

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

Katedra zoologie



Bakalářská práce

**REŠERŠE KE STUDIU MOLEKULÁRNÍ
FYLOGEOGRAFIE MRAVENCE *CREMATOGASTER
POLITA* (HYMENOPTERA: FORMICIDAE)**

Vypracovala: Klára Doubnerová

Vedoucí práce: Mgr. Milan Janda, PhD.

Rok vypracování: 2008

Doubnerová, K. (2008) Rešerše ke studiu molekulární fylogeografie mravence *Crematogaster polita* (Hymenoptera: Formicidae) [Review of molecular phylogeography of *Crematogaster polita* (Hymenoptera: Formicidae). Bc Thesis, in Czech.], 42 pp. Faculty of Biological Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic

Annotation:

Crematogaster polita group Smith F. 1865 is tropical species, where it forms dominant elements of the arboreal fauna. This species has polydomous large colonies characterized by territorial behaviour. Its morphology is very variable and therefore identification of this species is very difficult. This thesis review molecular methods that are used for study of population and can be alternatively used for identification of cryptic species.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím literatury, jejíž seznam je uveden na konci práce.

V Českých Budějovicích 30.4.2008

.....

Klára Doubnerová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli Milanu Jandovi za odborné vedení, ochotu a hlavně trpělivost. Velké poděkování patří Janě Kvičarové za ochotu, pomoc a přátelský přístup při naší společné práci v laboratoři, ale také Radce Ležalové, která byla vždy ochotna pomoci s čímkoli a kdykoli a Alešovi Horákovi za uvedení do počátečních tajů laboratorních. Dále bych také ráda poděkovala přítelovi a rodičům, za jejich trpělivost a podporu.

OBSAH

1. ÚVOD	5
1.1. BIOLOGIE RODU <i>CREMATOGASTER</i>	6
2. VLASTNOSTI IDEÁLNÍHO MOLEKULOVÉHO MARKERU	8
2.1. MITOCHONDRIÁLNÍ DNA.....	9
2.2. DNA BARCODING.....	14
2.3. JADERNÉ GENY.....	18
2.4. MIKROSATELITY.....	22
3. METODY PRO TVORBU FYLOGENTICKÝCH VZTAHŮ	27
3.1. MAXIMUM PARSIMONY.....	27
3.2. MAXIMUM LIKELIHOOD.....	29
3.3. BAYESOVSKÁ ANALÝZA	30
3.4. STATISTICKÉ METODY.....	32
4. ZÁVĚR	33
4.1. INFORMACE K BUDOUCÍ MAGISTERSKÉ PRÁCI.....	33
4.2. ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ	34
5. SEZNAM LITERATURY.....	36

1. ÚVOD

Má práce je součástí výzkumu evoluční ekologie mravenců, který probíhá na Papui Nové Guinei (PNG) od roku 2003 v rámci projektů Biologického Centra AVČR a Přírodovědecké fakulty JU. Výzkum je zaměřen zejména na studium 1) diverzity společenstev mravenců na lokální a regionální škále, 2) jejich vzájemných vztahů a efektu na ostatní hmyz, a 3) na inventarizaci pralesní fauny, která je do velké míry dosud neprobádaná (viz. např. Janda 2007).

Jedním z přístupů k efektivní inventarizaci bohaté tropické fauny je využití molekulárně-genetických metod v kombinaci s tradičnějšími přístupy (morfologická taxonomie, digitální zobrazování atd.) (Smith et al. 2005). Tento postup je důležitý zejména v případech, kdy máme o místní fauně nedostatečné znalosti a zároveň je obtížné předejít nesprávné identifikaci druhů, což je právě případ mnohých skupin hmyzu v tropech.

Má práce se primárně zaměří na studium populací mravenců druhu *Crematogaster polita* Smith F. 1865. Tento melanéský druh může být lokálně velmi početný v korunách i podrostu pralesa (Janda 2007). Jedná se o mravence s velkými polydomními koloniemi a rozsáhlými teritorii, který tak představuje důležitou dominantu nížinného lesa s pravděpodobně významným vlivem na ostatní faunu korun stromů. Mimo to jde o druh velice morfologicky variabilní, s čímž souvisí i jeho obtížná identifikace.

Hlavní cíle práce

- 1) popsat lokální populační strukturu *Crematogaster polita* v rámci několika lokalit na západním pobřeží PNG
- 2) pokusit se zjistit, zda se jedná o jeden druh či komplex kryptických druhů
- 3) analyzovat příbuznost kolonií na škále 2 ha primárního a sekundárního lesa a porovnat s daty o prostorové distribuci těchto kolonií
- 4) srovnat výpovědní hodnotu standardního protokolu DNA barcodingu s postupy zahrnujícími širší výběr i délky genů a kombinujícími několik metod populační genetiky

Další eventuálně navazující prací budou porovnání populační struktury *C. polita* s dalšími austronéskými druhy mravenců, které budou zpracovány obdobnými molekulárně-genetickými metodami.

Bakalářská práce měla být nejprve laboratorně zaměřená s vlastními daty a jejich zpracováním. Následovala možnost rešerše s alespoň některými vlastními výsledky. Nakonec je práce zcela rešeršní, což bylo způsobeno technickými problémy s izolací DNA, která se nám povedla z mravenců extrahovat až koncem minulého roku. Protože by pravděpodobně nebyla práce při odevzdání kompletní (získání molekulárních dat a jejich následné zpracování je časově náročné), přistoupili jsme tedy na variantu rešerše.

Snahou této práce je podat čtenáři výčet a zhodnocení možných přístupů používaných pro studium jejich populací na lokální i globální škále a identifikaci eventuálních kryptických druhů. Mě pak tato práce bude sloužit jako kvalitní informační zdroj pro budoucí magisterskou práci.

1.1. Biologie rodu *Crematogaster*

Mravenci rodu *Crematogaster* (*Formicidae: Myrmicinae*) tvoří čtvrtý nejpočetnější rod s více než 430 druhy a celosvětovou distribucí (Bolton 1995). Převážná většina druhů je tropických a v lesích často tvoří dominantní prvek stromové fauny. Hnízda jsou většinou v mrtvém dřevě, ačkoli někteří žijí na zemi nebo v hrabance a u několika druhů se vyskytuje rovněž symbióza s rostlinami, ve kterých také hnízdí (myrmekofyty) (Longino 2003). Několik druhů je rozšířených i v temperátní zóně, kde mnohem častěji hnízdí na zemi nebo pod kameny (Wheeler 1906). Můžeme nalézt i druhy, které vytvářejí kartónová hnízda na stromech (Wilson 1959).

Crematogaster je mnohdy běžný mravenec hrající hlavní ekologickou roli v mnoha tropických lesích. Kolonie mohou být veliké až s několika milióny jedinců pokrývající celá stromová patra, nebo malé, zahrnuté v rámci jediné mrtvé větve. Rozlehlé kolonie jsou obvykle polydomní s mnoha hnízdy, charakterizované teritoriálním a agresivním chováním (Majer et al. 1994, Tschinkel and Hess 1999, Longino 2003).

Rod jako celek je monofyletický s apomorfií týkající se morfologie postpetiolu a zadečku (Longino 2003). Zadeček má srdčitý tvar, zezadu špičatý a postpetiolus připojený k dorsálnímu povrchu čtvrtého abdominálního článku. Takže je zadeček zavěšen pod postpetiolem, a ne pouze posteriorně, jak je obvyklé u ostatních skupin. Petiolus nemá dorsální připojení, a když je zadeček zdvižený, petiolus pasuje do propodea. Tato kombinace vlastností pravděpodobně souvisí s obranným nebo útočným chováním, ve kterém dělnice mávají svými zadečky ve

vzduchu a vytlačují kapičku jedu do lopatkovitého žihadla (Buren 1959 ("1958")), i když ne všechny druhy toto chování vykazují (Davidson 1988).

Na úrovni druhů se rod může zdát poněkud jednotvárný, poněvadž vykazuje jen malou variabilitu hlavních tvarových rysů. Nicméně rozeznávaná druhová diverzita je vysoká, jak v rámci společenstev, tak globálně. Druhy se liší v detailech tvaru u petiolu a postpetiolu, celkovou charakteristikou chlupatosti a vrásčitosti. Jelikož rod je běžným a nápadným prvkem většiny fauny, zvláště pak v tropech, liší se v rámci regionů i mezi nimi (Bolton 1995).

2. VLASTNOSTI IDEÁLNÍHO MOLEKULOVÉHO MARKERU

Ideální molekulový marker by měl být přítomný jako jediná kopie (single-copy) v haploidním genomu. Jestli je přítomna více než jedna kopie, není vyloučeno, že sekvence získané z různých jedinců budou z různých (paralogních) kopií genu (Cruickshank 2002). Zřejmé řešení je použít jen geny, které jsou pouze v jediné kopii. Avšak není vždy zřejmé předem, které geny jsou takto přítomny. Kromě toho se tyto geny mohou obtížně amplifikovat. Geny v mnoha kopiích (multiple-copy) mohou být též užitečné, pokud mají všechny kopie stejnou sekvenci, tak aby nezáleželo, která kopie je sekvenována. Takové geny je obecně snadnější amplifikovat, a zvýšit tak výnos dat (Avisé 2004).

Díky kodónové struktuře protein-kódujících genů může být asi jen třetina možných míst variabilní tak, aniž by došlo ke změně v pořadí proteinu. Mutace, které změní protein, budou mít pravděpodobně škodlivý účinek na jeho funkci, a proto se takové změny (nesynonymní mutace) považují za daleko méně pravděpodobné. Kvůli tomu bude pravděpodobně jen maximálně třetina sekvenovaných míst fylogeneticky informativní, přinejmenším pro blízké příbuzné taxony (Hillis et al. 1996).

Různé markery se vyvíjejí různými rychlostmi, a proto je důležité si vybrat marker s patřičným substitučním poměrem, který přísluší k jeho použití. Pro blízké příbuzné druhy bude potřeba gen s vysokým stupněm substitucí, aby zajistil dost změn nahromaděných během doby, ve kterém se taxon vyvíjel (Cruickshank 2002).

Pokud se gen mění příliš rychle, budou v něm místa, ve kterých došlo ke dvěma nebo více substitucím. Jelikož následující substituce maskují předchozí, stává se stále více obtížné pro většinu fylogenetických metod zrekonstruovat strom. Tento jev se nazývá saturace. Problém může být obnovený zkreslením složení bází, protože mnohem pravděpodobněji druhá změna v určitém místě bude reverzní k originálu (například $A \rightarrow T$, následně $T \rightarrow A$) (Navajas et al. 1996).

Jestliže je složení bází zkreslené, pak se zvýší šance na stejnou změnu vyskytující se na kladogramu více než jedenkrát. Toto povede k vyššímu množství homoplazie ve skupině dat. Tento fakt může být problémem u mitochondriálních genů, které mají sklon být bohaté na AT (Cruickshank 2002). Například Navajas a spol. (1996) zjistili, že mitochondriální gen cytochrom

c oxidáza I (COI) u roztočů skupiny *Tetranychidae* má AT obsah až 75 % (95 % v třetích kodónových pozicích).

Variabilita ve složení bází mezi taxony může být problémem pro některé fylogenetické analýzy, které mohou seskupovat taxony dohromady kvůli podobnému složení bází spíše než podle skutečného sdíleného původu (Avice 2004).

Geny, které byly široce užívané v jiných studiích, přidávají na hodnotě dat, jelikož mohou být použity spolu se sekvencemi z dalších studií ke konstrukci fylogenezí na širší škále nebo ve srovnávacích studiích molekulární evoluce (Hillis et al. 1996).

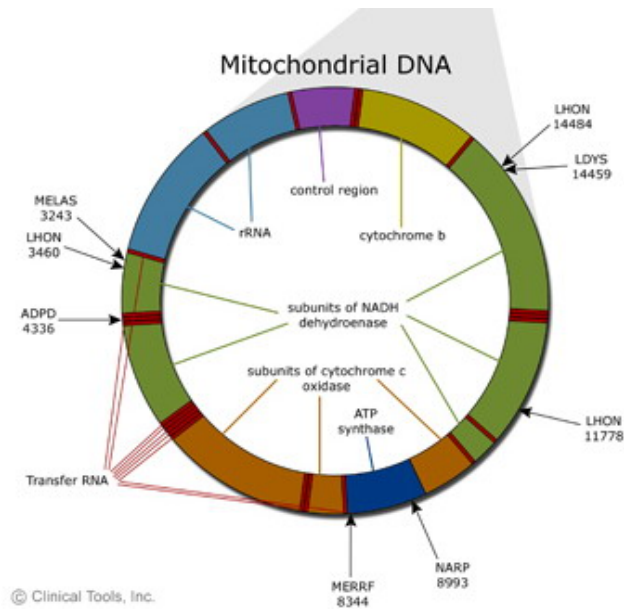
Molekulový marker by tedy měl být lehce alignovatelný, ideálně by všechna místa měla být volná pro variabilitu, substituční rychlost by měla být natolik vysoká, aby poskytovala dostatečný počet informativních míst, ale tak nízká, aby se předešlo několikanásobným substitucím. Markery by měly mít přibližně stejné složení bází, a toto složení by nemělo být variabilní mezi druhy (Cruickshank 2002).

Jediný molekulový marker nemůže ale uspokojit všechny podmínky výše uvedené, a proto jsem v následujících kapitolách zhodnotila použití vybraných markerů. Výběr byl sestaven z markerů používaných v různých publikovaných studiích zabývajících se především mravenci.

2.1. Mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (mtDNA) je DNA lokalizovaná v organelách zvaných mitochondrie. Je odvozena od kruhového genomu bakterie, která byla pohlcena předky dnešních eukaryotických buněk. Je odhadováno, že každá mitochondrie obsahuje 2 – 10 kopií mtDNA (Wiesner et al. 1992), takže každá somatická buňka má přes tisíc kopií mtDNA a oocyty mohou mít až sto tisíc těchto kopií (Hillis et al. 1996).

Mitochondriální DNA živočichů (**obr. 1**) je poměrně malá molekula obvykle 16 kpb dlouhá. Kóduje 13 proteinů, 2 ribosomální RNA a 22 transferových RNA a obsahuje oblast kontrolující replikaci (Crozier et al. 1989).



Obr. 1: Mitochondriální DNA živočichů

Mitochondriální DNA je jeden z nejpoužívanějších genetických markerů pro fylogeografické studie živočichů, protože mtDNA je maternálně přenášena (přínejmenším ve většině případů u většiny druhů) (Hillis et al. 1996), nerekombinuje (Rokas et al. 2003) a všechny části molekuly sdílejí stejný historický pattern linie společného původu (Avise 2004), avšak geny mohou být funkčně spojené (Rokas et al. 2003).

Základní sekvence živočišné mtDNA se rychle mění (Crozier et al. 1989), proto může být mtDNA použitelná pro hodnocení genetické příbuznosti jedinců nebo skupin v rámci druhů. Dále též pro identifikaci a kvantifikaci fylogeneze (evoluční příbuznosti) v rámci rozdílných druhů s podmínkou, že nejsou příliš neurčitě příbuzní (Hillis et al. 1996). V tomto případě se nejprve určí a dále pak srovnávají mtDNA sekvence z různých jedinců nebo druhů. Vytvoří se síť vztahů mezi těmito sekvencemi, které poskytují odhad příbuznosti mezi jedinci (druhy), kteří mtDNA poskytli. Tento přístup je limitován předepsaným poměrem sekvenčních změn v mtDNA (Avise 2004).

Metoda sekvenace mtDNA je dnes masově používána. Byla využita ve studii mnoha nejrůznějších organismů (Crozier et al. 1989, Cao et al. 1998, Buckley et al. 2001, Rokas et al. 2003).

Používá se pochopitelně i u mravenců, např. Schlick-Steiner a spol. (2006) studovali genetickou diverzitu u *Mesor cf. struktor* ve střední Evropě pomocí sekvenování 1255 pb COI (cytochrom c oxidázy podjednotky I). Jako studovaný materiál sloužili jedinci ze 40 kolonií sebraných po celé Evropě. Celkově bylo analyzováno 29 kolonií *Mesor cf. struktor* (zde byl zahrnut *M. struktor* a těžce rozlišitelný *M. muticus*), čtyři kolonie *M. capitatus*, čtyři *M. concolor*, tři *M. bouvieri*. DNA byla extrahována z většiny jedinců pomocí kitu (Sigma Genelute Extraction kit), u některých vzorků byla využita izolace DNA pomocí směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol. V rámci 29 vzorků určených jako *M. cf. struktor* bylo nalezeno 166 mutací, na jejichž základě bylo rozlišeno 16 haplotypů (HT) s maximální divergencí sekvencí 9.3 %. Maximální vnitrodruhová variabilita v rámci *M. bouvieri* (3 HT), *M. cf. concolor* (4 HT) a *M. capitatus* (3 HT) byla 0.2 – 0.6 %. Minimální mezidruhová variabilita mezi těmito druhy byla od 8.5 do 11.3 %. Sekvenční divergence byla zkombinována hodnotou statistické podpory uzlů (metody neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP), Bayesovská analýza) pro stanovení hranic jednotek a bylo vytvořeno šest linií libovolně označených 1 – 6. Výsledky naznačují, že linie 1 + 2 a 3 + 4 by mohly být konspecifické. Zvláště pro linie 1 a 2 je navržený nízký stupeň evoluční diferenciace kvůli absenci specifické kombinace aminokyselin. Tyto druhy měly vysokou vnitrodruhovou sekvenční divergenci: 2.4 % (1 + 2) a 3.7 % (3 + 4). Při nejmenším se zdá být pravděpodobná existence dvou druhů v rámci analyzovaného *M. cf. struktor*: 1 + 2 a 3 + 4 + 5 + 6 s minimální sekvenční divergencí 7.1 % mezi nimi, která je blízko u rozsahu minimální mezidruhové divergence *M. bouvieri*, *M. cf. concolor* a *M. capitatus* (8.5 – 11.3 %). Studie tedy ukázala, že *Mesor cf. struktor* není s největší pravděpodobností jen jeden druh.

Mitochondriální DNA využili také Savolainen a Vepsäläinen (2003) při rekonstrukci vztahů mezi volně žijícími a parazitickými mravenci rodu *Myrmica* a při vytváření hypotézy o roli sympatrické speciace v tomto hostitelsko-parazitickém systému. Ve Finsku byly sebrány tři páry parazit-hostitel (*M. karajevi* – a jeho hostitelské druhy *M. sabuleti*, *scabrinosis* a *rugulosa*), jeden pár v Německu (*M. hirsuta* – *M. sabuleti*) a další pár v Anglii (*M. microrubra* – *M. rubra*). Každý parazit a hostitel byli sebráni ze stejného hnízda. Dále byly sebrány ještě čtyři druhy z rodu *Myrmica* (*M. ruginodis*, *M. rugulosa*, *M. hellenica*, a *M. sulcinodis*), všechny z neparazitovaných hnízd. U všech jedinců byly sekvenovány úseky cytochromu oxidázy podjednotky I (COI), podjednotky II (COII) a cytochromu b (celkem 2772 bp). Topologie výsledného kladogramu podporovala hypotézu autorů, že hnízdní parazité jsou polyfyletičtí a řídí

se striktní formou Emeryho pravidla (Janda et al. 2004), to znamená, že každý hnízdní parazit je nejbližší příbuzný svého hostitele. To bylo v souladu s interpretací, že každý hnízdní parazit vznikl jako vnitrodruhový sociální parazit. Takováto evoluce hnízdních parazitů by znamenala vícenásobný sympatrický vznik druhů.

Avšak Steiner a spol. (2006) ve své práci ukazují, že *Myrmica microrubra* určitě není samostatný druh, ale pouze reprodukční morfotyp *Myrmica rubra*. V tomto případě bylo pro analýzu sebráno 116 jedinců *M. microrubra* a 107 *M. rubra* po celé Evropě (49 lokalit). Příbuznost mezi těmito dvěma formami byla studována pomocí mtDNA, nukleárního genu ITS, mikrosatelitů a morfometrie. Morfometrická analýza zahrnovala 141 samic a 47 samců. Pro analýzu mtDNA bylo vybráno 22 vzorků (ze šesti lokalit) z materiálu, který byl morfometricky zpracován. U těchto vzorků byl sekvenován úsek COI, COII a cytochromu b. Pro analýzu jaderných genů byl využit gen ITS (42 vzorků sekvenováno) a tři mikrosatelity (sekvenováno 5 – 17 vzorků na lokalitu). Výsledky vyvrací hypotézu dvou samostatných druhů, která byla publikována v práci Savolainen a Vepsalainen (2003), avšak ukazují na možnost existence dvou morf *M. microrubra* jako *microgynes* a *M. rubra* jako *macrogynes*.

Problémem v práci Savolainen a Vepsalainen (2003) byla pravděpodobně interpretace výsledků, které pocházely pouze z mtDNA, navíc s velmi nedostatečným počtem analyzovaných vzorků. Je pravda, že autoři uvádějí, že u rodu *Myrmica* dochází k minimální mezidruhové hybridizaci. Tuto informaci získali z dříve publikovaných prací, ale ostatní možné problémy (viz. níže) nijak neřešili. Pokud by měly být výsledky opravdu věrohodné, měly by být podloženy i jinými metodami jako např. v práci Steiner a spol. (2006).

Goropashnaya a spol. (2004) studovali příbuznost šesti druhů mravenců *Formica rufa group* (*F. polycтена*, *F. rufa*, *F. lugubris*, *F. paralugubris*, *F. aquilonia*, a *F. pratensis*). K získání dat ze 44 jedinců (zahrnujících šest druhů z *Formica rufa group*), sebraných z různých lokalit v Euroasii, bylo využito 2051 bp fragmentu mtDNA, který zahrnoval 1047 bp 5' konce cytochromu b, 57 bp intergenic region I, 74 bp transferové RNA pro serin, 20 bp intergenic regionu II, 853 bp 3' konce NADH dehydrogenasy 1. Fylogeneze založená na mtDNA ukazuje, že šest druhů *Formica rufa group* si je navzájem velmi blízkých ve srovnání s druhy pocházejících z jiných podrodů, které byly užity jako outgroup (*F. truncorum* a *F. frontalis*). Dále porovnáním distribuce sociálního uspořádání na fylogenetickém stromě ukazuje, že přechod od monogynie k vysokému stupni polygynie vznikl během evoluce více než jedenkrát.

Srovnáním mezidruhové divergence u *F. rufa group* (2.2 %) s odhady jiných blízce příbuzných hmyzů (např. 2.9 – 5.2 % pro střevlíka rodu *Carabus* nebo 6.5 % pro cikádu *Marocicada*), ukazuje, že je tato divergence mezi druhy *F. rufa group* relativně nízká. Dále výsledky ukazují, že druhy vznikaly během Pleistocénu, a to dokonce pod nejpomalejším a nejvíce konzervativním divergenčním stupněm 0.4 % změn za milion let.

Tato studie je významná zejména proto, že komplex druhů okolo *F. rufa* obsahuje několik morfologicky velmi podobných druhů často s nezřetelnými přechody mezi rozeznávanými druhy či formami (Seifert and Goropashnaya 2004) žijícími sympatricky na většině evropského kontinentu. Následkem toho jde o skupinu v minulosti značně taxonomicky nestabilní, u které byly popisovány časté „mezidruhové hybridizace“ a smíšené kolonie (Goropashnaya et al. 2004).

Další studie využívající mitochondriálními geny pro studium populací mravenců je práce Beibl a spol. (2007), kteří pomocí kombinace COI a COII analyzovali fylogenetické a fylogeografické vztahy sociálně parazitického mravence rodu *Chalepoxenus* a jeho hostitele *Themnothorax*. Analýza zahrnovala celkem 39 vzorků (32 haplotypů) ze čtyř druhů *Chalepoxenus* a 11 druhů *Themnothorax*. Mezi COI / COII sekvencemi ze vzorků *Chalepoxenus* byla průměrná distance v rámci haplotypu *C. kutteri* 0.004. Průměrná vzdálenost v rámci haplotypu *C. muellerianus* byla 0.021, zatímco u dvou nejvzdálenějších vzorků z *C. muellerianus* (h7 a h8) představovala sekvenční divergenci 0.048. Průměrná vzdálenost mezi skupinami druhů byla od 0.0035 do 0.0788. K fylogenetické analýze prováděné pomocí distančních metod, maximální parsimonie a Bayesovské analýzy, bylo použito 789 bp COI a 531 bp COII, nekódující úsek mezi těmito podjednotkami nebyl do analýzy zahrnut. Všechny tři fylogenetické metody poskytly shodné výsledky s pouze malými odchylkami. Výsledky z analýz ukazují, že čtyři druhy *Chalepoxenus* jsou s velmi dobrou podporou monofyletickou skupinou s *Themnothorax flavicornis*. Hostitelské druhy tradičně náležející do rodu *Themnothorax* se ukazují být parafyletické vzhledem k rodu *Chalepoxenus*. Studie neodhalila možnou přítomnost kryptických druhů.

Tato metoda má též své problémy a limitace spojené s použitím těchto dat pro rekonstrukci mezi- či vnitrodruhových vztahů. Jde především o to, že mitochondriální geny odhalí jen jeden aspekt evoluce a mtDNA analýza může být špatná kvůli „neúplnému odštěpení linií“ (incomplete lineage sorting), hybridizaci, introgresi a kopiím včleněným do jaderného

genomu (tzn. NUMTS – nuclear copies of mitochondrial sequences) (Savolainen and Vepsalainen 2003, Beibl et al. 2007). Tyto skutečnosti by pak mohly vést ke špatné rekonstrukci fylogeneze (Savolainen and Vepsalainen 2003). Will a Rubinoff (2004) také říkají, že ohraničování druhů divergenční hodnotou z genových sekvencí samo o sobě není vhodné, protože biologický vznik druhů je postupný spíše než náhlá událost. A genetický znak se nutně nemusí vyvíjet ve stejném tempu jako druhy a rychlost jejich vývoje se může lišit u jednotlivých druhů a markerů (Hebert et al. 2003).

Jak je vidět, sekvenování mtDNA je v současné době opravdu hojně využívanou metodou studia populací a mezidruhových vztahů u velkého počtu organismů (Hebert et al. 2003). Což je samozřejmě velice výhodné – snadné získání protokolů o sekvenování u různých druhů, zjištění, kdo měl s čím problémy nebo např. čeho je lepší se vyvarovat. Avšak metoda má i své problémy (viz. výše). Těmto problémům je ale možno se vyhnout. Prověříme-li možnou existenci tzv. NUMTS a zhodnotíme-li pravděpodobnost hybridizace nebo „neúplného odštěpení linií“ např. tím, že vzorky nejprve morfologicky rozřadíme do skupin, které pak porovnáme se skupinami, jenž vyjdou z molekulární analýzy. Pokud budou v souladu s morfologií, je velice pravděpodobné, že bude vše v pořádku (Savolainen and Vepsalainen 2003, Beibl et al. 2007). Můžeme si též informace o mezidruhové hybridizaci najít v již dříve publikovaných článcích (Savolainen and Vepsalainen 2003).

Pokud nejsou jako dodatečná metoda využita morfologická data, můžeme se setkat s použitím jiných molekulárních markerů, a to převážně s jadernými geny – ITS (Steiner et al. 2006), wingless (Ward and Downie 2004), opsin (Hasegawa and Crozier 2006). Avšak nejčastěji používanou formou jaderných markerů jsou mikrosatelity.

2.2. DNA barcoding

DNA barcoding je v taxonomii nově používaná metoda, která využívá krátký standardizovaný genetický úsek v mitochondriální DNA organismu k rychlé, přesné a snadné identifikaci druhů (alespoň podle tvrzení propagátorů metody) (Hebert and Gregory 2005). Je založena na poměrně jednoduchém konceptu. Většina eukaryotických buněk obsahuje mitochondrie, které mají vlastní, tzn. mitochondriální DNA (mtDNA). Mitochondrie mají

relativně rychlý mutační stupeň, což má za následek signifikantní změny v mtDNA sekvencích mezi druhy a v zásadě poměrně malou variabilitu uvnitř druhů (Avice 2004).

Tyto krátké, standardizované DNA sekvence – obvykle 650 bp 5' konce části mitochondriálního genu, cytochromu c oxidázy I (Moritz and Cicero 2004), se používají jako vnitřní „čárové kódy“ (barcodes) jednotlivých druhů (Hebert and Gregory 2005).

V konceptu DNA barcodingu není prakticky nic nového. Používání molekulárních markerů (allozomy, rDNA, mtDNA) pro účely taxonomie je známo již po několik desetiletí (Avice 2004). Výrazný rozdíl je pouze ve zvýšené míře použití a navrhované standardizaci tohoto postupu (Moritz and Cicero 2004).

Navzdory potenciálním výhodám DNA barcodingu, jako je praktičnost a použitelnost, je DNA barcoding v některých vědeckých kruzích vnímán jako kontroverzní (Wheeler 2004, Will and Rubinoff 2004, Will et al. 2005). Někteří charakterizují DNA barcoding dokonce jako "anti-taxonomii", argumentující, že jeho používání bude znamenat smrt Linného systému, který se už 250 let používá (Hebert and Gregory 2005).

DNA barcoding neusiluje o nahrazení Linného klasifikačního systému, čímž se podstatně liší od návrhů vytvořit nový taxonomický systém založený výhradně na DNA. S pouze 15 % popsáných druhů z odhadovaných 10 miliónů se může DNA barcoding používat k odhalení pravděpodobných nových druhů v rámci dosud nestudovaných taxonů. Nicméně tyto „druhy čekající na odhalení“ nemohou být pojmenovány výhradně pomocí DNA barcodeů, měly by být pojmenovány Linného názvem založeném na studii typového vzorku, digitálních obrazů s vysokým rozlišením, informacích z lokalit sběru dat a ostatních informacích (Gregory and Ryan 2005).

DNA barcoding se obvykle snaží o identifikaci předem určených druhů a sám o sobě neoslovuje problém druhového vymezení (Monaghan et al. 2005). Tato metoda může být použita 1) k identifikaci a určení neznámých vzorků druhů, které byly již popsány a 2) k detekci možných nových druhů použitím míry rozdílnosti sekvencí (Hebert et al. 2003, Moritz and Cicero 2004).

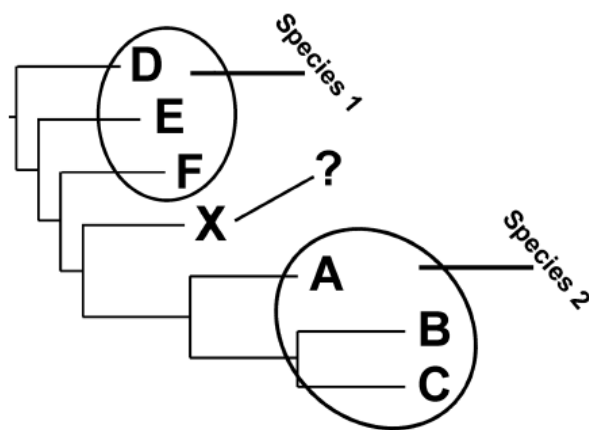
Typický postup DNA barcodingu byl využit např. k odhalení kryptických druhů u motýla *Astraptes fulgerator* (Hebert et al. 2004). DNA barcodey byly získány z 484 jedinců, a to vždy z jedné suché nohy. Výsledky podpořily předchozí dohady, že *A. fulgerator* může být komplexem kryptických druhů. Avšak studium klasických znaků (morfologických, ekologických

a etologických) ukazovalo na šest nebo sedm druhů, kdežto data z COI zvýšila tento počet na deset. Autoři navrhuji, že by tyto výsledky mohly motivovat vyhodnocování výskytu dalších kryptických druhů v tropech. Toto úsilí by mohlo být urychleno použitím účinného „screeningového postupu“ jako je DNA barcoding.

Metoda DNA barcodingu byla využita i u mravenců, např. ve studii Smith a spol. (2005), která analyzovala odhad druhové diverzity na Madagaskaru v porovnání s inventarizací pomocí morfologie. Byly zkoumány čtyři lokality na severo-východním Madagaskaru. Z každé byli ručně sesbíráni mravenci a určeni do morfodruhů. Pro genetickou analýzu byly použity sekvence získané z 268 vzorků, které patřily do 28 rodů, pomocí DNA barcodingu. Každý jedinec byl přiřazen k morfodruhu použitím morfologických znaků a k MOTU (Molecular Operational Taxonomic Unit) použitím sekvenčních divergence (threshold) 2 a 3 %. Výsledky neukázaly průkazný rozdíl mezi použitím morfologie a použitím sekvencí DNA jak na 2 % tak 3 % hladině divergence při odhadu druhové diverzity. Avšak molekulární metoda měla tendenci naznačovat vyšší druhovou bohatost ve srovnání s morfologicky definovaným druhovým konceptem. Na závěr je v práci hodnoceno použití DNA barcodingu. Analýza provedená v práci poskytuje příklad rychlosti a doplňkovosti, se kterým DNA barcoding může pracovat ve spojení s tradičním morfologickým systematickým přístupem – žádná konkurence ani nahrazování, jak se obávají Hebert a Gregory (2005). V této práci nevyšel žádný rozdíl mezi 2 a 3 % mírou divergence, avšak v práci Hebert a spol. (2004) se ukázalo, že na 2 % hladině nebyly objeveny žádné kryptické druhy, kdežto na 3 % hladině jich pak bylo objeveno 10. Tyto rozdíly mohou souviset a) s rozdílnou úrovní divergence mezi příbuznými druhy u obou skupin hmyzu, b) pravděpodobně je to ale vedlejší efekt způsobu sběru dat a rozdílného zaměření obou studií. V případě mravenců se jednalo o široký taxonomický screening mnoha druhů, přičemž DNA data byla získána vždy jen z několika jedinců daného druhu. To výrazně snižuje pravděpodobnost zachycení rozdílných haplotypů. V případě motýlů *Astrapes* byl analyzován jediný druhový komplex s větším množstvím materiálu z několika populací, takže pravděpodobnost zachycení různých haplotypů či kryptických druhů byla výrazně vyšší.

Mohou ale nastat i možné komplikace dané různými haplotypy a sdílením ancestrálního polymorfismu v mtDNA. Dokonce i jednoduché parafyletické genové stromy jsou problematické

(Will et al. 2005). Je dán sesterský pár druhů, oba se skládají ze známých křížících se jedinců a vzorků jedinců u druhu 1 = A,B,C, u druhu 2 = D,E,F a neidentifikovaný fragment, který byl osekvenovaný = X. Jeden možný genový strom vyplývající z NJ je (D(E(F(X(A(B,C)))))) (obr. 2). V takovém případě nemůže nová sekvence poskytnout identifikaci, která by nebyla sporná. V tomto případě může být X členem druhu 1 jako jeho sesterský druh, ale může také být přiřazen k druhu 2 jako druh ležící uvnitř skupiny D,E,F (obr. 2). DNA barcoding toto sám o sobě nevyřeší. Pokud je vzorkování (sampling) omezené na málo jedinců a druhy s relativně starým odštěpením od společného předka, a/nebo jsou výsledkem allopatrické speciace, můžeme pak očekávat stálé a relativně velké rozdíly mezi taxony na druhové úrovni. Publikované studie zabývající se barcodingem užívaly dosud převážně tyto druhy vzorků (např. Hebert et al. 2004). Velmi nedávno vzniklé, sesterské taxony a vysoce variabilní populace jsou ale dnes také často analyzovány. Výsledky z neúplných a výběrových vzorků signalizují, že přesnost metody je v těchto případech poměrně variabilní. Na druhou stranu, názor, že větší množství vzorků může pouze zvýšit pravděpodobnost selhání barcodingu, protože množství variability se jen může zvětšovat (Will et al. 2005), je možné považovat za přinejmenším diskutabilní. Naopak s intenzivnějším samplingem a zachycením co nejvíce populačních (či druhových) linií je možné očekávat postupné zpřesňování dat a získání lepší znalosti o míře variability sekvencí. Je ovšem otázkou v kolika případech je takto úplný sampling v reálných podmínkách dosažitelný.



Obr. 2: Diagram ukazuje potenciální problém určování druhů používáním DNA barcodingu. Neznámé sekvenční taxonu je X, sekvenční taxony vybrané z křížících se populace považované za druh 1 (species 1) jsou D, E, F a podobně A, B, C jsou z druhu 2 (species 2). X může být umístěno s druhu 2 nebo s druhu 1.

Dalším problémem může být tvrzení, že asi 23 % živočišných druhů je polyfyletických (Funk and Omland 2003). Jestli je toto pravdivé, můžeme říct, že používání mtDNA barcodu k přiřazení druhového názvu k živočichovi bude asi ve 23 % nejednoznačné nebo chybné. Studie hmyzu naznačují stejnou nebo dokonce větší frekvenci chyb, kvůli častému nedostatku vzájemného vztahu mezi mitochondriálním genomem a nukleárním genomem. Hmyz reprezentuje přes 75 % všech známých organismů (Hebert et al. 2004). Toto tedy ukazuje, že zatímco mtDNA barcodey mohou být efektivní u obratlovců, nemusí ale už být efektivní pro většinu známých organismů.

Ros a Breeuwer (2007) ve své studii na roztočích *Tetranychidae* též hodnotí DNA barcoding. Použití této metody může být silný a důležitý nástroj k druhové identifikaci (Will et al. 2005), avšak také tvrdí, že použití jediného (mitochondriálního) genu pro DNA barcoding nebo DNA taxonomii je poměrně nedostačující kvůli problémům s mtDNA, jako je „neúplné odštěpení linií“, hybridizace a introgrese. Je proto potřeba kombinovat jaderné a mitochondriální geny s morfologickými i ekologickými znaky.

Jak je vidět např. z množství článků, které se v poslední době DNA barcodingem zabývají, stává se tato metoda stále populárnější. Avšak i v této metodě se vyskytují určité problémy (viz. výše). Nejsou takové, aby DNA barcoding „zničily“, avšak je nutné si je při interpretaci výsledků uvědomovat. A samozřejmě nejlepším řešením těchto problémů je kombinace DNA barcodingu s jinými doplňkovými metodami a daty. I přes tyto problémy si myslím, že DNA barcoding má budoucnost teprve před sebou. Už jen proto, že téměř všechny peníze určené na výzkum taxonomie jdou na DNA barcoding. Avšak o DNA barcodingu se v posledních letech živě debatuje jako dříve o fenetice. A ta bohužel, ač měla spousty stoupenců, nakonec selhala a téměř se z fylogenetiky vytratila (Will et al. 2005).

2.3. Jaderné geny

Jaderné geny jsou umístěny v buněčném jádře eukaryot (Avise 2004). Použití částí jaderných genů pro vnitrodruhové studie si získalo zatím daleko menší pozornost než použití

mtDNA. V poslední době se však sekvence jaderných intronů jeví velice slibně pro účely vnitrodruhových studií (Hillis et al. 1996).

Jaderný genom je vysoce komplexní. Mnoho jaderných genů by mělo být použitelných pro odvozování fylogenetických vztahů vyšších řádů (Friedlander et al. 1992). Nejlepší příklad široké užitečnosti jaderných genů jsou rDNA repetice, které mají za sebou ležící sekvence, které jsou variabilní v rámci nebo mezi populacemi, a kódují vysoce konservativní sekvence, které jsou použitelné pro srovnávání mezi široce divergovanými taxony (Mindell and Honeycutt 1990) – dokonce i mezi říšemi (Pace et al. 1986). Jelikož mají jaderné geny intron/exonovou strukturu, mohou se také užívat na velmi nízkých systematických úrovních (Avice 2004).

Nekódující oblasti zahrnující introny nukleárních genů a oblasti internal transcribed spacer (ITS) jaderných ribozomálních genů (ale i mitochondriální řídicí oblast) jsou pod malým selekčním tlakem a inklinují tak k velmi rychlému vývoji (Cruickshank 2002). Jsou proto vhodné jen k použití v rámci druhů nebo pro blízké příbuzné druhy. Kvůli jejich vysoké substituční rychlosti je běžné v těchto genech najít heterozygoty, a proto je často nezbytné klonovat PCR produkty před sekvenací (Avice 2004).

Jaderné ribozomální DNA (rDNA) geny se skládají z jednotek tandemových repetic a každá jednotka obsahuje 18S, 5.8S, a 28S ribozomální RNA (rRNA). Ta je přítomna v mnoha kopiích. Mezi těmito rRNA repeticemi jsou spacery jako ITS regiony, které jsou následně vystřiženy a neslouží (pravděpodobně) k žádnému známému účelu. Od doby, kdy nemají žádnou jinou funkci, nejsou tyto ITS sekvence pod velkým selekčním tlakem a mohou velmi rychle hromadit substituce. Kvůli ohromným změnám v jejich sekvencích mohou být užitečné pro studování genetické variability a prozkoumávání mezidruhových nebo vnitrodruhových fylogenetických vztahů (Hung 2004). Různá rychlost evoluce mezi různými rDNA regiony a sekundární struktura transkribovaných regionů dává rDNA vysokou systematickou přizpůsobivost (Hillis and Dixon 1991).

ITS sekvence obecně poskytují dostatečnou variabilitu nukleotidů pro fylogenetickou analýzu na specifické nebo generické úrovni. Nicméně v některých případech se ITS elementy z různých druhů zdají být příliš konzervativní (Kuperus and Chapco 1994), nebo naopak příliš variabilní (Harris and Crandall 2000) pro použití ve fylogenetických analýzách. Kromě toho délka a variabilita ITS sekvencí se v některých případech zdá být tvořena pouze opakováním

nukleotidových fragmentů (Avisé 2004). Sekvenční délka z ITS1a ITS2 regionů u hmyzu je obvykle krátká (190 – 663 bp). Avšak u některých skupin mravenců může být mnohem delší (657 – 940 bp) (Hung 2004).

Hung (2004) využil ITS2 sekvenci ke studiu fylogenetických vztahů a sekvenční variability u mravenců rodu *Strumigenys*. Výsledky ukazují, že ITS2 region rDNA vykazuje vysoký polymorfismus a divergenci sekvencí následkem krátkých tandemových repetit. Zvýšení nebo snížení délky ITS2 sekvencí možná bylo způsobeno sklouznutím při replikaci (replication slippage) (**obr. 3**), které tvoří velké množství repetit. Tento fenomén je častý u hmyzu. Na rozdíl od některých názorů, že ribozomální spacery jsou příliš variabilní pro fylogenetickou analýzu, ITS2 sekvence se v této studii ukázaly jako vhodné pro odvozování fylogenetických vztahů u mravenců rodu *Strumigenys*.

Mezi nejpoužívanější jaderné ribozomální geny v molekulární systematice patří 18S a 28S rDNA, které jsou často užívány pro rekonstrukce vztahů na hlubokých fylogenetických úrovních.

Crampton a spol. (1996) sekvenovali 260 bp z 28S rDNA genu a 245 bp z 18S rDNA genů u několika druhů klišťat a ukázali, že tyto regiony jsou více zachované než 16S rDNA a hodí se pro fylogenezi na úrovni čeledí a podčeledí. Protože tyto sekvence byly dost krátké, Black a spol. (1997) sekvenovali celý gen 18S (1846 bp) pro menší množství taxonů a shrnuli, že samotný 18S je pro řešení na této systematické úrovni lepší než kombinace ribosomálních mitochondriálních genů 12S a 16S rDNA.

Vhodnost použití 18S rDNA, 28S rDNA na úrovni podčeledí potvrdili i Ward a Downie (2004), kteří zkoumali fylogenetické vztahy rodů mravenců podčeledi *Pseudomyrmecinae*. Tyto oblasti kombinovali navíc s geny wingless, abdominal-A, LW rhodopsin a 144 morfologickými znaky.

Cruickshank a Thomas (1999) použili celkem 751 bp ze dvou oblastí 28S rDNA genu pro zkoumání fylogenetických vztahů rodů uvnitř podřádu roztočů *Dermanyssina*. Ačkoli získali plně rozlišenou fylogenezi, hodnoty bootstrapu pro mnoho uzlů byly nízké. Nicméně míra homoplazie byla v tomto souboru dat nízká a neúplné rozlišení vztahů bylo následkem pravděpodobně nedostatečného množství informativních míst (jen 8 % z míst bylo podle parsimonního kritéria informativních). To ukazuje, že 28S rDNA může být vhodnější na hlubších fylogenetických úrovních.

V systematice hmyzu byl nedávno posun směrem k používání nízkého počtu kopií jaderných protein-kódujících genů. Tyto geny mají velkou škálu substitučních rychlostí a mohou mít tedy různé využití. Jeden potenciální problém u těchto genů jsou ale paralogy. Jsou často duplikovány a není vždy jisté, že byla sekvenována stejná kopie genu u všech taxonů (Cruickshank et al. 2001).

Široce užívaný gen u hmyzu je elongační faktor-1-alfa (EF1 α), který byl mj. použit i při rekonstrukci fylogeneze mravenců na rodové úrovni v práci Moreau a spol. (2006) spolu s dalšími 4 jadernými geny. Např. Klompen (2000) zhodnotil vhodnost tohoto genu pro objasňování vztahů mezi basálními řády roztočů *Mesostigmata* tím, že to "může být dobrý molekulový ukazatel pro roztoče nadřádu *Parasitiformes*, zvláště uvnitř infrařádů, ale mohl by být ještě více efektivní v kombinaci s dalšími molekulovými ukazovateli a/nebo morfologií."

V rozsáhlé studii fylogeneze mravenců na rodové úrovni Brady a spol. (2006) byl uveden přehled (**tab. 1**) sedmi jaderných genů s jejich charakteristikami.

Gene	Total sites	Variable sites	Parsimony-informative sites	G+C %
18S rDNA	1904	310	198	0.51
28S rDNA	1690	529	366	0.59
wingless	421	282	246	0.60
LW rhodopsin	458	289	271	0.50
abdominal-A	639	291	243	0.62
EF1 α -F1	359	147	139	0.59
EF1 α -F2	517	209	196	0.51

Tab. 1: Vybrané jaderné geny použité pro rekonstrukci fylogeneze rodů mravenců (Brady et al. 2006) s informacemi o celkové délce, počtu variabilních a informativních míst, a obsahu CG.

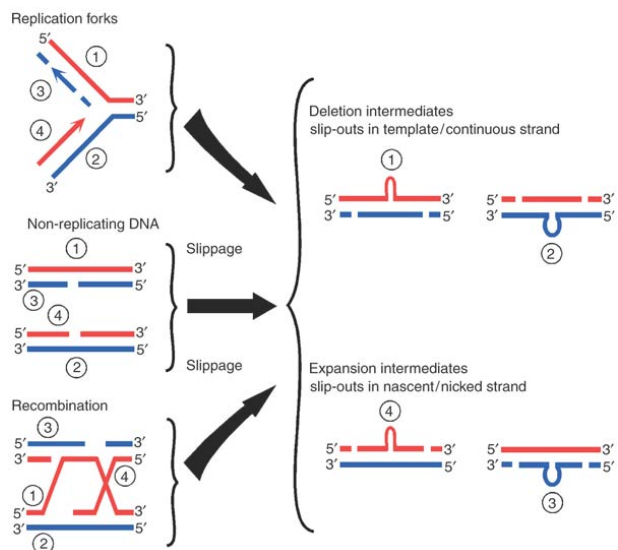
Z tabulky je vidět, že EF1 α , hojně používaný u hmyzu, je poměrně krátký a v tomto případě je i počet jeho informativních míst spíše podprůměrný ve srovnání např. s wingless nebo LW rhodopsinem.

Prací, které využívají jaderných markerů u mravenců, mnoho není, pominu-li mikrosatelity, které pro své hojné použití (nejen u mravenců), byly zpracovány v samostatné kapitole. I přesto že několik prací, které využívají jaderné markery u mravenců jsem našla, nejednalo se téměř nikdy o ty samé markery, a proto práce nešly příliš hodnotit. Vybrala jsem tedy proto i studie, které zkoumaly skupiny v rámci hmyzu nebo členovců

2.4. Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou speciální třída za sebou jdoucích repetitivních DNA. Jsou kodominantní, široce rozšířené v genomu a vysoce variabilní v délce (Jarne and Lagoda 1996). Běžně jsou pro ně používány zkratky STRs (short tandem repeats; (Goldstein and Schlötterer 1999)), SSRs (simple sequence repeats; (Goldstein and Schlötterer 1999)). Ačkoliv se mikrosatelity vyskytují v genomu nejrůznějších organismů ve velkém množství, jejich biologická funkce je stále nejasná (Goldstein and Schlötterer 1999). Avšak jsou to jediné satelitní sekvence, u kterých je znám jejich vznik – jsou přímým důsledkem sklouzávání DNA polymerázy (**obr. 3**).

Mikrosatelity jsou úseky DNA, které jsou složeny z krátkých opakujících se jednotek o délce nejčastěji 1 – 5 bp (Jarne and Lagoda 1996). Podle délky repetice dělíme mikrosatelity na mononukleotidové (např. AAA), dinukleotidové (např. CACACA), trinukleotidové (např. ATGATGATG) nebo tetranukleotidové (např. CATGCATGCATG) (Goldstein and Schlötterer 1999). Většinu mikrosatelitů v genomu (30 – 60 %) tvoří pravděpodobně dinukleotidové repetice. V genomu obratlovců se pak nejčastější vyskytují motivy (AC) n nebo (AT) n (Toth et al. 2000). U trinukleotidových mikrosatelitů jsou nejčastější sekvence (AAT) n a (CAG) n (Stallings 1994) a u tetranukleotidových se nachází téměř výhradně sekvence (GATA) n a (GACA) n (Jarne and Lagoda 1996).



Obr. 3: Replikační sklouznutí DNAP na tandemové repetici

Rozlišujeme také různé typy mikrosatelitů: a) dokonalé mikrosatelity tvořené pouze jedním opakujícím se motivem, který není nikde přerušen ...CACACACACACACA..., b) nedokonalé mikrosatelity, kde je repetice přerušena jednou jinou bází ...CTCTCTGCTCTCT..., c) složené mikrosatelity, které jsou tvořeny několika dílčími motivyCACACATGTGTG..... a nakonec d) mikrosatelity přerušované, ve kterých se nachází inserce malého počtu bází, které nenásledují strukturu repetice ...CACATTCACACATTCACA... (Goldstein and Schlötterer 1999).

Mikrosatelity se nacházejí v celém genomu eukaryotických i prokaryotických organismů (Field and Wills 1996, Toth et al. 2000), nejvíce pak v jeho nekódujících oblastech (telomery, subtelomery, heterochromatin u centromer) (Metzgar et al. 2000). V kódujících oblastech, např. obratlovců, se nachází pouze 9 – 15 % mikrosatelitů (Moran 1993, VanLith and VanZutphen 1996). Tato nízká frekvence mikrosatelitů v kódujících oblastech může být vysvětlena negativní selekcí posunových mutací při translaci (Metzgar et al. 2000, Li et al. 2004).

Mikrosatelity se v poměrně nedávné době (zhruba od roku 1980) staly často využívanými genetickými markery při studiu příbuzenských vztahů, populačně-genetické struktury volně žijících živočichů a ve studiích molekulárně-ekologických (Jarne and Lagoda 1996). Někteří autoři také ukazují, že mikrosatelity mohou být použity ke studiu evolučních vztahů mezi

skupinami, které se vyvíjely nezávisle po dobu několika milionů let (Goldstein and Schlötterer 1999). Popularitu si mikrosatelity získaly hlavně díky jejich extrémní variabilitě (polymorfismu) a relativně snadné identifikaci jednotlivých alel. Jejich hlavní nevýhodou je nutnost izolace *de novo* u druhů, které jsou zkoumány poprvé (Awise 2004). Mikrosatelity však mají i některé další vlastnosti, které omezují jejich použitelnost. Limitující může být např. jejich velikost (délka) a dále mají vysoký stupeň mutace. Jako následek kombinace těchto vlastností může být omezena potenciální genetická divergence (Richard and Thorpe 2001).

Data z mikrosatelitů byla užita k rekonstrukci populačních vztahů i druhové fylogeneze v rozsahu od hmyzu až po obratlovce (Moran 1993, Stallings 1994, MacHugh et al. 1997, Angers and Bernatchez 1998).

Mikrosatelitové markery při studiích mravenců využil např. Gyllenstrand (2004) k odhadu příbuznosti a genetické struktury sympatrických populací *Formica rufa* a *Formica polyctena*. Pro genetickou analýzu použil 8 mikrosatelitů. Z výsledků práce vyplývá, že mezi *F. rufa* a *F. polyctena* není žádný kvalitativní rozdíl v sociální organizaci, i když má každý druh odlišnou hnízdní strategii. Vyskytl se však malý neočekávaný rozdíl ve stupni polygynie. Dle dříve publikovaných poznatků je *F. rufa* vysoce monogynní (s jednou rozmnožující se královnou v hnízdě) a *F. polyctena* naopak polygynní (s několika rozmnožujícími se královnami). Avšak výsledky této studie ukazují, že ne všechny kolonie *F. rufa* byly monogynní, u *F. polyctena* studie potvrdila již dříve publikované výsledky. Co se týče genetické příbuznosti, práce dochází k závěru, že *F. rufa* a *F. polyctena* jsou striktně geneticky oddělené skupiny a to na základě genetické vzdálenosti, která byla v rozmezí mezi 0.343 a 0.609.

To je ovšem v jistém rozporu s výsledky souběžně publikované práce Goropashnaya a spol. (2004). Ta na základě nepřítomnosti variability v sekvencích mtDNA (2051 bp fragment zahrnující cytochrom b, NADH dehydrogenázu 1 a tRNA pro serin) nebyla schopna populačně-fylogenetickými analýzami rozlišit mezi sekvencemi těchto druhů. Oba druhy vždy tvořili jednu monofyletickou skupinu, což naznačuje jejich nedávnou divergenci a nekompletní oddělení populačních linií (lineage sorting).

Konfrontace těchto dvou prací se zdánlivě rozporuplnými výsledky ukazuje nutnost kombinovat několik alternativních postupů při studiích populační struktury. Ačkoliv se na úrovni některých mitochondriálních genů rozdíly mezi populacemi dosud neprojevíly, bylo možné je

detekovat pomocí mikrosatelitů a následně objevit rozdíly v sociální struktuře. Proto je v případě špatně morfologicky rozlišitelných druhů s podezřením na mezidruhovou hybridizaci žádoucí použít oba typy dat.

Trontti a spol. (2005) studovali způsoby páření a disperze a dále koloniální příbuznost u třech populací polygynního mravence *Plagiolepis pygmaea*. Dělnice byly sebrány ze třech lokalit v jižní Francii, z jedné bylo analyzováno 49, z druhé z 11 a ze třetí z 33 kolonií. Osm až 20 dělnic z každé z celkem 66 lokalit a 40 larev z 12 lokalit byly genotypovány pomocí sedmi mikrosatelitů. Získané sekvence byly zpracovávány v několika hierarchických stupních – jedinci v rámci kolonie, kolonie v rámci populací a populace v rámci všech vzorků. U sekvencí, které byly získány z královen, byl navíc proveden test, jak moc je pravděpodobná adopce královny jinou kolonií. Toto bylo prováděno hledáním divergentních genotypů mezi královnami nalezenými v kolonii. Bylo zjištěno, že 1) vysoký stupeň inbreedingu u dělnic i královen naznačuje rozsáhlé páření mezi příbuznými a fylopatrii u obou kast, 2) většina královen je přijímána jejich rodnou kolonií. Dále bylo zajímavé, že ze 160 analyzovaných jedinců nebyl ani jeden samec.

Fernández Escudero a spol. (2002) studovali výskyt a genetický efekt polyandrie u druhu *Proformica longiseta*. Pomocí tří mikrosatelitových markerů byly analyzovány královny, dělnice, samci a extrakt sperma. Materiál byl sebrán v horní části toku řeky San Juan v pohoří Seira Nevada (Španělsko). Výsledky ukazují vysokou frekvenci (2.4) páření královen, ale nízkou úspěšnost paternity, což ukazuje rozdílné sperma užívané královnami, 69 % královen bylo několikanásobně oplozeno. Geneticko-variabilní hypotéza navrhuje, že geneticky více různorodé dělnice mohou zlepšit rezistenci celé kolonie proti parazitům nebo patogenům a dále mohou též vést k účinnější dělbě práce a ke zvýšení přežití kolonie v proměnných podmínkách prostředí. Tato testovaná hypotéza, která by měla vysvětlit evoluci polyandrie (jako jedna z několika), nebyla daty podpořena.

Ve studii Henshaw a spol. (2005) byly využity mikrosatelity spolu s proteinovým markerem k odhalení historie introdukce invazního mravence *Solenopsis invicta* na Fishermanovy ostrovy a do Brisbane. Populace z těchto zamořených lokalit (objevených v roce 2001) byly srovnávány mezi sebou a následně porovnány s potenciálními zdrojovými populacemi v Severní a Jižní Americe. Pro studium byli genotypováni dělnice a samci pomocí čtyř mikrosatelitů a také pomocí Gp-9 (General protein-9). Analýza odhalila, že 26 % genetické

variace pocházelo z australských populací mezi Brisbane a Fishermanovými ostrovy. Toto ukazuje, že jsou od sebe geneticky odlišní a pravděpodobně představují oddělenou introdukci do Austrálie. Dále výsledky ukazují, že Severní Amerika je velmi pravděpodobně zdrojem zamoření na pozorovaných lokalitách.

Studie, která je zajímavá z metodického hlediska, je práce Zeisset a spol. (2005), který podává podrobný popis izolace pěti dinukleotidových mikrosatelitů z *Myrmica scabrinosis*. Práce, ve kterých jsou publikovány mikrosatelity pro rod *Crematogaster* jsou např. Heinze a spol. (2000), kteří ve své práci použili k analýze kolonií monogynního mravence *Crematogaster smithi* dva mikrosatelity. V této práci je popis izolace těchto mikrosatelitů a jejich charakteristika. Ve studii Feldhaar a spol. (2004) popsali izolaci a vlastnosti pěti mikrosatelitů rodu *Crematogaster* (*Decacrema*).

Mikrosatelity jsou hojně používány při odhalování např. fylogentických vztahů, historii introdukce, atd. Avšak např. Balloux a spol. (2000) studovali, jak jsou mikrosatelity vhodné k používání. Odhadovali genetickou diferenciaci v kontaktních zónách mezi dvěma chromozómy u rejska *Sorex araneus*. Využili deseti autosomálních mikrosatelitů, jednoho Y-chromosomálního mikrosatelitu a mtDNA. Práce představuje zprávu o extrémním podceněním populační genetické struktury odvozené z mikrosatelitů. Jak Balloux a spol. (2000) dodávají: předchozí studie, které srovnávaly mikrosatelity s ostatními genetickými markery, nezjistily tak silné rozpory. Důvodem je zřejmě, že genový tok přes hybridní zónu, který byl studován je pravděpodobně mnohem nižší než ve všech ostatních studiích. Ačkoli toto je extrémní příklad velmi omezené genové výměny, tato situace by se mohla běžně vyskytovat uvnitř hybridních zón.

Mikrosatelity jsou určitě vhodným genetickým markerem pro studium jak populačních, tak druhových vztahů, jen by mělo být vzato v úvahu zvláštní varování ohledně interpretace populační struktury založené na vysoce polymorfních genetických markerech, kdy je genový tok redukovaný (Balloux et al. 2000). Právě proto je v mnoha pracích využita kombinace mikrosatelitů s jinými genetickými markery.

3. METODY PRO TVORBU FYLOGENETICKÝCH VZTAHŮ

V mnoha molekulárních studiích jsou jednotkami fylogenetických analýz (OTUs, operational taxonomic units) druhy nebo vyšší taxony (vlastně, analyzovaný genetický materiál, který v sobě skrývají), ale mohou to též být konspecifické populace, jednotlivé organismy nebo nerekombinované alely specifických genů jako je mtDNA (Avisé 2004).

Odvozování fylogeneze založené na DNA nebo aminokyselinových sekvenčních datech z žijících druhů je jedna z nejmocnějších technik moderní genetiky a v některých ohledech možná i jedna z nejvíce kontroverzních. Molekulová data byla použita na umístění člověka mezi primáty (Hasegawa 1991), k nalezení vztahů savců k ptákům a dinosaurům (Hedges et al. 1990, Hedges 1994) a k zjištění příbuzenských vztahů u nejranějších žijících organismů (Olsen et al. 1994).

Dva hlavní problémy ve fylogenetických analýzách jsou 1) vytváření fylogeneze použitím metod, které realisticky modelují komplexní síly na základě útržků evoluce, a 2) testování takové fylogeneze k odhadu její pravděpodobnosti v porovnání s mnoha nebo všemi jinými možnými topologiemi, které mohou existovat pro dané soubory dat (Bhattacharya 1996).

Pro mnoho druhů molekulárních markerů, včetně DNA sekvencí, dovolují jednotlivé stavy znaků aplikaci fylogenetických analýz rovnou na kvalitativní syrová data bez požadavku prvotní rekonstrukce vzdálenostní (distanční) matice. Několik takových přístupů je k dispozici (Avisé 2004). Takovými to fylogenetickými analýzami jsou nejčastěji metody maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) (Bhattacharya 1996) a Bayesovská analýza (Avisé 2004).

3.1. Maximum parsimony (MP)

Mnoho evolučních teorií vytváří předpovědi o průběhu a časování evoluce. Odvozování postavení společných předků je důležitým nástrojem pro testování těchto teorií (Maddison 1994, Maddison 1995). Maximum parsimony je jedna z nejběžněji používaných a značně studovaných metod pro rekonstrukci fylogeneze (Hang et al. 2007).

Obecně, metoda MP pro odvozování fylogeneze funguje na předpokladu „evoluce je parsimonní“, to jest, vybírá stromy, které mají minimální celkovou délku – počet evolučních kroků (transformace z jednoho stavu znaku do druhého) požadovaných k vysvětlení daných souborů dat (Hillis et al. 1996).

Ačkoliv MP může ve většině případů nabídnout racionální odhady rekonstrukce předků u znaků, které splňují předpoklady této metody, nemusí vést vždy ke správným výsledkům. Tato situace může nastat, když existuje mnoho příležitostí ke změnám (příklad když je rychlost evoluce vysoká) (Maddison 1994, Zhang and Nei 1997).

Hlavním argumentem stojícím proti MP je, že parsimonie implicitně předpokládá sporné záležitosti o evolučním procesu. Protože MP je standardně formulovaná jako pravidlo pro výběr mezi fylogenezemi, je možné vyvodit, že tato metoda předpokládá evoluci jako větvicí proces, ve kterém se nevytváří síťovité vztahy mezi OTU. Toto však předpokládá i maximum likelihood.

Používání parsimonního kritéria pro odvozování fylogeneze vyžaduje mnohem méně výpočtů než používání maximum likelihood kritéria. Avšak parsimonní kritérium postrádá žádoucí statistický odhad vlastností ovládaný maximum likelihood a Bayesovskými kritérii.

Hang a spol. (2007) ukazuje, že MP, stejně jako mnoho ostatních metod pro rekonstrukci fylogeneze, může fungovat významně lépe na současná biologická data, než je navrhováno na základě počítačových simulací, protože se setkáváme v efektem přirozeného výběru. To je velkou měrou kvůli specifickým místům postupně se fixujícím v genomu, které vykonávají funkce spojené se zvýšením fitness. Je však důležité poznamenat, že přirozený výběr vede k zlepšení přesnosti rekonstrukce pro maximum parsimony pouze, pokud zde byly změny, které vedly k předkovi získáním významné adaptace. To předpokládá, že přirozený výběr může pouze pomoci v rekonstrukci fylogeneze taxonů, které divergovaly kvůli novému selekčnímu tlaku.

Parsimonní přístup představuje rozsáhlou rodinu příbuzných metod zahrnující různé předpoklady o tom, jak se vyskytuje transformace určitého stavu znaku. Wagnerova parsimonie předpokládá, že volná evoluční reversibilita znaku je dovolena se změnou v obou směrech stejně pravděpodobnou. Naopak Dollova parsimonie předpokládá, že každý nový znak (neancestrální) je unikátně odvozen (ačkoli několikanásobná reverze k původním podmínkám je povolena) a Camin-Sokal parsimonie předpokládá, že všechny evoluční změny jsou irreversibilní (Avice 2004).

V běžné praxi jsou data analyzována počítačovými programy, které vyhledávají obrovské množství alternativních stromů s minimální celkovou délkou. PAUP* (phylogeny analysis using parsimony) a PHYLIP (phylogeny inference package) patří mezi běžně používané pro tyto analýzy (Hillis et al. 1996).

Maximum parsimony je metoda pro rekonstrukci fylogeneze, která má své výhody i nevýhody. Je to zcela jiný přístup, než je maximum likelihood nebo Bayesovská analýza (viz. níže), je neparametrickou metodou, má jiné předpoklady, jiný výpočtový přístup a podle některých názorů se hodí více na data morfologická než na molekulární (Cruickshank 2002). Její výhodou je bezesporu jednoduchost a s tím spojená rychlost zpracování.

3.2. Maximum likelihood (ML)

Mezi nejpopulárnější fylogenetické metody dnes patří maximum likelihood. ML je stejně jako parsimonie optimalizačním kritériem. Maximum likelihood metody (ML) užívají hodnotu log likelihood (lnL) pro každou topologii jako optimální skóre a strom s nejvyšší lnL je vybrán jako ML strom (Hillis et al. 1996).

Jeden problém s metodami založenými na optimalizačním principu je, že vyžadují enormní množství času pro výpočet, když je soubor sekvencí velký, což platí obzvláště pro ML. Z tohoto důvodu je v současné době používáno velké množství heuristických vyhledávacích algoritmů, které se pokouší o nalezení optimálního stromu (Avice 2004). Navíc je ale nutno připomenout, že strom s optimálním skóre není ještě nutně pravdivou rekonstrukcí fylogeneze (Takahashi and Nei 2000).

Maximum likelihood zahrnuje rozsáhlou třídu procesů spojených principem, že rekonstruované stromy by měly maximalizovat pravděpodobnost pozorování dostupných dat pod částečným modelem evolučních změn (Avice 2004). Metoda ML hodnotí hypotézy o evoluční historii v podmínce pravděpodobnosti, že navržený model evolučního postupu a hypotetická historie může dát vzniknout pozorovaným datům (Hillis et al. 1996). ML je parametrická statistická metoda, ve které se používá jasný model evoluce znaků. Takové metody jsou potenciálně silnější než neparametrické statistické metody, jako je parsimonie, ale pouze pokud

užívaný model je rozumným přiblížením procesů, které produkovaly data (Kolaczkowski and Thornton 2004).

Odhad ML byl poprvé použit ve fylogenetických analýzách Cavalli-Sforzou a Edwardsem v roce 1967. Ale jelikož nepoužili sekvenční data, zůstala tato práce relativně nejasná (Hillis et al. 1996). Felsenstein a Kishino (1993) přinesli přístup ML do rekonstrukcí fylogenezí založených na nukleotidech. Později byl také maximum likelihood aplikován na sekvenční data z aminokyselin (Kishino et al. 1990, Adachi and Hasegawa 1992).

Hlavním problémem ML je, že vyžaduje přijetí modelu evolučního procesu, o kterém můžeme pochybovat, zda-li je pravdivý. Model evolučního procesu je třeba proto, neboť hypotézy určující topologii stromu (a nic víc) nepotvrzují samy o sobě pravděpodobnosti svého pozorování (Sober 2004). Další zmiňovanou nevýhodou je situace, kdy analyzuje soubor s vysokým počtem sekvencí, avšak s malým počtem informativních nukleotidů. ML stromy (ale i maximum parsimony!) zde inklinují k nesprávným topologiím (Nei et al. 1998). Nicméně v případech, kdy je počet sekvencí velký a počet zkoumaných nukleotidů malý, je velmi těžké najít správný strom jakoukoli metodou (Takahashi and Nei 2000).

Praktickou nevýhodou pak je, že ML je značně pomalejší než MP a může jednoduše převyšovat kapacitu počítače. Maximum likelihood pravděpodobně překonal parsimonii v popularitě u dat získaných ze sekvencí nukleotidů (Kolaczkowski and Thornton 2004).

Maximum likelihood je oproti parsimonii metodou parametrickou, jeho výpočet je pomalejší a složitější než u parsimonie, což může být poměrně nevýhodné.

3.3. Bayesovská analýza

V Bayesovské analýze, je odvozování fylogeneze založené na veličině nazývané posteriorní pravděpodobnost, která je odvozená z fylogenetických stromů (Huelsenbeck et al. 2001). Parametry, jako je topologie stromu, délka větví a substituční parametry, jsou zde modelovány jako distribuce pravděpodobností. Použitím „Bayesovské věty“ může být posteriorní pravděpodobnost jakéhokoli z těchto parametrů vyjádřena „marginální distribucí“ zbývajících parametrů. Analytické řešení této posteriorní pravděpodobnosti vyžaduje integraci funkce likelihood přes všechny možné hodnoty zbývajících parametrů, což je neúčinné pro již dokonce

mírně složité problémy. Moderní Bayesovské metody využívají Markovův řetězec Monte Carlo (MCMC) metod k přiblížení této integrace, tím že simulují jednotlivé tahy ze spojené posteriorní distribuce všech parametrů modelu. Posteriorní pravděpodobnosti pro námi sledované parametry jsou spočítány použitím vzorků z Markovova řetězce. Např. posteriorní pravděpodobnost stromu nebo rozvětvení ve stromu je určena jednoduše prozkoumáním poměru všech vzorků z Markovova řetězce, které obsahují topologické větvení našeho zájmu (Alfaro et al. 2003).

Larget a Simon (1999) ve své práci ukazují, že Bayesovský přístup k fylogenetickému odvozování má značné výhody pro rozsáhlé stromy oproti přístupu maximum likelihood. Dále pak že algoritmy, např. Metropolis-Hastings, jsou efektivnější než jiné výpočtové algoritmy, které byly dosud publikované, minimálně u malého množství dat. Nicméně autoři zmiňují několik problémů. Stejně jako u ML je otázka, zda-li použitý algoritmus opravdu nachází globální maximum, proto se můžeme ptát, jestli MCMC správně identifikuje a změří posteriorní pravděpodobnosti ze souboru vysoce pravděpodobných topologií stromů (Larget a Simon 1999). Dalším běžným problémem je zaseknutí se v regionu jen několika hodnot vyhledávacích parametrů a neprozkoumání regionů s topologiemi, u nichž je posteriorní pravděpodobnost podobná nebo dokonce i větší, což vede ke zkreslení závěrů. V případech, že jsou přechody mezi ostrovy topologií s vysokou posteriorní pravděpodobností ve velmi nízkých stupních. Je pak tedy nutno kontrolovat, zda skutečná topologie stromu je zachycena s dostatečnou posteriorní pravděpodobností.

Bayesovské odvozování má několik výhod nad jinými metodami fylogenetického odvozování včetně snadného výkladu výsledku, schopnosti včlenit dřívější informaci (jestli taková informace je k dispozici) a některých výpočtových výhod (Larget and Simon 1999, Huelsenbeck and Ronquist 2001). Bayesovské odvozování se stalo použitelným díky počítačovému programu MrBAYES, který vykonává odvozování fylogeneze užitím variant Markovova řetězce Monte Carlo (Huelsenbeck and Ronquist 2001). A tento přístup se nyní stává téměř převládající fylogenetickou metodou (Kolaczkowski and Thornton 2004).

Je mnoho důvodů věřit, že úspěch Bayesovského odvozování bude pokračovat, protože je možné ho aplikovat na širší řadu problémů v evoluční biologii. Bayesovská analýza by měla být také užitečná při oslovování některých nevyřešených problémů ve fylogenetice, jako je odhalování míry horizontálního přenosu genů (proces, který komplikuje fylogenetickou analýzu

bakterií), vykonávání fylogenetických analýz použitím dat z celého genomu, porozumění evoluce genomu v tomto kontextu fylogeneze a konstrukci velkých stromů kombinováním výsledků z menších a překrývajících se analýz.

Myslím si, že Bayesovská metoda, ač je také velice náročná na výpočet, má poměrně slibnou budoucnost, a to hlavně díky snadné interpretaci výsledku. Pokud se nestane nic nečekaného, myslím, že Bayesovské metody nahradí maximum likelihood. Maximum parsimony má díky jinému výpočtovému algoritmu šanci přežít.

3.4. Statistické metody

Tradiční fylogenetické metody, jako je maximum parsimony, maximum likelihood, Bayesovská analýza nebo neighbor-joining vytváří předpoklady, které jsou neúčinné na úrovni populací. Např. tyto metody předpokládají, že ancestrální haplotypy již v populaci nejsou, přesto koalescenční teorie předpovídá, že ancestrální haplotypy budou nejčastějšími sekvencemi získanými na úrovni populací. Tradiční metody také předpokládají, že se nebude rekombinace vyskytovat. Selhání v začlenění možnosti rekombinace do rekonstrukce fylogeneze může vést k vážným chybám ve výsledné odhadnuté fylogenezi. Proto je potřeba využít alternativních metod (Hillis et.al. 1996)

Program TCS je užíván s tradičními metodami k odvozování vztahů mezi organismy, které mají široký rozsah divergence (Hillis et. al. 1996). Přístup je také používán k rozdělení struktury populace. Program uspořádá identické sekvence do haplotypů a vypočítá frekvence haplotypů ve vzorku. Tyto frekvence se užívají k odhadování pravděpodobností outgroupů, které korelují se stářím haplotypů. Dalšími alternativními programy jsou, např. Arlequin, který poskytuje metody k analýze patternů genetické diverzity v rámci a mezi populacemi nebo Genalex, který umožňuje populační genetickou analýzu dat z kodominantních, haploidních a binárních genetických dat (Avisé 2004).

4. ZÁVĚR

4.1. Informace k budoucí magisterské práci

Výchozí data a vzorky k práci

Jedná se o soubor materiálu sebraného mezi roky 2003 až 2007 z několika lokalit na západním pobřeží PNG v rámci dalších výzkumných projektů zabývajících se mravenci i vzorky sebrané specificky pro studium populací *Crematogaster polita*. Vzorky byly sbírány přímým sběrem (hand collecting)* nebo pomocí vnaďících pastí (bait traps)** v podrostu i korunách primárního a sekundárního lesa.

Lokality

Hlavní objem materiálu pochází z lokalit v okolí vesnic Baitabag, Ohu a Wannang, v provincii Madang. Baitabag a Ohu jsou vzájemně vzdáleny cca 30 km a jsou spojeny mozaikou primárního a sekundárního lesa. Na každé z obou lokalit byli jedinci sbíráni na ploše přibližně 25 km². Vzdálenosti mezi sebranými koloniemi jsou na škále od několika metrů do pěti kilometrů. Z těchto dvou lokalit pochází největší množství sebraného materiálu (cca 250 vzorků) pomocí obou uvedených metod sběru. Na tyto lokality se také zaměří analýza detailní populační struktury druhu. Materiál s těchto lokalit bude také porovnán se sběry na vzdálenějších lokalitách PNG (v rozsahu 10 – 300 km).

Materiál z lokality Wannang (cca 50-150 vzorků) bude sloužit ke studiu příbuznosti kolonií obývajících koruny stromů v rámci dvou hektarových ploch primárního a sekundárního lesa. Zde jsou k dispozici data o detailní distribuci i velikosti kolonií mravenců, která bude zajímavé srovnat s aktuální genetickou příbuzností. Bude se pravděpodobně jednat o vůbec první takovou studii z oblasti tropického lesa.

* Ruční sběr (hand collecting) je metoda, která spočívá v hledání mravenců všude tam, kde se pravděpodobně vyskytují. Což zahrnuje hledání na zemi pod kameny, listy, kádami nebo jinými objekty, v rozkládajícím se dřevě, v rostlinách, na kmenech stromů nebo pod jejich kůrou (Bolton 1995).

** Návnady (baits) mohou být použity pro přilákání a koncentraci jedinců. Toto často zvyšuje počet sebraných jedinců a někdy budou přilákány i druhy, které by bylo obtížné lokalizovat. Návnady jsou velmi selektivní a nemusí přilákat druhy, které nejsou flexibilní ve svých potravních nárocích (Bolton 1995).

Práce se vzorky

Vzorky byly uloženy do lihu o koncentracích 70 – 98 %. Před extrakcí DNA museli být vzorky lihu zbaveny. Extrakce DNA byla již několika způsoby prováděna. 1) pomocí komerčního kitu (Tissue DNA spin kit 250) dle návodu výrobce. Tato metoda se bohužel pro extrakci DNA u mravenců neukázala jako úspěšná, a to i po různých drobných změnách oproti manuálu (např. různě dlouhá lyze buněk), 2) extrakce pomocí směsi fenol-chloroformu, avšak ani ta nebyla bohužel úspěšná, 3) extrakce směsí fenol-chloroform-isoamylalkohol s použitím enzymu chitináza a využitím tekutého dusíku k homogenizaci vzorků. Tato metoda se zatím jeví jako úspěšná, což bude pravděpodobně způsobeno použitím enzymu chitináza, který je vhodné využít při extrakci DNA z hmyzu.

Vzhledem k tomu, že ve vlastní práci jsem zatím ve fázi extrakce DNA, další postup bude popsán jen stručně. Genotypování bude provedeno pomocí fragmentu COI a COII mtDNA (cca 100 jedinců), v kombinaci s mikrosatelity (cca 50 jedinců), jadernými geny (cca 50 jedinců) a DNA barcodingem (cca 40 jedinců). Mikrosatelity pro druh *Crematogaster polita* vyvinuty zatím nebyly, využiji proto tedy mikrosatelity z jiných blízkých příbuzných druhů (Heinze et al. 2000, Feldhaar et al. 2004).

V jednotlivých metodách se samozřejmě budou jedinci překrývat, aby popřípadě bylo možné na závěr magisterské práce porovnat výpovědní hodnoty těchto molekulárních markerů. Pro tyto účely jsem již odeslala na barcodování cca 40 vzorků druhu *Crematogaster polita* (na analýzu byl vždy zaslán jeden mravenec; všechny vzorky pochází z lokality Baitabag a byly sebrané v období 18. – 22. 10. 2004). Přednostně budou využíváni jedinci sebrané pomocí přímého sběru, protože jedinci sebraní pomocí návnadových pastí jsou často poničení a není jasná jejich příslušnost ke kolonii (což je u studií populací podstatné).

Analýza molekulárních dat bude následně provedena pomocí maximum parsimony, Bayesovskou analýzou a statistickými metodami (např. TCS, Arlequin).

4.2. Závěrečné shrnutí

ITS2 a COI mohou společně poskytnout silný nástroj pro studie vnitrodruhové variability a fylogeneze blízkých příbuzných druhů. 18S rDNA a 28S rDNA jsou stejně užitečné pro fylogenetiku na druhém konci systematického spektra. Chybí však soubor markerů, které by bylo

možné použít v prostředních systematických úrovních, to jest mezi rody a třídami. Výsledky z některých prací u hmyzu ukazují, že mitochondriální ribosomální geny (12S a 16S rDNA) by v tomto směru mohly být užitečné. Avšak naproti tomu některé práce ukazují, že tyto geny jsou chudé v řešení fylogeneze na této úrovni pravděpodobně kvůli jejich vysokému obsahu AT. Nejlepším řešením mohou být jaderné protein-kódující geny, jako je například široce užívaný EF1 α . Avšak jeho nevýhodou je délka a s tím spojený malý počet informativních míst (**tab. 1**). Dále jsou u hmyzu využívány třeba wingless, abdominal-A, LW rhodopsin.

Dle informací o různých molekulárních markerech, které jsem sepsala a zhodnotila, jsem došla k názoru, že ve své budoucí magisterské práci využiji mtDNA COI (přibližně 1000 bp) v kombinaci s COII (přibližně 1000 bp). Tyto markery, které nicméně mohou zkreslovat fylogenetickou informaci (složení bazí, hybridizace, introgrese, NUMTS...), bych chtěla doplnit o mikrosatelity. Tato doplňková metoda by měla případné problémy s nesprávnou topologií stromu předejít. Ačkoliv dosud nebyly publikovány mikrosatelity vyvinuté pro druh (nebo komplex druhů), kterým se budu zabývat, bude proto nutno použít mikrosatelity vyvinuté pro jiné blízké příbuzné druhy (avšak s rostoucí genetickou vzdáleností se snižuje procento jejich úspěšnosti (Jarne and Lagoda 1996)) nebo eventuálně vyvinout vlastní (to v krajním případě).

Jaderné geny jako doplňkovou metodu bych též chtěla použít. Jako nejvhodnější se mi zdá ITS2 (už pro svou vhodnost v kombinaci s COI na úrovni vnitrodruhové variability) a EF1 α . I přesto, že je tento gen poměrně krátký, je stále nejhojněji užívaný u hmyzu, proto bych ho i já chtěla využít.

Fylogenetickou analýzu provedu pomocí maximum parsimony, protože ač je vyvinuta především na data morfologická, dá se celkem dobře použít i na data molekulární a vychází z jiných kritérií a výpočetních algoritimů. Tu budu kombinovat s Bayesovskou analýzou, která je tedy přímo využitelná na molekulární data. Jelikož si myslím, že Bayesovská analýza je zlepšený maximum likelihood nebudu ho ve své práci využívat.

Dalším postupem, zejména v analýzách vnitropopulační variability a příbuznosti kolonií bude třeba využít statistických metod ke zjištění příbuznosti kolonií a genetické vzdálenosti populací. TCS nebo Arlequin budou vhodnými programy pro tyto studie.

5. SEZNAM LITERATURY

- Adachi, J., and M. Hasegawa. 1992. Amino-Acid Substitution Of Proteins Coded For In Mitochondrial-Dna During Mammalian Evolution. *Japanese Journal Of Genetics* 67:187-197.
- Alfaro, M. E., S. Zoller, and F. Lutzoni. 2003. Bayes or bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov chain Monte Carlo sampling and bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Molecular Biology And Evolution* 20:255-266.
- Angers, B., and L. Bernatchez. 1998. Combined use of SMM and non-SMM methods to infer fine structure and evolutionary history of closely related brook charr (*Salvelinus fontinalis*, Salmonidae) populations from microsatellites. *Molecular Biology And Evolution* 15:143-159.
- Avise, J. C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*, second edition. Sinauer.
- Balloux, F., H. Brunner, N. Lugon-Moulin, J. Hausser, and J. Goudet. 2000. Microsatellites can be misleading: An empirical and simulation study. *Evolution* 54:1414-1422.
- Beibl, J., A. Buschinger, S. Foitzik, and J. Heinze. 2007. Phylogeny and phylogeography of the Mediterranean species of the parasitic ant genus *Chalepoxenus* and its *Temnothorax* hosts. *Insectes Sociaux* 54:189-199.
- Bhattacharya, D. 1996. Analysis of the distribution of bootstrap tree lengths using the maximum parsimony method. *Molecular Phylogenetics And Evolution* 6:339-350.
- Black, W. C., J. S. H. Klompen, and J. E. Keirans. 1997. Phylogenetic relationships among tick subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. *Molecular Phylogenetics And Evolution* 7:129-144.
- Bolton, B. 1995. *A new general catalogue of the ants of the world*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Brady, S. G., T. R. Schultz, B. L. Fisher, and P. S. Ward. 2006. Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 103:18172-18177.
- Buckley, T. R., C. SIMON, and G. K. CHAMBERS. 2001. Phylogeography of the New Zealand cicada *Maoricicada campbelli* based on mitochondrial dna sequences: ancient clades associated with cenozoic environmental change. *Evolution* 55:1395-1407.
- Buren, W. F. 1959 ("1958"). A review of the species of *Crematogaster*, sensu stricto, in North America (Hymenoptera: Formicidae). Part I. *J. N. Y. Entomol. Soc.* 66:119-134.

- Cao, Y., A. Janke, P. J. Waddell, M. Westerman, O. Takenaka, S. Murata, N. Okada, S. Paabo, and M. Hasegawa. 1998. Conflict among individual mitochondrial proteins in resolving the phylogeny of eutherian orders. *Journal Of Molecular Evolution* 47:307-322.
- Crampton, A., I. McKay, and S. C. Barker. 1996. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. *International Journal For Parasitology* 26:511-517.
- Crozier, R. H., Y. C. Crozier, and A. G. Mackinlay. 1989. The Co-I And Co-II Region Of Honeybee Mitochondrial-Dna - Evidence For Variation In Insect Mitochondrial Evolutionary Rates. *Molecular Biology And Evolution* 6:399-411.
- Cruickshank, R. H. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic & Applied Acarology* 7.
- Cruickshank, R. H., and R. H. Thomas. 1999. Evolution of haplodiploidy in dermanyssine mites (Acari: Mesostigmata). *Evolution* 53:1796-1803.
- Cruickshank, R. H., K. P. Johnson, V. S. Smith, R. J. Adams, D. H. Clayton, and R. D. M. Page. 2001. Phylogenetic analysis of partial sequences of elongation factor 1 alpha identifies major groups of lice (Insecta: Phthiraptera) (vol 19, pg 202, 2001). *Molecular Phylogenetics And Evolution* 20:326-326.
- Davidson, D. W. 1988. Ecological studies of Neotropical ant gardens. *Ecology* 69:1138-1152.
- Feldhaar H, Fiala B, Gadau J. 2004. Characterization of microsatellite markers for plant-ants of the genus *Crematogaster* subgenus *Decacrema*. *Molecular ecology notes* 4: 409-411.
- Felsenstein, J., and H. Kishino. 1993. Is There Something Wrong With The Bootstrap On Phylogenies - A Reply. *Systematic Biology* 42:193-200.
- Fernández Escudero, I., Pamilo, P., Seppä, P. 2002. Biased sperm use by polyandrous queens of the ant *Proformica longiseta*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 51:207-213.
- Field, D., and C. Wills. 1996. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* 263:209-215.
- Friedlander, T. P., J. C. Regier, and C. Mitter. 1992. Nuclear Gene-Sequences For Higher Level Phylogenetic Analysis - 14 Promising Candidates. *Systematic Biology* 41:483-490.
- Funk, D. J. And Omland, K. E. 2003 Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Ecology; Evolutionary biology* 37: 397-423.
- Goldstein, and Schlötterer. 1999. *Microsatellites: evolution and applications*. New York: Oxford university press.

- Goropashnaya, A. V., V. B. Fedorov, and P. Pamilo. 2004. Recent speciation in the *Formica rufa* group ants (Hymenoptera, Formicidae): inference from mitochondrial DNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:198-206.
- Gregory, and T. Ryan. 2005. DNA barcoding does not compete with taxonomy. *Nature* 434:1067.
- Gyllenstrand, N., P. Seppä, and P. Pamilo. 2004. Genetic differentiation in sympatric wood ants, *Formica rufa* and *F. polyctena*. *Insect. Soc.* 51:139–145.
- Hang, D. H., E. Torng, C. Ofria, and T. M. Schmidt. 2007. The effect of natural selection on the performance of maximum parsimony. *Bmc Evolutionary Biology* 7.
- Harris, D. J., and K. A. Crandall. 2000. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies. *Molecular Biology And Evolution* 17:284-291.
- Hasegawa, E., and R. H. Crozier. 2006. Phylogenetic relationships among species groups of the ant genus *Myrmecia*. *Molecular Phylogenetics And Evolution* 38:575-582.
- Hasegawa, M. 1991. Molecular Phylogeny And Mans Place In Hominoidea. *Journal Of The Anthropological Society Of Nippon* 99:49-61.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270:313–321.
- Hebert, P. D. N., and T. R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology* 54:852-859.
- Hebert, P. D. N., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen, and W. Hallwachs. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS* 101:14812–14817.
- Hedges, S. B. 1994. Molecular Evidence For The Origin Of Birds. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 91:2621-2624.
- Hedges, S. B., K. D. Moberg, and L. R. Maxson. 1990. Tetrapod Phylogeny Inferred From 18s-Ribosomal And 28s-Ribosomal Rna Sequences And A Review Of The Evidence For Amniote Relationships. *Molecular Biology And Evolution* 7:607-633.
- Heinze J, Stratz M, Pedersen JS, et al. 2000. Microsatellite analysis suggests occasional worker reproduction in the monogynous ant *Crematogaster smithi*. *Insectes sociaux* 4: 299-301.
- Henshaw, M. T., N. Kunzmann, C. Vanderwoude, M. Sanetra, and R. H. Crozier. 2005. Population genetics and history of the introduced fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae), in Australia. *Australian Journal of Entomology* 44:37-44.

- Hillis, D. M., and M. T. Dixon. 1991. Ribosomal Dna - Molecular Evolution And Phylogenetic Inference. *Quarterly Review Of Biology* 66:411-453.
- Hillis, D. M., C. Moritz, and B. K. Mable. 1996. *Molecular systematics*, second edition. Sinauer.
- Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Huelsenbeck, J. P., F. Ronquist, R. Nielsen, and J. P. Bollback. 2001. Evolution - Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294:2310-2314.
- Hung, Y. T., Chen, C.A., Wu, W.J., Lin, C.C., Shih, C.J. 2004. Phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 in *Strumigenys* spp. (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32:407-415.
- Janda, M. 2007. *Ecology and natural history of Melanesian ants*. University of South Bohemia, Faculty of Science.
- Janda, M., D. Folkova, and J. Zrzavy. 2004. Phylogeny of *Lasius* ants based on mitochondrial DNA and morphology, and the evolution of social parasitism in the *Lasiini* (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33:595-614.
- Jarne, P., and P. J. L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends In Ecology & Evolution* 11:424-429.
- Kishino, H., T. Miyata, and M. Hasegawa. 1990. Maximum-Likelihood Inference Of Protein Phylogeny And The Origin Of Chloroplasts. *Journal Of Molecular Evolution* 31:151-160.
- Klompen, H. 2000. A preliminary assessment of the utility of elongation factor-1 alpha in elucidating relationships among basal Mesostigmata. *Experimental And Applied Acarology* 24:805-820.
- Kolaczowski, B., and J. W. Thornton. 2004. Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous. *Nature* 431:980-984.
- Kuperus, W. R., and W. Chapco. 1994. Usefulness Of Internal Transcribed Spacer Regions Of Ribosomal Dna In Melanopline (Orthoptera, Acrididae) Systematics. *Annals Of The Entomological Society Of America* 87:751-754.
- Larget, B., and D. L. Simon. 1999. Markov chain Monte Carlo algorithms for the Bayesian analysis of phylogenetic trees. *Molecular Biology And Evolution* 16:750-759.
- Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, and E. Nevo. 2004. Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution. *Molecular Biology And Evolution* 21:991-1007.
- Longino, J. T. 2003. The *Crematogaster* (Hymenoptera, Formicidae, Myrmicinae) of Costa Rica. *Zootaxa* 151:1-150.

- MacHugh, D. E., M. D. Shriver, R. T. Loftus, P. Cunningham, and D. G. Bradley. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and Zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146:1071-1086.
- Maddison, D. R. 1994. Phylogenetic Methods For Inferring The Evolutionary History And Processes Of Change In Discretely Valued Characters. *Annual Review Of Entomology* 39:267-292.
- Maddison, W. P. 1995. Calculating the probability distributions of ancestral states reconstructed by parsimony on phylogenetic trees. *Systematic Biology* 44:474-481.
- Majer, J. D., J. H. C. Delabie, and M. R. B. Smith. 1994. Arboreal ant community patterns in Brazilian cocoa farms. *Biotropica* 26:73-83.
- Metzgar, D., J. Bytof, and C. Wills. 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* 10:72-80.
- Mindell, D. P., and R. L. Honeycutt. 1990. Ribosomal-Rna In Vertebrates - Evolution And Phylogenetic Applications. *Annual Review Of Ecology And Systematics* 21:541-566.
- Monaghan, M. T., M. Balke, T. R. Gregory, and A. P. Vogler. 2005. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B-Biological Sciences* 360:1925-1933.
- Moran, C. 1993. Microsatellite Repeats In Pig (*Sus-Domestica*) And Chicken (*Gallus-Domesticus*) Genomes. *Journal Of Heredity* 84:274-280.
- Moreau, C. S., C. D. Bell, R. Vila, S. B. Archibald, and N. E. Pierce. 2006. Phylogeny of the Ants: Diversification in the Age of Angiosperms. *Science* 312.
- Moritz, C., and C. Cicero. 2004. DNA barcoding: Promise and pitfalls. *Plos Biology* 2:1529-1531.
- Navajas, M., D. Fournier, J. Lagnel, and P. Boursot. 1996. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variation in base composition. *Insect Molecular Biology* 5.
- Nei, M., S. Kumar, and K. Takahashi. 1998. The optimization principle in phylogenetic analysis tends to give incorrect topologies when the number of nucleotides or amino acids used is small. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 95:12390-12397.
- Olsen, G. J., C. R. Woese, and R. Overbeek. 1994. The Winds Of (Evolutionary) Change - Breathing New Life Into Microbiology. *Journal Of Bacteriology* 176:1-&.
- Pace, N. R., G. J. Olsen, and C. R. Woese. 1986. Ribosomal-Rna Phylogeny And The Primary Lines Of Evolutionary Descent. *Cell* 45:325-326.

- Richard, M., and R. S. Thorpe. 2001. Can microsatellites be used to infer phylogenies? Evidence from population affinities of the Western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*). *Molecular Phylogenetics And Evolution* 20:351-360.
- Rokas, A., B. L. Williams, N. King, and S. B. Carroll. 2003. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* 425:798-804.
- Ros, V. I. D., and J. A. J. Breeuwer. 2007. Spider mite (Acari: Tetranychidae) mitochondrial COI phylogeny reviewed: host plant relationships, phylogeography, reproductive parasites and barcoding. *Experimental And Applied Acarology* 42:239-262.
- Savolainen, R., and K. Vepsäläinen. 2003. Sympatric speciation through intraspecific social parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 100:7169-7174.
- Seifert, B., and A. V. Goropashnaya. 2004. Ideal phenotypes and mismatching haplotypes - errors of mtDNA treeing in ants (Hymenoptera: Formicidae) detected by standardized morphometry. *Organisms Diversity & Evolution* 4:295-305.
- Schlick-Steiner, B. C., F. M. Steiner, H. Konrad, B. Marko, S. Csoz, G. Heller, B. Ferencz, B. Sipos, E. Christian, and C. Stauffer. 2006. More than one species of Messor harvester ants (Hymenoptera: Formicidae) in Central Europe. *European Journal Of Entomology* 103:469-476.
- Smith, M. A., B. L. Fisher, and P. D. N. Hebert. 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360:1825-1834.
- Sober, E. 2004. The contest between parsimony and likelihood. *Systematic Biology* 53:644-653.
- Stallings, R. L. 1994. Distribution Of Trinucleotide Microsatellites In Different Categories Of Mammalian Genomic Sequence - Implications For Human Genetic-Diseases. *Genomics* 21:116-121.
- Steiner, F. M., B. C. Schlick-Steiner, H. Konrad, K. Moder, E. Christian, B. Seifert, R. H. Crozier, C. Stauffer, and A. Buschinger. 2006. No sympatric speciation here: multiple data sources show that the ant *Myrmica microrubra* is not a separate species but an alternate reproductive morph of *Myrmica rubra*. *Journal Of Evolutionary Biology* 19:777-787.
- Takahashi, K., and M. Nei. 2000. Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and maximum likelihood when a large number of sequences are used. *Molecular Biology And Evolution* 17:1251-1258.
- Toth, G., Z. Gaspari, and J. Jurka. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10:967-981.

- Trontti, K., S. Aron, and L. Sundström. 2005. Inbreeding and kinship in the ant *Plagiolepis pygmaea*. *Molecular Ecology* 14:2007-2015.
- Tschinkel, W. R., and C. A. Hess. 1999. Arboreal ant community of a pine forest in northern Florida. *Annals Of The Entomological Society Of America* 92:63-70.
- VanLith, H. A., and L. F. M. VanZutphen. 1996. Characterization of rabbit DNA microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence database. *Animal Genetics* 27:387-395.
- Ward, P. S., and D. A. Downie. 2004. The ant subfamily Pseudomyrmecinae (Hymenoptera: Formicidae): phylogeny and evolution of big-eyed arboreal ants. *Systematic Entomology* 30:310-335.
- Wheeler, Q. D. 2004. Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* 359:571-583.
- Wheeler, W. M. 1906. The habits of the tent-building ant (*Cremastogaster lineolata* Say). *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 22:1-18.
- Wiesner, R. J., J. C. Ruegg, and I. Morano. 1992. Counting Target Molecules By Exponential Polymerase Chain-Reaction - Copy Number Of Mitochondrial-Dna In Rat-Tissues. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 183:553-559.
- Will, K. W., and D. Rubinoff. 2004. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics-The International Journal Of The Willi Hennig Society* 20:47-55.
- Will, K. W., B. D. Mishler, and Q. D. Wheeler. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology* 54:844-851.
- Wilson, E. O. 1959. Some ecological characteristics of ants in New Guinea rain forests. *Ecology* 40:437-447.
- Zeisset, I., J. R. Ebsen, and J. J. Boomsma. 2005. Dinucleotide microsatellite DNA loci from the ant *Myrmica scabrinodis*. *Molecular Ecology Notes* 5:163-164.
- Zhang, J. Z., and M. Nei. 1997. Accuracies of ancestral amino acid sequences inferred by the parsimony, likelihood, and distance methods. *Journal Of Molecular Evolution* 44:S139-S146.