Masarykova univerzita
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Oddělení fyziologie a imunologie živočichů

Vliv hybridizace na spermatogenezi a poměr pohlaví u myši domácí

The effect of hybridization on spermatogenesis and sex ratio in the house mouse

Diplomová práce

Brno 2011

Autor: Bc. Gabriela Pražanová
Vedoucí DP: Prof. RNDr. Miloš Macholán, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně na základě pokynů a rad vedoucího diplomové práce, a že veškeré použité zdroje jsou v ní řádně citovány.

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Miloši Macholánovi, CSc., za jeho obětavou pomoc a čas, který mi věnoval při řešení zadané problematiky.

Dále chci poděkovat svému nadřízenému, doc. MVDr. Pavlu Suchému, Ph.D. za to, že mi umožnil studovat při zaměstnání, a všem kolegům, především pak RNDr. Ladislavě Bartošové, Ph.D., za jejich velikou podporu.

V neposlední řadě pak kolegům z Oddělení populační biologie Ústavu biologie obratlovců AV ČR ve Studenci za poskytnutí vzorků, potřebných k mé práci.

Práce vznikla na základě finanční podpory grantů GAČR 206/08/0640 a Ministerio de Ciencia, Tecnologia e Ensino Superior PTDC/BIA-BEC/103440/2008 (Portugalsko)

Obsah:

1. Teoretická část ... 7
1.1. Speciace ... 7
1.2. Reprodukční bariéry ... 7
1.2.1. Inkompatibilita na úrovni chromozomů – chromozomová speciace ... 8
1.2.2. Inkompatibilita na úrovni genů ... 9
1.3. Hybridní zóny ... 10
1.3.1. Taxonomie myší ... 14
1.3.2. Zóna kontaktu dvou taxonů domácích myší komplexu *Mus musculus* a její struktura ... 15
1.3.3. Studium postzygotických bariér v hybridní zóně komplexu *Mus musculus* ... 16
1.3.4. Introgrese chromozomu Y ... 18
1.4. Reprodukce ... 19
1.4.1. Gametogeneze ... 20
1.4.2. Proces spermatogeneze myších samců ... 20
1.4.3. Poruchy spermatogeneze hybridních samců na buněčné úrovni ... 21
1.5. Cíle práce ... 24
2. Materiál a metody ... 25
2.1. Odběr vzorků ... 25
2.2. Použité chemikálie ... 25
2.3. Použité metody ... 26
2.3.1. Histologické zpracování tkáně ... 26
2.3.2. FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace ... 26
2.3.3. Hodnocení ... 28
2.3.3.1. Histologické hodnocení ... 28
2.3.3.2. Hodnocení poměru pohlaví u spermií (FISH) ... 30
3. Výsledky ... 31
3.1. Histologická analýza varlat hybridních samců ... 31
3.2. Stanovení poměru pohlaví u vzorků spermií ... 34
4. Diskuze ... 37
4.1. Narušení spermatogeneze hybridů ... 38
4.2. Poměr pohlaví ve spermiích ... 40
4.3. Výzkum speciace z pohledu diplomové práce ... 41
5. Závěr – shrnutí výsledků ... 43
6. Seznam použitých zkratek ... 44
7. Seznam použité literatury ... 45

Abstrakt

Výsledky genetických, behaviorálních aj. studií ukazují na působení přírodního výběru proti hybridům mezi dvěma poddruhy domácích myší (*Mus musculus musculus* a *M. m. domesticus*) v Evropě. Podstata snížení reprodukční zdatnosti (fitness) hybridních jedinců však není dosud spolehlivě objasněna, naopak se zdá, že se jedná o složitý fenomén, navíc se silnými lokálními odlišnostmi. Jedním z unikátních jevů středoevropské části myší hybridní zóny je masivní introgrese chromozomu Y *M. m. musculus* do areálu *M. m. domesticus*. Tento jev je spojen s vychýlením poměru pohlaví, a tudíž pravděpodobně souvisí s genetickým konfliktem mezi pohlavními chromozomy. Tato práce se zabývá histologickou analýzou parenchymu varlat a vyšetřením preparátů spermií z *epididymis* samců myší odchycených podél česko-bavorského transektu napříč hybridní zónou. Přestože u hybridních jedinců bylo zjištěno mírné snížení počtu spermatid, naznačující narušení spermatogeneze, tento rozdíl není statisticky průkazný a neznamená pravděpodobně výrazné snížení reprodukční zdatnosti samotných hybridních jedinců. Tento výsledek je v souladu s genetickými studiemi naznačujícími absenci genů pro sterilitu v této části myší hybridní zóny, nicméně může hrát významnou roli z hlediska potenciální kompetice spermií, související s vícečetnou paternitou. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) ukázala, že poměr pohlaví u myších spermií se neodchyluje od očekávané hodnoty 1:1 po celém studovaném území včetně populací *M. m. domesticus* s introgresovaným chromozomem Y *M. m. musculus*. K odchylkám v poměru pohlaví tak pravděpodobně dochází v pozdějších fázích vývoje.

Klíčová slova: hybridní zóna, genová inkompatibilita, genový konflikt, myš domácí, poměr pohlaví, speciace, spermatogeneze

Abstract

Results of the genetic, behavioral and other studies suggest natural selection acts against hybrids between two house mouse subspecies (*Mus musculus musculus* and *M. m. domesticus*) in Europe. However, the nature of decreasing fitness of hybrid individuals has not yet been reliably explained; conversely, it seems to be a complex phenomenon, with strong local differences. One of the unique features of the Central European part of the mouse hybrid zone is massive introgression of the Y chromosome of *M. m. musculus* into *M. m. domesticus* territory. This phenomenon is associated with perturbation of the census sex ratio (SR) and hence it is likely to be related to the genetic conflict between sex chromosomes over SR. This thesis is focused on analysis of the ratio between primary spermatocytes and round spermatids in testicular parenchyma and SR in sperm using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in male mice collected along the Czech-Bavarian transect across the hybrid zone. Although a moderate decrease in spermatid count was revealed in hybrid individuals, suggesting slight spermatogenesis impairment, this difference was statistically non-significant and probably does not cause considerable reduction of fitness of hybrid individuals *per se*. This result is consistent with genetic studies suggesting absence of sterility genes in this part of the mouse hybrid zone, however, it can play an important role in potential sperm competition related to multiple paternity. FISH revealed no deviation in SR of sperm from the expected 1:1 ratio across the whole study area including the populations of *M. m. domesticus* with introgressed *M. m. musculus* Y chromosome. It is concluded that the census sex ratio perturbations are likely to appear in later developmental stages.

Key words: hybrid zone, gene conflict, genetic incompatibility, house mouse, sex ration, speciation, spermatogenesis

1. Teoretická část

1.1. Speciace

Z hlediska biologického pojetí druhu je speciace procesem, v jehož průběhu vzniká z původního druhu jeden či více druhů nových. Avšak pouze u pohlavně se rozmnožujících organismů speciace vyžaduje i vytvoření reprodukčních bariér mezi starým a nově vznikajícím druhem (Coyne a Orr 2004). Patrně nejrozšířenější koncepcí biologického druhu je Mayrova definice (Mayr 1942, 1963). Podle ní je druh definován jako skupina přírodních, vzájemně se křížících populací, reprodukčně izolovaných od ostatních takových skupin. Podle striktního pojetí definice to znamená, že jakmile se jedinci dvou odlišných forem mohou spolu plodně rozmnožovat, je třeba je považovat za příslušníky stejného druhu, a to i v případě, že se budou navzájem fenotypově lišit a že se mezi sebou v přírodě nerozmnožují (například protože se jejich areály rozšíření nestýkají). Je však známo, že v některých skupinách organismů (především u rostlin) může docházet k hybridizaci i mezi fylogeneticky vzdálenými druhy. Navíc s přibývajícími daty o sekvencích DNA u volně se vyskytujících organismů je zřejmé, že mezidruhové křížení je poměrně častým jevem i mezi živočichy. Proto se obvykle existence omezené hybridizace připouští i u biologických druhů.

U pohlavně se rozmnožujících druhů lze rozlišit dva základní typy speciace: sympatrickou a alopatrickou. Zatímco v případě sympatrické speciace vznikají druhy bez předchozí geografické izolace, pro speciaci alopatrickou je nezbytná geografická izolace populací. Jestliže je původní populace rozdělena geografickou bariérou, budou se mezi oběma dceřinými populacemi postupně hromadit genetické rozdíly, které mohou časem způsobit reprodukční izolaci mezi nimi (Mayr 1963, Coyne a Orr 1989, 2004). Tento způsob speciace je patrně nejčastější a z evolučního hlediska nejvýznamnější.

1.2. Reprodukční bariéry

Bariéry umožňující reprodukční oddělení dvou populací lze rozdělit na geografické a biologické. Geografické reprodukční bariéry existují v prostředí nezávisle na existenci a biologických vlastnostech organismů (pohoří, vodní tok atd.). Naproti tomu biologické bariéry jsou přímo či nepřímo určeny genotypem organismů a vznikají nebo zanikají v důsledku genetických procesů (Mayr 1970, Coyne a Orr 2004). Z hlediska stadia, ve kterém působí, můžeme reprodukční bariéry členit na prezygotické a postzygotické. Jak název napovídá,

prezygotické bariéry působí před vznikem zygoty. Mohou se na nich podílet jak vnější faktory (např. geografická izolace), tak faktory vnitřní. Ty zahrnují bariéry ekologické (např. dva druhy obývají v rámci společného areálu jiné biotopy nebo v rámci stejného biotopu cizopasí na jiných hostitelských rostlinách), sezónní (např. dva druhy ve stejném prostředí se rozmnožují během odlišných časových úseků), etologické (tj. mechanismy založené na geneticky podmíněných rozdílech v chování jedinců obou diferencujících se druhů), morfologické (založené na neslučitelnosti struktur reprodukčního systému) a konečně gametická inkompatibilita, tedy neschopnost splynutí pohlavních buněk (např. v důsledku neslučitelnosti povrchových proteinů gamet), která se uplatňuje zejména u druhů, které své gamety uvolňují do volného prostředí. Ekologické a sezónní izolace je možné řadit jak k vnějším, tak i k vnitřním faktorům.

U postzygotických bariér sice zygota vzniká, v pozdějších stadiích však dochází ke snížení životaschopnosti nebo fertility hybridů buď v první filiální generaci, nebo v generacích následujících. Sterilita hybridů, případně jejich potomstva, je v přírodě mnohem častější než jejich neživotaschopnost. Mezi známé příčiny patří poruchy při segregaci chromozomů v průběhu meiózy (Johnson a Kliman 2002, Coyne a Orr 2004), genová inkompatibilita (Coyne & Orr, 1998) nebo polyploidie. Polyploidizační speciace je však z hlediska savců podružná, takže v této práci nebude dále diskutována.

1.2.1. Inkompatibilita na úrovni chromozomů – chromozomová speciace

Při chromozomové speciaci dochází vlivem chromozomových mutací k vytvoření karyotypu, který je zcela nebo částečně inkompatibilní s karyotypem původním. Důsledkem jsou poruchy při meióze a vznik aneuploidních buněk, vedoucí k částečné, nebo úplné sterilitě hybridů. Podle Whitea (1978) je až 98 % speciací provázeno změnami karyotypu. Mnoho biologů proto tvrdí, že chromozomové mutace mají při speciaci zásadní význam (viz např. King 1993). Nicméně s rozvojem molekulárně-genetických metod se ukazuje, že postzygotické bariéry vznikají především v důsledku inkompatibility mezi geny a význam chromozomových přestaveb je spíše druhotný (Perez, 1993; Coyne & Orr, 1998, 2004).

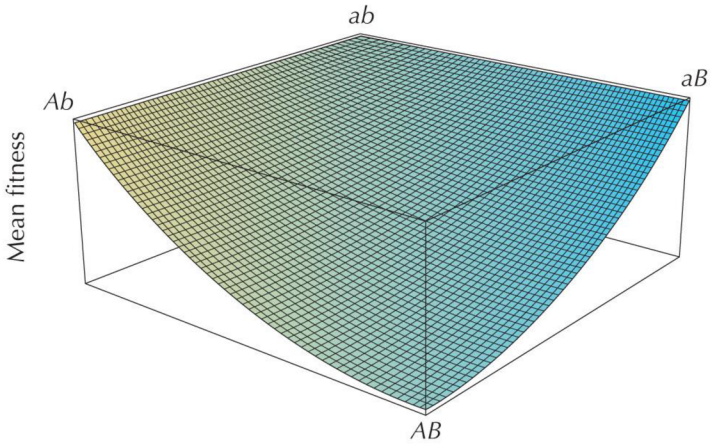
Významným typem chromozomové mutace je Robertsonova translokace (Robertson 1916). Robertsonova translokace je považována za jednu z nejčastějších mutací s frekvencí výskytu zhruba jednou na každých 1000 meióz (Redi a Capanna 1988, King 1993). Robertsonovou translokací rozumíme chromozomovou přestavbu, při níž dochází k fúzi dvou jednoramenných chromozomů za vzniku jednoho dvouramenného chromozomu a tím ke

snížení celkového počtu elementů v karyotypu. Jestliže mezi dvěma nebo více robertsonskými metacentriky existují tzv. monobrachiální homologie (tj. stav, kdy dva páry dvouramenných chromozomů sdílí jedno totožné rameno), bude během meiózy docházet ke vzniku více či méně dlouhých multivalentů (řetězců nebo kruhů) znemožňujících správnou disjunkci homologních elementů. Důsledkem této nondisjunkce jsou poruchy procesu spermatogeneze a sterilita heterozygotů (Redi a Capanna 1988, Hauffe 1993).

U domácích myší se Robertsonovy translokace omezují na myš západoevropskou (*Mus musculus domesticus*), kdežto u její příbuzné *M. m. musculus* se prakticky nevyskytují (Zima a Macholán 1989; Zima *et al.* 1990). U prvně jmenovaného taxonu bylo popsáno 97 oddělených populací charakterizovaných různým počtem a kombinací dvouramenných chromozomů (pozn.: normální karyotyp myši domácí je tvořen 20 páry akrocentrických chromozomů (Levan *et al.* 1962)). Robertsonské populace *M. m. domesticus* byly nalezeny ve Skotsku, Dánsku, Francii, Belgii, Německu Švýcarsku, Itálii, Chorvatsku, Španělsku, Tunisku, Řecku, Turecku a na Madeiře (Piálek *et al.* 2005). Přestože tento typ chromozomových přestaveb může ovlivňovat i strukturu hybridní zóny mezi oběma myšími poddruhy (např. v Dánsku, Fel-Clair *et al.* 1996), ve střední Evropě, v oblasti východního Bavorska a západních Čech, se vyskytuje pouze jediná fúze (Rb4.12), a to v zanedbatelné frekvenci, takže narušení fertility myší v důsledku chromozomových přestaveb je v této oblasti nepravděpodobné.

1.2.2. Inkompatibilita na úrovni genů

Genovou inkompatibilitu dobře popisuje Dobzhanského-Mullerův model (obr. 1). Podle tohoto modelu vznikají postzygotické reprodukční bariéry interakcí dvou nebo více genů, jejichž vzájemná kombinace je v důsledku kumulace odlišných vícečetných substitucí neslučitelná. Tyto interakce způsobují sterilitu nebo neživotaschopnost hybridů a redukují tak jejich reprodukční zdatnost neboli fitness (Dobzhansky 1936, Muller 1940, 1942).



Obr. 1: **Dobzhanskeho–Mullerův model speciace**. U dvou rozdělených populací dochází k mutaci původních alel *a* (v jedné populaci) a *b* (v druhé populaci) a následné fixaci alel *A* a *B*. Nově vzniklý genotyp *Aabb* a *aaBB* je sice kompatibilní s genetickým pozadím, ze kterého pochází, a neovlivňuje tudíž fitness svých nositelů, nicméně tyto alely nemusí být kompatibilní mezi sebou. Po kontaktu takto divergovaných jedinců vznikne hybridní potomstvo *AaBb*, které má buď výrazně sníženou fitness, nebo je sterilní. Obrázek znázorňuje závislost průměrné fitness hybridní populace v závislosti na frekvenci genotypu *AABB*, který je eliminován přírodním výběrem (převzato z Barton *et al*., 2007).

Platnost Dobzhanského-Mullerova modelu potvrdily studie genů, které se významně podílejí na sterilitě či neživotaschopnosti hybridů (Ting *et al.*, 1998, Brideau *et al.*, 2006, Harrison & Burton, 2006). Většina poznatků popisujících vnitrodruhové rozdíly vlivem postzygotické izolace u živočichů vychází zejména z laboratorních křížení (Forejt a Iványi 1975, Perez a Wu 1995), nicméně stále více vědců zaměřuje svoji pozornost na výzkum možných inkompatibilit v přírodních populacích (Vyskočilová *et al*., 2005, 2009, Sweigart *et al.*, 2007).

Jedním z klíčových součástí genetiky speciace je Haldaneovo pravidlo, podle kterého jsou v hybridním potomstvu snížením fertility nebo životaschopnosti více postiženi zástupci heterogametického pohlaví (Haldane 1922). U savců a dalších skupin s určením pohlaví typu *Drosophila* jsou to tedy samci (XY), u ptáků, některých motýlů a dalších skupin s určením pohlaví typu *Abraxas* pak samice (ZW). Platnost Haldaneova pravidla byla opakovaně prokázána u mnoha taxonů (Coyne a Orr 2004) a lze jej považovat za jeden z typických projevů mezidruhové hybridizace, při kterém dochází k redukci toku genů mezi divergentními populacemi.

Vznik reprodukčních bariér je možné studovat pomocí umělého křížení různých druhů v laboratorním prostředí, při kterém jsou sledovány specifické změny fenotypu signalizující genovou nekompatibilitu. Patrně nejznámějším živočišným druhem využívaným v laboratořích

za účelem experimentální hybridizace jsou octomilky rodu *Drosophila*. Důvodem je zejména nenáročnost jejich chovu, krátká generační doba, značné množství potomků, snadná manipulace a především malý počet chromozomů a malý genom (asi 1/20 typického savčího genomu). Právě u těchto mušek byl objeven první a zřejmě i nejznámější speciační gen Odysseus-site homeobox (*OdsH*). Tento gen, objevený v genomu *D. mauritiana*, způsobuje u samců druhu *D. simulans* sterilitu (Perez a Wu 1995).

Nevýhodou umělého laboratorního křížení je především malý počet dostupných generací hybridů a omezená generalizace na reálné situace v přírodě. Navíc křížení dvou hotových druhů s sebou přináší problém odlišení inkompatibilit zodpovědných za vznik reprodukční bariéry od těch, které vznikly až v jejím důsledku. Druhou možností studia mezidruhové hybridizace nám nabízí příroda sama v podobě hybridních zón (Hewitt 1988, Harrison 1993, Arnold 1997). Nespornou výhodou přírodních hybridních zón je mnohem vyšší počet generací a tedy i rekombinací, které nám umožňují přesnější mapování oblastí genomu, souvisejících se vznikem reprodukčních bariér. Můžeme tak snadněji detekovat i velmi malé snížení reprodukční zdatnosti, které bychom v laboratorních možnostech vůbec nemuseli zaznamenat. Navíc všechny genotypy, které lze v oblasti hybridní zóny nalézt, jsou podrobeny sítu přírodního výběru.

1.3. Hybridní zóny

Hybridní zóna je definována jako oblast, ve které dochází ke křížení dvou geneticky odlišných taxonů a je tak produkována hybridní populace jedinců s kombinovaným genomem, která je alespoň částečně fertilní (Barton a Hewitt 1985, Harrison 1990).

Z geografického hlediska mohou mít dva různé taxony buď zcela oddělené areály (jsou alopatrické), nebo sdílet společnou hranici (jsou parapatrické). Místa, kde se areály rozšíření nově vznikajících druhů stýkají, aniž by došlo k přerušení kontaktu mezi nimi, a kde tudíž dochází k určitému stálému toku genů, se nazývají primární hybridní zóny. Naopak jestliže se druhotně setkají dva taxony, původně oddělené geografickou bariérou, v místě styku obou areálů může při neúplné reprodukční izolaci mezi nimi docházet k jejich křížení za vzniku hybridní zóny, která se v tomto případě označuje jako sekundární. Přestože je zpravidla obtížné rozlišit, ke kterému typu určitá hybridní zóna patří (Barton a Hewitt 1985), z teoretického hlediska lze primární zóny považovat za vzácnější, protože při významnějším toku genů bude vznik nového druhu méně pravděpodobný (Jiggins a Mallet 2000).

Hybridní zóny jsou považovány za jakési přírodní laboratoře, které nám umožňují studovat působení přírodních bariér na genovou výměnu a identifikovat geny, které jsou za tyto bariéry zodpovědné (Hewitt 1988, Harrison 1993). Poskytují nám tak experimentální materiál pro zkoumání podstaty rozdílů mezi vznikajícími druhy, mechanismů jejich vzniku a role, kterou při speciaci hrají náhodné genetické procesy a přírodní výběr. V podstatě nám tyto zóny umožňují sledovat skutečné, přirozeně probíhající evoluční procesy a změny.

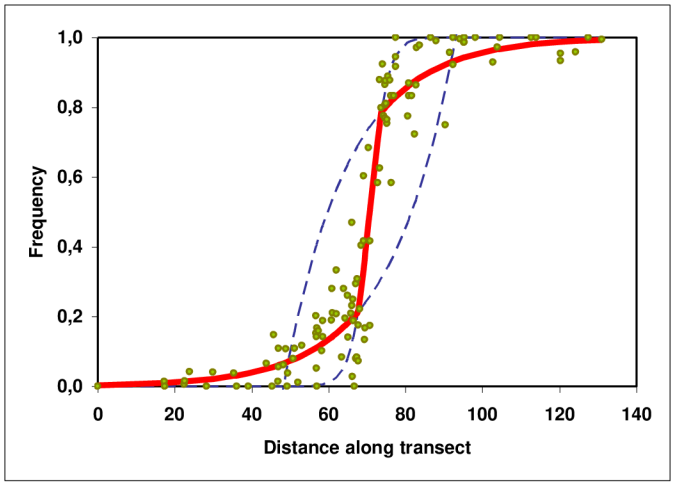
Hybridní zóny se mohou vyskytovat v místech ostrého přechodu dvou habitatů (zpravidla označovaných jako ekoton). V této oblasti mohou mít hybridi díky působení balancující selekce vyšší fitness než oba rodičovské taxony (omezená vyšší kvalita hybridů = bounded hybrid superiority), nebo jsou v areálu cizího taxonu selekcí znevýhodňovány alely adaptované na vlastní habitat. Zdá se však, že většina hybridních zón je udržována rovnováhou mezi disperzí jedinců a vnitřní selekcí proti alelám vyskytnuvším se na cizím genetickém pozadí (viz Dobzhanského-Mullerův model). Tento typ zóny se označuje jako tenzní (název odkazuje na skutečnost, že tenzní zóna minimalizuje svoji délku v důsledku diferenciální migrace mezi oblastmi o různé populační hustotě; Barton a Hewitt 1985, Barton a Gale 1993). Na rozdíl od předchozích případů není tato zóna závislá na konkrétním prostředí a bude se proto pohybovat, dokud se nezastaví v místě geografické bariéry nebo nejnižší populační hustoty („populační prohlubeň“, population trough).

Tenzní zóny jsou zpravidla poměrně úzké, někdy jen několik metrů široké, které se však mohou táhnout několik stovek až tisíc kilometrů (Barton a Hewitt 1985). Alely jednotlivých genů, charakteristické pro ten či onen taxon, pronikají přes hybridní zónu do areálu výskytu druhého taxonu nestejně hluboko (viz níže). Zóna je tedy pro každý gen jinak široká, tudíž nemá ostrou hranici. Hloubka, do níž konkrétní alela proniká, závisí na tom, do jaké míry je tato alela kompatibilní s alelami vyskytujícími se u sousedního taxonu, neboli do jaké míry v kombinaci s alelami genů cizího taxonu snižuje reprodukční zdatnost svého nositele. Alely některých lokusů mohou pronikat daleko za hybridní zónu, i když fitness hybridů je nízká. Průnik alel jednoho taxonu do areálu taxonu druhého se označuje jako introgrese.

Přechod jednotlivých genetických markerů přes zónu je charakterizován gradientem alelových frekvencí, tzv. klinou (obr. 2). Bezprostředně po sekundárním kontaktu se všechny kliny pro jednotlivé markery nacházejí na stejném místě (jsou tzv. koincidentní) a mají stejnou šířku (jsou tzv. konkordantní). S časem se kliny pro snadněji pronikající lokusy rozšiřují, konkordance se tedy postupně vytrácí (kliny však zpravidla zůstávají koincidentní). Podle tvaru a především šířky kliny můžeme odhadovat sílu selekce, která na daný lokus působí (Barton a

Hewitt 1985, Barton a Gale 1993). Platí, že čím je selekce silnější, tím je šířka kliny menší a naopak. To znamená, že pomocí sady molekulárních znaků, u kterých známe jejich pozici na chromozomu, můžeme sledovat změny frekvencí alel pro tyto znaky a podle šířky jednotlivých klin určit oblasti genomu, které nesou geny potenciálně zodpovědné za vznik reprodukční bariéry a tedy i za speciaci (Rieseberg *et al.* 19992, Payseur *et al.* 2004, 2005). Tohoto principu využili např. Rieseberg *et al.* (1999) při hledání reprodukčních bariér u mezidruhového křížení slunečnic *Helianthus petiolaris* a *H. annuus*. V genomu těchto druhů našli 26 oblastí s velmi nízkou introgresí, z nichž 16 bylo spojeno s pylovou sterilitou.

K proložení dat z hybridní zóny se zpravidla používá některý z klinálních modelů. Nejjednodušší model kliny je založen na hyperbolické tangenciální funkci, jehož výsledkem je hladká sigmoidní křivka. Tento model je dán pouze dvěma parametry, polohou a šířkou kliny. Sigmoidní model je poměrně robustní a lze ho použít pro řadu situací. Selekce však většinou působí na víc genů. Pro tenzní zónu jsou typické zvýšené asociace mezi geny (vazbová nerovnováha). Tato nerovnováha zpětně zvyšuje sílu selekce, která je tak silnější, než by byl součet selekcí působících na jednotlivé geny zvlášť. Tento efekt se projeví strmým přechodem v centrální oblasti hybridní zóny, kdežto v okrajových oblastech, kde je vazbová nerovnováha nízká, bude klina mnohem pozvolnější (Barton a Gale 1993). Pro tyto případy jsou proto vhodnější modely, které rozdělují klinu na tři části, centrální a dva okrajové. Centrální segment je proložen stejnou hyperbolickou tangenciální funkcí jako u sigmoidního modelu, kdežto obě okrajové části jsou charakterizovány exponenciální funkcí, která je u symetrického modelu (který je popsán šesti parametry) na obou stranách hybridní zóny stejná a u asymetrického modelu (osm parametrů) se liší. Pro prokládání klinálních modelů a odhad jednotlivých parametrů lze použít některý z volně dostupných statistických programů, jako je např. *Analyse* a *ClineFit* (Porter *et al.* 1997).



Obr. 2: **Klina** proložená na základě tzv. „stupňového“ (stepped) modelu. Skládá se ze tří částí. Střední segment je popsán jednoduchou sigmoidní křivkou, kdežto oba krajní úseky („introgresní chosty“) jsou exponenciální (originál M. Macholán).

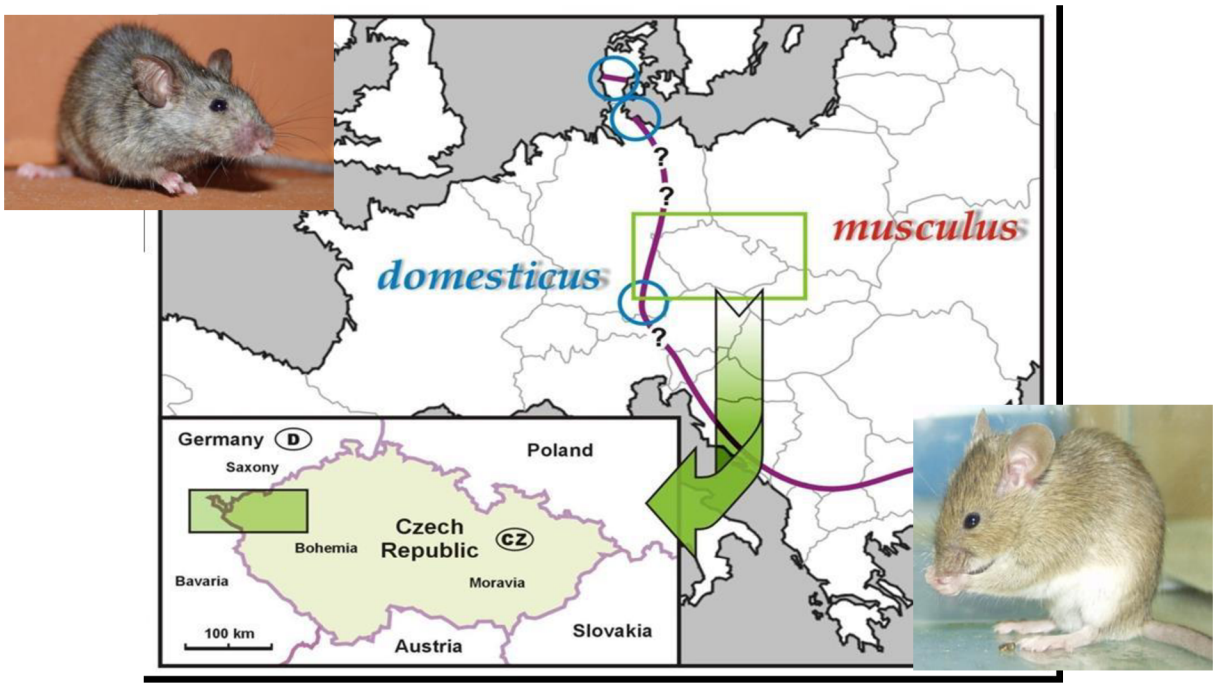
1.3.1 Taxonomie myší

Taxonomie myší byla až do 80. let minulého století poměrně nejasná. Teprve rozmach biochemických a později molekulárně-genetických metod znamenal novou etapu ve studiu systematických a fylogenetických vztahů mezi jednotlivými myšími taxony. V evropském kontextu je důležitá tzv. palearktický klad podrodu *Mus*, který můžeme s určitou nepřesností rozdělit do dvou ekologicky odlišných skupin.

Do první skupiny patří myši, které žijí nezávisle na člověku (tj. exoantropně): *Mus spretus*, *M. macedonicus*, *M. spicilegus* a nedávno popsaný druh *M. cypriacus* (Macholán et al. 2007b). Ve druhé skupině jsou taxony více či méně závislé na člověku (tj. synantropní), zpravidla považované za formy komenzální. Vzhledem k tomu, že nikdy nedošlo k úplné reprodukční izolaci těchto forem, panuje jistá neshoda, zda je považovat za samostatné druhy nebo subspecie jediného druhu *M. musculus* (Macholán 1996, Musser a Carleton 2005). K nejrozšířenějším formám patří *M. m. musculus*, *M. m. domesticus* a *M. m. castaneus*, které se zhruba před pěti sty tisíci lety oddělily od společného předka (Boursot *et al.* 1993, Geraldes *et al.* 2008). Některé poslední studie naznačují, že počet známých komenzálních forem myší nemusí být konečný (M. Macholán, osobní sdělení).

1.3.2. Zóna kontaktu dvou taxonů domácích myší komplexu *Mus musculus* a její struktura

Hybridní zóna mezi dvěma poddruhy domácích myší, západní *M. m. domesticus* a východní *M. m. musculus* (obr. 3), je jednou z nejlépe prozkoumaných hybridních zón. Probíhá Norskem, protíná Jutský poloostrov v Dánsku a od pobřeží Baltského moře ve východním Holštýnsku míří přes střední Evropu a Balkán k moři Černému (Boursot et al. 1993, Macholán, in press). Jednou z výhod myši jakožto modelového organismu je znalost sekvence jejího genomu (Mouse Genome Consortium, 2002), navíc máme k dispozici stovky tisíc vhodných molekulárních znaků, které lze použít k různým typům genetických analýz (viz např. Copeland *et al*. 1993, Ditrich *et al*. 1996, Abe *et al.* 2004). Zpravidla není příliš obtížné získat dostatečné množství studijního materiálu a navíc myši lze snadno chovat a rozmnožovat v zajetí.



Obr. 3. **Hybridní zóna *Mus musculus musculus/M. m. domesticus* v Evropě** s vyznačenými oblastmi výzkumu (modré kroužky); v rámečku vlevo dole pozice transektu v západních Čechách a východním Bavorsku (originál M. Macholán).

Ačkoli se vzájemný kontakt neomezuje pouze na evropský kontinent, situace v jiných oblastech je zatím známa v mnohem menší míře. Výzkum probíhá už několik desetiletí v různých částech Evropy – v Dánsku (Hunt a Selander 1973, Ferris *et al*. 1982, Vanlerberghe *et al*. 1986, 1988, Dod *et al*. 1993, 2005, Fel-Clair *et al*. 1996, 1998, Britton-Davidian *et al*., 2005, Raufaste *et al*. 2005), v jižním Německu (Sage *et al*., 1986, Tucker *et al*. 1992, Payseur

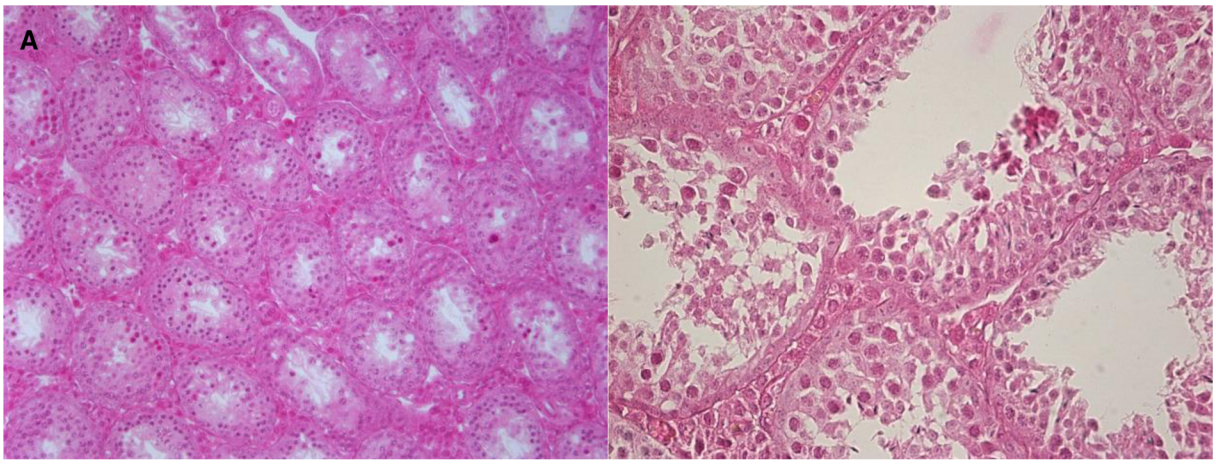
et al. 2004, 2005, Payseur a Nachman 2005), ve východním Holštýnsku na severu Německa (Prager *et al.* 1993, 1997), v Bulharsku (Boursot *et al.* 1984, Vanlerberghe *et al.* 1988) a v České republice (Macholán a Zima 1994, Munclinger *et al.* 2002, Bímová *et al.* 2005, Macholán *et al.* 2007a, 2008, Dufková *et al.* 2011). Přestože určení přesného stáří této zóny v různých částech kontinentu je poměrně spekulativní, není sporu o tom, že v jihovýchodní Evropě došlo ke vzájemnému kontaktu obou poddruhů mnohem dříve než v severních oblastech (Hunt a Selander 1973, Sage *et al.* 1993, Macholán *et al.* 2003, 2007a).

1.3.3. Studium postzygotických bariér v hybridní zóně komplexu *Mus musculus*

S rozvojem molekulárně-biologických metod došlo v posledních desetiletích ve studiu postzygotických bariér i celého výzkumu genetiky speciace k výraznému pokroku. Kromě výše zmíněného genu *OdsH* bylo do současné doby u octomilek i dalších organismů identifikováno více než 10 speciačních genů. Prvním popsaným speciačním genem, popsaným na savčím modelu, je gen *Hst1* (Hybrid sterility 1) (Forejt a Iványi 1975). Tento gen způsobuje při křížení laboratorních kmenů C57BL/6 (s převažujícím genomem *M. m. domesticus*) a PWD (odvozeného z volně žijící populace *M. m. musculus*) sterilitu u 43,4% hybridních samců. Histologicky tito samci vykazují naprostou zástavu spermatogeneze v pachytenní fázi primárních spermatocytů (obr. 4), nižší hmotnost varlat a nepřítomnost spermií v *epididymis*, přičemž hladina testosteronu v krvi je normální (Forejt a Iványi 1975, Forejt *et al.* 1991). *Hst1* byl lokalizován v proximální části chromozomu 17 a později identifikován jako gen *Prdm9* (PR- domain containing 9), kódující histon H3 lyzin4 metyl-transferázu (Mihola et al. 2009). Tento gen dokáže aktivovat specifické geny, potřebné k normálnímu průběhu meiózy (Hayashi a Matsui 2006), takže jeho knockoutováním dochází k zástavě spermatogeneze ve fázi primárních spermatocytů (Mihola *et al.* 2009).

Současné výzkumy naznačují, že na vzniku reprodukční bariéry mezi oběma laboratorními kmeny myší se podílí více genů, především gen *Hstx1* (Hybrid sterility, X chromosome 1) (Storchová *et al.* 2004). Tento poznatek je v souladu se závěry dalších laboratorních analýz (Good et al. 2008) a také studia myší hybridní zóny, které ukazují na význam genů vázaných na chromozom X při vzniku reprodukční izolace (Dod *et al.* 1993, Payseur *et al.* 2004, 2005, Macholán *et al.* 2008, 2011). Redukce introgrese chromozomu X byla kromě domácí myší zjištěna i u dalších organismů (Macholán *et al.* 2007a, Masly a Presgraves 2007, Presgraves 2010) v souladu s hypotézou velkého efektu chromozomu X (large X-effect; Coyne a Orr 2004).

Čtyřicet procent genů aktivních ve spermatogoniích se vyskytuje právě na chromozomu X, což pravděpodobně souvisí s tím, že geny na gonozomech mají většinou sexuálně antagonistické účinky (Chippindale *et al.* 2001). Vzhledem k tomu bude na chromozomu X zastoupeno více genů, které budou zvyšovat reprodukční zdatnost samic na úkor biologické zdatnosti samců. Avšak výhodné recesivní geny na chromozomu X se v samicích neprojevují, ale u samců s jednou kopií chromozomu X se mohou projevovat ihned. To znamená, že recesivní sexuálně antagonistické geny zvýhodňují samce a vyskytují se častěji na chromozomu X než na autozomech, což je v souladu s tzv. teorií dominance, která je jedním z navržených vysvětlení Haldaneova pravidla (Coyne a Orr 2004). Je prokázáno, že je nositelem genů, které se buď výlučně, nebo preferenčně exprimují v jednom pohlaví. To potvrzuje i skutečnost, že myší chromozom X obsahuje podstatně méně genů exprimovaných v meioticky se dělících spermatogenních buňkách a podstatně více genů exprimovaných v somatických buňkách varlete, spermatogenních buňkách před meiózou, vaječnících a placentě (Wang *et al.* 2001, Divina *et al.* 2005).



Obr. 4: **Zástava spermatogeneze v pachytenní fázi primárních spermatocytů (SPC)**. Na obrázku jsou semenotvorné kanálky, bez přítomnosti kulatých a elongovaných spermatid. Kanálky obsahují pouze SPC prvního řádu, spermatogonie a Sertoliho buňky. Zvětšeno: A – 100 x, B – 400 x. Barveno hematoxylinem-eozinem.

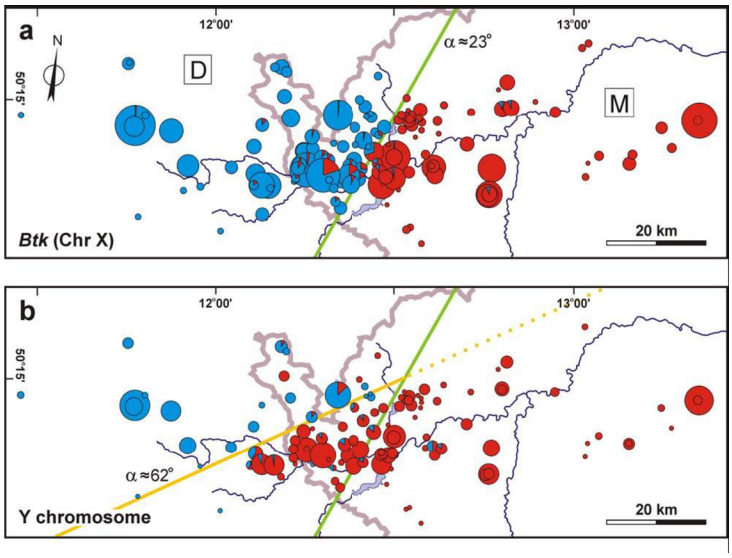
Přestože se dosavadní výzkum myší hybridní zóny soustředil především na molekulární znaky (Munclinger *et al.* 2002, Storchová *et al.* 2004, Bímová *et al.* 2005, Vyskočilová *et al.* 2005, Macholán *et al.* 2007a, 2008, 2011), histologické vyšetření parenchymu varlat samců může poskytnout cenné informace o potenciálním narušení spermatogeneze jakožto indikátoru snížení reprodukční zdatnosti hybridů. Součástí vyšetření je i morfologická analýza spermií, jejich počet, velikost a hmotnost varlat, i když hmotnost varlat nemusí být vždy signifikantním znakem. Britton-Davidian *et al.* (2005) ve své práci nezaznamenali sterilní fenotyp samců

z hybridní zóny, ačkoliv hmotnost varlat měla tendenci se v centru transektu snižovat. Kromě uvedených analýz je sledována celá řada dalších faktorů, které mohou potenciálně přispívat k divergenci a reprodukční izolaci mezi oběma poddruhy domácích myší. Bylo vyprodukováno několik konsomických kmenů (tj. inbredních kmenů obsahujících vždy jeden chromozom jiného inbredního kmene, zde kmene reprezentujícího druhý poddruh), jsou sledovány výsledky různých typů laboratorních křížení (množství párů produkujících potomstvo, velikost vrhu atd.), probíhají behaviorální studie s cílem odhadnout možnou roli prezygotických bariér, myši odchycené v hybridní zóně jsou podrobovány parazitologickým vyšetřením a testována hypotéza vyšší parazitace hybridů. Všechny tyto výzkumy nám mohou poskytnout komplexní informaci o povaze bariéry oddělující oba taxony i o dynamice jejich sekundárního kontaktu.

1.3.4. Introgrese chromozomu Y

Podobně jako u chromozomu X byla takřka nulová introgrese zjištěna i pro chromozom Y, a to v několika geograficky oddělených částech myší hybridní zóny (Vanlerberghe *et al.* 1986, Tucker *et al.* 1992, Dod *et al.* 2005). Tento poměrně konzistentní obraz je narušen neobvykle vysokou introgresí tohoto chromozomu v oblasti západních Čech a severovýchodního Bavorska. V této oblasti dochází k průniku Y poddruhu *M. m. musculus* do areálu *M. m. domesticus* až do vzdálenosti 22 km od středu hybridní zóny a celý introgresní areál zabírá plochu přesahující 330 km^2 (obr. 5). Linie styku obou taxonů pro většinu znaků (zelená čára na obr. 5) a pro chromozom Y (žlutá čára na obr. 5) tak na zkoumaném území vymezují tři oblasti: populace s genomem *M. m. musculus* (M) a *M. m. domesticus* (D) a oblast s chromozomem Y typu *musculus*, vyskytujícím se na genetickém pozadí *domesticus* (DyM). Současně byly v těchto oblastech zjištěny statisticky významné rozdíly v poměru pohlaví: zatímco v areálech M a D bylo prokázáno signifikantně vyšší procento samic, poměr pohlaví v areálu DyM se od obou předchozích statisticky průkazně lišil a současně se neodchyloval od poměru 1:1. Oba tyto jevy (výrazná introgrese a posun poměru pohlaví) byly interpretovány jako důsledek konfliktu mezi geny na pohlavních chromozomech (a pravděpodobně i na některých autozomech) (Macholán *et al.* 2008). Podle této hypotézy intragenomový konflikt a z něho plynoucí evoluční závod ve zbrojení (arms race) v alopatrických populacích vedl k tomu, že chromozom $Y^{musculus}$ se po sekundárním kontaktu mezi oběma taxony ocitnul na genetickém pozadí *domesticus*, které bylo selektováno v kontaktu s vlastním heterochromozomem, ale nikoli s cizím Y. V důsledku toho může $Y^{musculus}$ prolomit bariéru, která drží většinu ostatních genů v oblasti hybridní zóny a uniknout tak z kompetice s vlastním

X (Macholán et al. 2008). Otevřená však zůstává otázka, ve které fázi vývoje k posunu poměru pohlaví dochází (při vzniku spermií, během oplození, během vývoje zygoty, na populační úrovni).



Obr. 5: **Alelové frekvence v oblasti hybridní zóny.** Červeně jsou znázorněny frekvence alel *musculus* a modře *domesticus*; a) frekvence alel genu *Btk* (chr. X); b) frekvence genu *Zfy2* (chr. Y). Na obrázku je patrná introgrese chromozomu $Y^{musculus}$ do areálu *M. m. domesticus*. Poloha i orientace kliny pro *Btk* odpovídá ostatním studovaným markerům (zelená čára), kdežto klina pro chromozom Y (žlutá čára) je oproti ní otočena přibližně o 45° ve směru hodinových ručiček. Velikost kroužků odpovídá velikostem populačních vzorků (převzato z Macholán *et al.* 2008).

1.4. Reprodukce

Reprodukce je základní vlastností živých systémů. V souladu se zaměřením této práce se omezím pouze na problematiku pohlavního rozmnožování. Tento typ reprodukce je evolučně mladší než rozmnožování nepohlavní a u eukaryotických organismů výrazně převládá, přestože s sebou přináší řadu nevýhod a rizik.

Důsledkem vzniku pohlavního rozmnožování je rozlišení individuí stejného druhu na samce a samice. Primární příčinou vzniku pohlavnosti byla zřejmě tzv. morfologická anizogamie neboli morfologická diferenciace gamet na mikrogamety (spermie) a makrogamety (vajíčka). Produkce makrogamet je podstatně nákladnější něž produkce mikrogamet a proto je jich samice schopna během svého života vyprodukovat výrazně menší množství v porovnání s produkcí samčích spermií. Předpokládá se, že tvorba spermií je zřejmě obecně citlivější k poruchám než tvorba vajíček (Hunt a Hassold 2002). Proces vzniku vajíčka (oogeneze) často proběhne úspěšně až do konce, i když je samice zatížena genetickou poruchou nebo

abnormálními vnějšími podmínkami. V souladu s Haldaneovým pravidlem (viz výše) je proto plodnost samic savců na rozdíl od samců výrazně narušena zpravidla až při vyšší genetické nebo environmentální zátěži.

1.4.1. Gametogeneze

Vývojové procesy vedoucí ke vzniku jedince začínají vývojem pohlavních buněk – gametogenezí. Podstatou gametogeneze je transformace nediferencovaných pohlavních buněk (spermatogonií a oogonií) ve zralé pohlavní buňky – spermie a vajíčka. Důsledkem gametogeneze je redukce počtu chromozomů v průběhu meiotického dělení, takže každá zralá pohlavní buňka obsahuje oproti somatickým buňkám haploidní počet chromozomů. Splynutím gamet je pak opět dosaženo diploidního počtu chromozomů.

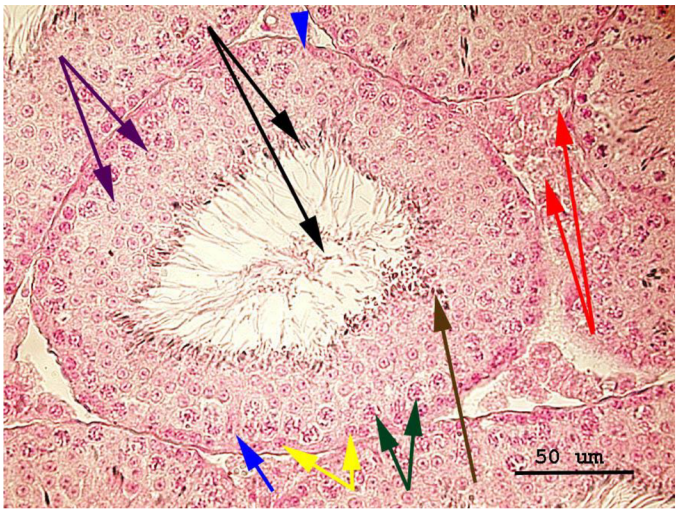
1.4.2. Proces spermatogeneze myších samců

Spermatogeneze je složitý a vysoce specializovaný proces, který můžeme rozdělit do tří základních fází: mitotické množení spermatogonií, meióza spermatocytů a transformace spermatid ve spermie. Mezibuněčnou spoluprací dochází v semenoplodném kanálku během každé této fáze ke změně počtu vyvíjejících se pohlavních buněk. Zárodečné buňky jsou podporovány a vyživovány řadou somatických Sertoliho buněk (Clermont 1972).

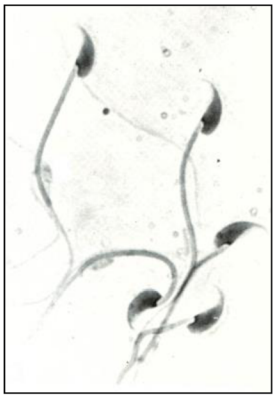
Základními buňkami celého procesu jsou spermatogonie. Jsou to zárodečné buňky, které zůstávají v semenoplodném kanálku jedince po celý život. Tyto buňky produkují potomstvo, které se dále vyvíjí. Studium spermatogonií je však problematické, neboť počet těchto buněk je velmi nízký, zhruba 2 až 3 buňky z každých 10 000 buněk myšího varlete (Meistrich a van Beek 1993, Tegelenbosch a de Rooij 1993). Období dělení spermatogonií je obecně označováno jako perioda množení a vzhledem k zásadnímu významu těchto buněk je předmětem zvýšeného zájmu vědců (Shinohara et al. 2000).

Po období množení následuje fáze růstu, kdy se potomstvo základních spermatogonií postupně vyvíjí ve spermatocyty I. řádu. Meiotickým dělením pak vznikají spermatocyty II. řádu, které se velmi rychle diferencují ve spermatidy. Nastává poslední fáze, kdy se spermatida transformuje ve zralou spermii. Tento proces se obecně označuje jako spermiohistogeneze nebo spermatelióza a podle dohodnuté klasifikace je rozčleněn do 12 stádií. Jednotlivá stádia se od sebe liší přítomností různých vývojových stupňů spermií. Každý stupeň je klasifikován

podle tvaru a uložení akrozomu (Oakberg 1971, LeBlond a Clermont 1952) (obr. 6). Tvar spermie se u různých druhů liší. Na obr. 7 je zachycen normální tvar myších spermií.



Obr. 6 : **Příčný řez varletem fertilního samce**. Leydigovy buňky (červené šipky) v intersticiálním prostoru, Sertoliho buňky (modré šipky), spermatogonie (žluté šipky), spermatocyty I. řádu (zelené šipky), spermatocyty II. řádu (fialové šipky), spermatidy (hnědá šipka), nezralé spermie (černé šipky). Barveno hematoxilinem-eozinem, zvětšeno 400x.



Obr. 7. **Zralé spermie myši** (originál Theiler 1972).

1.4.3. Poruchy spermatogeneze hybridních samců na buněčné úrovni

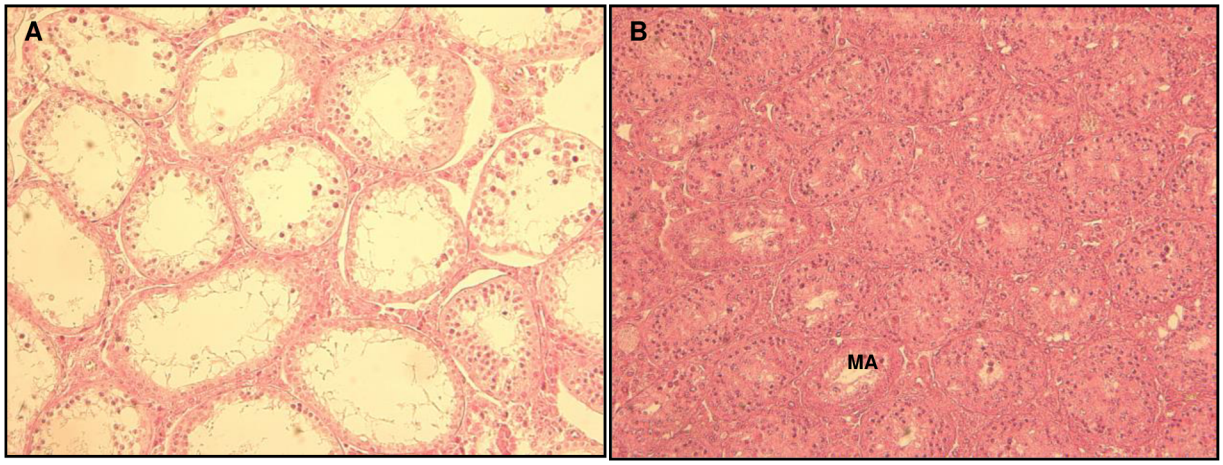
Histologické vyšetření parenchymu varlat přináší definitivní doklad o vlastním procesu, který byl příčinou poruchy plodnosti. Vyšetření je věnována velká pozornost neboť narušení spermatogeneze, jak již bylo uvedeno, může být významným indikátorem snížení reprodukční zdatnosti samčích hybridů. Je také nutno brát v potaz podmínky prostředí, ve kterém přírodní

hybridi žijí. Případné toxické látky, se kterými se zvířata mohou kontaktovat, mohou rovněž proces spermatogeneze ovlivnit. Například Garanga *et al.* (2005) zkoumali vliv herbicidu Bentazon, běžně používaného v severní Itálii, na myší spermatogenezi. Jasně prokázali genotoxický vliv herbicidu a poruchu vývoje germinálních buněk, projevující se částečnou nebo úplnou degenerací spermiogenetického epitelu, provázené morfologickými změnami jednotlivých buněk.

Morfologický obraz parenchymu varlat myších samců vykazujících úplnou sterilitu se dá označit za těžkou formu degenerace spermatogenetického epitelu. Nejčastější histologický obraz se z diagnostického hlediska definuje jako zástava zrání – stopfáze (viz obr. 4). Spermatogeneze je v tomto případě zastavena ve všech kanálcích stejnoměrně na tomtéž stupni vývoje. Tato zástava vývoje není definována u jednotného stádia, takže u každého případu může jít o jiný obraz stopfáze (Věžník *et al.* 2004). Například hybridi s prokázaným genem hybridní sterility (*Hst1*) vykazovali stopfázi v pachytenní fázi primárních spermatocytů (Forejt a Iványi 1975). Storchová (2004) dospěla k podobným závěrům u samců sterilních v důsledku přítomnosti genu *Hstx1*. Fertilní hybridi vykazovali značně sníženou meiotickou aktivitu a případné spermie byly z velké části defektní. Makroskopicky byla varlata v obou případech podstatně menší, než u kontrolních samců.

Finálním obrazem těžké degenerace spermatogenetického epitelu (obr. 8a) je jeho naprosté vymizení. V kanálcích se nacházejí pouze Sertoliho buňky. Obraz tohoto typu bývá vesměs fokální (postiženo jen několik kanálků, zpravidla v jediném úseku), velmi vzácně difúzní (postižena je většina nebo všechny kanálky). Bazální membrány odpovídají degenerativnímu procesu, jsou zvlněné a ztluštělé. Tento nález v hybridní zóně myši není tak častý, nicméně se s ním setkáváme.

Velmi častým nálezem (prakticky u všech hybridů, kteří jsou alespoň částečně fertilní) je obraz hypospermatogeneze. Hypospermatogeneze je charakteristická variabilním obrazem snížené mitotické aktivity zárodečného epitelu, mnohdy s výrazně rozdílným obrazem intenzity v jednotlivých částech parenchymu varlat (obr. 8b) (Hauffe 1993, Storchová et al. 2004).



Obr. 8: **Degenerativní změny při poruchách spermatogeneze:** a) obraz těžké degenerace spermatogenetického epitelu. Na obrázku jsou patrné atrofované kanálky s naprostým vymizením epitelu a kanálky ze zbytky disfunkčních SPC I. řádu; b) obraz hypospermatogeneze, charakterizovaný atrofií kanálků a sníženým množstvím SPD. Zachyceny jsou i kanálky s klasickým obrazem meiotického arestu (MA). Barveno hematoxylinem-eozinem, zvětšeno 200x (a) a 100x (b).

Jak již bylo řečeno, za nejčastější obraz poruchy spermatogeneze hybridních samců lze považovat hypospermatogenezi, která je často způsobená poruchami buněčného dělení v různých fázích buněčného cyklu. Studium příčin narušení buněčného cyklu je nyní v popředí zájmu vědců, snažících se objasnit komplexní genetický základ poruchy (např. Oka *et al.* 2010).

Nedílnou součástí je i vyšetření spermií, kde se hodnotí počet, morfologie, motilita a viabilita. Zdeformovaná spermie není schopna oplodnit vajíčko a je proto také považována za znak hybridní sterility nebo inviability hybridních samců (Storchová et al. 2004).

1.5. Cíle práce

Cílem této práce bylo prokázat vliv hybridizace na spermatogenezi a poměr pohlaví u myši domácí. Experimentální část byla rozdělena do dvou částí:

- První část byla zaměřena na histologické vyšetření parenchymu varlat hybridních samců

- Druhá část byla zaměřena na analýzu poměru pohlaví u spermií hybridních myší pomocí metody Fluorescenční hybridizace *in situ*

2. Materiál a metody

2.1. Odběr vzorků

Vzorky testes pro histologickou analýzu i vzorky spermií byly získány na základě odchytu divokých myší do živolovných pastí v oblasti 140 km dlouhého a 50 km širokého transektu napříč hybridní zónou v západních Čechách a severovýchodním Bavorsku (dále jen „česko-bavorský“ transekt). Myši pro histologickou analýzu byly odchyceny na 27 lokalitách: Benk, Bezvěrov, Buškovice, Dolní Dvory, Hebanz, Horní Slavkov, Hůrka, Jindřichov, Kaceřov, Kübelhof, Lehsten, Libá, Lužná, Milhostov, Mostov, Neuenreuth 8, Neuenreuth, Nová Ves, Obilná, Počerny, Rudolec, Straas, Thierstein, Týniště, Unterweissenbach, Weidesgrün a Žihle). Vzorky spermií pro analýzu poměru pohlaví byly získány z 55 lokalit: Hrzín, Pilmersreuth am Wald, Hiltershof, Friedsmannsdorf, Ottmansreuth, Kübelhof, Sandehreuth, Plössen, Eckartsreuth, Straas, Emtmannsberg, Wolfsbühl, Neuenreuth 8, Hohenberg, Lehsten, Birk, Dolní Pelhřimov, Mlýnská, Nový Kostel, Žihle, Rudolec, Poustka, Milhostov, Josefov, Krajková, Kopanina, Nová Ves, Střížov, Květná, Pastuchovice, Křižovatka, Chřášťany, Buškovice, Vrbička, Vrbice, Obilná, Nový Drahov, Lužná, Dolní Žantov, Nepomyšl, Kozlov, Kryry, Mostov, Starý Rybník, Odrava, Nebanice, Hůrka, Teleč, Týniště, Jindřichov, Chlum sv. Maří, Kaceřov, Dolní Dvory, Lipová, Libá.

Po odchytu byla zvířata usmrcena cervikální dislokací a byla jim odebrána levá testis a pravá *cauda epididymis*. Oba orgány byly zváženy a bezprostředně umístěny do příslušného média či fixačního roztoku. Terénního odchytu volně žijících myší jsem se přímo nezúčastnila a příslušné vzorky mi byly dodány prostřednictvím mého školitele.

2.2. Použité chemikálie

Roztok Bouin (Dr. Kulich Pharma), methanol p.a. (Dr. Kulich Pharma), kyselina octová p.a. (Dr. Kulich Pharma), ethanol p.a. (Dr. Kulich Pharma), xylen p.a. (Dr. Kulich Pharma), Histowax (Bamed), eosin yellowish water soluble (Dr. Kulich Pharma), haematoxylin for micro (Sigma), jodičnan sodný p.a. (Dr. Kulich Pharma), síran hlinito-draselný p.a. (Dr. Kulich Pharma), kyselina citronová bezvodá p.a. (Dr. Kulich Pharma), chloralhydrát p.a. (Dr. Kulich Pharma), Solakryl BMX (Dr. Kulich Pharma), chlorid sodný p.a. (Dr. Kulich Pharma), citronan sodný $2H_2O$ p.a. (Dr. Kulich Pharma), hydroxid sodný p.a. (Dr. Kulich Pharma), MD Mountant + DAPI (Cambio) a Poseidon^{TM} RAB9B (XqF1)/WC Y mouse probe (Intimex).

2.3. Použité metody

2.3.1. Histologické zpracování tkáně

Vzorky varlat byly fixovány roztokem Bouinu (formaldehyd s kyselinou pikrovou), odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou (80%, 85%, 90%, 95%, 98%), projasněny třemi lázněmi xylenu, prosyceny třemi lázněmi parafínu a posléze zality do parafínu (Histovax). Všechny expozice tkáně chemikáliím probíhaly v hodinových intervalech.

Parafínové bločky s tkání byly nakrájeny na sáňkovém mikrotomu Leica 2010 na řezy o tloušťce 4 μm. Řezy byly přichyceny na podložní sklo a usušeny v termostatu při 37 °C.
Takto zhotovené nativní preparáty byly obarveny základním histologickým barvením hematoxylinem – eosinem. Hematoxylin obarvil jádra buněk modrofialově, eosin dobarvil cytoplasmu červeně. Pro barvení byl zvolen 1% vodný roztok eosinu a roztok Mayerova hematoxylinu o složení:

Hematoxylin..... 1g
Jodičnan sodný..... 0,2 g
Síran hlinito-draselný..... 50 g
Kyselina citronová..... 1 g
Chloralhydrát..... 50 g
Destilovaná voda..... 1000 ml

Takto obarvené preparáty byly zamontovány do Solakrylu a hodnoceny pomocí světelného mikroskopu Olympus BX40 (viz níže).

2.3.2. FISH – fluorescenční *in situ* hybridizace

Cauda epididymis byla nejprve umístěna na 15 minut do 1 ml 1% roztoku citronanu sodného (Vyskočilová *et al.* 2005) a poté byly pomocí Pasteurovy pipety vyplaveny spermie do Petriho misky pro následnou analýzu jejich motility. Část tohoto vzorku byla nakapána na podložní sklo. Po zaschnutí byl preparát fixován Carnoyovou směsí (metanol : ledová kyselina octová v poměru 3 : 1) a skladován při +4 °C.

Fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH) je molekulárně cytogenetická metoda, založená na schopnosti vazby jednořetězcové DNA s komplementárními úseky cílové DNA, která je fixována na mikroskopickém preparátu. Jednořetězcovou DNA zde představují specifické hybridizační sondy, které v tomto případě mohou být značeny buď přímo

fluorochromem (v sondě jsou inkorporovány fluorescenčně označené nukleotidy) nebo nepřímo (inkorporované nukleotidy jsou značené haptenem, který se detekuje pomocí fluorescenčně značené protilátky). Pomocí fluorescenčního mikroskopu je pak detekován barevný signál použitého fluorochromu. Metodou FISH byly v nátěrech spermií rozlišeny spermie nesoucí chromozom X od spermií s chromozomem Y.

Použitá sonda:

K FISH byla použita sonda Poseidon™ RAB9B (XqF1)/WC Y mouse probe. Tato sonda obsahuje 200 kb dlouhou sekvenci nukleotidů, komplementární s RAB9B oblastí q raménka X chromozomu myši. Nukleotidy jsou přímo značeny fluoroforem Platinum*Bright*550, který po expozici UV zářením fluorescenčního mikroskopu excituje při vlnové délce 546 nm a emituje při vlnové délce 580 nm jako červený signál. Současně obsahuje sekvence nukleotidů komplementární k Y specifickým repeticím, charakteristických pro celý myší chromozom Y. Tato sekvence je přímo značena fluoroforem Platinum*Bright*495, který excituje po expozici UV zářením při vlnové délce 495 nm a emituje při vlnové délce 525 nm jako zelený signál.

Pracovní postup:

1. fáze: příprava preparátu
   - bezprostředně před barvením byla skla vyjmuta z lednice a na 2 minuty vložena do pufru 2xSSC, předem temperovaného na 37 °C (viz níže);
   - inkubací v 1N roztoku hydroxidu sodného po dobu 2 minut bylo zajištěno rozrušení buněčné stěny spermie (natrávení silnou zásadou);
   - zbytky hydroxidu byly vymyty pufrem 2xSSC;
   - následovala dehydratace vzestupnou alkoholovou řadou (70%, 85%, 95%, 98%), vždy po 2 minutách;
   - po vyjmutí z 98% alkoholu se preparát nechal uschnout při laboratorní teplotě.
2. fáze: denaturace
   - na připravený preparát byla nanesena sonda, přikryta krycím sklem a zalepena Rubber cementem;
   - následovala kodenaturace při 75 °C po dobu 8 minut.
3. fáze: hybridizace
   - preparát byl vložen do vlhké komůrky (zabráněno odpaření sondy) a po dobu 24 hodin inkubován v termostatu při 37 °C, současně bylo zamezeno průniku světla.

4 fáze: posthybridizační

- po 24 hodinách byl preparát vyjmut z termostatu a bylo odstraněno krycí sklo
- pufrem 2xSSC byly ze skla odstraněny zbytky sondy;
- inkubací ve vodní lázni v pufru 0,5xSSC při 72 °C po dobu 2 minut byla z preparátu odstraněna přebytečná (nenavázaná) sonda;
- pufrem 2xSSC při laboratorní teplotě po dobu 2 minut byla snížena teplota preparátu;
- následovala dehydratace vzestupnou alkoholovou řadou (70%, 85%, 95%, 98%), vždy po 2 minutách;
- po vyjmutí z 98% alkoholu se preparát nechal uschnout při laboratorní teplotě, za současného zamezení průniku světla;
- na suchý preparát bylo naneseno montovací médium s DAPI a ten nakonec překryt krycím sklem.

Bezprostředně po provedení byl preparát hodnocen pomocí fluorescenčního mikroskopu (viz níže).

Použitý pufr:

20xSSC (základní roztok)

Chlorid sodný ..... 87,6 g

Citronan sodný .....44,1 g

Destilovaná voda .....do 500 ml

Upravit pH na 7,4.

2.3.3. Hodnocení

2.3.3.1. Histologické hodnocení

Histologické vyšetření bylo provedeno u každého odebraného vzorku tkáně hybridního samce. Každý vzorek byl před kvantifikací germinálních buněk vyšetřen celkově (pod zvětšením 200x a 400x). U všech vzorků tak byly vyloučeny inflamatorní změny (zpravidla provázené cévními dilatacemi, kulatobuněčnými infiltracemi, fibrózou a pod) i změny toxikologické (pro expozici toxickým látkám jsou charakteristické morfologické změny buněk, provázené hydropií, steatózou až nekrózou. Poté při zvětšení 1000x (pod imerzí) bylo u fertilních samců vyšetřeno 3 x 5 semenoplodných kanálků v každém vzorku. Kanálky dosahovaly velikosti minimálně 50 μm. Byl mapován počet primárních spermatocytů (SPC) a počet okrouhlých spermatid (SPD) v semenných kanálcích, a to ve stádiích I., VI. a XI postupem, který popsala Hauffe (1993) ve své disertační práci a později použili Britton-Davidian *et al.*(2005).

Dvanáct stádií cyklu spermatogenetického epitelu bylo identifikováno podle Oakberga (1956) a Leblonta a Clermonta (1952) na základě tvaru akrozomu a jeho postupného dozrávání. Poměr spermatocytů k okrouhlým spermatidám udává celkový údaj o buněčné smrti vyskytující se mezi primárními spermatocyty a okolními stádii spermatid (SPC/SPD) ve varleti. Očekávaný poměr je u neporušené spermatogeneze 1 : 4. Procento mrtvých buněk pro každý kanálek bylo vypočítáno pomocí vzorce SSF = 100x(1-(SPD/4SPC)), kde SPD je počet spermatid a SPC počet spermatocytů I. řádu (Britton-Davidian *et al.* 2005). Získáme tak informaci o stupni snížení fertility hybridních samců.

Získané hodnoty SPC/SPD i SSF byly konfrontovány s několika parametry popisujícími stupeň hybridnosti vyšetřených myší. Tato vlastnost bývá zpravidla vyjádřena pomocí hybridního indexu (HI), který je v případě diagnostických znaků (tj. genů s fixovanými alternativními alelami pro hybridizující taxony) spočítán jako frekvence alel jednoho z taxonů (HI pro jednotlivá zvířata) nebo průměrná frekvence alel (HI pro celou populaci nebo hybridní třídu). V tomto případě jsem použila dva typy indexů. Především jsem měla možnost využít velký datový soubor založený na 1401 jednonukleotidovém rozdílu (single nucleotide polymorphisms, SNP) (Wang *et al.*, in press). Protože však tento index (HI_SNP) nemohl být vypočítán pro všechny histologicky vyšetřené jedince, byly hodnoty HI kalkulovány jako průměrný HI pro každou lokalitu. Druhý index byl založen na 24 markerech, 12 autozomálních (chromozom 1: *Idh1*; chr4: *4B2_141I14*, *H6pd*; chr7: *7B2-3720*, *7B2- 3746*, *7U2_318M16*, *Abpa27*; chr8: *Es1*; chr9: *Mpi*; chr14: *Np*; chr16: *Sod1*; chr17: *17-106*) (Vošlajerová Bímová *et al.* 2011) a 12 markerech na chromozomu X (*Fmr1*, *X65*, *Emd*, *X92*, *DXMit18.2*, *X323*, *Pou3f4*, *Btk*, *X125*, *X133*, *X149*, *Glra2*). Protože se všechny posledně jmenované markery nacházejí na chromozomu X, byly vybrány tak, aby jejich počet nepřesáhl počet autozomálních znaků, aby rekombinace mezi nimi byla dostatečná (tj. aby bylo možno je považovat za samostatné znaky) a aby jejich genotypy byly známy pro všechny vyšetřené jedince. Oba indexy byly počítány jako frekvence alel *M. m. musculus*, ve druhém případě pro každého jedince zvlášť. Na základě HI_SNP byly všechny lokality rozděleny do 3 kategorií: D = *domesticus* (HI_SNP = 0,00–0,39), H = hybridi (HI_SNP = 0,40–0,59), M = *musculus* (HI_SNP = 0,60–1,00). Rozdíly mezi průměrnými hodnotami SPC/SPD pro tyto tři kategorie byly hodnoceny pomocí analýzy variance (ANOVA) a pomocí Studentova t-testu s Bonferroniho korekcí, aby bylo zamezeno potenciální inflaci chyby I. typu (hladina významnosti je dělena počtem všech párových srovnání, tj. v tomto případě při běžné 5% hranici bude hladina významnosti α = 0,05/3 = 0,0167). Kromě obou hybridních indexů byl

stupeň hybridnosti zkoumaných myší vyjádřen jako průměrná očekávaná heterozygotnost, odhadnutá z 1401 SNP, pro jednotlivé lokality.

2.3.3.2. Hodnocení poměru pohlaví u spermií (FISH)

Detekce chromozomů X a Y pomocí FISH byla prováděna pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica BMLB, pod imerzí (zvětšení 1000x). Dle použitých fluoroforů byl zvolen trojpásmový fluorescenční filtr, detekující signál emitujícího fluoroforu v dané vlnové délce: 475 nm (Platinium *Bright* 415 – modrý signál, dobarvení DAPI), 525 nm (Platinum *Bright* 495 – zelený signál, chromozom Y, fluorofor FITC) a 580 nm (Platinum *Bright* 550 – červený signál, chromozom X, Texas Red).

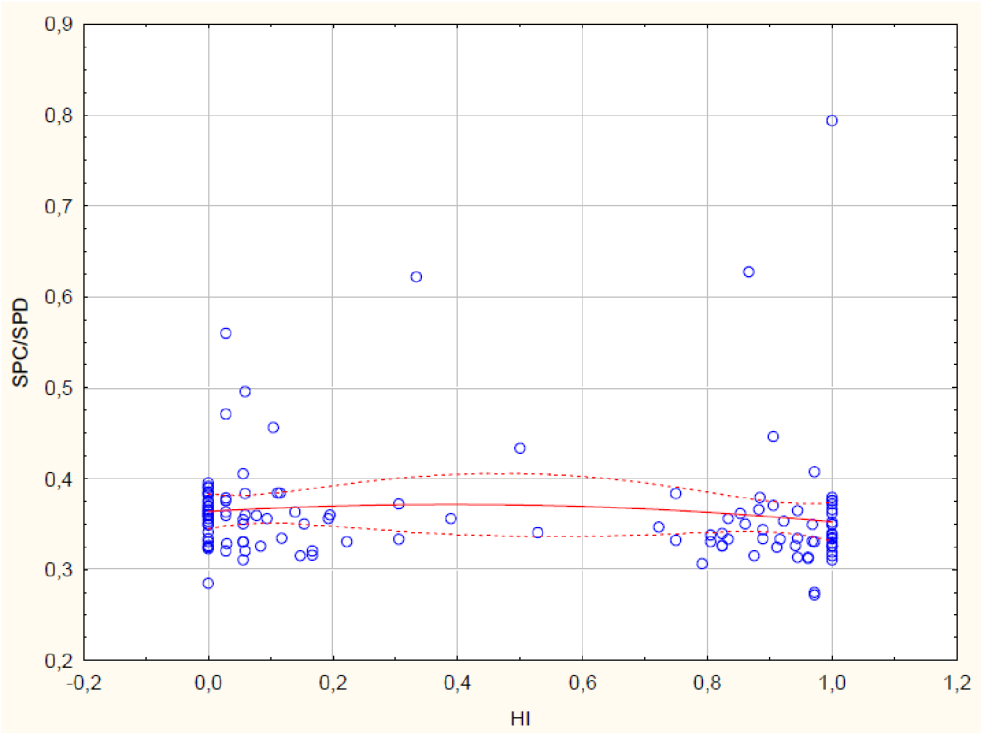
Z každého vzorku bylo celkově počítáno minimálně tisíc buněk, které byly zařazeny dle barevného signálu do příslušné skupiny (X nebo Y) pomocí počítačového programu Anomaly Counter (psSoft). V rámci možností byla dále sledována morfologie spermií s cílem detekovat případné malformace.

Vzhledem k rozsáhlé introgresi chromozomu Y *M. m. musculus* do areálu *M. m. domesticus* a s ní souvisejícími rozdíly v poměru pohlaví (viz kap. 1.3.4) byl poměr pohlaví hodnocen pro tři skupiny lokalit: D = genom *M. m. domesticus* s $Y^{domesticus}$, M = genom *M. m. musculus* s $Y^{musculus}$ a DyM = genom *M. m. domesticus* s $Y^{musculus}$. Pro všechny skupiny byla pomocí χ^2-testu testována shoda s předpokládaným poměrem (X:Y) 1:1. Kromě toho byl poměr pohlaví spermií vyjádřen v závislosti na HI (24 znaků, viz výše) pro každého jedince.

3. Výsledky

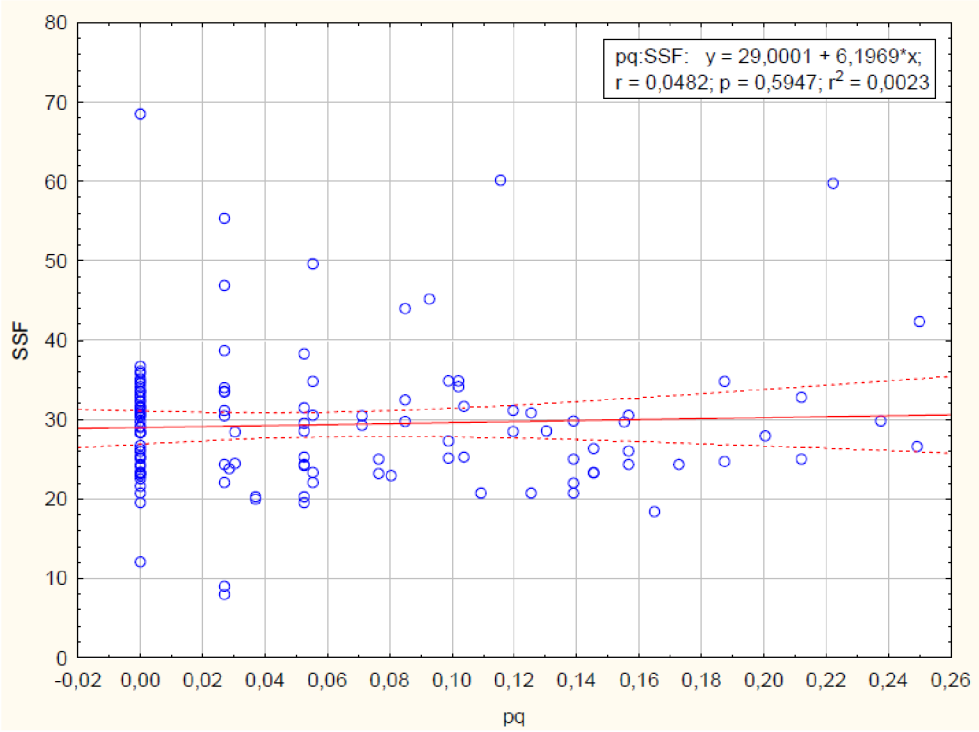
3.1. Histologická analýza varlat hybridních samců

Celkem bylo histologicky zpracováno a vyšetřeno 124 vzorků varlat myších samců. Průměrný počet primárních spermatocytů se na vyšetřených řezech semennými kanálky pohyboval mezi 38,0 a 93,7, rozmezí průměrných počtů spermatid na preparát bylo 74,3–276,0. Výsledný poměr spermatocytů a spermatid (SPC/SPD) se pohyboval v rozmezí 0,272–0,794, odpovídající procentu odumřených buněk (SSF) 8,0–68,5%. Toto rozmezí, stejně jako průměrná hodnota SPC/SPD = 0,362 (SD = 0,0659), ukazuje na výrazné snížení tohoto poměru od očekávané hodnoty 0,250 (1:4) i u geneticky čistých jedinců. Závislost SPC/SPD na hybridním indexu jednotlivých samců ukazuje obr. 9. Proložený polynom druhého řádu měl tvar $y = 0{,}3638 + 0{,}0402x - 0{,}0517x^2$ (oba typy hybridních indexů poskytly totožné proložení). Z grafu je patrné mírné zvýšení poměru (a snížení plodnosti) u hybridních jedinců, tento rozdíl je však malý a navíc počet vyšetřených hybridů byl nízký.



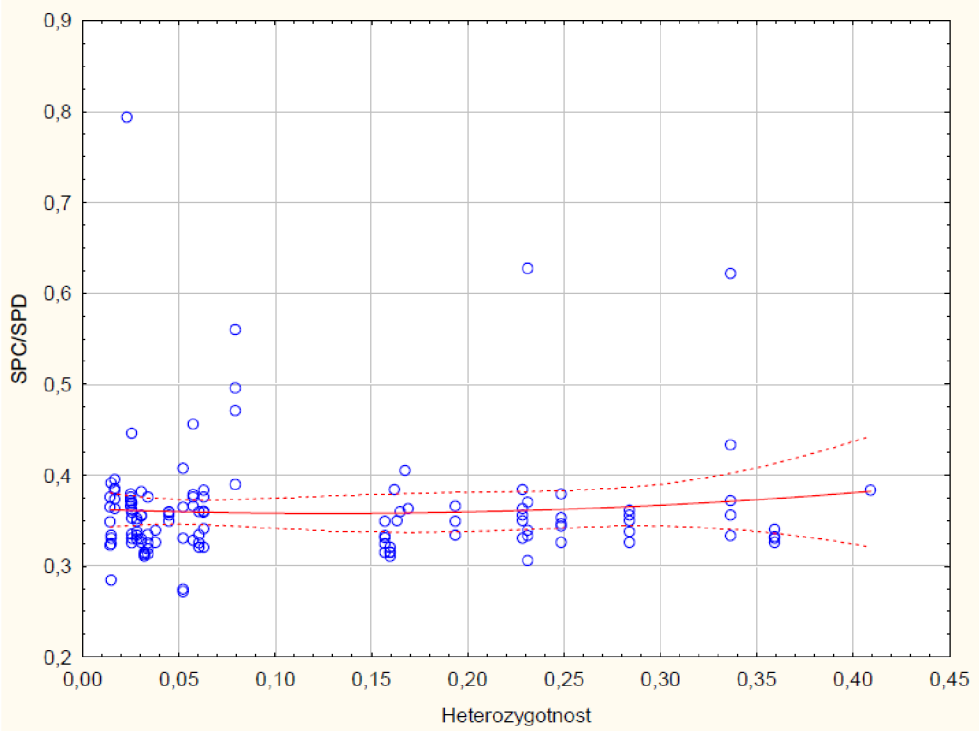
Obr. 9: **Poměr spermatocytů I. řádu a okrouhlých spermatid (SPC/SPD) vynesený proti hybridnímu indexu (HI)**. Proložen polynom druhého stupně (kvadratická funkce): $y = 0{,}3638 + 0{,}0402x - 0{,}0517x^2$; tečkované čáry vyjadřují 95% interval spolehlivosti kvadratického proložení.

Abych mohla lépe vyjádřit závislost kvality spermatogeneze na hybridním statutu studovaných jedinců, vynesla jsem poměr SPC/SPD i hodnoty SSF proti míře zvýšení míry hybridnosti, kterou jsem vypočetla jako součin HI(1-HI). Protože hybridní index nabývá hodnot 0–1, výsledný součin se pohybuje v rozmezí 0–0,25, tj. čím bližší je jeho hodnota nule, tím více se daný jedinec blíží rodičovským populacím. Výsledný graf pro SSF je ukázán na obr. 10 (graf závislosti SPC/SPD je totožný): proložená lineární regrese má tvar $y = 29{,}000 + 6{,}197x$ ($R^2 = 0{,}0023$, $p = 0{,}5947$) a odchylka její směrnice není statisticky průkazně odlišná od nuly, tj. procento mrtvých buněk u hybridů se neliší od hodnot pro geneticky čisté jedince *M. m. musculus* i *M. m. domesticus*.



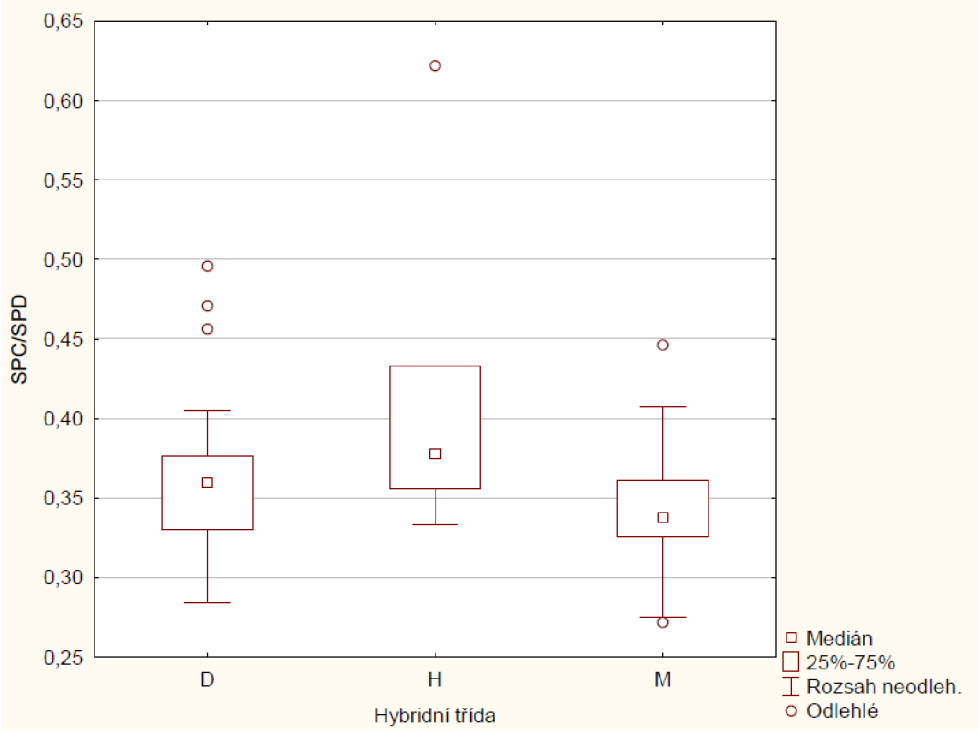
Obr. 10: **Stupeň snížení fertility, vyjádřený jako procento mrtvých buněk (SSF) vynesený proti součinu *pq***, kde *p* je frekvence alel *musculus* a *q* frekvence alel *domesticus* na 24 lokusech pro každého jedince (protože hybridní index je v tomto případě totožný s frekvencí alel *musculus*, platí *pq* = HI(1-HI)). Tečkované čáry ukazují 95% interval spolehlivosti lineární regrese, jejíž rovnice je uvedena v okně grafu.

Jako alternativa k hybridnímu indexu byl stupeň hybridnosti vyjádřen jako průměrná očekávaná heterozygotnost pro každou lokalitu, odhadnutá z matice genotypů 1401 SNP (viz kap. 2). Graf závislosti SPC/SPD na průměrných heterozygotnostech je prezentován na obr. 11. Ani v tomto případě nevidíme významné rozdíly mezi geneticky čistými a hybridními populacemi.



Obr. 11**: Poměr spermatocytů I. řádu a okrouhlých spermatid (SPC/SPD) vynesený proti průměrné očekávané heterozygotnosti**, odhadnuté na základě 1401 diagnostických SNP markerů. Proložen polynom druhého stupně: $y = 0{,}3628 - 0{,}0784x + 0{,}3073x^2$.

Pokud však závislost poměru SPC/SPD na hybridním indexu vyjádříme jako průměrné hodnoty pro tři základní kategorie, *M. m. musculus*, *M. m. musculus* a hybridní populace (viz kap. 2), posledně jmenovaná kategorie ukazuje zřetelné zvýšení oproti oběma „nehybridním“ třídám (tabulka 1 a obr. 12). Přestože rozdíly mezi třídami nebyly statisticky průkazné (ANOVA: $F = 2{,}637$, df = 2, $p = 0{,}0757$), lze je považovat alespoň za marginálně signifikantní. Podobně Studentův t-test mezi jednotlivými dvojicemi naznačil rozdíly mezi třídami M a H ($p = 0{,}0629$) a D a H ($p = 0{,}0614$), blížící se statistické významnosti, po Bonfferoniho korekci hodnoty α (0,0167, viz kap. 2) se však průkaznost těchto rozdílů výrazně sníží. (Pravděpodobně díky nízkému počtu jedinců v hybridní kategorii H se rozdělení hodnot v této třídě odchyluje od normality a striktně vzaty by bylo třeba použít neparametrické ekvivalenty uvedených testů, tyto alternativy jsou však obecně mnohem slabší než parametrické testy a nelze proto očekávat, že by poskytly signifikantní výsledky).



Obr. 12: **Poměr spermatocytů I. řádu a kulatých spermatid (SPC/SPD) pro tři hybridní kategorie** (D – *domesticus*, H – hybridi, M – *musculus*). Tyto třídy byly vymezeny na základě hodnot HI_SNP v rozmezí 0,00–0,39 (D), 0,40–0,59 (H) a 0,60–1,00 (M).

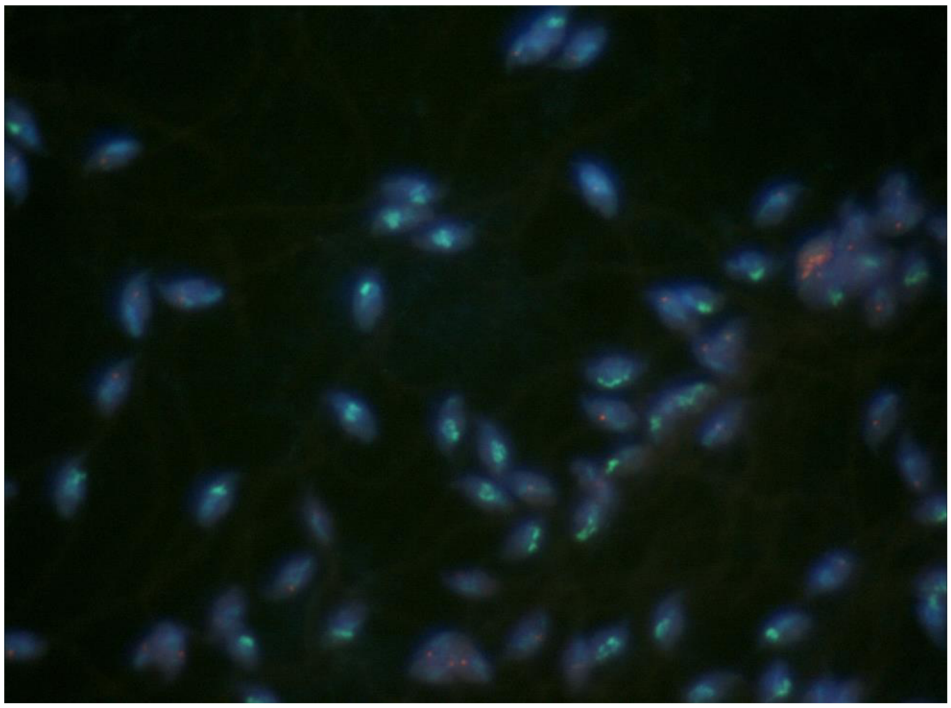
Tabulka 1. **Průměrné hodnoty HI_SNP pro tři hybridní třídy**; *N* – počet vyšetřených jedinců, HI_SNP – hybridní index vypočtený z frekvencí alel na 1401 SNP, SD – směrodatná odchylka.

hybridní třída	*N*	HI_SNP	průměr	SD
D	61	0,0–0,4	0,363	0,044
H	6	0,4–0,6	0,417	0,097
M	57	0,6–1,0	0,354	0,075

3.2. Stanovení poměru pohlaví u vzorků spermií

Celkem bylo pomocí FISH vyšetřeno 84 vzorků. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2 (viz také obr. 14), ze které je patrný mírně vyšší počet spermií nesoucích chromozom X, a to ve všech třech geografických oblastech (*M. m. musculus*, *M. m. domesticus*, *M. m. domesticus* s introgresí $Y^{musculus}$, podrobnosti viz kap. 2), tyto hodnoty se však statisticky průkazně neodchylují od předpokládaného poměru 1:1 (χ^2-test, hodnoty pravděpodobnosti v pravém sloupci tabulky 2). Navíc rozdíly mezi jednotlivými geografickými oblastmi nejsou

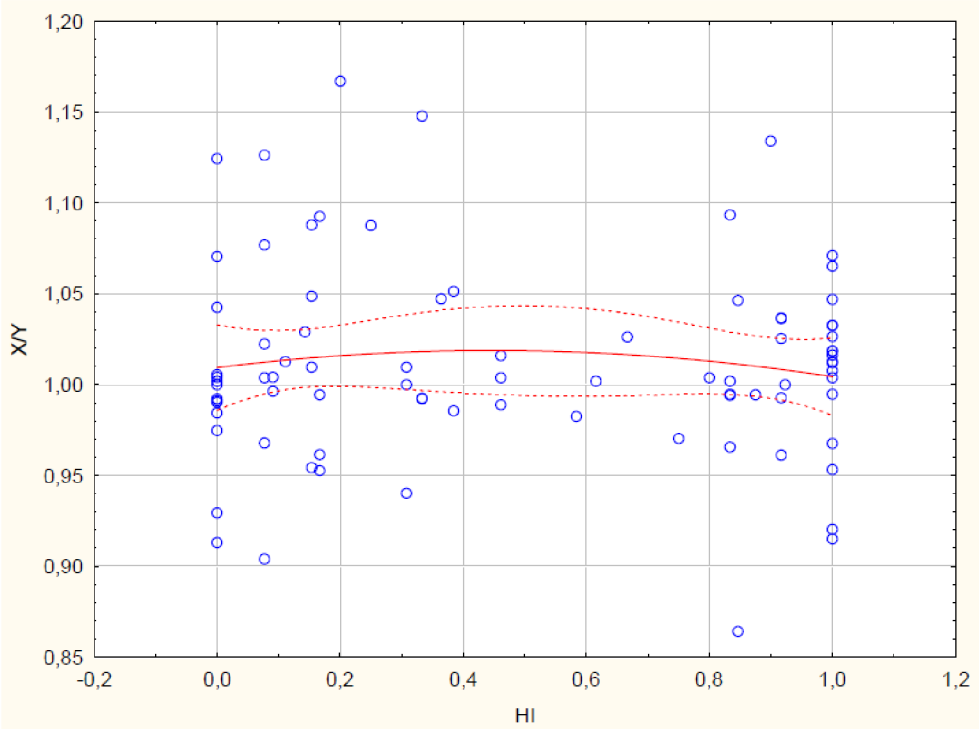
signifikantní. Z uvedených výsledků (tabulka 2, obr. 14 a 15) je tedy zjevné, že nedošlo k vychýlení poměru pohlaví u vyšetřovaných spermií z očekávaného poměru.



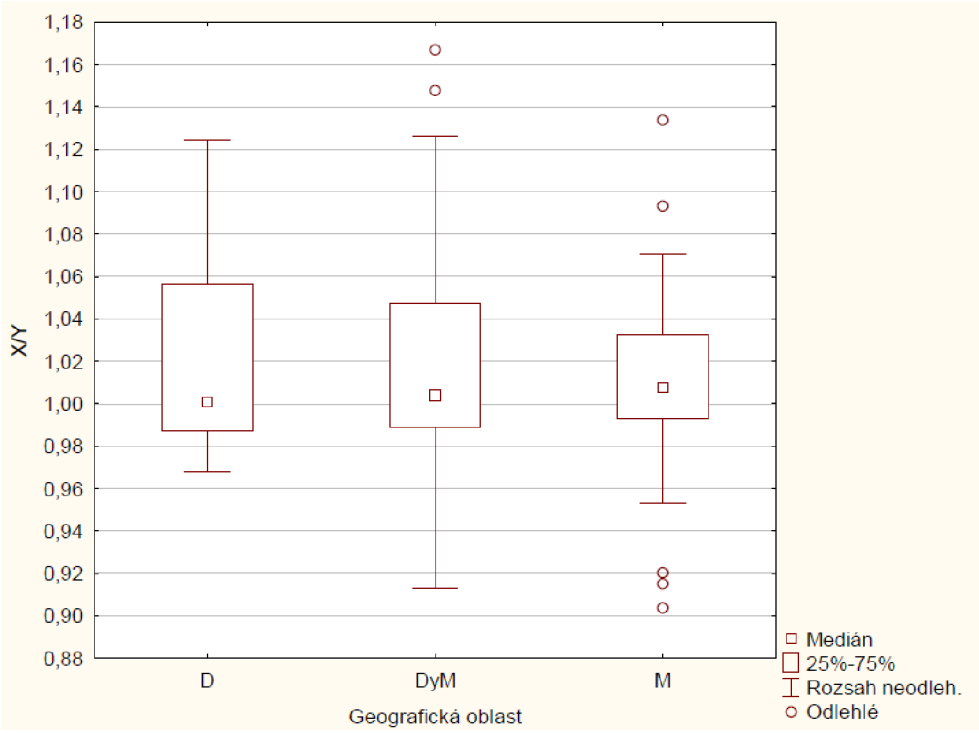
Obr. 13: **Spermie hybridizované metodou FISH**. Chromozom X emituje červený a chromozom Y zelený signál. Hlavičky spermií jsou dobarveny DAPI; zvětšeno 1000x.

Tabulka 2. **Průměrný počet spermií nesoucích chromozom X a Y a poměr X/Y** (SD – směrodatná odchylka). V pravých dvou sloupcích jsou uvedeny hodnoty χ^2-statistiky a příslušné pravděpodobnosti.

oblast	***N***	**X**	**Y**	**X/Y**	**SD**	χ^2	***p***
D	12	504,33	498,25	1,019	0,048	0,107	0,744
DyM	35	562,11	554,71	1,015	0,058	0,049	0,825
M	37	534,08	532,30	1,005	0,051	0,003	0,954



Obr. 14: **Poměr X a Y chromozomů ve spermiích (X/Y), vynesený proti HI**. Proložený polynom má tvar $y = 1{,}0093 + 0{,}0422x - 0{,}0472x^2$. Čárkovaně jsou vyznačeny 95% intervaly spolehlivosti.



Obr. 15: **Krabicový graf poměru X a Y chromozomů ve spermiích (X/Y), v jednotlivých geografických oblastech**. D - areál *M. m. domesticus*, M – areál *M. m. musculus*, DyM – areál *M. m. domesticus* s introgresí $Y^{musculus}$.

4. Diskuze

Problém vzniku nových druhů (speciace) stojí v popředí zájmu již od publikace Darwinova *Původu druhů*. Vyjdeme-li ze všeobecně rozšířeného pojetí druhu jakožto společně sdíleného genofondu, reprodukčně izolovaného od jiných druhů (Dobzhansky 1937, Mayr 1942), je zřejmé, že vznik reprodukčních bariér (prezygotických nebo postzygotických) mezi divergujícími populacemi je z hlediska speciace klíčovým krokem (Coyne a Orr 2004). Avšak právě otázka, jak může přírodní výběr podporovat vznik takových vlastností, jako je neživotaschopnost nebo sterilita hybridů (tzv. Darwinův paradox), zůstávala pro mnoho generací evolučních biologů neřešitelná. Představíme-li si reprodukční zdatnost jako tzv. adaptivní krajinu, je uvedený paradox ekvivalentní problému přechodu z jednoho adaptivního vrcholu (druh A) přes „údolí“ snížené fitness na druhý vrchol (druh B) (obr. 1), tolerovaného selekcí. Řešení nabídl model, navržený nezávisle Batesonem (1909), Dobzhanským (1936) a Mullerem (1940, 1942). Ten je založen na kumulaci odlišných mutací na dvou nebo více lokusech ve dvou dceřinných populacích, vzniklých rozdělením jedné populace původní. Zatímco tyto nově vzniklé alely jsou perfektně kompatibilní s alelami ancestrálními (a tudíž tolerované selekcí), jejich kombinace s mutantními alelami, fixovanými ve druhé populaci, je po jejich sekundárním kontaktu nekompatibilní. Tímto způsobem může dojít ke vzniku reprodukční izolace, aniž by populace musely projít adaptivním údolím.

Přestože se Dobzhanského-Mullerův model stal úhelným kamenem genetiky speciace, v poslední době se množí důkazy, že reprodukční bariéry mohou vznikat i v důsledku meiotického tahu, tj. působením přírodního výběru na sobecké genetické elementy spíše než Darwinovskou adaptací na vnější prostředí (Tao *et al.* 2001, Phadnis a Orr 2009, Presgraves 2010). V tomto případě jsou genetické nekompatibility akumulovány v důsledku pokračujícího „závodu ve zbrojení“ po rozdělení ancestrální populace. Opětovný kontakt obou populací pak s velkou pravděpodobností vyústí v hybridní dysfunkci (Hurst a Pomiankowski 1991, Presgraves 2010).

V posledních 2–3 desetiletích došlo ve výzkumu speciace k významnému pokroku, korunovanému popisem více než 10 tzv. speciačních genů, tj. genů odpovědných za vznik reprodukčních bariér mezi incipientními druhy (shrnutí viz Coyne a Orr 2004, Presgraves 2010). Většina těchto výsledků však byla dosažena pouze na jediném modelovém organismu, octomilce rodu *Drosophila* a je proto otázkou, do jaké míry je lze extrapolovat i na jiné druhy. Navíc všechny tyto studie byly založeny na křížení již existujících, často fylogeneticky vzdálených druhů, takže může být obtížné odlišit příčiny vzniku reprodukční izolace od jejích

důsledků. Konečně umělé laboratorní experimenty nemohou dostatečně simulovat přírodní podmínky, včetně dostatečného počtu generací rekombinací, nutného k přesné lokalizaci zájmových genů. Tyto nevýhody do značné míry překonává výzkum přirozených hybridních zón mezi částečně reprodukčně oddělenými populacemi nebo druhy ve stadiu zrodu (*species in statu nascendi*, *species incipientes*).

Jednou z nejlépe prozkoumaných hybridních zón je zóna sekundárního kontaktu mezi dvěma poddruhy myší domácích (*M. m. musculus*, *M. m. domesticus*) v Evropě (Boursot *et al.* 1993, Macholán, in press). Výhodou tohoto modelového systému je kromě jiného znalost kompletní sekvence genomu (Mouse Genome Consortium, 2002) a dostupnost bohatých databází vhodných molekulárních znaků (např. Copeland *et al.* 1993, Ditrich *et al.* 1996, Abe *et al.* 2004) i známých genů (např. Panther, MGI Mouse Genome Database, Ensembl). Např. jedna z těchto databází, obsahující 623 124 SNP markerů (Mouse Diversity Genotyping Array; Yang *et al.*, 2009) umožnila selekci více než 1400 SNP, fixovaných pro alternativní alely u obou myších taxonů, a jejich aplikaci na česko-bavorský transekt napříč zónou (Wang *et al.* in press). Možnost podrobného mapování myšího genomu, včetně znalosti pozice každého markeru, na druhou stranu otevírá široké pole statistických asociací se specifickými fenotypy pozorovanými v oblasti hybridní zóny.

4.1. Narušení spermatogeneze hybridů

Jednou z možných příčin snížené fertility hybridů může být narušení spermatogeneze, kterému jsem se věnovala ve své práci. Histologický obraz příčného řezu semenným kanálkem sterilního samce se může lišit u různých typů narušení tohoto procesu, vždy je však nápadně odlišný od normální struktury (viz obr. 4). Kromě těchto extrémních případů však mohou být důsledky mezidruhového křížení manifestovány různou mírou snížení počtu zdravých spermií. Často používaným kritériem při hodnocení dopadů hybridizace na fertilitu je odhad odchylky poměru primárních spermatocytů a okrouhlých spermatid (SPC/SPD) od očekávané hodnoty 1:4 (Hauffe 1993, Britton-Davidian *et al.* 2005). Kromě toho jsem věnovala pozornost i možným změnám histologického obrazu potenciálně indikujícího narušení spermatogeneze a snažila se vyloučit případné ovlivnění výsledků jinými faktory (expozice toxickým látkám, inflamatorní procesy apod.). Bohužel vzhledem k dlouhodobému přechovávání vzorků v Bouinově roztoku nemohla být provedena podrobnější imunohistochemická detekce proteinů buněčného cyklu.

Ze získaných výsledků vyplývá několik závěrů. 1) průměrný podíl SPC/SPD (0,362 ± 0,066; rozmezí 0,272–0,794) je vyšší, než teoretická hodnota 0,250, a tedy i u geneticky čistých a zdravých myších samců dochází během spermatogeneze ke ztrátě určitého množství spermatid (viz také Hauffe 1993, Britton-Davidian *et al.* 2005). 2) U hybridních jedinců dochází k dalšímu poklesu počtu spermatid a tím ke zvýšení SPC/SPD, rozdíl od hodnot naměřených u obou rodičovských taxonů je však statisticky neprůkazný. Bohužel počet vyšetřených hybridních jedinců (HI ≈ 0,5) byl příliš nízký a tato skutečnost mohla výsledky negativně ovlivnit, nicméně poměrně dobře koreluje s obecnějším problémem malé dostupnosti dostatečného počtu těchto hybridů v oblasti centra hybridní zóny. Toto může být důsledkem nižší životaschnopnosti hybridů, pravděpodobnějším vysvětlením je však fakt, že myší hybridní zóna se jakožto tenzní zóna nachází v oblasti s nejméně příhodným habitatem a s tím související nejnižší populační hustoty (viz kap. 1). 3) 24 vybraných molekulárních znaků (12 autozomálních, 12 vázaných na chromozom X) se ukázalo jako dostatečná aproximace pro výpočet celogenomového hybridního indexu (HI_SNP).

Moje výsledky jsou konzistentní s předchozími nebo paralelně probíhajícími výzkumy, a to jak s experimentální hybridizací, tak genetickými analýzami volně žijících myší. Tyto studie naznačují, že na samčí sterilitě hybridů mezi oběma poddruhy se podílí minimálně dva, spíše však tři i více epistaticky interagujících genů (*Hst1*, *Hstx1*, *2*; Storchová *et al.* 2004), popř. až několik desítek genů s malými účinky (Raufaste *et al.* 2005, Macholán *et al.* 2007a). Účinky speciačního genu *Hst1/Prdm9* by se u samců první filiální generace projevily meiotickým arestem spermatogeneze v pachytenní fázi primárních spermatocytů (Forejt a Ivanyi 1975, Mihola *et al.* 2009), který jsem ve svém materiálu nepozorovala, na druhou stranu je ovšem známo, že F1 hybridi se v myší hybridní zóně prakticky nevyskytují (Macholán *et al.* 2007a) a navíc v přírodních myších populacích středoevropského prostoru není sterilní alela tohoto genu fixována (Vyskočilová *et al.* 2005, 2009; J. Piálek, osobní sdělení).

Přestože pozorované mírné snížení produkce spermatid u hybridních samců nedosahovalo statistické průkaznosti, lze ho dávat do souvislostí i s dalšími jevy. Především studie hybridní zóny (Tucker *et al.* 1992, Dod *et al.* 1993, Payseur *et al.* 2004, 2005, Macholán *et al.* 2007a, 2011, Teeter *et al.* 2008, 2010, Dufková *et al.* 2011) i laboratorní křížení (Storchová *et al* 2004) konzistentně ukazují na působení silné selekce proti hybridům v centrální oblasti chromozomu X v souladu s hypotézou velkého efektu chromozomu X a dominantní teorií Haldaneova pravidla (Coyne a Orr 2004, viz kap. 1). V této oblasti se nachází několik genů souvisejících se spermatogenezí (*Fate1*, *Tex28*, komplex *Zfx*, predikovaný gen *Gm14698* atd.) a diferenciací Sertoliho a Leydigových buněk (*Nr0b1/DAX1*). Do jaké míry se

účinky těchto genů u hybridních samců promítají do histologického obrazu spermatogeneze, je však v současné době nejasné.

Konečně nedávno publikované údaje o míře vícečetné paternity, dosahující 20% u *M. m. domesticus* (Dean *et al.* 2006) a podobné procentu u *M. m. musculus* (J. Piálek, osobní sdělení), nabízí možnost navrhnout a testovat některé hypotézy spojené s potenciální kompeticí spermií. Recentní studie totiž ukazují, že hybridní samci, kterým je jako jediným umožněno pářit se se samicí, jsou schopni ji bez problému oplodnit, jakmile je však tato samice spářena s více samci, spermie hybridního samce nedokážou v kompetici se spermiemi nehybridních samců vajíčko úspěšně oplodnit (Birkhead 2010). O tomto jevu bude pojednáno v následujícím oddílu, z hlediska histologického vyšetření semenných kanálků se však lze domnívat, že i mírné snížení počtu spermií, které neznamená při absenci vícečetných paternit žádné výraznější snížení samčí fertility, může v konfrontaci s kompeticí s jinými samci vést k redukci reprodukční zdatnosti hybridů. Přestože sociální struktura středoevropských populací je pravděpodobně démová (Hauffe 1993), tj. sestávající z jednoho dominantního samce a několika samic s mláďaty a silně bráněná vůči pronikání cizích jedinců, především samců (Sage 1981), frekvence „mimodémových“ paternit (Bronson 1979; Drickamer *et al.* 2000; Dean *et al.* 2006) naznačuje, že kompetice spermií může hrát u domácích myší větší roli, než se původně předpokládalo.

4.2. Poměr pohlaví ve spermiích

Masivní průnik chromozomu Y *M. m. musculus* hluboko do areálu *M. m. domesticus* (Macholán *et al.* 2008) je vzhledem k praktické absenci introgrese tohoto pohlavního chromozomu ve všech ostatních studovaných oblastech myší hybridní zóny (Vanlerberghe *et al.* 1986, Tucker *et al.* 1992, Dod *et al.* 2005) velice neobvyklý a jeho vysvětlení není zdaleka triviální. Odchylky v poměru pohlaví mezi jednotlivými geografickými oblastmi (*M. m. musculus*, *M. m. domesticus* a *M. m. domesticus* s introgresním $Y^{musculus}$) naznačují, že za pozorovaný jev je zodpovědný konflikt mezi chromozomem Y a geny na chromozomu X (a pravděpodobně i na některých autozomech) (Macholán *et al.* 2008).

Přestože statistická analýza velkého množství molekulárních znaků ukazuje na statisticky průkazné asociace některých lokusů na pohlavních chromozomech i autozomech s vychýlením poměru pohlaví (M. Macholán, osobní sdělení), vlastní mechanismus tohoto posunu není znám. Mým cílem bylo proto zjistit, zda tento jev není patrný už na úrovni spermií. K tomuto účelu jsem použila metodu fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH), která

dokáže pomocí navázání speciální chromozomově-specifické sondy odlišit oba pohlavní chromozomy. Díky dobarvení hlavičky spermie pomocí DAPI bylo lze navíc sledovat i případný výskyt větších malformací.

Jak ukazuje tabulka 2, ve všech třech oblastech byla zjištěna mírná převaha chromozomu X, která by mohla částečně korespondovat s vyšším počtem samic zjištěným v oblastech bez introgresního $Y^{musculus}$ (oblasti D a M, viz kap. 2) (Macholán *et al.* (2008), ani v jednom případě však nebyla u spermií potvrzena průkazná odchylka od očekávaného poměru 1:1. Nedostatečná průkaznost získaných výsledků může být vysvětlena menším počtem vyšetřených jedinců, tento nedostatek je však částečně kompenzován velkým množstvím skórovaných spermií (≈ 1000). To naznačuje, že k vychýlení tohoto poměru musí docházet v pozdějších stadiích vývoje. V úvahu připadá např. rozdílná schopnost oplození vajíčka spermiemi nesoucími různé pohlavní chromozomy nebo rozdílné přežívání v zygotické fázi v prenatálním a postnatálním stadiu, přičemž platí, že čím dříve se daný fenotyp (tj. vychýlení poměru) projeví, tím bude výsledná odchylka výraznější a snáze detekovatelná. (Proto byla jako počáteční fáze výzkumu zvolena analýza spermií.) Diferenciální značení spermií pomocí fluorescenční sondy tyto alternativní hypotézy testovat neumožňuje, současné analýzy však naznačují, že spermie hybridních samců mají sníženou motilitu ve srovnání s geneticky čistými jedinci (Albrechtová *et al.*, in prep.). Tyt spermie měly navíc signifikantně menší hlavičky. Budeme-li proto uvažovat možnou existenci kompetice spermií v myších populacích (viz výše), mohou být právě tyto fenotypové rozdíly jedním s mechanismů selekčního znevýhodnění hybridů. Ke snížení motility ovšem nedochází v populacích *M. m. domesticus* s introgresním chromozomem Y poddruhu *M. m. musculus*. Jestliže jsou spermie s takto uspořádaným genomem pohyblivější než spermie „normálních“ hybridních samců, může se $Y^{musculus}$ šířit přes hybridní zónu na úkor svého protějšku ($Y^{domesticus}$). Pro potvrzení této hypotézy je však nutné prokázat, že jsou to právě tyto spermie (a nikoli spermie nesoucí chromozom X), které mají vyšší motilitu.

V tomto případě tedy pokračující „závody ve zbrojení“ v důsledku konfliktu genů a meiotického tahu v geograficky oddělených populacích nevedly po opětovném kontaktu k hybridní dysfunkci a reprodukční izolaci (Hurst a Pomiankowski 1991, Presgraves 2010), ale naopak k prolomení reprodukční bariéry mezi nimi. Přestože moje analýza spermií pomocí FISH vedla k negativním výsledkům, přispěla k postupnému zpřesňování celkového obrazu možného mechanismu vychýlení poměru pohlaví.

4.3. Výzkum speciace z pohledu diplomové práce

Tato práce se skládala ze dvou částí, jejichž vzájemná souvislost nemusí být na první pohled zřejmá. Zatímco první část (dopad hybridizace na poměr primárních spermatocytů a okrouhlých spermatid) může ukázat potenciální mechanismus selekčního znevýhodnění hybridních samců a tedy částečné postzygotické reprodukční bariéry, část druhá měla naopak za úkol přispět k objasnění mechanismu prolomení této bariéry. Současné studie naznačují, že genetická architektura reprodukční izolace u myši domácí je mnohem složitější než se předpokládalo (Teeter *et al*. 2008, 2010, Macholán *et al*. 2011). Speciační geny (jak ve smyslu Dobzhanského-Mullerova modelu, tak i „sobecké" geny zodpovědné za meiotický tah) mohou být promíchány s geny, které při kontaktu s „naivním" genetickým pozadím, se kterým se během evoluce v geografické separaci nesetkaly, prezygotickou bariéru naopak prolamují. Častější detekci posledně jmenovaných genů může bránit jak malé množství použitých molekulárních markerů v dřívějších studiích, tak i silná vazbová nerovnováha s jinými geny, bránící jejich projevu (S.J.E. Baird, osobní sdělení). Mnoho markerů vykazujících signifikantní asociace se sníženou fertilitou nebo naopak s konfliktem mezi pohlavními chromozomy se nachází blízko genů, účastnících se spermatogeneze, tvorby Leydigových a Sertoliho buněk (viz výše), akrozomální reakce a dalších funkcí souvisejících s reprodukcí (např. skupina genů reprodukčního homeoboxu (*Rhox*), sperm acrosome associated 5 (*Spaca5*) a další). Podrobnější vysoce výkonné (high-throughput) analýzy s využitím stovek molekulárních markerů doplněné o poziční klonování fokálních oblastí a s nimi kompementární histologické, biochemické a fyziologické studie jsou nezbytným předpokladem k významnému posunu ve výzkumu speciace.

5. Závěr – shrnutí výsledků

Histologickou analýzou testes hybridních samců odchycených v definovaných lokalitách česko-bavorského transektu zóny kontaktu dvou taxonů domácích myší komplexu *Mus musculus* jsem vyloučila úplnou sterilitu hybridů, což odpovídá i výsledkům molekulárně genetických analýz. Také jsem vyloučila případné ovlivnění výsledků jinými faktory (expozice toxickým látkám, inflamatorní procesy apod.). Nicméně mírné snížení počtu okrouhlých spermatid může v případě vícečetné paternity a s ní spojené kompetice spermií vést ke snížení reprodukční zdatnosti hybridů.

Fluorescenční *in situ* hybridizací spermií hybridních samců ze zkoumané oblasti jsem nezjistila průkazné odchylky od předpokládaného poměru pohlaví 1:1 ani v oblasti s introgresí chromozomu Y *M. m. musculus* do genomu *M. m. domesticus*, ani v oblastech bez introgrese tohoto chromozomu. Možnost, že k posunu poměru pohlaví dochází na úrovni spermií, je prot nepravděpodobná.

6. Seznam použitých zkratek

DAPI	4´,6-diamidino-2-phenylindol *(fluoresčenční barvivo)*
FISH	Fluorescent *in situ* Hybridization
HI	Hybridní index vypočtený z frekvencí alel na 24 lokusech
HI-SNP	Celogenomový hybridní index (1401 SNP markerů)
Hst 1	Hybrid sterility 1 *(gen hybridní sterility)*
Hstx 1	Hybrid sterility, X chromosome 1
OdsH	Odysseus – site homeobox *(gen hybridní sterility)*
Prdm 9	PR – domain containing 9 *(gen hybridní sterility)*
Rb	Robertsonova translokace
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPC	Počet spermatocytů I. řádu (primárních spermatocytů)
SPD	Počet okrouhlých spermatid
SPC/SPD	Poměr počtu spermarocytů I. řádu a okrouhlých spermatid
SSF	Spermatocyte–to-spermatid factor

7. Seznam použité literatury

Abe, K., H. Noguchi, K. Tagawa, M. Yuzuriha, A. Toyoda, T. Kojima, K. Ezawa, N. Saitou, M. Hattori, Y. Sakaki, K. Moriwaki, T. Shiroishi. 2004. Contribution of Asian mouse subspecies *Mus musculus molossinus* to genomic constitution of strain C57BL/6J, as defined by BAC-end sequence-SNP analysis. Genome Res. 12: 2439-2447.

Arnold, M. L. 1997. *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford Univ. Press, New York

Barton, N.H., Briggs, D.E.G., Eisen, J.A., Goldstein, D.B., Patel, N.H. 2007. *Evolution*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

Barton, N. H., Gale, K.S. 1993. Genetic analysis of hybrid zones. In: R. G. Harrison, ed. Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford. Univ. Press, Oxford, U. K., pp. 13-45.

Barton, N. H., Hewitt, G.M. 1985. Analysis of hybrid zones. Annu. Rev. Ecol. Syst. 16: 113-148.

Bateson, W. 1909. Heredity and variation in modern lights. In: A. C. Seward, ed. Darwin and modern science. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, pp. 85-101.

Bímová, B., Karn, R.C., Piálek, J. 2005. The role of salivary androgen-binding protein in reproductive isolation between two subspecies of house mouse: *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*. Biol. J. Linn. Soc. 84: 349-361.

Birkhead, T.R. 2010. How stupid not to have thought that: post-copulatory sexual selection. Journal of Zoology, 281: 78-93.

Boursot, P., Auffray, J.-C., Britton-Davidian, J., Bonhomme, F. 1993. The evolution of house mice. Annu. Rev. Ecol. Syst. 24: 119-152.

Boursot, P., Bonhomme, F., Britton-Davidian, J., Catalan, J., Yonekawa, H., Orsini, P., Gerasimov, S., Thaler, L. 1984. Introgression différentielle des genomes nucléaires et mitochondriaux chez deux semi-espéces européennes de Souris. C. R. Acad. SC. Paris, Ser. III. 299: 365-370.

Brideau, N.J., Flores, H.A., Wang, J., Maheshwari, S., Wang, X., Barbash, D.A. 2006. Two Dobzhansky–Muller genes interact to cause hybrid lethality in *Drosophila*. Science 314: 1292-1295.

Britton-Davidian, J., Fel-Clair, F., Lopez, J., Alibert, P., Boursot, P. 2005. Postzygotic isolation between the two European subspecies of the house mouse: estimates from fertility patterns in wild and laboratory-bred hybrids. Biol. J. Linn. Soc. 84: 379-393.

Bronson, F.H. 1979. The reproductive ecology of the house mouse. The Quarterly Review of Biology, 54, 265–299.

Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol. Rev. 52: 198-236.

Coyne, J.A., Orr, A.H. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Suenderland, Massachusetts.

Coyne, J.A., Orr, H.A. 1998. The evolutionary genetics of speciation. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 353: 287-305.

Coyne, J. A., Orr, H.A. 1989. Two rules of speciation. In: D. Otte and J. Endler, eds. Speciation and its consequences. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, pp. 180-207.

Chippindale, A. K., Gibson, J.R., Rice, W.R. 2001. Negative genetic correlation for adult fitness between sexes reveals ontogenetic conflict in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98: 1671-1675.

Copeland, N. G., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Eppig, J.T., Maltais, L.J., Miller, J.C., Dietrich, W.F., Weaver, A., Lincoln, S.E., Steen, R.G., Stein, L.D., Nadeau, J.H., Lander, E.S.. 1993. A genetic linkage map of the mouse: Current applications and future prospects. Science 262: 57-66.

Dean, M.D., Ardlie, K.G., Nachman, M.W. 2006. The frequency of multiple paternity suggests that sperm competition is common in house mice (*Mus domesticus*). Mol. Ecol., 15: 141-4151.

Dietrich, W.F., Miller, J.C., Steen, R.G., Merchant, M.A., Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R., Daly, J.M., Ingalls, K.A., O´Connor, T.J., Evans, C.A., DeAngelis, M.M., D.M., Levinson, Kruglyak, L., Goodman, N., Copeland, N.G, Jenkins, N.A., Hawkins, T.L., Stein, L.D., Page, D.C., Lander, E.S. 1996. A comprehensive genetic map of the mouse genome. Nature 380: 149-152.

Divina, P., Vlček, C., Strnad, P., Pačes, V., Forejt, J. 2005. Global transcriptome analysis of the C57BL/6J mouse testis by SAGE: evidence for nonrandom gene order. BMC Genomics 6: 29.

Dobzhansky, T. 1937. *Genetics and the Origin of Species*. Columbia Univ. Press, New York.

Dobzhansky, T. 1936. Studies on hybrid sterility. 11. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids. Genetics 21:113.135.

Dod, B., Smadja, C., Karn, R.C., Boursot, P. 2005. Testing for selection on the Androgen-Binding Protein in the Danish mouse hybrid zone. Biol. J. Linn. Soc. 84: 447-459.

Dod, B., Herniin, L.S., Boursot, P., Champan, V.H., Nielsen, J.T., Bonhomme,F. 1993. Counterselection on sex chromosomes in the *Mus musculus* European hybrid zone. J. Evol. Biol. 6: 529-546.

Drickamer, L.C., Gowaty, P.A., Holmes, C.M. 2000. Free female mate choice in house mice affects reproductive success and offspring viability and performance. Anim. Behav. 59: 371-378.

Dufková, P., Macholán, M., Piálek, J. 2011. Inference of selection and stochastic effect in the house mouse hybrid zone. Evolution 65: 993-1010.

Fel-Clair, F., Catalan, J., Lenormand, T., Britton-Davidian, J. 1998. Centromeric incompatibilities in the hybrid zone between house mouse subspecies from Denmark: Evidence

from patterns of NOR activity. Evolution 52: 592-603.

Fel-Clair, F., Lenormand, T., Catalan, J., Robert, J., Orth, A., Boursot, P., Vidouc, M.-C., Britton-Davidian, J. 1996. Genomic incompatibilities in the hybrid zone between house mice in Denmark: Evidence from steep and non-coincident chromosomal clines for Robertsonian fusions. Genet. Res. 67: 123-134.

Ferris, S. D., Sage, R.D., Wilson, A.C. 1982. Evidence from mtDNA sequences that common laboratory strains of inbred mice are descended from a single female. Nature 295: 163-165.

Forejt, J., Vincek, V., Klein, J., Lehrach, H., Loudová-Micková, M. 1991. Genetic mapping of the t-complex region on mouse chromosome 17 including the *Hybrid sterility-1* gene. Mamm. Genome 1: 84-91.

Forejt, J., Ivanyi, P. 1975. Genetic studies on male sterility of hybrids between laboratory and wild mice (*Mus musculus* L.). Genet. Res. 24: 189-206.

Garagna, S., Vasco, Ch., Merico, V., Esposito, A., Zuccotti, M., Redi, C. A. 2005. Effects of a low dose of bentazon on spermatogenesis of mice exposed during foetal, postnatal and adult life. Toxicology 212: 165-174.

Geraldes, A., Basset, P., Gibson, B., Smith, K.L., Harr, B., Yu, H.T., Bulatova, N., Ziv, Z., Nachman, M.W. 2008. Inferring the history of speciation in house mice from autosomal, X-linked, Y-linked and mitochondrial genes. Mol. Ecol. 17: 5349-5363.

Good, J.M., Dean, M.D., Nachman, M.W. 2008. A complex genetic basis to X-linked hybrid male sterility between two species of house mice. Genetics 179: 2213-2228.

Haldane, J.B.S. 1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. J. Genet. 12: 101-109.

Harrison, J.S., Buton, R.S. 2006. Tracing hybrid incompatibilities to single amino acid substitutions. Mol. Biol. Evol. 23: 559-564.

Harrison, R.G. 1993. *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*. Oxford Univ. Press, Oxford.

Harrison, R. G. 1990. Hybrid zones – windows on evolutionary process. Oxford Surv. Evol. Biol. 7: 69-128.

Hauffe, H. C. 1993. Robertsonian fusions and speciation in a house mouse hybrid zone. Thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy at the University of Oxford.

Hayashi, K., Matsui, Y. 2006**.** *Meisetz*, a novel histone tri-methyltransferase, regulates meiosis-specific epigenesis. Cell Cycle 5: 615-620.

Hewitt, G.M. 1988. Hybrid zones – natural laboratories for evolutionary studies. Trends Ecol. Evol., 37: 158-167.

Hunt, P.A., Hassold, T.J. 2002. Sex matters in meiosis. Science 296: 2181-2183.

Hunt, W.G., **Selander, R.K.** 1973. Biochemical genetics of hybridisation in European house mice. Heredity 31: 11-33.

Hurst, L.D., Pomiankowski, A. 1991. Causes of sex ratio bias may account for unisexual sterility in hybrids: A new explanation of Haldane's rule and related phenomena. Genetics 128: 841-858.

Jiggins, C.D., Mallet, J. 2000. Bimodal hybrid zones and speciation. Trends Ecol. Evol. 15: 250-255.

Johnson, N.A., Kliman, R.M. 2002. Hidden evolution: progress and limitations in detecting multifarious natural selection. Genetica 114: 281-291.

King, M. 1993. *Species Evolution. The Role of Chromosome Change*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

LeBlond, C.P., Clermont, Y. 1952. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the ´periodic acid-fuchsin sulfurous acid´technique. American Journal of Anatomy 90: 167-215.

Levan, A., Hsu, T.C., Stich, H.F. 1962. The ideogram of the mouse. Hereditas 48: 677-687.

Macholán, M. Hybrid Zones, Mouse. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, London, in press.

Macholán, M., Baird, S.J.E., Dufková, P., Munclinger, P., Vošlajerová Bímová, B., Piálek, J. 2011. Assessing multilocus introgression patterns: A case study on the mouse X chromosome in Central Europe. Evolution 65:1428-1446.

Macholán, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P., Dufková, P., Bímová, B., Piálek, J. 2008. Genetic conflict outweighs heterogametic incompatibility in the mouse hybrid zone? BMC Evol. Biol. 8: 271.

Macholán, M., Munclinger, P., Šugerková, M., Dufková, P., Bímová, B., Božíková, E., Zima, J., Piálek, J. 2007a. Genetic analysis of autosomal and X-linked markers across a mouse hybrid zone. Evolution 61: 746-771.

Macholán, M., Vyskočilová, M., Bonhomme, F., Kryštufek, B., Orth, A., Vohralík, V. 2007b. Genetic variation and phylogeography of free-living mouse species (genus *Mus*) in the Balkans and the Middle East. Mol. Ecol. 16: 4774-4788.

Macholán, M., Kryštufek, B., Vohralík, V. 2003. The location of the *Mus musculus/M. domesticus* hybrid zone in the Balkans: Clues from morphology. Acta Theriol. 48: 177-188.

Macholán, M. 1996. Key to European house mice (*Mus*). Folia Zool. 45: 209-217.

Macholán, M., Zima, J. 1994. *Mus domesticus* in Western Bohemia: A new mammal for the Czech Republic. Folia Zool. 43: 39-41.

Masly, J.P., Presgraves, D.C. 2007. High-resolution genome-wide dissection of the two rules of speciation in *Drosophila*. PLoS Biol. 5 (9): e243.

Mayr, E. 1970. *Populations, Species and Evolution*. Harvard Univ. Press, Cambridge.

Mayr, E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard Univ. Press, Cambridge.

Mayr, E. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia Univ. Press, New York.

Meistrich, M.L., van Beek, M.E.A.B. 1993. Spermatogonial stem cells. In: C. Desjardins and L. L. Ewing, eds. *Cell and Molecular Biology of the Testis*. Oxford Univ. Press, New York, pp. 266-295.

Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlček, C., Schimenti, J.C., Forejt, J. 2009. A Mouse speciation gene encodes a meiotic Histone H3 Methyltransferase. Science. 323: 373-375.

Mouse Genome Sequencing Consortium 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. Nature 420: 520-562.

Muller, H.J. 1942. Isolating mechanisms, evolution, and temperature. Biol. Symp. 6: 71–125.

Muller, H.J. 1940. Bearing of the *Drosophila* work on systematics. In: J. S. Huxley, ed. *The New Systematics*. Clarendon Press, Oxford, pp. 185–268.

Munclinger, P., Božíková, E., Šugerková, M., Piálek, J., Macholán, M. 2002. Genetic variation in house mice (*Mus*, Muridae, Rodentia) from the Czech and Slovak Republics. Folia Zool. 51: 81-92.

Musser, G.G., Carleton, M.D. 2005. Superfamily Muroidea. In: Wilson, D.E., Reeder, D.A.M., eds. *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd ed. The John Hopkins University Press, Baltimore, pp. 894-1531.

Oakberg E.F. 1971. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. Anat. Rec. 169: 515-531.

Oka, A., Mita, A.,Takada, Y.,Koseki, H., Shiroishi, T. 2010. Reproductive Isolation in Hybrid Mice Due to Spermatogenesis Defects at Three Meiotic Stages. Genetics 186: 339–351.

Payseur, B.A., Nachman, M.W. 2005. The genomics of speciation: investigating the molecular correlates of X chromosome introgression across the hybrid zone between *Mus domesticus* and *Mus musculus*. Biol. J. Linn. Soc. 84: 523-534.

Payseur, B.A., Krenz, J.G., Nachman, M.W. 2005. The genomics of speciation: investigating the molecular correlates of X chromosome introgression across the hybrid zone between *Mus domesticus* and *Mus musculus*. Biol. J. Linn. Soc. 84: 523-534.

Payseur, B.A., Krenz, J.G., Nachman, M.W. 2004. Differential patterns of introgression across the X chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. Evolution 58: 2064-2078.

Perez, D.E., **Wu, C.-I.** 1995. Further characterization of the *Odysseus* locus of hybrid sterility in *Drosophila*: One gene is not enough. Genetics 140: 201-206.

Perez, D.E., Wu, C.-I., Johnson, N.A., Wu, M.L. 1993. Genetics of reproductive isolation in the *Drosophila* simulans clade: DNA marker-assisted mapping and characterization of a hybrid-male sterility gene, *Odysseus* (*Ods*). Genetics 134: 261-275.

Phadnis, N., Orr, H.A. 2009. A single gene causes both male sterility and segregation distortion in Drosophila hybrids. Science 323:376–379.

Piálek, J., Hauffe, H.C., Searle, J.B. 2005. Chromosomal variation in the house mouse. Biol. J. Linn. Soc. 84: 535-563.

Porter, A.H., Wegner, R., Geiger, H., Scholl, A., Shapiro, A.M. 1997. The *Pontia daplidice-edusa* hybrid zone in northwestern Italy. Evolution 51: 1561-1573.

Prager, E.M., Boursot, P., Sage, R.D. 1997. New assays for Y chromosome and p53 pseudogene clines among East Holstein house mice. Mamm. Genome 8: 279-281.

Prager, E.M., Sage, R.D., Gyllensten, U., Thomas, W.K., Hübner, R., Jones, C.S., Noble, L., Searle, J.B., Wilson, A.C. 1993. Mitochondrial-DNA sequence diversity and the colonization of Scandinavia by house mice from East Holstein. Biol. J. Linn. Soc. 50: 85-122.

Presgraves, D.C. 2010. The molecular evolutionary basis of species formation. Nature Reviews 11: 175-180.

Raufaste, N., Orth, A., Belkhir, K., Senet, D., Smadja, C., Blaird, S.J.E., Bonhomme, F., Dod, B., Boursot, P. 2005. Inferences of selection and migration in the Danish house mouse hybrid zone. Biol. J. Linn. Soc. 84: 593-616.

Redi, C.A., **Capanna, E.** 1988. Robertsonian heterozygotes in the house mouse and the fate of their germ cells. In: Daniel, A., ed. The Cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements. A.R. Liss, Inc., New York. Pp. 315-359.

Rieseberg, L.H., Whitton, J., Gardner, K.A. 1999. Hybrid zones and the genetic architecture of a barier to gene flow between two wild sunflower species. Genetics 152: 713-727.

Sage, R.D., Atchley, W.R., Capana, E. 1993. House mice as models in systematic biology. Syst. Biol. 42: 523-561.

Sage, R.D., Whitney III, J.B., Wilson, A.C. 1986. Genetic analysis of a hybrid zone between *domesticus* and *musculus* mice (*Mus musculus* comlpex): Hemoglobin polymorphisms. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 127: 75-85.

Sage, R.D. 1981. Wild mice. In: Foster, H. L., Small, J. D., Fox, J. G., eds. *The Mouse in Biomedical Research*, vol. 1. New York: Academic Press, pp. 39–90.

Shinohara, T., Avarbock, M.R., Brinster, R.L. 2000. Functional analysis of spermatogonial stem cells in steel and cryptorchid infertile mouse models. Dev. Biol. 220: 401-411.

Storchová, R., Gregorová, S., Buckiová, D., Kyselová, V., Divina, P., Forejt, J. 2004. Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse. Mamm. Genome 15: 515-524.

Sweigart, A.L., Mason, A.R., Willis, J.H. 2007. Natural variation for a hybrid incompatibility between two species of *Mimulus*. Evolution 61: 141-151.

Tao, Y., Hartl, D.L., Laurie, C.C. 2001. Sex-segregation distortion associated with reproductive isolation in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:13183–13188.

Teeter, K.C., Thibodeau, L.M., Gompert, Z., Buerkle, A.C., Nachman, M.W., Tucker, P.K. 2010. The variable genomic architecture of isolation between hybridizing species of house mice. Evolution 64: 472-485.

Teeter, K.C., Payseur, B.A., Harris, L.W., Bakewell, M.A., Thibodeau, L.M., O'Brien, J.E., Krenz, J.G., Sans-Fuentes, M.A., Nachman, M.W., Tucker, P.K. 2008. Genome-wide patterns of gene flow across a house mouse hybrid zone. Genome Res. 18: 67-76.

Tegelenbosch, R. A. J., de Rooij, D.G. 1993. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F_1 hybrid mouse. Mutat. Res. 290: 193-200.

Ting, C.T., Tsaur, S.C., Wu M.L. &. Wu, C.-I. 1998. A rapidly evolving homeobox at the site of a hybrid sterility gene. Science **282**: 1501-1504.

Tucker, P.K., Sage, R.D., Warner, J., Wilson, A.C., Eicher, E.M. 1992. Abrupt cline for sex chromosomes in a hybrid zone between two species of mice. Evolution 46: 1146-1163.

Vanlerberghe, F., Boursot, P., Nielsen, J.T., Bonhomme, F. 1988. A steep cline for mitochondrial DNA in Danish mice. Genet. Res. 52: 185-193.

Vanlerberghe, F., Dod, B., Boursot, P., Bellis, M., Bonhomme, F. 1986. Absence of Y-chromosome introgression across the hybrid zone between *Mus musculus domesticus* and *Mus musculus musculus*. Genet. Res. 48: 191-197.

Věžník, Z., Švecová, D., Zajícová, A., Přinosilová, P., Rubeš, J., Rybář, R., Vozdová, M., Machatková, M., Horáková, J. 2004. Repetitorium spermatologie a andrologie a metodiky spermatoanalýzy. Výzkumný ústav veterinálního lékařství, Brno.

Vošlajerová Bímová, B., Macholán, M., Baird, S.J.E., Munclinger, P., Dufková, P., Laukaitis, C.M., Karn, R.C., Luzynski, K., Tucker, P.K., Piálek, J. 2011. Reinforcement selection acting on the European house mouse hybrid zone. Molecular Ecology, doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05106.x.

Vyskočilová, M., Pražanová, G., Piálek, J. 2009. Polymorphism in hybrid male sterility in wild-derived *Mus musculus musculus* strains on proximal chromosome 17. Mamm. Genome 20: 83-91.

Vyskočilová, M., Trachtulec, Z., Forejt, J., Piálek, J. 2005. Does geography matter in hybrid sterility in house mice? Biol. J. Linn. Soc. 84: 663-674.

Wang L, Luzynski K, Pool J.E., Janoušek V., Dufková P., Mrkvicová Vyskočilová M., Teeter K.C., Nachman M.W., Munclinger P., Macholán M., Piálek J., Tucker P.K. Measures of linkage disequilibrium among neighboring SNPs indicate asymmetries across the house mouse hybrid zone. Mol. Ecol., in press.

Wang, P.J., McCarrey, J.R., Yang, F. & Page, D.C. 2001. An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. Nat. Genet**.** 27: 422-426.

White, M.J.D. 1978. *Modes of Speciation*. Freeman, San Francisco

Yang, H., Ding, Y.M., Hutchins, L.N., Szatkiewicz, J., Bell, T.A., Paigen, B.J., Graber, J.H., Pardo-Manuel de Villena, F., Churchill, G.A. 2009. A customized and versatile high-density genotyping array for the mouse. Nature Meth. 6: 663 – 666.

Zima J., Gaichenko, V.A., Macholán, M., Radjabli, S.I., Sablina, O.V., Wójik, J.M. 1990. Are Robertsonian variations a frequent phenomenon in mouse population in Eurasia? Biol. J. Linn. Soc. 41: 229-233.

Zima, J., **Macholán, M.** 1989. Robertsonian fusion 5.12 in a population of *Mus musculus musculus*. Folia Zool. 38: 233-238.

8. Seznam doporučené literatury

1. **Coyne, J. A.,** and **H. A. Orr**. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Suenderland, Massachusetts.
2. **Mayr, E**. 1942. *Systematics and the Origin of Species*. Columbia Univ. Press, New York
3. **Mayr, E**. 1963. *Animal Species and Evolution*. Harvard Univ. Press, Cambridge
4. **Coyne, J. A.,** and **H. A. Orr.** 1989. Two rules of speciation. In: Otte, D., Endler, J., eds. *Speciation and its Consequences*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, pp. 180-207.
5. **Mayr, E.** 1970. *Populations, Species and Evolution*. Harvard Univ. Press, Cambridge.
6. **Johnson, N. A.** and **R. M. Kliman**. 2002. Hidden evolution: progress and limitations in detecting multifarious natural selection. Genetica 114: 281-291.
7. **Coyne, J.A. & Orr, H.A.** 1998. The evolutionary genetics of speciation. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **353**: 287-305.
8. **White, M. J. D**. 1978. *Modes of Speciation*. Freeman, San Francisco.
9. **King, M.** 1993. *Species Evolution. The Role of Chromosome Change*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.