

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Bakalářská práce

**Druhá identifikace korovnic (*Adelgidae*) na základě
molekulárních markerů**

Pavčina Věchtová

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, PhD

Školitel specialista: Ing. Jan Havelka, CSc.

České Budějovice

2008

Bakalářská práce

Věchtová, P. 2008 : Druhová identifikace korovnic (*Adelgidae*) na základě molekulárních markerů [Identification of species within *Adelgidae* by molecular markers. Bc.Thesis, in Czech.]

Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic- 45 p.

Annotation

Four molecular markers (nuclear ITS, EF1 α and mitochondrial AT-Rich and COI) were tested for use in species identification of selected species of the Adelgidae family. Markers EF1 α and COI were successfully amplified and sequenced. Aligned sequences of those two markers were used for reconstruction of dendrogram by Minimum Evolution method with Kimura 2-Parameter model. Comparison of the dendrogram with assumptions based on morphology and biology of Adelgids confirmed suitability of chosen molecular markers for reliable resolution of taxonomic relationships within Adelgidae, although further testing and marker with higher variability will be required to delineate sister species with higher precision.

Projekt byl financován GA AVČR, č. grantu IAA600960705 a 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, 8.1.2008

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala zejména mé školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení, Janu Havelkovi za poskytnutí veškerého analyzovaného materiálu, odborných rad a literatury, Michalu Žurovcovi a celému kolektivu jeho laboratoře za poskytnutí zázemí a uvedení do laboratorní praxe, dále děkuji kolegům z laboratoře Martě Slámové, Renče Strouhalové a Mirce Sýkorové za rady, připomínky a vytvoření příjemné pracovní atmosféry. Neméně vděčná jsem i Luce Kučerové za výraznou pomoc při analýze sekvencí a tvorbě taxonomických analýz a Petru Šváchovi za pomoc při práci s programy pro analýzu sekvencí a s tvorbou a vyhodnocováním dendrogramů. Velký díl na této práci mají moji rodiče, kteří mě ochotně podporovali ve studiích a to jak materiálně, tak i psychicky.

Obsah

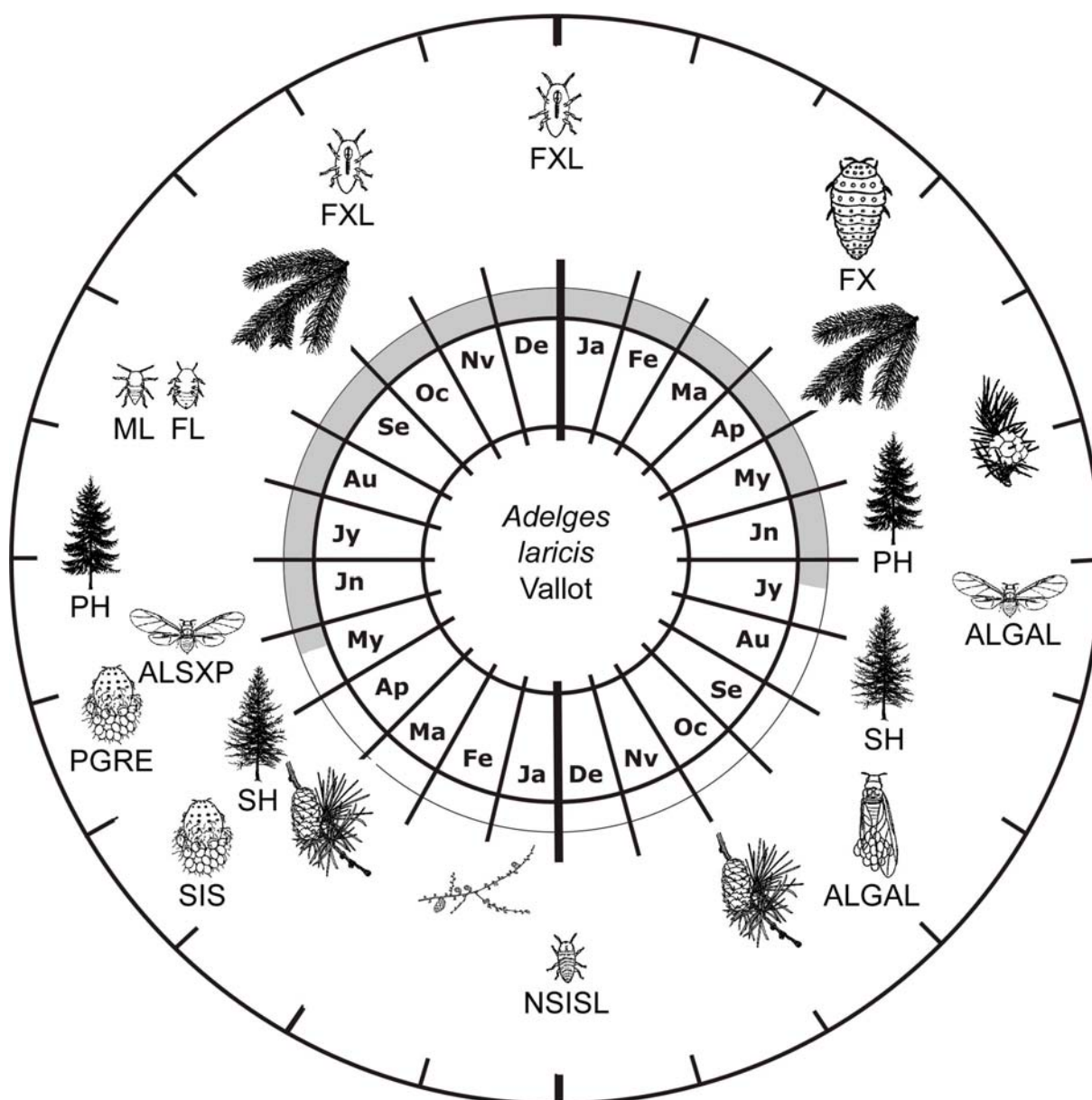
1. Úvod	1
2. Cíle práce	10
3. Materiál a metody	11
3.1 Materiál	11
3.1.1 Analyzované organismy	11
3.2 Metody	12
3.2.1 Izolace DNA	11
3.2.2 Amplifikace DNA	12
3.2.3 Elektroforetická verifikace	16
3.2.4 Sekvenování	17
3.2.5 Vyhodnocování DNA sekvencí	19
4. Výsledky	21
4.1 Charakteristika COI markeru	21
4.2 Charakteristika EF1 α markeru	24
5. Diskuse	29
5.1 Sběr a skladování vzorků	29
5.2 Extrakce DNA	29
5.3 Purifikace PCR produktů	29
5.4 Testování markerů	29
5.5 Analýza sekvencí, tvorba dendrogramů	30
5.6 Hodnocení vhodnosti markeru	30
6. Závěr	33
7. Literatura	34
Přílohy	
1. Tabulka obsahu bazí v sekvencích COI markeru	40
2. Tabulka obsahu bazí v sekvencích EF1 α markeru	41

1. Úvod

Mšice korovnice (Sternorrhyncha, Aphidini, *Adelgidae*) tvoří samostatnou skupinu mšic, která je charakterizována především mimořádným vnitrodruhovým polymorfismem a složitými generačními cykly, zahrnujícími střídání pohlavního a nepohlavního rozmnožování a střídání hostitelských dřevin.

Čeď korovnicovitých obsahuje významné škůdce jehličnatých dřevin. Citelně škodí především v mladších porostech. Řada druhů silně poškozuje jehlice a výhonky, které v extrémních případech odumírají. Světová biodiverzita korovnic čítá přibližně 70 druhů, ale existuje zde mnoho nejasností a zřejmě i kryptických druhů (Havill a Footitt, 2007). Na území ČR se vyskytuje 17 druhů (Havelka, ústní sdělení).

Morfologické znaky tuto skupinu výrazně odlišují od ostatních mšic, avšak mezidruhové rozdíly jsou malé a jsou ještě komplikovány velkým počtem životních forem a vývojových instarů, které jsou si často velmi podobné v důsledku konvergentní a paralelní evoluce. Zejména larvální stádia jsou morfologicky velmi homogenní a nelze je od sebe prakticky rozlišit. Generační vývojové cykly jsou složité. Úplný vývojový cyklus (holocyklus) známých druhů korovnic je dvouletý. Část cyklu obvykle probíhá na primární hostitelské dřevině, kterou jsou vždy různé druhy smrku (*Picea*) a zbylá část na sekundárním hostiteli, kterým je rovněž jehličnan, ale patří do jiného rodu (*Abies*, *Larix*, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*). Jednotlivé generace a stádia mají speciální označení a zabývala se jimi v nedávné době celá řada autorů (Lampel, 1968; Steffan, 1972; Carter, 1971, Eichhorn, 1989, Blackman, Eastop, 1994). Nehledě na to, jsou při bližším ohledání patrné jak rozdíly v názvosloví, tak i nejasnosti v popisu cyklů u jednotlivých známých druhů. Jako příklad druhu s dobře prostudovaným generačním vývojovým cyklem je možné uvést korovnici pupenovou (*Adelges laricis* Vallot) (obr.1).



Obr. 1 Generační vývojový cyklus korovnice pupenové (*Adelges laricis* Vallot) (Havelka, Biologické centrum AV ČR, ENTU)

Vysvětlivky: **FXL** Larva zakladatelky
ALGAL .. Alatae gallicolae (okřídlená samice)
SIS Sistens (neokřídlená samice sídlící na sekundárním hostiteli)
ALSXP .. Alatae sexupara (okřídlená samice produkující sexuální potomstvo)
FL Samice

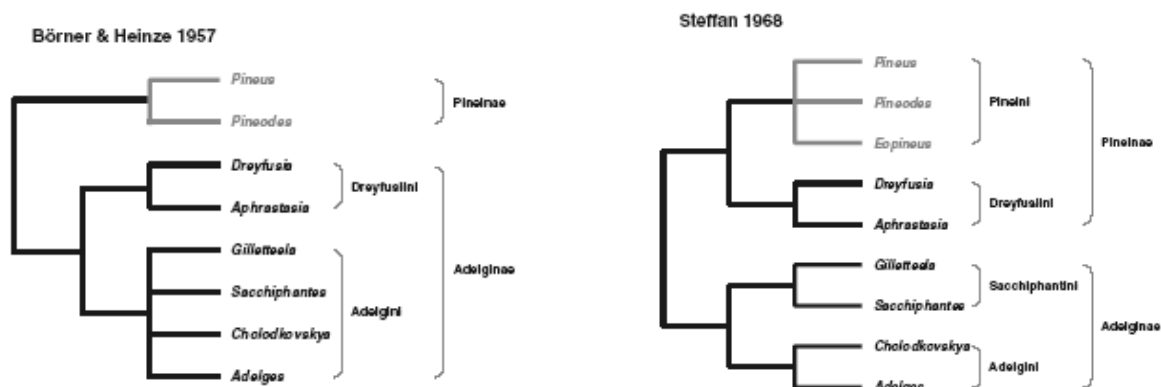
FX Zakladatelka (fundatrix)
NSISL Neosistens (hiemales) (larva přezimující na sekundárním hostiteli)
PGRE Progrediens (neokřídlená samice sídlící na sekundárním hostiteli a produkující okřídlené partenogenetické potomstvo)
ML Samec

První práce, věnované taxonomii a bionomii korovnic ve světě se objevily na přelomu 20. století (Cholodkovsky, 1896; Börner, 1908; Burdon, 1908; Marchal, 1913). Podstatnější publikace však vyšly až po roce 1950. Jde o shrnující taxonomická studia Inouye (1953), Börner, Heinze (1957), Heinze (1962), Carter (1971, 1976), Covassi, Binazzi (1981),

Pashchenko (1988), Binazzi, Covassi (1991), Blackman & Eastop (1994) a Binazzi (2000). Pro území Československa je důležitá souhrnná publikace Paška (1954). V současné době byl v rámci časopisu *Lesnické práce* vydán soubor informačních letáků s fotografiemi a základní informací o vybraných druzích korovnic (Kapitola, 2003, 2005).

Velké množství kvalitních dílčích publikací bylo věnováno korovnicím podrodů *Adelges*, *Sacchiphantes* a *Dreyfusia* na smrku a jedli (Balch, 1952; Pschorn-Walcher, Zwölfer, 1958; Stefan, 1962; Eichhorn, 1956, 1957, 1964, 1968, 1975, 1991). Důvodem tohoto zaměření výzkumníků byly především škody způsobené zmíněnými korovnicemi v porostech jehličnanů mladších a středních věkových kategorií. Několik druhů korovnic způsobuje rozsáhlé deformace výhonů a v příznivých podmínkách může docházet k hromadnému odumírání napadených kultur (Havelka, ústní sdělení).

Základem jakéhokoliv výzkumu zaměřeného na biologii, ekologii a kontrolu populační hustoty škodlivého hmyzu je důkladná biosystematická informace - správné určení zkoumaného druhu. Nehledě na to, že řada prací o korovnicích je směřována na vypracování systému determinace druhů, je určování korovnic stále velmi obtížné a nespolehlivé. První určovací klíče na druhové úrovni byly sestaveny podle morfologických rozdílů (uspořádání průduchů a voskových žláz) u larev prvního instaru (Börner & Heinze, 1957), neboť jejich autoři byli přesvědčeni, že morfologické znaky jsou právě u tohoto instaru dostatečně stabilní a tedy vhodné k determinaci. Na tomto základě byly vymezeny dva rody *Pineus* a *Adelges* (se šesti podrody) (viz obr. 2). Podrobnější analýzu na základě morfologie a biologie doplněnou o analýzu počtu chromozomů provedl v roce 1968 Steffan et al. (viz obr. 2). Při praktickém určování druhů se však ukázalo, že určení druhů pouze podle larev je obtížné a někdy dokonce nemožné. Z tohoto důvodu provedl Carter (1971) detailní morfologickou studii okřídlených forem (*gallicolae* a *sexuparae*) všech britských druhů korovnic a sestavil určovací klíč. Z tohoto klíče vyšel také Binazzi (2000) při zpracování italských korovnic.



Obr. 2 Grafické podání rekonstrukce fylogenetických vztahů v rámci čeledi *Adelgidae* Börner & Heinze (1957) na základě morfologie a biologie a Steffan (1968) založené na morfologii, počtu chromozomů a vztazích s endosymbionty.

Studium generačních vývojových cyklů popsaných druhů korovnic však ukázalo nesrovnalosti mezi druhy uváděnými v determinačních klíčích, rozlišitelnými na základě morfologických znaků a druhy morfologicky nerozlišitelnými, avšak s evidentně odlišnými generačními vývojovými cykly (Havelka, ústní sdělení).

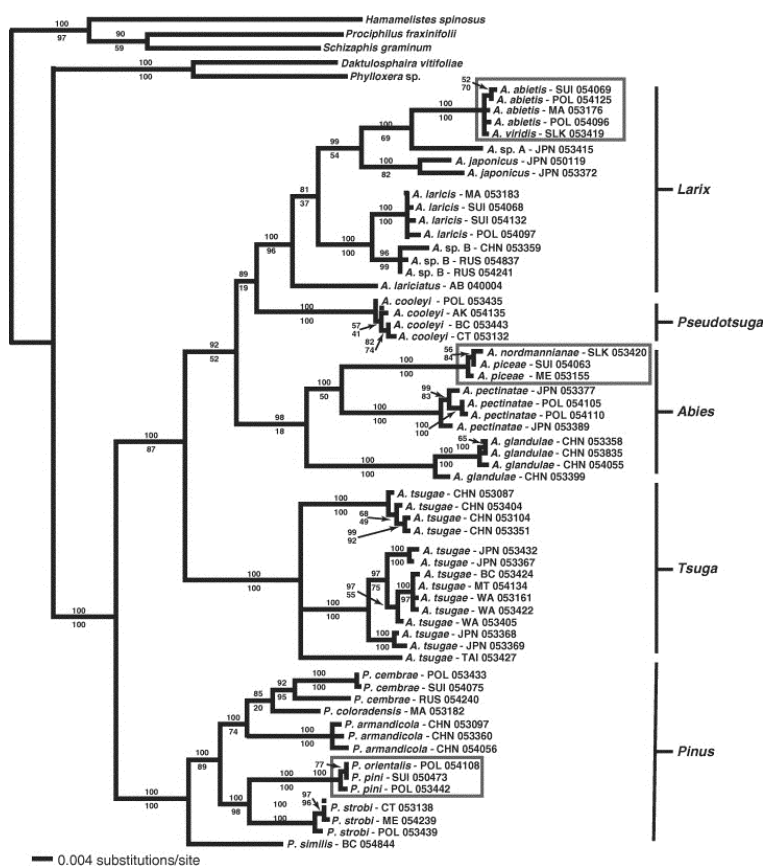
Obdobné problémy se objevily při zavlečení některých druhů korovnic do nového zoogeografického areálu. Například korovnice douglasková *Adelges (Gilletteella) cooleyi*, která pochází ze Severní Ameriky, kde má úplný dvouletý cyklus na dvou hostitelských dřevinách (holocyklus). Primárním hostitelem jsou různé druhy smrku, sekundárním pak *Pseudotsuga*. Po zavlečení do Evropy došlo k redukci vývojového cyklu (sexuální generace na smrku byla vyřazena) a zkrácený vývoj probíhá pouze na sekundárním hostiteli – douglasce (*Pseudotsuga menziesii* Franko). Taková redukce cyklů a vyřazení některých vývojových stádií je pro některé další druhy korovnic typická, což značně komplikuje druhovou determinaci. Podobné změny vznikají při importu okrasných jehličnatých dřevin, kdy se na území naší republiky objevují druhy korovnic s různě modifikovanými generačními vývojovými cykly (Havelka, ústní sdělení).

Rozhodující význam pro druhovou determinaci a k vyjasnění generačních vývojových cyklů mohou mít v tomto případě spolehlivé molekulárně-biologické metody. Využití metod molekulární biologie v biosystematice a taxonomii mšic bylo zahájeno v 80. letech 20. století. Jednalo se o studium polymorfismu isozymů metodou elektroforézy ve škrobovém gelu. Předběžná studia isoenzymů zhruba 400 druhů mšic ukázala, že metoda je vhodná pro druhovou identifikaci jen některých rodů, v jiných případech poskytuje neprůkazné výsledky (Eggers-Schumacher, 1987; Tomiuk, Wöhrmann, 1984; Lampel, Burgener, 1987). Na základě genetických vzdáleností, určených podle rozdílů frekvencí isoenzymů, byly zrekonstruovány

taxonomické vztahy některých skupin mšic. Tyto údaje byly rovněž využívány ke stanovení genetické struktury populací mšic v souvislosti s různými ekologickými vlastnostmi.

Na přelomu 90. let 20. století se objevily první práce, využívající fragmenty mitochondriální DNA v systematice mšic (Powers et al., 1989). Metoda „DNA fingerprinting“ byla úspěšně použita pro stabilní označení biotypů kyjatky osenní (*Sitobion avenae*) (De Barro et al., 1994). Lushai et al., (2004) prokázali, že metoda „microsatellite DNA flanking sequences“ je vhodná jak pro studium fylogenetických vztahů, tak i pro rozlišení populací mšic. Převážná většina projektů využívajících DNA markerů u mšic je však zaměřena na čeleď *Aphididae* (Moran et al., 1999; von Dohlen, Teulon, 2003).

Korovnicím jsou věnovány tři novější publikace. První (Mantovani et al., 2002) popisuje dílčí výsledek použití úseků mitochondriálních genů *cytb* a *ND4* při definování druhové příslušnosti korovnic v rámci rodu *Adelges* (*Dreyfusia*). Z ní vyplývá, že minimálně tři druhy z pěti (pro podrod *Dreyfusia*) uváděných z jehličnanů na území Itálie, jsou pochybné. Tato práce je zároveň prvotní studií zabývající se variabilitou mitochondriální DNA korovnic a dokazuje použitelnost metody pro analýzu druhové příslušnosti u dané skupiny živočichů. Druhá publikace (Havill et al., 2006) popisuje analýzu mitochondriální DNA při stanovení mezipopulačních rozdílů u druhu *A. funitecta* (= *A. tsugae*). K analýze byly použity 3 úseky mitochondriálního genomu. Úsek genu pro 2. podjednotku Cytochrom oxidázy (COII), část genu pro cytochrom b (*cytb*) a oblast obsahující část genu pro 1. podjednotku NADH dehydrogenázy, gen pro tRNA Leucinu navazující na část úseku pro transkripci rRNA velké ribozomální podjednotky (16S). Konečným cílem tohoto výzkumu bylo zjištění geografického původu vysoce agresivní populace, která způsobuje velké škody na americkém druhu dřeviny *Tsuga canadensis* na severo-východě USA. Tyto výsledky jsou rovněž uloženy v databázi DNA sekvencí (genetic sequence database, GenBank, NIH, USA). Nejnovější publikace (Havill et al., 2007) se zabývá evolucí životních cyklů a paraziticko-hostitelských vztahů čeledi *Adelgidae* a jejich hostitelských dřevin na základě molekulárních markerů COI, COII, *cytb* a *EF1 α* . Jedním z cílů bylo též analyzovat taxonomické vzahy v rámci čeledi *Adelgidae*, konkrétně příslušnost skupin do podčeledí *Adelginae* a *Pineinae* a jejich fylogenezi (viz obr. 3).



Obr. 3 Grafické podání vztahů v rámci čeledi *Adelgidae* na základě molekulárních markerů COI, COII, cyt b a EF1 α a paraziticko-hostitelských vztahů (Havill et al., 2007)

Molekulární markery

Molekulární markery jsou nejmodernějším typem genetických markerů a jsou používány jako nástroj k odhalování genetické variability na úrovni proteinů a DNA sekvencí. Zvláště vhodné se jeví při zjišťování taxonomických vztahů u skupin rychle se vyvíjejících organismů, které obvykle vykazují nízkou morfologickou variabilitu, a jediným způsobem, jak je lze od sebe odlišit, je na základě DNA sekvencí. S výhodou je lze použít, máme-li k dispozici omezené množství materiálu nebo při analýze starých či suchých vzorků (Loxdale et al., 1998).

DNA markery se liší podle stupně variability a můžeme je tak aplikovat pro diskriminaci organismů na různých taxonomických úrovních. V zásadě lze rozlišit 2 typy DNA markerů - mitochondriální a jaderné. Za nejpoužívanější jaderné markery jsou pokládány ribozomální RNA, nejčastěji 18S rRNA, dále „Internal Transcribed Spacer“ (ITS) a kódující Elongační faktor 1 α (EF1 α) (Caterino et al., 2000). Mitochondriální genom mutuje 20 x rychleji než jaderný a zvolené markery se používají pro diskriminaci skupin na nižších taxonomických úrovních (Loxdale et al., 1998). Nejčastěji používanými markery jsou Cytochrom Oxidáza,

podjednotka I a II (COI, COII), 16S rRNA a 12S rRNA (Caterino et. al, 2000). Variabilita obou typů markerů závisí na tom, jedná-li se o kódující či nekódující sekvenci.

Pro druhovou diagnostiku korovnic jsme proto na základě údajů z literatury vytypovali celkem čtyři vhodné markery, a to 2 jaderné a 2 mitochondriální.

Jaderné markery

Internal Transcribed Spacer (vymezené nekódující oblasti, ITS)

Jedná se o krátké intergenové nekódující oblasti oddělující strukturní ribozomální rRNA, konkrétně 18S, 5,8S a 28S rRNA. Tyto oblasti se nacházejí pouze na transkripčním prekurzoru, protože během posttranskripčních úprav dochází k jejich excizi a následné rychlé degradaci. Ribozomální RNA je jednou z nejpočetnějších molekul v buňce a je třeba zajistit nepřetržitou transkripci co největšího počtu kopií, proto jsou geny pro rRNA, včetně ITS, uspořádány v buňce tandemově za sebou v mnoha tisících kopiích. ITS jsou díky své vysoké variabilitě ideálním markerem pro identifikaci organismů na nejnižších taxonomických úrovních, což je zapříčiněno nízkým selekčním tlakem, kterému jsou nekódující sekvence vystaveny. Velký počet kopií na buňku usnadňuje amplifikaci a to i z malého množství analyzovaného materiálu. ITS jsou široce používány v molekulární taxonomii a fylogenetice, zvláště pro rozlišování velmi blízce příbuzných druhů a blízce příbuzných rodů (Loxdale et al., 1998).

Elongační faktor 1 alfa (EF1 α)

EF1 α je gen, kódující protein, který lze najít ve všech eukaryotických organismech. Je velmi hojný v cytosolu a účastní se GTP dependentního procesu vázání aminoacyl-tRNA do A místa ribozomu 2. kroku translace mRNA. Jedná se o velmi výhodný marker z hlediska taxonomické determinace a to z několika důvodů : konzervovaná aminokyselinová sekvence dovoluje analýzu druhů v širokém taxonomickém měřítku, diferenciaci na třetích variabilních kodonových pozicích umožňuje determinaci i na druhové úrovni. Některé jeho vlastnosti s sebou ale přinášejí i určité komplikace. Degenerace 3. pozice společně s přítomností intronů znesnadňují vývoj univerzálních primerů, malý počet kopií (2 na buňku u diploidních organismů ve srovnání se stovkami až tisíci kopií u mitochondriálních či ribozomálních markerů) komplikuje amplifikaci. Paralogní kopie a heterozygotitu (biparentální dědičnost nukleárních markerů) je třeba brát v úvahu při amplifikaci i následných fylogenetických a

taxonomických analýzách, které jimi mohou být výrazně zkresleny. Výskyt, počet, pozice a délka intronů výrazně kolísá a to i v rámci čeledí. V nadčeledi Aphidoidea nalézáme 2 introny a to na pozicích I 492/493 a I 753/754 vzhledem k sekvenci *D. melanogaster* (Djernaes et al., 2006). Délka intronů v rámci *Adelgidae* se pohybuje v rozmezí 65-73 bp respektive 57-65 bp (Havill et al., 2007).

Mitochondriální markery

AT-Rich

AT-Rich je rozsáhlá kontrolní nekódující oblast mitochondriálního genomu obsahující vysoký podíl AT bazí. U savců je také někdy uváděna pod jménem „D-loop“ (Taylor et al., 1993). Vysoký obsah AT je s největší pravděpodobností zapříčiněn působením silných cílených mutačních tlaků. Oblast je u bezobratlých sekvenčně i délkově velmi variabilní a může obsahovat tandemové repetice. Tandemové repetice zřejmě podstoupily synchronizovanou evoluci a počet kopií ukazuje na vysokou mutační rychlost. S tím však kontrastuje rychlost nukleotidových substitucí, která je redukována právě vysokým obsahem AT bazí a cílenými mutačními tlaky. Podle všeho se i přesto nejedná o nejvariabilnější oblast genomu a lze ho ještě použít jako marker pro molekulární taxonomii a fylogenetické studie, nejčastěji je aplikován pro analýzy blízkce příbuzných taxonů (Zhang et al., 1997).

Cytochrom oxidáza - podjednotka I

Mitochondriální enzym Cytochrom oxidáza (CO) je součástí dýchacího řetězce, kde katalyzuje redukci kyslíku na vodu. Podjednotky I-III vytváří funkční jádro enzymového komplexu, přičemž COI je katalytická podjednotka tohoto jádra. Protože se jedná o esenciální buněčný enzym, jeho sekvence musela být schopna čelit výrazným selekčním tlakům a proto ji lze aplikovat jako molekulární marker pro taxony napříč celým živočišným spektrem.

Výhodou používání mitochondriální DNA jako markeru je především její maternální dědičnost resp. haploidní konstituce zajišťující mt DNA omezenou rekombinací. Velký počet kopií na buňku navíc usnadňuje PCR amplifikaci, rychlá evoluce činí marker variabilnější, sekvence bez intronů usnadňuje tvorbu alignmentů. Mitochondriální DNA je také na rozdíl od jaderné robustnější vůči degradacím (Avisé et al., 1987, Hebert et al., 2002).

DNA barcoding

Tzv. „DNA barcoding“ je relativně nová metoda, která umožňuje rychle a spolehlivě identifikovat jedince na základě molekulárních markerů s vhodně rozloženou vnitrodruhovou a mezidruhovou variabilitou. Stejně tak ji lze použít k identifikaci morfologicky špatně rozlišitelných druhů. Ke stanovení variability je možné použít jakékoli vývojové stádium sledovaného taxonu, lze identifikovat druhy v širokém taxonomickém měřítku, metodu navíc neovlivňuje fenotypová variabilita na rozdíl od morfologické taxonomie. V některých studiích se díky barcodingu podařilo identifikovat invazivní, kryptické či nové druhy. (Hebert et al., 2003).

„DNA barcoding“ je založen na 658 bp sekvenci na 5' konci 1. podjednotky mitochondriálního genu Cytochrom oxidázy (COI). Podstatou tohoto přístupu je myšlenka, že krátká standardizovaná sekvence může odlišit jednotlivé druhy, protože genetická variabilita mezidruhová převyšuje variabilitu vnitrodruhovou (Hajibabaei et al., 2007). U COI je průměrná vnitrodruhová variabilita menší než 1 %, vzácně víc než 2 %, zatímco mezidruhová je obvykle víc než 10 %. Ve výjimečných případech se nepodaří jednotlivé druhy pomocí COI vymezit, ale obecně je celková úspěšnost identifikace v rámci živočišné říše kolem 95 % (Waugh, 2007). DNA barcoding se běžně používá pro určování vztahů u nižších taxonů a to zejména na druhové úrovni (Hebert et al., 2003). Identifikace vyšších taxonů vykazovala nižší statistickou průkaznost.

Pro barcodovou analýzu je získána standardizovaná sekvence COI testovaného jedince. Tato sekvence je porovnána s knihovnou referenčních barkodových sekvencí získaných z jedinců známého taxonomického zařazení (Hajibabaei et al., 2007).

2. Cíle práce

Hlavním úkolem bylo najít vhodné markery pro spolehlivou identifikaci druhů z čeledi Adelgidae, což zahrnuje následující úkoly:

1. Najít nejefektivnější způsob extrakce DNA, vybrat vhodný metodický přístup pro úspěšnou amplifikaci, purifikaci a sekvenování DNA.
2. Amplifikovat a osekvenovat vybrané fragmenty mitochondriální i nukleární DNA u dobře prostudovaných druhů korovnic.
3. Pomocí vybraných shlukovacích analýz ověřit použitelnost vybraných markerů pro věrohodnou druhovou identifikaci.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

3.1.1 Analyzované organismy

Vzorky byly sbírány na různých lokalitách na území ČR (viz Tab. 1) a uchovávány v 98 % etanolu. Veškerý sběr a morfologickou identifikaci prováděl dr. Jan Havelka (Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav).

Tab. 1 Seznam analyzovaných druhů. Modře označeny jsou vzorky, ze kterých se nepodařilo získat sekvence. Vysvětlivky k instarům viz Obr. 1.

druh	číslo vzorku	lokality	instar
<i>A. laricis</i>	993,994,995	České Budějovice	al-gal
<i>A. laricis</i>	2797	Jílové u Železného Brodu	al-gal
<i>A. tardus</i>	1283,1284,1285,1286,1287,1288	České Budějovice	fund
<i>A. tardus</i>	1433	České Budějovice	al-gal
<i>A. tardus</i>	2553,2554	Nový Dvůr	al-gal
<i>D. merkeri</i>	444,445,449	Buchlovice	al-gal
<i>D. nordmannianae</i>	1401,1402,1403,1404,1405,1406, 1407,1408,1409,1410,2480, 815-17	Chvalčov	al-ex
<i>D. nordmannianae</i>	2685	Buchlovice	al-gal
<i>D. prelli</i>	706,707,708,939	Nový Dvůr	al-gal
<i>D. prelli</i>	812,813,814	Buchlovice	al-ex
<i>D. prelli</i>	854,2693,2701,1963-74,1764,1765	Buchlovice	al-gal
<i>D. prelli</i>	2633	Lednice	al-gal
<i>G. cooleyi</i>	1739,1740,1741,1742,1743, 1744,1745,1746,1788,1789	České Budějovice	al-gal
<i>G. cooleyi</i>	1270,1273,1279	České Budějovice	prog
<i>G. cooleyi</i>	1293,1294	Stráž nad Nežárkou	prog
<i>P. orientalis</i>	2514,2515,2486,2487,2488,2489	Buchlovice	al-gal
<i>P. orientalis</i>	922,923,924	Nový Dvůr	al-gal
<i>P. orientalis</i>	1620,1621,1622,1623	Lednice	al-gal
<i>P. pini</i>	2263,2264,2265,2266,2267,2269,2270	Praha-Břevnov	sys
<i>P. pini</i>	2353	Bystřice pod Hostýnem	sys
<i>P. strobi</i>	2457,2458,2459,2460	České Budějovice	prog
<i>P. strobi</i>	2462,2463,2464,2465	Nový Dvůr	prog
<i>P. strobi</i>	2215,2217,2219,2222,2223	České Budějovice	sys
<i>S. abietis</i>	1044	Zdiměřice	al-gal
<i>S. abietis</i>	2416,2417,2418,2419,2420	Troják	fund
<i>S. abietis</i>	2887,2893	Čertovo jezero	al-gal
<i>S. viridis</i>	2375,2376,2377,2378,2379	Vrchy u Fulneku	fund
<i>S. viridis</i>	846	Český Krumlov	al-gal
<i>S. viridis</i>	1652	Strmilov, školka	al-sxp
<i>S. viridis</i>	2849	České Budějovice	al-gal

Poznámky :

<i>A. laricis</i>	<i>Adelges laricis</i>	<i>G. cooleyi</i>	<i>Gilletteella cooleyi</i>
<i>A. tardus</i>	<i>Adelges tardus</i>	<i>P. pini</i>	<i>Pineus pini</i>
<i>D. nordmannianae</i>	<i>Dreyfusia nordmannianae</i>	<i>P. strobi</i>	<i>Pineus strobi</i>
<i>D. prelli</i>	<i>Dreyfusia prelli</i>	<i>S. abietis</i>	<i>Sacchiphantes abietis</i>
<i>D. vitifoliae</i>	<i>Daktulosphaira vitifoliae</i>	<i>S. viridis</i>	<i>Sacchiphantes viridis</i>

3.2. Metody

Během všech metodických postupů byly používány aerosolové špičky, abychom předešli kontaminaci cizorodou DNA z ostatních analyzovaných jedinců.

3.2.1 Izolace DNA

Vzorky byly entomologickou pinzetou vytaženy z mikrozkušavky s lihem a ponechány na polštářku buničité vaty oschnout od zbytku etanolu, který by mohl negativně ovlivňovat průběh dalšího zpracování tkáně. Pro izolaci bylo testováno několik metod podle následujících protokolů :

Protokol Chelex – 100 resin (cat. No. 142-2832, BioRad) (Hoelzel, 1998)

1. Byl připraven 10 % roztok chelexu za použití deionizované vody (dále jen ddH₂O).
2. Suspenze byla rozpipetována po 250 µl do mikrozkušavek.
3. Do každé mikrozkušavky byl entomologickou pinzetou přenesen analyzovaný jedinec.
4. Každý jedinec byl v roztoku chelexu v mikrozkušavce rozdrčen homogenizátorem připraveným z 1000 µl špičky s nataveným a uhlazeným hrotem.
5. Ke zhomogenizovanému vzorku bylo přidáno 250 µl ddH₂O do konečného objemu 500 µl a 5 % výsledné koncentrace.
6. Vzorky byly inkubovány při 56°C 45 min.
7. Po krátkém zvortexování byl chelex inaktivován při 98°C 10 min.
8. Vzorky byly vortexovány a centrifugovány při 14500 otáčkách (dále jen ot.) 5 min.
9. Izolované vzorky je možno skladovat při 4°C po krátkou dobu, dlouhodobě při -20°C.
10. Vzorky bylo třeba před každým použitím zvortexovat a centrifugovat při 14500 ot. 5 min.

Izolace extrakčním roztokem Chelex –Proteináza K

1. Do 250 µl 10 % roztoku chelexu byl přenesen analyzovaný jedinec a zhomogenizován homogenizátorem připraveným z natavené 1000 µl špičky.
2. Mikrozkušavka byla doplněna 250 µl ddH₂O na výslednou koncentraci 5 % roztoku, zvortexována a krátce ztočena na centrifuze.
3. Do roztoku bylo přidáno 5 µl Proteinázy K a opět následovalo vortexování a krátké ztočení na centrifuze.
4. Vzorek byl inkubován při 56°C 45 min. – 3 h.
5. Extrakční roztok byl inaktivován při 95-100°C 10 min.

6. Před použitím se takto extrahované vzorky vortexují a centrifugují při 14500 ot. 5 min.

Izolace extrakčním pufrem podle Hubberta a kol.

izolační roztok :

1 x PCR pufr s MgCl ₂ (TopBio)	100 µl
1 % TWEEN 20	10 µl
100 µl/ml Proteináza K	5 µl
ddH ₂ O	885 µl

1. Do mikroskopavky bylo napipetováno 100 µl extrakčního pufru a přenesen 1 analyzovaný jedinec.
2. Mikroskopavka byla přenesena do mrazícího boxu na 15 min. při -76°C.
3. Vzorek byl inkubován při 55°C 8 h i déle nebo při 65°C 2 h.
4. Extrakční pufr byl inaktivován při 94°C 15 min.

Izolace Squishing bufferem (SB)

izolační roztok :

TRIS-Cl, pH 8,2	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	25 mM
Proteináza K	200 µg/ml

1. Do mikroskopavky byl přenesen analyzovaný jedinec.
2. Pipetou bylo nasáto 50 µl SB a vzorek byl pomocí špičky s roztokem zhomogenizován (SB ze špičky během homogenizace samovolně uniká).
3. Po homogenizaci byl zbytek SB ze špičky vytlačen ke zhomogenizovanému vzorku.
4. Vzorek byl inkubován při 37°C 20-30 min.
5. SB byl inaktivován při 95°C 2 min.

Izolace DNeasy tissue kit (QIAGEN) – dle návodu výrobce

Izolace ZR Genomic DNA II kit (ZYMO RESEARCH) – dle návodu výrobce

DNA byla dále uchovávána zmražením v -20°C.

3.2.2 Amplifikace DNA

Primery

Na úvod byly použity tzv. univerzální primery, které umožňují vzhledem ke svému umístění v konzervativních oblastech genomu namnožit sekvence zástupců většiny taxonů

živočišné říše. Jejich přehled a údaje o publikacích, ze kterých byly primery převzaty uvádí Tab.2 .

Tab. 2 Seznam a popis testovaných primerů.

primer	typ	sekvence
Cytochromoxidáza (COI)		
LCO 1490 ¹⁾	F	5'-GGT CAA CAA ATCATA AAG ATA TTG G-3'
HCO 2198 ¹⁾	R	5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'
Elongation factor 1 α (EF1α)		
AdelEF1F1 ²⁾	F	5'-GTA CAT CCC AAG CCG ATT GT-5'
AdelEF1R2 ²⁾	R	5'-CTC CAG CTA CAA AAC CAC GA-3'
Elongation factor 1 α (EF1α)		
EF0-5' ³⁾	F	5'-TCC GGA TGG CAY GGC GAG AAY ATG-3'
EF1-5'b ³⁾	F	5'-GAC AAC GTT GGC TTC AAC GTG-3'
EF2-3'b ³⁾	R	5'-ATG TGA GCA GTG TGG CAA TCC-3'
Internal transcribed spacer (ITS) ITS		
ITS5f ⁴⁾	F	5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3'
ITSr4 ⁴⁾	R	5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'
ITS 1		
ITSf1 ⁵⁾	F	5'-TAC ACA CCG CCC GTC GCT ACT A-3'
ITSr2 ⁵⁾	R	5'-ATG TGC GTT CRA AAT GTC GAT GTT C-3'
ITS 2		
ITSf2 ⁶⁾	F	5'-TGA ACA TCG ACA TTT YGA ACG CA-3'
ITSr1 ⁶⁾	R	5'-CTT TTC CTC CSC TTA YTR ATA TGC-3'
AT Rich		
SR-J-14612 ⁷⁾	F	5'-AGG GTA TCT AAT CCT AGT TT-3'
TIN-24 ⁷⁾	R	5'-ATT TAC CCT ATC AAG GTA A-3'

1) Folmer et. al, 1994

2) Havill et al., 2007

3) Dokumentace „Insect nuclear primer set“, NAPS Unit, University of British Columbia (www.michalsmith.nbc.ca/services/NAPS)

4) Simon et al., 1994

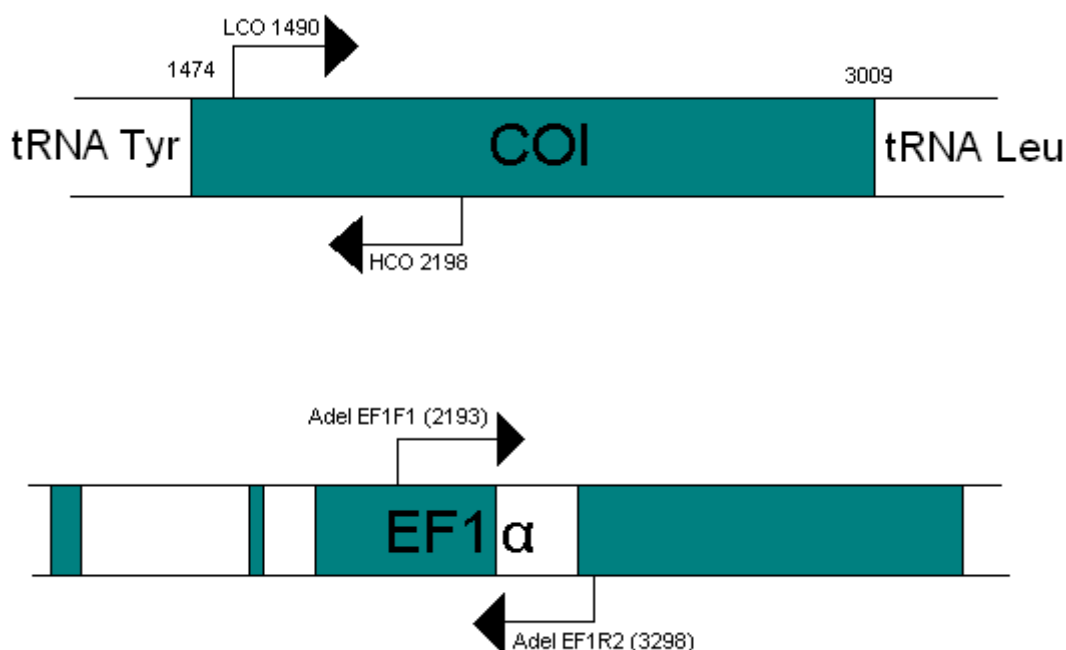
5) Ji et al., 2003

6) Simon et al., 1994

7) Simon et al., 1994

Úspěšně se podařilo naamplifikovat markery COI a EF1 α . Pozice úspěšně naamplifikovaných fragmentů a primerů jsou znázorněny na Obr. 4. Primery LCO 1490 a HCO 2198 leží na pozicích shodných s pozicemi u *D. melanogaster*. AdelEF1F1 leží na pozici 2193 a AdelEF14R2 na pozici 3299 opět shodné s pozicemi sekvence *D. melanogaster*.

Primery pro EF1 α byly navrženy tak, aby byl naamplifikován úsek ohraničující pouze 1 ze 2 přítomných intronů.



Obr. 4 Umístění primerů pro amplifikaci úseků genů COI a EF1 α u *D. melanogaster*. Šipky ukazují směr syntézy DNA, nápisy u šipek informují o názvu primeru a místu jeho nasednutí. Tmavé úseky označují kódující úseky/exony.

PCR reakční směs

Byl použit standardní předpis (dle doporučení výrobce) s použitím 2 typů polymeráz :

Předpis s Taq polymerázou (FERMENTAS) (reakce 12,5 μ l)

voda	7,25 μ l
10 x pufr	1,25 μ l
dNTPs (2,5 mM)	1 μ l
primery F,R (5 μ M)	0,75 μ l
Taq polymerasa (5 U/ μ l)	0,5 μ l
DNA	1 μ l

Předpis s Ex-Taq polymerázou (TAKARA)(reakce 12,55 μ l)

voda	7,75 μ l
10 x pufr	1,25 μ l
dNTPs (2,5 mM)	1 μ l
primery F,R (5 μ M)	0,75 μ l
Ex-Taq polymerasa (5 U/ μ l)	0,05 μ l
DNA	1 μ l

PCR profil

Pro amplifikaci byly použity 3 typy PCR profilů, přičemž Touch-down a Step-up PCR byly použity v případě, nepodařilo-li se naamplifikovat DNA běžným profilem a bylo tedy třeba snížit specificitu podmínek při amplifikaci.

Pro vlastní PCR byly použity 3 typy přístrojů. T3 Termocycler Biometra, T personal Biometra, kde se lišily některé hodnoty od základního programu - doba annealingu (40 s), postelongace (420 s) a teplota uchování (16°C) a Eppendorf Master Cycler.

Základní PCR profil

primer krok	COI		EF1 α	
	teplota [°C]	doba [s]	teplota [°C]	doba [s]
1. predenaturace	94	60	94	60
2. denaturace	94	30	94	30
3. annealing	47	30	55	30
4. elongace	72	60	72	60
5. postelongace	72	120	72	120
6. uchování	4	∞	4	∞

Krok 2-4 byl opakován 35 x.

Step-up PCR profil

primer krok	COI		EF1 α	
	teplota [°C]	doba[s]	teplota[°C]	doba[s]
1. predenaturace	94	60	94	60
2. denaturace	94	30	94	30
3. annealing	37	30	45	30
4. elongace	72	60	72	60
5. denaturace	94	30	94	30
6. annealing	47	30	55	30
7. elongace	72	60	72	60
8. postelongace	72	120	72	120
9. uchování	4	∞	4	∞

Krok 2-4 byl opakován 20 x a každý cyklus se zvyšoval o 0,5°C, krok 5-7 byl opakován 15 x a teplota zůstávala konstantní.

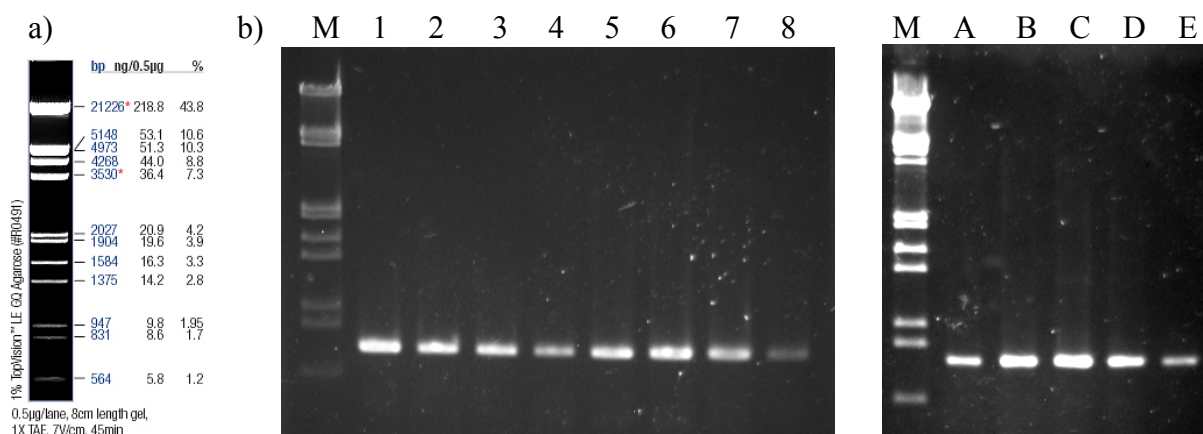
Touch-down PCR profil

krok \ primer	COI		EF	
	teplota [°C]	doba[s]	teplota[°C]	doba[s]
1. predenaturace	94	60	94	60
2. denaturace	94	30	94	30
3. annealing	47	30	55	30
4. elongace	72	60	72	60
5. denaturace	94	30	94	30
6. annealing	47	30	55	30
7. elongace	72	60	72	60
8. postelongace	72	120	72	120
9. uchování	4	∞	4	∞

Krok 2-4 byl opakován 10 x a teplota se každý cyklus snižovala o 1°C. Krok 5-7 se opakoval 20 x a teplota zůstávala konstantní.

3.2.3 Elektroforetická verifikace

1 µl PCR produktu byl elektroforeticky rozdělen na 1,5 % agarózovém gelu při napětí 90 V po dobu 45 min. Gel byl připraven rozpuštěním 1,2 g agarózy (SeaKem LE Agarose) v 80 ml 1 x TAE pufru (zásobní 50 x 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 gel nalit do připravené formy a pak byly umístěny hřebínky pro vznik jamek. Takto připravený gel byl ponechán při pokojové teplotě tuhnout cca 30 min. Pro porovnání velikosti PCR produktu byl použit velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+Hind III (FERMENTAS). Gel byl následně 20 min. barven ve 100 ml roztoku 1 x TAE pufru s přídavkem 5 µl roztoku ethidium bromidu o koncentraci 0,5 µg/µl. Rozdělený PCR produkt byl vizualizován na UVP transiluminátoru. Fotografická dokumentace byla pořízena digitální kamerou (UVP). Ukázkové fotografie elektroforeticky rozdělených PCR produktů jsou znázorněny na Obr. 5.



Obr. 5 Výsledek elektroforézy PCR produktů.

a) Lambda DNA/EcoRI+Hind III Marker

b) elektroforetická verifikace přítomnosti a velikosti PCR produktu.

M.....Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker

1-8....vzorky fragmentu COI (velikost 683 bp)

A-E...vzorky fragmentu EF1α (velikost 602-618 bp)

3.2.4 Sekvenování

Po ověření úspěšnosti první amplifikace bylo naamplifikováno větší množství PCR produktu podle trojnásobku předpisu PCR reakční směsi. Kvalita a kvantita byla ověřena pomocí elektroforézy a porovnáním s velikostním markerem Lambda DNA/EcoRI+HindIII. Následovalo přečištění PCR produktu, a to buď kitem „QIA quick PCR purification kit“ (QIAGEN) nebo kitem „DNA clean & concentrator clean-up“ (ZYMO Research) nebo SephadexTM G-50 Superfine (Amersham Biosciences).

QIA quick PCR purification kit (QIAGEN) – dle návodu výrobce

DNA clean & concentrator clean-up (ZYMO Research) – dle návodu výrobce

Množství PCR produktu po přečištění bylo ověřeno pomocí agarózové elektroforézy a velikost fragmentu byla zjištěna porovnáním s markerem Lambda DNA/EcoRI+Hind III. Ze zjištěné koncentrace bylo odvozeno množství PCR produktu, které bylo použito do reakční směsi sekvenační PCR. Produkt sekvenační PCR reakce byl přečištěn Sephadexem nebo isopropanolem a přečištěný vzorek byl vysušen ve vakuové sušičce Speed-VAC při 30°C nejméně 20 min. Sekvence vzorků byly analyzovány na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) (Biologické centrum AVČR, UMBR, Laboratoř genomiky) a ABI PRISM 310 Perkin-Elmer (Applied Biosystem) (Biologické centrum AVČR, ENTU).

Sekvenační PCR

Byl použit Big Dye® Terminátor v 3.1. Cycle Sequencing Kit. Oba naamplifikované templáty měly kolem 750 bp a proto byla do reakce použita koncentrace templátu 20 ng/μl (podle doporučení výrobce).

Předpis pro sekvenační PCR reakční směs (20 μl)

Ready Reaction Premix (RR směs)	2 μl
5 x sekvenační pufr	3 μl
Primer F/R (5 μM)	1 μl
ddH ₂ O	doplnit do 20 μl po přidání DNA

Sekvenační PCR profil

Reakce probíhala na přístrojích Eppendorf Master cycler, GeneAmp PCR System 2400 Perkin-Elmer nebo T3 Termocycler Biometra.

krok	teplota [°C]	doba [s]
1. predenaturace	94	60
2. denaturace	94	15
3. annealing	50	20
4. elongace	60	240
6. uchování	4	∞

Sephadex™ G-50 Superfine (Amersham Biosciences)

1. Sephadex byl hydratován v poměru 0,05 g sephadexu : 800 μl ddH₂O na 1 vzorek a byl ponechán bobtnat minimálně 45 min. v chladničce.
2. Suspenze byla nanášena do sloupečku připraveného ze seříznuté 1000 μl aerosolové špičky a umístěného v 1,5 μl mikrozkuhavce.
3. Nejprve bylo nanášeno 400 μl, přebytečná voda byla protlačena pipetovacím dudlíkem, pak bylo nanášeno dalších 300 μl, opět byla protlačena přebytečná voda a nakonec bylo nanášeno zbývajících 100 μl.
4. Sloupečky byly centrifugovány při 1000 rcf 2 min. a přemístěny do nové mikrozkuhavky.
5. Na takto připravený sloupeček byl nanášen PCR produkt a zcentrifugován při 1000 rcf 2 min.

Přečištění isopropanolem

1. Vzorek (20 μ l) byl smíchán s 80 μ l 75 % isopropanolu a ponechán 15-20 min. ve tmě při pokojové teplotě.
2. Po uplynutí doby byl vzorek zcentrifugován při max. ot. 20 min. při 4°C.
3. Ze vzorku byla okamžitě odsáta veškerá tekutina pipetou nebo pomocí vývěvy, přičemž bylo třeba dávat pozor, aby nebyla odsáta i DNA přichycená na stěně mikrozkuhavky.
4. Ke vzorku bylo přidáno 250 μ l isopropanolu a proběhla centrifugace při max. ot. 5 min. při 4°C.
5. viz bod 3
6. Otevřená mikrozkuhavka se vzorkem byla umístěna na 1 min. na termobloček zahřátý na 90°C.

3.2.5 Vyhodnocování DNA sekvencí

Sekvence byly upravovány v programu SeqMan (DNASTAR) a MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Kontrolní identifikace sekvencí byla prováděna srovnáváním se sekvencemi dostupnými v internetové databázi „National Center for Biotechnology Information BLAST” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Program MEGA 4 byl také použit pro stanovení základních charakteristik variability DNA úseků, tedy frekvence jednotlivých nukleotidů, průměrná délka sekvencí, počet variabilních míst a genetická vzdálenost (model Kimura 2-Parameter). Analýza haplotypů byla provedena pomocí programu DnaSP ver. 3. (Rozas & Rozas, 1999).

Pro statistické zhodnocení spolehlivosti daných markerů pro druhovou identifikaci byla použita distanční shlukovací (klastrovací) metoda Minimum Evolution s modelem Kimura-2 Parameter. Analýza byla statisticky ověřena bootstrapovou analýzou (1000 replikací).

Jako outgroup při tvorbě dendrogramu byla použita mšice *Daktulosphaira vitifoliae* ze sesterské čeledi *Phylloxeridae*, jejíž sekvence je dostupná v databázi GeneBank (GeneBank Accession Nos.: COI – EF073059, EF1 α – EF073221) (Havill et al., 2007).

4. Výsledky

Z testovaných markerů se podařilo naamplifikovat fragmenty COI a EF1 α . Celkem bylo analyzováno 108 vzorků, přičemž se podařilo úspěšně osekvenovat 59 jedinců pro COI marker a 39 jedinců pro EF1 α marker. Tento soubor představuje celkem zahrnujících 11 druhů, 6 podrodů a 2 rody. S univerzálními primery pro EF1 α se nepodařilo naamplifikovat všechny jedince, proto byly použity také specifické primery z nedávno publikovaného článku (Havill et al., 2007).

4.1 Charakteritika COI markeru

Sekvence COI markeru byly upraveny na jednotnou délku 683 bp. Počet variabilních míst byl 172 (25,2 %). Obsah AT/CG v sekvecích byl 75,1/24,9 (viz příloha 1).

Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita byla odečtena z matice genetických vzdáleností markeru COI zhotovené v programu MEGA 4 (viz Tab. 4 a Tab. 5).

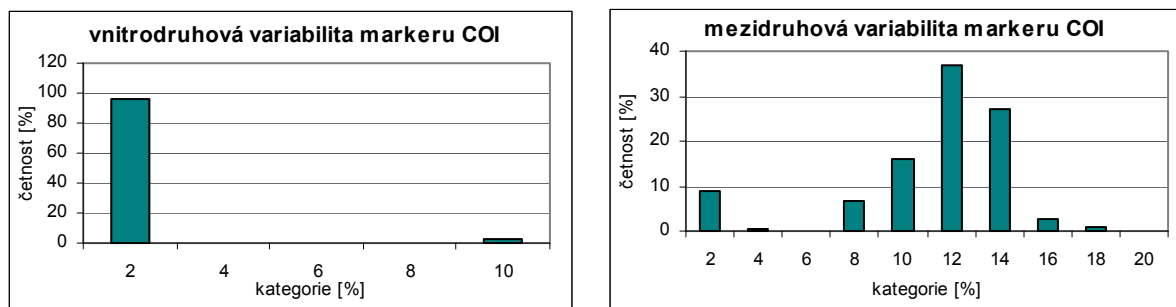
Tab. 4 Průměrné vnitrodruhové genetické vzdálenosti u COI markeru. (S.E. - střední chyba průměru).

COI		
druh	d	S.E.
A. laricis	0,005	0,002
A. tardus	0,002	0,001
D. merkeri	n/c	n/c
D. prelli	0,002	0,001
D. nordmannianae	0,014	0,004
P. orientalis	0,001	0,001
G. cooleyi	0,001	0,001
P. pini	0,003	0,001
P. strobi	0,003	0,001
S. abietis	0,004	0,001
S. viridis	0,029	0,004

Tab. 5 Průměrné mezidruhové genetické vzdálenosti u COI markeru. Modře jsou označeny směrodatné odchylky.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A. laricis	1	0,001	0,013	0,013	0,013	0,012	0,013	0,012	0,014	0,011	0,002
A. tardus	2	0,004	0,013	0,013	0,013	0,012	0,013	0,012	0,014	0,011	0,002
D. merkeri	3	0,112	0,110	0,000	0,003	0,014	0,012	0,014	0,015	0,013	0,012
D. prelli	4	0,113	0,111	0,001	0,003	0,013	0,012	0,014	0,014	0,013	0,012
D. nordmannianae	5	0,116	0,114	0,011	0,012	0,014	0,012	0,015	0,015	0,014	0,012
P. orientalis	6	0,099	0,101	0,121	0,120	0,134	0,015	0,001	0,010	0,014	0,012
G. cooleyi	7	0,104	0,102	0,088	0,086	0,096	0,130	0,015	0,014	0,013	0,012
P. pini	8	0,100	0,102	0,124	0,123	0,136	0,002	0,132	0,010	0,014	0,012
P. strobi	9	0,124	0,123	0,122	0,122	0,136	0,068	0,127	0,070	0,015	0,014
S. abietis	10	0,079	0,080	0,110	0,112	0,120	0,126	0,099	0,127	0,140	0,009
S. viridis	11	0,017	0,016	0,109	0,110	0,114	0,104	0,099	0,106	0,125	0,069

Průměrná hodnota vnitrodruhé variability je 0,64 % a mezidruhé 9,7 %. Rozložení genetické variability lépe znázorňuje histogram (Obr. 6) vytvořený z matice párových srovnání. Vnitrodruhá variabilita byla nejvyšší v kategorii do 2 %, zatímco mezidruhá kolísala mezi 10 a 14 %.



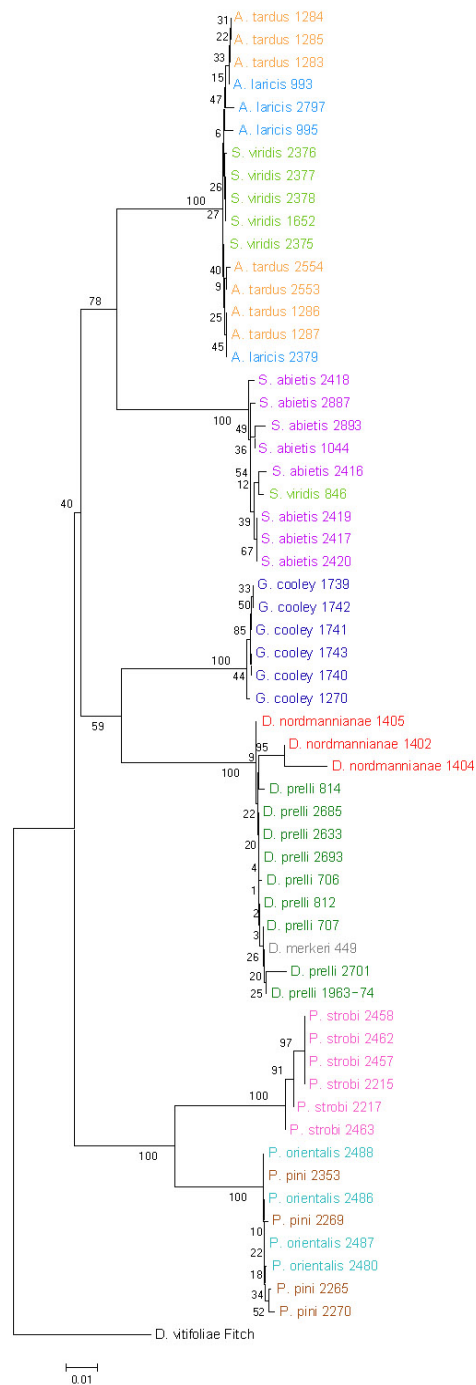
Obr. 6 Znázornění rozložení vnitrodruhé a mezidruhé variability COI markeru.

Analýza rozlišila 17 haplotypů, které víceméně korespondovaly s podrody (Tab. 6). Některé haplotypy však sdílelo více druhů v rámci jednoho rodu.

Tab. 6 Seznam haplotypů COI markeru.

COI			
haplotyp	frekvence	druh	číslo vzorku
1	1	<i>A. laricis</i>	2797
2	4	<i>A. laricis</i>	993,1283,1284,1285
3	1	<i>A. laricis</i>	995
4	9	<i>A. tardus</i>	2553,2554,1286,1287
		<i>A. laricis</i>	2379
		<i>S. viridis</i>	2375,2377,2378,1652
5	10	<i>D. merkeri</i>	449
		<i>D. nordmannianae</i>	1405
		<i>D. prelli</i>	2685,2633,706,707,812,814,2693,1963-74
6	1	<i>D. nordmannianae</i>	1402
7	1	<i>D. nordmannianae</i>	1404
8	8	<i>P. orientalis</i>	2480,2486,2487,2488
		<i>P. pini</i>	2353,2265,2269,2270
9	1	<i>D. prelli</i>	2701
10	6	<i>G. cooleyi</i>	1743,1270,1739,1740,1741,1742
11	6	<i>P. strobi</i>	2463,2215,2217,2457,2458,2462
12	3	<i>S. abietis</i>	2893,1044,2887
13	4	<i>S. abietis</i>	2419,2416,2417,2420
14	1	<i>S. abietis</i>	2418
15	1	<i>S. viridis</i>	846
16	1	<i>S. viridis</i>	2379

Na základě sekvencí COI markeru byl vytvořen dendrogram metodou Minimum Evolution (viz Obr. 7). Jednotlivé uzly stromu jsou podpořeny bootstrapovou hodnotou (1000 replikací) vyjadřující procento věrohodnosti daného uzlu. Genetické vzdálenosti byly vypočteny metodou Kimura 2-Parameter. Pozice obsahující mezery a chybějící data byly eliminovány pomocí „Pairwise deletion option“. Strom je zakořeněn pomocí mšice *Daktulosphaira vitifoliae* ze sesterské čeledi *Phylloxeridae*.



Obr. 7 Znázornění vztahů v rámci čeledi *Adelgidae* na základě COI markeru. Jednotlivé druhy jsou odlišeny barevně.

4.2 Charakteristika EF1 α markeru

Sekvence EF1 α markeru měly variabilní délku, která kolísala od 602 do 618 bp. Tuto délkovou variabilitu způsoboval vmezeřený intron, jehož délka byla specifická pro jednotlivé podrody (viz Tab. 7).

Tab. 7 Délka intronu EF1 α markeru v rámci podrodů čeledi *Adelgidae*.

podrod	druh	délka intronu [bp]
Adelges	laricis	82
	tardus	
Dreyfusia	nordmannianae	67
	prelli	
Gilleetteella	cooleyi	78
Pineus	orientalis	75
	pini	
	strobi	
Sacchiphantes	abietis	83
	viridis	82

Počet variabilních míst byl 128 (20,7 %). Obsah AT/CG v sekvencích byl 55,9/44,1 (viz příloha 2).

Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita byla odečtena z matice genetických vzdáleností markeru EF1 α zhotovené v programu MEGA 4 (viz Tab. 8 a Tab. 9).

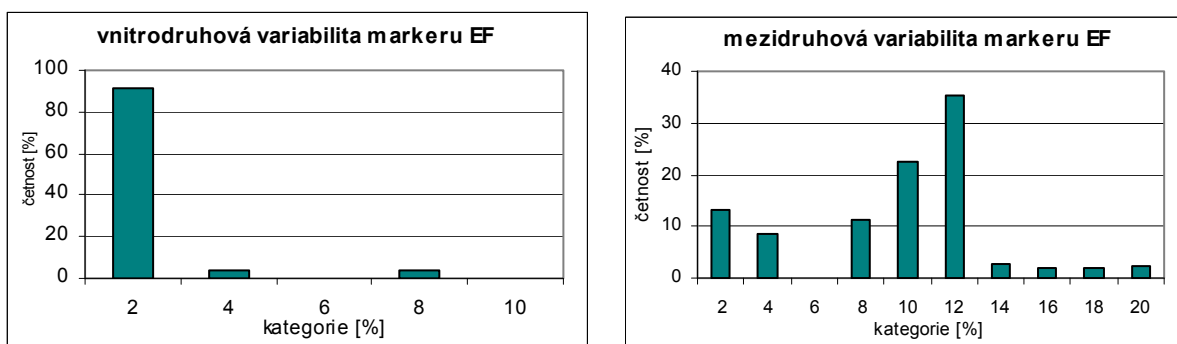
Tab. 8 Průměrné vnitrodruhové genetické vzdálenosti u EF1 α markeru. (S.E. - střední chyba průměru).

EF1 α		
druh	d	S.E.
A. laricis	0,004	0,002
A. tardus	0,011	0,003
P. orientalis	0,003	0,001
D. nordmannianae	n/c	n/c
D. prelli	0,016	0,005
G. cooleyi	n/c	n/c
P. pini	0,001	0,001
P. strobi	0,001	0,001
S. abietis	0,008	0,002
S. viridis	0,041	0,006

Tab. 9 Průměrné mezidruhové genetické vzdálenosti u EF1 α markeru. Modře jsou označeny směrodatné odchylky

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A. laricis	1	0,002	0,014	0,011	0,011	0,014	0,014	0,014	0,011	0,004
A. tardus	2	0,009	0,014	0,011	0,011	0,014	0,014	0,014	0,011	0,004
P. orientalis	3	0,103	0,107	0,012	0,013	0,016	0,001	0,006	0,014	0,013
D. nordmanniana	4	0,070	0,073	0,087	0,003	0,013	0,013	0,013	0,011	0,010
D. prelli	5	0,08	0,083	0,097	0,011	0,013	0,013	0,014	0,011	0,010
G. cooleyi	6	0,090	0,092	0,109	0,077	0,080	0,016	0,017	0,014	0,012
P. pini	7	0,104	0,107	0,002	0,087	0,097	0,107	0,006	0,014	0,013
P. strobi	8	0,101	0,103	0,024	0,089	0,100	0,125	0,024	0,014	0,013
S. abietis	9	0,081	0,081	0,114	0,072	0,086	0,099	0,116	0,107	0,008
S. viridis	10	0,027	0,029	0,107	0,073	0,081	0,090	0,108	0,102	0,059

Průměrná hodnota vnitrodruhové variability je 1,06 % a mezidruhové 8,2 %. Rozložení genetické variability znázorňuje histogram (Obr. 8) vytvořený z matice párových srovnání. Vnitrodruhová variabilita byla nevyšší v kategorii 2 %, hodnoty mezidruhové variability jsou nejvyšší v kategorii 12 %.

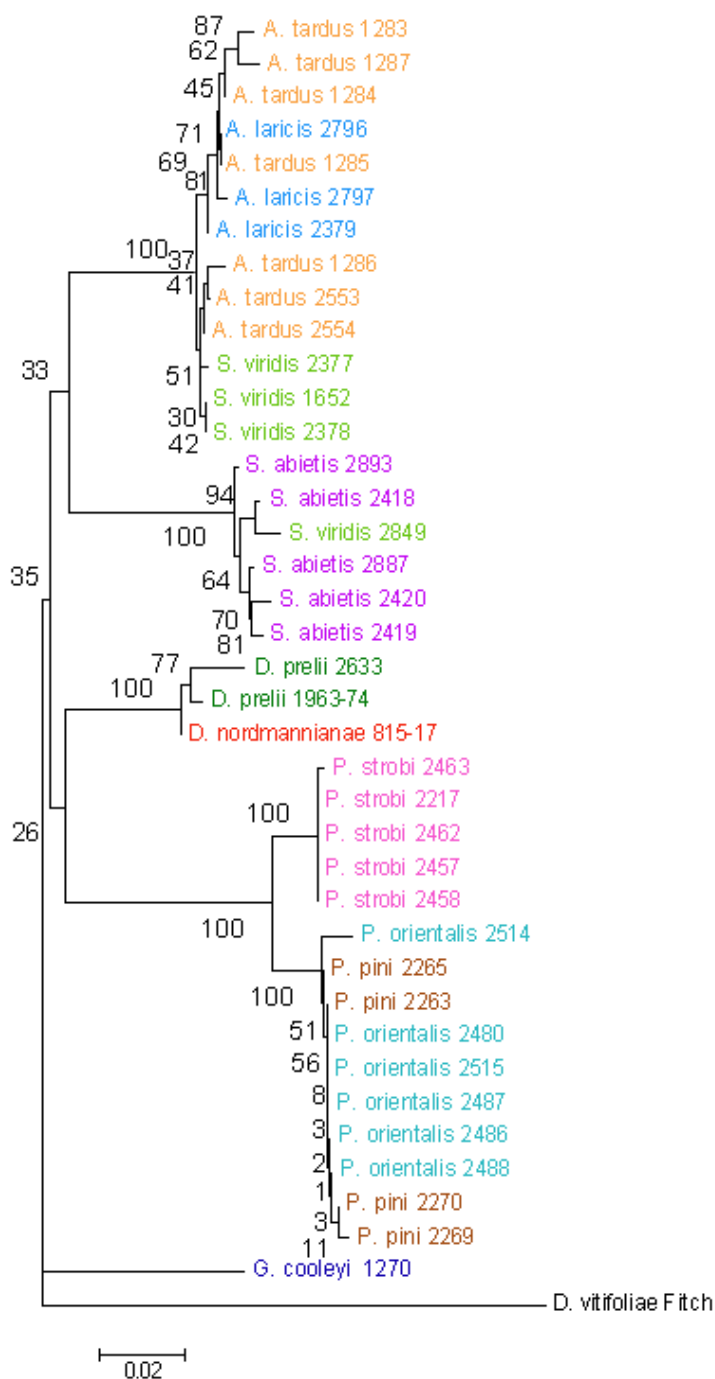
**Obr. 8** Znázornění vnitrodruhové a mezidruhové variability EF1 α markeru

Analýza rozlišila 28 haplotypů, jejichž zastoupení u jednotlivých druhů je v Tab. 10. Haplotypy jsou sdíleny mezi druhy v rámci téhož podrodu ve dvou případech; první dvojici tvoří *A. laricis* a *A. tardus*, druhou pak *P. orientalis* a *P. pini*.

Tab. 10 Seznam haplotypů EF1 α markeru.

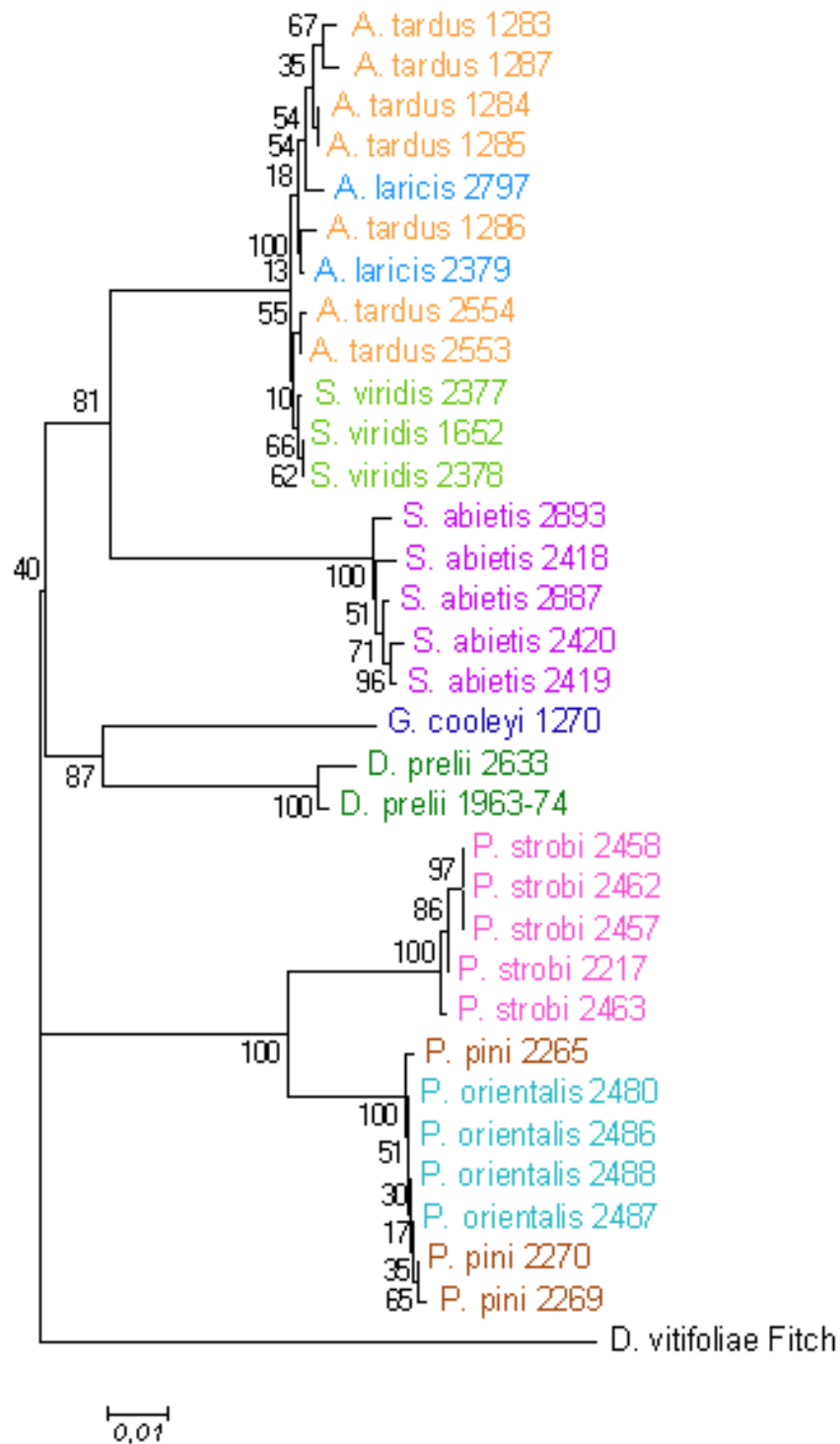
EF			
haplotyp	frekvence	druh	číslo vzorku
1	1	<i>A. laricis</i>	2797
2	2	<i>A. laricis</i>	2796
		<i>A. tardus</i>	1285
3	1	<i>A. tardus</i>	2554
4	1	<i>A. tardus</i>	1283
5	1	<i>A. tardus</i>	1284
6	1	<i>A. tardus</i>	1286
7	1	<i>A. tardus</i>	1287
8	1	<i>A. tardus</i>	2553
9	7	<i>P. orientalis</i>	2480,2487,2486,2488,2515
		<i>P. pini</i>	2270,2263
10	1	<i>D. nordmannianae</i>	815-17
11	1	<i>D. prelli</i>	2633
12	1	<i>D. prelli</i>	1963-74
13	1	<i>G. cooleyi</i>	1270
14	1	<i>P. orientalis</i>	2514
15	1	<i>P. pini</i>	2265
16	1	<i>P. pini</i>	2269
17	1	<i>P. strobi</i>	2463
18	4	<i>P. strobi</i>	2217,2457,2458,2462
19	1	<i>S. abietis</i>	2893
20	1	<i>S. abietis</i>	2418
21	1	<i>S. abietis</i>	2420
22	1	<i>S. abietis</i>	2887
23	1	<i>S. abietis</i>	2419
24	1	<i>S. viridis</i>	2849
25	2	<i>S. viridis</i>	1652, 2378
26	1	<i>S. viridis</i>	2377
27	1	<i>A. laricis</i>	2379

Na základě sekvencí EF1 α markeru byl vytvořen dendrogram metodou Minimum Evolution (viz Obr. 9). Jednotlivé uzly stromu jsou podpořeny bootstrapovou hodnotou (1000 replikací) vyjadřující procento věrohodnosti daného taxonomického uzlu. Genetické vzdálenosti byly vypočteny metodou Kimura 2-Parameter. Pozice obsahující mezery a chybějící data byly eliminovány pomocí „Pairwise deletion option“. Strom je zakořeněný pomocí mšice *Daktulosphaira vitifoliae* ze sesterské čeledi *Phylloxeridae*.



Obr. 9 Znárodnění vztahů v rámci čeledi *Adelgidae* na základě EF1 α markeru. Jednotlivé druhy jsou odlišeny barevně.

Na závěr byl vytvořen dendrogram na základě obou markerů, a to opětovně metodou Minimum Evolution, genetické vzdálenosti byly vypočteny modelem Kimura 2-Parameter (bootstrap 1000 replikací). Pozice obsahující mezery a chybějící data byly eliminovány pomocí „Pairwise deletion option“.



Obr. 10 Znárodnění vztahů v rámci čeledi *Adelgidae* na základě COI a EF1 α markeru. Jednotlivé druhy jsou odlišeny barevně.

5. Diskuze

5.1 Sběr a skladování vzorků

K dispozici byly vzorky uchovávané v 98 % etanolu. Vzorky sbírané v letech 2005 a 2006 bylo třeba rychle zpracovat, protože etanol penetruje měkké tkáně a DNA by mohla rychle degradovat. Tento náš předpoklad se potvrdil u některých starších vzorků, neboť u těch, které byly skladovány déle než 10 měsíců, se již žádnou z testovaných metod nepodařilo amplifikovatelnou DNA vyizolovat. Sezóna 2007 byla nepříznivá na sběr čerstvých vzorků a tudíž se nám nepodařilo získat DNA vzácnějších druhů. K analýze jsme používali instary, u nichž je determinace na základě morfologie nejméně problematická, a to *alata galicola*, *alata exulans*, *systemens*, *progrediens*, *fundatrix* (vysvětlivky viz Obr. 1). Přesto se morfologická identifikace u některých instarů ukázala jako značně komplikovaná a někteří jedinci byly identifikováni při prvním předběžném určování nesprávně, jak se ukázalo při pozdější analýze.

5.2 Extrakce DNA

Z porovnání jednotlivých metod se jeví jako nejlepší izolace pomocí ZR Genomic DNA II kit (Zymo Research). Na počátku projektu byla používána levnější a rychlejší metoda chelexové izolace, ale DNA v extraktu během půl roku degradovala i přes uchování ve zamraženém stavu. Izolace extrakčním kitem od QIAGEN i ZymoResearch fungovaly bezchybně, nicméně kit od ZymoResearch je finančně méně náročný.

5.3 Purifikace sekvenačních PCR produktů

Produkt sekvenační PCR jsme zkoušeli purifikovat dvěma metodami – isopropanolem a sephadexem. Přečištění sephadexem se ukázalo být rychlejší a šetrnější z hlediska zachování kvality a kvantity PCR produktu.

5.4 Testování markerů

Při amplifikaci markerů ITS 1 a ITS 2 vzniklo po rozdělení gelovou elektroforézou množství nespecifických produktů, což ukazuje, že použité univerzální primery nebyly pro amplifikaci ITS oblasti u korovnic vhodné a bude třeba navrhnout primery specifické pro tuto skupinu hmyzu, popřípadě se pokusit produkty klonovat. Primery pro AT Rich byly nejspíše málo konzervované a amplifikace se nezdařila u žádného z testovaných druhů.

U markerů EF1 α postrádáme 30 sekvencí získaných u COI markeru. 18 z těchto chybějících sekvencí se nezdařilo ze vzorků izolovaných chelexem a je tedy možné, že u nich došlo k rychlé degradaci. Zbylých 12 sekvencí se nepodařilo naamplifikovat nejspíše kvůli

polymorfismu přítomnému v oblasti nasedání primerů těchto analyzovaných jedinců. U COI markeru postrádáme 4 sekvence z analýzy EF1 α markeru, což si opět můžeme nejlépe vysvětlit jako sekvenční polymorfismus.

5.5 Tvorba dendogramů, analýza sekvencí

K tvorbě dendogramů byla použita distanční shlukovací metoda Minimum Evolution na základě modelu genetické vzdálenosti Kimura 2-Parameter. Metoda Minimum Evolution byla zvolena jako spolehlivější varianta metody Neighbour-Joining neboť pracuje na základě složitějších algoritmů a výkonnost současné techniky dovoluje používat náročnější programy aniž by se tím výrazně prodloužila doba analýzy (Švácha, ústní sdělení). Model Kimura 2-Parameter porovnává rozdíly vztažené na délku sekvence, přičemž počítá s různou pravděpodobností transverzních a tranzičních substitucí. Tento model je standardně používán pro „DNA barcoding“, tedy marker COI, a pro možnost srovnání jsem ho použila i při vyhodnocování markeru EF1 α .

5.6 Hodnocení vhodnosti markerů

Poměr obsahu bazí u obou markerů souhlasí s hodnotami práce Havill et al., 2007. Při porovnávání obsahu variabilních míst obou markerů byl zjištěn nesoulad u variability COI markeru, kdy práce Havill et al. (2007) uvádí variabilitu 32,3 %, zatímco naše analýza prokázala variabilitu pouze 25,2 %, Tato odlišnost může být způsobena větším druhovým zastoupením, které Havill et al. (2007) zkoumali (šlo o druhy z celého areálu rozšíření korovnic) Ve své práci jsem se naproti tomu více zaměřovala na jednotlivé druhy, a celý soubor reprezentuje korovnice pouze na území ČR.

Při srovnání vnitrodruhové a mezidruhové variability u obou markerů vidíme, že mezidruhová variabilita je zhruba 10 x vyšší než variabilita vnitrodruhová. Můžeme tedy říci, že jak marker COI tak EF1 α splňují požadavky spolehlivého molekulárního markeru v této skupině organismů.

Práce Havill et al. 2007 vypustila při hodnocení EF1 α markeru přítomný intron, čímž by se měla výrazně snížit jeho variabilita, nicméně při porovnání variabilit markerů z obou prací byl zjištěn pokles variability jen o cca 4 %.

Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita markerů COI se pohybovala v rámci předpokládaných hodnot. V grafu mezidruhové variability si můžeme všimnout vyšší četnosti hodnot v kategorii 0-2 %, mezidruhová variabilita by se však podle odhadů měla pohybovat převážně v kategoriích od 10 do 14 %. Toto je způsobeno nejspíše faktem, že některé druhy

v rámci svých podrodů vykazují velmi nízkou mezidruhovou variabilitu. Jsou to druhy morfologicky nerozlišitelné a geneticky téměř identické. Dají se identifikovat pouze na základě jejich biologie. Takto lze rozlišit několik druhových komplexů, v rámci kterých můžeme rozlišit druhy holocyklické a anholocyklické, tedy jedince kteří migrují na sekundárního hostitele a nacházíme u nich okřídlené migrační formy a druhy, které uzavírají svůj životní cyklus na primárním hostiteli. Molekulární znaky nejsou schopny tyto druhové komplexy rozlišit, v některých případech dokonce sdílejí stejné haplotypy. Jedná se především o druhy *A. laricis* (holocyklický) a *A. tardus* (anholocyklický) jejichž mezidruhová variabilita se pohybuje v hodnotách 0-0,8 %, dále jsou to druhy *D. prelli* a *D. nordmannianae* (oba holocyklické, ale liší se druhem sekundárního hostitele) s mezidruhovou variabilitou 0-2,4 %, *P. orientalis* (holocyklický) a *P. pini* (anholocyklický) s rozmezím mezidruhové variability 0-0,3 % a konečně *S. abietis* (anholocyklický) a *S. viridis* (holocyklický) s mezidruhovou variabilitou 0,5-1 %.

Rozložení vnitrodruhové variability markeru EF1 α odpovídá odhadovaným hodnotám, avšak mezidruhová variabilita se rozmněnila prakticky do všech kategorií variabilit, přičemž předpokládané kategorie variabilit svými hodnotami jen mírně převyšují hodnoty ostatní. Z toho vyplývá, že tento marker je pro rozlišení druhů méně spolehlivý, vykazuje nižší variabilitu a ani zahrnutí intronu není v tomto ohledu velkým vylepšením. Vysoká četnost mezidruhové variability v rozmezí 0-2 % je nejspíš opět způsobena identickou morfologií a velmi podobnou sekvenční strukturou druhů v rámci podrodů, lišících se jen na základě biologie (viz odstavec výše). Vysoké četnosti variabilit v rozmezích 2-4 % a 6-8 % je způsobena nižšími hodnotami mezidruhové variability oproti předpokladům a to i mezi druhy, které u markeru COI vykazovaly hodnoty normální. Jedná se opět o druhy v rámci stejného podrodu, lišící se svou biologii (holocyklus x anholocyklus a různé druhy sekundárních hostitelů). Jsou to dvojice druhů *P. orientalis*, *P. strobi* a dvojice *P. pini* a *P. strobi*, oba s hodnotami mezidruhové variability 2,3-2,7 %. V tomto ohledu však není bez zajímavosti druhová specificita délky intronu. Pokud by se toto zjištění potvrdilo, pak by zřejmě tento úsek mohl sloužit jako velmi dobrý druhový marker i pro uvedené druhové komplexy.

Při porovnávání dendrogramů obou markerů zjišťujeme víceméně shodné pozice jednotlivých skupin. U dendrogramu zhotoveného na základě markeru EF1 α si můžeme všimnout odlišného zařazení druhu *G. cooleyi*, což můžeme s největší pravděpodobností vysvětlit jako důsledek nedostatečného zastoupení jedinců tohoto druhu v analýze markeru EF1 α .

Druhy *A. laricis* a *A. tardus* se shlukly do jedné skupiny a podobně se seskupily i druhy *P. pini* a *P. orientalis*. Tento výsledek je podporován dendogramy obou markerů a byl potvrzen i dendogramem vytvořeným analýzou obou markerů. Opět se jedná o druhy, spadající do druhových komplexů, které se liší jen svou biologii (holocyklické x anholocyklické druhy) a stojí zřejmě na počátku fáze speciace.

Vzorky č. 2375, 2376, 2377 a 2378 původně identifikované na základě morfologie jako *S. viridis* se v dendogramu vytvořeném z molekulárních znaků (COI marker) přiřadily do podrodu *Adelges*. Po konzultaci s dr. Havelkou jsme dospěli k závěru, že byly tyto vzorky s největší pravděpodobností nesprávně identifikovány, protože se jedná o instar fundatrix, který je morfologicky identický se stejným instarem u druhu *A. laricis*, navíc oba tyto instary obývají stejný druh primárního hostitele a to ve stejnou dobu, což ještě více jejich morfologickou identifikaci znesnadňuje. Molekulární marker COI je však byl schopen rozlišit. Vzorek 1652 byl rovněž identifikován s nejistotou jako *S. laricis*, přestože se jednalo o relativně dobře rozpoznatelný instar sexupara. Nejistota v určení tohoto jedince vyplývá nejspíše z nedostatečného počtu preparovaných vzorků při předběžné identifikaci. Ve stejné analýze se vzorek 449 identifikovaný jako *D. merkeri* přiřadil do klasteru k *D. prelli* a *D. nordmannianae* a po následné dodatečné morfologické analýze byl přiřazen k druhu *D. nordmannianae*. Tyto závěry se potvrdily i při následné detailnější morfologické analýze.

Stejný problém nastal při analýze dendrogramu vytvořeného na základě EF1 α markeru opět u vzorků č. 2376, 2377 a 1652 (záměna *A. laricis* za *S. laricis*). Naši domněnku navíc potvrzuje i neshoda v délce intronu, která je u ostatních druhů specifická v rámci podrodů, jen v podrodu *Sacchiphantes* se liší a to právě u těchto tří nejasně identifikovaných jedinců.

Porovnáním sekvencí některých nejasně identifikovaných jedinců se sekvencemi známých druhů se podařilo tyto jedince zařadit do patřičného podrodu, resp. druhu. Jednalo se o záměnu jedinců v rámci druhových komplexů. Konkrétně vzorek č. 2379, původně identifikovaný jako *S. viridis* byl analýzou identifikován jako *A. laricis*, vzorek 2480 byl přeřazen z *D. nordmannianae* do *P. orientalis*, vzorek 2685 byl z původního *D. nordmannianae* přeřazen do *D. prelli*. Vzorek 2263, jednoznačně identifikovaný jako *P. pini*, se v dendrogramu přiřadil do jasně monofyletické skupiny *S. abietis*. Po konzultaci s dr. Havelkou konstatujeme, že se jednalo o kontaminaci, ke které došlo během některého z postupů a to i přes skutečnost, že jsme používali výhradně aerosolové špičky, které by měly této „kroskontaminaci“ zabránit.

6. Závěr

Podarilo se vybrat vhodné metody a postupy pro skladování, izolaci a amplifikaci vzorků. Ze čtyř testovaných molekulárních markerů pro druhovou identifikaci korovnic (ITS, EF1 α , AT-Rich, COI) byly úspěšně amplifikovány a osekvenovány mitochondriální marker COI a jaderný marker EF1 α . Ověření spolehlivosti vztahů vytvořených na základě sekvencí těchto markerů bylo provedeno srovnáním s předpokládanými taxonomickými vztahy v čeledi *Adelgidae* založenými na morfologii a biologii. Rekonstrukce dendrogramů znázorňující tyto vztahy byla provedena shlukovací (klastrovací) distanční metodou Minimum Evolution s modelem Kimura 2-Parameter. Některé vzorky byly na základě těchto dendrogramů předběžně přeřazeny do jiných druhových komplexů, což bylo následně potvrzeno dodatečnou detailnější morfologickou analýzou.

Pomocí úspěšně testovaných markerů budou dále získány sekvence ze zbývajících druhů a dokončena kompletní taxonomická analýza vztahů v rámci čeledi *Adelgidae*. Všechny druhy budou také podrobeny analýze dalšími markery (např. ITS), které by měly pomoci zejména při dořešení taxonomických nejasností u výše uvedených druhových komplexů. Ze sekvencí pro COI ze všech analyzovaných druhů budou vytvořeny molekulární barkódy, které budou dostupné v internetové databázi BOLD, Barcodes od Life data systém (www.barcodinglife.org) a GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), kam budou odeslány během přípravy publikace.

7. Literatura

- Awise, J.C., 1987.** Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 489–522.
- Awise, J., 1993.** *Molecular markers, natural history and evolution.* New York, USA: Chapman & Hall., 511 pp.
- Balch, R. E., 2005.** *Studies of the balsam woolly aphid, Adelges piceae (Ratz.) and its effects on balsam fir, Abies balsamea (L.) Mill.* Ottawa: Department of Agriculture, Science Service, Division of Forest Biology, Fredericton, N. B.
- Baudyš, E., 1910.** Korovnice (Chermesinae) jehličin. *Les a Lov*, 4: 177-181.
- Berney, C., Pawlowsky, J., Zaninetti, L., 2000.** Elongation factor 1-Alpha sequences do not support an early divergence of the *Acoela*. *Mol. Biol. Evol.*, 17: 1032-1039.
- Blackman, R. L. & Eastop, V. F., 1994.** *Aphids on the world's trees. An identification and information guide.* CAB International. 1-987.
- Börner, C., 1908.** Eine monographische Studie über die Chermiden. *Arb.Kais.Biol.Anst.f.Land- U.Forstw.*, 6: 81-320.
- Börner, C. & Heinze, K., 1957.** Aphidina - Aphidoidea. In Sorauer (Ed.), *Handbuch der Pflanzenkrankheiten* : 48-63.
- Burdon, E. R., 1908.** Some critical observations on the European species of the genus chermes. *Journ.Econ.Biol.*, 2: 119-148.
- Carter, C. I., 1971.** Conifer woolly aphids (Adelgidae) in Britain. *Forestry Commission. Bulletin*, Her Majesty's Stationary Office, London, 42: 1-52.
- Carter, C. I., 1976.** Key to the adelgid galls. *Entomologist's Mon.Mag.*, 111: 29-32.
- Caterino, M. S., Cho, S., Sperling, F. H. S., 2000.** The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 1-54
- Cholodkovsky, N., 1896.** Zur Biologie der Lärchen-Chermes-Arten. *Zool.Anz.*, 19: 37-40.
- Covassi, M. & Binazzi, A., 1981.** Contributions to the knowledge of the conifer aphid fauna IV. Remarks on several woolly aphids occurring in Italy (Homoptera, Adelgidae). (in Ital.). *REDIA*, 64: 303-330.
- Djernæs, M., Damgaard, J., 2006.** Exon-intron structure, paralogy and sequenced regions of elongation factor-1 alpha in Hexapoda. *Arthrop. sys. Phylog.*, 64: 45-52
- Eggers-Schumacher, H. A., 1987.** Enzyme electrophoresis in biosystematics and taxonomy of Aphids. Conference Proceedin: *Population Structure, Genetics and Taxonomy of Aphids and Thysanoptera.* 63-70.

- Eichhorn, O., 1956.** Eine dritte gefährliche Tannenlaus der Gattung *Dreyfusia* in Südbaden. *Forschungen und Fortschritte*, 30: 289-293.
- Eichhorn, O., 1957.** Eine neue Tannenlaus der Gattung *Dreyfusia* (*Dreyfusia merkeri* nov. spec.). *Z. Ang. Zool.*, 44: 303-348.
- Eichhorn, O., 1963.** Zum Überwinterungsverhalten der Tannenläuse der Gattung *Dreyfusia* (Hemipt., Adelgidae). *Z. Ang. Ent.*, 51: 358-363.
- Eichhorn, O., 1969.** Investigations on woolly aphids of the genus *Adelges* An. (Hemipt.: Adelgidae) and their predators in Turkey. *Techn. Bull.*, 12: 83-103.
- Eichhorn, O., 1975.** Über die Gallen der Arten der Gattung *Dreyfusia* (Adelgidae), ihre Erzeuger und Bewohner. *Z. Angew. Ent.*, 79(1): 56-76.
- Eichhorn, O., 1989.** On the life-cycle (Heterogony) and host alternation of the conifer woolly aphids *Sacchiphantes* Spp (Hom, Adelgidae). *J. Appl. Entomol.*, 108(1): 44-53.
- Eichhorn, O., 1991.** On the generation cycle of *Dreyfusia nordmanniana* Eckst (Hom, Adelgidae). *J. Appl. Entomol.*, 112(3): 217-219.
- Felsenstein, J., 1993.** *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5 c.* Seattle, USA.: Department of Genetics, University of Washington.
- Finck, K.E., Humphreys P., Hawkins G.V., 1989.** *Field guide to pests of managed forests in British Columbia.* Joint Publication Number 16, Forest Pest Review Committee of British Columbia. 188pp.
- Goetze, E., 2006.** Elongation factor 1- α in marine copepods (Calanoida: Eucalanidae): Phylogenetic utility and unique intron structure. *Mol. Phylog. Evol.*, 40: 880-886
- Havelka, J. (unpubl.)** PC - databáze mšic (Sternorrhyncha, Aphidinea) České republiky. EntÚ AV ČR, České Budějovice.
- Havelka, J. & Starý, P., 2006.** Buchlovický zámecký park z pohledu entomologa. *Živa*, 54: 28-29.
- Havill, N. P., Montgomery, M. E., Yu G. Y., Shiyake, S. & Caccone A., 2006.** Mitochondrial DNA from hemlock woolly adelgid (Hemiptera: Adelgidae) suggests cryptic speciation and pinpoints the source of the introduction to Eastern North America. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 99: 195-203.
- Havill, N. P., Footitt, R. G., von Dohlen, C. D., 2007.** Evolution of host specialization in Adelgidae (Insecta: Hemiptera) inferred from molecular phylogenetics. *Mol. Phylog. Evol.*, 44: 357-370

- Hebert, P. D. N., Ratnasingham S., deWaard J. R., 2003.** Barcoding animal life: cytochrom c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 96-99.
- Hebert, P. D. N., Cywinska A., Ball, S. L., deWaard, J. L., 2002.** Biological identification through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 313-321
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N., Hickey, D. A., 2007.** DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Elsevier Ltd.* (www.sciencedirect.com)
- Heinze, K. 1964.** Aphidoidea, Blattläuse. *Fauna Von Deutschland.*, 9: 209-222.
- Hillis, D. M., Moritz, C., & Mable, B. K., 2005.** *Molecular systematics*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Hochmut, R., 1964.** Problematika korovnice kavkazské (*Dreyfusia nordmanniana* Eckst.) v ČSSR a ochrana proti ní. *Lesnický časopis*, 37(10): 879-902.
- Hoelzel, A. R., 1998.** *Molecular genetics analysis of population*, second edition. Oxford University Press, New York.
- Hoy, M., 1994.** Insect molecular genetics. San Diego, California, USA.: Academic Press.
- Inouye, M. 1953. Monographische Studie über die Japanischen Koniferen-Gallenläuse (*Adelgidae*). *Bull.Sapporo Branch Governm.Forest Exp.Stn.*, 15: 1-91.
- 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. *Mol. Ecol. Not.*, 3: 581-585.
- Kapitola, P., 2003.** Korovnicovití (*Adelgidae*). *Příloha Lesnická práce* 5:1-4.
- Kapitola, P., 2005.** Korovnice rodu *Sacchiphantes* a *Adelges* na smrku. *Příloha Lesnická práce* 11:1-4.
- Komárek, J. & Pfeffer, A., 1937.** *Ernstliche Gefährdung unserer Tannenbestände.* *Sudetendeutsch.Forst- U.Jagdztg.*, 23.
- Konšel, J., 1933.** Chřadnutí jedle. *Dobové Spisky Čs. Mat. Les.*, 1-4.
- Křístek, J. & Urban, J., 2004.** *Lesnická entomologie*. Praha: Academia.
- Lampel, G., 1968.** *Die biologie des blattlaus-generationswechsels*. Jena: VEB Gustav Fischer.
- Loxdale, H. D., Castanera, P., & Brookes, C. P., 1983.** Electrophoretic study of enzymes from cereal aphid populations. 1. Electrophoretic techniques and staining systems for characterising isoenzymes from six species of cereal aphids (Hemiptera: Aphididae). *Bull. Ent. Res.*, 73: 645-657.

- Loxdale, H. D. & Lushai, G., 1998.** Molecular markers in entomology. *Bull. Ent. Res.*, 88: 577-600.
- Lushai, G., Footitt, R., Maw, E., and Barette, R., 2004.** Genetic variation in the green apple aphid, *Aphis pomi* De Geer (Aphididae, Homoptera) detected using microsatellite DNA flanking sequences. *Aphids in a New Millennium*. Conference Proceeding. 245-252.
- Mantovani, B., Francardi, V., Binazzi, A. & Leccese, A., 2002** - A molecular approach to differentiate the species of *Dreyfusia* Börner occurring in Italy (Aphidoidea, Adelgidae).- *Redia*, 84: 151-159.
- Marchal, P., 1913.** Contribution a l'etude de la biologie des *Chermes*. *Ann. Sci. Nat., Zool.*, 18: 171-226.
- Moran, N. A., Kaplan, M. J., Gelsey, M. J., Murphy, T. G. & Sholes, E. A., 1999.** Phylogenetics and evolution of the aphid genus *Uroleucon* based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Systematic Entomol.*, 24: 85-93.
- Novák, V., Hrozinka, F., Starý, B., 1976.** Atlas of insects harmful to forest trees. *Elsevier Sci. Publ. Comp.*, Amsterdam, Oxford, New York.
- Pašek, V., 1950.** *Dreyfusia nordmanniana* Eckst. (= *nüsslini* C. B.) - nebezpečný škodca jedle. *Polana*, 6: 234-237.
- Pašek, V., 1954.** *Vošky našich lesných drevín*. Bratislava: Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied.
- Pashchenko, N. F., 1988.** Suborder Aphidinea, Aphids. (in Russ.). In book: Leer, P. A. (ed.), *Keys to Insects of the Far East. of USSR*,: 546-686. Leningrad.: Nauka.
- Powers, T. O., Jensen, S. G., Kindler, S. D., Stryker, C. J., & Sandall, L. J., 1989.** Mitochondrial DNA divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes. *Ann.Entomol.Soc.Am.*, 82: 298-302.
- Pschorn-Walcher, H. & Zwölfer, H., 1958.** Preliminary investigations on the *Dreyfusia* (*Adelges*) populations, living on the trunk of the silver fir. *Z.Angew.Ent.*, 42: 241-277.
- Remigio, E. A., Hebert, P. D. N., 2003.** Testing the utility of partial COI sequences for phylogenetic estimates of gastropod relationships. *Mol. Phylog. Evol.*, 29: 641-647.
- Roe, A. D., Felix, A. H., Sperling, A. H., 2007.** Pattern of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Mol. Phylog. Evol.*, 44: 325-345
- Rozas, J., Rozas, R., 1999.** DnaSP version 3: An integrated program for molecular population genetics and marker evolution analysis. *Bioinformatics*, 15: 174-175.

- Shaposnikov G.Ch., 1964.** Aphidinea, pp. 489-616, in : Bej-Bienko G.Ja. (ed.), *Insects of the European part of the USSR: Identification key*. Tom. I., Nauka Publ. House, Moscow, 1-935 (in Russ.).
- Shearer, T. L., Coffroth, M. A., 2007.** Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Mol. ecol. N.* (Published ahead online)
- Simon, S., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P., 1994.** Evolution, weighting, phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann.Entomol.Soc.Am.*, 87: 651-701.
- Steffan, A. W., 1961.** Zur Evolution der fundatrigenen und virginogenen Anholozyklie im Adelgidae-Genus *Sacchiphantes* Curtis 1844 (Hemiptera: Aphidoidea). *Beitr.Ent.*, 11(5/6): 571-576.
- Steffan, A. W., 1962.** *Sacchiphantes abietis* Befall an *Picea abies* in Montenegro. *Z.Angew.Zool.*, 49: 281-295.
- Steffan, A. W., 1968.** Evolution und Systematik der Adelgidae (Homoptera: Aphidina): Eine Verwandtschaftsanalyse auf vorwiegend ethologischer, zytologischer und karyologischer Grundlage. *Zoologica*, 115, 1-139.
- Steffan, A. W., 1972.** *Die Forstschädlinge Europas*, Unterordnung Aphidina, Blattläuse. In Schwenke, W. (Ed.): 162-386. Hamburg und Berlin: Parey.
- Swofford, D., 1998.** PAUP: *Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Sunderland, Massachusetts, USA.: Sinauer Associates, Inc.
- 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. *Mol. Biol. Evol.* 10(6): 12559-1272.
- von Dohlen, C. D. and Teulon, D. A. J., 2003.** Phylogeny and historical biogeography of New Zealand indigenous Aphidini Aphids (Hemiptera: Aphididae). *Annals of the Entomological Society of America*, 96:107-116.
- Waugh, J., 2007.** DNA Barcoding in animal species: progress, potentials and Pitfalls. *Wiley InterScience* (www.interscience.wiley.com)
- Zhang, D., Hewitt, G. M., 1997.** Insect mitochondrial control region: A review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Bilch. Syst. Ecol.*, Vol 25, No. 2: 99-120.

Internetové zdroje

BOLD, Barcode of life data systems (<http://www.barcodinglife.org>)

GenBank, National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services.
genetic sequence database, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

www.michalsmith.nbc.ca/services/NAPS

Příloha 1

Tabulka obsahu bazí v sekvencích COI markeru

	T(U)	C	A	G	Total
D. vitifoliae (Fitch)	40.6	14.2	35.3	9.9	657
A. laricis (2797)	37.3	15.7	37.4	9.6	604
A. laricis (993)	37.9	14.8	38.1	9.2	575
A. laricis (995)	37.3	15.7	38.1	8.9	517
A. tardus (2554)	37.8	14.9	37.0	10.2	683
A. tardus (1283)	37.6	14.9	38.2	9.3	623
A. tardus (1284)	37.8	15.1	36.9	10.2	677
A. tardus (1285)	36.8	15.2	37.8	10.2	646
A. tardus (1286)	37.8	14.9	37.0	10.2	683
A. tardus (1287)	37.8	14.9	37.0	10.2	683
A. tardus (2553)	37.7	15.5	38.1	8.7	530
D. merkeri (449)	38.9	14.7	36.6	9.7	647
D. prelli (2685)	39.2	14.2	36.6	10.0	683
D. nordmannianae (1402)	38.4	14.6	38.4	8.6	555
D. nordmannianae (1404)	38.5	15.3	36.6	9.7	590
D. nordmannianae (1405)	39.1	14.3	36.6	10.0	683
P. orientalis (2480)	39.5	14.5	36.0	10.0	683
D. prelli (2633)	39.2	14.2	36.6	10.0	683
D. prelli (707)	38.5	14.3	37.2	10.1	616
D. prelli (706)	39.4	14.2	36.5	10.0	683
D. prelli (812)	39.2	14.2	36.6	10.0	683
D. prelli (814)	38.9	13.9	37.0	10.2	646
D. prelli (2693)	39.2	14.2	36.6	10.0	683
D. prelli (2701)	39.2	14.5	37.4	8.9	586
D. prelli (1963-74)	39.4	14.2	36.5	10.0	683
G. cooleyi (1743)	39.5	14.3	36.0	10.1	683
G. cooleyi (1270)	39.7	14.2	36.0	10.1	683
G. cooleyi (1739)	39.5	13.9	37.3	9.3	603
G. cooleyi (1740)	39.5	14.3	36.0	10.1	683
G. cooleyi (1741)	39.2	14.3	36.7	9.8	643
G. cooleyi (1742)	39.2	14.3	36.6	9.9	645
P. orientalis (2488)	39.5	14.3	36.0	10.1	683
P. orientalis (2486)	39.5	14.3	36.0	10.1	683
P. orientalis (2487)	39.6	14.4	35.9	10.1	682
P. pini (2353)	39.5	14.3	36.0	10.1	683
P. pini (2265)	39.5	14.3	36.9	9.3	636
P. pini (2269)	39.5	14.3	36.2	10.0	683
P. pini (2270)	38.3	15.0	36.7	9.9	618
P. strobi (2463)	39.2	14.5	36.2	10.1	683
P. strobi (2215)	39.2	15.3	35.8	9.8	615
P. strobi (2217)	39.2	14.5	35.9	10.4	683
P. strobi (2457)	39.2	14.5	35.9	10.4	683
P. strobi (2458)	39.2	14.5	35.9	10.4	683
P. strobi (2462)	39.2	14.5	35.9	10.4	683
S. abietis (2893)	38.8	15.5	35.2	10.5	631
S. abietis (2419)	39.7	14.6	35.1	10.5	683
S. abietis (1044)	38.5	14.9	35.9	10.7	652
S. abietis (2416)	39.7	14.6	35.1	10.5	683
S. abietis (2417)	39.7	14.6	35.1	10.5	683
S. abietis (2418)	39.5	14.8	35.4	10.2	683
S. abietis (2420)	39.7	14.6	35.1	10.5	683
S. abietis (2887)	39.5	14.8	35.0	10.7	683
S. viridis (2377)	37.9	14.8	37.2	10.1	683
S. viridis (846)	38.8	14.9	35.4	10.8	649
S. viridis (2378)	37.9	14.8	37.2	10.1	683
S. viridis (1652)	37.9	14.8	37.2	10.1	683
A. laricis (2379)	37.8	14.9	37.0	10.2	683
S. viridis (2375)	37.8	14.9	37.2	10.1	683
S. viridis (2376)	37.8	14.9	37.2	10.1	683
Avg.	38.9	14.6	36.5	10.0	656.7

Příloha 2Tabulka obsahu bazí v sekvencích EF1 α markeru

	T(U)	C	A	G	Total
D. vitifoliae (Fitch)	31.7	16.1	29.4	22.8	663
A. laricis (2797)	28.0	21.4	27.1	23.5	617
A. laricis (2796)	28.2	21.4	27.2	23.2	617
A. tardus (2554)	28.8	21.1	27.2	22.9	617
A. tardus (1283)	28.0	21.2	27.7	23.0	617
A. tardus (1284)	28.4	21.2	27.2	23.2	617
A. tardus (1285)	28.2	21.4	27.2	23.2	617
A. tardus (1286)	28.4	21.4	27.4	22.9	617
A. tardus (1287)	28.2	21.7	27.0	23.1	603
A. tardus (2553)	28.7	21.1	27.2	23.0	617
P. orientalis (2480)	28.5	20.3	27.2	23.9	610
D. nordmanniana (815-17)	27.6	21.1	27.4	23.9	602
D. prelii (2633)	28.7	20.2	27.3	23.8	564
D. prelii (1963-74)	27.3	21.0	27.3	24.4	594
G. cooleyi (1270)	28.7	20.1	28.9	22.4	478
P. orientalis (2515)	28.5	20.3	27.2	23.9	610
P. orientalis (2487)	28.5	20.3	27.2	23.9	610
P. orientalis (2486)	28.5	20.3	27.2	23.9	610
P. orientalis (2488)	28.5	20.3	27.2	23.9	610
P. orientalis (2514)	28.5	20.6	27.6	23.2	557
P. pini (2270)	28.5	20.3	27.2	23.9	610
P. pini (2263)	28.5	20.3	27.2	23.9	610
P. pini (2265)	28.7	20.2	27.2	23.9	610
P. pini (2269)	28.9	19.6	27.3	24.2	546
P. strobi (2463)	28.4	20.5	27.9	23.3	610
P. strobi (2217)	28.4	20.3	27.9	23.4	610
P. strobi (2457)	28.4	20.3	27.9	23.4	610
P. strobi (2458)	28.4	20.3	27.9	23.4	610
P. strobi (2462)	28.4	20.3	27.9	23.4	610
S. abietis (2893)	26.2	21.2	29.3	23.3	618
S. abietis (2418)	25.9	21.2	29.4	23.5	618
S. abietis (2420)	25.6	21.2	29.6	23.6	618
S. abietis (2887)	25.7	21.2	29.6	23.5	618
S. abietis (2419)	25.9	21.5	29.3	23.3	618
S. viridis (2849)	27.0	19.9	30.1	23.1	559
S. viridis (1652)	28.4	21.4	27.2	23.0	617
S. viridis (2377)	28.7	21.4	27.2	22.7	617
S. viridis (2378)	28.4	21.4	27.2	23.0	617
A. laricis (2379)	28.5	21.2	27.1	23.2	617
Avg.	28.1	20.7	27.8	23.4	604.9