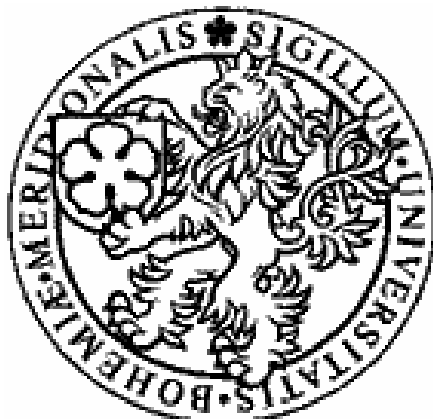


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

**Identifikace druhů a molekulární taxonomie
bejlomorek (*Cecidomyiidae*)**

Renata Strouhalová

Školitelka: PaedDr. Martina Žurovcová, PhD
Školitel specialista: RNDr. Václav Skuhravý, CSc.

České Budějovice
2008

Bakalářská práce

Strouhalová, R., 2008. Identifikace druhů a molekulární taxonomie bejlomorek (*Cecidomyiidae*). [Species identification and molecular taxonomy of gallmidges (*Cecidomyiidae*), Bc. Thesis, in Czech] Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 38 pp.

Annotation

Four molecular markers were tested for their potential to be used for species identification of selected taxa of *Cecidomyiidae*. Two markers were successfully amplified, part of the mitochondrial COI („DNA barcoding“ marker) and nuclear fragment ITS1. Subsequent analysis of their intra- and interspecific variability enabled us to resolve several taxonomical uncertainties. However, both markers appear to be too variable for reliable delineation of species and genera under investigation.

Tato práce byla financována ze záměru Entomologického ústavu Z-50070508.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s paragrafem 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetové stránce.

V Českých Budějovicích, 7.1.2008

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svojí školitelce Martině Žurovcové za odborný dohled a vedení, poskytnutí vynikajícího zázemí a řadu cenných informací. Dík patří i mému školiteli – specialistovi Václavu Skuhravému za odborné rady týkající se problematiky bejlomorek a za poskytnutí materiálu. Dále děkuji Lucii Kučerové a Václavu Brožovi za velkou trpělivost a ochotnou výpomoc zejména v začátcích práce, ale i kdykoli později. Dík patří i celému kolektivu naší laboratoře a také mojí rodině, s jejichž podporou jsem mohla práci dokončit.

OBSAH

1. Úvod.....	1
1.1 Obecná charakteristika bejlmorek.....	1
1.2 Problémy v taxonomii.....	2
1.3 Studované markery.....	2
1.3.1. Mitochondriální markery.....	3
1.3.2. Nukleární markery.....	4
1.4. Studované druhy a jejich stručná charakteristika.....	5
2. Cíle práce.....	8
3. Materiál a metodika.....	9
3.1. Materiál.....	9
3.2. Izolace DNA.....	9
3.2.1. Chelexová izolace.....	9
3.2.2. Izolace pomocí kitu.....	9
3.2.3. Izolace extrakčním pufrem.....	10
3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	10
3.3.1. Použité primery.....	10
3.3.2. Složení reakční směsi.....	11
3.3.3. Amplifikace markeru COI („barcoding“).....	11
3.3.4. Amplifikace markeru ITS1.....	11
3.4. Gelová elektroforéza.....	11
3.5. Purifikace PCR produktů a izolace z gelu.....	12
3.6. Klonování.....	12
3.6.1. Příprava vektoru.....	12
3.6.2. Transformace bakterií.....	13
3.7. Sekvenování DNA.....	13
3.7.1. Sekvenační směs.....	13
3.7.2. Sekvenační program.....	13
3.8. Přečištění sekvenační reakce pomocí Sephadexu a aerosolových špiček.....	14
3.8.1. Hydratace Sephadexu.....	14
3.8.2. Příprava sloupečku.....	14
3.8.3. Čištění sekvenační reakce.....	14
3.9. Vyhodnocení sekvencí.....	14
3.10. Software pro analýzu sekvencí.....	14

4. Výsledky.....	16
4.1. Izolace DNA.....	16
4.2. Testované markery	16
4.2.1. Gen COI	16
4.2.2. Fragment ITS1.....	19
4.3. Parazitace <i>Mikioly fagi</i>	23
4.4. Problematické sekvence	23
5. Diskuse.....	24
5.1. Izolace DNA.....	24
5.2. Srovnání použitých markerů	24
5.2.1. Marker COI	24
5.2.2. Marker ITS1	27
5.3. Tvorba dendrogramů	28
5.4. Parazitace <i>M. fagi</i>	29
5.5. Kontaminace vzorků	29
6. Závěr.....	30
7. Literatura	31
8. Příloha	35

1. Úvod

1.1 Obecná charakteristika bejlomorek

Bejlomoreky (*Cecidomyiidae*) patří do řádu dvoukřídlých (*Diptera*), podřádu dlouhorohých (*Nematocera*). Tito malí komárci o velikosti jednoho až pěti milimetrů jsou jednou z nejpočetnějších čeledí dvoukřídlého hmyzu. V České republice se vyskytuje asi 500 druhů, ve světě je známo celkem asi 5000 druhů.

Bejlomoreky patří k hmyzu s proměnou dokonalou, což znamená, že mají čtyři vývojová stadia: vajíčko, larvu, kuklu a imago. Podle způsobu života v larválním stadiu bejlomoreky dělíme na fytofágní - vytvářející háčky na nejrůznějších rostlinách, dále mykofágní – živící se houbami nebo zoofágní – živící se látkami živočišného původu.

Háčky (cecidia) vytvářejí larvy fytofágních bejlomorek ihned po vylíhnutí z vajíčka, kdy začnou chemickými látkami dráždit pletiva rostliny a tím vyvolají vznik háčky, jež má pro každý druh typický tvar. Háčky vznikají na různých částech rostlin: na listech, plodech, květech, stéblech, na vegetačních vrcholech větví i na kořenech.

Larva při sání vypouští z ústního otvoru tekutinu obsahující růstové látky na bázi giberilinu a kyseliny beta-indolyl-octové. Háčka se vyvíjí na mladých, právě se rozvíjejících pletivech rostliny. K úspěšnému vývoji háčky je nutná koincidence (soulad) mezi určitým stadiem larvy a pletivem rostliny, nacházejícím se ve vhodném stadiu vývoje. Když tato koincidence neexistuje, háčka se nevyvine nebo vznikne jen částečná háčka a larva v takovém případě hyne.

V dnešní době jsou intenzivně studovány zvláště tyto ekonomicky významné fytofágní druhy, napadající svými háčkami nejrůznější zemědělské plodiny a lesní dřeviny. Škodlivost bejlomorek závisí hlavně na dvou faktorech: jednak na tom, které orgány hostitelské rostliny bejlomoreky poškozují a jakým způsobem ovlivňují růst a asimilační schopnost dřeviny, jednak na populační hustotě, v níž se druh bejlomoreky na dřevině vyskytuje.

Podle stupně škodlivosti mohou být bejlomoreky rozděleny do čtyř skupin:

1. druhy velmi škodlivé, jejichž výskyt může vést až k odumření rostliny;
2. druhy škodlivé, které snižují asimilační plochu dřevin, a tím značně redukují výnos rostliny;
3. druhy slabě škodlivé, jejichž poškození na rostlinách je málo patrné;
4. druhy neškodné, jejichž výskyt se na růstu rostliny vůbec neprojeví.

Příkladů poškození rostlin existuje spousta. V některých místech ČR není možno pěstovat vojtěšku na semeno, neboť její květy jsou téměř stoprocentně napadeny plodomorkou vojtěškovou. Snížené výnosy pšenice a žita jsou v některých oblastech také způsobeny obilními bejlomorekami. Místy je až třetina plodů hrušní napadena plodomorkou hruškovou a ovoce padá

ze stromů dříve, než dozraje (Skuhrová & Skuhrový, 1960; Skuhrová, Skuhrový & Brewer, 1984; Skuhrová & Skuhrový, 1998).

1.2 Problémy v taxonomii

Velmi častým problémem entomologů – taxonomů, zabývajících se bejlmorkami, je patrná ekologická diferenciacie druhů (např. adaptace na různé hostitelské rostliny), u kterých ale nelze najít žádné morfologické odlišnosti. Rodová a druhová taxonomie bejlmorek je dnes ale ještě převážně založena právě na morfologii všech vývojových stadií (larva, kukla, imago), na tvaru a velikosti hálek, na druhu hostitelských rostlin a geografickém rozšíření. V řadě případů jsou však tyto znaky pro zřetelné rozlišení druhů a jejich řazení do vyšších taxonomických skupin nedostačující.

Analýza DNA může významně přispět k potvrzení polyfágnosti některých druhů bejlmorek a stanovení celkového rozsahu hostitelů, což je velmi důležité při boji proti těmto škůdcům (Uechi *et al.* 2003). V této práci studovali *Contarinia maculipennis* napadající svými hálkami různé hostitelské rostliny v Japonsku, Thajsku a na Havaji. Na základě mitochondriálního markeru COI byla potvrzena polyfágnost tohoto druhu. Podobným problémem se zabývala i další studie (Yukawa *et al.* 2003), ve které také pomocí markeru COI zjistili polyfágnost, resp. střídání hostitelských rostlin v závislosti na vývojovém cyklu u rodu *Asphondylia*.

Podrobnější genetické studie DNA by mohly napomoci k přesnému rozdělení bejlmorek na rodové a druhové úrovni, k pochopení evoluce tohoto druhu a zároveň také pomoci při boji proti těmto škůdcům.

1.3 Studované markery

Molekulární markery jako významný nástroj v biologii pomáhají řešit problémy a otázky týkající se fylogenetiky, evoluce, ekologie a populační dynamiky druhů. Dělí se na markery proteinové (alozymy) a na DNA markery. Jako DNA markery mohou být použity geny nebo nekódující úseky DNA jak nukleární, tak mitochondriální.

Mitochondriální DNA obsahuje obecně větší množství rozdílů než DNA nukleární, její mutační rychlost je totiž asi 20x vyšší než u jaderné DNA. Je také charakteristická vysokou mezidruhovou variabilitou a vysokým počtem kopií v jedné buňce (stovky až tisíce kopií), zatímco jaderná DNA se vyskytuje pouze ve dvou kopiích v buňce diploidních organismů. Výhodou mitochondriální DNA oproti nukleárním genům je také hemizygotní konstituce (dědí se pouze v maternální linii) a možnost získat tuto DNA i z malých a částečně degradovaných vzorků. Nukleární DNA je ze starších vzorků hůře dostupná, protože snadněji degraduje. Další

výhodou mitochondriální DNA je nepřítomnost intronů, což ale může být u jaderných markerů i výhodou, zvyšující jejich variabilitu (Loxdale & Lushai, 1998).

Pro tento projekt jsme na základě údajů z literatury (Loxdale & Lushai, 1998; www.barcodinglife.org) vytypovali celkem 4 markery, a to dva z mitochondriální a dva z nukleární DNA.

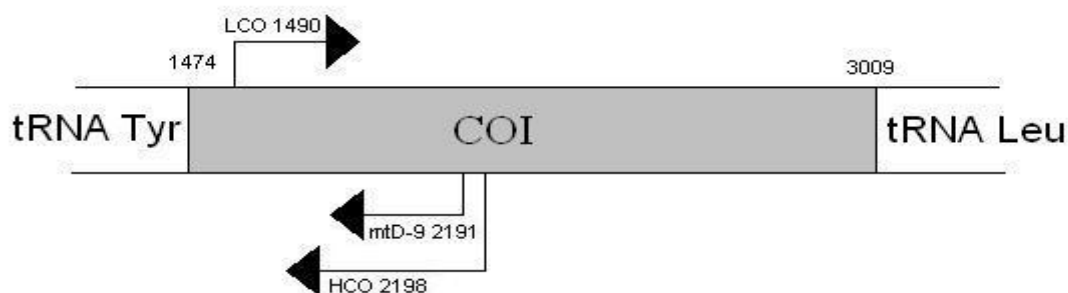
1.3.1. Mitochondriální markery

Mitochondriální genom obsahuje řadu genů, z nichž každý může být použit jako marker. Vzhledem k tomu, že mají různou evoluční rychlost a tedy i variabilitu, je nutné dopředu posoudit, který z nich je vhodný pro daný problém. Vždy se ale musí provést pilotní studie, během níž je otestováno, zda skutečně variabilita vybraného markeru odpovídá předpokladu.

Jedním z mitochondriálních genů, vhodným pro efektivní rozlišení vnitrodruhové a mezidruhové variability, je oblast genu cytochrom oxidasy - podjednotka I (COI). Díky své široké použitelnosti jak u živočichů, tak u rostlin, byl tento gen vybrán i pro projekt „DNA barcoding“.

„DNA barcoding“ je technika využívající krátkou sekvenci genu (~ 650 bp dlouhou oblast poblíž 5' konce podjednotky I cytochrom oxidasy) ze standardizované oblasti genomu jako diagnostický „biomarker“ pro přesné určení a pozdější rychlou identifikaci rostlinných a živočišných druhů (Hebert *et al.* 2003a). Slouží ale nejen k rozlišení už známých druhů (Hebert *et al.* 2003b; Ward *et al.* 2005), ale také k identifikaci nových nebo kryptických druhů (Hebert *et al.* 2004; Penton *et al.* 2004; Smith *et al.* 2006), invazivních druhů (Siddal & Budinoff 2005) a ke stanovení biodiverzity (Janzen *et al.* 2005; Smith *et al.* 2005a). Tato technika spoléhá na to, že průměrná vnitrodruhová variabilita je asi 10x menší než variabilita mezidruhová (Shearer & Coffroth, 2007). Předpokládá se, že prahová hodnota mezi vnitro- a mezidruhovou variabilitou je dostatečně široká k rozlišení různých taxonů (Meyer & Paulay 2005). Poloha markeru a pozice primerů standardně pro barcoding používaných je uvedena na Obr.1.

Obr. 1. Struktura genu COI a umístění jednotlivých primerů.



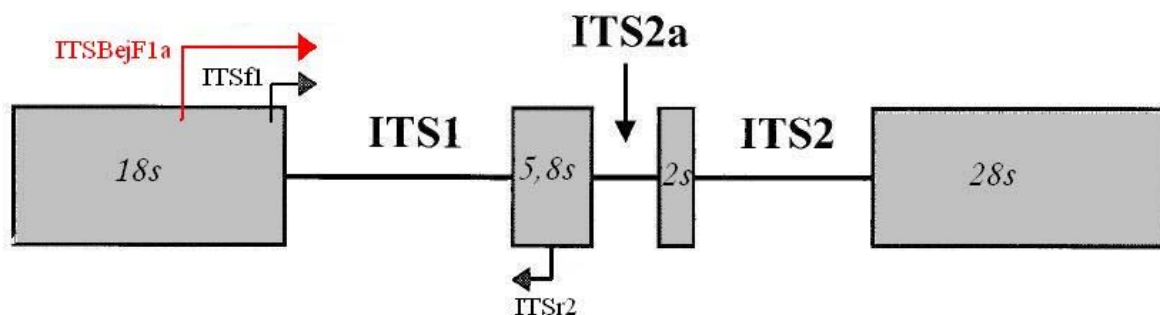
Marker COI byl pro rozlišení vnitro- a mezidruhové variability použit i u bejlomorek, a to konkrétně u rodu *Asteralobia* (Tokuda *et al.* 2004) a *Placochela* (Tokuda *et al.* 2005). V obou pracích se pokusili na základě srovnání morfologie, ekologie a variability markeru COI o identifikaci některých druhů z těchto rodů s cílem určit rozsah jejich hostitelských rostlin a způsobu speciace.

Dalším testovaným mitochondriálním markerem byla kontrolní oblast A+T-rich. Tato oblast je vysoce variabilní a polymorfní, proto je vhodná pro populační a fylogenetické studie blízkce příbuzných taxonů (Taylor *et al.* 1993).

1.3.2. Nukleární markery

Nukleárním markerem, často používaným pro rozlišení a identifikaci druhů, je fragment ITS1 (internal transcribed spacer). Tato nekódující sekvence, nacházející se mezi konzervovanými kódujícími 18s a 5.8s podjednotkami ribosomální DNA, se vyvíjí rychleji než většina jiných genů, může se tedy značně lišit i mezi blízkce příbuznými druhy. Také obsahuje velké množství polymorfismů, a to i délkových, které jsou primárně způsobeny variabilním počtem jednoduchých opakujících se jednotek mezigenových a nepřepisovaných oblastí. Díky těmto polymorfismům můžeme organismy rozdělit i do těch nejnižších taxonomických úrovní (Douglas *et al.* 2001). Protože je ITS1 nekódující oblastí, očekává se zde větší variabilita než u genu cytochrom oxidasy kódující aminokyseliny (Vickerman *et al.* 2004). Problémem zde může být opakovanost daného úseku v genomu, ale vzhledem k tomu, že jsou tyto opakované sekvence homogenizovány synchronizovanou evolucí (concerted evolution), je možné tento marker použít (Hillis & Dixon, 1991). Poloha markeru a pozice používaných primerů je uvedena na Obr. 2.

Obr. 2. Struktura oblasti ITS a umístění používaných primerů.



Dalším testovaným nukleárním markerem pro fylogenetické studie je gen pro elongační faktor-1 alfa (EF-1 α). EF-1 α je gen hojný zejména v cytosolu, kde se podílí na GTP – závislé vazbě aminoacyl-tRNAs do místa A na ribosomech při druhém kroku translace z mRNA na

protein. Obecně je to vysoce konzervovaný gen, který ale obsahuje několik variabilních intronových oblastí. Právě tato exon-intronová struktura dělá z tohoto genu marker vhodný pro rozlišení organismů na druhové a rodové úrovni (Berney *et al.* 2000).

1.4 Studované druhy a jejich stručná charakteristika

Ke studiu DNA byly na doporučení V. Skuhravého vybrány rody (resp.druhy), které představují určité taxonomické problémy. Od naprosté většiny bylo k analýze variability na molekulární úrovni vzato 2-5 jedinců.

Rod: *Dryomyia*:

Dryomyia circinans (Giraud, 1861) vytváří velké, plošné, silně ochlupené háčky (viz Příloha 1) na listech dubu ceru (*Quercus cerris*). Během roku se vyvíjí jediná generace. Imága létají na začátku května. Samice kladou vajíčka na rašící listy dubu ceru. Larvy se vyvíjejí v háčkách velmi pomalu, plně jsou dorostlé až v polovině září, kdy opouštějí háčku. Přezimují v půdě a tam se na jaře kuklí (Skuhravá & Skuhravý, 1998).

Rod *Hartigiola*:

Hartigiola annulipes (Hartig, 1839) tvoří drobné, kulovité, chlupaté háčky na dolní straně buku lesního (*Fagus sylvatica*). Během roku se vyvíjí jediná generace. Z larev přezimujících v háčkách se po 2-3 týdenní době kuklení líhnou imága od poloviny května do začátku června. Samičky kladou vajíčka na dolní stranu listů buku a tam se začíná vyvíjet háčka. Koncem srpna už jsou larvy v háčkách plně vyvinuté, na podzim háčky padají na zem a larvy přezimují v háčkách na povrchu půdy nebo v půdě (Skuhravá & Skuhravý, 1998).

Rod *Aphidoletes*:

Aphidoletes aphidimyza (Rondani, 1847) je dravá bejlmorka živící se mšicemi.

Sledování těchto tří druhů mělo za cíl získat zkušenosti pro hodnocení dalších druhů a výsledky byly použity jako kontroly k dalším výzkumům.

Rod *Mikiola*:

Mikiola fagi (Hartig, 1839) je evropský druh s širokým areálem a snad nejznámější háčkotvornou bejlmorkou vůbec. Vytváří háčky na listech buku lesního (*Fagus sylvatica*). Háčky jsou vřetenovitého tvaru, břichaté, na vrcholu ukončené ostrým hrotem (viz Příloha 2). V hálce žije pouze jediná solitérní larva. Během roku se vyvíjí jediná generace. Imága se líhnou

z hálek, které na podzim spadaly na zem. Líhnou se koncem března a na začátku dubna, v lokalitách s vyšší nadmořskou výškou o něco později (Skuhrová & Skuhrový, 1998).

Hálky tohoto druhu byly sesbírány v roce 2006 na několika lokalitách v České republice ke zjištění vnitrodruhové variability v rámci většího území.

Rod *Lasioptera*: Jedná se o jeden rod, jehož larvy se vyvíjejí na rostlinách z různých čeledí. Tyto druhy jsou dobře odlišitelné morfologickými znaky na larvách i na imágách. Jde tedy o zjištění, jak jsou po molekulární stránce rozdílné jasně zřetelné druhy jednoho rodu.

Lasioptera hungarica (Möhn, 1968) vytváří hálky v myceliu stébel rákosu *Phragmites australis*.

Lasioptera carophila (F. Löw, 1874) tvoří tvrdé zduřeliny na konci okolíků rostlin z čeledi *Apiaceae*.

Lasioptera arundinis (Schiner, 1854) larvy žijí společně v hálkách, které vytvářejí na postranních výhoncích rákosu *Phragmites australis*.

Lasioptera calamagrostidis (Rübsaamen, 1893) tvoří hálky pod listovými pochvami *Calamagrostis epigeios* (Skuhrová & Skuhrový, 1960).

Rod *Rhabdophaga*:

Rhabdophaga rosaria (H. Loew, 1850): Během roku se vyvíjí jediná generace. Imága létají začátkem května. Samice klade na každý terminální pupen vrby pouze jedno vajíčko. Vylíhlá larva vniká doprostřed pupenu, začíná sát a v tomto místě se tvoří malá komůrka, v níž žije uprostřed růžice zakrnělých lístků tvořících růžipodobnou hálku (někdy až 4-5 cm v průměru) (viz Příloha 3). Larva pomalu roste během léta. Na podzim je larva plně vyvinutá a jako larva třetího instaru v hálce přezimuje. V dubnu příštího roku se larva v hálce kuklí a pak z hálky vyletuje imágo (Skuhrová & Skuhrový 1998).

Larvy studované v této práci byly nalezeny na *Salix caprea* a *Salix alba* a molekulární analýza měla určit, zda je to opravdu jeden druh nebo už se jedná o druhy dva.

Rod *Janetia*:

Jedná se o dva druhy tohoto rodu (*Janetia szepligetii* a *Janetia cerris*), oba tvoří hálky na dubu ceru (*Quercus cerris*). Jejich hálky jsou od sebe dobře odlišitelné. U *Janetia szepligetii* byly nalezeny růžové a bílé larvy, analýza DNA měla stanovit, zda se opravdu jedná o jeden druh.

Janetia szepligetii (Kieffer, 1896) vytváří kulaté vypuklinky na listech *Quercus cerris*. Je to mediteránní a submediteránní druh, v České republice byly hálky zjištěny pouze na několika málo lokalitách (Skuhrová & Skuhrový 1998).

Janetia cerris (Kollar, 1850): Během roku se vyvíjí jediná generace. Imága létají na začátku května. Samice kladou vajíčka na rašící listy *Quercus cerris*. Háčky na horní straně listu jsou kuželovité, na dolní straně listu jsou malé a chlupaté. Larvy se v háčkách vyvíjejí velmi pomalu. Dorostlé larvy opouštějí háčky v polovině září. V té době se odděluje dolní část háčky v podobě víčka a larva padá na zem (Skuhrová & Skuhrový, 1998).

Rod *Oligotrophus* (Latreille, 1805):

Tento rod zahrnuje druhy, které tvoří háčky na jalovcích (*Juniperus* sp.). Jejich larvy způsobují přeměnu pupenů jalovce, zahrnujících několik posledních přeslenů jehlic, v podlouhlé zašpičatělé háčky (viz Příloha 4). Jednotlivé druhy lze jen velmi těžko rozeznat podle tvaru háček i podle morfologických znaků, i když se o to pokusil ve své práci Harris *et al.* 2006. Ten se také snažil o opětovné vymezení rodu *Oligotrophus* na základě částečné sekvence mitochondriálního genu 12S rRNA.

Jedinci studovaní v této práci pocházeli z několika lokalit v Čechách, dále z Bulharska, Francie, Itálie a pravděpodobně nový druh z háček na *Juniperus navicularis* z jižního Španělska. Proto se dal očekávat zajímavý výsledek právě hodnocení druhového postavení na základě molekulárních analýz. Podle Skuhrového se na lokalitách v Česku vyskytují přechody mezi tvarem háček na keřích, které rostou blízko sebe a dokonce i na keři jediném. Šlo tedy o zjištění, zdali by molekulární analýza mohla přispět k řešení složitých morfologických a biologických vztahů.

2. Cíle práce

- 1) Vybrat vhodný způsob extrakce DNA z larev bejmorek.
- 2) Otestovat vybrané markery pro efektivní rozlišení rodové a druhové příslušnosti bejmorek.
- 3) Na základě otestovaných markerů se pokusit o objasnění komplikovaného problému druhové příslušnosti vybraných zástupců.

3. Materiál a metodika

3.1. Materiál

Všechny zpracované vzorky byly v larválním stadiu, uchovávány v 96 % etanolu. Naprostá většina pocházela ze sbírek Václava Skuhravého, dravé bejloalky *Aphidoletes aphidimyza* daroval Jan Havelka (Biologické centrum AV ČR, ENTÚ) a Giorgios Broufas (Democritus University of Thrace, Orestiada). Přehled vzorků a lokalit je uveden v Tab .1.

Tab. 1. Studované druhy bejloalk.

Druh (počet jedinců)	Lokalita	Hostitelské rostliny
<i>Lasioptera hungarica</i> (2)	Praha	<i>Phragmites australis</i>
<i>Lasioptera carophila</i> (2)	Španělsko	<i>Apiaceae</i>
<i>Lasioptera arundinis</i> (4)	Praha, Španělsko	<i>Phragmites australis</i>
<i>Lasioptera calamagrostidis</i> (2)	Jižní Morava	<i>Calamagrostis epigeios</i>
<i>Dryomyia circinans</i> (2)	Brno	<i>Quercus cerris</i>
<i>Mikiola fagi</i> (10)	Velké Skaliny, Třísnov u Zlaté Koruny, Hranice, Pardubice, Praha	<i>Fagus sylvatica</i>
<i>Hartigiola annulipes</i> (1)	Praha	<i>Fagus sylvatica</i>
<i>Rhabdophaga rosaria</i> (4)	Praha	<i>Salix caprea</i> , <i>Salix alba</i>
<i>Janetia szepligetii</i> (4)	Brno	<i>Quercus cerris</i>
<i>Janetia cerris</i> (2)	Brno	<i>Quercus cerris</i>
<i>Aphidoletes aphidimyza</i> (9)	České Budějovice, Thessaloniki	dravý druh
<i>Arceuthomyia valerii</i> (1)	Francie	<i>Juniperus communis</i>
<i>Oligotrophus juniperinus</i> (27)	ČR, Bulharsko, Francie, Itálie, Španělsko	<i>Juniperus communis</i> , <i>J. nana</i>
<i>Oligotrophus panteli</i> (1)	Nemíž	<i>Juniperus communis</i>
<i>Oligotrophus navicularis</i> (1)	Španělsko	<i>Juniperus navicularis</i>

3.2. Izolace DNA

Před použitím byly vzorky ponechány 5-10 minut na vzduchu z důvodu odpaření etanolu. Vzhledem k malé velikosti byly vždy použity celé larvy.

Veškeré dále uvedené laboratorní metody byly prováděny s aerosolovými špičkami (špičky s filtrem), aby bylo zabráněno nežádoucí kontaminaci mezi vzorky.

Izolace byla prováděna pomocí jedné z těchto metod:

3.2.1. Chelexová izolace (Hoelzel 1998)

Vzorky byly zhomogenizovány v 500 μ l 5 % chelexu (BioRad) pomocí sterilního homogenizátoru. Poté byly inkubovány při 56°C minimálně 45 minut, zvortexovány a znovu inkubovány 10 minut při 98°C. Vyizolovaná DNA byla uchovávána při teplotě 4°C.

3.2.2. Izolace pomocí kitu (ZR Genomic DNA II Kit™)

Postup dle návodu výrobce.

Podstatou této metody je uvolnění DNA do extrakčního pufru, následné zachycení na kolonce a eluce. Vyizolovaná DNA byla uskladněna při teplotě -20°C.

3.2.3. Izolace extrakčním pufrem (Cox & Hebert, 2001; Frati *et al.* 2001)

Složení extrakčního pufru: 885 µl dd H₂O; 100 µl 1x PCR pufru s MgCl₂ (TopBio); 10 µl 1 % Tween 20; 5 µl proteinázy K (100 µg/ml). Vzorek ve 20 µl extrakčního pufru byl zmražen (-76°C, 15 minut), poté inkubován (65°C, 2 hodiny) a povařen (94°C, 15 minut). Vzniklá směs byla uskladněna při teplotě 4°C a následně použita jako templát pro PCR.

3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

3.3.1. Použité primery

Mitochondriální gen (COI) byl amplifikován pomocí univerzálních primerů používaných pro DNA barcoding (www.barcodinglife.org).

Jaderný marker (ITS) byl amplifikován pomocí jednoho univerzálního primeru, jednoho degenerovaného primeru a jednoho specifického primeru (viz Obr. 2). Primery byly navrženy tak, aby nasedaly do konzervovaných podjednotek 18S rDNA a 5.8S rDNA, což umožnilo snadnější amplifikaci, než kdyby nasedaly přímo do variabilního intronu. Tato metoda se nazývá Exon Primed-Intron Crossing PCR (EP-IC-PCR) (Palumbi & Baker, 1994). Specifický primer byl navržen na základě námi získaných sekvencí bejlmerek.

Markery EF-1 α a A+T rich oblast se uvedenými primery naamplifikovat nepodařilo. Přehled sekvencí všech použitých primerů je uveden v Tab. 2.

Tab. 2. Přehled použitých primerů.

Gen	Název primeru	Sekvence primeru 5' → 3'	Směr
COI	LCO1490 ⁽¹⁾	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	F
	HCO2198 ⁽¹⁾	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	R
	mtD-9 ⁽²⁾	CCC GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC	R
ITS1	ITSf1 ⁽³⁾	TAC ACA CCG CCC GTC GCT ACT A	F
	ITSr2 ⁽³⁾	ATG TGC GTT CRA AAT GTC GAT GTT C	R
	ITSBejF1a ⁽⁴⁾	GTG ATC GCT GCG ACG CCT	F
EF-1 α	EF0-5' ⁽⁵⁾	TCC GGA TGG CAY GGC GAG AAY ATG	F
	EF1-5'b ⁽⁵⁾	GAC AAC GTT GGC TTC AAC GTG	F
	EF2-3'b ⁽⁵⁾	ATG TGA GCA GTG TGG CAA TCC	R
A+T rich	TIN-24 ⁽²⁾	ATT TAC CCT ATC AAG GTA A	R
	SR-J-14612 ⁽²⁾	AGG GTA TCT AAT CCT AGT TT	F

1) Folmer *et al.* 1994

2) Simon *et al.* 1994

3) Ji *et al.* 2003

4) Žurovcová, Strouhalová

5) dokumentace „Insect nuclear primer set“, NAPS Unit, University of British Columbia

(www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS)

3.3.2. Složení reakční směsi

Typická PCR reakce připravená do mikrozkušavky (0,5 ml) měla objem 12,05 μ l a obsahovala tyto složky: 7,25 μ l dd H₂O, 1,25 μ l 10x Ex Taq pufru (TaKaRa), 1,0 μ l dNTP (2,5mM, TaKaRa), 0,75 μ l primer forward (5 μ M), 0,75 μ l primer revers (5 μ M), 1,0 μ l templátová DNA, 0,05 μ l TaKaRa Ex Taq polymerázy.

Reakce byla připravena na ledu, přidání polymerázy byl poslední krok.

3.3.3. Amplifikace markeru COI („barcoding“)

Všechny PCR amplifikace proběhly na Eppendorf Master cycleru.

Amplifikační program sestával z následujících kroků: predenaturace 94°C, 1 min., následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 30 s, annealing 43-55°C, 45 s, elongace 72°C, 1 min.), reakci ukončila postelongace 72°C, 3 min.

U některých vzorků však při výše uvedené teplotě annealingu k nasedání primerů nedocházelo, proto musel být použit program step-up: predenaturace 94°C, 1 min., následovalo 5 cyklů (denaturace 94°C, 15 s, annealing 37°C, 45 s, elongace 68°C, 1 min.), poté následovalo 30 cyklů (denaturace 94°C, 15 s, annealing 43-55°C, 45 s, elongace 72°C, 1 min.), reakci ukončila postelongace 72°C, 7 min.

3.3.4. Amplifikace markeru ITS1

Všechny PCR amplifikace proběhly na Eppendorf Master cycleru.

Amplifikační program sestával z následujících kroků: predenaturace 94°C 1 min., následovalo 30 cyklů (denaturace 94°C, 30 s, annealing 57-69°C, 30 s, elongace 72°C, 1 min.), reakci ukončila postelongace 72°C, 7 min.

I zde u některých vzorků k nasedání primerů nedocházelo, proto byl také použit step-up: predenaturace 94°C, 1 min., následovalo 5 cyklů (denaturace 94°C, 15 s, annealing 37°C, 45 s, elongace 68°C, 1 min.), poté následovalo 30 cyklů (denaturace 94°C, 15 s, annealing 57-69°C, 45 s, elongace 72°C, 1 min.), reakci ukončila postelongace 72°C, 7 min.

3.4. Gelová elektroforéza

Elektroforéza byla použita ke kontrole úspěšnosti izolace DNA, ke kontrole velikosti fragmentů DNA po PCR amplifikaci a dále po jejich přečištění pro sekvenování. Byla prováděna na 1,5 % agarózovém gelu. Gel byl připraven rozpuštěním 1,5 g agarózy (SeaKem LE Agarose) v 98,5 ml 1x TAE pufru (50x TAE pufr: 242 g TRIS, 57,1 ml kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA, 1000 ml H₂O, pH = 8,0) a rozvařením v mikrovlnné troubě. Po ochlazení na cca 50°C

byl nalit do připravené formy s vloženými hřebínky a ponechán přibližně 40 minut tuhnout při pokojové teplotě. Na připravený gel bylo nanášeno buď 5 μl PCR produktu anebo pouze 1 μl , pokud šlo o PCR produkt přečištěný.

Elektroforéza probíhala po dobu 30 minut při napětí 120 V. Poté byla DNA barvena v lázni (100 ml 1x TAE pufru + 5 μl ethidiumbromidu o koncentraci 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) po dobu 25 minut a zviditelněna na UV transiluminátoru (UVP Transilluminator). Fotografie byly pořízeny pomocí kamery (UVP).

Pro odečtení velikosti produktu byly použity velikostní markery Lambda DNA/EcoRI + HindIII (Fermentas) a ΦX174 RF1 DNA/BsuRI (Fermentas); porovnání s těmito standardy sloužilo také pro odhad kvantity daného PCR produktu.

3.5. Purifikace PCR produktů a izolace z gelu

U většiny vzorků byla použita pouze metoda purifikace PCR produktů pomocí kitu DNA Clean & Concentrator™-5 dle návodu výrobce. Výsledek purifikace byl ověřen pomocí elektroforézy a koncentrace přečištěného fragmentu pro sekvenační reakci byla odečtena vizuálně srovnáním s velikostním standardem.

U některých vzorků se při PCR vytvořilo více nespecifických produktů, takže amplifikované úseky požadované velikosti musely být izolovány přímo z gelu. Takovýto úsek byl z gelu vyříznut na UV transiluminátoru (UVP Transilluminator) a purifikován pomocí kitu Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit podle návodu výrobce. Výsledek purifikace byl opět ověřen elektroforeticky a vizuálně byla odečtena koncentrace přečištěného fragmentu pro sekvenační reakci.

3.6. Klonování

3.6.1. Příprava vektoru

PCR reakce byla vyhodnocena pomocí elektroforézy na 1,5 % gelu z agarózy s nízkým bodem tání (120V, následně barveno roztokem 100 ml 1x TAE pufru a 5 μl ethidiumbromidu o koncentraci 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ po dobu 25 min). Požadovaný fragment byl vyříznut na UV transiluminátoru (UVP Transilluminator) a rozpuštěn v mikrozkuhavce při 70°C cca. 10 min.

Složení ligační směsi : 10 μl dd H_2O + 7 μl rozpuštěné agarosy + 1 μl pDrive klonovacího vektoru (50 ng/ μl) (QIAGEN) + 2 μl 10x ligačního pufru (Fermentas) + 1 μl T4 ligázy (400 jednotek / μl) (Fermentas). Ligace byla prováděna 12 hodin při 8°C.

Ligace byla prováděna také pomocí komerčního kitu QIAGEN PCR Cloning Kit (QIAGEN) dle návodu výrobce.

3.6.2. Transformace bakterií

Do 100 μ l kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5 α bylo přidáno 2 μ l merkaptoetanolu a 5 - 10 μ l plazmidu z předchozí reakce, promícháno kroužením.

Směs byla nechána 20 min stát na ledu. Poté byl proveden tepelný šok ponořením na 40 sekund do 42°C horké vodní lázně a vrácením na led. Ke směsi bylo přidáno 500 μ l tekutého LB média. Vše bylo inkubováno 45-50 min při 37°C v třepačce.

Na předem připravené agarové misky (obsahující tuhé LB médium s přidáním ampicilínem o konečné koncentraci 100 mg/ml) bylo naneseo 50 μ l X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galaktózid, 20 mg/ml v dimethylformamidu) a 10 μ l IPTG (Izopropyl-thio-D-galaktózid 200 mg/ml). Po zaschnutí bylo na misky naneseo po 100 μ l bakteriální směsi a rovnoměrně rozetřeno.

Inkubace probíhala 15-18 hodin při 37°C v inkubátoru dnem vzhůru (první hodinu misky z 2/3 odkryté dnem dolů pro odpaření přebytečné tekutiny).

Po inkubaci bylo možno detekovat kolonie s integrovaným inzertem v plazmidech pomocí modrobílé selekce na utilizaci galaktózy.

Na důkaz zaklonování správného fragmentu bylo provedeno PCR. Jako templát posloužila část kolonie, která byla resuspendována v 20 μ l dd H₂O a cca 5 min povařena při 94°C. PCR bylo provedeno stejným způsobem jako v kapitolách 3.3.3. a 3.3.4.

3.7. Sekvenování DNA

3.7.1. Sekvenační směs

Pro sekvenování byl použit kit BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit. Složení reakční směsi (20 μ l): 2,0 μ l sekvenačního mixu, 3,0 μ l 5x sekvenačního pufru, 1,0 μ l primeru (5 μ M), 10-40 ng PCR produktu, vše doplněno dd H₂O do 20 μ l.

3.7.2. Sekvenační program

Sekvenační reakce, při které byl použit jako templát PCR produkt, proběhla v 25 cyklech při teplotách 96 °C, 15 s, 50 °C, 20 s, 60 °C, 4 min.; s úvodní denaturací 96 °C, 1 min. (Eppendorf Master cycler).

3.8. Přečištění sekvenační reakce pomocí Sephadexu a aerosolových špiček

3.8.1. Hydratace Sephadexu

Pro přípravu 1 sloupečku bylo potřeba 0,05 g Sephadexu (Sephadex G-50) a 750 μ l MilliQ H₂O. Sephadex byl ve vodě rozpuštěn a vzniklá směs byla ponechána minimálně 45 min. stát při 4 °C.

3.8.2. Příprava sloupečku

Aerosolová špička (1 ml) byla uříznuta cca 5 mm pod filtrem a umístěna do 1,5 ml mikrozkuhavky. Roztok Sephadexu byl důkladně promíchán. Na každý sloupeček bylo nanášeno 400 μ l roztoku Sephadexu a pipetovacím dudlíkem byla protlačena přebytečná voda. Poté bylo nanášeno na sloupeček dalších 400 μ l a centrifugováno 2 min při 1 000 g. Sloupečky byly umístěny do nových 1,5 ml mikrozkuhovek.

3.8.3. Čištění sekvenační reakce

Sekvenační reakce byla nanášena na čerstvě připravený sloupek Sephadexu, jehož povrch by neměl obsahovat nečistoty a neměl by být popraskaný. Sloupečky byly umístěny v centrifuze ve stejné orientaci a stočeny 2 min. při 1 000 g. Přečištěná sekvenační reakce byla vysušena ve vakuové vysoušečce Speed-Vac (cca 20 min) při pokojové teplotě.

3.9. Vyhodnocení sekvencí

K analýze sekvencí byl použit automatický sekvenátor ABI PRISM 310 od firmy Perkin Elmer (Applied Biosystems, Biologické centrum AV ČR, ENTÚ) a ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, Biologické centrum AV ČR, ÚMBR, Laboratoř genomiky).

3.10. Software pro analýzu sekvencí

Při práci s molekulárními daty a pro úpravu sekvencí byly použity programy EditSeq a SeqManII z programového balíku DNASTAR ver. 4.0 (DNASTAR, Inc.). Program EditSeq sloužil jako textový editor sekvencí, v programu SeqManII a MEGA verze 4 (Tamura *et al.* 2007) byly komplementární sekvence spojeny, upraveny a byla z nich vytvořena konsenzuální sekvence. Kontrolní identifikace sekvencí byla provedena pomocí databáze NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Aligmenty byly vytvořeny metodou ClustalW také v programu MEGA verze 4.

V programu MEGA verze 4 byly také vypočteny základní charakteristiky sekvencí (průměrná délka, nukleotidové složení), dále genetické vzdálenosti (model Kimura 2-Parameter) a provedena shlukovací (klastrová) analýza metodou Neighbour-Joining (NJ). Pomocí modelu Kimura 2-Parameter byly vytvořeny dendrogramy, přičemž mezery (gapy)

byly považovány za chybějící data u genu COI (použita volba „Complete deletion“), naopak u ITS1 byly gapy zohledňovány, započítávány jako další znak (použita volba „Pairwise deletion“). Statistická podpora stromu byla testována pomocí metody bootstrap (1000 opakování).

Analýza haplotypů a jejich frekvencí byla provedena pomocí programu DnaSP ver. 3 (Rozas & Rozas, 1999).

4. Výsledky

4.1. Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna pomocí tří různých metod. Izolace extrakčním puřrem se nepodařila ani v jediném případě. U chelexové izolace a izolace pomocí komerčního kitu byla izolace skoro stoprocentní, z celkového počtu 64 zpracovávaných jedinců se nepodařilo vyizolovat DNA pouze u šesti vzorků (viz Příloha 5).

4.2. Testované markery

V této práci byla testována vhodnost dvou nukleárních a dvou mitochondriálních markerů pro rozdělení bejloerek na druhové a rodové úrovni. Celkem bylo použito 11 primerů. Úspěšně se podařilo naamplifikovat pouze mitochondriální gen COI a nukleární fragment ITS1.

4.2.1. Gen COI

Cílová oblast mitochondriálního genu COI byla osekvenována u celkem 51 jedinců ze 14 druhů (podrobná tabulka uvádějící primery použité na sekvenování u jednotlivých druhů viz Příloha 5). Vzorek č. 18 (*Oligotrophus juniperinus*, ČR – Nemíž) byl z konečné analýzy vyřazen, protože při tvorbě dendrogramů byla zjištěna jeho naprostá totožnost se sekvencí vzorku 11-2 (*Lasioptera arundinis*, Španělsko), což bylo pravděpodobně způsobeno kontaminací při sekvenační reakci. Průměrná délka sekvence COI byla 651 bází. Další statistické informace o použitých sekvencích jsou uvedeny níže (Tab. 3).

Tab. 3. Statistika sekvencí COI.

Druh (počet jedinců)	Nukleotidové frekvence (%)				Délka sekvence
	T (U)	C	A	G	
<i>L. hungarica</i> (2)	40,2	13,6	34	12,3	629
<i>L. carophila</i> (2)	44,4	12,3	34,1	12,4	686,5
<i>L. arundinis</i> (4)	41	12,5	33,9	12,5	665,7
<i>L. calamagrostidis</i> (2)	41,6	12,1	34,4	12,1	679
<i>D. circinans</i> (2)	39,9	12,1	34,4	13,7	647,5
<i>H. annulipes</i> (1)	39,6	13,7	33,3	13,4	604
<i>M. fagi</i> (2)	41	13,8	31,8	13,4	640
<i>R. rosaria</i> (4)	40,6	14,1	31,8	13,5	624,5
<i>J. szeptigetii</i> (4)	39,8	14,5	31,9	13,9	635,8
<i>J. cerris</i> (2)	40,8	14,8	32,1	12,4	638
<i>O. panteli</i> (1)	40,8	12,8	34	12,4	686
<i>O. navicularis</i> (1)	41,4	13,4	32,6	12,6	635
<i>O. juniperinus</i> (17)	40,5	13	34,5	12	655,2
<i>A. aphidimyza</i> (7)	41	13,2	33,4	12,3	686
Průměr	40,9	13,3	33,3	12,7	651

Počet variabilních míst sekvencí COI je 278, což je 40,1 % z celkové délky sekvence.

Celková průměrná genetická vzdálenost získaných sekvencí COI je 0,142 se směrodatnou odchylkou 0,011.

Byly spočítány i genetické vzdálenosti uvnitř jednotlivých druhů a mezi druhy navzájem (Tab. 4, 5).

Tab. 4. Vnitrodruhové genetické vzdálenosti.

Druh (počet jedinců)	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>L. hungarica</i> (2)	0,004	0,003
<i>L. carophila</i> (2)	0,000	0,000
<i>L. arundinis</i> (4)	0,086	0,011
<i>L. calamagrostidis</i> (2)	0,000	0,000
<i>D. circinans</i> (2)	0,000	0,000
<i>H. annulipes</i> (1)	n/c	n/c
<i>M. fagi</i> (2)	0,000	0,000
<i>R. rosaria</i> (4)	0,069	0,010
<i>J. szeptigetii</i> (4)	0,032	0,007
<i>J. cerris</i> (2)	0,002	0,002
<i>A. aphidimyza</i> (7)	0,000	0,000
<i>O. panteli</i> (1)	n/c	n/c
<i>O. juniperinus</i> (17)	0,073	0,008
<i>O. navicularis</i> (1)	n/c	n/c

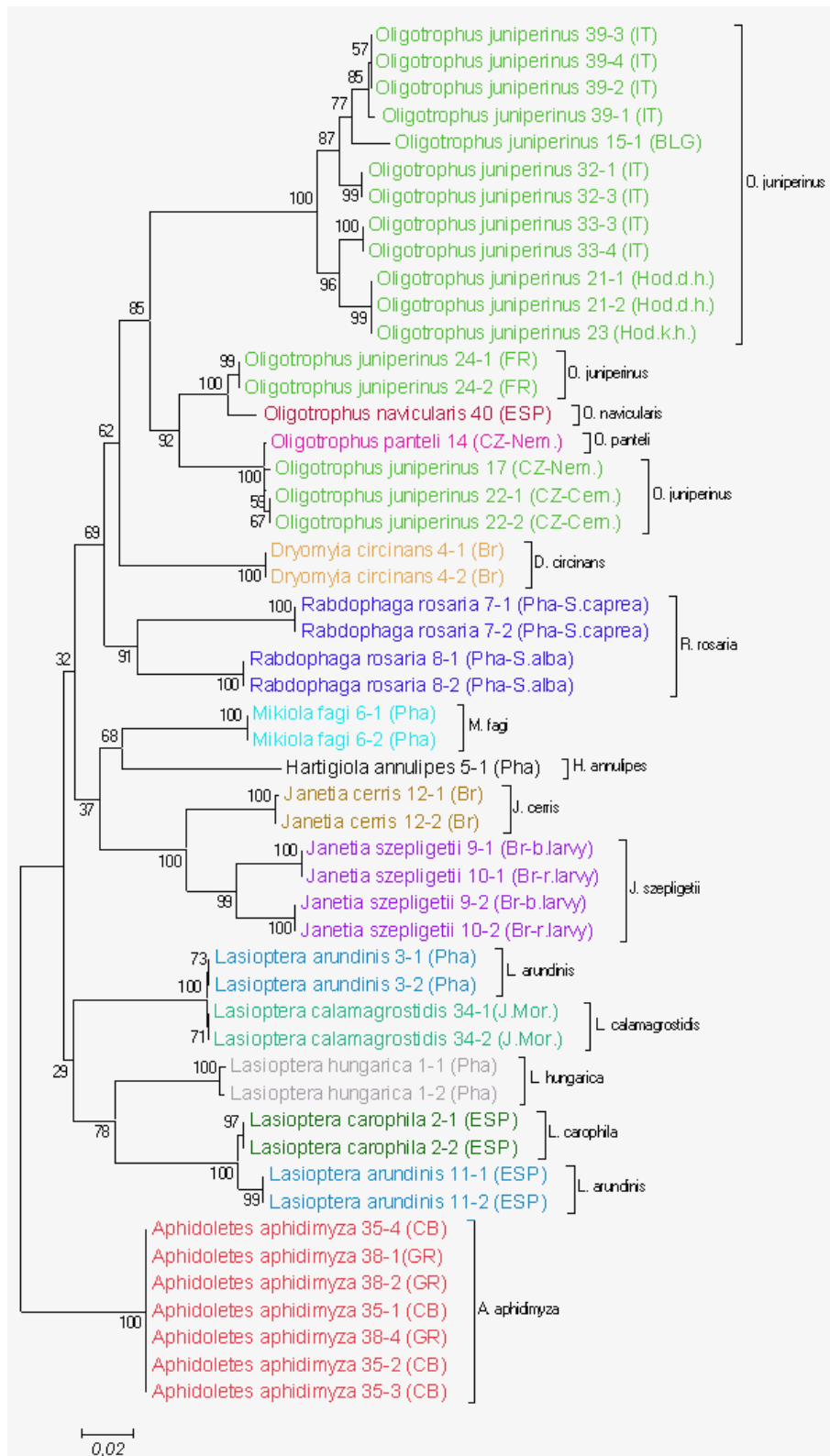
n/c....průměr a odchylka nebyla spočítána u druhů s pouze jedním osekvenovaným jedincem.

Tab. 5. Mezidruhové genetické vzdálenosti.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1		0,014	0,013	0,019	0,019	0,019	0,017	0,019	0,018	0,019	0,018	0,015	0,017	0,019
2	0,093		0,008	0,018	0,018	0,018	0,017	0,016	0,015	0,019	0,020	0,016	0,017	0,020
3	0,110	0,064		0,017	0,016	0,016	0,015	0,015	0,015	0,017	0,017	0,008	0,014	0,017
4	0,153	0,138	0,154		0,018	0,019	0,016	0,018	0,019	0,015	0,015	0,019	0,019	0,015
5	0,146	0,143	0,155	0,136		0,016	0,017	0,018	0,018	0,018	0,019	0,019	0,019	0,018
6	0,142	0,138	0,141	0,138	0,112		0,016	0,017	0,018	0,019	0,019	0,017	0,017	0,019
7	0,149	0,146	0,155	0,132	0,142	0,134		0,018	0,017	0,015	0,014	0,016	0,017	0,015
8	0,158	0,130	0,150	0,150	0,147	0,135	0,171		0,012	0,019	0,019	0,019	0,020	0,018
9	0,139	0,118	0,138	0,144	0,140	0,135	0,150	0,080		0,02	0,019	0,018	0,019	0,018
10	0,152	0,156	0,155	0,112	0,143	0,156	0,134	0,166	0,167		0,012	0,019	0,019	0,012
11	0,171	0,184	0,177	0,142	0,184	0,172	0,156	0,191	0,184	0,099		0,017	0,018	0,012
12	0,114	0,114	0,064	0,156	0,166	0,131	0,151	0,165	0,144	0,146	0,163		0,015	0,017
13	0,146	0,133	0,129	0,138	0,148	0,133	0,152	0,167	0,150	0,156	0,175	0,117		0,019
14	0,149	0,166	0,152	0,105	0,138	0,141	0,125	0,151	0,147	0,066	0,105	0,133	0,148	

1 - *L. hungarica*, 2 - *L. carophila*, 3 - *L. arundinis*, 4 - *D.circinans*, 5 - *H.annulipes*, 6 - *M. fagi*, 7 - *R. rosaria*, 8 - *J. szeptigetii*, 9 - *J. cerris*, 10 - *O. panteli*, 11 - *O. juniperinus*, 12 - *L. calamagrostidis*, 13 - *A. aphidimyza*, 14 - *O. navicularis*. Černě jsou psány průměry, modře směrodatné odchylky od průměru.

V 51 získaných sekvencích COI se celkově vyskytovalo 27 různých haplotypů, tyto haplotypy byly rozděleny rovnoměrně mezi druhy, což je zřetelné i z níže uvedeného dendrogramu (Obr. 3).



Obr. 3. Dendrogram COI (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parameter, Complete deletion, Bootstrap 1000). Zakořeněný strom, jako outgroup použit *A. aphidimyza*. Barvy znázorňují příslušnost k témuž druhu.

4.2.2. Fragment ITS1

Sekvenci nukleární oblasti ITS1 se podařilo získat u 48 jedinců ze 14 druhů (tabulka uvádějící použité primery u jednotlivých druhů opět viz Příloha 5). Do konečné analýzy a tvorby dendrogramů nebyly zahrnuty sekvence 8 jedinců druhu *Aphidoletes aphidimyza* z důvodu příliš velké odlišnosti od ostatních sekvencí a neumožnění tvorby společného aligmentu. Průměrná délka získaných sekvencí byla 662,4 bází. Další statistické údaje jsou uvedeny níže (Tab. 6).

Tab. 6. Statistika sekvencí ITS1.

Druh (počet jedinců)	Nukleotidové frekvence (%)				Délka sekvence
	T (U)	C	A	G	
<i>L. hungarica</i> (2)	36,7	12,1	36,0	15,4	622,5
<i>L. carophila</i> (2)	36,1	12,2	36,5	15,4	662,5
<i>L. arundinis</i> (4)	37,0	12,1	35,5	15,5	665
<i>L. calamagrostidis</i> (2)	36,7	12,5	34,3	16,6	701
<i>D. circinans</i> (2)	36,4	12,6	33,7	17,4	600,5
<i>R. rosaria</i> (4)	36,5	12,7	32,5	18,2	604,3
<i>H. annulipes</i> (1)	35,2	11,8	33,8	19,1	727
<i>M. fagi</i> (1)	35,5	12,2	34,5	17,9	682
<i>J. szepligetii</i> (2)	38,1	11,5	31,9	18,3	710
<i>J. cerris</i> (2)	37,7	11,4	33,0	18,1	678
<i>O. juniperinus</i> (16)	37,1	12,0	33,0	17,8	667,2
<i>O. panteli</i> (1)	36,3	12,0	33,3	18,4	691
<i>O. navicularis</i> (1)	36,5	12,1	32,9	18,4	695
Průměr	36,8	12,1	33,7	17,4	662,4

Počet variabilních míst u sekvencí ITS1 je 269, což je 30,7 % z celkové délky sekvence.

Celková průměrná genetická vzdálenost získaných sekvencí ITS1 je 0,107 se směrodatnou odchylkou 0,007.

Pro marker ITS1 byly také spočítány genetické vzdálenosti uvnitř druhu i mezi jednotlivými druhy navzájem (Tab. 7, 8).

Tab. 7. Vnitrodruhové genetické vzdálenosti.

Druh (počet jedinců)	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>L. hungarica</i> (2)	0,002	0,002
<i>L. carophila</i> (2)	0,008	0,003
<i>L. arundinis</i> (4)	0,072	0,009
<i>L. calamagrostidis</i> (2)	0,000	0,000
<i>D. circinans</i> (2)	0,008	0,004
<i>R. rosaria</i> (4)	0,008	0,003
<i>H. annulipes</i> (1)	n/c	n/c
<i>M. fagi</i> (1)	n/c	n/c
<i>J. szepligetii</i> (2)	0,007	0,003
<i>J. cerris</i> (2)	0,003	0,002
<i>O. panteli</i> (1)	n/c	n/c
<i>O. juniperinus</i> (16)	0,006	0,002
<i>O. navicularis</i> (1)	n/c	n/c

n/c....průměr a odchylka nebyla spočítána u druhů s pouze jedním osekvenovaným jedincem.

Tab. 8. Mezidruhové genetické vzdálenosti.

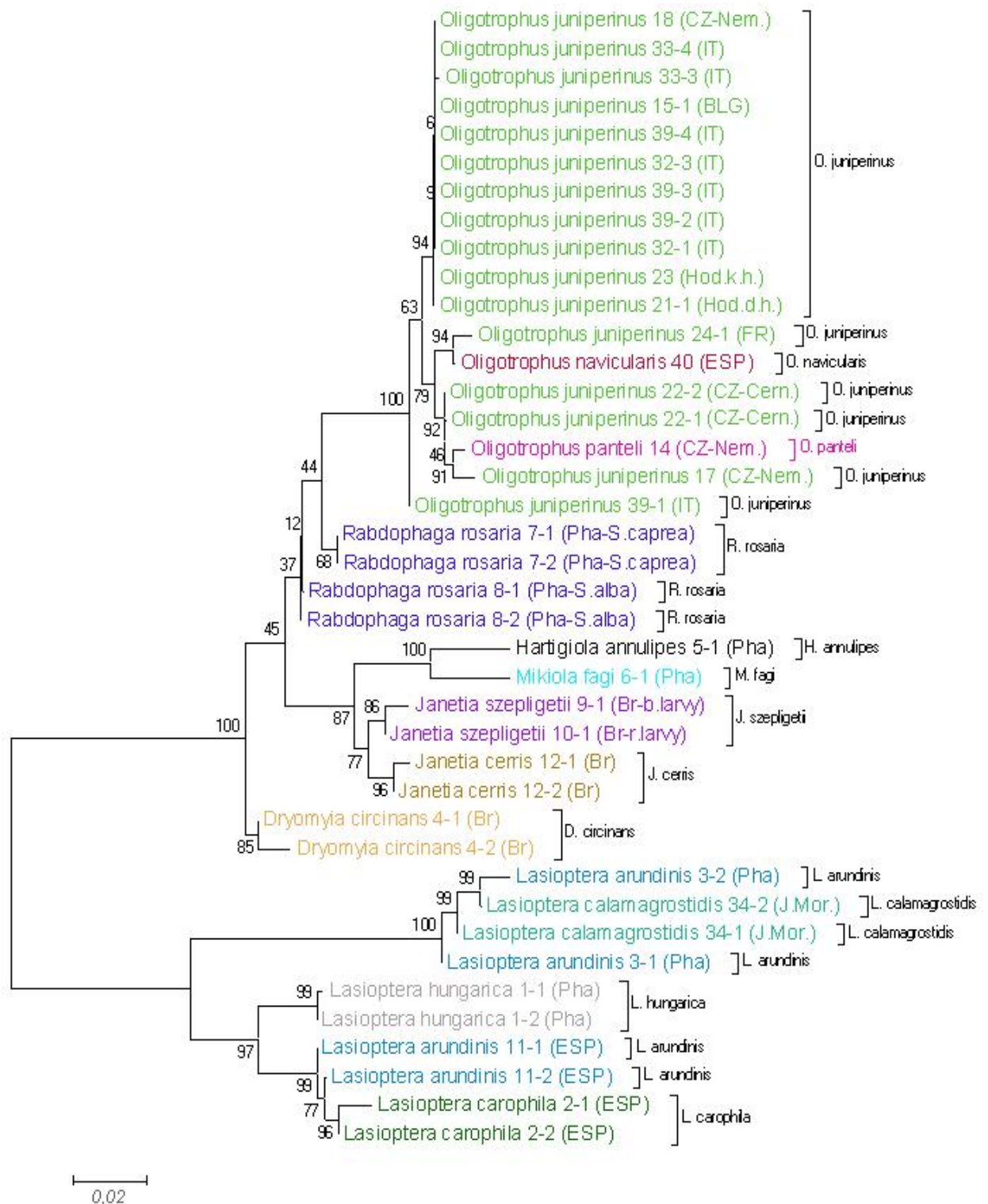
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1		0,007	0,016	0,017	0,016	0,018	0,011	0,011	0,010	0,010	0,010	0,009	0,009
2	0,037		0,015	0,016	0,015	0,017	0,010	0,009	0,008	0,008	0,008	0,007	0,007
3	0,159	0,137		0,007	0,009	0,014	0,018	0,019	0,020	0,020	0,019	0,018	0,019
4	0,167	0,152	0,037		0,007	0,013	0,018	0,019	0,019	0,020	0,019	0,018	0,019
5	0,176	0,159	0,070	0,058		0,007	0,018	0,018	0,021	0,019	0,018	0,018	0,018
6	0,185	0,171	0,106	0,111	0,054		0,02	0,020	0,009	0,021	0,021	0,021	0,020
7	0,181	0,066	0,190	0,201	0,212	0,225		0,008	0,009	0,009	0,014	0,013	0,013
8	0,180	0,063	0,196	0,206	0,217	0,231	0,043		0,004	0,009	0,013	0,013	0,013
9	0,063	0,045	0,211	0,220	0,223	0,228	0,051	0,056		0,004	0,010	0,010	0,009
10	0,064	0,045	0,204	0,213	0,217	0,221	0,052	0,057	0,017		0,010	0,009	0,009
11	0,064	0,042	0,208	0,215	0,231	0,247	0,117	0,113	0,072	0,073		0,004	0,004
12	0,057	0,036	0,204	0,212	0,225	0,241	0,105	0,105	0,069	0,070	0,014		0,003
13	0,059	0,037	0,212	0,220	0,230	0,237	0,111	0,109	0,071	0,073	0,015	0,012	

1 – *D. circinans*, 2 – *R. rosaria*, 3 – *L. hungarica*, 4 – *L. carophila*, 5 – *L. arundinis*,

6 – *L. calamagrostidis*, 7 – *H.annulipes*, 8 – *M. fagi*, 9 – *J. szepligetii*, 10 – *J. cerris*,

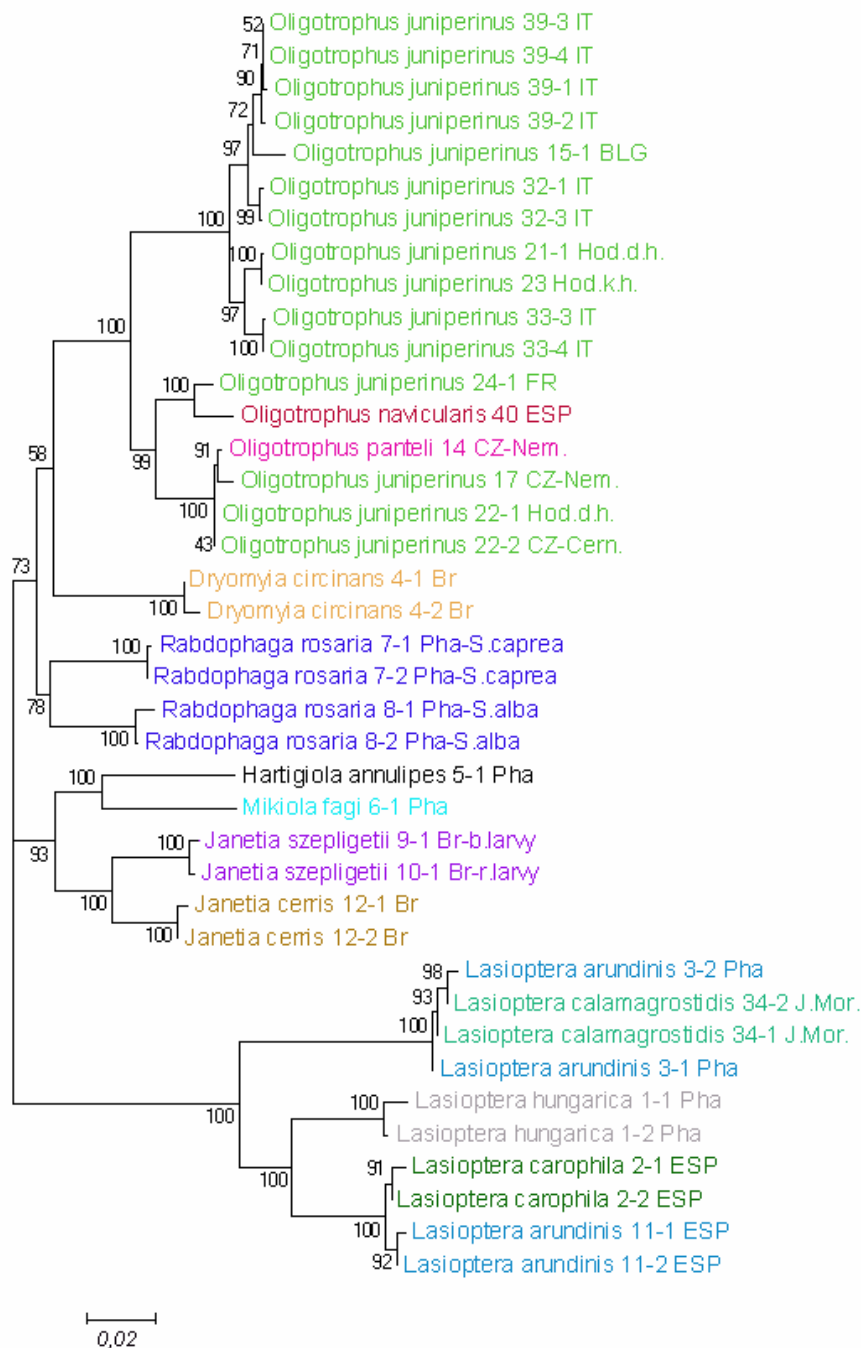
11 – *O. panteli*, 12 – *O. juniperinus*, 13 – *O. navicularis*. Černě jsou psány průměry, modře směrodatné odchylky od průměru.

Ve 40 získaných sekvencích ITS1 se vyskytovalo 18 různých haplotypů. I u tohoto genu byly rozděleny rovnoměrně mezi druhy. Výsledkem klastrové analýzy je dendrogram znázorněný na Obr. 4.



Obr. 4. Dendrogram na základě ITS1 (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 1000), „midpoint rooting“. Barvy znázorňují příslušnost k témuž druhu.

Pro srovnání se dvěma předešlými dendrogramy byl na základě sekvencí obou markerů vytvořen společný dendrogram (Obr. 5) metodou Neighbour-Joining, modelem Kimura 2-Parameter. Gapy byly zohledňovány a započítávány jako další znak, stejně jako u dendrogramu ITS1 (použita volba „Pairwise deletion“). Statistická podpora stromu byla otestována pomocí metody Bootstrap (1000 opakování).



Obr. 5. Dendrogram vytvořený na základě obou markerů COI+ITS1 (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 1000, „midpoint rooting“). Barvy znázorňují příslušnost k témuž druhu.

4.3. Parazitace *Mikioly fagi*

Dalším zajímavým výsledkem bylo zjištění nadměrné parazitace u druhu *Mikiola fagi*. Sekvence genu COI získané z jedinců nasbíraných na podzim roku 2006 na různých lokalitách v ČR patřily parazitům z řádu *Hymenoptera* (Tab. 9).

Tab. 9. Parazitace u *M. fagi*.

Číslo sekvence	Druh	Lokalita	Parazitický rod
26.	<i>M. fagi</i>	Velké Skaliny	<i>Ceratosolen (Hymenoptera)</i>
27-1.	<i>M. fagi</i>	Třísov u Zlaté Koruny	<i>Torymus (Hymenoptera)</i>
27-2.	<i>M. fagi</i>	Třísov u Zlaté Koruny	<i>Torymus (Hymenoptera)</i>
27-3.	<i>M. fagi</i>	Třísov u Zlaté Koruny	<i>Trichograma (Hymenoptera)</i>
28-1.	<i>M. fagi</i>	Hranice	<i>Trichograma (Hymenoptera)</i>
28-2.	<i>M. fagi</i>	Hranice	<i>Trichograma (Hymenoptera)</i>
29-1.	<i>M. fagi</i>	Pardubice	<i>Trichograma (Hymenoptera)</i>
29-2.	<i>M. fagi</i>	Pardubice	<i>Trichograma (Hymenoptera)</i>

4.4. Problematické sekvence

U druhu *Oligotrophus juniperinus* z jižní Francie (jedinci 25-1, 25-2), který byl určen V. Skuhravým s nejistotou, se potvrdila sekvencemi obou markerů nepříbuznost s *Cecidomyiidae*. Při kontrolní identifikaci sekvencí pomocí databáze NCBI BlastSearch oba osekvenovaní jedinci připadli do řádu *Lepidoptera*.

5. Diskuse

5.1 Izolace DNA

Byly vyzkoušeny celkem tři různé postupy izolace DNA z larev bejlomorek. Jako nejvhodnější se jeví metoda izolace pomocí kitu (ZR Genomic DNA II Kit™), kde byla téměř stoprocentní úspěšnost. Chelexová izolace se také zdařila ve většina případů, ale její nevýhodou byla poměrně častá degradace DNA, i přesto, že byla zamrazena. Izolace extrakčním pufrem (Cox & Hebert, 2001; Frati *et al.* 2001), používaná u velmi malých larev, se neosvědčila ani v jediném případě.

Případné neúspěchy u všech tří typů izolací mohly být způsobeny degradací DNA působením etanolu, ve kterém byly vzorky uchovávány.

5.2 Srovnání použitých markerů

Podarilo se naamplifikovat jak jeden marker mitochondriální (COI), tak i jeden marker nukleární (ITS1), což nám poskytlo zajímavé srovnání variability těchto dvou typů DNA. Gen COI, užívaný též pro „barcoding“, byl vybrán jako hlavní marker, ITS1 byl markerem doplňujícím. U obou fragmentů nás zajímalo, zda by mohly být vhodnými markery pro rozdělení bejlomorek na rodové a druhové úrovni. Obecně se očekávala vyšší variabilita u nekódujícího nukleárního ITS1. Výsledky ale byly přesně opačné. Jako variabilnější se v případě bejlomorek ukázal mitochondriální gen COI.

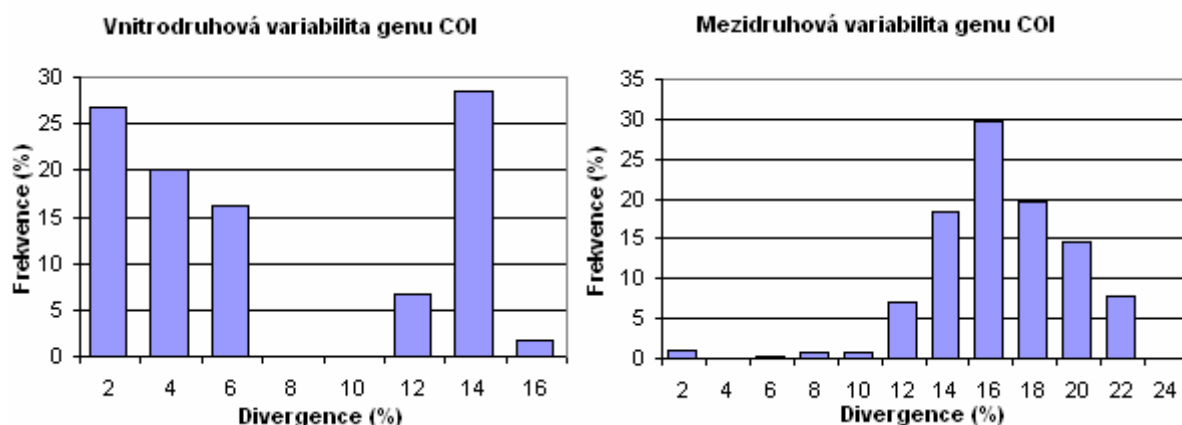
5.2.1. Marker COI

I když je „barcoding“ metodou upotřebitelnou na širokou škálu živočišných i rostlinných druhů (asi 95 %), existují výjimky, pro které všechny obecně uznávané zákonitosti této metody neplatí. Podle jedné studie (Meier *et al.* 2006) je takovou výjimkou i řád *Diptera* nebo aspoň určité čeledi tohoto řádu. V této studii bylo srovnáváno 1333 mitochondriálních COI sekvencí od 449 různých druhů. Byla zjištěna vysoká vnitrodruhová variabilita a její rozsáhlý překryv s mezidruhovou variabilitou (0-15 %) často způsobil chybnou identifikaci druhu. Také bylo zjištěno, že i když jsou dvě COI sekvence identické, existuje až 6 % šance, že patří rozdílným druhům. 21 % všech studovaných druhů, u kterých bylo k dispozici větší množství sekvencí, měly naprosto identickou konsenzuální sekvenci. Ze všech těchto údajů, zjištěných v této studii, vyplynulo, že COI není úplně vhodným identifikačním markerem u *Dipter*.

I když dendrogram vytvořený ze získaných sekvencí COI u bejlomorek rozdělil rody a druhy do společných skupin správně, překryv vnitrodruhové a mezidruhové variability tohoto genu byl velmi vysoký. Vnitrodruhová variabilita se pohybovala v rozmezí 0 – 14,6 % s průměrnou hodnotou 2,4 %. Mezidruhová variabilita se pohybovala v rozmezí 0,2 – 22,2 %

s průměrnou hodnotou 14,2 %. Rozhodně se tedy nepotvrdil obecný předpoklad „barcodingu“, že vnitrodruhová variabilita by měla být průměrně asi 10x menší než variabilita mezidruhová. Na základě matice genetických vzdáleností (analýza Pairwise distance calculation, Kimura 2-Parameter v programu MEGA verze 4) byly vytvořeny histogramy zobrazující vnitro- a mezidruhovou variabilitu (Obr. 6), ze kterých je překryv obou variabilit zřejmý.

Obr. 6. Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita genu COI u bejloemek.

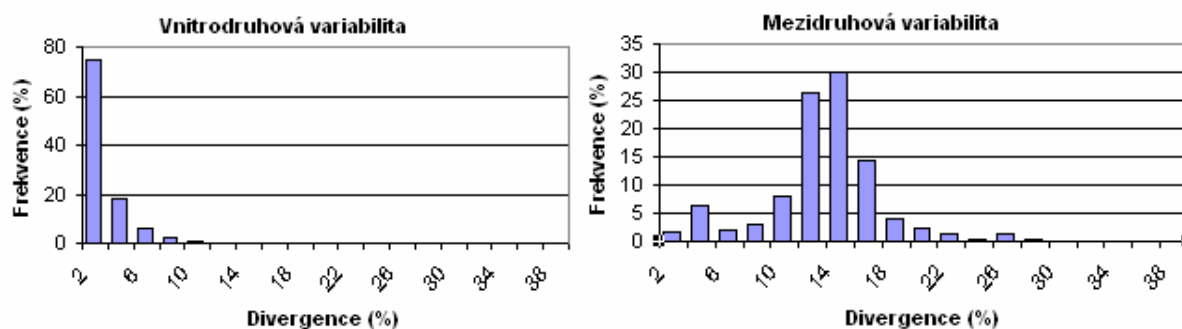


Vnitrodruhová variabilita by měla být nejvyšší v rozmezí 0-2 % a ne v rozmezí 12-14 %, jak je tomu u bejloemek.

Pro srovnání jsou zde zobrazeny histogramy vnitro- a mezidruhové variability u *Dipter* získané v databázi BOLD (www.barcodinglife.org) (Obr. 7). I zde se sice obě variability překrývají, ale maximální hodnoty variabilit se nacházejí v tom správném rozmezí procent.

Žádná podrobnější srovnání se sekvencemi genu COI u bejloemek dostupných na internetu (GenBank, BOLD) nebyla provedena, protože všechny tyto sekvence byly nejméně o 250 bází kratší než naše sekvence, což by mohlo jakékoliv analýzy zkreslit.

Obr. 7. Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita genu COI u řádu *Diptera*.



Průměrné nukleotidové frekvence získaných sekvencí COI bejlomorek odpovídají průměrným nukleotidovým frekvencím sekvencí *Dipter* dostupných v databázi BOLD (www.barcodinglife.org).

Celkovou vysokou vnitrodruhovou variabilitu genu COI u bejlomorek zapříčiňuje zejména vysoká vnitrodruhová variabilita druhu *Lasioptera arundinis*, *Oligotrophus juniperinus* a *Rabdophaga rosaria*.

Druh *Lasioptera arundinis* (čísla sekvencí 3-1, 3-2, 11-1, 11-2) pochází ze vzdálených geografických lokalit, z ČR a ze Španělska. Buď je vysoká variabilita (12,9 %) způsobena právě geografickou vzdáleností nebo se jedná o dva rozdílné druhy. I v dendrogramu jsou totiž tyto jedinci z různých lokalit od sebe vzdáleni. *L. arundinis* z Prahy (3-1, 3-2) je spíše příbuzná s *L. calamagrostidis* (34-1, 34-2), jejich mezidruhová variabilita je pouze 0,2 %.

Vnitrodruhová variabilita u *O. juniperinus* se vždy mezi více jedinci z téže lokality pohybuje v rozmezí 0-0,4 %. I otázka krátkých a dlouhých hálek z Hodkova (21-1, 21-2, 23) je s nulovou variabilitou vyřešena – jedná se pravděpodobně o tentýž druh. Mezi jedinci z různých lokalit je ale variabilita většinou hodně vysoká, pohybující se v rozmezí 2,1- 14,6 %, což by mohlo znamenat buď potenciální druhovou směs nebo výraznou geografickou diferenciaci.

Druh *Rabdophaga rosaria* byl nalezen na dvou hostitelských rostlinách, *Salix caprea* (7-1, 7-2) a *Salix alba* (8-1, 8-2). Šlo o zjištění, jestli se stále jedná o jeden a tentýž druh. Zatímco mezi dvěma jedinci z téže hostitelské rostliny byla variabilita vždy 0 % (v tomto případě však mohlo jít také o příbuzné jedince), variabilita jedinců z různých hostitelských rostlin byla 10,3 %, což by mohlo znamenat, že tato ekologická diferenciaci ukazuje opravdu na dva různé druhy. Dlouhé větve v dendrogramu tuto domněnku jen potvrzují.

Naopak nízký rozsah variability (0-4,9 %) i rozložení v dendrogramu u druhu *Janetia szepligetii*, u něhož byly nalezeny bílé larvy (9-1, 9-2) a růžové larvy (10-1, 10-2) svědčí spíše o tom, že se stále jedná o jeden druh.

Dravý druh *Aphidoletes aphidimyza*, pocházející ze dvou geograficky vzdálených lokalit (ČR a Řecko), který byl použit jako srovnávací materiál, vykazuje naprosto nulovou variabilitu mezi jedinci v rámci jednotlivých populací. Vzhledem k tomu, že *A. aphidimyza* z ČR pochází z laboratorních chovů, použití jedinci mohli být identickými klony nebo silně inbrední. Zajímavé ale je, že i v řecké populaci a dokonce mezi populacemi navzájem byla nulová variabilita, i když řecké bejlomoreky pocházejí z volné přírody.

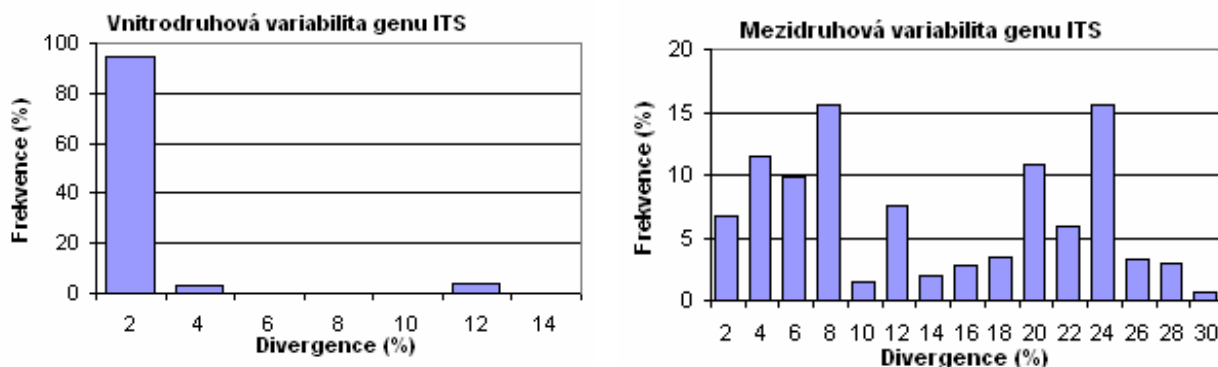
Hodnoty mezidruhové variability vycházejí o něco lépe. Za povšimnutí stojí ale velice nízká variabilita mezi *O. juniperinus* (17) a *O. panteli* (14) a to pouze 0,2 %. Oba druhy pocházejí z téže lokality, mohlo by se tedy jednat o druh jediný.

U pravděpodobně nového, dosud nepopsaného druhu *O. navicularis* ze Španělska je mezidruhová variabilita s *O. juniperinus* poměrně vysoká (6,9-14,4 %), což by opravdu mohlo ukazovat na jiný druh.

5.2.2. Marker ITS1

I když byly předpoklady odlišné, variabilita genu ITS1 u bejlomorek je menší než u genu COI, jak je již uvedeno výše. I když v dendrogramu jsou opět rody i druhy rozděleny správně, překryv variabilit byl značný i u tohoto genu. Vnitrodruhová variabilita se pohybovala v rozmezí 0 – 11,3 % s průměrnou hodnotou 1,3 % a mezidruhová variabilita v rozmezí 0 - 28,1 % s průměrnou hodnotou 13,7 %. V zásadě tyto hodnoty vyhovují obecnému pravidlu, že vnitrodruhová variabilita by měla být asi 10x menší než variabilita mezidruhová. I u tohoto genu byly na základě matice genetických vzdáleností (analýza Pairwise distance calculation, Kimura 2-Parameter v programu MEGA verze 4) vytvořeny histogramy zobrazující vnitro- a mezidruhovou variabilitu, ze kterých je ale také zřejmý příliš velký překryv variabilit, což je rozhodně nutné brát v úvahu (Obr. 8).

Obr. 8. Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita genu ITS1 u bejlomorek.



Vnitrodruhová variabilita je nejvyšší v rozmezí 0-2 %, což vychází lépe než u genu COI. I u druhu *O. juniperinus* se v případě tohoto genu pohybuje vnitrodruhová variabilita v rozmezí 0-2 %. Jediným problémem je opět druh *L. arundinis* s vysokou variabilitou mezi jedinci ze vzdálených lokalit (11,3 %).

U druhu *Rabdophaga rosaria* je vnitrodruhová variabilita jedinců z různých hostitelských rostlin (*S. caprea*, *S. alba*) podstatně nižší než u genu COI, pohybuje se v rozmezí 1,2-1,4 %. Ke

konečnému rozhodnutí, zda se tedy opravdu jedná o dva různé druhy v závislosti na hostitelské rostlině, by bylo třeba srovnání ještě dalších markerů a také asi větší soubor jedinců.

Druh *Janetia szepligetii* (růžové versus bílé larvy) vykazuje i u genu ITS1 nízkou vnitrodruhovou variabilitu (0,7 %), dalo by se tedy snad tvrdit, že se opravdu jedná o jeden druh, kde nezáleží na barvě larev.

Co se týká mezidruhové variability, opět můžeme pozorovat jednu zajímavou skutečnost a to velice nízkou variabilitu mezi druhy *L. arundinis* z Prahy (3-1, 3-2) a *L. calamagrostidis* z Jižní Moravy (34-1, 34-2), která se pohybuje v rozmezí 0-0,6 %. I v dendrogramu jsou tyto dva druhy umístěny vedle sebe.

Mezi *O. juniperinus* (17) a *O. panteli* (14) z Nemíže je mezidruhová variabilita opět dosti nízká (1 %). K rozhodnutí, jestli se jedná o dva nebo pouze jeden druh, by bylo i zde třeba srovnání s dalšími markery a větší počet studovaných jedinců.

Mezidruhová variabilita mezi *O. juniperinus* a pravděpodobně novým druhem *O. navicularis* ze Španělska byla u genu ITS1 podstatně nižší než u genu COI a to pouze 0,6-1,2 %. K definitivnímu rozhodnutí, zda se opravdu jedná o nový druh, by bylo ale třeba srovnat větší soubor jedinců.

Celkově je mezidruhová variabilita ITS1 dosti rozsáhlá, jak je vidět z histogramu, proto asi nebude tento marker k určení tohoto typu variability zrovna vhodný. Lepší situace je ale u variability vnitrodruhové, kde se gen ITS1 jeví jako vhodnější marker než gen COI.

5.3. Tvorba dendrogramů

Metoda Neighbour-Joining a model Kimura 2-Parameter byly pro tvorbu dendrogramů vybrány na základě jejich ověřeného použití u markerů COI a ITS1 v pracích Smith *et al.* 2005b a Smith *et al.* 2006. V obou pracích byly na základě těchto dvou markerů objeveny kryptické druhy parazitických much (*Diptera: Tachinidae*).

Vyzkoušena byla i metoda Minimum Evolution, která pracuje na základě složitějšího algoritmu v porovnání s metodou Neighbour-Joining. Oba získané dendrogramy vypadaly ale velice podobně, proto byla i nadále používána jednodušší metoda Neighbour-Joining, stejně jako ve výše zmíněných pracích. Tato metoda je navíc standardem pro DNA barcoding (www.barcodinglife.org).

Dendrogram vytvořený na základě markerů COI i ITS1 (Obr. 5) obsahuje pouze společné sekvence, získané u obou genů. Proto je, co se týká počtu porovnávaných sekvencí, ze všech tří dendrogramů nejomezenější. Jednotlivé druhy jsou v tomto dendrogramu rozděleny velice podobně jako u dendrogramu genu ITS1, většina větví je ale podpořena vyšším bootstrapem (často až 100 %).

5.4. Parazitace *M. fagi*

Mikiola fagi měla v minulých letech gradaci, která byla v letech 2006 a 2007 silně ovlivněna parazity. V roce 2007 v důsledku parazitace *Mikiola fagi* téměř vymizela. Maličcí parazité se nacházejí v hálkách již ve velmi raném stadiu. Napadené hálky mají jiný tvar než hálky zdravé, nejsou tak baňaté a pěkně zduřelé (Skuhravý, osobní sdělení).

5.5. Kontaminace vzorků

I přes všechna patřičná opatření a práci se sterilním materiálem zřejmě došlo ke kontaminaci vzorku č. 18 (*O. juniperinus*) při sekvenační reakci.

Skutečnost, že vzorky 25-1 a 25-2 (*O. juniperinus*) byly přiřazeny při kontrolní identifikaci sekvencí k řádu *Lepidoptera*, byla pravděpodobně způsobena kontaminací při sběru.

6. Závěr

Úspěšnost izolace DNA byla sice v případě chelexové izolace a izolace pomocí kitu dosti vysoká, nebyla ale stoprocentní, což může být způsobeno degradací vzorků v etanolu. Pro ještě vyšší procento úspěšných izolací by bylo vhodné v dalších studiích vzorky po odběru zamrazit.

I když oba studované markery rozdělily v dendrogramech rody a druhy do správných taxonomických skupin, zdá se, že jsou oba dosti variabilní na to, aby byly pomocí nich bejlomorky spolehlivě rozděleny na rodové a druhové úrovni. V případě několika druhů, u kterých nebyla zcela jasná jejich druhová příslušnost, nelze také vyslovit žádné definitivní závěry z důvodu velmi malého souboru studovaných jedinců. V dalších studiích by bylo tedy vhodné získat větší soubor jedinců a zejména vyzkoušet i další molekulární markery.

Literatura:

- Berney C., Pawlowski J., Zaninetti L.** (2000). Elongation factor 1-alpha sequences do not support an early divergence of the *Acoela*. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 1032-1039.
- Cox A.J., Hebert P.D.N.** (2001). Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*. 10: 331-386.
- Douglas L.J., Haymer D.S.** (2001). Ribosomal ITS1 polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera: Tephritidae). *Entomological Society of America*. 94: 726-731.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R.** (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294-299.
- Fрати F., Spinsanti G., Dallai R.** (2001). Genetic variation of mtCOII gene sequences in the collembolan *Isotoma klovstadi* from Victoria Land, Antarctica: evidence for population differentiation. *Polar Biol*. 24: 934-940.
- Harris K.M., Sato S., Uechi N., Yukawa J.** (2006). Re-definition of *Oligotrophus* (Diptera: Cecidomyiidae) based on morphological and molecular attributes of species from galls on *Juniperus* (Cupressaceae) in Britain and Japan. *Entomological Science*. 11: 411-421.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R.** (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *The royal society* (published online).
- Hebert P.D.N., Penton E.H., Burns J.M., Janzen D.H., Hallwachs W.** (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 101: 14812-14817.
- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., deWaard J.R.** (2003b). Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 270: S96-S99.
- Hillis D.M., Dixon M.T.** (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411-453.
- Hoelzel A.R.** (1998). Molecular genetic analysis of population, second edition. *Oxford University Press*, New York.
- Janzen D.H., Hajibabaei M., Burns J.M. et al.** (2005). Wedding biodiversity inventory of a large and complex Lepidoptera fauna with DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 360: 1835-1845.

- Ji Y., Zhang D., He L.** (2003). Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes*. 3: 581-585.
- Loxdale H.D., Lushai G.** (1998). Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*. 88: 577-600.
- Meier R., Kwong S., Vaidya G., NG P.K.L.** (2006). DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*. 55: 715-728.
- Meyer C.P., Paulay G.** (2005). DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *Public Library of Science, Biology*. 3: 2229-2238.
- Palumbi S.R., Baker C.S.** (1994). Contrasting population structure from nuclear introns sequences and mtDNA of humpback whales. *Mol. Biol. Evol.* 11: 513-522.
- Penton E.H., Hebert P.D.N., Crease T.J.** (2004). Mitochondrial DNA variation in North American populations of *Daphnia obtusa*: continentalism or cryptic endemism? *Molecular Ecology*. 13: 97-107.
- Rozas J., Rozas R.** (1999). DnaSP version 3: an integrated program for molekular analysis. *Bioinformatics*. 15: 174-175.
- Shearer T.L., Coffroth M.A.** (2007). Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Notes* (published ahead online).
- Siddall M.E., Budinoff R.B.** (2005). DNA-barcoding evidence for widespread introductions of the leech from the South American *Helobdella triserialis* complex. *Conservation Genetics*. 6: 476-472.
- Skuhřav M., Skuhřav V.**, 1960: *Bejlořorky*. SAZV + SZN, Praha, 1-271.
- Skuhřav M., Skuhřav V.**, 1998: *Bejlořorky lesnch strom a keř*. Matice lesnick, s.r.o., Psek, 1-174.
- Skuhřav M., Skuhřav V., Brewer J.W.**, 1984: Biology of Gall Midges. 169-222. In: Ananthakrishnan T.N. (editor): *Biology of Gall Insects*. New Delhi, Bombay, Calcutta. Oxford + IBH Publ. Co., 1-362.
- Simon S., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P.** (1994). Evolution, weihgting, phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*. 87: 651-701.

- Smith M.A., Fisher B.L., Hebert P.D.N.** (2005a). DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 360: 1825-1834.
- Smith M.A., Wood D.M., Janzen D.H., Hallwachs W., Hebert P.D.N.** (2006). DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 104: 4967-4972.
- Smith M.A., Woodley N.E., Janzen D.H., Hallwachs W., Hebert P.D.N.** (2005b). DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 103: 3657-3662.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.** (2007). MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.
- Taylor M.F.J., McKechnie S.W., Pierce N., Kreitman M.** (1993). The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 10: 1259-1272.
- Tokuda M., Harris K.M., Yukawa J.** (2005). Morphological features and molecular phylogeny of *Placochela Rubsaamen* (Diptera: Cecidomyiidae) with implication for taxonomy and host specificity. *Entomological Science*. 8: 419-427
- Tokuda M., Tabuchi K., Yukawa J., Amano H.** (2004). Inter- and intraspecific comparisons between *Asteralobia* gall midges (Diptera: Cecidomyiidae) causing axillary bud galls on *Ilex* species (Aquifoliaceae): species identification, host range, and mode of speciation. *Entomological Society of Amerika*. 97: 957-970.
- Uechi N., Tokuda M., Yukawa J., Kawamura F., Teramoto K.K. and Harris K.M.** (2003). Confirmation by DNA analysis that *Contarinia maculipennis* (Diptera: Cecidomyiidae) is a polyphagous pest of orchids and other unrelated cultivated plants. *Bulletin of Entomological Research*. 93: 545-551.
- Vickerman D.B., Hoddle M.S., Triapitsyn S., Stouthamer R.** (2004). Species identity of geographically distinct populations of the glassy-winged sharpshooter parasitoid *Gonatocerus ashmeadi*: morphology, DNA sequences, and reproductive compatibility. *Biological Control*. 31: 338-345.
- Ward R.D., Zemplak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D.N.** (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Science*. 360: 1847-1857.

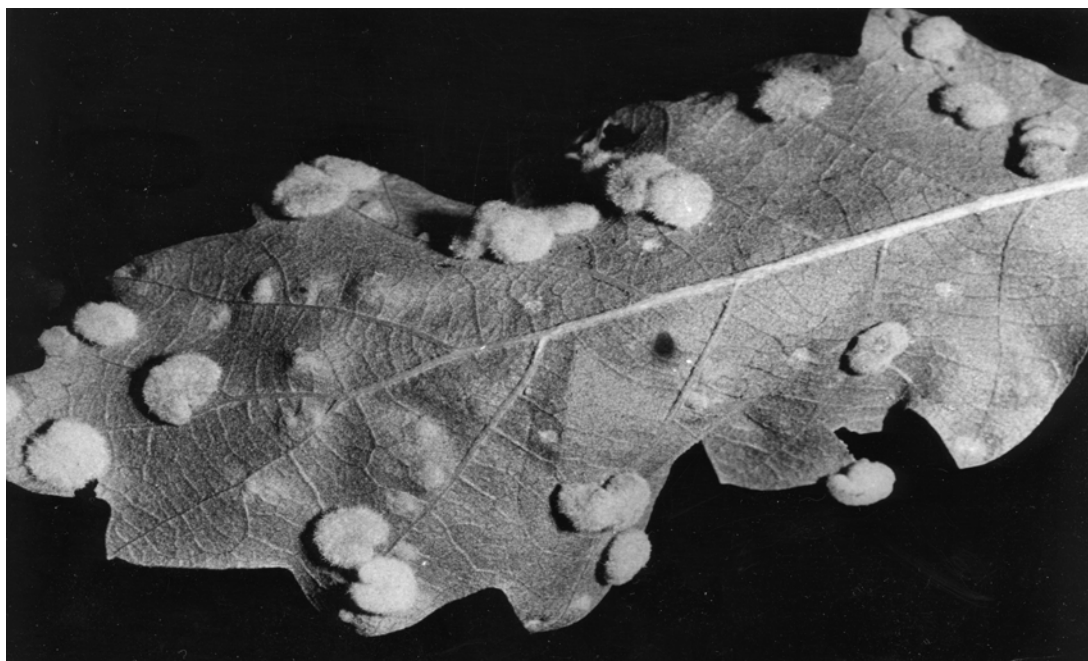
Yukawa J., Uechi N., Horikiri M. and Tuda M. (2003). Description of the soybean pod gall midge, *Asphondylia yushimai* sp. n. (Diptera: Cecidomyiidae), a major pest of soybean and findings of host alternation. *Bulletin of Entomological Research*. 93: 73-86.

Internetové zdroje: www.barcodinglife.org

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS

Příloha 1: Hálky druhu *Dryomyia circinans*



Příloha 2: Hálky druhu *Mikiola fagi*



Příloha 3: Hálka druhu *Rabdophaga rosaria*



Příloha 4: Hálka druhu *Oligotrophus juniperinus*



Příloha 5: Tabulka studovaných jedinců s uvedenými primery použitými na sekvenování.

Číslo sekvence	Druh	Lokalita	Gen	
			ITS	COI
1-1.	<i>Lasioptera hungarica</i>	Praha (Pha)	f1-r2	LCO-mtD9
1-2.	<i>Lasioptera hungarica</i>	Praha (Pha)	f1-r2	LCO-HCO
2-1.	<i>Lasioptera carophila</i>	Španělsko (ESP)	f1-r2	LCO-HCO
2-2.	<i>Lasioptera carophila</i>	Španělsko (ESP)	f1-r2	LCO-mtD9
3-1.	<i>Lasioptera arundinis</i>	Praha (Pha)	f1B-r2	LCO-HCO
3-2.	<i>Lasioptera arundinis</i>	Praha (Pha)	f1-r2	LCO-HCO
4-1.	<i>Dryomyia circinans</i>	Brno (Br)	f1-r2	LCO-HCO
4-2.	<i>Dryomyia circinans</i>	Brno (Br)	f1-r2	LCO-HCO
5-1.	<i>Hartigiola annulipes</i>	Praha (Pha)	f1-r2	LCO-HCO
6-1.	<i>Mikiola fagi</i>	Praha (Pha)	f1-r2	LCO-HCO
6-2.	<i>Mikiola fagi</i>	Praha (Pha)	x	LCO-HCO
7-1.	<i>Rabdophaga rosaria</i>	Praha (Salix caprea) (Pha-S.caprea)	f1-r2	LCO-HCO
7-2.	<i>Rabdophaga rosaria</i>	Praha (Salix caprea) (Pha-S.caprea)	f1-r2	LCO-HCO
8-1.	<i>Rabdophaga rosaria</i>	Praha (Salix alba) (Pha-S.alba)	f1-r2	LCO-HCO
8-2.	<i>Rabdophaga rosaria</i>	Praha (Salix alba) (Pha-S.alba)	f1-r2	LCO-HCO
9-1.	<i>Janetia szepligetii</i>	Brno (bílé larvy) (Br-b.larvy)	f1-r2	LCO-HCO
9-2.	<i>Janetia szepligetii</i>	Brno (bílé larvy) (Br-b.larvy)	x	LCO-HCO
10-1.	<i>Janetia szepligetii</i>	Brno (růžové larvy)(Br.-r.larvy)	f1-r2	LCO-HCO
10-2.	<i>Janetia szepligetii</i>	Brno (růžové larvy)(Br.-r.larvy)	x	LCO-mtD9
11-1.	<i>Lasioptera arundinis</i>	Španělsko (ESP)	f1B-r2	LCO-HCO
11-2.	<i>Lasioptera arundinis</i>	Španělsko (ESP)	f1B-r2	LCO-mtD9
12-1.	<i>Janetia cerris</i>	Brno (Br)	f1-r2	LCO-HCO
12-2.	<i>Janetia cerris</i>	Brno (Br)	f1B-r2	LCO-mtD9
14.	<i>Oligotrophus panteli</i>	ČR - Nemíž (CZ - Nem.)	f1B-r2	LCO-HCO
15-1.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	Bulharsko (Vitoša) (BLG)	f1B-r2	LCO-mtD9
15-2.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	Bulharsko (Vitoša) (BLG)	-----	-----
16.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	ČR - Nemíž	-----	-----
17.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	ČR - Nemíž (CZ - Nem.)	f1B-r2	LCO-HCO
18.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	ČR - Nemíž (CZ - Nem.)	f1B-r2	LCO-mtD9
19.	<i>Arceuthomyia valerii</i>	Francie (Martane) (FR)	x	x
20.	<i>Oligotrophus ?</i>	Francie (Mussane) (FR)	x	x
21-1.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	ČR - Hodkov (dlouhé hálky) (Hod.d.h.)	f1B-r2	LCO-HCO
21-2.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	ČR - Hodkov (dlouhé hálky) (Hod.d.h.)	x	LCO-HCO
22-1.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	Černýšovice u Bechyně (CZ-Cern.)	f1B-r2	LCO-HCO
22-2.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	Černýšovice u Bechyně (CZ-Cern.)	f1-r2	LCO-HCO
23.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	ČR - Hodkov (krátké hálky)(Hod.k.h.)	f1B-r2	LCO-HCO
24-1.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	jižní Francie (FR)	f1B-r2	LCO-HCO
24-2.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	jižní Francie (FR)	x	LCO-HCO
25-1.	<i>Oligotrophus ?</i>	jižní Francie (FR)	Lepido.	Lepido.
25-2.	<i>Oligotrophus ?</i>	jižní Francie (FR)	Lepido.	Lepido.
32.1	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	Furnes, sev. Itálie (IT)	f1-r2	LCO-HCO
32-2.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	Furnes, sev. Itálie (IT)	-----	-----
32-3.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	Furnes, sev. Itálie (IT)	f1-r2	LCO-HCO
32-4.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	Furnes, sev. Itálie (IT)	-----	-----
33-1.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	St. Zyprian, sev. Itálie (IT)	x	x
33-2.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	St. Zyprian, sev. Itálie (IT)	-----	-----
33-3.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	St. Zyprian, sev. Itálie (IT)	f1-r2	LCO-mtD9
33-4.	<i>Oligotrophus juniperinus</i>	St. Zyprian, sev. Itálie (IT)	f1B-r2	LCO-HCO
34-1.	<i>Lasioptera calamagrostidis</i>	Jižní Morava (J.Mor.)	f1B-r2	LCO-mtD9
34-2.	<i>Lasioptera calamagrostidis</i>	Jižní Morava (J.Mor.)	f1B-r2	LCO-HCO

35-1.	<i>Aphidoletes ahidimyza</i>	České Budějovice (CB)	f1-r2	LCO-mtD9
35-2.	<i>Aphidoletes ahidimyza</i>	České Budějovice (CB)	f1-r2	LCO-mtD9
35-3.	<i>Aphidoletes ahidimyza</i>	České Budějovice (CB)	f1-r2	LCO-HCO
35-4.	<i>Aphidoletes ahidimyza</i>	České Budějovice (CB)	f1-r2	LCO-HCO
38-1.	<i>Aphidoletes ahidimyza</i>	Thessaloniki (Řecko) (GR)	f1-r2	LCO-HCO
38-2.	<i>Aphidoletes ahidimyza</i>	Thessaloniki (Řecko) (GR)	f1-r2	LCO-HCO
38-3.	<i>Aphidoletes ahidimyza</i>	Thessaloniki (Řecko) (GR)	-----	-----
38-4.	<i>Aphidoletes ahidimyza</i>	Thessaloniki (Řecko) (GR)	f1-r2	LCO-HCO
38-5.	<i>Aphidoletes ahidimyza</i>	Thessaloniki (Řecko) (GR)	f1-r2	x
39-1.	<i>Oligotrophus</i>	severní Itálie (IT)	f1-r2	LCO-mtD9
39-2.	<i>Oligotrophus</i>	severní Itálie (IT)	f1-r2	LCO-HCO
39-3.	<i>Oligotrophus</i>	severní Itálie (IT)	f1B-r2	LCO-mtD9
39-4.	<i>Oligotrophus</i>	severní Itálie (IT)	f1B-r2	LCO-mtD9
40.	<i>Oligotrophus navicularis</i>	Španělsko (ESP)	f1B-r2	LCO-mtD9

Lepido. = *Lepidoptera*;

----- jedinci, u kterých se nepodařilo vyizolovat DNA

x jedinci, u kterých došla DNA během práce