

VILNIUS UNIVERSITY  
INSTITUTE OF ECOLOGY OF NATURE RESEARCH CENTRE

Jekaterina Bašilova

**BIOSYSTEMATIC STUDY OF THE APHID (HEMIPTERA,  
STERNORRHYNCHA: APHIDIDAE) GENUS *CRYPTOMYZUS* OESTLUND, 1922  
IN LITHUANIA**

Summary of doctoral dissertation

Biomedical sciences, zoology (05 B)

Vilnius, 2010

Dissertation research was carried out at the Department of Zoology, Vilnius University in 2006–2010.

**Scientific supervisor:**

prof. habil. dr. Rimantas Rakauskas (Department of Zoology, Vilnius University, biomedical sciences, zoology – 05 B)

**The defence of the doctoral dissertation is held at the Vilnius University Council on Zoology:**

**Chairman**

Prof. dr. Sigitas Podėnas (Vilniaus University, biomedical sciences, zoology – 05B)

**Members:**

Assoc. prof. dr. Eduardas Budrys (Institute of Ecology of Nature Research Centre, biomedical sciences, zoology – 05B)

dr. Asta Križanauskienė (Institute of Ecology of Nature Research Centre, biomedical sciences, zoology – 05B)

Prof. dr. Virginijus Sruoga (Vilnius Pedagogical University, biomedical sciences, zoology – 05B)

Prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytautas Magnus University, biomedical sciences, zoology – 05B)

**Opponents:**

Prof. habil. dr. Jonas Rimantas Stonis (Vilnius Pedagogical University, biomedical sciences, zoology – 05B)

Assoc. prof. dr. Rolandas Meškys (Institute of Biochemistry of Vilnius University, physical sciences, biochemistry – 04 P)

The official defence of the dissertation will be held at public meeting of the Council at Faculty of Natural Sciences, Vilnius University, on 8 October 2010 at 14.00.

Address: M. K. Čiurlionio str. 21, LT–03101, Vilnius, Lithuania

The summary of the doctoral dissertation was distributed on 8 September 2010.

The dissertation is available at the libraries of Vilnius University and Institute of Ecology of Nature Research Centre.

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
GAMTOS TYRIMŲ CENTRO EKOLOGIJOS INSTITUTAS

Jekaterina Bašilova

***CRYPTOMYZUS* OESTLUND, 1922 GENTIES AMARŲ (HEMIPTERA,  
STERNORRHYNCHA: APHIDIDAE) BIOSISTEMATINIAI TYRIMAI  
LIETUVOJE**

Daktaro disertacijos santrauka

Biomedicinos mokslai, zoologija (05 B)

Vilnius, 2010

Disertacija rengta 2006–2010 metais Vilniaus universiteto Zoologijos katedroje

**Mokslinis vadovas:**

Prof. habil. dr. Rimantas Rakauskas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

**Disertacija ginama Vilniaus universiteto Zoologijos krypties taryboje:**

**Pirmininkas**

Prof. dr. Sigitas Podėnas (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05 B)

**Nariai:**

Doc. dr. Eduardas Budrys (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05B)

Dr. Asta Križanauskienė (Gamtos tyrimų centro Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05B)

Prof. dr. Virginijus Sruoga (Vilniaus Pedagoginis universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05B)

Prof. dr. Algimantas Paulauskas (Vytauto Didžiojo universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05B)

**Oponentai:**

Prof. habil. dr. Jonas Rimantas Stonis (Vilniaus Pedagoginis universitetas, biomedicinos mokslai, zoologija – 05B)

Doc. dr. Rolandas Meškys (Vilniaus universiteto Biochemijos institutas, fiziniai mokslai, biochemija – 04 P)

Disertacija bus ginama viešame Zoologijos mokslo krypties tarybos posėdyje 2010 m. spalio 8 d. 14.00 val. Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Didžiojoje auditorijoje

Adresas: M. K. Čiurlionio g. 21, LT–03101, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2010 m. rugsėjo 8 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Gamtos tyrimų centro Ekologijos instituto bibliotekose.

## INTRODUCTION

### Relevance of the study

Aphids (Hemiptera, Sternorrhyncha, Aphidoidea) are mostly sedentary colonial phytophagous insects, some of their species are well-known as pests of agriculture, horticulture and forestry. Complex life cycles of aphids are characterized by several different adult morphs emerging during the season and well-defined host specificity. Moreover, there are plenty of aphid species shifting host plants during the season. Genotype that in other groups of animals would be characteristic only for one individual considerably increases due to diploid parthenogenesis and fast rate of reproduction in aphids (Heie, 1987). Aphids not only damage the plants directly by feeding on phloem or parenchyma sap, but also transfer virus diseases (Minks and Harrewijn, 1987). For this reason precise aphid species identification, data on their species composition and host plant specificity in particular region are very important before decisions on measures of plant protection from pests can be made.

There are about 4700 aphid species registered in the world (Remaudière and Remaudière, 1997), 18 of them belong to the genus *Cryptomyzus* (Remaudière and Remaudière, 1997; Holman, 2009). The representatives of this genus are important both from practical as insects associated with agricultural plants and theoretical point of view as the model of sympatric speciation in aphids (Guldmond, 1990a, 1992; Guldmond and Dixon, 1994). Genus *Cryptomyzus* is of Palaearctic origin, though some species invaded Nearctic region (Nieto Nafria et al., 2004). Ten species from two subgenera, *Ampullosiphon* and *Cryptomyzus* s. str., are registered in Europe (Nieto Nafria et al., 2004). One species belongs to the subgenus *Ampullosiphon* and other nine are representatives of the subgenus *Cryptomyzus* s. str. comprising of fourteen species known in the world. In the middle of 20th century it was suggested to divide subgenus *Cryptomyzus* s. str. into two subgenera (Börner, 1930) and later on into two genera (Börner, 1952) according to the morphological differences of described species. Similar grouping of European species was obtained by J. A. Guldmond (1990a) after host specificity and enzyme electromorphs of almost all (9 of

10) European species of this genus were investigated. There are still no data whether these morphological and biological differences are also reflected by partial DNA sequences.

Species of the genus *Cryptomyzus* reported from Europe are well investigated, as majority of their morphs are described, their host plants and life cycles are known and numbers of chromosomes in diploid set are also detected. Nevertheless, there are still not enough data on their life cycles under field conditions, karyotype structure and DNA sequences. Moreover, there are some still unresolved questions. One of them concerns the subspecies of *C. galeopsidis*. In main catalogues (Remaudière and Remaudière, 1997; Holman, 2009) three subspecies of *C. galeopsidis* are mentioned (*C. galeopsidis galeopsidis*, *C. galeopsidis citrinus* and *C. galeopsidis dickeri*). They were described by Hille Ris Lambers (1953) according to the peculiarities of their life cycles. The separation of monoecious and heteroecious subspecies of *C. galeopsidis* turned out to be doubtful when aphids with different life cycle strategies were used for enzyme electromorph and hybridological analysis (Guldemon, 1991a). Partial DNA sequences have not been previously applied to investigate this problem. The other unresolved question concerns the life cycle of *C. leonuri*. It is often noted that life cycle of this species is unknown (Guldemon, 1991a; Blackman and Eastop, 2006). Identification keys to the genus *Cryptomyzus* contain morphological characters of *C. leonuri* apterous viviparous females (Guldemon, 1991a; Blackman and Eastop, 2006) or this species even is excluded from identification keys (Heie, 1994).

Six species of the genus *Cryptomyzus* were recorded in Lithuania before 2004 (Rakauskas et al., 1992; Nieto Nafria et al., 2004). The biology of *C. ribis* is investigated the best (Pakayckas, 1986), there are some data on life cycle of *C. galeopsidis* (Pakayckas, 1983), while monoecious species associated with herbaceous plant have not previously been studied in Lithuania.

### **Aim and tasks of the study**

The aim of this study was to investigate biology, taxonomy and phylogenetic relationships of aphids of the genus *Cryptomyzus* distributed in Lithuania. The following tasks were set up:

1. To investigate the species contents of aphids of the genus *Cryptomyzus* in Lithuania.
2. To explore biological features of aphids of the genus *Cryptomyzus* in Lithuania: host plants, life cycles, number of generations per season, mean time needed for one generation to mature.
3. To carry out morphometric study of aphids of the genus *Cryptomyzus*, to construct discriminant functions for the separation of apteous and alate viviparous females belonging to morphologically similar species and to evaluate the effectiveness of these functions.
4. To study karyotypes of cloned species of the genus *Cryptomyzus*.
5. To compare partial sequences of mitochondrial (COI) and nuclear (EF-1 $\alpha$ ) DNA from the aphids of the genus *Cryptomyzus*.
6. To perform phylogenetic analysis of European species of the genus *Cryptomyzus* based on their partial DNA sequences.
7. To perform phylogenetic analysis of Palaearctic species of the genus *Cryptomyzus* based on their morphological characters and biological features.
8. To compile identification key to European species of the subgenus *Cryptomyzus* s. str. based on their morphological characters and biological features.

#### **The statements being defended**

1. The majority of European species of the genus *Cryptomyzus* are recorded in Lithuania.
2. Life cycle strategies of two facultatively heteroecious species distributed in Lithuania, *C. galeopsidis* and *C. ribis*, are different.
3. *C. leonuri* is a holocyclic monoecious species in Lithuania.
4. Canonical discriminant functions constructed for apterous and alate viviparous females of *C. alboapicalis* and *C. leonuri* and *C. galeopsidis*, *C. maudamanti* and *C. ulmeri* are offered.
5. Chromosome number in diploid set is the same for all studied species of the genus *Cryptomyzus* ( $2n=12$ ), and their karyotype structure is similar.

6. The values of within-species divergences for partial sequences of mitochondrial (COI) and nuclear (EF-1 $\alpha$ ) DNA are low in studied species of the genus *Cryptomyzus*.
7. The values of between-species divergences for partial sequences of mitochondrial (COI) and nuclear (EF-1 $\alpha$ ) DNA are different.
8. Phylogenetic reconstructions of the genus *Cryptomyzus* based on partial sequences of mitochondrial (COI) and nuclear (EF-1 $\alpha$ ) DNA do not contradict phylogenetic reconstruction based on morphological characters.
9. The separation of *C. galeopsidis* subspecies, heteroecious *C. galeopsidis galeopsidis* and monoecious on black currants *C. galeopsidis dickeri*, was not supported by the results of life cycle study and analysis of partial sequences of mitochondrial (COI) and nuclear (EF-1 $\alpha$ ) DNA.

#### **Scientific novelty of the study**

1. Two aphid species of the genus *Cryptomyzus*, *C. ulmeri* and *C. maudamanti*, new to Lithuania were found during this study.
2. Life cycles of *C. alboapicalis*, *C. ulmeri*, *C. korschelti*, *C. leonuri* and *C. maudamanti* were examined in Lithuania for the first time.
3. The life cycle of *C. leonuri* as well as previously unknown morphs, alate viviparous females, males and oviparae, were described and the description of apterous viviparous female was renewed.
4. Characters and their combinations for discrimination between apterous and alate viviparous females, males and oviparae of morphologically similar species were found due to morphometric and subsequent discriminant analysis of cloned aphids carried out using the same scheme.
5. Karyotype idiograms of seven European species of the genus *Cryptomyzus* were constructed, and karyotypes of *C. leonuri* and *C. ulmeri* were described for the first time.
6. Partial sequences of mitochondrial (COI) and nuclear (EF-1 $\alpha$ ) DNA of eight European species of genus the *Cryptomyzus* were obtained for the first time, their



within- and between-species divergences were estimated and phylogenetic trees based on the partial DNA sequences were constructed.

7. Phylogenetic scheme was constructed when biological and morphological data on 17 species of the genus *Cryptomyzus* were summarized.
8. Identification keys to apterous and alate viviparous females, males and oviparae of European species of the subgenus *Cryptomyzus* s. str. were compiled.

### **Scientific and practical significance**

Aphid cloning under field conditions ensured that their biological features were recorded and samples for morphometric, cytogenetic and molecular research were collected. Morphometric analysis of aphids with known life cycles and subsequent discriminant analysis will allow improving of available identification keys to European species of the genus *Cryptomyzus*. The analysis of partial DNA sequences will serve for selection of molecular markers suitable for the discrimination between morphologically close species as well as for the assessment of within-, between-species divergences and phylogenetic relationship in aphids of the genus *Cryptomyzus*.

### **The presentation and approbation of the results**

Three scientific papers on the topic of the dissertation were published in ISI Master Journal List issues.

### **The structure and volume of the dissertation**

The dissertation contains the following chapters: Introduction, Review of the literature (3 subchapters), Methods of the study (6 subchapters), Results of the study (8 subchapters), Conclusions, References (83 positions), List of publications and Supplemental material. The dissertation and supplemental material consist of 172 pages, with 130 pages of the main text and 26 tables and 39 figures. The supplemental material contains 14 tables. The dissertation is written in Lithuanian with the summary in English.

### **Acknowledgements**

I would like to thank my scientific supervisor prof. habil. dr. Rimantas Rakauskas for valuable advise and support in planning and performing the research, preparing the publications and the manuscript of the dissertation. I also thank assoc. prof. dr. Jurga

Turčinavičienė for encouraging to perform cytogenetic study and for help in learning molecular techniques and data analysis. I am grateful to dr. Jaroslav Holman and dr. Jan Havelka from Institute of Entomology of Biology Centre of Czech Academy of Science for the possibility to work in aphid collection. I thank Eglė Kananovičiūtė for aphid samples from Kėdainiai district, Lithuania, which were used in life cycle studies. I would like to thank Mrs. Eglė Rudokienė (Institute of Biotechnology, Vilnius, Lithuania), who performed sequencing reactions. I am also grateful to the staff of the Department of Zoology (Vilnius University) for a good atmosphere at work.

This study was partly supported by the Lithuanian Science and Study Foundation, grant nr. C 08023.

I would like to thank the Baniuševičiai and the Bareišos for their tolerance towards the studies of aphid life cycles and the Kaljumäe for hospitality during my expedition in Estonia. I also would like to thank all my relatives and friends who had sincere interest in my studies. Special thanks are for my mother Larisa for her everyday help and support.

## **THE REVIEW OF THE LITERATURE**

This chapter contains three subchapters, where the general characteristic of aphids of the genus *Cryptomyzus* is given, the present state of knowledge about this genus in the world, in Europe and in Lithuania is discussed.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Study of fauna**

To summarize the data on aphids of the genus *Cryptomyzus* in Lithuania microscope slides stored at the collection of the Department of Zoology (Faculty of Natural Sciences, Vilnius University) were checked. Aphids were sampled by the following researches (the names are grouped in alphabetic order): J. Bašilova (since 2003), R. Grigaliūnaitė (1997), R. Kairaitytė (2008), E. Kananovičiūtė (2007), V. Kudirkaitė (2004-2005), R. Rakauskas (since 1974), Z. Strumskytė (1978-1979) and J. Trukšinitė (2006-2007). Samples were collected in the following counties (number in parenthesis indicates the number of sampling

localities): Klaipėda (8), Telšiai (2), Šiauliai (4), Panevėžys (27), Kaunas (6), Marijampolė (3), Utena (22), Vilnius (21) and Alytus (9). Publications concerning distribution and host plants of aphids of the genus *Cryptomyzus* in Lithuania (Рупайс, 1966; Рупайс and Юронис, 1983; Юронис, 1984) were also used. Morphological identification of aphids was performed with the keys compiled by J. A. Guldemon (1991a) and R. L. Blackman and V. F. Eastop (2006).

### **Study of life cycles**

Life cycle studies were carried out in Pakalniškės, Vilnius distr., in 2007-2009. Seven species of the genus *Cryptomyzus* belonging to the subgenus *Cryptomyzus* s. str. found in Lithuania were used. Isolated aphid colonies were kept under outdoor conditions. The state of host plants and aphid colonies was checked two times a week, each 3-4 days. Plants of the family Lamiaceae were collected in the field and then grown potted and isolated. Branch tip isolators were put on currants after their thorough examination. When host plants were infested with aphids, groups of 5-10 individuals were transferred into new isolator depending on the size of aphids and plants. When alate viviparous females were emerging, the migration was simulated by transferring groups of 5-15 individuals onto new host plants. Aphids samples were collected and placed into 70 % (for the preparation of microscope slides) and 96 % (for molecular analysis) ethanol. The numbers of generations per season and mean time and standard deviation for one generation to mature (in days) were calculated for each aphid line studied.

### **Study of morphology and morphometry**

Samples of cloned aphids collected in 2007-2009 were used for morphological and morphometric studies. Microscope slides in Canada balsam from the aphids stored in 70 % ethanol were prepared using a modified method described by R. L. Blackman and V. F. Eastop (2000). Characters for morphometric analysis (Table 1) were selected from three identification keys (Hille Ris Lambers, 1953; Guldemon, 1991a; Heie, 1994) with morph description. Measurements were performed using Olympus BX40 microscope with an interactive measurement system MicroImage. Initial data analysis was done with Excel 2003, for other calculations Statistica (version 5.5) was used.

Table 1. Characters used for the morfometric analysis of each morph (X) and their abbreviations.

1 lentelė. Požymių, panaudotų kiekvienos morfos (X) morfometrinei analizei, pavadinimai ir santrumpos.

| Full character name  | Abbreviation      | Apterous<br>viviparous female | Ovipara | Alate viviparous<br>female, alate male |
|--|-------------------|-------------------------------|---------|--|
| Measurements   |                   |                               |         |  |
| Body length, excluding cauda, mm   | body              | X                             | X       | X                                      |
| Hind tibia length, mm  | htibia            | X                             | X       | X                                      |
| Length of antennal segment 3, mm   | ant3              | X                             | X       | X                                      |
| Length of antennal segment 4, mm   | ant4              |                               |         | X                                      |
| Length of basal part of antennal segment 5, mm   | ant5a             |                               |         | X                                      |
| Length of processus terminalis, mm   | pt                | X                             | X       | X                                      |
| Length of distal part of antennal segment 5, mm  | ant5b             |                               |         | X                                      |
| Length of the base of antennal segment 6, mm   | bant6             | X                             | X       | X                                      |
| Length of cauda, mm  | cauda             | X                             | X       | X                                      |
| Length of siphunculus, mm  | siphon            | X                             | X       | X                                      |
| Minimal width of the proximal part of siphunculus, mm  | miwsi             | X                             | X       | X                                      |
| Maximal width of the distal part of siphunculus, mm  | mawsi             | X                             | X       | X                                      |
| Length of the last rostral segment, mm   | lrs               | X                             | X       | X                                      |
| Length of segment 2 of hind tarsus, mm   | tars2             | X                             | X       | X                                      |
| Maximal width of hind tibia, mm  | dhtibia           |                               | X       |  |
| Diameter of the base of antennal segment 3, mm   | dbant3            | X                             | X       | X                                      |
| Length of the longest hair on antennal segment 1, mm   | hant1             | X                             | X       | X                                      |
| Length of the longest hair on antennal segment 3, mm   | hant3             | X                             | X       | X                                      |
| Length of the longest hair on abdominal tergites 2-4, mm   | abhair            | X                             | X       | X                                      |
| Counts   |                   |                               |         |  |
| Number of dorsal hairs on abdominal segments 1-4   | dhas1-4           | X                             | X       | X                                      |
| Number of secondary rhinaria on antennal segment 3-5   | srhin3-5          | X                             | X       | X                                      |
| Number of additional hairs on the last rostral segment   | hlrs              | X                             | X       | X                                      |
| Number of scent plaques on hind tibia  | scent<br>plaques  |                               | X       |  |
| Relative lengths   |                   |                               |         |  |
| Minimal width of the proximal part of siphunculus /<br>Maximal width of the distal part of siphunculus | miwsi/mawsi       | X                             | X       | X                                      |
| Length of the last rostral segment / Length of segment 2<br>of hind tarsus                             | lrs/tars2         | X                             | X       | X                                      |
| Processus terminalis/ Length of antennal segment 3   | pt/ant3           | X                             | X       | X                                      |
| Processus terminalis/ Length of the base of antennal<br>segment 6                                      | pt/bant6          | X                             | X       | X                                      |
| Length of the longest hair on antennal segment 3/<br>Diameter of the base of antennal segment 3        | hant3/dbant3      | X                             | X       | X                                      |
| Length of the longest hair on antennal segment 1/<br>Length of the longest hair on antennal segment 3  | hant1/hant3       | X                             | X       | X                                      |
| Length of the longest hair on abdominal tergites 2-4/<br>Diameter of the base of antennal segment 3    | abhair/dbant<br>3 | X                             | X       | X                                      |
| Length of the longest hair on abdominal tergites 2-4/<br>Length of the base of antennal segment 6      | abhair/bant6      | X                             | X       | X                                      |
| Length of siphunculus / Body length, excluding cauda   | siphon/body       | X                             | X       | X                                      |
| Length of siphunculus / Length of cauda  | siphon/cauda      | X                             | X       | X                                      |
| Length of cauda / Length of siphunculus  | cauda/siphon      | X                             | X       | X                                      |

Measurements, counts and relative lengths of aphids with studied life cycles were used for discriminant analysis of different morphs. Pearson correlation coefficients ( $r$ ) were calculated for the whole data set of every morph and characters with medium, strong and very strong statistically significant ( $p < 0,05$ ) correlation (correlation coefficients  $|r| \geq 0,5$ ) with body length were removed from the analysis. Data set was divided into two subsets and one of them was used to construct canonical discriminant function, and another one to evaluate its effectiveness. Data set containing measurements, counts and relative lengths was used to perform forward stepwise discriminant analysis. Then relative lengths were removed and the procedure was repeated. The most effective function was selected from these two types of functions obtained. Statistica (version 5.5) was used to perform these calculations.

### **Study of cytogenetics**

Seven species of cloned aphids of the genus *Cryptomyzus* were used for cytogenetic study. Modified cell suspension technique (Blackman, 1985; Turčinavičienė et al., 1997) was applied to make preparations of chromosome spreads. Microscope slides were analyzed using Olympus BX40 microscope with 100x objective under immersion oil without cover glass. Metaphase plates were photographed, and digital pictures of 25 metaphase plates of each species were selected for measurements. Interactive measuring system MicroImage was used to perform the measurements.

Aphid chromosomes are holocentric and lack clear morphological features, therefore they were grouped in descending order by their relative length (chromosome length \*100% / total length of chromosomes in a diploid set): the pair of longest chromosomes was named as 1st and so on. Mean chromosome pair lengths were used to construct idiograms of presumably homologous pairs. To illustrate between-species differences of relative chromosome lengths, cluster analysis was performed. The matrix of squared Mahalanobis distances between group centroids for cluster analysis (linkage method: UPGA) was obtained by a forward stepwise discriminant analysis. Statistica (version 5.5) was used for these calculations.

### **Study of partial DNA sequences**

Two DNA fragments were used in this study: 616 bp length partial sequence of mitochondrial COI (Cytochrome Oxidase subunit I) gene, and 499 bp length partial sequence of nuclear EF-1 $\alpha$  (Elongation Factor-1a) gene. Fifty two samples from eight countries were analyzed and eight European species of the genus *Cryptomyzus* belonging to the subgenus *Cryptomyzus* s. str. were studied.

DNA was extracted from the single aphid with DNA Blood & Tissue Kit (Qiagen) following the manufacture's protocol. Primers and PCR conditions were as in Turčiniavičienė et al. (2006). PCR products were cleaned with QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) following the manufacture's protocol. Cleaned PCR products were dissolved in nuclease free water (Fermentas). Sequencing reactions were performed at the Sequencing Centre of the Institute of Biotechnology (Vilnius, Lithuania).

Nucleotide sequences were aligned with BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1999). To estimate within- and between-species sequence divergences p-distances were calculated. MEGA 4 (Tamura et al., 2007) was applied to compute distances between sequences and to construct phylogenetic trees. For each DNA fragment studied phylogenetic tree was constructed by maximum parsimony method. Bayesian analysis using MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2003) was also performed, and Model test (Posada, 2008) was exploited to select the model. Consensus trees with posterior probabilities were visualized with TreeView (Page, 2001).

### **Study of phylogeny based on biology and morphology**

Thirty characters were used (15 morphological and 15 biological) to obtain phylogeny scheme for 17 species of the genus *Cryptomyzus* based on their morphology and biology. Maximum parsimony phylogenetic tree was constructed with PAUP\*4.0b10 (Swofford, 2003), and the characters defined as specific to subgenera were given additional weight.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Fauna of the aphids of the genus *Cryptomyzus* in Lithuania

Six species of the genus *Cryptomyzus* are listed in the checklist of Lithuanian aphids (Rakauskas et al., 1992; Nieto Nafria et al., 2004): *C. alboapicalis*, *C. galeopsidis*, *C. korschelti*, *C. leonuri*, *C. ribis* and *C. stachydis*. Data on their host plants, sampling localities and dates were published mainly before 1986 (Rakauskas et al., 1992). When the new identification key to European species of genus *Cryptomyzus* was published (Guldmond, 1991a), the microscope slides stored at the collection of Department of Zoology (Faculty of Natural Sciences, Vilnius University) had to be checked. Summarized data on aphids of the genus *Cryptomyzus* collected in Lithuania in 1974–2008 is presented in this chapter. Host plants, sampling localities and dates as well as the researchers, who collected the aphids, are noted in the checklist.

After the checklist of Lithuanian aphids was published (Rakauskas et al., 1992), two species of the genus *Cryptomyzus* new to Lithuania were found: *C. ulmeri* (in 2004) and *C. maudamanti* (in 2007). Therefore, 8 of 10 species of genus *Cryptomyzus* were registered in Lithuania by 2008. *C. ballotae* and *C. heinzei* also are expected as the host plants (*Ballota nigra* and *Stachys officinalis*) needed for their development are distributed in Lithuania (Butkus et al., 1976).

### Life cycles of seven species of the genus *Cryptomyzus* in Lithuania.

Life cycles of two *Cryptomyzus* species, *C. ribis* and *C. galeopsidis*, were previously studied in Lithuania (Pakayckas, 1983, 1986). The biology of *C. ribis* is investigated the best: the peculiarities of its phenology, fecundity and lifespan rates, and species of entomophagous arthropods observed in colonies are known (Pakayckas, 1986). The data on *C. galeopsidis* biology in Lithuania is concerned with two life cycle strategies used by this aphid species (Pakayckas, 1983). The results of experiments carried out in Pakalniškės, Vilnius distr., Lithuania, are presented in this chapter. The life cycles of *C. alboapicalis*, *C. korschelti*, *C. leonuri*, *C. maudamanti* and *C. ulmeri* were not previously studied in Lithuania, and repeated study of *C. galeopsidis* and *C. ribis* life cycles contributed to the knowledge of their biology.

Seven species of the genus *Cryptomyzus* were studied in 2007-2009. Three of them (*C. alboapicalis*, *C. leonuri* and *C. ulmeri*) were holocyclic monoecious on the plants of family Lamiaceae, one (*C. maudamanti*) was obligatively heteroecious and three (*C. galeopsidis*, *C. korschelti* and *C. ribis*) were facultatively heteroecious. The life cycle of *C. stachydis* in Lithuania remained unstudied. This aphid species is rare in Lithuania, and few sampling localities are recorded by now. During the life cycle studies of seven species of the genus *Cryptomyzus* it was observed that up to 12 generations of aphids could mature in Lithuania per one season (from the middle of April to the beginning of November) and from 9 to 28 days were needed for one generation to mature.

The life cycle study of *C. galeopsidis* revealed that there were both obligatively and facultatively heteroecious aphid lines in this species. In facultatively heteroecious lines of *C. galeopsidis* only the first generation of alate viviparous females from black currants could successfully use both winter and summer hosts, contrary to obligatively heteroecious lines with first generation of alate viviparous females migrating only to summer hosts. The fact that no obligatively monoecious aphid lines were observed during this study indicates that the separation of monoecious on black currants subspecies of *C. galeopsidis*, *C. galeopsidis dickeri* Hille Ris Lambers, 1953 is doubtful. The other facultatively heteroecious species *C. ribis* was observed to use the life cycle strategy different from that of *C. galeopsidis* during the experiment: alate viviparous females of *C. ribis* from red currants could migrate only to summer hosts. According to references (Hille Ris Lambers, 1953; Пакаускас, 1986) amphigonic generation of *C. ribis* (oviparae, alate and/or apterous males) can emerge on *Ribes rubrum*. Probably, this is not quite a frequent event as during the study in 2007-2009 only oviparae were observed on *R. rubrum*.

This study was the first to examine the life cycle of *C. leonuri* and this aphid species proved to be a holocyclic monoecious species with its amphigonic generation emerging on *Leonurus cardiaca*. *Lamium album* and *Lamium purpureum* were detected as host plants of *C. leonuri* under experiment conditions, where no choice of host plants was available.



## The application of discriminant analysis to separate morphologically close species of the genus *Cryptomyzus*

To discriminate between apterous viviparous females of *C. alboapicalis* and *C. leonuri* function AL1A was obtained ( $- 0,630 * (dhas1-4) + 0,381 * (srhin3) + 4,360 * (siphon/cauda) - 52,150 * (lrs) - 0,369 * (pt/bant6) - 58,093 * (mawsi) + 11,814$ ; *C. alboapicalis*, if  $AL1A < 0$ , *C. leonuri*, if  $AL1A > 0$ ). This function separates all individuals of *C. leonuri* (n=37) and *C. alboapicalis* (n=60) (100 % effectiveness) from the data set used for this function construction. When function AL1A was applied to the data set for evaluation of its effectiveness (Figure 1), all individuals of *C. alboapicalis* (n=60) and *C. leonuri* (n=39) were classified correctly (100 % effectiveness).

*C. leonuri* alate viviparous females are not included in the identification key to European species of genus *Cryptomyzus* (Guldemon, 1991a) as when this key was compiled the only available morphological description of *C. leonuri* was that of apterous viviparous female. Obtained function AL1B ( $- 65,464 * (ant5b) + 57,515 * (tars2) + 208,394 * (mawsi) - 0,185 * (srhin3) - 86,360 * (hant1) - 2,450$ ; *C. alboapicalis*, if  $AL1AB > -0,5$ , *C. leonuri*, if  $AL1AB < -0,5$ ) allowed discrimination between all individuals of *C. leonuri* (n=25) and *C. alboapicalis* (n=35) (100 % effectiveness) from the data set for function construction. When function AL1B was applied to the data set for evaluation of its effectiveness (Figure 2) all individuals of *C. alboapicalis* (n=34) and *C. leonuri* (n=26) were identified correctly (100 % effectiveness).

The application of discriminant analysis to apterous viviparous females of *C. alboapicalis* and *C. leonuri* showed that some characters from the function AL1A corresponded to those from the identification key: *srhin3*, *siphon/cauda* and *pt/bant6*. Some other characters also turned out to be important in separation of these two aphid species: *dhas1-4*, *lrs* and *mawsi*. Moreover, characters suitable to distinguish between alate viviparous females of *C. alboapicalis* and *C. leonuri* were detected for the first time through the application of discriminant analysis.

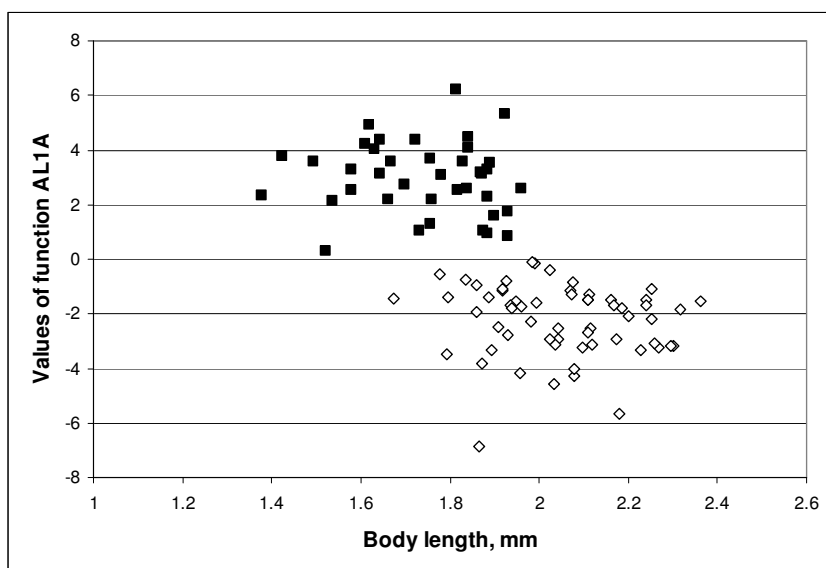


Figure 1. The application of canonical function AL1A to apterous viviparous females of *Cryptomyzus alboapicalis* (■) ir *Cryptomyzus leonuri* (◇). *C. alboapicalis*, if  $AL1A < 0$ ; *C. leonuri*, if  $AL1A > 0$ .

1 paveikslas. Kanoninės funkcios AL1A taikymas *Cryptomyzus alboapicalis* (■) ir *Cryptomyzus leonuri* (◇) besparnėms partenogenetinėms patelėms. *C. alboapicalis*, jei  $AL1A < 0$ ; *C. leonuri*, jei  $AL1A > 0$ .

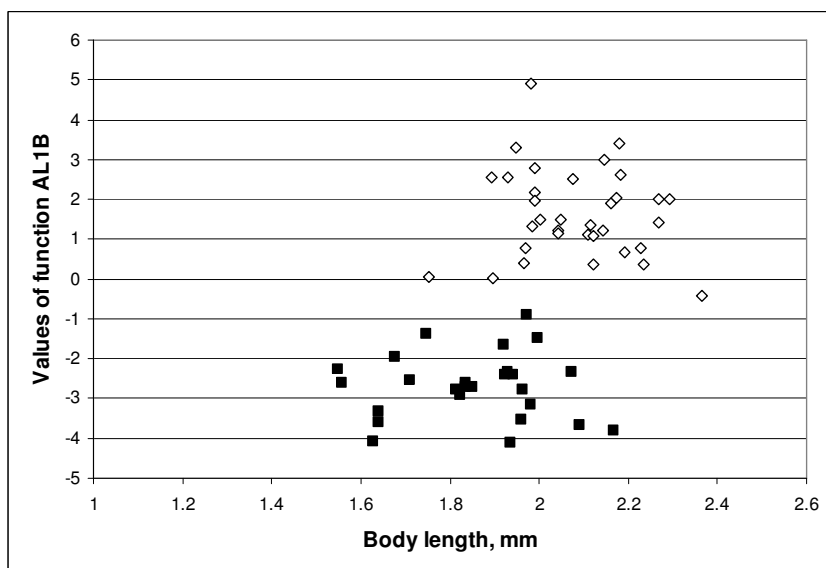


Figure 2. The application of canonical function AL1B to alate viviparous females of *Cryptomyzus alboapicalis* (■) ir *Cryptomyzus leonuri* (◇). *C. alboapicalis*, if  $AL1AB > -0,5$ ; *C. leonuri*, if  $AL1AB < -0,5$ .

2 paveikslas. Kanoninių funkcijų AL1B taikymas *Cryptomyzus alboapicalis* (■) ir *Cryptomyzus leonuri* (◇) sparnuotoms partenogenetinėms patelėms. *C. alboapicalis*, jei  $AL1AB > -0,5$ ; *C. leonuri*, jei  $AL1AB < -0,5$ .

To ensure more precise identification of *C. galeopsidis*, *C. maudamanti* and *C. ulmeri* J. A. Guldemond (1991a) offered two canonical discriminant functions, one of them (LDF-1) allowed separation between *C. ulmeri* and *C. galeopsidis* with *C. maudamanti*, and the other (LDF-2) was constructed for discrimination between *C. galeopsidis* and *C. maudamanti*. When the function LDF-1 ( $0,5 * (dhas3) + 697,6 * (tars2) - 0,7 * (srhin3)$ ; *C. ulmeri* < 49,4 < *C. maudamanti* + *C. galeopsidis*) was applied to the measurements of cloned aphids, 82,1% individuals of *C. galeopsidis* (174 from 212), 85,7 % individuals of *C. maudamanti* (42 from 49) and 85,4 % individuals of *C. ulmeri* (35 from 41) were classified correctly. When the function LDF-2 ( $181,1 * (abhair) + 113,0 * (bant6) + 1,3 * (dhas3) - 327,6 * (hant1)$ ; *C. galeopsidis* < 20,0 < *C. maudamanti*) was applied to measurements the of cloned aphids 64,6 % individuals of *C. galeopsidis* (137 from 212) and 98,0 % individuals of *C. maudamanti* (48 from 49) were classified correctly.

Two functions, GMU1A and GMU2A, were obtained to distinguish between apterous viviparous females of *C. galeopsidis*, *C. maudamanti* and *C. ulmeri*. Function GMU1A ( $86,930 * (cauda/siphon) + 18,273 * (siphon/cauda) - 0,089 * (dhas1-4) + 2,241 * (siphon) + 44,405 * (siphon/body) + 7,290 * (abhair/bant6) - 73,645 * (miwsi) - 90,760$ ; *C. ulmeri*, if GMU1A>5, *C. galeopsidis*+*C. maudamanti*, if GMU1A<5) separates all individuals of *C. galeopsidis* (n=106) and *C. maudamanti* (n=25) from all individuals of *C. ulmeri* (n=20) (100% effectiveness) and function GMU2A ( $13,230 * (cauda/siphon) + 6,935 * (siphon/cauda) - 0,924 * (dhas1-4) - 7,170 * (siphon) + 58,009 * (siphon/body) + 1,909 * (abhair/bant6) - 135,983 * (miwsi) - 32,505$ , *C. maudamanti*, if GMU2A>2; *C. galeopsidis*, if GMU2A<2) discriminates between all individuals of *C. galeopsidis* (n=106) and *C. maudamanti* (n=25) (100% effectiveness) from the data set used for function construction. When function GMU1A was applied to the data set for evaluation of its effectiveness (Figure 3), all individuals of *C. maudamanti* (n=24, 100% effectiveness) and *C. galeopsidis* (n=106, 100% effectiveness) were separated from 20 of 21 individuals of *C. ulmeri* (95,2 % effectiveness). When function GMU2A was applied to the data set for evaluation of its effectiveness (Figure 4), all individuals of *C. maudamanti* (n=24, 100% effectiveness) and 104 individuals of 106 *C. galeopsidis* (98,1% effectiveness) were classified correctly.

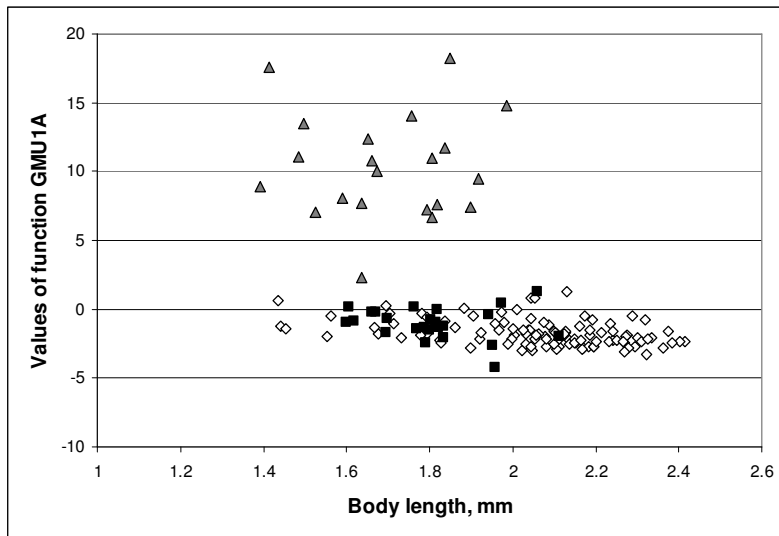


Figure 3. The application of canonical function GMU1A to apterous viviparous females of *Cryptomyzus galeopsidis* (◇), *Cryptomyzus maudamanti* (■) and *Cryptomyzus ulmeri* (▲). *C. ulmeri*, if  $GMU1A > 5$ ; *C. galeopsidis*+*C. maudamanti*, if  $GMU1A < 5$ .

3 paveikslas. Kanoninės funkcios GMU1A taikymas *Cryptomyzus galeopsidis* (◇), *Cryptomyzus maudamanti* (■) ir *Cryptomyzus ulmeri* (▲) besparnėms partenogenetinėms patelėms. *C. ulmeri*, jei  $GMU1A > 5$ ; *C. galeopsidis*+*C. maudamanti*, jei  $GMU1A < 5$ .

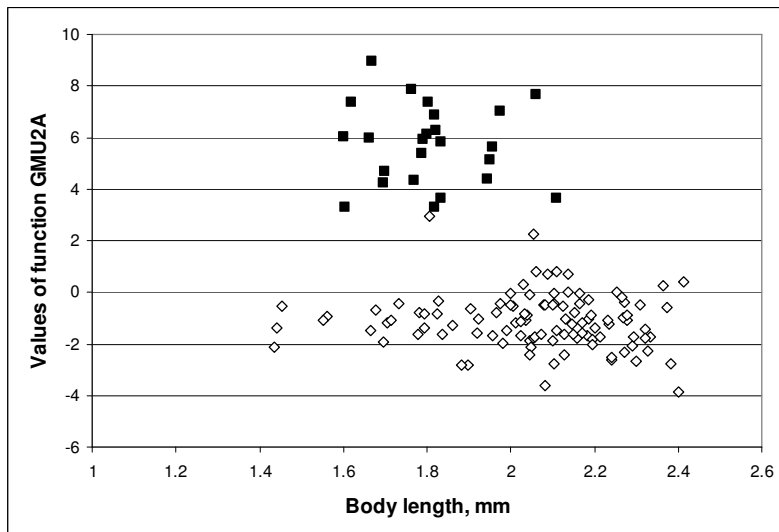


Figure 4. The application of canonical function GMU2A to apterous viviparous females of *Cryptomyzus galeopsidis* (◇) and *Cryptomyzus maudamanti* (■). *C. maudamanti*, if  $GMU2A > 2$ ; *C. galeopsidis*, if  $GMU2A < 2$ .

4 paveikslas. Kanoninės funkcios GMU2A taikymas *Cryptomyzus galeopsidis* (◇) ir *Cryptomyzus maudamanti* (■) besparnėms partenogenetinėms patelėms. *C. maudamanti*, jei  $GMU2A > 2$ ; *C. galeopsidis*, jei  $GMU2A < 2$ .

Two functions, GMU1B and GMU2B, were obtained to discriminate between alate viviparous females of *C. galeopsidis*, *C. maudamanti* and *C. ulmeri*. Function GMU1B ( $0,940 * (dhas1-4) - 0,040 * (srhin3) + 147,389 * (miwsi) - 158,074 * (hant1) + 0,525 * (hlrs) - 8,373$ ; *C. maudamanti*, if GMU1B>3,5, *C. galeopsidis*+*C. ulmeri*, if GMU1B<3,5) separates all individuals of *C. galeopsidis* (n=61) and *C. ulmeri* (n=2) from all individuals of *C. maudamanti* (n=26) (100% effectiveness) and function GMU2B ( $- 0,138 * (dhas1-4) - 0,130 * (srhin3) + 241,602 * (miwsi) + 123,167 * (hant1) + 0,141 * (hlrs) - 1,456$ ; *C. ulmeri*, if GMU2B>4; *C. galeopsidis*, if GMU2B<4) discriminates between all individuals of *C. galeopsidis* (n=60) and *C. ulmeri* (n=2) (100% effectiveness) from the data set used for function construction. When function GMU1B was applied to the data set for evaluation of its effectiveness (Figure 5), 26 of 29 individuals of *C. maudamanti* (89,7% effectiveness) were separated from 61 of 62 individuals of *C. galeopsidis* (98,4% effectiveness) and all individuals of *C. ulmeri* (n=2, 100 % effectiveness). When function GMU2B was applied to the data set for evaluation of its effectiveness (Figure 6), all individuals of *C. ulmeri* (n=2) and *C. galeopsidis* (n=62) were classified correctly (100 % effectiveness).

*C. galeopsidis*, *C. maudamanti* and *C. ulmeri* species group was previously examined morphologically to find out the characters making the discrimination of these species easier and more precise (Guldemon, 1991a). If one compares characters (dhas3, tars2, srhin3, miwsi, abhair, bant6, hant1) used in the functions LDF-1 and LDF-2 (Guldemon, 1991a) with those from the functions GMU1A and GMU2A, one will easily note that they share some of these characters (dhas1-4, miwsi, abhair/bant6) together with other two characters (siphon/body and dhas3) from the identification key (Guldemon, 1991a). Furthermore, through the discriminant analysis relative lengths of cauda and siphon (cauda/siphon and siphon/cauda) proved to be important for separation of *C. galeopsidis*, *C. maudamanti* and *C. ulmeri*.

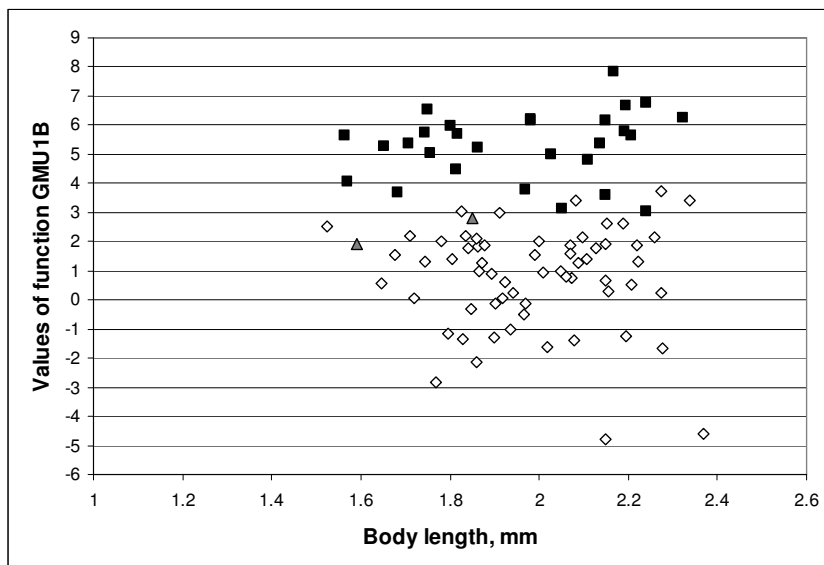


Figure 5. The application of canonical function GMU1B to alate viviparous females of *Cryptomyzus galeopsidis* ( $\diamond$ ), *Cryptomyzus maudamanti* ( $\blacksquare$ ) and *Cryptomyzus ulmeri* ( $\blacktriangle$ ). *C. maudamanti*, if  $GMU1B > 3.5$ , *C. galeopsidis*+*C. ulmeri*, if  $GMU1B < 3.5$ .

5 paveikslas. Kanoninių funkcijų GMU1B taikymas *Cryptomyzus galeopsidis* ( $\diamond$ ), *Cryptomyzus maudamanti* ( $\blacksquare$ ) ir *Cryptomyzus ulmeri* ( $\blacktriangle$ ) sparnuotoms partenogenetinėms patelėms. *C. maudamanti*, jei  $GMU1B > 3,5$ , *C. galeopsidis*+*C. ulmeri*, jei  $GMU1B < 3,5$ .

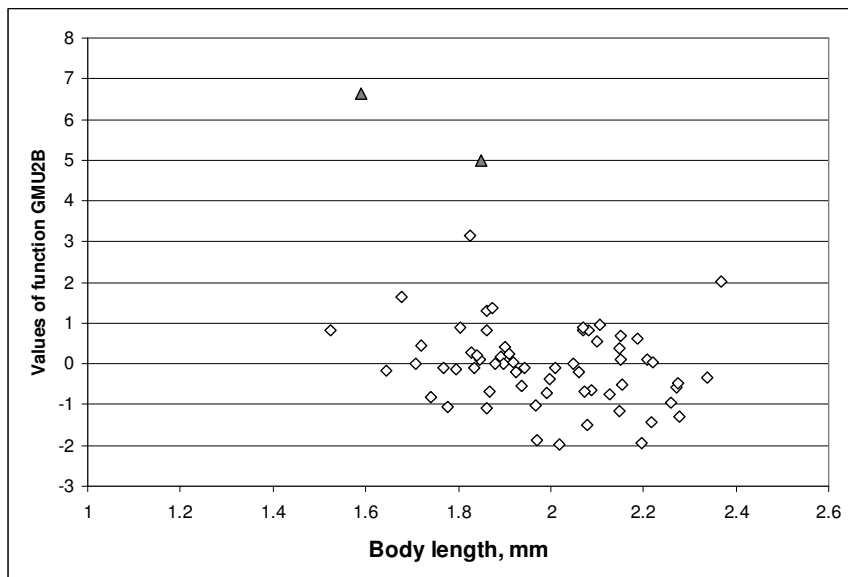


Figure 6. The application of canonical function GMU2B to alate viviparous females of *Cryptomyzus galeopsidis* ( $\diamond$ ) and *Cryptomyzus ulmeri* ( $\blacktriangle$ ). *C. ulmeri*, if  $GMU2B > 4$ ; *C. galeopsidis*, if  $GMU2B < 4$ .

6 paveikslas. Kanoninių funkcijų GMU2B taikymas *Cryptomyzus galeopsidis* ( $\diamond$ ) ir *Cryptomyzus ulmeri* ( $\blacktriangle$ ) sparnuotoms partenogenetinėms patelėms. *C. ulmeri*, jei  $GMU2B > 4$ ; *C. galeopsidis*, jei  $GMU2B < 4$ .

## Karyotypes of the seven aphid species of genus *Cryptomyzus*

The analysis of microscope slides with chromosome spreads of seven cloned aphid species of the genus *Cryptomyzus* revealed that metaphase plates with the diploid chromosome number  $2n=12$  were dominant (from 71,67 to 86,83 %). Karyotypes of all studied species of the genus *Cryptomyzus* were made up of one pair of long, three pairs of medium-sized and two pairs of short chromosomes (Figure 8). The earlier published idiogram of *C. ribis* (Robinson & Chen, 1969) presented one chromosome pair distinctly longer than others, approximately twice the length of the second pair while other chromosomes decreased gradually in size. Such inconsistency to the idiogram based on relative chromosome lengths could be explained by differences in methods used for idiogram construction. In this study the mean values of relative chromosome lengths were used, whereas previously published idiogram (Robinson and Chen, 1969) seems to be constructed using direct measurements from photographs.

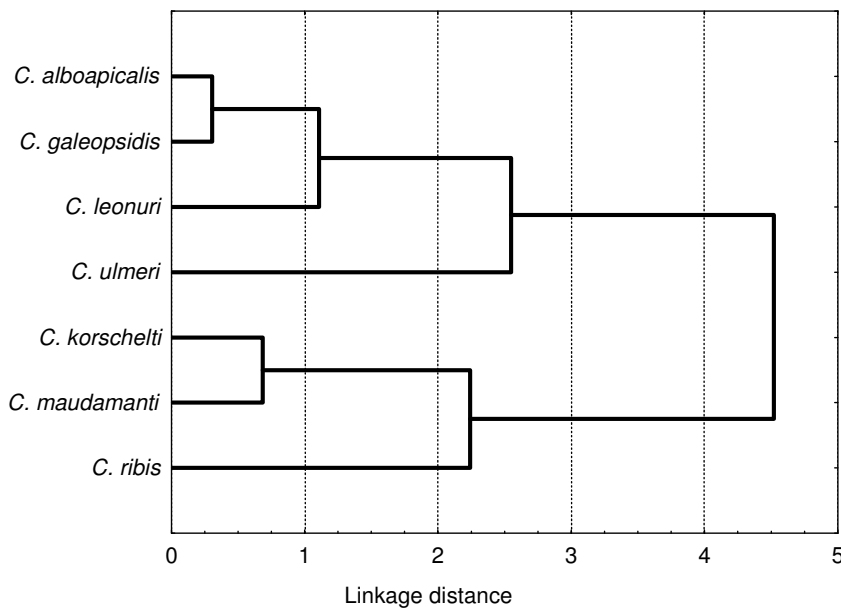


Figure 7. Differences of relative chromosome lengths in haploid sets among seven species of the genus *Cryptomyzus* (squared Mahalanobis distances between group centroids, linkage method: UPGA).

7 paveikslas. Chromosomų santykinių ilgių skirtumai haploidiniame rinkinyje tarp septynių *Cryptomyzus* genties amarų rūšių (kvadratiniai Mahalanobis atstumai tarp grupių centrų, jungimo būdas: UPGA).

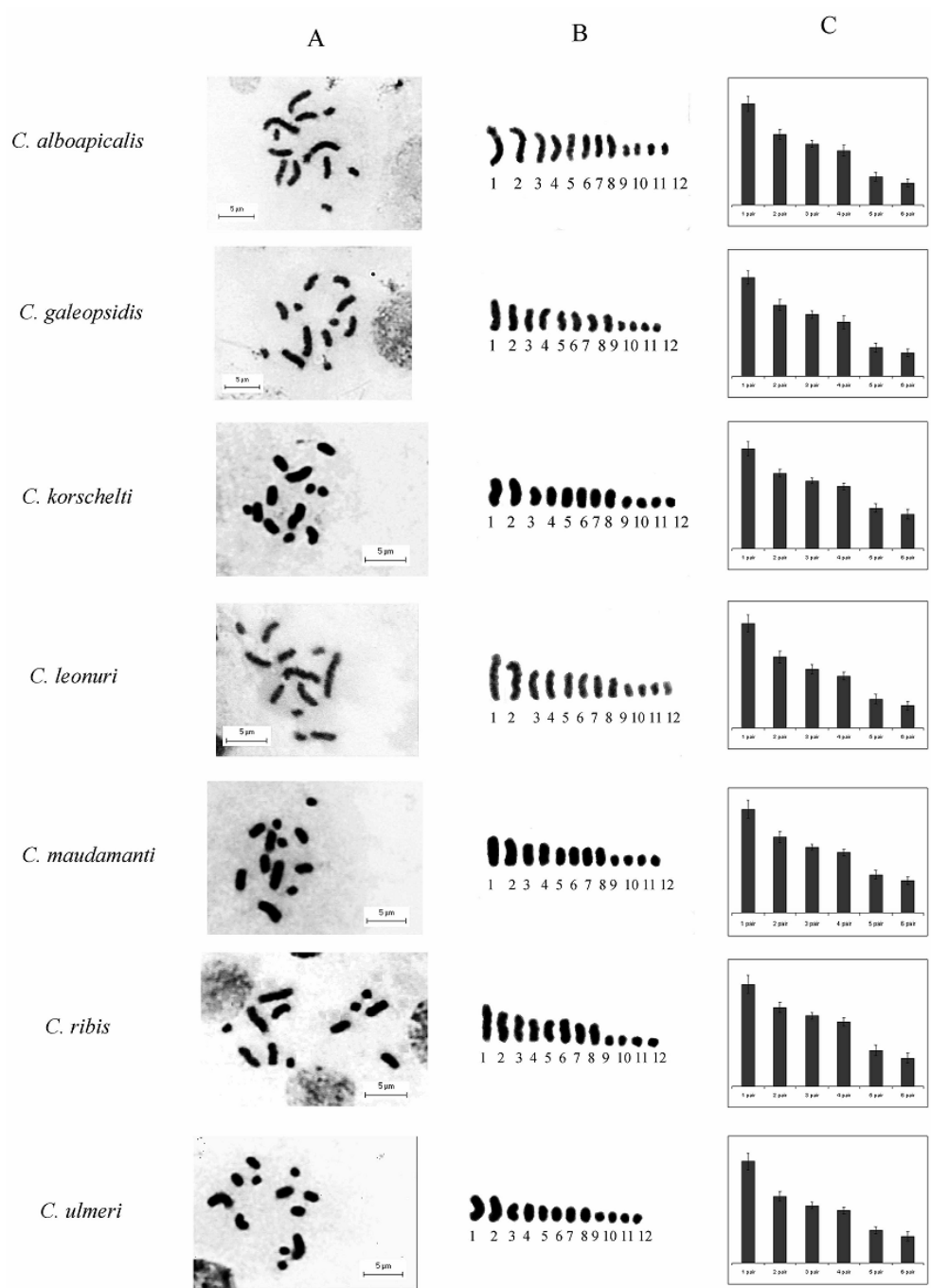


Figure 8. Karyotypes of seven species of the genus *Cryptomyzus*. A – metaphase plates; B – chromosomes grouped by their relative lengths in descending order; C – idiograms of haploid sets based on relative chromosome lengths (column height indicates the mean value, and whiskers show standard deviation).

8 paveikslas. Septynių *Cryptomyzus* genties amarų rūšių kariotipai. A – metafazinės plokštelės; B – chromosomos sugrupuotos pagal santykinius ilgius mažėjimo tvarka; C – haploidinių rinkinių idiogramos sudarytos santykinių ilgių pagrindu (stulpelių aukštis rodo vidurkį, o ūseliai – standartinį nuokrypį).



Cluster analysis was performed to reveal between-species differences of relative chromosome lengths in haploid set. Two main clusters were obtained (Figure 7). One cluster consisted of one species heteroecious between *R. nigrum* and *Galeopsis* sp., *C. galeopsidis*, and three monoecious species from herbaceous plants, *C. alboapicalis*, *C. ulmeri* and *C. leonuri*. The other cluster contained three species related to *R. rubrum* and *R. alpinum* as winter hosts and *Stachys* (*C. korschelti* and *C. ribis*) and *Lamium* (*C. maudamanti*) as summer hosts. This scheme is in some agreement with available phylogenetic reconstruction of the genus *Cryptomyzus*, based on morphological, biological (host plants and life cycles) and certain enzyme electrophoresis (Guldemon & Eggers-Schumacher, 1989; Guldemon, 1990a).

### **Partial COI and EF-1 $\alpha$ DNA sequences of the eight European species of genus *Cryptomyzus***

The alignment of partial COI sequences contained 616 bp, 48 sites were variable and 33 of them were parsimony informative. Nucleotide frequencies were the following: A – 34,8 %, T – 39,9 %, C – 13,0 %, G – 12,3 %. When within-species divergences of partial COI sequences were calculated, their values for all individuals of *C. alboapicalis*, *C. galeopsidis*, *C. leonuri* and *C. maudamanti* turned out to be identical ( $p=0,000$ ). Moreover, there were no differences detected between partial COI sequences of *C. galeopsidis* and *C. maudamanti* ( $p=0,000$ ). The values of between-species divergences were low for *C. ribis* and *C. korschelti* ( $p=0,002$ ).

The alignment of partial EF-1 $\alpha$  sequences contained 499 bp, 48 sites were variable and 39 of them were parsimony informative. Nucleotide frequencies were the following: A – 30,3 %, T – 30,7 %, C – 17,6 %, G – 21,5 %. When within-species divergences of partial EF-1 $\alpha$  sequences were calculated, their values for all individuals of *C. korschelti*, *C. alboapicalis*, *C. galeopsidis*, *C. leonuri* and *C. maudamanti* appeared to be identical ( $p=0,000$ ). Partial EF-1 $\alpha$  sequences of *C. alboapicalis* and *C. galeopsidis* showed low values of between-species divergences ( $p=0,002$ ).

Samples of *C. galeopsidis* and *C. ribis* from 5 countries, including individuals from different host plants and with different life cycle patterns, samples of *C. korschelti* from 4 countries and samples of *C. alboapicalis* and *C. ulmeri* from 2 countries were analyzed, nevertheless, the values of within-species divergences in all *Cryptomyzus* species examined were 0,000-0,003 for partial COI and 0,000-0,002 partial EF-1 $\alpha$  sequences. As the genus *Cryptomyzus*, genus *Megoura* belongs to the tribe Macrosiphini (Remaudière & Remaudière, 1997). When species of the genus *Megoura* were studied, the values of within-species divergences were 0,000-0,004 for partial COI and 0,001-0,003 for partial EF-1 $\alpha$  sequences (Kim & Lee, 2008b). Therefore, the values of within-species divergences detected in *Cryptomyzus* aphids fall into the same interval for both DNA fragment studied.

The values of between-species divergences in studied species of the genus *Cryptomyzus* were 0,000-0,049 for partial COI and 0,002-0,068 for partial EF-1 $\alpha$  sequences. Similar results were observed in species of the genus *Megoura*, as the values of between-species divergences were 0,001-0,052 for partial COI and 0,002-0,080 for partial EF-1 $\alpha$  sequences (Kim & Lee, 2008b). Mean value of between-species divergence for partial COI sequences (0,024) in all analyzed species of the genus *Cryptomyzus* turned out to be lower than that for partial EF-1 $\alpha$  sequences (0,033).

Partial COI sequences are proposed as the tool for aphid species identification (Footitt et al., 2008, 2009). However, the application of this method was limited for some genera of tribe Macrosiphini, *Uroleucon* and *Macrosiphum* (Footitt et al., 2009). The same trend seem to be valid for aphid species of the genus *Cryptomyzus*. Partial COI sequences analyzed in this study were not suitable for discrimination between morphologically similar species with different life cycles, *C. galeopsidis* with *C. maudamanti* and *C. ribis* with *C. korschelti*. Although these pairs of species can be separated if partial EF-1 $\alpha$  sequences analyzed in this study are used. Similar trends are also characteristic of other representatives of tribe Macrosiphini: *Macrosiphum rosae* and *M. knautiae* – *M. sylvaticum* (Turčinavičienė & Rakauskas, 2009).

**Phylogeny schemes of aphid species of the genus *Cryptomyzus* based on partial COI and EF-1 $\alpha$  DNA sequences, morphological and biological characters.**

Examined species of the genus *Cryptomyzus* formed clusters of morphologically similar species in phylogenetic reconstructions based on partial COI sequences (Figure 9). One cluster consisted of *C. heinzei* with *C. ribis* and *C. korschelti*, and there were no clearly defined groups within *C. ribis-C. korschelti* clade. The other cluster was comprised of *C. galeopsidis*, *C. maudamanti*, *C. ulmeri*, *C. alboapicalis* and *C. leonuri* with two clades formed by these species. One clade consisted of two species associated with currants, *C. galeopsidis* and *C. maudamanti*, while the other clade contained monoecious species from herbaceous plants of family Lamiaceae, *C. alboapicalis*, *C. leonuri* and *C. ulmeri*.

Analyzed species of the genus *Cryptomyzus* formed two main clusters in phylogenetic reconstructions based on partial EF-1 $\alpha$  sequences (Figure 10). One cluster was comprised of *C. heinzei*, *C. ribis* and *C. korschelti* with the latter two species clearly separated. The other cluster containing *C. galeopsidis*, *C. maudamanti*, *C. ulmeri*, *C. alboapicalis* and *C. leonuri* was partitioned into two clades. One clade was made up of *C. galeopsidis*, *C. alboapicalis* and *C. ulmeri*, and the other one consisted of *C. maudamanti* and *C. leonuri*. *C. galeopsidis* and *C. maudamanti* were clearly separated in this phylogenetic reconstruction, contrary to that based on partial COI sequences (Figure 9).

Generally, phylogenetic reconstructions based on partial DNA sequences did not contradict with each other, and eight species of the genus *Cryptomyzus* analyzed form the same main clusters containing morphologically similar species (Figures 9 and 10). However, species situation within clusters is not identical, and the correlation with life cycle (monoeciousy and heteroeciousy) was observed in phylogenetic reconstructions based on partial COI sequences, but not in those based on partial EF-1 $\alpha$  sequences. The relations of *C. leonuri* to the other representatives of the genus *Cryptomyzus* was not identical in phylogenetic reconstructions based on partial DNA sequences: its partial COI sequences were closer to those of *C. alboapicalis*, while partial EF-1 $\alpha$  sequences were similar to those of *C. maudamanti*.

In phylogenetic reconstructions based both on mitochondrial and nuclear DNA obtained 8 species of the genus *Cryptomyzus* divided into two main clusters. One cluster consisted of species corresponding to subgenus (Börner, 1930) or genus (Börner, 1952) *Myzella*, that is *C. galeopsidis* and other morphologically similar species, *C. maudamanti*, *C. leonuri*, *C. alboapicalis* and *C. ulmeri*. The other cluster contained species corresponding to C. Börner's subgenus (Börner, 1930) or genus (Börner, 1952) *Cryptomyzus*.

Phylogenetic reconstruction of European species of the genus *Cryptomyzus* offered by J. A. Guldemond (1990a) combined peculiarities of biology, morphology and enzyme electromorphs. Several new Asian species of the genus *Cryptomyzus* belonging to three subgenera (*Cryptomyzus* s. str., *Phlomimyzus* and *Alataumyzus*) were described (Kadyrbekov, 1993, 2000) after the publication of this phylogenetic scheme.

The dendrogram showed in Figure 11 was constructed through summarizing the data on biology (host plants, life cycles and their strategy) and morphology (the main characters from the identification keys to discriminate between these species) of all species of the genus *Cryptomyzus*. All subgenera (*Ampullosiphon*, *Alataumyzus*, *Phlomimyzus* and *Cryptomyzus* s. str.) were separated from each other. The subgenus *Cryptomyzus* s. str. was divided into two clusters with European species forming the same groups as in the phylogenetic reconstructions based on partial DNA sequences (Figures 9 and 10), that is, one cluster consisted of *C. ribis*, *C. korschelti*, *C. heinzei* and *C. ballotae*, and the other one contained *C. alboapicalis*, *C. leonuri*, *C. ulmeri*, *C. galeopsidis* and *C. maudamanti*.

Aphid species *C. stachydis* definitely differs from all, as it is morphologically similar to the representatives of other genera (*Hyperomyzus* and *Nasonovia*). They share the same features of life cycle (host alternation between currants and the plants of family Lamiaceae) with all other representatives of the genus *Cryptomyzus*. *C. malkovskii* is the other species with morphological characters not common for other species of subgenus *Cryptomyzus* s. str.. Therefore, molecular study of *C. stachydis* and *C. malkovskii* together with detailed examination of morphology and biology of the latter species will be useful in revealing whether these species should be included in genus *Cryptomyzus*.

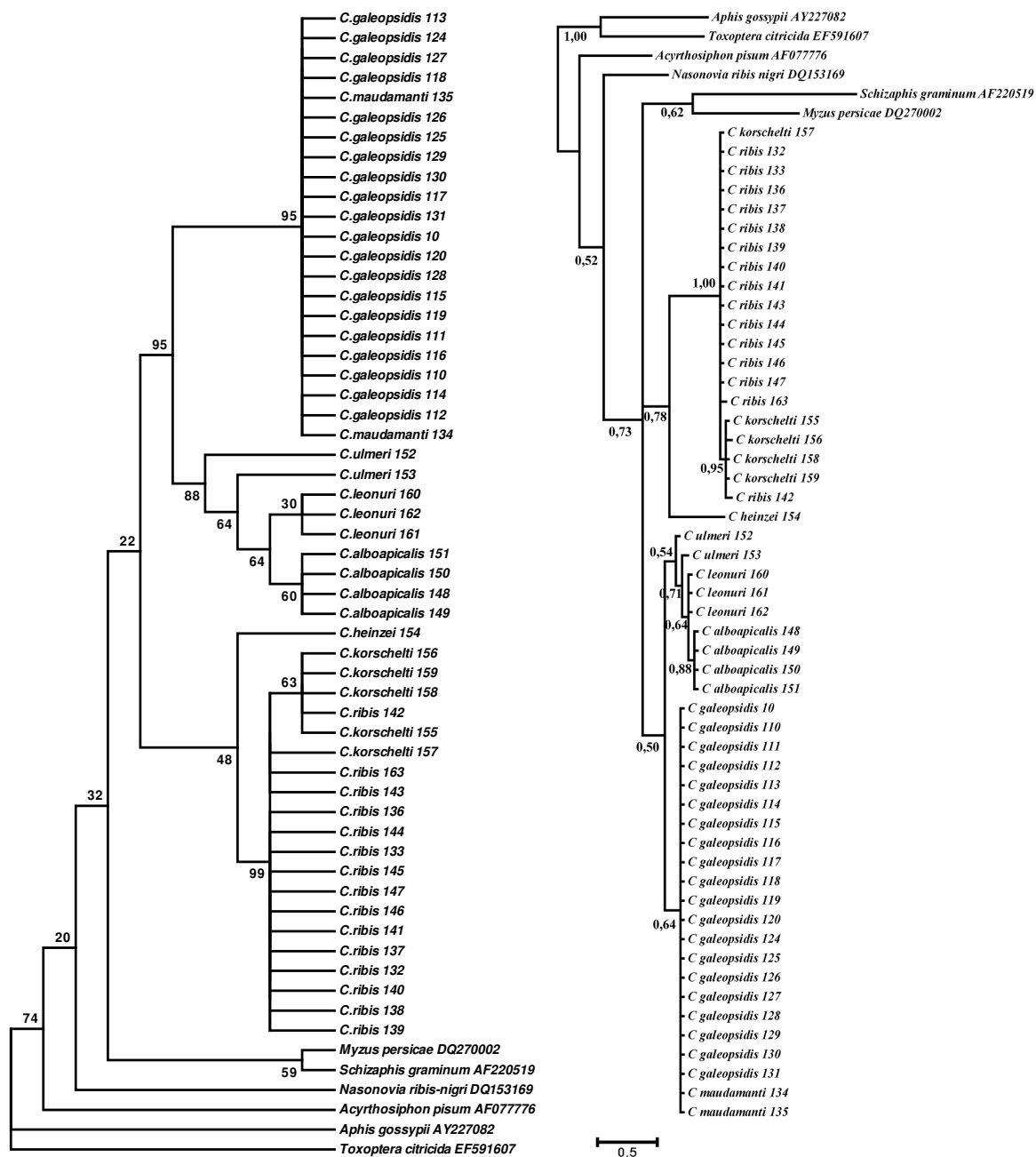


Figure 9. Phylogenetic reconstructions of species belonging to the genus *Cryptomyzus* based on partial COI sequences. Left – constructed by maximum parsimony method (1000 bootstraps, branch support > 20 % is showed), right - constructed by Bayesian inference in phylogeny (posterior probabilities of branch support and substitutions per site are showed).

9 paveikslas. *Cryptomyzus* genties rūšių filogenetiniai medžiai dalinių COI sekų pagrindu. Kairėje – sudarytas maksimalios parsimonijos metodu (1000 pakartotinių imties įkėlimų, parodytos šakų palaikymo reikšmės > 20 %), dešinėje – sudarytas atlikus Bajesinę analizę (parodytos šakų aposteriorinės tikimybės ir pakaitų skaičius vienai sekos vietai).

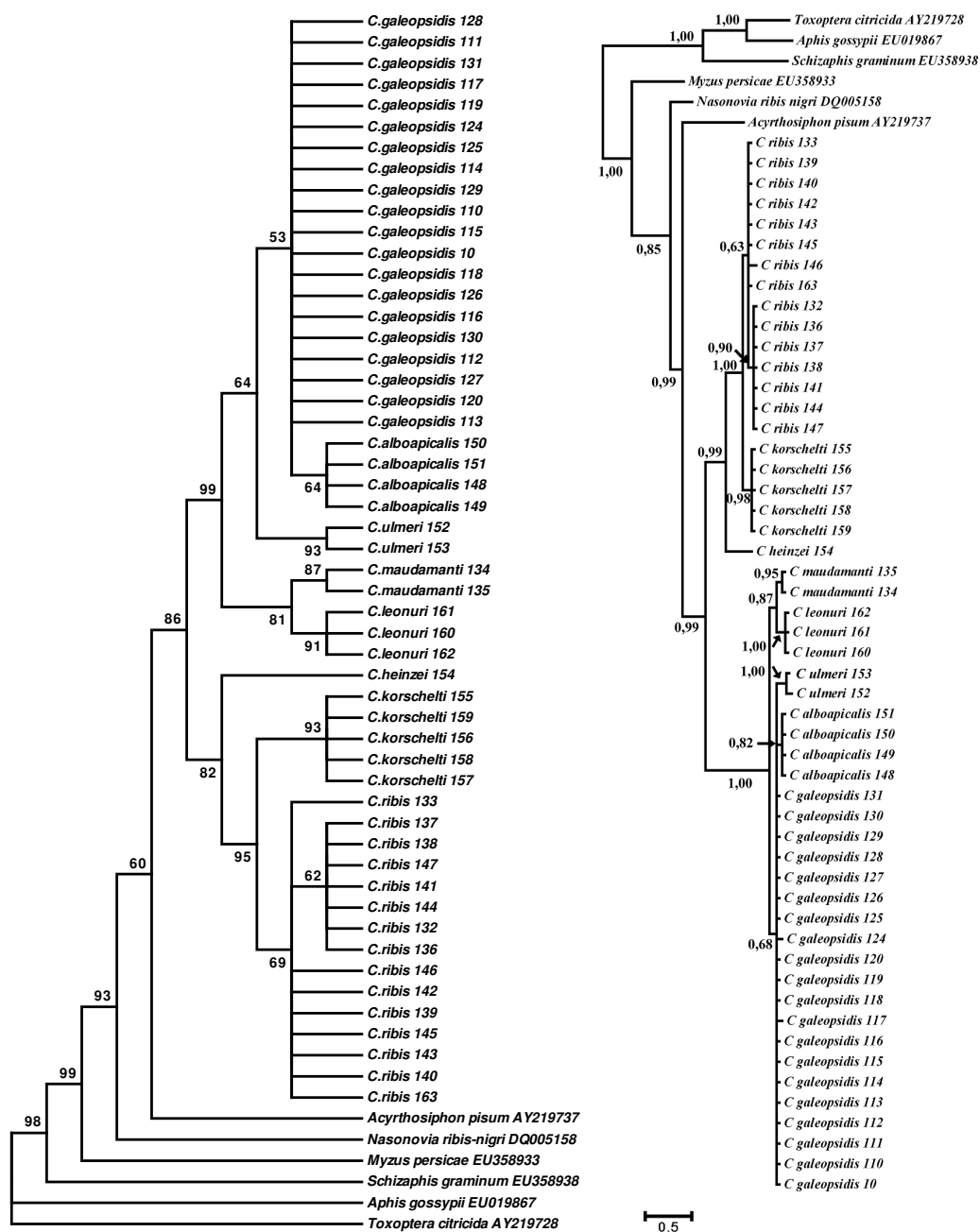


Figure 10. Phylogenetic reconstructions of species belonging to the genus *Cryptomyzus* based on partial EF-1 $\alpha$  sequences. Left – constructed by maximum parsimony method (1000 bootstraps, branch support > 50 % is showed), right - constructed by Bayesian inference in phylogeny (posterior probabilities of branch support and substitutions per site are showed).

10 paveikslas. *Cryptomyzus* genties rūšių filogenetiniai medžiai dalinių EF-1 $\alpha$  sekų pagrindu. Kairėje – sudarytas maksimalios parsimonijos metodu (1000 pakartotinių imties įkėlimų, parodytos šakų palaikymo reikšmės > 50 %), dešinėje – sudarytas atlikus Bajesinę analizę (parodytos šakų aposteriorinės tikimybės ir pakaitų skaičius vienai sekos vietai).

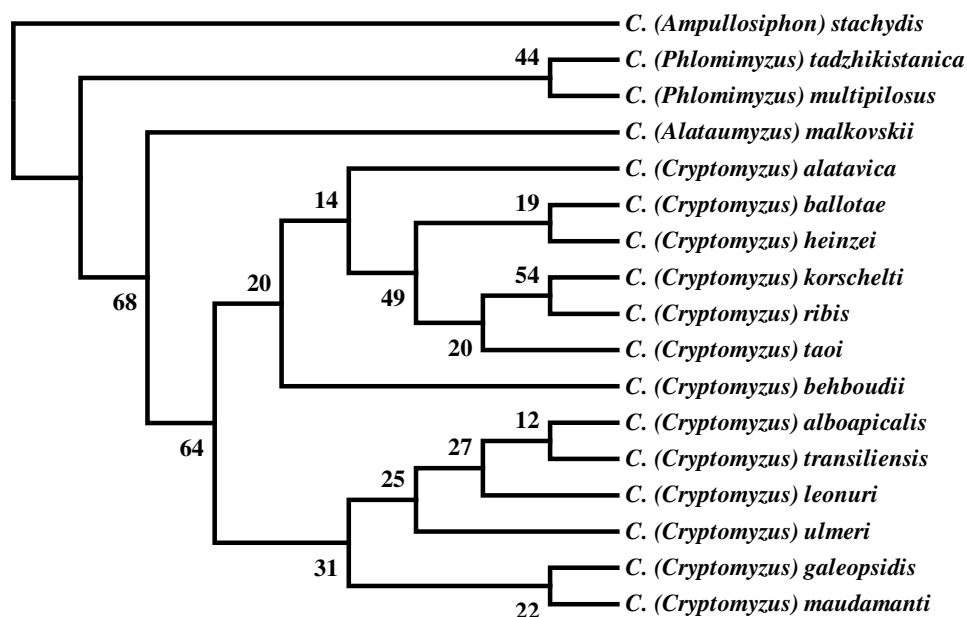


Figure 11. Phylogeny of seventeen species of the genus *Cryptomyzus* based on biology and morphological characters of apterous viviparous females obtained by maximum parsimony method with 1000 bootstraps. 11 paveikslas. Septyniolikos *Cryptomyzus* genties rūšių filogenijos schema pagal biologiją ir besparnių partenogenetinių patelių morfologiją sudaryta maksimalios parsimonijos (MP) metodu, 1000 pakartonių imčių įkėlimų (bootstrap).

The examination of biology and morphology of *C. (Phlomimyzus) multipilosus*, *C. (Phlomimyzus) tadzhikistanica*, *C. (Alataumyzus) malkovskii*, *C. (Cryptomyzus) alatavica*, and *C. (Cryptomyzus) transiliensis* is important to obtain phylogenetic reconstruction of all species belonging to the genus *Cryptomyzus*. Samples of other species of the genus *Cryptomyzus* not included in this study are required to find molecular markers suitable both for identification of morphologically similar species and phylogenetic analysis.

**Identification key to the European species of the genus *Cryptomyzus* belonging to the subgenus *Cryptomyzus* s. str..**

In this chapter identification keys to apterous and alate viviparous females, oviparae and males are provided. They were compiled using the results of morphometric and discriminant analysis of seven cloned aphid species of the genus *Cryptomyzus*.

**Summary of the study results**

In this chapter the main results of the study are briefly discussed.

## CONCLUSIONS

1. Eight of ten European species of genus *Cryptomyzus* are now registered in Lithuania.
2. Among species examined in 2007-2009 three were holocyclic monoecious (*C. alboapicalis*, *C. leonuri*, *C. ulmeri*) on the plants of family Lamiaceae, one was holocyclic obligatively heteroecious (*C. maudamanti*) and three were holocyclic facultatively heteroecious (*C. galeopsidis*, *C. korschelti*, *C. ribis*).
3. During the life cycle studies of three monoecious and four heteroecious species of the genus *Cryptomyzus* it was observed that up to 12 generations of aphids could mature in Lithuania per one season and from 9 to 28 days on average were needed for one generation to mature.
4. Facultatively heteroecious lines of *C. galeopsidis* and *C. ribis* use two different life cycle strategies in Lithuania. The first generation of alate viviparous females of *C. galeopsidis* from *Ribes nigrum* could successfully live both on *R. nigrum* and *Galeopsis tetrahit*, while alate viviparous females of *C. ribis* could live only on *Stachys palustris* and other herbaceous plants, but not on *R. rubrum*, where the descendants of apterous viviparous females lived till autumn.
5. *C. leonuri* proved to be a holocyclic monoecious species with its amphigonic generation, alate males and oviparae, emerging on *Leonurus cardiaca*. It was also detected that *Lamium album* and *Lamium purpureum* were used as host plants by *C. leonuri* under experiment conditions.
6. Canonical discriminant functions constructed to distinguish between *C. alboapicalis* and *C. leonuri* and between *C. galeopsidis*, *C. maudamanti* and *C. ulmeri* both apterous and alate viviparous females have effectiveness of 90-100 %.
7. Karyotypes of seven species of the genus *Cryptomyzus* have  $2n=12$  chromosomes in diploid set and are made up of one pair of long, three pairs of medium-sized and two pairs of short chromosomes.
8. The values of within-species divergences are low both for partial COI ( $p=0,000-0,003$ ) and EF-1 $\alpha$  ( $p=0,000-0,002$ ) DNA sequences in seven studied species of genus *Cryptomyzus*.



9. Partial COI sequences did not allow discrimination between morphologically similar species with different life cycles, *C. galeopsidis* and *C. maudamanti*, and *C. korschelti* and *C. ribis*. Although these species pairs could be separated if partial EF-1 $\alpha$  sequences were used.
10. Phylogenetic reconstructions based on partial COI and EF-1 $\alpha$  DNA sequences did not contradict with each other and eight species of the genus *Cryptomyzus* analyzed formed the same main clusters containing morphologically similar species.
11. In the phylogenetic reconstruction based on morphological and biological features the subgenus *Cryptomyzus* s. str. was divided into two clusters with European species forming the same groups as in the phylogenetic reconstructions based on partial COI and EF-1 $\alpha$  DNA sequences
12. The separation of *C. galeopsidis* subspecies, heteroecious *C. galeopsidis galeopsidis* and monoecious on black currants *C. galeopsidis dickeri*, is not supported in this study as no obligatively monoecious line were observed and partial mitochondrial (COI) and nuclear (EF-1 $\alpha$ ) DNA sequences of cloned *C. galeopsidis* with different variations of life cycles were identical (p=0,000).

## ĮVADAS

### Darbo aktualumas

Amarai (Hemiptera, Sternorrhyncha, Aphidoidea) yra mažai judrūs kolonijiniai augalėdžiai vabzdžiai, kai kurios jų rūšys gerai žinomos kaip žemės ūkio, sodininkystės, daržininkystės ir miškininkystės kenkėjai. Amarams būdingas sudėtingas gyvenimo ciklas, kai per sezoną atsiranda kelios skirtingos suaugėlių morfos, ir gerai išreikšta mitybinė specializacija. Be to, yra nemažai amarų rūšių, keičiančių mitybinius augalus sezono metu. Diploidinės partenogenezės ir greito dauginimosi dėka genotipas, kuris kitose gyvūnų grupėse būtų būdingas tik vienam individui, žymiai pagausėja (Heie, 1987). Maitindamiesi augalų karnienos sultimis arba parenchimos skysčiu (Minks ir Harrewijn, 1987), amarai ne tik tiesiogiai pažeidžia augalus, bet ir perneša virusinių ligų sukėlėjus (Minks ir Harrewijn, 1987). Dėl šios priežasties tikslus amarų rūšių atpažinimas, žinios apie jų rūšinę sudėtį ir mitybinę specializaciją regione yra labai svarbūs priimant sprendimus dėl augalų apsaugos nuo kenkėjų priemonių panaudojimo.

Pasaulyje registruota apie 4700 amarų rūšių (Remaudière ir Remaudière, 1997), iš jų 18 priklauso genčiai *Cryptomyzus* (Remaudière ir Remaudière, 1997; Holman, 2009). Šios genties atstovai yra svarbūs tiek praktiniu požiūriu, kaip vabzdžiai, susiję su žemės ūkio kultūromis, tiek teoriniu požiūriu, kaip simpatrinio amarų rūšių susidarymo modelis (Guldemon, 1990a, 1992; Guldemon ir Dixon, 1994). *Cryptomyzus* yra Palearktikos gentis, nors kai kurios rūšys pateko į Nearktinę sritį (Nieto Nafria ir kt., 2004). Europoje registruota 10 rūšių, priklausančių dviem pogenčiams: viena pogenčio *Ampullosiphon* rūšis ir 9 *Cryptomyzus* s. str. pogenčio rūšys (Nieto Nafria ir kt., 2004) iš 14 žinomų pasaulyje. Dvidešimto amžiaus viduryje remiantis tuo metu aprašytų rūšių morfologija buvo siūloma pogenčių *Cryptomyzus* s. str. skelti iš pradžių į du pogenčius (Börner, 1930), o vėliau – į dvi gentis (Börner, 1952). Panašų rūšių suskirstymą gavo J. A. Guldemonas (Guldemon, 1990a), ištyręs daugumos (9 iš 10) europinių *Cryptomyzus* genties rūšių mitybinę specializaciją ir baltymų elektromorfą. Kol kas nepaskelbta jokių duomenų, ar šie pastebėti morfologijos ir biologijos skirtumai taip pat atsispindi dalinėse DNR sekose.

Europoje registruotos *Cryptomyzus* genties rūšys yra ištirtos geriausiai: aprašyta dauguma jų morfų, žinomi mitybiniai augalai ir gyvenimo ciklai, nustatytas daugumos rūšių chromosomų skaičius diploidiniame rinkinyje. Tačiau trūksta žinių apie šios genties amarų gyvenimo ciklus lauko sąlygomis, kariotipų struktūrą ir DNR sekas. Be to, iki šiol likę kai kurie neišspręsti klausimai. Vienas jų yra dėl *C. galeopsidis* porūšių. Pagrindiniuose kataloguose (Remaudière ir Remaudière, 1997; Holman, 2009) minimi trys *C. galeopsidis* porūšiai (*C. galeopsidis galeopsidis*, *C. galeopsidis citrinus* ir *C. galeopsidis dickeri*), kuriuos išskyrė D. Hille Ris Lambersas (Hille Ris Lambers, 1953), remdamasis šių amarų gyvenimo ciklo ypatybėmis. *C. galeopsidis* rūšies amarų linijų, turinčių skirtingus gyvenimo ciklo variantus baltymų elektromorfų ir hibridologinių tyrimų pagrindu, J. A. Guldmondas (Guldmond, 1991a) parodė, kad dvinamių ir vienanamių porūšių išskyrimas nėra pagrįstas. Tai iki šiol nebuvo patikrinta dalinių DNR sekų tyrimais. Kitas neišspręstas klausimas yra *C. leonuri* gyvenimo ciklas. Dažniausiai nurodoma, kad šios amarų rūšies gyvenimo ciklas nežinomas (Guldmond, 1991a; Blackman ir Eastop, 2006). *Cryptomyzus* genties atpažinimo raktuose naudojami tik besparnių partenogenetinių patelių morfologiniai požymiai (Guldmond, 1991a; Blackman ir Eastop, 2006) arba ši rūšis visiškai nėra įtraukta į atpažinimo raktus (Heie, 1994).

Lietuvoje iki 2004 metų buvo registruotos 6 *Cryptomyzus* genties amarų rūšys (Rakauskas ir kt., 1992; Nieto Nafria ir kt., 2004). Iš jų geriausiai ištirta tik *C. ribis* biologija (Pakayckac, 1986), yra duomenų apie *C. galeopsidis* gyvenimo ciklą (Pakayckac, 1983), o vienanamės rūšys, gyvenančios ant žolinių augalų, Lietuvoje anksčiau nebuvo tirtos.

### **Darbo tikslas ir uždaviniai**

Šio darbo tikslas yra ištirti Lietuvoje sutinkamų *Cryptomyzus* genties amarų biologiją, taksonomiją ir filogenetinius ryšius. Tikslui pasiekti iškelti tokie uždaviniai:

1. Išsiaiškinti *Cryptomyzus* genties amarų rūšinę sudėtį Lietuvoje.
2. Ištirti Lietuvoje sutinkamų *Cryptomyzus* genties rūšių biologijos ypatybes: mitybinius augalus, gyvenimo ciklus, kartų skaičių per sezoną, vidutinį vienos kartos subrendimo laiką.

3. Atlikti *Cryptomyzus* genties rūšių morfometrinius tyrimus, sudaryti diskriminantines funkcijas morfologiškai artimų rūšių besparnėms ir sparnuotoms partenogenetinėms patelėms atskirti ir patikrinti šių funkcijų veiksmingumą.
4. Ištirti klonuotų *Cryptomyzus* genties rūšių kariotipus.
5. Palyginti *Cryptomyzus* genties rūšių dalines mitochondrinės (COI) ir branduolio (EF-1 $\alpha$ ) DNR sekas.
6. Atlikti Europoje registruotų *Cryptomyzus* rūšių filogenetinę analizę dalinių DNR sekų pagrindu.
7. Atlikti Palearktikoje žinomų *Cryptomyzus* rūšių filogenetinę analizę morfologinių požymių ir biologijos ypatybių pagrindu.
8. Remiantis morfologiniais požymiais ir biologijos ypatybėmis sudaryti Europinių *Cryptomyzus* s. str. pogenčio rūšių atpažinimo raktą.

#### **Ginamieji teiginiai**

1. Lietuvoje registruota dauguma Europoje žinomų *Cryptomyzus* genties amarų rūšių.
2. Lietuvoje gyvenančių fakultatyviai dvinamių rūšių *C. galeopsidis* ir *C. ribis* gyvenimo ciklo strategijos yra skirtingos.
3. Lietuvoje *C. leonuri* yra holociklinė vienanamė rūšis.
4. Pasiūlytos kanoninės diskriminantinės funkcijos sudarytos *C. alboapicalis* ir *C. leonuri* bei *C. galeopsidis*, *C. maudamanti* ir *C. ulmeri* besparnėms ir sparnuotoms partenogenetinėms patelėms remiantis morfologiniais požymiais.
5. Tirtoms *Cryptomyzus* genties rūšims būdingas vienodas chromosomų skaičius diploidiniame rinkinyje ( $2n = 12$ ) ir panaši kariotipo struktūra.
6. Tirtų *Cryptomyzus* genties rūšių mitochondrinės (COI) ir branduolio (EF-1 $\alpha$ ) DNR dalinių sekų vidurūšiniai skirtumai nežymūs.
7. Tirtų *Cryptomyzus* genties rūšių mitochondrinės (COI) ir branduolio (EF-1 $\alpha$ ) DNR dalinių sekų tarprūšinių atstumų reikšmės yra skirtingos.
8. Filogenijos schemas, sudarytos mitochondrinės (COI) ir branduolio (EF-1 $\alpha$ ) dalinių DNR sekų pagrindu, neprieštarauja morfologinių požymių pagrindu sudarytai *Cryptomyzus* rūšių filogenijos schemai.

9. Gyvenimo ciklą ir dalinių mitochondrinės (COI) ir branduolio (EF-1 $\alpha$ ) DNR sekų tyrimų rezultatai parodė, kad *C. galeopsidis* porūšių, dvinamio *C. galeopsidis galeopsidis* ir vienanamio ant juodųjų serbentų *C. galeopsidis dickeri*, išskyrimas neturi pagrindo.

### **Darbo mokslinis naujumas**

1. Tyrimų metu rastos dvi Lietuvai naujos *Cryptomyzus* genties amarų rūšys: *C. ulmeri* ir *C. maudamanti*.
2. Pirmą kartą ištirti *C. alboapicalis*, *C. ulmeri*, *C. korschelti*, *C. leonuri* ir *C. maudamanti* gyvenimo ciklai Lietuvos sąlygomis.
3. Aprašytas *C. leonuri* gyvenimo ciklas ir anksčiau nežinomos šios rūšies morfos: sparnuotos partenogenetinės patelės, sparnuoti patinai ir oviparos, bei atnaujintas besparnės partenogenetinės patelės aprašymas.
4. Pagal bendrą schemą atlikti klonuotų amarų rūšių morfometrinių tyrimai ir diskriminantinės analizės taikymas leido surasti požymius ir jų kombinacijas morfologiškai artimų rūšių besparnėms ir sparnuotoms partenogenetinėms patelėms, oviparoms ir patinams atskirti.
5. Sudarytos septynių europinių *Cryptomyzus* genties amarų rūšių kariotipų idiogramos, dviejų rūšių, *C. leonuri* ir *C. ulmeri*, kariotipai aprašyti pirmą kartą.
6. Pirmą kartą gautos aštuonių europinių *Cryptomyzus* genties amarų rūšių dalinės mitochondrinės (COI) ir branduolio (EF-1 $\alpha$ ) DNR sekos, įvertinti vidurūšiniai ir tarprūšiniai gautų sekų skirtumai bei sudarytos filogenijos schemos dalinių DNR sekų pagrindu.
7. Apibendrinus žinias apie 17 *Cryptomyzus* genties rūšių biologiją ir morfologiją, sudaryta jų filogenijos schema.
8. Sudaryti Europoje registruotų *Cryptomyzus* s. str. pogenčio rūšių atpažinimo raktai besparnėms ir sparnuotoms partenogenetinėms patelėms, patinams ir oviparoms.

### **Mokslinė ir praktinė darbo reikšmė**

Klonuojant amarus stacionare lauko sąlygomis buvo surinkti duomenys apie jų biologiją, sukaupta medžiaga morfometriniams, citogenetiniams ir molekuliniais

tyrimams. Atlikta amarų su žinomais gyvenimo ciklais morfometrinė analizė kartu su diskriminantinės analizės panaudojimu leis patobulinti dabar žinomus europinių *Cryptomyzus* genties rūšių atpažinimo raktus. Dalinių DNR sekų tyrimų rezultatai pasitarnaus molekulinį žymenų, tinkančių morfologiškai artimoms rūšims atskirti, parinkimui bei vidurūšinių, tarprūšinių skirtumų ir filogenetinių ryšių įvertinimui.

### **Rezultatų pristatymas ir aprobavimas**

Disertacijos tema paskelbti 3 moksliniai straipsniai ISI Master Journal List sąrašo žurnaluose.

### **Disertacijos apimtis ir struktūra**

Disertaciją sudaro šie skyriai: Įvadas, Literatūros apžvalga (3 poskyriai), Tyrimų metodai (6 poskyriai), Tyrimų rezultatai (8 poskyriai), Išvados, Literatūros sąrašas (83 šaltiniai), Publikacijų disertacijos tema sąrašas ir Priedai. Disertacijos su priedais apimtis 172 psl., pagrindinio teksto apimtis 130 psl., yra 26 lentelės ir 39 paveikslai, priedus sudaro 14 lentelių. Disertacijos tekstas parašytas lietuvių kalba su santrauka anglų kalba.

### **Padėkos**

Norėčiau padėkoti savo mokslinio darbo vadovui prof. hab. dr. Rimantui Rakauskui už vertingus patarimus ir pagalbą planuojant ir atliekant tyrimus, ruošiant publikacijas ir rengiant disertacijos rankraštį. Taip pat dėkoju doc. dr. Jurgai Turčinavičienei už paraginimą atlikti citogenetinius tyrimus, visokeriopą pagalbą įsisavinant molekulinį tyrimų metodus ir gautų duomenų apdorojimo būdus. Esu dėkinga dr. Jaroslavui Holmanui ir dr. Janui Havelkai iš Čekijos mokslų akademijos Biologijos centro Entomologijos instituto už galimybę dirbti amarų kolekcijoje. Dėkoju Eglei Kananovičiūtei už amarų mėginius iš Kėdainių r., kurie buvo panaudoti gyvenimo ciklo tyrimams. Poniai Eglei Rudokienei iš Sekvenavimo centro (Biotechnologijos institutas, Vilnius) norėčiau padėkoti už sekvenavimo reakcijų atlikimą. Taip pat dėkoju visam Zoologijos katedros personalui už gerą atmosferą darbe.

Tyrimai buvo dalinai finansuojami Lietuvos Valstybinio mokslo ir studijų fondo, projekto registracijos Nr. C 08023.

Dėkoju šalia stacionaro įsikurusioms Baniuševičių ir Bareišų šeimoms už tolerantišką požiūrį į amarų gyvenimo ciklą tyrimus ir Kaljumäe šeimai už svetingumą ekspedicinio vizito Estijoje metu. Taip pat dėkoju visiems giminaičiams ir draugams, kurie visą laiką nuoširdžiai domėjosi mano darbu. Ypatinga padėka mano mamai Larisai už jos kasdienę paramą ir palaikymą.

## LITERATŪROS APŽVALGA

Skyrių sudaro trys poskyriai, kuriuose pateikta *Cryptomyzus* genties amarų bendra charakteristika, pristatyta šios genties tyrimų būklė pasaulyje, Europoje ir Lietuvoje.

## MEDŽIAGA IR METODAI

### Faunos tyrimai.

Ruošiant apibendrinimą apie *Cryptomyzus* genties amarų fauną Lietuvoje, buvo patikrinti VU GMF Zoologijos katedros kolekcijoje saugomi amarų mikroskopiniai preparatai. Mėginiai buvo rinkti šių tyrėjų (pagal pavardes abėcėlės tvarka): J. Bašilovos (nuo 2003 m.), R. Grigaliūnaitės (1997 m.), R. Kairaitytės (2008 m.), E. Kananovičiūtės (2007 m.), V. Kudirkaitės (2004–2005 m.), R. Rakausko (nuo 1974 m.), Z. Strumskytės (1978–1979 m.) ir J. Trukšinitės (2006–2007 m.). Mėginiai surinkti šiose apskrityse (skaičiai skliaustuose yra vietovių skaičius): Klaipėdos (8), Telšių (2), Šiaulių (4), Panevėžio (27), Kauno (6), Marijampolės (3), Utenos (22), Vilniaus (21) ir Alytaus (9). Apžvalgai taip pat panaudotos publikacijos (Рупайс, 1966; Рупайс ir Юронис, 1983; Юронис, 1984), kur yra duomenų apie *Cryptomyzus* genties amarų paplitimą ir mitybinius augalus Lietuvoje. Amarų atpažinimui pagal morfologinius požymius naudoti J. A. Guldemondo (Guldemon, 1991a) bei R. L. Blackmano ir V. F. Eastopo (Blackman ir Eastop, 2006) sudaryti raktai.

### Gyvenimo ciklų tyrimai.

Gyvenimo ciklų tyrimai atlikti stacionare Pakalniškėse, Vilniaus rajone, 2007–2009 metais. Tyrimams panaudotos septynios Lietuvoje randamos *Cryptomyzus* genties amarų rūšys, priklausančios pogenčiui *Cryptomyzus* s. str.. Amarų kolonijos buvo laikomos

izoliatoriuose lauke. Mitybinių augalų ir amarų kolonijų būklė tikrinta du kartus per savaitę, kas tris–keturias dienas. Lauke surinkti notrelinių šeimos augalai vėliau buvo auginami izoliuotuose vazonuose. Kruopščiai patikrinus serbentų ūglius ant šakų buvo uždedami ūgliniai izoliatoriai. Kai amarų kolonijos pasidarydavo labai tankios, ant naujo mitybinio augalo buvo perkeliamos 5–10 individų grupės, priklausomai nuo amarų ir augalo dydžio. Atsiradus sparnuotoms partenogenetinėms patelėms, buvo imituojama migracija, tai yra, 5–15 individų grupės, priklausomai nuo amarų ir augalo dydžio, buvo perkeliamos į kitą izoliatorių. Amarų mėginiai buvo renkami į 70 % (morfologinių preparatų gamybai) ir 96 % (molekuliniams tyrimams) etanolį. Kiekvienai tirtai amarų linijai buvo paskaičiuotas amarų kartų skaičius per sezoną ir laiko (dienomis), reikalingo vienai kartai subręsti, vidurkis ir standartinis nuokrypis.

### **Morfologiniai ir morfometriniai tyrimai.**

Morfologiniams ir morfometriniams tyrimams buvo panaudoti klonuotų amarų mėginiai, surinkti 2007–2009 metais. Iš amarų, surinktų į 70 % etanolį, buvo ruošiami mikroskopiniai preparatai Kanados balzame pagal modifikuotą metodiką, aprašytą R. L. Blackmano ir V. F. Eastopo (Blackman ir Eastop, 2000). Iš trijų atpažinimo raktų su morfu aprašymu (Hille Ris Lambers, 1953; Guldemon 1991a; Heie, 1994) buvo atrinkti požymiai morfometrinei analizei (1 lentelė). Matavimai atlikti naudojant mikroskopą Olympus BX40 ir matavimo programą MicroImage. Pradinis matavimų apdorojimas atliktas naudojant Excel 2003, kitiems skaičiavimams atlikti naudota programa Statistica (versija 5.5) .

Amarų su žinomais gyvenimo ciklais morfu diskriminantinei analizei buvo naudojami matuojamieji ir skaičiuojamieji požymiai bei kai kurių požymių santykiniai ilgiai. Pearsono koreliacijos koeficientai ( $r$ ) paskaičiuoti kiekvienos morfos visam duomenų masyvui, ir iš analizės pašalinti požymiai, turintys vidutinio stiprumo, stiprų ar labai stiprų statistiškai reikšmingą ryšį ( $p < 0,05$ ) su kūno ilgiu (koreliacijos koeficientas  $|r| \geq 0,5$ ). Duomenų masyvas buvo padalintas į dvi dalis: viena dalis buvo panaudota kanoninės funkcijos sudarymui, o kita dalis šios funkcijos veiksmingumui įvertinti. Atliekant pažingsninę diskriminantinę analizę „į priekį“ (angl. forward stepwise) pirmiausia buvo naudojamas visas duomenų masyvas iš matuojamųjų, skaičiuojamųjų požymių ir santykinių



ilgių. Po to procedūra buvo kartojama iš duomenų masyvo pašalinus santykinus ilgius. Iš dviejų tipų funkcijų išsirinktos veiksmingiausios. Skaičiavimams atlikti panaudota programa Statistica (versija 5.5).

### **Citogenetiniai tyrimai.**

Citogenetiniams tyrimams buvo naudojami septynių *Cryptomyzus* genties rūšių klonuoti amarai. Ruošiant chromosomų preparatus buvo panaudotas modifikuotas ląstelių suspensijos metodas (Blackman, 1985; Turčinavičienė ir kt., 1997). Paruošti preparatai analizuojami Olympus BX40 mikroskopo 100x objektyvu su imersiniu aliejumi be dengiamojo stikliuko. Metafazinės plokštelės buvo fotografuojamos, matavimams atrinktos kiekvienos rūšies 25 metafazinių plokštelių skaitmeninės nuotraukos. Matavimai atlikti naudojant interaktyvią matavimo sistemą MicroImage.

Amarų chromosomos yra holocentrinės ir neturi ryškių morfologinių bruožų, todėl jos grupuojamos pagal santykinus ilgius (chromosomos ilgis\*100% /bendras chromosomų ilgis diploidiniame rinkinyje) mažėjimo tvarka: pora ilgiausių chromosomų pavadinama pirma ir taip toliau. Vidutiniai chromosomų porų ilgiai buvo panaudoti sudarant galimai homologinių chromosomų porų idiogramas. Kad būtų parodyti santykinų chromosomų ilgių skirtumai tarp rūšių, buvo atlikta klasterinė analizė. Kvadratinių Mahalanobis atstumų tarp grupių centrų matrica klasterinei analizei (jungimo būdas: UPGA) gauta atlikus pažingsninę diskriminantinę analizę „į priekį“ (angl. forward stepwise). Skaičiavimams atlikti panaudota programa Statistica (versija 5.5).

### **Dalinių DNR sekų tyrimai.**

Dalinių DNR sekų tyrimams panaudoti du fragmentai: 616 bazių porų ilgio mitochondrinės DNR COI (Cytochrome Oxidase subunit I, citochromoksidazės I subvienetas) geno ir 499 bazių porų ilgio branduolio DNR EF-1 $\alpha$  (Elongation Factor-1 $\alpha$ , elongacijos / ilginimo faktorius 1 $\alpha$ ) geno dalinės sekos. Analizei panaudoti 52 mėginiai iš 8 šalių, ir ištirtos 8 europinės *Cryptomyzus* genties amarų rūšys, priskiriamos pogenčiui *Cryptomyzus* s. str..

DNR buvo išskiriama iš vieno amaro naudojant rinkinį DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) pagal gamintojo protokolą. Pradmenų sekos ir PGR reakcijos sąlygos kaip

nurodyta Turčinavičienės ir kt. (2006). Gauti PGR produktai vėliau buvo valomi naudojant rinkinį QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) pagal gamintojo protokolą. Išvalytas PGR produktas ištirpinamas vandenyje be nukleazių (Fermentas). Sekvenavimas atliktas Biotechnologijos Instituto Sekvenavimo centre (Vilnius, Lietuva).

Gautos nukleotidų sekos sulyginamos naudojant programą BioEdit (versija 7.0.9.0.) (Hall, 1999). Vidurūšiniam ir tarprūšiniam sekų kintamumui įvertinti buvo paskaičiuoti p- atstumai. Atstumams tarp sekų paskaičiuoti ir filogenetiniams medžiams sudaryti naudota programa MEGA versija 4 (Tamura ir kt., 2007). Kiekvienam tirtam DNR fragmentui sudarytas filogenetinis medis maksimalios parsimonijos metodu. Taip pat buvo atlikta analizė Bajeso teoremos pagrindu naudojant programą MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck ir Ronquist, 2003), o modelis parinktas su programa Model test (Posada, 2008). Konsensuso medžių su aposteriorinėmis tikimybėmis grafiniai vaizdai gauti naudojant programą TreeView (Page, 2001).

### **Filogenijos tyrimai biologijos ir morfologijos pagrindu.**

Sudarant septyniolikos *Cryptomyzus* genties rūšių filogenijos schemą pagal morfologiją ir biologiją panaudota 30 požymių: 15 morfologinių ir 15 susijusių su amarų gyvenimo ciklais. Filogenetinis medis maksimalios parsimonijos metodu sudarytas naudojant PAUP\*4.0b10 (Swofford, 2003). Papildomai sureikšminti požymiai, kurie buvo išskirti kaip specifiniai atskiriems pogenčiams.

## **REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS**

### **Faunos tyrimai**

Lietuvos amarų rūšių sąrašė (Rakauskas ir kt., 1992; Nieto Nafria ir kt., 2004) nurodomos šešios *Cryptomyzus* genties rūšys: *C. alboapicalis*, *C. galeopsidis*, *C. korschelti*, *C. leonuri*, *C. ribis* ir *C. stachydis*. Duomenys apie šias rūšis (mitybiniai augalai, rinkimo vietos ir datos) buvo paskelbti daugiausia iki 1986 metų (Rakauskas ir kt., 1992), todėl pasirodžius naujam europinių *Cryptomyzus* genties rūšių atpažinimo raktui (Guldemon, 1991a), reikėjo patikrinti VU GMF Zoologijos katedros kolekcijoje saugomus amarų mikroskopinius preparatus. Šiame skyriuje pateikti apibendrinti duomenys apie

*Cryptomyzus* genties amarus, surinktus Lietuvoje 1974–2008 metais. Sudarytame rūšių sąrašė nurodomi mitybiniai augalai, rinkimo vietovės ir datos bei šiuos mėginius surinkę tyrėjai.

Po Lietuvos amarų rūšių sąrašo paskelbimo (Rakauskas ir kt., 1992), buvo registruotos dvi Lietuvai naujos *Cryptomyzus* genties amarų rūšys: *C. ulmeri* (2004 metais) ir *C. maudamanti* (2007 metais). Taigi, iki 2008 metų Lietuvoje buvo registruotos aštuonios *Cryptomyzus* genties amarų rūšys iš dešimties žinomų Europoje. Dar dvi amarų rūšys, *C. ballotae* ir *C. heinzei*, taip pat gali būti aptiktos, nes mitybiniai augalai (*Ballota nigra* ir *Stachys officinalis*), reikalingi jiems vystytis, yra paplitę Lietuvoje (Butkus ir kt., 1976).

### **Gyvenimo ciklų tyrimai**

Lietuvoje anksčiau buvo tirti tik *C. galeopsidis* ir *C. ribis* gyvenimo ciklai (Pakayckac, 1983, 1986). *C. ribis* rūšies amarų biologija ištirta geriausiai: žinomi jų vislumo ir gyvenimo trukmės rodikliai, fenologijos ypatybės bei amarų kolonijose pastebėtos entomofagų rūšys (Pakayckac, 1986). Apie *C. galeopsidis* biologiją Lietuvoje žinoma tai, kad šios rūšies amarai gali naudoti dvi gyvenimo ciklo strategijas (Pakayckac, 1983). Šiame skyriuje pateikti stacionare (Pakalniškės, Vilniaus r., Lietuva) atliktų tyrimų rezultatai. *C. alboapicalis*, *C. korschelti*, *C. leonuri*, *C. maudamanti* ir *C. ulmeri* gyvenimo ciklai Lietuvoje anksčiau nebuvo tirti, o pakartotiniai *C. galeopsidis* ir *C. ribis* tyrimai papildė žinias apie šių rūšių biologiją.

Iš 2007–2009 metais tirtų *Cryptomyzus* genties amarų rūšių trys (*C. alboapicalis*, *C. leonuri* ir *C. ulmeri*) yra holociklinės vienanamės ant notrelinių šeimos augalų, viena (*C. maudamanti*) yra obligatyviai dvinamė ir trys (*C. galeopsidis*, *C. korschelti* ir *C. ribis*) yra fakultatyviai dvinamės. Liko neištirtas tik *Cryptomyzus stachydis* gyvenimo ciklas Lietuvos sąlygomis. Šita amarų rūšis yra reta mūsų šalyje, iki šiol žinomos tik kelios jos radimo vietos. Tiriant septynių *Cryptomyzus* genties amarų rūšių gyvenimo ciklus, pastebėta, kad per sezoną, tai yra, nuo balandžio vidurio iki lapkričio pradžios, Lietuvoje gali subręsti iki 12 amarų kartų, o vienai kartai subręsti reikia vidutiniškai nuo 9 iki 28 dienų.

Ištyrus *C. galeopsidis* gyvenimo ciklą paaiškėjo, kad tarp šios rūšies amarų gali būti obligatyviai dvinamės ir fakultatyviai dvinamės linijos. Šie gyvenimo ciklo variantai skiriasi

tuo, kad fakultatyviai dvinamių *C. galeopsidis* linijų pirmoji sparnuotų partenogenetinių patelių karta nuo juodųjų serbentų gali apsigyventi ir ant žieminių, ir ant vasarinių mitybinių augalų, o obligatyviai dvinamių – tik ant vasarinių mitybinių augalų. Obligatyviai vienanamių linijų nebuvimas verčia abejoti vienanamio *C. galeopsidis* porūšio, *C. galeopsidis dickeri* Hille Ris Lambers, 1953 išskyrimo pagrįstumu. Tyrimų metu buvo pastebėta, kad kita fakultatyviai dvinamė rūšis, *C. ribis*, naudojami kitokia nei *C. galeopsidis* gyvenimo ciklo strategija: sparnuotos partenogenetinės patelės nuo raudonųjų serbentų gali migruoti tik ant vasarinių mitybinių augalų. Literatūroje yra duomenų, kad ant *Ribes rubrum* gali susidaryti *C. ribis* amfigoninė karta, tai yra, oviparos bei sparnuoti ir/ar besparniai patinai (Hille Ris Lambers, 1953; Pakayckac, 1986). Tikriausiai, tai nėra labai dažnas reiškinys, nes 2007–2009 metais atliktų tyrimų metu ant *R. rubrum* pastebėtos tik oviparos.

Pirmą kartą buvo ištirtas *C. leonuri* gyvenimo ciklas. Paaiškėjo, kad tai yra vienanamė holociklinė rūšis, kurios amfigoninė karta susidaro ant *Leonurus cardiaca*. Taip pat nustatyta, kad eksperimento metu, kai nesuteikiama galimybė rinktis, *C. leonuri* kaip mitybinius augalus naudojo *Lamium album* ir *Lamium purpureum*.

### **Diskriminantinės analizės taikymas morfologiškai artimoms rūšims atskirti**

*C. alboapicalis* ir *C. leonuri* besparnėms partenogenetinėms patelėms atskirti gauta funkcija  $AL1A (-0,630 * (dhas1-4) + 0,381 * (srhin3) + 4,360 * (siphon/cauda) - 52,150 * (lrs) - 0,369 * (pt/bant6) - 58,093 * (mawsi) + 11,814$ ; *C. alboapicalis*, jei  $AL1A < 0$ , *C. leonuri*, jei  $AL1A > 0$ ). Šita funkcija atskiria visus *C. leonuri* (n=37) ir *C. alboapicalis* (n=60) individus (100 % veiksmingumas) iš duomenų masyvo, skirto kanoninės funkcijos sudarymui. Taikant  $AL1A$  funkciją duomenų masyvui, skirtam jos veiksmingumui įvertinti (1 paveikslas), taip pat būtų teisingai apibūdinti visi *C. alboapicalis* (n=60) ir *C. leonuri* (n=39) individai (100 % veiksmingumas).

*C. leonuri* sparnuotos partenogenetinės patelės nėra įtrauktos į europinių *Cryptomyzus* genties amarų rūšių atpažinimo raktą (Guldemon, 1991a), nes tuo metu, kai jis buvo sudaromas, buvo žinomas tik šios amarų rūšies besparnės partenogenetinės patelės morfologijos aprašymas. Gauta funkcija  $AL1B (-65,464 * (ant5b) + 57,515 * (tars2) +$

208,394 \* (mawsi) – 0,185 \* (srhin3) – 86,360 \* (hant1) – 2,450; *C. alboapicalis*, jei AL1AB>-0,5, *C. leonuri*, jei AL1AB<-0,5), atskirianti visus *C. leonuri* (n=25) ir *C. alboapicalis* (n=35) individus (100 % veiksmingumas) iš duomenų masyvo, skirto kanoninės funkcijos sudarymui. Taikant AL1B funkciją duomenų masyvui, skirtam jos veiksmingumui įvertinti (2 paveikslas), taip pat būtų teisingai apibūdinti visi *C. alboapicalis* (n=34) ir *C. leonuri* (n=26) individai (100 % veiksmingumas).

Atlikta *C. alboapicalis* ir *C. leonuri* besparnių partenogenetinių patelių diskriminantinė analizė parodė, kad kai kurie požymiai iš atpažinimo rakto (Guldemon, 1991a) sutampa su požymiais, sudarnčiais funkciją AL1A: srhin3, siphon/cauda ir pt/bant6. Taip pat paaiškėjo, kad šių dviejų amarų rūšių atpažinimui svarbūs ir kiti požymiai: dhas1–4, lrs ir mawsi. Be to, atliktos diskriminantinės analizės dėka pirmą kartą buvo surasti požymiai *C. alboapicalis* ir *C. leonuri* sparnuotoms partenogenetinėms patelėms atskirti.

Kad *C. galeopsidis*, *C. maudamanti* ir *C. ulmeri* atpažinimas būtų tikslesnis, J. A. Guldemonas (Guldemon, 1991a) pasiūlė kanonines diskriminantines funkcijas, viena jų (LDF-1) leistų atskirti *C. ulmeri* nuo *C. galeopsidis* ir *C. maudamanti*, o kita (LDF-2) – *C. galeopsidis* ir *C. maudamanti*. Taikant šias funkcijas klonuotų amarų matavimams, pirmoji (LDF-1) teisingai klasifikavo 82,1 % (174 iš 212) *C. galeopsidis*, 85,7 % (42 iš 49) *C. maudamanti* ir 85,4 % (35 iš 41) *C. ulmeri* rūšių individų. Antroji funkcija (LDF-2) teisingai klasifikavo 64,6 % (137 iš 212) *C. galeopsidis* ir 98,0 % (48 iš 49) *C. maudamanti* rūšių individų.

*C. galeopsidis*, *C. maudamanti* ir *C. ulmeri* besparnėms partenogenetinėms patelėms atskirti gautos dvi funkcijos, GMU1A ir GMU2A. Funkcija GMU1A (86,930 \* (cauda/siphon) + 18,273 \* (siphon/cauda) – 0,089 \* (dhas1–4) + 2,241 \* (siphon) + 44,405 \* (siphon/body) + 7,290 \* (abhair/bant6) – 73,645 \* (miwsi) – 90,760; *C. ulmeri*, jei GMU1A>5, *C. galeopsidis*+*C. maudamanti*, jei GMU1A<5) nuo *C. ulmeri* (n=20) atskiria visus *C. galeopsidis* (n=106) ir *C. maudamanti* (n=25) individus (100 % veiksmingumas), o funkcija GMU2A (13,230 \* (cauda/siphon) + 6,935 \* (siphon/cauda) – 0,924 \* (dhas1–4) – 27,170 \* (siphon) + 58,009 \* (siphon/body) + 1,909 \* (abhair/bant6) – 135,983 \* (miwsi) – 32,505; *C. maudamanti*, jei GMU2A>2; *C. galeopsidis*, jei GMU2A<2) atskiria visus *C.*

*galeopsidis* (n=106) ir *C. maudamanti* (n=25) individus (100 % veiksmingumas) iš duomenų masyvo, skirto kanoninės funkcijos sudarymui. Taikant GMU1A funkciją duomenų masyvui, skirtam jos veiksmingumui įvertinti (3 paveikslas), būtų atskirti visi *C. maudamanti* (n=24) individai (100 % veiksmingumas) ir *C. galeopsidis* (n=106) (100 % veiksmingumas) nuo 20 *C. ulmeri* (n=21) individų (95,2 % veiksmingumas). Taikant GMU2A funkciją duomenų masyvui, skirtam jos veiksmingumui įvertinti (4 paveikslas), būtų atskirti visi *C. maudamanti* (n=24) individai (100 % veiksmingumas) ir 104 *C. galeopsidis* (n=106) individai (98,1 % veiksmingumas).

*C. galeopsidis*, *C. maudamanti* ir *C. ulmeri* sparnuotoms partenogenetinėms patelėms atskirti gautos dvi funkcijos, GMU1B ir GMU2B. Funkcija GMU1B ( $0,940 * (dhas1-4) - 0,040 * (srhin3) + 147,389 * (miwsi) - 158,074 * (hant1) + 0,525 * (hlrs) - 8,373$ ; *C. maudamanti*, jei  $GMU1B > 3,5$ , *C. galeopsidis*+*C. ulmeri*, jei  $GMU1B < 3,5$ ) nuo *C. maudamanti* (n=26) atskiria visus *C. galeopsidis* (n=61) ir *C. ulmeri* (n=2) individus (100 % veiksmingumas), o funkcija GMU2B ( $- 0,138 * (dhas1-4) - 0,130 * (srhin3) + 241,602 * (miwsi) + 123,167 * (hant1) + 0,141 * (hlrs) - 1,456$ ; *C. ulmeri*, jei  $GMU2B > 4$ ; *C. galeopsidis*, jei  $GMU2B < 4$ ) atskiria visus *C. galeopsidis* (n=60) ir *C. ulmeri* (n=2) individus (100 % veiksmingumas) iš duomenų masyvo, skirto kanoninės funkcijos sudarymui. Taikant GMU1B funkciją duomenų masyvui, skirtam jos veiksmingumui įvertinti (5 paveikslas), būtų atskirti 26 *C. maudamanti* (n=29) individai (89,7 % veiksmingumas) nuo 61 *C. galeopsidis* (n=62) (98,4 % veiksmingumas) ir visų *C. ulmeri* (n=2) individų (100 % veiksmingumas). Taikant GMU2B funkciją duomenų masyvui, skirtam jos veiksmingumui įvertinti (6 paveikslas), būtų atskirti visi *C. ulmeri* (n=2) ir *C. galeopsidis* (n=62) individai (100 % veiksmingumas).

*C. galeopsidis*, *C. maudamanti* ir *C. ulmeri* rūšių grupė jau ir anksčiau buvo tirta morfologiškai, siekiant surasti požymius, palengvinančius šių trijų rūšių atskyrimą (Guldemon, 1991a). Jei palyginsime J. A. Guldemono (Guldemon, 1991a) pasiūlytose funkcijose naudojamus požymius (*dhas3*, *tars2*, *srhin3*, *miwsi*, *abhair*, *bant6*, *hant1*), pamatysime, kad funkcijose GMU1A ir GMU2A taip pat yra kai kurie iš jų (*dhas1-4*, *miwsi*, *abhair/bant6*) kartu su dviem kitais atpažinimo rakte (Guldemon, 1991a) nurodytais

požymiais (siphon/body ir dhas3). Be to, atlikus diskriminantinę analizę paaiškėjo, kad *C. galeopsidis*, *C. maudamanti* ir *C. ulmeri* rūšių amarams atskirti yra svarbus uodegėlės ir sifono santykiniai ilgiai (cauda / siphon ir siphon / cauda).

### **Citogenetiniai tyrimai**

Ištirus septynių klonuotų *Cryptomyzus* genties amarų rūšių chromosomų preparatus, nustatyta, kad dominavo metafazinės plokštelės su diploidiniu chromosomų skaičiumi  $2n=12$  (71,67–86,83 %). Visų tirtų *Cryptomyzus* rūšių kariotipus sudaro viena pora ilgų, trys poros vidutinio ilgio ir dvi poros trumpų chromosomų (8 paveikslas). Anksčiau publikuotoje *C. ribis* idiogramoje (Robinson ir Chen, 1969) viena chromosomų pora žymiai ilgesnė už kitas, beveik dvigubai ilgesnė už antrą porą, o kitos chromosomos palaiptai mažėja. Toks neatitikimas santykinų ilgių pagrindu sudarytai idiogramai galėtų būti paaiškintas tuo, kad jos buvo sudarytos skirtingais metodais. Šiame darbe buvo panaudotos vidutinės chromosomų santykinų ilgių reikšmės, o anksčiau paskelbta idiograma (Robinson ir Chen, 1969) sudaryta panaudojus tiesioginius matavimus iš nuotraukų.

Santykinų chromosomų ilgių haploidiniame rinkinyje skirtumams parodyti, atlikta klasterinė analizė. Gauti du pagrindiniai klasteriai (7 paveikslas). Į vieną klasterį pateko dvinamė rūšis *C. galeopsidis*, migruojanti tarp *R. nigrum* ir *Galeopsis* sp., ir trys vienanamės rūšys nuo žolinių augalų: *C. alboapicalis*, *C. ulmeri* ir *C. leonuri*. Kitame klasteryje yra trys dvinamės rūšys, naudojančios *R. rubrum* ir *R. alpinum* kaip žieminius mitybinius augalus ir *Stachys* (*C. korschelti* ir *C. ribis*) bei *Lamium* (*C. maudamanti*) kaip vasarinius. Tai iš dalies atitinka šiuo metu žinomas *Cryptomyzus* genties filogenetines schemas, sudarytas pagal morfologinius, biologinius (mitybiniai augalai ir gyvenimo ciklai) ir kai kurių baltymų elektromorfų tyrimų duomenis (Guldmond ir Eggers-Schumacher, 1989; Guldmond, 1990a).

### **Dalinių DNR sekų tyrimai**

Tirtuose 616 bazių porų ilgio COI fragmentuose yra 48 variabilios sekų vietos, 33 iš jų parsimoniškai informatyvios. Nukleotidų dažniai yra tokie: A – 34,8 %, T– 39,9 %, C – 13,0 %, G –12,3 %. Palyginus tos pačios rūšies individų COI dalines sekas, pastebėta, kad visų tirtų *C. alboapicalis*, *C. galeopsidis*, *C. leonuri* ir *C. maudamanti* rūšių individų jos yra

vienodos ( $p=0,000$ ). Be to, nepastebėta skirtumų tarp *C. galeopsidis* ir *C. maudamanti* dalinių COI sekų, nedideli skirtumai yra tarp *C. ribis* ir *C. korschelti* ( $p=0,002$ ) tirtų individų sekų.

Tirtuose 499 bazių porų ilgio EF-1 $\alpha$  fragmentuose yra 48 variabilios sekų vietos, iš jų 39 parsimoniškai informatyvios. Nukleotidų dažniai yra tokie: A – 30,3 %, T – 30,7 %, C – 17,6 %, G – 21,5 %. Palyginus tos pačios rūšies individų EF-1 $\alpha$  dalines sekas, pastebėta, kad visų tirtų *C. korschelti*, *C. alboapicalis*, *C. galeopsidis*, *C. leonuri* ir *C. maudamanti* rūšių individų jos yra vienodos ( $p=0,000$ ). Mažiausia tarprūšinio kintamumo reikšmė pastebėta tarp *C. alboapicalis* ir *C. galeopsidis* ( $p = 0,002$ ) dalinių EF-1 $\alpha$  sekų.

Nors tyrimams buvo panaudoti *C. galeopsidis* ir *C. ribis* mėginiai iš 5 šalių nuo įvairių mitybinių augalų ir su skirtingais gyvenimo ciklo variantais, *C. korschelti* mėginiai iš 4 šalių ir *C. alboapicalis* ir *C. ulmeri* mėginiai iš 2 šalių, visų tirtų *Cryptomyzus* genties rūšių COI ir EF-1 $\alpha$  dalinių sekų vidurūšinio kintamumo reikšmės yra atitinkamai 0,000–0,003 ir 0,000–0,002. Panašūs rezultatai buvo gauti ir gentyje *Megoura*, kuri kaip ir gentis *Cryptomyzus* priklauso tribai Macrosiphini (Remaudière ir Remaudière, 1997). Tiriant *Megoura* genties rūšis nustatytos tokios dalinių sekų vidurūšinio kintamumo reikšmės: COI dalinių sekų jos siekė 0,000–0,004, o EF-1 $\alpha$  – 0,001–0,003 (Kim ir Lee, 2008b). Taigi, *Cryptomyzus* genties amarų šitų dviejų genų fragmentų vidurūšinio kintamumo reikšmės patenka į tą patį reikšmių intervalą.

Tirtų *Cryptomyzus* genties amarų dalinių COI sekų tarprūšinio kintamumo reikšmės yra nuo 0,000 iki 0,049, o EF-1 $\alpha$  dalinių sekų – nuo 0,002 iki 0,068. Panašūs rezultatai buvo gauti ir su *Megoura* genties rūšimis: COI dalinių sekų tarprūšinio kintamumo reikšmės yra 0,001–0,052, o EF-1 $\alpha$  dalinių sekų jos siekia 0,002–0,080 (Kim ir Lee, 2008b). Tiriant *Cryptomyzus* genties rūšis taip pat nustatyta, kad vidutinio dalinių COI sekų kintamumo reikšmė (0,024) yra žemesnė už tą patį EF-1 $\alpha$  dalinių sekų rodiklį (0,033).

COI dalinės sekos siūlomos naudoti kaip priemonė amarų rūšims atpažinti (Footit ir kt., 2008, 2009), tačiau šio metodo taikymo galimybės yra ribotos kai kurioms Macrosiphini tribos gentims, pvz., *Uroleucon* ir *Macrosiphum* (Footit ir kt., 2009). Panašu, kad toks dėsningumas galioja ir *Cryptomyzus* genties amarams. Analizuotos dalinės COI sekos



netinka morfologiškai artimoms rūšims su skirtingais gyvenimo ciklais atskirti: *C. galeopsidis* ir *C. maudamanti* bei *C. ribis* ir *C. korschelti*. Šias rūšių poras galima atskirti naudojant analizuotas dalines EF-1 $\alpha$  sekas. Panašus dėsningumas būdingas ir kitiems Macrosiphini tribos amarams: *Macrosiphum rosae* ir *M. knautiae* - *M. silvaticum* (Turčinavičienė ir Rakauskas, 2009).

### ***Cryptomyzus* genties amarų rūšių filogenijos schemos, sudarytos COI ir EF-1 $\alpha$ dalinių DNR sekų, morfologinių bei biologinių požymių pagrindu**

COI dalinių sekų pagrindu sudarytose filogenetinėse schemose (9 paveikslas), tirtos *Cryptomyzus* genties rūšys sudaro dvi aiškias kladas, kur pateko morfologiškai artimos rūšys. Vienai priklauso *C. heinzei* su *C. ribis* ir *C. korschelti*, o kitai – *C. galeopsidis*, *C. maudamanti*, *C. ulmeri*, *C. alboapicalis* ir *C. leonuri*. *C. ribis*–*C. korschelti* kladoje nėra aiškiai išsiskiriančių grupių. Kitoje kladoje galima išskirti dvi pagrindines grupes. Vienoje yra dvi su serbentais susijusios rūšys, *C. galeopsidis* ir *C. maudamanti*, kurių sekos sudaro bedrą kladą, o į kitą pateko nemigruojančios rūšys nuo žolinių augalų, *C. alboapicalis*, *C. ulmeri* ir *C. leonuri*.

EF-1 $\alpha$  dalinių sekų pagrindu sudarytose filogenetinėse schemose (10 paveikslas), tirtos *Cryptomyzus* rūšys sudaro dvi aiškias kladas. Vienoje yra *C. ribis* ir *C. korschelti* kartu su *C. heinzei*, o kitoje – *C. galeopsidis*, *C. maudamanti*, *C. ulmeri*, *C. alboapicalis* ir *C. leonuri*. Šioje kladoje galima išskirti dvi pagrindines grupes. Vieną sudaro *C. galeopsidis*, *C. alboapicalis* ir *C. ulmeri*, o į kitą pateko *C. maudamanti* ir *C. leonuri*. Šiame medyje aiškiai išsiskiria *C. ribis* ir *C. korschelti* bei *C. galeopsidis* ir *C. maudamanti*, priešingai nei medyje, sudarytame panaudojus dalines COI sekas.

Iš esmės abiejų fragmentų pagrindu sudarytos schemos neprieštarauja viena kitai, ir aštuonios tirtos *Cryptomyzus* genties rūšys sudaro tas pačias pagrindines kladas, sudarytas iš morfologiškai artimų rūšių (9 ir 10 paveikslai). Rūšių išsidėstymas pagrindinių kladų viduje nėra vienodas: COI pagrindu sudarytoje filogenetinėje schemoje pastebimas ryšys tarp gyvenimo ciklo strategijos (vienanamiškumas ar dvinamiškumas), ko nėra EF-1 $\alpha$  pagrindu sudarytoje schemoje. Dalinių DNR sekų pagrindu sudarytose filogenijos schemose *C. leonuri* padėtis kitų *Cryptomyzus* genties atstovų atžvilgiu skiriasi: COI dalinių sekų

pagrindu sudarytame medyje šios rūšies sekos yra panašesnės į *C. alboapicalis* sekas, o EF-1 $\alpha$  pagrindu sudarytame medyje – į *C. maudamanti* sekas.

Visose filogenijos schemose (9 ir 10 paveikslai) tirtos *Cryptomyzus* genties rūšys sudaro dvi kladas. Vienoje atsidūrė rūšys, atitinkančios C. Börnerio išskirtą pogentį (Börner, 1930), vėliau net atskirą gentį *Myzella* (Börner, 1952): *C. galeopsidis* ir morfologiškai artimos kitos rūšys, *C. maudamanti*, *C. ulmeri*, *C. alboapicalis* ir *C. leonuri*. Be to, tos rūšys susigrupavo pagal jų biologijos ypatybes, kaip ir 9 paveiksle esančioje filogenijos schemoje. Kitoje kladoje yra rūšys, C. Börnerio priskirtos *Cryptomyzus* pogenčiui (Börner, 1930) ar genčiai (Börner, 1952).

J. A. Guldemondo (Guldemon, 1990a) pasiūlyta *Cryptomyzus* genties filogenijos schema apima Europoje registruotų rūšių biologijos, morfologijos ir baltymų elektromorfų ypatybes. Po šitos schemos paskelbimo buvo aprašytos kelios naujos *Cryptomyzus* genties rūšys, priklausančios trimis pogenčiams: *Cryptomyzus* s. str., *Phlomimyzus* ir *Alataumyzus* (Кадырбеков, 1993, 2000).

Apibendrinus žinias apie visų *Cryptomyzus* genties amarų biologiją (mitybiniai augalai, gyvenimo ciklai ir jų strategija) ir morfologiją (pagrindiniai požymiai iš atpažinimo raktų šioms rūšims atskirti) buvo sudaryta 11 paveiksle esanti dendrograma. Joje išsiskiria visi keturi pogenčiai: *Ampullosiphon*, *Alataumyzus*, *Phlomimyzus* ir *Cryptomyzus* s. str.. Pastarajam pogenčiui priklausančios rūšys sudaro dvi kladas, kuriose Europoje registruotos rūšys susigrupavo panašiai kaip ir filogenetinėse schemose dalinių DNR sekų pagrindu: į vieną kladą patenka *C. ribis*, *C. korschelti*, *C. heinzei* ir *C. ballotae*, o į kitą – *C. alboapicalis*, *C. leonuri*, *C. ulmeri*, *C. galeopsidis* ir *C. maudamanti*.

Iš visų išsiskiria *C. stachydis* rūšies amarai, kurie morfologiškai yra artimesni kitų genčių, pavyzdžiui, *Hyperomyzus* ar *Nasonovia* atstovams. Su kitomis *Cryptomyzus* genties rūšimis juos sieja gyvenimo ciklo ypatybės, tai yra, migracija tarp serbentų ir notrelinių šeimos augalų. Kita rūšis, *C. malkovskii*, taip pat turi morfologijos bruožų, nebūdingų pogenčio *Cryptomyzus* s. str. atstovams. Taigi šių dviejų rūšių molekuliniai tyrimai kartu su *C. malkovskii* detalesniais morfologijos ir biologijos tyrimais padėtų išsiaiškinti, ar tikrai šios rūšys turi priklausyti genčiai *Cryptomyzus*.

Visų *Cryptomyzus* genties amarų rūšių filogenijos schemos sudarymui svarbu iširti kai kurių rūšių biologiją ir morfologiją: *C. (Phlomimyzus) multipilosus*, *C. (Phlomimyzus) tadzhikistanica*, *C. (Alataumyzus) malkovskii*, *C. (Cryptomyzus) alatavica* ir *C. (Cryptomyzus) transiliensis*. Taip pat reikėtų surinkti trūkstamus pasaulyje žinomų rūšių mėginius DNR analizei ir surasti molekulinis žymenis, kurie tiktų ir morfologiškai artimų rūšių atskyrimui, ir filogenetinei analizei.

### **Europinių *Cryptomyzus* genties amarų, priklausančių pogenčiui *Cryptomyzus* s. str. atpažinimo raktas.**

Šiame skyriuje pateikti atpažinimo raktai besparnėms ir sparnuotoms partenogenetinėms patelėms, oviparoms ir patinams sudaryti panaudojus Lietuvoje klonuotų *Cryptomyzus* genties amarų rūšių morfometrinių tyrimų duomenis ir diskriminantinės analizės rezultatus.

### **Tyrimų rezultatų apibendrinimas**

Šiame skyriuje trumpai aptariami pagrindiniai visų tyrimų rezultatai.

## **IŠVADOS**

1. Šiuo metu Lietuvoje registruotos aštuonios *Cryptomyzus* genties amarų rūšys iš dešimties žinomų Europoje.
2. Tarp 2007–2009 metais tirtų *Cryptomyzus* genties amarų rūšių trys (*C. alboapicalis*, *C. leonuri* ir *C. ulmeri*) yra holociklinės vienanamės ant notrelinių šeimos augalų, viena (*C. maudamanti*) yra obligatyviai dvinamė ir trys (*C. galeopsidis*, *C. korschelti* ir *C. ribis*) yra fakultatyviai dvinamės.
3. Klonuojant Lietuvoje tris vienames ir keturias dvinames *Cryptomyzus* genties amarų rūšis, 2007–2009 metais per sezoną galėjo susidaryti iki 12 amarų kartų, o vienai kartai subręsti reikėjo vidutiniškai nuo 9 iki 28 dienų.
4. Lietuvoje *C. galeopsidis* ir *C. ribis* fakultatyviai migruojančios linijos naudojami skirtingomis gyvenimo ciklo strategijomis: *C. galeopsidis* pirmoji sparnuotų migrantų karta nuo *Ribes nigrum* gali sėkmingai apsigyventi tiek ant *Galeopsis*

- tetrahit*, tiek ant *R. nigrum*, o *C. ribis* sparnuoti migrantai gali apsigyventi ant *Stachys palustris*, o ant *Ribes rubrum* iki rudens gyvena tik besparnių patelių palikuonys.
5. *C. leonuri* yra gyvenanti ant *Leonurus cardiaca* holociklinė vienanamė rūšis, kuriai būdingi sparnuoti patinai; eksperimento metu kaip mitybinius augalus *C. leonuri* galėjo naudoti *Lamium album* ir *Lamium purpureum*.
  6. *C. alboapicalis* ir *C. leonuri* bei *C. galeopsidis*, *C. maudamanti* ir *C. ulmeri* besparnėms ir sparnuotoms partenogenetinėms patelėms sudarytos diskriminantinės funkcijos pasižymi 90–100 % veiksmingumu.
  7. Tirtų septynių *Cryptomyzus* genties rūšių diploidinį rinkinį sudaro 12 chromosomų: viena pora ilgų, trys poros vidutinio ilgio ir dvi poros trumpų chromosomų.
  8. Tirtų septynių *Cryptomyzus* genties rūšių dalinių DNR sekų vidurūšinė įvairovė yra žema: p atstumų reikšmės siekia 0,000–0,003 COI ir 0,000–0,002 EF-1 $\alpha$ . dalinėse sekose.
  9. Dalinės COI sekos neleido atskirti morfologiškai artimų rūšių *C. galeopsidis* ir *C. maudamanti* bei *C. ribis* ir *C. korschelti*, kurioms būdingi skirtingi gyvenimo ciklai, tačiau šios rūšių poros atsiskiria, kai naudojamos dalinės EF-1 $\alpha$  sekos.
  10. COI ir EF-1 $\alpha$  dalinių DNR sekų pagrindu sudarytos filogenijos schemos neprieštaruoja viena kitai, ir aštuonios tirtos *Cryptomyzus* genties rūšys sudaro tas pačias kladas.
  11. Filogenijos schemoje morfologijos ir biologijos pagrindu *Cryptomyzus* s. str. pogenčiui priklausančios rūšys sudaro dvi kladas, kuriose Europoje registruotos rūšys grupuojasi panašiai kaip ir filogenijos schemose COI ir EF-1 $\alpha$  dalinių DNR sekų pagrindu.
  12. *C. galeopsidis* porūšių išskyrimas, dvinamio *C. galeopsidis galeopsidis* ir vienanamio ant juodųjų serbentų *C. galeopsidis dickeri*, neturi pagrindo, nes tyrimų metu nepastebėta šios rūšies amarų obligatyviai vienanamių linijų, ir klonuotų *C. galeopsidis* su skirtingais gyvenimo ciklo variantais dalinės mitochondrinės (COI) ir branduolio (EF-1 $\alpha$ ) DNR sekos yra vienodos ( $p = 0,000$ ).

## List of publications on the dissertation topic

### Disertacijos tema paskelbtų mokslinių straipsnių sąrašas

1. Bašilova J. ir Rakauskas R., 2007. The genus *Cryptomyzus* (Hemiptera, Sternorrhyncha: Aphididae) in Lithuania: the species list, biology and distribution. *Acta Zoologica Lituanica*, 17(4): 263-271.
2. Bašilova J., Turčinavičienė J. ir Rakauskas R., 2008. Karyotypes of seven European aphid species of the genus *Cryptomyzus* (Hemiptera, Sternorrhyncha: Aphididae). *Ekologija*, 54(4): 256-259.
3. Bašilova J., 2010. Life cycle of *Cryptomyzus leonuri* Bozhko, 1961 in Lithuania with the description of previously unknown morphs. *Acta Zoologica Lituanica*, 20(1): 22-30.

## **Jekaterina Bašilova**

### **Personal information**

Date of birth: 11 February 1982

Place of birth: Vilnius, Lithuania

### **Education**

2000–2004 –Bachelor's Degree in Biology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University.

2004–2006 –Master's Degree in Biology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University.

June–August 2005 – Lithuanian-Norwegian Network of Master Programmes in Environmental Sciences (ENLINO).

2006–2010 – PhD studies, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University.

### **Internships**

September 2005, November–December 2006, November 2009 – Institute of Entomology of Biology Centre of Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech republic.

### **Current position and workplace**

Junior researcher at the Department of Zoology, Faculty of Natural Sciences, Vilnius University

M. K. Čiurlionio str. 21, LT-03101, Vilnius, Lithuania, tel. (370 5) 239 82 70

E-mail: jekaterina.basilova@gf.vu.lt

## **Jekaterina Bašilova**

### **Asmens duomenys**

Gimimo data: 1982 m. vasario 11 d.

Gimimo vieta: Vilnius, Lietuva

### **Išsilavinimas**

2000–2004 – biologijos bakalauro kvalifikacinis laipsnis, Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas.

2004–2006 – biologijos magistro kvalifikacinis laipsnis, Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas.

2005 birželis–rugspjūtis – Lietuvos ir Norvegijos aplinkotyros magistrantūros programų tinklas (ENLINO).

2006–2010 – doktorantūros studijos, Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas.

### **Stażuotės**

2005 m. rugsėjis, 2006 m. lapkritis–gruodis, 2009 m. lapkritis – Čekijos Mokslų akademijos Biologijos centro Entomologijos institutas, České Budějovice, Čekijos Respublika .

### **Dabartinės pareigos ir darbovietė**

Jaunesnioji mokslo darbuotoja, Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Zoologijos katedra

M. K. Čiurlionio g. 21, LT-03101, Vilnius, Lietuva, tel. (370 5) 239 82 70

Elektroninio pašto adresas: jekaterina.basilova@gf.vu.lt