

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

Diagnostika druhových komplexů čeledi Adelgidae
na základě molekulárních markerů

Andrea Jarošová

Školitelka: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

Školitel specialista: Ing. Jan Havelka, Ph.D.

České Budějovice

2009

Jarošová, A., 2009: Diagnostika druhových komplexů čeledi Adelgidae na základě molekulárních markerů. [Diagnostics of species complex in the family *Adelgidae* by molecular markers. Bc. Thesis, in Czech.] – 46 p., Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Three molecular markers were tested for use in species identification of two selected genera of the *Adelgidae*. Two mitochondrial markers were successfully amplified and sequenced, part of the COI gene and fragment between the COII and COIII genes. Their ability to distinguish species complexes was checked by statistical methods and by construction of phylogenetic trees.

Projekt byl financován GA AVČR, č. grantu IAA600960705, ze záměru Entomologického ústavu Z 50070508 a Přírodovědecké fakulty JU.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím literatury a podkladových materiálů uvedených v příloženém seznamu literatury.

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

V Českých Budějovicích, 6. 5. 2009

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení, rady a poskytnutí zázemí při zpracovávání mé práce. Dále děkuji Janu Havelkovi za poskytnutí studovaného materiálu, Pavlíně Věchtové, Mirce Sýkorové, Renatě Strouhalové a Martině Slámové za pomoc v začátcích mého laboratorního působení a Lucce Kučerové za rady a pomoc, když bylo potřeba. Bez podpory kolegyň z laboratoře Danči Chundelové a Aničky Kuřátkové by tato práce také nevznikla a za jejich pomoc a vytvoření příjemné atmosféry moc děkuji. Poděkování patří také mojí rodině a přátelům, kteří mi byly oporou po celou dobu studia.

OBSAH

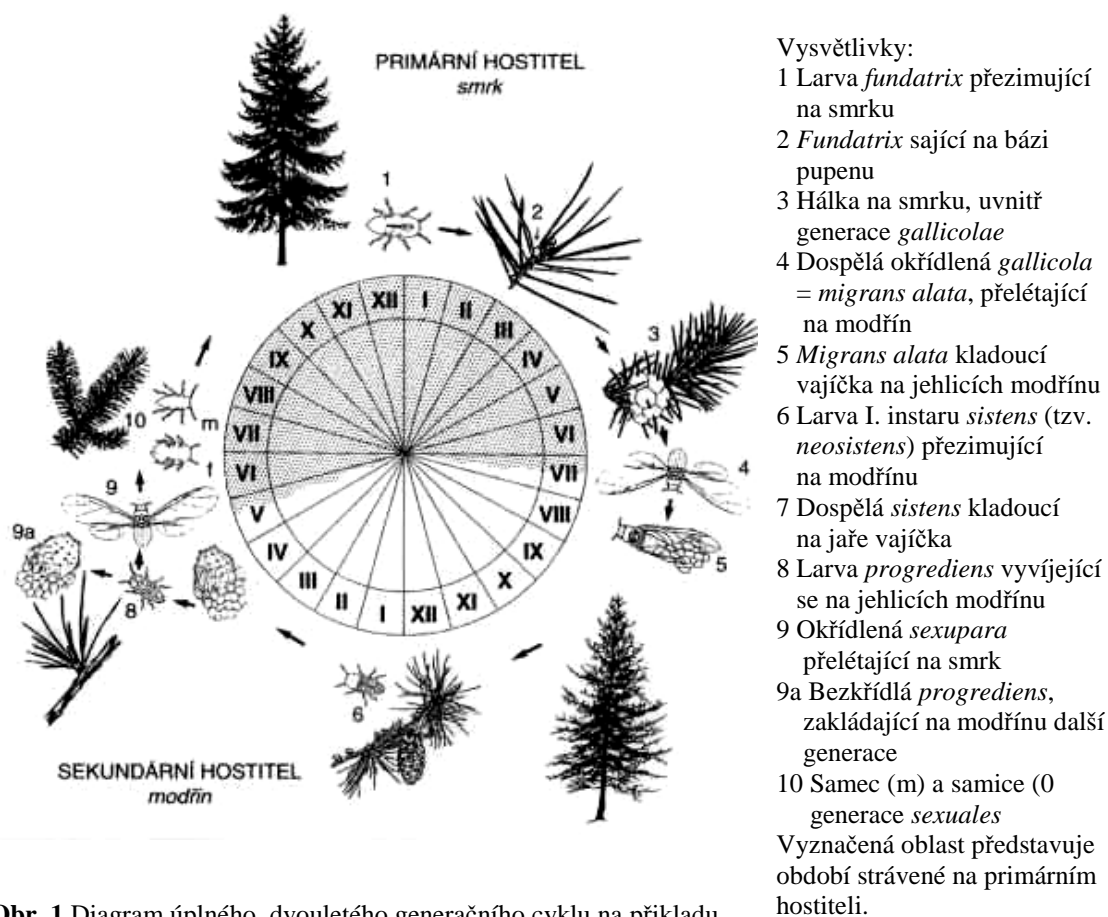
| | | |
|--------|----------------------------------------------------|----|
| 1. | Úvod..... | 1 |
| 1.1. | Studované druhy | 4 |
| 1.2. | Molekulární markery | 5 |
| 2. | Cíle..... | 8 |
| 3. | Materiál a metody | 9 |
| 3.1. | Materiál | 9 |
| 3.2. | Extrakce DNA..... | 9 |
| 3.2.1. | Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit | 9 |
| 3.2.2. | Izolace Squishing bufferem (SB) | 9 |
| 3.2.3. | Izolace pomocí Invisorb Spin Tissue Mini Kit | 10 |
| 3.3. | Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 10 |
| 3.3.1. | Použité primery | 10 |
| 3.3.2. | Reakční směs | 11 |
| 3.3.3. | PCR profil | 12 |
| 3.4. | Gelová elektroforéza..... | 13 |
| 3.5. | Purifikace PCR | 14 |
| 3.5.1. | DNA Clean & Concentrator ^{TM-5} | 14 |
| 3.5.2. | Čištění pomocí směsi ExoSAP | 14 |
| 3.6. | Sekvenování..... | 15 |
| 3.6.1. | Sekvenační směs | 15 |
| 3.6.2. | Program pro sekvenační reakci..... | 15 |
| 3.6.3. | Čištění sekvenační reakce pomocí Sephadexu | 15 |
| 3.7. | Analýza sekvencí | 16 |
| 4. | Výsledky | 17 |
| 4.1. | Testované markery..... | 17 |
| 4.1.1. | Gen COI..... | 17 |
| 4.1.2. | Oblast ATP | 19 |
| 5. | Diskuze | 28 |
| 5.1. | Extrakce DNA..... | 28 |
| 5.2. | Purifikace produktů sekvenační reakce | 28 |
| 5.3. | Testované markery..... | 28 |
| 5.3.1. | COI marker | 29 |
| 5.3.2. | Oblast ATP | 30 |
| 6. | Závěr | 33 |
| 7. | Použitá literatura | 34 |
| 8. | Přílohy..... | 39 |

1. Úvod

Korovnice patří do čeledi *Adelgidae* (*Aphidinea*, *Sternorrhyncha*), jsou blíže příbuzné mšicím a jsou charakteristické svými složitými generačními cykly spojenými se střídáním generací i hostitelů. Živí se sáním rostlinných šťáv na jehličnatých stromech. Areál jejich rozšíření se nalézá na severní polokouli, ale některé druhy byly zavlečeny i do jiných koutů světa (Havill & Footit, 2007). Popsáno je kolem 70 druhů (Blackman & Eastop, 1994), avšak některé možná nepředstavují samostatný druh, ale jde pouze o jiné morfologické formy, které se nachází na jiném hostiteli. U 50 zástupců korovnicovitých jsou popsány jejich životní cykly (Havill & Footit, 2007). Z těchto je 19 druhů holocyklických, 8 anholocyklických na hostiteli rodu *Picea* a 23 korovnic anholocyklických, ale žijících na sekundárním hostiteli. U nás se vyskytuje 17 druhů. Obecně jsou u korovnic rozlišovány dva typy životních cyklů, úplný a neúplný.

Úplný cyklus (holocyklus, Obr. 1) je dvouletý, vyznačuje se střídáním dvou hostitelů a pouze druhy s tímto generačním cyklem se rozmnožují sexuálně. Primárním hostitelem je smrk (*Picea* spp.). Na něm se koncem léta vylíhne larva *fundatrix*, která se usadí poblíž nebo přímo na pupenu a přezimuje jako I. instar (Annand, 1928). Na jaře pak pokračuje v sání šťáv a indukuje tak přeměnu pupenu v hálku. Po dosažení dospělosti naklade bezkřídlá samice snůšku vajíček, ze kterých se vylíhnou *gallicolae*. Ty se přesunou do hálky, ve které se vytváří komůrky, a larvy v nich (po jejich uzavření) dokončují svůj vývoj. V letních měsících hálka usychá, komůrky se otevrou, vylezou *gallicolae* a stávají se z nich okřídlení *migrantes alatae*, kteří přelétávají na sekundárního hostitele (Kapitola, 2003). Tím mohou být zástupci několika rodů jehličnatých stromů – *Abies*, *Larix*, *Pseudotsuga*, *Tsuga* nebo *Pineus* (Havill & Footit, 2007). Na nich *migrantes alatae* snesou vajíčka, ze kterých se líhnou *sistentes*, a ty přezimují v klidovém stavu jako I. nebo II. instar (Kapitola, 2003). Na jaře dospějí a z jejich vajíček se líhne generace *progredientes*. Bezokřídle samice mohou pak během léta plodit další generace. Pokud se vylíhne okřídlená samice – *sexupara*, stěhuje se zpět na primárního hostitele, kde naklade vajíčka. Z nich se vyvíjí generace *sexuales* tvořená bezkřídlými samci a samicemi. Po oplodnění samice naklade jedno vajíčko, ze kterého se líhne larva *fundatrix*, a cyklus se opakuje.

Druhý vývojový cyklus - anholocyklus trvá jen jeden rok, korovnice se při něm rozmnožují pouze partenogeneticky a setrvávají na jednom hostiteli. Tím může být jakýkoli jehličnan z výše uvedených rodů. Pokud je hostitelskou rostlinou smrk, skládá se životní cyklus ze dvou partenogenetických generací – *fundatrix* a *gallicolae* (Kapitola, 2003). Alternativou je přítomnost pouze bezkřídlých forem (typu *sistens*), které ale nevytváří háčky. Poslední možností jsou korovnice, které žijí pouze na sekundárním hostiteli ve formě *sistens* nebo *progreadiens* a mohou produkovat okřídlené potomstvo.

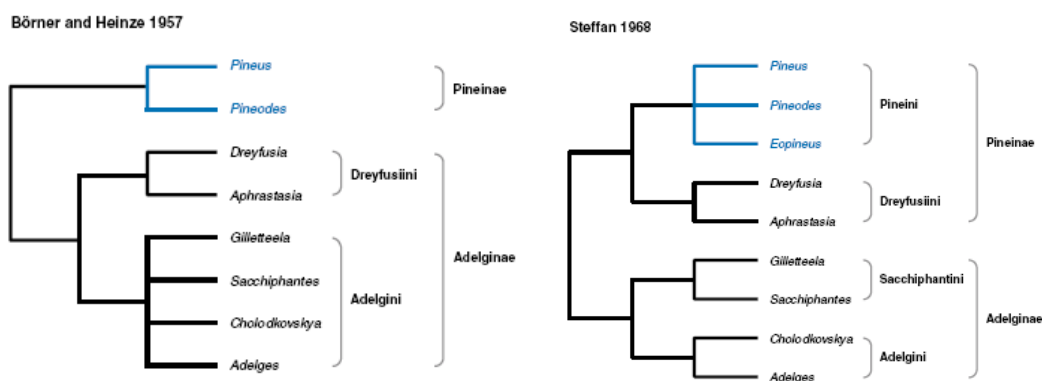


Obr. 1 Diagram úplného, dvouletého generačního cyklu na příkladu korovnice pupenové -*Adelges laricis* (podle Blackman & Eastop, 1994)

První práce pojednávající o biologii korovnic se objevily na konci 19. století (Blochmann, 1887, 1889; Cholodkovsky, 1889; Dreyfus, 1889). Na ty navázaly publikace zabývající se terminologií používanou při popisu životního cyklu a

morfologickými znaky užívanými v taxonomii (Cholodkovsky, 1896; Börner, 1908; Marchal, 1913; Annand, 1928). Další vlna zájmu přišla ve 2. polovině 20. století. Byly sepsány studie zabývající se druhovým zastoupením korovnic na určitém území (Inouye, 1945; Bodenheimer & Swirski, 1957; Carter, 1971; Ghosh, 1983; Footit & Richards, 1993), populační dynamikou a vztahem predátor – kořist (Eichhorn, 1968, 1969) anebo jejich životním cyklem (Steffan, 1972; Roversi & Binazzi, 1996). Téma taxonomie a systematiky je zpracováno také v dílech autorů Börner & Heinze (1957), Heinze (1961), Steffan (1968), Covassi & Binazzi (1981), Blackman & Eastop (1994) nebo Binazzi (2000).

Pro jakýkoli boj proti škůdcům je důležitá správná identifikace druhu. Přes rozsáhlý počet publikací zabývajících se nomenklaturou a taxonomií *Adelgid* se však odborníci na klasifikačním systému neshodují (Wallace, 2005). Obecně jsou používány dva systémy. První považuje za nejdůležitější při identifikaci korovnic tvar a rozmístění dorzálních skleritů, voskových plátů a voskových žláz u larev I. instaru (Börner & Heinze, 1957), kdežto druhý (Steffan, 1968) používá k druhovému rozlišení morfologii, počet chromozomů a výskyt a lokaci endosymbiotických bakterií. Fylogenetické vztahy v rámci obou systémů zobrazuje Obr. 2.



Obr. 2 Grafické vyobrazení klasifikace korovnic u Börner & Heinze (1957) a Steffan (1968) (převzato z Havill & Footit, 2007)

Na konci 20. století se pro taxonomické vztahy začaly využívat molekulární markery. Příkladem mohou být práce využívající DNA sekvence při sestavě fylogenetických vztahů u mšic (Powers *et al.*, 1989; Moran *et al.*, 1999). Mezi novější publikace věnující se korovnicím patří Mantoni (2002), který ke studiu rodu *Dreyfusia*

na území Itálie využívá fragmenty genů cytb a NADH4. Vorweck a Forneck (2006) zkoumají strukturu genomu u *Daktulosphaira vitifoliae* a hledají při tom důkaz převážně asexuální reprodukce u tohoto druhu. V roce 2006 (a) vydává Havill práci o *Adelges tsugae*, ve které analyzuje její mtDNA, aby objasnil původ tohoto zavlečeného druhu působícího značné škody na jehličnanech rodu *Tsuga* v Severní Americe. Téhož roku vychází i jeho druhá publikace (Havill *et al.*, 2006b), tentokrát zaměřená na evoluci specializace na hostitelské dřeviny a životních cyklů. Ve svém nejnovějším díle (Havill *et al.*, 2007) shrnuje poznatky o biologii, životních cyklech a vztazích s hostitelskými rostlinami u čeledi *Adelgidae*.

1.1. Studované druhy

Některé skupiny korovnic jsou od sebe morfologicky téměř nerozlišitelné a druhová příslušnost je u nich určována na základě způsobu rozmnožování (sexuálně x partenogeneticky) a s ohledem na hostitelský druh jehličnanu (Havill *et al.*, 2006b). Například *Sacchiphantes laricis* je holocyklická a v Evropě migruje mezi jehličnany *Picea* nebo *Larix*. Morfologicky velmi podobné druhy *Sacchiphantes abietis* a *Sacchiphantes segregis* jsou anholocyklické a jsou vázány pouze na druh *Picea*, respektive *Larix* (Steffan, 1961). S ohledem na tuto skutečnost byly k diagnostice na základě molekulárních markerů vybrány následující druhy.

Rod *Adelges*

Zástupci tohoto rodu parazitují častěji na starších smrcích, kde vytváří menší, kulovité, bledě zelené až žlutavé hálky (Kapitola, 2005). V ty je přeměněn celý pupen, který se nalézá většinou na bočních výhonech nebo slabších větvičkách.

Adelges laricis (Vallot 1836) neboli korovnice pupenová (někdy též modřínová) má dvouletý životní cyklus, během kterého střídá dva hostitele, smrk ztepilý a modřín evropský. Na její přítomnost na druhotném hostiteli upozorňují žloutnoucí a zohýbané jehlice (Kapitola, 2005). Mimo území Evropy byl její výskyt zaznamenán i v Severní Americe.

Adelges tardus (Dreyfus 1888) se vyznačuje jednoletým generačním cyklem, při kterém setrvává na primárním hostiteli smrku ztepilém. Výskyt jejích hálek bývá četnější než u předchozího druhu, a proto také způsobující větší škody (Kapitola, 2005).

Rod *Sacchiphantes*

Korovnice rodu *Sacchiphantes* žijí především na mladých smrcích, kde z báze pupenu vytváří větší, oválné, tmavozelené háčky s červenavou kresbou (Kapitola, 2005).

Životní cyklus *Sacchiphantes abietis* (Linnaeus 1758), česky korovnice smrkové, je jednoletý a vázaný na smrk ztepilý. Její háčky bývají početnější a často se vyskytují ve shlucích, čímž způsobují větší poškození než *S. viridis* (Kapitola, 2005). Kromě Evropy se vyskytuje i v Severní Americe, Indii a severní Africe.

Sacchiphantes viridis (Ratzeburg 1843) neboli korovnice zelená má stejně jako korovnice pupenová holocyklický způsob života. Kromě Evropy byl její výskyt zjištěn i v Číně (Kapitola, 2005).

1.2. Molekulární markery

Molekulární markery jsou nástrojem, který nachází široké uplatnění v různých oblastech biologie a napomáhá řešit otázky týkající se fylogenetiky, ekologie, evoluce či populační dynamiky (Loxdale & Lushai, 1998). Rozdělují se na proteinové a DNA markery. Z prvně jmenovaných jsou nejčastěji používány allozymy. Jedná se o enzymy, které jsou produkovány různými alelami jednoho lokusu. DNA markery rozlišujeme na jaderné a mitochondriální (podle místa jejich výskytu).

Mitochondriální DNA je zpravidla kruhovitá molekula o délce kolem 15 – 18 kbp (Wilson *et al.*, 1985) a sestává z 37 genů, z toho je 22 pro tRNA, 2 pro rRNA a 13 kóduje proteiny (ND1-6, ND4L, COI-III, ATP6, ATP8, Cytb) (Clary & Wolstenholme, 1985). Kromě těchto kódujících oblastí má jednu nekódující nazývanou „control region“. Oproti jaderné má mitochondriální DNA několik výhod. Mutuje přibližně 20krát rychleji, v buňce se nachází v mnoha kopiích, což usnadňuje amplifikaci, a lze ji snadněji získat i ze starších vzorků, protože je odolnější vůči degradacím (Loxdale & Lushai, 1998).

AT-rich

AT-rich oblast je jeden z názvů pro „control region“, který se používá v souvislosti se hmyzem (Clary & Wolstenholme, 1987). Předpokládá se, že tento úsek je zapojen do regulace transkripce a kontroly DNA replikace (Clayton, 1992). Jedná se o nekódující oblast mitochondriálního genomu bohatou na přítomnost nukleotidů adeninu a thyminu, kterých zpravidla obsahuje přes 85 % (Zhang & Hewitt, 1997), ale u druhu *Drosophila melanogaster* bylo pozorováno dokonce 96 % (Lewis *et al.*, 1994). U hmyzu je oblast sekvenčně i délkově variabilní a může obsahovat tandemové repetice (Zhang & Hewitt, 1997), což ho předurčuje pro populační a fylogenetické studie u blízce příbuzných taxonů (Taylor *et al.*, 1993).

COI

Cytochrom oxidáza – podjednotka I (COI) patří mezi velmi konzervované protein-kódující geny v živočišné mtDNA (Brown, 1985) a je tedy vhodná jako molekulární marker pro široký okruh systematických studií u různých živočišných skupin. Pro tyto účely byly také navrženy univerzální primery LCO1490 a HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994), které úspěšně naamplifikovaly úsek dlouhý 710 bp u více jak 80 druhů z 11 živočišných kmenů.

Vzhledem k univerzálnosti použití těchto primerů byl zmiňovaný úsek mtDNA vybrán pro projekt „DNA barcoding“ (Hebert *et al.*, 2003). Ten si dává za cíl rychlou a přesnou determinaci u známých i neznámých druhů na základě krátké sekvence tohoto genu (658 bp). Získaná data jsou shromažďována v databázi BOLD (Barcode of Life Data Systém, www.barcodinglife.org), kde lze nalézt nejenom samotné sekvence, ale i taxonomické údaje, zápisy o místu a čase sběru zkoumaných jedinců nebo jejich fotografie (Ratnasingham & Hebert, 2007). Tato metoda druhové determinace však není používána jen taxonomy, ale v poslední době se uvažuje i o aplikaci v ekologii (Valentini *et al.*, 2008). Zde by mohla pomoci například při identifikaci a analýze výskytu ohrožených druhů, u kterých by byly nalezeny pouze výkaly nebo chlupy.

ATP oblast

Jedná se o úsek mitochondriální DNA mezi cytochrom oxidázami – podjednotky II a III a nalézají se zde geny pro tRNA^{lys}, tRNA^{asp}, ATP8 a ATP6 (Simon *et al.*, 1994). Geny pro transferové RNA bývají krátké a velmi konzervované. U úseků genomu kódujících ATP8 i ATP6 byla při porovnání druhů *Drosophila melanogaster* a *Drosophila yakuba* zjištěna variabilita v zastoupení aminokyselin 4 %, což převyšovalo hodnotu získanou ze srovnání COI úseku těchto dvou druhů (ta byla pouze 1 %).

2. CÍLE

1. Amplifikovat a osekvenovat vybrané fragmenty mitochondriální a jaderné DNA u mšic korovnic se zaměřením na druhové komplexy rodů *Adelges* a *Sacchiphantes*.
2. Ověřit použitelnost sledovaných markerů k přesnější druhové identifikaci těchto dvou rodů čeledi *Adelgidae* pomocí statistických metod a shlukovacích analýz.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

Veškerý zkoumaný materiál (Příloha 1) determinoval a poskytl Ing. Jan Havelka, Ph.D. (ENTÚ, Biologické centrum AV ČR). Vzorky byly nasbírány v letní sezóně od června do srpna v letech 2006-2008 na území České Republiky.

3.2. Extrakce DNA

Vzorky byly uchovávány buď v 98% etanolu, nebo byly ihned po sběru a determinaci zamraženy a při - 80 °C uskladněny v mrazáku až do dalšího zpracování.

Pokud byla izolována DNA z lihových vzorků, byli jedinci před extrakcí ponecháni pár minut na kousku buničité vaty, aby došlo k odpaření přebytečného etanolu.

K izolaci byli použiti 1-3 klonální jedinci na jeden vzorek a extrakce proběhla pomocí jedné z následujících metod.

3.2.1. Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)

Postup dle návodu výrobce.

3.2.2. Izolace Squishing bufferem (SB) (Gloor *et al.*, 1993)

Pipetou bylo nabráno 50 µl SB (10 mM TRIS-Cl, pH 8,2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl a 200 µg/ml proteinázy K) a pomocí špičky s tímto roztokem byl vzorek v mikrozkuhavce (0,5 ml) homogenizován. Po dokončení byl zbylý SB ze špičky vytlačen ke vzorku.

Vzorek byl inkubován při 37 °C 20-30 min a poté byla proteináza K inaktivována při 95 °C 2 min. Výsledek extrakce mohl být ihned použit do PCR reakce nebo byl zamražen pro další použití.

Pokud byly použity lihové vzorky, byli jedinci ponecháni 15-20 min ve 20 µl elučního pufru (TE, firma GIAGEN), který byl před přidáním SB odpipetován. K jedincům uchovávaným v mrazáku byl SB přidán bez tohoto mezikroku.

3.2.3. Izolace pomocí Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitek)

Postup dle návodu výrobce.

3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

3.3.1. Použité primery

Pro úsek z mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu - podjednotka I (COI) byly použity standardní primery pro DNA barcoding (Folmer *et al.* 1994).

Úsek ATP byl amplifikován prostřednictvím kombinace 3 primerů. Primer AphidCO2f1 nasedá do genu pro cytochrom oxidázu II (COII) a spolu s reverzním primerem AphidCO3rev nebo C3-N-5460 umožňuje amplifikaci úseku mtDNA až do oblasti pro cytochrom oxidázu III (COIII). V této části se nachází tRNA pro kyselinu asparagovou a pro lysin a ATPasové podjednotky 8 a 6.

Primery pro AT-rich oblast AdelATfor1 a AdelATrev1 i pro ATP oblast AphidCO2f1 a AphidCO3rev byly navrženy podle sekvencí druhů *Schizaphis graminum* a *Daktulosphaira vitifoliae* zjištěných v databázi NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekvence jsou zde vedeny pod čísla NC 006158 pro *S. graminum* a DQ021446 pro *D. vitifoliae*.

Seznam a detailní popis použitých primerů je uveden v Tab. 1 a místa jejich nasednutí na DNA na Obr. 3.

Tab. 1 Přehled použitých primerů

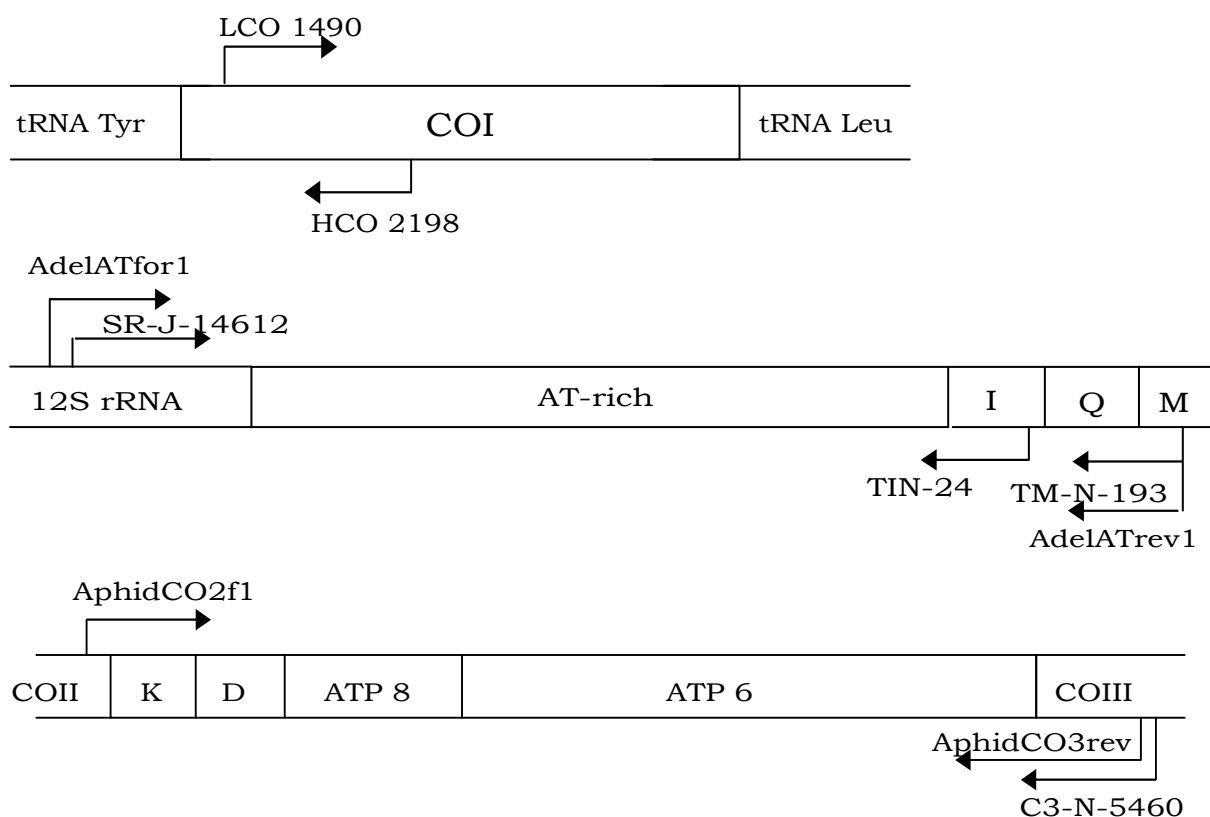
| Gen | Primer | Typ | Sekvence primeru 5' → 3' |
|-----|---------------------------|-----|-----------------------------------|
| COI | LCO1490 ¹⁾ | F | GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G |
| | HCO2198 ¹⁾ | R | TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT |
| ATP | AphidCO2f1 ²⁾ | F | CAA TGC TCA GAA ATT TGT GG |
| | AphidCO3rev ²⁾ | R | TTG GTG GTC AAT TTA ATC CTA |
| | C3-N-5460 ³⁾ | R | TCA ACA AAG TGT CAG TAT CA |

| | | | |
|---------|--------------------------|---|-----------------------------|
| AT-rich | SR-J-14612 ³⁾ | F | AGG GTA TCT AAT CCT AGT TT |
| | TIN-24 ³⁾ | R | ATT TAC CCT ATC AAG GTA A |
| | TM-N-193 ³⁾ | R | TGG GGT ATG AAC CCA GTA GC |
| | AdelATfor1 ²⁾ | F | CAA TTA TAG AAC AGA TTC CTC |
| | AdelATrev1 ²⁾ | R | TTG AAG TAT GAA TCC AAA AGC |

1) Folmer *et al.* 1994

2) Žurovcová

3) Simon *et al.* 1994



Obr. 3 Struktura testovaných genů a místa nasednutí jednotlivých markerů

3.3.2. Reakční směs

Množství některých složek pro přípravu směsi na PCR reakci se lišilo podle použité polymerázy (Tab. 2). Pro amplifikaci byly vyzkoušeny polymerázy Ex Taq (TAKARA), UNIS Taq (Top Bio) a LA polymerázový mix (Top Bio).

Tab. 2 Složení reakční směsi

| | | | |
|---------------------------|---------|-----------------------------|---------|
| ddH ₂ O | 7,75 µl | ddH ₂ O | 7,7 µl |
| 10 x ExTaq pufr | 1,25 µl | 10 x ExTaq pufr | 1,25 µl |
| dNTPs (2,5 mM) | 1 µl | dNTPs (2,5 mM) | 1 µl |
| Primer forward (5 µM) | 0,75 µl | Primer forward (5 µM) | 0,75 µl |
| Primer revers (5 µM) | 0,75 µl | Primer revers (5 µM) | 0,75 µl |
| Ex Taq polymeráza (5U/µl) | 0,05 µl | UNIS Taq polymeráza (5U/µl) | 0,1 µl |
| DNA | 1 µl | DNA | 1 µl |

Pokud se nepovedlo naamplifikovat DNA, bylo do reakční směsi pro jeden vzorek přidáno 0,5 µl BSA (Bovine Serum Albumin, Fermentas) naředěné 1 ku 3 dílům ddH₂O. Množství ddH₂O v reakční směsi bylo adekvátně sníženo na výsledný objem mixu 12,55 µl. BSA stabilizuje během reakce enzymy a zabraňuje jejich ulpívání na stěnách mikrozkušavky a může tak zvýšit účinnost reakce.

Polymeráza LA byla zkoušena po předchozích neuspokojujících výsledcích při amplifikaci AT-rich oblasti. Jde o směs UNIS polymerázy a další polymerázy s 3'→5' exonukleázovou aktivitu. Množství v reakční směsi byla stejná jako při použití samotné UNIS polymerázy.

3.3.3. PCR profil

PCR reakce probíhaly na termocyclerech Mastercycler ep gradientS (Eppendorf), TC-XP Cycler (Bioer) a GeneAmp PCR System 2400 Perkin-Elmer podle následujících programů (Tab. 3).

Tab. 3 PCR profily

| | COI | | ATPs | | AT oblast | |
|------------------|--------------|----------|--------------|----------|--------------|----------|
| | teplota (°C) | doba (s) | teplota (°C) | doba (s) | teplota (°C) | doba (s) |
| 1. predenaturace | 94 | 60 | 94 | 60 | 94 | 60 |
| 2. denaturace | 94 | 30 | 94 | 30 | 94 | 30 |
| 3. annealing | 47 | 45 | 49 | 40 | 51/53 | 30 |
| 4. elongace | 72 | 50 | 68 | 90 | 68/72 | 90 |
| 5. postelongace | 72 | 120 | 72 | 300 | 72 | 120 |
| 6. uchovávání | 4 | ∞ | 4 | ∞ | 4 | ∞ |

Kroky 2-4 byly opakovány 35krát. Profily platí pro primery LCO1490/HCO2198 u úseku COI a AphidCO2f1/AphidCO3rev u úseku ATP. Pokud byl u ATP použit reverzní primer C3-N-5460, byla teplota annealingu 47 °C. Při použití primerů SR-J-14612 nebo TIN-24 u AT-rich oblasti byla teplota annealingu 51 °C a při kombinace zbylých tří primerů (TM-N-193, AdelATfor1, AdelATrev1) byla zvýšena na 53 °C z důvodu vyššího zastoupení nukleotidů GC v sekvencích těchto primerů.

3.4. Gelová elektroforéza

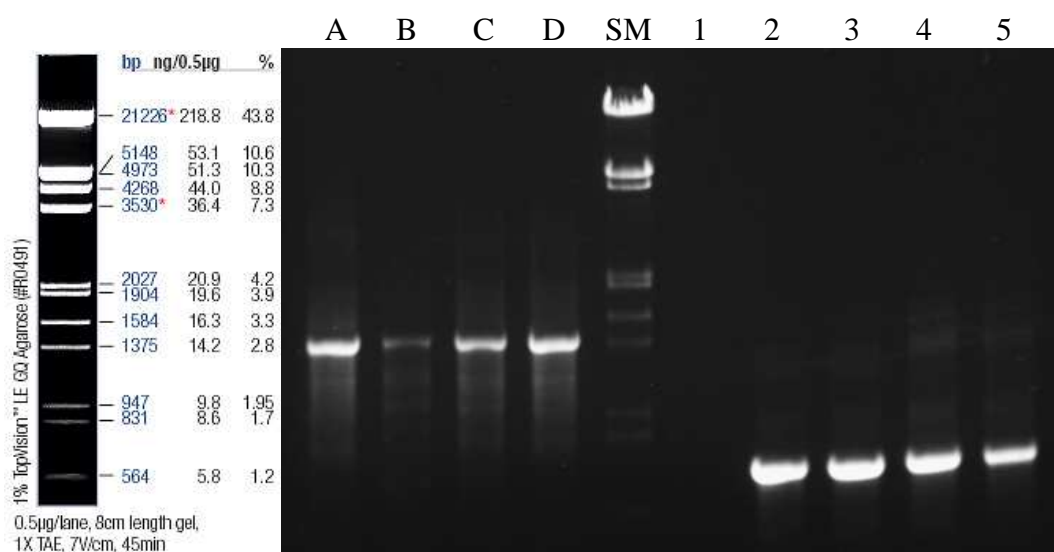
Elektroforéza byla použita k ověření úspěšnosti PCR reakce, ke kontrole velikosti fragmentu DNA a k určení jejího množství.

Byl použit 1,5% gel (1,5 g agarózy (SeaKem LE Agarose, Cambrex) bylo rozpuštěno v 98,5 ml 1x TAE pufru (50x TAE pufr: 242 g TRIS, 57,1 ml kys.octové, 100 ml 0,5 M EDTA, 1000 ml H₂O, pH = 8,0)). Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě, a poté ochlazena na cca 50-60 °C. Pak bylo přidáno 10 µl/100 ml ethidium bromidu (koncentrace 5 µg/ml), gel byl nalit do formy, byly do něj vloženy hřebínky pro utvoření jamek a tuhnul 30-40 min při pokojové teplotě. Hotový gel byl použit rovnou k elektroforéze nebo uchováván v 1x TAE pufru při 4 °C v chladničce.

Na gel byl nanesen 1 µl vzorku smíchaného se 3 µl Loading Dye (700 µl ddH₂O, 300 µl 100% glycerolu, 0,5 mg bromfenolové modři) a elektroforéza běžela při 120 V 40 min dle délky očekávaného fragmentu.

DNA byla zviditelněna na UV transiluminátoru (UVP Transilluminator) spojeném s digitální kamerou, kterou byly pořízeny fotografie výsledného gelu (Obr. 4).

K odhadu velikosti fragmentu naamplifikované DNA byl použit velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII (Fermentas) (Obr. 4).



Obr. 4 Výsledek elektroforézy po PCR amplifikaci

A-D...fragment ATP (AphidCO2f1/AphidCO3rev)

SM... Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker

2-5....fragment COI (LCO1490/HCO2198)

1.....negativní kontrola

3.5. Purifikace PCR

Pro vyčištění vzorků po amplifikaci byly použity dvě metody.

3.5.1. DNA Clean & Concentrator^{TM-5} (ZYMO RESEARCH)

Postup dle návodu výrobce. Pouze doba centrifugace byla u všech kroků prodloužena z 5-10 s na 30 s.

3.5.2. Čištění pomocí směsi ExoSAP

Při čištění pomocí směsi ExoSAP-IT[®] (USB) byl použit protokol od výrobce, avšak množství Exosapu bylo sníženo a doba inkubace prodloužena. K PCR produktu (10-11 µl) byl na ledu přidán 1 µl Exosapu, výsledná směs byla zvortexována a následně inkubována v cycleru při 37 °C 30 min a při 80 °C 15 min. Ve druhém kroku došlo k inaktivaci Exosapu. Produkt byl poté ihned použit do sekvenační reakce nebo byl zamražen pro další použití.

3.6. Sekvenování

3.6.1. Sekvenační směs

Do sekvenační směsi byl použit kit BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Složení reakční směsi pro jeden vzorek (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 a vše bylo doplněno ddH₂O do 20 μ l anebo byla reakční směs míchána pro výsledné množství 10 μ l při zachování přidávaného množství PCR produktu.

3.6.2. Program pro sekvenační reakci

Sekvenační reakce probíhala v termocycleru v 25 cyklech při programu: 96 °C 15 s, 50 °C 20 s, 60 °C 4 min a s úvodní denaturací 96 °C 2 min dle doporučení výrobce.

3.6.3. Čištění sekvenační reakce pomocí Sephadexu

SephadexTM G-50 (GE Healthcare) byl hydratován v poměru 0,05 g Sephadexu ku 800 ml ddH₂O na jeden sloupeček a ponechán bobtnat nejméně 45 min při 4 °C v chladničce.

Sloupeček byl vytvořen z aerosolové špičky (1 ml) seříznuté asi 5 mm pod filtrem a umístěné do 1,5 ml mikrokumavky.

Nabobtnalý Sephadex byl zvortexován a na sloupeček bylo nanášeno 400 ml této suspenze. Přebytečná voda byla protlačena pomocí pipetovacího dudlíku. Po nanášení dalších 400 ml byl sloupeček centrifugován 2 min při 1000 g a přendán do nové mikrokumavky.

Na takto připravenou vrstvu Sephadexu byl nanášen produkt sekvenační reakce a centrifugován 2 min při 1000 g. Špička byla vyhozena a přečištěná reakce v mikrokumavce byla vysušena ve vakuové sušičce Speed-Vac při pokojové teplotě (cca 30 až 40 min).

Později bylo čištění prováděno s polovičním množstvím Sephadexu: na jeden vzorek bylo hydratováno 0,025 g Sephadexu ku 400 ml ddH₂O a suspenze byla nanášena na menší sloupečky připravené ze 100 µl špiček a 0,5 ml mikrozkumavek.

3.7. Analýza sekvencí

Sekvenace proběhla na sekvenátoru ABI PRISM 3130xl od firmy Applied Biosystems v Laboratoři genomiky na ÚMBR (Biologické centrum AV ČR).

Kontrolní identifikace sekvencí byla provedena v databázi NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pro další analýzu byl použit program SeqManII z balíku programů DNASTAR ver. 4 (DNASTAR, INC.), ve kterém byly komplementární sekvence spojeny do tzv. contig (z anglického „contiguous sequence“). V programu MEGA verze 4 (Tamura *et al.*, 2007) byly tyto contigy dle potřeby opraveny podle původní sekvence a byla z nich vytvořena sekvence konsensuální. Poté byly pomocí metody ClustalW v témže programu vytvořeny alignmenty.

V programu MEGA verze 4 byly taktéž vypočteny základní charakteristiky sekvencí (průměrná délka, variabilní místa, nukleotidové složení), genetické vzdálenosti (model Kimura 2-Parameter) a byla provedena shlukovací (klastrovací) analýza metodou Neighbour-Joining (NJ). Dendrogramy byly vytvořeny pomocí modelu Kimura 2-Parameter, přičemž mezery (gaps) byly u genů z ATP oblasti zohledňovány a započítávány jako další znak (použita volba „Pairwise deletion“). Statistická podpora stromu byla testována pomocí metody bootstrap (2000 opakování). Metoda NJ a model K2P byly vybrány, protože jsou standardně používány pro „DNA barcoding“. S ohledem na možnost srovnání testovaných markerů byla tato metoda použita při vyhodnocení i zbylých zkoumaných genů.

Pro tvorbu histogramů byla použita data z programu TaxonDNA (Meier *et al.*, 2006) (metoda „pairwise summary“), která byla zpracována v Microsoft Excelu.

Analýza haplotypů a jejich frekvencí byla provedena pomocí programu DnaSP ver. 4 (Rozas *et al.*, 2003).

4. VÝSLEDKY

4.1. Testované markery

Ze tří testovaných markerů u 50ti vzorků se podařilo naamplifikovat a osekvenovat dvě mitochondriální oblasti, a to cytochrom oxidázu I u 47 vzorků a pak oblast mezi cytochrom oxidázou II a III. U tohoto úseku mtDNA se povedlo získat 45 sekvencí. AT-rich oblast se sice několikrát povedlo naamplifikovat, ale sekvence se získat nepodařilo.

4.1.1. Gen COI

Oblast genu COI se podařilo osekvenovat u 47 jedinců a získané sekvence byly upraveny na jednotnou délku 687 bp. Počet variabilních míst je 63 (tj. 9,2 % délky sekvence) a počet parsimoniálně informativních míst je 60 (8,7 %). (Jako parsimoniálně informativní jsou označována místa v sekvenci, která obsahují alespoň dva různé nukleotidy a nejméně dva z nich se vyskytují minimálně dvakrát.) Frekvence nukleotidů u jednotlivých druhů, průměrné frekvence a poměry nukleotidů AT ku GC jsou uvedeny v Tab. 4. Z té je také patrné, že poměr těchto nukleotidů u všech čtyř druhů je velmi vyrovnaný. Celková průměrná variabilita je 3,9 % se směrodatnou odchylkou 0,5 %. Dále byly spočítány genetické vzdálenosti uvnitř druhů (Tab. 5a) i mezidruhové (Tab. 5b).

Tab. 4 Frekvence nukleotidů u COI

| Druhy | Frekvence nukleotidů (%) | | | | Poměry nukleotidů AT/GC |
|-------------------|--------------------------|------|------|------|----------------------------|
| | T | C | A | G | |
| <i>A. laricis</i> | 37,7 | 15,1 | 37,2 | 10,0 | 74,9/25,1 |
| <i>A. tardus</i> | 37,7 | 15,3 | 37,1 | 10,0 | 74,8/25,3 |
| <i>S. abietis</i> | 39,4 | 15,0 | 35,3 | 10,4 | 74,7/25,4 |
| <i>S. viridis</i> | 39,3 | 14,9 | 35,3 | 10,4 | 74,6/25,3 |
| průměr | 38,8 | 15,0 | 35,9 | 10,3 | 74,7/25,3 |

Tab. 5 Průměrné genetické vzdálenosti u COI (modře znázorněny směrodatné odchylky)

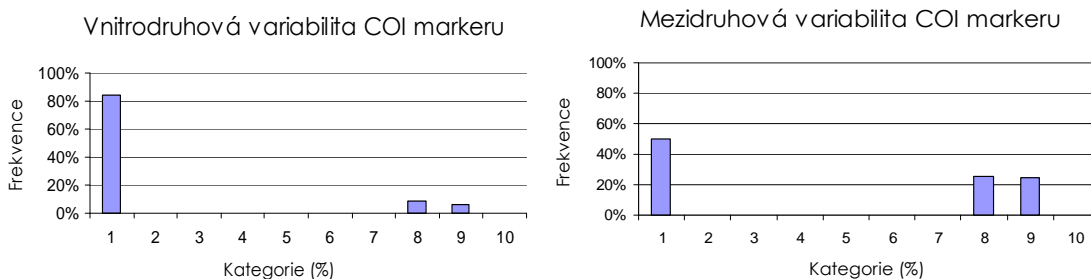
a) vnitrodruhová

| Druhy | Prům. vzdálenost |
|-------------------|------------------|
| <i>A. laricis</i> | 0,003 (0,001) |
| <i>A. tardus</i> | 0,004 (0,002) |
| <i>S. abietis</i> | 0,015 (0,002) |
| <i>S. viridis</i> | 0,019 (0,002) |

b) mezidruhová

| Druhy | | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------|---|-------|-------|-------|-------|
| <i>A. laricis</i> | 1 | | 0,001 | 0,009 | 0,008 |
| <i>A. tardus</i> | 2 | 0,003 | | 0,009 | 0,008 |
| <i>S. abietis</i> | 3 | 0,070 | 0,070 | | 0,002 |
| <i>S. viridis</i> | 4 | 0,068 | 0,067 | 0,016 | |

Průměrná vnitrodruhová variabilita je 1 % a mezidruhová 4,9 %. Celkové rozložení je patrné z histogramů (Obr. 5). Variabilita uvnitř druhů byla nejvyšší v rozmezí od 0 do 1 % a mezi druhy se rozdělila do kategorií do 1 % a od 7 do 9 %.



Obr. 5 Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita COI markeru

Analýzou haplotypů (Tab. 6) bylo zjištěno 10 typů, z toho u většiny byl jeden haplotyp sdílen jedním rodem.

Tab. 6 Rozložení haplotypů u COI

| Haplotyp | Četnost | Druhy | Čísla vzorků |
|----------|---------|-------------------|--------------------------------------|
| 1 | 10 | <i>A. laricis</i> | 994, 995, 11339 |
| | | <i>A. tardus</i> | 1283, 11196, 11340, 11458 |
| | | <i>S. abietis</i> | 11660 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2947, 10311 |
| 2 | 8 | <i>A. laricis</i> | 2379, 10688, 10555, 10960, 11031 |
| | | <i>A. tardus</i> | 1286, 2553, 10286 |
| 3 | 1 | <i>A. laricis</i> | 11500 |
| 4 | 1 | <i>A. tardus</i> | 1287 |
| 5 | 11 | <i>S. abietis</i> | 2893, 3436, 3448, 11624, 11697 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2849, 2972, 3007, 3423, 10493, 11573 |

| | | | |
|----|----|-------------------|---------------------------------------|
| 6 | 1 | <i>S. abietis</i> | 1044 |
| 7 | 11 | <i>S. abietis</i> | 3026, 10141, 10142, 11350, 11696 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2957, 3009, 3020, 10521, 11380, 11549 |
| 8 | 2 | <i>S. viridis</i> | 11619, 10461 |
| 9 | 1 | <i>S. viridis</i> | 846 |
| 10 | 1 | <i>S. viridis</i> | 11362 |

Na základě sekvencí COI markeru byl vytvořen dendrogram (Příloha 2). Jak je patrné už z rozložení haplotypů (Tab. 6) i zde se 3 vzorky rodu *Sacchiphantes* přiřadily k rodu *Adelges*.

4.1.2. Oblast ATP

Oblast ATP se podařilo osekvenovat u 45 vzorků. Ze získaných sekvencí byl vytvořen alignment, který byl upraven na jednotnou délku 1337 bp. Poté byly sekvence rozděleny na jednotlivé geny (tRNA_{lys}, tRNA_{asp}, ATP 8, ATP 6, COIII) podle sekvence druhu *Daktulosphaira vitifolia* získané v databázi GenBank pod číslem DQ021446 a výsledky byly zpracovány pro každý gen zvlášť.

tRNA_{lys}

Analýza genu tRNA_{lys} byla provedena pro 43 vzorků. Se dvěma vzorky nebylo počítáno, protože oblast pro zmíněný gen u nich nebyla osekvenována (celkový fragment ATP u vzorků č. 1286 a 2893 byl kratší než u zbývajících).

Délka sekvence genu pro tRNA_{lys} je 73 bp, počet variabilních míst je 3 (4,1 %) a parsimoniálně informativní místa jsou pouze 2 (2,7 %). Frekvence nukleotidů u jednotlivých druhů, průměrné frekvence a poměry nukleotidů AT ku GC jsou uvedeny v Tab. 7. Zjištěné poměry nukleotidových dvojic jsou vyrovnané u stejných rodů, ale mezi rody se nepatrně liší. Celková průměrná variabilita je 1,0 % se směrodatnou odchylkou 0,8 %. Dále byly spočítány genetické vzdálenosti vnitrodruhové (Tab. 8) i mezidruhové (Tab. 9).

Tab. 7 Frekvence nukleotidů u genů oblasti ATP

| Druhy | Frekvence nukleotidů (%) | | | | Poměr nukleotidů AT/GC |
|-------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|---------------------------|
| | T | C | A | G | |
| tRNA lys | | | | | |
| <i>A. laricis</i> | 30,6 | 12,5 | 45,1 | 11,8 | 75,1/24,3 |
| <i>A. tardus</i> | 30,1 | 12,3 | 45,2 | 12,3 | 75,3/24,6 |
| <i>S. abietis</i> | 29,3 | 14,0 | 43,8 | 13,0 | 73,1/27,0 |
| <i>S. viridis</i> | 29,4 | 13,7 | 44,1 | 12,8 | 73,5/26,5 |
| průměr | 29,7 | 13,3 | 44,4 | 12,6 | 74,1/25,9 |
| tRNA asp | | | | | |
| <i>A. laricis</i> | 36,7 | 6,2 | 52,4 | 4,6 | 89,1/10,8 |
| <i>A. tardus</i> | 36,9 | 6,2 | 52,3 | 4,6 | 89,2/10,8 |
| <i>S. abietis</i> | 41,3 | 4,4 | 50,2 | 4,0 | 91,5/8,4 |
| <i>S. viridis</i> | 40,1 | 4,7 | 50,7 | 4,5 | 90,8/9,2 |
| průměr | 39,2 | 5,1 | 51,2 | 4,5 | 90,4/9,6 |
| ATP 8 | | | | | |
| <i>A. laricis</i> | 42,2 | 9,2 | 46,7 | 1,8 | 88,9/11,0 |
| <i>A. tardus</i> | 42,2 | 9,2 | 46,8 | 1,7 | 89,0/10,9 |
| <i>S. abietis</i> | 44,4 | 9,6 | 44,7 | 1,3 | 89,1/10,9 |
| <i>S. viridis</i> | 44,5 | 9,7 | 44,7 | 1,3 | 89,2/11,0 |
| průměr | 43,7 | 9,5 | 45,4 | 1,4 | 89,1/10,9 |
| ATP 6 | | | | | |
| <i>A. laricis</i> | 42,1 | 13,1 | 40,2 | 4,7 | 82,3/17,8 |
| <i>A. tardus</i> | 42,1 | 13,1 | 40,2 | 4,7 | 82,3/17,8 |
| <i>S. abietis</i> | 43,7 | 11,7 | 40,1 | 4,5 | 83,8/16,2 |
| <i>S. viridis</i> | 43,7 | 11,7 | 40,1 | 4,5 | 83,8/16,2 |
| průměr | 43,1 | 12,2 | 40,1 | 4,5 | 83,2/16,7 |
| COIII | | | | | |
| <i>A. laricis</i> | 40,2 | 10,8 | 43,4 | 5,7 | 83,6/16,5 |
| <i>A. tardus</i> | 40,0 | 10,8 | 43,6 | 5,7 | 83,6/16,5 |
| <i>S. abietis</i> | 43,8 | 8,4 | 42,1 | 5,8 | 85,9/14,2 |
| <i>S. viridis</i> | 43,7 | 8,4 | 42,1 | 5,8 | 85,8/14,2 |
| průměr | 42,5 | 9,2 | 42,5 | 5,8 | 85,0/15,0 |

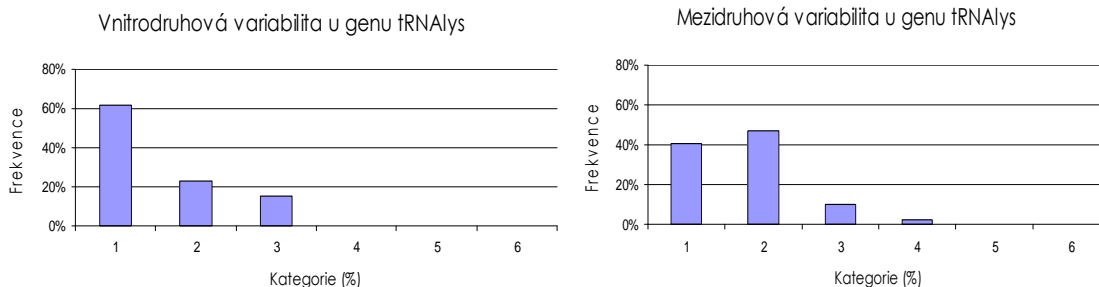
Tab. 8 Průměrné vnitrodruhové gen. vzdálenosti u genů ATP oblasti (modře směr. odchylky)

| | <i>A. laricis</i> | <i>A. tardus</i> | <i>S. abietis</i> | <i>S. viridis</i> |
|---------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| tRNAlys | 0.0000 (0.0000) | 0.0000 (0.0000) | 0.0067 (0.0049) | 0.0071 (0.0043) |
| tRNAasp | 0.0000 (0.0000) | 0.0000 (0.0000) | 0.0028 (0.0029) | 0.0032 (0.0033) |
| ATP8 | 0.0013 (0.0012) | 0.0000 (0.0000) | 0.0253 (0.0049) | 0.0297 (0.0057) |
| ATP6 | 0.0016 (0.0008) | 0.0013 (0.0009) | 0.0173 (0.0021) | 0.0183 (0.0023) |
| COIII | 0.0035 (0.0020) | 0.0019 (0.0013) | 0.0236 (0.0038) | 0.0268 (0.0041) |

Tab. 9 Průměrné mezidruhové gen.vzdálenosti u genů ATP oblasti (modře směr. odchylky)

| tRNAlys | | | | | |
|-------------------|---|--------|--------|--------|--------|
| Druhy | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>A. laricis</i> | 1 | | 0.0000 | 0.0139 | 0.0134 |
| <i>A. tardus</i> | 2 | 0.0000 | | 0.0131 | 0.0126 |
| <i>S. abietis</i> | 3 | 0.0162 | 0.0156 | | 0.0043 |
| <i>S. viridis</i> | 4 | 0.0154 | 0.0148 | 0.0067 | |
| tRNAasp | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>A. laricis</i> | 1 | | 0.0000 | 0.0136 | 0.0132 |
| <i>A. tardus</i> | 2 | 0.0000 | | 0.0135 | 0.0131 |
| <i>S. abietis</i> | 3 | 0.0142 | 0.0141 | | 0,0027 |
| <i>S. viridis</i> | 4 | 0.0138 | 0.0137 | 0.0028 | |
| ATP8 | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>A. laricis</i> | 1 | | 0.0006 | 0.0221 | 0.0216 |
| <i>A. tardus</i> | 2 | 0.0006 | | 0.0221 | 0.0217 |
| <i>S. abietis</i> | 3 | 0.1155 | 0.1149 | | 0.0049 |
| <i>S. viridis</i> | 4 | 0.1131 | 0.1125 | 0.0256 | |
| ATP6 | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>A. laricis</i> | 1 | | 0.0008 | 0.0093 | 0.0091 |
| <i>A. tardus</i> | 2 | 0.0014 | | 0.0093 | 0.0091 |
| <i>S. abietis</i> | 3 | 0.0745 | 0.0745 | | 0.0021 |
| <i>S. viridis</i> | 4 | 0.0721 | 0.0721 | 0.0166 | |
| COIII | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| <i>A. laricis</i> | 1 | | 0.0015 | 0.0167 | 0.0164 |
| <i>A. tardus</i> | 2 | 0.0026 | | 0.0166 | 0.0163 |
| <i>S. abietis</i> | 3 | 0.1072 | 0.1054 | | 0.0035 |
| <i>S. viridis</i> | 4 | 0.1056 | 0.1038 | 0.0235 | |

Průměrná variabilita uvnitř druhů je 0,35 % a mezi druhy 1,15 %. Rozložení je znázorněno na histogramu (Obr. 6).



Obr. 6 Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita u tRNAlys

Analýza haplotypů je znázorněna v Tab. 10.

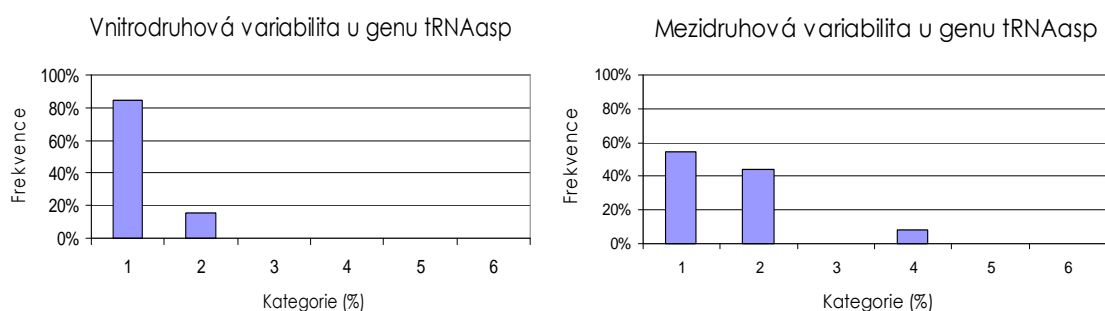
Tab. 10 Rozložení haplotypů u tRNAlys

| Haplotyp | Četnost | Druhy | Čísla vzorků |
|----------|---------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | 18 | <i>A. laricis</i> | 994, 995, 2379, 10555, 10688, 10960, 11031, 11339, 11500 |
| | | <i>A. tardus</i> | 1283, 1287, 0282, 11196, 11340, 11458 |
| | | <i>S. abietis</i> | 11660 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2947, 10311 |
| 2 | 25 | <i>S. abietis</i> | 3026, 3436, 3448, 10141, 10142, 11350, 11624, 11696, 11697 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2849, 2957, 2972, 3007, 3009, 3020, 3423, 10461, 10493, 10521, 11362, 11380, 11549, 11550, 11573, 11619 |

tRNAasp

Sekvence genu tRNAasp dlouhé 67 pb byly analyzovány u 43 vzorků. Variabilita se projevila pouze u jedné báze, což představuje 1,5 % sekvence. Četnost nukleotidů u jednotlivých druhů, průměrné četnosti a poměry nukleotidů AT ku GC jsou uvedeny v Tab. 7. Celková průměrná variabilita je 0,74 % se směrodatnou odchylkou 0,75 %. Dále byly spočítány genetické vzdálenosti vnitrodruhové (Tab. 8) i mezidruhové (Tab. 9).

Průměrná vnitrodruhová variabilita je 0,15 % a mezidruhová 0,98 %. Rozložení je lépe vidět na histogramech (Obr. 7).



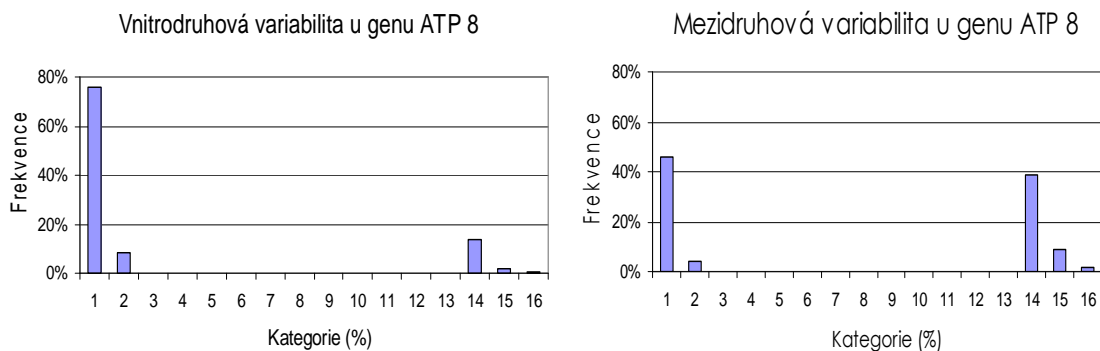
Obr. 7 Histogram vnitrodruhové a mezidruhové variability u tRNAasp

Analýza haplotypů sjednotila všechny vzorky do jediného.

ATP 8

Statistické vyhodnocení genu ATP8 bylo provedeno u 45 vzorků. V sekvencích o délce 173 pb se nachází 26 variabilních (15 %) a 22 parsimoniálně informativních (12,7 %) míst. Frekvence nukleotidů u jednotlivých druhů, průměrné frekvence a poměry nukleotidů AT ku GC jsou uvedeny v Tab. 7. Z té je patrné, že poměr AT/GC je u všech druhů velmi vyrovnaný. Byla také vypočtena celková průměrná variabilita, která činí 6,5 % a její směrodatná odchylka je 1,2 %. Dále byly spočítány genetické vzdálenosti vnitrodruhové (Tab. 8) i mezidruhové (Tab. 9).

Průměrná variabilita v rámci druhu je 1,38 % a mezi druhy 8 %. Z grafů vyplývá, že vnitrodruhová variabilita se nejvíce soustředí v kategorii do 1 % a mezidruhová je rozdělena především do oblastí do 1 % a mezi 13 a 15 % (Obr. 8).



Obr. 8 Histogram vnitrodruhové a mezidruhové variability u ATP8

Při analýze se vzorky oddělily do 4 haplotypů, ve kterých rozdělení dle rodů zase narušují vzorky s čísly 2947, 10311 a 11660 (Tab. 11). To samé potvrdil i dendrogram (Příloha 5).

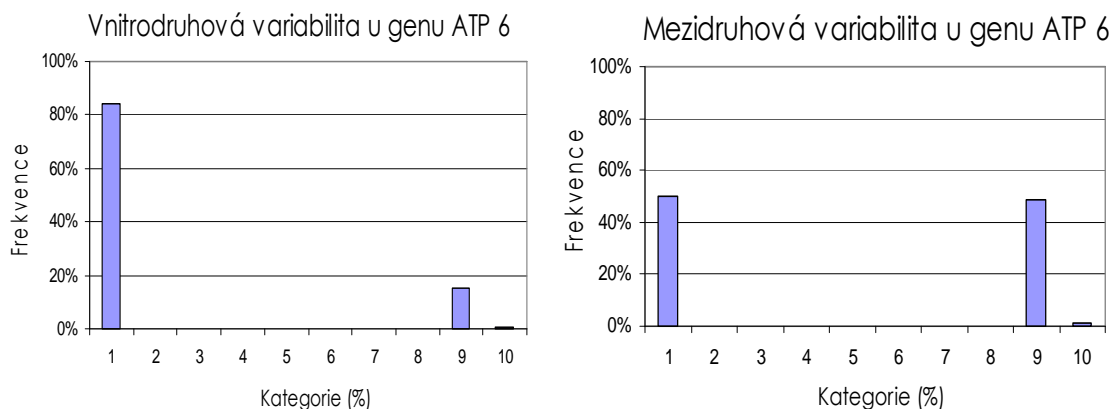
Tab. 11 Rozložení haplotypů u ATP8

| Haplotyp | Četnost | Druhy | Číslo vzorků |
|----------|---------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | 18 | <i>A. laricis</i> | 994, 995, 2379, 10555, 10960, 11031, 11339, 11500 |
| | | <i>A. tardus</i> | 1283, 1286, 1287, 10282, 11196, 11340, 11458 |
| | | <i>S. abietis</i> | 11660 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2947, 10311 |
| 2 | 1 | <i>A. laricis</i> | 10688 |
| 3 | 25 | <i>S. abietis</i> | 2893, 3026, 3436, 3448, 10141, 10142, 11350, 11624, 11696, 11697 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2849, 2957, 2972, 3007, 3009, 3020, 3423, 10493, 10521, 11362, 11380, 11549, 11500, 11573, 11619 |
| 4 | 1 | <i>S. viridis</i> | 10461 |

ATP 6

Gen ATP6 se podařilo osekvenovat u 45 vzorků. Délka zkoumaného úseku je 651 pb a z toho je 60 míst variabilních (9,2 %) a 56 parsimoniálně informativních (8,6 %). Druhové četnosti nukleotidů, průměrné četnosti a poměry nukleotidů AT ku GC jsou uvedeny v Tab. 7. Celková průměrná variabilita je 4,2 % se směrodatnou odchylkou 0,5 %. Dále byly spočítány genetické vzdálenosti vnitrodruhové (Tab. 8) i mezidruhové (Tab. 9).

Průměrná vnitrodruhová variabilita je 1 % a mezidruhová 5,2 % a jejich rozptýlení je znázorněno v grafech (Obr. 9). Z těch je patrné, že obě variability se pohybují v kategoriích do 1 % a od 8 do 9 %.



Obr. 9 Histogram vnitrodruhové a mezidruhové variability u ATP6

Tab. 12 Rozložení haplotypů u ATP 6

| Haplotyp | Četnost | Druhy | Čísla vzorků |
|----------|---------|-------------------|------------------------------------------------------------------|
| 1 | 6 | <i>A. laricis</i> | 994, 995 |
| | | <i>A. tardus</i> | 1283, 11196, 11458 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2947 |
| 2 | 1 | <i>A. laricis</i> | 2379 |
| 3 | 10 | <i>A. laricis</i> | 10555, 10688, 10960, 11031, 11500 |
| | | <i>A. tardus</i> | 1286, 1287, 10282 |
| | | <i>S. abietis</i> | 11660 |
| | | <i>S. viridis</i> | 10311 |
| 4 | 2 | <i>A. laricis</i> | 11339 |
| | | <i>A. tardus</i> | 11340 |
| 5 | 1 | <i>S. abietis</i> | 2893 |
| 6 | 15 | <i>S. abietis</i> | 3026, 3448, 11624, 11696, 11697 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2849, 2972, 3007, 3020, 10493, 10521, 11549, 11550, 11573, 11619 |
| 7 | 1 | <i>S. abietis</i> | 3436 |

| | | | |
|----|---|-------------------|---------------------------------|
| 8 | 1 | <i>S. abietis</i> | 10141 |
| 9 | 6 | <i>S. abietis</i> | 10142 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2957, 3009, 10461, 11362, 11380 |
| 10 | 1 | <i>S. abietis</i> | 11350 |
| 11 | 1 | <i>S. viridis</i> | 3423 |

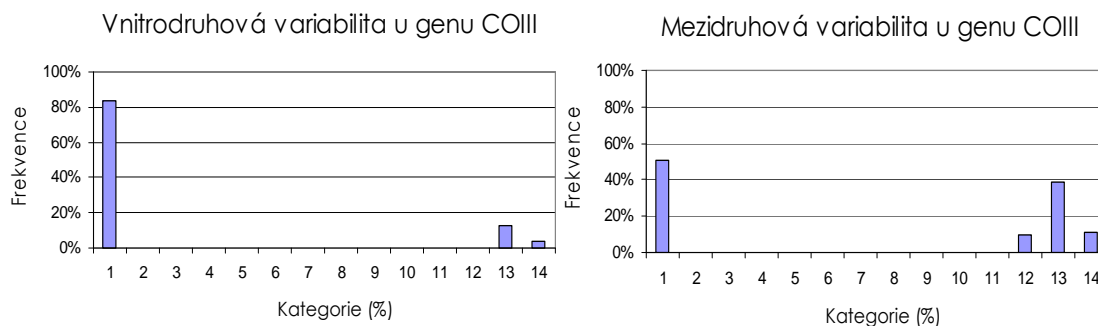
Analýza haplotypů (Tab. 12) rozlišila 11 typů, které jsou opět většinou sdíleny pouze jedním rodem, avšak vzorky č. 2947, 10311 a 11660 rodu *Sacchiphantes* se zařadily k rodu *Adelges*, což je vidět i na dendrogramu (Příloha 6).

COIII

Oblast genu COIII se povedlo osekvenovat u 44 vzorků. Celková sekvence u jednoho vzorku (č. 2379) byla opět kratší a nezasahovala až do COIII genu, a tak tento vzorek nemohl být zahrnut do analýzy.

Délka osekvenovaného fragmentu byla u alignmentu upravena na jednotných 297 pb. Z tohoto úseku bylo 40 míst variabilních (13,5 %) a 38 parsimoniálně informativních (12,8 %). Byly vypočteny frekvence nukleotidů, průměrné četnosti a poměry nukleotidů AT ku GC (Tab. 7). Tyto poměry se liší mezi rody, ale v rámci rodu jsou vyrovnané. Celková průměrná variabilita je 5,9 % se směrodatnou odchylkou 0,9 %. Dále byly spočítány genetické vzdálenosti vnitrodruhové (Tab. 8) i mezidruhové (Tab. 9).

Průměrná vnitrodruhová variabilita činí 1,4 %, mezi druhy 7,5 % a jejich rozdělení je opět lépe čitelné z histogramů (Obr. 10). V obou případech je největší zastoupení variability do 1 % a mezi druhy se polovina vzorků pohybuje v rozmezí od 11 do 15 %.



Obr. 10 Histogram vnitrodruhové a mezidruhové variability u COIII

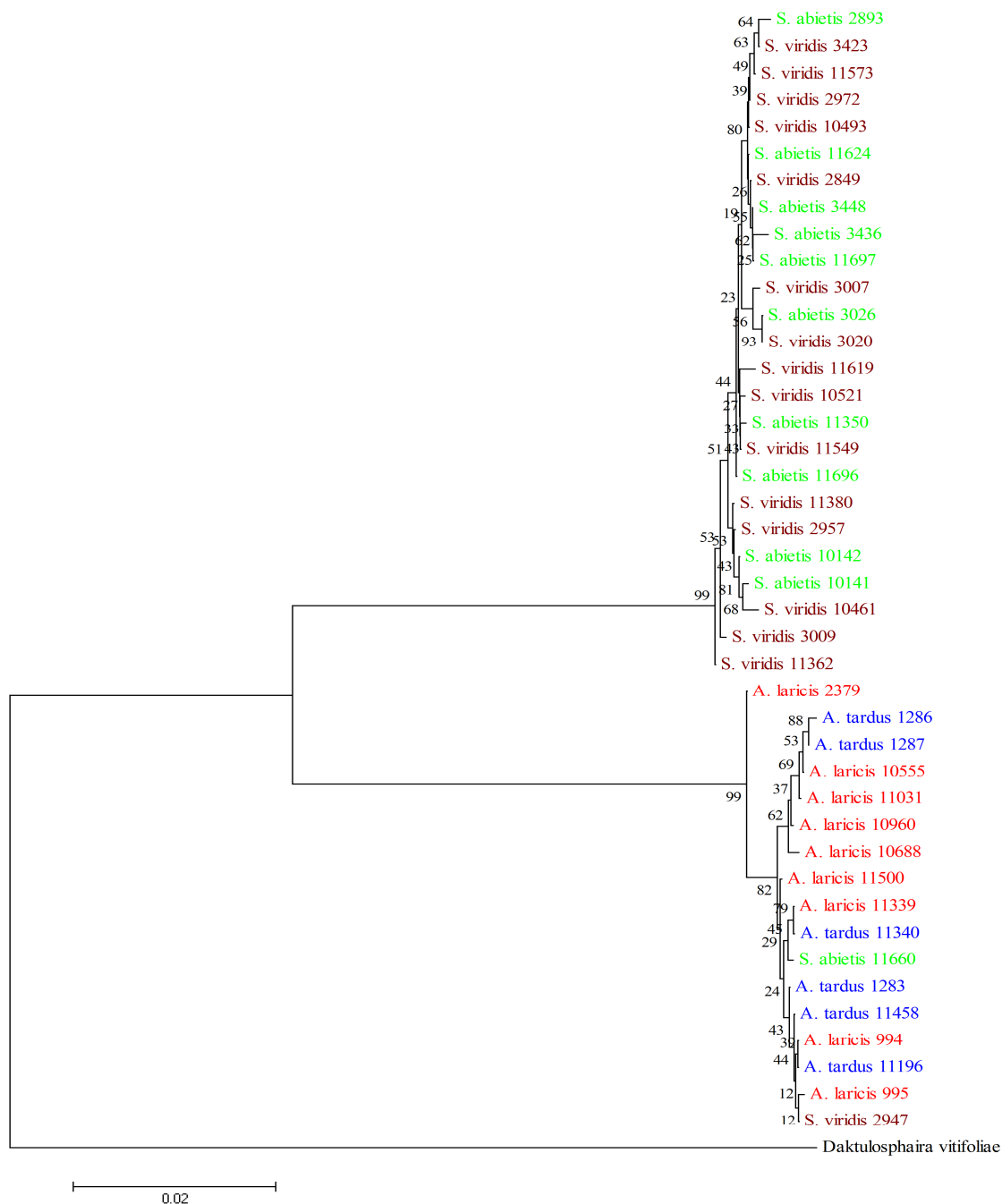
Sekvence genu COIII byly podrobeny analýze, která zjistila 7 haplotypů (Tab. 13).

Tab. 13 Rozložení haplotypů u COIII

| Haplotyp | Četnost | Druhy | Čísla vzorků |
|----------|---------|-------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 1 | 4 | <i>A. laricis</i> | 994, 10960, 11031 |
| | | <i>A. tardus</i> | 11196 |
| 2 | 10 | <i>A. laricis</i> | 995, 10555, 10688, 11500 |
| | | <i>A. tardus</i> | 1283, 1286, 1287, 102821 11458 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2947 |
| 3 | 4 | <i>A. laricis</i> | 11339 |
| | | <i>A. tardus</i> | 11340 |
| | | <i>S. abietis</i> | 11660 |
| | | <i>S. viridis</i> | 10311 |
| 4 | 19 | <i>S. abietis</i> | 2893, 3026, 3448, 11350, 11624, 11696, 11697 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2849, 3007, 3009, 3020, 3423, 10493, 10521, 11362, 11549, 11550, 11573 |
| 5 | 1 | <i>S. abietis</i> | 3436 |
| 6 | 5 | <i>S. abietis</i> | 10141, 10142 |
| | | <i>S. viridis</i> | 2957, 10461, 11380 |
| 7 | 1 | <i>S. viridis</i> | 11619 |

V dendogramu (Příloha 7) vytvořeném na základě COIII genu se opět vzorky rodu *Sacchiphantes* s čísly 2947, 10311 a 11660 přiřadily k rodu *Adelges*.

Jako srovnání k fylogenetickým stromům jednotlivých genů byl sestaven dendrogram (Obr. 11) ze sekvencí jak pro gen COI, tak pro celou oblast ATP. Do analýzy byly použity pouze vzorky, u kterých byly k dispozici sekvence obou fragmentů.



Obr. 11 Dendrogram vytvořený na základě obou markerů COI+ATPs (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Jako outgroup byla použita *Daktulosphaira vitifoliae*.

5. DISKUZE

5.1. Extrakce DNA

Ze tří zkoušených metod byly izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit i Invisorb Spin Tissue Mini Kit stoprocentně úspěšné a extrakce pomocí Squishing bufferu se také podařila u většiny vzorků. S ohledem na menší finanční náročnost kitu Invisorb Spin Tissue Mini Kit oproti DNeasy Blood & Tissue Kit se tento zdá jako nejvýhodnější.

5.2. Purifikace produktů sekvenační reakce

Byly používány dva různé postupy pro přečištění PCR produktu po sekvenační reakci a oba se ukázaly vhodné jak z hlediska kvality, tak kvantity získaného produktu. Při purifikace více vzorků najednou však bylo rychlejší a jednodušší použití Exosapu.

5.3. Testované markery

Oblast AT-rich se podařilo naamplifikovat pouze u několika málo vzorků pomocí primerů AdelATfor a TIN-24. Po neuspokojivých výsledcích s UNIS Taq polymerázou byl vyzkoušen LA polymerázový mix, ale ani ten nebyl úspěšnější. V obou případech se povedla amplifikace pouze jednou, a to u 4 (LA pol.) a u 2 (UNIS pol.) vzorků. U některých se po rozdělení gelovou elektroforézou objevilo několik nespecifických produktů, a to i přesto, že jeden z primerů byl specifický. Příčinou mohla být kontaminace při přípravě PCR reakce, přestože byly při práci vždy používány aerosolové špičky, které by jí měly zabránit. Vzorky bez těchto nespecifických produktů byly sekvenovány, ale sekvence se bohužel získat nepodařilo. Při práci s úseky bohatými na adenin a thymin dochází často k problémům s polymerázou, která není schopna tyto dlouhé jednotvárné fragmenty naamplifikovat a reakce je ukončena předčasně.

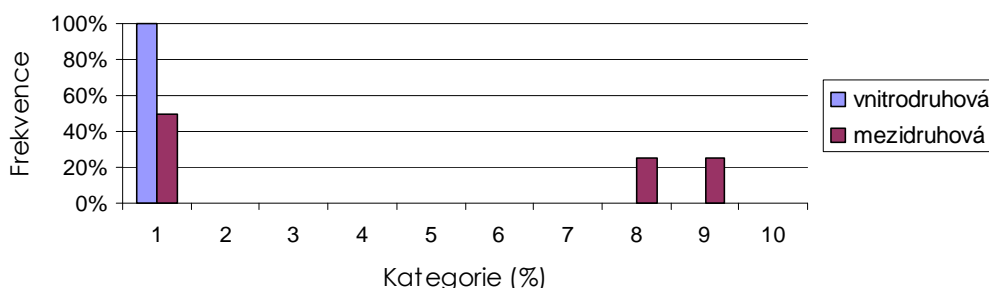
Další dva markery byly úspěšně naamplifikovány i osekvenovány. U obou byla testována jejich vhodnost pro rozlišení druhových komplexů *Adelges* a

Sacchiphantes, které se liší pouze svým způsobem života a morfologicky jsou téměř nerozeznatelné (viz Úvod).

U jednoho vzorku nebyla získána sekvence ani genu COI ani ATP oblasti (přes opakovanou amplifikaci), přestože velikost fragmentů při kontrole gelovou elektroforézou ukazovala na úspěšnost proběhnutí PCR reakce. Příčinou dalších chybějících sekvencí je nejspíš polymorfismus v místě nasedání primerů.

5.3.1. COI marker

Z dendrogramu i analýzy haplotypů u COI markeru je patrné, že vzorky 2947, 10311 a 11660 se řadí k jinému rodu, než který byl u nich určen. To může být způsobeno kontaminací při práci s těmito vzorky nebo byli jedinci chybně identifikováni při morfologické analýze (ta je totiž velmi časově náročná a musí být analyzováno několik jedinců pro spolehlivou druhovou determinaci, což je také důvod, proč jsou hledány molekulární markery, které by toto usnadnily), a proto jsem je vyloučila a znovu spočítala vnitrodruhovou variabilitu. Průměrná hodnota je nyní 0,33 % a její rozložení je vidět na Obr. 12. Variabilita v oblasti od 7 do 9 % (Obr. 5) zmizela a přes 99,6 % tvoří kategorie do 1 %.



Obr. 12 Variabilita u COI markeru po vyřazení vzorků 2947, 10311 a 11660 z analýzy

Přestože průměrné hodnoty variabilit teď odpovídají předpokladu, že u „barcodingu“ by vnitrodruhová měla být asi 10krát menší než mezidruhová, dochází v oblasti do 1 % ke značnému překryvu těchto variabilit (u mezidruhové je frekvence téměř 50 %), který je způsoben velmi nízkou proměnlivostí uvnitř rodu *Adelges*. Z dendrogramu je vidět, že ani druhové komplexy rodu *Sacchiphantes* nelze na základě COI markeru odlišit. Tomu odpovídá i výsledek práce Havill *et al.* (2006b), ve které se

také podařilo odlišit rody *Sacchiphantes* a *Adelges*, ale druhové rozlišení již úspěšné nebylo. U druhů *S. abietis* a *S. viridis* uvádí autor variabilitu od 0,11 do 0,32 %, avšak u našich dat je rozpětí větší, a sice od 0 do 1,08 %. Tento rozdíl vyplývá nejspíš z toho, že my jsme měli k dispozici větší počet zástupců tohoto rodu, kdežto Havill *et al.* se zaměřovali na více druhů při menším množství zkoumaných jedinců jednoho druhu.

Ani Věchtová (2008) nebyla ve své práci úspěšná při rozlišení druhů u rodů *Sacchiphantes* a *Adelges* pomocí COI markeru. U průměrné variability dospěla autorka k hodnotám 0,64 % uvnitř druhů a 9,7 % mezi druhy, kdežto z našich dat vyplývají hodnoty 0,33 % a 4,9 %. Lze předpokládat, že příčinou těchto rozdílů jsou naše menší druhové zastoupení, a z něho plynoucí menší mezidruhová variabilita, a náš výběr druhových komplexů jako studovaného jevu, u kterého se předpokládá nízká variabilita uvnitř druhů.

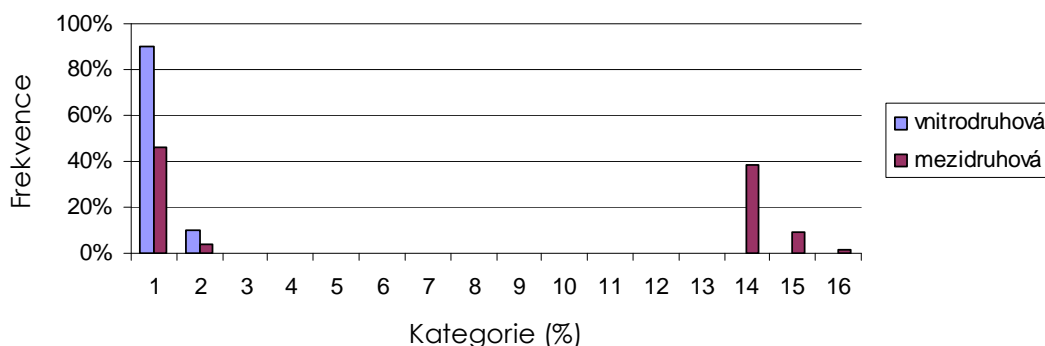
5.3.2. Oblast ATP

U transferových RNA pro lysin a kyselinu asparagovou se potvrdila jejich konzervovanost, která je zmíněna v práci Simon *et al.* (1994). Sekvence všech vzorků rodu *Adelges* byly jak v rámci lysinu, tak kyseliny asparagové dokonce totožné. Po vyřazení vzorků 2947, 10311 a 11660 klesla průměrná vnitrodruhová variabilita tRNA lysinu na 0,22 % a u asparagové kyseliny na 0,18 %.

Přestože analýza genu tRNA_{asp} sjednotila sekvence do jednoho haplotypu, byl při jejich přezkoumání zjištěn nesoulad s tímto výsledkem. Sekvence se na rodové úrovni lišily v jednom nukleotidu a dvou mezerách zvaných „indely“ (v těchto místech došlo buď k inserci, nebo delecii nukleotidů – odtud název, protože nejsme schopni rozhodnout, která situace opravdu nastala) u rodu *Adelges*, takže došlo k rozdělení rodů, které je vidět i na dendrogramu (Příloha 4). Pouze vzorek č. 10141 se oddělil úplně. Při opětovném prohlédnutí dané sekvence jsem dospěla k názoru, že se tak stalo proto, že sekvence nevyšla úplně dobře a na několika místech nešlo rozhodnout o umístění správného nukleotidu. A právě jedna z těchto bází byla ve variabilním místě, na základě kterého došlo v dendrogramu k rodovému rozlišení.

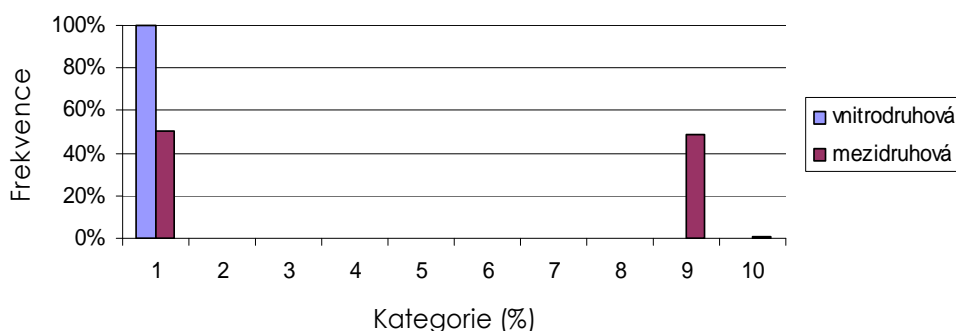
U genu ATP 8 klesla průměrná vnitrodruhová variabilita po vyloučení problematických vzorků na 0,21 %. Přestože byla odstraněna variabilita zasahující do

kategorií od 13 do 16 %, stále zůstává překryv obou variabilit v oblasti do 2 % (Obr. 13).



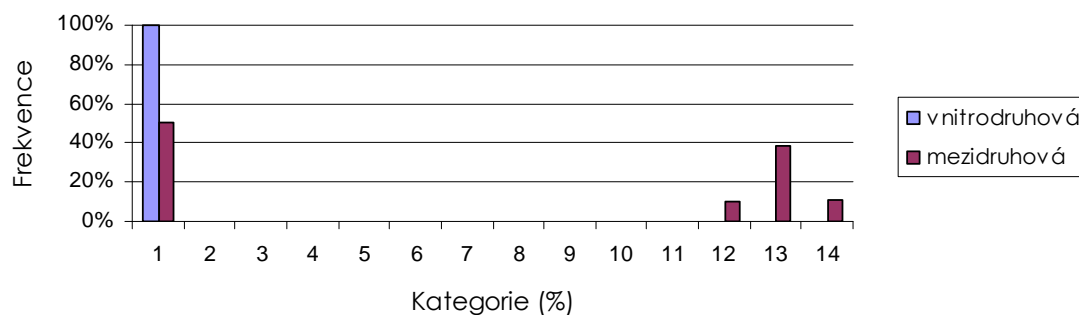
Obr. 13 Rozložení variabilit u ATP 8 po vyřazení vzorků 2947, 10311 a 11660

Po vyřazení vzorků z analýzy genu ATP 6 nepřekračuje variabilita uvnitř druhů 1 % a na zobrazeném histogramu (Obr. 14) je vidět, že polovina té mezidruhové se pohybuje ve stejném rozsahu. Průměrná variabilita uvnitř druhu klesla na 0,19 %.



Obr. 14 Rozložení variabilit u ATP 6 po vyřazení vzorků 2947, 10311 a 11660

Průměrná vnitrodruhová variabilita poklesla po vyloučení inkriminovaných vzorků na 0,27 % a seskupila se v kategorii do 1 %. Obr. 15 zobrazuje překryv obou variabilit v tomto úseku.



Obr. 15 Rozložení variabilit u COIII po vyřazení vzorků 2947, 10311 a 11660

U genů ATP 8, ATP 6 a COIII jsou výsledky velmi podobné. Rovnoměrné rozdělení mezidruhové variability na dvě oblasti je zapříčiněno velmi nízkou rozdílností v sekvencích uvnitř rodu *Adelges*, která spadá do 2 %, a o něco vyšší variabilitou mezi rody *Adelges* a *Sacchiphantes*. Ani jeden marker se však neukázal vhodný pro rozlišení druhových komplexů.

Dendrogramy genů pro COI, ATP 8, ATP 6 i COIII potvrzují schopnost těchto markerů rozlišit studované druhy na rodové úrovni, což je podepřeno i bootstrapovou hodnotou 99 % nebo dokonce 100 %.

6. ZÁVĚR

Ze tří testovaných úseků mitochondriální DNA byly úspěšně naamplifikovány a osekvenovány dva, COI a ATP oblast. Tyto markery byly sice schopny spolehlivě rozdělit vzorky do rodů, ale vnitrodruhová variabilita se u prvně jmenovaného pohybovala v rozmezí od 0 do 1,08 %, u ATP oblasti dosahovala nejvyšší hodnoty 1,8 % (ATP 8) a druhové komplexy se jimi rozlišit bohužel nepodařilo.

Z našich výsledků vyplývá, že mitochondriální genom pravděpodobně není dostatečně variabilní, aby byl schopen rozlišit problematické druhy, a oblasti, u kterých se tato variabilita předpokládá (AT-rich), se nedaří osekvenovat. Problémy s úsekem AT-rich odpovídají zjištění Věchtové (2008), které se z této oblasti také nepodařilo získat sekvence. U markeru COI byl podpořen i její závěr o nevhodnosti tohoto genu k druhové identifikaci u korovnic a v dalších studiích bude nutné se zaměřit spíše na variabilní fragmenty v jaderné DNA.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- ANNAND, P. N. *A Contribution Toward a Monograph of the Adelginae (Phylloxeridae) of North America*. Palo Alto, CA: Stanford University Press, 1928. 146 s.
- ANNAND, P. N. *A Contribution Toward a Monograph of the Adelginae (Phylloxeridae) of North America*. Palo Alto, CA: Stanford University Press, 1928, Vol. 6, No. 1, s. 146.
- BINAZZI, A. *Notes on and key to winged forms of Adelgids recorded from Italy (Homoptera Aphidoidea Adelgidae)*. Redia, 2000, Vol. 83, s. 187-215.
- BLACKMAN, R. L., EASTOP, V. F. *Aphids on the World's Trees: An Identification and Information Guide*. Wallingford (UK): CAB International, 1994. 987 s.
- BLOCHMANN, F. *Über die Geschlechtsgeneration von Chermes abietis*. Biologisches Zentralblatt, 1889, Nr. 9, s. 271-284.
- BLOCHMANN, F. *Über die rügelmässigen Wanderungen der Blattläuse, speziell über den Generationszyklus von Chermes abietis*. Biologisches Zentralblatt, 1887, Nr. 7, s. 417-420.
- BODENHEIMER, F. S., SWIRSKI, E. *The Aphidoidea of the Middle East*. Jerusalem: The Weizmann Science Press of Israel, 1957. 378 s.
- BÖRNER, C. V. *Eine monographische Studie über die Chermiden*. Arbeiten aus der Kaiserlichen biologischen Anstalt für Land- und Forstwirtschaft, 1908, Bd. 6, Hft. 2, s. 81-318.
- BÖRNER, C. V., HEINZE, K. *Aphidina-Aphidoidea*. Tierische Schädlinge an Nutzpflanzen, Teil 2., 1957, s. 323-355.
- BROWN, W. M. *The Mitochondrial Genome of Animals*. Molecular Evolutionary Genetics, 1985, s. 95-130.
- CARTER, C. I. *Conifer woolly aphids (Adelgidae) in Britain*. Forestry Commission Bulletin, London: Her Majesty's Stationery Office, 1957. 51 s.
- CLARY, D. O., WOLSTENHOLME, D. R. *Drosophila mitochondrial DNA: Conserved sequences in the A+T-rich region and supporting evidence for a secondary*

- structure model of the small ribosomal RNA*. Journal of Molecular Evolution, 1987, Vol. 25, No. 2, s. 116-125.
- CLARY, D. O., WOLSTENHOLME, D. R. *The mitochondrial DNA molecule of Drosophila yakuba: Nukleotide sequence, gene organization, and genetic code*. Journal of Molecular Evolution, 1985, Vol. 22, No. 3, s. 252-271.
- CLAYTON, D. A. *Transcription and Replication of Animal Mitochondrial DNAs*. International Review of Cytology, 1992, Vol. 141, s. 217-232.
- COVASSI, M., BINAZZI, A. *Contributions to the knowledge of aphids of conifers. IV. Notes on some species of adelgids found in Italy (Homoptera Adelgidae)*. Redia, 1981, Vol. 64 s. 303-330.
- DREYFUS, L. T. *Neue Beobachtungen bei den Gattungen Chermes L. und Phylloxera Boyer de Fonsc.* Zoologischer Anzeiger, 1889, Bd. 12, s. 233.
- EICHHORN, O. *Investigations on woolly aphids of the genus Adelges An.(Homoptera: Adelgidae) and their predators in Turkey*. Commonwealth Institute of Biological Control, 1969, Technical Bulletin No. 12, s. 83-103.
- EICHHORN, O. *Problems of the population dynamics of silver fir woolly aphids, Genus Adelges (=Dreyfusia), Adelgidae*. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 1968, Vol. 61, s. 157-214.
- FOLMER, O. et al. *DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates*. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, Vol. 3, No. 5, s. 294-299.
- FOOTTIT, R., RICHARDS, W. R. *The insects and arachnids of Canada. Part 22. Genera of the aphids of Canada (Homoptera: Aphidoidea: Phylloxeroidea)*. Ottawa: Research Branch, Agriculture Canada, 1993. 776 s.
- GHOSH, A. K. *A review of the family Adelgidae from the Indian subregion (Homoptera: Aphidoidea)*. Oriental Insects, 1983, Vol. 17, s. 34.
- GLOOR, G. B. et al. *Type I Repressors of P Element Mobility*. Genetics, September 1993, Vol. 135. No. 1, s. 81-95.
- HAVILL, N. P. et al. *Mitochondrial DNA from Hemlock Woolly Adelgid (Hemiptera: Adelgidae) Suggests Cryptic Speciation and Pinpoints the Source of the*

- Introduction to Eastern North America*. Annals of the Entomological Society of America, 2006a, Vol. 99, s. 195-203.
- HAVILL, N. P., FOOTTIT, R.G. *Biology and Evolution of Adelgidae*. Annual Review of Entomology, 2007, Vol. 52, s. 325-349.
- HAVILL, N. P., FOOTTIT, R.G., VON DOHLEN, C. D. *Evolution of host specialization in the Adelgidae (Insecta: Hemiptera) inferred from molecular phylogenetics*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006b, Vol. 44, s. 357-370.
- HEBERT, P. D. N., RATNASINGHAM, S., DE WAARD, J. R. *Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species*. Proceedings of the Royal Society of London, August 2003, Vol. 270, No. 1, s. S96-S99.
- HEINZE, K. *Pflanzenschädliche Blattläusarten der Familien Lachnidae, Adelgidae und Phylloxeridae, eine systematisch-faunistische Studie*. Deutsche Entomologische Zeitschrift, Juni 1962, Band 9, Heft 1-2, s. 143-227.
- CHOLODKOVSKY, N. A. *Beiträge zu einer Monographie der Coniferen-Läuse*. Horae Societatis Entomologicae Rossicae, 1896, Bd. 30, s. 1-102.
- CHOLODKOVSKY, N. A. *Noch einiges zur Biologie der Gattung Chermes*. Zoologischer Anzeiger, 1889, Nr. 12, s. 60-64.
- INOUYE, M. *Monographische Studie über die japanischen Koniferen-Gallenläuse (Adelgidae)*. Hokkaido: Bulletin of the Sapporo Branch of the Government Forest Experiment Station, No.15, 1953. 91 s.
- KAPITOLA, P. *Korovnice rodu Sacchiphantes a Adelges na smrku*. Lesnická práce – příloha, listopad 2005. roč. 84, č. 11, s. i.-iv.
- KAPITOLA, P. *Korovnicovití (Adelgidae)*. Lesnická práce – příloha, květen 2003, roč. 82, č. 5, s. i.-iv.
- LEWIS, D. L. et al. *Sequence, organization, and evolution of the A+T region of Drosophila melanogaster mitochondrial DNA*. Molecular Biology and Evolution, 1994, Vol. 11, No. 3, s. 523-538.
- LOXDALE, H. D., LUSHAI, G. *Molecular markers in entomology*. Bulletin of Entomological Research, 1998, Vol. 88, s. 577-600.

- MANTOVANI, B. et al. *A molecular approach to differentiate the species of Dreyfusia Börner occurring in Italy (Aphidoidea, Adelgidae)*. Redia, 2002, Vol. 84, s. 151-159.
- MARCHAL, P. *Contribution to the study of the biology of Chermes*. Annales des Sciences Naturelles Comprenant la Zoologie, la Botanique, l'Anatomie et la Physiologie Comparée des Deux Règnes et l'Histoire des Corps Organisés Fossiles, 1913, Vol. 18, s. 153-385.
- MEIER, R. et al. *DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: a Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success*. Systematic Biology, 2006, Vol. 55, s. 715-728.
- MORAN, N. A. et al. *Phylogenetics and evolution of the aphid genus Uroleucon based on mitochondrial and nuclear DNA sequences*. Systematic Entomology, 1999, Vol. 24, s. 85-93.
- POWERS, T. O. et al. *Mitochondrial DNA divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes*. Annals of the Entomological Society of America, 1989, Vol. 82, s. 298–302.
- RATNASINGHAM, S., HEBERT, P. D. N. *BOLD: the barcode life data system (www.barcodinglife.org)*. Molecular Ecology Notes, May 2007, Vol. 7, No. 3, s. 355-364.
- ROVERSI, P. F., BINAZZI, A. *Life cycle of the DOUGLAS-fir woolly aphid Gilletteella coweni (Gillettee) in central Italy (Homoptera: Adelgidae)*. Redia, 1996, Vol. 79, s. 241-245.
- ROZAS, J., et al. *DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods*. Bioinformatics, 2003, Vol. 19, s. 2496-2497.
- SIMON, Ch. et al. *Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers*. Annals of the Entomological Society of America, 1994, Vol. 87, No. 6, s. 651-701.
- STEFFAN, A. W. *Unterordnung Aphidina, Blattläuse*. Die Forstschädlinge Europas, 1972, Bd. 1, s. 162-386.

- STEFFAN, A. W. *Evolution und systematik der Adelgidae (Homoptera: Aphidina)*. Stuttgart: Zoologica, Heft 115, 1968. s. 139.
- STEFFAN, A. W. *Die Stammes- und Siedlungsgeschichte des Artenkreises *Sacchiphantes viridis* (Ratzeburg 1843) (Adelgidae, Aphidoidea)*. Zoologica, Original-Abhandlungen aus dem Gesamtgebiete der Zoologie, 1961, Bd. 39, Lft. 4, Heft 109, s. 113.
- TAMURA, K. et al. *MEGA 4: Molecular evolutionary genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Molecular Biology and Evolution, 2007, Vol. 24, No. 8, s. 1596-1599.
- TAYLOR, M. F. et al. The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. Molecular Biology and Evolution, 1993, Vol. 10, No. 6, s. 1259-1272.
- VALENTINI, A., POMPANON, F., TABERLET, P. *DNA barcoding for ecologists*. Trends in Ecology and Evolution, December 2008, Vol. 24, No. 2, s. 110-117.
- VĚCHTOVÁ, P. *Druhová identifikace korovnic (Adelgidae) na základě molekulárních markerů*. Č. Budějovice: Jihočeská Univerzita. Přírodovědecká fakulta, 2008. 41 s.
- VORWERK, S., FORNECK, A. *Reproductive mode of grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*, Homoptera: Phylloxeridae) in Europe: molecular evidence for predominantly asexual populations and a lack of gene flow between them*. GENOME, 2006, Vol. 49, Iss. 6, s. 678-687.
- WALLACE, M. S. *A Historical Review of Adelgid Nomenclature* [online]. 2005, poslední úprava 5. března 2009 [cit. 25. 4. 2009]. Dostupné z: <http://na.fs.fed.us/fhp/hwa/pubs/proceedings/2005_proceedings/wallace.pdf>.
- ZHANG, D.-X., HEWITT, G. M. *Insect Mitochondrial Control Region: A Review of its Structure, Evolution and Usefulness in Evolutionary Studies*. Biochemical Systematics and Ecology, 1997, Vol. 25, No. 2, s. 99-120.

8. PŘÍLOHY

Příloha 1 Přehled a popis zkoumaných vzorků

| Druh | Číslo vzorku | Lokalita | Instar | Způsob uchovávání |
|-------------------|-----------------|------------------------------------|--------|-------------------|
| <i>A. laricis</i> | 994-995 | Č. B. | al-gal | 98% etanol |
| <i>A. laricis</i> | 2379 | Vrchy u Fulneku | fund | 98% etanol |
| <i>A. laricis</i> | 3298 | Praha - Břevnov | al-gal | 98% etanol |
| <i>A. laricis</i> | 10555 | Buchlovice | al-gal | -80 °C |
| <i>A. laricis</i> | 10688 | Nový Dvůr | al-gal | -80 °C |
| <i>A. laricis</i> | 10960 | Nový Dvůr | al-gal | -80 °C |
| <i>A. laricis</i> | 11031 | Nový Dvůr | al-gal | -80 °C |
| <i>A. laricis</i> | 11339 | Praha - Břevnov | al-gal | -80 °C |
| <i>A. laricis</i> | 11500 | Č. B. - Borek | al-gal | -80 °C |
| <i>A. tardus</i> | 1283, 1286-1287 | Č. B. | fund | 98% etanol |
| <i>A. tardus</i> | 10282, 10286 | Nový Dvůr | al-gal | -80 °C |
| <i>A. tardus</i> | 11196 | Č. B. - Stromovka | al-gal | -80 °C |
| <i>A. tardus</i> | 11340 | Praha - Břevnov | al-gal | -80 °C |
| <i>A. tardus</i> | 11458 | Č. B. - Stromovka | al-gal | -80 °C |
| <i>A. tardus</i> | 11661 | Šumava, Jenišov | al-gal | -80 °C |
| <i>S. abietis</i> | 1044 | Zdiměřice | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. abietis</i> | 2893 | Čertovo jezero | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. abietis</i> | 3026 | Nový Dvůr | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. abietis</i> | 3436 | Šumava, Jenišov | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. abietis</i> | 3448 | Šumava, Vítkův Kámen | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. abietis</i> | 10141-10142 | Bystřice p. H., Troják, U Češků | al-gal | -80 °C |
| <i>S. abietis</i> | 11350 | Serbia, Kapaonik Natl. Park | al-gal | -80 °C |
| <i>S. abietis</i> | 11624 | Šumava, Jenišov | al-gal | -80 °C |
| <i>S. abietis</i> | 11660 | Šumava, Jenišov | al-gal | -80 °C |
| <i>S. abietis</i> | 11696-11697 | Šumava, Vítkův Kámen | al-gal | -80 °C |
| <i>S. viridis</i> | 846 | Český Krumlov | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. viridis</i> | 2849 | Č. B. | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. viridis</i> | 2947 | Cehnice | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. viridis</i> | 2957 | Č. B. - Stromovka | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. viridis</i> | 2972 | Těchobuzy | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. viridis</i> | 3007 | Č. B. - Stromovka | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. viridis</i> | 3009 | Bystřice p. H., Troják, křižovatka | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. viridis</i> | 3020 | Nový Dvůr | al-gal | 98% etanol |

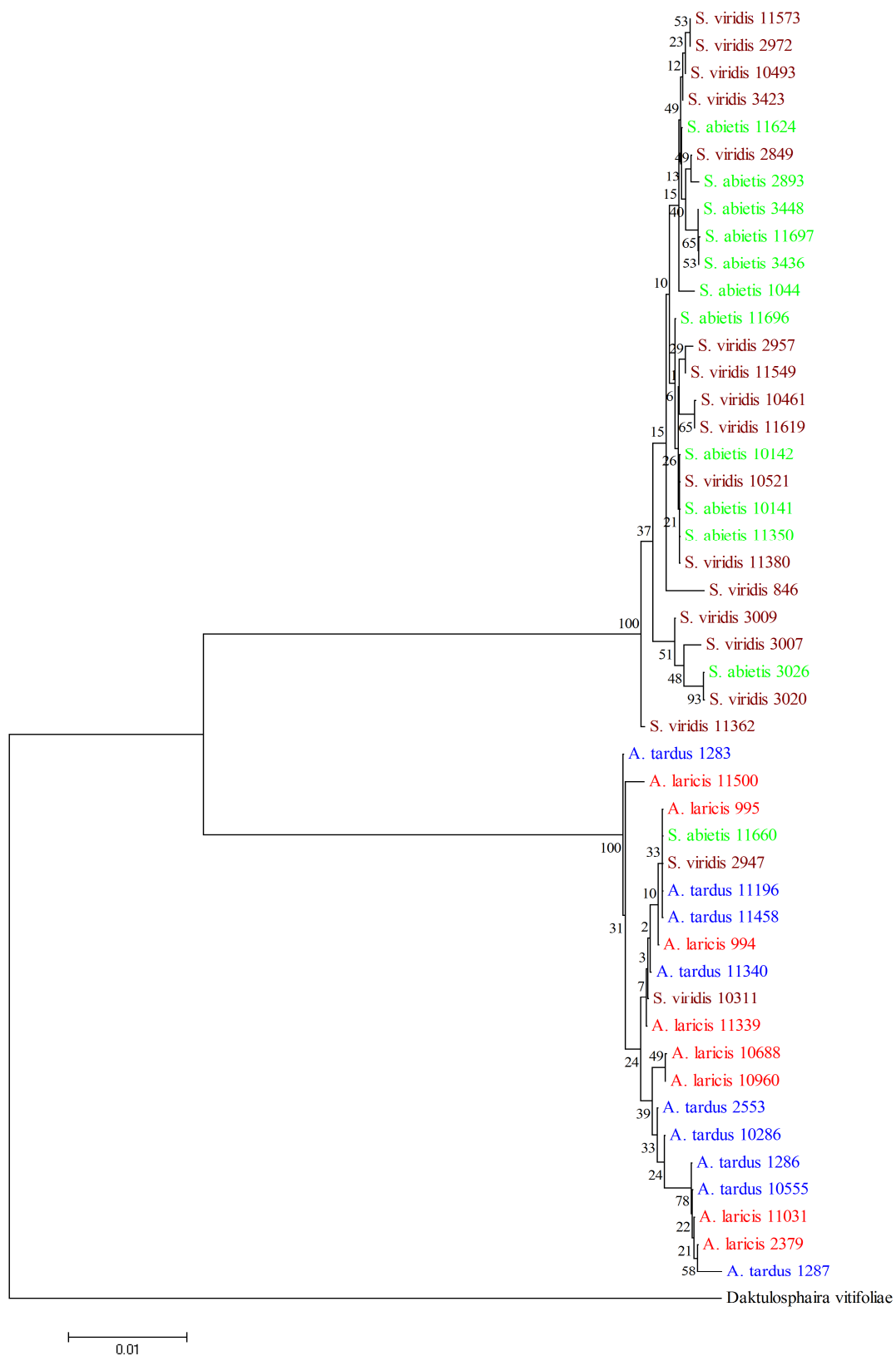
| | | | | |
|-------------------|--------------|-----------------------|--------|------------|
| <i>S. viridis</i> | 3423 | Strmilov | al-gal | 98% etanol |
| <i>S. viridis</i> | 10311 | Č. B. - Stromovka | al-gal | -80 °C |
| <i>S. viridis</i> | 10461 | Č. B. - Stromovka | al-gal | -80 °C |
| <i>S. viridis</i> | 10493 | Těchobuz | al-gal | -80 °C |
| <i>S. viridis</i> | 10521 | Nový Dvůr | al-gal | -80 °C |
| <i>S. viridis</i> | 11362 | Lednice | al-gal | -80 °C |
| <i>S. viridis</i> | 11380 | Č. B. - Haklovy Dvory | al-gal | -80 °C |
| <i>S. viridis</i> | 11549, 11550 | Strmilov | al-gal | -80 °C |
| <i>S. viridis</i> | 11573 | Želetava | al-gal | -80 °C |
| <i>S. viridis</i> | 11619 | Fulnek | al-gal | -80 °C |

Vysvětlivky:

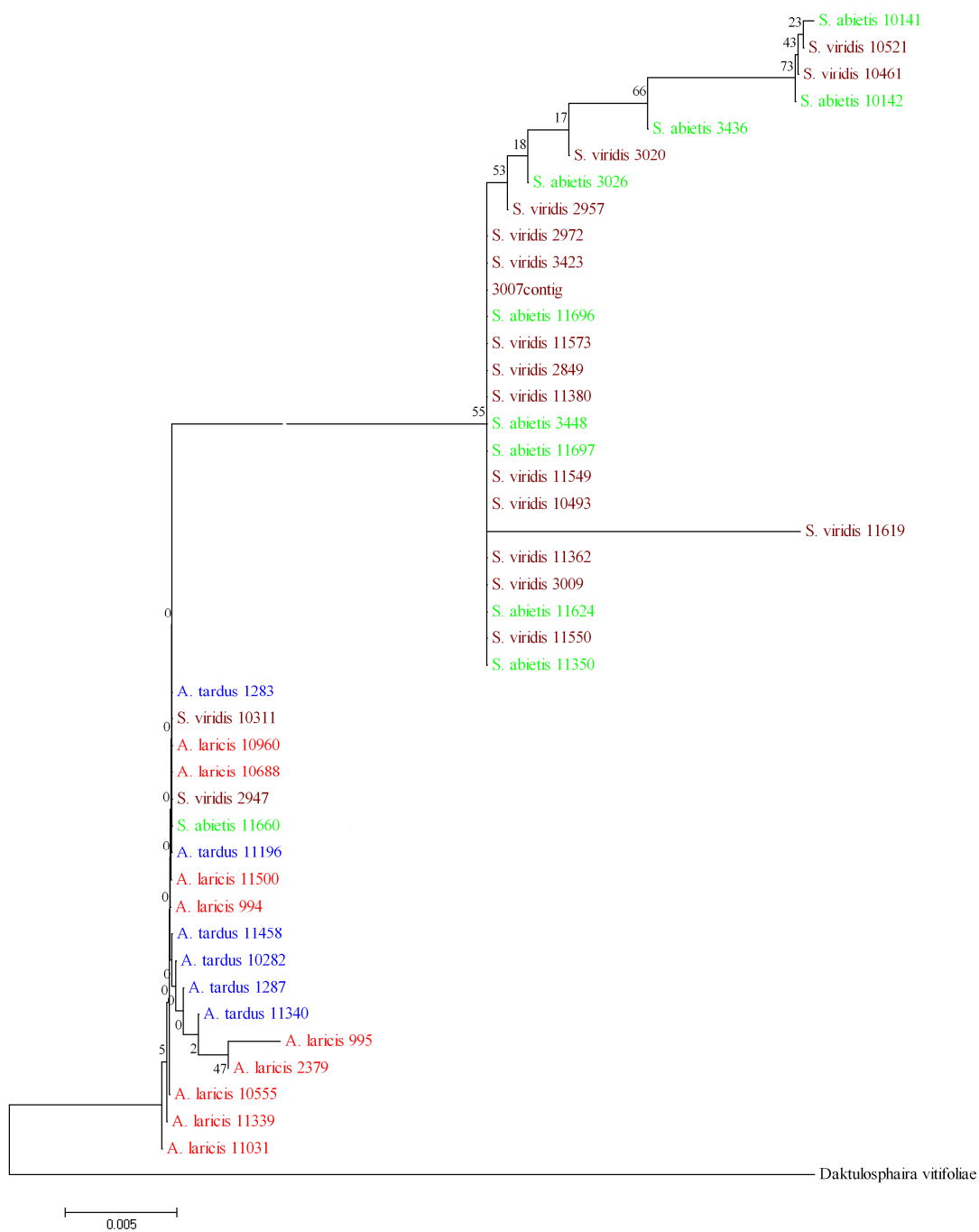
A. tardus *Adelges tardus*
A. laricis *Adelges laricis*
al-gal..... *allatae gallicolae*

S. abietis *Sacchiphantes abietis*
S. viridis *Sacchiphantes viridis*
fund..... *fundatrix*

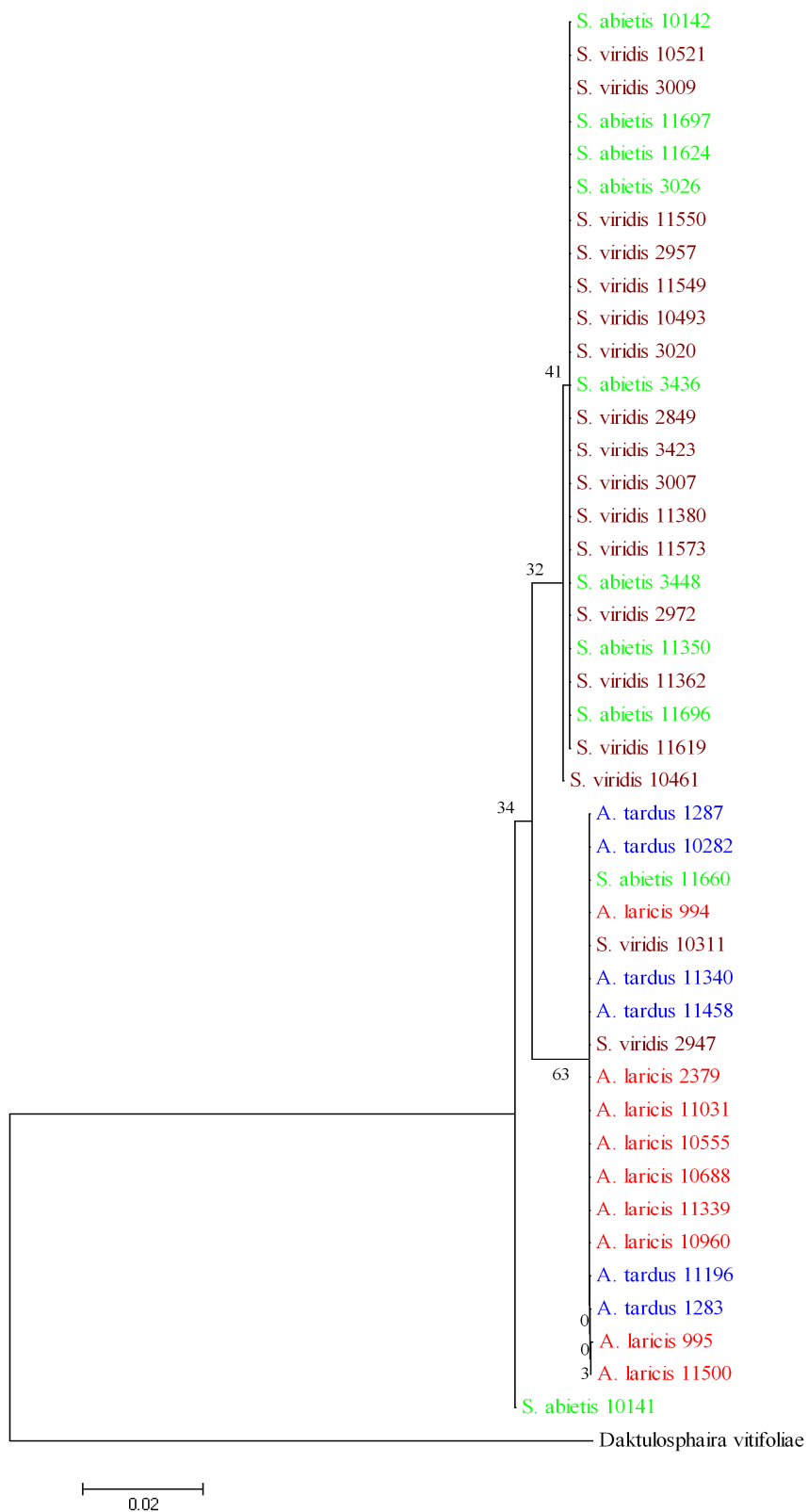
Příloha 2 Dendrogram na základě COI markeru (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Jako outgroup byla použita *Daktulosphaira vitifoliae*.



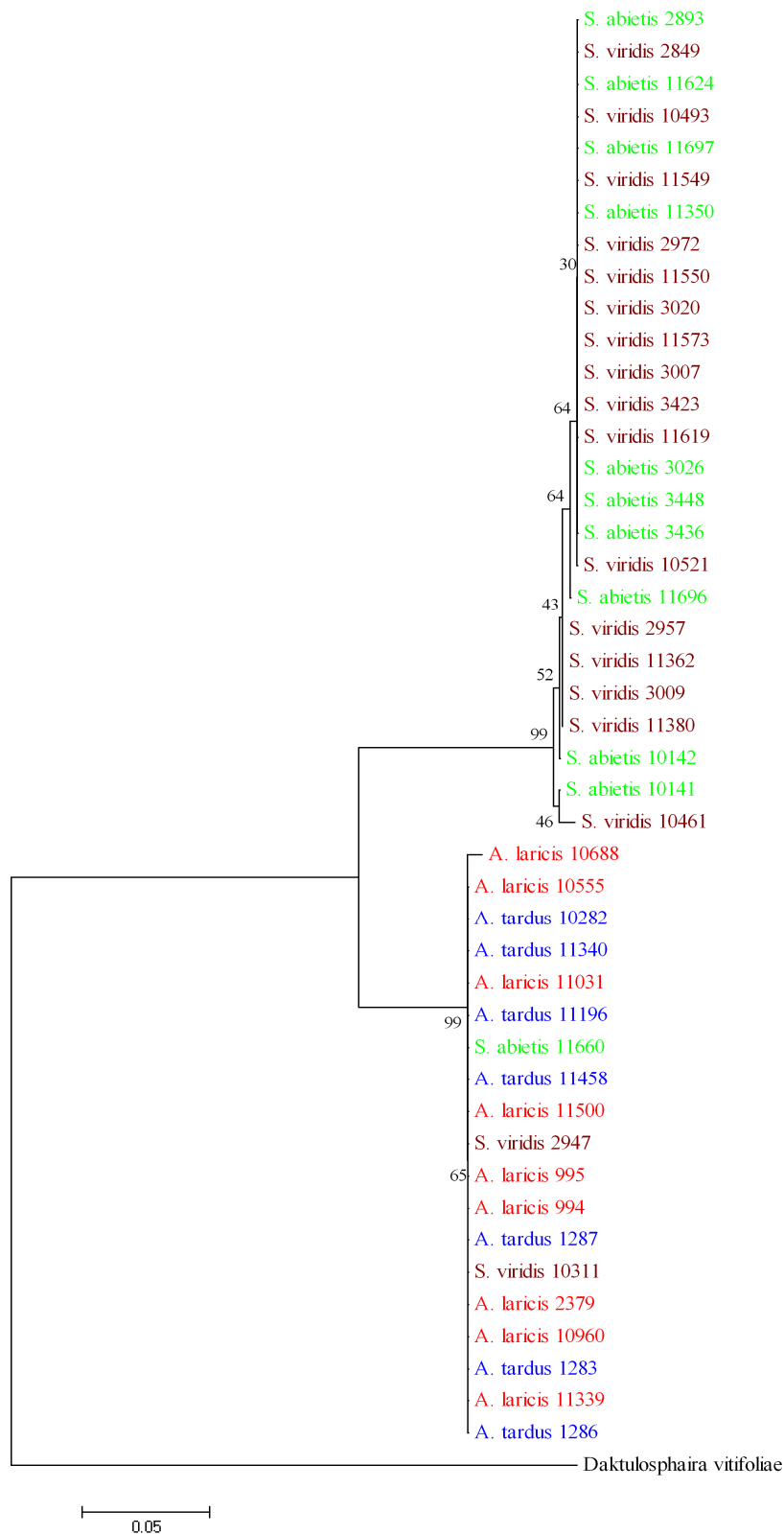
Příloha 3 Dendrogram na základě tRNAlys (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Jako outgroup byla použita *Daktulosphaira vitifoliae*.



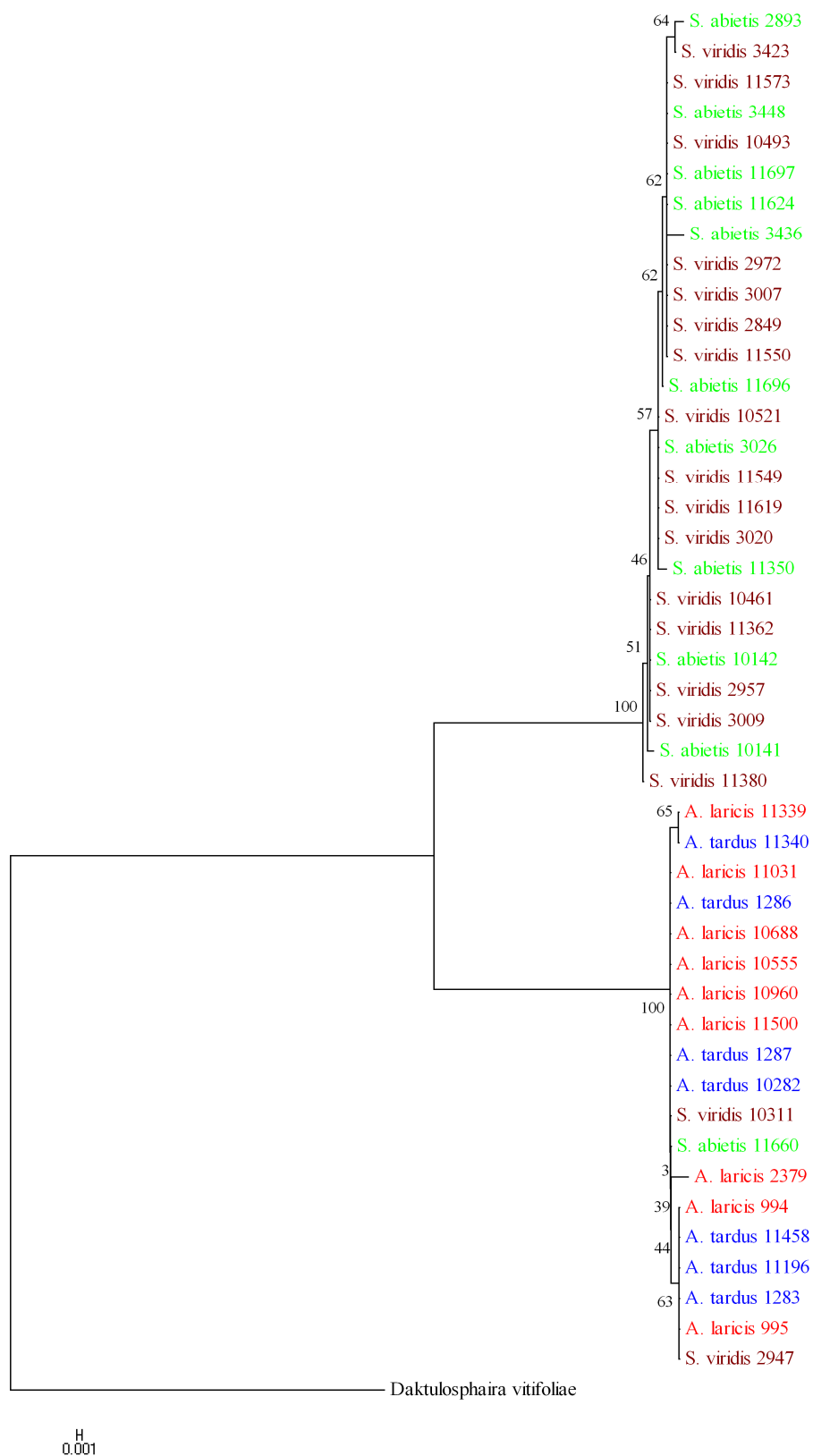
Příloha 4 Dendrogram na základě tRNAasp (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Jako outgroup byla použita *Daktulosphaira vitifoliae*.



Příloha 5 Dendrogram na základě ATP8 (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Jako outgroup byla použita *Daktulosphaira vitifoliae*.



Příloha 6 Dendrogram na základě ATP6 (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Jako outgroup byla použita *Daktulosphaira vitifoliae*.



Příloha 7 Dendrogram na základě genu COIII (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Jako outgroup byla použita *Daktulosphaira vitifoliae*.

