

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

---



**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Charakteristika genetické struktury populací parazitoida mšic**  
***Lysiphlebus fabarum* použitím molekulárních markerů**

Doktorand: Ing. Kamila Štrymplová Šťastná  
Školitel : Prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.  
Studijní obor: Ochrana rostlin

---

**České Budějovice**  
**2009**

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma: **Charakteristika genetické struktury populací parazitoidea mšic *Lysiphlebus fabarum* použitím molekulárních markerů** vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a literárních pramenů v práci řádně citovaných.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce, a to v nezkrácené podobě fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 25. 2. 2009

.....  
Ing. Kamila Štrymplová Šťastná

### **Poděkování:**

Děkuji **Prof. Ing. Vladislavu Čurnovi, Ph.D.**, za pomoc a odborné vedení, které mi poskytoval po dobu mého doktorandského studia.

Děkuji **RNDr. Petru Starému, Ph.D., DrSc.**, za cenné rady a konzultace.

V neposlední řadě děkuji svému manželovi a rodině za podporu a trpělivost při sepisování této práce.

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE</b> .....	<b>8</b>
<b>3. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>9</b>
3.1. CHARAKTERISTIKA PARAZITOIDŮ MŠIC .....	9
3.1.1. Význam parazitoidů .....	9
3.1.2. Výskyt a šíření .....	10
3.1.3. Vyhledávání hostitele .....	10
3.1.3.1. Hostitelská preference .....	11
3.1.3.2. Preference hostitelských instarů .....	12
3.1.4. Způsoby rozmnožování .....	13
3.1.5. Reprodukce .....	14
3.1.6. Kladení vajíček .....	14
3.1.7. Larvální vývoj .....	15
3.1.8. Podčeleď Aphidiinae .....	16
3.2. DETEKCE BIOLOGICKÉ DIVERZITY GENETICKÝMI MARKERY .....	16
3.2.1. Biochemické a molekulární markery .....	16
3.2.2. Izolace DNA .....	17
3.2.3. Metoda PCR .....	18
3.2.3.1. Princip PCR metody .....	19
3.2.3.2. Složení reakční směsi .....	19
3.2.4. Metoda RAPD .....	19
3.2.4.1. Charakteristika RAPD primerů .....	20
3.2.4.2. Optimalizace RAPD metody .....	20
3.2.4.3. Výhody a nevýhody RAPD metody .....	21
3.2.4.4. Využití RAPD metody .....	21
3.2.5. Mikrosatelity .....	22
3.2.5.1. Struktura a vlastnosti mikrosatelitů .....	22
3.2.5.2. Mutační mechanismy .....	23
3.2.5.3. Získání sekvence mikrosatelitových primerů .....	24
3.2.5.4. Využití mikrosatelitů .....	24
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>25</b>
4.1. CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÝCH POPULACÍ .....	25
4.2. ANALÝZY DNA MARKERŮ .....	27
4.2.1. Izolace DNA .....	27
4.2.2. RAPD analýza .....	29
4.2.3. SSR analýza .....	30
4.3. STATISTICKÉ HODNOCENÍ DAT .....	31
4.3.1. Program DARwin .....	31
4.3.2. Program Structure .....	31
4.3.3. Hlavní koordinační analýza .....	31
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>32</b>
5.1. METODA IZOLACE DNA .....	32
5.2. METODA RAPD .....	32
5.3. METODA SSR .....	33
5.4. STANOVENÍ MEZIDRUHOVÉ VARIABILITY .....	35
5.5. STANOVENÍ VNITROPOPULAČNÍ VARIABILITY V ZÁVISLOSTI NA LOKALITĚ VÝSKYTU, DRUHU HOSTITELE A ROSTLINY .....	38
5.6. STANOVENÍ VNITROPOPULAČNÍ VARIABILITY V ZÁVISLOSTI NA PARAZITACI PŘIROZENÉHO HOSTITELSKÉHO DRUHU .....	44

5.7. STANOVENÍ VNITROPOPULAČNÍ VARIABILITY V ZÁVISLOSTI NA PARAZITACI NEPŘIROZENÉHO HOSTITELE .....	46
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>53</b>
6.1. ANALYZOVANÝ MATERIÁL .....	53
6.2. METODA IZOLACE DNA.....	54
6.3. RAPD A SSR METODA.....	54
6.3.1. RAPD metoda.....	55
6.3.2. SSR metoda.....	56
6.4. MEZIDRUHOVÁ VARIABILITA .....	56
6.5. VNITROPOPULAČNÍ VARIABILITA V ZÁVISLOSTI NA LOKALITĚ VÝSKYTU, DRUHU HOSTITELE A ROSTLINY .....	57
6.6. VNITROPOPULAČNÍ VARIABILITA V ZÁVISLOSTI NA PARAZITACI PŘIROZENÉHO HOSTITELSKÉHO DRUHU .....	58
6.7. VNITROPOPULAČNÍ VARIABILITA V ZÁVISLOSTI NA PARAZITACI NEPŘIROZENÉHO HOSTITELSKÉHO DRUHU .....	59
6.8. VNITROPOPULAČNÍ VARIABILITA POPULACÍ PARAZITUJÍCÍCH NA PŘIROZENÉM A NEPŘIROZENÉM HOSTITELI .....	59
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>61</b>
<b>8. SOUHRN / SUMMARY .....</b>	<b>62</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>63</b>

## Abstrakt/Abstract

Population genetics of host alternation in aphid parasitoids were studied on thelytokous populations of *Lysiphlebus fabarum*, which were presumed to manifest genetically stable patterns (possibly host-species dependent lineages). Model populations and isofemale populations centering the determination of the individual lineages on *Aphis fabae* were analysed using RAPD and SSR molecular methods. Host alternation utilized an unnatural host, *Diuraphis noxia* (Kurdj.) in no-choice laboratory trials yielded populations manifesting different respective characters. The results indicate the potential of RAPD markers to differentiate *L. fabarum*, *L. cardui* and *L. confusus*. The results (from the RAPD and SSR methods) tend on the role of host-alternation as a less selective net affecting respectively the parasitoid filial progeny on another host aphid species. The correct identification of species and strains of these parasitoids is necessary to implement, when using parasitoids in a biological control program, to undoubtedly identify species in the natural population in order to design strategies for monitoring releases in the environment.

# 1. Úvod

K významným škůdcům v zemědělství (v polních i skleníkových kulturách) a v lesnictví patří mšice. Rostliny poškozují zejména sáním rostlinných šťáv a častými následnými deformacemi. Z pohledu hospodaření je největším nebezpečím produkce lepkavých výkalů – medovice, která pokrývá listy v souvislém povlaku a znesnadňuje tak asimilaci i dýchání rostlin. Lepkavý povlak je také bránou pro sekundární houbové choroby. Mšice mohou být také vektory virových chorob.

Chemická ochrana rostlin proti mšicím je často účinná jen zpočátku aplikace, neboť mšice rychle získávají odolnost. Při dlouhodobém používání chemických postřiků dochází k navýšení výrobních nákladů, zvyšuje se obsah reziduí pesticidů v potravinách, snižuje se druhová rozmanitost organismů v přírodě. Spotřebu pesticidů lze snížit metodami biologické ochrany rostlin. Jsou záměrně využívány živé organismy – přirození nepřátelé škodlivých činitelů nebo antagonistické organismy (případně jejich metabolity), k potlačování populací škodlivých druhů omezováním jejich vývoje a šíření. K přirozeným nepřítelům mšic patří jedinci některých skupin blanokřídlého hmyzu (*Hymenoptera*), zejména podčeledi mšicomarů (*Aphidiinae*) z čeledi lumčíkovitých (*Braconidae*). Do této čeledi patří studovaný rod *Lysiphlebus*. Jedná se o endoparazitické vosičky, které náleží k běžným bioregulátorům mšic v ekosystémech a agroekosystémech. V České republice jsou některé druhy mšicomarů používány již řadu let jako bioagens v biologické ochraně skleníkových kultur, pokusně i v agroekosystémech.

Analýzy populačně biologických procesů vnitrodruhové a mezidruhové variability studovaného druhu *Lysiphlebus fabarum* (Marsh.) významně přispějí k vyjasnění vzájemných vztahů isospecifických populací pocházejících z různých hostitelů, oblastí. Výsledky analýz mohou být použity při vytváření efektivních konceptů opatření, pro použití studovaného druhu v programech biologické ochrany. Studie diverzity a fylogeneze u mnoha druhů hmyzu byly v počátcích odvozovány od různých fenotypových znaků, morfologických charakteristik či fyziologických a vývojových vlastností, čímž byla odhalena jen malá část variability. Teprve během posledních desetiletí bylo vyvinuto mnoho různých molekulárních markerů, které jsou používány při studiích populační

genetiky. K nejpoužívanějším patří chromosomální markery, allozymy, DNA fingerprinting, RAPD markery a mikrosatelity.

## 2. Cíle disertační práce

- 1) Stanovení optimální metody izolace DNA rodu *Lysiphlebus*
- 2) Optimalizace metody RAPD a SSR pro analýzy rodu *Lysiphlebus*
- 3) Stanovení mezidruhové variability u druhů *Lysiphlebus fabarum*, *Lysiphlebus cardui*, *Lysiphlebus confusus*
- 4) Stanovení variability partenogenetických populací druhu *Lysiphlebus fabarum*, odlišující se druhem hostitele, lokalitou výskytu a druhem rostliny
- 5) Stanovení variability partenogenetických populací druhu *Lysiphlebus fabarum* před a po parazitaci nepřírodního hostitele
- 6) Porovnání výsledků RAPD a SSR metod použitých pro populační studie druhu *Lysiphlebus fabarum*

## 3. Literární přehled

### 3.1. Charakteristika parazitoidů mšic

#### 3.1.1. Význam parazitoidů

V přírodních ekosystémech se vyskytuje řada rostlinných škůdců patřící do třídy hmyzu. Tito škůdci mají ve většině případech své bioregulátory, kteří se významně podílí na potlačování populací škůdců rostlin. Pokud v prostředí, kde žijí škůdci, chybí jejich bioregulátor, je splněna jedna ze základních podmínek kalamitního přemnožení škůdců. Současná úroveň poznání škůdců a jejich antagonistů na straně jedné a uchování kvalitního životního prostředí na straně druhé vytváří předpoklady pro široké a účinné uplatnění prostředků a metod biologické ochrany rostlin v praxi.

K nejvýznamnějším rostlinným škůdcům patří mšice. Je známo více než 4000 druhů mšic (Dixon, 1990). Mšice poškozují rostliny nejen sáním rostlinné šťávy, ale jejich sliny způsobují krnění rostlin, svinování a deformaci listů. Nebezpečné jsou především také jako přenašeči obávaných persistentních viróz. Při přemnožení mšic jsou rostliny potaženy silnou vrstvou lepivé medovice, která je ve větším množství pro rostlinu škodlivá, protože zacpává dýchací průduchy a vyživuje škodlivé saprofytické plísně (př. *Capnodium*).

Jedním z přirozených bioregulátorů mšic jsou parazitovi. Jejich činnost je jedním z důležitých faktorů přispívající k regulaci populací mšic (Starý, 1988). Cílem parazitoidů není úplné vyhubení populací mšic, některé kolonie jsou však silně redukovány (Starý, 1988). Nedochozí ani k zabránění jejich stěhování, i když část mšic může v době přeletu být již parazitoidem napadena (Tamaki *et al.*, 1970). Parazitovaná mšice neukončí příjem potravy bezprostředně po napadení (Starý, 1988), čímž se také nezabrání okamžitému přenosu virových chorob mšicemi (Starý, 1988). Přesto ochrana rostlin působením parazitoidů mšic má několik významných předností: nenese žádná rizika ohrožení na zdraví lidí, zvířat nebo samotných rostlin; nezatěžuje životní prostředí a má na rozdíl od chemických přípravků nulovou ochrannou lhůtu; po namnožení parazitoidů je kultura, s ohledem na klimatické podmínky, dlouhodobě (většinou až do konce vegetace) před škůdci chráněna. Z tohoto hlediska bývá biologická ochrana levnější než časté používání insekticidů.



V určité míře působí parazitoidi na kolonie mšic také pasivně (samice vyhledávají vhodného hostitele; samci vyhledávají samice), což může vést k opadu mšic z rostlin a při nízké teplotě půdy pak mšice nejsou schopny se zpětně vrátit na rostlinu (Starý, 1988).

### 3.1.2. Výskyt a šíření

V rámci podnebných pásů a kontinentů je rozšíření parazitoidů *Aphidiinae* nestejně, parazitoidi více či méně následují rozšíření hostitelské skupiny. Většina druhů se vyskytuje v mírných a subtropických pásech severní polokoule. Několik endemických skupin (většina z nich dost odlišná od severních druhů) leží v subtropických a mírných pásech jižní polokoule. Některé druhy se dokonce vyskytují v chladných podnebných subantarktických a subarktických pásech (Starý, 1988).

Světová fauna *Aphidiinae* byla rozdělena do několika skupin faunistických komplexů, které zpravidla korespondují jednotlivé floristické pásy (Starý, 1970; Kavallieratos *et al.*, 2004). Nejvíce výrazná podobnost faun je na severní části, směrem k jižní se podobnost snižuje (Starý, 1988). Faunistickým faktorem je také náhodná migrace a cílená introdukce některých druhů (Starý, 1970).

Na krátké vzdálenosti se parazitoid aktivně rozšiřuje letem či lezením (Starý, 2006). Při šíření na delší vzdálenosti využívá buď pasivně jako imago vzdušných proudů a stává se tak součástí vzdušného planktonu (Starý, 1988; 2006) a nebo využívá svého hostitele (již parazitovaného), kdy jsou pasivně rozptýlena různá vývojová stadia na jiná stanoviště (Starý, 1988).

Určité změny ve stanovišti lze pozorovat těsně před mumifikací parazitované mšice, kdy mšice často opouští svou kolonii a přesouvá se do místa, které je z mikroklimatického hlediska příznivé pro larvy 4. instaru (Starý, 1988). Indukované rozptýlení parazitoida závisí na jeho hostitelském druhu a může být závislé také na jednotlivých generacích stejného hostitelského druhu v průběhu ročního období (Starý, 1970; Cierniewska, 1976).

### 3.1.3. Vyhledávání hostitele

Proti útokům parazitoida se mšice brání kopáním, třesením, chozením a padáním z rostliny, tím může docházet k ovlivňování úrovně parazitizmu (Gardner *et al.*, 1984). Tyto obranné reakce hostitele nebo naopak jeho pasivní chování při napadení mohou stimulovat či odradit určité parazitoidní druhy (*Anonymous*).

Proces vyhledávání hostitele probíhá na 3 úrovních: rostlinné prostředí hostitele, společenstva hostitele a jednotlivý hostitel (Vinson, 1976). Lokalitu výskytu hostitele

hledají samice parazitoidů pomocí vizuálních podnětů určující rostliny, kterými se hostitelský druh živí (Vinson, 1976; Vet *et Dicke*, 1992; Powell *et al.*, 1998; Dicke, 1999; Guerrieri *et al.*, 2002). K těmto rostlinným znakům patří např. barva, struktura a výška rostliny, struktura a povrch listů (Whitman *et Eller*, 1990; Guerrier, 1996; Cloyd *et Sadof*, 2000; Jang *et al.*, 2000). Některé parazitoidní druhy jsou schopné lokalizovat hostitele i podle biologicky aktivních látek, které produkují mšicemi napadené (Powell *et Zhang*, 1983; Kitt *et Keller*, 1998), ale i nenapadené rostliny (Nordlund *et al.*, 1988). Uvolnění látek rostlinami z důvodu napadení škůdcem slouží jako mechanismus, který je vyvinut jako přímá ochrana proti býložravcům (i patogenům) (Dicke *et Sabelis*, 1988; Dicke *et van Loon*, 2000) a druhotně přitahuje jejich přirozené nepřátele (Tumlinson *et al.*, 1992; Guerrieri *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 1998; Guerrieri *et al.*, 2002; Turlings *et Wäckers*, 2004). Některé druhy parazitoidů jsou schopny ze složení těchto látek odhadnout množství hostitelů v dané lokalitě (Tentelier *et al.*, 2005), neboť kvalita látek, které produkují napadené rostliny, se zvyšuje s počtem rostlinných škůdců (Schmelz *et al.*, 2003) a jejich koncentrace souvisí s délkou napadení rostlin (Du *et al.*, 1998). Této schopnosti využívají parazitoidi k náletu na nejvíce napadené rostliny (Geervliet *et al.*, 1998; Guerrieri *et al.*, 1999). Na druhé straně látky, které produkují zdravé rostliny, mají sloužit k prodloužení parazitace v rámci určité lokality během období nízké hustoty hostitele, nebo jeho absence (Guerrieri *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 1998). Schopnost parazitoidů lokalizovat jejich hostitele pomocí chemických rostlinných látek bude kolísat v rámci rozdílného druhového spektra hostitele a druhů napadených rostlin, protože dochází k uvolnění různých směsí těchto látek (Pinto *et al.*, 2003). U několika druhů parazitoidů mšic (např. *Lysiphlebus testaceipes*, *Aphidius colemani*) byly zjištěny reakce na tyto kontakty a čichové podněty související s hledáním hostitele nebo jeho lokality (Powell *et Zhang*, 1983; Guerrieri *et al.*, 1997; Jang *et al.*, 2000; Carver *et Franzmann*, 2001).

Po nalezení lokality výskytu hledají samice parazitoidů hostitele buď náhodně podél listové žilnatiny nebo při okrajích listů pomocí tykadel (Hagvar *et Hofsvang*, 1991), jimiž svého hostitele analyzují podle určitých znaků, kterými může být tvar, povrch, velikost a pohyby hostitele (Rodrigues *et Bueno*, 2001).

### **3.1.3.1. Hostitelská preference**

Evoluční trend mšicomarů směřuje k pokrytí všech druhů hostitelských mšic ve všech lokalitách po celém světě (Starý, 2006). Na území České republiky bylo identifikováno 755 druhů mšic (Havelka, 2003), aktuální počet druhů parazitoidů mšic se pohybuje v rozmezí 130 – 140 (Starý, 2006). Nejvíce rozšířenou potravní skupinou

mšicomarů jsou oligofágní druhy dělitelné do několika podskupin (parazitování několika druhů mšic jednoho rodu), následují parazitoidé napadající druhy mšic několika rodů a podčeledí, atd. Méně než 1/3 celkového počtu tvoří monofágní druhy (Starý, 1988). Monofágní druhy mohou být z nedostatku hostitelského druhu více ohroženy, zatímco oligofágní druhy mohou být ovlivňovány souborem dostupných hostitelských druhů (Starý, 2006). I přesto, že některé druhy parazitoidů jsou schopny napadat různé druhy mšic, je prokázána určitá preference k druhu hostitelské mšice (Starý, 1988), kdy volbu může ovlivnit kvalita (zdravý hostitel), množství a distribuce hostitele (Hagvar *et* Hofsvang, 1991). Rozdíly v přizpůsobování parazitoida se mohou vyskytovat v rámci druhů a dokonce i uvnitř populací stejného druhu ve stejné i různé zeměpisné oblasti (Starý, 1988).

Lze však předpokládat, že parazitoidi budou více napadat vhodný hostitelský druh, než druh okrajový (van Alphen *et* Vet, 1986). Přesto u některých druhů studie prokázaly, že parazitoidi kladou vajíčka také do okrajových nebo dokonce zcela nevhodných hostitelů i přesto, že vhodný hostitel je přítomen (Janssen, 1989; Driessen *et al.*, 1991). Tímto chováním je snadněji dosažena stabilita hostitelsko – parazitoidního společenstva, než by tomu bylo s vhodným hostitelem (Heimpel *et al.*, 2003), který může působením parazitoida dojít ke svému zániku (Hassell *et* Anderson, 1984; Godfray *et* Hassell, 1991). Hostitelská preference může být považována za důležitou, zvláště když na stejné rostlině není výjimkou výskyt příbuzných hostitelských druhů (Ehler *et* Miller, 1978).

Potenciální hostitel musí splňovat určité požadavky na minimální fyziologickou a dietetickou potřebu nutnou pro vývoj a růst parazitoida (Mackauer *et al.*, 1996; Rodrigues *et* Bueno, 2001).

### **3.1.3.2. Preference hostitelských instarů**

Preference hostitelských instarů samicemi parazitoidů při kladení vajíček je známá, ale není pravidlem (Hafez, 1961; Tremblay, 1964; Brousal, 1966; Starý, 1970; Cierniewska, 1976; Akinlosotu, 1978, Hart *et al.*, 1978, Cloutier *et al.*, 1981). Mladé samice kladou vajíčka častěji do 2. a 3. instaru larev hostitele, než do 4. instaru a dospělce, starší samice tuto preferenci nemají, avšak mají-li možnost upřednostní také mladší instary (*Anonymous*). Lze tedy usuzovat, že 2. a 3. larvální instary hostitele jsou optimální pro vývoj parazitoidů, jednak z hlediska charakteristiky vývojových a fyziologických rysů (Starý, 1988) a také pro absenci obranných reakcí mšice (zejména kopání), které jsou typické pro 4. instar larvy a dospělce (*Anonymous*). Na základě výše uvedených skutečností je 4. instar a dospělce méně vhodným hostitelem. Není však zcela jasné, zda vykazují nižší kvalitu pro vývin larev či jsou mladší instary hostitele snadnější obětí. Předpokládá se tedy,

že kladení vajíček do kolonie mšic závisí na stáří parazitoida, instaru mšic, obranném chování hostitele a vyhledávací schopnosti parazitoida. Zajímavé je, že napadení mšice starším parazitoidem podmiňuje méně obranných reakcí u 4. instaru a dospělce, než napadení mladším parazitoidem. Důvod tohoto chování však není dosud dobře prostudován (*Anonymous*).

Nový pohled na preferenci instarů představují výzkumy Jarošíka *et al.* (2003), podle nichž preference instarů je ovlivňována cíleně samicí parazitoida a dle preference instarů je ovlivňováno pohlaví potomstva.

Preference hostitelských instarů nabývá na důležitosti hlavně z hlediska dopadu na hostitelskou populaci. Parazitovaná mšice i přes to, že bude následkem parazitace mumifikována a později usmrcena, může být ještě schopna po určitou dobu reprodukce. Z tohoto pohledu je tedy rozhodující, do kterého larválního instaru hostitele bude vajíčko kladeno. Je-li vajíčko kladeno do 1. a 2. instaru larvy mšice, nedojde k vývinu dospělého jedince, je-li parazitován 3. instar larvy, dospělec se vyvine, ale nedojde k reprodukci, parazitování 4. instaru larvy mšice nebo jejího dospělého způsobí omezení reprodukce (Starý, 1988). Přítomnost parazitoida v jakémkoli stádiu hostitele však způsobuje degenerativní změny v embryogenezi a několik dní před dosažením zralosti parazitoida dochází k celkové resorpci embryí (Cloutier *et al.*, 1981; Soldán *et al.*, 1981). Parazitoid *Lysiphlebus cardui* napadá mšici *Aphis fabae* a hostitelská preference instarů je závislá na stáří parazitoida. Parazitoid starý jeden den či méně, napadá mšice druhého a třetího instaru, u starších parazitoidů se preference k instarům hostitele neobjevuje (*Anonymous*).

### 3.1.4. Způsoby rozmnožování

U většiny mšicmarů jsou druhy biparentální – neoploďná vejce dávají vznik samcům (arrhenotokie), oplodněná vajíčka dávají vznik samicím (thelytokie). Uniparentální druhy se reprodukuje tzv. deuterotokní partenogenezi, což je charakterizováno produkcí velkého počtu samic a velmi malého počtu samců (Starý, 1988). U některých druhů se samci nevyskytují vůbec, pak se jedná o tzv. thelytokní partenogenezi (Starý, 1970). Partenogenetické rozmnožování je charakteristické pro mnoho rodů řádu *Hymenoptera* (Luck *et al.*, 1992). Z celkového množství všech živočišných a rostlinných druhů zaujímají druhy s partenogenetickým rozmnožováním přibližně 1% (Suomalainen *et al.*, 1987). Častým jevem je existence biparentálního i partenogenetického rozmnožování v rámci jednoho druhu, ale geograficky odděleného (Koivisto *et al.*, 2003), tzv. geografická partenogeneze. Příkladem je studovaný druh *Lysiphlebus fabarum*, který v rámci mírného

pásu vykazuje převážně partenogenetické rozmnožování, kdežto v subtropickém pásu vykazuje biparentální rozmnožování. Toto „střídání“ způsobu rozmnožování lze vysvětlit přizpůsobením druhů k podmínkám prostředí (Koivisto *et Braig*, 2003). Působením antibiotik nebo vyšší teplotou lze navodit produkování samců (Stouthamer and Luck, 1993). Partenogeneze může být způsobena vlivem bakterie *Wolbachia* (Hoy, 2003). Tato bakterie patří do čeledi *Rickettsiaceae* a vyskytuje se zejména u členovců (Werren *et al.*, 1995; Rigaud *et Rousset*, 1996; Jeyaprakash *et Hoy*, 2000) a přinejmenším u 70 druhů parazitních druhů řádu *Hymenoptera* (Cook *et Butcher*, 1999), ale i korýšů (Rigaud, 1999) a hlístic (Bandi *et al.*, 1999). Převážně se nachází v tkáních gonád (Dobson *et al.*, 1999). Partenogenetické rozmnožování navozené infekcí bakterie *Wolbachia* je běžné u rodu *Trichogramma* (Pinto *et Stouthamer*, 1994).

U rodu *Lysiphlebus* nebyl zjištěn žádný důkaz o vlivu bakterie *Wolbachia* na partenogenetické rozmnožování daných druhů (West *et al.*, 1998; Belshaw *et al.*, 1999; Belshaw *et Quicke*, 2003).

### 3.1.5. Reprodukce

Celkový počet vajíček se liší v závislosti na průběhu ročního období a na jednotlivých druzích. Specifické rozdíly jsou známy i mezi jednotlivými populacemi určitého druhu (Starý, 1988).

Skutečná plodnost samic parazitoida je menší než jeho potenciální, což způsobuje řada faktorů např.: poruchy při hledání vhodného hostitele, ztráta vajec zmrzačením hostitele nebo opakovaným kladením vajíčka, neúspěšný vývoj vajíčka v hostiteli a také nemusí dojít k naklazení všech vajíček (Starý, 1988). Dospělí parazitoidi jsou také napadeni polyfágními dravci (Völkl *et Kraus*, 1996; Völkl *et Kroupa*, 1997; Rosenheim, 1998), kteří obvykle pátrají po mšicích jako primárních cílech nebo sbírají jejich medovici. Parazitoidní larvy vyvíjející se v hostitelských mšicích mohou být konzumovány dravci mšic (Frazer *et van den Bosch*, 1973; Colfer *et Rosenheim*, 1995) nebo ohroženy hyperparasitismem (Sullivan, 1987; Völkl, 1992; Mackauer *et Völk*, 1993).

Počet generací parazitoida za jedno roční období záleží jak na povětrnostních podmínkách tak na přizpůsobení životního cyklu hostiteli (Starý, 1988).

### 3.1.6. Klazení vajíček

Po nalezení vhodného hostitele samice parazitoida pohybem břicha vpřed, bodne hostitele svým kladélkem do jeho těla. Opakované propíchnutí hostitelovy pokožky může

způsobit jeho omráčení nebo usmrcení. Délka aktivity kladení je druhově závislá a trvá od 1 s do 1 min. Samice jsou do jisté míry schopny rozlišovat již parazitované mšice a tím zabrání tzv. superparazitismu (Starý, 1988). Kladení je ovlivněno biotickými i abiotickými faktory. Již samotný útok parazitoida na vhodného hostitele je negativně ovlivněn nízkými teplotami, větrem a deštěm (Fink *et* Volkl, 1995).

### 3.1.7. Larvální vývoj

Rozlišují se čtyři larvální stadia. První instar larvy má odlišné tělní části, výrazné čelisti a ocásek. V těle hostitele způsobí rozptýlení cytolitických látek do hemolymfy hostitele, což negativně působí na jeho tkáň. Druhý a třetí instar larvy jsou od sebe méně odlišné; tyto larvy se živí hemolymfou hostitele. Čtvrtý instar má již čelisti a živí se přímo tkáněmi hostitele, čímž způsobuje jeho usmrcení. Před dokončením vývoje, larva vytváří uvnitř mšice kuklu a kůže mšice tak zatvrdne s následným typickým vzhledem mumie. Typ zakuklení je charakteristický pro jednotlivé rody (Starý, 1988), ale v závislosti na diapauze, mohou být dva nebo tři typy kukel identifikovány také u stejného druhu parazitoida (Cierniewska, 1976).

Dospělí jedinci se z těla mšic dostávají výletovým otvorem, který je kruhový a nese snadno odklopitelné víčko. U většiny parazitoidů *Aphidiinae* se tento výletový otvor nachází v některé části břicha mšice (Starý, 1988). Vyskytují se však skupiny u nichž výletový otvor a odklopitelné víčko jsou pouze ve vrcholové části břicha mumie (Starý, 1974).

Rychlost vývoje parazitoida může být odlišná v rámci jednotlivých hostitelských druhů (Heimpel *et al.*, 2003), v rámci geografických oblastí, a také v rámci stejného hostitelského druhu (Campbel *et al.*, 1974; Flint 1980). Průměrný vývoj trvá zhruba 14 dní (Campbell *et al.*, 1974; Cloutier *et al.*, 1981) a je podmíněn zejména teplotou (Starý, 1988).

Dospělci jsou většinou aktivnější v teplých, slunných dnech, zvláště koncem dopoledních a odpoledních hodin (Starý, 1988). Dostupnost potravy, příznivá teplota a vlhkostní podmínky prodlužují délku života parazitoidů o 2 až 3 týdny (Brousal, 1966; Cierniewska, 1976; Cloutier *et al.*, 1981).

V rámci definované geografické oblasti vykazují populace parazitoidů na různých hostitelských druzích různou genetickou diverzitu. Nejvyšší stupeň polymorfismu se vyskytuje u populací široce oligofágních druhů parazitoidů (Němec *et* Starý, 1983), druhové střídání hostitele je tak pravděpodobně spojeno se změnami genetické diverzity populace parazitoidů (Němec *et* Starý, 1985). Antolin *et al.* (2006) dokázali na základě srovnávacích populačně genetických studií, že např. parazitoid *Diaeretiella rapae* (M'Int.),

široce oligofágní druh, napadá jednotlivé druhy mšic podle jejich sezónního výskytu nebo geografických oblastí, při čemž nedochází k populačně genetickým změnám. „Gene flow“ je dostatečný a chrání populaci před tvorbou hostitelsky-specifikovaných linií.

### 3.1.8. Podčeleď *Aphidiinae*

Řád blanokřídlí (*Hymenoptera*) je druhově nejbohatším řádem hmyzu na našem území. Patří sem řada užitečných parazitoidů, predátorů a opylovačů (Laštůvka *et al.*, 1996).

Velký počet užitečných parazitoidních druhů patří do podřádu štíhloпасí (*Apocrita*), zejména nadčeledi lumkovitých (*Ichneumonoidea*), kam patří početné čeledi lumkovití (*Ichneumonidae*) a lumčíkovití (*Braconidae*) (Laštůvka *et al.*, 1996). Řada parazitoidů čeledi *Braconidae* je již úspěšně využívána v programech biologické ochrany rostlin proti různým druhům mšic (Starý, 1970; Carver, 1989; Hughes, 1989) ve sklenících, sadech a agroekosystémech v řadě zemí.

Do této čeledi patří podčeleď *Aphidiinae* zahrnující přibližně 50 rodů (Kambhampati *et al.*, 2000) a přes 450 druhů významných parazitoidů mšic. Do této podčeledi patří studovaný rod *Lysiphlebus*, jehož druhy náleží k běžným bioregulátorům mšic v ekosystémech a agroekosystémech, zejména mšic rodu *Aphis*.

## 3.2. Detekce biologické diverzity genetickými markery

Jedním ze základů populačních analýz je detekce genetické variability (Edwards *et Hoy*, 1993). Molekulární genetické metody zahrnující analýzu proteinů, jaderné DNA, mtDNA a mRNA; jsou velmi důležitými nástroji ve studiu biologie, ekologie a populační genetiky přirozených i laboratorních populací hmyzu (Hoy, 2003).

Jednotlivé úrovně biologické diverzity jsou vzájemně spojeny kauzálními vztahy a zpětnými vazbami v příčinné řadě genů, jedinců, populací, druhů, společenstev a ekosystémů. K pochopení struktury a dynamiky přírodní rozmanitosti musí být přístup nutně multidisciplinární. Měl by tedy zahrnovat metodologii rozličných deskriptivních a experimentálních oborů. Velmi důležité je srovnání fenotypových i genotypových výsledků, čímž se docílí podrobnějších a přesnějších poznatků nejen o fylogenetickém vývoji, ale i o druhovém rozdělení, morfologických a biosystematických přístupech.

### 3.2.1. Biochemické a molekulární markery

Taxonomický a systematický výzkum je dnes nemyslitelný bez použití genetických metod. O tom svědčí úspěšné aplikace cytogenetických, biochemických a molekulárních metod v rozlišování druhů a stanovení fylogenetických vztahů.

Analýzy proteinové elektroforézy byly použity u mnoha druhů hmyzu, vykazují však nižší úroveň genetické variability než studie založené na DNA markerech (2003). Biochemické markery detekují asi jen 30 % genetické diverzity, než lze detekovat metodami molekulárních DNA markerů (Hoy, 2003).

Od počátku objevu specifické DNA amplifikace počet aplikací této techniky exponenciálně vzrostl. Vývoj PCR metody způsobil převrat studií v molekulární biologii také u hmyzu (Hoy, 2003). Analýzy genetické variability používáním DNA technik se staly důležitým přístupem k systematickým (Campbell *et al.*, 1994; Dowton *et al.*, 1994), populačně genetickým a evolučním studiím v rámci jednotlivých druhů hmyzu. Přispívají tak k řešení základních a aplikovaných otázek ekologie hmyzu, populační genetiky hmyzu, důležité v ochraně proti škodlivému hmyzu (Hoy, 2003).

Nedostatečně objasněny zůstávají fylogenetické vztahy uvnitř rodů a evoluce skupin hmyzu (Kambhampati *et al.*, 2000). Základní informace týkající se molekulárně genetických analýz byly u podčeledi *Aphidiinae* zaměřeny převážně na fylogenetické studie (Belshaw *et al.*, 1997; Dowton *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1999), které se mnohdy od předchozích studií liší v dosažených výsledcích (Belshaw *et al.*, 1999), neboť fylogenetické studie byly v počátcích odvozovány porovnáváním různých fenotypových znaků, morfologických a vývojových stádií (Tremblay *et al.*, 1971; Chou, 1984; O'Donnell, 1989; Finlayson, 1990) nebo fyziologickými vlastnostmi.

Nejčastěji je detekována mitochondriální nebo jaderná DNA v metodách PCR - RFLP, často jsou využívány mikrosatelitové nebo minisatelitové DNA sekvence a jaderné DNA ve standardních PCR a RAPD metodách (Reineke *et al.*, 1998).

### **3.2.2. Izolace DNA**

Volba nejvhodnější izolace DNA pro daný experiment je závislá na jeho cíli, množství a způsobu uchování analyzovaných jedinců a v neposlední řadě na finanční náročnosti.

Analýzy DNA je možné provádět z larev nebo dospělých jedinců hmyzu bez předešlé izolace DNA (Grevelding *et al.*, 1996). Tento způsob snižuje čas a cenu přípravy vzorků vzniklých při zpracování velkého množství jedinců, avšak neumožňuje dlouhodobé uchování vzorků DNA.



Rychlý a levný způsob izolace DNA může být dosažen chelatační metodou – Chelex 100 (Bio-Rad). Jedná se o kopolymer styrenu a divinylbenzenu obsahující iminodiacetátové ionty působící jako chelatační skupiny a zamezující enzymatické degradaci DNA (Singer-Sam *et al.*, 1989), což lze považovat za klíčové, neboť při použití degradovaných fragmentů DNA jako templátu, dochází k redukci efektivity analýz a k omezení velikosti produktů při amplifikaci (Golenberg *et al.*, 1996). Přidáním Chelexu 100 ke vzorku během zahřívání, dochází ke zvýšení množství izolované DNA také ze vzorků, které obsahují malé množství templátové DNA. Chelex není toxický, poskytuje rychlé výsledky a lze ho použít pro izolaci DNA ze stovek hmyzích jedinců a jedinců menšího rozměru (Edwards *et Hoy*, 1993). Úspěšné jsou izolace z 1mg tkáně nebo 1 - 3 mm<sup>3</sup>. Pro PCR reakci objemu 10 - 20 µl lze použít 0,8 - 1 µl DNA. Tato izolace je často a úspěšně používána při populačních studiích hmyzu (Edwards *et Hoy*, 1995; Winder *et al.*, 1997; Foitzik *et Heinze*, 2001; Persad *et al.*, 2004, Anton *et al.*, 2006; Sandrock *et al.*, 2007), při analýzách mikroorganismů (Regensbogenova *et al.*, 2004; Cox *et al.*, 1998; Jansa *et al.*, 2003), ryb (McGregor *et al.*, 1996; Yue *et Orban*, 2001), ptáků (Burg *et al.*, 2003) a savců (Arbogast, 1999; Cooper *et al.*, 2001). V případě izolace DNA jedinců menší velikosti, není DNA možné detekovat ethidium bromidem v agarózovém gelu, bez předešlé amplifikace DNA.

Další rychlé metody izolace DNA jsou běžně komerčně dostupné ve formě kitů, které jsou specificky navrženy pro izolaci DNA z různých tkání: např. kit pro izolaci DNA z krve, čerstvé rostlinné tkáně či herbářových vzorků, různých druhů mikroorganismů, obratlovců i bezobratlí (Hufbauer *et al.*, 2001; van Veen *et al.*, 2003). Tato specifita je však zahrnuta ve vyšší pořizovací ceně.

Velmi často jsou používány metody založené na fenol-chloroformové izolaci, mezi které patří CTAB, při analýzách hmyzu také používaná (Downton *et al.*, 1998; Kambhampati *et al.*, 2000; Weathersbee *et al.*, 2004). V porovnání s uvedenými metodami je pracnější, tím časově náročnější, zůstává však finančně výhodná.

### **3.2.3. Metoda PCR**

V roce 1985 byla vynalezena metoda PCR (Polymerase Chain Reaction – polymerázová řetězová reakce) a ve velmi krátké době se stala standardní laboratorní metodou (Rabinow, 1996). Tato relativně jednoduchá technika poskytla vědcům nové možnosti při řešení různých problémů (White *et al.*, 1989; Arnheim *et al.*, 1990; Erlich *et Arnheim* 1992), zejména v oblastech soudní diagnostiky, studií základní biologie,

ekologie a evoluci.. PCR metoda je jednou z nejpřístupnějších technik také pro entomology, zabývající se základním a aplikovaným výzkumem (Hoy, 2003).

### **3.2.3.1. Princip PCR metody**

PCR metoda zahrnuje komplex kinetických reakcí vznikajících mezi templátovou DNA, oligonukleotidovými primery (polymery 10 až 30 nukleotidů dlouhé), deoxynukleotidovými trifosfáty (dNTP), pufrům a enzymem (DNA polymerázy) (Hoy, 2003).

Při PCR metodě dojde nejprve k tepelné denaturaci templátové DNA, na komplementární úseky DNA nasednou primery a působením DNA polymerázy dochází k amplifikaci těchto úseků (Hoy, 2003). Cyklus je možné mnohokrát opakovat, v každém cyklu se množství DNA zdvojnásobí. Specifičnost PCR metody závisí na párování bází dvou primerů a templátové DNA (Hoy, 2003).

### **3.2.3.2. Složení reakční směsi**

Protokol PCR metody není univerzální pro všechny analýzy, každý nový experiment nutně vyžaduje optimalizaci metody. Například amplifikace 100 bp fragmentů není ekvivalentní pro amplifikaci 10 kb DNA fragmentu (Hoy, 2003). Optimalizace reakčních parametrů je potřebná pro zlepšení specifity a výnosu PCR reakce (Hoy, 2003). Lze optimalizovat tyto parametry: reakční pufr (zvláště koncentraci  $MgCl_2$ ); koncentraci templátové DNA, primerů, dNTPs a DNA polymerázy; čas a teplotu nasedání primeru na templát DNA, čas a teplotu prodlužování (Carbonari *et al.*, 1993). Výhodou PCR metody je její rychlost a dobrá vypovídající úroveň získaných dat, za předpokladu známých primerových sekvencí. Genetické informace u mnoha organismů nejsou k dispozici, nebo jsou jen v omezené míře. PCR metoda byla proto modifikována pomocí různých typů a množství primerů (Hoy, 2003).

Následně jsou uvedeny 2 příklady modifikace PCR metody, které se používají při řešení otázek populační genetiky hmyzu - metody RAPD a SSR. Tyto metody byly použity v této práci pro genetickou analýzu studovaného druhu *Lysiphlebus fabarum*.

### **3.2.4. Metoda RAPD**

Genomová DNA různých organismů může být amplifikována jedním krátkým oligonukleotidovým primerem (6 - 10 nukleotidů) (Williams *et al.*, 1990). Při této délce je značná pravděpodobnost, že v genomu bude mnoho homologních míst k použitému oligonukleotidu a některá z nich budou dostatečně blízko u sebe, aby v úseku mezi nimi

při využití PCR docházelo k amplifikaci DNA (Ondřej, 1999). Takto amplifikovaná DNA může být vizualizována ethidium bromidem na agarózovém gelu. Tato modifikace PCR metody byla nazvána Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD (polymorfismu náhodně amplifikované DNA), produkuje tedy náhodně amplifikované polymorfnní DNA fragmenty (Hoy, 2003).

#### **3.2.4.1. Charakteristika RAPD primerů**

Tyto primery mohou být navrženy zcela náhodně (Samec, 1993), bez jakékoli znalosti genetické informace testovaného organismu. Jediným omezením je nutný obsah G + C bází, které by měly být zastoupeny z 50 až 80 %, bez obsahu palindromických sekvencí. Různé náhodné primery používané se stejnou genomovou DNA produkují různý počet a velikost PCR produktů (Ellsworth *et al.*, 1993; Kernodle *et al.*, 1993). Celkový počet amplifikovaných fragmentů se může pohybovat od <10 až přes 100. Tento počet nekoreluje s velikostí genomu. Množství vzniklých produktů závisí na sekvenci primeru, ovšem nelze ho předem přesně odhadnout. Některé primery, které dávají bohaté spektrum v kombinaci s jedním templátem DNA, nemusí s jiným nic vytvořit (Caetano-Anollés *et al.*, 1991).

RAPD produkty představují většinou dominantní genetické markery a jsou děděny mendelisticky (Carlson *et al.*, 1991). Tím u diplo-diploidních druhů nemohou být identifikovány heterozygotní genotypy. U haplo-diploidního blanokřídlého hmyzu je tato potíž překonána analýzou jen u haploidních samců, nebo analýzou genotypu samic testováním jejich samčích potomků (Edwards *et Hoy*, 1993). Pouze zřídka jsou RAPD markery kodominantní (Hunt *et Page*, 1992), což je pravděpodobně důsledek vnitřních delecí nebo inzercí. O nukleotidové sekvenci RAPD produktů je velmi málo informací. Předpokládá se, že jsou částí variabilní repetitivní oblasti (Caetano-Anollés *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1990).

#### **3.2.4.2. Optimalizace RAPD metody**

Genomy příbuzných, ale také vzdálených druhů jsou velmi shodně organizovány. Většina amplifikovaných fragmentů bývá shodná. Na RAPD profilu lze nalézt fragmenty, které jsou charakteristické pro rod, druh, populaci, popř. linii (Hadrys *et al.*, 1992). Je tedy důležité vyhledat primer vykazující různé spektrum fragmentů i u velmi příbuzných jedinců. Počet a velikost amplifikovaných fragmentů závisí na koncentraci hořčiku, genomické DNA a vybraném primeru. Také různé typy DNA polymerázy mohou ovlivnit výsledné spektrum RAPD fragmentů (Schierwater *et Ender*, 1993).

Nelze opomíjet ani vliv rychlosti teplotních změn v průběhu reakce, což závisí na použitém termocycleru (odlišné teplotní podmínky) a různém objemu a koncentraci složek v PCR směsi, vzniklých používáním různých pipet. Je tedy vhodné používat primery produkující shodné proužky amplifikované v používaných termocyclerech a primery produkující shodné proužky v opakujících se reakcích (Edwards *et Hoy*, 1993). Reakční podmínky musí být pečlivě optimalizovány (Edwards *et Hoy*, 1993) a je vhodné RAPD-PCR podmínky optimalizovat konkrétně pro daný analyzovaný druh (Hadrys *et al.*, 1992).

Různé spektrum RAPD fragmentů může být získáno také použitím různých DNA izolačních metod, pravděpodobně kvůli přítomnosti různých druhů nebo množství kontaminujících látek nebo odlišné koncentraci templátu DNA (Micheli *et al.*, 1994). V rámci jedné studie je důležité používat stejnou metodu izolace DNA u všech analyzovaných jedinců (Edwards *et Hoy*, 1993). Citlivost RAPD-PCR na koncentraci a kvalitu templátové DNA spočívá v kolísání intenzity amplifikovaných fragmentů, nebo k amplifikaci fragmentů vůbec nedojde (Khandka *et al.*, 1997).

#### **3.2.4.3. Výhody a nevýhody RAPD metody**

Tato metoda má při srovnání s dalšími molekulárními metodami několik výhod. Pro aplikaci metody není nutná předchozí znalost genomu analyzovaného druhu, je rychlá (Callejas *et al.*, 2005) a při srovnání s RFLP analýzou, DNA sekvenováním, PCR - RFLP, mikrosatelity nebo analýzou microarray relativně levná (Penner *et al.*, 1993). K analýze postačí malé množství biologického materiálu a dokonce jen tkáňové fragmenty (Callejas *et al.*, 2005). Tím je metoda vhodná pro studie malých jedinců hmyzu (Callejas *et al.*, 2005), jako jsou blanokřídlí parazitoidé (Edward *et Hoy* 1993; Roehrdanz *et al.*, 1993). RAPD-PCR je zavrhována pro její špatnou reprodukovatelnost (Black 1992; Ayliffe *et al.*, 1994; Perez *et al.*, 1998; Micheli *et al.*, 1994). Jak ukazují studie, je nutné tuto metodu ve všech výše uvedených parametrech dostatečně přesně optimalizovat.

#### **3.2.4.4. Využití RAPD metody**

Genomová DNA sekvence lišící se jen v jediné bázi může způsobovat změnu v počtu a velikosti amplifikované DNA. Tím RAPD může detekovat i malé rozdíly mezi genomy jedinců v rámci druhu a populací. RAPD metoda je využívána ve studiích molekulární ekologie, k druhové identifikaci, hodnocení příbuznosti, při analýzách paternity, odhadování genetické variability uvnitř populací a monitoringu osídlování (Hadrys *et al.*, 1992), k detekci individuální nebo meziliniové genetické variability (Mazura *et al.*, 2001). RAPD fingerprinting může analyzovat i jednotlivá embrya mšic

(Chan *et al.*, 1999), je vhodný pro rozlišení malých parazitoidních druhů nebo biotypů (Edwards *et Hoy* 1993, 1994). Rozdíly v RAPD patternu korelují s evolucí v rámci jednotlivých taxonů (Espinasa *et Borowsky*, 1998). Tím lze detekovat fylogeneticky konzervované produkty specifické pro jedince, náhodně rozdělené v genomu templátové DNA (Williams *et al.* 1990). RAPD metoda byla úspěšně použita pro stanovení genetické variability: parazitoidních druhů *Tryoxys pallidus* a *Dyglyphus begini* (Edwards *et Hoy*, 1993), parazitoidních druhů v rámci rodů *Telenomus* a *Trissolcus* (Aljanabi *et al.*, 1998), parazitoidního druhu *Diaeretiella rapae* (Vaughn *et Antolin*, 1998) a *Psytalia concolor* (Karam *et al.*, 2008); mapování genomu parazitoidního druhu *Trichogramma brassicae* (Laurent *et al.*, 1998). Genetická variabilita v rámci druhu *Dyglyphus begini* zjištěna RAPD metodou byla vyšší, než ve studii allozymových markerů (Menken, 1991) a srovnatelná s úrovní variability detekované RFLP (Hoy, 2003). U druhu *Tetranychus urticae* byly analýzou RAPD úspěšně rozlišeny populace rezistentní vůči pesticidům. Jednoznačně odlišila dva morfologicky velmi podobné druhy molice *Aleurodicus dispersus* a *Lecanoideus floccissiums* (Callejas *et al.*, 2005). Je vhodná pro studia genového toku (Hadrys *et al.*, 1993) i mapování genomů (Reiter *et al.*, 1992). Tři druhy rodu *Orius* byli touto metodou jednoznačně rozlišeny, avšak nebylo dosaženo rozlišení geografických populací v rámci jednoho druhu (Gozlan *et al.*, 1997).

### **3.2.5. Mikrosatelity**

V roce 1984 bylo u některých eukaryotních genomů zjištěno velké množství sekvence tandemových repetice, které byly nazvány mikrosatelity (Litt *et Luty*, 1989). Následné studie zjistily distribuci mikrosatelitů u dalších eukaryotních genomů a také u některých prokaryotních genomech (Tautz *et al.*, 1986) a to v protein - kódujících i nekódujících regionech (Kashi *et al.*, 1997; Tóth *et al.*, 2000). U hmyzu mohou mikrosatelity zaujímat velkou část genomové DNA (Hoy, 2003). Ačkoli využití mikrosatelitů v posledních letech stále stoupá, jejich původ a biologická funkce zůstávají nejasnými. Lze však říci, že v buňce ovlivňují řadu procesů (regulace genové aktivity, rekombinace, DNA replikace, buněčný cyklus nebo organizaci chromatinu) (Li *et al.*, 2002).

#### **3.2.5.1. Struktura a vlastnosti mikrosatelitů**

Mikrosatelitní DNA markery - SSR (Simple Sequence Repeats) nebo STR (Single tandem repeats) jsou sekvence DNA složené z mnohokrát se za sebou opakujících motivů, jejichž délka je 2-, 3-, 4-, nebo 6- bází (Tautz *et Renz*, 1984). U členovců byla tato

opakování nalezena ve složení opakování dinukleotidů (AC, AT, AG), trinukleotidů (AGC, AAC, AAT) nebo tetranukleotidů (ACAT, AAAT, AAAC) (Tóth *et al.*, 2000). U hmyzu se nejčastěji vyskytují dinukleotidové repetice (Hoy, 2003).

Mikrosatelity lze rozdělit do čtyř skupin:

- a) dokonalé (perfekt) – opakováný motiv není přerušen žádnou bází (...TATATATATATATA...)
- b) nedokonalé (imperfekt) – opakováný motiv je přerušen/přerušován náhodnými bázemi (...TATATATACTATATATA...)
- c) přerušené (interrupted) – do opakováného motivu je vložena odlišná sekvence (...TATATATACGTGTATATA...)
- d) složené (composite) – opakuje se motiv je tvořen dvěma sekvencemi, které na sebe navazují (...TATATAGTGTGT...) (Oliveira *et al.*, 2006)

Vysoký stupeň polymorfismu umožňuje rozeznání homozygotních a heterozygotních jedinců. Shodný počet repetic je na obou homologických chromozomech u homozygota, zatímco u heterozygotů se u každé alely počet repetic liší (Oliveira *et al.*, 2006). Můžeme zkoumat frekvenci jejich výskytu, stanovit podíl heterozygotů v populaci i stupeň podobnosti jednotlivých populací.

Byla prokázána souvislost mezi velikostí genomu a celkovým počtem opakování repetic u mikrosatelitů vyskytujících se v dlouhých sekvencích (Hancock, 1995). Tato studie potvrzuje hypotézu, že zabudování mikrosatelitů je doprovázeno zvětšením genomu během evoluce. Vkládáním více repetic do genomu poskytuje organismům molekulární prostředek pro rychlejší adaptaci na stres z prostředí (Li *et al.*, 2002). Distribuce různých typů repetic (od mono- až po hexanukleotidové) je vysoce závislá na taxonomické skupině. Jedny z nejdelších mikrosatelitů se vyskytují u jednoduchých organismů (plísňe, houby) (Field *et al.*, 1996).

### 3.2.5.2. Mutační mechanismy

Mutační rychlost mikrosatelitů je mnohem vyšší než v jiných oblastech genomu. Pohybuje se mezi  $10^{-2}$  až  $10^{-6}$  na lokus a generaci (Sia *et al.*, 2000). Lze očekávat, že v kódujících oblastech bude nižší počet mikrosatelitů než v nekódujících. Změna v kódující oblasti (posunutí čtecího rámce) může způsobit ztrátu funkce vzniklého proteinu (Tóth *et al.*, 2000). Je tedy potvrzena existence selekčního tlaku na mutace, které se vyskytují

v oblastech genů (Li *et al.*, 2004) a tím zpochybněn názor, že mikrosatelity jsou selekčně neutrální (nejsou ovlivněny selekčním tlakem) (Oliveira *et al.*, 2006).

Vysokou mutační rychlost mohou vysvětlit dva hypoteticky předpokládané mutační mechanismy: první vysvětluje vznik „klouzáním“ DNA polymerázy při replikaci DNA; druhý vysvětluje vznik rekombinací mezi dvěma řetězci DNA (Hoelzel, 1998, Oliveira *et al.*, 2006). Rekombinace mění délku mikrosatelitů buď nerovnoměrným crossing-overem nebo genovou konverzí (Li *et al.*, 2002).

### **3.2.5.3. Získání sekvence mikrosatelitových primerů**

Pro amplifikaci mikrosatelitových primerů je třeba znát sekvence primerů (Hoelzel, 1998), které jsou komplementární se sekvencemi sousedícími s mikrosatelitovým lokusem. Tyto sekvence se získávají prohledáváním známých sekvencí obsažených v různých databázích, nebo z již publikovaných prací. Pro mnoho organismů však doposud nebyly sekvence navrženy, a je nutné je získávat *de novo* izolací z genomových knihoven (Tautz, 1989), což může představovat relativně zdlouhavý a finančně náročný úkon. Pro tyto druhy lze však použít sekvence primerů, které byly původně vyvinuty pro jiný příbuzný druh z téhož rodu. Tato vlastnost mikrosatelitů je známa jako nahraditelnost (transferability) nebo cross-species amplifikace (Jaarola *et al.*, 2007; Roa *et al.*, 2000). Umožňuje to homologní DNA sekvence v mikrosatelitních regionech (DNA sekvence vyskytující se před a za určitým lokusem nebo genem) (Oliveira *et al.*, 2006). S rostoucí fylogenetickou vzdáleností druhů však pravděpodobnost úspěšného použití těchto primerů klesá. Délka mikrosatelitních lokusů je většinou druhově specifická (Goldstein *et al.*, 1995).

### **3.2.5.4. Využití mikrosatelitů**

Jako kodominantní markery jsou mikrosatelity jednoduše amplifikovány během PCR. Své uplatnění nacházejí především při studiu evoluce, ekologie nebo populací (Hoelzel, 1998; Bachmann *et al.*, 1993; Winder *et al.*, 1997; Caterino *et al.*, 2000; Macdonald *et al.*, 2003; Anton *et al.*, 2006; Carballa *et al.*, 2007; Sandroek *et al.*, 2007). Mikrosatelitovými markery lze identifikovat rozdíly mezi jedincem a jeho potomstvem, mezi populacemi určitého druhu (Burke, 1989; Wang *et al.*, 1999; ; Hufbauer *et al.* 2001; Hufbaer *et al.*, 2004; Fauvergue *et al.*, 2005; Zhou *et Dorn*, 2005). Mohou být použity při monitoringu složení a výskytu populací v určitém biotopu, včetně populací s nižší úrovní variability, jako jsou partenogenetické populace mšic nebo populace blanokřídlých parazitoidů (Hoy, 2003).

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Charakteristika analyzovaných populací

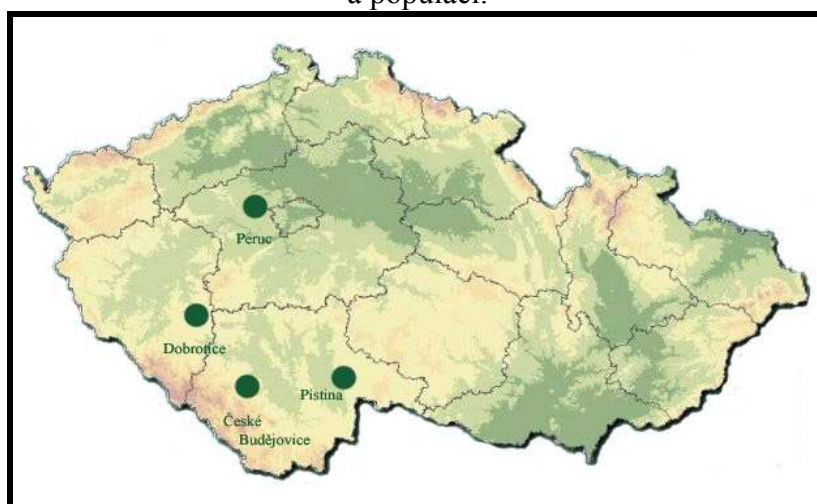
Analyzovaní jedinci pocházejí přímo ze sběrů v terénu, nebo z čistých laboratorních kultur. Odchyt analyzovaných populací a druhů byl proveden na lokalitách, rostlinách a hostitelských druzích uvedených v tabulce 1 (viz také obr. 1). Odchyt mšice makové (*Aphis fabae*) byl uskutečněn v polních porostech bobu zahradního. V laboratorních podmínkách byl tento druh mšice chován na stejném druhu rostliny. Odchyt mšice *Diuraphis noxia* byl proveden na polním porostu ječmene setého a tento druh byl následně v laboratorních podmínkách chován na rostlinách pšenice seté. Oba druhy mšic pocházely z polních porostů v České republice.

Chov mšic a parazitoidů byl uskutečněn v housenicích – složených z drátěné kostry potažené nylonovými sítěmi o rozměru 35 x 35 x 35cm. V každém houseníku bylo celkem devět kelímků s rostlinami jeden týden starými. Vždy byly tři kelímky s rostlinami stejného stáří: mladé, střední, staré. Vždy jednou týdně byly tři 3 kelímky nahrazeny novými. Špičky listů s hustě osazenými mšicemi byly ostříhány a přeneseny na nové rostliny, další den odstraněny. Imága parazitoidů byla odchycena exhaustorem na stropě houseníku a přenášena do nové kultury. V rámci jedné populace bylo přeneseno minimálně 30 jedinců. Odchov v housenicích probíhal za podmínek: teplota 18 – 22 °C, vlhkost vzduchu 70 %, 18-ti hodinová fotoperioda. Jedinci určené pro populační studie byly převedeny pinzetou přímo do čistého 96 % ethanolu a uchovány při 4 °C do doby izolace DNA.

Každý jedinec byl před předáním k analytickému zpracování předurčen RNDr. Petrem Starým, Ph.D, DrSc, z Entomologického ústavu AVČR. K analýzám byly dále použity tyto druhy: *Lysiphlebus cardui*, *Lysiphlebus confusus*, *Lysiphlebus fabarum* (viz tabulka 1, obrázek 1). Schéma pokusu pro zjištění vlivu střídání hostitelského druhu u analyzovaného druhu *Lysiphlebus fabarum* je znázorněno na obrázku 2. Analyzované populace a analyzované druhy byly charakterizované vždy 23 jedinci.



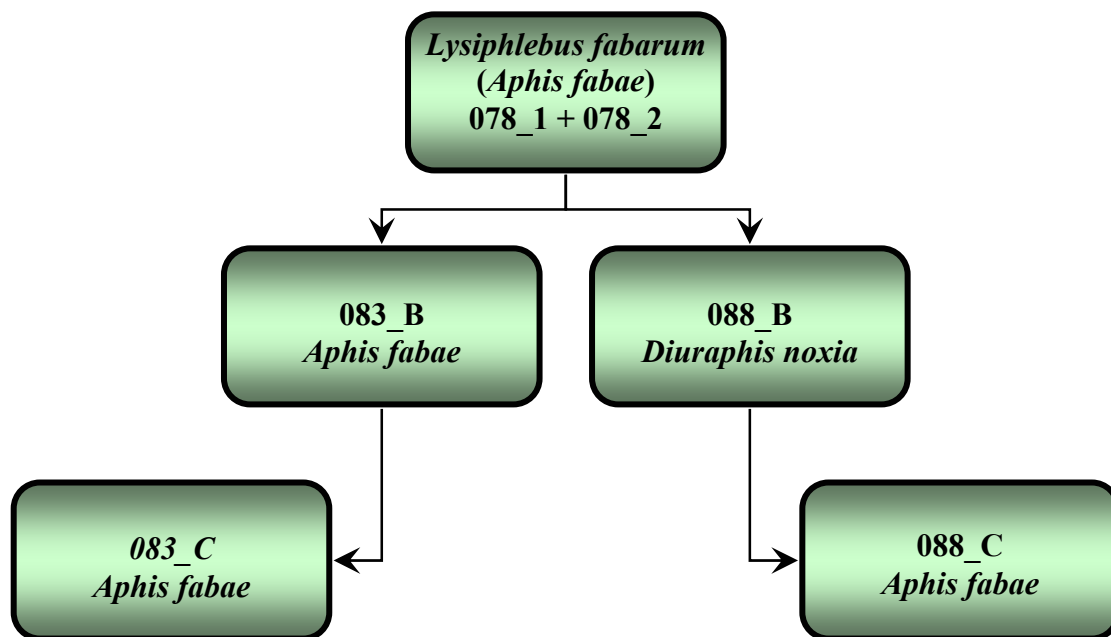
Obrázek 1: Mapa České republiky s vyznačenými místy odběru jednotlivých druhů a populací.



Tabulka 1: Seznam analyzovaných druhů a populací rodu *Lysiphlebus*.

Druh	Označení	Lokalita výskytu	Druh hostitele	Rostlina
<i>Lysiphlebus fabarum</i>	051	Peruc	<i>Aphis fabae</i>	<i>Chenopodium album</i>
<i>Lysiphlebus fabarum</i>	078	Dobruška	<i>Aphis fabae</i>	<i>Chenopodium album</i>
<i>Lysiphlebus fabarum</i>	081	České Budějovice	<i>Aphis taraxacicola</i>	<i>Taraxacum officinale</i>
<i>Lysiphlebus fabarum</i>	050	České Budějovice	<i>Aphis fabae</i>	<i>Cirsium arvense</i>
<i>Lysiphlebus cardui</i>	030	Pístina	<i>Aphis fabae</i>	<i>Cirsium arvense</i>
<i>Lysiphlebus confusus</i>	004	Pístina	<i>Aphis rafinosa</i>	<i>Salix alba</i>

Obrázek 2: Schéma parentální a filiální generace druhu *Lysiphlebus fabarum* a jejich hostitelských druhů.



## 4.2. Analýzy DNA markerů

Jednotlivé metodiky analýz - izolace DNA, RAPD analýza, SSR analýza a elektroforetická separace jsou obecně známé a jejich pracovní postupy jsou již publikovány. V každé laboratoři však dochází k určitým modifikacím pracovních postupů na základě přístrojového a materiálového vybavení dané laboratoře, proto jsou podrobněji popsány postupy použitých metod, které byly provedené v Biotechnologické laboratoři, Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

### 4.2.1. Izolace DNA

Na základě stanovených cílů této práce bylo nutné získat templátovou DNA každého analyzovaného jedince každé populace/druhu. S ohledem na rozměry jedinců studovaného rodu *Lysiphlebus*, bylo přihlédnuto k možnostem menšího vstupního

materiálu pro izolaci DNA. Při výběru vhodné metody izolace bylo také důležité zhodnotit časovou a metodologickou nenáročnost, neboť je nutné souběžně analyzovat větší počet jedinců. Pro stanovení optimální metody izolace DNA byly zvoleny následující metody:

#### **Alkalická metoda:**

Jedinec byl umístěn do 1,5ml zkumavky, bylo přidáno 10 $\mu$ l 0,5M NaOH, tkáň byla homogenizátorem rozmělněna a po dobu 1 minuty při 12 000 rpm odstředěna. Do nové 1,5ml zkumavky bylo přeneseno 5 $\mu$ l supernatantu, bylo přidáno 495 $\mu$ l pufru (0,5M NaOH; 100mM Tris, pH= 8,0; 1mM EDTA, pH = 8,0) a dobře promícháno. Vzorky byly uchovány při -20 °C.

#### **Metoda SDS:**

Jedinec byl umístěn do 1,5ml zkumavky a po přidání tekutého dusíku byla tkáň rozmělněna. Ke každému vzorku bylo přidáno 400 $\mu$ l extrakčního pufru (200mM Tris, pH = 7,5; 25mM EDTA, pH = 8,0; 250mM NaCl; 5% SDS), směs byla protřepána a ponechána při pokojové teplotě do doby přípravy všech vzorků. Dále byly vzorky odstředěny po dobu 1 minuty při 12 000 rpm. Supernatant (cca 300 $\mu$ l) byl přenesen do nové 1,5ml zkumavky, bylo přidáno 300 $\mu$ l isopropanolu. Inkubace směsi probíhala po dobu 2 minut při pokojové teplotě a pak následovalo odstředění po dobu 5 minut při 12 000 rpm. Supernatant byl odstraněn a pelet DNA krátce usušen při 65 °C. DNA byla rozpuštěna ve 100 $\mu$ l TE pufru (10mM Tris, pH = 8,0; 1mM EDTA, pH = 8,0). Vzorky DNA byly uchovány při -20 °C.

#### **Metoda Chelex 100:**

Jedinec byl umístěn do 1,5ml zkumavky obsahující 1ml sterilní vody. Tkáň byla následně rozmělněna, vzniklá směs byla 3 min při 12 000 rpm odstředěna. Supernatant v objemu 200 – 300 $\mu$ l byl přenesen do nové 1,5ml zkumavky, bylo přidáno 200 $\mu$ l 5% Chelexu. Inkubace vzorků probíhala po dobu 20 minut při 56 °C. Při vysoké rychlosti byly vzorky třepány po dobu 10 vteřin. Následovala inkubace vzorků po dobu 8 - 10 minut při 100 °C a pak ihned jejich odstředění po dobu 3 minut při 12 000 rpm a při teplotě 4 °C . Vzorky byly uchovány při 4 °C. Před každým použitím byly vzorky vždy krátce odstředěny a pro analýzy DNA byl použit supernatant.

### 4.2.2. RAPD analýza

Pro RAPD analýzu byly použity primery sad OPA, OPB, OPF a OPK (Operon Technologie, Inc.), sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny na webové stránce <http://www.operon.com/products/RAPD/OperonsRAPD10merSequences.xls>.

Primery byly zkoušeny na DNA jednoho jedince. PCR reakce byla provedena v celkovém objemu 25 $\mu$ l obsahující 0,1M Tris-HCl, pH = 8,3; 50mM KCl; 2mM MgCl<sub>2</sub>; 1% Triton X-100; 100mM každého dATP, dCTP, dGTP a dTTP; 1U Taq DNA polymerázy (TaKaRa); 10pM primeru (Operon Technologies, Inc., Alameda, CA) a 25ng templátové DNA.

#### Schéma pipetování pro 1 vzorek:

- 2.5 $\mu$ l 10X reakční pufr
- 0.5 $\mu$ l dNTPs
- 1 $\mu$ l DNA
- 4 $\mu$ l primer s orientací 5'-3'
- 0.2 $\mu$ l Taq DNA polymeráza
- dH<sub>2</sub>O do objemu 25 $\mu$ l

Amplifikace DNA probíhala v termocycleru PTC – 100 (MJ RESEARCH) za následujícího termálního cyklu:

- 93 °C (3 min)
- 45 cyklů při » 92 °C (1 min)
  - » 35 °C (2 min)
  - » 72 °C (3 min)
- konečná elongace 72 °C (10 min)

PCR produkty byly rozděleny elektroforetickou separací na 1,5 % agarózovém gelu v 1x TBE pufru (54 g Tris báze, 27,5 g kyselina boritá, 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0). Ke každému vzorku byly přidány 3  $\mu$ l nanášecího barviva (30 % glycerol, 0,12 % bromfenolová modř). PCR produkty byly detekovány barvením ethidium bromidem. Doba trvání elektroforézy byla při 2,5 hodiny při napětí 70 V. Gely byly vizualizovány pomocí

UV světla a vyfoceny (Epson Ultra Cam 3100Z Imaging Systém). Pro stanovení velikosti PCR produktů byl použit 100 bp DNA ladder (NEB).

### 4.2.3. SSR analýza

SSR primerové páry byly zvoleny na základě odborných článků: Macdonald *et al.* (2003), Fauvergue *et al.* (2005) a ještě před vydáním Sandrock *et al.* (2007). PCR reakce byla provedena v celkovém objemu 25  $\mu$ l obsahující 2x PPP master mix Top Bio, 10 pM primeru (Invitrogen) a 25 ng templátové DNA.

#### Schéma pipetování pro 1 vzorek (systém PPP MM Top-Bio):

- 12,5  $\mu$ l PPP master mixu
- 1  $\mu$ l DNA
- 0,25  $\mu$ l primeru s orientací 5'
- 0,25  $\mu$ l primeru s orientací 3'
- 11  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O do objemu 25  $\mu$ l

Amplifikace DNA probíhala v termocykleru PTC-100 (MJ Research) za následujícího termálního cyklu:

- 94 °C (10 min)
- 35 cyklů při » 94 °C (1 min)
  - » 55 - 65 °C (1 min)
  - » 72 °C (1 min)
- konečná elongace 72 °C (3 min)

PCR produkty byly rozděleny elektroforetickou separací na 2 % synergelu (0,7 g agarózy a 0,65 g synergelu na 100 ml) v 1x TBE pufru (54 g Tris báze, 27,5 g kyselina boritá, 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0). Ke každému vzorku byly přidány 3  $\mu$ l nanášecího barviva (30 % glycerol, 0,12 % bromfenolová modř). PCR produkty byly detekovány barvením ethidium bromidem. Doba trvání elektroforézy byla 2 hodiny při napětí 80 V. Gely byly vizualizovány pomocí UV světla a vyfoceny (Epson Ultra Cam 3100Z Imaging Systém). Pro stanovení velikosti PCR produktů byl použit 100 bp DNA ladder (NEB).

## 4.3. Statistické hodnocení dat

Statistické hodnocení dat bylo provedeno na základě vstupního souboru, kterým byla matice sestavena na základě přítomnosti (1) a nepřítomnosti (0) amplifikovaných fragmentů po RAPD a SSR analýze, získaných elektroforetickou separací na agarózovém gelu. Matice byla vytvořena v souboru Microsoft Excel, 2006.

### 4.3.1. Program DARwin

V programu DARwin, 5.0.156 (Perrier *et Jacquemoud-Collet*, 2006) lze na základě srovnání individuálních profilů fragmentů vytvořit diagram klastrů – dendrogram. K zařazení do jednotlivých klastrů je využíván tzv. bootstrap – nepodobnostní matice je vytvořena z iniciační matice několika nezávislými výpočty několikrát za sebou. Počet opakování výpočtů lze libovolně zadat a udává kolik výpočtů z celkového počtu mělo stejný výsledek.

### 4.3.2. Program Structure

Program Structure, verze 2.2 (<http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>) umožňuje grafické znázornění struktury analyzovaných populací, identifikovat genetickou vzdálenost mezi populacemi, zařadit k analyzovaným populacím neznámého nebo migrujícího jedince (Pritchard *et al.* 2000). Analýza také stanoví hodnotu fixačního indexu  $F_{st}$  dle Wrighta (1943), která charakterizuje genetickou diferenciaci u zkoumaných populací.

### 4.3.3. Hlavní koordinační analýza

Hlavní koordinační analýza (PCoA – principal coordinate analysis) umožňuje použití všech typů proměnných, za předpokladu výpočtu podobnostní matice. Výstupem této analýzy je ordinační diagram, ve kterém jsou znázorněna data, podle jejich distančních hodnot. Analýza byla provedena v programu MVSP, verze 3.13.

## **5. Výsledky**

### **5.1. Metoda izolace DNA**

Pro populačně-genetické analýzy bylo nutné zvolit optimální metodu izolace DNA, vykazující dostatečnou kvalitu i kvantitu DNA získanou z každého jedince. K izolaci DNA byli použiti náhodně vybraní jedinci všech druhů a populací. Kritéria pro zvolení optimální metody izolace DNA byla: časová a finanční náročnost, výtěžnost a čistota izolované DNA. Z důvodu přítomnosti tkání ve vzorku při použití metody Chelex 100, byla výtěžnost, čistota a integrita izolované DNA hodnocena elektroforetickou separací na 1,5% agarózovém gelu po předchozí amplifikaci náhodně vybraného RAPD primeru. Na základě výše uvedených kritérií dosahovala nejlepších výsledků metoda izolace DNA 5% roztokem chelatačního činidla Chelex 100. Tato metoda byla použita k izolaci DNA všech analyzovaných jedinců.

### **5.2. Metoda RAPD**

Dále byla provedena optimalizace podmínek RAPD metody. Reakční podmínky pro amplifikaci RAPD primerů jsou uvedeny v kapitole 4.2.2. a pro všechny použité RAPD primery a zvolené studie byly stejné. Pro analýzy byly vybrány takové RAPD primery, které po amplifikaci na jednom náhodně vybraném jedinci vykazovaly při elektroforetické separaci dobře od sebe navzájem rozpoznatelné fragmenty s dostatečnou intenzitou. Z 80 testovaných primerů bylo vybráno celkem 5 RAPD primerů. Jejich názvy a sekvence jsou uvedeny v tabulce 2. Amplifikace ostatních RAPD primerů buď neproběhly vůbec, nebo poskytly soubor malého množství navzájem těžko rozeznatelných či pouze monomorfních fragmentů, nebo amplifikované fragmenty nevykazovaly stejné spektrum ve dvou opakování. Velikost hodnocených RAPD produktů se pohybovala od 300 do 1500 bp.

Tabulka 2: Přehled vybraných RAPD primerů, jejich sekvence a využití v analýzách.

Název primeru	Sekvence primeru 5'-3'	Analýza variability			Počet lokusů
		druhů	LHR*	populací	
OPA- 11	CAA TCG CCG T	x	x	-	10
OPA-12	TCG GCG ATA G	x	x	x	7
OPA-18	AGG TGA CCG T	x	x	-	16
OPF-1	ACG GAT CCT G	x	x	x	11
OPF-16	GGA GTA CTG G	x	x	x	16

\* v závislosti na lokalitě výskytu, druhu hostitele a druhu rostliny

### 5.3. Metoda SSR

Pro analýzu mikrosatelitů bylo použito celkem 20 primerových párů: 5 párů - Macdonald *et al.* (2003), 10 párů - Fauvergue *et al.* (2005) a 5 párů Sandrock *et al.* (2007 – sekvence primerů sděleny ještě před vydáním článku). I přes uvedené teploty annealingu každého primerového páru ve člancích, byla tato teplota pro každý primerový pár ověřena, popřípadě optimalizována. Každý primerový pár byl testován na DNA několika náhodně vybraných jedinců. Stabilní a opakovatelné fragmenty poskytovaly tyto primerové páry: Lysi03, Lysi05, Lysi06, Lysi08, Lysi13 (Sandrock *et al.*, 2007) a LysiF10 (Fauvergue *et al.*, 2005). Názvy a pracovní označení, sekvence primerových párů, počet opakování motivu a annealingová teplota jsou uvedeny v tabulce 3. Maximální a minimální počet amplifikovaných fragmentů vybraných SSR primerových párů je uveden v tabulce 4. Velikost amplifikovaných fragmentů byla porovnána s velikostním standardem. Pouze u mikrosatelitových primerů Lysi03 a Lysi05 byl amplifikován počet fragmentů dle uváděné literatury (viz tab. 4). Primer Lysi05 vykazoval monomorfni charakter a nebyl zahrnut do celkového hodnocení vnitropopulační analýzy pro možné zkreslení výsledků. Ostatní vybrané mikrosatelitové primery nevykazovaly stejný počet fragmentů jako v uvedené literatuře a proto tato data byla hodnocena jako kodominantní. Z tohoto důvodu mají data pouze informační charakter. Pro demonstraci byla ze získaných



dat vytvořena kolomapa na základě sestavení společné binární matice, ve které jsou uvedeny výsledky analyzovaných populací parazitujících na přirozeném i nepřirozeném hostiteli. Zastoupení heterozygotních a homozygotních jedinců bylo možné určit v jednotlivých populacích pouze na základě spektra získaného mikrosatelitovým primerovým párem LysiF10 (17). Z výše uvedených skutečností nebylo provedeno statistické hodnocení a zastoupení homozygotů a heterozygotů bylo vyjádřeno pouze počtově na základě podobnosti získaných spekter fragmentů použitých SSR primerů

Tabulka 3: Sekvence, motiv opakování a teplota nasedání vybraných SSR primerových párů.

Název primeru	Sekvence 5' - 3'	Motiv opakování	Teplota nasedání
Lysi03* (18)	F: TTTGACTTGATGTCATGGGAAG R: TGATGAGATAAATGTTGGATAAGTGC	(GA) <sub>12</sub>	58 °C
Lysi05*(19)	F: TGAAAGGGGTAAAGGGATTC R: CAATTTTCATTTTCTTTCTCCAC	(GA) <sub>5</sub> TA(GA) <sub>2</sub> TA(GA) <sub>11</sub> TA(GA) <sub>2</sub> TA(GA) <sub>12</sub> TA(GA) <sub>2</sub>	56 °C
Lysi06*(20)	F: GTTTTATATTATTAGAAGGCTGACACC R: GGTGCTTCTTGAATAGTGAAACG	(CA) <sub>4</sub> CC(CA) <sub>11</sub>	57 °C
Lysi08*(21)	F: TGACTGAACGTGGACTTTGAT R: TCGTTAAACGTCCAACCACAT	(GT) <sub>14</sub>	58 °C
Lysi13*(22)	F: TGTATATCCATAAGGGTGTACCATAC R: TTTTCAACGATATTTATTTCTACAACG	(GT) <sub>10</sub>	54 °C
LysiF10**(17)	F: CATTGTCTATATGGGTGCAC R: TGTCCAGAAGGGTTGAATTA	(CT) <sub>14</sub>	56 °C

\*dle Sandrock *et al.* (2007); \*\* dle Fauvergue *et al.* (2005)

Tabulka 4: Počet pozic SSR primerů, maximální a minimální počet amplifikovaných fragmentů.

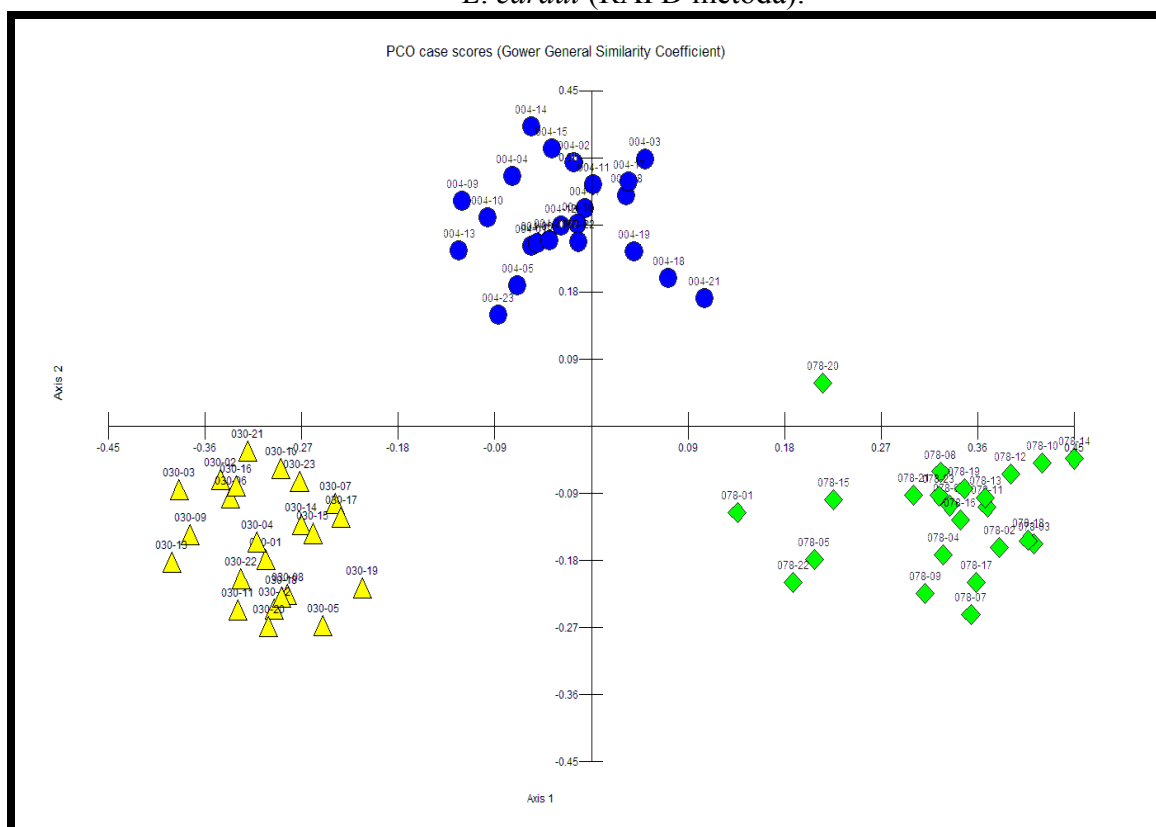
Primer	Lysi03*	Lysi05*	Lysi06*	Lysi08*	Lysi13*	LysiF10**
Počet pozic	3	4	4	4	4	1
Maximální počet fragmentů	3	4	2	1	3	1
Minimální počet fragmentů	1	1	1	1	1	1
Velikost fragmentů (bp)	70-278	111-127	197-203	80-102	113-23	132
Analýza variability druhů	–	–	–	–	–	–
Analýza variability LHR	x	x	x	x	x	x
Analýza variability lab. populací	x	x	x	x	x	x

\*dle Sandrock *et al.* (2007); \*\* dle Fauvergue *et al.* (2005)

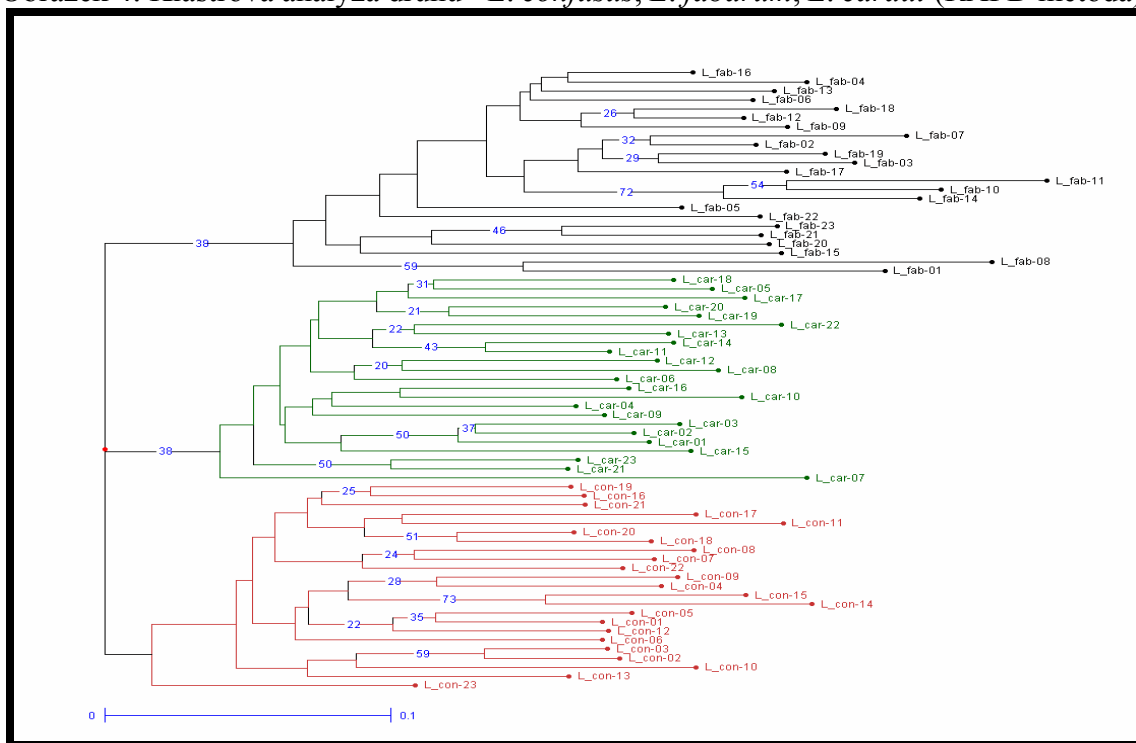
## 5.4. Stanovení mezidruhové variability

Mezidruhová variabilita byla stanovena na základě dat získaných RAPD metodou. Na obrázku 3 je každý analyzovaný druh rozmístěn v jiném kvadrantu ordinačního diagramu. Druh *L. confusus* (004) se nachází na prvním a druhém kvadrantu, *L. cardui* (030) na třetím a druh *L. fabarum* (078) na čtvrtém kvadrantu. Na základě rozptylu druhů k ose x, vykazuje druh *L. cardui* (030) větší podobnost k druhu *L. confusus* (004). Druh *L. fabarum* (078) je více podobný druhu *L. confusus* (004). Druhy *L. fabarum* (078) a *L. cardui* (030) vykazují nejmenší podobnost.

Obrázek 3: PCoA ordinační diagram – rozdělení druhů *L. fabarum*, *L. confusus*, *L. cardui* (RAPD metoda).



Obrázek 4: Klastrová analýza druhů - *L. confusus*, *L. fabarum*, *L. cardui* (RAPD metoda).



Klastrová analýza v programu DARwin na obrázku 4 opět zřetelně rozlišila všechny 3 analyzované druhy na jednotlivé klastry.

Tabulka 2: Výsledky hodnocení dat (RAPD metoda).

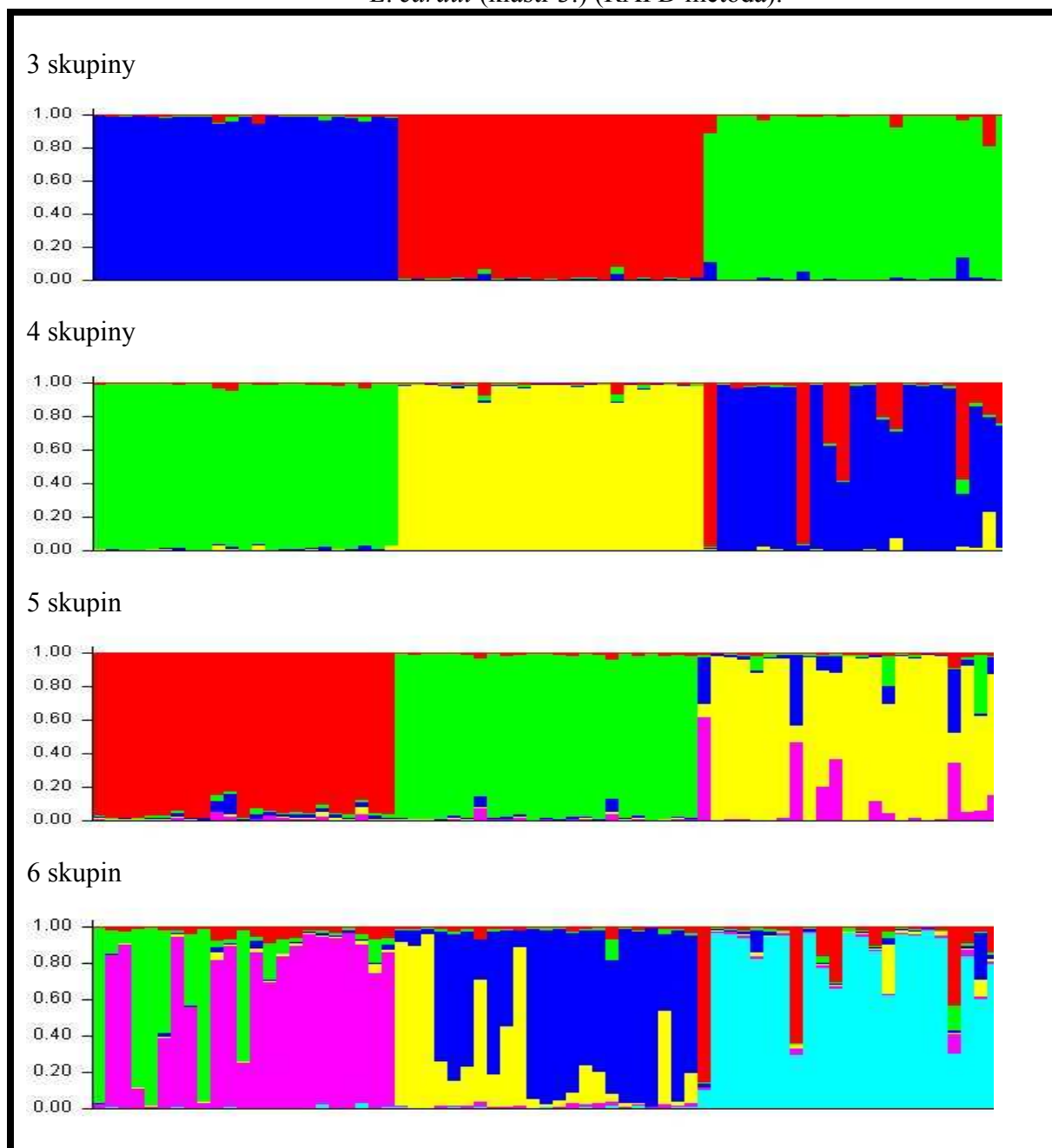
Druh	Číslo clusteru	RAPD primer/číslo lokusu markeru	Očekávaná heterozygotnost
<i>L. confusus</i> - 004	1	A11/5	0.2266
<i>L. cardui</i> - 030	2	A18/3; A18/12; F1/1; F16/3	0.2863
<i>L. fabarum</i> - 078	3	F1/1	0.2339

U každého analyzovaného druhu byl detekován marker, který se u druhu vyskytoval nejčastěji (tab. 2). Nejvíce markerů bylo detekováno u druhu *L. cardui*. Očekávaná heterozygotnost jednotlivých analyzovaných druhů je podobné hodnoty.

Výstupem analýzy programu Structure je klastrová analýza (obr. 5), znázorňující výsledky při různém počtu analyzovaných skupin. Porovnáním jednotlivých klastrů je

patrné, že při zadání třech, čtyřech, pěti a šesti skupin, byly analyzované druhy ve všech případech rozděleny jen do třech samostatných klusterů.

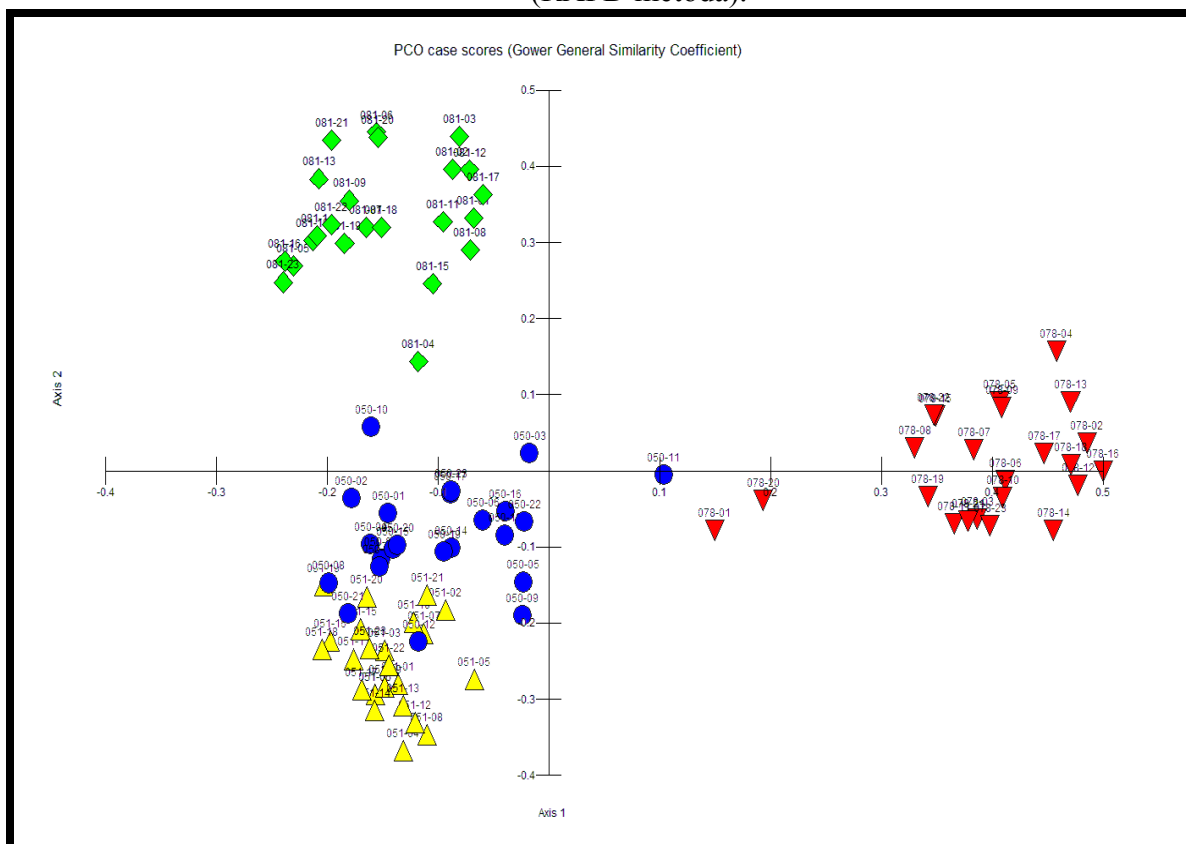
Obrázek 5: Klastrová analýza druhů - *L. confusus* (klastr 1.), *L. fabarum*(klastr 2.), *L. cardui* (klastr 3.) (RAPD metoda).



## 5.5. Stanovení vnitropopulační variability v závislosti na lokalitě výskytu, druhu hostitele a rostliny

Variabilita populací (tab. 1) byla analyzována metodami RAPD a SSR. Získaná data RAPD analýzou byla hodnocena hlavní koordinační analýzou PCoA (obr. 6), klastrovou analýzou v programu DARwin (obr. 7) a v programu Structure (obr. 8). SSR data byla hodnocena hlavní koordinační analýzou PCoA (obr. 9,10). Na obrázku 11 jsou data RAPD a SSR analýz vyhodnocena společně hlavní koordinační analýzou PCoA.

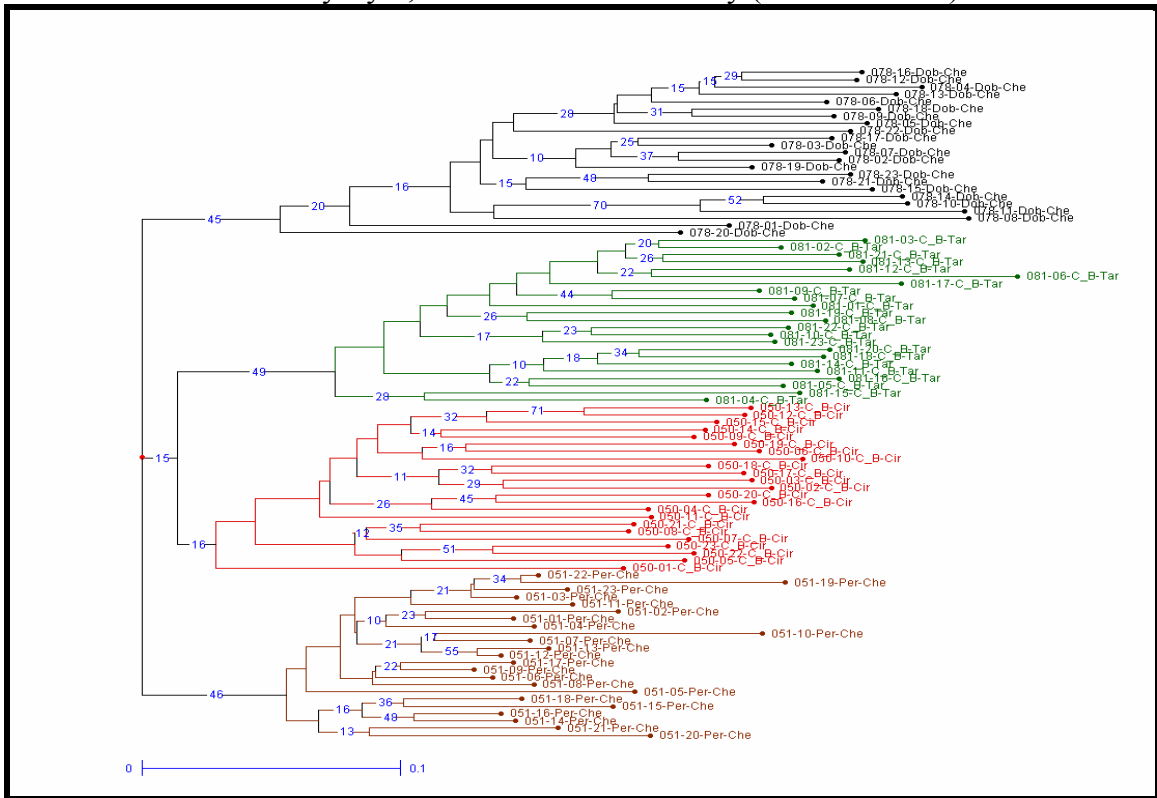
Obrázek 6: PCoA ordinační diagram – porovnání populací druhu *Lysiphlebus fabarum* (RAPD metoda).



Porovnáním rozptýlení jedinců jednotlivých populací v ordinačním prostoru na obrázku 6 je patrné, že jedinci populace 051 ve třetím kvadrantu vykazují největší

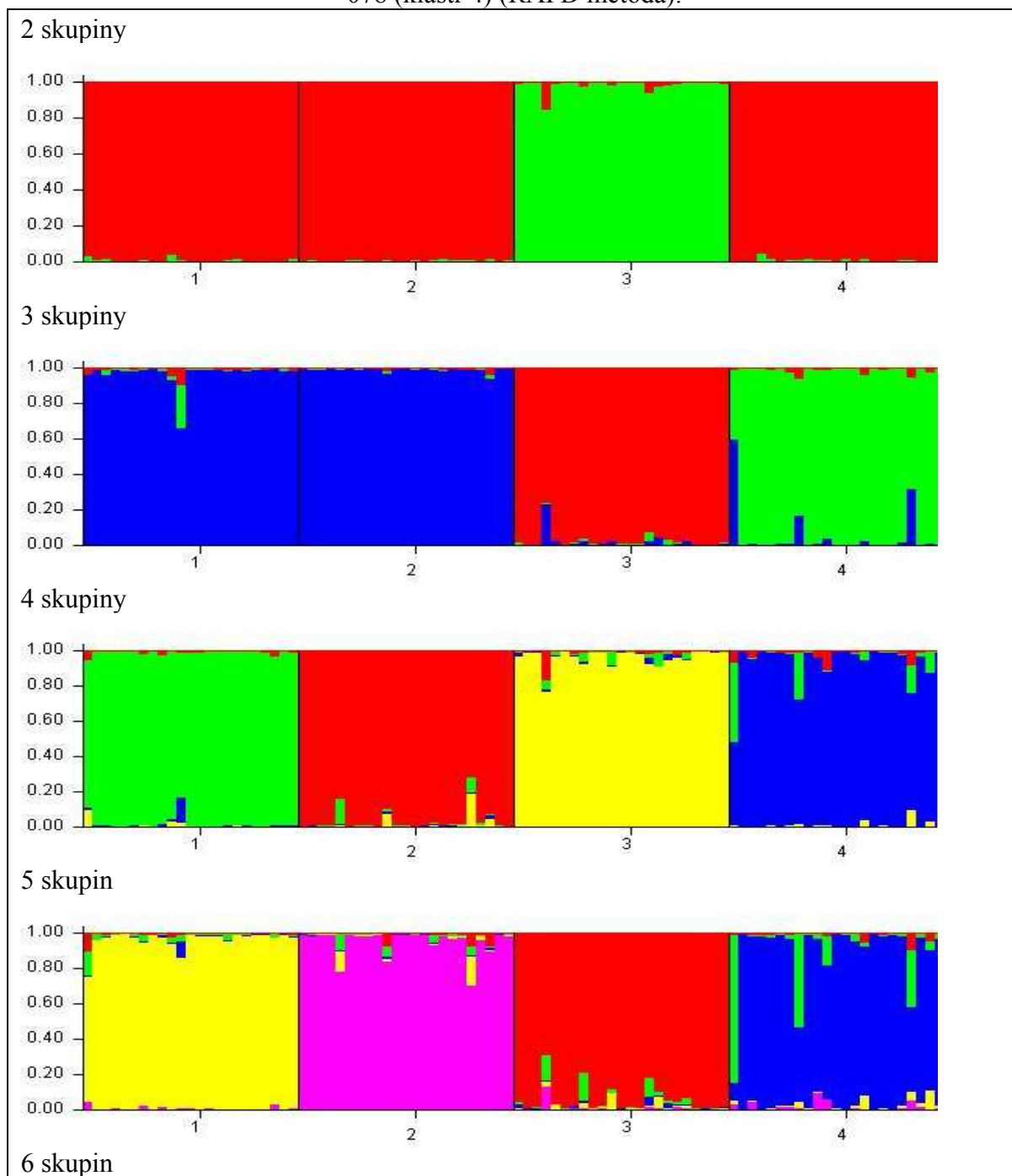
vzájemnou podobnost. Populace 050 vykazuje největší podobnost k populaci 051 a na základě rozptylu jednotlivých populací k ose x, lze stanovit vzájemnou podobnost populací 050, 051 a 081. Populace 078 je nejméně podobná k ostatním populacím.

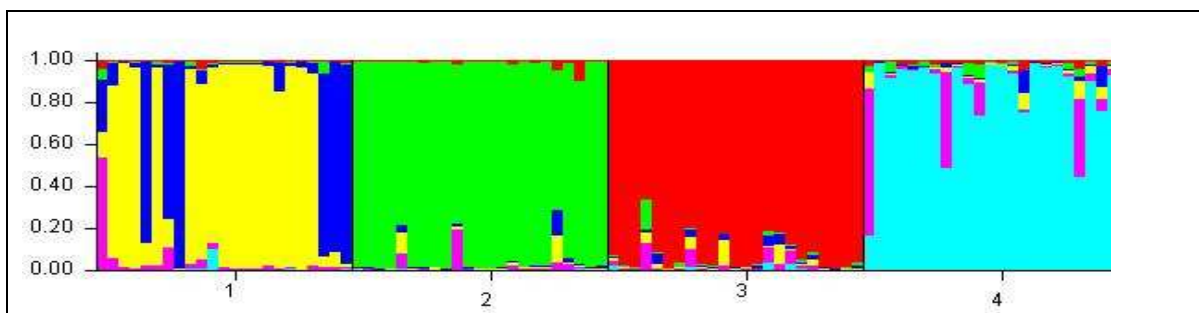
Obrázek 7: Klastrová analýza 4 populací druhu *L. fabarum* – v závislosti na lokalitě výskytu, druhu hostitele a rostliny (RAPD metoda).



Na obrázku 7 jsou zcela zřetelně rozděleny čtyři analyzované populace do čtyř samostatných klastrů. Z tohoto klastrového rozdělení je patrné, že populace 050 a 081 vykazují největší podobnost, na rozdíl od rozdělení populací v ordinačním prostoru na obrázku 6, kde největší podobnost vykazovaly populace 050 a 051.

Obrázek 8: Klastrová analýza populací: 050 (klastr 1.), 051 (klastr 2.), 078 (klastr 4) (RAPD metoda).





Na obrázku 8 jsou klastry, znázorňující vyhodnocení dat v programu Structure na základě zadání různého počtu analyzovaných skupin. Porovnáním jednotlivých klastrů je patrné, že při zadání dvou a třech skupin se vytvoří vždy tři skupiny. V tomto případě populace 050 a 051 vykazují největší podobnost, což koresponduje s hodnocením hlavní koordinační analýzy PCoA (obr. 6). Při zadání čtyř, pěti a šesti skupin došlo k vytvoření vždy čtyř skupin a je patrné, že došlo k změnám v zařazení některých jedinců do jiných populací.

Tabulka 3: Výsledky hodnocení dat (RAPD metoda).

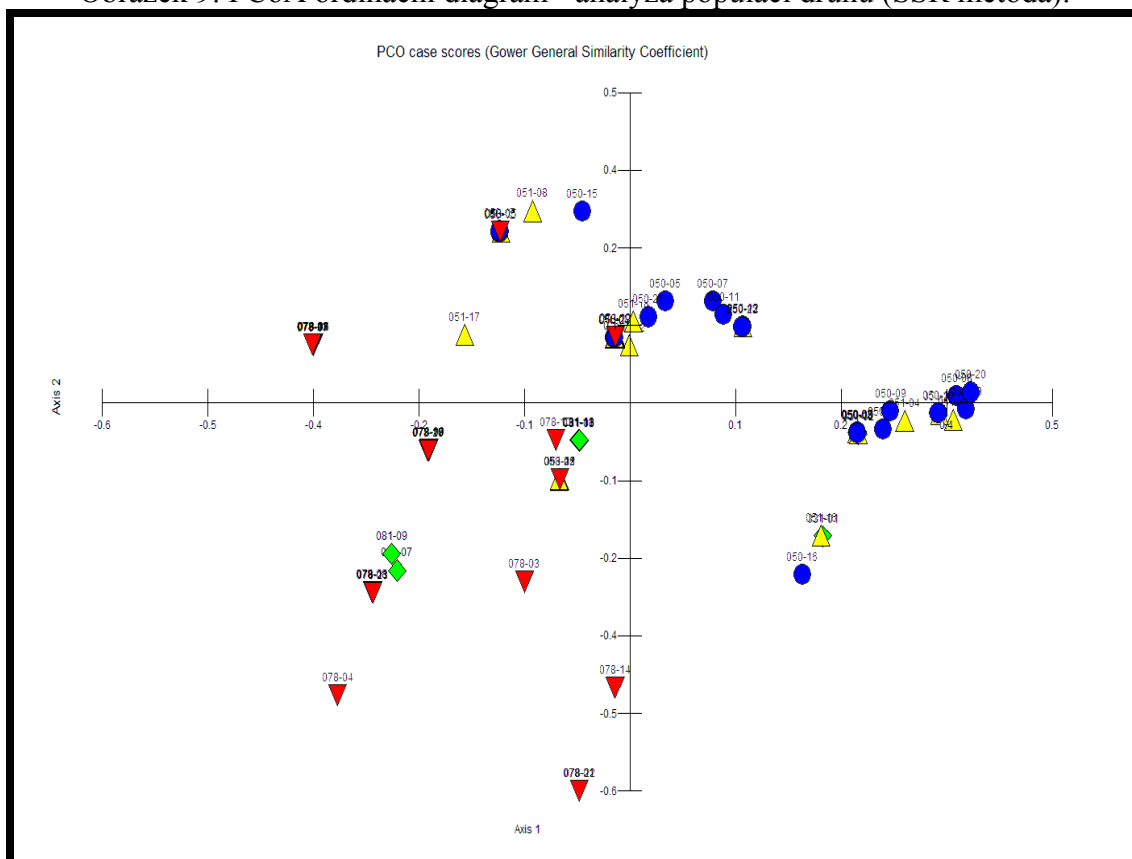
Populace	Číslo clusteru	Hodnota $F_{st}$	RAPD primer/číslo lokusu	Očekávaná heterozygotnost
050	1	0.5039	A11/5; A11/6; A18/8; A18/15; F1/11	0.1775
051	2	0.2715	-	0.2678
081	3	0.3532	A11/9; A18/4; A18/9; A18/12; F16/3; F16/6	0.2660
078	4	0.3393	F1/4	0.2492

Až na populaci 051 byl u každé analyzované populace detekován marker, který se dané populace vyskytoval nejčastěji (tab. 3). Nejvíce markerů bylo detekováno u populace 081 – šest markerů. Očekávaná heterozygotnost jednotlivých analyzovaných populací vykazuje podobné hodnoty.

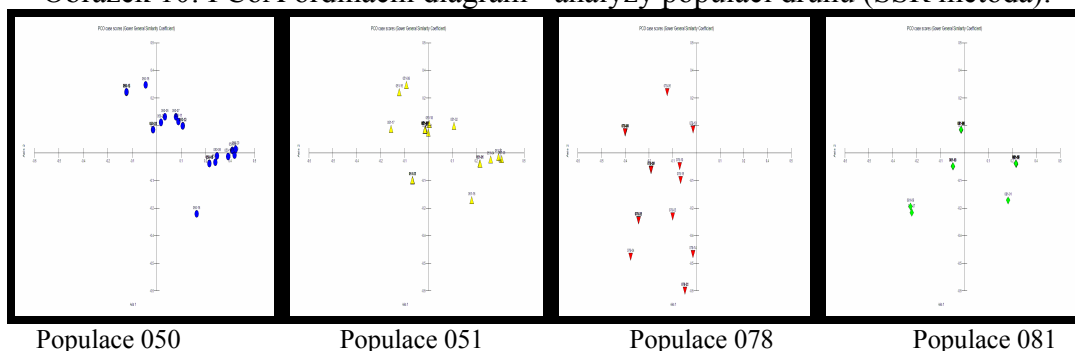
Dále byly stanoveny hodnoty fixačního indexu ( $F_{st}$ ) pro jednotlivé analyzované populace. Průměrná hodnota  $F_{st} = 0.37045$  poukazuje na značně velkou genetickou diferenciaci. Z celkové genetické variability je téměř 37% způsobeno variabilitou mezi populacemi a 63% připadá na variabilitu uvnitř populací.



Obrázek 9: PCoA ordinační diagram - analýza populací druhu (SSR metoda).



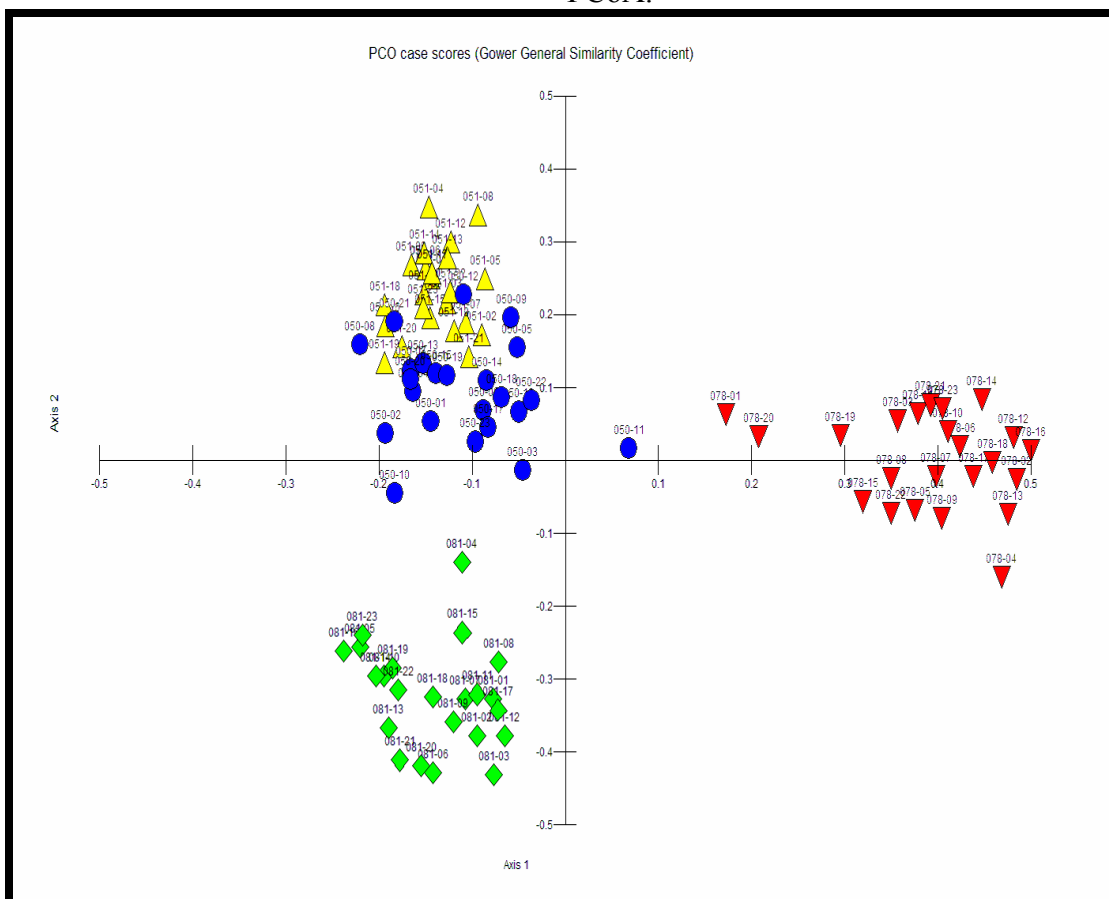
Obrázek 10: PCoA ordinační diagram - analýzy populací druhu (SSR metoda).



Na obrázku 9 jsou analyzované populace druhu *L. fabarum* znázorněny ve společném ordinačním diagramu a na obrázku 10 je každá populace v ordinačním prostoru znázorněna samostatně. Z diagramů je patrný podobný rozptyl v rámci ordinačního prostoru u populací 051 a 050, tyto populace opět vykazují největší podobnost.

Zatímco populace 078 je nejvíce rozptýlená ve třetím kvadrantu a tím vykazuje nejmenší podobnost k ostatním analyzovaným populacím. Tento trend koreluje s výsledky RAPD analýzy (obr. 6).

Obrázek 11: RAPD a SSR data populací hodnocena hlavní koordinační analýzou PCoA.

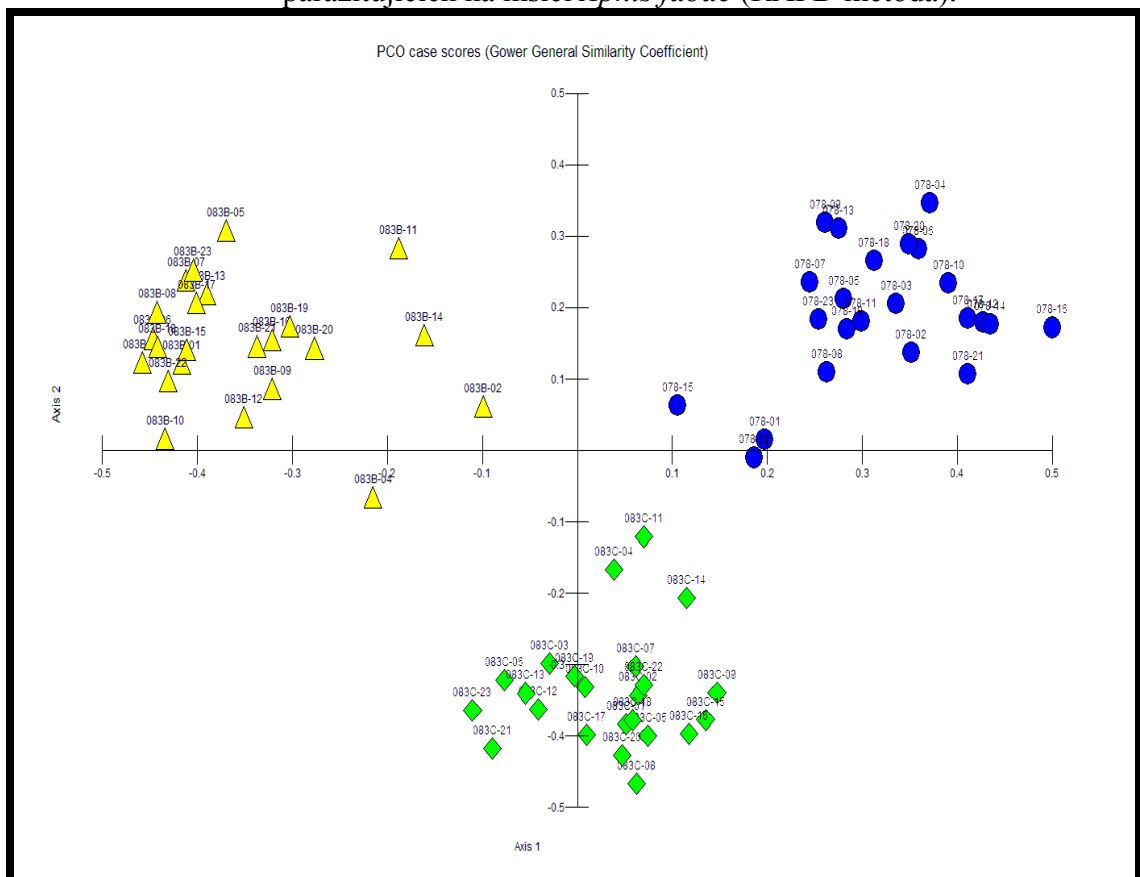


Z obrázku 11 je patrné, že výsledky RAPD a SSR metod analyzovaných populací vykazují jednotný trend rozptýlení v rámci ordinačního diagramu. Populace 051 a 050 vykazují největší podobnost, zatímco populace 078 na základě rozptylu jednotlivých populací k ose x vykazuje nejmenší podobnost k ostatním analyzovaným populacím.

## 5.6. Stanovení vnitropopulační variability v závislosti na parazitaci přirozeného hostitelského druhu

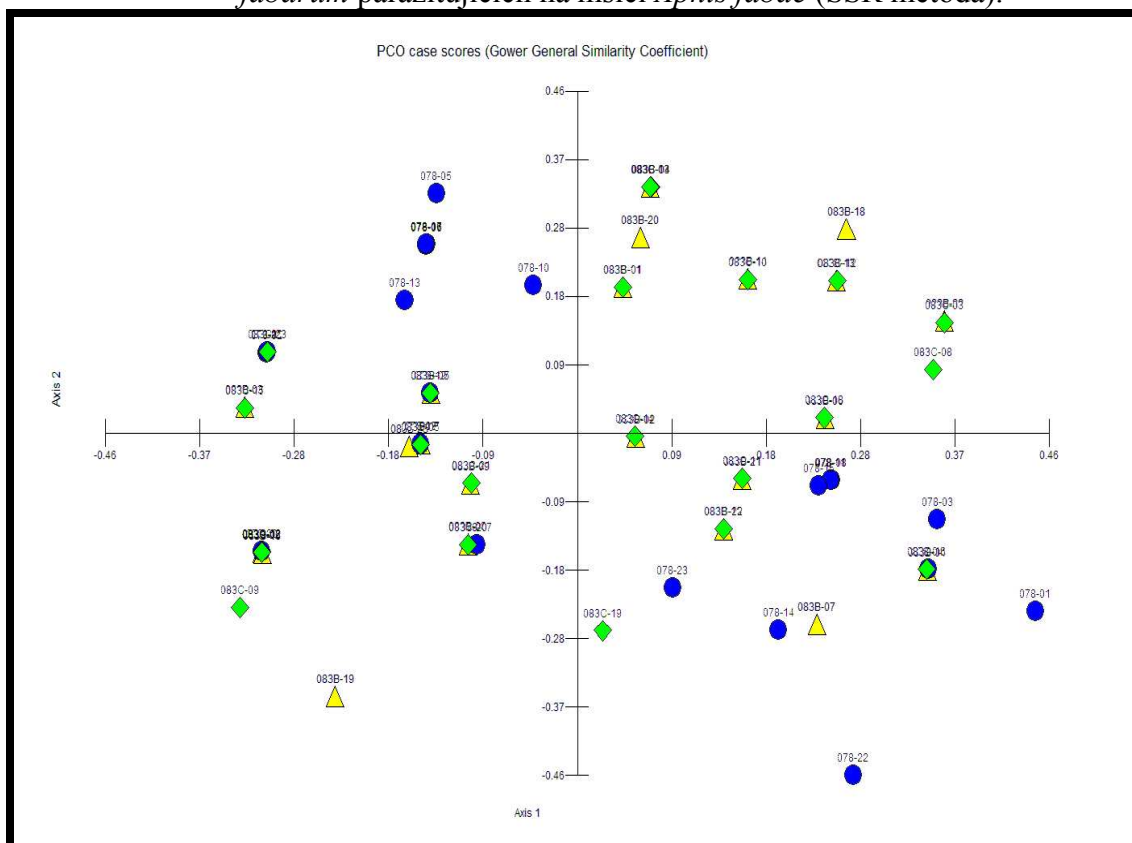
Variabilita populací parazitujících na přirozeném hostitelském druhu byla analyzována metodami RAPD a SSR. Získané výsledky byly vyhodnoceny hlavní koordinační analýzou PCoA (obr. 13).

Obrázek 13: PCoA ordinační diagram – porovnání populací druhu *Lysiphlebus fabarum* parazitujících na mšici *Aphis fabae* (RAPD metoda).

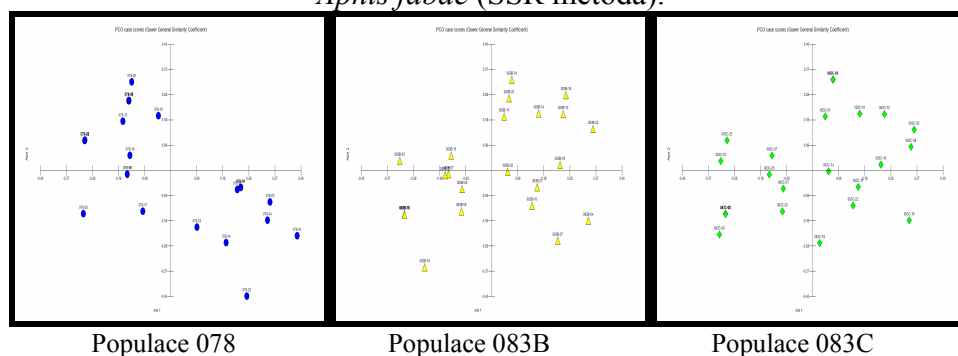


Na obrázku 13 jsou analyzované populace rozděleny v ordinačním prostoru. Porovnáním rozptylů jednotlivých jedinců populací k ordinační ose x, vykazují populace 083B a 078 nejmenší podobnost.

Obrázek 14: PCoA ordinační diagram – porovnání populací druhu *Lysiphlebus fabarum* parazitujících na mšici *Aphis fabae* (SSR metoda).



Obrázek 15: PCoA ordinační diagram populací *L. fabarum* parazitujících na mšici *Aphis fabae* (SSR metoda).



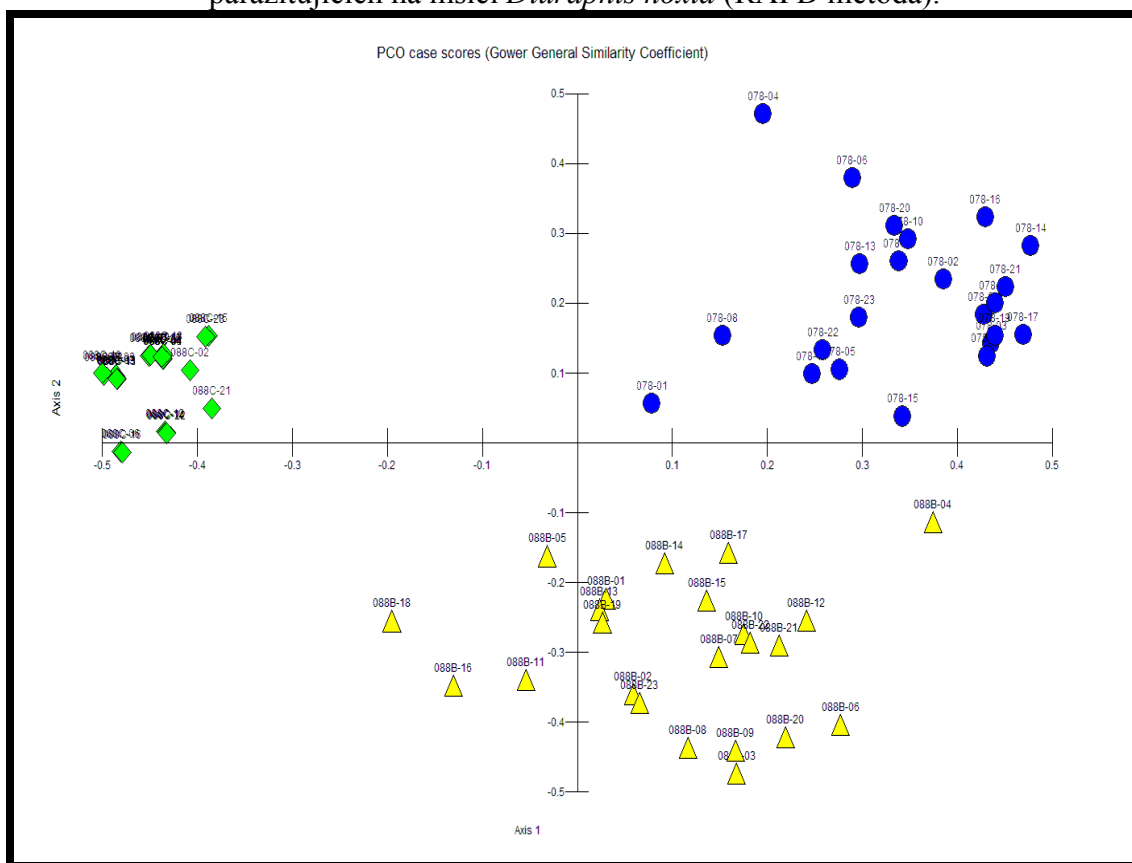
Na obrázku 14 jsou analyzované populace 078, 083B a 083C znázorněny ve společném ordinačním diagramu a jsou rozptýleny po celém prostoru. Z obrázku 15 je patrný podobný rozptyl populací 083C a 08B. Odlišný rozptyl vykazuje populace 078, který je od prvního kvadrantu ke čtvrtému. Porovnáme-li výsledky RAPD a SSR metody je

patrné, že v obou metodách vykazovala výchozí mateřská populace 078 nejmenší podobnost k oběma dceřným populacím (083B a 083C).

## 5.7. Stanovení vnitropopulační variability v závislosti na parazitaci nepřírozeného hostitele

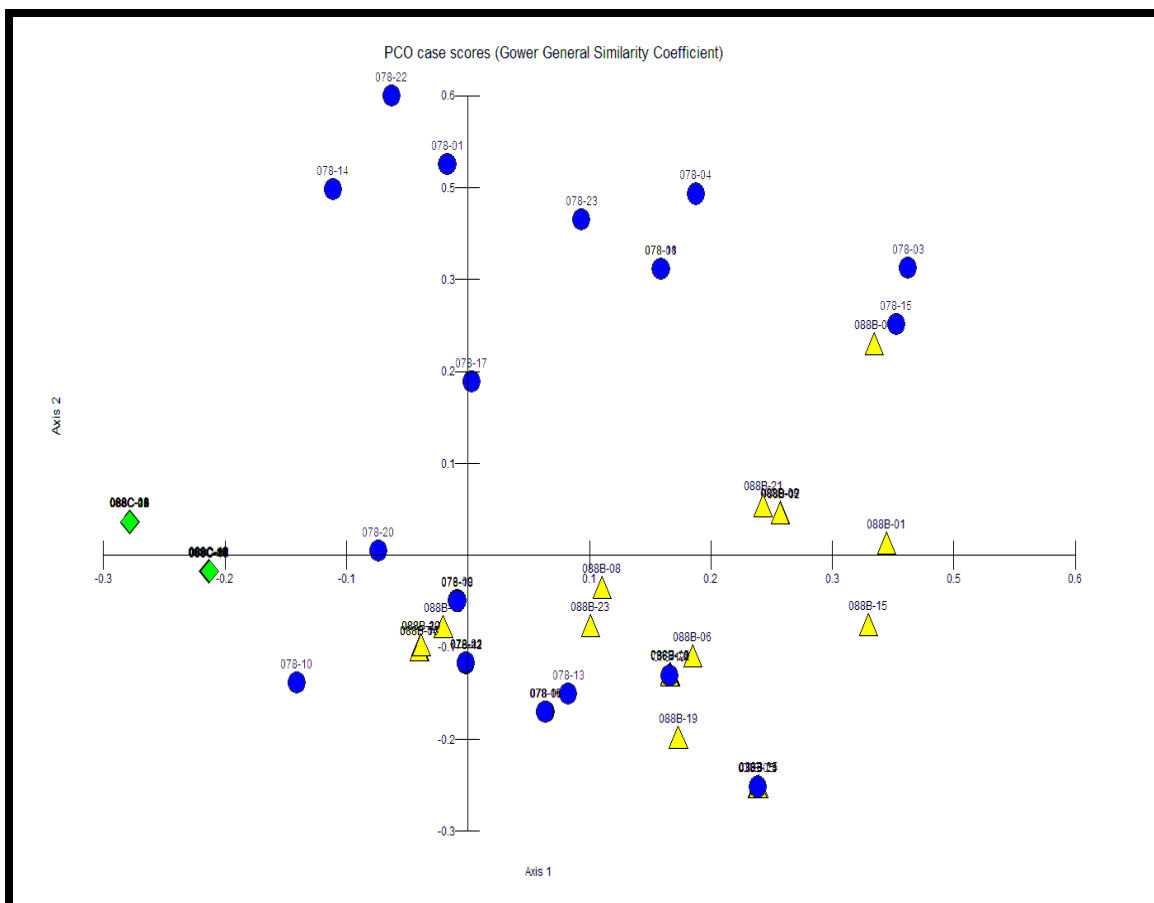
Variabilita populací parazitujících na nepřírodném hostiteli byla analyzována metodami RAPD a SSR. Získané výsledky byly hodnoceny hlavní koordinační analýzou PCoA (obr. 15, 16, 17).

Obrázek 15: PCoA ordinační diagram – porovnání populací druhu *L. fabarum* parazitujících na mšici *Diuraphis noxia* (RAPD metoda).

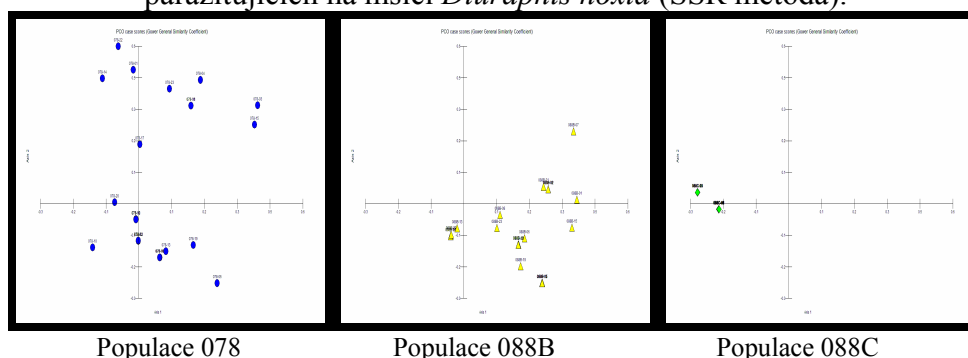


Na obrázku 15 jsou analyzované populace rozděleny v ordinačním prostoru. Jedinci populace 088C vytvořili zcela samostatnou skupinu v prvním kvadrantu a vykazují nejmenší rozptýlení v porovnání s ostatními populacemi. Porovnáním populací k ordinační ose x, vykazují populace 088C a 078 nejmenší vzájemnou podobnost.

Obrázek 16: PCoA ordinační diagram – porovnání populací druhu *Lysiphlebus fabarum* parazitujících na mšici *Diuraphis noxia* (SSR metoda).



Obrázek 17: PCoA ordinační diagram – porovnání populací druhu *Lysiphlebus fabarum* parazitujících na mšici *Diuraphis noxia* (SSR metoda).



Na obrázku 16 jsou analyzované populace 078, 088B a 088C znázorněny v ordinačním diagramu společně a na obrázku 17 je každá populace v ordinačním prostoru znázorněna samostatně. Jedinci populace 078 jsou rozptýleni v rámci celého ordinačního prostoru. Rozptyl populace 088B směřuje nejvíce ke čtvrtému kvadrantu. Na prvním

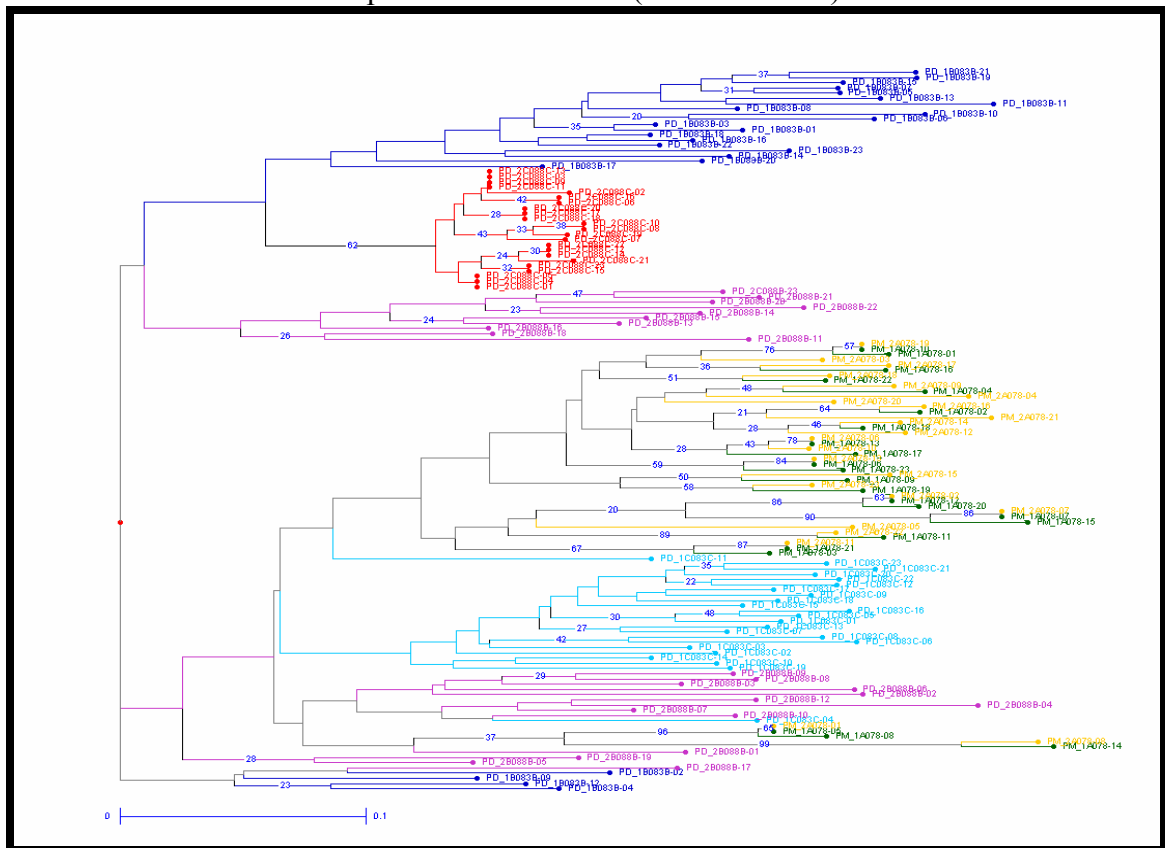
kvadrantu jsou vytvořeny dva shodné shluky jedinců populace 088C, které v porovnání s populací 088B vykazují nejmenší podobnost na rozdíl od výsledků RAPD dat, kde nejmenší podobnost vykazují populace 078 a 088C.

## 5.8. Porovnání vnitropopulační variability populací parazitujících na přirozeném i nepřirozeném hostiteli

### 5.8.1 Metoda RAPD

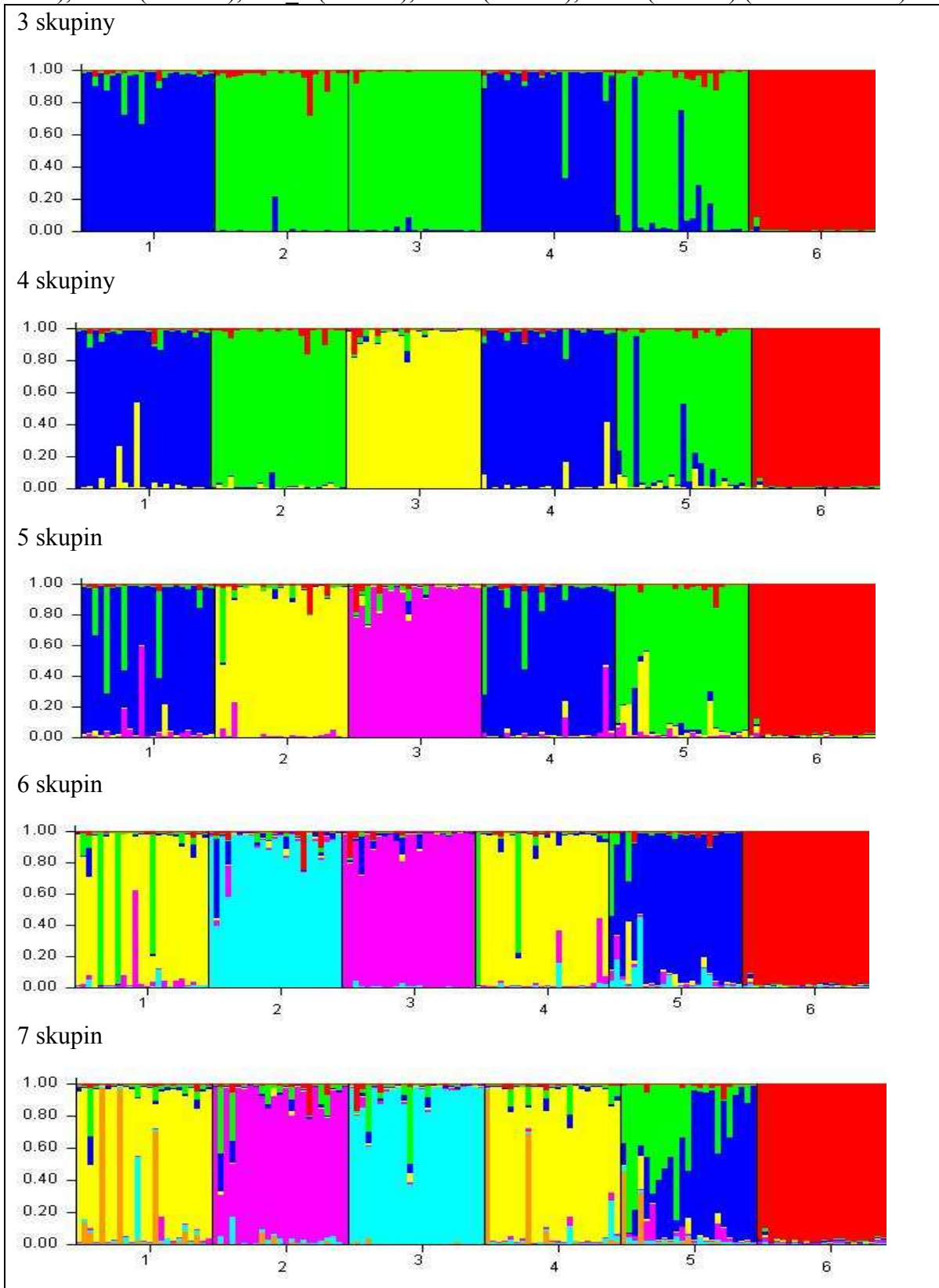
Variabilita uvnitř jednotlivých analyzovaných populací druhu *L. fabarum* je vyhodnocena klastrovou analýzou v programu DARwin (obr. 18).

Obrázek 18: Klastrová analýza populací druhu *L. fabarum* parazitujících na přirozeném i nepřirozeném hostiteli (RAPD metoda).



Na obrázku 18 jsou populace rozděleny do dvou klastrů. První klastř je tvořen dceřinými populacemi: zhruba 1/2 populace 088B, 2/3 populace 083B a celou populací 088C. Druhý klastř je tvořen oběma mateřskými populacemi 078\_1 a 078\_2, dále populací 083C, 1/2 populace 088B a 1/3 populace 083B. Je zřejmé, že populace 088C vykazuje nejmenší podobnost k své mateřské populaci 078.

Obrázek 19: Klastrová analýza populací druhu *L. fabarum*: 078\_1 (klastr 1.), 083B (klastr 2.), 083C (klastr 3.), 078\_2 (klastr 4), 088B (klastr 5), 088C (klastr 6) (RAPD metoda).





Na obrázku 19 jsou analyzované populace rozděleny podle zadání různého počtu analyzovaných skupin. Při zadání třech skupin byly vytvořeny skutečně tři skupiny: první byla složena z mateřských populací 078\_1 a 078\_2, druhá z dceřiných 083B, 083C a 088B, třetí samostatnou skupinu vytvořila populace 088C. Při zadání čtyř skupin se opět vytvořily čtyři skupiny, kde v první skupině byly obě mateřské populace 078\_1 a 078\_2, druhou skupinu vytvořily dceřiné populace 083B a 088B, samostatné skupiny tvořily populace 083C a 088C. Zadáním pěti, šesti a sedmi skupin se již vždy vytvořilo šest skupin korespondující se šesti analyzovanými populacemi. V rámci jednotlivých klastrů i napříč zvolenými skupinami je patrná variabilita uvnitř jednotlivých populací a nástin existence subpopulací. Populace 088C vykazuje v porovnání s ostatními populacemi nejmenší variabilitu .

Tabulka 4: Výsledky hodnocení dat (RAPD metoda).

Populace	Číslo clusteru	Hodnota $F_{st}$	RAPD primer/číslo lokusu	Očekávaná heterozygotnost
<b>078_1</b>	1	0.1356	-	0.3352
<b>083B</b>	2	0.3742	-	0.2369
<b>083C</b>	3	0.3737	-	0.2392
<b>078_2</b>	4	0.1972	-	0.3041
<b>088B</b>	5	0.2105	F16/8	0.2824
<b>088C</b>	6	0.8322	A12/4; A12/6; F1/5; F1/6; F1/8	0.0716

Pro populace 088B a 088C byly zjištěny nejčastěji se vyskytující markery (tab. 4). Je zajímavé, že nejvíce markerů bylo nalezeno u populace, která po parazitaci nepřírozeného hostitele. Dále byly dále stanoveny hodnoty fixačního indexu ( $F_{st}$ ) pro jednotlivé analyzované populace. U populací parazitujících na přirozeném hostiteli je průměrná hodnota  $F_{st} = 0.37045$ , což poukazuje na značně velkou genetickou diferenciaci. Z celkové genetické variability je téměř 37% způsobeno variabilitou mezi populacemi a zbývajících 63% připadá na variabilitu uvnitř populací. U populací parazitujících na nepřirozeném hostiteli je průměrná hodnota ještě vyšší  $F_{st} = 0.4133$ , znamená to také značně velkou genetickou diferenciaci, kde z celkové genetické variability je přibližně 41% způsobeno variabilitou mezi populacemi a zbývajících 51% připadá na variabilitu uvnitř populací. Z tabulky 4 je patrné, že největší fixační hodnota byla stanovena

u populace 088C, která ve všech analýzách vykazovala nejmenší podobnost k ostatním populacím a očekávaná heterozygotnost této populace dosahovala nejmenší hodnoty.

### 5.8.2. SSR metoda

Četnost homozygotů a heterozygotů (tab. 5) byla stanovena na základě získaných SSR spekter amplifikovaných fragmentů u jedinců v jednotlivých populacích. Z tabulky 5 je patrný trend většího zastoupení homozygotních jedinců u populací parazitujících nepřírozeného hostitele. Tyto výsledky potvrzují výsledky získané z RAPD dat (tab. 4).

Výsledky analyzovaných populací parazitujících na přirozeném i nepřírozeném hostiteli jsou společně uvedeny v kolormapě (tab. 6). SSR markery byly hodnoceny jako kodominantní markery: bílé pole prezentuje nepřítomné (0) a zelené pole přítomné (1) SSR alely. Kolormapa graficky znázorňuje zastoupení homozygotních a heterozygotních jedinců uvedených v tabulce 5. Je patrné, že vlivem parazitace nepřírozeného hostitele došlo ke změně struktury populace druhu *Lysiphlebus fabarum*.

Tabulka 5: Počty homozygotů a heterozygotů analyzovaných populací parazitujících na přirozeném (071\_1; 083\_B; 083\_C) a nepřírozeném (078\_2; 088\_B; 088\_C) hostiteli dle výsledků z elektroforetické separace mikrosatelitového primer 17.

Populace	Počet homozygotů	Počet heterozygotů
078_1	9	14
083_B	6	17
083_C	6	17
078_2	9	14
088_B	17	6
088_C	16	7

Tabulka 6: Kolormapa - přehled výsledků analýzy laboratorních populací (SSR metoda).

Populace	Pattern	17a	17b	18b	18c	18d	20b	21	22c	17a	17b	18b	18c	18d	20b	21	22c	Pattern	Populace
078_1	H_52																	H_54	078_2
078_1	H_43																	H_44	078_2
078_1	H_53																	H_44	078_2
078_1	H_46																	H_43	078_2
078_1	H_55																	H_3	078_2
078_1	H_46																	H_45	078_2
078_1	H_42																	H_44	078_2
078_1	H_44																	H_43	078_2
078_1	H_51																	H_53	078_2
078_1	H_32																	H_33	078_2
078_1	H_34																	H_33	078_2
078_1	H_59																	H_32	078_2
078_1	H_59																	H_33	078_2
078_1	H_36																	H_15	078_2
078_1	H_38																	H-15	078_2
078_1	H_7																	H_56	078_2
078_1	H_8																	H_24	078_2
078_1	H_24																	H_21	078_2
078_1	H_12																	H_22	078_2
078_1	H_24																	H_2	078_2
078_1	H_16																	H_3	078_2
078_1	H_12																	H_4	078_2
078_1	H_11																	H_1	078_2
088_B	H_28																	H_27	088_B
088_B	H_47																	H_58	088_B
088_B	H_53																	H_26	088_B
088_B	H_43																	H_25	088_B
088_B	H_48																	H_58	088_B
088_B	H_40																	H_50	088_B
088_B	H_31																	H_54	088_B
088_B	H_32																	H_54	088_B
088_B	H_35																	H_52	088_B
088_B	H_32																	H_50	088_B
088_B	H_32																	H_53	088_B
088_B	H_39																	H_53	088_B
088_B	H_37																	H_54	088_B
088_B	H_57																	H_49	088_B
088_B	H_14																	H_50	088_B
088_B	H_9																	H_53	088_B
088_B	H_19																	H_53	088_B
088_B	H_11																	H_34	088_B
088_B	H_10																	H_36	088_B
088_B	H_17																	H_18	088_B
088_B	H_20																	H_12	088_B
088_B	H_22																	H_13	088_B
088_B	H_23																	H_6	088_B
088_C	H_28																	H_55	088_C
088_C	H_47																	H_55	088_C
088_C	H_43																	H_55	088_C
088_C	H_53																	H_55	088_C
088_C	H_40																	H_55	088_C
088_C	H_41																	H_55	088_C
088_C	H_32																	H_55	088_C
088_C	H_32																	H_55	088_C
088_C	H_30																	H_55	088_C
088_C	H_31																	H_55	088_C
088_C	H_32																	H_55	088_C
088_C	H_35																	H_55	088_C
088_C	H_33																	H_55	088_C
088_C	H_39																	H_55	088_C
088_C	H_20																	H_55	088_C
088_C	H_19																	H_55	088_C

088_C	H_17						H_29	088_C
088_C	H_57						H_29	088_C
088_C	H_9						H_29	088_C
088_C	H_57						H_29	088_C
088_C	H_14						H_29	088_C
088_C	H_5						H_29	088_C
088_C	H_22						H_29	088_C

## 6. Diskuze

### 6.1. Analyzovaný materiál

Z důvodu vyloučení vlivu křížení, které zvyšuje genetickou variabilitu potomstva, byl pro analýzy vnitropopulačních studií zvolen druh *Lysiphlebus fabarum*, který se rozmnožuje partenogeneticky. Existenci partenogenetických druhů v rámci rodu *Lysiphlebus* potvrzují práce Starý (1966, 1976, 1986, 2006) a Belshaw *et al.* (1999). Právě Belshaw *et al.* (1999) vysvětluje partenogenetické rozmnožování působením bakterie rodu *Wolbachia*. Tato studie však nebyla dosud potvrzena. Výsledky ve studii Starý *et al.* (2002) dokazují výskyt partenogenetických populací rodu *Lysiphlebus* až v oblastech Korey. Existenci biparentálního i partenogenetického způsobu rozmnožování populací v rámci jednoho druhu, avšak geograficky oddělených, lze dle studie Koivisto *et Braig* (2003) označit za tzv. geografickou partenogenezí.

Pro stanovení vlivu parazitace nepřirozeného hostitele na vnitropopulační variabilitu parazitoida byl za nepřirozený hostitelský druh zvolena mšice *Diuraphis noxia* (Kurdj.). Tato mšice představuje přirozeného hostitele pro druhy rodu *Aphidius*: *A. colemani*, *A. ervi*, *A. matricariae*, *A. rhopalosiphi*, *A. uzbekistanicus*, druh *Ephedrus plagiator*, druh *Diaeretiella rapae* a druhy *Praon gallicum* a *P. volucre* (Starý, 2006). Mšice *Diuraphis noxia* je systematicky vzdálena od přirozených hostitelských druhů, které jedinci rodu *Lysiphlebus* parazitují. Druh *Lysiphlebus fabarum* napadá mšice rodu *Aphis* (*A. balloticola*, *A. brohmeri*, *A. chloris*, *A. confusa*, *A. coronillae*, *A. craccivora*, *A. cytisorum*, *A. fabae*) (Starý, 2006). Do střední Evropy mšice *Diuraphis noxia* expandoval z jihovýchodní Evropy (Starý *et al.*, 1993) stejně tak jako analyzovaný druh *Lysiphlebus fabarum*. Tato podobnost měla zamezit (a také zamezila) vzniku situace, ve které by nedošlo k žádné parazitaci nepřirozeného hostitele studovaným druhem.

## 6.2. Metoda izolace DNA

Metoda izolace DNA pro vnitropulační studie druhu *Lysiphlebus fabarum* musela vykazovat dostatečné množství a kvalitu DNA s ohledem na malý vstupní materiál. Při výběru metody bylo dále přihlédnuto na časovou, metodickou a finanční nenáročnost. Tato kritéria splňovaly tři metody izolace DNA – alkalická, SDS, a chelatační. První metoda izolace DNA – alkalická, vykazovala při detekci DNA na agarózovém gelu její degradaci; metoda SDS, poskytovala vysoce kvalitní DNA, avšak byla časově náročná v porovnání s třetí metodou izolace DNA – Chelex 100, která z hlediska časové, metodické i finanční nenáročnosti byla vybrána za optimální i přes to, že neumožňuje kvantifikaci DNA na spektrofotometrickém přístroji. Kvalita, kvantita a integrita DNA byla tedy zjištěna elektroforetickou separací na 1,5 % agarózovém gelu. Ve studiích Edwards *et Hoy* (1993) a Gozlan *et al.* (1997) zabývajících se genetickou variabilitou byla tato metoda úspěšně použita pro RAPD analýzu a Winder *et al.* (1997) a Gerven *et al.* (1998) ji použili pro SSR analýzu.

## 6.3. RAPD a SSR metoda

Heckel (2003) zastává názor, že během několika let došlo k výraznému zvýšení využití DNA markerů u hmyzu a to nejen v ekologických a populačních studiích, ale také při výzkumech fylogenetiky, populační dynamiky nebo při mapování genů. Do té doby byly studie diverzity, ekologie, migrace a dědičnosti znaků hmyzu založeny na hodnocení fenotypových znaků (např. barva očí, anatomické rozměry těla, páteře) (Barlett *et al.* 1968; Fay *et Craig*, 1969). Behura (2006) upřednostňuje DNA analýzy před analýzami proteinů z důvodu větší variability a stability vzorků. Domnívá se také, že při entomologických studiích, zabývajících se populačními a fylogenetickými analýzami, je nutné využívat právě DNA metody. Dle Kim *et Sappington* (2004) mohou různé druhy molekulárních markerů odhalit různé hodnoty genetické variability. V této studii pro detekci genetické variability v rámci rodu *Lysiphlebus* byly zvoleny dvě metody, které se od sebe liší právě typem molekulárních markerů. RAPD metoda detekuje dominantní znaky a k amplifikaci jsou používány nespecifické primery. Metoda mikrosatelitů detekuje kodominantní znaky a

k amplifikaci jsou používány specifické primery. Tyto dva typy molekulárních markerů použili ke stanovení genetické variability druhů a populací také ve studii Figueroa *et al.* (1999) a konstatovali, že jejich použitím získáváme přesnější informace důležité pro studie populační biologie, genetické variability a genetické struktury. Bardakci (2000) zastává názor, že je potřeba 2-10x více vzorků pro analýzu dominantních markerů, aby byla dosažena stejná statistická průkaznost jako u kodominantních markerů.

### 6.3.1. RAPD metoda

Pro genetické studie není v současné době metoda RAPD tak využívána jako metoda SSR. Z důvodu nízké reprodukovatelnosti doporučuje Greenstone (2005) RAPD metodu využívat pouze pro restriční aplikace. Black (1993) nedoporučuje tuto metodu používat v populačních studiích právě kvůli špatné reprodukovatelnosti RAPD fragmentů, čímž se snižuje spolehlivost výsledků. Hadrys *et al.* (1992) klade důraz na optimalizaci koncentrace reakčních komponent ve směsi a na optimalizaci teplotního profilu reakce, neboť jen tak bude zajištěna reprodukovatelnost amplifikovaných fragmentů. Ve studiích Callejas *et al.* (2005) a Kim *et al.* (2004) byla RAPD reakce provedena ve dvou opakování, ve studii Kengne *et al.* (2001) ve třech opakování a pro analýzu byly vybrány takové primery, které poskytovaly stabilní, opakovatelné a čitelné spektrum fragmentů. V této práci byla RAPD reakce provedena ve dvou opakování a RAPD primery byly pečlivě vybrány na základě reprodukovatelnosti amplifikovaných fragmentů s ohledem na cíl využití. To je důvodem rozdílného počtu RAPD primerů v jednotlivých studiích této práce. Celkem bylo vyzkoušeno 80 RAPD primerů. Pro určení mezidruhové variability třech druhů *L. fabarum*, *L. cardui* a *L. confusus* bylo použito pět primerů, vnitropopulační variabilita v rámci populací druhu *Lysiphlebus fabarum* byla stanovena pěti stejnými primery a detekce vzniku linií v populacích druhu *Lysiphlebus fabarum* v důsledku parazitace nepřírodního hostitelského druhu byla provedena třemi primery. Ve studii Callejas *et al.* (2005) testovali 50 RAPD primerů, z toho šest primerů zřetelně odlišilo dva druhy molic. Aljanabi *et al.* (1998) testovali 34 RAPD primerů, z toho 18 primerů použili k rozlišení čtyř druhů rodu *Trissolcus* a 13 primerů použili k populační analýze druhu *Telenomus podisi*. Citlivost RAPD metody dokazuje studie Black *et al.* (1992), ve které byly jednoznačně detekovány v těle parazitované mšice dva druhy parazitoidů – *Lysiphlebus testaceipes* a *Diaeretiella rapae*.

Bardakci (2000) zastává názor, že navzdory problému s reprodukovatelností, bude RAPD metoda využívána, pokud další metody DNA fingerprintingu budou nedostupné pro vyšší náklady nebo časovou a metodologickou náročnost.

### 6.3.2. SSR metoda

Z důvodu neznámých mikrosatelitových primerů pro analyzovaný druh *Lysiphlebus fabarum*, byly vyzkoušeny v letech 2005 - 2006 primerové páry převzaté z práce Macdonald *et al.* (2003), ve které studovali parazitoidní druh *Diaeretiella rapae*, a práce Fauvergue *et al.* (2005) studující *Lysiphlebus testaceipes*. Až na jediný primerový pár LysiF10 z práce Fauvergue *et al.* (2005) byly ostatní primery z analýzy vyřazeny, protože buď nevykazovaly stanovenou délku amplifikovaných fragmentů, nebo nedošlo vůbec k jejich amplifikaci, nebo počet amplifikovaných fragmentů převyšoval počet uvedený v citované literatuře. V roce 2006 byly pro tuto studii poskytnuty kolektivem Sandrock *et al.* (2007) sekvence mikrosatelitových primerů, které navrhli a vyzkoušeli přímo na studovaný druh *Lysiphlebus fabarum*. Primer Lysi 05 byl z hodnocení vyloučen, protože v rámci analyzovaného druhu vykazoval monomorfní fragmenty ve všech analyzovaných populacích. Ostatní primery vykazovaly menší počet amplifikovaných fragmentů, než bylo uvedeno v původní práci. Proto byla získaná SSR data hodnocena jako dominantní a tím výsledky mají pouze informativní charakter. Přesnějšího hodnocení vnitropopulační variability použitím mikrosatelitových primerů je možné dosáhnout jejich fluorescenčním značením s následným rozdělením na kapilární elektroforéze.

## 6.4. Mezidruhov<sup>á</sup> variabilita

Jednoznačné určení některých blanokřídlých jedinců je obtížné pro jejich malé rozměry a nedostatek jasných morfologických rozdílů mezi blízce příbuznými druhy. Pro rozlišení vybraných druhů rodu *Lysiphlebus* a stanovení mezidruhové variability, byla v této práci zvolena RAPD metoda. K analýze byly vybrány tyto druhy: *Lysiphlebus fabarum*, *Lysiphlebus cardui* a *Lysiphlebus confusus*. Získaná data byla hodnocena hlavní koordinační analýzou PCoA, klastrovou analýzou v programu DARwin a Structure. Ve všech analýzách došlo ke zřetelnému oddělení analyzovaných druhů. Vzájemnou podobnost vykazovaly druhy *L. cardui* a *L. confusus*. V programu Structure bylo pro porovnání druhů zadáno tři až šest skupin. V každé analýze byly vyhodnoceny pouze tři skupiny, které charakterizovaly analyzované tři druhy. Na základě získaných RAPD dat byly pro jednotlivé druhy určeny markery, které se nejvíce amplifikovaly v rámci analyzovaných druhů a jsou vhodné pro přípravu SCAR markerů. Lze tedy získat marker

pro rychlou detekci druhové příslušnosti v rámci rodu *Lysiphlebus*. Tento krok však nebyl v této práci realizován z důvodu finanční náročnosti postupu přípravy SCAR markerů. Ve studii Kengne et al. (2001) úspěšně využili SCAR markery získané z RAPD analýzy pro identifikaci druhů komárů. RAPD metoda byla také úspěšně použita ve studii Aljanabi et al. (1998), ve které byly jednoznačně odlišeny tři druhy rodu *Trissolcus* a druhy rodu *Telenomus* a také ve studii Callejas et al. (2005) byly touto metodou úspěšně odlišeny morfologicky velmi podobné dva druhy molice *Aleurodicus dispersus* a *Lecanoideus floccissimus*.

## **6.5. Vnitropopulační variabilita v závislosti na lokalitě výskytu, druhu hostitele a rostliny**

Dle Vaughn et Antolin (1998) může parazitoidní hmyz, který využívá různé hostitelské druhy, vykazovat genetickou variabilitu v rámci jednotlivých populací, v závislosti na parazitovaném hostitelském druhu, nebo lokalitě výskytu. Na druhé straně byly populace analyzované z oblastí (tab. 1) vykazující rádius přibližně 210 km, což by naznačovalo existenci velké populace. Při vnitropopulační studii v práci Kim et Sappington (2004) určily radius populací dokonce do vzdálenosti 300-400 km. Data RAPD metody byla hodnocena hlavní koordinační analýzou PCoA a shlukovou analýzou v programu Structure. Všechny populace byly zřetelně odděleny a v obou výstupech vykazovaly populace 050 a 051 největší vzájemnou podobnost. Při zadání počtu dvou a tří skupin v programu Structure, byly tyto čtyři analyzované populace rozděleny v případě zadání dvou skupin – skutečně pouze do dvou skupin, kdy jedna skupina byla tvořena populacemi 050, 051, 081 a druhá populací 078. V případě zadání třech skupin se vytvořily opět jen tři skupiny o složení: první skupina populace 050 a 051, druhá skupina populace 081 a třetí populace 078. Při zadání čtyř, pěti a šesti skupin se již vytvořily vždy čtyři skupiny, charakterizované čtyři analyzované populace. Na základě těchto výstupů vytvořených z výsledků RAPD metody, je možné stanovit nástin podobnosti populací podle parazitace stejného hostitelského druhu (populace 050 a 051) v návaznosti na stejnou lokalitu výskytu (populace 050 a 081). Do tohoto schématu však nezapadá populace 078, která parazitoval stejný hostitelský druh mšice jako populace 050 a 051 a stejnou lokalitu výskytu jako populace 081.

Ve studii Callejas et al. (2005) použitím RAPD metody nedošlo ke zřetelnému odlišení populací druhu *Aleurodicus dispersus*, v rámci populací byla nalezena vysoká genetická podobnost, kterou zdůvodnili nedávnou kolonizací druhu a tím nedošlo



k dostatečnému rozptylu druhu na sledovaném území. Ve studii Aljanabi *et al.* (1998) stanovili RAPD metodou více než 78 % podobnost populací u druhu parazitoida *Telenomus podisi*. Nízký polymorfismus odůvodňují homogenními populacemi ve stejných oblastech. Roderick (1996) zastává názor, že genetická variabilita mezi populacemi daného druhu je limitována migrací, malou velikostí populace v dané lokalitě, omezením páření a selekcí uvnitř populací. Z hodnocení RAPD dat bylo zjištěno, že z celkové genetické variability připadá téměř 37 % na variabilitu mezi populacemi a 63 % je způsobeno variabilitou uvnitř populací.

Dále v programu Structure byly vytypovány markery, které se nejvíce amplifikovaly při analýzách jednotlivých populací. Tyto markery mohou být opět použity pro navržení SCAR markerů. Tento postup nebyl realizován z důvodu finanční náročnosti sekvenační analýzy. Výsledky metody SSR vykazovaly opět větší vzájemnou podobnost populací 050 a 051, zatímco populace 078 vykazovala nejmenší podobnost k ostatním analyzovaným populacím. Společné vyhodnocení výsledků RAPD a SSR dat analýzou PCoA (obr. 11) potvrdilo výsledky, kterých bylo dosaženo samostatným hodnocením.

## **6.6. Vnitropopulační variabilita v závislosti na parazitaci přirozeného hostitelského druhu**

Vnitropopulační variabilita byla stanovena u tří populací druhu *Lysiphlebus fabarum*. Populace byly reprezentovány třemi generacemi parazitoidů: jedna mateřská generace a dvě dceřinné generace – generace potomků. Jedinci ze všech populací parazitovali na přirozeném hostitelském druhu mšice a představovali kontrolní populace k populacím parazitujícím nepřirozeného hostitele. Výsledky metod RAPD a SSR byly hodnoceny hlavní koordinační analýzou PCoA a ukazují na malou podobnost mateřské populace 078\_1 k první dceřinné populaci 083B. Stejný výsledek vykazoval ordinační diagram sestaven z SSR dat. Porovnáním rozptylu jednotlivých populací v rámci ordinačního prostoru je patrný podobný rozptyl populací 083B a 083C, odlišný rozptyl v ordinačním prostoru vykazuje populace 078, přesto nelze potvrdit vznik specifických linií.

## 6.7. Vnitropopulační variabilita v závislosti na parazitaci nepřirozeného hostitelského druhu

Vnitropopulační variabilita byla stanovena u tří populací druhu *Lysiphlebus fabarum* na základě RAPD dat. Z výstupu hlavní koordinační analýzy PCoA je patrné, že populace byly rozděleny na samostatné skupiny. Druhá dceřinná populace 088C vykazovala nejmenší podobnost k první dceřinné a mateřské populaci a jedinci populace 088C v ordinačním prostoru zaujímali nejmenší rozptyl v porovnání k první dceřinné a mateřské populaci. Tyto výsledky korelují s výsledky hlavní koordinační analýzy PCoA hodnotící SSR data, kde se v ordinačním prostoru vytvořily pouze dvě skupiny tvořené z jedinců druhé dceřinné populace. Všechny tři analyzované populace vykazují odlišný trend rozptylu v rámci ordinačního prostoru. Na základě těchto výsledků můžeme říci, že parazitací nepřirozeného hostitelského druhu došlo ke vzniku specifických linií.

## 6.8. Vnitropopulační variabilita populací parazitujících na přirozeném a nepřirozeném hostiteli

Vnitropopulační variabilita u populací parazitujících přirozeného i nepřirozeného hostitele byla stanovena společným klastrovým hodnocením. Vytvořily se dva klastry. Obě mateřské populace byly zahrnuty ve stejném klastru a populace 088C vykazovala nejmenší podobnost ke své mateřské populaci 078\_2.

Zajímavých výsledků bylo dosaženo klastrovou analýzou programu Structure. Kde při zadání třech, čtyřech, pěti a šesti skupin vytvořila druhá dceřinná populace 088C vždy samostatný klastr. Tyto výsledky opět ukazují na vznik specifických linií v důsledku parazitace nepřirozeného hostitele.

V programu Structure byly pro populace 088B a 088C vytypovány markery, vhodné pro přípravu SCAR markerů. Významné využití těchto markerů by bylo v případě snahy o detekci jedinců schopných parazitovat nepřirozeného hostitele.

V programu Structure byly dále stanoveny hodnoty  $F_{st}$  pro populace parazitující přirozeného a nepřirozeného hostitele. Hodnoty fixačního indexu byly vypočítány na základě dat získaných RAPD metodou, matice přítomnosti a nepřítomnosti fragmentů z jednotlivých elektroforeogramů. Porovnáním těchto hodnot fixačního indexu lze konstatovat, že hodnoty u mateřských populací vykazují střední genetickou diferenciaci. Zatímco dceřinné populace vykazují značně velkou genetickou diferenciaci. Zjištěné

nenulové hodnoty fixačního indexu vypovídají o tom, že celková populace není homogenní, ale je rozdělena na subpopulace. Vysoké hodnoty fixačního indexu ( $F_{st}$  0.8322) vykazovala druhá dceřinná populace 088C, což naznačuje existenci subpopulací. Porovnáním hodnot očekávané heterozygotnosti u mateřské populace a jejich dceřinných populací je patrný významný pokles této hodnoty u druhé dceřinné populace 088C. Tyto závěry jsou potvrzeny sníženým počtem heterozygotů, který byl zjištěn ze SSR dat a to i přes to, že byly hodnoceny jako dominantní markery.

V dostupné literatuře nebyla dosud popsána analýza vlivu parazitace nepřirozeného hostitele na vznik specifických linií při laboratorních podmínkách. Z tohoto důvodu není možné dostatečné porovnání dosažených výsledků s jinými studiemi.

Vybrané RAPD markery mohou poskytnout rychlou a přesnou metodologii rozlišení druhů a mohou doplnit informace nebo potvrdit spolehlivost morfologických a allozymových analýz u rodu *Lysiphlebus*. Navíc mohou být silným a užitečným nástrojem ve studiích populační biologie, genetické variability, genetické struktury, distribuci a množství různých druhů. Nicméně tyto výsledky je nutné potvrdit studií většího počtu jedinců v rámci jednotlivých populací. Pro SSR analýzu lze doporučit testování většího množství mikrosatelitových primerů, nebo v rámci finančních možností přistoupit přímo na jejich navržení. Pro získání přesnějších mikrosatelitových dat je vhodné použít metodu kapilární elektroforézy s fluorescenčně značenými mikrosatelitovými primery.

## 7. Závěr

Cílem této práce bylo posoudit vhodnost zvolených molekulárních metod pro studium vnitropopulační variability parazitoidního druhu *Lysiphlebus fabarum* v závislosti na parazitaci nepřírodního hostitelského druhu.

- V rámci práce byla stanovena optimální metoda izolace DNA – Chelex 100, která vykazovala optimální kvalitu i kvantitu DNA, byla časově, metodicky i finančně přístupná.
- Z šesti úspěšně amplifikovaných SSR primerů byl pouze jeden určen jako kodominantní. Ostatní mikrosatelitové primery nevykazovaly stejné parametry se studiemy z kterých byly převzaty a proto získaná data byla hodnocena jako dominantní. Výsledky nebyly podrobeny statistickému hodnocení a mají pouze informační charakter.
- Analyzované druhy *L. fabarum*, *L. confusus*, *L. cardui* byly zřetelně odlišeny použitím pěti RAPD primerů. Výsledky signalizují potenciál RAPD markerů k odlišení populací druhu *L. fabarum*. Pro druh *L. cardui* byly určeny potenciaální markery vhodné k přípravě SCAR markerů.
- Analyzované populace byly jednoznačně rozlišeny. Vliv lokality výskytu, druhu hostitele a rostliny však nebyl v populacích jednoznačně prokázán. Na základě hodnocení dat lze stanovit pouze nástin podobnosti populací dle parazitace stejného hostitelského druhu v návaznosti na stejnou lokalitu výskytu. Pro dvě analyzované populace byly určeny potenciaální markery vhodné k přípravě SCAR markerů.
- Metodou RAPD byl zjištěn vliv parazitace nepřírodního hostitelského druhu na genetickou variabilitu analyzovaných populací. Jedinci populace po parazitaci nepřírodního hostitele vytvořili pouze dva shodné klastry a populace vykazovala nepodobnost k mateřské populaci. Výsledky SSR analýzy, i přes její pouhý informační charakter, tento vliv potvrdily.
- Na základě výše uvedených výsledků lze stanovit vliv parazitace nepřírodního hostitele na vznik specifických populací parazitoida *Lysiphlebus fabarum*.

## 8. Souhrn / Summary

*Lysiphlebus fabarum* (Marshall) is a solitary parasitoid wasp (*Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae*) of aphids naturally occurring as both *arrhenotokous* (biparental, sexually reproducing) as well as *thelytokous* (all-female) lineages. The taxonomy of the genus *Lysiphlebus* is poorly resolved and the morphologically defined species *Lysiphlebus fabarum*. The main objectives of this study were to: 1) optimizing of the methods extraction DNA, 2) optimizing RAPD and SSR methods, 3) use RAPD markers for identification of species *L. fabarum*, *L. cardui*, *L. confusus*, 4) use RAPD and SSR markers for analyses the influence of geographical distance of host species on level genetic variability on populations *L. fabarum*, 5) use RAPD and SSR markers to the determination of the individuals lineages by the populations *L. fabarum*, 6) assessment availability used RAPD and SSR methods for study populations of analyses species *L. fabarum*.

Population genetics of host alternation in aphid parasitoids were studied on thelytokous populations of *Lysiphlebus fabarum*, which were presumed to manifest genetically stable patterns (possibly host-species dependent lineages). Model populations and isofemale populations centering the determination of the lineages and their frequency on *Aphis fabae* were analysed using RAPD and SSR molecular methods. Host alternation utilized an unnatural host, *Diuraphis noxia* (Kurdj.) in no-choice laboratory trials yielded populations manifesting different respective characters. Final comparison of the two experimental series (1 - *A.faba* - *A.fabae* - *A. fabae*, 2 - *A.fabae* - *D.noxia* - *A.fabae*) manifested differences in lineages in the final *A. fabae* populations if reared on *A. fabae* continuously or through alternation with *D. noxia*, respectively.

The 5 selected primers pair used to analyze these species produced 55 clear polymorphic markers. Six polymorphic microsatellite loci were selected for used to comparison of the two experimental series. These primers pair produced 16 clear polymorphic markers. The results indicate the potential of RAPD markers to differentiate *L. fabarum*, *L. cardui* and *L. confusus*. Species are easily distinguishable by this technique, but distinguishable of strains from distinct geographic origins were differentiation of the SSR results. However even SSR markers were not demonstration influence of geographical distance of host species on level genetic variability on analyses populations. The results (from the RAPD and SSR methods) tend on the role of host-alternation as a less selective net affecting respectively the parasitoid filial progeny on another host aphid species.

The correct identification of species and strains of these parasitoids is necessary to implement, when using parasitoids in a biological control program, to undoubtedly identify species in the natural population in order to design strategies for monitoring releases in the environment.

## 9. Seznam použité literatury

- Akinlosotu** T.A. (1978): Some aspects of the host finding behaviour of the female *Diaeretiella rapae* (McIntosh) (Hymenoptera, Aphidiidae). Nigerian Journal of Entomology. 1:11-18.
- Aljanabi** S.M., Loiacono M.S., Lourenco R.T., Borges M., Tigano M.S. (1998): RAPD analysis revealing polymorphisms in egg parasitoids of sobean sting bufs (*Hemiptera: Pentatomidae*). An. Soc. Entomol. Brasil. 27(3).
- Antolin** M.F., Bjorksten T.A., Vaughn T. (2006): Host-related fitness trade-offs in a presumed generalist parasitoid, *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae). Ecological Entomology 31:242-254.
- Anton** Ch., Settele J., Durka W. (2006): Nine polymorphic microsatellite loci for the parasitic wasp *Neotypus melanocephalus* (Hymenoptera: Ichneumonidae). Mol. Ecol. Notes. 6:399-401.
- Arbogast** B.S. (1999): Mitochondrial DNA phylogeography of the new world flying squirrels (*Glaucomys*): Implications for pleistocene biogeography. Journal of Mammalogy. 82:142-155.
- Arnheim** N., White T., Rainey W.E. (1990): Applications of PCR: organismal and population biology. BioScience. 40:174-182.
- Ayliffe** M.A., Lawrence G.J., Ellis J.G., Pryor A.J. (1994): Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. Nucleic Acids Res. 22:1632-1636.
- Bachmann** K. (1992): Nuclear DNA markers in angiosperm taxonomy. Acta bot. Neerl. 39: 369-384.
- Bandi** C., Slatko B, O'Neil S.L. (1999): *Wolbachia* genomes and the many faces of symbiosis. Parasitol. Today. 15:428-429.
- Bardakci** F. (2000): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Turk J. Biol. 25:185-196.
- Barlett** A.C., Hooker P.A., Hardee D.D. (1968): Behavior of irradiated boll weevils. I. Feeding, attraction, mating, and Mortality. Journal of Economic Entomology. 61(6): 1677-1680.
- Belshaw** R., Quicke D. (1997): A molecular phylogeny of the *Aphidiinae* (Hymenoptera: Braconidae). Molecular phylogenetics and evolution. 7:281-293.
- Belshaw** R., Quicke D.L. (2003): The cytogenetics of thelytoky in a predominantly asexual parasitoid wasp with covert sex. Genome. 46:170-173.
- Belshaw** R., Quicke D.L.J., Völkl W., Godfray H.C.H. J. (1999): Molecular marker indicate rare sex in a predominantly asexual parasitoid wasp. Evolution. 53(4):1189-1199.
- Black** W.C., Deu Teau N.M., Puterka G.J., Nechols J.R., Pettorini J.M. (1992): Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (*Homoptera: Aphididae*). Bull. Entomol. Res. 82:151-159.
- Black** W.C. (1993): PCR with arbitrary primers: approach with care. Insect Molecular Biology. 2:1 – 6.
- Broussal** G. (1966): Les *Hyménoptères* parasites et hyperparasites de *Brevicoryne brassicae* (Homoptera: Aphididae). Thesis faculté des Sciences de l'Académie de Teims.187.
- Burg** T.M., Lomax J., Amond R., Brook M.L., Amos W. (2003): Unravelling dispersal patterns in an expanding population of a highly mobile seabird, the northern fulmar (*Fulmarus glacialis*). The Royal Society. 270:979-984.
- Burke** T. (1989): DNA fingerprinting and other methods for the study of mating succes. Trends Ecol. Evol. 4: 139-144.
- Edwards** O.R., Hoy M.A. (1993): Polymorphism in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. Biol. Control. 3: 234-257.
- Edwards** O.R., Hoy M.A. (1995): Random amplified polymorphic DNA markers to monitor laboratory-selected, Pesticide-resistant *Troxys pallidus* (Hymenoptera: Aphidiidae) After release into three California Walnut Orchards. Entomology Society of America. 24(3):487-496.
- Caetano-Anollés** G., Bassam B. J., Gresshoff P.M. (1991): DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Biotechnol. 9:553-557.
- Callejas** C., Vealisco A., Gobi A., Bestia F. Ochando M.D. (2005): Fast discrimination (RAPD-PCR) of the species forming the pest complex *Aleurodicus dispersus* – *Lecanoideus floccissimus* (Hom: Aleyrodidae). Blackwell Verlag. 129 (7):382-385.
- Campbell** A., Frazer B.D. Gilbert N., Gutierrez A.P., Mackauer M. (1974): Temperature requirements of some aphids and their parasites. Journal of Applied Ecology. 11:431-438.
- Campbell** B.C., Steffen-Campbell J.D., Gill R.J. (1994): Evolutionary origin of whiteflies (*Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodidae*) inferred from 18S rDNA sequences. Insect Molec. Biol. 3:73-88.
- Carballa** O.L., Giere S., Cordero A., Hadrys H. (2007): Isolation and characterization of microsatellite loci to study parthenogenesis in the citrine forktail, *Ischnura hastata* (Odonata: Coenagrionidae). Mol. Ecol. Notes. 7(5):839-841.
- Carbonari** M., Sbarigia D., Cibati M., Fiorilli M. (1993): Optimization of PCR performance. Trends Genet. 9: 42-43.
- Carlson** J.E., Tulsieram L.K., Glaubitz J.C., Luk V.W.K., Kaufeldt C., Rutledge R. (1991): Segregation of random amplified DNA markers in F<sub>1</sub> progeny of conifers. Theor. Appl. Genet. 235:157 - 165.

- Carver M.** (1989): Biological control of aphids. Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control. Elsevier. 141-165.
- Carver M., Franzmann B.** (2001): *Lysiphlebus* Forster (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) in Australia. Australina Journal of entomology. 40:198-201.
- Caterino M.S., Cho S., Sperling F.A.H.** (2000): The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. Annu. Rev. Entomol. 45: 1-54.
- Cierniewska B.** (1976): Studies on the ecology of *Ephedrus persicae* Frog. (Hymenoptera, Aphidiidae), a parasite of the rosy apple aphid, *Dysahis plantaginea* (Pass.) (Homoptera: Aphididae). Roczniki Nauk rolniczych. Ser. E. 6:59-75.
- Cloutier C., McNeil J.N., Regnière J.** (1981): Fecundity, longevity, and sex ratio of *Aphidius nigripes* (Hymenoptera: Aphidiidae) parasitizing different stages of its host, *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae). Canada Entomologist. 113:193-198.
- Cloyd R.A., Sadof C.S.** (2000): Effects of plant architecture on the attack rate of *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the citrus mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). Environmental Entomology. 2:535-541.
- Colfer R.G., Rosenheim J.A.** (1995): Intraguild predation by coccinellid beetles on an aphid parasitoid, *Lysiphlebus testaceipes*. Proceedings of betwide cotton conference. 2:1033-1036.
- Cooper S.J.B., Day P.R., Reardon T.B. Schulz M.** (2001): Assessment of species boundaries in Australian Myotis (Chiroptera: Vespertilionidae) using mitochondrial DNA. Journal of Mammalogy. 328-338.
- Cook J. M., Butcher R.D.J.** (1999): The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. Res. Popul. Ecol. 41:15-28.
- Cox T., Frazier C., Tuttle J., Flood S., Yagi L., Yamashiro C.T., Behari R., Paszko C., Cano R.J.** (1998): Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in dairy samples utilizing a PCR-based fluorogenic 5' nuclease assay. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 21: 167-174.
- Dicke M.** (1999): Evolution of induced indirect defence of plants. The ecology and Evolution of Inducible defenses. Princeton University Press, NJ. 62-88.
- Dicke M., Sabelis M.W.** (1988): How plants obtain predatory mites as bodyguards. Netherlands Journal of Zoology 38:148-165.
- Dicke M., van Loon J.J.A.** (2000): Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. Entomologia Experimentalis et Applicata. 97:237-249.
- Dixon A.F.G.** (1990): Ecological interactions of aphids and their host plants. In: Campbell R.K., Eikenbary R.D.: Aphid-plant genotype interactions. Elsevier. 7-19.
- Dobson S.L., Bourtzis K., Braig H.R., Jones B.F., Zhou W., Rousset F., O'Neil S.C.** (1999): *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. Insect Biochem. Mol. Biol. 29:153-160.
- Dowton M., Austin A.D.** (1994): Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera-Apocritan relationships. Proc. Natl. Acad. Sci. 91:991-9915.
- Dowton M., Austin A.D., Antolin M.F.** (1998): Evolutionary relationships among the Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea) inferred from partial 16S rDNA gene sequences. Insect Mol. Biol. 7:129-150.
- Driessen G., Hemerik L., Boonstra B.** (1991): Host selection behaviour of the parasitoid *Leptopilina clavipes*. Neth. J. Zool. 41: 99-111.
- Du Y., Poppy G.M., Powell W., Pickett J.A., Wadhams L.J., Woodcock C.M.** (1998): Identification of semiochemicals released during aphid feeding that attract parasitoid *Aphidius ervi*. Journal of Chemical Ecology. 24:1355-1368.
- Ehler L. E., Miller J.C.** (1978): Biological control in temporary agrosystems. Entomophaga. 23:207-212.
- Edwards O.W., Hoy M.A.** (1993): polymorphisms in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR. Biol. Control. 3:243-257.
- Edwards O.W., Hoy M.A.** (1994): Monitoring laboratory and field biotypes of the walnut aphid parasite, *Trioxys pallidus*, in population cages using RAPD-PCR. Biocontr. Sci. Technol. 5:313-327.
- Ellsworth D.L., Rittenhouse K.D., Honeycutt R.L.** (1993): Artfactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. BioTechniques. 14:214-217.
- Erlich H.A., Arnheim N.** (1992): Genetic analysis using the polymerase chain reaction. Annu. Rev. Genetics. 26:479-506.
- Espinasa L., Borowsky R.** (1998): Evolutionary divergence of AP-PCR (RAPD) patterns. Mol. Biol. Evol. 15:408-414.
- Fauvergue X., Tentelier C., Genson G., Autiot P. Guillemaud T., Streiff R.** (2005): Microsatellite DNA markers for *Lysiphlebus testaceipes*. Mol. Ecol. Notes. 5:109-111.
- Fay R.W., Craig G.G.** (1969): Genetically marked *Aedes Aegypti* in studies of field populations. Mosquito News. 29(1):121.
- Field D., Wills Ch.** (1996): Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. Proceeding of the Royal Society of London B. 263:209-215.
- Figuroa Ch., Simon J. Ch., Le Gallic J.F., Niemeyer H.M.** (1999): Molecular markers to differentiate two morphologically-close species of the genus *Sitobion*. Entomologia Experimentalis et Applicata. 92(2):217-225.

- Finlayson T.** (1990): The systematics and taxonomy of final instar larvae of the family *Aphidiidae*. Entomol. Society of Canada. 152:1-74.
- Fink U., Volk W.** (1995): The effect of abiotic factors on foraging and oviposition success of the aphid parasitoid, *Aphidius rosae*. Oecologie. 103:371-378.
- Flint M.L.** (1980): Climatic ecotypes in *Trioxys complanatus*, a parasite of the spotted alfalfa aphid. Environmental Entomology. 9:501-507.
- Foitzik S., Heinze J.** (2001): Microgeographic genetic structure and intraspecific parasitism in the ant *Leptothorax nylanderi*. Ecol Entomol 26:449-456.
- Frazer B.D., Van den Bosch R.** (1973): Biological control of the walnut aphid in California: The interrelationship of the aphid and its parasite. Environmental Entomology. 2: 561-568.
- Gardner W.A., Oetting R.D., Stoery G.K.** (1984): Scheduling of *Verticillium lecanii* and Benomyl applications to Maintain Aphid (*Hemiptera: Aphidae*) Control on Chrysanthemums in Greenhouses. Journal of Economic Entomology 77 (2): 514-518.
- Geervliet J.B.F., Ariens S., Dicke M., Vet L.E.M.** (1998): Long-distance assessment of patch profitability through volatile infochemicals by the parasitoids *Cotesia glomerata* and *C. rubecula* (*Hymenoptera: Braconidae*). Biological Control. 11:113-121.
- Greenstone M.H.** (2006): Molecular methods for assessing insect parasitism. Bulletin of Entomological Research. 96: 1-13.
- Godfray H.C.J., Hassell M.P.** (1991). Encapsulation and host-parasitoid population biology. In: Parasite-host associations, coexistence or conflict? Oxford University Press. Oxford. 131-147.
- Goldstein D.B., Ruiz Linares A., Cavalli-Sforza L.L., Feldman M.W.** (1995): An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics. 139 (1):463-471.
- Golenberg E.M., Bickel A., Weihs P.** (1996): Effect of highly fragmented DNA on PCR. Nucleic Acids Res. 24:5026-5033.
- Gozlan S., Millot P., Rousset A., Fournier D.** (1997): Test of the RAPD-PCR method to evaluate the efficacy of augmentative biological control with *Orius* (*Het., Anthicoridae*). Entomophaga. 42(4):593-604.
- Grevelding C.G., Kampkotter A., Hollmann M., Schafer U., Kunz W.** (1996): Direct PCR on fruitflies and blood flukes without prior DNA isolation. Nucleic Acids Res. 24:4100-4101.
- Guerrieri E.** (1996): Flight behaviour of *Encarsia formosa* in response to plant and host stimuli. Entomologia Experimentalis et Applicata. 82:129-133.
- Guerrieri E., Pennacchio F., Tremblay E.** (1997): Effect of adult experience on in-flight orientation to plant and plant-host complex volatiles in *Aphidius ervi* Haliday (*Hymenoptera: Braconidae*). Biological Control. 10:159-165.
- Guerrieri E., Poppy G.M., Powell W., Tremblay E., Pennacchio F.** (1999): Induction and systemic release of herbivore - induced plant volatiles mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. Journal of Chemical Ecology. 25:1247-1261.
- Guerrieri E., Poppy G.M., Powell W., Rao R., Pennacchio F.** (2002): Plant-to-plant communication mediating in-flight orientation of *Aphidius ervi*. Journal of chemical ecology. 28(9):1703-1715.
- Hadrys H., Balick M., Schierwater** (1992): Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol. Ecol. 1:55-63.
- Hadrys H., Schierwater B., Dellaporta S.L. DeSalle R., Buss L.W.** (1993) Determination of paternity in dragonflies by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Mol. Ecol. 2:78-87.
- Hafez M.** (1961): Seasonal fluctuations of population density of the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*. European Journal of Plant Pathology. 67:445-548.
- Hagvar E.B., Hofsvang T.** (1991): Aphid parasitoids (*Hymenoptera: Aphidiidae*): biology, host selection and use in biological control. Biocontrol News Inf. 12: 13-41.
- Hancock J.M.** (1995): The contribution of slippage-like processes to genome evolution. Journal of Molecular Evolution 41:1038-1047.
- Hassell M.P., Andeson R.M.** (1984): Host susceptibility as a component in host-parasitoid systems. Journal of Anim. Ecol. 53:611-621.
- Hart J., de Jonge J., Collé C., Dicke M., Van Lenteren J.C., Ramakers P.M.J.** (1978): Host selection, host discrimination and functional response of *Aphidius matricariae*, Haliday (*Hymenoptera: Braconidae*), a parasite of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulz.). Mededelingen van de Faculteit der Landbouwetenschappen, Rijksuniversiteit Genet. 43:441-453.
- Havelka J.** (2003): Aphids of the Czech republic. For Fauna Europaea (manuscript). In: Starý P. (2006): Aphid parasitoids of the Czech republic (*Hymenoptera: Braconidae Aphidiinae*). Academia. ISBN-80-200-1384-9.
- Heckel D.G.** (2003): Genomics in pure and applied entomology. Annual Review of Entomology. 48:235-260.
- Heimpel G.E., Neuhauser C., Hoogendoorn M.** (2003): Effects of parasitoid fecundity and host resistance on indirect interactions among hosts sharing a parasitoid. Ecology Letters. 6(6):556-566.



- Hoelzel A.R.** (1998): Molecular genetic analysis of populations. A practical approach. 2nd ed. IRL press, Oxford, UK.
- Hoy M.A.** (2003): Insect molecular genetics: An introduction to principles and applications. Academic press. ISBN 0-12-357031-X.
- Hufbauer R.A.** (2001): Pea aphid-parasitoid interactions: have parasitoids adapted to differential resistance? *Ecology*. 82:717-725.
- Hufbauer R.A., Bogdanowicz S.M., Perez L., Harrison R.G.** (2001): Isolation and characterization of microsatellites in *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae) and their applicability to related species. *Mol. Ecol. Notes*. 1:197-199.
- Hufbauer R.A., Bogdanowicz S.M., Harrison R.G.** (2004): The population genetics of a biological control introduction: mitochondrial DNA and microsatellite variation in native and introduced populations of *Aphidius ervi*, a parasitoid wasp. *Mol. Ecology*. 13:337-348.
- Hughes R.D.** (1989): Biological control in the open field. *Ahids. Their Biology. Natural Enemies and control*. Elsevier. 167-198.
- Hunt G.J., Page R.E. jr.** (1992): Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in honey bee. *Theor. Appl. Genet.* 85:15-20.
- Chan C.K., Petersen D.J., Vrain T.C.** (1999): DNA fingerprinting of single aphid embryos by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR). *Can. Entomol.* 131:229-230.
- Chou L.Y.** (1984): The phylogeny of *Aphidiidae* (Hymenoptera). *Journal of Agricultural Research*. 33:437-446.
- Jang E.B., Messing R.H., Klungness L.M., Carvalho L.A.** (2000): Flight tunnel responses of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) to olfactory and visual stimuli. *Journal of Insect Behaviour*. 13:525-538.
- Jansa J., Mozafar A., Kuhn G., Anken T., Ruh R., Sanders R., Frossard E.** (2003): Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecol. Applications*. 13(4). pp. 1164-1176.
- Janssen A.** (1989): Optimal host selection by *Drosophila* parasitoids in the field. *Func. Ecol.* 3:469-479.
- Jarošík V., Holý I., Lapchin L., Havelka J.** (2003): Sex ratio in the aphid parasitoid *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae) in relation to host size. *Bulletin of Ent. Res.* 93:255-258.
- Jaarola M., Ratkiewicz M., Ashford R.T., Brunhoff C., Borkowska A.** (2007): Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the field vole, *Microtus agrestis*, and their cross-utility in the common vole, *Microtus arvalis*. *Mol. Ecology Notes* 7:1029-1031.
- Jeyaprakash A., Hoy M.A.** (2000): Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76 % of sixty-three arthropod species. *Insect Mol. Biol.* 9:393-405.
- Kambhampati S., Völkl W., Mackauer M.** (2000): Phylogenetic relationship among genera of *Aphidiinae* (Hymenoptera: Braconidae) based on DNA sequence of the mitochondrial 16S rDNA gene. *Sys. Entomology*. 25:437-445.
- Karam N., Bublilmino C.R., Bertin S., Gomulski L.M., Bonomi A., Baldacchino F., Simeone V., Malacrida A.R.** (2008): RAPD analysis in the parasitoid wasp *Psytalia concolor* reveals mediterranean population structure and provides SCAR markers. *Biol. Control*. 47:22-27.
- Kashi Y., King D., Soller M.** (1997): Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet.* 13:74-78.
- Kavallieratos N.G., Tomanović Ž., Starý P., Athanassiou C.B., Sarlis G.P., Petrović O., Nikterić M., Veroniki M.A.** (2004): A survey of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) of Southeastern Europe and their aphid-plant association. *Appl. Entomol. Zool.* 39:527-563.
- Kengne P., Trung H.D., Baimai V., Coosemans M., Manguin S.** (2001): A multiplex PCR-based method derived from random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for the identification of species of the *Anopheles minimus* group in Southeast Asia. *Insect Molecular Biology*. 10(5):427-435.
- Kernodle S.P., Cannon R.E., Scandalios J.G.** (1993): Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *BioTechniques* 14:362-364.
- Khandka D.K., Tuna M., Tal M., Nejidat A., Golan-Goldhirsh A.** (1997): Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. *Electrophoresis* 18:2852-2856.
- Kim K.S., Sappington T.W.** (2004): Genetic structuring of boll weevil populations in the US based on RAPD markers. *Insect mol. Biol.* 13:293-303.
- Kitt J.T., Keller M.A.** (1988): Host selection by *Aphidius rosae* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) with respect to assessment of host specificity in biological control. *Journal of Applied Entomology*. 122:57-63.
- Koivisto R.K.K., Braig H.R.** (2003): Microorganisms and parthenogenesis. *Biological journal of the Linnean Society*. 79 (1):43-58.
- Laurent V., Wajnberg E., Mangin B., Schiex T., Gaspin CH., Vanlerberghe-Masutti F.** (1998): A composite genetic map of the parasitoid wasp *Trichogramma brassicae* based on RAPD markers. *Genetics*. 150 (1):275-282.

- Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. (2002):** Microsatellites: genomic distribution, putative function and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*. 11:2453-2465.
- Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E. (2004):** Microsatellites within genes: structure, function and evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 21:991-1007.
- Litt M., Luty J.A. (1989):** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat withing the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:397-401.
- Luck R. F., Stouthamer R., Nunney L. (1992):** Sex determination and sex ratio patterns in parasitic *Hymenoptera*. In: Evolution and diversity of sex ratio in haplodiploid insects and mites. Wrench D.L., Ebbert. M.A. Chapman and Hall. New York. 442-476.
- Macdonald C., Brookes C.P., Edwards K.J., Baker D.A., Lockton S., Loxdale H.D. (2003):** Microsatellite isolation and characterization in the beneficial parasitoid wasp *Diaeretiella rapae* (M'Intosh) (*Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae*). *Mol. Ecol. Notes*. 3:601-603.
- Mackauer M., Wölk M. (1993):** Regulation of aphid populations by aphidiid wasps: Does parasitoid foraging behaviour or hyperparasitism limit impact? *Oecologia*. 94:339-350.
- Mackhauer M., Michaud J.P., Völk W. (1996):** Host choice by *Aphidiidae* parasitoids (*Hymenoptera: Aphidiidae*): Host recognition, host quality and host value. *The Canadian Entomologist*. 128(6):959-975.
- McGregor D., Galvin P., Sadusky T., Cross T. (1996):** PCR amplification of a polymorphic minisatellite VNTR locus in whiting (*Merlangius merlangus* L.). *Anim. Genet.* 27(1):49-51.
- Menken S.B.J. (1991):** Does haplodiploidy explain reduced levels of genetic variability in *Hymenoptera*? *Proc. Exp. Appl. Entomol. N.E.V. Amsterdam*. 2:172-178.
- Micheli M.R., Bova R., Pascale E., D'Ambrosio E. (1994):** Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Res.* 22:1921-1922.
- Němec V., Starý P. (1983):** Elpho-morph differentiation in *Aphidius ervi* Hal. Biotype on *Microlophium carnosum* (Bckt.) related to parasitization on *Acyrtosiphon pisum* (Harr.) (*Hym.: Aphidiidae*). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*. 95:524-530.
- Němec V., Starý P. (1985):** Population diversity in deuterotokous *Lysiphlebus* species, parasitoids of aphids (*Hymenoptera: Aphidiidae*). *Acta Entomolog. Bohemoslov.* 82:170-174.
- Nordlund D.A., Lewis W.J., Altieri M.A. (1988):** Influences of plant-produced allelochemicals on the host-prey selection behaviour of entomophagous insects. *Novel Aspects of Insect-Plant Interactions*. Wiley. 65-90.
- O'Donnell D.J. (1989):** A morphological and taxonomic study of first instar larvae of *Aphidiinae* (*Hymenoptera: Braconidae*). *Systematic Entomology*. 14:197-219.
- Oliveira E.J., Pádua J.G., Zucchi M.I., Venkovsky R., Carneiro Vieira M.L. (2006):** Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29:294-307.
- Ondřej M. (1999):** Genetika rostlin. – JU BF – České Budějovice.
- Perez T., Albornoz J., Dominguez A. (1998):** An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Mol. Ecol.* 7:1347-1357.
- Persad A.B., Jeyaprakash A., Hoy M.A. (2004):** High-fidelity PCR assay discriminates between immature *Lioloxis oregmae* and *Lysiphlebus testaceipes* (*Hymenoptera: Aphidiidae*) within their aphid hosts. *Florida entomologist*. 87 (1):18 – 24.
- Penner G.A., bush A., Wise R., Kim W., Domier L., Kasha K., Laroche A., Scoles G., Molar S.J., Fedak G. (1993):** Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods App*. 2:341-345.
- Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P. (2006):** DARwin software (<http://darwin.cirad.fr/darwin>).
- Pinto J.D., Stouthamer R. (1994):** Systematics of the *Trichogrammatidae* with emphasis in *Trichogramma*. 1-36. In: Biological control with egg parasitoids. Wajnberg E., Hassan S.A. Wallingford, CAB international. 304.
- Pinto J.D., Platner G.R., Stouthamer R. (2003):** The systematics of the *Trichogramma minutum* Complex (*Hymenoptera: Trichogrammatidae*), a group of important North American biological control agents: The evidence from reproductive compatibility and allozymes. *Biological control*. 27:167-180.
- Powell W., Pennacchio F., Poppy G.M., Tremblay E. (1998):** Strategies involved in the location of hosts by the parasitoid *Aphidius ervy* Haliday (*Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae*). *Biological Control*. 11: 104-112.
- Powell W., Zhang Z.L. (1983):** The reaction of two cereal aphid parasitoids, *Aphidius uezbeckistanicus* and *A. ervi* to host aphids and their food plants. *Physiological Entomology* 8: 439-443.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000):** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Rabinow P. (1996):** Making PCR. A Story of Biotechnology. Univ. Of Chicabo Press. In: Hoy M.A. Insect molecular genetics: An introduction to principles and applications. Academic press. ISBN 0-12-357031-X.
- Regensbogenova M., Kisidayova S., Michalowski T., Javorsky P., Moon-van der Staay S.Y. et al. (2004):** Rapid identification of rumen protozoa by restriction analysis of amplified 18S rRNA gene. *Acta protozool.* 43: 219-224.
- Reineke A., Kaarlovsky P., zebitz C.P.W. (1998):** Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. *Insect Mol. Biol.* 7:95-99.

- Reiter** R.S., Williams J.G.K., Feldmann K.A., Rafalski J.A., Tingey S.V., Scolnik P.A. (1992): Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 89:1477-1481.
- Rigaud** T. (1999): Further *Wolbachia* endosymbiont diversity: a tree hiding in the forest? Trends Ecol. Evol. 14:212-213.
- Rigaud** T., Rousset F. (1996): What generates the diversity of *Wolbachia*-arthropod interactions? Biodiversity conserv. 5:999-1013.
- Roa** A.C., Chavarriaga-Aguirre P., Duque M.C., Maya M.M., Bonierbale M.W., Iglesias C., Tohme J. (2000): Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (*Euphorbiaceae*) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. American Journal of Botany. 87:1647-1655.
- Roderick** G.K. (1996): Geographic structure of insect population: gene flow, phylogeography, and their uses. Ann. Rev. Ent. 42: 325-352.
- Rodrigues** S.M.M., Bueno V.H.P. (2001): Parasitism rates of *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (*Hym.: Aphidiidae*) on *Schizaphis graminum* (Rond.) and *Aphis gossypii* Glover (*Hem.: Aphididae*). Biol. Control. 30:625-629.
- Roehrdanz** R.L., Reed D.K., Burton R.L. (1993): Use of polymerase chain reaction and arbitrary primers to distinguish laboratory-raised colonies of parasitic *Hymenoptera*. Biol. Control. 3:199-206.
- Rosenheim** J.A. (1998): Higher-order predators and the regulation of insect herbivore populations. Annual Review of Entomology. 43: 421-447.
- Samec** P. (1993): Length polymorphism of random amplified DNA fragments. Plant gene engineering for low environmental impact crops. Course. Protokol 7.
- Sandrock** Ch., Frauenfelder N., von Burg S., Vorburger Ch. (2007): Microsatellite DNA markers for the aphid parasitoid *Lysiphlebus fabarum* and their applicability to relate species. Mol. Ecol. Note. 7:1080-1083.
- Schmelz** E.A., Alborn H.T., Banchio E., Tumlinson J.H. (2003): Quantitative relationships between induced jasmonic acid levels and volatile emission in *Zea mays* during *Spodoptera exigua* herbivory. Planta. 216:665-673.
- Schierwater** B., Ender A. (1993): Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. Nucleic Acids Res. 21: 4647-4648.
- Sia** E.A., Hitler Ch. A., Dominika M., Greenwell P., Fox T.D. Peters T.D. (2000): Analysis of microsatellite mutans in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. Proceeding of the National Academy of Science. 97: 250-255.
- Singer-Sam** J., Tanguay R.L., Riggs A.D. (1989): Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. Amplifications. (3):11.
- Smith** P.T., Kambhampati S., Volkl W., Mackauer M. (1999): A phylogeny of aphid parasitoids (*Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae*) inferred from mitochondrial NADH 1 dehydrogenase gene sequence. Molecular Phylogenetics and Evolution. 11:236-245.
- Soldán** T., Starý P. (1981): Parasitogenic effects of *Aphidius smithi* (*Hymenoptera: Aphidiidae*) on the reproductive organs of the pea aphid. *Acyrtosiphon pisum* (*Homoptera: Aphididae*). Acta entomologica Bohemoslovaca. 78:243-253.
- Starý** P. (1966): Aphid parasites of Czechoslovakia (A review of the Czechoslovak *Aphidiidae*, *Hymenoptera*). Academia. Praha. 1-242.
- Starý** P. (1970): Biology of aphid Parasites (*Hymenoptera: Aphidiidae*) with respect to Integrated Control. Series Entomologica. Vol. 6. pp. 643.
- Starý** P. (1974): The emergence hole of aphid parasites (*Hymenoptera, aphidiidae*): its significance in a natural system. Acta entomologica Bohemoslovaca, 71: 209-216.
- Starý** P. (1976): Parasite spectrum and relative abundance of parasites of cereal aphids in Czechoslovakia (*Hymenoptera: Aphidiidae, Homoptera: Aphidoidea*). Acta Entomol. Bohemoslov. 73: 216-223.
- Starý** P. (1986): Specificity of parasitoids (*Hymenoptera: Aphidiinae*) to the black bean aphid. *Aphid fabae* complex, in agroecosystems. Acta Entomol. bohemoslov. 83:24-29.
- Starý** P. (1988): Parasites: *Aphidiidae*. In: Aphids, their Biology, natural enemies and control. El. Sci. Pub. pp 171-184.
- Starý** P. (2006): Aphid parasitoids of the Czech republic (*Hymenoptera: Braconidae Aphidiinae*). Academia. ISBN-80-200-1384-9.
- Starý** P., Rodriguez F., Gerding M.P. (1993): Liberaciones de enemigos naturales del pulgon ruso del trigo, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov), en Chile. Agric. Tecnica, 4: 359-361.
- Starý** P., Havelka J., Choi L. Y. (2002): New species and populations of *Lysiphlebus* Foerster aphid parasitoids (*Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae*) in Korea. Ins. Koreana. 19: 205-211.
- Stouthamer** R., Luck R.F. (1993): Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma-Deion* and *T-Pretiosum*. Entomologia experimentalis et applicata. 67(2):183-192.
- Sullivan** D.J. (1987): Insect hyperparasitism. Annual Review of Entomology. 32:49-70.
- Suomalainen** E., Saura A., Lokki J. (1987): Cytology and evolution in parthenogenesis. CRC press, Boca Raton, FL.

- Tamaki** G.J., Halfhill E., Hathaway D.O. (1970): Dispersal and reduction of colonies of pea aphids by *Aphidius smithi* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Annals of the Entomological Society of America*. 63:973-980.
- Tautz** D. (1989): Hypervariability of simple sequence repeats as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17:6463–6471.
- Tautz** D., Renz M. (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Res.* 12:4127-4138.
- Tautz** D., Trick M., Dover G.A. (1986): Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322, 652-656.
- Tentelier** C., Wajnberg E., Fauvergue X. (2005): Parasitoids use herbivore-induced information to adapt patch exploitation behaviour. *Ecological Entomology*. 30:739–744.
- Tóth** G., Gáspári Z., Jurka J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research*. 10: 967-981.
- Tremblay** E. (1964): Research on parasitic Hymenoptera. I .Morpho-biological study on *Lysiphlebus fabarum* (Marshall) (Hymenoptera: Braconidae, Aphidiinae). *Bolletino de Laboratorio di Entomologia Agraria*. 22:1-122.
- Tremblay** E., Calver D. (1971): Embryosystematics in the aphidiines (Hymenoptera: Braconidae). *Bolletiono del Laboratorio di entomologia Agraria Filippo Silvestri di Portici*. 29:223-249.
- Tumlinson** J.H., Turling T.C.J., Lewis W.J. (1992): The semiochemical complexes that mediate insect parasitoid foraging. *Agricultural Zoology Reviews*. 5:221-251.
- Turlings** T.C.J., Wäckers, F.L. (2004): Recruitment of predators and parasitoids by herbivore - injured plants. *Insect Chemical Ecology*. 21–75.
- Vaughn** T.T., Antolin M.F. (1998): Population genetics of an opportunistic parasitoid in an agricultural landscape. *Heredity*. 80:152-162.
- van Alphen** J.J.M., Vet L.E.M. (1986): An evolutionary approach to host finding and host selection. In: *Insect parasitoids*. Academic Press, San Diego. CA. 23-62.
- van Veen** F.J.F., Belshaw R., Godfray H.Ch. J. (2003): The value of the ITS2 region for the identification of species boundaries between *Alloxysta* hyperparasitoids (Hymenoptera: Charipidae) of aphids. *Eur. J. Entomol.* ISSN 1210-5759.
- Vet** L.E.M., Dicke M. (1992): Ecology of infochemical use by natural enemies in a trophic context. *Annual Review of Entomology*. 37:141-172.
- Vinson** S. B. (1976): Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*. 21:109-133.
- Völkl** W. (1992): Aphids or their parasitoids: Who actually benefits from ant-attendance? *Journal of Animal Ecology*. 61:273-281.
- Völkl** W., Kraus W. (1996): Foraging behaviour and resource utilization of the aphid parasitoid *Pauesia unilachni*: adaptation to host distribution and mortality risks. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 79:101-109.
- Völkl** W., Kroupa A.S. (1997): Effects of adult mortality risks on parasitoid foraging tactics. *Animal Behaviour*. 54:349-359.
- Wang** R., Kafatos F.C., Zheng L. (1999). Microsatellite markers and genotyping procedures for *Anopheles gambiae*. *Parasitol. Today* 15: 33-37.
- Weathersbee** A.A., Shufran K.A., Panchal T.D., Dang P.M. Evans G.A. (2004): Detection and differentiation of parasitoids (Hymenoptera: Aphidiidae and Aphelinidae) of the Brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae): species-specific polymerase chain reactin amplification of 18S rDNA. *Ecology and Population Biology*. 97(2):286-292.
- Werren** J.H., Zhang W., Guo L.R. (1995): Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Biol. Sci.* 261-55-63.
- West** S.A., Cook J.M., Werren J.H., Godfray H.C.J. (1998): *Wolbachia* in two insect host-parasitoid communities. *Molecular ecology*. 7(11):1457-1465.
- White** T.J., Arnheim N., Erlich H.A. (1989): The polymerase chain reaction. *Trends Genet.* 5:185-189.
- Whitman** D.W., Eller F.J. (1990): Parasitic wasps orient to green leaf volatiles. *Chemo-Ecology*. 1:69-75.
- Williams** J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*. 18(22):6531-6535.
- Winder** L.M., Goldson S.L, C. L. (1997): Genomic variation between two *Microctonus hyperoda* populations