

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

Katedra medicínské biologie



Bakalářská práce

**METODOLOGICKÉ POSTUPY PŘI URČENÍ
PŘÍBUZENSKÝCH VZTAHŮ V KOLONIÍCH
MRAVENCŮ**

Vypracoval: Karel Kopejtko

Vedoucí práce: Mgr. Milan Janda, Ph.D. (ENTÚ AV ČR)

Školitel – specialista: Mgr. Jan Zíma (ENTÚ AV ČR)

České Budějovice 2011

Kopejtka, K., (2011): Metodologické postupy při určení příbuzenských vztahů v koloniích mravenců [Assesment of molecular methods for study of social organisation in ant colonies. Bc. Thesis, in Czech] – 48 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Ants from the genus *Rhytidoponera* (Hymenoptera: Formicidae) are known for specific type of social organization in which the colony can be occupied by unrelated nestmates. This thesis reviews molecular methods and markers available for study of population structure of social insects with the particular reference to *Rhytidoponera* ants.

Projekt byl finančně podporován Výzkumným záměrem MSM6007665801, granty Akademie věd ČR - KJB612230701 a Ministerstvem školství ČR - LC06073.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním svého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu své kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.1. 2011

.....

Karel Kopejtka

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval Mgr. Milanu Jandovi, Ph.D. za jeho trpělivost a ochotu při opravách mé bakalářské práce. Dále bych chtěl vyjádřit své poděkování Bc. Petře Šimůnkové, RNDr. Michaele Borovanské, Ph.D. a Mgr. Janu Zímovi za pomoc při práci v laboratoři a za cenné rady. Za podporu nejen finanční děkuji své rodině.

OBSAH

1 Úvod a cíle práce.....	1
1.1 Biologie a sociální struktura rodu <i>Rhytidoponera</i>	2
2 Molekulové markery.....	4
2.1 Historie molekulových markerů.....	4
2.2 DNA molekulové markery.....	6
2.2.1 Mitochondriální DNA (mtDNA).....	6
2.2.2 Jaderná DNA.....	10
2.2.3 Další vybrané molekulové markery a metody.....	16
2.2.4 Závěr.....	24
3 Experimentální část.....	27
3.1 Metody práce.....	27
3.1.1 Izolace DNA.....	27
3.1.2 PCR, elektroforéza.....	28
3.1.3 Purifikace PCR produktů.....	30
3.1.4 Sekvenování.....	30
3.1.5 Skládání sekvencí.....	30
3.1.6 Zarovnávání sekvencí.....	31
3.1.7 Tvorba kladogramu.....	31
3.1.8 Statistická analýza sekvencí.....	31
4 Výsledky.....	34
5 Diskuze.....	36
6 Závěr.....	38
7 Seznam literatury.....	39
8 Příloha.....	48

1 Úvod a cíle práce

Má bakalářská práce se zabývá porovnáním dvou typů molekulárních metod při rekonstrukci populačních vztahů u novoguinejských zástupců mravenců rodu *Rhytidoponera*. Práce je členěna do dvou částí – rešeršní část a část věnující se interpretaci vlastních dat z práce v laboratoři.

V rešeršní části jsem se pokusil krátce shrnout současné znalosti o problematice molekulových DNA markerů a přinést čtenáři aktuální přehled literatury napsané na toto téma.

V experimentální části jsou popsány materiál a metody, které jsem použil pro získání a vyhodnocení molekulárně-genetických dat.

Hlavní cíle práce

1. kriticky zhodnotit metody, které slouží ke studiu příbuznosti kolonií sociálního hmyzu
2. zjistit, jak jsou mitochondriální DNA markery a jaderné DNA markery vhodné pro mapování příbuzenských vztahů mezi koloniemi mravenců rodu *Rhytidoponera*
3. vyhodnotit, jestli jsou dříve použité primery vhodné pro druh *Rhytidoponera strigosa*
4. odhalit příbuznost jedinců rodu *Rhytidoponera* v rámci jednotlivých kolonií a mezi koloniemi navzájem
5. vyhodnotit, který z výše uvedených DNA markerů je pro toto mapování vhodnější, případně zda je výhodné použít jejich kombinaci

1.1 Biologie a sociální struktura rodu *Rhytidoponera*

V rámci rodu *Rhytidoponera* bylo dosud popsáno 114 druhů (Hymenoptera Online Databáze, listopad 2010) obývajících Austro-papuánskou oblast. Předpokládá se, že všech 12 druhů, které se vyskytují na Papui Nové Guinei, si je ve své sociální struktuře podobno.

Zástupci rodu *Rhytidoponera* žijí v rozmanitých typech prostředích: od savan přes deštné pralesy až po městské oblasti. Hnízda můžeme najít téměř vždy jen v půdě nebo v dutinách rozkládajících se stromů. Půdní hnízda bývají často pod kameny, které je chrání před extrémními teplotami a také slouží jako doplňkový zdroj tepla v chladných obdobích (Thomas 2002). Hnízda, která nejsou ničím zvenku kryta, vytváří většinou malé neupravené hromady až velké kupy, které jsou zakryty drobnými kamínky, listím či malými větvičkami. Některé druhy obývající tropické deštné pralesy mohou v ojedinělých případech hnízdit ve stromech (Shattuck 1999).

Rod *Rhytidoponera* patří k typickým potravním generalistům, ale v některých oblastech je významným predátorem. Mezi jeho potravu patří také dužnina různých druhů ovoce a semena.

Mravenci rodu *Rhytidoponera* zakládají své kolonie dvěma možnými způsoby:

- a) skrze jednotlivé okřídlené pářící se samice (královny) – podobně jako mnoho dalších druhů mravenců; nebo
- b) jako výsledek rozdělení stávající kolonie nebo fragmentace (tzv. „odpučování“): jedna nebo více rozmnožováníschopných dělnic – doprovázených neoplodněnými dělnicemi – opouští mateřskou kolonii, aby založily nové dceřiné hnízdo.

Z předchozího tedy vyplývá, že u rodu *Rhytidoponera* existují dva typy samic schopných reprodukce: tzv. pravé královny a „gamergates“ (ty jsou ale morfologicky neodlišitelné od nerozmnožujících se dělnic). Platí, že pravé královny a gamergates se nikdy nevyskytují ve stejném hnízdě současně, ale často se stává, že se vyskytnou v různých hnízdech v rámci jedné mravenčí populace (Ward 2006).

V rámci rodu *Rhytidoponera* bylo popsáno široké spektrum sociální organizace a rozmnožovacích systémů (Crozier a Pamilo 1996). Od druhů s pravými královnami přes druhy s polygynnými koloniemi, gamergates (pravé královny zde nejsou známy), až po skupiny druhů s polymorfními koloniemi obsahujícími jak polygynné kolonie, gamergates, tak i monogynné kolonie s pravými královnami. U některých druhů rodu *Rhytidoponera* nebyly

dosud pravé královny popsány (Tay a Crozier 2000). Vysoká plasticita sociálního systému rodu *Rhytidoponera* je zajímavým fenoménem a výzkum genetických a ekologických faktorů ovlivňujících sociální strukturu kolonie se jeví jako vhodný model pro studium sociální evoluce. Z těchto důvodů jsem vybral pro svou práci jako modelového zástupce právě druh *R. strigosa*. Dalšími výhodami zvoleného druhu je jeho vysoká lokální početnost a výskyt v různých typech habitů.

2 Molekulové markery

DNA molekulové markery slouží u hmyzu k získání informací, na jejichž základě je možné následně odhadnout genetickou diverzitu a genový tok mezi druhy, identifikovat haplotypy a fylogenetické linie, příp. zmapovat migraci a historii populací (Hale a Singh 1991; Yoon a Aquadro 1994; Behura et al. 2001b; Salvato et al. 2002; Llewellyn et al. 2003; Bosio et al. 2005). Molekulární data poskytují možnost, jak odlišit sympatrické druhy od allopatrických a parapatrických druhů (Ballinger-Crabtree et al. 1992; Wilkerson et al. 1993; Favia et al. 1994; Apostol et al. 1996; Banuls et al. 1999; Ayres et al. 2003; Margonari et al. 2004). Monitorování genového toku a genetické variability uvnitř hmyzích druhů a mezi nimi má zásadní význam při odhalování populační struktury a dynamiky (Cervera et al. 2000; Wong et al. 2000; Takami et al. 2004; Mendelson a Shaw 2005). Přirozený výběr je hybnou silou populační diverzity - v tomto kontextu jsou molekulární markery používány pro odvozování fylogeneze a biogeografie hmyzích populací a k porozumění evolučním mechanismům (Luque et al. 2002; Chatterjee a Mohandas 2003; Chatterjee a Tanushree 2004; Prasad et al. 2005).

2.1 Historie molekulových markerů

Pro potřeby molekulární biologie byly jako první molekulové markery používány zejména bílkoviny a jejich různé typy, tzv. izoenzymy a allozymy. Jako izoenzymy jsou označovány enzymy, které vykonávají shodnou funkci, ale jsou kódovány geny nacházejícími se na různých lokusech. Naproti tomu allozymy jsou varianty jednoho enzymu, které jsou kódovány různými alelami umístěnými na stejném lokusu. Allozymy a izoenzymy se v průběhu elektroforézy pohybují gelem různou rychlostí, protože se navzájem liší ve velikosti a elektrickém náboji.

Po skončení elektroforézy je gel vizualizován metodou tzv. histochemického barvení, při kterém jsou detekovány projevy reakce katalyzované zkoumaným enzymem – na gelu vzniknou v místě aktivity enzymu barevné zóny v podobě proužků. Hlavními výhodami použití izoenzymů jako molekulových markerů ve srovnání s DNA molekulovými markery jsou: nižší cena, kodominantní charakter (je možné přímo rozlišit heterozygoty) a velká

univerzálnost této metody. V současnosti se však více využívá DNA markerů, které jsou oproti enzymům více variabilní a mohou charakterizovat celý genom.

(<http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory>, listopad 2010)

Mezi prvními byl odhalován zejména polymorfismus mléčných bílkovin (albuminy, kaseiny) a bílkovin krevního séra.

Mléčné bílkoviny

Mléčné bílkoviny skotu jsou charakteristické vysokým stupněm polymorfizmu; je známo, že stupeň polymorfizmu koresponduje s kvantitativními i kvalitativními ukazateli mléka. Nejběžnějším typem polymorfizmu je polymorfismus substituční – jeden nukleotid v řetězci DNA je nahrazen jiným, takže příslušná aminokyselina v molekule bílkoviny je zaměněna jinou. Mléčné bílkoviny jsou tkáňově specifické; jsou syntetizovány a vylučovány sekrečním epitelem mléčné žlázy během laktace. Asi 80 % celkové bílkoviny v mléce skotu tvoří čtyři typy kaseinů (alfa S₁, alfa S₂, beta a kappa-kasein); geny pro všechny typy kaseinu jsou v buněčném jádře lokalizovány na šestém chromozómu a je známa jejich nukleotidová sekvence. Druhou skupinu mléčných bílkovin tvoří syrovátkové bílkoviny – alfa-laktalbumin a beta-laktoglobulin. Surovátkové bílkoviny jsou umístěny na pátém, respektive jedenáctém chromozómu (Czerneková et al. 2004).

Bílkoviny krevního séra

V krevním séru se dají prokázat stovky různých bílkovin; liší se koncentrací, velikostí svých molekul a svou funkcí v organismu. Většina plazmatických bílkovin je tvořena v játrech a vylučována do krve. Elektroforetický je možné rozdělit bílkoviny krevního séra na 5 – 6 frakcí: albumin a globuliny alfa₁, alfa₂, beta (často beta₁ a beta₂) a gamma. V současnosti se užívá zejména elektroforéza v agarózovém gelu nebo na acetátcelulóзовém nosiči (Racek et al. 1999).

2.2 DNA molekulové markery

Molekulové markery založené na DNA umožňují v porovnání s bílkovinnými markery získat obvykle větší množství polymorfizmů (Richardson et al. 1986). Je to způsobeno tím, že mutace v intronech či dokonce v genových kodónech mají potenciál poskytnout větší míru variability na úrovni DNA než na úrovni bílkoviny. Kromě toho – pro potřeby detekce je DNA ve tkáních po většinu času v nezměněné formě a je stabilnější než bílkovina. Molekulové DNA markery se proto staly jedněmi z nejběžnějších markerů používaných pro potřeby měření genetických rozdílů mezi jedinci nebo mezi příbuznými druhy a populacemi. Významné pokroky na poli molekulární biologie – a zejména v technikách využívajících DNA markery – vytvořily dostatečně širokou základnu technického know-how, která může být využita pro molekulárně-ekologické studie hmyzu (Hoy 2003).

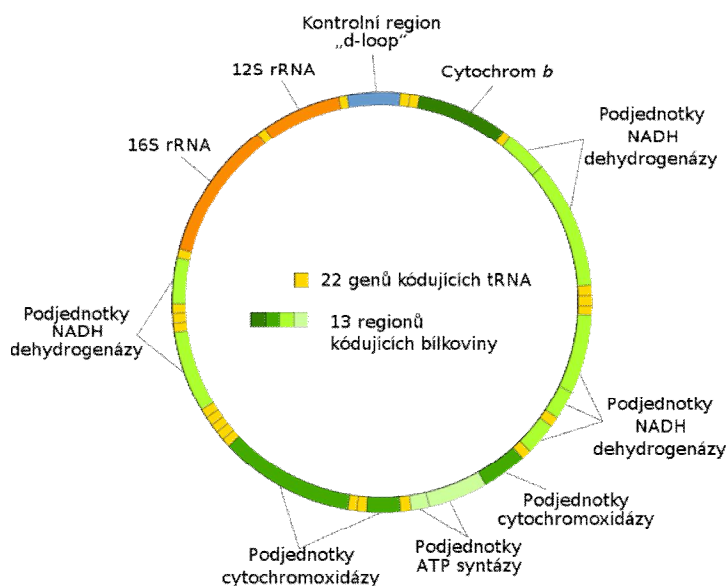
2.2.1 Mitochondriální DNA (mtDNA)

Mitochondrie mají svoji vlastní DNA; tato DNA kóduje několik genů, které produkují bílkoviny nezbytné pro fungování mitochondrií jakožto center buněčného oxidativního metabolismu. Všechny tyto geny jsou přepisovány do RNA, která je použita k syntéze bílkovin přímo uvnitř mitochondrií. Tento proces vyžaduje malé molekuly RNA a ribozomální složky, které mtDNA také kóduje. Nicméně, většina genů, které produkují enzymy použité v oxidativním metabolismu, je uložena v buněčném jádře.

Eukaryotní buňky nevytváří zcela nové mitochondrie během každého buněčného dělení. Namísto toho se samotné mitochondrie rozdělí každá ve dvě nové dceřiné mitochondrie. Tyto zmnožené mitochondrie jdou do nových buněk. Většina komponent nezbytných pro mitochondriální dělení je kódována geny umístěnými v jádře buňky a translatována do bílkovin pomocí cytoplazmatických ribozómů. Mitochondriální replikace by tedy nemohla probíhat bez účasti buněčného jádra; mitochondrie proto nemohou být pěstovány samotné v médiu bez buněk (Raven a Johnson 1999).

Mitochondriální DNA je dvouvláknová (ds) DNA; u živočichů je to kružnicová dsDNA o velikosti 16 až 20 kbp. Každý živočišný druh má svůj vlastní typ mitochondriálního genoforu.

Konformace, tvar a velikost mtDNA jsou velmi heterogenní a závisí na fylogenetickém postavení druhu. Obvykle se v mitochondrii vyskytuje více molekul mtDNA, počet molekul kolísá podle konkrétního druhu organismu. Mitochondriální DNA živočichů je poměrně malá – má informační kapacitu kódovat maximálně 36 bílkovin. Živočišná mtDNA kóduje 2 molekuly rRNA (12S-rRNA a 16S-rRNA), 22 molekulárních druhů tRNA a 13 různých bílkovin.



Obr. 1: Mitochondriální DNA (<http://cs.wikipedia.org>, listopad 2010).

Použití mtDNA k rekonstrukci populačních vztahů

Mitochondriální DNA je jedním z nejvhodnějších genetických markerů používaných pro zvířecí fylogeografické a populační studie, protože se přenáší po mateřské linii (až na výjimky – viz Schwartz a Vissing 2002; Gyllensten et al. 1991; Kondo et al. 1990; Skibinski et al. 1994), vykazuje velkou vnitrodruhovou variabilitu a nerekombinuje (až na výjimku – rekombinace může proběhnout jen v případě splynutí mitochondrií). Díky jinému mechanismu replikace a jiným reparačním procesům je u mitochondrií jiná mutační frekvence než v jaderném genomu - jejich molekulární evoluce je cca 5x – 10x vyšší než u jaderné DNA. Mutace mtDNA jsou způsobovány především zvýšenou koncentrací mutagenů (např.

kyslíkových radikálů) v důsledku energetického metabolismu probíhajícího uvnitř mitochondrií, málo přesnou replikací a neúčinnými reparačními mechanizmy.

Geny uložené v mtDNA jsou výborným nástrojem pro studie zabývající se populační strukturou, genovým tokem a evolucí blízce příbuzných skupin organismů, protože její striktní mateřská dědičnost zaručuje v každé nově vzniklé linii hromadění mutací v mitochondriálním genomu (Avisé 2004). Další nezanedbatelnou výhodou použití mtDNA pro výše zmíněné studie je její obvykle bezproblémová izolace a fakt, že existuje řada univerzálních (tzv. degenerovaných) primerů použitelných pro mnoho jejích vysoce konzervovaných genů (Hoy 2003).

Navzdory výše uvedeným výhodám není použití mtDNA zcela bez překážek. Jedním z problémů je možná interference pseudogeny z jádra; některé degenerované primery určené pro mtDNA mohou nasedat i na určitou nukleotidovou sekvenci v jaderném genomu v místech integrace mtDNA (v jádře se mtDNA chová jinak než její obdoba v mitochondrii). Jaderné pseudogeny mohou zkomplikovat analýzu výsledků a pro populačně-genetické studie je tedy tato situace nežádoucí. Nicméně tyto pseudogeny pouze limitují rozlišovací schopnost analýzy; následkem je nižší efektivita použití mtDNA v populačně-genetických studiích. Použité primery by proto měly splňovat požadavek na co největší specifitu k cílové sekvenci DNA (Zhang a Hewitt 2003).

U některých druhů organismů existují sekvence mtDNA ve velkém množství kopií s malou mírou odlišnosti mezi jednotlivými jedinci; to má za následek malou vypovídací hodnotu při mapování populační genetiky (Zhang a Hewitt 1996). Dalším problémem při použití mtDNA v populačních studiích může být výskyt mikrobiálních symbiontů (příp. parazitů), kteří mohou způsobit změnu distribuce mtDNA bez vlivu na nukleární DNA, protože cytoplazmatický genom může být ovlivněn nepřímou selekcí spojenou s přenosem genetického materiálu mikroorganizmem (Hurst a Jiggins 2005). Klasickým příkladem takovýchto endosymbiotických mikroorganizmů jsou bakterie rodu *Wolbachia*. Jedná se o gramnegativní bakterie, které způsobují v hostitelském organismu vývojové poruchy jako například cytoplazmatickou inkompatibilitu (cytoplasmic incompatibility – CI), feminizaci a posun poměru pohlaví (sex-ratio distortion); (Werren 1997). Výskyt těchto bakterií je u hmyzu běžný, proto je stále více druhů testováno na jejich přítomnost metodami molekulární biologie (Jeyaprakash a Hoy 2000). V populaci určitého druhu hmyzu, která je infikována bakteriemi rodu *Wolbachia*, postupně stoupá výskyt mitochondrií z nakažených jedinců; to je

způsobeno podobným způsobem přenosu mitochondrií a bakterií. Výsledkem je tedy vysoká prevalence mtDNA z nakažených jedinců v této populaci (Turelli et al. 1992; Rigaud et al. 1999). Tato situace je příkladem tzv. genetického svezení se (genetic hitchhiking) – obecně takto označujeme proces, kdy se evolučně neutrální nebo negativní mutace nebo alela šíří v určitém genofondu díky tomu, že je ve vazbě s genem, který je pozitivně selektován (Barton 2000). Genetické svezení se je tedy příkladem horizontálního přenosu genetické informace (horizontal gene transfer – HGT) u eukaryot.

Oblasti mtDNA využívané k rekonstrukci populačních vztahů

- a) geny pro ribozomální RNA
- b) geny kódující bílkoviny
- c) nekódující sekvence

ad a) U mravenců (stejně jako u většiny živočichů) se na mtDNA nachází dva geny pro rRNA. Jedná se o gen pro malou ribozomální podjednotku (12S rRNA) a gen pro velkou velkou ribozomální podjednotku (16S rRNA). Geny neobsahují spacery a nacházejí se na molekule mtDNA vždy jen v jedné kopii. Ve srovnání s jadernými geny pro rRNA jsou menší a strukturně jednodušší. Pro populační studie je nejvíce informativní gen pro 16S rRNA (Hoy 2003).

ad b) Geny kódující bílkoviny jsou na mtDNA reprezentovány geny pro cytochrom-c-oxidázy (tři podjednotky: COI – COIII), cytochrom b (Cytb), podjednotky ATP-syntetázy (dvě podjednotky: A6 a A8), podjednotky NADH-dehydrogenázy (sedm podjednotek: ND1 – ND6 a ND4L). V populačně-genetických studiích jsou z nich ve větší míře používány jako DNA markery geny pro COI, COII a Cytb.

ad c) Úseky genomu, které kódují aminokyseliny v bílkovinách, představují u eukaryot většinou méně než 10% jeho velikosti. Několik desítek procent eukaryotického genomu zabírají krátké opakované sekvence (buď ve velkých blocích nebo roztroušené), které nic nekódují. U hmyzí mtDNA se vyskytuje krátký variabilní segment kontrolní oblasti s vysokou úrovní polymorfizmu; protože je zde obzvláště vysoký obsah adeninových a thyminových nukleotidů, nazývá se tato oblast tzv. A+T bohatá oblast (na rozdíl od obratlovců, kde je obsah těchto dvou nukleotidů menší) (Simon 1994). Hmyzí kontrolní oblasti mohou být klasifikovány do dvou různých skupin: skupina 1 u zástupců rodu *Drosophila*, skupina 2 hmyzího kontrolního

regionu, který není rozdělen do odlišných konzervovaných nebo variabilních domén – namísto toho jsou krátké konzervované sekvence rozmístěny po celé kontrolní oblasti. Zhang a Hewitt (1997) ve své práci (srovnávající A+T bohaté oblasti mezi druhy) uvádějí, že i když tandemové repetice vykazují intenzivní evoluci a množství rozdílných kopií ukazuje na značnou rychlost mutací, přesto je zde pravděpodobně snížena rychlost substituce nukleotidů díky přítomnosti velkého množství adeninu a thyminu a přímého mutačního tlaku. Proto A+T kontrolní region není nezbytně nejvariabilnější oblastí genomu co se týče požadavku nukleotidové substituce a nevyvíjí se rychleji než samostatné kopie jaderných nekódujících sekvencí. Z výše uvedeného vyplývá omezená úspěšnost analýz využívajících této oblasti mtDNA – což má následně vliv také na užití tohoto markeru v populačně-genetických studiích.

2.2.2 Jaderná DNA

Struktura a organizace jaderné DNA

Jádro eukaryotických buněk je tvořeno chromatinem; jedná se o komplex dvouvláknové DNA, histonů a proteinů nehistonové povahy. Oproti prokaryotům je jádro eukaryotních buněk zřetelně ohraničeno jadernou membránou. Dělení jádra je mitotické a zajišťuje rozdělení chromozómů do dceřiných buněk. Většina genů je soustředěna v jádře na chromozómech; každý eukaryotní chromozóm obsahuje jednu dlouhou lineární molekulu dvouvláknové DNA. Geny umístěné na této DNA se nazývají jaderné geny. Tyto geny kódují proteiny nebo jsou přepisovány do funkční RNA, která významným způsobem zasahuje do životních funkcí eukaryotních buněk.

Struktura chromozómů se mění podle fyzikálního a chemického stavu chromatinu (jaderné hmoty), tj. zda je chromatin ve stavu kondenzovaném nebo dekonenzovaném. Podle stupně obarvení bazickými barvivy a míry kondenzace je možné rozlišit dva fyzikálně odlišné stavy chromatinu: a) euchromatin, který se barví slabě a je v dekonenzovaném stavu; b) heterochromatin, který se barví silně a představuje kondenzovaný stav chromatinu.

S kondenzací chromatinu souvisí i jeho transkripční aktivita. Obecně se dá říci, že chromatin, ve kterém právě probíhá transkripce, musí být v dekonenzovaném stavu (ve stavu

euchromatinu). Ale obecně neplatí, že všechny euchromatin je transkripčně aktivní; velká část chromozómové DNA ve formě euchromatinu nemůže být přepisována, protože neobsahuje promotory. V heterochromatinu transkripce probíhat nemůže – je v kondenzovaném stavu; heterochromatin se tedy považuje za transkripčně neaktivní.

Každý eukaryotní chromozóm obsahuje jednu dlouhou lineární molekulu dvouvláknové DNA. Značná část eukaryotního genomu připadá na nekódující sekvence (např. pouze cca 10 % savčího genomu obsahuje genetickou informaci). Z evolučního hlediska tato skutečnost znamená, že většina eukaryotního genomu nebyla v evoluci využita a je k dispozici dalším mutačním změnám.

Tab. 1: Velikost DNA jaderné složky haploidního genomu u vybraných druhů eukaryot.

Druh	Velikost genomu [bp]	Počet chromozómů
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1,34 \times 10^7$	16
<i>Caenorhabditis elegans</i>	8×10^7	4
<i>Drosophila melanogaster</i>	$1,65 \times 10^8$	4
<i>Xenopus laevis</i>	3×10^9	18
<i>Mus musculus</i>	3×10^9	20
<i>Homo sapiens</i>	3×10^9	23
<i>Zea mays</i>	5×10^9	10
<i>Allium cepa</i>	$1,5 \times 10^{10}$	8

Každý eukaryotní chromozóm má dvě funkční složky, které zajišťují jeho biologickou funkci jako celku; jsou to:

- a) centromera - zajišťuje segregaci chromozómů do dceřiných buněk během buněčného dělení
 - její konce jsou, co se týče sekvencí, velmi konzervativní
- b) telomera - řídí zakončení replikace na 3'-koncích DNA chromozómu
 - konce DNA v telomerách se vyznačují tandemovými repeticemi, které jsou pro daný druh charakteristické

Použití jaderných genů jako genetických markerů

Z dostupné literatury vyplývá, že jaderné geny nejsou v rámci populačních studií používány tak často jako je tomu u mtDNA. Sekvence jaderných intronů jsou ale potenciálně vhodné pro účely vnitrodruhových studií (Hillis et al. 1996). Například ribozomální DNA

repetice mají za sebou ležící sekvence, které jsou vysoce konzervativní a variabilní v rámci populací nebo mezi nimi (Mindell a Honeycutt 1990).

Jaderné ribozomální DNA (rDNA) geny jsou složeny z jednotek tandemových repetit, každá taková jednotka kóduje 5S, 5.8S, 18S a 28S ribozomální RNA (rRNA). U eukaryot jsou rDNA geny v těsných tandemových klastrech na jednom nebo několika chromozómech. Části chromozómů s rDNA geny se v jádře shlukují a spolu s obklopující rRNA a vázanými bílkovinami jsou v jádře dobře vidět jako tzv. jádérka.

Jednotlivé transkripční jednotky jsou oddělené tzv. ITS (internal transcribed spacer) regiony, které jsou během zrání rRNA vystřiženy a rychle degradovány. Délka sekvencí ITS1 a ITS2 spacerů u hmyzu je obvykle 190 bp - 663 bp, u některých druhů mravenců může být však mnohem delší (657 bp – 940 bp); (Hung 2004). Dodnes není známo, zda zastávají tyto spacery v genomu v současné době nějakou funkci. Od té doby, co (pravděpodobně) ztratily svůj účel, nejsou tyto ITS sekvence pod velkým selekčním tlakem a mohou tedy velmi rychle hromadit mutace. Díky rozsáhlým změnám ve svých sekvencích mohou být použity pro studium genetické variability uvnitř druhů a mezi nimi (Hung 2004). Rozdílné tempo evoluce mezi různými rDNA oblastmi a sekundární struktura transkribovaných oblastí poskytují rDNA vysokou míru systematické přizpůsobivosti (Hillis a Dixon 1991). Například Hung (2004) použil sekvenci ITS2 oblasti ke studiu sekvencí variability u mravenců rodu *Strumigenys*. Z výsledků této studie je zřejmé, že ITS2 region rDNA vykazuje vysoký polymorfismus a divergenci sekvencí.

Mezi nejoblíbenější jaderné rDNA geny používané zejména pro fylogenetické studie hmyzu patří 18S a 28S rDNA. Takové studie publikovali např. Crampton et al. (1996); Black et al. (1997); Ward a Downie (2004); Cruickshank a Thomas (1999).

Z dostupné literatury je zřejmé, že studií využívajících jaderné markery u mravenců není mnoho; nepočítáme-li mikrosatelity, které díky svému četnému použití (nejen u mravenců) tvoří samostatnou kapitulu.

Mikrosatelity

Mikrosatelity - často označované zkratkami SSRs (simple sequence repeats), VNTRs (variable number of tandem repeats) či SSLPs (simple sequence length polymorphisms) – je možné nalézt uvnitř celého jaderného genomu většiny eukaryotních organismů a v menší míře i u prokaryot (Jarne a Lagoda 1996; Vaughan a Lloyd 2003). Byly také nalezeny v rostlinných chloroplastech (Cato a Richardson 1996; Chung et al. 2006) a živočišných mitochondriích

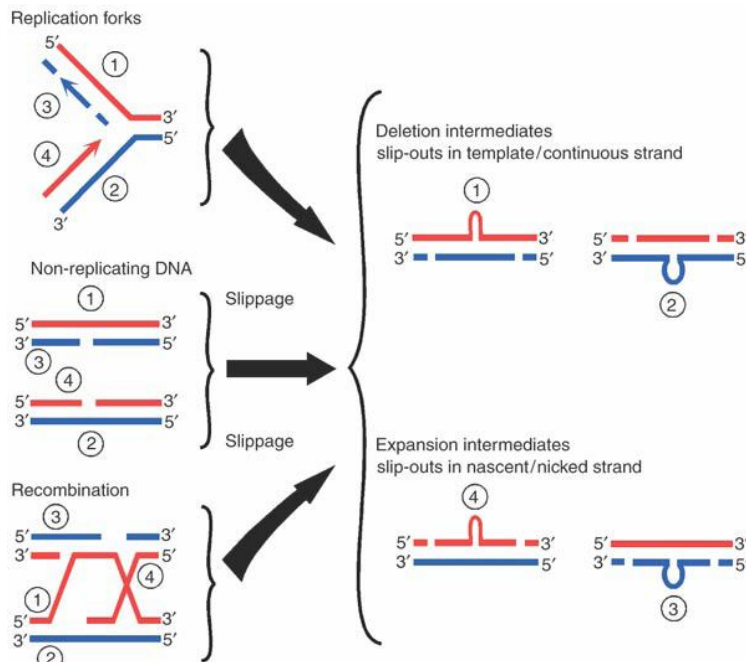
(Hoelzel et al. 1994; Soranzo et al. 1999; van Oppen et al. 2000; Rajendrakumar et al. 2007). Mikrosatelitní sekvence mohou být dlouhé v rozsahu jednoho až šesti nukleotidů a tandemově se opakují (van Oppen et al. 2000), celková délka klastru je maximálně několik set nukleotidů. Obvykle se z několika možných mikrosatelitů u určitého druhu vyskytuje jeden neobyčejně hojně – v mnoha desítkách až stovkách tisíc klastrů roztroušených víceméně náhodně po celém genomu.

Mikrosatelity je možné klasifikovat jako:

- a) jednoduché dokonalé („simple perfect“) - tandemové sady jednoduché opakující se sekvence (např. [AGG]_n)
- b) jednoduché nedokonalé („simple imperfect“) - sady skládající se z jedné nebo více opakujících se sekvencí různých délek (např. [AAC]_n[ACT][AAC]_{n+1}).
- c) složené dokonalé („compound perfect“) - sady skládající se ze dvou nebo více různých opakujících se sekvencí o stejné délce (např. [AGG]_n[AATC]_n)
- d) složené nedokonalé („compound imperfect“) - sady sekvencí přerušovaných jedním nebo více opakováními o rozdílné délce (např. [GGAT]_n[ACT][GTAA]_{n+1})

(Roy et al. 2004)

Vznik těchto repetitivních sekvencí byl objasněn mechanismem sklouzávání DNA-polymerázy („DNA slippage“) po vlákně DNA při replikaci. Je známo, že DNA-polymeráza má tendenci při syntéze lagging strandu sklouzávat po templátu zpět – obzvláště na krátkých, tandemově se opakujících sekvencích. DNA-polymeráza pak nasyntetizuje kousek sekvence ještě jednou a prodlouží tak nově vzniklý genom o stejnou, krátkou sekvenci. Sklouzávání DNA-polymerázy bylo potvrzeno pokusy *in vitro*.



Obr. 2: Sklouzávání DNA-polymerázy (Doubnerová 2008).

Další možná vysvětlení vzniku mikrosatelitů zahrnují rekombinaci dvouvláknové DNA, reparaci dvouřetězcových zlomů homologní rekombinací a retrotranspozici (retropozici). Sklouzávání DNA-polymerázy při replikaci je sice pokládáno za hlavní mechanismus vzniku a evoluce mikrosatelitních sekvencí, ale ostatní uvedené mechanismy možná také hrají jistou roli a jejich vliv zůstává předmětem dalších studií (Schlotterer 2000).

Mikrosatelity coby DNA markery jsou využívány k nejrůznějším typům základního genetického výzkumu u většiny druhů žijících organismů. U hmyzu byly mikrosatelitní markery vyvinuty mimo jiné k účelům identifikace jednotlivých druhů a populačně-genetických a evolučních studií (Lawson a Zhang 2006).

Mikrosatelitní markery se staly oblíbenými zejména díky svému vysokému stupni polymorfismu a relativně jednoduché identifikaci jednotlivých alel. Nevýhodou při jejich použití u druhů, které jsou zkoumány poprvé, je nutnost vytvoření primerů *de novo* (metodou skenování genomových knihoven); (Avisé 2004). Případně je možné použít primery již vytvořené pro blízké příbuzné druhy (tzv. cross-amplifikace); v tomto případě ale úspěšnost amplifikace klesá se vzájemnou fylogenetickou vzdáleností druhů. Dalšími vlastnostmi, které mohou snížit použitelnost mikrosatelitních markerů, je např. délka jejich sekvence a vysoký stupeň mutací (Richard a Thorpe 2001).

Mikrosatelitní markery pro rod *Rhytidoponera*

V současnosti je pro rod *Rhytidoponera* dostupných 14 publikovaných mikrosatelitních markerů; pouze 8 z nich lze údajně využít v rámci celé skupiny (Tay a Crozier 2000).

Tay a Crozier (2000) vytvořili 5 mikrosatelitních markerů, avšak většina je použitelná pouze pro druh *Rhytidoponera sp. 12* (Chapuisat et al. 2000). Chapuisat et al. (2000) navrhl pro druh *R. metallica* 8 nových mikrosatelitních markerů; také zveřejnil jeden mikrosatelitní marker, který vytvořili Tay a Crozier (2000) pro svou práci na *Rhytidoponera sp. 12*, tento marker ale ve svém článku neuvedli.

Chapuisat et al. (2000) uvádí, že všechny mikrosatelitní markery, které jsou zahrnuty v jeho studii, jsou vhodné pro zkoumání populačně-genetických vztahů v rámci celé skupiny rodu *Rhytidoponera*.

Tab. 2: Vybrané mikrosatelitní markery pro rod *Rhytidoponera* (Chapuisat et al. 2000).

Lokus	Sekvence primeru (5'-3')	Repetice	Velikost [bp]
Rmet3	F: TCTCGGAAAAGAAAATAGAGACAG R: CATGTCTACCTGACCGAGAAC	(GA) ₄₀	226–248
Rmet4	F: CATACTATCGCTTATCTCAGC R: GAACTAACCTCATCGTCCACT	(CT) ₂₆	152–178
Rmet7	F: AGACTTCAATCACGAGAAGCG R: ATTGGCACTTGGTCGATAGG	(AG) ₃₀	223–269
Rmet8	F: AAAACACGAGATACCGTCCTC R: CTGTTGACCCGCCTCCTG	(CT) ₅₀	108–144
Rmet10	F: GTCATGGACGGAATCGC R: TACCCCATCTATCTCGCA	(CT) ₃₇	246–296
Rmet12	F: GGAGTTTCTACTCGCCTCTCG R: CTCATTCGTATCACGCAAGC	(GA) ₂₀	275–315
Rmet15	F: CATTGACCGCATTITTC R: CGAGAGAGGGTGCGACAT	(AG) ₂₈	154–202
Rmet16	F: TTTAGGGACAAGAGACATGGC R: ATTGATAGGTCGCGGTCTTG	(CT) ₄₀	117–203
Rh12–13525	F: GACATACCGGGAGCGACC R: CGCCTTCTGACACCTTTGG	(CT) ₁₁	178–192

2.2.3 Další vybrané molekulové markery a metody

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Princip metody

Rozdíly v restrikčních mapách jedinců téhož druhu se označují jako polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP). Tyto rozdíly jsou podmíněné různou délkou a počtem restrikčních fragmentů vytvořených štěpením genomové DNA určitou restrikční endonukleázou; jejich podstatou jsou buď mutace vedoucí k vytvoření nebo ztrátě rozpoznávacích míst pro restrikční endonukleázy, nebo vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu repetitivních sekvencí, delecí, inzercí nebo přestaveb ve specifických oblastech chromozómů. Rozdíly ve velikosti restrikčních fragmentů u různých jedinců je možné následně snadno zjistit gelovou elektroforézou.

Použití metody v populačních studiích

Metoda RFLP se používá v populačně-genetických studiích pro jadernou i mtDNA. Jedním z úskalí této techniky je fakt, že RFLP analýza vyžaduje poměrně velké množství čisté DNA – to bývá u hmyzu v některých případech velmi obtížné. Dále také analýza dat z RFLP bývá obtížná z technického a statistického hlediska. Nevýhody klasické RFLP je možné obejít použitím její modifikace – tzv. PCR-RFLP (Karl a Avise 1993). Předností je, že pro PCR-RFLP nemusíme mít větší množství jedinců – stačí nám jeden, je možné připravit specifické primery pro určité konkrétní alely. Navíc se jedná o metodu celkově rychlejší a cenově dostupnější než RFLP (Hoy 2003).

Primery pro PCR-RFLP jsou konstruovány z klonů izolovaných z knihoven jaderné DNA a tyto primery jsou následně použity *in vitro* k syntéze homologních oblastí (Karl a Avise 1993). Výsledkem PCR jsou produkty o stejné délce, které se detekují elektroforeticky. Amplifikované produkty jsou štěpeny restrikční endonukleázou a poté opět analyzovány elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Vzorky jsou typizovány restrikčními spektry fragmentů amplifikované DNA (svých vzorků RFLP).

Obecně se dá říci, že mendelovské polymorfizmy zjištěné touto PCR metodou můžeme řadit mezi cenné genetické DNA markery použitelné pro populačně-genetické studie – obzvláště v případech, kdy jednodušší (a levnější) allozymové metody selhávají (Karl a Avise 1993).

Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)

Princip metody

Podstatou tohoto polymorfizmu jsou změny v sekvencích DNA pro vazebná místa primerů nebo delece a inserce v amplifikačních produktech vznikajících při použití některých variant polymerázové řetězové reakce (např. AP-PCR, REP-PCR, Alu-PCR, ITS-PCR, SRFA). Stanovení AFLP je vhodné pro účely srovnávací typizace celkové genomické DNA a zpravidla nevyžaduje znalosti sekvencí pro hybridizaci univerzálních primerů.

Použití metody v populačních studiích

Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP) je další metodou používanou pro populačně-genetické studie, která využívá štěpení restrikcími enzymy (endonukleázami). Stejně jako u RFLP, tato technika je v praxi spojena s PCR, a pak mluvíme o tzv. PCR-AFLP.

Pomocí metod na bázi AFLP je možné v krátké době vyprodukovat stovky genetických markerů z DNA nejrůznějších druhů organismů; tyto metody tedy dovolují provádět genotypování nebo fingerprinting s vysokou rozlišovací schopností. Úspora času a finančních nákladů, reprodukovatelnost a rozlišovací schopnost jsou větší (nebo minimálně stejné) v porovnání s ostatními markery (allozomy, mikrosatelity, RFLP, RAPD). Díky vysokému stupni reprodukovatelnosti výsledků a snadnému použití nalézají AFLP markery hlavní pole působnosti ve studiích zabývajících se systematikou, určováním patotypů (pathotyping), populační genetikou, DNA fingerprintingem a mapováním lokusů pro kvantitativní znaky (quantitative trait loci mapping); (Müller a Wolfenbarger 1999).

Hlavní nevýhoda AFLP-PCR tkví ve skutečnosti, že je obtížné nalézt homologní markery (alely) – to činí tuto metodu méně vhodnou pro studie vyžadující přesné stanovení mezialelických vztahů (jako např. určení míry heterozygotnosti); (Müeller a Wolfenbarger 1999).

SNPs (single-nucleotide polymorphisms)

Princip metody

Jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs) jsou odchylky jednotlivých nukleotidů v sekvenci genomové DNA. Metoda používaná pro ověření jednonukleotidových polymorfizmů se nazývá minisekvencování. Tato technika je založena na prodloužení 3'-konce primeru o jediný značený nukleotid, který slouží jako terminátor; primer se váže svým 3'-koncem v těsném sousedství polymorfního místa. K prodloužení primeru DNA-polymerázou dojde pouze v případě, že značený nukleotid přítomný v reakci je komplementární k bázi v cílovém místě. Produkty prodloužených primerů jsou analyzovány elektroforeticky a vyznačují se odlišnou pohyblivostí.

Automatizaci stanovení SNPs umožňuje modifikace této metody, která se provádí na DNA čípech a používá specificky fluorescenčně značené nukleotidy.

Použití metody v populačních studiích

SNPs jsou nejčastější formou mutace u mnoha genomů; na základě jejich výskytu v genomu můžeme odhadnout celkový rozsah přirozených mutací v populaci (Willing et al. 2009). Velmi častý výskyt SNPs v rámci celého genomu je proto vhodný pro populačně-genetické studie na celogenomové úrovni, při současném použití modelů šíření chyb v genomu a nejnovějších sekvenčních metod (Narum et al. 2008). Rychlý vývoj experimentálních metod v této oblasti umožňuje značnou míru automatizace, vyšší efektivitu a především se analýza SNPs stává cenově dostupným nástrojem pro genetické studie i u nemodelových druhů organizmů (Willing et al. 2009).

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Princip metody

Náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD) bývá popisována také pod označeními AP-PCR, DAF a MAAP. Je to rychlá a jednoduchá technika pro DNA fingerprinting; je vhodná pro rychlou srovnávací typizaci genomové DNA mikroorganismů a některých druhů rostlin. Metoda využívá zpravidla jeden nebo více krátkých primerů o délce 8-12 nukleotidů libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA a málo přísné podmínky pro připojení primerů. Za těchto okolností dochází k annealingu (nasednutí primerů) s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích DNA. Obvykle se vyskytne několik míst, která nejsou od sebe příliš vzdálena a umožňují připojení primerů na protilehlých řetězcích směřujících 3'-konci k sobě. Výsledkem reakce je amplifikace mnoha fragmentů o různé délce a rozdílném molárním množství – v závislosti na izolátu, ze kterého genomová DNA pochází. I když je tato metoda vysoce účinná, bývají při RAPD problémy s reprodukovatelností a s nedostatkem shodných pravidel pro interpretace rozdílů mezi jednotlivými vzory.

Použití metody v populačních studiích

Technika RAPD bývá používána v molekulární ekologii pro stanovení taxonomické totožnosti zkoumaného jedince, sestavování příbuzenských vztahů, k analýze smíšených vzorků DNA a k tvorbě specifických DNA sond; na úrovni populace nebo druhu je možné pomocí RAPD detekovat hybridní populace nebo druhy. Hlavními výhodami náhodné amplifikace polymorfní DNA je její vhodnost pro práci s neznámými genomy, použitelnost při řešení případů, kdy je k dispozici jen omezené množství DNA, efektivita a nízká cena (Hadrys et al. 1992). Těchto výhod využili např. Lu a Rank (1996) ve své studii pěti geograficky izolovaných populací včely *Megachile rotundata*; autoři tvrdí, že tento genetický marker je vhodný pro odhad genetické diverzity nejen u haploidních populací této včely (haploidní samci), ale s dostatečným množstvím vzorků je použitelný pro odhad genetické divergence i u diploidních populací.

Mezi nevýhody RAPD patří nízká opakovatelnost experimentů a malá hodnověrnost získaných výsledků; často se liší nejenom výsledky při použití stejných protokolů prováděných v různých laboratořích, ale i výsledky opakovaných analýz prováděných za zcela stejných podmínek ve stejné laboratoři (Black et al. 1992). Je to dáno faktem, že metoda je velmi citlivá na sebemenší změny reakčních podmínek i na nepatrné kontaminace reakční směsi (Edwards a Hoy 1993). Další komplikací je skutečnost, že dědičnost RAPD fragmentů u diplo-diploidních organismů funguje jako dědičnost dominantních znaků, což znemožňuje rozlišení heterozygotů od dominantních homozygotů. Stejně tak u haplo-diploidních organismů je problém při analýzách prováděných pouze na haploidních samcích nebo při testování genotypů diploidních samic zkoumáním jejich samčího potomstva (Edwards a Hoy 1993).

Expressed sequence tags (ESTs)

Princip metody

Místo s expresní adresou („expressed sequence tag“) je krátká sekvence odvozená z klonu cDNA. Tato místa mohou být použita k identifikaci genových transkriptů a mohou sloužit jako nástroj při určování genových sekvencí. V současnosti jsou ve veřejných databázích (např. GenBank) dostupné desítky miliónů jednotlivých ESTs.

Místa s expresní adresou (ESTs) jsou produkována sekvenováním klonované mRNA / cDNA. Výsledná sekvence má relativně nízkou kvalitu (obzvláště na koncích) a délka sekvence se pohybuje od 100 do 800 bp. Celková kvalita sekvence je obvykle výrazně vyšší ve středu (Nagaraj et al. 2007). Protože se tyto klony skládají z DNA, která je komplementární k mRNA, představují ESTs části exprimovaných genů. Výsledná sada ESTs je redundantní, protože použitý cDNA templát může být jen částečný či v plné délce. Techniky konstrukce cDNA knihoven a způsoby eliminace nadbytečných sekvencí popisuje např. Bonaldo et al. (1996).

Vzhledem k technikám, které jsou použity při sekvenování ESTs, vzniká často mnoho různých částečných sekvencí; tyto sekvence korespondují se stejnou mRNA daného organismu. Průběžně sestavované dílčí spojité úseky se označují jako kontigy. V první fázi je

kontigů obvykle mnoho a odpovídají jen krátkým úsekům genomu. Se zvyšujícím se počtem charakterizovaných klonů se daří kontigy postupně navzájem spojovat jeden s druhým a tím je zvětšovat (prodlužovat). Postupné seřazování klonů se proto nazývá kontigové mapování a jeho výsledkem je sestavení kontigové mapy tvořené uspořádanými sekvencemi. Konečným kontigem je kompletní nepřerušovaná sekvence DNA chromozómu nebo celého genomu. Z tohoto důvodu je kontigová mapa formou fyzikální mapy genomu. Výše uvedený způsob fyzikálního mapování DNA (genomu) se řadí mezi tzv. přístup zdola nahoru. Tento přístup obecně spočívá ve vytvoření souboru klonovaných fragmentů genomové DNA, jejichž uspořádáním lze sestavit spojitou sekvenci odpovídající celému genomu nebo dílčím chromozómům.

ESTs jsou, co se týče použití, všestrannými DNA markery a lze je využít pro nejrůznější účely genetických studií; poprvé byly použity při konstrukci fyzikálních map lidského genomu. EST databáze jsou užitečné při predikcích genové struktury, zkoumání mechanismů alternativního sestřihu, pro rozlišení genů exprimovaných v konkrétních tkáních či při specifických nemocech a při detekci a charakterizaci SNPs (jednonukleotidových polymorfizmů). Protokoly genové exprese založené na bázi EST byly také použity pro identifikaci a analýzu těch genů, které se exprimují společně. Techniky *in silico* diferenciálního zobrazení umožňují odhalit geny, které se odlišně exprimují v různých tkáních a ve zdravých a nemocných jedincích. ESTs se také staly neocenitelným nástrojem v těch oblastech proteomiky, které se zabývají identifikací jednotlivých bílkovin a charakterizací celých proteomů; obzvláště užitečné jsou v případech, kdy neexistují kompletní sekvence zkoumaného genomu. Ve spojení s dalšími genomickými a proteomickými metodami (transkripční analýzou a peptidovým fingerprintingem) se EST sekvenování stalo významným způsobem, jak identifikovat geny a jejich jednotlivé alely.

Z výše uvedeného vyplývá, že použití ESTs se výrazně rozšířilo za hranice svého původního využití – t.j. identifikace jednotlivých genů a analýzy transkriptomů. Vzhledem k tomu, že je dnes trend používat nejrůznější holistické způsoby k řešení složitých biologických problémů, je pravděpodobné, že analýzy EST data setů budou používány i v biomedicínských a biotechnologických odvětvích (Nagaraj et al. 2007).

Použití metody v populačních studiích

V nedávné době se EST markery staly populárními i v oblasti genetických studií hmyzu. Díky používání komerčních kitů pro přípravu cDNA knihoven a metodám automatizovaného sekvenování DNA je možné relativně rychle a efektivně generovat rozsáhlé EST data sety. Ačkoliv dosud byly EST markery u hmyzu používány především pro analýzy transkriptomů (Whitfield et al. 2002; Pedra et al. 2003; Nakabachi et al. 2005) a mapování hmyzích genomů (Fulton et al. 2001; Severson et al. 2002; Graham et al. 2004), představuje vývoj těchto molekulárních markerů cenný zdroj informací i pro molekulárně-ekologické studie (Behura 2006).

Transposon display

Princip metody

Technika „transposon display“ (TD) byla zpočátku úspěšně použita při vývoji rostlinných markerů (Waugh et al. 1997; Casa et al. 2000; Kentner et al. 2003; Lee et al. 2005) a až teprve později v entomologických studiích (Behura et al. 2001a; Guimond et al. 2003; Zampicini et al. 2004). TD technika je velice podobná AFLP a slouží k identifikaci polymorfizmů v inzerčních částech transpozónů.

Nejdříve je genomová DNA naštipána restrikcí enzymem, který rozpoznává restrikcí místa v konzervovaných oblastech transpozónu. Další enzym je použit k druhému rozštípání DNA, kdy dojde k digesci řetězce v oblastech DNA přiléhajících k transpozónu. Po druhé digesci jsou použity specifické adaptory (komplementární k restrikcí místům) k tomu, aby se připojily k naštipaným molekulám DNA. Tyto molekuly jsou následně použity jako templáty pro dvě PCR reakce. Při první PCR jsou použity primery se specifitou k adaptorům. Produkt této reakce je naředěn a slouží jako templát pro druhou PCR, kdy je použit radioaktivně značený primer komplementární k sekvenci transpozónu. 3'-konec tohoto primeru je prodloužen o tři nukleotidy. Pokud jsou vnitřní sekvence elementu použity jako ukotvující primer, 3' konec sekvence může být vytvořen podle přiléhající sekvence až za motiv známé části sekvence transpozónu. Amplifikované produkty druhé PCR jsou poté

rozděleny elektroforeticky na agarózovém gelu a pomocí autoradiografie jsou vyhodnoceny velikosti a pozice proužků na gelu (Behura et al. 2006).

Použití metody v populačních studiích

Vzhledem k principu metody je TD technika použitelná ve spojení s konkrétními typy transpozónů. U hmyzu je velmi rozšířený např. transpozón *mariner*, který je součástí tzv. IS630-Tc1-*mariner* superfamily. *Mariner* elementy mají délku 1,2 – 1,4 kb a mají dvě inverzní koncové repetice (inverted terminal repeats – ITRs), které jsou třeba k transpozici elementu do genomové DNA. Kódují enzym transponázu, která katalyzuje excizi a inserci transpozónu během transpozice *mariner* elementu do genomové DNA. Roberts (1993) vytvořil na základě konzervované sekvence aminokyselin v kódující oblasti *mariner* transponázy pár degenerovaných primerů, které byly intenzivně využívány při identifikaci *mariner* podobných elementů u různých druhů hmyzu. Pro svůj hojný výskyt a přítomnost konzervovaných sekvenčních motivů jsou *mariner* transpozibilní elementy používány k vývoji TD metod.

Přítomnost transpozibilních elementů typu *mariner* byla technikou TD sledována např. v genomu asijského druhu bejlomorky (*Orseolia oryzae*), která patří mezi významné hmyzí škůdce rýže. V tomto případě byly nalezeny a charakterizovány polymorfizmy v inserční oblasti těchto elementů u různých indických populací bejlomorky (*Orseolia oryzae*); (Behura et al. 2001a). Dalším příkladem může být použití TD techniky při identifikaci a mapování tří polymorfizmů v oblastech DNA přiléhajících k *mariner* elementům v genomu bejlomorky obilné (*Mayetiola destructor*) – významného škůdce obilí (Behura et al. 2004).

Dalším DNA transpozibilním elementem, který je potenciálně použitelný pro entomologické studie prováděné metodou TD, je transpozón *hermes*. Je členem rodiny *hAT* (*hobo*, *Ac*, *Tam3*) a můžeme ho nalézt v genomu minimálně patnácti druhů hmyzu, včetně octomilek, komárů, brouků a molů. Tento element je dlouhý méně jak 3 kb a obsahuje 17-bp inverzní koncové repetice (ITRs). Guimond et al. (2003) použil *hermes* element - klonovaný v plazmidu a následně injikovaný do embryí - ke studiu inserčních znaků těchto elementů u transgenních octomilek (*D. melanogaster*). Guimond et al. (2003) také díky technice TD ukázal, že *hermes* element je možné použít jako vektor pro genetické transformační experimenty u hmyzu.

Hlavní výhodou při použití markerů na bázi TD je skutečnost, že není třeba určit sekvenci pro každý jednotlivý lokus. Protože je použit pouze jeden degenerovaný primer spolu se specifickými adaptorovými primery, náklady na výrobu a následnou sekvenční analýzu jsou nižší než u konvenčních markerů. Tyto metody jsou poměrně jednoduché, používá se radioaktivní značení primeru nebo značení PCR produktů stříbrem. Vzhledem k tomu, že u některých druhů hmyzu se DNA transpozóny vyskytují v hojném počtu, jsou výše zmíněné metody obzvláště vhodné pro tvorbu genomických map. Dále ještě existuje mnoho různých restričních enzymů, které je možné potenciálně použít při hledání polymorfizmů restričních míst na obou stranách transpozibilního elementu. Transpozón (ve spojení s *in situ* hybridizací) může být také použit jako sonda, díky které je možné určit fyzické umístění lokusů na chromozómech (Behura et al. 2006).

Navzdory výše uvedeným výhodám TD techniky nejsou rutinně používané a nedosáhly větší popularity. Hlavním důvodem je zřejmě fakt, že pokud nejsou podmínky PCR optimalizovány, vznikají nespecifické PCR produkty (Behura et al. 2001).

2.2.4 Závěr

V této kapitole jsem se pokusil krátce shrnout současné znalosti o problematice molekulových DNA markerů a přinést čtenáři aktuální přehled literatury napsané na toto téma.

Popsané markery a metody

- mitochondriální DNA (mtDNA)
- mikrosatelitní markery
- polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)
- polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)
- jednonukleotidové polymorfizmy (SNPs)
- náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD)
- místa s expresní adresou (ESTs)
- „transposon display“ (TD)

V Tab. 3 je uvedeno stručné shrnutí kladů a záporů výše popsaných markerů a metod.

Tab. 3: Porovnání markerů a metod.

Markery a metody	Výhody	Nevýhody
mtDNA	maternální přenos, velká vnitrodruhová variabilita, nerekombinuje, snadná izolace, existence univerzálních primerů	interference pseudogeny, výskyt mikrobiálních symbiontů, striktní maternální přenos
mikrosatelity	vysoký stupeň polymorfizmu, jednoduchá identifikace alel, možnost cross-amplifikace	nutnost vytvoření primerů <i>de novo</i> , limitující délka sekvence, vysoký stupeň mutací
RFLP	nevýhody lze obejít použitím PCR-RFLP	vyžaduje velké množství čisté DNA, obtížná analýza dat
AFLP	univerzálnost primerů, variabilita, úspora času a finančních nákladů, reprodukovatelnost a rozlišovací schopnost	obtížné nalézt homologní markery
SNPs	automatizace metody – DNA čipy, cenově dostupné, velmi častý výskyt v genomu	
RAPD	vysoce účinná, rychlá, jednoduchá metoda	problémy s reprodukovatelností
ESTs	všestrannost, využití komerčních kitů pro přípravu cDNA knihoven, metody automatizovaného sekvenování	
TD	nízké náklady na výrobu a sekvenční analýzu, jednoduchost metody	riziko vzniku nespecifických PCR produktů

Pro svoji práci na druhu *R. strigosa* jsem jako genetický marker zvolil mtDNA. Hlavními důvody byla jednoduchá izolace mtDNA pomocí komerčně dostupného kitu DNeasy Blood & Tissue Kit od spol. QIAGEN a velká vnitrodruhová variabilita mtDNA (pracoval jsem pouze s jedním cílovým druhem). Mnou použitý gen pro cytochrom c oxidázu I (COI) je široce užíván v jiných populačních studiích, což přidává mým datům na hodnotě, protože mohou být použity ve srovnávacích studiích. Např. Doubnerová (2008) ve své práci uvádí, že COI je vhodným markerem pro vnitrodruhové studie mravenců.

3 Experimentální část

Cíle experimentální části

V rámci experimentální části jsem testoval dostupné satelitní markery (Chapuisat et al. 2000) na druhu *R. strigosa*. Mým cílem bylo zjistit, zda markery vyvinuté pro druhy *R. metallica* a *R. sp. 12* žijící v Austrálii budou vhodné pro studium sociální struktury cílového novoguinejského druhu.

Cílem praktické části práce bylo získat DNA data pro studium příbuznosti jedinců mravence *Rhytidoponera strigosa* v rámci kolonií a pro zjištění příbuznosti mezi koloniemi navzájem.

Jako další vhodný marker byl vybrán gen pro cytochrom c oxidázu I (COI) z důvodů velké vnitrodruhové variability a jednoduché izolace mtDNA pomocí komerčně dostupného kitu DNeasy Blood & Tissue Kit od spol. QIAGEN

Z každé z vybraných kolonií (37 kolonií, 225 jedinců) pocházejících ze dvou lokalit bylo odebráno 3 - 7 jedinců, kteří byli zpracováni níže uvedeným způsobem.

Vzorky pocházely z primárního a sekundárního lesa lokalit Baitabag a Ohu, provincie Madang, Papua Nová Guinea, kde byly odebrány během roku 2008 a uloženy v absolutním ethanolu.

3.1 Metody práce

3.1.1 Izolace DNA

Izolace genomové DNA byla provedena pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Z každého jedince byla na izolaci použita jedna končetina. Následně byla tkáň homogenizována v 220 μ l ATL pufru (Tissue Lysis Buffer) ve skleněném homogenizátoru. Po homogenizaci bylo ke každému vzorku přidáno 40 μ l proteinázy K, směsi byly krátce promíchány a inkubovány přes noc ve vodní lázni při teplotě 57°C. Po inkubaci byl každý vzorek důkladně promíchán a bylo k němu přidáno 200 μ l AL pufru

(Lysis Buffer). Vzorky byly promíchány a poté bylo přidáno ke každému vzorku 200 μ l 96% ethanolu. Směsi byly přepipetovány do připravených 2 ml mikrozkušavek s izolačními kolonkami. Vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 8000 ot./min. Po centrifugaci byl filtrát z mikrozkušavek odstraněn a mikrozkušavky nahrazeny novými. Poté bylo naaplikováno na každou izolační kolonku 500 μ l AW1 pufru (Wash Buffer 1), vzorky byly opět centrifugovány 1 minutu při 8000 ot./min. Po centrifugaci byl filtrát z mikrozkušavek odstraněn. Izolační kolonky byly umístěny do nových 2 ml sběrných mikrozkušavek. Poté bylo napipetováno do každé izolační kolonky 500 μ l AW2 pufru (Wash Buffer 1), vzorky byly centrifugovány 2 minuty při 14000 ot./min a filtrát z mikrozkušavek opět odstraněn. Dvakrát promyté (AW1 a AW2 pufr) izolační kolonky byly vloženy do nových 2 ml mikrozkušavek a bylo do nich napipetováno 50 μ l AE pufru (Elution Buffer). Po 10 minutách inkubace následovala centrifugace trvající 1 minutu při 8000 ot./min. Vzorky s izolovanou genomovou DNA byly pro další použití uskladněny v mrazicím boxu při teplotě -20°C . Veškeré centrifugace byly prováděny při pokojové teplotě (ca 25°C).

3.1.2 PCR, elektroforéza

Cytochrom c oxidáza I (COx)

Jako templát pro amplifikaci produktu COx byly použity vždy 2 μ l vyizolované genomové DNA (viz kapitola 3.1.1). Reakční směs (bez templátové DNA) se skládala z 12,5 μ l PPP Master Mixu (Top-Bio s.r.o.) obsahujícího 150 mM Tris-HCl, pH 8,8, 40 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,02% Tween 20, 5 mM MgCl_2 , 400 μ M dATP, 400 μ M dCTP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dTTP, 100 U/ml Taq-Purple DNA polymerázu, stabilizátory a aditiva a dále 1 μ l forward primeru (c= 20 pmol/ μ l), 1 μ l reverse primeru (c= 20 pmol/ μ l); (viz Tab. 4) a 8,5 μ l PCR H_2O .

Následná amplifikace probíhala v automatickém termálním cycleru (Master cycler, Eppendorf) za následujících podmínek: denaturace 5 min při 95°C , 35x opakovaný cyklus složený z denaturace 1 minutu při 92°C , annealingu 1 minutu při 50°C a elongace 1 minutu při 70°C .

Amplifikované produkty byly separovány v 1,5% agarózovém gelu ponořeném do 1x TAE pufru. Vždy 5 μ l vzorku smíchaných se 2 μ l směsi SYBR Greenu (Top-Bio s.r.o.) a PCR

vkładacího pufu (Top-Bio s.r.o.) bylo naneseo do jamky gelu a byla provedena elektroforéza (150 V / 25 min). Poté byl gel vyfotografován při osvícení UV zářením na transiluminátoru. Vizualizované PCR produkty na gelu byly odečítány podle velikostního standardu PCR 100bp Low Ladder (Sigma-Aldrich).

Tab. 4: Charakteristika použitých COx primerů (Folmer et al. 1994).

Název	Sekvence (5' - 3')	Očekávaná velikost produktu [bp]
LCO1-1490 (fw)	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	1000
LCO1-1490 (rev)	GCTACTACATAATAKGTATCATG	1000

Mikrosatelitní markery

Devět mikrosatelitních markerů (viz Tab. 2) bylo testováno pro použití na druhu mravence *Rhytidoponera strigosa*. Každý marker byl testován na čtyřech jedincích.

Složky 1 PCR reakce (celkový objem 20 µl):

PCR H₂O 11 µl
 PPP Master Mix 5 µl
 5' primer 1 µl
 3' primer 1 µl
 Templátová DNA 2 µl

Amplifikace probíhala v automatickém termálním cycleru za následujících podmínek: denaturace 3 minuty při 94°C a 30x opakovaný cyklus složený z denaturace 30 sekund při 92°C, annealingu 30 sekund při 50 °C a elongace 30 sekund při 72 °C. Amplifikované produkty PCR reakce byly separovány v agarózovém gelu a vizualizovány pomocí barviva SYBR Green za stejných podmínek jako PCR produkty pro gen COx.

3.1.3 Purifikace PCR produktů

Purifikace PCR produktů COx byla provedena pomocí kitu GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich).

Reakční směs o objemu 20 µl obsahující PCR produkt (z celkového objemu 25 µl bylo 5 µl použito pro elektroforézu) byla smíchána se 100 µl vázacího roztoku (Binding Solution). Směs byla přepipetována do připravené vázací kolony umístěné v mikrozkuhavce. Vzorek byl centrifugován 1 minutu při 13 000 ot./min. Filtrát byl odstraněn. Do kolony bylo přidáno 500 µl promývacího roztoku (Wash Solution); následovala centrifugace 1 minutu při 13 000 ot./min. Filtrát byl opět odstraněn. Vzorek byl bez přidání dalšího roztoku centrifugován 2 minuty při 13 000 ot./min. Filtrát i sběrná mikrozkuhavka byly odstraněny. Vázací kolonka byla vložena do čisté 2 ml sběrné mikrozkuhavky. Do středu vázací kolony bylo opatrně aplikováno 30 µl elučního roztoku (Elution Solution); následovala inkubace při pokojové teplotě (ca 25°C) po dobu 1 minuty. Poté byl vzorek centrifugován 1 minutu při 13 000 ot./min. Po centrifugaci byla vázací kolonka odstraněna a přečištěný produkt byl před odesláním k sekvenaci uskladněn v mrazícím boxu při teplotě -20°C.

3.1.4 Sekvenování

Přečištěné PCR produkty byly nechány ve sběrných kolonkách; ty byly označeny názvem vzorku (z boku) a použitým primerem (shora). Uzávěry sběrných kolonek byly utěsněny (omotáním) proužky parafilmu. Vzorky přečištěné DNA spolu se 100 µl roztoku použitého primeru (forward, reverse zvlášť) o c = 5 pmol/µl byly odeslány do laboratoří společnosti Macrogen Inc., kde proběhla sekvenace.

3.1.5 Skládání sekvencí

Ke skládání sekvencí byl použit program Geneious Pro 5.1.7. Přední (forward) a zadní (reverse) konec sekvence od každého vzorku byly umístěny pod sebou a spojeny pomocí příkazu „Assembly“; sensitivity nastavením nejvyšší citlivosti a minimálním překryvem nastaveným na 20 bází a s parametrem Overlap Identity: 50. Sestavené sekvence bylo možné

jednotlivě zkontrolovat podle chromatogramu fw a rev sekvencí a případně opravit nejasné báze (označené písmeny K, M, N, S, R, W).

3.1.6 Zarovnávání sekvencí, alignment

Dále bylo třeba sestavené sekvence zarovnat; nejdříve byly modře označeny a zarovnání bylo provedeno příkazem „Alignment“ (Alignment – Consensus Alignment: „Sequence alignment options: MUSCLE Alignment“; „Maximum number of Iterations: 15“). Alignováním jsme získali soubor sekvencí zarovnaných pod sebou tak, aby shodné báze genetického kódu byly na stejných pozicích. Nyní bylo možné odstranit mezery mezi bázemi a nejasné báze (označené písmeny K, M, N, S, R, W) doplnit podle chromatogramů původních sekvencí. Výsledný nukleotidový alignment byl převeden do aminokyselinových sekvencí pro kontrolu správného čtecího rámce výsledného alignmentu. Po převedení zpět do nukleotidového formátu byl zeditovaný soubor sekvencí uložen ve formátu FASTA a podroben statistické analýze v programech Arlequin 3.5.1.2 a DnaSP v5.

3.1.7 Tvorba kladogramu

Kladogram mitochondriálních sekvencí (viz Příloha 1) byl vytvořen metodou maximum likelihood (ML) v programu PHYML skrze interface Geneious Pro 5.1.7. Jako substituční model byl použit nejuniverzálnější GTR model. Parametry modelu transition/transversion poměr 4; a automaticky odhadnutými parametry pro proporcii invariabilních míst i parametr gamma. Počet substitučních kategorií modelu byl 4 a výsledný ML strom byl optimalizován pro topologii, délku a substituční rychlost.

3.1.8 Statistická analýza sekvencí

Soubor COI sekvencí byl analyzován ve statistických programech Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier a Lischer 2010) a DnaSP v5 (Librado a Rozas 2009). Výstupem těchto dvou programů byly statisticky zpracované informace o genové a molekulární diverzitě (obr. 3) sledované populace *R. strigosa* a informace o zastoupení různých haplotypů v této populaci

(Obr. 5). Dalšími důležitým údaji byly hodnoty celkové haplotypové a nukleotidové diverzity a hodnota Tajima's D (Tab. 5).

Statistický program DnaSP v5

Vstupním souborem pro tento program byly COI sekvence ve formátu FASTA. Spočítány byly hodnoty DNA polymorfizmu a Tajima's D (Tab. 5).

Tajima's D Test (Tajima 1989)

Tajima's D je statistický test vytvořený za účelem odlišit DNA sekvence, které se vyvíjejí náhodně („neutrálně“), od sekvencí vyvíjejících se pod vlivem nějakého procesu (např. přímá nebo nepřímá selekce, demografická expanze). Náhodně se vyvíjející DNA sekvence obsahuje mutace, které nemají vliv na fitness a přežití organismu. Tajima's D porovnává hodnoty nukleotidové diverzity π a nukleotidového polymorfizmu σ . V případě neutrálního chování genu se tyto dvě hodnoty rovnají.

Haplotypová diverzita (H_d)

H_d je možné definovat jako pravděpodobnost, že ve vzorku jedinců budou dva jedinci nositeli rozdílného haplotypu. Vyjadřuje míru výskytu určitého haplotypu v dané populaci. Je možné ji vypočítat jako podíl haplotypů ve vzorku k celkovému počtu haplotypů; počítá se pro každý vzorek zvlášť.

Nukleotidová diverzita (P_i)

P_i slouží k měření míry polymorfizmu v populaci. Je definována jako průměrný počet nukleotidových rozdílů mezi kterýmikoliv dvěma DNA sekvencemi vybranými náhodně ze vzorku. Nukleotidová diverzita je měřítkem genetické variability populace.

Statistický program Arlequin 3.5.1.2

Vstupními daty byl výstup z programu DnaSP v5 v Arlequin formátu.

Zadaná struktura – celkem 37 populací představujících jednotlivé kolonie, jednotlivé sekvence z každé kolonie byly spojeny do 1 populace v editoru struktury

Nastavení – výpočet párových F_{st} , 100 permutací, spočítání distanční matice

Haplotypová inference – odhad hapl. Frw pouhým počítáním, sdílené haplotypy odvozeny z distanční matice

Standard diversity indices – ano

Molecular diversity indices – ano

Neutrality tests – 1000 replikací

Haplotypové definice – odvozeny z distanční matice

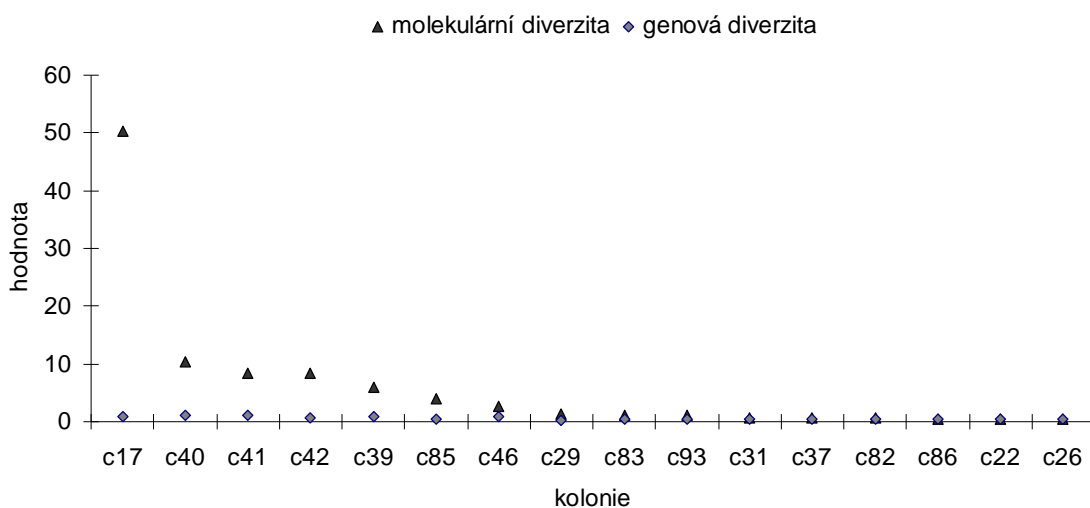
Tabulky a grafy v této práci byly vytvořeny v programu Microsoft® Office Excel 2003 (11.8328.8329) SP3.

4 Výsledky

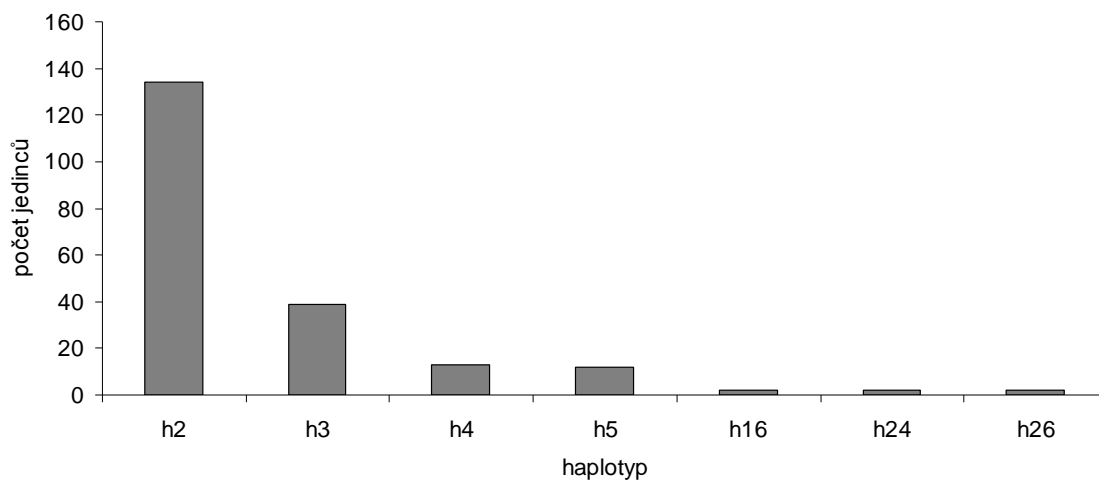
Po otestování dříve použitých mikrosatelitních primerů jsem zjistil, že všech devět navržených satelitních markerů je možné použít i pro druh *R. strigosa*. Každý primer jsem vyzkoušel na 4 jedincích z různých kolonií. Po provedení PCR reakce a elektroforéze amplifikovaných produktů jsem detekoval DNA produkty v rozmezí očekávaných velikostí (Tab. 2).

Po statistickém zpracování v programu DnaSP jsem ve zkoumaném souboru 225 jedinců pocházejících z 37 kolonií našel 28 různých haplotypů. Dominantními haplotypy byly h2, h3, h4, h5 (Obr. 4 a Obr. 5). Pro 21 haplotypů existoval ze zkoumaném souboru jedinců pouze jeden nositel. Celková haplotypová diverzita byla 0,6112, celková nukleotidová diverzita měla hodnotu 0,00599, Tajima's D = -2,40907 (Tab. 5). Z hodnot genové a molekulární diverzity bylo zřejmé, že 16 kolonií je geneticky diverzních (Obr. 3).

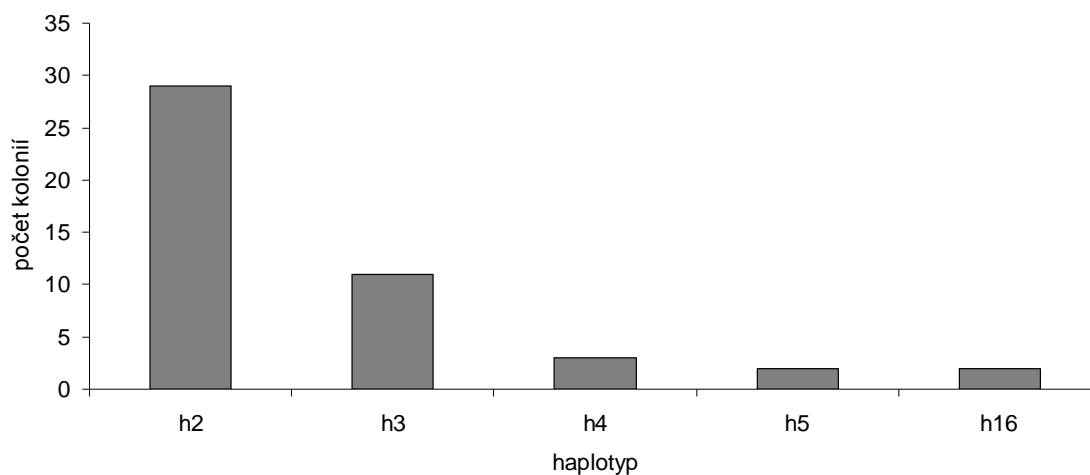
Hodnoty genové a molekulární diverzity (Obr. 3) vyjadřují v rámci každé kolonie míru genetické diverzity.



Obr. 3: Graf genové a molekulární diverzity sledované populace *R. strigosa*. Kolonie s nulovými hodnotami nejsou zobrazeny.



Obr. 4: Zastoupení haplotypů v populaci *R. strigosa*. Haplotypy reprezentované pouze jedním nositelem nejsou zobrazeny.



Obr. 5: Zastoupení haplotypů v koloniích. Haplotypy zjištěné pouze v jedné kolonii nejsou zobrazeny.

Tab. 5: Statistické hodnoty charakterizující sledovanou populaci *R. strigosa* (SD=směrodatná odchylka).

Statistický údaj	Hodnota
Celková haplotypová diverzita	0,6112 (SD=0,034)
Celková nukleotidová diverzita	0,00599 (SD=0,00128)
Tajima's D	-2,40907

5 Diskuze

V experimentální části své bakalářské práce jsem pracoval se souborem 225 jedinců druhu *R. strigosa* pocházejícími z 37 kolonií. Převážná většina kolonií pocházela z jedné lokality (Ohu), pro porovnání genetické diverzity jsme rovněž zahrnuli 4 kolonie z lokality Baitabag, ležící ve vzdálenosti 30 km. Jednotlivé kolonie byly v rámci lokality od sebe vzdáleny v rozmezí 1m – 1km.

Statistickým zpracováním molekulárně-genetických dat jsem zjistil, že ve zkoumaném souboru jedinců je možno nalézt 28 různých haplotypů. Jak je možné vyčíst z grafů (Obr. 4 a Obr. 5), silně dominantním haplotypem byl haplotyp h2 (nositelem tohoto haplotypu bylo celkem 134 jedinců z 29 kolonií), dalšími převládajícími haplotypy byly: h3 (11 kolonií, 39 jedinců), h4 (3 kolonie, 13 jedinců) a h5 (2 kolonie, 12 jedinců). Pro 21 haplotypů existoval ze zkoumaném souboru jedinců pouze jeden nositel. Můžeme tedy říci, že v populaci je relativně vysoká haplotypová diverzita. Např. Azuma et al. (2006) publikoval studii druhu mravence *Oecophylla smaragdina* využívající mimo jiné COI. Celkově bylo pro analýzu vnitrodruhové divergence *O. smaragdina* zvoleno 152 kolonií z 35 lokalit. Pro COI bylo rozpoznáno 52 haplotypů; fylogram ukázal, že haplotypy jsou jasně rozděleny do sedmi skupin. Z hodnot genové a molekulární diverzity (Obr. 3) je zřejmé, že sledovaná populace je heterogenní (16 kolonií je geneticky diverzních). Ze záporné hodnoty Tajima's D (Tajima 1989) vyplývá, že populace expanduje (pravděpodobně po předchozí události typu „efektu hrdla láhve“) a vznikají v ní s větší frekvencí nové haplotypy. Tento předpoklad je v souladu se zjištěnou relativně vysokou haplotypovou diverzitou. Z kladogramu (viz Příloha 1) je patrné, že i v rámci jednotlivých kolonií existují nepříbuzní jedinci; tento fakt odpovídá již dříve zjištěné velké sociální plasticitě rodu *Rhytidoponera*.

Součástí experimentální části mé práce bylo také otestovat dříve použité satelitní primery (Chapuisat et al. 2000) na druhu *R. strigosa*. Zjistil jsem, že všech devět navržených mikrosatelitních primerů je možné použít i pro tento druh a jsou tedy potenciální alternativou k mtDNA pro další populační studii druhu *R. strigosa*. Studie založená na kombinaci jaderných a mitochondriálních markerů by byla v budoucnosti vhodná, protože oba typy zmíněných markerů mají svoje výhody (mtDNA: velká vnitrodruhová variabilita, snadná izolace, existence univerzálních primerů; mikrosatelity: vysoký stupeň polymorfizmu, jednoduchá identifikace alel, možnost cross-amplifikace) ale i nevýhody (mtDNA: možná interference pseudogeny z jádra, výskyt mikrobiálních symbiontů, jen maternální dědičnost;

mikrosatelity: limitující délka sekvence, vysoký stupeň mutací) a jejich kombinací by se zvýšila vypovídací hodnota takové populační studie.

6 Závěr

V rešeršní části své bakalářské práce jsem krátce shrnul markery a metody, které slouží ke studiu příbuznosti kolonií sociálního hmyzu; na závěr jsem uvedl v tabulce (Tab. 3) výhody a nevýhody jednotlivých markerů a metod.

V experimentální části jsem potvrdil, že mitochondriální DNA markery jsou vhodné pro mapování příbuznosti mezi koloniemi mravenců rodu *Rhytidoponera* a zjistil jsem, že dříve použité satelitní primery (Chapuisat et al. 2000) jsou vhodné i pro druh *Rhytidoponera strigosa*. Dále jsem odhalil příbuznost jedinců rodu *Rhytidoponera* v rámci jednotlivých kolonií a mezi koloniemi navzájem; zjistil jsem, že i v rámci kolonií existují nepříbuzní jedinci.

7 Seznam použité literatury

Apostol BL, Black WC 4th, Reiter P et al. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity* 76: 325–334.

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

Ayres CF, Melo-Santos MA, Sole-Cava AM et al. 2003. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. *Journal of Medical Entomology* 40: 430–435.

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

Ballinger-Crabtree ME, Black WC 4th, Miller BR. 1992. Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 47: 893–901.

Banuls AL, Jonquieres R, Guerrini F et al. 1999. Genetic analysis of leishmania parasites in Ecuador: are *Leishmania* (Viannia) *panamensis* and *Leishmania* (V.) *guyanensis* distinct taxa? *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61: 838–845.

Barton, N H. 2000. "Genetic hitchhiking". *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 355 (1403): 1553–1562.

Beckmann JS, Soller M. 1990. Toward a unified approach to genetic mapping of eukaryotes based on sequence tagged microsatellite sites. *Nature Biotechnology* 8: 930-932.

Behura SK, Nair S, Mohan M. 2001a. Polymorphisms flanking the *mariner* integration sites in the rice gall midge (*Orseolia oryzae* Wood-Mason) genome are biotype-specific. *Genome* 44: 947–954.

Behura SK, Sahu SC, Mohan M et al. 2001b. *Wolbachia* in the Asian rice gall midge, *Orseolia oryzae* (Wood-Mason): correlation between host mitotypes and infection status. *Insect Molecular Biology* 10: 163–171.

Behura SK, Valicente FH, Rider SD Jr et al. 2004. A physically anchored genetic map and linkage to avirulence reveals recombination suppression over the proximal region of Hessian fly chromosome A2. *Genetics* 167: 343–355.

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

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

Black, W. C., J. S. H. Klompen, and J. E. Keirans. 1997. Phylogenetic relationships among tick subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. *Molecular Phylogenetics And Evolution* 7: 129-144.

Bonaldo MF, Lennon G, Soares MB. 1996. Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Research* 6: 791–806.

Cato SA, Richardson TE. 1996. Inter- and intraspecific polymorphism at chloroplast SSR loci and the inheritance of plastids in *Pinus radiata* D. Don. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 587-592.

Cervera MT, Cabezas JA, Simon B et al. 2000. Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. *Bulletin of Entomological Research* 90: 391–396.

Condit R, Hubbell SP. 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome* 34: 66-71.

Crampton, A., I. McKay, and S. C. Barker. 1996. Phylogeny of ticks (Ixodida) inferred from nuclear ribosomal DNA. *International Journal For Parasitology* 26: 511-517.

Cruickshank, R. H., and R. H. Thomas. 1999. Evolution of haplodiploidy in dermanyssine mites (Acari: Mesostigmata). *Evolution* 53:1796-1803.

Czerneková, V., Kott, T., Dudková, G., Sztankóová, Z. 2004. Studium genetického polymorfizmu mléčných bílkovin skotu. Poster, Odborný seminář Mléko a Sýry 2004, Ústav technologie mléka a tuků VŠCHT Praha, Českomoravský svaz mlékárenský.

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

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

Excoffier, L. and H.E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Favia G, Dimopoulos G, Louis C. 1994. Analysis of the *Anopheles gambiae* genome using RAPD markers. *Insect Molecular Biology* 3: 149–157.

Folmer et al. 1994. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3 (5): 294-299.

Guimond N, Bideshi DK, Pinkerton AC et al. 2003. Patterns of *Hermes* transposition in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Genetics and Genomics* 268: 779–790.

Gur-Arie R, Cohen CJ, Eitan Y, Shelef L, Hallerman EM, Kashi Y. 2000. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Genome Research* 10: 62-71.

Gyllensten U, Wharton D, Josefsson A, Wilson AC. 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature* 352: 255-257.

Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA(RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55–63.

Hale LR, Singh RS. 1991. A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. IV. Mitochondrial DNA variation and the role of history vs. selection in the genetic structure of geographic populations. *Genetics* 129: 103–117.

Hillis, D. M., and M. T. Dixon. 1991. Ribosomal Dna - Molecular Evolution And Phylogenetic Inference. *Quarterly Review Of Biology* 66: 411-453.

Hillis, D. M., C. Moritz, and B. K. Mable. 1996. *Molecular systematics*, second edition. Sinauer.

Hoelzel AR, Lopez JV, Dover GA, O'Brien SJ. 1994. Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequence in the mitochondrial DNA control region of carnivores. *Journal of Molecular Evolution* 39: 191-199.

Hughes CR, Queller DC. 1993. Detection of highly polymorphic microsatellite loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molecular Ecology* 2: 131-137.

Hung, Y. T., Chen, C.A., Wu, W.J., Lin, C.C., Shih, C.J. 2004. Phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 in *Strumigenys* spp. (Hymenoptera: Formicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 407-415.

Chapuisat, M., J. Painter, and R. Crozier. 2000. Microsatellite markers for *Rhytidoponera metallica* and other ponerine ants. *Molecular Ecology* 9(12): 2218-2220.

Chatterjee SN, Mohandas TP. 2003. Identification of ISSR markers associated with productivity traits in silkworm, *Bombyx mori* L. *Genome* 46: 438–447.

- Chatterjee SN, Tanushree T. (2004). Molecular profiling of silkworm biodiversity in India. *Genetika* 40: 1618–1627.
- Chung AM, Staub JE, Chen JF. 2006. Molecular phylogeny of *Cucumis* species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation. *Genome* 49: 219-229.
- Jarne P, Lagoda PJJ. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.
- Jeyaprakash A, Hoy MA. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: *wsp* sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Molecular Biology* 9: 393–405.
- Kondo R, Satta Y, Matsuura ET et al. 1990. Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Genetics* 126: 657-663.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Llewellyn KS, Loxdale HD, Harrington R et al. 2003. Migration and genetic structure of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climate and clonal fluctuation as revealed using microsatellites. *Molecular Ecology* 12: 21–34.
- Love JM, Knight AM, McAleer MA, Todd JA. 1990. Towards construction of a high resolution map of mouse genome using PCR-analyzed microsatellites. *Nucleic Acids Research* 18: 4123-4130.
- 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: 655-63.
- Luque C, Legal L, Staudter H et al. 2002. ISSR (inter simple sequence repeats) as genetic markers in *noctuids* (Lepidoptera). *Hereditas* 136: 251–253.

Margonari CS, Fortes-Dias CL, Dias ES. 2004. Genetic variability in geographical populations of *Lutzomyia whitmani* elucidated by RAPD-PCR. *Journal of Medical Entomology* 41: 187–192.

Mendelson TC, Shaw KL. 2005. Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity. *Methods in Enzymology* 395: 161–177.

Mindell, D. P., and R. L. Honeycutt. 1990. Ribosomal-Rna In Vertebrates - Evolution And Phylogenetic Applications. *Annual Review Of Ecology And Systematics* 21: 541-566.

Moore SS, Sargeant LL, King TJ, Mattick JS, Georges M, Hetzel DJ. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10: 654-660.

Nagaraj SH, Gasser RB, Ranganathan S. 2007. "A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis". *Briefings in Bioinformatics* 8 (1): 6–21.

Narum SR, Banks M, Beacham TD et al. 2008. Differentiating salmon populations at broad and fine geographical scales with microsatellites and single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology* 17: 3464–3477.

Prasad MD, Muthulakshmi M, Madhu M et al. 2005. Survey and analysis of microsatellites in the silkworm, *Bombyx mori*: frequency, distribution, mutations, marker potential and their conservation in heterologous species. *Genetics* 169: 197–214.

Racek, J. et al. 1999. *Klinická biochemie*. Praha: Galén, 317 pp.

Rajendrakumar P, Biswal AK, Balachandran SM, Srinivasarao K, Sundaram RM. 2007. Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions. *Bioinformatics* 23: 1-4.

Raven, Peter H. and Johnson, George B. 1999. *Biology*. Washington: WCB/McGraw-Hill Publishing, 1310 pp.

Rigaud T, Bouchon D, Souty-Grosset C et al. 1999. Mitochondrial DNA polymorphism, sex ratio distorters and population genetics in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* 152: 1669–1677.

Richard, M., and R. S. Thorpe. 2001. Can microsatellites be used to infer phylogenies? Evidence from population affinities of the Western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*). *Molecular Phylogenetics And Evolution* 20: 351-360.

Robertson HM. 1993. The *mariner* transposable element is widespread in insects. *Nature* 362: 241–245.

Salvato P, Battisti A, Concato S et al. 2002. Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa* - *wilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* 11: 2435–2444.

Shattuck, S. O. 1999. Australian ants. Their biology and identification. Collingwood, Victoria: CSIRO Publishing, 226 pp.

Schlotterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.

Schwartz, M. and J. Vissing. 2002. Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *New England Journal of Medicine* 347(8): p. 576.

Skibinski DOF, Gallagher C, Beynon CM. 1994. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature* 368: 817-818.

Soranzo N, Provan J, Powell W. 1999. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42: 158-161.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

- Takami Y, Koshio C, Ishii M et al. 2004. Genetic diversity and structure of urban populations of *Pieris* butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. *Molecular Ecology* 13: 245–258.
- Tay, W. T. and Crozier, R. H. 2000. Microsatellite analysis of gamergate relatedness of the queenless ponerine ant *Rhytidoponera* sp. 12. *Insectes Sociaux* 47: 188-192.
- Thomas, M. L. 2002. Nest site selection and longevity in the ponerine ant *Rhytidoponera metallica* (Hymenoptera, Formicidae). *Insectes Sociaux* 49: 147-152.
- Turelli M, Hoffmann AA, McKechnie SW. 1992. Dynamics of cytoplasmic incompatibility and mtDNA variation in natural *Drosophila simulans* populations. *Genetics* 132: 713–723.
- van Oppen MJ, Rico C, Turner GF, Hewitt GM. 2000. Extensive homoplasy, nonstepwise mutations, and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in Lake Malawi cichlids. *Molecular Biology and Evolution* 17: 489-498.
- Vaughan V, Lloyd AM. 2003. An analysis of microsatellite loci in *Arabidopsis thaliana*: mutational dynamics and application. *Genetics* 165: 1475-1488.
- Ward, P. S. 2007. Phylogeny, classification, and species-level taxonomy of ants (Hymenoptera: Formicidae). *Zootaxa* 1668: 549–563.
- Ward, P. S., and D. A. Downie. 2004. The ant subfamily Pseudomyrmecinae (Hymenoptera: Formicidae): phylogeny and evolution of big-eyed arboreal ants. *Systematic Entomology* 30: 310-335.
- Wilkerson RC, Parsons TJ, Albright DG et al. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Diptera: Culicidae: Anopheles). *Insect Molecular Biology* 1: 205–211.
- Willing, E., Bentzen, P., van Oosterhout, C., Hoffmann, M., Cable, J., Breden, F., Weigel, D. and Dreyer, C. 2010. Genome wide single nucleotide polymorphisms reveal population history and adaptive divergence in wild guppies. *Molecular Ecology* 19: 968-984.

Wong A, Forbes MR, Smith ML. 2000. Characterization of AFLP markers in damselflies: prevalence of codominant markers and implications for population genetic applications. *Genome* 44: 677–684.

Yoon CK, Aquadro CF. 1994. Mitochondrial DNA variation among the *Drosophila athabasca* semispecies and *Drosophila affinis*. *Journal of Heredity* 85: 421–426.

8 Příloha

Příloha 1: soubor *tree.jpg* na přiloženém CD