

# NALAZ STRANE VRSTE *Cinara (Cinara) cedri* (HEMIPTERA; APHIDIDAE) U ISTRI, HRVATSKA

## RECORD OF ALIEN *Cinara (Cinara) cedri*, (HEMIPTERA; APHIDIDAE) IN ISTRIA, CROATIA

Nediljko LANDEKA<sup>1\*</sup>, Martina PODNAR<sup>2</sup>

### Sažetak

Lisna uš *Cinara cedri* strana vrsta hrvatske apidofaune, zabilježena je na području Pule (Istra, Hrvatska) na libanonskom cedru (*Cedrus libani*). Uz morfološku, provedena je i molekularna identifikacija vrste. Standardizirani fragment mitohondrijskog gena za podjedinicu I citokrom c oksidaze (tzv. DNA barkod regija) korišten je kao molekularni biljeg. Monitoringom u razdoblju od 2013. do 2015. godine nisu utvrđene populacije ove vrste na širem području niti povećana brojnost na istoj lokaciji.

**KLJUČNE RIJEČI:** Aphididae, *Cinara cedri*, Pula, Hrvatska, strana vrsta, DNA barkodiranje

### UVOD INTRODUCTION

Od 4700 vrsta lisnih uši (Hemiptera: Aphididae), koliko ih je otprilike poznato, jedna trećina živi na području Europe među kojima su i mnoge strane (Coeur d'acier i dr. 2010). Nedavni podaci za područje Hrvatske navode 14 vrsta (Matošević i Pajač Živković 2013). Iako rod *Cinara* čine 222 vrste i drugi je najbrojniji rod iz porodice Aphididae, veći dio čine vrste koje ne žive u Europi. Samo su tri vrste do sada zabilježene u Europi kao strane vrste, od kojih *Cinara laportei* (Remaudière, 1954) i *Cinara cedri* (Mimeur, 1936) dolaze iz Sjeverne Afrike, a *Cinara curvipes* (Patch, 1912) iz Sjeverne Amerike. Teško je utvrditi da li su vrste *C. laportei* i *C. cedri* pristigle s biljkom domaćinom koja se nasaduje na području Europe ili su možda došla vjetrom ili zračnim strujama, ali se zna da su ograničene na cedar, najčešće u parkovima i vrtovima (Coeur d'acier i dr. 2010). Za razliku

od njih *C. curvipes* napada i druge vrste crnogorice, pa joj domaćin mogu biti i autohtone vrste (*Abies*, *Picea*, *Tsuga*, *Pinus*) (Scheurer i Binazzi 2004). Za vrstu *C. cedri* poznato je da je prisutna u Alžiru, Argentini, Belgiji, Danskoj, Engleskoj, Francuskoj, Mađarskoj, Izraelu, Italiji, Libanonu, Maroku, Srbiji, Crnoj Gori, Španjolskoj, Švedskoj, Siriji, Cipru i Kini (Aytar 2006; Yu i Wang 2014; Binazzi i dr. 2015). Napada vrste *Cedrus atlantica* (Endl.) Manetti ex Carr., *Cedrus brevifolia* Elwes et Henry, libanonski cedar, *Cedrus libani* A. Rich, *Cedrus deodara* Roxb. ex D. Don i *Pinus* sp. Živi u kompaktnim kolonijama na koju se naseljavaju gljivice čađavice, jer izlučuje slatku i ljepljivu mednu rosu. Tijekom velikog porasta brojnosti može izazvati i opadanje grančice cedra te uzrokovati štete na plantažama cedra, što je zabilježeno za područja južne Francuske (Fabre i dr. 1988) i Turske (Aytar 2006). Iako se vrsta *C. cedri* navodi na popisu stranih fitofagnih vrsta na drvenastom bilju u Hrvatskoj (Matošević i Pajač Živković 2013), daljnjim pregledom

<sup>1</sup> Mr. sc. Nediljko Landeka, Zavod za javno zdravstvo Istarske županije, *Public Health Institute of the Istrian Region*, Nazorova 23, p.p.192, HR-52100 Pula, Hrvatska, ddd@zzjz.hr

<sup>2</sup> Dr. sc. Martina Podnar, Hrvatski prirodoslovni muzej, *Croatian Natural History Museum*, Demetrova 1, HR-10000 Zagreb, Hrvatska, martina.podnar@hpm.hr  
Dopisni autor, *Corresponding author*

referenci ne može se sa sigurnošću potvrditi tko ju je prvi put zabilježio i gdje na području Hrvatske (Fabre 1976; Coeur d'acier i dr. 2010).

U jesen 2012. godine Zavod za javno zdravstvo Istarske županije zaprimio je dojavu o neuobičajenoj masovnoj pojavnosti nepoznatih vrsta kukaca uočenih na zidovima višestambenog objekta, na terasama, ali i u unutrašnjim prostorima objekta nakon ulaza kroz otvorene prozore s grana libanonskog cedra. Preliminarni pregled materijala pokazao je da se najvjerojatnije radi o jednoj od vrsta biljnih ušiju iz roda *Cinara*.

Cilj ovog rada je precizno određivanje vrste biljne uši nađene u Istri na temelju analize morfoloških i molekularnih značajki.

## MATERIJALI I METODE MATERIALS AND METHODS

Na poziv vlasnika objekta, u Puli, ul. P. Budicin br. 25., o pojavi neuobičajenih kukaca uzet je uzorak (slika 1.) te je materijal pregledan pod entomološkom lupom i fotografiran.

Uzorci uzeti tijekom prvog nalaza pregledani su entomološkom lupom u Zavodu za javno zdravstvo Istarske županije Olympus SZX9 i fotografirani na lupi Olympus 5.0 i na 3D lupi Stereo-mikroskop Discovery V20, Zeiss Hrvatskog veterinarskog instituta, gdje su i precizno izmjereni (Slika 2.).

Budući da morfološka analiza nije bila u potpunosti sigurna (Blackman 2006, Poljaković-Pajnik 2002) napravljena je DNA analiza u laboratoriju Hrvatskog prirodoslovnog muzeja u Zagrebu.

Kroz 2013., 2014. i 2015. godinu proveden je povremeni monitoring na 10 libanonskih cedrova na području grada Pule (Ul. Pino Budicin k. br. 25. – 1 stablo, Ul. Pino Budicin k. br. 4. – 1 stablo, Ul. Pino Budicin k.br. 1. – 2 stabla, Mornarički park – 2 stabla, B. Kosa k. br. 16. – 1 stablo, park Montezaro – 2 stabla i Park pod Arenom – 1 stablo). Uz pregledavanje grana i kore debla uzeti su i uzorci zemlje i opalih iglica i pregledavani pod entomološkom lupom.

### Molekularna identifikacija – *Molecular identification*

Ukupna genomska DNA izolirana je pojedinačno iz dvije jedinice korištenjem komercijalnog kompleta PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) i eluirana u 50 µl pufera za eluciju.

Molekularno-genetička determinacija nepoznatih uzoraka provedena je metodom DNA barkodiranja usporedbom s ranije karakteriziranim vrstama roda *Cinara* i to na temelju filogenetske analize sekvenci dostupnih u banci gena (226 sekvenci, 56 vrsta, pristupni brojevi u banci gena: KF649338, KF649340, KF649342 – KF649355, KF649357 – KF649565 i KJ433268, Jousselin i dr. 2013; Yu i Wang

2014), kao i korištenjem analitičkih alata i sekvenci platforme BOLD (1265 sekvenci, 99 vrsta; Barcode of Life Database System, [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)).

Metodologija DNA barkodiranja predložena je 2003. godine kao univerzalni sustav za determinaciju biološkog materijala u smislu identifikacije vrste u svim razvojnim stadijima, ali također i kao oruđe za otkrivanje novih tzv. kriptičnih vrsta koje se ne mogu međusobno razlikovati na temelju morfoloških karakteristika (Hebert i dr. 2003). Pri tome se određuje slijed nukleotida standardiziranog fragmenta mitohondrijskog (mt) gena za podjedinicu jedan citokrom c oksidaze (*COI*) dužine oko 650 pb tzv. DNA barkod regija.

Za obje jedinice, lančanom reakcijom polimeraze (PCR) umnožena je DNA barkod regija uporabom LCO1490: 5'-ggtaacaacaatcataaagatattgg-3' i HCO2198: 5'-taaactcagggtgacaaaatca-3' (Folmer i dr. 1994) PCR početnica. Reakcijska smjesa od 50 µl sadržavala je pufer (Go Taq® Reaction Buffer, Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM svakog dNTP-a, 0,4 µM obje početnice, 1,25 u Taq polimeraze (Go Taq® DNA Polymerase, Promega) te 4 µl eluata genomske DNA. Uvjeti PCR reakcije obuhvaćali su početnu denaturaciju od 2 min na 94°C, zatim 35 ciklusa naizmjenične denaturacije (94°C / 30 s), sparivanja (50°C / 30 s) i elongacije (72°C / 1 min 30 s), nakon čega je slijedila završna elongacija na temperaturi od 72°C u trajanju od 7 minuta. Određivanje slijeda nukleotida provedeno je u servisu za sekvencioniranje (Macrogen Inc, Korea) uporabom LCO1490 (uzorak CINC1) i HCO2198 (uzorak CINC2) početnica.

Sekvence DNA barkod regije vrsta roda *Cinara* povučene iz banke gena srađene su s dvije sekvence iz ovog istraživanja uporabom opcije „ClustalW Multiple sequence Alignment“ u programu BioEdit v.7.1.3 (Hall 1999).

Genetičke udaljenosti izračunate su u računalnom programu MEGA (verzija 6, Tamura i dr. 2013) korištenjem K2P (Kimura two-parameter) evolucijskog modela. Ovaj evolucijski model uobičajeno se koristi za određivanje genetičkih udaljenosti u studijama barkodiranja (Coeur d'acier i dr. 2014) te je odabran da bi se mogli uspoređivati rezultati ovog i prijašnjih istraživanja.

Filogenetska analiza provedena je Bayesian metodom (3 000 000 generacija uz uzorkovanje svake tisućite generacije te odbacivanje prvih 20 % stabala) uz pomoć računalnog programa MrBayes (version 3.1.2, Ronquist i Huelsenbeck 2003). Evolucijski model koji najbolje odgovara setu podataka, TPM3uf+I+G, prethodno je odabran računalnim programom jModelTest 0.1.1 (Posada 2008) uporabom Bayesian informacijskog kriterija. *COI* sekvence vrsta *Lachnus roboris*, *Trama troglodytes* i *Tuberolachnus salignus* korištene su kao vanjska grupa (Jousselin i dr. 2013).



**Slika 1.** Uzorak *Cinara cedri* uzet 23. listopada 2012. godine  
**Figure 1** Sample *Cinara cedri* taken on October 23<sup>rd</sup>, 2012



**Slika 2.** Imago *Cinara cedri* pod 3D lupom (foto R. Bek)  
**Figure 2** Adult of *Cinara cedri* under 3D microscope (photo R. Bek)

## REZULTATI RESULTS

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je *C. cedri* i morfološki i analizom DNA utvrđena na jednom lokalitetu u Istri tijekom 2012. godine.

Daljnji monitoring proveden je na 10 libanonskih cedrova na kojima tijekom 2013., nisu utvrđene jedinice *C. cedri*. U uzorku zemlje i otpalih iglica ispod stabla 2014. godine na lokalitetu Ul. P. Budicina 25, pronađene su uginule jedinice *C. cedri*. U uzorku 2015. nisu pronađeni tragovi *C. cedri*, ali su pronađeni ostaci harlekinske božje ovčice, *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773), invazivne vrste božje ovčice.

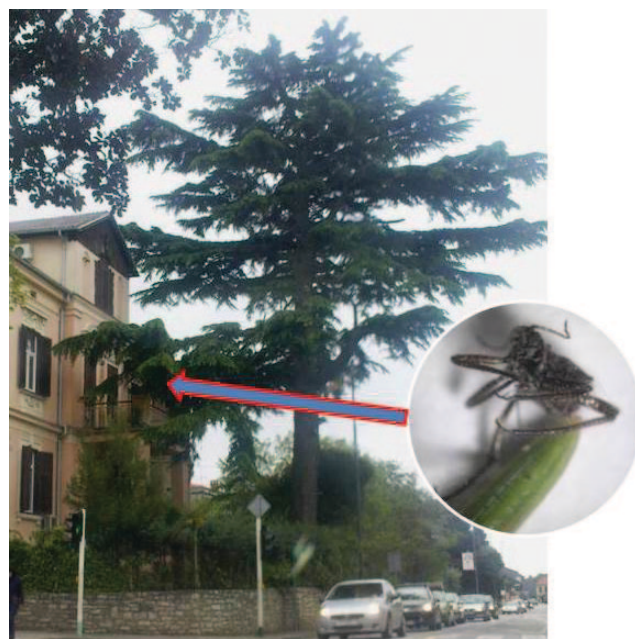
Sekvence dva uzorka iz Pule (CINC1, 650 pb i CINC2, 655 pb) pohranjene su u Banci Gena (pristupni brojevi u Banci Gena: KU754491, KU754492) i međusobno su istovjertne u području preklapanja (647 pb). S rasponom udvojenih K2P genetičkih udaljenosti od 0,0 do 1,6 %, uzorci iz Pule pokazali su se najbližiji vrsti *C. cedri*, dok su genetičke udaljenosti između njih i svih ostalih vrsta roda *Cinara* veće od 7,7 %. Štoviše, u području preklapanja (629 pb) sekvence uzoraka iz Hrvatske istovjetne su nedavno objavljenoj sekvenci uzorka iz Kine (Yu i Wang 2014).

Identifikacija putem BOLD platforme svrstala je oba uzorka iz Pule s 99,7 postotnom vjerojatnošću u vrstu *C. cedri*.

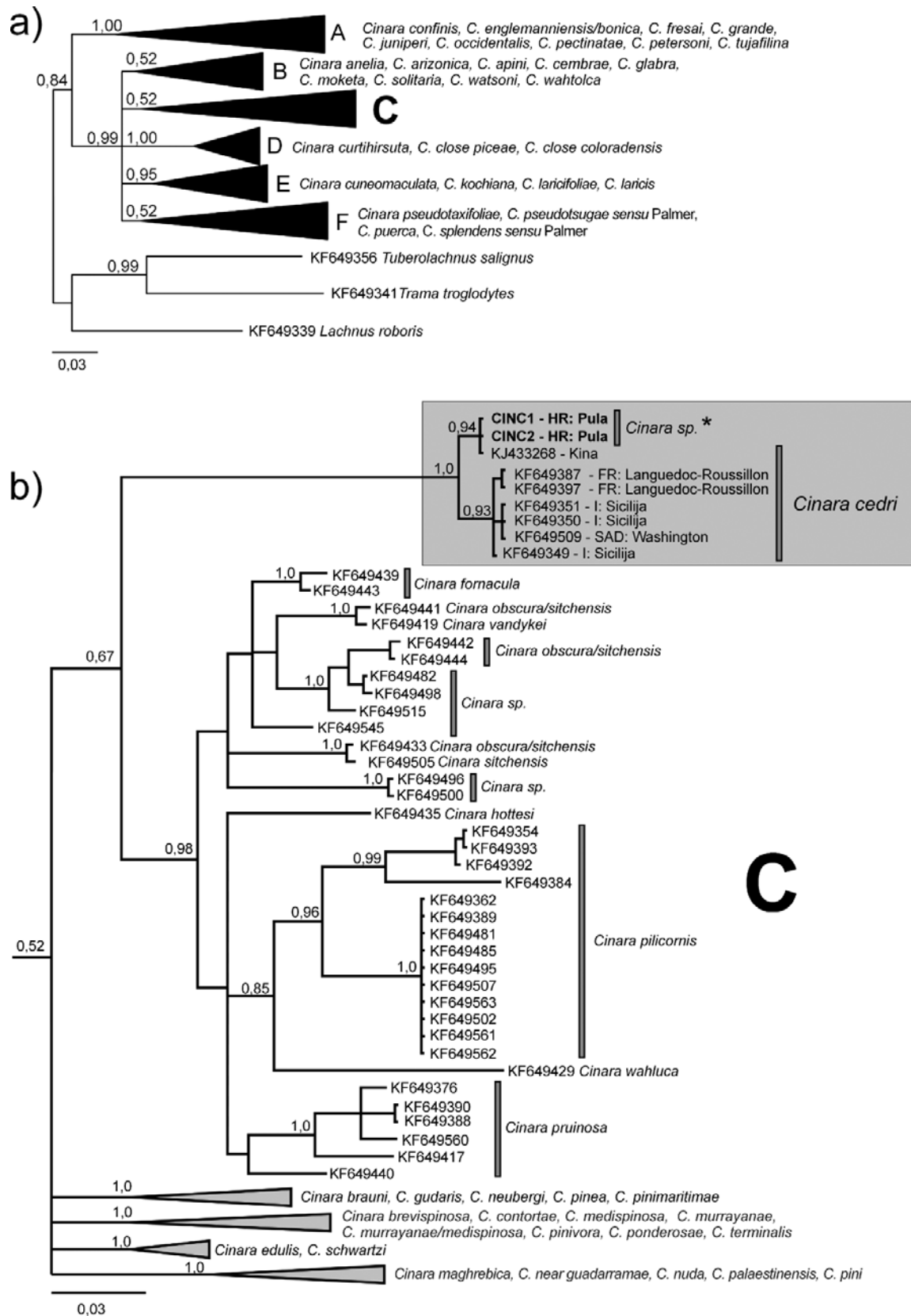
Rezultati filogenetske analize prikazani su na slici 4. Uzorci iz Pule grupiraju se s visokom podržanošću (posteriorna vjerojatnost, BPP = 1,00) unutar monofiletske grupe koja obuhvaća sve do sada analizirane uzorke vrste *C. cedri* (slika 4 b.). Unutar te *Cinara cedri* grupe, dobro su podržane dvije podgrupe od kojih jedna obuhvaća uzorke iz Italije, Francuske i SAD (K2P genetičke udaljenosti: 0,0-0,3 %.), a druga uzorke iz Pule i kineski uzorak (K2P genetička udaljenost: 0,0 %). Udvojene K2P genetičke udaljenosti između dvije podgrupe su u rasponu od 1,4 do 1,6 %.

## RASPRAVA DISCUSSION

Pronalaskom nove strane vrste štetnika na libanonskom cedru na području Pule 23. listopada 2012. godine otvara se pitanje njene prisutnosti i u ostalim dijelovima Hrvatske. Praćenjem cedrova u blizini mjesta nalaza, u gradu Puli, nije utvrđena prisutnost na drugim stablima do jeseni 2015.



**Slika 3.** Lokacija nalaza *Cinara cedri* 23. listopada 2012. godine  
**Figure 3** Finding site of *Cinara cedri* on October 23<sup>rd</sup>, 2012.



**Slika 4.** a) Topologija filogenetskog stabla konstruiranog Bayesian metodom na temelju sekvenci mitohondrijskog gena za *COI* (DNA barkod regija) vrsta roda *Cinara*. Glavne grupe su kolabirane i prikazane su samo vrste koje obuhvaćaju b) Detaljniji prikaz grupe C koja sadrži haplotipove uzoraka *Cinara sp.* iz Pule (\*). Brojevi na čvorovima predstavljaju podršku u obliku posteriornih vjerojatnosti (BPP). I = Italija, FR = Francuska, SAD = Sjedinjene Američke Države

**Figure 4** a) Topology of phylogenetic tree obtained by Bayesian inference based on mitochondrial *COI* sequences (DNA barcode region) of the *Cinara* species. Major clades are collapsed and all species clustered within each of them are depicted. b) Partially expanded clade C comprising haplotypes of *Cinara sp.* samples from Pula (\*). Numbers at nodes represent Bayesian posterior probability (BPP) support. I = Italy, FR = France, SAD = United States of America

Ako uzmemo u obzir prisutnost u susjednim zemljama kao što su Italija, Mađarska, Srbija i Crna Gora (Aytar i dr. 2006), sa sličnim klimatskim prilikama, realno je očekivati pojavnost ove vrste i u drugim dijelovima Hrvatske. Kako se u zemljama u kojima je prisutna ne bilježe velike štete (Binazzi i dr. 2015) za očekivati je se da ni u Hrvatskoj njena prisutnost neće imati veliki utjecaj na zasađene populacije cedra. Teško je pretpostaviti kada je vrsta *C. cedri* došla u Hrvatsku, jer se tek kod njene masovnije pojavnosti može lako detektirati. Smatra se da se u prosjeku 3 – 5 godina nakon unosa nove vrste u Hrvatsku ona i otkrije (Matošević i Pajač Živković 2013).

U uzorku sa mjesta prvog nalaza (29. 10. 2015.) nisu pronađeni tragovi *C. cedri*, ali su pronađeni ostaci harlekinske božje ovčice, *H. axyridis*, invazivne vrste božje ovčice koja se posljednjih godina raširila na području Hrvatske, a poznata je kao izvrstan predator biljnih ušiju (Mičetić Stančević i dr. 2011). Kako su populacije harlekinske božje ovčice, *H. axyridis*, na području Istarske županije zadnjih godina u porastu (Landeka i dr. 2016) izvjestan je i njen predatorski utjecaj na populaciju *C. cedri*. Takav utjecaj je već opisan na srodnu alohtonu vrstu *C. curvipes* na području Turske (Görür i dr. 2015).

Precizna determinacija lisnih uši na temelju morfoloških značajki izuzetno je zahtjevna, jer je otežava vrlo velika morfološka sličnost brojnih vrsta, kao i visok unutarvrstni varijabilitet (Coeur d'acier i dr. 2014). S druge strane, molekularna metodologija „DNA barkodiranja“ (Hebert i dr. 2003) pokazala se kao izuzetno koristan alat za determinaciju morfološki sličnih europskih vrsta porodice Aphididae (Coeur d'acier i dr. 2014). Genetičke udaljenosti, kao i rezultati filogenetske analize te identifikacija putem BOLD platforme snažno podržavaju morfološku identifikaciju nepoznatih uzoraka iz Pule kao vrstu *C. cedri*. Grupiranje s ostalim uzorcima te vrste izvrsno je podržano u filogenetskom stablu, a genetičke udaljenosti od 0,0 – 1,6 % nalaze se unutar raspona intraspecifičnih genetičkih udaljenosti zabilježenih u studiji DNA barkodiranja europskih afida (Coeur d'acier i dr. 2014). Ipak, treba naglasiti da je zabilježeno preklapanje u vrijednostima intra- i interspecifičnih genetičkih udaljenosti, kako unutar europskih afida (Coeur d'acier i dr. 2014), tako i za neke vrste roda *Cinara* analizirane u radu od Jousselein i dr. (2013). Iako interspecifične genetičke udaljenosti u tom istraživanju uglavnom premašuju iznos od 2 %, te time i maksimalnu genetičku udaljenost uočenu između uzorka iz Pule i ostalih jedinki vrste *C. cedri*, genetičke udaljenosti između pojedinih parova distinktnih vrsta roda *Cinara* su manje, primjerice, *C. anelia* i *C. moketa* (0,0 – 1,1 %), *C. anelia* i *C. wahtolca* (1,4 – 1,5%), *C. moketa* i *C. wahtolca* (0,8 – 1,5 %), *C. apini* i *C. moketa* (0,2 – 1,5 %), *C. contortae* i *C. medispinosa* (0,0 – 0,2 %), *C. contortae* i *C. murrayanae* (0,0 – 2,8), no prema autorima, u većini tih slučajeva se vrlo vjerojatno radi o pogrešnoj identifikaciji uzorka.

Veće genetičke udaljenosti između uzoraka iz Pule i kineskog uzorka s jedne strane, te uzoraka *C. cedri* iz Francuske, Sicilije i SAD-a s druge (dvije podgrupe unutar *C. cedri* grupe, Slika 4b), u odnosu na male genetičke udaljenosti unutar podgrupa, može se objasniti postojanjem dvije filogeografske linije iste vrste. Ipak, mogućnost da te dvije linije predstavljaju kompleks kriptičnih vrsta, ne može se u potpunosti odbaciti.

Uz ovu vrstu, i slične vrste Aphididae kao što su *C. laportei* i *C. curvipes*, s obzirom na klimatske uvjete zemalja u kojima je do sada zabilježena i prisutnost biljke domaćina možemo očekivati u Hrvatskoj. Razlog tome su trgovina sadnicama ukrasnog drveća uslijed širenja tržišta i opće globalizacije, kao i mogućnost prijenosa vjetrom (Coeur d'acier i dr. 2010). Prisutnost u susjednim zemljama vrste *C. curvipes* predstavlja dodatni rizik od ulaska, jer možemo očekivati unos iz Slovenije, Mađarske i Srbije (Haľaj i dr. 2015). *Cinara curvipes* bira više vrsta domaćina, pa osim cedrova napada i više vrsta jele (*Abies grandis*, *Abies concolor*, *Abies koreana* i *Abies alba*), smreki (*Picea omorica*, *Picea pungens*) i kanadsku čugu (*Tsuga canadensis*) (Jurc i dr. 2009), pa je time i njena prisutnost od većeg značenja.

Iz istraživanja je razvidno da se kod nas mogu sresti i nove vrste iz porodice Aphididae. Uz *C. cedri* moguć je ulaz i još nekih sličnih vrsta koje zbog prelaska na druge biljke domaćine mogu imati i značajni učinak na njih. Stoga je ubuduće potrebno obratiti veću pozornost na ovu, kod nas malo istraživanu skupinu kukaca.

## LITERATURA REFERENCES

- Aytar, F., 2006: Geographical distribution of *Cinara cedri*, *Cinara (Cedrobium) laportei* (Homo.; Aphididae) and newly discovered a parasitoid of *Cinara cedri*, *Pauesia (Pauesia) anatolica* (Hym.; Braconidae) in Turkey. VIII. European Congress of Entomology, on September 17-22, Supplementary Abstract Book-2, PVPP-77 (Poster Number) Poster Presentation, p.27, Izmir, Turkey
- Binazzi, F., Sabbatini, Peverieri, G., Roversi, P., 2015: First record in Cyprus of *Cinara (cinara) cedri* Mimeur (Aphididae Lachninae) on *Cedrus brevifolia* (Hooker fil.) Henry, Redia J Zool, 98: 151-154.
- Blackman, R. L. and V. F. Eastop. 2006. Aphids on the world's herbaceous plants and shrubs. 2 Vols. John Wiley & Sons Ltd., England. 1439 pp. Coeur d'acier A, Pérez Hidalgo, N., Petrović-Obradović, O., 2010: Aphids (Hemiptera, Aphididae) Chapter 9.2. Alien terrestrial arthropods of Europe, BioRisk, 4: 435-474.
- Coeur d'acier, A., Cruaud, A., Artige, E., Genson, G., Clamens, A-L., Pierre, E., Hudaverdian, S., Simon, J-C., Jousselein, E., Rasplus J-Y., 2014: DNA Barcoding and the Associated PhylAphidB@se Website for the Identification of European Aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae), Plos One, 9 (6), e97620.
- Fabre, J.P., 1976: Sur la présence en France de *Cinara cedri* (Mimeur) puceron nuisible au cédre, Comptes-Rendus de l'Académie d'Agriculture de France Juin 1976: 771-775.

- Fabre, J.P., Chalon, A., Chizky, J., E. Robert, E., 1988: Possibilités d'infestation par les pucerons: *Cedrobium laportei* Remaudière, *Cinara cedri* Mimeur (Homoptera, Lachnidae), chez le genre *Cedrus*, Ann Sci For, 45(2): 125-140.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates, Mol Mar Biol Biotechnol, 3: 294-299.
- Görür, G., Topper, Kaygin, A., Şenol, Ö., Akyildirim Beğen, H., 2015: *Cinara curvipes* (Patch, 1912) (Homoptera; Aphididae) as new aphid species for Turkish aphidofauna, Artvin Coruh University Journal of Forestry Faculty, 16 (41): 37-39.
- Hařaj, R., Osiadacz, B., 2015: On foreign land: the conquest of Europe by *Cinara curvipes* (Patch, 1912), Deutsche Entomologische Zeitschrift 62(2): 261-265
- Hall, T.A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 96/98/NT, Nucleic Acids Symp Ser, 41: 95–98.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003: Biological identifications through DNA barcodes, Proc R Soc Lond B Biol Sci, 270: 313–321.
- Joussetin, E., Cruaud, A., Genson, G., 2013: Is ecological speciation a major trend in aphids? Insights from a molecular phylogeny of the conifer feeding genus *Cinara*, Front Zool, 10: 1-18.
- Jurc, M., Poljaković-Pajnik, L., Jurc, D., 2009: The first record of *Cinara curvipes* (patch, 1912) (Homoptera, Aphididae) in Slovenia and its possible economic impact, Zbornik gozdarstva in lesarstva, 88: 21 – 29.
- Landeka N., Kokan B., Žitko T., Šušnić V., Klobučar, A.: 2016: **Masovne pojave azijske božje ovčice, *Harmonia axyridis*** (Pallas, 1773) tijekom 2015. godine u Hrvatskoj i javnozdravstveni značaj, Zbornik radova DDD i ZUPP 2016, 28. Seminar „Novine u djelatnosti dezinfekcije, dezinfekcije i deratizacije i zaštite uskladištenih poljoprivrednih proizvoda, Korunić, 171-179.15. Matošević, D., Pajač Živković, I., 2013: Strane fitofagne vrste kukaca i grinja na drvenastom bilju u Hrvatskoj, Šumarski list, 3–4: 191–205.
- Mičetić Stanković, V., Koren, T., Stanković, I., 2011: The Harlequin ladybird continues to invade southeastern Europe, Biol Invasions, 13 (8): 1711–1716.
- Poljaković-Pajnik, L., Petrović-Obradović, O. 2002: Bow-legged fir aphid *Cinara curvipes* (patch) (Aphididae, Homoptera) new pest of *Abies concolor* Serbia, Acta Ent Serb, 7 (1/2): 147-150.
- Posada, D., 2008: jModelTest: Phylogenetic Model Averaging, Mol Biol Evol, 25: 1253-1256.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003: MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, Bioinformatics, 19: 1572–1574.
- Scheurer, S., Binazzi, A., 2004: Notes in bio-ecology and ethology of *Cinara curvipes* (Patch), a newly introduced species into Europe (Aphididae, Lachninae), Redia, 87: 61–65.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol, 30: 2725-2729.
- Yu, G.Y., Wang, H., 2014: *First record of Cinara cedri Mimeur (Homoptera, Aphididae, Lachninae) on Cedrus deodara in Beijing, China*, Natural Enemies of Insects, 2: 260-264.

## Summary

Aphid species *Cinara cedri* (Mimeur, 1936), the unusual species of the Croatian aphid fauna, was recorded in the area of Pula (Istria, Croatia) on October 23<sup>rd</sup>, 2012 (Figure 2,3). It was found in the southern part of the town on *Cedrus libani* tree. The species was identified by combined morphological and molecular approaches. Standardised fragment of the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene (DNA barcode region) was used as a molecular marker. Molecular analysis supported morphological identification of specimens as *Cinara cedri*.

Phylogenetic analysis placed Pula specimens within highly supported, monophyletic *Cinara cedri* clade. In the overlapping region (629 bp) their sequences are identical to the sequence of *Cinara cedri* from China, while the pairwise genetic distance between them and 56 other *Cinara* species included in analysis were greater than 7.7 % (Figure 4 b). Identification through Barcode of Life Data Systems (BOLD) web platform (currently containing DNA barcode sequences of 99 species of genus *Cinara*), matched Pula specimens to *Cinara cedri* with 99.7 % probability of placement.

Monitoring conducted during the time period of 2013 – 2015 in the wider area has not revealed either new populations of this species or the population increment at the original location.

---

**KEY WORDS:** Aphididae, *Cinara cedri*, Pula, Croatia, alien species, DNA barcoding