

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**Katedra zoologie**



**Bakalářská práce**

**REŠERŠE KE STUDIU POPULAČNÍ BIOLOGIE RODU  
*RHYTIDOPONERA* (HYMENOPTERA:FORMICIDAE)**

Vypracoval: Jiří Bizos

Vedoucí práce: Mgr. Milan Janda, PhD.

Rok vypracování: 2009

Bizos, J. (2009) **Rešerše ke studiu populační biologie rodu *Rhytidoponera*** (Hymenoptera: Formicidae) [Population biology of *Rhytidoponera* ants (Hymenoptera: Formicidae) – a literature retrieval. Bc Thesis, in Czech.], 51 pp. Faculty of Biological Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic

**Annotation:**

Ants from the genus *Rhytidoponera* are known for specific type of social organization in which some workers can reproduce. Species of this ants are commonly occurring in lowland rainforests of New Guinea but their biology is unknown to great extent. This thesis reviews available molecular methods suitable for study of population structure and phylogeography of *Rhytidoponera* ants in rainforest environment.

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

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

V Českých Budějovicích 7.1.2009

.....

Jiří Bizos

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěl bych poděkovat vedoucímu bakalářské práce Mgr. Milanu Jandovi, PhD. za ochotnou pomoc při zpracování a korektuře práce.

# Obsah:

Úvod a cíle rešeršní práce.....	5
1. Biologie rodu Rhytidoponera (Mayr,1862).....	7
1.1 Taxonomický status.....	7
1.2 Ekologie rodu Rhytidoponera.....	9
1.3 Biogeografie rodu Rhytidoponera.....	10
1.4 Populačně genetické vztahy.....	11
2. Molekulárně-genetické metody.....	19
2.1 Historie markerů.....	19
2.2 DNA markery.....	20
2.2.1 Mitochondriální DNA.....	21
2.2.2 Mikrosatelity.....	26
2.2.3 Jiné vybrané markery – restrikční metody a RAPD.....	30
2.2.4 Studie mravenčích populací založené na kombinaci markerů.....	34
Závěr.....	41

# Úvod a cíle rešeršní práce

Mravenci jsou v mnoha terestrických ekosystémech klíčovým elementem. Mají značný vliv nejen na biotickou, ale i na abiotickou povahu prostředí v místě svého výskytu. Významně ovlivňují populační dynamiku jiných druhů organismů (nejen živočichů, ale i rostlin a hub), tok živin (přemisťováním půdy a různého organického materiálu) a dekompoziční procesy. Jsou vhodnými kandidáty pro monitorování změn životního prostředí. Díky své unikátní sociální organizaci jsou také častým předmětem výzkumu zaměřeného na poznání druhové a sociální diverzity této skupiny.

Tato rešeršní práce představuje shrnutí publikovaných studií jako podklad k budoucímu výzkumu rodu *Rhytidoponera* v rámci výzkumu ekologie a evoluce mravenčí fauny Melanésie, prováděného Entomologickým ústavem AVČR a Přírodovědeckou fakultou JU. Zabývá se zhodnocením molekulárních metod (sekvenování DNA, populačně-genetické metody) vhodných k rekonstrukci populačních a fylogenetických vztahů u novoguinejských zástupců mravence rodu *Rhytidoponera* s ohledem na jejich distribuci v Austronéské oblasti.

V celkovém objemu fylogenetických a populačně-genetických prací, které byly publikovány na různých druzích čeledi Formicidae, představují studie na rodu *Rhytidoponera* jen velmi malou část. Práce věnující se zhodnocení fylogeneze a fylogeografie tohoto druhu nejsou publikovány vůbec. Z celkově 104 popsanych druhů bylo důkladněji z populačně-genetického hlediska prostudováno jen velmi málo druhů a to pouze ty, vyskytující se v Austrálii. Na základě tohoto dosavadního poznání však autoři vydaných prací předpokládají, že všech 12 druhů vyskytujících se na Nové Guineji (z toho 6 považovaných za endemické) je ve své sociální organizaci téměř uniformní (polygynie s větším množstvím gamergates). To je do jisté míry překvapivé, neboť r. *Rhytidoponera* se vyznačuje poměrně vysokou variabilitou v sociální organizaci jednotlivých druhů (Ward 1983; Tay & Crozier 2000; Chapuisat et al. 2000), přičemž patrně nejpozoruhodnější zvláštností je existence morfologicky neodlišených dělnic schopných rozmnožování tzv. gamergates.

Možné rozkrytí vztahů mezi druhy a populacemi r. *Rhytidoponera* na Nové Guineji by mělo rozšířit současný stav poznání této bezesporu zajímavé skupiny mravenců a také přispět k aktuální problematice studia vlivu člověka na pralesní ekosystémy.

Jak bude detailněji popsáno dále, specifická životní strategie rodu *Rhytidoponera* má za následek eventuální omezení migrace jedinců do okolí. Proto by vztahy mezi populacemi

vybraných druhů r. *Rhytidoponera* mohly být vhodným indikátorem vlivu fragmentace biotopu na životaschopnost druhů v narušeném prostředí tropického pralesa.

Cílem této rešerše je uvést výhody a nevýhody zvolených molekulárních markerů pro sledování příbuzenských vztahů v rámci populací či na mezidruhové úrovni. Pro pochopení fylogenetických vztahů mezi mravenci na úrovni populace i vyšší je nicméně potřebné pochopit sociální organizaci sledovaných druhů, která má významný vliv na další aspekty životní historie a evoluce (migrace, speciace). Proto jsem se pokusil shrnout a vyhodnotit dosud publikované práce věnující se rodu *Rhytidoponera* z hlediska populačně-genetického i sociobiologického.

Detailněji by tato rešerše měla odpovědět na následující otázky:

- 1) Je polymorfismus na úrovni mitochondriální a jaderné DNA vhodným markerem pro mapování vztahů mezi populacemi a druhy rodu *Rhytidoponera* na velkých prostorových škálách?
- 2) Jaké molekulární markery použít pro mapování vztahů mezi populacemi na nižších prostorových škálách a jaký vliv má komplikovaná sociální organizace rodu *Rhytidoponera* na jejich použití?
- 3) Je rod *Rhytidoponera* vhodným organismem pro sledování vlivu fragmentace a degradace biotopu a pokud ano, tak proč?

Níže uvedený text je členěn na dva oddíly a závěrečné shrnutí s odpověďmi na výše položené otázky. První oddíl se podrobně věnuje současnému stavu poznání r. *Rhytidoponera* s přihlédnutím na publikované populačně-genetické studie. Druhý zhodnocuje molekulární markery aplikovatelné ve studiu vztahů mezi druhy a populacemi a vybrané práce prováděné pomocí těchto markerů na mravencích.

# 1. Biologie rodu *Rhytidoponera* (Mayr, 1862)

## 1.1 Taxonomický status

První druhy dnes rozeznávaného rodu *Rhytidoponera* byly popsány v polovině 19. století a zařazeny do rodů *Ponera* (Latreille 1804; Le Guillou 1842; Smith 1858; Roger 1860, 1861) a *Ectatomma* (Smith 1858, 1859; Mayr 1876; Emery 1883, 1895a). *Rhytidoponera* byla následně Mayrem (1862) zařazena jako jeden ze tří podrodů *Ectatomma*.

V roce 1897 Emery ustavil *Rhytidoponera* jako samostatný rod se dvěma podrody *Rhytidoponera* a *Chalcoponera*. Následně Wheeler (1922) povýšil *Chalcoptera* na samostatný rod. Zásadní porovnání odlišností mezi *Rhytidoponera* a *Chalcoptera* provedl Brown (1953) a stanovil, že se nejedná o rozdílné skupiny a synonymizoval je.

První revizi rodu *Rhytidoponera* publikoval Clark (1936). Avšak Brown (1958) tuto revizi nepovažoval za zdařilou. Důvodem byly nejasně definované odlišovací charakteristiky druhů. Sám v roce 1954 určil a přezkoumal skupinu *R. impressa* (Mayr 1876) a publikoval poznámky ke skupině *R. metallica* (Smith 1858). V práci věnované tribu Ectatommini Brown (1958) provedl předběžnou revizi a evidenci všech dosud popsaných druhů *Rhytidoponera* a zároveň popsal tři australské a dva novokaledonské druhy. Wilson (1958) zrevidoval druhy vyskytující se v západní Melanesii a na Molukách a popsal jeden nový. Ward (1980a) přezkoumal skupinu druhů z okolí *R. impressa* s využitím allozymové elektroforézy a morfologických charakteristik. Další jeho studie (1984) se věnovala revizi druhů *Rhytidoponera* vyskytujících se na Nové Kaledonii. Nejnovější práci vypracoval Andersen (2000), zabývá se taxonomií druhů severní Austrálie.

Dosud však nikdo nepublikoval žádný text, který by se věnoval klasifikaci a fylogenetickým vztahům druhů rodu *Rhytidoponera* na podkladě DNA, tak jak je v současnosti běžné. Jedna z nepublikovaných prací zabývající se molekulární fylogenezí australských druhů je od Reichel (2003). Studie je založena na jednom mitochondriálním (cytochrom b) a jednom nukleárním genu (elongační faktor 1 alpha). Výsledky tohoto výzkumu potvrdily monofylii rodu *Rhytidoponera* a jeho nejbližší příbuznost s rodem *Ectatomma*. Zároveň stanovuje dvanáct kladů zajímavých pro bližší kvalifikaci rodu, nicméně vztahy v rámci jednotlivých linií příliš nerozřešuje.

Tribus Ectatommini ustanovil Emery (1895b) jako jeden z pěti tribů podčeledi Ponerinae. Ačkoliv se v následujících studiích v rámci Ectatommini (Wheeler 1922; Brown

1958; Lattke 1994) měnily počty rodů, *Rhytidoponera* v něm zůstávala vždy zařazena.

Brown (1958) navrhl jako sesterskou skupinu rodu *Rhytidoponera* rod *Heteroponera*, který se vyskytuje v Jižní Americe, Austrálii a na Novém Zélandu. Naproti tomu fylogenetická studie (Lattke 1994), založená na morfologických datech, stanovuje jako nejbližší příbuzné tribu *Rhytidoponera* rody *Gnamptogenys* (Jižní Amerika a Jihovýchodní Asie) a *Ectatomma* (Střední Amerika a severní část Jižní Ameriky). Vzájemné vztahy mezi těmito třemi skupinami neuvádí. Keller (2000) v jeho kritickém přezkoumání Lattkeho práce uvádí jako nejbližšího příbuzného *Rhytidoponera* rod *Ectatomma*, k této dvojici pak jako sesterskou skupinu rod *Gnamptogenys*.

Rozsáhlá práce Brown (2003), zaměřená na fylogenezi čeledi Formicidae na základně molekulárních dat, nově ustanovuje podčeď Ectatomminae zahrnující čtyři rody (mimo třech výše zmíněných také rod *Typhlomyrmex*). Ectatomminae je zde, spolu s dalšími pěti skupinami (Amblyoponinae (9 rodů), Heteroponerinae (3 rody), Paraponerinae (1 rod), Ponerinae (25 rodů) a Proceratiinae (3 rody)) řazena do seskupení tzv. poneromorfních podčeďí. Naproti tomu práce Saux et al. (2004), jejichž data vycházejí z užití 28S rDNA sekvencí, považuje klad "poneromorfních" podčeďí za polyfyletickou skupinu a vyčleňuje z něj Ectatomminae do "formikoidního" kladu (tj. blíže ke skupinám Formicinae a Myrmeciinae).

Toto podporují i Brady et al. (2006), Moreau et al. (2006), kteří se zabývají fylogenezí převážné většiny rodových linií mravenců. Obě práce vycházejí ze sekvenace většího počtu genů: Moreau et al. využívá pět nukleárních genů (18S RNA, 28S RNA, wingless, long-wavelength Rhodopsin a abdominal-A) a jeden mitochondriální (cytochrom I), Brady et al. (2006) naopak sedm nukleárních genů (mimo výše zmíněných také elongační factor 1 alpha F1 a elongační factor 1 alpha F2). Mimoto se práce také shodují v zařazení rodu *Ectatomma* jako nejbližšího příbuzného k *Rhytidoponera* a rodu *Heteroponera* (*Heteroponerinae*) jako nejbližšího příbuzného ke skupině *Ectatomminae*, a zároveň určují nejbližší příbuznost seskupení ectaheteromorfních (*Heteroponerinae* + *Ectatomminae*) ke skupině *Formicinae* + *Myrmicinae*. Výše uvedené poznatky prací z roku 2006 podpořil i Ward (2007) ve svém článku shrnujícím současné poznání fylogeneze a klasifikace skupiny *Formicidae*.



## 1.2 Ekologie rodu *Rhytidoponera*

V oblasti svého výskytu jsou zástupci r. *Rhytidoponera* rozšířeni ve velkém množství rozmanitých habitatů od pouští přes deštné pralesy až po městské oblasti. Hnízda se nacházejí téměř výhradně v půdě nebo v tlejících stromech, přičemž půdní hnízda jsou často pod kameny nebo stromy. Hnízda, která jsou nekrytá, tvoří většinou malé, neupravené hromady až velké kupy, které jsou pokryty listím, malými částmi větviček a kamínky. Druhy obývající deštné pralesy mohou vzácně hnízdit ve stromech ([www.australianants.org](http://www.australianants.org)).

Vyhledávání a sběr potravy provádí každá dělnice osamoceně. V suchých oblastech především večer a v noci, v zalesněných místech i přes den. Kooperativní transport není dobře vyvinut, vzácně však byl tento jev pozorován u vstupů do hnízda. Svolávání jiných dělnic k potravnímu zdroji v blízkosti hnízda prostřednictvím chemického signálu popisuje Ward (1981) u druhů *R. chalybaea* a *R. purpurea*. Druhým pozorovaným svolávacím signálem je stridulace (Ward 1981; Pamilo et al. 1985). *Rhytidoponera* patří v některých oblastech svého výskytu, například v Austrálii, k velmi významným predátorům a mrchožroutům. Jako další potrava těchto mravenců se uvádí semena, dužnina ovoce a také medovice, kterou produkuje hmyz z řádu Hemiptera (Wilson 1958; Ward 1981), patří tedy k typickým potravním generalistům.

Transport dospělců, při kterém je jedna dělnice přenášena druhou, je v přírodě pozorován často i u jiných druhů mravenců. Časté stěhování hnízd je dokumentováno u druhů *R. metallica* (Thomas 2002), *R. confusa*, *R. chalybaea* (Ward 1981) a *Rhytidoponera* sp. 12 (Pamilo 1985).

### 1.3 Biogeografie rodu *Rhytidoponera*

Distribuce rodu *Rhytidoponera* je omezena na Australskou oblast a na část Orientální oblasti nazývané Indonéská, kde s výjimkou druhu *Rhytidoponera araneoides* vyskytující se na Filipínách, nepřesahuje do oblasti západně od Wallaceovy linie (Bolton 1995). Ze 104 popsáných druhů se jich 76 nachází přímo v Austrálii. Z této skutečnosti Wilson (1959) usuzuje, že místem vzniku skupiny *Rhytidoponera* je právě Austrálie, odkud došlo k migracím do ostatních oblastí výskytu. Stanovuje tři migrační vlny. První, která umožnila rozšíření na Novou Kaledonii, kde se v současnosti nachází 18 popsáných druhů (Ward 1984), a na Novou Guineu (12 popsáných druhů (Wilson 1958)), druhá migrační vlna zahrnující druhy *R.nexa* a *R. araneoides*, z Nové Guineje na ostrov Nová Británie a třetí migrační vlna druhu *R. araneoides*, která proběhla ze dvou oblastí: Z Nové Británie na severně od ní ležící ostrov Nové Irsko a z Nové Guineje východně na Šalamounovy ostrovy a západně na indonéské ostrovy a Filipíny. Bolton (1995) zmiňuje na indonéském ostrově Aru také druhy *R. strigosa* a *R. subcyanea*. Po jednom druhu má Nový Zéland (*R. chalybaea*) a Timor (*R. hanieli*). Nicméně je nutno podotknout, že Wilson nezaložil své závěry na žádné exaktní biogeografické analýze, ale na pouhém porovnání morfologie a distribuce druhů austronézké oblasti. Je proto třeba tyto hypotézy považovat za ne příliš podložené.

Box 1. Druhy rodu *Rhytidoponera* vyskytující se na Nové Guinei a další oblasti jejich výskytu (Bolton 1995).

<i>R. abdominalis</i>	
<i>R. aenescens</i>	
<i>R. araneoides</i>	(Ceram, Aru, Austrálie, Nová Británie, Nové Irsko, Šalamounovy Ostrovy, Sulawesi, Filipíny)
<i>R. celtinodis</i>	
<i>R. hanieli</i>	(Timor)
<i>R. inops</i>	
<i>R. laciniosa</i>	
<i>R. nexa</i>	(Nová Británie)
<i>R. purpurea</i>	(Austrálie)
<i>R. rotundiceps</i>	
<i>R. strigosa</i>	(Aru)
<i>R. subcyanea</i>	(Aru)

## 1.4 Populačně-genetické vztahy rodu *Rhytidoponera*

### 1.4.1 Obecné populačně-genetické vztahy v rámci skupiny Formicidae

Všechny sociální hmyzy žijí ve vysoce organizovaných společenstvích, které se však u jednotlivých druhů i jejich jednotlivých populací pozoruhodně odlišují. Variabilita v sociálním uspořádání, nejen že ovlivňuje genetickou strukturu populací, ale také může vést ke vzniku nového druhu pokud dojde k výrazné změně v sociální struktuře, jež následně ovlivní genofond sociálně pozměněných populací (Avisé 2004).

Jedním z důležitých faktorů, který má vliv na odlišnou genetickou strukturu populací je množství samic (královen) v hnízdě schopných reprodukce (Ross 2001). Mnoho druhů mravenců je typicky monogynní, tzn. že v hnízdě se nachází pouze jedna královna, zatímco jiné druhy mají kolonie polygynní s mnoha královnami schopnými pářit se a produkovat potomstvo. Právě přítomnost mnoha královen pářících se s větším množstvím samců má vliv na pokles genetické příbuznosti mezi jedinci v porovnání s monogynním uspořádáním (tzn. pro ideální monogynní uspořádání příbuznost mezi královnou a dělnicemi vyjádřená jako  $b = 0.75$ , příbuznost dělnic a pářících se samců vyjádřená jako  $b = 0.25$  a příbuznost mezi dělnicemi (sestrami) vyjádřená jako  $b = 0.50$ , stejná i pro samce (bratry)). Odlišnosti v počtu královen jsou spojeny s množstvím důležitých rysů životní historie jako například s agresivitou směřovanou k jedincům nesdílejících společné hnízdo nebo s disperzní schopností královny (Hölldobler & Wilson 1990).

Ve většině případů jsou samice produkované v monogynních hnízdech schopné letu a svá hnízda zakládají nezávisle, což vyžaduje větší množství tělních zásob (Stille 1996), protože většina královen plodí první dělnice v úplné izolaci (Hölldobler & Wilson 1990). Některé druhy mravenců však mají alternativní způsob reprodukce, který obchází solitérní zakládání hnízd (Hölldobler & Wilson 1990). Mladé královny (často z polygynních kolonií) zakládají kolonie v doprovodu dělnic v blízkosti mateřské kolonie (závislé zakládání kolonie) (Keller 1991), nebo jsou adoptovány do mateřského hnízda (Hölldobler & Wilson 1990), případně se pokoušejí proniknout a využívat nepřibuzné kolonie (inter- nebo intraspecifický parasitismus). Takovýto způsob zakládání hnízd nepotřebuje královny nebo oplodněné dělnice schopné reprodukce, s velkými tělními zásobami, a proto mohou být dispergující samice malé (Stille 1996). Mimo redukce tělní velikosti je sekundární polygynie často provázena procesem nazývaným štěpení či "pučení" mateřské kolonie (Hölldobler & Wilson 1990). Poslední jmenovaná strategie může vést k shlukování příbuzných kolonií a tímto

dochází ke zvýšení tak zvané populační viskozity (vzájemná blízká genetická příbuznost sousedních kolonií respektive hnízd) (Seppä & Pamilo 1995; Chapuisat et al. 1997). Tento stav pak může ovlivňovat lokální vztahy mezi koloniemi (např. snížení míry agresivity) a následně vést k lepší pozici při mezidruhové kompetici (o prostor, potravu apod.). Na druhou stranu však může dojít v polygynních koloniích, kde se často páří královny s více než jedním samcem, ke snížení míry příbuznosti mezi členy kolonie (Hölldobler & Wilson 1990).

U řady druhů nacházíme sociální polymorfismus, kdy některé kolonie v populaci jsou funkčně monogynní, jiné funkčně polygynní. Takovéto specifické uspořádání je popsáno u invazního druhu *Solenopsis invicta* (Ross et al. 2007), u některých druhů mravence rodu *Rhytidoponera* (Ward 1983) a také u tří druhů rodu *Formica* (Goropashnaya et al. 2001).

Členové samostatné kolonie u monogynních druhů často obývají pouze jedno hnízdo (monodomie). Naproti tomu mnoho funkčně polygynních kolonií má často hnízd více (polydomie) (Hölldobler & Wilson 1990).

## 1.4.2 Populačně-genetické vztahy mravence rodu *Rhytidoponera*

U některých druhů mravenců (někdy anglicky označovaných jako queenless ants) dříve řazených do podčeledi Ponerinae, která je dnes rozčleněna na pět samostatných skupin (viz. kapitola taxonomie), zastává reprodukční funkci část dělnic tzv. gamergates, přičemž rozmnožující a nerozmnožující dělnice se morfologicky neliší (Peeters 1991).

Gamergates mohou zcela zastávat funkci královny nebo se vyskytovat v populaci společně s pravou královnou. V případě, že populace má oba typy rozmnožujících se jedinců, převažuje uspořádání, kdy část kolonií obsahuje pouze pravé královny a část gamergates. Nicméně jsou také známy případy jejich koexistence v jedné kolonii (Ward 1981, 1983). Kolonie obsahující gamergates mohou být monogynní i polygynní. Obvyklejší je však přítomnost více gamergates v hnízdě, i pokud jiné kolonie stejné populace jsou monogynní s pravou královnou (Komene et al. 1999).

U rodu *Rhytidoponera* je popsáno pozoruhodně široké spektrum sociální organizace a pářících systémů (Crozier & Pamilo 1996). Od *R. purpurea* s pravými královnami, přes dosud nepojmenovaný druh *Rhytidoponera* sp. 12 (Crozier & Pamilo 1986 (nachází se v Australské National Insect Collection, CSIRO, Canberra) s polygynními koloniemi gamergates, pravé královny zde nejsou známy, (Ward 1983b; Crozier et al. 1984) až po skupinu druhů *R. impressa* (*R. purpurea*, *R. confusa* a *R. chalybaea*) s polymorfními koloniemi obsahujícími

jak polygynní kolonie gamergates, tak i monogynní kolonie s pravými královnami (Ward 1983). Královny skupiny *R. impressa* jsou schopny samostatně zakládat kolonie (Ward 1981). Naproti tomu u *R. metallica* s převážně funkčně polygynními koloniemi gamergates (Ward 1986) jsou snahy založit kolonii královnou značně neúspěšné (Crozier & Pamilo 1986; Ward 1986). U všech ostatních druhů rodu *Rhytidoponera* nebyly dosud královny popsány a někteří autoři předpokládají, že jejich rozmnožování probíhá výhradně prostřednictvím gamergates (Tay & Crozier 2000).

Podrobněji budou geneticko-populační vztahy r. *Rhytidoponera* rozebrány v následujícím popisu vybraných studií založených na DNA markerech (především mikrosatelity a mitochondriální DNA). Jejich volba má reflektovat cíl této bakalářské práce.

Nejstarší práce (Ward 1980) založená na elektroforéze enzymů odhalila rozdělení celkového počtu 22 lokusů u druhového komplexu *R. impressa* do 7 lokusových skupin. Vzorky pro tuto populačně-genetickou analýzu pocházely z 35 „populací“ (populací je v této práci míněn shluk kolonií obvykle na 100 až 200 ha, kde byly nalezeny nejméně čtyři kolonie pro každou oblast) sedmi odhadovaných druhů z oblasti pralesů podél pobřeží východní Austrálie.

Ward (1980) uvádí, že odhad heterozygosity odpovídá popisovaným nízkým hodnotám uváděných u jiných druhů řádu Hymenoptera a liší se od většiny diploidních druhů hmyzu u nichž je nacházena vyšší úroveň allozymové variability. Nicméně důkazy podporující hypotézu, že haplodiploidní uspořádání je odpovědné za redukci variability, je slabá. Úroveň odlišností genových frekvencí pro všechny sledované lokusy ukazuje, že většina populací se navzájem mírně odlišuje, což Ward vysvětluje možným vlivem stochastických procesů (efekt zakladatele, ale i vysoké variability nasbíraných vzorků) a selekce. Podle autora výsledky odpovídají zrychlené diferenciaci populací u haplodiploidních druhů.

Roku 1983 Ward publikoval rozsáhlou studii genetické příbuznosti a organizace kolonie u druhového komplexu *R. impressa*, přičemž nejvíce dat pro tuto práci získal u dvou sesterských druhů *R. confusa* a *R. chalybaea*.

Vzorky byly získány ze dvou typů kolonií, které označuje jako typ A) monogynní kolonie s pravou královnou, která může být okřídlená i neokřídlená a typ B) monogynní nebo obvykle polygynní kolonie s neokřídlenými gamergates (velmi zřídka produkce pravých královen). Typ B má zároveň menší velikost kolonie, ale větší počet samců (Ward 1983). Oba typy kolonií se mohou vyskytovat v jedné populaci.

Analýzou dat u *R. confusa* a *R. chalybaea* nezjistil žádné důkazy pro reprodukční izolaci mezi dvěma uvedenými typy sociální organizace – frekvence alel na několika polymorfických lokusech enzymů (celkem zpracoval 22 proteinových lokusů) byly v podstatě identické u sympatrických kolonií A a B. Genotypové modely jednotlivých typů kolonií ukázaly vyšší genotypickou diverzitu v koloniích s gamergates, kdy u typu A pouze 1 z 101 dospělců obsahuje dělnice s více než 2 genotypy, zatímco více než polovina z 135 dospělců kolonie typu B vykazuje 3 nebo více genotypů. Z toho zjištění lze usuzovat, že existence ne více než 2 genotypů na lokus u prakticky všech kolonií typu A nejen, že ukazuje na monogynní uspořádání kolonií, ale také na fakt, že královna se v tomto typu uspořádání páří pouze jednou a je matkou všech členů kolonie včetně samců.

Na druhou stranu, značná genotypová diverzita v typu B může znamenat mnohonásobné páření jedné reproduktivní samice. Nicméně, v takovémto případě musí být jedna ze dvou alel přítomna v každé dělnici, což se pro všechna hnízda nepotvrdilo. Kromě toho multilokusová genotypová řada není v mnoha hnízdech shodná s mnohonásobným pářením jedné samice. Toto by naznačovalo výměnu dělnic mezi hnízdy nebo vzájemné nahrazování se gamergates. Také podle etologických pozorování usuzuje autor na nižší příbuznost mezi dělnicemi (analýzou allozymových markerů získal hodnotu  $b = 0.30$ ): v koloniích s gamergates se při narušení hnízda ukazuje méně agresivní chování (což by mohlo charakterizovat „sobecké“ chování), než u kolonií typu A (velmi vysoká příbuznost mezi dělnicemi  $b = 0.70$ ), kde jsou sterilní dělnice více agresivní (nejagresivnější jedinci jsou u druhu *R. purpurea* se zcela monogynním uspořádáním s pravými královnami).

Rozlišení samic schopných pářit se je mnohem obtížnější než detekce královen u kolonie typu A. Gamergates jsou rozpoznány podle chování při narušení hnízda, kdy oproti jiným dělnicím nejsou agresivní a jsou vždy uvnitř skupiny individuí, proto přesné určení gamergates lze provést pouze pitvou neagresivních jedinců. I když některé samice se chovají jako dělnice navzdory jejich reprodukčnímu potenciálu. Je rovněž nejasné, jaký faktor či faktory omezují páření a diploidní reprodukci (Ward 1983).

Další práce využívající stejně jako předchozí studie molekulárních metod (allozomy), se věnují druhu *Rhytidoponera sp. 12*. Zpracovali je R.H. Crozier, Y. C. Crozier a P. Pamilo

v roce 1984 (*Rhyt. sp. 12* je zde označována jako *R. mayri*), kteří pro analýzu jednoho allozymového markeru vybrali plochu s velkou hustotou hnízd tohoto druhu (celkem 117 kolonií). Výsledky ukázaly, že příbuznost mezi dělnicemi stejného hnízda je nízká, ( $b = 0.15$  až  $0.16$ ), stejně jako příbuznost mezi jednotlivými sousedními hnízdy. Autoři se v diskuzi zabývají různými možnostmi vzniku tohoto jevu. Uvádějí, že hodnota příbuznosti mezi hnízdy by mohla být očekávána vyšší, protože u tohoto druhu není popsána přítomnost okřídlených jedinců samičího pohlaví, proto je rozšiřování kolonií pravděpodobně omezeno na migraci po zemi. Nicméně popsání situace odpovídá stavu, kdy pozorujeme nízkou příbuznost v rámci jednotlivých kolonií a nízkou příbuznost mezi koloniemi – kdy dělnice z odlišných hnízd si jsou méně příbuzné než dělnice ze stejného hnízda.

V roce 1997 (Tay et al.) byly poprvé publikovány výsledky výzkumu australských zástupců *Rhytidoponera* využívající mtDNA markeru, který je považován za vhodný pro studium matrilineárního pohybu (Avisé 2004). Autoři využívají PCR amplifikovaných úseků genů pro cytochrom b a serin tRNA mitochondriální DNA (mtDNA) analyzovaných metodou DGGE, k rozkrytí populační struktury *Rhytidoponera sp. 12*. Detekce shluků haplotypů (kombinace alel dvou nebo více těsně vázaných genových lokusů přenášených mezi generacemi společně) mezi koloniemi a plochami by měla ukazovat následky disperze neokřídlených samic – přítomnost více než jednoho haplotypu v kolonii by měla ukazovat na výměnu jedinců mezi hnízdy.

Studie vychází z dříve publikovaných zjištění o *Rhyt. sp. 12*, která je považována za funkčně polygynní s jediným hnízdem na kolonii (Peeters 1991), přičemž okřídlení samci se páří s nepříbuznými gamergates uvnitř cizích kolonií. Úroveň příbuznosti mezi mravenci z navzájem sousedících kolonií je relativně nízká (Crozier 1984), nicméně přesun jedinců mezi jednotlivými hnízdy zmiňuje Pamilo et al. (1985), avšak Peeters (1987) na základě pozorování útočného chování příslušníků jednotlivých hnízd to považuje za nepravděpodobné.

Studovaná oblast byla rozdělena na šest ploch, přičemž každá plocha obsahovala rozdílný počet kolonií. Celkový počet kolonií byl 75. Z každé kolonie bylo sebráno 15 až 20 dělnic (minimální počet dělnic pro stanovení dostatečné míry polymorfismu byl určen na 14 z každého hnízda). Vzdálenost mezi jednotlivými plochami se pohybovala od 1 do 5,8 km. Vzdálenost mezi hnízdy nebyla uvedena.

Ve sledovaných koloniích byly odhaleny celkem čtyři haplotypy. Kombinace dvou různých haplotypů nalezená v téměř 35 % koloniích ukazuje, že genetická struktura dělnic v koloniích je komplikovanější než původní předpoklad (pro mtDNA byla zjištěna příbuznost

mezi koloniemi  $b = 0.448$ ). Naopak Crozier et al. (1984) pomocí allozymů odhalil úroveň příbuznosti na mnohem nižší úrovni ( $b = 0.021 < 0.054 < 0.087$ ) pro dělnice z nejbližších sousedských kolonií. To naznačuje možnost migrace samic mezi blízkými hnízdy. Pozorovaná tendence k shlukování haplotypů je nicméně v souladu s omezenou disperzí neokřídlených samic.

W. T. Tay a R. H. Crozier v roce 2000 rozšířili své studie *Rhyt. sp. 12* analýzou příbuzenských vztahů gamergates prostřednictvím dat z pěti vysoce polymorfních mikrosatelitů. Výsledky ukazují především značnou variabilitu na příbuzenských úrovních gamergates, která se pohybuje od plně sesterských gamergates až po nižší úroveň příbuznosti. Rozpoznaná vyšší příbuznost mezi gamergates (0,772 až 0,746 – na rozdíl od druhého typu kolonií, kde byla příbuznost gamergates, stejně jako dělnic, nízká 0.368 až 0.179), spolu s pozorovanou nízkou příbuzností mezi dělnicemi a genetickými známkami migrace ukazují na častý bottleneck efekt.

R. H. Crozier a M. Chapuisat se naopak ve své práci věnovali druhu *R. metallica* (Chapuisat & Crozier 2001). Užitím mikrosatelitních markerů, které dříve navrhli (Crozier a Chapuisat 2000), stanovují Chapuisat a Cro. (2001) míru příbuznosti mezi nepářícími se dělnicemi jak v jednom hnízdě, tak i mezi třiceti hnízdy nacházejících se na ploše o rozměrech 500 x 200 metrů (vzdálenost mezi hnízdy se pohybovala od 0,5 do 465 m).

Autoři vycházeli z předpokladu, že u *R. metallica*, jako u jiných mravenců bez morfologicky odlišné královny se některé dělnice páří a stávají se gamergates. Nicméně, množství gamergates v hnízdě je pravděpodobně vyšší než u druhů *Rhytidoponera* s velkými dělnicemi, např. *Rhyt. sp. 12*. Haskins a Haskins (1983) uvádějí, že 5 až 15 % samic se u *R. metallica* stává gamergates. V hnízdě tohoto druhu se průměrně nachází 500 dospělých samic (Chapuisat & Crozier 2001). Z tohoto důvodu je možné očekávat relativně nízkou genetickou příbuznost členů kolonie. Pokud je gamergates mnoho, úroveň příbuznosti mezi členy kolonie bude závislá na síle genového toku mezi hnízdy. Ke genetickému toku mezi hnízdy, který způsobuje nízkou příbuznost mezi obyvateli hnízda u *R. metallica*, může docházet třemi různými faktory. Za první, k intenzivnímu genovému toku může docházet prostřednictvím samců, kteří mohou létat mezi vzdálenějšími hnízdy a pářit se tak s novými gamergates (Hölldobler & Haskins 1977). Za druhé, pokud se gamergates pářily s nepříbuznými samci, síla genového toku mezi hnízdy by závisela na obměně gamergates. Očekávána je vysoká obměna gamergates, protože žijí krátce (Keller 1993) a také dochází k častému štěpení kolonie, což vyžaduje produkci nových gamergates. Za třetí, mohlo by také docházet k určitému pohybu dělnic nebo gamergates mezi jednotlivými koloniemi, jak bylo



zdokumentováno u *Rhytidoponera* sp. 12 (Pamilo et al. 1985; Tay et al. 1997). Pohyb gamergates však vylučují Tay a Crozier (2000).

Na druhou stranu, jiné prvky rozmnožovacího systému *R. metallica* mohou přispívat k zvýšení příbuzenství mezi obyvateli hnízda, i přes velké množství gamergates (Hamilton, 1972). Příbuznost mezi gamergates může být vysoká, pokud je jejich množství v kolonii periodicky snižováno na jednu nebo několik gamergates. Tento jev je předpokládán u dvou druhů rodu *Rhytidoponera* s velkými dělnicemi (Komene 1999; Tay & Crozier 2000). Za druhé, jedna nebo několik gamergates by si mohly monopolizovat reprodukci vytvořením dominantní hierarchie. Za třetí, je zde možnost příbuzenského páření, protože např. *R. metallica* gamergates se páří v blízkosti mateřského hnízda (Hölldobler & Haskins 1977) a kolonie mohou být udržovány jako uzavřené rodové jednotky v laboratoři až 14 let (Haskins & Haskins 1983). Za čtvrté, očekávaná je viskozita, protože nové kolonie jsou obligátně vytvářeny štěpením a disperze je omezená. Odštěpená hnízda by tedy měla být geneticky podobná blízkým mateřským hnízdům, přinejmenším krátkodobě.

Výsledky přinesly neočekávané závěry. U studované populace byly nalezeny dva odlišné genofondy, které pravděpodobně reprezentují příbuzné druhy. Autoři tak usuzují ze zjištění vysoké genetické odlišnosti mezi dvěma skupinami hnízd a nalezené vlastní typické skladby alel u každé skupiny. Nález kryptického příbuzného druhu není však překvapující, neboť již dříve se *R. metallica* považovala za komplex druhů (Ward 1981, 1983). Průměrná příbuznost mezi nestmates byla potvrzena jako velmi nízká (pro jeden typ genofondu 0,082, pro druhý 0,037), což by ukazovalo na malou příbuznost gamergates ve většině hnízd. I když, jak autoři uvádějí, u malého množství hnízd data ukazují vyšší příbuznosti dělnic, proto je v těchto hnízdech také očekávána i vyšší příbuznost gamergates. Data neodhalila populační viskozitu, ani známky inbreedingu. Tato zjištění ukazují že gamergates se páří s nepříbuznými samci ze vzdálenějších hnízd. U nalezených genofondů se na základě korelace genetických odlišností a geografických vzdáleností neprokázala žádná izolovanost kolonií - hnízda, která jsou vzdálena pár metrů od sebe si nejsou více geneticky příbuzná než hnízda vzdálená několik stovek metrů. Toto je poměrně odlišná situace v porovnání s mnoha studiemi jiných druhů mravenců s pravými královnami, kde se předpokládá, že polygynie kolonií je spojena s omezenou disperzí, lokálním pářením a podstatnou populační viskozitou. Autoři poukazují na fakt, že pozorovaná hodnota příbuznosti mezi členy kolonie je nejnižší popsanou hodnotou u sociálního hmyzu vůbec (v rámci uspořádání, kde dělnice mají možnost pářit se, produkovat potomstvo a nejsou nuceny k úloze helperů jejich morfologií). Nižší hodnoty příbuzností byly zaznamenány u invazních *Solenopsis invicta* (Ross & Shoemaker 1997) a *Linepithema humile*

(Krieger & Keller 2000). Nicméně, dělnice těchto druhů nemají jinou možnost než pomáhat královně s produkcí potomstva, protože postrádají spermatéku i ovaria. Toto omezení může být důvodem zachování altruismu u těchto druhů i přes nízké hodnoty příbuznosti nesmates. U *R. metallica* je to však překvapivé, a je v rozporu s předpoklady Hamiltonovy teorie příbuzenské selekce u sociálního hmyzu (Bourke & Franks 1995).

Celkově, obecné vzorce populačně-genetických vztahů nelze stanovit bez přihlédnutí k habitatovým preferencím konkrétních druhů *Rhytidoponera*. Data, které získal Ward (1983) na pralesních družích *R. confusa* a *R. chalybaea* ukazují na vyšší počet kolonií závislých na reprodukci dělnic (gamergates) pokud se kolonie vyskytují v malých, izolovaných populacích. Podobný vzorec lze očekávat také u druhu vyskytujících se v aridních oblastech nebo v místech s velkou náchylností k disturbanci (např. časté požáry) (Ward 1983), kde je předpokládána migrace samic mezi blízkými hnízdy (Tay et al. 1997) a samců mezi hnízdy vzdálenějšími (Chapuisat & Crozier 2001). Tento mechanismus by měl zajišťovat stabilitu kolonií *Rhytidoponera* s polygynním uspořádáním s gamergates, protože umožňuje zachovat různé úrovně genetické variability.

## 2. Molekulárně-genetické metody

### 2.1 Historie markerů

Až do poloviny 60. let 20. století, kdy začaly být rutinně aplikovány metody tzv. „biochemické genetiky“ (tj. elektroforézy proteinů) na volně žijící populace živočichů, nebylo až na výjimky možno studovat uspořádání a dynamiku genetické proměnlivosti v populacích.

Prvními markery, které se využívaly, jsou viditelné (diskrétní) polymorfizmy. Tyto markery dovozovaly odhalovat jen malou část genetické variability, byly relativně vzácné a často obtížně zaznamenatelné. Jsou diskrétní, protože ve fenotypu mají jen několik málo variant (obvykle 2 až 3) a jsou podmíněny jedním nebo někdy dvěma lokusy. Nejsou zpravidla ovlivněny prostředím. Viditelný polymorfismus není reprezentativní pro celý genom a neodhaluje dostatek genetické variability. Ačkoliv byly viditelné polymorfizmy využívány ještě v šedesátých letech minulého století, došlo v tomto období k podstatnému posunu ve vývoji markerů díky poznatkům molekulární biologie.

Prvními molekulárními markery byly proteiny, obvykle enzymy, kterým se také říká allozymy nebo isoenzymy. Pomocí elektroforézy bílkovin byl odhalován polymorfismus mléčných bílkovin (kaseiny, albuminy, ...), bílkovin krevního séra a pod. Bylo důležité, aby mezi alelami byl vztah kodominance, aby mohl být rozeznán heterozygotní genotyp. Největší nevýhodou proteinových markerů je, že odhalují jen malou část skutečné variability v DNA sekvencích mezi jedinci.

Zásadní průlom v oblasti molekulárních markerů přinesly metody pro odhalování variability v DNA sekvenci, které se objevily v sedmdesátých letech minulého století. První z vytvořených technik pracuje s rozštípaným řetězcem DNA na malé části pomocí specifických enzymů a tyto kousky DNA se následně separují na gelu a vizualizují radioaktivním značením, později fluorescenčními značkami. Tato technika se nazývá polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP). RFLP markery jsou kodominantní, takže lze odhalovat heterozygotní genotypy. Ve spojení s polymerázovou řetězovou reakcí (PCR), která dokáže namnožit na milióny kopií specifický úsek DNA, vznikla široce používaná metoda PCR-RFLP pro odhalování bodových mutací v DNA. V následujících desetiletích byla vytvořena či objevena celá řada dalších DNA markerů, které spolu s výše zmíněnou technikou zásadní měrou přispěly k rychlému vzestupu molekulárních studií genetické příbuznosti, fylogeneze, populační dynamiky, genového a genomového mapování u celé řady živočichů.

## 2.2 DNA markery

Molekulární, resp. molekulárně-genetické metody jsou nejmladší, současně však nejdynamičtější se rozvíjející součástí metodologického aparátu zoologie. Současné trendy aplikace DNA markerů v rozmanitých oblastech studia rozmanitých organismů ukazují, že mitochondriální DNA (mtDNA), mikrosatelity, náhodně amplifikovaná polymorfická DNA (RAPD, random amplified polymorphic DNA), polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů (AFLP, amplified fragment length polymorphism) a další metody molekulární biologie podstatně přispívají k pokroku v oblastech genetiky, ekologie, systematiky, populační biologie, etologie a dalších biologických oborů.

Vedle těchto všeobecně rozšířených markerů existují novější, také často užívané, techniky jakými jsou především VNTRS (variabilní počet tandemových opakování), která identifikuje minisatelity a mikrosatelity a metoda stanovení jednonukleotidových polymorfizmů (SNP, single polymorphism nucleotide). Zároveň se však dnes rozvíjejí progresivnější přístupy zahrnující transpozabilní elementy, polymorfismus amplifikovaných specifických sekvencí (S-SAP), a další, které nabízejí alternativu k běžně používaným markerům.

Výběr částí genomu, které jsou z hlediska našich potřeb optimální, závisí na několika kritériích, především na rychlosti evoluce a způsobu dědičnosti. Dalším kritériem je, zda potřebujeme znát pouze prostorovou distribuci jednotlivých alel, nebo také jejich fylogenezi, neboť vhodnost některých metod například pro fylogenetickou analýzu je omezená. U živočichů je to zpravidla mitochondriální DNA (mtDNA), která je charakterizována absencí rekombinace (Rokas et al. 2003) a vysokou frekvencí nukleotidových substitucí a tedy rychlou evolucí, především v některých částech kontrolní oblasti. V jaderném genomu patří k nejrychleji se vyvíjejícím částem nekódující oblasti, v kódujících oblastech jsou to pak synonymní substituce. Vysoká mutační rychlost VNTR je výhodná pro studium rozmnožovacích systémů, paternity a struktury blízkce příbuzných populací.

## 2.2.1 Mitochondriální DNA

### Obecné informace o použití mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (mtDNA) je genetickou informací mitochondrie, eukaryotní buněčné organely vzniklé endosymbiózou z prokaryotického organismu, která pro buňku představuje respirační továrnu generující ATP. Má obvykle kruhový tvar a na rozdíl od genomu prokaryot má menší velikost (více než 90% původních prokaryotních genů se přesunulo do jádra (tzv. jaderné pseudogeny) nebo jejich funkce byla nahrazena jinými jadernými geny). Replikace probíhá nezávisle na jaderné DNA (nDNA). Velikost mitochondriálních genomů se u jednotlivých organismů značně liší. Průměrná velikost mtDNA živočichů je ~16 kb, zatímco u rostlin se pohybuje mezi 200 až 2500 kb. Velikost mtDNA hub se pohybuje v rozmezí 19 kb až 176 kb. Většina mitochondrií obsahuje 5 – 10 kopií své mtDNA, která kóduje rRNA obou podjednotek ribosomů, 22 tRNA molekul a 13 polypeptidů.

Analýza mitochondriální DNA bývá úspěšnou metodou umožňující odlišení jednotlivých geografických ras či poddruhů. Mitochondriální DNA je vynikajícím „substrátem“ pro studium populační struktury a historie, genového toku a evoluce v rámci blízké příbuzných skupin, neboť její striktní mateřská dědičnost zaručuje v každé nově vzniklé linii hromadění mutací v mitochondriálním genomu (Awise 2004). Molekulární evoluce mtDNA probíhá také daleko rychleji – je přibližně 5x - 10x vyšší - než u jaderné DNA. Důvodem je nepřítomnost opravných enzymů pro chyby v replikaci a pro opravy poškozené DNA. Mutace jsou oproti jaderné DNA (dále nDNA) přítomny především v podobě nukleotidových substitucí. Může to být způsobeno málo přesnou replikací, neefektivními reparačními mechanismy a zvýšenou koncentrací mutagenů (například kyslíkové radikály) v důsledku metabolických procesů probíhajících v mitochondrii. Tranzice převažují nad transverzemi v ještě větším poměru než u nDNA. Mimo to jsou častější tranzice mezi pyrimidiny než mezi puriny (Graur & Li 2000). Díky zmíněné rychlosti evoluce na úrovni mtDNA je zajištěna dostatečná rozlišovací schopnost pro systematická a evoluční studia vnitrodruhových forem. Výhodou použití mtDNA je fakt, že v rámci jejího genomu téměř neprobíhá rekombinace, její poměrně snadná izolace a také existence univerzálních primerů pro mnoho jejích vysoce konzervovaných genů (Hoy 2003).

I přes uvedené výhody není využití mtDNA úplně bez komplikací. Například některé univerzální primery určené pro mtDNA mohou stále ještě označovat určitou nukleotidovou sekvenci i v jaderném genomu v místech, kde je integrována mitochondriální genetická

informace (v jádře se vyvíjí jinak než její obdoba v mitochondrii- jiné rychlosti vývoje různých pozicí kodónu či genu a celkově pomalejší vývoj v jádře). Tento může komplikovat analýzu a pro populačně genetické studie je tato situace nežádoucí (Zhang & Hewitt 2003). Nicméně existují metody, které umožňují zásah pseudogenů z nDNA omezit. Pseudogeny pouze limitují rozlišovací schopnosti analýz, což má za následek snížení efektivnosti užití mtDNA v populačně-genetických studiích. Primery by proto měly být co nejvíc specifické na cílovou mtDNA (Zhang & Hewitt 2003). Dále, u některých skupin živočichů mohou existovat sekvence ve velkém množství kopií s malou odlišností mezi jednotlivými jedinci daného druhu, (např. popsáno u některých rovnokřídlých), což má za následek malou hodnotu takového markeru při mapování genetiky populace (Zhang & Hewitt 1996). Pokud nebereme na vědomí tyto základní problémy mitochondriálního DNA markeru, může nám to významně zkomplikovat vyhodnocování výsledků analýz (Zhang & Hewitt 2003). Další problémy může způsobit přítomnost některých mikrobiálních symbiontů a/nebo parazitů (např. *Wolbachia*), kteří mohou způsobit změnu distribuce mtDNA bez vlivu na nukleární DNA, protože cytoplasmatický genom může být ovlivněn nepřímou selekcí spojenou s materiálním přenosem mikroorganismu (Hurst & Jiggins 2005). V populačně-genetických studiích díky tomuto jevu může dojít k chybnému výkladu pozorování, např.: Pokud je pozorována vysoká diverzita mtDNA mezi populacemi je klasickým vysvětlením historická izolace populace, avšak alternativním vysvětlením může být přítomnost odlišných kmenů symbiontů, která zachovává danou strukturu haplotypů navzdory genovému toku.

MtDNA markery mají i další omezení při jejich použití (Zhang & Hewitt 2003).

Těmi nejdůležitějšími jsou:

1. MtDNA představuje pouze jeden lokus; díváme se jen jedním oknem evoluce. Odráží pouze maternální historii, která by se tak mohla odlišovat od historie celkových populací nebo druhů. Což může zkreslovat populační či druhovou historii.

2. Efektivní populační velikost je pouze čtvrtinová oproti jaderným autozomálním sekvencím, i proto je evoluční rychlost v genomu mitochondrií mnohem větší (včetně vyšší rychlosti vytrácení alel).

Následky těchto omezení jsou následující: 1) Vývojové vztahy by mohly být příliš zjednodušeny. 2) Genetická diverzita hodnocená mtDNA markery může být podhodnocena. 3) Nejistota v genealogických analýzách může být zvyšovaná díky růstu pravděpodobnosti vyšších ztrát spojitostí u mitochondriálních haplotypů. 4) Vzdálené populační procesy nemohou být s tímto markerem přesně detekovány.

## Oblasti mtDNA využívané k rekonstrukci populačních a fylogenetických vztahů

### Geny pro ribozomální RNA

U blanokřídlého hmyzu stejně jako u většiny živočichů se na mtDNA vyskytují dva geny pro rRNA. Je to gen malé ribozomální podjednotky 12S rRNA, označovaný jako *12S rDNA*, a gen velké podjednotky 16S rRNA (*16S rDNA*). Geny neobsahují mezerníky a nacházejí se na molekule mtDNA jen v jedné kopii. Ve srovnání s jadernými geny pro rRNA jsou menší a jednodušší. *12S rDNA* má délku asi 800 bp, *16S rDNA* asi 1500 bp. Hoy (2003) ukazuje, že 16 rRNA je nejvíce informativní nejen pro fylogenetické studie na úrovních druhových a vyšších, ale také pro studie na úrovni populací. Tento marker buď nebývá pro objasnění mezipopulačních vztahů u blanokřídlých používán, nebo studie na něm založené nejsou publikovány.

### Geny kódující proteiny

Na mtDNA leží 13 genů kódujících enzymy, respektive podjednotky enzymů. Je to cytochrom b (Cytb), 7 podjednotek NADH-dehydrogenázy (*ND 1-6*, *ND 4L*), tři podjednotky cytochrom-c-oxidázy (*CO I-III*) a dvě podjednotky ATP-syntetázy (*A6*, *A8*).

Z jejich genů se v průměru nejpomaleji vyvíjí *CO I*, nejrychleji naopak *ND 2* a *ND 6*. Je to dáno rozdílným funkčním omezením těchto enzymů. Bylo zjištěno, že se rychlost vývoje *CO I* liší u různých fylogenetických linií. *CO I* často spolu s Cytb nebo *CO II*, jsou v populačně-genetických a evolučních studiích nejpoužívanější mtDNA markery, protože se jedná o největší podjednotku a zároveň sekvence proteinu obsahuje značně konzervované funkční domény a variabilní oblasti (Hoy 2003).

Studie mravenců založenou pouze na mtDNA markerech genů kódujících proteiny publikovali např. Strehl a Gadau (2004). Věnují se příbuznosti izolovaných populací *Pogonomyrmex badius* na Floridě, který je považován za endemický druh mravence v této oblasti USA (Deyrup & Trager 1986). Pomocí mtDNA (*COI*, Cytb) vytvářejí vlastní pohled na fylogeografii tohoto mravence. Stanovili hypotézu, která předpovídá, že vztahy mezi dnešními izolovanými populacemi *P. badius* by měly odpovídat minulé dlouhé separaci vedoucí přímo k omezení genového toku mezi jednotlivými populacemi. Výsledný kladogram by měl odpovídat historickým událostem ustoupení druhu *P. badius* do refugií před a po příchodu invazních druhů mravenců. Genetické vzdálenosti zjištěné analýzou by se měly zvyšovat s geografickou vzdáleností, pokud je fylogenetický model ostrůvkovitých

populací *P. badius* založen na dávné kolonizační události tohoto druhu, spíše než na rozdělení jeho široké populační zóny a následných náhodných, ale nesouvislých mutačních událostech.

Do analýzy bylo zahrnuto celkem šest populací *P. badius* nasbíraných napříč Floridou, přičemž podobně byly sbírány druhy sloužící jako outgroups (*Pogonomyrmex (Epebomyrmex) imberbicus*, *Pogonomyrmex californicus*, *P. occidentalis*, *P. barbatus* a *P. huachucanus*). Výsledky ukázaly existenci tří odlišných linií: 1) jižní linii zahrnující vzorky z Lake Placid a Situsville, 2) střední linii zahrnující oblast Withlacoochee a město Ocala a jeho okolí a 3) severní linii město Tallahassee a jeho okolí. Střední linie je pravděpodobně blíže příbuzná k linii severní. Tento pohled je také podpořen pozitivní korelací genetické vzdálenosti s geografickou.

Celkově fylogeneze mitochondriálních genů a průkazná korelace genetických a geografických vzdáleností, které, jak bylo předpokládáno, odpovídají hypotéze, odkazuje na dávný pohyb *P. badius* od severu k jihu s velmi omezeným tokem genů zpět k severním populacím, nebo méně pravděpodobně, na vyšší mutační/fixační rychlost na hranici rozšiřujících se populací (Edmonds et al. 2004). Stejně tak odkrývá možné paleo-klimatické události během níž došlo k dlouhé trvalé separaci populací. Autoři našli nejméně tři populace, které vykazují výraznou mezi-populační variabilitu mtDNA sekvencí. Tyto fylogeneticky separované linie, které jsou omezeny ve své geografické distribuci by mohly být charakterizovány jako ESUs (Evolučně stabilní jednotky). Toto zjištění, i vzhledem k endemismu druhu, může být chápáno jako oprávnění k ochraně těchto populací, protože mohou obsahovat podstatné složky evoluční historie druhu (Strehl & Gadau 2004).

Zajímavou fylogeografickou studii druhu *Oecophylla smaragdina* (mravenec tkalec) využívající COI a Cytb, ale i jednoho jaderného genu (LW Rh gen), publikoval Azuma et al. (2006) – dřívější práce na fylogeografii stejného druhu byla založena pouze na Cytb a menším počtu vzorků (Azuma et al. 2002). Dodatečné využití LW Lh genu je odůvodněno jeho mnohem pomalejším vývojem oproti použitým mtDNA markerům. Navíc Cameron a Williams (2003) ukazují, že tento gen je informativní při modelování fylogeneze blanokřídlého hmyzu na mezidruhové úrovni.

Celkově bylo pro analýzu vnitrodruhové divergence *Oecophylla smaragdina* zvoleno 35 lokalit se 152 koloniemi z Indie, jihovýchodní Asie, Indonésie, Filipín (Luzon, Negros, Mindanao) a australské oblasti, přičemž na každé lokalitě bylo sbíráno od jedné k devíti kolonií. Jako outgroup byl zvolen druh *Oecophylla longinoda*, vzorek pocházející z jedné kolonie v Kamerunu.



Pro mtDNA bylo rozpoznáno 30 haplotypů pro Cytb (v předchozí studii Azuma et al. (2002) našel 26 haplotypů pro Cytb) a 52 haplotypů pro COI. Fylogram vytvořen na základě mtDNA ukázal, že haplotypy jsou jasně rozděleny do sedmi skupin. Kromě toho, byly nalezeny u *O. smargdina* dva haplotypy pro gen LW Rh, přičemž jeden z haplotypů byl nalezen u skupiny „2“ (Indočína, Velké Sundy spolu s ostrovy Lombok a Sumbawa) a jiný u všech zbývajících skupin. Srovnání haplotypů u jiných druhů blanokřídlých umožňuje vyslovit domněnku, že skupina „2“ je mladší než zbylé skupiny. Shluková analýza sedmi detekovaných haplotypů odpovídá geologickým důkazům rozmístění kontinentů, ostrovů a moří během poslední glaciální periody.

Obdobně využila sekvence mtDNA také Goropashnaya et al. (2004a) pro studium příbuznosti šesti mravců druhového komplexu *Formica rufa* na území Eurasie, u kterého nejsou zcela jasné vztahy mezi jednotlivými druhy – častá mezidruhová hybridizace i přítomnost smíšených kolonií.

Pro odkrytí vazeb mezi těmito druhy použila sekvence celkem čtyř mitochondriálních genů (cytochrom b, transferová RNA pro serin, intergenic region II a NADH dehydrogenázy).

Výsledný kladogram 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*). Autorka 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 druhů hmyzu (pro střevlíka rodu *Carabus* je její míra uváděna mezi 2.9 – 5.2 % , pro cikádu rodu *Marocicada* 6.5 %), ukazuje, že je tato divergence mezi druhy *F. rufa group* relativně nízká.

### **Nekódující sekvence**

Krátká A+T oblast je variabilní segment kontrolní oblasti mtDNA hmyzu s vysokou úrovní polymorfismu. U hmyzu se tyto části nazývají na A+T bohatá oblast, protože je zde obzvlášť vysoký obsah adeninových a thyminových nukleotidů na rozdíl od obratlovců, kde je obsah těchto dvou nukleotidů menší (Simon 1994). Duenas et al. (2006) ve své práci na strukturní organizaci kontrolního regionu komára druhu *Aedes aegypti* uvádí, že tato oblast genomu je jedna z nejvíce variabilních částí mtDNA: a to nejen díky vysoké rychlosti substituce a inserce-delece nukleotidů, ale také protože vykazuje pozoruhodnou variabilitu ve velikosti u blízké příbuzných skupin a i mezi jedinci stejného druhu. Tento délkový

polymorfismus je často výsledkem přítomnosti proměnlivého množství tandemově se opakujících jednotek. A díky svému polymorfismu se jedná o vhodný marker pro populačně genetické studie.

Naproti tomu však Zhang a Hewitt (1997), ve své práci srovnávající A+T bohaté oblasti mezi druhy, poznamenávají, že i když tandemové repetece vykazují intenzivní evoluci a množství rozdílných kopií ukazuje na značnou rychlost mutací, přesto zde je pravděpodobně snížena rychlost substituce nukleotidů díky přítomnosti velkého množství adeninu a thyminu a přímého mutačního tlaku. Proto A+T kontrolní oblast není nezbytně nejvariabilnější oblastí genomu v požadavku nukleotidové substituce a nemůže se vyvíjet rychleji než samostatné kopie jaderných nekódujících sekvencí. Výše zmíněná zjištění mají vliv na užití této oblasti mtDNA v evolučních a molekulárně ekologických pracích – tedy omezená úspěšnost analýz využívajících tohoto regionu DNA. Dále, srovnávací studie také odkryla, že hmyzí kontrolní oblasti mohou být klasifikovány do dvou odlišných skupin: Skupina 1 u druhů rodu *Drosophila* a skupina 2 hmyzího kontrolního regionu, který se nerozděluje do odlišných konzervovaných nebo variabilních domén; místo toho jsou krátké konzervované sekvence rozmístěny po celém kontrolním regionu.

Jediné dvě publikované práce uvádějí využití tohoto markeru při studiu populačně-genetických vztahů u hmyzu. A to spolu s mikrosatelity Vargo (2003) u termita *Reticulitermes flavipes* a Atkinson a Adams (2003) u termita druhu *Nasutitermes corniger*.

## 2.2.2 Mikrosatelity

### Obecné informace o mikrosatelitech a jejich použití

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující úseky DNA nejčastěji o délce 2-6 párů bazí. Běžně jsou pro ně používány zkratky STRs (short tandem repeats), SSR (simple sequence repeats), nebo VNTRs (variable number of tandem repeats). Ačkoliv se mikrosatelity vyskytují v genomu nejrozličnějších organismů ve velkém množství, jejich biologická funkce je stále nejasná. Díky vysoké mutační rychlosti jsou mikrosatelity velmi polymorfní. To znamená, že se nacházejí v různých variantách v rámci jedné populace. Tato rozmanitost alel je v laboratoři snadno zjistitelná a dovoluje nám sledovat genetickou variabilitu mezi jednotlivými druhy, v rámci jednoho druhu, či v rámci jedinců uvnitř jedné populace. Mikrosatelitové markery (tj. úseky DNA obsahující repetitivní sekvenci ohraničené sekvencí primerů použitelných při PCR reakci) je možno vyhledávat z tzv. genomických knihoven použitím hybridizace s oligonukleotidovými sondami, nebo metodou tzv. cross-

amplifikace, což je použití primerů popsaných u blízce příbuzných druhů. Následně je nutno u nalezených markerů popsat úroveň polymorfismu.

Využití mikrosatelitů je velmi široké. Jako kodominantní markery relativně malé velikosti jsou jednoduše amplifikovány během PCR. Své uplatnění nacházejí především při studiu příbuzenských vztahů, určování paternity, nebo při studiu parametrů populačně-genetické struktury, jako je tok genů a jeho bariéry, efektivní velikost populace nebo odchylky od Hardy Wienbergovy rovnováhy.

Mikrosatelity jsou úseky DNA, které jsou složeny z krátkých opakujících se jednotek o délce 1-10 párů bazí (nejčastěji 2-6bp). Podle délky repetice dělíme mikrosatelity na dinukleotidové (např. CACACACA), trinukleotidové (např. ATGATGATGATG), případně tetranukleotidové (např. CATGCATGCATGCATG) atd. Většinu mikrosatelitů v genomu (30-60%) tvoří pravděpodobně dinukleotidové repetice.

Mikrosatelity se nacházejí v celém genomu eukaryotických i prokaryotických organismů (Awise 2004). Okolí mikrosatelitů (tzv. flanking regions) je tvořeno přesným sledem bazí, který je vždy stejný pro daný lokus. V této oblasti je pak možno navrhnout primery, používané při PCR amplifikaci daného mikrosatelitu. Mutační rychlost mikrosatelitů, která je zodpovědná za vysokou různorodost mikrosatelitů, je poměrně vysoká  $10^{-2}$  -  $10^{-6}$  na lokus a generaci (Awise 2004), oproti mutační rychlosti na kódující oblasti genomu.

Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní díky vysoké proměnlivosti v počtu repeticí (Hoy 2003). Jednotlivé alely tak mohou být snadno a rychle detekovány metodou PCR použitím dvou oligonukleotidových primerů, které ohraničují mikrosatelitový lokus. Protože se dědí kodominantně (délka každého mikrosatelitu je děděna mendelisticky), jsou krátké, nacházejí se na celém genomu, jsou multialelické a relativně hojné. Dále se u mikrosatelitových markerů "a priori" předpokládá, že jsou neutrální k přírodnímu výběru, nicméně některé lokusy mohou ležet v sousedství významných funkčních genů a mohou také podléhat selekčnímu tlaku.

Při populačně-genetických analýzách je také nutné stanovit, který teoretický mutační model by měl být aplikován, aby správně určil genetické parametry populace získané z mikrosatelitových dat. Bohužel všechny modely mají své nevýhody při aplikaci na mikrosatelitová data. Další nevýhodou je přítomnost tzv. nulových nebo také neamplifikujících se alel, které mohou negativně ovlivnit analýzu mikrosatelitové DNA.

Největší nevýhodou mikrosatelitů však je nesnadnost jejich nalezení. Mikrosatelity jsou ohraničeny tzv. flanking regions (přiléhajícími oblastmi). Tyto oblasti jsou stejné pro daný mikrosatelit u všech jedinců daného druhu, a proto v této oblasti bývají navrženy vhodné primery. Existují dvě možnosti jak nalézt sekvence primerů: buď je možno je vyhledávat a designovat „de novo“ skenováním genomových knihoven, nebo je možno použít primery již nalezené u jiných, blízce příbuzných druhů. Této druhé metodě se říká cross-amplifikace. Cross-amplifikace znamená použití genetických markerů, které již byly zoptimalizovány u jiného více či méně příbuzného druhu. Úspěšnost amplifikace klesá s fylogenetickou vzdáleností linií.

### **Mikrosatelitní markery pro rod *Rhytidoponera***

V současnosti jsou již známy mikrosatelitní markery pro většinu zástupců linie *Ectatomminae*, rod *Rhytidoponera* nevjímaje. Prozatím je pro rod *Rhytidoponera* dostupných 14 publikovaných mikrosatelitů. Avšak jen 8 lze využít v rámci celé skupiny (Tay & Crozier 2000).

Tay a Crozier (2000) navrhli celkem 5 markerů, ale většina je použitelná pouze pro jediný druh *Rhytidoponera sp. 12*, jak poukazuje ve své práci Chapuisat et al. (2000), který zjistil, že z pěti výše uvedených mikrosatelitů jsou pouze dva využitelné i pro *R. metallica*. Proto navrhuje 8 nových markerů pro druh *R. metallica*, které by měli být využitelné i pro jiné druhy „ponerinních linií mravenců“. Zároveň zveřejňuje také jeden mikrosatelitní marker, který navrhli Tay a Crozier (2000) pro svou práci na *Rhytidoponera sp. 12*, ale tento marker ve svém článku neuvedli.

Mikrosatelity navržené Capuisat et al. (2000) ukazují při testování na jiných druzích „poneroidních mravenců“ malou využitelnost. Polymorfismus mezi třemi jedinci byl zjištěn na jednom markeru u čtyřech druhů fylogeneticky odlišných od r. *Rhytidoponera*, tj. v 9% ze 45 testů. Naopak, mnohem lepší využitelnost se ukazuje v rámci skupiny r. *Rhytidoponera*. Kdy u každého testovaného druhu *Rhytidoponera* bylo 3 až 8 markerů vysoce polymorfických a tento počet by se měl zvyšovat pokud bychom zahrnuli do analýzy více jedinců.

Jak autoři uvádějí, všechny mikrosatelitní markery, které jsou uvedeny v jejich studii jsou použitelné pro detailní rozbor populačně-genetických vztahů v rámci celé skupiny rodu *Rhytidoponera*.

## Srovnání populačně-genetických studií mravenců využívajících mikrosatelity

Typickou prací, která se opírá o data získaná pouze z mikrosatelitů, a která ukazuje jak jsou mikrosatelitní markery využívány je studie, která kteří se snaží zjistit genetickou strukturu a frekvenci páření invazního mravence *Linepithema humile* (Krieger & Keller 2000). Pomocí 8 vysoce polymorfních úseků DNA aplikovaných na nasbíraných dělnících a královnách z několika z hnízd na transektu o délce 200m zjistili (sledovaná hnízda byla od sebe vzdálena 20-30m), že genotypy spermií ze spermaték studovaných královen byly shodné. Pravděpodobnost vícenásobného páření byla nízká, což by mělo znamenat, že jen velmi málo nebo vůbec žádné královny se nepáří s více samci. Další analýzou byly detekovány rozdíly v allelových frekvencích v některých hnízdech.

Tento výsledek je očekávatelný, protože někteří samci se úspěšně šíří, vstupují do cizích hnízd a páří se v nich. Zatímco jiní zůstávají v mateřském hnízdě a páří se tam. Odlišnosti v alelových frekvencích byly pozorovány i u jiných druhů mravenců (Pamilo 1993). Jak uvádí Pamilo (1993) vznik toho jevu je spekulativní. Existují dvě možná vysvětlení. Zaprvé, jak již bylo naznačeno výše, samci mohou pocházet z jiné populace lišící se alelovými frekvencemi. Odlišnost alelových frekvencí se v tomto případě projeví na většině nebo všech lokusech. Druhé vysvětlení je, že dominantní faktor, který eliminuje jednu sadu chromozomů u diploidních potomků, je nerovnoměrné propojení s alelou na sledovaném lokusu. V tomto případě by samicím skutečně sledovaná alela chyběla.

Dále Krieger a Keller (2000) zjistili, že genetická odlišnost mezi hnízdy je nízká a neodlišuje se od nuly. Stejný výsledek byl při porovnání příbuznosti mezi dělnicemi v jednom hnízdě. Interpretace výše zmíněných výsledků byla, že tato populace *L. humile* může být považována za unikoloniální. I když je možné, že výsledky pro komplexní určení populační struktury byly zkresleny malou vzdáleností mezi sledovanými hnízdy.

Odlišnou práci z hlediska využití mikrosatelitů publikovali Gyllenstrand et al. (2004). Jde o analýzu sociální organizace a genetické struktury u dvou blízce příbuzných druhů lesních mravenců ze skupiny *F. rufa*, které žijí sympatricky a je mezi nimi předpokládán genový tok. *F. polycytena* by se zároveň měla vyznačovat polygynním uspořádáním a naopak *F. rufa* monogynním uspořádáním (Seifert 1991).

Výsledky potvrzují vyšší úroveň polygynie u *F. polycytena*, avšak vyvracejí, že *F. rufa* má převážně monogynní uspořádání – ukazují naopak na jistou míru polygynie. Genový tok obzvláště zprostředkovaný samicemi je mnohem nižší mezi polygynními než mezi více monogynními populacemi a sousední populace patřící do stejného druhu (tzv. konspecifická

populace) může vykazovat významné genetické odlišnosti, jak bylo také popsáno u *F. execta* (Liautard & Keller 2001) či *Solenopsis invicta* (Shoemaker & Ross 1996). Tyto odlišnosti jsou velmi zřejmé u mtDNA, která odráží omezený genový tok u samic.

Mikrosatelity jsou jistě vhodným gen. markerem pro studium jak populačních, tak i druhových vztahů, avšak mělo by být bráno v úvahu varování ohledně interpretace populační struktury založené na vysoce polymorfních genetických markerech, kdy je genový tok redukován (Balloux et al. 2000). Právě proto je v mnoha pracích využita kombinace mikrosatelitů s jinými gen. markery.

### **2.2.3 Jiné vybrané markery – restrikční metody a RAPD**

#### **Markery založené na restrikčních metodách**

V zoologických a populačně-genetických výzkumech využívajících restrikční endonukleázy je často vynechána kompletní konstrukce tzv. restrikčních map. Restrikční mapa je schematickým znázorněním polohy restrikčních míst na DNA, které se uvádějí v počtech nukleotidů (většinou v kilobázích), a jako taková je v podstatě formou fyzické mapy. A právě přítomnost či absence restrikčního místa na zkoumaném úseku DNA může být rovněž použita k rekonstrukci fylogeneze (restriction-site data). Avšak konstrukce restrikčních map může být poměrně náročná a jejich použití je často především molekulárně-genetické.

Proto se v molekulární ekologii místo informace o poloze restrikčních míst používá informace o délce restrikčních fragmentů (restriction-fragment data). Jestliže totiž v rozpoznávací sekvenci dojde k mutaci, příslušný restrikční enzym ho již nerozezná a molekulu DNA v tomto místě nerozštěpí. Lze si představit i obrácený proces vzniku nového restrikčního místa. Ke vzniku restrikčního místa však dochází s nižší pravděpodobností. Ke změně v délce restrikčních fragmentů však může dojít i inzercí či delecí jednoho či více nukleotidů (oba typy mutace se někdy souhrnně označují jako *indels*), aniž by došlo ke změně rozpoznávací sekvence a tím ke vzniku či ztrátě restrikčního místa.

Právě proměnlivost velikostí restrikčních fragmentů, podléhající v populaci mendelovské segregaci, se obecně označuje jako polymorfismus délky restrikčních fragmentů, zkráceně RFLP (restriction fragment length polymorphisms). Analýzy RFLP jsou používány ke studiu genetické proměnlivosti v populacích i mezi nimi, a to jak u mtDNA, tak i jaderné DNA (Hoy 2003). Podle Behury (2006) se však nejedná o metodu vhodnou pro

evoluční a fylogenetické studie mtDNA. Mímoto RFLP analýzy vyžadují relativně velké množství čisté DNA, kterou v některých případech nelze u hmyzu získat z malého množství jedinců. Následná analýza výsledků obsahujících velké množství různých fragmentů však s sebou také přináší některé technické a statistické obtíže: 1. specifické fragmenty nelze přiřadit konkrétnímu lokusu a tím identifikovat jednotlivé alely a určit genotypy; 2. nehomologní fragmenty mohou migrovat do stejné vzdálenosti; 3. díky vazbě může docházet ke korelacím mezi lokusy (Hoy 2003).

Modifikací této klasické metody je nazývána PCR-RFLP, která eliminuje mnohé její nevýhody (Karl & Avise 1993). Pro PCR-RFLP nemusíme mít pro analýzu větší množství jedinců, stačí pouze jeden, lze navrhnout alelám specifické primery a také je tato metoda rychlejší a méně nákladná než RFLP (Hoy 2003).

Další metodou využívající štěpené restričními enzymy a PCR je nazývána PCR-AFLP (amplified fragment length polymorphisms). Výhodou této metody je, že dokáže rychle vygenerovat velké množství polymorfních markerů pro populační studie (Müeller & Wolfenbarger 1999). Hlavní nevýhodu shledává Hoy (2003) v obtížné identifikaci homologických markerů, což dělá tuto metodu nevhodnou pro studie, kde je potřeba identifikovat heterozygotní jedince. Black (1993) uvádí, že AFLP není vhodná pro některé populační studie, protože je tato metoda málo spolehlivá a opakovatelná. I když, Müeller a Wolfenbarger (1999) ukazují, že je nejvhodnější užití této metody pro určení míry genetické odlišnosti mezi jedinci, populacemi a druhy. Behura (2006) navíc uvádí, že AFLP je lepší marker ve srovnání se RAPD a RFLP.

## **RAPD**

RAPD (randomly amplified polymorphic DNAs) je metoda založená na PCR, při které se používají velmi krátké primery (dlouhé okolo deseti nukleotidů). Např. Haymer (1994) vyhodnotil sekvence různých RAPD primerů užívaných u hmyzu a sestavil přehled 55 obzvláště informativních. Do reakční směsi pro PCR se přidává jen jeden primer, který má díky své malé délce řadu komplementárních míst na různých místech genomu. S velkou pravděpodobností se pak stane, že dva primery nasednou na komplementární vlákna DNA poměrně blízko sebe (zhruba do 1000 bp) a takto označený fragment se namnoží při PCR. Obvykle se při jedné PCR takových dvojic najde více a vzniká směs fragmentů o různé délce, které lze elektroforeticky analyzovat. Soubor proužků na gelu, představujících jednotlivé fragmenty, může vytvářet druhově specifický vzor, popřípadě – při použití více primerů –

mohou být v některých případech rozlišeny jednotlivé populace nebo dokonce jedinci. Podle některých autorů (Packer & Owen 1992), je úroveň genetické variability zjištěné RAPD u blanokřídlých vyšší než při použití allozymů. Hadrys et al. (1992) označuje tuto metodu za nejvšestranněji využitelnou v molekulární ekologii hmyzu.

Mimo uvedených výhod, však existují i nepřehlédnutelné nevýhody při použití tohoto markeru. Black et al. (1992) RAPD marker pro populační studie nedoporučuje a uvádí, že vážnou komplikací je jak nízká opakovatelnost experimentů, tak i malá hodnověrnost výsledků. Liší se nejen výsledky stejných protokolů prováděných v různých laboratořích, ale někdy i opakování pokusů ve stejné laboratoři při zcela shodných podmínkách. Metoda je totiž velmi citlivá i na sebemenší změny i na nepatrné kontaminace (Edwards & Hoy 1993). Jak uvádí Hoy (2003), jinou komplikací je dědičnost RAPD fragmentů jako dominantních znaků u diplo-diploidních organismů, což normálně znemožňuje rozlišení heterozygotů od dominantních homozygotů. Také, u haplo-diploidních blanokřídlých je obtížné překonat analýzy dělané pouze na haploidních samcích nebo testovat genotyp diploidních samic testováním jejich samčího potomstva (Edwards & Hoy 1993). Jiný názor na využití RAPD mají Lu a Rank (1996), kteří ve své studii pěti geograficky izolovaných populací *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Apoidea) uvádějí, že tento marker je vhodným nástrojem pro odhad genetické diverzity (heterozygosity, divergence nukleotidů a genetické vzdálenosti) nejen u haploidních populací této včely (autoři pracovali s haploidními samci), ale s dostatečným množstvím vzorků je použitelný pro odhad genetické divergence i u diploidních populací.

### **Populačně-genetické studie mravenců využívající restričních metod a RAPD markerů**

Výše uvedené restriční metody jsou do jisté míry využívány i při populačních studiích mravenců. Nicméně dosud existuje jen málo prací které tyto metody aplikují (Farau et al. 2001; Vucetich et al. 2001). V řadě případů jde navíc o studie detailní příbuzenské struktury v rámci dané kolonie spíše než o analýzu populační struktury na větší prostorové škále.

Bickel et al. (2006) analyzuje genetickou diverzitu a populační strukturu druhů *Odontomachus rixosus* a *Pheidole annexus* ve fragmentaci poškozeném tropickém pralese na Borneu (region Sabah, Malajsie) s pomocí RAPD-fingerprinting.



Vzorky byly sbírány v nížinném pralese na čtyřech místech odlišné rozlohy. Největší sledovanou plochou s rozlohou 43800 ha byla chráněná oblast Danum Valley, která se nachází ve vzdálenosti 100 km od míst narušených fragmentací lesa. Vzdálenosti mezi studovanými fragmenty se pohybovaly mezi 5 až 15 km. Přičemž tyto oblasti byly izolovány od okolního lesa plantážemi olejových palm, které jsou označovány za velmi nevhodný habitat pro sledované pralesní druhy. Počty sledovaných kolonií byly u *O. rixosus* v největší oblasti 22, v oblasti střední 19, 16 v oblasti malé a 3 v oblasti nejmenší. Pro *P. annexus* 12, 24, 23 a 22. Menší počet kolonií nalezených na některých místech byl dán menší početností druhů tam sledovaných.

Zpracování vzorků vyneslo u *O. rixosus* (při použití 31 primerů) 105 polymorfických markerů, u *P. annexus* 187 polymorfických markerů (23 primerů). Avšak pro oba druhy bylo jen málo markerů populačně specifických (5 u *Odontomachus rixosus* a 9 u *Pheidole annexus*). Data pro *O. rixosus* získaná pro nejmenší oblast jsou, jak uvádějí autoři, prezentována pouze pro kompletnost studie – důvodem je malý počet analyzovaných kolonií.

Hypotéza redukce genetické variability byla podpořena několika měřeními genetické variability (diverzita nukleotidů, heterozygosita, množství polymorfních lokusů). Genetická diverzita pro oba druhy byla v narušeném lese průkazně nižší. Ztráta heterozygotnosti u obou druhů ukazuje na vliv inbreedingu a genetického driftu. Tedy vlivů, které jsou očekávány u malých populací. Avšak jak také uvádějí autoři, koeficient inbreedingu ( $F_{is}$ ) nemůže být prokázán pomocí RAPD dat, pokud nemáme k dispozici data z více než jedné generace. Model izolace populace předpovídá korelaci genetické vzdálenosti se vzdáleností geografickou díky vlivu minimální disperze a genového toku na větší vzdálenost. Také vysoký stupeň vytváření subpopulací ukazuje na nízkou metapopulační dynamiku, právě kvůli omezenému genovému toku mezi populacemi. Podle autorů nejsou výsledky ovlivněny případnými artefakty při sběru vzorků (s výjimkou populace *O. rixosus* z oblasti Labuk), ale jsou omezeny nízkým počtem opakování experimentu.

## 2.2.4 Studie mravenčích populací založené na kombinaci markerů

Úskalí, ale především výhody použití kombinací markerů založených především na mtDNA, mikrosatelitech ukazují i některé práce týkající se populační genetiky mravenců lišících se svoji sociální strukturou od rodu *Rhytidoponera*.

Rozsáhlou práci věnující se genetické struktuře a variabilitě populací druhu invazního mravence *Solenopsis invicta* v místě jeho přirozeného výskytu (oblasti Brazílie a Argentiny) vypracoval Ross et al. (2007). Vedle mikrosatelitů využil také allozymových a mtDNA markerů. Použití jak nukleárních, tak mtDNA markerů umožňuje vytvořit detailní obraz míry a distribuce genetické variability v oblasti přirozeného výskytu *S. invicta*. Zároveň spojení genotypových dat ze 14 lokusů a sekvence mitochondriální DNA získaných ze 568 hnízd z téměř celé oblasti výskytu nativních populací spolu s následnou statistickou analýzou umožnilo vytvořit přehled základních rysů historické a současné demografie a disperzní biologie tohoto problematického druhu.

Oba z použitých jaderných markerů přinášejí pozoruhodně podobné výsledky se zřetelem k odhadům současné diverzity *S. invicta* a mírou odlišností uvnitř a mezi populacemi. Vysokou shodu u populací lišících se svoji sociální strukturou nelze automaticky očekávat vzhledem k velmi odlišným mutačním mechanismům zapříčiňujícím zjistitelnou variabilitu, podstatně odlišné úrovni polymorfismu a odlišnému kódujícímu/nekódujícímu statusu lokusu v každé třídě. Tato shoda ukazuje, že demografické a disperzní události zanechaly podobné stopy na těchto charakteristických součástech jaderného genomu.

Srovnání výsledků z jaderné a mtDNA podobně ukazuje některé společné znaky pozorované ve sledovaných genomech, avšak také ukazuje podstatné odlišnosti. Stejný obraz dávají u hodnocení vnitřní populační diverzity. Odlišnosti dvou jaderných a mitochondriálního markeru jsou velmi zřetelné a pravděpodobně mohou být užitečné pro vyvození detailního obrazu demografického a genového toku u mravence *S. invicta*. Charakteristická distribuce genetické variability byla pozorována na dvou prostorových škálách, kdy analýza molekulární variance (AMOVA) ukázala značně vyšší diferenciaci pro mtDNA než u jaderné DNA jak mezi populacemi v rámci regionu, tak v rámci vztahu populací mezi regiony. Stejně tak byly zjištěny pro tyto dva genomy odlišné vzorce

příbuznosti populací. Tyto odlišnosti mohou být způsobeny shlukovací tendencí některých geograficky blízkých populací. U populací s touto tendencí je nacházena silná podobnost v jaderné DNA a naopak značné odlišnosti v mtDNA. Tyto odlišnosti v populačně-genetické struktuře mohou být také výrazně ovlivněny rozdílnostmi v efektivní velikosti populací. Přičemž silnější struktura může být očekávána pro mtDNA na všech sledovaných škálách za předpokladu nižší efektivní velikosti populace a větším vlivem genetického driftu na mitochondriální genom, když jsou populace relativně izolovány (Avice 2004). Taktéž může k odlišným výsledkům získaných analýzou těchto markerů přispívat vyšší pohyblivost samců mezi hnízdy. Případně mohou být výsledky získané z mtDNA ovlivněny výskytem endosymbiotické bakterie *Wolbachia*, která je nacházena u nativních *S. invicta*.

Další kombinace mitochondriálních (části genů COI a CytB) a mikrosat. markerů využil Drescher et al. (2007) při studiu populační struktury a agresivního chování invazního mravence *Anoplolepis gracilipes* v severní části Bornea.

Celkem 475 jedinců z 24 kolonií bylo analyzováno pomocí 8 mikrosatelitů a po jednom jedinci z 28 kolonií pomocí markerů mtDNA. Dělnice byly sbírány z 22 hnízd v regionu Sabah v Malajsii a do analýzy založené na mtDNA byly zahrnuty také 3 kolonie ze sousední Bruneje 2 z Filipín a jedna kolonie z oblasti Lambir Hills z regionu Sarawak, který sousedí se Sabahem. Na Borneu byly vzorky sbírány na třech škálách: 1) na úrovni odlišných regionů, 2) uvnitř regionů (kdy jednotlivá hnízda byla vzdálená i několik kilometrů) a 3) na úrovni hnízd mezi sebou vzdálených pár až stovky metrů.

Mikrosatelitní markery ukázaly vysokou příbuznost v rámci kolonií, zatímco mezi koloniemi byla nízká (negativní). Přičemž pro všechny vzorky bylo množství alel od 2 do 23 na lokus. Celkově bylo srovnáváno 5 oblastí z regionu Sabah a Bruneje. Přičemž výsledky ukázaly vysokou genetickou variabilitu mezi koloniemi uvnitř jednotlivých regionů, ale nízké genetické odlišnosti uvnitř kolonií nebo mezi regiony. Pro zjištěnou vysokou příbuznost v rámci jednotlivých kolonií a nízkou mezi jednotlivými koloniemi může mít několik vysvětlení. Za prvé, mnohonásobná invazní událost z odlišných zdrojových populací může způsobit následný vzestup v genetické diverzitě pro celou studovanou oblast. Za druhé, vysoká příbuznost mezi členy kolonie by mohla být způsobena monogynním rozmnožováním. Protože však kolonie *A. gracilipes* obsahují mnoho královen (Abbott 2005), mohlo by toto zjištění ukazovat spíše na funkční monogynii u tohoto druhu. Za třetí, vysoká příbuznost mezi členy jedné kolonie může být také způsobena klonální produkcí jednoho nebo obou pohlaví schopných rozmnožování, tak bylo nedávno popsáno u *W. auropunctata* (Fournier et al. 2005). Poslední možností může být přítomnost intranidálního páření vedoucí k vyšší

příbuznosti členů jednoho hnízda, přestože intranidální páření může vést k selektivní nevýhodě díky vysokému stupni inbreedingu (Schrempf et al. 2006.) Značná byla úroveň heterozygosity (se dvěma lokusy zcela heterozygotními), mimo většiny samečků, kteří byli homozygotní téměř pro všechny lokusy, může také znamenat, že populace prodělala silný bottleneck efekt nebo má neobvyklý způsob rozmnožování. Homozygotnost samečků by mohla ukazovat na možnost, že určité součásti genomu jsou základem pro určení kast u sledovaných populací *A. gracilipes*.

MtDNA odkryla 6 haplotypů, přičemž 2 představovaly 82,1 % všech sekvencí. Ukázalo se, že oblast Sabah odpovídá mozaice různých hnízd v různém stádiu jejich zakládání. Přičemž určité ze sledovaných kolonií mohou patřit k superkolonii, jiné s větší pravděpodobností v současnosti rozvíjející se kolonii nebo právě expandující rozmnožující se jednotku určité kolonie.

Podobnou práci, ale na ekologicky zcela odlišném druhu *Formica exsecta* vyskytující se na spojitém území Eurasie publikovala Goropashnaya et al. (2007). Opět se pomocí variability mitochondriální DNA (cytochrom b a podjednotku 6 NADH dehydrogenáza) a mikrosatelitů snaží popsat spojení mezi geneologií a geografickou distribucí. MtDNA by měla v tomto kontextu ukázat možnou vikarianční separaci v odlišných glaciálních refugiích a cesty postglaciální kolonizace, zahrnující druhy *F. exsecta* a *F. mesasiatica*. Mikrosatelity spolu mtDNA potom odlišnosti v populačních strukturách, které by mohly odrážet refugiální separaci.

Byly nalezeny dvě odlišné mitochondriální linie, přičemž jedna je reprezentována jediným jedincem z Tibetu. Tyto výsledky by mohly ukazovat vysokou míru intraspecifické mtDNA divergence, existenci dvou kryptických druhů uvnitř morfologicky definovaného druhu *F. exsecta* nebo introgresi mtDNA neznámého druhu. Nicméně, pouze s jediným vzorkem z Tibetu nemůže být přesně určeno, o který z jevů se jedná. Naopak, haplotypy morfologicky odlišeného druhu *Formica mesasiatica* vytvářejí slabě se lišící monofyletickou skupinu mezi haplotypy *F. exsecta*. Toto zjištění s největší pravděpodobností ukazuje, že *F. exsecta* a *F. mesasiatica* byli geograficky odděleny příliš krátkou dobu pro přesné vymezení monofyletických druhů při použití vybraných markerů. Goropashnaya et al. (2007) také uvádí, i když na malém počtu vzorků, že jeden jedinec *F. exsecta* pocházející z intraspecifické kontaktní zóny v Kazachstánu nese haplotyp *F. mesasiatica* a tudíž je možné navrhnout přenos mtDNA hybridizací nebo nekompletní odlišení linií obou druhů od separace jejich populací. Celkově haplotypová síť zahrnuje několik malých kladů (2 až 4 haplotypy v každém) s geograficky omezenou distribucí s výjimkou jednoho regionu, který může nést

dva nebo více takovýchto kladů. Tento model by mohl ukazovat míchání rozdílných genomů během postglaciální kolonizace Evropy z odlišných refugií nebo z odlišných ancestrálních zdrojů s prostorovou genetickou diferenciací.

Jak mikrosatelitní tak mtDNA ukazuje nevýraznou, ale přesto signifikantní úroveň variability populací po celé Eurasii. Nicméně, žádná korelace mezi genetickou variabilitou odhadovanou pro mikrosatelity a mtDNA nebyla mezi populacemi nalezena. Významná redukce v mikrosatelitní genetické diverzitě byla detekována u malé populace *F. exsecta* v Anglii – odhady průměrného počtu alel na lokus a průměrná heterozygotnost byla u této populace nejnižší. Je poněkud neočekávané, že redukce diverzity na úrovni jaderné DNA nebyla promítnuta do podobné redukce mtDNA, ačkoliv malá efektivní populační velikost by měla být citlivá k redukcí velikosti populace (Goropashnaya et al. 2007).

Poslední uvedenou práci zabývající se vztahem populací na různých prostorových měřítcích a jako předchozí uvedené studie ukazující kontrasty mezi markery je porovnání variability v mtDNA a osmi mikrosatelitních lokusech pomocí které posuzuje Doums et al. (2002) populační biologii druhu *Diacamma cyaneiventre* na dvou úrovních: i) mikrogeografickou genetickou strukturu na jedné lokalitě a ii) následky omezené disperze samic na větším prostorové škále (mezi lokalitami v rámci jednoho regionu a mezi regiony).

Jedinci byli sbíráni z 221 kolonií na 7 lokalitách 3 regionů v jižní Indii. Vzdálenost mezi lokalitami nebyla větší než pár kilometrů (méně než 10 km), mezi regiony od 36 do 188 km. Na lokalitě na niž byla studována mikrogeografická genetická struktura byly stanoveny 3 demy (plochy na lokalitách) s různým počtem kolonií.

*D. cyaneiventre* je funkčně monogynní se závislým zakládáním hnízda (čerstvě oplozené královny se vrací do mateřské kolonie). Kolonie má pouze jedno hnízdo. Samci jsou okřídlení a mají potenciál rozšiřovat své geny na mnohem větší vzdálenost než neokřídlené samice. Tato potenciální disperze samců by měla zanechat na populačně-genetické struktuře nějaké stopy, které by měly být zjištělné porovnáním maternálních a biparentálních markeru (Ennos 1994) (maternální – mtDNA, biparentální - mikrosatelity).

Uvnitř lokality byla pozorována přesvědčivá populační struktura pro mitochondriální DNA ( hodnota příbuznosti mezi sousedními hnízdy 0.74), kdežto slabá nebo neexistující struktura byla pozorována pro mikrosatelity (hodnota příbuznosti mezi sousedními hnízdy 0.07). Toto ukazuje na fakt, že blízká hnízda přísluší k jedné matrilinii a proto se jejich haplotypy shlukují. Naopak nízká genetická příbuznost ukazuje na silně omezenou možnost detekovat populační viskozitu. Spolu se zjištěním, že genový tok zprostředkovaný samci byl oproti samicím 20 krát až 30 krát vyšší, je možné předpokládat možnost efektivní disperze

samců. Pro oba markery byla pozorována velmi silná genetická diferenciace mezi lokalitami. Na vyšší prostorové škále neexistuje disperze samic a zároveň je velmi omezená i disperze samců, zvláště mezi regiony. Fylogeografická struktura haplotypů mtDNA odhalila velmi nízkou genetickou diverzitu mtDNA uvnitř lokalit, která ukazuje, že nové plochy jsou kolonizovány jednou migrační událostí přilehlých kolonií s následným štěpením kolonie.

Markery se v poslední době začínají využívat ve spojení i s morfologickými daty. Steiner et al. (2006) ve své práci, kombinující morfometrii, ITS sekvence, mtDNA a mikrosatelity, vyvrací závěry studie Savoleinen a Vepsäläinen (2003), kteří použili pro rozkrytí příbuznosti sociálních parazitů a jejich hostitelů (*Myrmica rubra* jako hostitel *Myrmica microrubra*) pouze data získaná analýzou mtDNA (geny pro COI, COII a Cyt b).

Topologie výsledného kladogramu v práci Savoleinen a Vepsäläinen (2003) podporovala jejich hypotézu, že hnízdní parazité jsou polyfyletičtí a jejich vývoj se řídí striktní formou Emeryho pravidla. Nicméně Steiner et al. (2006) uvádí, že pochybnosti vyvolává malý počet vzorků zahrnutých ve studii a především její možné alternativní vysvětlení (Berlocher 2003). Steiner et al. (2006) se přiklání k možnosti, a následně ji také potvrzuje, že *M. microrubra* je morfotyp *M. rubra* a představuje miniaturní královnu (microgyne). Stejně varování před použitím mtDNA bez dostatečně rozsáhlého sběru vzorků jak na úrovni lokální, tak na úrovni geograficky vyšší a taktéž před výkladem výsledku bez podpory dat z nukleární DNA uvádí ve své studii příbuznosti mravenců ze skupiny *F. rufa* Seifert a Goropashnaya (2004).

Steiner et al. (2006) do analýzy zahrnuli 116 jedinců *M. microrubra* a 107 *M. rubra* ze 49 lokalit ze 9 evropských zemí. Na základě morfometrie autoři ukázali, že královny (rozmnožovací samičí kasty) *M. microrubra* a *M. rubra* se liší jen v celkové velikosti, i když morfologické odlišnosti samců těchto dvou druhů již nejsou tak jednoznačné. Celkově morfometrické výsledky odpovídají druhům mravenců, které mají dimorfické královny (Steiner et al. 2006).

Směrodatné výsledky však mohly poskytnout jen molekulární data. Proto pro analýzu Cytb, COI a COII mtDNA bylo vybráno 22 vzorků ze šesti lokalit z materiálu, který byl morfometricky zpracován. Výsledky ukázaly, že oba druhy sdílely 3 z celkově 18 haplotypů na třech lokalitách. Nicméně na těchto lokalitách byly nalezeny další haplotypy jedinečné vždy pro jeden z obou druhů. To však není v rozporu s haplotypy, které druhy sdílejí, protože množství sekvenovaných exemplářů bylo malé. Potvrzuje to i propočít pro čtyři oblasti, kde nebyly nalezeny žádné společné haplotypy, který ukazuje, že vzorků vybraných pro analýzu v rámci jedné lokality bylo velmi málo (u *M. microrubra* bylo bráno od 1 do 4 vzorků na

lokalitu, u *M. rubra* pouze jeden až dva) – takto podobně prezentovali data právě Savoleinen a Vepsälläinen (2003). Dle propočtu je pro zamezení možnosti překrytu haplotypů (zkreslení výsledků) a relevantnímu vyvrácení hypotézy jednoho druhu zapotřebí analyzovat nejméně 6 vzorků od každého druhu pro každou z těchto čtyř lokalit (Steiner et al. 2006)

Významná diverzita haplotypů v rámci jedné lokality při analýze malého množství jedinců je důležitým východiskem pro teorie pokusu - tedy stanovení potřebného počtu vzorků zkoumaných na jedné lokalitě pro signifikantní prokázání sledovaného jevu, pokud je například 10 haplotypů na lokalitu (množství odpovídající pozorování) a tyto jsou stejně časté, potom je vysoká pravděpodobnost, že se neobjeví společné haplotypy pro analyzované vzorky při počtu právě šesti vzorků od každého sledovaného druhu na lokalitu. I tak je diverzita haplotypů na určité lokalitě vycházející z tak malého množství vzorků pozoruhodná. Na druhou stranu by diverzita haplotypů v rámci jedné lokality mohla ukazovat na paralelní evoluci, která proběhla několikrát samostatně v rámci různých lokalit. V souhrnu však fylogenetická analýza nepodporuje hypotézu samostatného vývoje *M. microrubra* od *M. rubra*.

Zpracování ITS sekvencí odpovídá výsledkům získaných z mtDNA – ITS sekvence sice vykazují jistou variabilitu v rámci obou druhů, avšak žádná podstatná odlišnost, podle které by se dalo stanovit, že *M. microrubra* a *M. rubra* jsou odlišné druhy nebyla nalezena.

Pro analýzu pomocí třech mikrosatelitů bylo použito 86 vzorků, které celkově poskytly 11 alel. Analýza ukázala dostatečnou diferenciaci uvnitř všech vzorků i mezi jednotlivými lokalitami. Výsledek, že všech 11 alel je sdíleno oběma druhy předpokládá genový tok v rámci i mezi druhy. Tento fakt odpovídá dřívějším pracím založených na analýze polymorfismu enzymů u anglických populací obou druhů (Pearson & Child 1980). Celkově, mikrosatelitní markery ukazují značnou propojenost genomů *M. rubra* a *M. microrubra* a současný genový tok i mezi geograficky vzdálenějšími populacemi.

Kvalitní studii sociálního parazitismu založenou na molekulárních metodách – rozkrytí genetické variability a úrovně genového toku pomocí mikrosatelitů a mtDNA - publikovali také Brandt et al. (2007). Zaměřili se na systém několika fylogeneticky příbuzných druhů mravenců na dvou kontinentech. V Evropě to byli *Leptothorax acervorum* a jeho sociální parazit *Harpagoxenus sublaevis*. V Severní Americe *Protomognathus americanus* a jeho hostitel *Temnothorax longispinosus*.

Výsledky této práce ukázaly, že odhady úrovně genového toku se nápadně liší mezi mitochondriálními a mikrosatelitními markery, které neobjasňují snížení efektivní velikosti populace mitochondriálních versus nukleárních genů. Je možné předpokládat, že populačně-

genetická struktura je s největší pravděpodobností podceňována mikrosatelity díky přítomnosti homoplazie a velkému množství alel v porovnání s množstvím prověřovaných vzorků (Brandt et al. 2007). Rozdílnost molekulárních markerů se projevila jak u evropských tak u severoamerických populací. Tyto odlišnosti v pohledu markerů mohou být způsobeny rozdílnou sociální strukturou, kdy např. *P. americanus* je striktně monogynní a *T. longispinosus* je fakultativně polygynní. A jak uvádí Chapuisat et al. (1997), u polygynních druhů mají samice větší tendenci k fylopatrii a proto je očekáváno, že genový tok na větší vzdálenost je zprostředkován samci.



# Závěr

Výzkum rodu *Rhytidoponera* na Nové Guineji představuje téměř nepopsaný list. Existuje pouze pár studií mapujících biologii, ekologii a biogeografii této skupiny, přičemž všechny představují pouze výsledky založené na pozorování nebo na nemolekulárních metodách.

Výzkum této skupiny mravenců pomoci molekulárních metod byl uskutečňován především na populační úrovni a pouze na australských druzích. Jediným autorem, který publikoval možné vztahy mezi druhy *Rhytidoponera*, a to v rámci komplexu převážně pralesních druhů *R. impressa*, analyzovaných pomoci molekulárních markerů byl Ward (1983). Ve své době použil velmi pokročilou metodu polymorfismu proteinů (allozomy). Nicméně dnes, kdy molekulární metody umožňují zaznamenat variabilitu přímo na DNA, je jejich využití zbytečné.

1) Je tedy polymorfismus na úrovni mitochondriální a jaderné DNA vhodným markerem pro mapování vztahů na úrovních druhů či populací rodu *Rhytidoponera* na vyšších prostorových škálách?

Ano. Současné poznání molekulární struktury a evolučních mechanismů na úrovni DNA umožnilo navrhnout různé druhy markerů lépe nebo hůře využitelných pro rozkrytí vztahů mezi druhy, populacemi i jedinci. Jedním z nejuniverzálněji použitelných markerů je polymorfismus mtDNA. Umožňuje přehledné mapování vztahů na úrovních druhu a populací na velkých prostorových škálách (desítky až stovky km). I přes určité zjištěné nedostatky, jeho využití k rozkrytí vztahů mezi novoguinejskými druhy *Rhytidoponera* či jejich populacemi je vhodné, za předpokladu, že počet sebraných kolonií je dostatečně rozsáhlý (Seifert & Goropashnaya 2004). Tento přístup podporují i Steiner *et al.* (2006) a Goropashnaya *et al.* (2004; 2007), kteří se zabývají druhovým komplexem *F. rufa*, který podobně jako *Rhytidoponera* obsahuje eventuální kryptické druhy. Jako nejvhodnější oblast mitochondriálního genomu pro analýzu mezidruhových vztahů se jeví COI, protože jeho vývoj z mitochondriálních genů kódujících proteiny je nejpomalejší. S podporou rychleji se vyvíjejících oblastí mitochondriálního genomu, např. podjednotky 2 a 6 NADH

dehydrogenázy či Cytb, jej lze použít i pro stanovení mezipopulačních vazeb v rámci druhu (Strehl & Gadau 2004; Azuma et al. 2006; Steiner 2006; Goropashnaya et al. 2007). Dostatečně informativní mohou být výsledky získané z mtDNA pouze pokud zahrneme některý z markerů postihující polymorfismus na úrovni jaderné DNA (Seifert & Goropashnaya 2004). Takovýmto markerem, který umožňuje detekovat variabilitu na mezidruhové úrovni, je např. gen LW Rh, který má ještě pomalejší vývoj než mitochondriální gen COI (Azuma et al. 2006). Ještě větší podporu poskytují mikrosatelity, protože dokáží výborně postihnout polymorfismus už na úrovni jedince. Kombinace mikrosatelitních a mitochondriálních markerů umožňuje dobře analyzovat nejen geografickou distribuci na velkých prostorových škálách (deset a více km), ale také možnost odhalit izolované populace.

2) Jaké molekulární markery použít pro mapování vztahů mezi populacemi na menších prostorových škálách a jaký vliv má sociální organizace rodu *Rhytidoponera* na jejich použití?

Jako nejvhodnější se jeví kombinace polymorfismu mtDNA a mikrosatelitů. Jejich kombinace využívá řada nejnovějších studií a to nejen na delších geografických vzdálenostech (Steiner et al. 2006; Goropashnaya et al. 2007; Drescher et al. 2007; Ross et al. 2007). Důvodem je možnost kvalitně zobrazit vztahy jak mezi populacemi na kratších prostorových vzdálenostech (pár metrů, desítky až stovky metrů), tak uvnitř jednotlivých populací. Toto je důležité zejména pokud přihlédneme k faktu, že o populačně-genetické struktuře jednotlivých druhů rodu *Rhytidoponera* na Nové Guineji nemáme téměř žádné informace a že populační struktura jednotlivých novoguinejských druhů nemusí být omezena pouze na polygynii s gamergates, ale může být i v rámci jedné populace kombinována například s monogynním uspořádáním. Proto je nutné před vlastní analýzou vztahů mezi populacemi na nejmenší prostorové škále (hnízda vzdálená několik metrů) rozpoznat sociální organizaci druhu, která určuje příbuznost v rámci kolonie a disperzi jednotlivých kast v kolonii. Pro nejrychlejší stanovení příbuznosti v rámci kolonie se jako nejlepší marker jeví mikrosatelity. Nejen vzhledem k jejich vysokému polymorfismu na úrovni jedince, ale také k faktu, že pro rod *Rhytidoponera* byly již publikovány (Tay & Crozier 2000). Nicméně analýzu příbuznosti je nutné provést u více hnízd od sebe vzdálených právě několik až stovek metrů proto, aby byla vyvrácena přítomnost i jiného typu soc. organizace. Vynechání tohoto kroku by výrazně ovlivnilo celkovou analýzu nejen v rámci populace, ale i mezi populacemi. Například přítomnost monogynních hnízd, ať už s pravou královnou či gamergates

monopolizující si reprodukci, by mohla ukazovat na odlišnou migraci samic i samců – v případě výskytu pravé královny možnost migrace samic i na větší vzdálenost. Stejně dobře je za pomoci mikrosatelitů, ale i mtDNA detekovatelná genetická variabilita na škále stovek metrů až několika kilometrů. Oba tyto markery by měly potvrdit, či vyvrátit předpoklad o nepřítomnosti populační viskozity odhalením migrace samců (Chapuisat & Crozier 2001). Zároveň by analýza rozmístění a shlukování haplotypů mtDNA mohla odhalit jakým způsobem byla sledovaná lokalita kolonizována (Doums et al. 2002) a i za podpory polymorfismu mikrosatelitů, které kolonie nejvíce ovlivňují genetickou skladbu sledované lokality (Ross et al. 2007).

Pokud by analýza mtDNA a mikrosatelitů potvrdila závěry z předchozích populačně-genetických prací na rodu *Rhytidoponera*, tj. nízká příbuznost mezi členy kolonie indikuje výskyt gamergates, je možné předpokládat, že blízká hnízda si nebudou výrazně příbuznější než hnízda vzdálenější (Chapuisat & Crozier 2001). Vzhledem k faktu, že publikované práce vyvracejí možnost migrace samic buď zcela (Tay & Crozier 2000) nebo na větší vzdálenosti (více než kilometr), ale podporují migraci samců (Tay 1997; Chapuisat & Crozier 2001), měly by být tyto strategie zjištěny použitím obou zmíněných markerů. Analýza haplotypů mtDNA by měla zachytit omezenou disperzi samic a analýza mikrosatelitů disperzi samců.

3) Je rod *Rhytidoponera* vhodným organismem pro sledování vlivu fragmentace a degradace biotopu a proč?

Ano. Některé druhy r. *Rhytidoponera* patří mezi nejčastější mravence v melanéských nížinných pralesích, jejich využití pro odhad vlivu fragmentace a degradace biotopu či pro studium dlouhodobějších přirozených izolačních mechanismů by proto bylo vhodné. Právě otázka migrace pohlaví u skupiny *Rhytidoponera* je v tomto kontextu důležitá. Životní strategie rodu *Rhytidoponera* může mít za následek eventuální omezení migrace jedinců do okolí. V narušeném prostředí by se měla vyskytovat místa zabraňující migraci jedinců – u polygynních hnízd jejich samců, u monogynních i samic. Lze tudíž předpokládat, že fragmentace a degradace biotopu omezující pohyb jedinců a vedoucí k izolaci kolonií (např. těžba, stěhovavé zemědělství nebo i dlouhodobější přirozené izolační procesy) se projeví relativně rychle na lokální populační struktuře. Izolované kolonie by měly vykazovat vyšší míru příbuznosti než v místech izolovaných méně nebo vůbec.

## Použitá literatura

Abbott, K. L. (2005). Supercolonies of the invasive yellow crazy ant, *Anoplolepis gracilipes*, on an oceanic island: forager activity patterns, density and biomass. *Insectes Sociaux* **52**: 266–273

Andersen, A. N. (2000). *The ants of northern Australia: a guide to the monsoonal fauna*. CSIRO Publishing, Melbourne.

Atkinson, L. & Adams, E. S. (1997). Double-strand conformation polymorphism (DSCP) analysis of the mitochondrial control region generates highly variable markers for population studies in a social insect. *Insect Molecular Biology* **6**: 369 – 376.

Avise, J. C. (2004). *Molecular markers, natural history and evolution*, second edition. Sinauer, Sunderland, MA.

Azuma, N., Kikuchi, T., Ogata K. & Higashi, S. (2002). Molecular phylogeny among local populations of weaver ant *Oecophylla smaragdina*. *Zoological Science* **19**: 1321–1328.

Azuma, N., Ogata, K., Kikuchi, T. & Higashi, S. (2006) Phylogeography of Asian weaver ants, *Oecophylla smaragdina*. *Ecological Research* **21**: 126–136

Balloux, F., H. Brunner, N. Lugon-Moulin, J. Hausser, & J. Goudet (2000). Microsatellites can be misleading: An empirical and simulation study. *Evolution* **54**: 1414-1422.

Behura, S. K. (2006). Molecular marker systems in insects: current trends and future avenue. *Molecular Ecology* **15**: 3087-3113.

Berlocher, S.H. (2003). When houseguests become parasites: Sympatric speciation in ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **100**: 6896–6898.

Bickel, T. O., Brühl, C. A., Gadau, J. R., Hölldobler, B. & Linsemaier, K. E. (2006). Influence of habitat fragmentation on the genetic variability in leaf litter ant populations in tropical rainforests of Sabah, Borneo. *Biodiversity and Conservation* **15**: 157–175.

Black, W. C., DuTeau, N. M., Puterka, G. J., Nechols, J. R. & Pettorini, J. M. (1992). Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bull. Entomol. Res.* **82**: 151–159.

Brandt, M., Fischer-Blass, B., Heinze, J. & Foitzik, S. (2007). Population structure and the co-evolution between social parasites and their hosts. *Molecular Ecology*

Bolton, B. (1995). *A new general catalogue of the ants of the world*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Bolton, B. (2003). Synopsis and Classification of Formicidae. *Memoirs of the American Entomological Institute* **71**: 1-370.

Bourke, A.F.G. & Franks, N.R. (1995). *Social Evolution in Ants*. Princeton University Press,

Princeton, NJ, USA.

Brady, S. G., Schultz, T. R., Fisher, B. L. & Ward, P. S. (2006). Evaluating alternative hypotheses for the early evolution and diversification of ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **103**: 18172–18177.

Brown, W. L. J. (1953). Characters and synonymies among the genera of ants. Part I. *Breviora, Museum of Comparative Zoology* **11**: 1-13.

Brown, W. L. J. (1954). Systematic and other notes on some of the smaller species of the ant genus *Rhytidoponera* Mayr. *Breviora, Museum of Comparative Zoology* **33**: 1-11.

Brown, W. L. J. (1958). Contributions toward a reclassification of the Formicidae. II. Tribe Ectatommini (Hymenoptera). *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* **118**: 175-362.

Cameron, S. A. & Williams, P. H. (2003) Phylogeny of bumble bees in the new world subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): congruence of molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **28**: 552–563.

Crozier, R. H., Pamilo, P. & Crozier, Y. C. (1984). Relatedness and microgeographic genetic variation in *Rhytidoponera mayri*, an Australian arid-zone ant. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **15**: 143-150.

Crozier, R. H. & Pamilo, P. (1986). Relatedness within and between colonies of a queenless ant species of the genus *Rhytidoponera* (Hymenoptera: Formicidae). *Entomol. Gener.* **11**: 113-117.

Clark, J. (1936). A revision of Australian species of *Rhytidoponera* Mayr (Formicidae). *Memoirs of the National Museum of Victoria, Melbourne* **9**: 14-89.

Deyrup, M. & Trager, J. (1986). Ants of the Archbold Biological Station, Highlands County, Florida (Hymenoptera: Formicidae). *Florida Entomologist* **69**: 206-228.

Drescher, J., Blüthgen, N. & Feldhaar, H. (2007). Population structure and intraspecific aggression in the invasive ant species *Anoplolepis gracilipes* in Malaysian Borneo. *Molecular Ecology* **16**: 1453–1465.

Doums, C., Cabrera, H. & Peeters, Ch. (2002). Population genetic structure and male-biased dispersal in the queenless ant *Diacamma cyaneiventris*. *Molecular Ecology*, **11**: 2251-2264.

Duenas, J. C. R., Gardenal, Ch. N., Llinás, G. A. & Panzetta-Gutari, G. M. (2006). Structural organization of the mitochondrial DNA control region in *Aedes aegypti*. *Genome* **49**: 931-937.

Edmons, C. A., Lillie, A. S. & Cavallisforza L. L. (2004). Mutations arising in the wave front of an expanding population. *Proceedings of the National Academy of Sciences U. S. A.* **101**: 975-979.

Edwards, O. W. & Hoy, M. A. (1993). Polymorphism in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR. *Biol. Control* **3**: 243–257.

Emery, C. (1883). Alcune formiche della Nuova Caledonia. *Bulletino della Societa Entomologica Italiana* **15**: 145-151.

- Emery, C. (1895a). Descriptions de quelques fourmis nouvelles d'Australie. *Annales de la Societe Entomologique de Belgique* **39**: 345-358.
- Emery, C. (1895b). Die Gattung *Dorylus* Fab. und die systematische Eintheilung der Formiciden. *Zoologische Jahrbücher. Abtheilung für Systematik, Geographie und Biologie der Thiere* **8**: 685-778.
- Emery, C. (1897). Formiche raccolte nella Nuova Guinea dal Dott. Lamberto Loria. *Annali del Museo Civico di Storia Naturale di Genova* **18**: 546-594.
- Gadau J., Heinze J., Hölldobler B. and Schmid M. 1996. Population and colony structure of the carpenter ant *Camponotus floridanus*. *Molecular Ecology* **5**: 785–792.
- Giraud, T., Blatrix, R., Solignac, M., Jaisson, P. (1999) Polymorphic microsatellite DNA markers in the ant *Gnamptogenys striatula*. *Molecular Ecology* **8**: 2143–2145.
- Goodisman, M., A., D. & Hahn, D., A. (2005). Breeding system, colony structure, and genetic differentiation in the *Camponotus festinatus* species complex of carpenter ants. *Evolution* **59**: 2185–2199.
- Goropashnaya, A. V., Seppä, P. & Pamilo, P. (2001). Social and genetic characteristics of geographically isolated populations in the ant *Formica cinerea*. *Molecular Ecology* **10**: 2807-2818.
- Goropashnaya, A. V., Fedorov, V. B. & Pamilo, P. (2004a). Recent speciation in the *Formica rufa* group ants (Hymenoptera, Formicidae): inference from mitochondrial DNA phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **32**:198-206.
- Goropashnaya, A. V., Fedorov, V. B., Seifert, B. & Pamilo, P. (2007). Phylogeography and population structure in the ant *Formica exsecta* (Hymenoptera, Formicidae) across Eurasia as reflected by mitochondrial DNA variation and microsatellites. *Ann. Zool. Fennici* **44**: 462-474.
- Graur, D. & Li, W.H. (2000). *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Gyllenstrand, N., Seppä, P. & Pamilo, P. (2004). Genetic differentiation in sympatric wood ants, *Formica rufa* and *F. polyctena*. *Insectes Sociaux* **51**: 139–145.
- Hadrys, H., Balick, M. & Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **1**: 55–63.
- Hamilton, W.D. (1972). Altruism and related phenomena, mainly in social insects. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **3**: 193-232.
- Haskins, C., P. Whelden, R. M. (1965). "Queenlessness", worker sibship, and colony versus population structure in the Formicid genus *Rhytidoponera*. *Psyche* **72**: 87-112.
- Haskins, C.P. & Haskins, E.F. (1983). Situation and location specific factors in the compatibility response in *Rhytidoponera metallica* (Hymenoptera: Formicidae: Ponerinae). *Psyche* **90**: 163-174.
- Haymer, D. S. (1994). Arbitrary (RAPD) primer sequences used in insect studies. *Insect Mol. Biol.* **3**: 191–194.
- Hölldobler, B. & Haskins, C.P. (1977). Sexual calling behavior in primitive ants.

*Science* **195**: 793-794.

Hölldobler, B. & Wilson, E. O. (1990). *The Ants*. Springer-Verlag, Berlin.

Hoy, M. A. (2003). *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications*, 2nd Edition. Elsevier Science, USA.

Hurst, G. D. D. & Jiggins, F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbiont. *Proceedings of the Royal Society B* **272**: 1525–1534.

Chapuisat M., Goudet J. & Keller L. (1997). Microsatellites reveal high population viscosity and limited dispersal in the ant *Formica paralugubris*. *Evolution* **51**: 475–482.

Chapuisat, M., Painter, J., N. & Crozier, R. H. (2000). Microsatellite markers for *Rhytidoponera metallica* and other ponerine ants. *Molecular Ecology*, **9**: 2219-2220.

Chapuisat, M. & Crozier, R. H. (2001). Low relatedness among cooperatively breeding workers of the greenhead ant *Rhytidoponera metallica*. *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 564-573.

Karl, S. A., & Avise, J. C. (1993). PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA: techniques and applications for population genetics. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 342–361.

Keller, L. (1991) Queen number, mode of colony founding, and queen reproductive success in ants (Hymenoptera Formicidae). *Ethology, Ecology and Evolution* **3**: 307-316.

Keller, L. (1993). *Queen Number and Sociality in Insects*. Oxford University Press, Oxford.

Keller, R., A. (2000). Cladistics of the tribe Ectatommini (Hymenoptera: Formicidae): a reappraisal. *Insect Systematics & Evolution* **31**: 59-69.

Krieger, M. J. B. & Keller, L. (2000). Mating frequency and genetic structure of the Argentine ant *Linepithema humile*. *Molecular ecology* **9**: 119-126.

Komene, Y., Higashi, S., Ito, F. & Miyata, H. (1999). Effect of colony size on the number of gamergates in the queenless ponerine ant *Rhytidoponera aurata*. *Insectes Sociaux* **46**: 29–33.

Lattke, J. E. (1994). Phylogenetic relationships and classification of ectatommine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Entomologica scandinavica* **25**: 105-119.

Le Guillou, E.J.F. (1842). Catalogue raisonné des insectes recueillis dans le voyage de circumnavigation des corvettes l'Astrolabe et la Zélée. Hyménoptères *Annales de la Société Entomologique de France* **10**: 311-324.

Liautard, C. & Keller, L. (2001). Restricted effective queen dispersal at a microgeographic scale in polygynous populations of the ant *Formica exsecta*. *Evolution* **55**: 2484–2492.

Lu, R. & Rank, G., H. (1996). Use of RAPD analyses to estimate population genetic parameters in the alfalfa leaf-cutting bee, *Megachile rotundata*. *Genome* **39**: 655-663.

Mayr, G. (1862). Myrmecologische Studien. *Verhandlungen der k.k. Zoologisch-Botanischen*

*Gesellschaft in Wien* **12**: 649-776.

Mayr, G. (1876). Die australischen Formiciden. *Journal des Museum Godeffroy* **12**: 56-115.

Moreau, C. S., Bell, Ch. D., Vila R., Archibald, B. & Pierce N. E. (2006). Phylogeny of the Ants: Diversification in the Age of Angiosperms. *Science* **312**: 101-104.

Müeller, U. G. & Wolfenbarger, L. L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* **14**: 389–393.

Savolainen, R. & Vepsäläinen, K. (2003). Sympatric speciation through intraspecific social parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **100**:7169-7174.

Seifert, B. & Goropashnaya, A. V. (2004). Ideal phenotypes and mismatching haplotypes - errors of mtDNA treeing in ants (Hymenoptera: Formicidae) detected by standardized morphometry. *Organisms Diversity & Evolution* **4**: 295-305.

Seppä P. & Pamilo P. (1995). Gene flow and population viscosity in *Myrmica* ants. *Heredity* **74**: 200–209.

Schrempf, A., Aron, S. & Heinze, J. (2006). Sex determination and inbreeding depression in an ant with regular sib-mating. *Heredity* **97**: 75–80.

Steiner, F. M., Schlick-Steiner, B. C., Konrad, H., Moder, K., Christian, E., Seifert, B., Crozier, R. H., Stauffer, C. & Buschinger, A. (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*. *The Authors* **19**: 777–787.

Strehl, CH. P. & Gadau, J. (2004). Cladistic Analysis of Paleo-Island Populations of the Florida Harvester Ant (Hymenoptera: Formicidae): Based upon Divergence of Mitochondrial DNA Sequences. *Florida Entomologist* **87**: 576-581.

Packer, L. & Owen, R. E. (1992). Variable enzyme systems in the Hymenoptera. *Biochem. Syst. Ecol.* **20**: 1–7.

Pamilo, P., Crozier, R. H. & Fraser, J. (1985). Inter-nest interactions, nest autonomy, and reproductive specialization in an Australian arid-zone ant, *Rhytidoponera* sp.12. *Psyche* **92**: 217-236.

Pamilo, P. (1993). Polyandry and allele frequency differences between sexes in the ant *Formica aquilonia*. *Heredity* **70**: 472–480.

Pamilo, P., Gertsch, P., Thorten, P. & Seppä, P. (1997). Molecular population genetics of social insect. *Annual Review of Ecology and Systematics* **28**: 1-25.

Pearson, B. & Child, A.R. (1980). The distribution of an esterase polymorphism in macrogynes and microgynes of *Myrmica rubra* Latreille. *Evolution* **34**: 105–109.

Peeters, C. P. (1987). The reproductive division of labour in the queenless ponerine ant *Rhytidoponera* sp.12. *Insectes Sociaux* **34**: 75-86.



- Peeters, C.P. (1991). The occurrence of sexual reproduction among ant workers. *Biological Journal of the Linnean Society* **44**: 141-152.
- Reichel, H. L. M. (2003). Systematics of the ant genus *Rhytidoponera* (Hymenoptera: Formicidae) in Australia. Npublikováno.
- Roger, J. (1860). Die *Ponera*-artigen Ameisen. *Berliner Entomologische Zeitschrift* **4**: 278-312.
- Roger, J. (1861). Myrmicologische Nachlese. *Berliner Entomologische Zeitschrift* **5**: 163-174.
- Rokas, A., Williams, B. L., King, N. & Carroll, S. B. (2003). Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. *Nature* **425**: 798-804.
- Ross, K. G. & Shoemaker, D. D. (1997). Nuclear and mitochondrial genetic structure in two social forms of the fire ant *Solenopsis invicta*: Insights into transitions to an alternate social organization. *Heredity* **78**: 590-602.
- Ross, K.G. (2001). Molecular ecology of social behaviour: analyses of breeding systems and genetic structure. *Molecular Ecology* **10**: 265-284.
- Ross, K.G., Krieger, M. J. B., Keller, L. & Shoemaker, D. D. (2007). Genetic variation and structure in native populations of the fire ant *Solenopsis invicta*: evolutionary and demographic implications. *Biological Journal of the Linnean Society* **92**: 541-560.
- Saux, C., Fischer, B. L. & Spicer, G. S. (2004). Dracula ant phylogeny as inferred by nuclear 28S rDNA sequences and implications for ant systematics (Hymenoptera: Formicidae: Amblyoponinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33**: 457-468.
- Seifert, B. (1991). The phenotypes of the *Formica rufa* complex in East Germany. *Abh. Ber. des Naturkundemus. Görlitz* **65**: 1-27.
- Shoemaker, D. D. and Ross, K. G. (1996). Effects of social organization on gene flow in the fire ant *Solenopsis invicta*. *Nature* **383**: 613-616.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* **87**: 651-701.
- Smith, F. (1858). *Catalogue of hymenopterous insects in the collection of the British Museum Part IV Formicidae*. London.
- Smith, F. (1859). Catalogue of hymenopterous insects collected by Mr. A.R. Wallace at the islands of Aru and Key. *Journal of the Proceedings of the Linnean Society, Zoology* **3**: 132-158.
- Stille, M. (1996) Queen/worker thorax volume ratios and nestfounding strategies in ants. *Oecologia* **105**: 87-93.
- Tay, W. T., Cook, J. M., Rowe, D. J. & Crozier, R. H. (1997). Migration between nests in the Australian arid-zone ant *Rhytidoponera* sp. 12 revealed by DGGE analyses of mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* **6**: 403-411.
- Tay, W. T. & Crozier, R. H. (2000). Microsatellite analysis of gamergate relatedness of the queenless ponerine ant *Rhytidoponera* sp. 12. *Insectes Sociaux* **47**: 188-192.

- Tay, W. T. & Crozier, R. H. (2001). Mating behaviour of *Rhytidoponera* sp. 12 ants inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology* **10**: 167-173.
- Thomas, M. L. (2002). Nest site selection and longevity in the ponerine ant *Rhytidoponera metallica* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux* **49**: 147-152.
- Vargo, E. L. (2003). Hierarchical analysis of colony and populations genetic structure of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes*, usány two classes of molecular markers. *Evolution* **57**: 2805 – 2818
- Vucetich, L.M., Vucetich, J.A., Waite, T.A. & Peterson, R.O. (2001). Genetic (RAPD) diversity in *Peromyscus maniculatus* populations in naturally fragmented landscapes. *Molecular Ecology* **10**: 35–40.
- Ward, P. S. (1980a). A systematic revision of the *Rhytidoponera impressa* group (Hymenoptera: Formicidae) in Australia and New Guinea. *Australian Journal of Zoology* **28**: 475-498.
- Ward, P. S. (1980b). Genetic variation and population differentiation in the *Rhytidoponera impressa* group, a species complex of ponerine ants (Hymenoptera: Formicidae). *Evolution* **34**: 1060-1076.
- Ward, P. S. (1981a). Ecology and life history of the *Rhytidoponera impressa* group (Hymenoptera: Formicidae). I. Habitats, nest sites, and foraging behavior. *Psyche* **88**: 89-108.
- Ward, P. S. (1981b). Ecology and life history of the *Rhytidoponera impressa* group (Hymenoptera: Formicidae). II. Colony origin, seasonal cycles, and reproduction. *Psyche* **88**: 109-126.
- Ward, P. S. (1983a). Genetic relatedness and colony organization in a species complex of ponerine ants. I. Phenotypic and genotypic composition of colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **12**: 285-299.
- Ward, P. S. (1983b). Genetic relatedness and colony organization in a species complex of ponerine ants. II. Patterns of sex ratio investment. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **12**: 301-307.
- Ward, P. S. (1984). A revision of the ant genus *Rhytidoponera* (Hymenoptera: Formicidae) in New Caledonia. *Australian Journal of Zoology* **32**: 131-175.
- Ward, P. S. (2007). Phylogeny, classification, and species-level taxonomy of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa* **1668**: 549–563.
- Wheeler, W. M. (1922). Ants of the American Museum Congo expedition. VII. Keys to the genera and subgenera of ants. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **45**: 631-710.
- Wilson, E. O. (1958). Studies on the ant fauna of Melanesia III. *Rhytidoponera* in western Melanesia and the Moluccas.IV. The tribe Ponerini. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* **119**: 303-371.
- Zhang, D. X. & Hewitt, G. M (1996). Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA

markers. *Trends in Ecology & Evolution* **11**: 247–251.

Zhang, D. X. & Hewitt, G. M (1997) Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects. *Insect Molecular Biology* **6**: 143-150.

Zhang, D. X. & Hewitt, G. M (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* **12**: 563-584