deleții, cu 1118 situsuri conservate, 273 situsuri variabile și 111 situsuri informative pentru parcimonie.

Aliniamentul *18S* are o lungime de 1361 pb (cele mai scurte secvențe au 559 pb) cu 1 sau 2 inserții/deleții, cu 1348 situsuri conservate, 11 situsuri variabile și 3 situsuri informative pentru parcimonie.

Aliniamente utilizate pentru analiza relațiilor filogenetice în interiorul tribului Dorcadionini

Matricea este formată din 2 aliniamente mitocondriale (*Citocrom c oxidaza subunitatea I* și *Citocrom b*), 3 aliniamente nucleare în copie unică (*Elongation factor 1a*, *Wingless* și *Histona 3*) și 3 aliniamente nucleare ribosomale (*ITS2*, *28S* și *18S*). Din această analiză multilocus am eliminat proba Al2101 (*Acrocinus longimanus*) întrucât este prea distantă filogenetic; aceasta a fost utilizată doar în analizele de testare a monofiliei.

Dintre acestea, aliniamentele mitocondriale sunt aproape complete, *COI* are 112 secvențe originale plus încă 15 secvențe descărcate din GenBank (Tabel 2.5. din teză), din care 2 sunt foarte scurte de 261 și 317 pb cu o inserție/deleție, 19 de secvențe de 419 pb și o inserție/deleție, 17 secvențe cu lungimi cuprinse între 452 și 658 cu sau fără o inserție/deleție și în final 75 secvențe complete de 659 de pb și o inserție/deleție. Inserția/deleția este dată de o secvență din GenBank. În acest aliniament sunt 343 situsuri conservate, 316 situsuri variabile și 294 situsuri informative pentru parcimonie.

Aliniamentul *Cytb* are 98 de secvențe originale (o secvență de 405 pb și restul de 436 pb cu o inserție de 3 pb și aparent o deleție de 1 pb la un specimen), plus o secvență descărcată din GenBank (Tabel 2.5. din teză). În acest aliniament există 186 situsuri conservate, 247 situsuri variabile și 202 situsuri informative pentru parcimonie.

Am obținut 53 de secvențe de *Elongation Factor 1α*, din care 3 incomplete de 248, 304 și 334 pb și 50 de secvențe complete de 348 pb. În analiza multilocus am adăugat la aliniamentul inițial 4 secvențe descărcate din GenBank (Tabel 2.5. din teză), rezultând un aliniament cu 222 situsuri conservate, 126 situsuri variabile și 84 situsuri informative pentru parcimonie.

Aliniamentul de *Wingless* are 64 de secvențe originale cu lungimi între 457 și 475 pb cu sau fără 3 sau 6 inserții/deleții și 4 secvențe importate din GenBank (Tabel 2.5. din teză) rezultând un aliniament cu 326 de situsuri conservate, 143 situsuri variabile și 105 situsuri informative pentru parcimonie.

Cele mai multe secvențe obținute pentru markerii nucleari sunt cele de *Histona 3*, mai exact 102 cu lungimi între 246 și 328 pb fără inserții/deleții. În analiza multilocus am adăugat 5 secvențe descărcate din GenBank (Tabel 2.5. din teză) rezultând un aliniament cu 214 situsuri conservate, 114 situsuri variabile și 99 situsuri informative pentru parcimonie.

Pe locul 3 ca dimensiune, se află aliniamentul de *ITS2* cu 102 de secvențe cu lungimi între 485 pb și 831 pb și cu 195 până la 430 inserții/deleții. În analiza multilocus am adăugat 2 secvențe descărcate din GenBank (Tabel 2.5. din teză), rezultând un aliniament cu 320 de situsuri conservate, 410 situsuri variabile și 265 situsuri informative pentru parcimonie.

Am obținut 84 de secvențe de *28S*, din care 25 scurte cu lungimi între 314 pb și 480 pb cu 13 până la 22 de inserții/deleții, celelalte 60 de secvențe au între 798 pb și 862 pb cu 18-22 inserții/deleții. La aliniamentul analizat am adăugat 7 secvențe minate din GenBank (Tabel 2.5. din teză) care au mărit aliniamentul la 1084 pb din care 948 sunt situsuri conservate, 130 situsuri variabile și 64 de situsuri informative pentru parcimonie.

Cel mai mic aliniament este cel de *18S*, cu 44 de secvențe din care una scurtă de 448 pb, iar restul de 43 sunt între 874 pb și 1361 pb cu sau fără 2 inserții/deleții. În acest aliniament nu au fost adăugate secvențe din GenBank și există 1345 situsuri conservate, 14 situsuri variabile și 4 situsuri informative pentru parcimonie.

Gradul de exhaustivitate a setului de date

Am obținut și analizat secvențe pentru 1 până la 8 markeri moleculari de la 114 specimene. Astfel, dintre toate probele am reușit să amplificăm toți cei 8 markeri moleculari pentru 32 de probe, 7 markeri moleculari pentru 18 probe, 6 markeri moleculari pentru 16 probe, 5 și 4 markeri moleculari pentru 18 probe diferite, pentru câte 4 probe am amplificat 2 sau 3 markeri moleculari și nu în ultimul rând, 4 probe au putut fi amplificate doar pentru un singur marker molecular. Probele cu un singur marker au fost incluse în analiză datorită

importanței în sistematica și taxonomia grupului. La acestea am mai adăugat încă 40 specimene cu secvențele descărcate din GenBank (Tabel 2.4. din teză).

Analiza filogenetică individuală a markerilor moleculari

Primul pas în reconstrucția multilocus a fost reconstrucția arborilor filogenetici pentru fiecare marker molecular în parte. Scopul este de a verifica dacă există contaminare încrucișată sau secvențe paraloage (pseudogene de exemplu). Aceasta poate fi detectată dacă se observă identitate genetică între specii neînrudite sau prin poziționarea în filogenie a unei specii în grupul de specii greșit. Pentru aceasta este necesară o bună cunoaștere a taxonomiei grupului. De asemenea, pot fi detectate secvențe plasate pe ramuri lungi ce indică

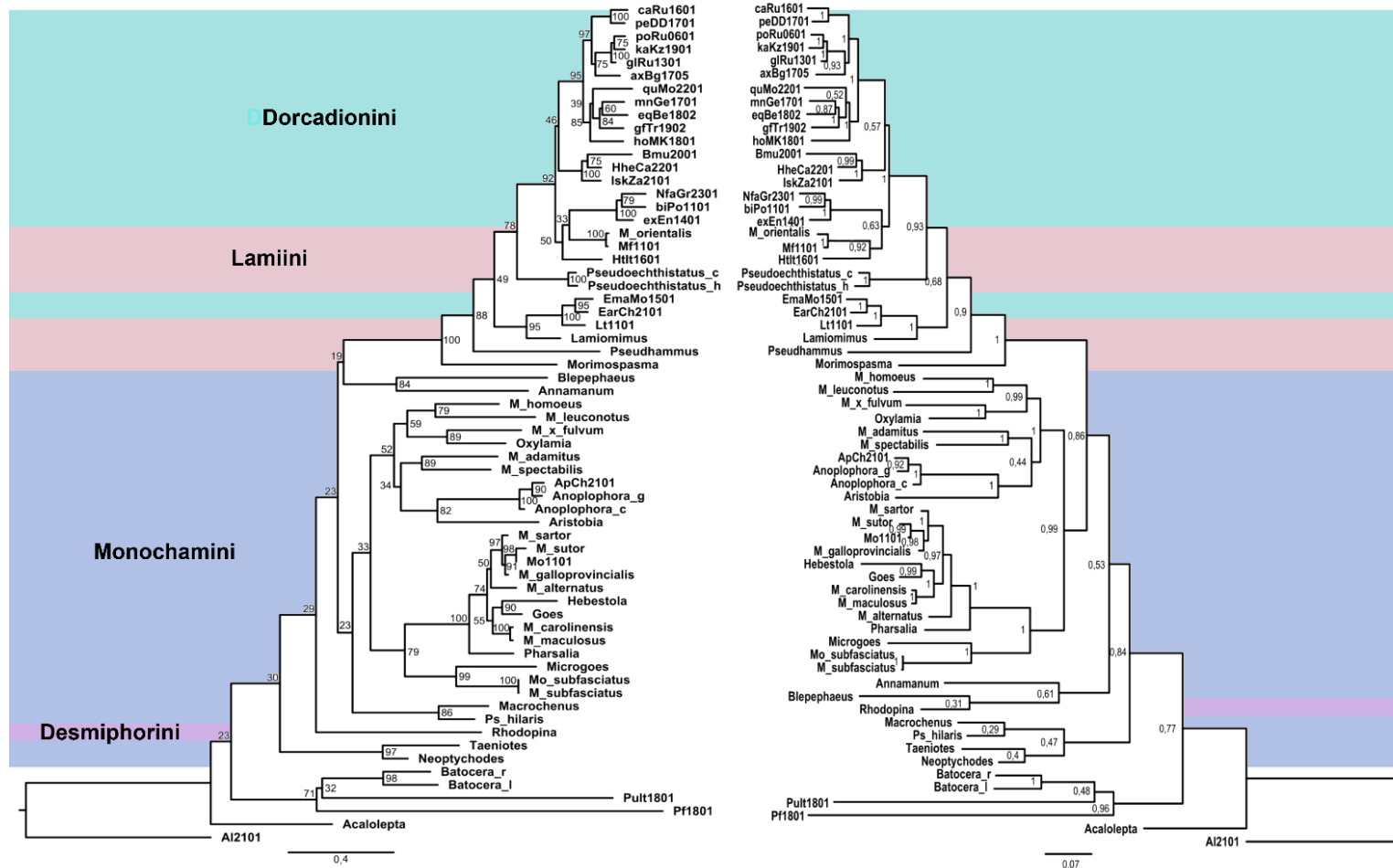


Figura 3.22. Arbori filogenetici multilocus ML stânga) și BI (dreapta), bazați pe setul de date restrâns pentru Dorcadionini dar extins pentru Lamiini și Monochamini. Culorile indică triburile în care sunt încadrați taxonii analizați.

amplificarea de pseudogene. În ambele cazuri aceste secvențe sunt eliminate. Dacă se omite această etapă, aceste secvențe nu mai pot fi detectate în analizele concatenate, dar pot duce la o topologie greșită.

Testarea monofiliei triburilor Dorcadionini, Lamiini și Monochamini

Pentru a demonstra monofilia tribului Dorcadionini, au fost generați arbori filogenetici multilocus ML (cu RAxML-NG și IQTree) și BI (cu MrBayes) – Figurile 3.22. și 3.23. (din teză) folosind un set de date restrâns pentru Dorcadionini dar extins pentru Lamiini și Monochamini. Topologia arborilor rezultați este foarte similară, oferind mai multă încredere în rezultatele prezentate aici. În arborii RAxML și MrBayes, cladul cu majoritatea genurilor de Dorcadionini incluse în analiză (*Iberodorcadion*, *Dorcadion* și *Politodorcadion*) este soră cu cladul ce include reprezentanți ai genurilor *Morimus* și *Herophila* (din Lamiini) și *Neodorcadion* (Dorcadionini). Astfel, în aceste analize doar o parte din reprezentanții tribului Dorcadionini formează o grupare monofiletică. Acest grup de Lamiini și Dorcadionini este susținută de o valoare PP maximă (1) în arborele BI, o valoare BP de 92% în arborele ML cu RAaML și SH-aLRT de 96 cu UFBoot de 100 în arborele IQTree. Cu toate acestea, în interiorul acestui clad relația dintre cele 3 genuri de Dorcadionini și cladul *Morimus+Herophila* are suport foarte mic, iar poziția genului *Iberodorcadion* variază în funcție de metoda folosită pentru reconstrucția filogeniei. Următorul clad din ambii arbori este reprezentat de două specii de *Pseudoechthistatus*, relația sa cu cladul anterior având valoare BP de 78% pentru arborele RAxML, PP egală cu 0,93 în arborele BI, iar în arborele IQTree SH-aLRT de 95 cu UFBoot de 99.

Poziția genului *Eodorcadion* este bazală față de ceilalți Dorcadionini, genul fiind plasat în același clad cu *Lamia* (genul tip al tribului Lamiini), cu valori de suport maxime (BP=100% și PP=1, SH-aLRT = 99, UFBoot = 100) și *Lamiomimus* cu valori de suport la fel de mari (BP=95% și PP=1, SH-aLRT = 95, UFBoot = 99). Relația dintre cladul *Lamiomimus+Lamia+Eodorcadion* și cel anterior are valori BP și PP destul de mici (BP = 49, PP= 0,68, SH-aLRT = 76, UFBoot = 93). O posibilă explicație pentru aceste valori este faptul că *Lamiomimus* și cele două specii de *Pseudoechthistatus* au doar markeri moleculari mitocondriali incluși în analiza multilocus concatenată spre deosebire de *Lamia textor* și cei doi taxoni de *Eodorcadion* care au și gene nucleare.

În continuare, tot acest clad este soră cu *Pseudhammus* (BP =88% , PP = 0,9, SH-aLRT = 84, UFBoot = 97), iar apoi cu *Morimospasma* (BP = 100% , PP = 1, SH-aLRT = 100, UFBoot = 100). Tot acest grup ce conține reprezentanți ai triburilor Dorcadionini și

Lamiini (ce nu sunt reciproc monofiletice) este inclus în grupul genurilor din tribul Monochamini pe care astfel îl fac să fie parafiletic. Tot în tribul Monochamini este inclus și *Rhodopina* (Desmiphorini). Alte deosebiri dintre cei trei arbori filogenetici obținuți constau în special în poziția genurilor *Annamanum* și *Blepephaeus* care fie formează un grup soră cu Lamiini+Dorcadionini (arborele RAxML), fie formează un clad destul de bazal în cadrul tribului (arborii IQTree și MrBayes). Poziția genurilor *Macrochenus* și *Psacotea* variază de asemenea foarte mult, fiind chiar în exteriorul tribului în arborele IQTree.

Filogenia tribului Dorcadionini: mitochondrial vs nuclear

Topologia arborilor filogenetici obținuți din seturile de date concatenate mitochondriale și respectiv nucleare are același aspect general ca topologia arborilor construiți pentru testarea monofiliei triburilor. Cel mai bazal taxon în arborele mitochondrial este Pf1801 (*Paraglenaia*), iar în cel nuclear este grupul Pf1801 cu PuIt1801 (*Paraglenaia*+*Parmena*). La fel ca în arborii construiți pentru testarea monofiliei, *Lamia textor* se plasează bazal în cladul cu indivizi din genul *Eodorcadion* având suport puternic, valoarea PP este 1 atât în arborele filogenetic mitochondrial cât și cel nuclear. Topologia din interiorul cladului *Eodorcadion* diferă în cei doi arbori însă nu semnificativ și fără suport la noduri; multe dintre noduri (PP < 0,6). Notabil este faptul că *E. humerale* EhuLK0153 este plasat cu *E. virgatum* din subgenul nominal în arborele mitochondrial dar cu *E. brandtii* din subgenul *Ornatodorcadion* în arborele nuclear.

Poziția genurilor *Herophila* și *Morimus* (Lamiini) variază între cei doi arbori: în arborele filogenetic mitochondrial BI (Fig. 3.24) dar și în arborele filogenetic ML (Fig. 3.25. din teză) cei doi taxoni sunt bazali față de Dorcadionini și sunt grupul lor soră, în ambii arbori cu suportul pentru noduri mare (PP = 1 și BP = 94%). Însă, în arborele filogenetic nuclear cele două genuri sunt în același clad cu *Neodorcadion*, suportul pentru acest clad fiind la limita între mare și moderat (PP=0,93 și BP = 85%). Practic în arborele nuclear *Morimus* și *Herophila* fac parte din Dorcadionini.

În arborii filogenetici mitochondriali genul *Iberodorcadion* este soră cu genul *Neodorcadion*, în analiza BI suportul este moderat (PP = 0,82), iar în analiza ML suportul este mic (BP = 43%). În arborii filogenetici nucleari, cladul *Iberodorcadion* este soră cladul ce cuprinde genurile *Dorcadion* și *Politodorcadion*. Topologia internă a cladului *Iberodorcadion* este ușor diferită între arborii mitochondriali și nucleari.

Diferențele dintre arborii BI mitochondrial și nuclear sunt evidențiate prin culori în Figura 3.24. În porțiunea din arbori în care se află taxonii (specii și subspecii) din genurile

Dorcadion și *Politodorcadion* se poate observa cele mai multe diferențe de topologie. Genul *Politodorcadion* nu se separă de genul *Dorcadion* într-un alt clad, ci este poziționat în interiorul cladului format din taxoni din *Dorcadion s. str.* În plus, în arborele nuclear, taxoni din *Politodorcadion* nu sunt grupați într-un clad ca în arborele mitocondrial ci se amestecă printre taxonii de *Acutodorcadion* și *Dorcadion s. str.* De exemplu, în arborele mitocondrial *P. politum* poRu0601 este grupat cu *P. balchashense* PbaKz1701, iar în cel nuclear este cel mai apropiat de *D. cephalotes* ceKz230. Aceeași situație este valabilă și pentru subgenurile *Acutodorcadion* și *Dorcadion s. str.* menționate anterior, care în arborele mitocondrial BI (Fig 3.24) au taxonii grupați în claduri cu excepția lui crKz2301 (*Dorcadion s. str.*) și myKa1501 (*Acutodorcadion*) care se poziționează bazal, separat de congenerii lor. În arborele filogenetic nuclear BI toți taxonii de *Politodorcadion*, *Dorcadion s. str.* și *Acutodorcadion* sunt amestecați între ei formând 2 claduri (genele nucleare sunt mai puțin informative în grupurile cu divergență recentă).

Taxonii de *Dzhungarodorcadion* (un subgen considerat sinonim) incluși în analiză, au aceeași poziție în ambii arbori filogenetici mitocondrial și nuclear, bazal față de *Politodorcadion*, *Dorcadion s. str.* și *Acutodorcadion*.

O altă diferență dintre cei doi arbori este individul axDD1701, aparținând unei subspecii de *D. axillare* discutată în capitolul 3.1 care este plasată fie cu subspecia nominotipică fie cu *D. murrayi*.

Speciile din subgenul *Carinatodorcadion* incluse în analiză sunt grupate într-un clad în ambii arbori filogenetici, însă în arborele mitocondrial, individul de *D. aethiops* aeTM01 nu se poziționează în cladul *Carinatodorcadion* ci împreună cu grupul *pedestre*. Acest caz special este discutat în capitolul 3.1 și capitolul 3.2.

Subgenul *Megalodorcadion* este reprezentat de 2 specimene din aceeași specie, *D. glabrofasciatum*, aceste două probe sunt atât în arborii mitocondriali cât și în arborii nucleari în același clad cu o specie din subgenul *Cribridorcadion* – *D. infernale*. Poziția acestui clad în interiorul arborilor filogenetici mitocondriali diferă semnificativ față de cei nucleari.

Subgenul *Maculatodorcadion* este reprezentat în analiză de specia tip, *D. quattrimaculatum* și 2 secvențe importate de *D. tristis* (de la Soydabaş-Ayoub & Uçkan, 2024). În arborii filogenetici mitocondriali (BI și ML) și în arborele nuclear ML - Figura 3.26. (din teză) (dar cu suport mic), cei doi taxoni formează un clad soră cu *D. gashtarovi*, iar în arborele nuclear BI *D. tristis* nu mai este în același clad cu taxonii amintiți anterior. O posibilă explicație pentru această neconcordanță este faptul că *D. tristis* are incluse în analiză doar 2 secvențe, *COI* mitocondrial și *28S* nuclear, iar *D. quattrimaculatum* și *D. gashtarovi* au

câte 8 secvențe fiecare (*COI*, *Cytb*, *Wg*, *H3*, *Ef-1 α* , *18S*, *28S* și *ITS2*). Secvența *28S* este foarte puțin informativă.

Două grupuri de specii, grupul *ljubetense* și grupul *minutum*, au poziție foarte diferită în filogenia mitocondrială și cea nucleară. În arborele mitocondrial grupul *minutum* este cel mai bazal grup din genul *Dorcadion*, el fiind derivat și soră cu grupul *ljubetense* în arborele nuclear (PP = 0,9).

Filogenia tribului Dorcadionini: date concatenate

Arborii filogenetici realizați plecând de la aliniamentul concatenat nuclear plus mitocondrial au topologie foarte similară indiferent de metoda utilizată: ML cu RAXML-NG (Fig. 3.27) sau IQTree (Fig. 3.28 din teză) pe de o parte și BI cu MrBayes (Fig. 3.29. din teză), pe de altă parte. În continuare, vom discuta arborele ML obținut cu RAXML-NG menționând diferențele acolo unde este cazul.

Reprezentanții tribului Dorcadionini sunt repartizați în două claduri, unul ce conține doar genul *Eodorcadion* ce este soră cu *Lamia* (genul tip al tribului Lamiini) și un alt clad ce grupează restul genurilor: *Dorcadion*, *Iberodorcadion*, *Neodorcadion* și *Politodorcadion*. Acest al doilea clad conține și genurile *Morimus* și *Herophila* (ambele clasificate în Lamiini) în poziție bazală. Suportul statistic pentru fiecare din cele două claduri este de BP = 99%, SH-aLRT = 100, UFBoot = 100, PP = 1 pentru primul și BP = 93%, SH-aLRT = 99, UFBoot = 99, PP = 1 pentru cel de al doilea.

În cadrul genului *Eodorcadion* gruparea bazală este formată din specia tip a subgenului *Humerodorcadion* (*E. humerale*) și un reprezentant din subgenul nominotipic (*E. virgatum*). Restul speciilor incluse în analiză nu formează nici ele claduri ce corespund exact cu cele trei subgenuri ale genului: *Eodorcadion s.str.* este monofiletic (exceptând lipsa lui *E. virgatum* menționat anterior), dar subgenul nominotipic face ca subgenul *Ornatodorcadion* să fie parafiletic.

Genurile *Iberodorcadion* și *Neodorcadion* sunt reciproc monofiletice și sunt claduri soră. Genul *Dorcadion* este parafiletic întrucât genul *Politodorcadion* este inclus (eng. nested) în el. Cu toate acestea reprezentanții acestor 4 genuri formează un singur clad. Acesta este aproape echivalent cu tribul Dorcadionini, lipsindu-i doar genul *Eodorcadion*. În această configurație redusă, Dorcadionini aproape că nu are suport pe nici un arbore (BP = 35, SH-aLRT = 42, UFBoot = 67, PP = 0,57) însă cladul ce include și grupul lor soră (*Morimus* + *Herophila*) are suport foarte mare (BP = 93, SH-aLRT = 99, UFBoot = 99, PP = 1). Suportul

statistic redus spre inexistent derivă din structura arborilor, în care ramul ce duce la trib este foarte scurt, indicând o radiație adaptativă foarte rapidă.

Structura subgenerică a genului *Dorcadion* este și ea reflectată parțial în topologia arborelui filogenetic. *Maculatodorcadion* și *Carinatodorcadion* sunt singurele subgenuri monofiletice. Pentru primul, suportul este mare (BP = 99, SH-aLRT = 96, UFBoot = 100, PP = 1), pentru al doilea este ceva mai mic din cauza includerii ca specie bazală a lui *D. aethiops*; cu tot cu această specie, BP = 55, SH-aLRT = 98, UFBoot = 81, PP = 1, iar restul speciilor formează o grupare cu BP = 99, SH-aLRT = 100, UFBoot = 100, PP = 1. Pentru subgenul *Megalodorcadion* am avut o singură specie inclusă (*D. glabrofasciatum*) care s-a dovedit a fi aproape identică din punct de vedere genetic pentru cele 4 gene studiate cu *D. infernale* din subgenul *Cribridorcadion*. Subgenurile *Dorcadion s. str.* și *Acutodorcadion* sunt polifiletic și respectiv parafiletic, iar împreună cu celelalte trei subgenuri menționate anterior fac ca subgenul *Cribridorcadion* care este și cel mai mare subgen, să fie parafiletic.

Genul *Politodorcadion*, descris inițial ca subgen, s-a dovedit a fi foarte apropiat de *Dorcadion s. str.* O specie este chiar inclusă în *Dorcadion s. str.* însă ea este reprezentată de o singură genă și confidența este mică.

Cei 3 taxoni incluși în analiză și care erau parte din subgenul *Dzhungarodorcadion* acum considerat sinonim cu *Cribridorcadion*, formează o grupare parafiletică poziționată bazal la cladul format din grupurile din Asia: *Acutodorcadion*, *Dorcadion s. str.* și *Politodorcadion*, făcând astfel tranziția dintre *Cribridorcadion* și acestea.

O grupare monofiletică ce poate fi observată pe arbori este formată din specii apropiate morfologic de *Dorcadion arenarium*, *D. scopolii*, *D. pusillum*. Acest grup nu a fost niciodată delimitat ca subgen, dar întrucât include și pe *D. arenarium* ce este specia tip a subgenului *Autodorcadion* ar putea fi denumită așa. Gruparea are suport mare, cu BP = 100, SH-aLRT = 100, UFBoot = 100, PP = 1.

3.3.2. Discuții

Triburile Dorcadionini, Lamiini și Monochamini nu sunt monofiletice

Din cele trei triburi analizate din punct de vedere filogenetic, numai Dorcadionini sunt monofiletici (daca se exclude genul *Eodorcadion*). În arborii din figurile 3.22. și 3.23. (din teză), în Dorcadionini sunt incluse și genurile *Morimus* și *Herophila*. Acest lucru se întâmplă probabil pentru că Dorcadionini au un eșantionaj redus iar grupurile externe (outgrupuri) au mulți taxoni, dar cu puține gene, fiind preluați predominant din GenBank. În toate filogeniile

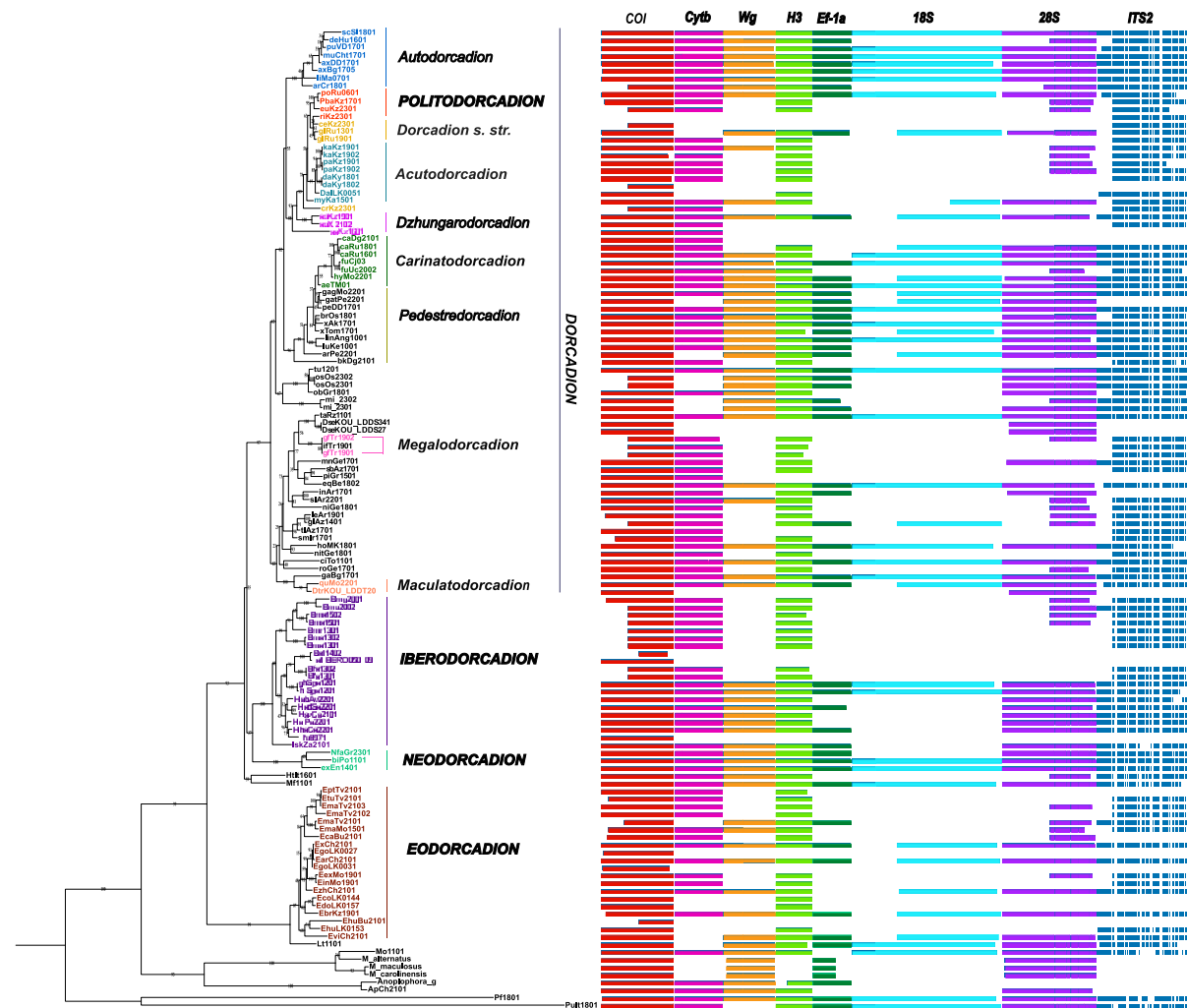


Figura 3.27. Arbore filogenetic multilocus ML (RAxML), cu setul de date complet pentru Dorcadionini și cu structura taxonomică subgenerică indicată (sunt notate inclusiv subgenuri considerate sinonime) și aliniamentul multilocus

în care eșantionajul pe Dorcadionini este mare și se utilizează toate genele, *Herophila* și *Morimus* (Lamiini) nu mai fac parte din trib, ci sunt grupul soră al Dorcadionini.

Lamiini în sens restrâns (fără Dorcadionini și Monochamini) sunt o grupare parafiletică, cu *Herophila* și *Morimus* mai apropiați filogenetic de Dorcadionini decât de alte genuri din trib. Așa cum am arătat și în ultima parte a subcapitolului de discuții, *Eodorcadion* trebuie să facă și el parte din acest trib, contrar unor clasificări actuale (Danilevsky & Lazarev, 2025).

Monochamini este de asemenea, o grupare parafiletică chiar dacă în interiorul lui există un mare grup monofiletic care include genul tip *Monochamus*, *Anoplophora* și genurile înrudite cu acestea.

Propunerea lui de Santana Souza (2020) de a considera cele trei triburi ca sinonime și de a le denumi Lamiini (numele cel mai vechi) ar trebui acceptată din punct de vedere al sistematicii filogenetice.

Pentru taxonomiștii care acceptă și taxoni parafiletici cele trei triburi pot fi păstrate pe bază de caractere plesiomorfe cu condiția ca *Eodorcadion* să fie transferat în Lamiini sensul restrâns. Monochamiini sunt grupul bazal de specii xilofage care are capacitate de zbor, Lamiini sunt predominant tot xilofage dar și-au redus aripile și au pierdut capacitatea de zbor, iar Dorcadionini la fel ca Lamiini nu zboară (aripile posterioare fiind și mai reduse) dar în plus s-au adaptat la a se hrăni atât ca larvă cât și ca adult cu graminee.

Filogenia tribului Dorcadionini: genomul mitocondrial și nuclear sunt concordante

Compararea filogeniilor nucleare și mitocondrială relevă o serie de cazuri potențiale de introgresie mitocondrială. Dacă cazurile discutate în capitolele 3.1. și 3.2. (*Dorcadion pusillum*, *Dorcadion axillare*, *Dorcadion aethiops*, *Dorcadion lugubre*) pot fi confirmate întrucât au fost analizate numeroase specimene, cele observate în această analiză indică potențiale viitoare direcții de cercetare, întrucât este vorba despre indivizi singulari.

Totuși, în cazul speciilor *D. pantherinum* (paKz1901 și 1902) și *D. kapchagaicum* (kaKz1901 și 1902) care au secvențe mitocondriale din același haplogrup, dar care sunt distincte morfologic pe baza dezvoltării și sculpturii carenelor humerală și dorsală și a desenului elitral (Plavilstshikov, 1958; Danilevsky 1995, 1996) secvențele nucleare confirmă că sunt specii distincte. Pentru aceste două specii au fost secvențiați câte doi indivizi, extrași la date diferite, pentru a exclude posibilitatea unei contaminări în laborator.

Dorcadion koenigi (bkDg2101) chiar dacă face parte din subgenul *Cribridorcadion* când a fost descris, a fost comparat cu patru specii din subgenul *Carinatodorcadion*

(Jakovlev, 1897). În filogenia mitocondrială, el apare ca specie bazală la cladul ce grupează speciile apropiate de *D. pedestre* și subgenul *Carinatodorcadion* ceea ce este concordant cu morfologia speciei. Pe arborele nuclear însă poziția sa se schimbă radical, fiind apropiat de subgenul *Maculatodorcadion* dar cu suport aproape inexistent (PP = 0,37), setul de date nuclear fiind mai puțin informativ datorită numărului mic de gene.

În ansamblul lor, cei doi arbori sunt suficient de similari pentru a putea concatena secvențele mitocondriale și cele nucleare, iar cazurile de transfer interspecific de mitocondrii au loc între specii apropiate filogenetic pentru a nu periclita imaginea de ansamblu a evoluției grupului.

Clasificarea generică și subgenerică a tribului Dorcadionini pe baza filogeniei multilocus

O concluzie inevitabilă, indiferent de școala de gândire taxonomică (una care acceptă parafilia sau una care acceptă doar grupuri monofiletice ca taxoni) este că genul *Eodorcadion* trebuie exclus din tribul Dorcadionini. Acest trib este monofiletic în analizele cu o eșantionare mare din trib, dar nu include și genul *Eodorcadion*. Acesta este grup soră cu genul *Lamia* (gen tip al tribului și al subfamiliei). Întrucât *Lamia* nu poate fi inclusă în Dorcadionini, tribul Lamiini având prioritate conform Codului Internațional de Nomenclatură Zoologică, singura soluție este transferarea genului *Eodorcadion* în Lamiini. Dorcadionini fără *Eodorcadion* este monofiletic și nu polifiletic, chiar dacă face ca Lamiini să fie parafiletic.

Prin excluderea genului *Eodorcadion*, distribuția tribului Dorcadionini trebuie restrânsă, arealul grupului ajungând de fapt cu limita estică în estul Kazahstanului și regiunea Dzsungaria din China (nordul regiunii Xinjiang). Practic Mongolia și Korea sunt excluse complet întrucât în aceste state este prezent doar genul *Eodorcadion* care nu face parte din trib. Singura excepție este *Politodorcadion lativittis* (Kraatz) descoperit recent în SV Mongoliei, la aproximativ 15 km de granița cu China (Danilevsky & Lazarev 2025).

Politodorcadion este inclus în *Dorcadion s.str.* din care și făceau parte toate speciile până în 1996, când a fost descris ca subgen distinct (Danilevsky 1996). Datorită poziției sale filogenetice, el poate fi considerat cel mult un subgen.

Clasificarea subgenurilor de *Dorcadion* ca genuri separate așa cum este propus uneori (Breuning & Villiers 1967; Sama, 2002) este exclusă. Recent, Özdikmen & Kaya (2015) vin din nou cu propunerea (dar doar propunerea) de a ridica la rang de gen aproape toate subgenurile. O fac însă doar pentru subgenul *Megalodorcadion* pe care îl ridică la rang

de gen ca să poată descrie în interiorul lui două noi subgenuri (*Fusodorcadion* și *Anatolodorcadion*).

Toate aceste propuneri nu sunt justificate din punct de vedere filogenetic întrucât toate subgenurile sunt incluse în interiorul celui mai mare subgen, *Cribridorcadion*, pe care îl fac parafiletic. În plus, unele subgenuri nu sunt nici măcar monofiletice. Astfel, *Acutodorcadion* este parafiletic pentru că *Dorcadion* (*A.*) *nikolaevi* Danilevsky este bazal pentru un clad ce include atât subgenul *Acutodorcadion* cât și subgenul nominotipic și genul *Politodorcadion*. De fapt, când descrie această specie, Danilevsky (1995) afirmă că nu are afinități clare cu nici o specie din gen. Subgenul *Dorcadion* s.str. este polifiletic, cu *Dorcadion* (*D.*) *crassipes* Ballion fiind din nou o specie bazală față de toate celelalte și neînrudită direct cu ceilalți membri ai subgenului.

Iberodorcadion trebuie să fie tratat ca gen distinct de genul *Dorcadion*, chiar dacă a fost descris ca subgen. Începând cu Vives (1976), el a fost considerat gen distinct, exceptând propunerea lui Tomé (2002) care sugerează retrogradarea la subgen și Sama (2002) care propune sinonimizarea cu *Dorcadion*, dar nu o face. Această propunere nu este justificată din punct de vedere filogenetic întrucât *Iberodorcadion* pare a fi mai apropiat de genul *Neodorcadion* cu care este grup soră. De fapt, o parte din speciile de *Iberodorcadion* au membrana epistomală vizibilă, caracteristică a genului *Neodorcadion* (Sama 2002) și de fapt a tuturor taxonilor de Lamiini și Monochamini, acesta fiind un caracter plesiomorf. Membrana este complet acoperită doar la genul *Dorcadion*, care este cel mai derivat grup din punct de vedere filogenetic.

În ce privește structura subgenerică a genului, aici Tomé (2002) are dreptate când propune sinonimia celor trei subgenuri întrucât acestea nu sunt monofiletice: subgenul *Baeticodorcadion* este polifiletic fiind format din două grupuri cu origine diferită, unul cu majoritatea speciilor analizate, celălalt cu *I. ferdinandi* și *I. atlantis*. *Iberodorcadion* (*B.*) *ferdinandi* este arătat de Tomé (2002) ca având caractere morfologice din toate cele trei subgenuri ceea ce ar explica poziția sa filogenetică. *Iberodorcadion* (*B.*) *atlantis* este plasat și el lângă această specie, dar doar pe baza secvențelor COI (alte gene nu au fost amplificate). *Iberodorcadion* (*B.*) *ferdinandi* este inclus în subgenul *Hispanodorcadion* atât pe arborele mitocondrial cât și pe cel nuclear (atunci când analizele au fost făcute separat, în subcapitolul anterior); pe gene nucleare este bazal la subgenul *Hispanodorcadion*, iar pe cele nucleare este soră cu *I. (H.) hispanicum* (specia tip a subgenului).

CONCLUZII

- Dorcadionini sunt un bun model pentru testarea succesului codurilor de bare ADN în identificarea și delimitarea speciilor pe baze moleculare. Aceasta se datorează numărului mare de specii și subspecii, care sunt cel mai probabil rezultatul speciației alopatrice (aceste specii sunt incapabile de zbor), dar și a evoluției reticulate. Având mobilitate redusă, structurarea filogeografică intraspecifică poate fi semnificativă, adăugând la divergența generată de speciație și pe cea generată de izolarea geografică. Secvențele publicate deja în GenBank în urma analizelor efectuate în cadrul tezei, reprezintă 307 din totalul de 835 de secvențe publice de Dorcadionini din GenBank și BOLD.
- La momentul publicării secvențelor de DNA barcoding (Dascălu, Caba & Fusu, 2022) acestea erau primele secvențe ce deveneau publice, cu excepția celor câtorva generate de proiectul German Barcoding of Life. Aceste secvențe acoperă toată fauna de Dorcadionini din România cu secvențe multiple per specie, cu excepția a două specii foarte rare la care am generat câte o singură secvență.
- Am generat adițional 659 de secvențe ce urmează să fie publicate, din care 112 sunt secvențe de *COI* – markerul standard pentru DNA barcoding.
- Am creat și testat un nou set de primeri specific pentru Dorcadionini ce generează un ”minibarcod”, compatibil cu cel standard, ce poate fi utilizat pentru specimene cu ADN-ul degradat.
- Am creat un set de primeri pentru a amplifica un fragment mai scurt de *ITS2* de Dorcadionini, cu ADN degradat – markerul *ITS2* fiind foarte informativ. Aceștia pot fi utilizați și atunci când extrasele de ADN sunt contaminate cu ADN de fungi (specimene din colecții).
- *Dorcadion axillare*, *D. murrayi* și *D. pusillum* reprezintă un caz interesant de hibridizare urmat de captură mitocondrială. Atât morfologia, cât și analiza genelor nucleare confirmă ca *D. axillare moldavicum*, *D. pusillum ochrolineatum* și *D. pusillum vasiliscus* sunt într-adevăr subspecii ale speciilor *D. axillare* și respectiv *D. pusillum* așa cum au fost descrise original și nu subspecii de *D. murrayi* de la care au preluat mitocondriile. Conform DNA barcoding aceste trei subspecii ar fi identificate ca *D. murrayi*.
- *Dorcadion aethiops* este un taxon hibridogen întrucât face parte din subgenul *Carinatodorcadion*, însă are ADN-ul mitocondrial mai apropiat de subgenul

Cribridorcadion decât de *D. (Carinatodorcadion) fulvum*, ce face parte din același subgen. Morfologia sa este intermediară între cele două subgenuri. Încă nu putem determina cu exactitate taxonul de la care a capturat mitocondrii *D. aethiops*, însă putem confirma că acest taxon este din aceeași linie mitocondrială ca și *D. lugubre minkovae* (taxon din SE Bulgariei).

- *Dorcadion lugubre lugubre* reprezintă și el un caz de discordanță între morfologie și datele moleculare și cel mai probabil este un taxon hibridogen.
- Am demonstrat folosind tehnici moleculare că un individ cu caractere atipice și intermediare este un hibrid. Conform haplotipului mitocondrial și analizei alelelor genelor nucleare investigate, individul hibrid a rezultat din împerecherea unei femele de *D. lineatocolle* cu un mascul de *D. lugubre minkovae*.
- DNA barcoding poate fi folosit în Dorcadionini doar în combinație cu morfologia, arealografia și mai mulți markeri nucleari, din cauza cazurilor frecvente de hibridizare și captură mitocondrială.
- Tribul Monochamini este o grupare parafiletică chiar dacă în interiorul lui există un mare grup monofiletic care include genul tip *Monochamus*, genul *Anoplophora* și genurile înrudite cu acestea. Tribul Lamiini în sens restrâns este și el o grupare parafiletică, întrucât Dorcadionini derivă din acest grup. Genurile *Morimus* și *Herophila* sunt mult mai apropiate de Dorcadionini decât de *Lamia* (genul tip al tribului Lamiini).
- Tribul Dorcadionini este monofiletic (daca se exclude genul *Eodorcadion*).
- Genul *Eodorcadion* ar trebui transferat în tribul Lamiini datorită poziției sale în toate filogeniile reconstruite în cadrul acestei teze. Aceasta este singura opțiune pentru taxonomiștii care acceptă și utilizează grupări parafiletice. Pentru o clasificare bazată doar pe grupări monofiletice, Monochamini și Dorcadionini sunt sinonime cu Lamiini.
- Distribuția tribului Dorcadionini trebuie restrânsă, grupul având de fapt limita estică în estul Kazahstanului și regiunea Dzsungaria din China (nordul regiunii Xinjiang). Practic Mongolia și Korea sunt excluse complet întrucât în aceste state este prezent doar genul *Eodorcadion* care nu face parte din trib.
- *Dorcadion (Maculatodorcadion)* și *Dorcadion (Carinatodorcadion)* sunt singurele subgenuri monofiletice. Pentru *Dorcadion (Megalodorcadion)* monofilia nu a putut fi testată, întrucât a fost inclusă în analize o singură specie.

- Subgenurile *Dorcadion s. str.* și *Acutodorcadion* sunt polifiletic și respectiv parafiletic, iar împreună cu subgenurile *Megalodorcadion*, *Maculatodorcadion* și *Carinatodorcadion* fac ca subgenul *Cribridorcadion* care este și cel mai mare subgen, să fie parafiletic.
- *Politodorcadion* este inclus în *Dorcadion s.str.* din care și făceau parte toate speciile până în 1996, când a fost descris ca subgen distinct (Danilevsky 1996). Datorită poziției sale filogenetice el poate fi considerat cel mult un subgen (dacă se acceptă parafilia).
- *Iberodorcadion* trebuie să fie tratat ca gen distinct de genul *Dorcadion*. Propunerile de a clasifica *Iberodorcadion* ca subgen nu sunt justificate din punct de vedere filogenetic, întrucât *Iberodorcadion* pare a fi mai apropiat de genul *Neodorcadion* cu care este grup soră.

BIBLIOGRAFIE

1. Ashman, L. G., Shin, S., Zwick, A., Ślipiński, A., & McKenna, D. D. (2022). The first phylogeny of Australasian Lamiinae longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae) reveals poor tribal classification and a complex biogeographic history. *Systematic Entomology*, 47(1), 213-230.
2. Baur, B., Coray, A., Lenzin, H., & Schmeta, D. (2020). Factors contributing to the decline of an endangered flightless longhorn beetle: A 20-year study. *Insect Conservation and Diversity*, 13(2), 175-186.
3. Baur, B., Coray, A., Minoretti, N., & Zschokke, S. (2005). Dispersal of the endangered flightless beetle *Dorcadion fuliginator* (Coleoptera: Cerambycidae) in spatially realistic landscapes. *Biological Conservation*, 124, 49-61.
4. Bianchini, G., & Sánchez-Baracaldo, P. (2024). TreeViewer: Flexible, modular software to visualise and manipulate phylogenetic trees. *Ecology and Evolution*, 14(2), e10873.
5. Bonfield, J. K., Smith, K. F., & Staden, R. (1995). A new DNA sequence assembly program. *Nucleic Acids Research*, 24, 4992-4999.
6. Bonnet, T., Leblois, R., Rousset, F., & Crochet, P. A. (2017). A reassessment of explanations for discordant introgressions of mitochondrial and nuclear genomes. *Evolution*, 71(9), 2140-2158.
7. Borchsenius, F. (2009). *FastGap, version 1.2*. Department of Biosciences, Aarhus University. http://www.aubot.dk/FastGap_home.Htm
8. Bouchard, P., Smith, A. B., Douglas, H., Gimmel, M. L., Brunke, A. J., & Kanda, K. (2017). Biodiversity of coleoptera. *Insect biodiversity: science and society*, 337-417.
9. Breuning, S. (1943a). Nouveaux cerambycides palearctiques (1re note). *Miscellanea Entomologica*, 40, 89-104.
10. Breuning, S. (1943b). Beitrag zur Wertung der Geschlechtorgane für die Systematik. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 39, 523-526.
11. Breuning, S. (1947) Nouveaux Cérambycides paléarctiques (4e note). *Miscellanea Entomologica* 43, [1946] 141-147.
12. Breuning, S. (1948). Notes concernant la repartition géographique et les tendances de spécialisations chez les Dorcadionini (Col. Cerambycidae). *EOS*, 24 (4).
13. Breuning, S. (1962). Revision der Dorcadionini (Coleoptera, Cerambycidae). *Entomologische Abhandlungen und Berichte aus dem Staatlichen Museum für Tierkunde in Dresden*, 27, 1-665.
14. Breuning, S., & Villiers, A. (1967). Cérambycides de Turquie (2. note). *L'entomologiste*, 23(3), 59-63.
15. Brower, A. V. Z. (1994). Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 6491-6495.
16. Caba, F. G., & Dascălu, M. M. (2024). Dissecting natural hybridisation in longhorned beetles through an integrative approach: Further proof of reticulate

- evolution in Dorcadionini (Cerambycidae, Lamiinae). *Zoologica Scripta*, 53(5), 665-687.
17. Chan, W. Y., Hoffmann, A. A., & van Oppen, M. J. (2019). Hybridisation as a conservation management tool. *Conservation Letters*, 12(5), e12652.
 18. Clement, M., Posada, D. C. K. A., & Crandall, K. A. (2000). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657-1659.
 19. Cruaud, A., Nidelet, S., Arnal, P., Weber, A., Fusu, L., Gumovsky, A., Huber, J., Polaszek, A., & Rasplus, J. Y. (2019). Optimized DNA extraction and library preparation for minute arthropods: Application to target enrichment in chalcid wasps used for biocontrol. *Molecular Ecology Resources*, 19, 702-710.
 20. Danilevsky, M. L. (1993). Some preliminary results of the type-material study of the Cerambycidae (Coleoptera) collection of the National Museum of Natural History, Paris. *Russian Entomological Journal*, 2(1), 47-50.
 21. Danilevsky, M. L. (1995). New *Dorcadion* Dalman, 1817 from Kazakhstan (Coleoptera, Cerambycidae). *Lambillionea*, 95(3), 420-428.
 22. Danilevsky, M. L. (1996). New taxa of the genus *Dorcadion* Dalman from Asia (Coleoptera, Cerambycidae). *Lambillionea*, 96(2), 407-420.
 23. Danilevsky, M. L. (1998). A review of subspecific configuration of *Dorcadion* (*Carinatodorcadion*) *carinatum* (Pallas, 1771) with a description of new subspecies (Coleoptera: Cerambycidae). *Acta ent. Slovenica*, 6, 135-142.
 24. Danilevsky, M. L. (2001). *Review of subspecific structure of Dorcadion (s. str) glycyrrhizae* (Pallas, 1771) (Coleoptera, Cerambycidae). *Les cahiers Magellanes*, 5: 1-27.
 25. Danilevsky, M. L. (2002). Subspecific structure of *Dorcadion* (*Dzhungarodorcadion*) *semenovi* Ganglbauer, 1884 (Coleoptera, Cerambycidae). - *Les cahiers Magellanes*, 10 (2001): 1-18.
 26. Danilevsky, M. L. (2007). *Revision of the Genus Eodorcadion Breuning, 1947* (Coleoptera, Cerambycidae). *Magellanes. Collection systematique*, vol. 16. Andresy (France).
 27. Danilevsky, M. L. (2010) Tribe Dorcadionini. In: Löbl, I. & Smetana, A. (Eds.), *Catalogue of Palaearctic Coleoptera*. Vol. 6. Chrysomeloidea. Apollo Books, Stenstrup, pp. 241–264.
 28. Danilevsky, M. L. (2014). Two new subspecies of *Dorcadion aethiops* (Scopoli, 1763) from Bulgaria (Coleoptera, Cerambycidae). *Human. Space. Int. Almanac*, 3, 251-254.
 29. Danilevsky, M. L. (2020). (ed). *Catalogue of Palaearctic Coleoptera*, vol. 6 (1), Chrysomeloidea I (Vesperidae, Disteniidae, Cerambycidae). Revised and updated edition. Leiden / Boston: Brill, i-xxii, 1-712.
 30. Danilevsky, M. L. (2021). A new species of the genus *Dorcadion* Dalman, 1917 (Coleoptera, Cerambycidae) from Xinjiang, China. *Гуманитарное пространство*, 10(8), 1063-1073.

31. Danilevsky, M. L. (author) & Lazarev M. A. (software) 2025. Catalogue of Palaearctic Chrysomeloidea (Vesperidae, Disteniidae, Cerambycidae). Version. 19.02.2025. - <http://cerambycidae.net>. Accessed 01.03.2025
32. Danilevsky, M. L., & Kasatkin, D. G. (2007). Further investigation of Dorcadionini (Coleoptera: Cerambycidae) endophallus with a revision of taxonomical position of the genus *Trichodorcadion* Breuning, 1942. *Russian Entomological Journal*, 15(4) [2006], 401-407.
33. Danilevsky, M. L., & Murzin, S. V. (2009). A revue of *Dorcadion* Dalman, 1817 species of “laeve-group”. Part 2 (Coleoptera, Cerambycidae, Lamiinae). *Les cahiers Magellanes*, 93, 1-22.
34. Danilevsky, M. L., Kasatkin, D. G., & Rubenyan, A. A. (2005). Revision of the taxonomic structure of the tribe Dorcadionini (Coleoptera: Cerambycidae) on the base of endophallic morphology. *Russian Entomological Journal*, 13 [2004], 127-149.
35. Dascălu, M. M. (2018). The subspecific structure of *Dorcadion* (*Cribridorcadion*) *pusillum* Kuster (Coleoptera: Cerambycidae) with description of two new subspecies from Romania. *Zootaxa*, 4442(1), 43-62.
36. Dascălu, M. M., & Fusu, L. (2012). *Dorcadion axillare* Kuster, 1847 (Coleoptera, Cerambycidae): Distribution, morphometrics, karyotype and description of a new subspecies from Romania. *Zootaxa*, 3322, 35-48.
37. Dascălu, M. M., Caba, F. G., & Fusu, L. (2022). DNA barcoding in Dorcadionini (Coleoptera, Cerambycidae) uncovers mitochondrial-morphological discordance and the hybridogenic origin of several subspecies. *Organisms Diversity & Evolution*, 1-25.
38. de Santana Souza, D., Marinoni, L., Monné, M. L., & Gómez-Zurita, J. (2020). Molecular phylogenetic assessment of the tribal classification of Lamiinae (Coleoptera: Cerambycidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 145, 106736
39. Dellicour, S., & Flot, J. F. (2018). The hitchhiker's guide to single-locus species delimitation. *Molecular Ecology Resources*, 18(6), 1234-1246.
40. Dmitriev, D. A., & Rakitov R. A. (2008). Decoding of superimposed traces produced by direct sequencing of heterozygous indels. *PLoS Computational Biology*, 4(7), e1000113.
41. Ezard, T., Fujisawa, T., & Barraclough, T. (2014). SPLITS: SPecies' LLimits by Threshold Statistics. R package version 1.0–19/r51. <https://R-Forge.R-project.org/projects/splits/>
42. Farrell, B. D. (1998). " Inordinate Fondness" explained: why are there So many beetles?. *Science*, 281(5376), 555-559.
43. Flot, J. F. (2015). Species delimitation's coming of age. *Systematic Biology*, 64(6), 897-899.
44. Flot, J. F., Couloux, A., & Tillier, S. (2010). Haplowebs as a graphical tool for delimiting species: a revival of Doyle's " field for recombination" approach and its application to the coral genus *Pocillopora* in Clipperton. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 1-14.

45. 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(5), 294-299.
46. Fontaneto, D., Herniou, E. A., Boschetti, C., Caprioli, M., Melone, G., Ricci, C., & Barraclough, T. G. (2007). Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *PLoS Biology*, 5(4), e87.
47. Funk, D. J., & Omland, K. E. (2003). Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology Evolution & Systematics*, 34, 397-423.
48. Fusu, L., & Ribes, A. (2017). Description of the first Palaearctic species of *Tineobius* Ashmead with DNA data, a checklist of world species, and nomenclatural changes in Eupelmidae (Hymenoptera, Chalcidoidea). *European Journal of Taxonomy*, 263, 1-19.
49. Giannoulis, T., Dutrillaux, A., Sarri, C., Mamuris, Z., & Dutrillaux, B. (2020). Phylogenetic relationships between genera *Dorcadion*, *Lamia*, *Morimus*, *Herophila* and some other Lamiinae (Coleoptera: Cerambycidae) based on chromosome and CO1 gene sequence comparison. *Bulletin of Entomological Research*, 110(3), 321-327.
50. Gorring, P. S., & Farrell, B. D. (2023). Evaluating species boundaries using coalescent delimitation in pine-killing *Monochamus* (Coleoptera: Cerambycidae) sawyer beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 184, 107777.
51. Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hebert, P. D., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), 167-172.
52. Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
53. Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96-S99.
54. Hendrich, L., Moriniere, J., Haszprunar, G., Hebert, P. D. N., Hausmann, A., Kohler, F., & Balke, M. (2015). A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles with a focus on Germany: Adding more than 3500 identified species to BOLD. *Molecular Ecology Resources*, 15, 795-818.
55. Hernández, J. M. (2000). Estudio multivariante de la genitalia masculina y femenina en seis especies de *Iberodorcadion* Breuning, 1943 (Coleoptera, Cerambycidae, Lamiinae) de la Comunidad de Madrid (España) y propuesta de nuevas sinonimias para el grupo. *Boletín Asociación Española de Entomología*, 24(1-2), 97-129.
56. Ilić, N., & Ćurčić, S. (2015). A checklist of longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae) of Serbia. *Zootaxa*, 4026(1), 1-97.

57. Jakovlev, B. E. (1897). Un nouveau *Dorcadion* du Caucase. *Horae Soc. Entomol. Ross.*, 31(1–2), 245–247.
58. Karpiński, L., Gorrington, P., & Cognato, A. I. (2023). DNA vs. morphology in delineating species boundaries of endemic Mongolian *Eodorcadion* taxa (Coleoptera: Cerambycidae). *Diversity*, 15(5), 662.
59. Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780.
60. Kirschner, P., Záveská, E., Gamisch, A., Hilpold, A., Trucchi, E., Paun, O., ... & Schoenswetter, P. (2020). Long-term isolation of European steppe outposts boosts the biome's conservation value. *Nature communications*, 11(1), 1968.
61. Kopecký, D., Martín, A., & Smýkal, P. (2022). Interspecific hybridisation and plant breeding: From historical retrospective through work of Mendel to current crops. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 58(3), 113–126.
62. Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: A fast, scalable, and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35(21), 4453–4455.
63. 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(6), 1547–1549.
64. Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2016). PartitionFinder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 34(3), 772–773.
65. Lazarev, M. A. (2023). The subspecies taxonomy of *Dorcadion* (*Cribridorcadion*) *lugubre* Kraatz, 1873 and *D. (C.) etruscum* (Rossi, 1790) (Coleoptera, Cerambycidae), *Гуманитарное пространство*, 12(4), 427–448.
66. Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116.
67. Li, K., Yu, S. W., Hu, H., Feng, Y. F., Storey, K. B., Ma, Y., Zhang, J.Y. & Yu, D. N. (2024). The phylogenetic relationship of Lamiinae (Coleoptera: Cerambycidae) using mitochondrial genomes. *Genes*, 15(1), 13.
68. Maddison, W. P. & Maddison, D.R. (2021). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.70 <http://www.mesquiteproject.org>
69. Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(5), 229–237.
70. Marshall, D. C., Hill, K. B. R., Moulds, M., Vanderpool, D., Cooley, J. R., Mohagan, A. B., & Simon, C. (2016). Inflation of molecular clock rates and dates: Molecular phylogenetics, biogeography, and diversification of a global cicada radiation from Australasia (Hemiptera: Cicadidae: Cicadettini). *Systematic Biology*, 65(1), 16–34.
71. Meier, R., Zhang, G., & Ali, F. (2008). The use of mean instead of smallest interspecific distances exaggerates the size of the barcoding gap and leads to misidentification. *Systematic Biology*, 57(5), 809–813.

72. Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular biology and evolution*, 37(5), 1530-1534.
73. Minkova, S. (1961). Untersuchungen über die Artenzusammensetzung der Tribus Dorcadionini (Col. Cerambycidae) in Bulgarien. *Bulletin de l'Institut de Zoologie et Musée, Sofia*, 10, 293-309.
74. Moritz, C., & Cicero, C. (2004). DNA barcoding: Promise and pitfalls. *PLoS Biology*, 2(10), e354.
75. Mutanen, M., Hausmann, A., Hebert, P. D., Landry, J. F., de Waard, J. R., & Huemer, P. (2012). Allopatry as a Gordian knot for taxonomists: Patterns of DNA barcode divergence in Arctic-Alpine Lepidoptera. *PLoS One*, 7(10), e47214.
76. Özdikmen, H., & Kaya, G. (2015). A proposed new arrangement of some Dorcadionini (Coleoptera: Cerambycidae). *Munis Entomology and Zoology*, 10, 1-10.
77. Paithankar, K. R., & Prasad, K. (1991). Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic acids research*, 19(6), 1346.
78. Pesarini, C., & Sabbadini, A. (2007). Ricerche sui Dorcadiini di Grecia. II. Le specie della Grecia centromeridionale e quelle del gruppo di *Dorcadion kozanii* (Coleoptera Cerambycidae). *Atti della Societa Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale in Milano*, 148(1), 35-83.
79. Pesarini, C., & Sabbadini, A. (2010). Ricerche sui Dorcadionini di Grecia IV. Le specie della Macedonia e della Tracia (Coleoptera Cerambycidae). *Atti della Societa Italiana di Scienze Naturali e del Museo Civico di Storia Naturale in Milano*, 151(2), 179-216.
80. Pesarini, C., & Sabbadini, A. (2013). Note su *Dorcadion turchi*, con descrizione di cinque nuove specie e tre nuove sottospecie (Coleoptera Cerambycidae). *Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Ferrara*, 14/15 [2011/2012], 51-64.
81. Plavilstshikov, N. N. (1958). *Timber Beetles. P.3. Subfamily Lamiinae. P.1. Fauna of the USSR, Beetles 23(1)*. Akademija Nauk SSSR, Moskow, Leningrad.
82. Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W.D & Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic biology*, 55(4), 595-609.
83. Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609-620.
84. Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. J. M. E. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular ecology*, 21(8), 1864-1877.
85. Rambaut, A. (2010). FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

86. Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901.
87. Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2013). A DNA-based registry for all animal species: The barcode index number (BIN) system. *PLoS One*, 8(7), e66213.
88. Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*, 7, 355-364.
89. Richmond, M. P. (2014). The role of aedeagus size and shape in failed mating interactions among recently diverged taxa in the *Drosophila mojavensis* species cluster. *BMC Evolutionary Biology*, 14, 255.
90. Ronquist, F., & Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
91. Rossa, R., & Goczał, J. (2021). Global diversity and distribution of longhorn beetles (Coleoptera: Cerambycidae). *The European Zoological Journal*, 88(1), 289-302.
92. Rougerie, R., Lopez-Vaamonde, C., Barnouin, T., Delnatte, J., Moulin, N., Noblecourt, T., Nusillard, B., Parmain, G., Soldati, F., & Bouget, C. (2015). PASSIFOR: A reference library of DNA barcodes for French saproxylic beetles (Insecta, Coleoptera). *Biodiversity Data Journal*, 3, e4078.
93. Rulik, B., Eberle, J., von der Mark, L., Thormann, J., Jung, M., Kohler, F., Apfel, W., Weigel, A., Kopetz, A., Kohler, J., & Fritzlar, F. (2017). Using taxonomic consistency with semi-automated data pre-processing for high quality DNA barcodes. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(12), 1878-1887.
94. Sama, G. (2002). *Atlas of the Cerambycidae of Europe and the Mediterranean Area* (Vol. 1). Kabourek.
95. Sama, G., Dascălu, M. M., & Pesarini, C. (2010). Description of *Dorcadion gashtarovi* n. sp. (Coleoptera, Cerambycidae) from Romania and Bulgaria with review of the closely related species. *North- Western Journal of Zoology*, 6(2), 286-293.
96. Simmons, M. P., & Ochoterena, H. (2000). Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic biology*, 49(2), 369-381.
97. Sloan, D. B., Havird, J. C., & Sharbrough, J. (2017). The on-again, offagain relationship between mitochondrial genomes and species boundaries. *Molecular Ecology*, 26(8), 2212-2236.
98. Smith, M. A., Fisher, B. L., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: The ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1825-1834.
99. Song, N., Wang, M., Zhai, Q., & Zhang, H. (2025). Insights into the phylogeny of longhorn beetles from phylogenomic data. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 203(1), zlae174.
100. Soydaş-Ayoub, H. K., & Uçkan, F. (2024). Time-scaled phylogenetic analysis of some extant Lamiinae (Coleoptera, Cerambycidae) species of East of Marmara Basin, Türkiye. *Biologia*, 79(2), 545-555.

101. Srivathsan, A., & Meier, R. (2012). On the inappropriate use of Kimura- 2-parameter (K2P) divergences in the DNA-barcoding literature. *Cladistics*, 28(2), 190-194.
102. Sukumaran, J., & Knowles, L. L. (2017). Multispecies coalescent delimits structure, not species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(7), 1607-1612.
103. Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G., & Cosson, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7(4), 453-464.
104. Toews, D. P. L., & Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, 21, 3907-3930.
105. Tomé, M. (2002). Revisión y propuesta de sinonimia de los subgéneros *Iberodorcadion*, *Hispanodorcadion* y *Baeticodorcadion* (Coleoptera, Cerambycidae). *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, (31), 77-81.
106. Tomé, M. (2004). Rehabilitación de *Dorcadion* (*Iberodorcadion*) *nudipenne* Escalera (Coleoptera, Cerambycidae). *Boletín de la S.E.A.*, 35, 247-249.
107. Tomé, M. (2012). Conexiones geológicas del *Dorcadion* (*Iberodorcadion*) *perezi* Graells, 1849 en la Sierra de Guadarrama (España). *Revista Gaditana de Entomología*, 3(1-2), 41-50.
108. Török, P., Ambarlı, D., Kamp, J., Wesche, K., & Dengler, J. (2016). Step (pe) up! Raising the profile of the Palearctic natural grasslands. *Biodiversity and Conservation*, 25, 2187-2195.
109. Vaidya, G., Lohman, D. J., & Meier, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27(2), 171-180.
110. Vives, E. (1976). Contribución al conocimiento de los *Iberodorcadion* Breuning (Col. Cerambycidae). *Miscel·lània Zoològica*, 3(5), 163-168.
111. Wang, Q. (Ed.). (2017). *Cerambycidae of the world: biology and pest management*. CRC press.
112. Willis, P. M. (2013). Why do animals hybridize? *Acta Ethologica*, 16(3), 127-134.
113. Wirtz, P. (1999). Mother species-father species: Unidirectional hybridization in animals with female choice. *Animal Behaviour*, 58(1), 1-12.
114. Wood, J. R. (2018). DNA barcoding of ancient parasites. *Parasitology*, 145(5), 646-655.
115. Xia, X. (2018). DAMBE7: New and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1550-1552.
116. Zagaykevich, I. K., & Puchkov, O. V. (2009). *Dorcadion equestre*. In I.A Akimov (Ed.), *Red book of Ukraine. The animal world*. (pp. 119). Global Consulting, Kiev.
117. Zamoroka, A. M. (2019a). A new subspecies of *Dorcadion fulvum* (Scopoli, 1763) (Coleoptera: Cerambycidae) from Western Ukraine. *Polish Journal of Entomology*, 88(4), 363-378.
118. Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.